

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία>>
Ειδίκευση: Χημεία Τροφίμων και Διατροφής

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ
ΝΕΜΕΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

ΦΩΤΙΟΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΖΑΡΚΑΔΟΥΛΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ. ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ

ΑΘΗΝΑ

Φεβρουάριος 2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία>>
Ειδίκευση: Χημεία Τροφίμων και Διατροφής

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ
ΝΕΜΕΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

ΦΩΤΙΟΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΖΑΡΚΑΔΟΥΛΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ. ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ

ΑΘΗΝΑ

Φεβρουάριος 2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία>>
Ειδίκευση: Χημεία Τροφίμων και Διατροφής

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ
ΝΕΜΕΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

ΦΩΤΙΟΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΖΑΡΚΑΔΟΥΛΑΣ

Τριμελής επιτροπή:

Ταραντίλης Πέτρος, Υπεύθυνος Εργαστηρίου Γενικής Χημείας

Παππάς Χρήστος, Καθηγητής, Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Γαρδέλη Χρυσσαυγή, Επίκουρη καθηγήτρια, Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης τροφίμων

ΑΘΗΝΑ

Φεβρουάριος 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής ερευνητικής μου μελέτης, κλείνει και ο κύκλος των πανεπιστημιακών μου σπουδών. Ήταν ένα πανέμορφο ταξίδι και η εργασία αυτή αποτελεί ένα πανέμορφο επίλογο που δημιουργήθηκε με κόπο, διάβασμα και πολλές ώρες στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου μελέτης, τον δρ Πέτρο Ταραντίλη, που με δέχτηκε και με εμπιστεύτηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας και με βοηθούσε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής και συγγραφής της μελέτης.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου ξεχωριστά για την άριστη φιλοξενία και τη πολύτιμη βοήθειά τους, τον Δρ Χρήστο Παππά, Δρ Δήμητρα Δαφερέρα, Δρ Χαράλαμπο Κανάκη, Δρ Ελένη Κακούρη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευτυχία Βλάχου που πραγματοποιεί το διδακτορικό της στο εργαστήριο γενικής χημείας και με βοηθούσε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος.

Περίληψη

Φώτης Ζαρκαδούλας

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ ΝΕΜΕΑΣ.

Φεβρουάριος 2024

Η ποικιλία Αγιωργίτικο καλλιεργείται σε διαφόρων ειδών εδάφη, αργιλώδη, αργιλοπηλώδη, αμμοαργιλώδη, όπως είναι τα περισσότερα εδάφη της Νεμέας. Υπολλείματα από τη παραγωγή οίνου περιλαμβάνουν γίγαρτα, μίσχους, στέμφυλα. Η χρήση και η αξιοποίηση τους έχει βοηθήσει τόσο την φαρμακοβιομηχανία, όσο και τη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων. Η παρακάτω μελέτη αφορά την μελέτη και προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών με τη δοκιμή Folin Ciocalteu για στέμφυλα της ερυθράς ποικιλίας Αγιωργίτικο. Επίσης, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των στέμφυλων με τις δοκιμές ABTS και DPPH. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε αλλάζοντας διάφορες μεταβλητές όπως είναι η αναλογία διαλύτη-νερού, η αναλογία στερεού-υγρού αλλά και ο χρόνος εκχύλισης. Τα περισσότερα φαινολικά συστατικά και η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, τόσο στην παρακάτω μελέτη αλλά και όσο σε σύγκριση με τη βιβλιογραφία, παραλαμβάνονται όταν η αναλογία μεθανόλης-νερού είναι 80-20%. Έτσι, μπορεί να δημιουργηθεί ένα συμπέρασμα που αφορά την ιδανικότερη αναλογία διαλύτη-νερού στην εκχύλιση, την ιδανικότερη δοκιμή που θα δείξει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, αλλά και θα επαληθευτεί η αναλογική σχέση μεταξύ φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικής δράσης.

Abstract

Fotis Zarkadoulas

STUDY AND DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN GRAPES OF THE VARIETY AGIORGITIKO NEMEA.

February 2024

The Agiorgitiko variety is cultivated in various types of soil, clayey, loamy, sandy, shale as are most of Nemea. By products from wine production include lees, stems, pips. Their use and exploitation has helped both the pharmaceutical industry, as well as agriculture and the food industry. The following study concerns the study and determination of total phenolics with the Folin Ciocalteu reagent for grapes of red variety Agiorgitiko. Also, the antioxidant activity of the stems with ABTS and DPPH reagents was studied. The extraction was carried out by changing various variables such as the solvent-water ratio, the solid-liquid ratio and the extraction time. Most phenolics both in the study below and compared to the literature, occur when the methanol-water ratio was 80-20%. Thus, a conclusion can be made regarding the most ideal solvent-water ratio in the extraction, the most ideal test that will show the greatest antioxidant activity, but also verify the proportional relationship between phenolic substances and antioxidant activity.

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..... | 4 |
| Περίληψη..... | 5 |
| Abstract..... | 6 |
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 9 |
| Η ιστορία της αμπέλου..... | 9 |
| Το αμπέλι στην Ελλάδα και στον κόσμο | 10 |
| Ποικιλία Αγιωργίτικο Νεμέας..... | 12 |
| Γενικά και βοτανικά χαρακτηριστικά..... | 12 |
| Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά | 14 |
| Παραπροϊόντα παραγωγής οίνου και στέμφυλα..... | 15 |
| Νομοθετικό πλαίσιο στεμφύλων..... | 17 |
| Φαινολικές ενώσεις στέμφυλων | 18 |
| Γενικά χαρακτηριστικά..... | 18 |
| Μη φλαβονοειδείς φαινόλες..... | 20 |
| Φλαβονοειδείς φαινόλες..... | 21 |
| Φλαβονόλες | 21 |
| Φλαβανόνες | 22 |
| Τανίνες..... | 22 |
| Ανθοκυάνες..... | 23 |
| Φαινολικές ενώσεις στεμφύλων Αγιωργίτικου..... | 24 |
| Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων | 25 |
| Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu ... | 26 |
| Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH..... | 26 |
| Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή ABTS | 27 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 28 |
| Σκοπός | 28 |
| Υλικά και μέθοδοι | 29 |
| Φωτογραφικό υλικό της διαδικασίας εκχύλισης δείγματος..... | 30 |
| Πειραματική διαδικασία | 35 |
| Αποτελέσματα..... | 39 |
| Ολικά φαινολικά συστατικά με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu..... | 39 |
| Αντιοξειδωτική δράση με το αντιδραστήριο DPPH | 41 |

| | |
|---|----|
| Αποτελέσματα IC50..... | 42 |
| Αντιοξειδωτική δράση με το αντιδραστήριο ABTS:..... | 43 |
| Αποτελέσματα IC50..... | 45 |
| Φωτογραφικό υλικό Runsmε διαφορετικό τρόπο εκχύλισης..... | 47 |
| Σύγκριση με βιβλιογραφία και συμπεράσματα | 55 |
| Βιβλιογραφία..... | 58 |

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η ιστορία της αμπέλου

Η άμπελος ή οиноφόρος (*Vitis Vinifera* L.) αποτελεί το μοναδικό ευρασιατικό είδος του γένους *Vitistis* οικογένειας των Αμπελιδών (*Vitaceae*). Όπως συνηγορούν τα απολιθώματα σε αρκετές περιοχές της Ευρώπης, της ανατολικής Μεσογείου και της δυτικής Ασίας, το είδος αυτό εμφανίσθηκε προς το τέλος της τριτογενούς γεωλογικής περιόδου. Κατά την περίοδο των παγετώνων, η άμπελος αναζήτησε καταφύγιο είτε στις παραμεσόγειες δασώδεις εκτάσεις είτε στην ευρύτερη περιοχή του Καυκάσου, μεταξύ της Μαύρης και της Κασπίας θάλασσας (Σταυρακάκης 2013).

Η καλλιέργεια της αμπέλου στον ευρύτερο ελλαδικό χώρο της αρχαιότητας μεταφέρθηκε, από την Αίγυπτο μέσω της μινωικής Κρήτης (3000-2800 π.Χ.). Στην ελληνική μυθολογία, η άμπελος και ο οίνος συνδέονται με τον Διόνυσο, γιό του Δία και της Σεμέλης, και ο βλαστός της αμπέλου αποτελεί ενσάρκωση του θεού. Η καλλιέργεια της αμπέλου στην αρχαία Ελλάδα γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη. Η άνθηση του μινωικού πολιτισμού συνέβαλε όχι μόνο στην περαιτέρω διάδοση και εξάπλωση της αμπέλου στην υπόλοιπη Ελλάδα, αλλά και στη σημαντική βελτίωση της αμπελοκομικής τεχνικής και της οινοποίησης. Η Νάξος, αποτελεί ίσως τον ενδιάμεσο σταθμό στο ταξίδι της αμπέλου στην ηπειρωτική Ελλάδα. Στα χρόνια που ακολούθησαν, η καλλιέργεια της αμπέλου διαδόθηκε σε ολόκληρη την χερσόνησο και η τεχνική της έφτασε σε τέτοιο επίπεδο, ώστε δίκαια να θεωρείται ότι η Αμπελουργία γεννήθηκε ως εμπειρική τέχνη στην αρχαία Ελλάδα (Σταυρακάκης 2013, Καρίμαλη 2018).

Η μελέτη της διαχρονικής παρουσίας της αμπέλου στον ελλαδικό χώρο αποκαλύπτει την τεράστια συμβολή της αμπελοκαλλιέργειας στην οικονομική, πολιτισμική, κοινωνική ανάπτυξη και στην πρόοδο και τη διαμόρφωση του κάλλους και της αισθητικής του αγροτικού τοπίου των μικρών και μεγάλων ελληνικών νησιών, των ορεινών και ημιορεινών περιοχών.

Το φυτό της αμπέλου προσαρμόσθηκε και εγκλιματίσθηκε αξιοποιώντας με τον καλύτερο τρόπο, μεταξύ όλων των καλλιεργούμενων φυτών, τις ξηροθερμικές νησιωτικές περιοχές και τα φτωχά εδάφη των ορεινών και ημιορεινών περιοχών της χώρας. Εκεί δηλαδή όπου τα εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα θεωρούνται προβληματικά ή ακατάλληλα για την πλειονότητα των καλλιεργούμενων φυτών, η άμπελος, με την κατάλληλη καλλιεργητική τεχνική, όχι μόνο επιβιώνει αλλά και παράγει αμπελουργικά προϊόντα υψηλής ποιότητας (Ζαχαριά 2009).

Οι μορφολογικές και φυσιολογικές ιδιαιτερότητες των ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στις διάφορες εδαφοκλιματικές περιοχές, ώθησαν τους Έλληνες αμπελουργούς να αναπτύξουν δεξιότητες, να ακονίσουν το νου και τη φαντασία ώστε να καταστήσουν εκλεκτούς αμπελότοπους τις μάλλον αφιλόξενες πλαγιές των λόφων και των ορεινών περιοχών.

Τα επιμέρους στοιχεία των αμπελώνων, ιδιαίτερα οι πεζούλες στις πλαγιές, οι <<αμπελιές>> και οι <<απλωταροές>> στις ξηροθερμικές συνθήκες των κυκλαδίτικων νησιών, πέραν της συμβολής τους στην αισθητική του τοπίου και την παραγωγή εξαιρετικά ποιοτικών προϊόντων, αποτελούν και σαφή δείγματα ορθής γεωργικής και περιβαλλοντικής πρακτικής, πρακτική η οποία διαμόρφωσε το ελληνικό πρότυπο αμπελουργίας και θεμελίωσε την ευρωπαϊκή και παγκόσμια αμπελουργία. Η προσαρμογή της αμπέλου στις πλαγιές των λόφων ή των βουνών ήταν γνωστή από την αρχαιότητα για την παραγωγή άριστης ποιότητας αμπελουργικών προϊόντων, ενώ η ίδια η άμπελος, ήδη από τότε, θεωρούνταν ένα από τα κυριότερα καλλιεργούμενα φυτά που προστατεύουν από τη διάβρωση τα, ούτως ή άλλως, φτωχά εδάφη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η προστασία των επικλινών εδαφών στους αμπελώνες των ορεινών και ημιορεινών περιοχών, όπου ο αμπελουργός άφησε ανεξίτηλα τα ίχνη του ανά τους αιώνες (DiLorenzo 2019).



Εικόνα 1: Αμπελος.

Το αμπέλι στην Ελλάδα και στον κόσμο

Οι ποικιλίες των ειδών και του γένους *Vitis* κατατάσσονται σε κατηγορίες με κριτήριο τη χρήση για την οποία προορίζεται η παραγωγή. Έτσι, υπάρχουν ποικιλίες οινοποιίας, σταφιδοποιίας, για τη παραγωγή χυμού σταφυλής, για τη παραγωγή σταφυλών προς κονσερβοποίηση και υπάρχουν ποικιλίες, είδη και υβρίδια για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού ανθεκτικού στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας (Καρίμαλη 2018, Ζαχαριά 2009).

Οι πέντε πρώτες ομάδες αφορούν κατά κύριο λόγο ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου (*V. vinifera*) και δευτερευόντως είδη της αμερικανικής αμπέλου (π.χ. *V. labrusca*). Στην έκτη κατηγορία περιλαμβάνονται ποικιλίες, είδη και υβρίδια της Β. Αμερικής από τα οποία λαμβάνονται τα υποκείμενα που εμβολιάζονται με τις ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου. Η κατάταξη αυτών των ποικιλιών δεν είναι απόλυτη, με την έννοια ότι μία ποικιλία είναι κατάλληλη για παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων ποιότητας όλων των κατηγοριών. Επίσης, ορισμένες ποικιλίες οινοποιίας, υπό ορισμένες συνθήκες ενδέχεται να παραγάγουν σταφυλές κατάλληλες για την παραγωγή διαφόρων τύπων οινών (Esther Gomez-Mejía 2022).

Όπως και στις λοιπές αμπελουργικές χώρες, στον ελληνικό αμπελώνα καλλιεργούνται οι γηγενείς ποικιλίες, καθώς και αρκετές ξενικής προέλευσης. Από τις ελληνικές ποικιλίες που συνιστώνται σε κάθε αμπελουργικό διαμέρισμα της χώρας ξεχωρίζουν το Αγιωργίτικο, το Ξινόμαυρο, το Μοσχοφίλερο, ο Ροδίτης, η Μαυροδάφνη, το Κοτσιφάλι, το Λιάτικο, το Λημνιό, η Μανδηλαριά, το Ασύρτικο, το Αθήρι, το Σαββατιανό, η Ρομπόλα κ.ά.

Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί η ποικιλία Σουλτανίνα, που είναι πολλαπλής χρήσης. Στην Ελλάδα αρχικά καλλιεργήθηκε με σκοπό την παραγωγή της ξανθιάς σταφίδας που με τη μαύρη κορινθιακή αποτέλεσαν τις κύριες ποικιλίες σε παγκόσμιο επίπεδο. Ακολούθως, στα τέλη της δεκαετίας του 1950, με την εφαρμογή των φυτορρυθμιστικών ουσιών για την αύξηση του μεγέθους των ραγών, η παραγωγή των σταφυλών κατευθύνθηκε σε μεγάλο ποσοστό για επιτραπέζια χρήση. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι το 2010 η παραγωγή σταφυλών Σουλτανίνας ήταν μεγαλύτερη από το σύνολο της παραγωγής όλων των άλλων επιτραπέζιων ποικιλιών. Σημαντικό πάντως μέρος της παραγωγής προορίζεται για την παραγωγή οίνων, ενώ αποτελεί την κύρια ποικιλία για την παραγωγή κονσέρβας σταφυλής. Τα τελευταία χρόνια, σημαντικός αριθμός ελληνικών ποικιλιών έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των αμπελουργών και των οινοποιών, χάρη στον πολύ καλό ποιοτικό τους χαρακτήρα. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι λευκές ποικιλίες Βιδιανό, Κυδωνίτσα και οι έγχρωμες Λημνιάνα, Αυγουστάτης, Κολλιανάτικο κ.ά. (Nevena Dabetic 2022).

Από τις ξενικές ποικιλίες, κυρίαρχη θέση στον ελληνικό αμπελώνα κατέχουν οι Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Ugniblan, Μοσχάτο Αμβούργου, ενώ, σε μικρότερες εκτάσεις, από τις ποικιλίες οινοποιίας καλλιεργούνται ακόμη οι Grenache, Carignan, Mourverde και Pinot noir.

Ποικιλία Αγιωργίτικο Νεμέας

Γενικά και βοτανικά χαρακτηριστικά

Από τις ευγενέστερες ερυθρές ελληνικές ποικιλίες, καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια στην ευρύτερη περιοχή της Νεμέας(27.000 στρ. περίπου), όπου κατά μια εκδοχή παράγονταν κατά την αρχαιότητα ο περίφημος ερυθρός οίνος, ο φλίαςος.

Η ποικιλία Αγιωργίτικο είναι γνωστή και ως Μαύρο Νεμέας ή Μαρούδι. Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής ερυθρών οίνων <<Νεμέα>> είναι η μεγαλύτερη στην Ελλάδα και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια εδαφικών και κλιματικών συνθηκών(υψόμετρο 250-850μ.) λόγω της μεγάλης έκτασης της. Η καλλιέργεια της ποικιλίας Αγιωργίτικο συνίσταται(σύμφωνα με την 3360045/16/11/2007 ΦΕΚ 2255/Β/26.11.07 απόφαση του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για την ταξινόμηση των ποικιλιών αμπέλου) για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου, για τις Ν.Α. Αττικής, Πειραιώς, τους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας και Ευβοίας και επιτρέπεται στους νομούς Δράμας, Πέλλας, Πιερίας και Φλώρινας(KonradV. Miller 2019). Στην ποικιλία Αγιωργίτικο Νεμέας, η κορυφή της νεαρής βλάστησης είναι μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, κιτρινοπράσινη, χνοώδης, κατά τόπους βαμβακώδης, με ρόδινη παρυφή. Τα νεαρά φύλλα είναι πράσινα, χνοώδη- βαμβακώδη, στην κάτω επιφάνεια στίλπνά, με μικρές ροδόχρες και ορειχάλκινες περιοχές, μεταξύδη στην άνω επιφάνεια του ελάσματος. Ο ποώδης βλαστός είναι οριζόντιος, πράσινος έως κιτρινοπράσινος στην κοιλιακή πλευρά, πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις στην νωτιαία πλευρά. Οι οφθαλμοί είναι πράσινοι με ερυθρές περιοχές. Το ανεπτυγμένο φύλλο είναι μέτριο έως μεγάλο, σφηνοειδές, πεντάκολπο. Το έλασμα είναι κυματοειδές, ελαφρώς πομφολυγώδες, παχύ, με αναδιπλώσεις κατά μήκος των κύριων νευρώσεων, βαθυπράσινο, και λείο στην άνω επιφάνεια, φαιοπράσινο και χνοώδες στην κάτω επιφάνεια. Ο μισχικός κόλπος είναι κλειστός, σχήματος V, με επικαλυπτόμενους λοβούς. Κατώτεροι κόλποι μέτριου βάθους, με συγκλίνοντα χείλη, σχήματος U ή V. Νευρώσεις κιτρινοπράσινες, χνοώδεις στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος. Οι έλικες είναι διαλείπουσες, λείες, πράσινες δισχιδείς και πολυσχιδείς, μέτριου έως μεγάλου μήκους. Η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική ή κυλινδροκωνική, συχνά διπλή, πυκνή έως πολύ πυκνή. Ο ποδίσκος είναι βραχύς έως μέτριος που κατά κανόνα ξυλοποιείται πλήρως, δυσχερούς αποκοπής. Η ράγα είναι μικρή έως μέτρια, σφαιρική, ενίοτε ωοειδής. Ο φλοιός μετρίως παχύς έως πολύ παχύς, μετρίως ανθεκτικός, πλούσιος σε ανθοκυανίνες, καλυμμένος με άφθονη ανθηρότητα. Σάρκα χυμώδης, γλυκιά έως ελαφρώς υπόξινη, μετρίως μαλακή. Συνήθως 2-3 γίγαρτα ανά ράγα. Η κληματίδα ερυθροκαστανή με φακίδια, κυκλικής έως ελλειψοειδούς τομής, γωνιώδης και λεία(Σταυρακάκης 2013).

Έναρξη βλάστησης στα τέλη του 3^{ου} δεκαημέρου του Μαρτίου. Η πλήρης βλάστηση πραγματοποιείται τις αρχές του 3^{ου} δεκαημέρου του Απριλίου. Το

διάστημα της έναρξης μέχρι τη πλήρη άνοιξη βρίσκεται στο 2^ο δεκαήμερο του Μάιου. Η έναρξη της ωρίμανσης πραγματοποιείται στα τέλη του 3^{ου} δεκαημέρου και Ιουλίου. Η πλήρης ωρίμανση πραγματοποιείται το 3^ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου.



Εικόνα 2: Σταφυλή και φύλλο αμπέλου.

Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Η ποικιλία είναι ζωηρή έως μετρίως ζωηρή, είναι αρκετά παραγωγική αλλά και όψιμης ωρίμανσης. Ο καρποφόρος βλαστός με δύο σταφυλές στον 4^ο και 5^ο κόμβο, πολλές φορές όμως εμφανίζονται 3-4 σταφυλές από το 2^ο έως τον 6^ο κόμβο. Επίσης, ο τυφλός οφθαλμός συνήθως είναι γόνιμος.

Η μόρφωση, συνήθως στους πιο παλιούς αμπελώνες είναι σε μορφή κυπέλλου, με 3-5 βραχίονες και κλάδεμα βραχύ. Σε αυτές τις συνθήκες, η παραγωγή κυμαίνεται ανά στρέμμα μέσα στα πλαίσια που θέτει η νομοθεσία. Τα γραμμικά σχήματα εμφανίζονται συνήθως στα πιο νέα πρέμνα. Το κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ και οι αποδόσεις ανά στρέμμα αυξάνονται σημαντικά, χωρίς όμως να παρατηρείται, τις περισσότερες φορές, μείωση της ποιότητας των προϊόντων οινοποίησης.

Για αύξηση της παραγωγής, χωρίς την ταυτόχρονη μείωση της ποιότητας, συνίσταται η αύξηση του αριθμού των πρέμνων ανά στρέμμα. Ο έντονος πολυμορφισμός των εδαφικών συνθηκών, αλλά και των κλιματικών παραγόντων που συμβάλλουν στη δημιουργία μεγάλου αριθμού μικροκλιματικών περιοχών, διαφοροποιούν τη ποιότητα και την μορφή των παραγόμενων προϊόντων.

Η ποικιλία Αγιωργίτικο καλλιεργείται σε διάφορων ειδών εδάφη, αργιλώδη, αργιλοπηλώδη, αμμοαργιλώδη, μαργώδη, σχιστολιθικά, όπως είναι τα περισσότερα εδάφη της Νεμέας. Υψηλή ποιότητα προϊόντων δίνει σε λοφώδεις περιοχές, σε χαλικώδη, μέσης σύστασης, γόνιμα εδάφη, στις οποίες η ευρωστία των πρέμνων είναι κανονική και η πορεία της θερμοκρασίας συμβάλλει στην ωρίμανση του φορτίου με βραδύ ρυθμό.

Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στο ωίδιο και τις ιώσεις, κυρίως στον μολυσματικό εκφυλισμό, και μέτρια ευαισθησία στον περονόσπορο. Είναι επίσης ευαίσθητη στην ξηρασία και στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και τον ανοιξιάτικο παγετό. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην άρδευση, ώστε να αποφευχθεί η έντονη υδατική καταπόνηση αλλά να διατηρηθούν τα πρέμνα σε κατάσταση πολύ ήπιας καταπόνησης, η οποία συμβάλλει στη βελτίωση των φυσιολογικών λειτουργιών. Ανάλογη προσοχή απαιτείται σε αμπελώνες με βαριά, αργιλώδη, συνεκτικά εδάφη, ώστε με τους κατάλληλους χειρισμούς να αμβλυνθούν οι αρνητικές επιπτώσεις από την υπερβολική υγρασία. Την Άνοιξη, σε πρέμνα υψηλής ζωηρότητας, παρατηρούνται προβλήματα στην άνθηση, τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση, με αποτέλεσμα τη μικρορραγία και τη παρουσία μικρών, πράσινων, αγίγαρτων ραγών. Τα προβλήματα αυτά εντείνονται όταν παρατηρείται σημαντική αυξομείωση της θερμοκρασίας, αλλά πιθανόν να συνδέονται με την τροφοπενία μολυβδαινίου (Κυραλέου 2013).

Το γλεύκος χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (220-240g/L), χαμηλή οξύτητα (4,4-6,4g/L τρυγικό οξύ) και έχει PH3,4-3,8. Από τις

πλουσιότερες ελληνικές ποικιλίες αμπέλου σε ανθοκυανίνες (900-1000mg/Kg ραγών) και ολικές φαινόλες (2400-2500 mg/Kg ραγών). Οι τιμές αυτές επηρεάζονται έντονα από τον κλώνο, την εφαρμοζόμενη καλλιεργητική τεχνική και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Οι οίνοι που παράγονται από την ποικιλία Αγιωργίτικο χαρακτηρίζονται από πλούσιο, βαθύ ερυθρό χρώμα με ιώδες αποχρώσεις και έχουν ικανότητα παλαίωσης. Μετά την παλαίωση αποκτούν άρωμα και σώμα.

Παραπροϊόντα παραγωγής οίνου και στέμφυλα

Τα υπολείμματα από την παραγωγή οίνου περιλαμβάνουν μεταξύ των άλλων, κλαδέματα αμπέλου, μίσχους σταφυλών, στέμφυλα, γίγαρτα σταφυλών και ελαίων αυτών, οινολάσπη, μαγιά, τρυγικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα κ.ά. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα υποπροϊόντα αυτά, προκαλούν πολλές φορές φυτοτοξικότητα σε καλλιέργειες και σε υδροβιότοπους.



Εικόνα 3: Στέμφυλα.

Ανάλογα με τη προέλευσή τους, τα υπολείμματα αυτά, έχουν διαφορετική χημική σύσταση και είναι πλούσια σε μακροσυστατικά και φαινολικά συστατικά και χαμηλό ποσοστό μικροσυστατικών και βαρέων μετάλλων. Η μέχρι τώρα κατεργασία των παραπροϊόντων αυτών, έχει βοηθήσει στη παραγωγή χρήσιμων ουσιών όχι μόνο για τη φαρμακοβιομηχανία αλλά και για τη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων (Mădălina UGA 2017).

Εξαιτίας της διαφορετικής διαδικασίας οينوποίησης τα μεν λευκά εξέρχονται της οينوποιητικής διαδικασίας σύσσωμα, προτού αρχίζει η ζύμωση, τα δε ερυθρά διαχωρίζονται και εξέρχονται σε δύο στάδια. Αρχικά, προτού την έκθλιψη, απομακρύνονται οι βόστρυχοι ενώ φλοιοί και γίγαρτα απομακρύνονται αργότερα. Η βιομάζα που προκύπτει περιέχει πλήθος συστατικών όπως πρωτεΐνες, άζωτο, φώσφορο, αιθυλική αλκοόλη, άλατα τρυγικού οξέος, γιγαρτέλαιο, ανθοκυανίνες, πολυφαινόλες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορες χρήσεις.

Κάποιες από τις χρήσεις αυτές είναι, αυτούσια η βιομάζα ως λίπασμα, ως λίπασμα μετά από χώνεψη, ως καύσιμο μετά από ξήρανση, για παραγωγή

τσίπουρου, για ανάκτηση αλάτων τρυγικού οξέος, για παραγωγή γιγαρτέλαιου με εκχύλιση, για παραγωγή εκχυλισμάτων σταφυλής.

Ένα προϊόν που χρησιμοποιείται επί πολλά χρόνια, είναι οι ανθοκυάνη, μια φυσική ερυθρά χρωστική. Όμως, τα τελευταία χρόνια, λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ομάδας ενώσεων, ευρισκόμενες στο σταφύλι, οι πολυφαινόλες, αλλά και την ολοένα αυξανόμενη ζήτηση φυσικών προϊόντων διαβίωσης, πολλές βιομηχανίες στρέφονται στη παραγωγή εκχυλισμάτων πλούσιων σε αυτές τις ενώσεις. Τα εκχυλίσματα αυτά κυκλοφορούν στην αγορά συνήθως υπό μορφή σκόνης, σε τιμή που εξαρτάται από τη συγκέντρωση πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Τα τελικά προϊόντα μπορεί να είναι κρέμες, σαπούνια, κ.α.

Οι πολυφαινόλες, ενώσεις που απαντώνται σε φυτά και λαχανικά στη φύση και αποτελούν βασικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής, παράγονται σε μεγάλο βαθμό από τα στέμφυλα. Το 2003 η συνολική αγορά πολυφαινολών ανήλθε στα 100 εκατομμύρια ευρώ, με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες να τοποθετούν τις φλαβονόλες και τις ανθοκυάνες των κόκκινων σταφυλιών στην κορυφή της επέκτασης της αγοράς.

Ένα άλλο προϊόν που παράγεται από τα γίγαρτα των στεμφύλων είναι το γιγαρτέλαιο. Αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εδωδιμο προϊόν ή ως συμπλήρωμα διατροφής, ενώ βρίσκει εφαρμογές σε βιομηχανίες παραγωγής βαφών, καλλυντικών, σαπουνιών. Θεωρείται εξαιρετικό για σωτάρισμα στη μαγειρική λόγω του χαμηλού ιζούδου του.

Ο κύριος όγκος στεμφύλων, που προέρχεται από τα μεγάλα οινοποιεία, συνήθως διατίθεται ως ζωοτροφή ή οργανικό λίπασμα.

Τα στέμφυλα είναι πλούσια σε φλαβονοειδή. Η αντιοξειδωτική δράση αυτών έχει δοκιμαστεί σε διάφορα τρόφιμα. Οι 3,4-διυδροξυλαχαλκόνες, μπουτεΐνη και οκανίνη βρέθηκε ότι είναι κατάλληλα αντιοξειδωτικά για το χοίρειο λίπος. Η διυδροκερσεΐνη φαίνεται αποτελεσματική στη συντήρηση του χοίρειου λίπους, του βαμβακελαίου και του βουτύρου. Η κερκεΐνη έδειξε καλά αντιοξειδωτικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε στη μαγειρική σε σκόνη γάλακτος. Εστέρες του καφεϊκού οξέος συντελούν στη συντήρηση του αραβοσιτελαίου.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών στη διατροφή παραγωγικών ζώων καθώς και στη προσθήκη τους στο κρέας και τα προϊόντα του. Στόχος είναι να ενισχυθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα είτε μέσω του ίδιου του ζώου είτε στα παραγόμενα προϊόντα με ενίσχυση της διάρκειας συντήρησης αυτών. Παράλληλα, στόχος είναι να ενισχυθεί το άρωμα, η γεύση, το χρώμα, η σύσταση, η θρεπτική αξία και συγχρόνως να παρέχουν στον οργανισμό αντιοξειδωτική προστασία απέναντι στις βλαβερές συνέπειες της παρουσίας των ελευθέρων ριζών.

Το εκχύλισμα από τα στέμφυλα έχει αποδειχθεί ότι αντιοξειδωτικές ιδιότητες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* σε πολλά είδη κρεάτων. Συμπληρώματα διατροφής με αντιοξειδωτικά έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τη βιταμίνη E στους μυς

βελτιώνοντας έτσι την αντιοξειδωτική σταθερότητα. Επίσης, η προσθήκη διάφορων αιθέριων ελαίων, μπορεί να βελτιώσει την οξειδωτική σταθερότητα του κρέατος των πουλερικών. Η χρήση των στέμφυλων σε συμπληρώματα διατροφής πουλερικών και χοίρων γίνεται είτε με τη μορφή αποξηραμένης σκόνης είτε με τη μορφή εκχυλισμάτων.

Παρά τα οφέλη της χρήσης εκχυλισμάτων στεμφύλων στην ενίσχυση της ασφάλειας της ποιότητας των τροφίμων, υπάρχουν ακόμα επιφυλάξεις σχετικά με τα αποτελέσματα, όταν λαμβάνεται ως διαιτητικό συμπλήρωμα. Περισσότερη έρευνα απαιτείται για να αξιολογηθούν τα θετικά αποτελέσματα. Ο βαθμός πολυμερισμού από τις προκυανιδίνες μπορεί να προσδιορίσει την αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι μεγαλύτερη όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός πολυμερισμού. Μεταξύ των τμημάτων του καρπού του σταφυλιού, τα γίγαρτα εμφανίζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ακολουθεί η επιδερμίδα και η σάρκα. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια διαδικασία η οποία έχει σημαντικές συνέπειες για τη βιομηχανία τροφίμων διότι μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητα των τροφίμων όπως είναι η τάγγιση, η γεύση και η οσμή του προϊόντος. Η οξειδωτική σταθερότητα στα ζωικά προϊόντα θεωρείται απαραίτητη για τη συντήρησή τους και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται τα αντιοξειδωτικά στις βιομηχανίες τροφίμων, που προστίθενται μέσα στη τροφή ή απευθείας στα τρόφιμα.

Νομοθετικό πλαίσιο στεμφύλων

Όσον αφορά τη νομοθεσία για τα υπολείμματα (υποπροϊόντα) οινοποίησης, οι κανονισμοί της Ε.Ε 1493/99 και 1623/2000 καθορίζουν τις ελάχιστες τιμές των προϊόντων αυτών στην αγορά. Η κατώτερη τιμή αφορά τα 0,995 ευρώ ανά αλκοολικό βαθμό σε εκατό κιλά στέμφυλα ή οινολάσπη. Με στόχο να διατηρηθούν τα έξοδα απόσταξης σε λογικά πλαίσια, από το άρθρο 46 ο κανονισμός 1623/2000 της Ε.Ε ορίζει τις ελάχιστες περιεκτικότητες υποπροϊόντων σε αιθυλική αλκοόλη. Συγκεκριμένα, η αντιστοιχία είναι 2 με 2,8 λίτρα αιθυλικής αλκοόλης για 100 κιλά στεμφύλων και 3-4 λίτρα αιθυλικής αλκοόλης για 100 κιλά οινολασπών.

Στη περίπτωση όπου στη περιοχή όπου βρίσκεται το οινοποιείο, δεν υπάρχουν οι κατάλληλες εγκαταστάσεις για την περαιτέρω κατεργασία αλλά και παραλαβή των υποπροϊόντων, ενώ και τα έξοδα μεταφοράς είναι υψηλά, δίνεται το δικαίωμα στον οινοποιό να αποσύρει τα προϊόντα από την αγορά υπό την επίβλεψη και έλεγχο της τοπικής διεύθυνσης γεωργίας.

Αυτά τα προϊόντα, που αποσύρθηκαν από την αγορά, μπορούν να διατεθούν σαν ζωοτροφή ή για τη παραγωγή λιπάσματος βελτιωτικού εδάφους. Σε αυτά, η ελάχιστη περιεκτικότητα σε αιθανόλη είναι 3 λίτρα σε 100 κιλά στέμφυλα ή 5 λίτρα αλκοόλης σε 100 κιλά οινολάσπης. Στην περίπτωση όπου δεν καλύπτεται το όριο του 10% της αιθυλικής αλκοόλης που περιέχεται στην συνολική παραγωγή οινικών προϊόντων της χρονιάς, ο οινοπαραγωγός είναι

υποχρεωμένος να παραδώσει οίνο για απόσταξη έως ότου συμπληρωθεί το 10%.

Ο οινοπνευματοποιός που παραλαμβάνει αλλά και επεξεργάζεται τα υποπροϊόντα οινοποίησης ενισχύεται οικονομικά από την Ευρωπαϊκή Ένωση σύμφωνα με το άρθρο 48 του Κανονισμού 1623/2000 της Ε.Ε. Ανάλογα με το παραγόμενο υποπροϊόν, η καταβολή της οικονομικής ενίσχυσης αντιστοιχεί σε 0,6279 ευρώ ανά αλκοολικό βαθμό και εκατό λίτρα ουδέτερης αλκοόλης, σε 0,3985 ευρώ ανά αλκοολικό βαθμό και εκατό λίτρα αποστάγματος στεμφύλων ή ακατέργαστης αλκοόλης στεμφύλων και σε 0,277 ευρώ ανά αλκοολικό βαθμό και εκατό λίτρα αποστάγματος οίνων ή ακατέργαστης αλκοόλης από οίνους και οινολάσπες.

Φαινολικές ενώσεις στέμφυλων

Γενικά χαρακτηριστικά

Τα φαινολικά συστατικά παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ποιότητα του οίνου, στη διαμόρφωση του χρώματος αλλά και σε διάφορους γευστικούς και αρωματικούς χαρακτήρες (Mejia et al, 2022).

Οι φαινολικές ενώσεις, ιδιαίτερα του ερυθρού οίνου, έχουν μεγάλη σημασία για την σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες των συστατικών αυτών είναι πρωταρχικής σημασίας για προστασία από καρκινογενέσεις, γήρανση κυττάρων και προβλήματα στην καρδιά.

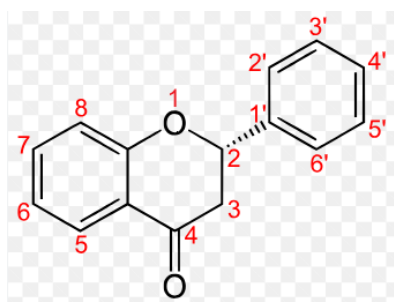
Το μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών ενώσεων βρίσκεται στους φλοιούς και στα γίγαρτα των σταφυλών. Η παρουσία τους στον οίνο οφείλεται λόγω της εκχύλισης ή διάχυσης τους από τα στέμφυλα κατά την οινοποίηση ή λόγω της εκχύλισης τους από δρύινα βαρέλια. Πολύ μικρές ποσότητες σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών (Ismael 2011).



Διάγραμμα 1: Ποσοστά φαινολικών στα στέμφυλων.

Με τον όρο φαινολικά συστατικά ή φαινολικές ενώσεις, εννοούμε μια ευρύτερη κατηγορία ενώσεων όπου το μόριο περιέχει έναν ή και περισσότερους αρωματικούς δακτύλιους με ένα ή και περισσότερα υδροξύλια. Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τη φαινυλαλανίνη, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σιμικού οξέος και των φαινυλοπροπανίων.

Τα φαινολικά συστατικά είναι ένα σύνολο ουσιών, διαδεδομένων στη φύση, που μπορεί να έχουν μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στις φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς φαινόλες (EstherGomez-Mejía,2022). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πολυμεριακές φαινόλες με βασικό τύπο C6-C3-C6, ο οποίος αντιστοιχεί στην φλαβανόνη. Οι κύριοι εκπρόσωποι σε αυτή τη κατηγορία είναι οι τανίνες και οι ανθοκυανίνες, που αποτελούν και τα σημαντικότερα φαινολικά στον οίνο.



Εικόνα 4: Φλαβανόνη.

Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες, είναι μονομεριακές φαινόλες, όπως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ(C. Negro, 2003).

Οι ανθοκυανίνες είναι φαινολικές ενώσεις που μπορεί κάποιος να συναντήσει στους φλοιούς. Δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα στα σταφύλια, ενώ σε μικρότερα ποσοστά, τα φαινολικά οξέα, οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες. Στα γίγαρτα, μπορεί να συναντήσει κάποιος κατεχίνες, προκυανιδίνες και καθόλου ανθοκυανίνες.

Κατά την οινοποίηση ένα ποσοστό παραμένει στα στέμφυλα ενώ ένα ποσοστό γύρω στο 50% περνάει στον οίνο. Η βιοσύνθεση των φαινολικών ουσιών πραγματοποιείται βάση των παρακάτω 5 διαφορετικών οδών : 1) Της γλυκόλυσης, 2) Της φωσφορικής πεντόζης, 3) Του Σικιμικού οξέος, 4) Του οξικού- Μαλονικού οξέος. Οι τρεις τελευταίοι βιοσυνθετικοί οδοί μπορούν να ενσωματωθούν στο γενικότερο πλαίσιο του αρωματικού μεταβολισμού, ενώ οι υπόλοιποι θεωρούνται ως οι πιο σημαντικές πλέον για τη βιοσύνθεση των φυτικών φαινολικών μορίων(En-Quin et al,2010).

Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Από την άλλη, οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες είναι μονομεριακά φαινολικά παράγωγα. Οι φλοιοί των σταφυλών περιέχουν παράγωγα του βενζοϊκού οξέος σε ελεύθερη μορφή λόγω υδρόλυσης, είτε σε μορφή εστέρων ή ετεροζιτών. Αυτά τα παράγωγα μπορεί να είναι το σαλυκιλικό οξύ, το υδροξυβενζικό, το γαλλικό, το πρωτοκατεχικό, το βανιλλικό, το συριγγικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Μπορούν να σχηματιστούν κατά το στάδιο της ωρίμανσης ενώ βρίσκεται στη σταφυλή. Έχουν αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση. Επίσης, σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν τα στιλβένια, με το σημαντικότερο από αυτά να απαντάται στο σταφύλη(ρεσβερατρόλη) (Αβραμούλη,2009).

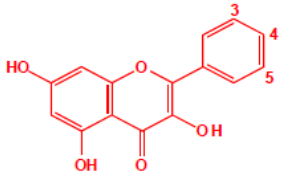
Τα βενζοϊκά οξέα με τη σειρά τους, δε βρίσκονται ελεύθερα στο καρπό αλλά εμφανίζονται με τη μορφή σύνθετων χημικών ενώσεων παρουσία ανθοκυανών. Επίσης, συμμετέχουν στη δομή των ταννινών αποτελώντας δομικό συστατικό τους. Η σταφυλή επίσης περιέχει το γαλλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται με τη μορφή εστέρων, των 3-φλαβονολών(κατεχίνες). Τέλος, τα κινναμμωνικά οξέα δε βρίσκονται ούτε αυτά ελεύθερα στη σταφυλή, αλλά απαντώνται υπό μορφή ενώσεων με τις ανθοκυάνες και με το τρυγικό οξύ(Mădălina IUGA 2017). Στην επόμενη κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών ανήκουν τα στιλβένια. Οι ενώσεις αυτές έχουν δύο βενζολικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται με ένα αιθάνιο ή με μια αιθυλενική αλυσίδα. Εκεί ανήκει η ρεσβερατρόλη υπό μορφή trans καθώς και το παράγωγο της με τη γλυκόζη. Η ρεσβερατρόλη φημίζεται για τις αντικαρκινικές, αντιθρομβωτικές και θεραπευτικές της ιδιότητες. Ως αντιοξειδωτικό, μπορεί να συμβάλει στην καταπολέμηση του καρκίνου, μέσω αναστολής μιας πρωτεΐνης, της NF-kappaB. Τέλος, μπλοκάρει την κυτταρική φλεγμονή που συνδέεται με αρθρίτιδα και άλλες νόσους.

Εμφανίζεται αποκλειστικά στους φλοιούς της σταφυλής στους ερυθρούς οίνους και εκχυλίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση σε συγκεντρώσεις από 1 έως 3 mg/L(YanqiuShen 2020).

Φλαβονοειδείς φαινόλες

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες ή 3-υδρόξυ φλαβόνες ή ανθοξανθίνες, απαντούν μόνο στους φλοιούς των ραγών, τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών σταφυλών, υπό μορφή γλυκοζιτών στη θέση 3- μονογλυκουρονοζιτών. Σχηματίζονται με τη προσκόλληση στη θέση 3 του κεντρικού δακτυλίου ενός μορίου μονοσακχαρίτη ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος. Επίσης, αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές του φυτού.

|  | Θέση άνθρακα-3 | Θέση άνθρακα-4 | Θέση άνθρακα-5 |
|---|------------------|----------------|----------------|
| Καμπφερόλη | - | OH | - |
| Κερκετίνη | OH | OH | - |
| Μυρικετίνη | OH | OH | OH |
| Ισοραμνετόλη | OCH ₃ | OH | - |

Πίνακας 1: Φλαβονόλες σταφυλής

Οι κατεχίνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της 3-φλαβανόλης, εκ των οποίων η σπουδαιότερη είναι η κατεχίνη, το όνομα της οποίας επεκτάθηκε σε όλη την οικογένεια αυτών των φλαβονοειδών φαινολών. Καθώς η κατεχίνη έχει 2 ασύμμετρα άτομα C, δίνει τέσσερα ισομερή. Την (-) κατεχίνη, (+) κατεχίνη, (-) επικατεχίνη και (+) επικατεχίνη. Η κατεχίνη είναι ουσία ευοξυδωτή καθώς υπάρχουν δύο –OH στον πλευρικό δακτύλιο. Όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον, πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και από αυτές προκύπτουν τα φλοιοβαφένια. Το χρώμα αυτών των ενώσεων είναι κίτρινο και ανάλογα τον βαθμό πολυμερισμού μπορεί να φτάσει και έως καστανόμαυρο για αυτό η παρουσία τέτοιων ουσιών στους οίνους είναι ανεπιθύμητες(Καρίμαλη,2018).

Οι προκυανιδίνες είναι συμπυκνωμένα παράγωγα των κατεχινών και σχηματίζονται με αφυδρογονώσεις. Στα στέμφυλα υπάρχουν μέχρι και τετραμερείς προκυανιδίνες αλλά και διμερείς και τριμερείς.

Το μόριο τους αποτελείται από 12-16 φαινολικές ομάδες και 5-7 αρωματικούς δακτυλίου ανά 1000 μονάδες μοριακού βάρους. Αυτό, σε συνδυασμό με το μεγάλο μοριακό βάρος, είναι που τις διαφοροποιεί από τα μονομερή φλαβονοειδή και τα χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικά οξέα στη δομή και στις ιδιότητες τους. Πρόκειται για πολυμερείς 3-φλαβανόλες οι οποίες ενώνονται με δεσμούς άνθρακα αλλά και C-O-C. Η κύρια δομή του σκελετού είναι C6-C3-C6. Στη σταφυλή οι περισσότερες κατεχίνες και προκυανιδίνες βρίσκονται στα γίγαρτα. Σε όξινο περιβάλλον, απουσία οξυγόνου οι προκυανιδίνες μπορούν να

σχηματίσουν κατιόν. Σε όξινο περιβάλλον πε τον ταυτόχρονο πολυμερισμό των προκυανιδών, σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα λόγω οξειδώσεων, να δημιουργούνται συσσωματώματα μεγάλου όγκου τα οποία καθιζάνουν.

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες διαφέρουν από τις φλαβονόλες κυρίως λόγω της απουσίας του δραστικού $-OH$ στη θέση -3. Οι φλαβανόνες είναι ελάχιστα διαδεδομένες στη φύση και τα παράγωγα τους δεν είναι συστατικά των σταφυλών, αλλά ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός. Επομένως η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί μόνο σε οίνους που παλαίωσαν σε δρύινα βαρέλια (Ζαχαριά 2009).

Τανίνες

Οι τανίνες απαντούν κυρίως στα στερεά μέρη της σταφυλής, δηλαδή στους βόστρυχους έως 22%, στα γίγαρτα έως 65%, στους φλοιούς έως 12% ενώ στη σάρκα έως 1%. Από χημικής άποψης είναι μόρια μεγάλα σε μέγεθος που προκύπτουν από το πολυμερισμό μορίων με φαινολικές ομάδες. Είναι ουσίες που μπορούν να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Με σκοπό να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες, θα πρέπει να είναι μεγάλες σε όγκο όχι όμως υπερβολικά, γιατί σε αυτή τη περίπτωση δε θα μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών (Negro, 2009).

Στις τανίνες των σταφυλών γίνεται συνήθως διαχωρισμός σε αυτές των γιγάρτων και του φλοιού. Στο φλοιό, εντοπίζονται οι τανίνες συνήθως στα χυμοτόπια, σχηματίζοντας έτσι πυκνά συμπλέγματα κοντά στα κύτταρα της επιδερμίδας, είτε είναι συνδεδεμένες με την πρωτεινοφωσφολιπιδική μεμβράνη είτε είναι ενωμένες με το κυτταρικό τοίχωμα. Όσων αφορά τα γίγαρτα, βρίσκονται στην εφυμενίδα και στον κερατοειδή ιστό του κελύφους και αποδεσμεύονται στο περιβάλλον μόνο όταν η επιδερμίδα γίνει διαλυτή.

Οι τανίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες, ή τανίνες κατεχίνης, και σε υδρολυόμενες ή τανίνες γαλλικού οξέος. Η μεγάλη διαφοροποίηση στη δομή, εξηγεί και τους διάφορους τύπους τανινών με διαφορετικές ιδιότητες, κυρίως γευστικές. Η θέρμανση των τανινών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στον σχηματισμό κυρίως ερυθρής κυανιδίνης αποδίδοντας έτσι τον όρο προκυανιδίνες (Κυραλέου, 2019).

Οι υδρολυμένες τανίνες αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζη, με το οποίο συνδέονται διάφορες φαινολικές ενώσεις, κυρίως γαλλικό οξύ. Οι τανίνες αυτές, που βρίσκονται στο ξύλο δρυός που χρησιμοποιείται για τη κατασκευή βαρελιών, είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη. Οι

συμπυκνωμένες τανίνες είναι οι φυσικές τανίνες της σταφυλής που απαντώνται σε όλα τα στερεά μέρη της και προέρχονται από τον πολυμερισμό της 3-φλαβονόλης και συγκεκριμένα της (+) κατεχίνης και (-) επικατεχίνης αλλά και της 3,4-φλαβονοδιόλης. Τα μόρια αυτών των φαινολών μπορεί να είναι ακυλιωμένα ή γλυκοζιλιωμένα.

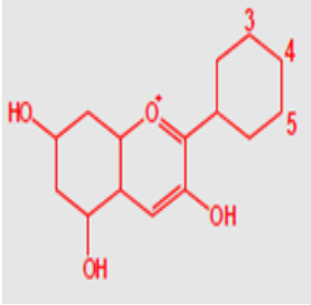
Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς σε αυτές οφείλεται το ερυθρό χρώμα. Κατά κανόνα βρίσκονται στο φλοιό των σταφυλών εκτός από ορισμένες ποικιλίες όπου εμφανίζονται στη σάρκα. Είναι επίσης παρούσα στα φύλλα, κυρίως στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης όπου και χρωματίζονται ερυθρά. Στις περισσότερες λευκές ποικιλίες οι ανθοκυάνες απουσιάζουν είτε ολοκληρωτικά είτε εμφανίζονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Ύστερα από μέτρηση των συνολικών ανθοκυανών που βρίσκονται στους φλοιούς στις περισσότερες ελληνικές ποικιλίες, προέκυψε ότι αυτές κυμαίνονται από 100 έως 1500mg/Kg ραγών(Ξαγοράρης 2017).

Η σύνθεση και η αποθήκευση των ανθοκυανών γίνεται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων της πρώτης επιδερμικής στοιβάδας των φλοιών της ράγας των ερυθρών σταφυλών. Οι ανθοκυάνες αρχίζουν να εμφανίζονται στο στάδιο του περκασμού. Εκείνη τη στιγμή οι πράσινοι καρποί χάνουν τη χλωροφύλλη και αρχίζουν να χρωματίζονται. Κατά την ωρίμανση οι σταφυλές καταλαμβάνουν περισσότερο χώρο στο κυτόπλασμα. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών παρουσιάζει μια μεταβολή από το εξωτερικό προς το εσωτερικό της ράγας, καθώς τα γειτονικά κύτταρα της σάρκας είναι περισσότερο χρωματισμένα από εκείνα της επιδερμίδας.

Επιπρόσθετα, οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες, όπου το άγλυκο τμήμα είναι υδροξυλιωμένο και μεθυλιωμένο παράγωγο του φαινύλ-2-βενζοπυριλίου και το σάκχαρο είναι σχεδόν πάντα αλδόζη. Ανάλογα με τη υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, χωρίζονται σε 5 είδη ανθοκυανών. Αυτά τα μόρια είναι πολύ πιο σταθερά υπό μορφή γλυκοζιτών από ότι μορφή άγλυκου τμήματος. Οι ανθοκυανιδίνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των –OH και –CH₃ που εισέρχονται στο πλευρικό δακτύλιο. Ο αριθμός αυτός επηρεάζει τόσο το χρώμα όσο και τη σταθερότητα της ανθοκυάνης(Ξαγοράρης 2017).

Από τις ανθοκυανιδίνες, η πιο γνωστή και διαδεδομένη είναι η κυανιδίνη, παρ'ότι είναι μαζί με την δελφινιδίνη πάρα πολύ ασταθείς. Η μαλβιδίνη είναι αυτή που επικρατεί στις περισσότερες ποικιλίες με ποσοστό από 60 έως 90%.

| Ένωση Ανθοκυάνη | Άγλυκο φαινολικό παράγωγο | Θέση ομάδων | |
|---|---------------------------------|-------------|-------------------|
| | | -OH | -OCH ₃ |
|  | Κυανιδίνη | 3' | - |
| | Δελφινιδίνη | 3' και 5' | - |
| | Μαλβιδίνη | - | 3' και 5' |
| | Πετουνιδίνη | 5' | 3' |
| | Παιονιδίνη | - | 3' |

Πίνακας 2: Ανθοκυάνη.

Φαινολικές ενώσεις στεμφύλων Αγιωργίτικου

Το Αγιωργίτικο είναι μία από τις πιο πλούσιες ποικιλίες ερυθρές ποικιλίες αμπέλου. Τα στέμφυλα της ποικιλίας αυτής όπως και σε πολλές άλλες ερυθρές ποικιλίες, είναι πλούσια σε ανθοκυάνες. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ανθοκυάνες που εμφανίζονται σε πλειοψηφία στη ποικιλία αυτή κυρίως στους φλοιούς και έπειτα στα γίγαρτα, είναι η Δελφινιδίνη, η Κυανιδίνη, η Πετουνιδίνη, η Πεονιδίνη, η Μαλβιδίνη, η ακετυλιωμένη μαλβιδίνη και η Κουμαρυλιωμένη μαλβιδίνη.

Πέρα όμως από τις ανθοκυάνες, τα στέμφυλα του αγιωργίτικου εμφανίζουν κι άλλες φαινολικές ενώσεις όπως είναι οι φλαβονόνες. Οι ενώσεις που βρίσκονται σε αφονία είναι η Κατεχίνη, Επικατεχίνη, Προκυανιδίνη Β1 και Β2.

Από τις φλαβονόλες, αυτές που κυριαρχούν στους φλοιούς είναι η Μυρικετίνη, η Καιμπφερόλη, η Κερκετίνη, η Ισοκαιμπφερόλη και η Ρουτίνη.

Τέλος, στα βενζοϊκά οξέα όπου ανήκει το γαλλικό οξύ και στα υδροξυκιναμωνικά οξέα το Καφεϊνικό οξύ, το Π-Κουραμικό και το Φερουλικό οξύ.

Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την οξειδωση των λιπιδίων ή άλλων μορίων με αναστολή της έναρξης ή εξάπλωσης αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες καθώς δεσμεύει και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται κυρίως στο είδος και τον αριθμό των υποκαταστατών τους παρά στο βασικό σκελετό τους (Souad et al, 2014). Στη χημική τους δομή οφείλεται η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τις βιταμίνες E και C. Η πιο σημαντική παράμετρος αντιοξειδωτικής δράσης είναι ο αριθμός των ελεύθερων υδροξυλίων του B δακτυλίου γιατί μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες κατιόντων υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες, ενώ μεθυλίωση ή γλυκοζυλίωση του υδροξυλίου στην 3-θέση αναστέλλει την αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται σε αυτό (Ismael et al, 2011).

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σταφύλια έχουν αναφερθεί διαφορετικές εκφράσεις αποτελεσμάτων και διαφορετικό αντιδραστήριο αναφοράς ανάλογα με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε. Έχουν χρησιμοποιηθεί, η μέθοδο ORAC, BRAI και TEAC, με έκφραση των αποτελεσμάτων με το αντιδραστήριο DPPH και ABTS (Di Lorenzo et al, 2019).

Σε μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχτεί η επίδραση της ποικιλίας και του συστήματος διαμόρφωσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των σταφυλών. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τα ολικά φαινολικά, κυρίως αυτών που προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τις συγκεντρώσεις των φλαβαν-3-ολών. Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί η μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε φλοιούς και γίγαρτα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης χωρίς ωστόσο να έχει παρατηρηθεί συγκεκριμένο μοτίβο αλλά αναφέρονται διαφορές ανάλογα με τη ποικιλία (Αβραμούλη 2009).

Οι αναφορές σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανών έρχονται σε αντιπαράθεση. Η αντιοξειδωτική τους ιδιότητα έχει αποδοθεί στο άγλυκο μέρος του μορίου τους, κι αυτό έχει διαπιστωθεί για την κυανιδίνη αλλά και για κάποιους γλυκοζίτες της. Ο αριθμός των υποκαταστατών στη θέση -3 του μορίου, ο βαθμός οξειδωσης του C δακτυλίου, ο βαθμός υδροξυλίωσης και η εστεροποίηση με φαινολικά οξέα, θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών. Ωστόσο, αναφέρεται ότι η γλυκοζυλίωση της θέσης -3 των ανθοκυανιδινών μειώνει την αντιοξειδωτική δράση του μορίου (En-QinXia, Gui-FangDeng 2010).

Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

Η δοκιμή Folin-Ciocalteu για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών, είναι μια φωτομετρική μέθοδος, η οποία αναπτύχθηκε το 1927 για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται αντιδρά με το φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης, σχηματίζεται έγχρωμο προϊόν. Στη συνέχεια, μελετητές βελτίωσαν τη μέθοδο και τη χρησιμοποίησαν για το προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών στο κρασί(Kυραλέου,2019).

Παρά το γεγονός ότι η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών ουσιών, στη πραγματικότητα προσδιορίζεται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος καθώς η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι οξειδοαναγωγική. Ως εκ τούτου η εν λόγω δοκιμή θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης ανήκει στη κατηγορία της μεταφοράς ηλεκτρονίων για αυτό δεν θα πρέπει να μπερδεύει το γεγονός ότι το σύνολο του πολυφαινολικού προφίλ που υπολογίζεται από αυτή τη μέθοδο, παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων(Nadia et al,2018).

Το αντιδραστήριο της μεθόδου αποτελείται από άλατα μολυβδαινίου και του βολφραμίου. Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται, και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξειδία που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου.

Από την άλλη, η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου.

Η μέθοδος είναι απλή, επαναλήψιμη και εύκολη, οπότε έχει εξελιχθεί σε μια μέθοδο ρουτίνας τόσο για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών όσο και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας(Diabetic et al,2022).

Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH

Η ρίζα DPPH· είναι μία από τις λίγες σταθερές αζωτούχες οργανικές οργανικές ρίζες. Το χρώμα είναι βαθύ ιώδες και το φάσμα της απορρόφησης της στο UV-Vis παρουσιάζει μέγιστο στα 517nm. Κατά την αναγωγή της η ρίζα χάνει σταδιακά το χρώμα της καταλήγοντας σε ανοιχτό κίτρινο(Madalina et al,2017).

Η αντίδραση μπορεί να καταγραφεί με φασματοφωτόμετρο. Η δοκιμή DPPH βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας των υπό εξέταση δειγμάτων, ως προς τη ρίζα DPPH. Η μέθοδος παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τους Brand-Williams και συνεργάτες, και έκτοτε έχει γίνει πολύ δημοφιλής ως μια

γρήγορη και εύκολη στη χρήση μέθοδο για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Έως τώρα επικρατούσε η άποψη ότι ο μηχανισμός αναγωγής του DPPH περιελάμβανε αντίδραση μεταφοράς υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό στη ρίζα, πρόσφατα όμως προτάθηκε ότι πρόκειται για αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Η μέθοδος αυτή από την άλλη, παρουσιάζει προβλήματα όταν εμπλέκονται ουσίες που απορροφούν στα 517nm, καθώς είναι δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα καροτενοειδή. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι ότι η ρίζα DPPH, δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα με τις ενεργές ρίζες που εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπιδίων, με αποτέλεσμα πολλά αντιοξειδωτικά που αντιδρούν ταχέως με τις ρίζες αυτές, αντιδρούν αργά ή και καθόλου με το DPPH λόγω στερικού παρεμποδισμού (Maritaz et al,2022).

Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή ABTS

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+} πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1993. Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τη ρίζα ABTS^{•+} είναι όμοιος με εκείνη της ρίζας DPPH, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε με τη προσθήκη ενός ηλεκτρονίου είτε με τη προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου.

Σε αντίθεση με τη ρίζα DPPH, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα, η ρίζα ABTS^{•+} πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται με τη παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση της ρίζας ABTS^{•+}.

Η οξείδωση της ρίζας του ABTS^{•+} είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Yanqiu et al,2020). Η ρίζα θα παραμείνει σταθερή αφού σχηματιστεί, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ανάγεται με τη προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται (Konrad et al,2019).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Σκοπός του παρακάτω πειράματος είναι ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής δράσης σε στέμφυλα της ποικιλίας Αγιωργίτικο Νεμέας. Φλοιοί, βόστρυχοι και γίγαρτα, που αποτελούν υπολείμματα ή απόβλητα στα οινοποιεία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αξιοποιηθούν περαιτέρω.

Πρωταρχικό μέλημα είναι η παραλαβή υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων από τα στέμφυλα. Τα υδροαλκοολικά μελετήθηκαν ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο(δοκιμασία Folin-Ciocalteu), και την αντιοξειδωτική δράση τους(δοκιμασίες DPPH, ABTS).



Εικόνα 5: Γίγαρτα στέμφυλων.



Εικόνα 6: Στέμφυλα.

Υλικά και μέθοδοι

Φυτικού υλικού

Τα αποξηραμένα στέμφυλα ποικιλίας Αγιωργίτικο Νεμέας ευγενικά μας τα προσέφερε η Γ.Α ΚΟΥΤΣΟΔΗΜΟΣ Α.Ε.Ο.Ε.

Διαδικασία εκχύλισης

Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο mixer για την άλεση του δείγματος. Έγινε απολίπωση(defatted) του αλεσμένου δείγματος με χρήση εξανίου ως διαλύτη και χρήση συσκευής διήθησης Buchner.

Για τις εκχυλίσεις του δείγματος, χρησιμοποιήθηκαν: Μεθανόλη και απιονισμένο νερό σε διάφορες αναλογίες, μία (1) ογκομετρική φιάλη 100mL, πουάρ, δύο (2) ποτήρια ζέσεως, σιφώνια πληρώσεως των 10 και 20 mL και κωνικές φιάλες όπου μέσα σε αυτές τοποθετούνται το δείγμα(1g) και το μείγμα μεθανόλης-νερού και τοποθέτηση των φιαλών αυτών στους ηπερήχους. Έπειτα από συγκεκριμένη ώρα εκχύλισης, με τη διήθηση σε γυάλινο χωνί με κωνικό χάρτινο ηθμό(για τη κατακράτηση του στερεού) γίνεται παραλαβή του εκχυλίσματος από κάθε δείγμα.

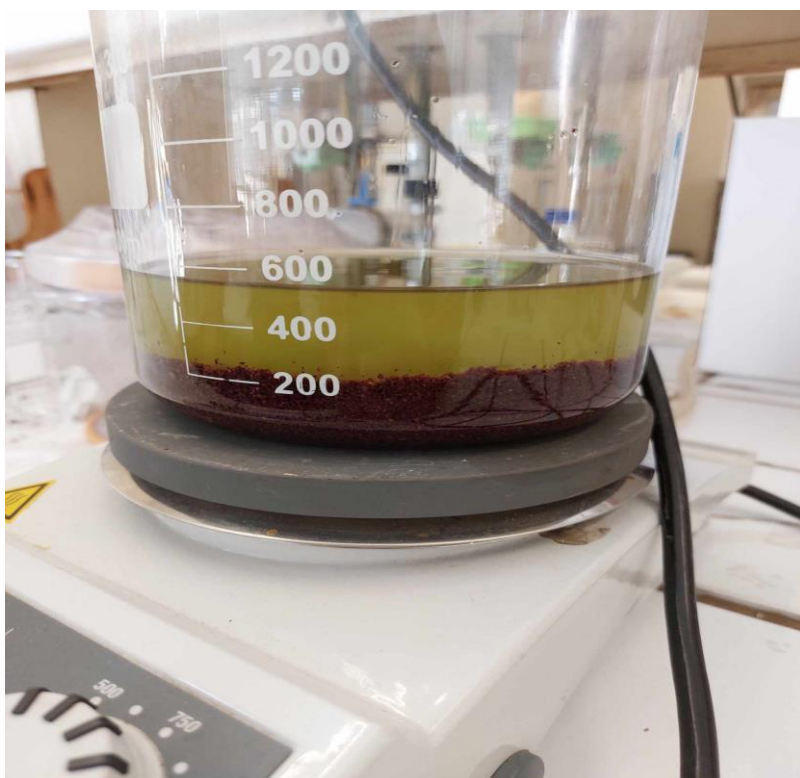
Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών παρασκευάζεται διάλυμα ανθρακικού νατρίου 20% w/v, για τη δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος κατά την αντίδραση του δείγματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Σε φιαλίδια τοποθετούνται 1,5mL H₂O, 25μL δείγματος, 125μL Folin, 375μL Na₂CO₃ και 475μL απιονισμένο νερό. Μετά από δύο ώρες στο σκοτάδι, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ωρατού, μετρίεται η απορρόφηση στα 765nm.

Για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν: α) Δοκιμή DPPH: 3,2g αντιδραστηρίου DPPH, μια ζυγαριά, σπάτουλα, μεθανόλη και ογκομετρική φιάλη των 100mL. β)Δοκιμή ABTS: 38,4mg αντιδραστηρίου ABTS με 2,4mg υπερθειϊκού καλίου K₂S₂O₈ 6,6mg, μια ογκομετρική φιάλη των 10mL.

Φωτογραφικό υλικό της διαδικασίας εκχύλισης δείγματος



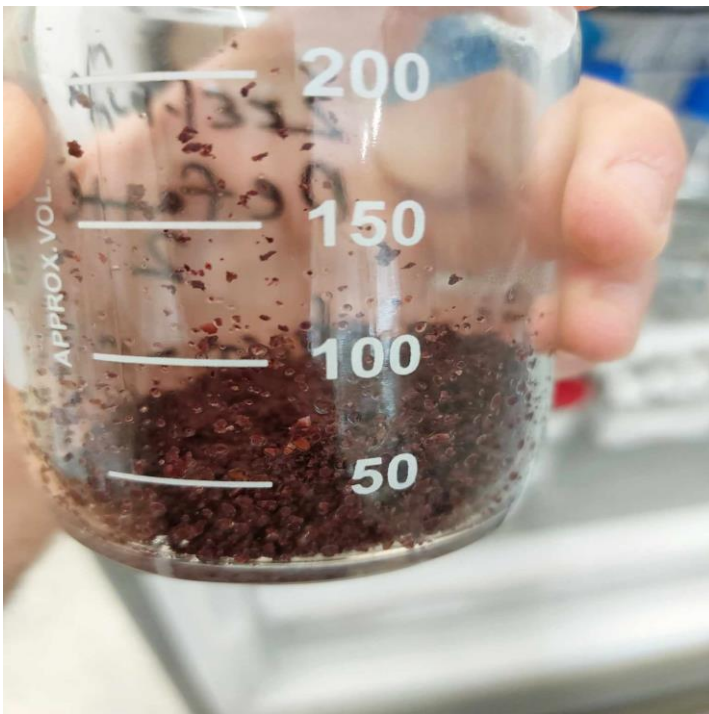
Εικόνα 7: Διαδικασία defatted.



Εικόνα 8: Διαδικασία defatted.



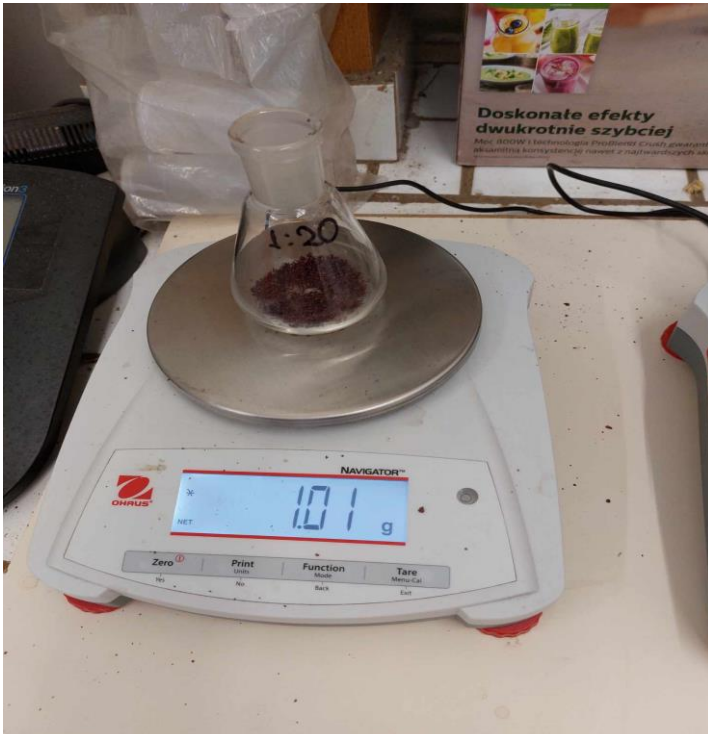
Εικόνα 9: Τελική μορφή δείγματος.



Εικόνα 10: Τελική μορφή δείγματος.



Εικόνα 11: Σκεύη εκχύλισης.



Εικόνα 12: Ζύγιση δείγματος.



Εικόνα 13: Εκχύλιση δείγματος.



Εικόνα 14: Εκχύλιση δείγματος



Εικόνα 15: Εκχύλιση δείγματος

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, έγινε παραλαβή των αποξηραμένων στέμφυλων που ήταν τοποθετημένα σε κούτες ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας τους. Αντιπροσωπευτικό δείγμα από όλες τις κούτες αναμείχθηκε και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη για περαιτέρω επεξεργασία.

Μετρήθηκε η υγρασία του δείγματος των στέμφυλων. Σε πύλινο ποτήρι τοποθετήθηκαν 3g(W1) δείγματος για 24 ώρες στους 105 °C.

m ποτηριού(χωρίς δείγμα)=162,59g.

m δείγματος=3gr.

Μετά από 16 ώρες-> Μέτρηση βάρους δείγματος:

m δείγματος+ποτήρι=164,57g.

m δείγματος 16h= 164,57-162,59=1,98g(W2).

Moisture(%)=(W1-W2)x100/W1=(3-1,98)x100/3=34%

Μετά από 19 ώρες-> Μέτρησης βάρους:

m δείγματος+ποτήρι=164,57g.

m δείγματος 16h= 164,57-162,59=1,98(W2).

Moisture(%)=(W1-W2)x100/W1=(3-1,98)x100/3=34%.

Έγινε ζύγιση 60gδείγματος και τοποθετήθηκε στο ψυγείο. Μετά από δύο ημέρες απόψυξης, έγινε άλεση του δείγματος με τη χρήση κατάλληλου μίξεργια δύο λεπτά. Έπειτα, έγινε ανάδευση με 1.000 στροφές για 1,30 ώρα και προστέθηκαν 600mlεξανίου (μη πολικός διαλύτης). Με στόχο την απομάκρυνση των λιπιδίων(defatted), έγινε διήθηση Buchner στο υπόλειμμα για να φύγει το εξάνιο. Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο και έπειτα στο ψυγείο για συντήρηση και περαιτέρω αναλύσεις.

Για εκχυλίσεις σε αναλογίες μεθανόλης-νερού:20/80, 50/50, 80/20:Το δείγμα βγαίνει από το ψυγείο και αφήνεται μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Ζυγίζεται 1g δείγματος με χρήση σπάτουλας σε κωνικές φιάλες. Παράλληλα, φτιάχνεται το διάλυμα μεθανόλης-νερού με την αναλογία που ζητείται. Ανάλογα με την αναλογία στερεού-υγρού(1/10 ή 1/20), με τη χρήση σιφωνιού πληρώσεως τοποθετείται το μείγμα μεθανόλης-νερού, στην κωνική φιάλη με το 1g δείγματος που ζυγίστηκε. Οι κωνικές φιάλες κουμπώνουν με κατάλληλο πώμα και τοποθετούνται στους ηπερήχους για το χρονικό διάστημα που ζητείται(10 ή 20 ή 30mins). Μετά το πέρας του χρόνου, το δείγμα που έχουν οι φιάλες, αδειάζεται σε χωνί που καλύπτεται με διηθητικό χαρτί και γίνεται παραλαβή του εκχυλισμένου αποστάγματος σε vials. Τα vials αυτά με το δείγμα, τοποθετούνται στο ψυγείο για περαιτέρω ανάλυση.

Για προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών ουσιών με αντιδραστήριοABTS:Τα δείγματα παραμένουν έξω από το ψυγείο μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Την προηγούμενη ημέρα(16-18 ώρες περίπου πριν), έχει γίνει Παρασκευή του διαλύματος ABTS, καθώς το αντιδραστήριο αυτό είναι αρκετά ευαίσθητο στο φως και με το πέρας της ώρας των αναλύσεων, χάνει σιγά σιγά τη δράση του. Το 2,2- αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) ή αλλιώς ABTSδιατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή αμμωνιακού άλατος. Η ρίζα ABTSέχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα και απορροφάται στα 734nm. Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να αντιδρούν με

το έγχρωμο διάλυμα του ABTS και να το αποχρωματίζουν. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος σε σκοτάδι για 6 λεπτά, μετράται η απορρόφηση στα 734nm. Στη συνέχεια υπολογίζεται το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης κάθε δείγματος με τη χρήση του τύπου $I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$.

Αναλυτικά, για να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα παρασκευάστηκε διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7mM. Η ρίζα ABTS παρασκευάζεται από την αντίδραση 7mM αμμωνιακού άλατος 38,4mg με 2,45 mM υπερθειικού καλίου 6,6mg, σε ογκομετρική φιάλη των 10mL. Η οξείδωση του αντιδραστηρίου αυτού αρχίζει αμέσως αλλά σταθεροποιείται μετά από 12 ώρες. Το διάλυμα της ρίζας που φτιάχτηκε παρέμεινε για 16-18 ώρες στο σκοτάδι και μετά αραιώθηκε με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης, ώστε η απορρόφηση του στα 734nm να είναι στα 0,700 σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη. Στη συνέχεια τοποθετούνται 30μL δείγματος και 3 mL του διαλύματος της ρίζας και μετά από επώαση για 6 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον, ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm στο φασματοφωτόμετρο και ο προσδιορισμός του ποσοστού της παρεμπόδισης I%. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν τρεις φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox και για αυτό το λόγο κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη. Για όλα τα δείγματα ακολούθησε μέθοδος ποσοτικοποίησης IC50, όπου εκφράζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που πετυχαίνει τη μείωση του αρχικού τμήματος απορρόφησης κατά 50%. Στα δείγματα με αναλογία στερεού/υγρού 1:20 έγιναν αραιώσεις με Cτελικό 40, 30, 20, 10 και 5mg/mL. Στα δείγματα με αναλογία στερεού/υγρού 1:10 έγιναν αραιώσεις με Cτελικό 50, 30, 20, 10 και 5mg/mL.

Για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών με αντιδραστήριο DPPH: Το 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) είναι μια σταθερή ρίζα που διατίθεται στο εμπόριο. Τα οργανικά του διαλύματα απορροφούν στα 517 nm και παρουσιάζουν ένα έντονο ιώδες χρώμα. Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αντιδρούν με το διάλυμα του DPPH και να το αποχρωματίζουν. Αυτή η φασματοφωτομετρική δοκιμή χρησιμοποιεί τη ρίζα του DPPH ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος στο σκοτάδι για 30mins, μετράται η απορρόφηση στα 517nm. Στη συνέχεια υπολογίζεται το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης κάθε δείγματος με τη χρήση του τύπου: $I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$, όπου I%= η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας, A₀= η απορρόφηση του τυφλού, A= η απορρόφηση του δείγματος.

Αναλυτικά, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH. Αρχικά ζυγίζονται 3,2 mg από το εμπορικό σκεύασμα DPPH, τα οποία διαλύονται σε μεθανόλη μέχρι τελικό όγκο Vτελικό=100mL. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε vials 50μL δείγματος και 5μL διαλύματος DPPH και μετά από επώαση για 30 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον, ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm σε

φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού και ο προσδιορισμός του ποσοστού της παρεμπόδισης I%. Όλα τα δείγματα μετρώνται τρεις φορές.

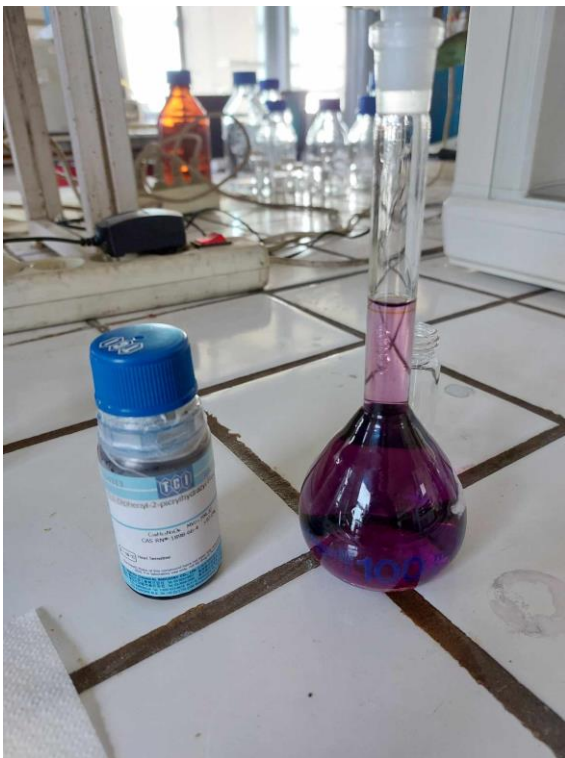
Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλωχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ), που είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό, ανάλογο της βιταμίνης E. . Για όλα τα δείγματα ακολούθησε μέθοδος ποσοτικοποίησης IC50, όπου εκφράζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που πετυχαίνει τη μείωση του αρχικού τμήματος απορρόφησης κατά 50%. Στα δείγματα με αναλογία στερεού/υγρού 1:20 έγιναν αραιώσεις με Cτελικό 40, 30, 20, 10 και 5mg/mL.Στα δείγματα με αναλογία στερεού/υγρού 1:10έγιναν αραιώσεις με Cτελικό 50, 30, 20, 10 και 5mg/mL.

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu:Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβγαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων, σε αλκαλικό περιβάλλον, να οξειδώνονται με παράλληλη αναγωγή των οξέων σε μείγμα οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαινίου, χαρακτηριστικού κυανού χρώματος. Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 765nm και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιεί το διάλυμα του Folin-Ciocalteu ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου, Na₂CO₃, νερού και δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 2 ώρες, μετράται η απορρόφηση στα 765nm.

Αναλυτικά, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά παρασκευάζεται διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na₂CO₃, 20%w/v, για την δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος κατά την αντίδραση του δείγματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ύστερα από 3 λεπτά προστίθενται 375μL Na₂CO₃ και 475μL απιονισμένο νερό και μετά από επώαση 2 ωρών στο σκοτάδι, ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 765nmστο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού. Όλα τα δείγματα μετρώνται 3 φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα καφεικού οξέος, για αυτό κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη.



Εικόνα 16: Φασματοφωτόμετρο πειράματος.



Εικόνα 17: Αντιδραστήριο DPPH.

Αποτελέσματα

Ολικά φαινολικά συστατικά με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση 18 δειγμάτων σε διάφορες συνθήκες ως προς την αναλογία μεθανόλης-νερού, στερεού-υγρού και χρόνου εκχύλισης. Ως προς την αναλογία στερεού-υγρού, 9 δείγματα είχαν αναλογία 1/10 ενώ 9 δείγματα 1/20. Ως προς την αναλογία μεθανόλης-νερού, 6 δείγματα 20%(μεθανόλη)-80%(νερό), 6 δείγματα 50%(μεθανόλη)-50%(νερό) και 6 δείγματα 80%(μεθανόλη)-20%(νερό). Ως προς τον χρόνο εκχύλισης, 6 δείγματα εκχυλίστηκαν για 10 λεπτά, 6 δείγματα εκχυλίστηκαν για 20 λεπτά και 6 δείγματα για 30 λεπτά.

Όσων αφορά τα δείγματα με **20% μεθανόλη και 80% νερό**: Αναλογία στερεού-υγρού: I)1/10: Η εκχύλιση στα 10 λεπτά εμφανίζει αρκετά φαινολικά συστατικά με μέσο όρο απορρόφησης 0,532 στα 765nm από 3 επαναλήψεις, ενώ από τις εκχυλίσεις σε 20 και 30 λεπτά, ήταν 0,374 και 0,389 αντίστοιχα. II)1/20: Για χρόνο εκχύλισης 10 και 20 λεπτών η μέση απορρόφηση ήταν σχεδόν ίδια (0,368 και 0,369 αντίστοιχα) ενώ για 30 λεπτά η απορρόφηση ήταν μικρότερη, στα 0,270.

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 εμφανίζει απορρόφηση 0,532 ενώ το δείγμα με αναλογία 1/20 0,368. II)20 λεπτών: Τα δείγματα με αναλογία 1/10 και 1/20 παρουσιάζουν κοινή μέση απορρόφηση 0,374 και 0,369 αντίστοιχα. III) 30 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 εμφανίζει μέση απορρόφηση 0,389 και το δείγμα με 1/20 0,270.

Όσων αφορά τα δείγματα με **50% μεθανόλη και 50% νερό**: Αναλογία στερεού-υγρού: I)1/10: Η εκχύλιση στα 10 λεπτά εμφανίζει μέση απορρόφηση 0,925 ενώ στα 20 και 30 λεπτά 0,799 και 0,881 αντίστοιχα. II)1/20: Για χρόνο εκχύλισης 20 λεπτών η μέση απορρόφηση μετρήθηκε στα 0,582, στα 10 λεπτά εκχύλισης 0,508 και στα 30 λεπτά εκχύλισης 0,486.

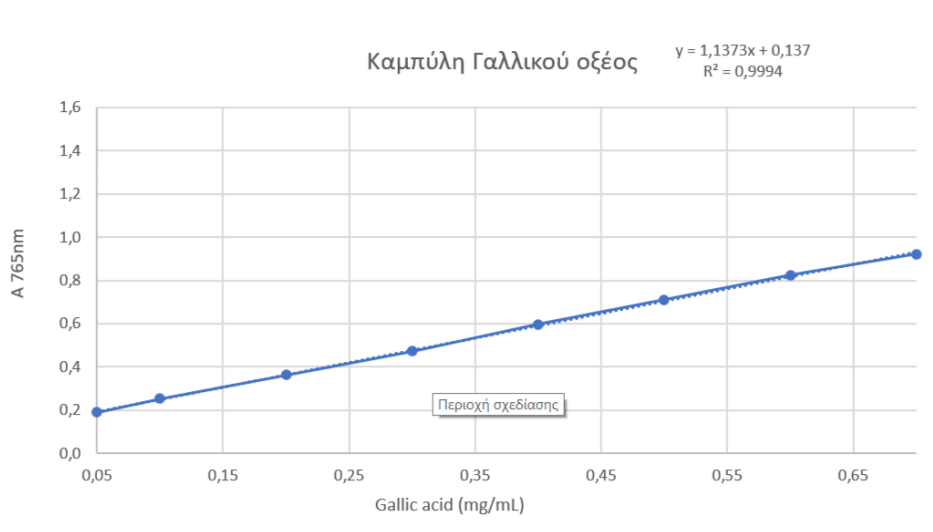
Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 εμφανίζει μέση απορρόφηση 0,925 ενώ με 1/20 0,508. II)20 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία 1/10 εμφανίζει απορρόφηση 0,799 και με 1/20 0,582. III) 30 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 εμφανίζει μέση απορρόφηση 0,881 και το δείγμα με αναλογία 1/20 εμφανίζει 0,486.

Όσων αφορά τα δείγματα με **80% μεθανόλη και 20% νερό**: Αναλογία στερεού- υγρού: I)1/10: Η εκχύλιση των 10 λεπτών, ύστερα από αραίωση του δείγματος(1:1) εμφάνισε το μεγαλύτερο αριθμό φαινολικών ενώσεων από όλα τα δείγματα, με απορρόφηση 0,578. Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 20 λεπτά εμφάνισε μέση απορρόφηση 0,796 ενώ το δείγμα που εκχυλίστηκε για 30 λεπτά εμφάνισε 0,895. II) Τα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 10 και 30 λεπτών, παρουσίασαν σχετικά κοινή απορρόφηση 0,412 και 0,402 αντίστοιχα. Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 20 λεπτά εμφάνισε απορρόφηση 0,517.

Για χρόνο εκχύλισης: I) 10 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 παρουσίασε απορρόφηση 0,895 και εκείνο με αναλογία 1/20 0,412. II) 20 λεπτών: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 εμφάνισε μέση απορρόφηση 0,796 και εκείνο με αναλογία 1/10 εμφάνισε 0,517. III) 30 λεπτών: Το αραιωμένο(1:1) δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 εμφανίζει απορρόφηση στα 0,578 ενώ εκείνο με αναλογία 1/20 εμφανίζει 0,402.

| Gallic acid (mg/mL) | Aa | Ab | Ac | A(M.O) | Std |
|---------------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 0,7 | 0,916 | 0,929 | 0,922 | 0,922 | 0,005 |
| 0,6 | 0,827 | 0,821 | 0,829 | 0,826 | 0,003 |
| 0,5 | 0,747 | 0,697 | 0,692 | 0,712 | 0,025 |
| 0,4 | 0,595 | 0,596 | 0,603 | 0,598 | 0,004 |
| 0,3 | 0,567 | 0,425 | 0,425 | 0,472 | 0,067 |
| 0,2 | 0,362 | 0,364 | 0,364 | 0,363 | 0,001 |
| 0,1 | 0,251 | 0,252 | 0,256 | 0,253 | 0,002 |
| 0,05 | 0,176 | 0,177 | 0,218 | 0,190 | 0,020 |

Πίνακας 3: Πίνακας γαλλικού οξέος.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη γαλλικού οξέος.

Αντιοξειδωτική δράση με το αντιδραστήριο DPPH

Όσων αφορά τα δείγματα με 20% μεθανόλη και 80% νερό: Να σημειωθεί ότι όσο μικρότερη η μέση τιμή της απορρόφησης, τόσο μεγαλύτερη η παρεμποδιστική ικανότητα της ρίζας(I%) και τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Αναλογία στερεού- υγρού: I)1/10: Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 10 λεπτά παρουσίασε $I=0,484$, ενώ τα δείγματα που εκχυλίστηκαν για 20 και 30 λεπτά εμφάνισαν $I=0,332$ και $I=0,430$ αντίστοιχα. II)1/20: Το δείγμα με χρόνο εκχύλισης 30 λεπτά παρουσίασε $I=0,228$ ενώ τα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 20 και 10 λεπτά παρουσίασαν σχετικά κοινό I, με $I=0,325$ και $I=0,302$ αντίστοιχα.

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 παρουσίασε $I=0,484$ και το δείγμα με αναλογία 1/20 $I=0,302$. II)20 λεπτά: Τα δείγματα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 και 1/20 παρουσίασαν κοινή παρεμπόδιση της ρίζας με $I=0,332$ και $I=0,325$ αντίστοιχα. III)30 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 παρουσίασε $I=0,430$ και εκείνο με 1/20 $I=0,228$.

Όσων αφορά τα δείγματα με 50% μεθανόλη και 50% νερό: Αναλογία στερεού- υγρού: I) 1/10: Το δείγμα με χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά εμφάνισε μεγάλη παρεμποδιστική ικανότητα με $I=0,875$ ενώ μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασαν και εκείνα με χρόνο εκχύλισης 20 και 30 λεπτά με $I=0,772$ και $I=0,797$ αντίστοιχα. II)1/20: Το δείγμα με 30 λεπτά εκχύλιση είχε $I=0,552$ ενώ σχετικά κοντά σε τιμές ήταν τα I για 20 λεπτά(0,632) και για 10 λεπτά(0,620).

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 εμφάνισε $I=0,875$ και το δείγμα με αναλογία 1/20 $I=0,620$. II) 20 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 και με $I=0,772$, ενώ εκείνο με αναλογία 1/20 παρουσίασε $I=0,631$. III)30 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 εμφάνισε $I=0,797$ και εκείνο με 1/20 $I=0,550$.

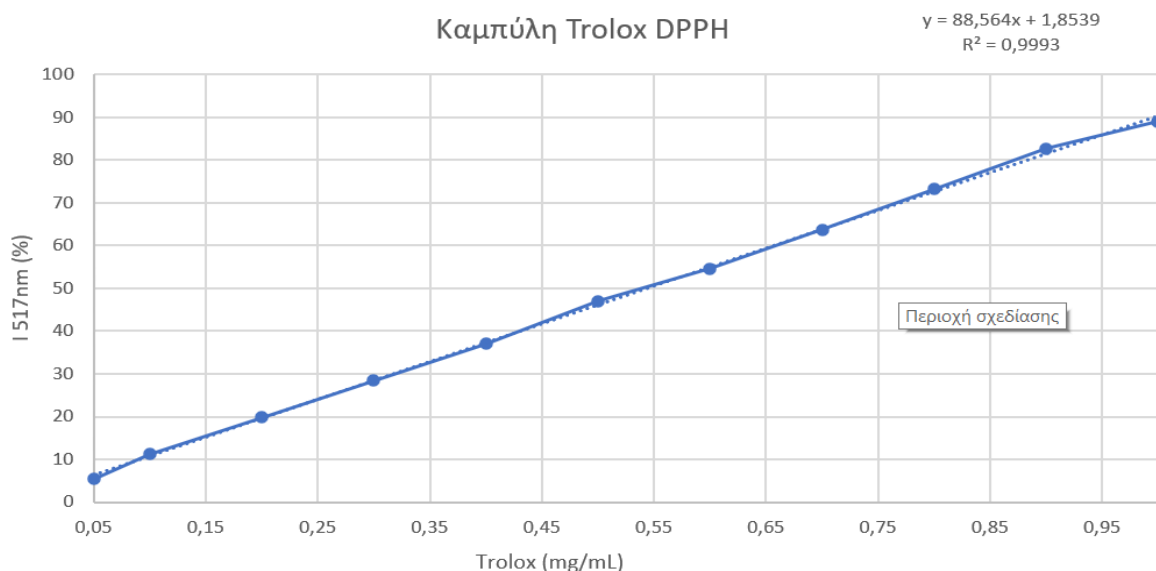
Όσων αφορά τα δείγματα με 80% μεθανόλη και 20% νερό: Αναλογία στερεού- υγρού: I)1/10: Το δείγμα που εκχυλίστηκε σε χρόνο 30 λεπτών είχε $I=0,887$ ενώ εκείνα με χρόνο εκχύλισης 10 και 20 λεπτά εμφάνισαν $I=0,805$ και $I=0,754$ αντίστοιχα. II) 1/20: Για χρόνο εκχύλισης 20 λεπτών $I=0,657$, για 10 λεπτά $I=0,516$ ενώ για χρόνο εκχύλισης 30 λεπτών $I=0,440$.

Για χρόνο εκχύλισης: I) 10 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 είχε μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα με $I=0,805$ και το δείγμα με αναλογία 1/20 $I=0,516$. II) 20λεπτά: Το δείγμα με αναλογία 1/10 παρουσίασε $I=0,754$ και το δείγμα με αναλογία 1/20 $I=0,657$. III) 30 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 παρουσίασε πολλή μεγάλη αντιοξειδωτική δράση, με $I=0,887$ ενώ το δείγμα με αναλογία 1/20 $I=0,440$.

A0=0,908

| Σημεία καμπύλης | Aa | Ab | Ac | Μέσος όρος | I | I(%) | Σφάλμα |
|-----------------|-------|-------|-------|------------|-------|--------|--------|
| 1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,890 | 88,987 | 0,000 |
| 0,9 | 0,159 | 0,158 | 0,154 | 0,157 | 0,827 | 82,709 | 0,002 |
| 0,8 | 0,245 | 0,242 | 0,243 | 0,243 | 0,732 | 73,201 | 0,001 |
| 0,7 | 0,331 | 0,333 | 0,324 | 0,329 | 0,637 | 63,730 | 0,004 |
| 0,6 | 0,437 | 0,436 | 0,365 | 0,413 | 0,546 | 54,552 | 0,034 |
| 0,5 | 0,479 | 0,484 | 0,482 | 0,482 | 0,470 | 46,953 | 0,002 |
| 0,4 | 0,563 | 0,561 | 0,565 | 0,563 | 0,370 | 37,025 | 0,002 |
| 0,3 | 0,633 | 0,661 | 0,627 | 0,640 | 0,284 | 28,374 | 0,015 |
| 0,2 | 0,735 | 0,71 | 0,705 | 0,717 | 0,198 | 19,836 | 0,013 |
| 0,1 | 0,795 | 0,791 | 0,796 | 0,794 | 0,112 | 11,186 | 0,002 |
| 0,05 | 0,845 | 0,843 | 0,85 | 0,846 | 0,054 | 5,369 | 0,003 |

Πίνακας 4: Πίνακας αντιδραστηρίου DPPH.



Διάγραμμα 4: Καμπύλη αντιδραστηρίου DPPH.

Αποτελέσματα IC50

Μετρήθηκε η τιμή του IC50 στα δείγματα(mg/mL), με κατάλληλες αραιώσεις, για περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50 τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Όσων αφορά τα δείγματα με 20% μεθανόλη και 80% νερό: Για αναλογία στερεού- υγρού: I)1/10: Στο δείγμα με χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά, το IC50 υπολογίστηκε ίσο με 81,446mg/mL. Στα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 20 και 30 λεπτά, το IC50 ήταν ίσο με 106,551 mg/mLκαι 92,108mg/mL αντίστοιχα. II)1/20:

Στα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 10 και 30 λεπτά, το IC50 ήταν παρόμοιο, με τιμές 161,092mg/mL και 164,342mg/mL αντίστοιχα.

Ανάλογα με το χρόνο εκχύλισης: I) 10λεπτά: Η τιμή του IC50 στο δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 ήταν 81,446mg/mL και στο δείγμα με αναλογία 1/20 ήταν 161,092mg/mL. II) 20 λεπτά: Η τιμή του IC50 στις αναλογίες 1/10 και 1/20 ήταν παρόμοιες με τιμές 106,551mg/mL και 110,350mg/mL αντίστοιχα. III) 30 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 παρουσίασε IC50=92,108mg/mL και εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=164,342mg/mL.

Όσων αφορά τα δείγματα με 50% μεθανόλη και 50% νερό: Για αναλογία στερεού- υγρού : 1/10: Το δείγμα με χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά, παρουσίασε IC50=40,206mg/mL. Τα δείγματα με 20 και 30 λεπτά εκχύλισης, είχαν IC50=48,873mg/mLκαι IC50=46,680mg/mLαντίστοιχα. II) 1/20: Στο δείγμα με χρόνο εκχύλισης 30 λεπτά το IC50 υπολογίστηκε ίσο με 82,970mg/mL. Στα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 10 και 20 λεπτά το IC50 ήταν παρόμοιο με τιμές 77,585 mg/mLκαι 76,224mg/mL αντίστοιχα.

Για χρόνο εκχύλισης: I) 10 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 παρουσίασε IC50=40,206mg/mLκαι εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=77,585mg/mL. II)20 λεπτά:Στο δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 το IC50 υπολογίστηκε ίσο με 48,873mg/mL και σε εκείνο με αναλογία 1/20 υπολογίστηκε ίσο με 76,224mg/mL. III) 30 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 είχε IC50=46,680 mg/mLενώ εκείνο με αναλογία 1/20 είχε IC50=82,970 mg/ML.

Όσων αφορά τα δείγματα με 80% μεθανόλη και 20% νερό: Για αναλογία στερεού- υγρού: II) 1/10: Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 30 λεπτά, ύστερα και από αρχική αραίωση του δείγματος(1:1), το IC50 ίσο με 38,728mg/mL, ενώ στα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 10 και 20 λεπτά το IC50 ήταν ίσο με 40,834 mg/mLκαι 46,307mg/mL αντίστοιχα. II)1/20: Στο δείγμα με που εκχυλίστηκε για 10 λεπτά το IC50=99,716mg/mL, σε εκείνο για 20 λεπτά IC50=72,236mg/mLκαι σε αυτό για 30 λεπτά εκχύλισης το IC50=105,527mg/mL.

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 το IC50 =40,834mg/mLκαι σε εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=99,716mg/mL. II)20 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 το IC50 υπολογίστηκε ίσο με 46,307mg/mL ενώ σε εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=72,316mg/mL. III) 30 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 το IC50 μετρήθηκε ίσο με 38,728mg/mL ενώ σε εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=105,527mg/mL.

Αντιοξειδωτική δράση με το αντιδραστήριο ABTS:

Όσων αφορά τα δείγματα με 20% μεθανόλη και 80% νερό: Να σημειωθεί ότι όσο μικρότερη η μέση τιμή της απορρόφησης, τόσο μεγαλύτερη η παρεμποδιστική ικανότητα της ρίζας(Ι%) και τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Για αναλογία στερεού-υγρού: I)1/10: Το δείγμα που

εκχυλίστηκε σε χρόνο 10 λεπτών, η παρεμποδιστική ικανότητα υπολογίστηκε ίση με $I=0,851$. Τα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 20 και 30 λεπτά, τα I ήταν ίσα με 0,648 και 0,686 αντίστοιχα. II)1/20: Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 10 λεπτά εμφάνισε $I=0,699$. Το δείγμα με 20 λεπτά εκχύλιση είχε $I=0,643$ και εκείνο με 30 λεπτά εκχύλισης $I=0,625$.

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία στερεού- υγρού 1/10 το I υπολογίστηκε ίσο με $I=0,851$ και σε εκείνο με αναλογία 1/20 το $I=0,699$. II)20 λεπτά: Τα δείγματα με αναλογία 1/10 και 1/20 είχαν παρόμοια παρεμπόδιση με $I=0,648$ και $I=0,643$ αντίστοιχα. III) Στο δείγμα με αναλογία 1/10 το $I=0,686$ και σε εκείνο με αναλογία 1/20 $I=0,625$.

Όσων αφορά τα δείγματα με 50% μεθανόλη και 50% νερό: Για αναλογία στερεού- υγρού: I)1/10: Στο δείγμα με χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά η παρεμποδιστική ικανότητα $I=0,810$. Στα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 20 και 30 λεπτά $I=0,634$ και $I=0,675$ αντίστοιχα. II)1/20: Για 10 και 30 λεπτά εκχύλισης τα I ήταν αρκετά κοντά με I για 10 λεπτά ίσο με 0,806 και για 30 λεπτά $I=0,79$. Για χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά $I=0,486$.

Ανάλογα με το χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Τα δείγματα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 και 1/20 ήτανε σχετικά κοντά με 0,810 και 0,806 αντίστοιχα. II)20 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία 1/10 $I=0,634$ και για 1/20 $I=0,486$. III)30 λεπτά: Για αναλογία 1/10 $I=0,675$ και για 1/20 $I=0,790$.

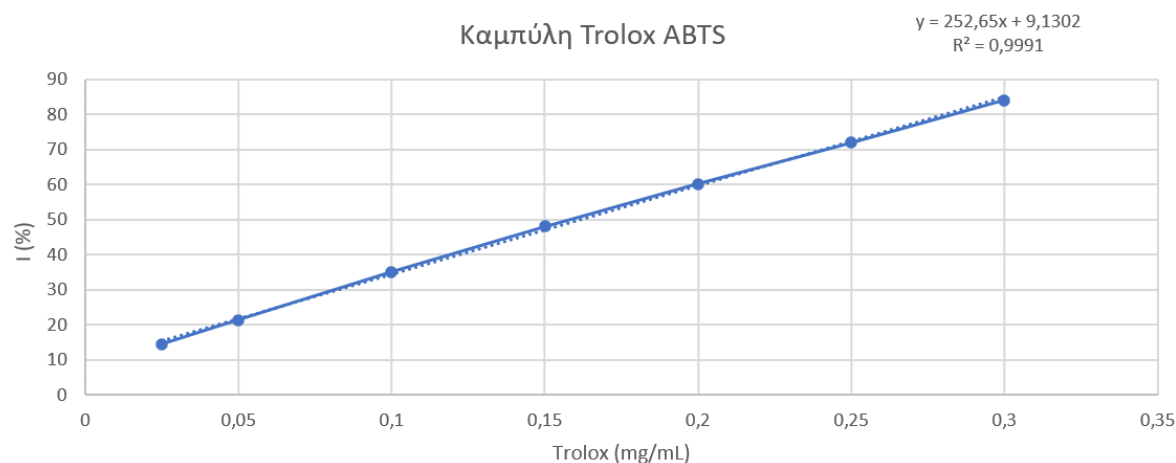
Όσων αφορά τα δείγματα με 80% μεθανόλη και 20% νερό: Ανάλογα με την αναλογία στερεού-υγρού: I) 1/10: Στο δείγμα με χρόνο εκχύλισης 30 λεπτά $I=0,685$ και σε εκείνα με 10 και 20 λεπτά $I=0,669$ και $I=0,653$ αντίστοιχα. II)1/20: Για χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά $I=0,797$ ενώ για 10 και 30 λεπτά η παρεμπόδιση I ήταν αρκετά κοντά με $I=0,719$ και $I=0,706$ αντίστοιχα.

Ανάλογα με το χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Στο δείγμα όπου η αναλογία στερεού-υγρού ήταν 1/10 $I=0,669$ και για αναλογία 1/20 $I=0,719$. II)20 λεπτά: Για αναλογία στερεού-υγρού 1/10 $I=0,653$ και για αναλογία 1/20 $I=0,797$. III)30 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία 1/10 $I=0,685$ και για 1/20 $I=0,706$.

A0=0,705

| Σημεία καμπύλης | Aa | Ab | Ac | Μέσος όρος | I | I(%) | Σφάλμα |
|-----------------|-------|-------|-------|------------|-------|--------|--------|
| 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,135 | 0,112 | 0,842 | 84,161 | 0,005 |
| 0,25 | 0,194 | 0,2 | 0,198 | 0,197 | 0,720 | 72,009 | 0,002 |
| 0,2 | 0,284 | 0,287 | 0,272 | 0,281 | 0,601 | 60,142 | 0,006 |
| 0,15 | 0,368 | 0,363 | 0,365 | 0,365 | 0,482 | 48,180 | 0,002 |
| 0,1 | 0,443 | 0,48 | 0,449 | 0,457 | 0,351 | 35,130 | 0,016 |
| 0,05 | 0,554 | 0,553 | 0,556 | 0,554 | 0,214 | 21,371 | 0,001 |
| 0,025 | 0,603 | 0,605 | 0,6 | 0,603 | 0,145 | 14,515 | 0,002 |

Πίνακας 5: Πίνακας αντιδραστηρίου ABTS.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα αντιδραστηρίου ABTS.

Αποτελέσματα IC50

Μετρήθηκε η τιμή του IC50 στα δείγματα(mg/mL), με κατάλληλες αραιώσεις, για περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50 τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Όσων αφορά τα δείγματα με 20% μεθανόλη και 80% νερό: Για αναλογία στερεού-υγρού: I)1/10: Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 10 λεπτά IC50=28,185 mg/mL ενώ εκείνα που εκχυλίστηκαν για 20 και 30 λεπτά IC50=41,591mg/mL και IC50=30,135mg/mL αντίστοιχα. II)1/20: Η τιμή IC50 για τα δείγματα με χρόνο εκχύλισης 10 και 20 λεπτά είναι 47,285mg/mL και 42,099mg/mL αντίστοιχα. Για χρόνο εκχύλισης 30 λεπτά IC50=75,989mg/mL.

Για χρόνο εκχύλισης : I)10 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 IC50=28,185mg/mL και για 1/20 IC50=47,285mg/mL. II) 20 λεπτά: Κοινό IC50

είχαν τα δείγματα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 και 1/20 με τιμές 41,591mg/mL και 42,099mg/mL αντίστοιχα. III)30 λεπτά: Για αναλογία 1/10 IC50=30,135mg/mL και για αναλογία 1/20 IC50=75,989mg/mL.

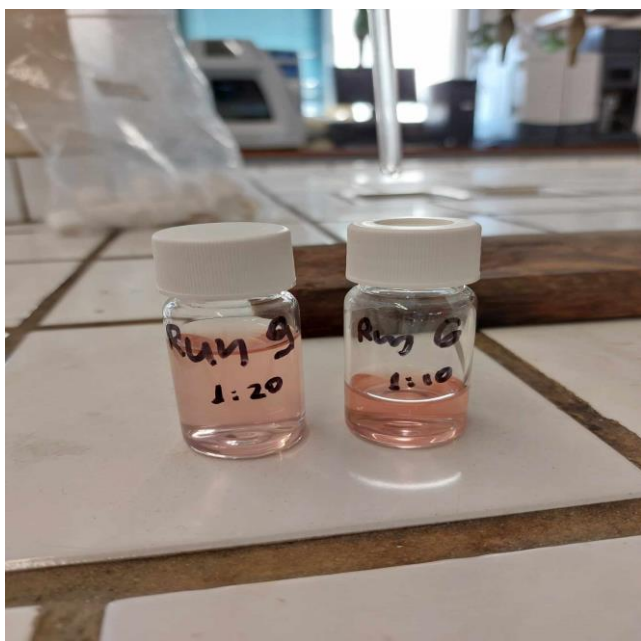
Όσων αφορά τα δείγματα με 50% μεθανόλη και 50% νερό: Για αναλογία στερεού-υγρού: I)1/10: Για χρόνο εκχύλισης 10 λεπτών IC50=14,526mg/mL ενώ για χρόνους 20 και 30 λεπτών το IC50 ήταν σχετικά κοντά με τιμές 22,287 mg/mL και 20,125mg/mL αντίστοιχα. II)1/20: Για χρόνο εκχύλισης 30 λεπτών το IC50=34,760mg/mL ενώ για τιμές 10 και 20 λεπτών υπολογίστηκε IC50=29,496mg/mL και IC50=28,538mg/mL αντίστοιχα.

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 10 λεπτά και είχε αναλογία στερεού-υγρού 1/10 παρουσίασε IC50=14,526mg/mL ενώ εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=29,496mg/mL. II)20 λεπτά: Για αναλογία στερεού-υγρού 1/10 IC50=22,287 mg/mL και για αναλογία 1/20 IC50=28,538mg/mL. III)30 λεπτά: Για αναλογία 1/10 IC50=20,125mg/mL και για αναλογία 1/20 IC50=24,760mg/mL.

Όσων αφορά τα δείγματα με 80% μεθανόλη και 20% νερό: Για αναλογία στερεού-υγρού: I) 1/10: Το δείγμα που εκχυλίστηκε για 30 λεπτά εμφάνισε IC50=12,707mg/mL ενώ για χρόνο εκχύλισης 10 και 20 λεπτά οι τιμές ήταν σχετικά κοντινές με IC50=17,004mg/mL και IC50=18,586mg/mL. II)1/20: Στο δείγμα με χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά IC50=26,088mg/mL ενώ για 10 και 30 λεπτά IC50=31,654mg/mL και IC50=32,327mg/mL αντίστοιχα.

Για χρόνο εκχύλισης: I)10 λεπτά: Το δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/20 IC50=17,004mg/mL ενώ εκείνο με αναλογία 1/20 IC50=31,654mg/mL. II)20 λεπτά: Για αναλογία 1/10 IC50=18,586mg/mL ενώ για αναλογία 1/20 IC50=26,088mg/mL. III)30 λεπτά: Στο δείγμα με αναλογία στερεού-υγρού 1/10 το IC50=12,707mg/mL ενώ για αναλογία 1/20 IC50=32,327mg/mL.

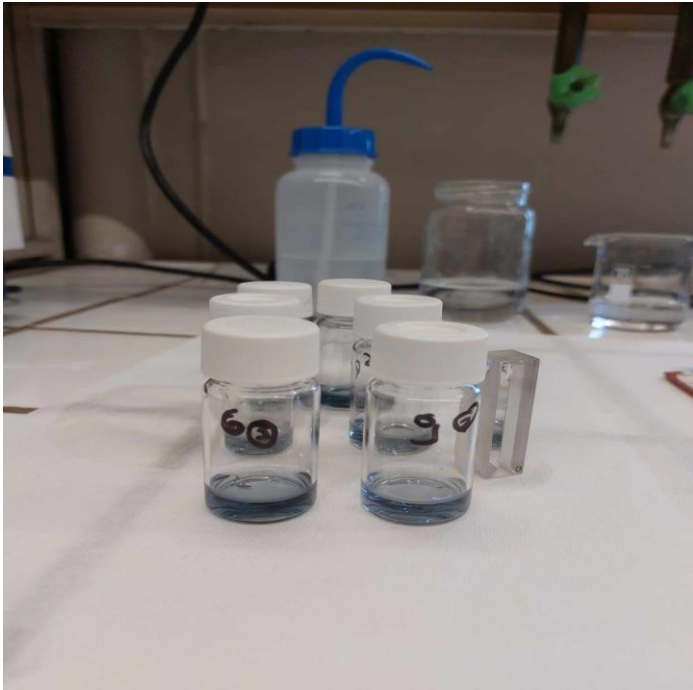
Φωτογραφικό υλικό Runsmε διαφορετικό τρόπο εκχύλισης



Εικόνα 18: Εκχυλίσματα δειγμάτων.



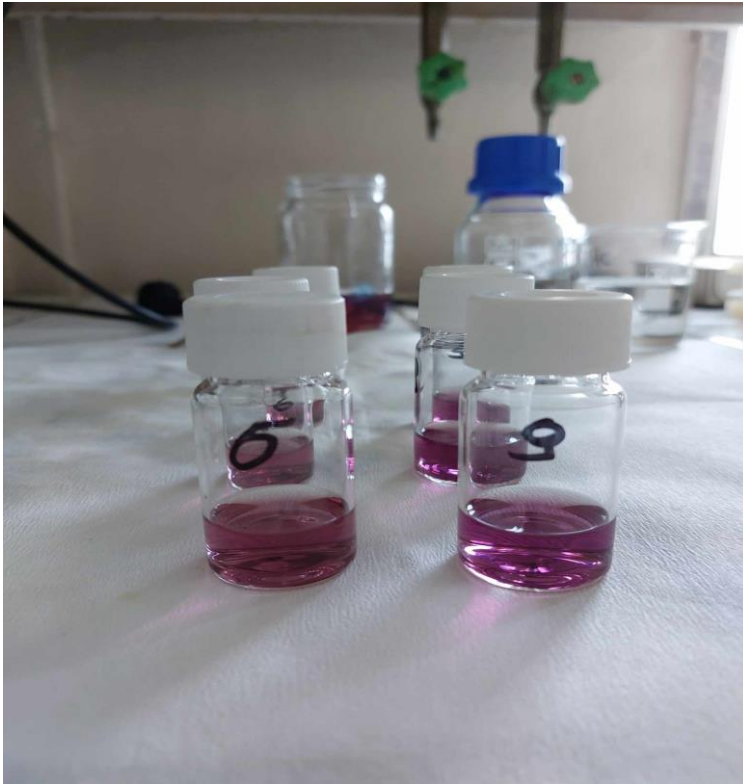
Εικόνα 19: Δείγματα μετά από αντίδραση με ABTS.



Εικόνα 20: Δείγματα μετά από αντίδραση με ABTS.



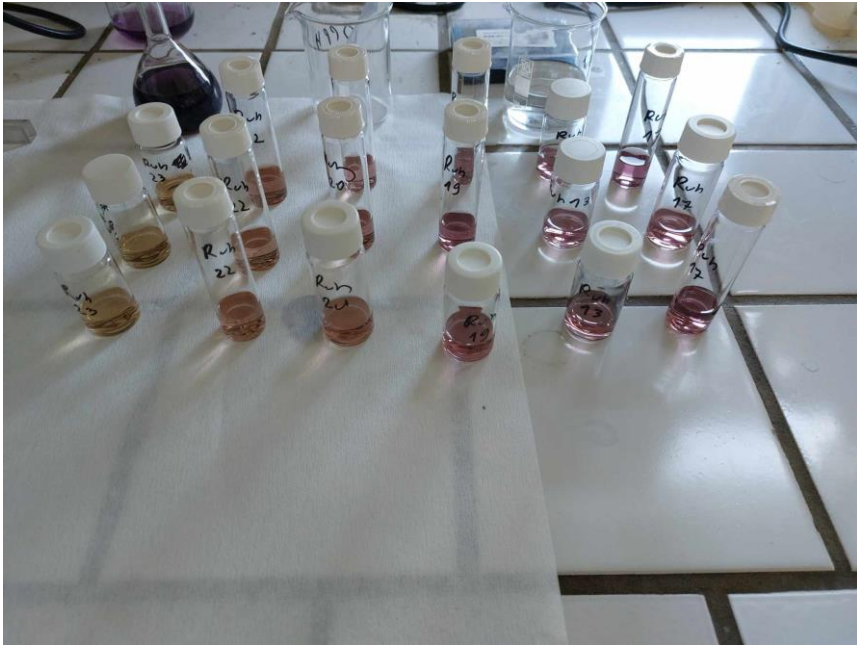
Εικόνα 20: Διαφορά δειγμάτων ως προς τα φαινολικά με βάση το χρώμα(Δείγμα 6 φαίνεται να έχει περισσότερα φαινολικά).



Εικόνα 21: Δείγματα μετά από αντίδραση με DPPH.



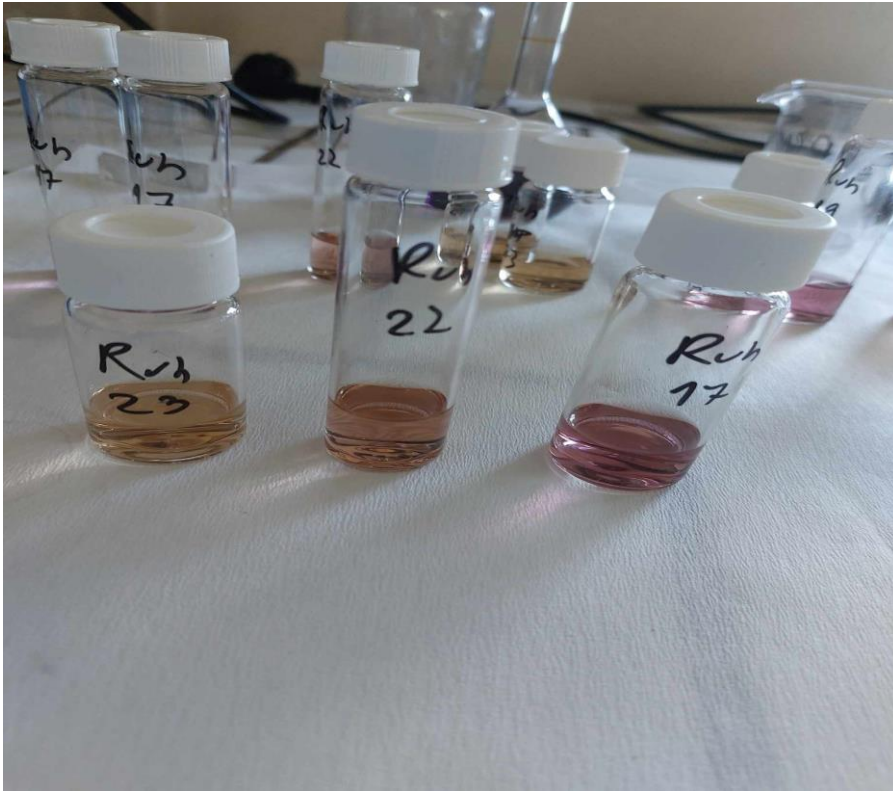
Εικόνα 22: Δείγματα μετά από αντίδραση με DPPH.



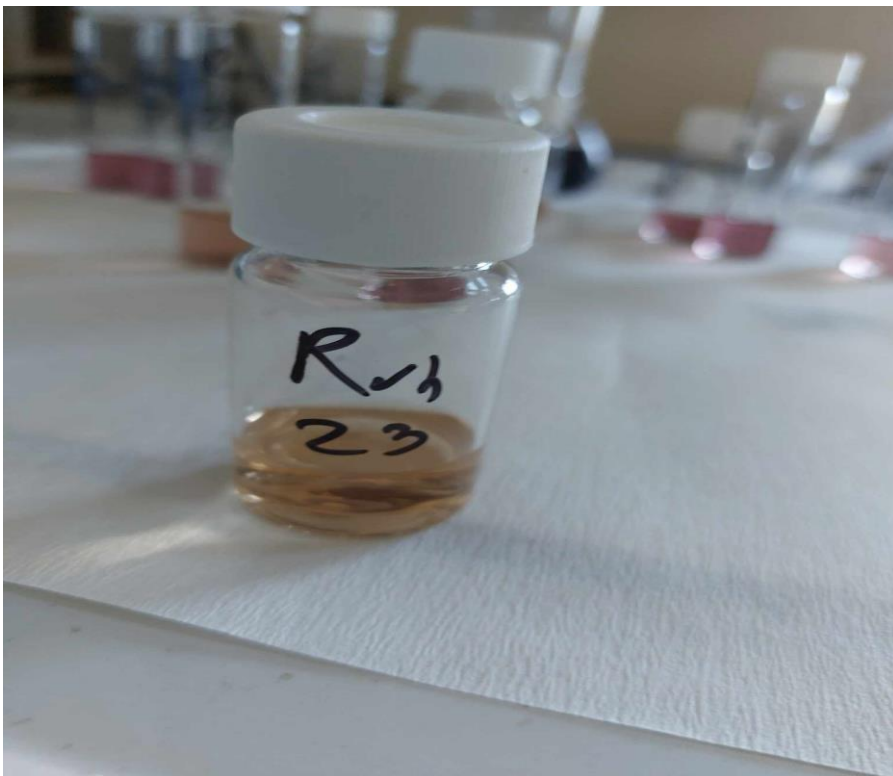
Εικόνα 23: Δείγματα μετά από αντίδραση με DPPH.



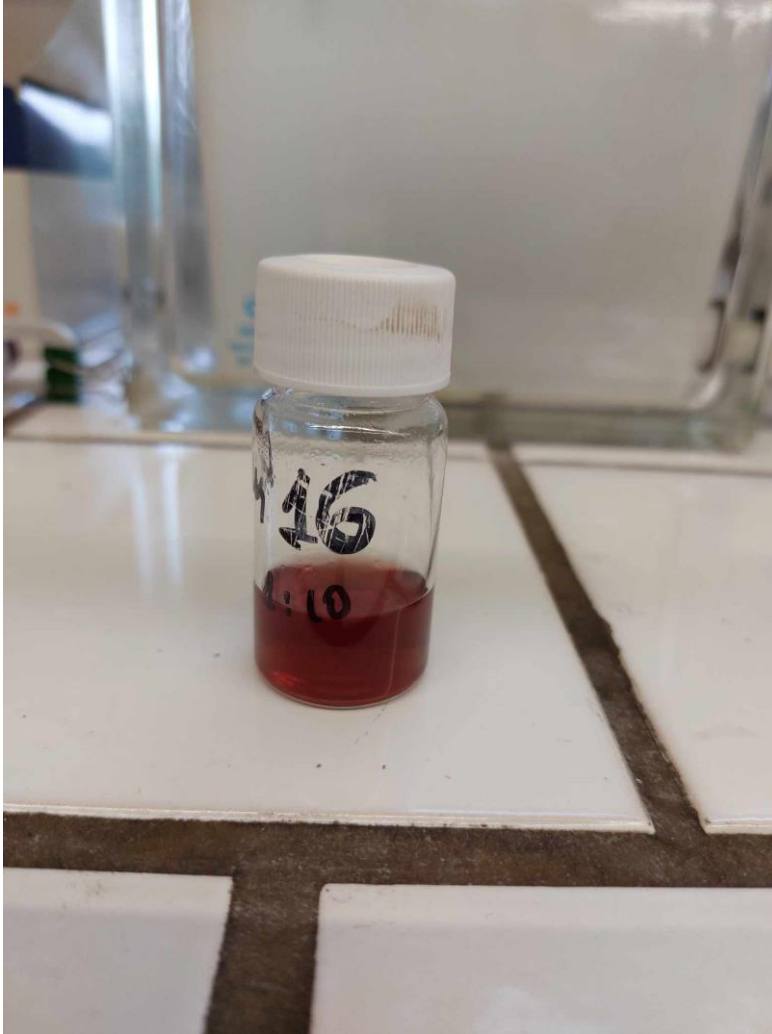
Εικόνα 24: Δείγματα μετά από αντίδραση με DPPH.



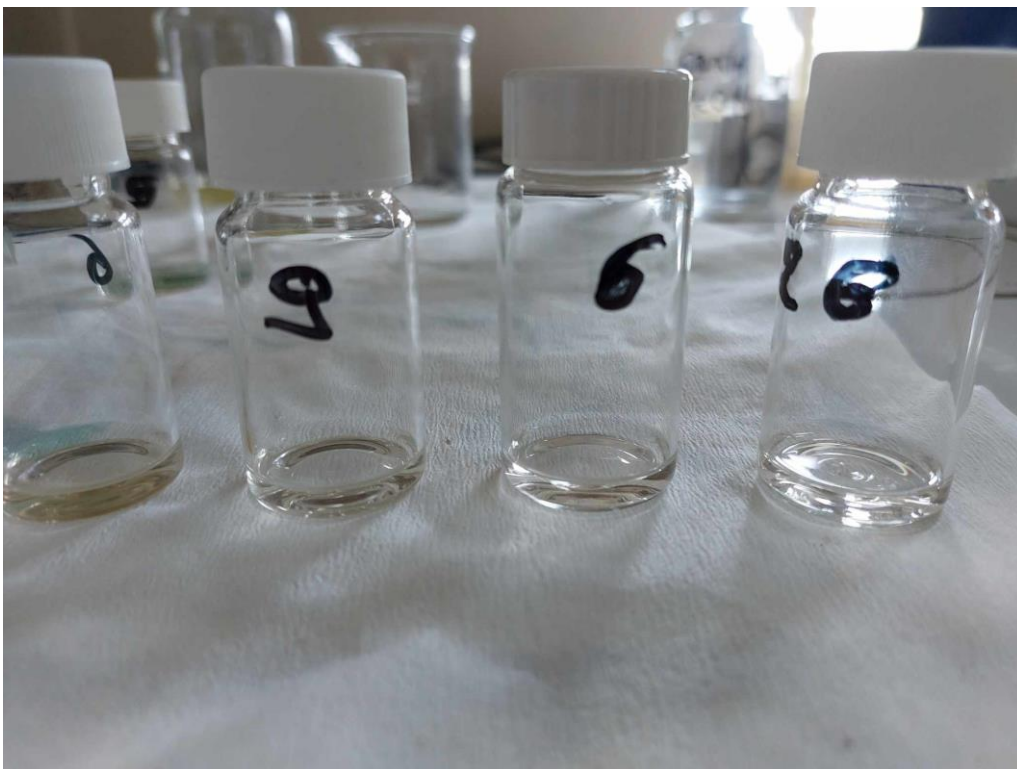
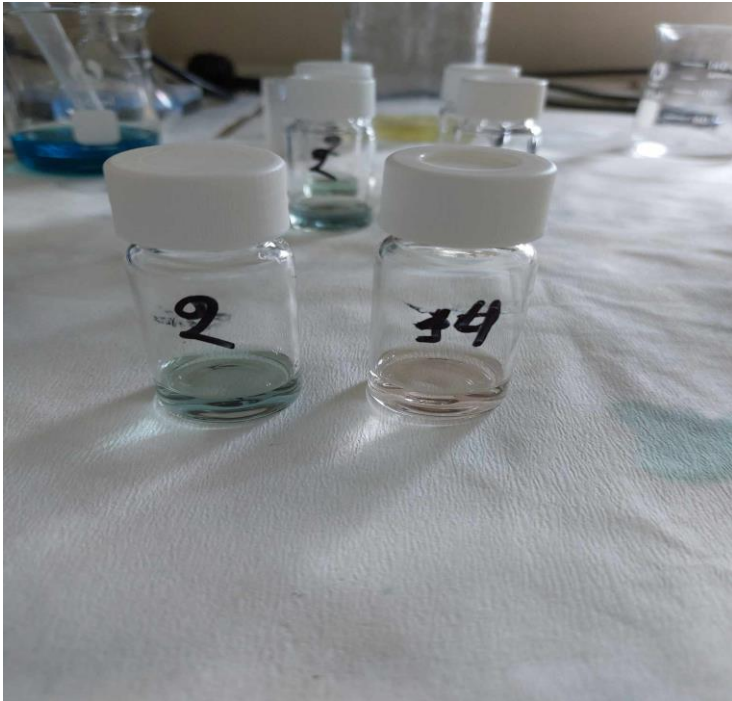
Εικόνα 25: Δείγματα μετά από αντίδραση με DPPH.



Εικόνα 26: Το δεύτερο δείγμα με τα περισσότερα φαινολικά και αντιοξειδωτικά.



Εικόνα 27: Δείγμα με τα περισσότερα φαινολικά και αντιοξειδωτικά.



Εικόνα 28: Δείγματα IC50.



Εικόνα 29: Δείγματα μετά από αντίδραση με DPPH.

Σύγκριση με βιβλιογραφία και συμπεράσματα

Στο παραπάνω πείραμα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση και τα φαινορικά συστατικά της ποικιλίας Αγιωργίτικο Νεμέας. Το δείγμα μελετήθηκε με διάφορους τρόπους εκχύλισης αλλάζοντας κάθε φορά το χρόνο εκχύλισης, την αναλογία στερεού – υγρού αλλά και την αναλογία διαλύτη – νερού Τα δύο Runs με τα περισσότερα αντιοξειδωτικά αλλά και φαινορικά, ήταν τα runs: 1)16 – Με αναλογία μεθανόλης – νερού 80/20, χρόνος εκχύλιση 30 λεπτά και αναλογία στερεού – υγρού 1/10. 2)23 – Με αναλογία μεθανόλης – νερού 50/50, χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά και αναλογία στερεού – υγρού 1/10.

Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση του χρόνου εκχύλισης αλλά και την αναλογία του διαλύτη με το νερό, κοιτώντας πάντα την εξοικονόμηση ενέργειας(ηλεκτρικό ρεύμα) αλλά και εργοστηριακών υλών(μεθανόλη) με ταυτόχρονη επίτευξη του στόχου(υψηλή συγκέντρωση φαινολικών και αντιοξειδωτικών).

Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός να ότι τα runsαυτά έδωσαν τόσο μεγάλο αριθμό φαινολικών και αντιοξειδωτικών σε τόσο μικρό χρόνο εκχύλισης(μόλις 10 λεπτά). Επίσης, στο ένα από τα δύο(run 23), ο όγκος του διαλύτη(μεθανόλης) που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολύ μικρότερος(50/50).

Μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε ο προσδιορισμός των ουσιών στα δύο αυτά runs με τον υψηλότερο αριθμό φαινολικών και αντιοξειδωτικών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αλλά και η σύγκριση με τα αντίστοιχα runsάλλων ποικιλιών της ίδιας αλλά και διαφορετικής περιοχής.

Όσον αφορά άλλες μελέτες που έχουν γίνει για το προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των στέμφυλων, με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, σε ερυθρές ποικιλίες και συγκεκριμένα στο Αγιωργίτικο, υπάρχουν διαφορές αλλά και ομοιότητες στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Αυτό συμβαίνει καθώς σε πολλές μελέτες χρησιμοποιούνται και άλλοι διαλύτες εκτός της μεθανόλης, διάφοροι χρόνοι εκχύλισης, αλλά και πάνω από μία επαναλήψεις της εκχύλισης.

Συγκεκριμένα, σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες εκχύλισης μεθανόλη, κετόνη και αιθανόλη ξεχωριστά, σε διάφορες αναλογίες με το νερό, η αναλογία 80% μεθανόλη-20% νερό ήταν αυτή που στο τέλος εμφάνισε τα περισσότερα φαινορικά συστατικά. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο πιο ιδανικός χρόνος εκχύλισης ήταν τα 30 λεπτά ενώ όταν η εκχύλιση επαναλήφθηκε 3 φορές, ο αριθμός των φαινολικών ήταν μεγαλύτερος. Τέλος, μεγαλύτερη διαφορά στον αριθμό των φαινολικών παρουσιάστηκε όταν η διαφορά στη θερμοκρασία μεταξύ δύο δοκιμών ήταν σε χαμηλές τιμές(π.χ 1^η δοκιμή στους 25 βαθμούς κελσίου, 2^η δοκιμή στους 35 βαθμούς κελσίου). Στις υψηλές τιμές θερμοκρασίας(π.χ 60 και 70 βαθμούς κελσίου) η διαφορά της τιμής των φαινολικών ήταν ελάχιστη.

Επιπρόσθετα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η πιο αποτελεσματική εκχύλιση έγινε όταν το ποσοστό μεθανόλη-νερού ήταν και πάλι 80-20%, αλλά ο χρόνος εκχύλισης ήταν στα 100 λεπτά και η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν στους 72

βαθμούς κελσίου. Τέλος, μελέτη έδειξε ότι σε ποικιλία Αγιωρίτικου, πολύ μεγάλο αριθμό φαινολικών, αν και όχι τον μεγαλύτερο, έδωσε η αναλογία μεθανόλης-νερού 65-45% και 15 λεπτά εκχύλισης.

Συμπερασματικά, αν και οι παράμετροι που μπορούν να μεταβληθούν στη εκχύλιση είναι πάρα πολλοί, αναλογία διαλύτη-νερού, στερεού-υγρού, θερμοκρασία, χρόνος εκχύλισης κ.α, όταν η αναλογία μεθανόλης-νερού είναι 80-20%, ο χρόνος εκχύλισης 30 λεπτά και η θερμοκρασία κοντά στους 65 βαθμούς κελσίου, ο αριθμός των φαινολικών συστατικών φτάνει στο μέγιστο όριο.

Όπως φαίνεται από τη παραπάνω μελέτη, αλλά και από την βιβλιογραφία, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του διαλύτη, στην αναλογία διαλύτη-νερού, τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός των ολικών φαινολικών που εμφανίζονται. Αυτό γίνεται γιατί η μεγάλη ποσότητα διαλύτη δίνει τη δυνατότητα στα φαινολικά συστατικά να απελευθερωθούν πιο εύκολα από το δείγμα και να διαλυθούν στο διάλυμα. Οι φαινολικές ενώσεις είναι συχνά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες όπως το μεθανόλη ή η αιθανόλη. Η χρήση ενός οργανικού διαλύτη μπορεί να βελτιώσει τη διάλυση αυτών των ενώσεων και να επιτρέψει την αποτελεσματική εκχύλισή τους από το δείγμα. Η μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία μεγαλύτερης επιφανειακής επαφής με το δείγμα, βοηθώντας έτσι στην αποτελεσματικότερη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, καθώς η υπερβολική χρήση οργανικών διαλυτών μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην ανάλυση.

Επίσης, τα φαινολικά συστατικά πολλές φορές αυξάνονται ανάλογα με την αντιοξειδωτική δράση και το αντίστροφο. Αν και πολλοί παράγοντες παίρνουν μέρος σε αυτήν την εξίσωση, όπως είναι η ποικιλία, οι καλλιεργητικές συνθήκες της ποικιλίας και το είδος της ανάλυσης, τις περισσότερες φορές η σχέση ανάμεσα στα φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση είναι ανάλογη. Τα φαινολικά συστατικά δεν είναι μία ομάδα ενώσεων, αλλά μια ποικίλη ομάδα με διάφορες χημικές δομές και ιδιότητες. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις έχουν εξαιρετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως οι κατεχίνες και τα φλαβονοειδή. Στα φυσικά προϊόντα, τα φαινολικά συστατικά συχνά παρουσιάζονται μαζί με άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα και άλλες ενώσεις. Αυτή η συνύπαρξη μπορεί να ενισχύσει τη συνολική αντιοξειδωτική δράση του δείγματος. Επομένως, η παρουσία φαινολικών συστατικών σε ένα δείγμα συνήθως συνδέεται με την αντιοξειδωτική του ικανότητα και την ικανότητά του να προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωση. Έτσι και στην παραπάνω μελέτη, τα δείγματα με τα περισσότερα φαινολικά συστατικά, είχαν και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Από την άλλη όμως, θα πρέπει να αξιολογηθούν και οι δοκιμές με τα αντιδραστήρια ABTS και DPPH. Σχεδόν όλα τα Runs με τη δοκιμή ABTS παρουσίασαν περισσότερα αντιοξειδωτικά σε σχέση με τη δοκιμή με DPPH. Αυτό συμβαίνει καθώς η μέθοδος ABTS μετρά τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Είναι κατάλληλη για αντιοξειδωτικά που διαλύονται τόσο σε νερό όσο και σε λιπαρά. Η δοκιμή DPPH μετρά κυρίως λιποφιλικά αντιοξειδωτικά. Μπορεί να υποεκτιμήσει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα υδροφιλικών ενώσεων. Η ακρίβεια μιας δοκιμής μπορεί να εξαρτηθεί από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών δοκιμής, των δειγμάτων και των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Σε γενικές γραμμές, η δοκιμή ABTS θεωρείται ότι παρέχει μια πιο ακριβή εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας σε σχέση με τη δοκιμή DPPH. Αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως η υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμής ABTS, η οποία μπορεί να εντοπίσει ακόμη και μικρές αλλαγές στην αντιοξειδωτική ικανότητα.

Βιβλιογραφία

1. Souad El Gengaihi , Faten M Aboul Ella et al, Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes, Journal of Food,2014.
2. Mădălina IUGA , Sorina ROPCIUC et al, Antioxidant activity and total phenolic content of grape seeds and peels from Romanian varieties, food and environment safety, , Issue 4-2017, 276 – 281.
3. Yanqiu Shen, Wanling Zhang et al, Analysis of Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Four Dark Skin Grapes, Web of Conferences 145, 2020.
4. En-Qin Xia, Gui-Fang Deng et al, Biological Activities of Polyphenols from Grapes, International Journal of Molecular Sciences, 2010, 622-644.
5. Ξαγοράρης Μαρίνος, εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τα στέμφυλα σταφυλής,2017.
6. Αγορίτσα Αβραμούλη, Επίδραση εκχυλισμάτων στεμφύλων και βοστρύχων σταφυλιών στην οξειδωτική βλάβη του DNA, Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας, 2009.
7. C. Di Lorenzo, F. Colombo et al, Phenolic profile and biological activity of table grapes (*Vitis vinifera* L.), Web of Science, 2019.
8. C. Negro, L. Tommasi, Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts, Bioresource Technology 87 ,2003, 41–44.
9. Ismael Ivan Rockenbach a , Eliseu Rodrigues et al, Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil, Food Chemistry 127 ,2011, 174–179.
10. Αγγελική Ζαχαριά, Ανάλυση πολυφαινολικών συστατικών ποικιλίας Αγιωργίτικο, μεταπτυχιακή εργασία, 2009.
11. Μαρία Κυραλέου, Προσδιορισμός της φαινολικής σύστασης των σταφυλιών που προέρχονται από ελληνικές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου, μεταπτυχιακή εργασία, 2019.
12. Καρίμαλη Δέσποινα, Χαρακτηρισμός πέντε ελληνικών ποικιλιών ερυθρών οίνων, μεταπτυχιακή εργασία , 2018.
13. Esther Gomez-Mejía , David Vicente-Zurdo et al, Screening the extraction process of phenolic compounds from pressed grape seed residue: Towards an integrated and sustainable management of viticultural waste, Food science and technology, 2022.
14. Nevena Dabetic 1 , Vanja Todorovic, Optimization of Extraction and HPLC–MS/MS Profiling of Phenolic Compounds from Red Grape Seed Extracts Using Conventional and Deep Eutectic Solvents, antioxidants, 2022.

15. MaritzaZ, María, Effects of subcritical water extraction and cultivar geographical location on the phenolic compounds and antioxidant capacity of Quebranta (*Vitis vinifera*) grape seeds from the Peruvian pisco industry by-product, *Food Science and Technology*, 2022.
16. Konrad V. Miller, Roberto Noguera, A Mechanistic Model for the Extraction of Phenolics from Grapes During Red Wine Fermentation, *Molecules*, 2019.
17. Μανόλης Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013.
18. Χατζηιωάννου, Κούμπαρη, Ενόργανη ανάλυση, 2015.
19. Μανόλης Σταυρακάκης, Αμπελογραφία, 2010.
20. Benmeziane, Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, *International Food Research Journal* 21(3): 1061-1065 (2014).
21. Lisard Iglesias-Carres et al, Optimized Extraction by Response Surface Methodology Used for the Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Whole Red Grapes (*Vitis vinifera*), *nutritients*, 2018.
22. Latifa Azaroual, Optimization of the Microwave-Assisted Extraction of Simple Phenolic Compounds from Grape Skins and Seeds, *agronomy*, 2021.
23. Βοσκίδη Ελένη, Σφγκρισθ φαινολικίν ζυστατικίν σταφυλιοφ και κρασιοφ των ποικιλίϊν Malbec και Αγιωργίτικου, 2012.
24. Nadia Paun et al, COMPARATIVE STUDY ON USING ETHANOL AND METHANOL FOR BLACK GRAPES POLYPHENOLS EXTRACTION, *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation Volume 20, issue 2/2017*.
25. Ευαγγέλου Μάριος, Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτικές ιδιότητες παραγόμενων οίνων της Θεσσαλίας, 2024.
26. ΦΙΛΙΠΠΟΥ ΠΟΛΥΧΡΟΝΗ, ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΡΥΘΡΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ, 2019.
27. ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΣΠΥΡΟΣ, ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΚΡΑΣΙΟΥ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΤΟΥ, 2019.

