



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

In vitro μελέτη λειτουργικών ιδιοτήτων πρώτων υλών τροφίμων

ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

AM: fns17010

Τριμελής Επιτροπή

Χαράλαμπος Καραντώνης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Επιβλέπων

Αντώνιος Κουτελιδάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος

Κωνσταντίνα Νασοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Μέλος

ΜΥΡΙΝΑ ΔΗΜΝΟΥ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2023

Πίνακας περιεχομένων

Εικόνες.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	8
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	8
1.1.1 Πολυφαινόλες	9
1.1.2 Πολυφαινόλες και υγεία.....	11
1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ.....	13
1.2.1 Σύσταση σε φαινολικά για φλοιό σταφυλιού.....	14
1.2.2 Σύσταση σε φαινολικά για γίγαρτο σταφυλιού.....	15
1.2.3 Αναφορά σε εφαρμογές σπόρων σταφυλιών	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	18
2.1 Μεθοδολογίες εκχύλισης- απομόνωσης φαινολικών(UAE,MAE,PLE).....	18
2.1.1 Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE/ Microwave assisted extraction)	18
2.1.2 Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (UAE/ Ultra sound assisted extraction).....	19
2.1.3 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurized liquid extraction)	20
2.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC)	20
2.2.1 DPPH	21
2.2.2 ABTS	21
2.2.3 FRAP.....	22
2.2.4 CUPRAC.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	24
3.1 Αντιοξειδωτικές δράσεις των φαινολικών από φλοιό και γίγαρτο σταφυλιού	24
4. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	26
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
5.1 Προετοιμασία δειγμάτων	27
5.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	27
5.1.2 Όργανα και εξοπλισμός	27
5.1.3 Παραλαβή εκχυλίσματος από φλοιό	27
5.1.4 Παραλαβή εκχυλίσματος από γίγαρτο	28

5.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία του 2,2'-αζινο-δισ-[3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]; ABTS).....	28
5.2.1 Σκοπός.....	28
5.2.2 Αρχή μεθόδου	28
5.2.3 Υλικά και αντιδραστήρια.....	29
5.2.4 Όργανα και εξοπλισμός	30
5.2.5 Παρασκευή διαλυμάτων	30
5.2.6 Πειραματική πορεία.....	30
5.2.7 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	31
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
6.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας φλοιού και γίγαρτου μέσω της δοκιμασίας ABTS....	32
6.2 Προσδιορισμός % εκκαθάρισης ABTS από φλοιό και γίγαρτο.....	33
6.3 Προσδιορισμός IC ₅₀	35
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
Βιβλιογραφία.....	37

Εικόνες

Εικόνα 1 Οξειδωτικό στρες και επιπτώσεις στην υγεία.....	9
Εικόνα 2 Αντιοξειδωτικά: οι πολύτιμοι σύμμαχοι της υγείας μας	9
Εικόνα 3 Κατηγορίες πολυφαινολών.....	10
Εικόνα 4 Φαινολικά συστατικά σταφυλιού	13
Εικόνα 5 Γράφημα αντιοξειδωτικής δράσης φλοιού και γιγάρτου.....	33
Εικόνα 6 Γραφική αναπαράσταση της εκκαθάρισης ABTS από φλοιό	34
Εικόνα 7 Γραφική αναπαράσταση της εκκαθάρισης ABTS από γιγάρτο.....	34
Εικόνα 8 Γραφική αναπαράσταση ABTS (IC ₅₀).....	35

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αναπληρωτή καθηγητή, κύριο Καραντώνη Χαράλαμπο καθώς και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Επίκουρο Καθηγητή, κύριο Αντώνιο Κουτελιδάκη και Επίκουρη Καθηγήτρια, κυρία Κωνσταντίνα Νασοπούλου για την πολύτιμη στήριξη και βοήθεια τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τις τόσο όμορφες εμπειρίες και στιγμές όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στον οργανισμό μας, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται φυσιολογικά μέσω διαφόρων βιοχημικών διεργασιών. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει ένα καθορισμένο όριο, τότε αρχίζουν να παράγονται ανεξέλεγκτα, πράγμα το οποίο ενθαρρύνεται και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα το κάπνισμα και η υπεριώδης ακτινοβολία. Αυτό οδηγεί στην πρόκληση οξειδωτικού στρες το οποίο μπορεί να φθείρει ή ακόμα και να καταστρέψει τα κύτταρα του οργανισμού μας. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να σχετίζεται με πολλές ασθένειες, μεταξύ των οποίων είναι διάφορες καρδιοπάθειες αλλά και ο καρκίνος. Ενάντια στο οξειδωτικό στρες δρουν και τα αντιοξειδωτικά, τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν μεταξύ άλλων και οι πολυφαινόλες, οι οποίες φαίνεται να συμβάλλουν στην πρόληψη πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Πλούσιες πηγές πολυφαινόλων είναι και τα σταφύλια, που αποτελούν σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών με τις φαινολικές ενώσεις τους να κατανέμονται κυρίως στο φλοιό και στο γίγαρτο. Για την εκχύλιση αυτών των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται διάφορες μεθοδολογίες που χωρίζονται στις συμβατικές και στις μη συμβατικές. Στις τελευταίες συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων οι MAE, UAE και PLE. Στις αντιοξειδωτικές δοκιμασίες ανήκουν οι DPPH, ABTS, FRAP και CUPRAC. Δεν είναι λίγες οι έρευνες που έχουν μελετήσει την αντιοξειδωτική δράση σταφυλιών. Στη παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση γιγάρτων και φλοιών σταφυλιού, της ποικιλίας Λημνιό. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου ABTS. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το γίγαρτο σταφυλιού της ποικιλίας Λημνιό εμφάνισε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τη φλούδα αυτού.

ABSTRACT

In our body, free radicals are produced naturally through various biochemical processes. However, when their concentration exceeds a certain limit, our body begins to generate them uncontrollably, which is also promoted by external factors, such as smoking and ultraviolet radiation. This leads to oxidative stress which can wear down or even destroy the cells of our body. Oxidative stress appears to be associated with many diseases, including various heart diseases and cancer. Antioxidants also act against oxidative stress, which neutralize free radicals. Natural sources of antioxidants include polyphenols, which seem to contribute to the prevention of many human diseases. Rich sources of polyphenols are also grapes, which are an important source of antioxidants with their phenolic compounds being distributed mainly in the skin and seed. Various methodologies are used for the extraction of these phenolic compounds, divided into conventional and non-conventional ones. The latter include, among others, MAE, UAE and PLE. Antioxidant tests include DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC. There are many studies that have analyzed the antioxidant activity of grapes. In this research, the antioxidant activity of grape skin and seed, of the Limnio variety, was studied. The research was carried out by applying the ABTS method. The results showed that the grape seed of the Limnio variety showed a higher antioxidant capacity compared to its skin.

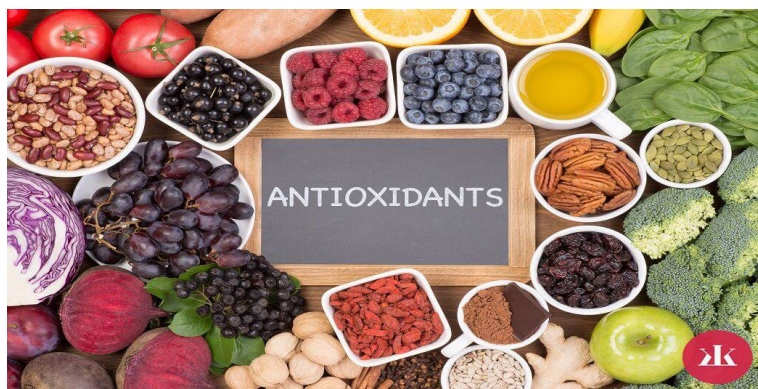
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Στον ανθρώπινο οργανισμό πραγματοποιούνται φυσιολογικά πολλές βιοχημικές διεργασίες από τις οποίες παράγονται μόρια γνωστά ως Δραστικές Μορφές Οξυγόνου(Reactive Oxygen Species/ ROS) και Δραστικές Μορφές Αζώτου(Reactive Nitrogen Species/ RNS). Κάποιες από τις ενώσεις αυτές είναι και οι γνωστές ελεύθερες ρίζες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η ύπαρξη των ROS και RNS στον οργανισμό μας όχι μόνο, συνήθως, δεν αποτελεί κίνδυνο αλλά αντιθέτως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του, αφού αυτές συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες (D Harikiedua, 2018). Ο κίνδυνος εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση των ενώσεων αυτών υπερβεί ένα καθορισμένο φυσιολογικό όριο. Τότε ξεκινούν να δρουν ανεξέλεγκτα (Young, 2001). Από αυτό το σημείο και έπειτα ,τα ROS και RNS αρχίζουν να αποτελούν γεννήτριες οξειδωτικού στρες (Brainina, και συν., 2019). Στη δημιουργία οξειδωτικού στρες συμβάλλει και η παραγωγή επιπλέον ελεύθερων ριζών από εξωγενείς παράγοντες , όπως για παράδειγμα το κάπνισμα, η υπερβολική έκθεση στον ήλιο, η έκθεση σε τοξικές χημικές ουσίες όπως φυτοφάρμακα ή ατμοσφαιρικούς ρύπους αλλά και η κατανάλωση αλκοόλ και ανθυγιεινών τροφίμων (D Harikiedua, 2018). Τα τελευταία, ευθύνονται ως επί το πλείστον για το λεγόμενο ‘οξειδωτικό στρες’ στο οποίο υπόκεινται τα κύτταρα του οργανισμού μας κάτω από αυτές τις συνθήκες και έχει ως αποτέλεσμα τη φθορά ή ακόμα και την ολοκληρωτική καταστροφή τους (Preiser, 2012). Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ασθενειών όπως η νόσος του Parkinson, καρδιοπάθειες , αρθρίτιδα, εγκεφαλικές βλάβες, ασθένειες του αναπνευστικού και του ανοσοποιητικού συστήματος ή ακόμα και καρκίνο. Παράλληλα θεωρείται πως επιταχύνει τη διαδικασία της γήρανσης (D Harikiedua, 2018). Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία του ανθρώπου.



Τα αντιοξειδωτικά είναι οι ουσίες που είναι ικανές να εξουδετερώσουν τις βλαβερές συνέπειες της φυσιολογικής διαδικασίας οξείδωσης που εμφανίζονται στους ζωικούς ιστούς. Αυτά μπορεί να είναι θρεπτικά συστατικά (βιταμίνες και μέταλλα) καθώς και ένζυμα (πρωτεΐνες) στο σώμα μας που βοηθούν στις χημικές αντιδράσεις (Kumar, και συν., 2017). Η σημασία των αντιοξειδωτικών αναγνωρίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας που έχει επιχειρηματολογήσει υπέρ της παγκόσμιας αυξανόμενης κατανάλωσης διαιτητικών πηγών αντιοξειδωτικών, καθώς η πρόσληψη τροφής είναι η κύρια μορφή για την απόκτηση αυτών των ενώσεων. Η αλληλεξάρτηση των αντιοξειδωτικών σε ζωντανούς οργανισμούς, μαζί με την αυξανόμενη αποκάλυψη των μέσων ενημέρωσης, αύξησε τις προσπάθειες για τον χαρακτηρισμό γνωστών πηγών φυσικών αντιοξειδωτικών (Lorenzo, και συν., 2018).

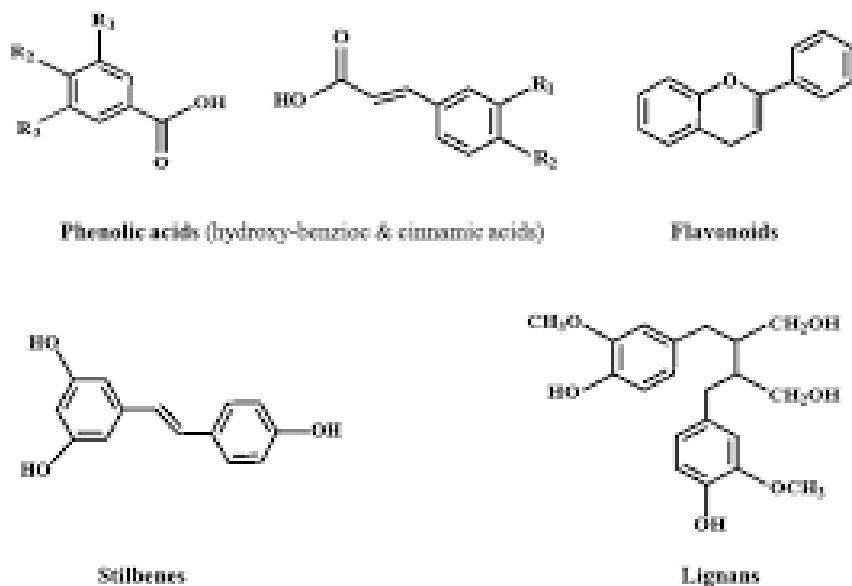


Εικόνα 2 Αντιοξειδωτικά: οι πολύτιμοι σύμμαχοι της υγείας μας

1.1.1 Πολυφαινόλες

Φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν μεταξύ άλλων πολλές βιταμίνες, όπως για παράδειγμα η βιταμίνη Α, η βιταμίνη Ε και η βιταμίνη C. Ακόμη, φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν και οι πολυφαινόλες (Moure, και συν., 2001). Οι πολυφαινόλες έχουν ταυτοποιηθεί σε ανώτερα φυτά και αρκετές εκατοντάδες βρίσκονται σε βρώσιμα φυτά. Αυτά τα μόρια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και γενικά εμπλέκονται στην άμυνα έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας ή της επιθετικότητας από παθογόνα (Manach, και συν., 2004), ενώ παράλληλα αποτελούν και πολύ σημαντικές λειτουργικές τροφές στη διατροφή μας (GÜNEŞ BAYIR, και συν., 2019). Ο όρος πολυφαινόλη είναι γενικά αποδεκτό πως αναφέρεται σε φυσικά προϊόντα που

έχουν δομή πολυφαινόλης, δηλαδή πολλές υδροξυλομάδες σε αρωματικούς δακτυλίους (Manach, και συν., 2004). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες, ως συνάρτηση του αριθμού των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και των δομικών στοιχείων που συνδέουν αυτούς τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι ομάδες αυτές είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες (Manach, και συν., 2004). Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται οι κατηγορίες αυτές με τις χημικές δομές τους.



Εικόνα 3 Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούν τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στη διατροφή. Η συνολική τους διατροφική πρόσληψη θα μπορούσε να φτάσει το 1 γραμμάριο ανά ημέρα, ποσότητα πολύ υψηλότερη των υπόλοιπων κατηγοριών φυτοχημικών και γνωστών διαιτητικών αντιοξειδωτικών. Η ποσότητα αυτή είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από την πρόσληψη βιταμίνης C και 100 φορές μεγαλύτερη από την πρόσληψη βιταμίνης E και καροτενοειδών (Scalbert, και συν., 2005). Ως αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες απαντώνται στο τσάι, στον καφέ, στο κόκκινο κρασί, στη σόγια αλλά και σε πολλά φρούτα και λαχανικά, μεταξύ των οποίων βρίσκονται και τα σταφύλια, τα οποία αποτελούν το μείζον θέμα της παρούσας εργασίας (Manach, και συν., 2004). Ένας σημαντικός όγκος βιβλιογραφίας υποστηρίζει πως οι πολυφαινόλες που λαμβάνονται μέσω της διατροφής, συμβάλλουν σημαντικά στην πρόληψη της παθογένεσης ανθρώπινων ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Scalbert, και συν., 2005).

1.1.2 Πολυφαινόλες και υγεία

Τα τρέχοντα στοιχεία υποστηρίζουν σθεναρά τη συμβολή των πολυφαινολών στην πρόληψη ανθρώπινων ασθενειών, όπως αποτελούν οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι διάφοροι τύποι καρκίνων και η οστεοπόρωση και υποδηλώνουν έναν ρόλο στην πρόληψη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και του σακχαρώδους διαβήτη (Scalbert, και συν., 2005).

Δεν είναι λίγες οι μελέτες που υποστηρίζουν πως η κατανάλωση πολυφαινολών περιορίζει τη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίων παθήσεων. Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που αναπτύσσεται σε περιοχές των μεσαίου μεγέθους αρτηριών, που είναι επιρρεπής σε βλάβες. Οι αθηροσκληρωτικές αυτές βλάβες μπορεί να είναι παρούσες και κλινικά σιωπηλές για δεκαετίες πριν γίνουν ενεργές και προκαλέσουν παθολογικές καταστάσεις. Οι πολυφαινόλες είναι ισχυροί αναστολείς της οξείδωσης της LDL, ενός τύπου οξείδωσης που συγκαταλέγεται στους βασικούς μηχανισμούς για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι προστατευτικές έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων είναι οι αντιοξειδωτικές, αντιαιμοπεταλιακές, αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις καθώς και η αύξηση της HDL και η βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Οι πολυφαινόλες μπορεί επίσης να συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.

Όσον αφορά τους διάφορους τύπους καρκίνου, φαίνεται πως οι πολυφαινόλες, πιο συχνά, επιδρούν προστατευτικά έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, προκαλώντας ταυτόχρονα τόσο μείωση του αριθμού των όγκων όσο και μείωση της ανάπτυξης τους. Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως υπάρχει μια πολυφαινόλη, η λεγόμενη ρεσβερατρόλη η οποία εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες, δρώντας προληπτικά στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου. Η συγκεκριμένη αποτελεί και συστατικό του φλοιού του σταφυλιού και θα μελετηθεί περαιτέρω στην αντίστοιχη υποενότητα. (βλέπε 1.2.1) Δεν είναι λίγες οι μελέτες που υποστηρίζουν τη χρήση πολυφαινολών στη διατροφή, σχετικά με τη χημειοπρόληψη του ανθρώπινου καρκίνου , συνδυαστικά είτε με χημειοθεραπευτικά φάρμακα είτε με κυτταροτοξικούς παράγοντες για την αποτελεσματική θεραπεία ανθεκτικών σε φάρμακα καρκινικών κυττάρων.

Η παραπάνω αναφερόμενη πολυφαινόλη, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να δρα επίσης και ως αντιδιαβητικός παράγοντας.

Όσον αφορά τη γήρανση, φαίνεται πως οι πολυφαινόλες αποτελούν και αντιγηραντικούς παράγοντες. Η γήρανση είναι η διαδικασία συσσώρευσης ποικίλων επιζήμιων αλλαγών στα κύτταρα και τους ιστούς με την προχωρημένη ηλικία, με αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης διαφόρων ασθενειών. Μεταξύ πολλών θεωριών που αποσκοπούν στην εξήγηση του μηχανισμού της γήρανσης, η θεωρία των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες είναι μια από τις πιο αποδεκτές. Μια ορισμένη ποσότητα οξειδωτικής βλάβης λαμβάνει χώρα ακόμη και υπό κανονικές συνθήκες. Ωστόσο, ο ρυθμός αυτής της βλάβης αυξάνεται κατά τη διαδικασία της γήρανσης καθώς μειώνεται η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών και επισκευαστικών μηχανισμών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σχετίζεται με τη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών. Έχει βρεθεί ότι η πρόσληψη διατροφής πλούσιας σε αντιοξειδωτικά είναι αποτελεσματική στη μείωση των επιβλαβών επιπτώσεων της γήρανσης. Αρκετές έρευνες υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά μπορεί να δείξουν αποτελεσματικότητα ως αντιγηραντικές ενώσεις, ενώ παράλληλα δρουν ευεργετικά προκειμένου να βελτιωθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις της γήρανσης τόσο στο νευρικό σύστημα όσο και στον εγκέφαλο.

Το οξειδωτικό στρες και η βλάβη στα μακρομόρια του εγκεφάλου είναι μια σημαντική διαδικασία στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η νόσος του Αλτσχάιμερ είναι μια από τις πιο συχνές εμφανιζόμενες νευροδιαταραχές. Επειδή οι πολυφαινόλες έχουν υψηλή αντιοξειδωτική φύση, η κατανάλωσή τους μπορεί να παρέχει προστασία σε νευρολογικές παθήσεις (Pandey, και συν., 2009).

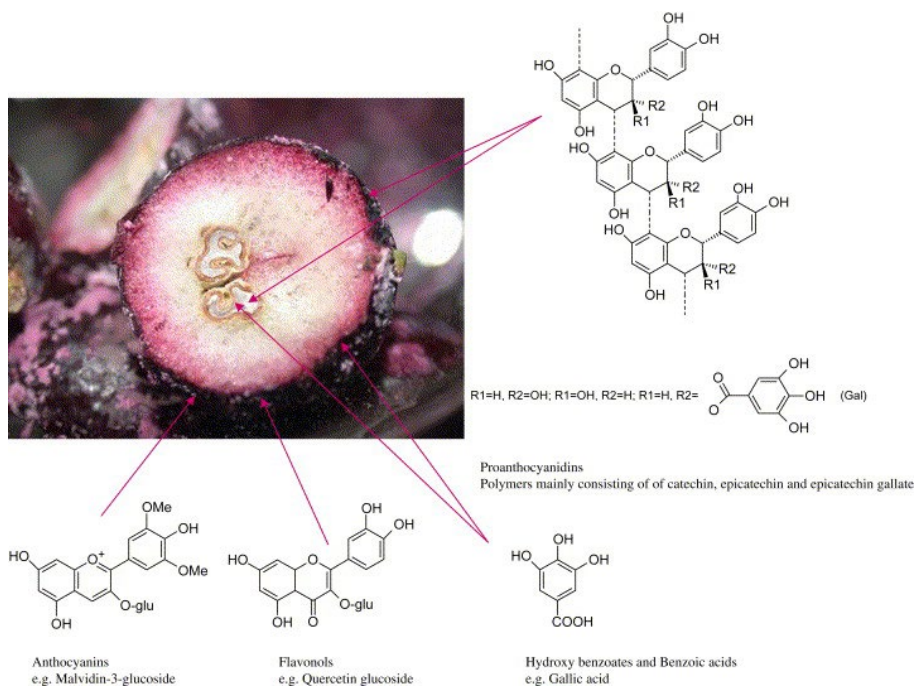
Ο ρόλος των πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία εξακολουθεί να είναι ένας γόνιμος τομέας έρευνας. Με βάση τις τρέχουσες επιστημονικές κατανοήσεις, οι πολυφαινόλες προσφέρουν μεγάλη ελπίδα για την πρόληψη των χρόνιων ανθρώπινων ασθενειών. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη και ταυτόχρονα αναγκαία, η περαιτέρω έρευνα γύρω από τις πολυφαινόλες, προκειμένου αυτή η ελπίδα να γίνει πράξη.

1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ

Οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν μια πολύπλοκη και εξαιρετικά ποικιλόμορφη οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών φυτών, είναι ένας από τους πιο άφθονους στα μούρα αμπέλου, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ποιότητα τόσο των σταφυλιών όσο και των κρασιών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, στους οποίους ανήκουν και οι φαινολικές ενώσεις, είναι πράγματι απαραίτητοι για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των φρούτων και την οινοποίηση, καθώς συμβάλλουν σε μια ποικιλία αισθητηριακών χαρακτηριστικών, όπως το χρώμα, η γεύση, το άρωμα, η υφή, η στυπτικότητα και η σταθεροποίηση του κρασιού (Luzio, και συν., 2021). Η υψηλή περιεκτικότητα των σταφυλιών σε φαινολικές ενώσεις τα καθιστά σημαντική πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (Pérez-Álvarez, και συν., 2021).

Στα μούρα αμπέλου, οι φαινολικές ενώσεις υπάρχουν στους διάφορους ιστούς της σύστασής τους, που βρίσκονται κυρίως στο δέρμα και στους σπόρους και μόνο ένα υπολειπόμενο ποσοστό βρίσκεται στον πολτό. Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η κατανομή των φαινολικών συστατικών στα διάφορα μέρη του σταφυλιού.

Τόσο η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων όσο και η συγκέντρωσή τους στην αμπέλια εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ποικιλία, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα το φως, η θερμοκρασία, η κατάσταση του νερού και τα θρεπτικά συστατικά, αλλά και οι αμπελουργικές πρακτικές (Luzio, και συν., 2021).



Εικόνα 4 Φαινολικά συστατικά σταφυλιού

1.2.1 Σύσταση σε φαινολικά για φλοιό σταφυλιού

Οι φλοιοί σταφυλιών αποτελούν περίπου το 5 με 10 τοις εκατό του συνολικού ξηρού βάρους του σταφυλιού και λειτουργούν παράλληλα ως υδρόφοβο εμπόδιο για την προστασία των σταφυλιών από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα από φυσικούς και κλιματικούς τραυματισμούς, από αφυδάτωση και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Ο φλοιός του σταφυλιού μπορεί να χωριστεί σε τρία επάλληλα στρώματα. Το πρώτο είναι το πιο εξωτερικό στρώμα, η επιδερμίδα, το δεύτερο είναι η ενδιάμεση επιδερμίδα και το τρίτο το υπόδερμα. Το τρίτο στρώμα είναι αυτό που βρίσκεται πλησιέστερα στον πολτό και είναι επίσης αυτό που αποτελείται από διάφορα κυτταρικά στρώματα που περιέχουν τα περισσότερα από τα φαινολικά του φλοιού του σταφυλιού.

Παρά το γεγονός πως η φαινολική σύνθεση στο σταφύλι μπορεί να ποικίλει έντονα εξαιτίας τόσο της ποικιλίας όσο και των συνθηκών καλλιέργειας, ο φλοιός του σταφυλιού περιέχει υψηλές ποσότητες τανινών. Οι τανίνες διαφέρουν από τα υπόλοιπα κλάσματα σταφυλιού καθώς εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού. Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η γαλλική επικατεχίνη είναι οι κύριες συστατικές μονάδες των τανινών του φλοιού, αν και η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη υπάρχουν επίσης σε μικρές ποσότητες (Pinelo, και συν., 2006).

Οι ανθοκυανίνες, οι οποίες αποτελούν υποσύνολο των флаβονοειδών, είναι ιδιαίτερα άφθονες σε έντονα χρωματισμένα φρούτα, μεταξύ των οποίων και τα σταφύλια (Pandey, και συν., 2009). Οι ανθοκυανίνες στο φλοιό των σταφυλιών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα χρώματα του κόκκινου σταφυλιού αλλά και του κρασιού, είναι πολυάριθμες. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν την δελφινιδίνη, την κυανιδίνη, την πετουνιδίνη, την πεονιδίνη και μερικά πυροσταφυλικά.

Γλυκοζίτες και γλυκουρονίδια κερκετίνης και καμπερόλης, γαλλικό οξύ και οι γλυκοζίτες του, ρεσβερατρόλη, καφταρικό και κουταρικό οξύ συμπληρώνουν επίσης, τη σύνθεση φαινόλης των φλοιών σταφυλιών (Pinelo, και συν., 2006).

Η κερκετίνη και η καμπερόλη ανήκουν στις флаβονόλες, οι οποίες είναι τα πιο συχνά απαντώμενα флаβονοειδή στα φυτά. Το κόκκινο κρασί περιέχει αρκετή ποσότητα флаβονολών. Τα φρούτα συχνά περιέχουν 5-10 διαφορετικούς флаβονολικούς γλυκοζίτες. Βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των φρούτων, στην επιδερμίδα και στα φύλλα επειδή η βιοσύνθεσή τους ενεργοποιείται από το φως. Οι флаβονόλες απαντούν μόνο στους φλοιούς, τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών σταφυλιών, με τη μορφή γλυκοζιτών. Σχηματίζονται με την προσκόλληση

ενός μορίου μονοσακχαρίτη, κυρίως γλυκόζης, ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος (PANAGOPOULOS, 2015).

Η ρεσβερατρόλη(3,5,4-τρι-υδροξυ-στιλβένιο) (PANAGOPOULOS, 2015) αποτελεί τον πιο κοινό από τους υποτύπους στιλβενίων (GÜNEŞ BAYIR, και συν., 2019). Τα στιλβένια, είναι ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους και συνδέονται με ένα αιθάνιο. Της αποδίδονται θεραπευτικές, αντικαρκινικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται μόνο στους φλοιούς του σταφυλιού (PANAGOPOULOS, 2015).

1.2.2 Σύσταση σε φαινολικά για γίγαρτο σταφυλιού

Οι σπόροι σταφυλιού παράγονται σε μεγάλες ποσότητες ως απόβλητα από τη βιομηχανία κρασιού και χυμών (Priyadarshi, και συν., 2021). Αυτοί οι σπόροι περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και 5-8% πολυφαινόλες, ανάλογα με την ποικιλία. Οι πολυφαινόλες στους σπόρους σταφυλιού είναι κυρίως φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένου του γαλλικού οξέος, των φλαβανο-3-ολών κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη και διμερή και τριμερή προκυανιδίνης (Shi, και συν., 2003).

Οι φλαβανόλες, ένα υποείδος των φλαβονοειδών, έχουν δύο μορφές. Η μία μορφή είναι οι κατεχίνες, οι οποίες έχουν δομή μονομερούς. Οι περισσότερες κατεχίνες βρίσκονται σε είδη φρούτων. Πλούσιες πηγές μεταξύ άλλων είναι και το κόκκινο κρασί (GÜNEŞ BAYIR, και συν., 2019). Τα πιο γνωστά είδη κατεχινών είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη γαλλικού εστέρα και η επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα (PANAGOPOULOS, 2015).

Ένα από αυτά τα είδη, η κατεχίνη, όταν πολυμερίζεται δημιουργεί τανίνες. Οι τανίνες διακρίνονται σε υδρολιομένες και συμπυκνωμένες. Οι συμπυκνωμένες τανίνες, γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες, αποτελούν την άλλη μορφή φλαβανολών και απαντώνται σε όλα τα στερεά μέρη των σταφυλιών (PANAGOPOULOS, 2015). Οι προανθοκυανιδίνες είναι ευρέως διαθέσιμες σε φρούτα, λαχανικά, ξηρούς καρπούς και σπόρους (Manach, και συν., 2004). Οι τανίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες (B1 και B2) (Pinelo, και συν., 2006) με μικρό βαθμό πολυμερισμού,

ο οποίος αυξάνεται κατά την πορεία της ωρίμανσης, και είναι πολύ στυφές (PANAGOPOULOS, 2015).

1.2.3 Αναφορά σε εφαρμογές σπόρων σταφυλιών

Με δεδομένες τις θετικές επιδράσεις των σπόρων σταφυλιού στην προαγωγή της υγείας, αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί ανά περιπτώσεις είτε για τον εμπλουτισμό τροφίμων είτε ακόμα και για τη συσκευασία τους. Παρακάτω ακολουθούν μερικά παραδείγματα.

Χρήση εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού για εμπλουτισμό αποβουτυρωμένου θερμικά επεξεργασμένου κατσικίσιου γάλακτος σε σκόνη.

Τα κυρίαρχα φαινολικά στο εκχύλισμα ήταν τα φαινολικά οξέα, οι φλαβανό-3-όλες και οι προκυανιδίνες. Η προσθήκη εκχυλίσματος στο θερμικά επεξεργασμένο κατσικίσιο γάλα, βελτίωσε σημαντικά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του γάλακτος. Το γαλλικό οξύ, η κατεχίνη και οι προκυανιδίνες συνέβαλαν κυρίως σε αυτές τις δραστηριότητες. Η προσθήκη εκχυλίσματος στο θερμικά επεξεργασμένο κατσικίσιο γάλα μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την ανάκτηση των απορριμμάτων τροφίμων και για την ενίσχυση των ευεργετικών επιπτώσεων στην υγεία, των λειτουργικών τροφών με βάση το κατσικίσιο γάλα (Milinčić, και συν., 2021).

Χρήση εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού στη συσκευασία τροφίμων.

Μια άλλη βασική λειτουργία της ενεργής συσκευασίας τροφίμων είναι η αντιοξειδωτική δράση για την πρόληψη της οξειδωτικής αλλοίωσης των συσκευασμένων τροφίμων. Ως πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών, οι σπόροι σταφυλιού αποτελούν απόβλητα της βιομηχανίας οινοποίησης. Το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού (GSE) περιλαμβάνει πολυφαινολικές ενώσεις σε αφθονία για χρήση ως φυσικό αντιοξειδωτικό. Επιπλέον, το GSE έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής λόγω των πολυάριθμων πλεονεκτημάτων του για την υγεία. Επειδή είναι βρώσιμο και ασφαλές, το GSE είναι μια συναρπαστική επιλογή για μια ενεργή αντιοξειδωτική ένωση σε μεμβράνες συσκευασίας τροφίμων (Priyadarshi, και συν., 2021).

Η σκόνη πυρήνων σταφυλιού (GPP), ένα υποπροϊόν από τη διαδικασία οινοποίησης, χρησιμοποιήθηκε για να αντικαταστήσει το αλεύρι για τον εμπλουτισμό του ψωμιού σίτου.

Εξετάστηκαν οι ρεολογικές ιδιότητες των ζυμών ελέγχου και των ενισχυμένων ζυμών, μαζί με τα φυσικοχημικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά, την αντιοξειδωτική δράση και την αισθητηριακή ανάλυση του ληφθέντος ψωμιού. Η προσθήκη GPP επηρέασε τις ρεολογικές

ιδιότητες της ζύμης δημιουργώντας πιο ανθεκτικά και λιγότερο εκτατά προϊόντα. Όσον αφορά το ψωμί, οι τιμές του pH και ο όγκος των εμπλουτισμένων προϊόντων μειώθηκαν καθώς το επίπεδο συμπερίληψης GPP αυξήθηκε στη συνταγή. Οι συνολικές φαινολικές ενώσεις και η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων ψωμιού, αυξήθηκαν με την προσθήκη GPP. Επιπλέον, το επίπεδο συμπερίληψης GPP αύξησε τη συνολική περιεκτικότητα του ψωμιού σε διαιτητικές ίνες. Όσον αφορά την αισθητηριακή αξιολόγηση, η ενίσχυση GPP είχε σημαντικό αντίκτυπο στην οξύτητα, τη συνολική γεύση, τη στυφότητα και τη μυρωδιά του κρασιού των δειγμάτων ψωμιού χωρίς να επηρεάσει τη συνολική αποδοχή του ψωμιού. Τα τρέχοντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το GPP θα μπορούσε να είναι ένα ελκυστικό συστατικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή εμπλουτισμένου ψωμιού, καθώς είναι πηγή φυτικών ινών και πολυφαινολών με δυνητικά θετικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (Tolve, και συν., 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Μεθοδολογίες εκχύλισης- απομόνωσης φαινολικών(UAE,MAE,PLE)

Εκχύλιση ονομάζεται η διαδικασία απομόνωσης μίας ή περισσότερων ενώσεων από στερεά ή υγρά μίγματα. Η εκχύλιση πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλου διαλύτη. Το αρχικό μίγμα μπορεί να είναι είτε υγρό, είτε στερεό, είτε ακατέργαστο μείγμα μίας αντίδρασης. Η απομόνωση της επιθυμητής ουσίας γίνεται με στενή επαφή αυτής με το διαλύτη, ο οποίος τη διαλύει εκλεκτικά. Αναλόγως την κάθε περίπτωση, επιλέγεται και εφαρμόζεται και διαφορετική μέθοδος (Papaioannopoulos, 2016)

Οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων σε φυτικά υλικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις συμβατικές μεθόδους και τις μη συμβατικές μεθόδους. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης χαρακτηρίζονται κατά κύριο λόγο από τη χρήση διαλυτών μεγαλύτερου όγκου καθώς και από τη χρήση χειρωνακτικών διαδικασιών, που εξαρτώνται κυρίως από τον ερευνητή και απαιτούν ένταση εργασίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι συγκεκριμένες τεχνικές να μην είναι ιδανικά συνεπείς. Στην κατηγορία αυτή, οι πιο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού(SLE), η εκχύλιση Soxhlet, η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) και η διαβροχή. Ωστόσο λόγω των μειονεκτημάτων που παρουσιάζουν οι συμβατικές μέθοδοι, δημιουργήθηκε η επιτακτική ανάγκη για νέες μεθόδους, οι οποίες θα φέρουν νέες προκλήσεις. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη χρήση μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, οι οποίες δημιουργήθηκαν ώστε να καλύψουν τυχόν κενά που υπήρχαν στις συμβατικές μεθόδους. Στις μη συμβατικές μεθόδους, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνεται η υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση(MAE), η υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση (UAE), η υποβοηθούμενη από ένζυμο εκχύλιση(EAE) και η εκχύλιση υπό πίεση(PFE). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά στοιχεία, αυτές οι νέες μέθοδοι εκχύλισης φαίνεται να αποτελούν μεθόδους επιλογής συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, αφού προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα, στα οποία συγκαταλέγονται ο μικρότερος όγκος διαλύτη, οι υψηλότερες αποδόσεις, τα μειωμένα τοξικά υπολείμματα, η καλύτερη αναπαραγωγικότητα διεργασίας καθώς επίσης και ο μικρότερος χρόνος εκχύλισης (Alara, και συν., 2021).

2.1.1 Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE/ Microwave assisted extraction)

Όσον αφορά την εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων(MAE), αυτή περιλαμβάνει τη χρήση ενέργειας ακτινοβολίας μικροκυμάτων για τη θέρμανση του μίγματος διαλυμένης ουσίας-

διαλύτη. Η παραγόμενη θερμότητα διευκολύνει τη διάχυση των διαλυτών στο δείγμα για τη βελτίωση της διάχυσης των φυτοχημικών στόχων έξω από το δείγμα. Η διάχυση του διαλύτη μέσω του δείγματος, αυξάνει τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που το συγκρατούν, επιτρέποντας έτσι στις ενώσεις-στόχους να διαλυθούν στο υγρό εκχύλισης. Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με τη βοήθεια μικροκυμάτων είναι ο μικρότερος χρόνος και οι χαμηλοί όγκοι διαλυτών. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει βρεθεί χρήσιμη στην εκχύλιση πολυφαινολών βραχείας αλυσίδας όπως είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Ωστόσο, χρησιμοποιείται με μέτρο όταν εξετάζονται πολυφαινόλες όπως οι ανθοκυανίνες και οι τανίνες, λόγω της ευαισθησίας αυτών στη θερμότητα και της πιθανότητας καταστροφής τους. Η θερμοκρασία εκχύλισης κατά τη διάρκεια της μεθόδου είναι άμεση συνάρτηση του χρόνου και της ισχύος (βατ), αλλά σχετίζεται σε αντίστροφη αναλογία με τη μάζα του δείγματος και τη θερμική ικανότητα των διαλυτών. Οι κινητικές διάχυσης και εκχύλισης διαλυτών ευνοούνται όταν χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες και μικροί όγκοι δειγμάτων στη διαδικασία εκχύλισης με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Alara, και συν., 2021).

2.1.2 Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (UAE/ Ultra sound assisted extraction)

Η μέθοδος εκχύλισης με τη βοήθεια υπερήχων (UAE) αποτελεί μια εύκολη τεχνική εκχύλισης, η οποία χρησιμοποιεί την επαγόμενη μηχανική επίδραση μέσω του φαινομένου σπηλαίωσης, κατά το οποίο έκρηξη φυσαλίδων μικρού μεγέθους δίνει γρήγορη αποδιοργάνωση των ιστών, που διευκολύνει τη διάχυση φυτοχημικών από την ουσία στον διαλύτη. Αποτελεί μια απλή και χαμηλού κόστους μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη κλίμακα. Τον τελευταίο καιρό η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σημαντικά για την εξαγωγή πολυφαινολών από διαφορετικές πηγές. Στην πειραματική διαδικασία της μεθόδου απαιτείται γενικά η χρήση υπερήχων με εύρος συχνοτήτων μεταξύ 20 και 2000 kHz για την αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος. Σύμφωνα με διάφορες αναφορές, η συγκεκριμένη μέθοδος διασφαλίζει ταχύτερη και καλύτερη εκχύλιση πολυφαινολών με ελαχιστοποίηση της διάσπασης των ενώσεων σε σχέση με άλλες τεχνικές εκχύλισης. Βασιζόμενη σε ορισμένες αναφορές, αυτή η τεχνική φαίνεται να είναι λιγότερο δαπανηρή τόσο λόγω συμμετοχής μικρότερου όγκου διαλύτη και μεγαλύτερου όγκου δείγματος, όσο και λόγω μικρότερου χρόνου εκχύλισης. Διαπιστώθηκε επίσης, ότι ο μικρότερος χρόνος υπερήχων και οι χαμηλότερες θερμοκρασίες θα ενίσχυαν την εκχύλιση πολυφαινολών και τη διατήρηση των θερμοευαίσθητων ενώσεων. Ωστόσο, δεν είναι λίγες οι αναφορές που έχουν υπογραμμίσει ότι

περίοδοι υπερήχων μεγαλύτερες από 40 λεπτά σε υψηλότερο επίπεδο ενέργειας που είναι πάνω από 20 kHz θα μπορούσαν να επηρεάσουν σοβαρά τα φυτοχημικά που εξάγονται, λόγω του μειωμένου ρυθμού διάχυσης και της αυξημένης απόστασης διάχυσης. Αυτές οι συνθήκες θα μπορούσαν να διευκολύνουν πιθανές ακούσιες αλλαγές αλλά και την δημιουργία ελεύθερων ριζών στις εκχυλισμένες ενώσεις (Alara, και συν., 2021).

2.1.3 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurized liquid extraction)

Η τεχνική εκχύλισης υγρού υπό πίεση (PLE) αποτελεί μία από τις πιο σύγχρονες τεχνικές που αναπτύχθηκαν για την εξαγωγή φυτοχημικών. Απαιτεί τη χρήση τόσο υψηλής θερμοκρασίας όσο και υψηλής πίεσης. Η πίεση κυμαίνεται από 3.3 έως 20.3 MPa και η θερμοκρασία από 40 έως 200°C, για να διευκολύνεται η εκρόφιση και η διαλυτότητα των μορίων σε διαλύτες. Υποστηρίζεται πως η μέθοδος αυτή, εξασφαλίζει ταχεία διαδικασία εκχύλισης χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους διαλυτών. Επιπλέον, ενθαρρύνει την καλύτερη χρήση του νερού ως διαλύτη εκχύλισης, όπως η λεγόμενη υποκρίσιμη εξαγωγή νερού λόγω της εμπλοκής της υψηλής θερμοκρασίας.

Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, περίπου 200°C, πραγματοποιείται αλλαγή στις διηλεκτρικές ιδιότητες του νερού, καθιστώντας το να λειτουργεί ως τυπικός οργανικός διαλύτης, βελτιώνοντας έτσι την ικανότητα της εκχύλισης. Σύμφωνα με διάφορες έρευνες, μεταξύ των αναφερόμενων θετικών στοιχείων της μεθόδου, περιλαμβάνεται και η καθαρότητα των εκχυλισμάτων. Αυτό εξαλείφει και την ανάγκη για οποιοδήποτε στάδιο καθαρισμού. Ωστόσο, οι κύριοι περιορισμοί της εκχύλισης υπό πίεση, είναι η χαμηλή εκλεκτικότητα αναλυτών κατά την εκχύλιση, η παρουσία παρεμβολών κατά τη διαδικασία εκχύλισης, το υψηλό επίπεδο αραίωσης εκχυλισμάτων, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται αρκετοί αριθμοί κύκλων και η ανάγκη για προηγμένα όργανα που αποτελεί μια δαπανηρή διαδικασία. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η υγρή εκχύλιση υπό πίεση είναι μια κοινή μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται αρκετά για την εκχύλιση πολυφαινολών από διάφορες πηγές (Alara, και συν., 2021).

2.2 ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC)

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα προκειμένου να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε ενώσεις ή και ουσίες. Μερικές από αυτές είναι οι DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, οι οποίες αναλύονται περαιτέρω παρακάτω. Το σχετικά απλό πρωτόκολλο καθώς επίσης και τα αξιόπιστα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις περισσότερες

από αυτές τις μεθοδολογίες, έχουν αυξήσει τη δημοτικότητα μεταξύ των ερευνητών σε σχετικούς τομείς (Lorenzo, και συν., 2018).

2.2.1 DPPH

Το 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα που έχει ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο σθένους σε ένα άτομο γέφυρας αζώτου. Η σάρωση της ρίζας DPPH είναι η βάση της δημοφιλούς αντιοξειδωτικής ανάλυσης DPPH (Sharma, και συν., 2009). Η αρχή της μεθόδου του DPPH βασίζεται στην εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματος του στα 515nm κατά τη δέσμευση του από τα αντιοξειδωτικά (ΤΣΙΓΑΡΑ, 2017). Η μέθοδος στηρίζεται στη φασματοφωτομετρική μέτρηση των μεταβολών της συγκέντρωσης του DPPH, που προκύπτουν από την αντίδραση του DPPH με ένα αντιοξειδωτικό. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ενώσεων προσδιορίζονται από την κινητική αυτής της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της εξεταζόμενης ένωσης απλοποιείται συχνότερα με τη μέτρηση της συγκέντρωσης DPPH στην αρχή της αντίδρασης DPPH /αντιοξειδωτικού και μετά από ορισμένο χρόνο επώασης. Ο εφαρμοζόμενος χρόνος επώασης, κυμαίνεται συνήθως από 1 έως 60 λεπτά, ενώ ορισμένες δημοσιεύσεις αναφέρουν και 24ωρη επώαση. Θα πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι ένας σύντομος χρόνος επώασης συχνά δεν επαρκεί για να επιτευχθεί η σταθερή κατάσταση της αντίδρασης. Αν και η ρίζα DPPH αναγνωρίζεται ως σταθερή, τα πειραματικά αποτελέσματα επισημαίνουν την αργή εξαφάνισή της στο χρόνο. Συνεπώς, ο χρόνος επώασης δεν πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερος από τον χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η σταθερή κατάσταση (Dawidowicz, και συν., 2012). Η ανάλυση DPPH είναι γρήγορη, απλή, απαιτεί σχετικά απλό εξοπλισμό και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση πολλαπλών δειγμάτων (Lorenzo, και συν., 2018).

2.2.2 ABTS

Η μέθοδος ABTS μπορεί να εκτιμήσει το αντιοξειδωτικό δυναμικό τόσο των υδρόφιλων όσο και των υδρόφοβων αντιοξειδωτικών, είναι απλή και γρήγορη και δεν εξαρτάται από το pH του μέσου, αλλά ο χρόνος αντίδρασης εξαρτάται από την ένωση και η ρίζα ABTS δεν βρίσκεται φυσικά σε βιολογικά συστήματα (Lorenzo, και συν., 2018).

Σε αυτή τη δοκιμασία, το ABTS(2,2'-αζινοδις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)) (Dawidowicz, και συν., 2012) οξειδώνεται στο ριζικό κατιόν του (ABTS•+) με την προσθήκη

υπερθειϊκού καλίου. Αυτό το ριζικό κατιόν έχει μπλε χρώμα και απορροφά το φως στα 415,645,734 και 815 nm. Το κατιόν της ρίζας ABTS αντιδράει με τα περισσότερα αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, των υδροξυκιναμικών, των καροτενοειδών και των αντιοξειδωτικών του πλάσματος. Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης, το μπλε ριζικό κατιόν ABTS αποχρωματίζεται, μετατρέπεται δηλαδή και πάλι στην άχρωμη ουδέτερη μορφή του. Η αντίδραση μπορεί να παρακολουθηθεί φασματοφωτομετρικά. Αυτή η ανάλυση αναφέρεται συχνά ως δοκιμασία ισοδύναμης αντιοξειδωτικής ικανότητας Trolox(TEAC). Η αντιδραστικότητα των διαφόρων αντιοξειδωτικών που δοκιμάζονται συγκρίνεται με αυτή του TROLOX, το οποίο είναι ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E (Re, και συν., 1999).

2.2.3 FRAP

Η ανάλυση FRAP θεωρείται ως μια απλή, χαμηλού κόστους και στιβαρή διαδικασία (Lorenzo, και συν., 2018). Η ανάλυση FRAP(Ferric Reducing Ability of Plasma) (Benzie, και συν., 1996), η οποία αναφέρεται στην αναγωγική ισχύ μείωσης του σιδήρου, είναι διαφορετική από τις παραπάνω μεθόδους, καθώς σε αυτήν δεν εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, παρακολουθείται η αναγωγή του τρισθενή σιδήρου(Fe^{3+}) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}). Η αναγωγή αυτή, σε χαμηλό pH, προκαλεί το σχηματισμό ενός έγχρωμου συμπλόκου σιδήρου-τριπυριδυλτριαζίνης. Οι τιμές FRAP λαμβάνονται συγκρίνοντας την αλλαγή απορρόφησης στα 593nm, σε μίγματα αντίδρασης δοκιμής, με εκείνα που περιέχουν ιόντα σιδήρου σε γνωστή συγκέντρωση. Οι αλλαγές απορρόφησης είναι γραμμικές σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων με μείγματα αντιοξειδωτικών, συμπεριλαμβανομένου του πλάσματος, και με διαλύματα που περιέχουν ένα αντιοξειδωτικό σε καθαρή μορφή. Δεν υπάρχει εμφανής αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών. Η ανάλυση FRAP προσφέρει έναν υποτιθέμενο δείκτη αντιοξειδωτικών ή μειωτικών δυνατοτήτων βιολογικών υγρών εντός της τεχνολογικής εμβέλειας κάθε εργαστηρίου και ερευνητή που ενδιαφέρεται για το οξειδωτικό στρες και τις επιπτώσεις του. (Floegel, και συν., 2011).

Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι αρχικά η ευαισθησία στην ένωση που δίνει ηλεκτρόνια. Επίσης μπορεί να βγουν ανακριβή αποτελέσματα για δείγματα μολυσμένα με Fe (III) και τέλος, μπορεί να υπάρξει έλλειψη αντιδραστικότητας με αντιοξειδωτικά μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (Lorenzo, και συν., 2018).

2.2.4 CUPRAC

Η δοκιμασία μείωσης αναγωγικής ικανότητας χαλκού (CUPRAC/ Cupric Reducing Antioxidant Capacity) βασίζεται στη μέτρηση απορρόφησης της ένωσης χαλκού Cu(I)-νεοκουπροΐνης(Nc), η οποία σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της αντίδρασης οξειδοαναγωγής, αντιοξειδωτικών που διασπών την αλυσίδα, Cu(II)- Nc με το αντιδραστήριο CUPRAC. Γενικά, στις μεθόδους που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η μέθοδος CUPRAC, μετράται η ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να μειώσει ένα οξειδωτικό, το οποίο αλλάζει χρώμα όταν μειώνεται. Η απορρόφηση καταγράφεται στα 450nm.(μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης φωτός) (Özyürek, και συν., 2011).

Αυτή η μέθοδος προσφέρει ευδιάκριτα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους προσδιορισμούς που βασίζονται σε μεταφορά ηλεκτρονίων. Αρχικά, είναι εφικτή η επιλογή του pH εργασίας σε φυσιολογικό pH. Παράλληλα, υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου τόσο σε υδρόφιλα όσο και σε λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Τέλος, συμβάλλει στην ολοκλήρωση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων για τα περισσότερα κοινά φλαβονοειδή, ενώ προσφέρει επίσης και εκλεκτική οξείδωση αντιοξειδωτικών ενώσεων χωρίς να επηρεάζονται τα σάκχαρα και το κιτρικό οξύ που συνήθως περιέχονται στα τρόφιμα (Aparak, και συν., 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Αντιοξειδωτικές δράσεις των φαινολικών από φλοιό και γίγαρτο σταφυλιού

Οι φλοιοί και τα γίγαρτα σταφυλιού αποτελούν σημαντικές πηγές αντιοξειδωτικής δράσης. Μέχρι σήμερα, δεν είναι λίγες οι έρευνες που έχουν γίνει πάνω στη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των συστατικών αυτών. Μερικές από αυτές αναφέρονται παρακάτω.

Σε μια έρευνα, στην οποία εξετάστηκαν επτά ποικιλίες επιτραπέζιου σταφυλιού της Ιταλίας, γίγαρτα και φλοιοί εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν, ως προς τα φαινολικά τους προφίλ και τις αντιοξειδωτικές τους δράσεις.

Ο Πίνακας 1 περιέχει τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής δράσης των δερμάτων και των σπόρων.

Όσον αφορά την ικανότητα σάρωσης ριζών DPPH, στα δέρματα των λευκών σταφυλιών, ανιχνεύθηκε η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στις ποικιλίες Baresana και Italia, ενώ η κόκκινη ποικιλία Crimson Seedless εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ιδιότητα μεταξύ όλων των εξεταζόμενων σταφυλιών. Όσον αφορά τους σπόρους, η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίστηκε στις ποικιλίες Italia και Michele Palieri σε λευκά και κόκκινα σταφύλια, αντίστοιχα. Όσον αφορά την αναστολή του σχηματισμού του κατιόντος της ρίζας ABTS, ανάμεσα στα λευκά σταφύλια, η υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα ανιχνεύθηκε σε δέρματα Baresana και σπόρους Italia. Από τα κόκκινα σταφύλια προβλήθηκαν οι καλύτερες επιδόσεις από τα Crimson Seedless skins και τους Red Globe seeds.

Μεταξύ φλοιών και σπόρων, οι τελευταίοι εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, εξαιτίας του υψηλότερου φαινολικού περιεχομένου τους σε σχέση με τους φλοιούς, καθώς επίσης και εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων προανθοκυνιδινών, φλαβονοειδή γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Baiano, και συν., 2011).

	white grapes				red/black grapes		
	Baresana	Italia	Pizzutello	Thompson Seedless	Crimson Seedless	Michele Palieri	Red Globe
	Skins						
DPPH	61.5 ± 3.5 c ^c (7%) ^d	58.2 ± 6.4 c (12%)	84.9 ± 10.6 b (13%)	153.8 ± 19.3 a (12%)	54.5 ± 11.4 c (21%)	61.3 ± 3.0 b (5%)	66.9 ± 11.3 a (18%)
ABTS	53.3 ± 8.5 c (17%)	64.5 ± 11.6 b (19%)	199.4 ± 3.4 a (13%)	205.4 ± 23.0 a (12%)	49.6 ± 8.8 c (19%)	95.1 ± 14.4 b (16%)	132.7 ± 16.4 a (13%)
	Seeds						
DPPH	21.3 ± 3.6 a (18%)	15.3 ± 0.9 c (7%)	19.3 ± 2.5 b (14%)			14.6 ± 1.1 b (8%)	20.6 ± 1.6 a (9%)
ABTS	32.8 ± 5.6 a (18%)	17.3 ± 1.4 c (8%)	25.2 ± 2.6 b (11%)			20.3 ± 2.2 a (11%)	11.7 ± 0.6 b (6%)

Πίνακας 1

Σε μία άλλη έρευνα, μελετήθηκαν οι σπόροι και οι φλοιοί σταφυλιών επτά διαφορετικών ερυθρών ποικιλιών της Γαλλίας, όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση. Οι ποικιλίες ήταν οι Grenache, Syrah, Carignan Noir, Mourvèdre, Counoise και Alicante Bouchet. Από τις παραπάνω ποικιλίες οι ποικιλίες Alicante και Syrah αποδείχθηκαν οι ποικιλίες που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την πιθανή ανάπτυξη τους για διατροφικούς σκοπούς. Με βάση την έρευνα, οι σπόροι εμφάνισαν και σε αυτή την περίπτωση υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, σε σχέση με τους φλοιούς (Ky, και συν., 2014).

4. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη του σταφυλιού της ποικιλίας Λημνιό, όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση τόσο του φλοιού όσο και των γιγάρτων αυτού, μέσω της αντιοξειδωτικής δοκιμασίας ABTS.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκε φλοιός και γίγαρτο από μια Ελληνική κόκκινη ποικιλία σταφυλιών, τη γνωστή ποικιλία Λημνιό.

5.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

1. Φλοιός από τη ποικιλία Λημνιό
2. Γίγαρτο από τη ποικιλία Λημνιό
3. Διαλύτης εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων: $\text{CH}_3\text{OH (M):H}_2\text{O(W):/CH}_3\text{COOH}$; 80:20:1; v/v/v)
4. Μεθανόλη (CH_3OH)

5.1.2 Όργανα και εξοπλισμός

1. Ζυγός ακριβείας
2. Κωνικές φιάλες
3. Ποτήρια ζέσεως
4. Ογκομετρικές φιάλες
5. Υάλινα χωνιά
6. Γυάλινη ράβδος
7. Αλουμινένια σκεύη
8. Φούρνος ξήρανσης
9. Μικροφιαλίδια πολυπροπυλενίου με πάμα των 2,0 Μl

5.1.3 Παραλαβή εκχυλίσματος από φλοιό

Για την παραλαβή του εκχυλίσματος των φλοιών, αρχικά έγινε διαχωρισμός των φλοιών των σταφυλιών, από κάθε ρώγα σταφυλιού ,χειρωνακτικά. Στη συνέχεια, το σύνολο των φλοιών ζυγίστηκαν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας και σημειώθηκε το συνολικό βάρος τους, το οποίο ήταν 14,4g. Οι φλοιοί που ζυγίστηκαν και παραλήφθηκαν, χωρίστηκαν σε 3 τμήματα και τοποθετήθηκαν σε αλουμινένια σκεύη και έπειτα στο φούρνο για ξήρανση. Μετά το πέρα της ξήρανσης, ακολούθησε άλεση των φλοιών και καταγράφηκε το βάρος τους σε σκόνη, το οποίο ήταν συνολικά 10g. Έπειτα, ποσότητα ίση με 1g των αλεσμένων φλοιών, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα ενώ ακολούθησε και προσθήκη ποσότητας 20 ml του διαλύματος $\text{MeOH/W/CH}_3\text{COOH}$. Για την εκχύλιση των φαινολικών των φλοιών, εφαρμόστηκε η μέθοδος εκχύλισης φαινολικών με τη βοήθεια υπερήχων UAE (ultra sound assisted extraction). Για το σκοπό αυτό, το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων. Ο χρόνος παραμονής στο λουτρό ήταν στα 30 λεπτά, η θερμοκρασία στους 50°C και η συχνότητα στα 37kHz. Μετά την εκχύλιση το δείγμα τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο, στα 2000g για 15 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησε διαχωρισμός

του υγρού εναιωρήματος από το στερεό. Από το υγρό εναιώρημα μεταφέρθηκαν 1800 μL σε 5 διαφορετικά σωληνάκια. Αυτό που περίσσεψε μεταφέρθηκε σε διαφορετικό σωλήνα.

5.1.4 Παραλαβή εκχυλίσματος από γίγαρτο

Αντίστοιχα, στην περίπτωση των γιγάρτων, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια. Έγινε διαχωρισμός των γιγάρτων από τις ρώγες των σταφυλιών χειρωνακτικά. Στη συνέχεια το σύνολο των γιγάρτων ζυγίστηκε με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας και σημειώθηκε το συνολικό βάρος τους το οποίο ήταν 10,36g. Τα γίγαρτα που ζυγίστηκαν και παραλήφθηκαν, χωρίστηκαν σε 3 τμήματα και τοποθετήθηκαν σε αλουμινένια σκεύη και έπειτα στο φούρνο για ξήρανση. Μετά το πέρας της ξήρανσης, ακολούθησε άλεση των γιγάρτων και καταγράφηκε το βάρος τους σε σκόνη, το οποίο ήταν συνολικά 7,36 g. Έπειτα, ποσότητα ίση με 1g των αλεσμένων γιγάρτων, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα ενώ ακολούθησε και προσθήκη ποσότητας 20 ml του διαλύματος $\text{MeOH}/\text{W}/\text{CH}_3\text{COOH}$. Για την εκχύλιση των φαινολικών των γιγάρτων, εφαρμόστηκε η μέθοδος εκχύλισης φαινολικών με τη βοήθεια υπερήχων UAE (ultra sound assisted extraction). Για το σκοπό αυτό το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων. Ο χρόνος παραμονής στο λουτρό ήταν στα 30 λεπτά, η θερμοκρασία στους 50°C και η συχνότητα στα 37kHz. Μετά την εκχύλιση το δείγμα τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο, στα 2000g για 15 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησε διαχωρισμός του υγρού εναιωρήματος από το στερεό. Από το υγρό εναιώρημα μεταφέρθηκαν 1800 μL σε 5 διαφορετικά σωληνάκια. Αυτό που περίσσεψε μεταφέρθηκε σε διαφορετικό σωλήνα.

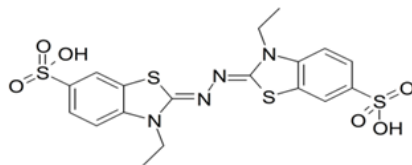
5.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία του 2,2'-αζινο-δισ-[3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]; ABTS)

5.2.1 Σκοπός

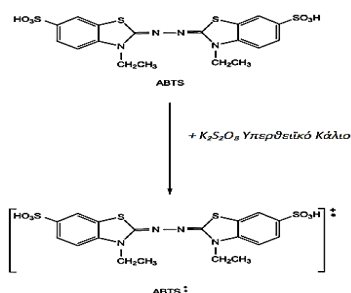
Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης ελεύθερης ρίζας.

5.2.2 Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου του ABTS (2,2'-αζινο δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος) βασίζεται στην οξειδωσή του προς ριζικό κατιόν με υπερθειικά ιόντα με βαθύ κυανοπράσινο χρώμα που απορροφά ισχυρά στα 734 nm, και στον ακόλουθο αποχρωματισμό αυτού υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών.



Σχήμα 1: δομή αντιδραστήριου ABTS



Σχήμα 2: σχηματισμός σταθερών ριζών ABTS από ABTS με υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$)

Η ποσότητα του ριζικού κατιόντος $ABTS^{\bullet+}$ που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες του δείγματος, εκφράζεται συνήθως σε ισοδύναμα Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchoman-2-carboxylic acid) και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Roginsky & Lissi, 2004).

Το $ABTS^{\bullet+}$ μπορεί να παραχθεί είτε από χημική αντίδραση [π.χ. με διοξειδίο μαγγανίου (MnO_2), με υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$) ή από ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. μεθμυσοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη)].

Γενικά, η χημική αντίδραση απαιτεί πολύ χρόνο (μέχρι και 16 ώρες για την παραγωγή υπερθειικού καλίου) ή υψηλές θερμοκρασίες, ενώ οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι ταχύτερες και οι συνθήκες αντίδρασης ηπιότερες.

Η μέγιστη απορρόφηση του $ABTS^{\bullet+}$ αποδείχτηκε ότι είναι σε μήκη κύματος 415, 645, 734 και 815nm. Τα μήκη κύματος, τα οποία επιλέχτηκαν από τους περισσότερους ερευνητές για να ελέγξουν φασματοφωτομετρικά την αντίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και του $ABTS^{\bullet+}$ είναι 415 και 734nm.

Οι πιο πρόσφατες αναθεωρημένες μέθοδοι μετρούν την μείωση της απορροφητικότητας του $ABTS^{\bullet+}$ παρουσία του προς εξέταση δείγματος ή του πρότυπου αντιδραστήριου Trolox σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα 4-6min και έπειτα η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται σε ισοδύναμα Trolox (Prior et al., 2005).

5.2.3 Υλικά και αντιδραστήρια

1. Πυκνό διάλυμα $ABTS(2,2'$ -αζινο δις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο) – 6 σουλφονικού οξέος) (M.W.:514.62 g/mol)
2. Υπερκάθαρο νερό
3. Υπό μελέτη δείγματα

5.2.4 Όργανα και εξοπλισμός

1. Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου 0,5-5 mL
2. Αυτόματες πιπέτες σταθερού όγκου 1000 μ L και 100 μ L
3. Υδροβολέας
4. Φασματοφωτόμετρο (734nm)
5. Σωλήνας πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50 mL

5.2.5 Παρασκευή διαλυμάτων

5.2.5.1 Παρασκευή διαλύματος φύλαξης ριζικού κατιόντος ABTS

Σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL τοποθετούνται 20 mL dH₂O και προστίθενται 0,1801 g ABTS (m.w: 514,62 g/mol) και 0,0331 g K₂S₂O₈ (m.w: 270,322 g/mol). Ακολουθεί ανάδευση έως διαλυτοποίησης και στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 50,0 ml για να δώσει συγκέντρωση 7 mM σε ABTS και 2,45 mM σε K₂S₂O₈. Το μίγμα που δημιουργείται διατηρείται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 16h, ώστε να προκύψει βαθύ κυανό διάλυμα. Στη συνέχεια αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40°C

5.2.5.2 Παρασκευή διαλύματος εργασίας ριζικού κατιόντος ABTS

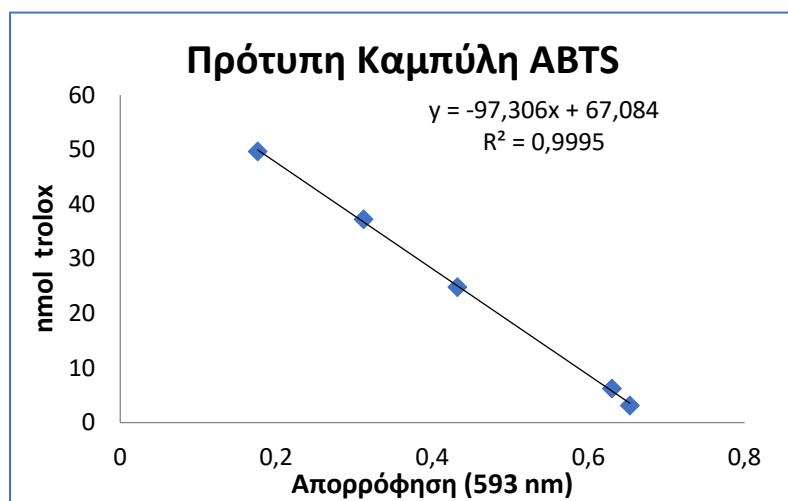
Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50 mL, τοποθετούμε 49,5mL υπερκάθαρο νερό και 0,5 mL διαλύματος φύλαξης ριζικού κατιόντος του ABTS. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm, η οποία θα πρέπει να βρίσκεται σε τιμή κοντά στο 0,700.

5.2.6 Πειραματική πορεία

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλισμάτων και εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου, εφόσον απαιτείται.
2. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ανά 30 sec 1000 μ l διαλύματος εργασίας του ριζικού κατιόντος του ABTS(ABTS⁺) και ακολουθεί ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Στη συνέχεια τα δείγματα επώζονται σε σκοτεινό μέρος για 15 min ακριβώς.
3. Μετά τα 15 min της επώασης ακολουθεί καταγραφή της απορρόφησης των δειγμάτων στα 734 nm.
4. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς Trolox και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox.

5.2.7 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 3 , 6 , 12,5 , 25, 37 και 50 nmol Trolox.



Διάγραμμα: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας ABTS

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

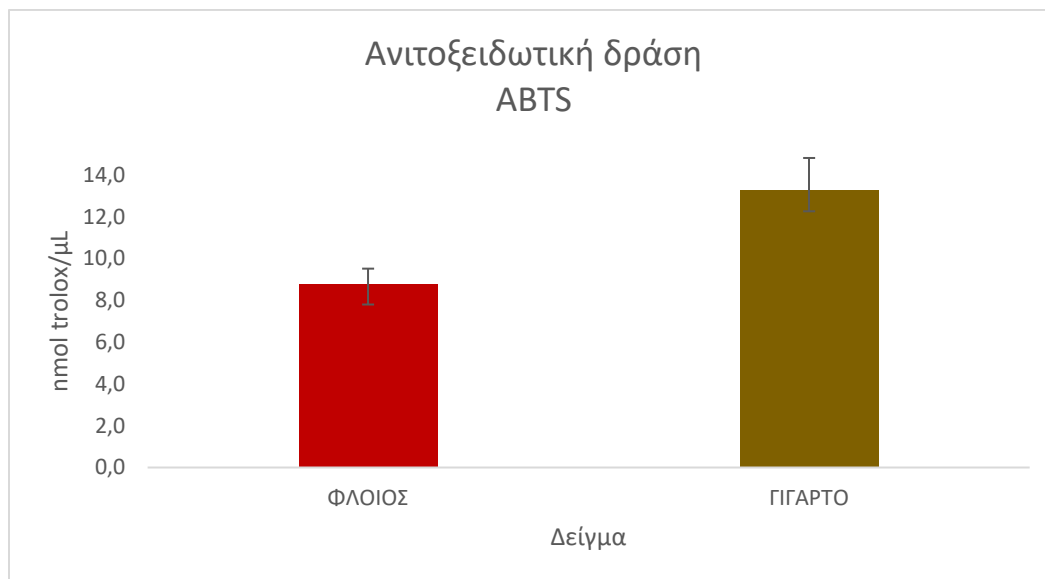
6.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας φλοιού και γιγάρτου μέσω της δοκιμασίας ABTS

Η αντιοξειδωτική δράση τόσο του φλοιού όσο και του γιγάρτου, μέσω της δοκιμασίας ABTS, εκφράστηκε ως ισοδύναμα Trolox. Ο υπολογισμός έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς Trolox. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) παρουσιάζονται οι τιμές των αποτελεσμάτων των δειγμάτων, εκχυλίσματος φλοιού και εκχυλίσματος γιγάρτου που χρησιμοποιήθηκαν, εκφρασμένες ως ισοδύναμα Trolox(nmol).

	ΦΛΟΙΟΣ		ΓΙΓΑΡΤΟ	
nmol trolox/uL	8,026048	9,357442	11,82098	14,53412
	8,70719	9,31852	11,56799	14,8455
	7,889819	9,552054	12,22967	14,65089

Πίνακας 2 Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS

Με βάση τις παραπάνω τιμές δημιουργήθηκε το γράφημα που παρουσιάζεται παρακάτω (εικόνα 1). Στο γράφημα γίνεται αναπαράσταση της αντιοξειδωτικής δράσης του φλοιού και του γιγάρτου, εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox.



Εικόνα 5 Γράφημα αντιοξειδωτικής δράσης φλοιού και γιγάρτου

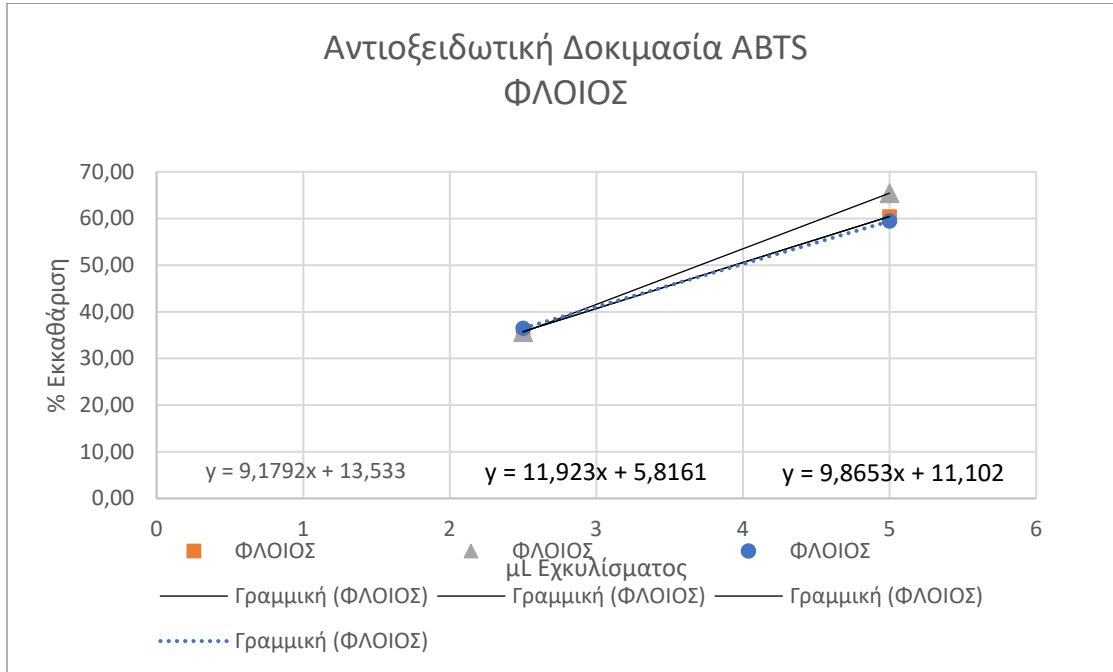
6.2 Προσδιορισμός % εκκαθάρισης ABTS από φλοιό και γιγάρτο

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν το ποσοστό εκκαθάρισης της ρίζας ABTS τόσο από φλοιό όσο και από γιγάρτο σταφυλιού, χρησιμοποιώντας και στις δύο περιπτώσεις 5μL και 2,5 μL εκχυλίσματος από το καθένα.

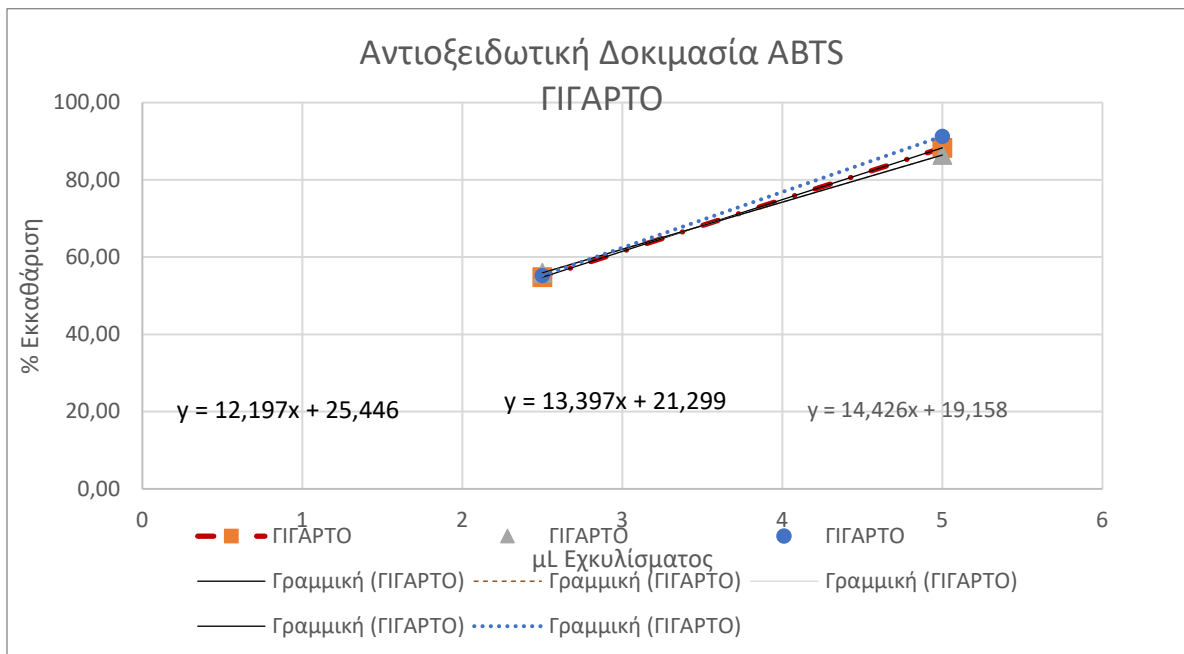
ΦΛΟΙΟΣ		ΓΙΓΑΡΤΟ	
5μL	2,5μL	5μL	2,5μL
% Εκκαθάριση	% Εκκαθάριση	% Εκκαθάριση	% Εκκαθάριση
60,43	35,77	88,29	54,79
65,43	35,62	86,43	55,94
59,43	36,48	91,29	55,22

Πίνακας 3 Αποτελέσματα % εκκαθάρισης ABTS από φλοιό και γιγάρτο

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα δημιουργήθηκαν τα γραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω (εικόνα 2 και 3). Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται το γράφημα που αφορά την εκκαθάριση ABTS από φλοιό, ενώ στην εικόνα 3 παρουσιάζεται το γράφημα που αφορά την εκκαθάριση ABTS από γίγαρτο.



Εικόνα 6 Γραφική αναπαράσταση της εκκαθάρισης ABTS από φλοιό



Εικόνα 7 Γραφική αναπαράσταση της εκκαθάρισης ABTS από γίγαρτο

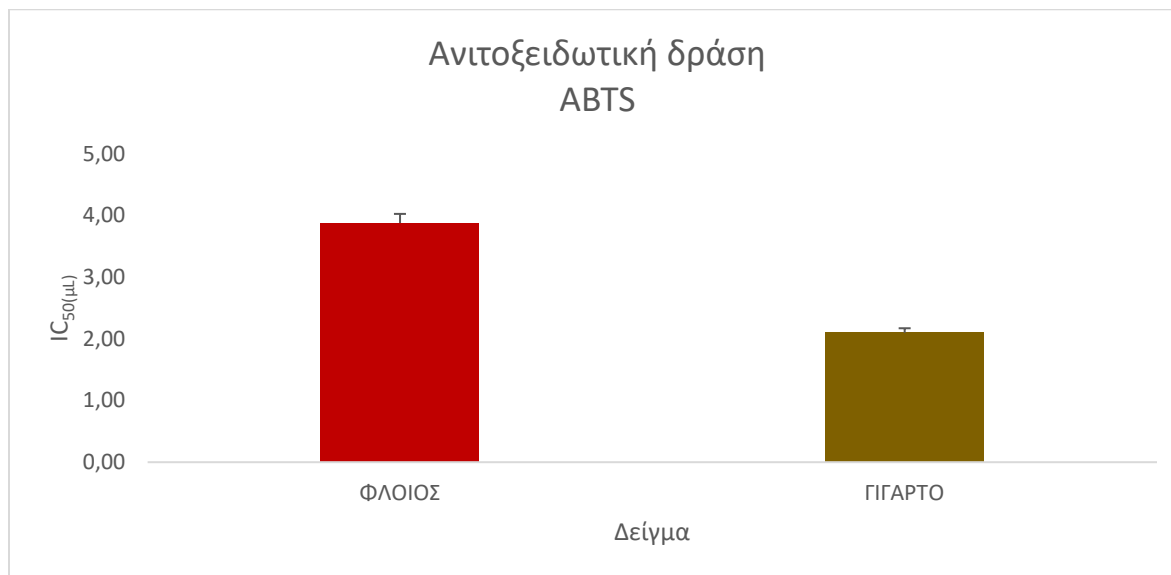
6.3 Προσδιορισμός IC₅₀

Βάση των αποτελεσμάτων που αναγράφονται στους πίνακες 2 και 3 αλλά και της πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox για την δοκιμασία ABTS, υπολογίστηκε η ποσότητα Trolox (nmol) που αντιστοιχεί στα μL εκχυλίσματος που απαιτήθηκαν για το κάθε δείγμα, για 50% δέσμευση της ρίζας ABTS.(IC₅₀). Τα αποτελέσματα καταγράφονται παρακάτω(πίνακας 4).

ΦΛΟΙΟΣ (μL)		ΓΙΓΑΡΤΟ (μL)	
IC ₅₀	3,95	IC ₅₀	2,14
IC ₅₀	3,71	IC ₅₀	2,01
IC ₅₀	3,97	IC ₅₀	2,14

Πίνακας 4 Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS (IC₅₀)

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά δημιουργήθηκε το γράφημα που αναπαρίσταται στην εικόνα 4, στο οποίο παρουσιάζεται γραφικά η ποσότητα του φλοιού και του γιγάρτου που απαιτείται για να επιτευχθεί 50 τοις εκατό εκκαθάριση του ABTS.



Εικόνα 8 Γραφική αναπαράσταση ABTS (IC₅₀)

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη μελέτη υποδεικνύει πως τόσο ο φλοιός όσο και το γίγαρτο σταφυλιού της ποικιλίας Λημνιό εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες. Παρακάτω παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που βγήκαν με βάση τα αποτελέσματα που αναφέρονται στο κεφάλαιο 6.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στην εικόνα 5, συμπεραίνεται πως το γίγαρτο του σταφυλιού της ποικιλίας Λημνιό εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το φλοιό αυτού.

Όσον αφορά την % εκκαθάριση του ABTS, παρατηρείται πως και πάλι το γίγαρτο εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τον πίνακα 3, βλέπουμε πως χρησιμοποιώντας 2,5 μL εκχυλίσματος φλοιού, επιτυγχάνεται περίπου 35 % εκκαθάριση ABTS, ενώ αντίστοιχα για το γίγαρτο η % εκκαθάριση βρίσκεται περίπου στο 55%. Όταν μάλιστα, χρησιμοποιούνται 5 μL εκχυλίσματος φλοιού, η % εκκαθάριση αυξάνεται περίπου στο 60 %, ενώ αντίστοιχα για το γίγαρτο η % εκκαθάριση φτάνει έως και το 91%.

Τέλος, όσον αφορά το IC₅₀, για άλλη μια φορά το γίγαρτο εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα. Ουσιαστικά, το IC₅₀ εκφράζει την ποσότητα του εκχυλίσματος φλοιού και γιγάρτου, που απαιτείται για τη εκκαθάριση του ABTS σε ποσοστό 50%. Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 4, απαιτείται μικρότερη ποσότητα γιγάρτου για την 50 % εκκαθάριση του ABTS σε σχέση με το φλοιό. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το γίγαρτο εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως και το γίγαρτο αλλά και ο φλοιός του σταφυλιού της ποικιλίας Λημνιό, εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, με το γίγαρτο να εμφανίζει την υψηλότερη, πράγμα το οποίο πιθανότατα δικαιολογείται από την παρουσία των προκυανιδινών στα γίγαρτα. Αυτό, οδηγεί στην όλο και μεγαλύτερη ανάγκη αξιοποίησής τους. Με δεδομένο, μάλιστα, πως και τα δύο αποτελούν παραγόμενα υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία οиноποίησης, η ανάγκη αυτή γίνεται ακόμα μεγαλύτερη. Η αξιοποίησή τους θα μπορούσε να αφορά συμπληρώματα διατροφής ή και εμπλουτισμό τροφίμων. Έτσι, εκχυλίσματα γιγάρτων και

φλοιών, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μέρος της διατροφής μας, προάγοντας την υγεία μας και δρώντας προστατευτικά έναντι χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Βιβλιογραφία

Alara, Oluwaseun Ruth, Abdurahman, Nour Hamid και Ukaegbu, Chinonso Ishamel. 2021. *Extraction of phenolic compounds: A review.* 2021. σσ. 200-214. 26659271.

Apak, Reşat, και συν. 2007. *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay.* 2007. σσ. 1496-1547. 1420-3049.

Baiano, Antonietta και Terracone, Carmela. 2011. *Varietal Differences among the Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Seven Table Grape Cultivars Grown in the South of Italy Based on Chemometrics.* 2011. σσ. 9815-9826. 0021-8561.

Benzie, Iris F.F. και Strain, J.J. 1996. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay.* 1996. σσ. 70-76. 00032697.

Brainina, Khiena, Stozhko, Natalia και Vidrevich, Marina. 2019. *Antioxidants: Terminology, Methods, and Future Considerations.* 2019. σ. 297. 2076-3921.

D Harikedua, Silvana. 2018. *Should Reactive Oxygen Species (ROS) in Human Body be Controlled with Antioxidant Supplement?* 2018. 26386070.

Dawidowicz, Andrzej L., Wianowska, Dorota και Olszowy, Małgorzata. 2012. *On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity).* 2012. σσ. 1037-1043. 03088146.

Fernández-Fernández, Adriana Maite, και συν. 2022. *Tannat Grape Skin: A Feasible Ingredient for the Formulation of Snacks with Potential for Reducing the Risk of Diabetes.* 2022. σ. 419. 2072-6643.

Floegel, Anna, και συν. 2011. *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.* 2011. σσ. 1043-1048. 08891575.

GÜNEŞ BAYIR, Ayşe, AKSOY, Ayşe Nur και KOÇYİĞİT, Abdurrahim. 2019. *The Importance of Polyphenols as Functional Food in Health.* 2019. σσ. 157-163. 2148-2373.

Kumar, Suresh, Sharma, Sunil και Vasudeva, Neeru. 2017. *Review on antioxidants and evaluation procedures.* 2017. 1672-0415.

Ky, Isabelle, και συν. 2014. *Wine by-Products: Phenolic Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Grapes and Grape Pomaces from Six Different French Grape Varieties.* 2014. σσ. 482-506. 1420-3049.

Lorenzo, Jose M., και συν. 2018. *Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review.* 2018. σσ. 136-147. 09242244.

- Luzio, A., και συν. 2021.** *Phytochemical screening and antioxidant activity on berry, skin, pulp and seed from seven red Mediterranean grapevine varieties (Vitis vinifera L.) treated with kaolin foliar sunscreen.* 2021. σ. 109962. 03044238.
- Manach, Claudine, και συν. 2004.** *Polyphenols: food sources and bioavailability.* 2004. σσ. 727-747. 0002-9165.
- Milinčić, Danijel D., και συν. 2021.** *Skimmed Goat's Milk Powder Enriched with Grape Pomace Seed Extract: Phenolics and Protein Characterization and Antioxidant Properties.* 2021. σ. 965. 2218-273X.
- Mora-Garrido, Ana Belén, και συν. 2022.** *Revalorization of residues from the industrial exhaustion of grape by-products.* 2022. σ. 113057. 00236438.
- Moure, Andrés, και συν. 2001.** *Natural antioxidants from residual sources.* 2001. σσ. 145-171. 03088146.
- Multescu, Mihaela, και συν. 2022.** *Byproducts (Flour, Meals, and Groats) from the Vegetable Oil Industry as a Potential Source of Antioxidants.* 2022. σ. 253. 2304-8158.
- Özyürek, Mustafa, και συν. 2011.** *A comprehensive review of CUPRAC methodology.* 2011. σ. 2439. 1759-9660.
- PANAGOPOULOS. 2015.** ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ. 2015.
- Pandey, Kanti Bhooshan και Rizvi, Syed Ibrahim. 2009.** *Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease.* 2009. σσ. 270-278. 1942-0900.
- Papaoikonomou. 2016.** ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΦΛΟΙΟΥΣ ΡΟΔΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ ΠΑΠΑΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΛΥΓΕΡΗΣ. 2016.
- Pérez-Álvarez, Eva P., και συν. 2021.** *Effects of Water Deficit Irrigation on Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Monastrell Grapes under Semiarid Conditions.* 2021. σ. 1301. 2076-3921.
- Pinelo, Manuel, Arnous, Anis και Meyer, Anne S. 2006.** *Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release.* 2006. σσ. 579-590. 09242244.
- Preiser, Jean-Charles. 2012.** *Oxidative Stress.* 2012. σσ. 147-154. 0148-6071.
- Priyadarshi, Ruchir, Kim, Se-Mi και Rhim, Jong-Whan. 2021.** *Carboxymethyl cellulose-based multifunctional film combined with zinc oxide nanoparticles and grape seed extract for the preservation of high-fat meat products.* 2021. σ. e00325. 22149937.
- Re, Roberta, και συν. 1999.** *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* 1999. σσ. 1231-1237. 08915849.
- Ribeiro, Leomara Floriano, και συν. 2022.** *Exploratory analysis of bioactive compounds and antioxidant potential of grape (Vitis vinifera) pomace.* 2022. σ. e56934. 1806-2563.

- Scalbert, Augustin, Johnson, Ian T και Saltmarsh, Mike. 2005.** *Polyphenols: antioxidants and beyond*. 2005. σσ. 215S-217S. 0002-9165.
- Sharma, Om P. και Bhat, Tej K. 2009.** *DPPH antioxidant assay revisited*. 2009. σσ. 1202-1205. 03088146.
- Shi, John, και συν. 2003.** *Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality*. 2003. σσ. 291-299. 1096-620X.
- Silva, Francieli Araújo, και συν. 2022.** *Incorporation of phenolic-rich ingredients from integral valorization of Isabel grape improves the nutritional, functional and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt*. 2022. σ. 130957. 03088146.
- Simchuer, Wilaiwan, Motham, Phongsathorn και Srihanam, Prasong. 2022.** *Determination of Wild Grape Phenolic Compounds in the Extracts of Winemaking Byproducts and Their Antioxidant Competency*. 2022. σσ. 131-136. 10288880.
- Tekos, Fotios, και συν. 2021.** *Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties of Red and White Wine Extracts In Vitro*. 2021. σ. 436. 2218-1989.
- Tolve, Roberta, και συν. 2021.** *Wheat Bread Fortification by Grape Pomace Powder: Nutritional, Technological, Antioxidant, and Sensory Properties*. 2021. σ. 75. 2304-8158.
- Young, I S. 2001.** *Antioxidants in health and disease*. 2001. σσ. 176-186. 00219746.
- ΤΣΙΓΑΡΑ, ΚΑΚΑΡΙΔΗ. 2017.** *Πανεπιστήμιο Αιγαίου Σχολή Περιβάλλοντος Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης φλοιού σταφυλιού της ποικιλίας Λημνιό ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ Των ΤΣΙΓΑΡΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΚΑΚΑΡΙΔΗ ΜΑΡΙΑ. 2017.*

