



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης και των φαινολικών συστατικών σε διαφορετικές ποικιλίες ροδιών (*Punica granatum* L.) και οίνους με φασματοφωτομετρικές μεθόδους, GC-MS και HPLC-PDA-ESI-MSⁿ τεχνικές ανάλυσης



Δήμητρα Ζ. Λαντζουράκη
Χημικός

Αθήνα
Απρίλιος 2014



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης και των φαινολικών συστατικών σε διαφορετικές ποικιλίες ροδιών (*Punica granatum* L.) και οίνους με φασματοφωτομετρικές μεθόδους, GC-MS και HPLC-PDA-ESI-MSⁿ τεχνικές ανάλυσης



Δήμητρα Ζ. Λαντζουράκη
Χημικός

Αθήνα
Απρίλιος 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης και των φαινολικών συστατικών
σε διαφορετικές ποικιλίες ροδιών (*Punica granatum* L.) και σε οίνους
με φασματοφωτομετρικές μεθόδους, GC-MS και HPLC-PDA-ESI-MSⁿ
τεχνικές ανάλυσης

Δήμητρα Ζ. Λαντζουράκη

A.M.: 51107

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Χαράλαμπος Προεστός, Λέκτορας ΕΚΠΑ

Τριμελής εξεταστική
επιτροπή:

Παναγιώτα Μαρκάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Χαράλαμπος Προεστός, Λέκτορας ΕΚΠΑ

Βασιλεία Σινάνογλου, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας

Ημερομηνία εξέτασης: 11/04/2014

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων και εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των αριλίων, του χυμού και των σπερμάτων από τους καρπούς μιας κλασικής ποικιλίας ροδιάς με τη χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων ανάλυσης. Παράλληλα, έγινε σύγκριση δύο μεθόδων εκχύλισης, μιας κλασικής και μιας υψηλής ενέργειας με τη χρήση υπερήχων, ως προς την απόδοση στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών. Ακολούθως, μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα φαινολικών ενώσεων από τους χυμούς δύο νέων ελληνικών ποικιλιών ροδιών και μιας κλασικής ποικιλίας ώστε να συγκριθούν μεταξύ τους ως προς το φαινολικό τους περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Αντίστοιχη συγκριτική μελέτη έγινε σε έναν οίνο από ρόδι και έναν ερυθρό οίνο από σταφύλια. Επίσης, αναπτύχθηκε μια μέθοδος GC-MS ανάλυσης για τον προσδιορισμό της ποιότητας του φαινολικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα από τους χυμούς των ροδιών και στους οίνους μετά από διαφορετικούς τύπους υδρόλυσης και μετατροπή των φαινολικών ενώσεων στα τριμεθυλοσιλυλοπαράγωγά τους. Τέλος, πραγματοποιήθηκε HPLC-PDA-ESI-MSⁿ ανάλυση για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των χυμών ροδιού και στους οίνους, ενώ κατασκευάστηκαν και ειδικές βιβλιοθήκες βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων για την ανίχνευση φαινολικών ενώσεων σε χυμούς ροδιού και οίνους με την εν λόγω ανάλυση.

Θεματική περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις-κλειδιά: *Punica granatum* L., οίνους, φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση, GC-MS ανάλυση, HPLC-PDA-ESI-MSⁿ ανάλυση

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθηνών.

Επιβλέπων της εν λόγω ερευνητικής εργασίας ήταν ο κ. Χαράλαμπος Προεστός, Λέκτορας του Ε.Κ.Π.Α., τον οποίον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλην τη διάρκεια εκτέλεσης της εργασίας.

Θεωρώ ιδιαίτερα σημαντικό να ευχαριστήσω την κα Βασιλεία Σινάνογλου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τ.Ε.Ι. Αθηνών, για την άριστη συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή της, και η οποία με δίδαξε με συνέπεια πολύτιμες γνώσεις και ιδέες.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω την κα Παναγιώτα Μαρκάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Ε.Κ.Π.Α., ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ' του Ε.Ι.Ε., για το ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλην τη διάρκεια των πειραμάτων, την άμεση βοήθεια και τη σημαντική συμβολή του στην εκπόνηση της εν λόγω εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Σπυρίδωνα Κοντελέ, επιστημονικό και εργαστηριακό συνεργάτη του Τ.Ε.Ι. Αθηνών, για τη βοήθειά του στη διαδικασία της λυοφιλοποίησης των δειγμάτων.

Οφείλω, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Σταμάτη Μερτύρη, γεωπόνο και παραγωγό, από τον οποίον προμηθεύτηκα τα δείγματα των ροδιών που μελέτησα, και είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία νέων ποικιλιών ροδιάς.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., το προσωπικό στα εργαστήρια του Ε.Ι.Ε. και ιδιαίτερω την υποψήφια διδάκτορα κα Θάλεια Τσιάκα για το άψογο κλίμα συνεργασίας και τη συνεισφορά της στις πειραματικές εργασίες.

*Αθήνα, 11 Απριλίου 2014
Δήμητρα Ζ. Λαντζουράκη*

Περιεχόμενα

	σελ.
Περίληψη.....	7
Ευχαριστίες.....	9
Περιεχόμενα.....	11
Κατάλογος Εικόνων.....	15
Κατάλογος Σχημάτων.....	16
Κατάλογος Πινάκων.....	19
1 Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	21
1.1 Φυτοχημικά – Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών – Φαινολικές ενώσεις φυτών και τροφίμων – Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	22
1.1.1 Τα φυτοχημικά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες φαινολικής φύσεως και η λειτουργία / ο ρόλος τους στα φυτά και τα τρόφιμα.....	22
1.1.2 Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων βάσει της δομής τους και περιγραφή τους.....	24
1.1.3 Οι φυσικές πηγές των φαινολικών ουσιών.....	31
1.1.4 Η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	33
1.1.5 Τα φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικές ενώσεις.....	34
1.1.6 Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	36
1.1.7 Φυτοχημικά και ανθρώπινη υγεία.....	37
1.1.8 Η χρήση των φυτοχημικών στη βιομηχανία.....	38
1.2 Το δένδρο της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.), το ρόδι και προϊόντα του.....	40
1.2.1 Η προέλευση, η ιστορία και η παράδοση της ροδιάς.....	40
1.2.2 Η καλλιέργεια της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.) στον κόσμο και την Ελλάδα.....	41
1.2.3 Προϊόντα και παραπροϊόντα προερχόμενα από τη ροδιά (<i>Punica granatum</i> L.) και το ρόδι.....	41
1.2.4 Η βοτανολογική ταξινόμηση της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.).....	43
1.2.5 Η μορφολογία του δένδρου της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.) και του ροδιού - Στοιχεία για την καλλιέργεια της ροδιάς.....	44
1.2.6 Η χημική σύσταση του ροδιού (<i>Punica granatum</i> L.).....	46
1.2.7 Οι φαρμακολογικές ιδιότητες και η ιατρική αξία του ροδιού.....	54
1.2.8 Ποικιλίες της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.).....	57
1.3 Οίνοι από σταφύλια (<i>Vitis vinifera</i> L.) και από ρόδια (<i>Punica granatum</i> L.).....	58
1.3.1 Γενικά για τον οίνο από τα σταφύλια της αμπέλου (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	58
1.3.2 Η σύσταση των φαινολικών ουσιών στα κρασιά από τα σταφύλια (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	58
1.3.3 Η σπουδαιότητα του κρασιού και τα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία.....	64
1.3.4 Το κρασί από τους καρπούς της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.).....	65
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	66

2	Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι.....	67
2.1	Διάγραμμα της πειραματικής πορείας.....	68
2.2	Αναλώσιμα και οργανολογία.....	69
2.2.1	Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες.....	69
2.2.2	Συσκευές και επιστημονικά όργανα.....	71
2.3	Δείγματα των ροδιών και των οίνων που μελετήθηκαν.....	72
2.3.1	Δείγματα των ροδιών που μελετήθηκαν.....	72
2.3.2	Δείγματα των οίνων που μελετήθηκαν.....	73
2.4	Επεξεργασία των δειγμάτων.....	73
2.4.1	Μέτρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και καθαρισμός των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	74
2.4.2	Διαχωρισμός και ομαδοποίηση των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου.....	75
2.4.3	Παρασκευή χυμού από τα δείγματα των ροδιών της Ερμιόνης.....	75
2.5	Λυοφιλοποίηση (Freeze drying) των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	75
2.6	Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	76
2.6.1	Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού–υγρού των φαινολικών συστατικών από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	77
2.6.2	Εκχύλιση στερεού–υγρού με υπέρηχους (Ultrasound–Assisted Extraction, UAE) των φαινολικών συστατικών από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	77
2.7	Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις στα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων.....	79
2.7.1	Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu.....	80
2.7.2	Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl).....	81
2.7.3	Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS•+ [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)].....	84
2.8	Ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές συνδυασμένες με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων.....	85
2.8.1	Ανάλυση με Αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC–MS) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων.....	86
2.8.1.1	Υδρόλυση των “δεσμευμένων” φαινολικών συστατικών και εκχύλισή τους.....	86

2.8.1.2	Σιλιανοποίηση των φαινολικών ενώσεων.....	87
2.8.1.3	GC–MS Ανάλυση.....	88
2.8.2	Ανάλυση με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Ανιχνευτή Πολλαπλών Διόδων (Photo-Diode Array, PDA) και Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS ⁿ) (HPLC–PDA–ESI–MS ⁿ) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων.....	90
3	Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	94
3.1	Εκτίμηση των γενικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	95
3.1.1	Μέτρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	95
3.1.2	Προσδιορισμός της υγρασίας στα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης.....	95
3.2	Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις στα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων.....	96
3.2.1	Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu.....	97
3.2.2	Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων.....	104
3.2.3	Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS•+ των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων.....	114
3.2.4	Συσχετισμοί των αποτελεσμάτων από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους Folin–Ciocalteu, DPPH• και ABTS•+.....	117
3.3	Ανάλυση με χρωματογραφικές αναλύσεις συνδυασμένες με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων.....	118
3.3.1	Ανάλυση με Αέριοχρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC–MS) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων.....	118

3.3.2	Ανάλυση με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Ανιχνευτή Πολλαπλών Διόδων (Photo-Diode Array, PDA) και Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS ⁿ) (HPLC–PDA–ESI–MS ⁿ) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων.....	127
3.4	Συμπεράσματα από την παρούσα μελέτη.....	138
	Παράρτημα.....	141
	Πίνακας ξενόγλωσσων όρων.....	
	Αρκτικόλεξα, ακρωνύμια και ξενόγλωσσοι όροι.....	142
	Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	143

Κατάλογος Εικόνων

σελ.

Εικόνα 1.2.5.1: Μορφολογικά και ανατομικά στοιχεία του καρπού της ροδιάς (<i>Punica granatum</i> L.), των αριλίων και των σπόρων.....	45
Εικόνα 2.4.1: Φωτογραφίες από τα δείγματα των ροδιών. Από τα αριστερά προς τα δεξιά, ρόδια της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο, και των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη.....	74
Εικόνα 2.6.2.1: Συσκευή δημιουργίας υπερήχων (US) με Probe της Sonics & Materials (USA).....	77
Εικόνα 2.8.1.3.1: GCMS-QP2010 Series, Shimadzu Corporation, Japan.....	88
Εικόνα 2.8.2.1: LCQ Fleet Ion Trap MS ⁿ , Thermo Fisher Scientific (UK).....	91

Κατάλογος Σχημάτων

	σελ.
Σχήμα 1.1.2.1: Γενική χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμωμικών οξέων, και παραδείγματα ενώσεων που απαντώνται σε τρόφιμα και φαρμακοτρόφιμα (nutraceuticals).....	25
Σχήμα 1.1.2.2: Χημικές δομές του γαλλικού, του ελλαγιικού οξέος και η γενική δομή των υδρολυόμενων τανινών.....	26
Σχήμα 1.1.2.3: Χημική δομή της cis και trans ρεσβερατρόλης και του 3-O-γλυκοζίτη της trans.....	26
Σχήμα 1.1.2.4: Χημικές δομές της σεκοϊσολαρικιρεσινόλης και της ματερεσινόλης.....	27
Σχήμα 1.1.2.5: Χημικές δομές των φλαβονολών καεμπφερόλη, κερκετίνη, ισοραμνετίνη και μυρικετίνη.....	28
Σχήμα 1.1.2.6: Χημικές δομές των φλαβονών απιγενίνη, λουτεολίνη, βαϊκαλεΐνη και γογκονίνη.....	28
Σχήμα 1.1.2.7: Χημικές δομές των άγλυκων φλαβανονών εσπερετίνη και ναρινγενίνη, και του φλαβανονικού γλυκοζίτη εσπεριδίνη.....	28
Σχήμα 1.1.2.8: Χημικές δομές των κυριότερων ανθοκυανιδινών (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη) που απαντώνται σε φυτά και τρόφιμα φυτικής προέλευσης.....	29
Σχήμα 1.1.2.9: Χημικές δομές των άγλυκων ισοφλαβονών δαϊδζεΐνη και γενιστεΐνη, και τριών O-γλυκοζιτών της δαϊδζεΐνης που απαντώνται μεταξύ άλλων σε προϊόντα σόγιας.....	30
Σχήμα 1.1.2.10: Χημικές δομές των φλαβαν-3-ολών (±)-κατεχίνη, (±)-επικατεχίνη, (+)-γαλλοκατεχίνη, (-)-επιγαλλοκατεχίνη, 3-O-γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης και 3-O-γαλλικός εστέρας της (-)-επιγαλλοκατεχίνης και των δύο διμερών προανθοκυανιδινών B ₅ και B ₂	31
Σχήμα 1.1.2.11: Χημικές δομές των γλυκοζιτών των διϋδροχαλκόνων ασπαλαθίνη και νοδοφαγίνη.....	31
Σχήμα 1.1.6.1: Δομές συνθετικών φαινολικών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα.....	36
Σχήμα 1.2.6.1: Ονομαστικά, τα κύρια συστατικά του χυμού από ρόδι που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.....	48
Σχήμα 1.2.6.2: Ενώσεις που απαντώνται στον καρπό του ροδιού και τα προϊόντα του.....	53

Σχήμα 1.2.7.1: Χημική δομή των ουρολιθινών Α και Β.....	56
Σχήμα 2.1.1: Διάγραμμα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα των ροδιών και των οίνων.....	68
Σχήμα 2.7.1.1: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e^-	80
Σχήμα 2.7.2.1: Δομή της ρίζας DPPH• που απορροφά στα 516 nm.....	81
Σχήμα 2.7.3.1: Δομή της ρίζας ABTS•• που απορροφά στα 734 nm.....	84
Σχήμα 2.8.1.2.1: Ο μηχανισμός της αντίδρασης σιλανοποίησης με το BSTFA.....	88
Σχήμα 3.2.1.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.....	99
Σχήμα 3.2.1.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τους χυμούς των ροδιών των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης, του κρασιού από ρόδι και του κόκκινου κρασιού, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος ανά 100 mL δείγματος.....	100
Σχήμα 3.2.2.1: Συγκριτικό γράφημα της επί τοις εκατό Ικανότητας Σάρωσης της Ρίζας DPPH• (Radical Scavenging Activity, RSA) από τα συστατικά που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, συναρτήσει της αναλογίας «ξηρό δείγμα/DPPH•» κατά βάρος. ($\theta \cong 18^\circ\text{C}$).....	105
Σχήμα 3.2.2.2: Συγκριτικό γράφημα της Ισχύος ενάντια στις ρίζες (Antiradical Power, ARP) εκφρασμένης σε mg^{-1} και της Ικανότητας ενάντια στις ρίζες (Antiradical Efficiency, AE) σε $\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ που επέδειξαν έναντι της ρίζας DPPH• τα διαφορετικών μεθόδων εκχυλίσματα από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου. ($\theta \cong 18^\circ\text{C}$).....	108
Σχήμα 3.2.2.3: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) ανά g ξηρού δείγματος. ($\theta \cong 18^\circ\text{C}$).....	111
Σχήμα 3.2.2.4: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών των εκχυλισμάτων από τους χυμούς των ροδιών των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης, του κρασιού από ρόδι και του	112

κόκκινου κρασιού, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) ανά 100 mL δείγματος. ($\theta \cong 18^{\circ}\text{C}$).....	
Σχήμα 3.2.3.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων της Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά g ξηρού δείγματος.....	116
Σχήμα 3.2.3.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών των εκχυλισμάτων από τους χυμούς των ροδιών των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης, του κρασιού από ρόδι και του κόκκινου κρασιού, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων της Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά 100 mL δείγματος.....	117
Σχήμα 3.3.1.1: GC-FID χρωματογράφημα των 11 πρότυπων φαινολικών ενώσεων που αναλύθηκαν.....	119
Σχήμα 3.3.1.2: Το φάσμα μαζών m/z όπως προκύπτει από την ανάλυση του MS και που είναι χαρακτηριστικό για την ένωση του τριμεθυλοσιλυλο-παραγώγου του γαλλικού οξέος (3,4,5-τριϋδροξυβενζοϊκό οξύ).....	120
Σχήμα 3.3.1.3: GC-FID χρωματογράφημα από την ανάλυση του εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά τη βασική υδρόλυση, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τη σιλανοποίηση.....	121
Σχήμα 3.3.1.4: GC-FID χρωματογράφημα από την ανάλυση του εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά την όξινη υδρόλυση διαδοχική της βασικής, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τη σιλανοποίηση.....	121
Σχήμα 3.3.1.5: GC-FID χρωματογράφημα από την ανάλυση του εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά την όξινη υδρόλυση, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τη σιλανοποίηση.....	122
Σχήμα 3.3.2.1: HPLC-PDA χρωματογράφημα (ανίχνευση στα 520 nm) των ανθοκυανινών από την ανάλυση του εκχυλίσματος του χυμού ροδιού της ποικιλίας «Wonderful».....	128
Σχήμα 3.3.2.1: Το φάσμα μαζών m/z όπως προκύπτει από την ανάλυση του MS και που είναι χαρακτηριστικό για την ένωση του 3,5-O-διγλυκοζίτη της δελφινιδίνης.....	128
Σχήμα Π1: Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin–Ciocalteu.....	141
Σχήμα Π2: Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του L-ασκορβικού οξέος (AA) για τη δοκιμή DPPH•.....	141
Σχήμα Π3: Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας Trolox για τη δοκιμή ABTS*+.....	141

Κατάλογος Πινάκων

	σελ.
Πίνακας 2.3.2.1: Πληροφορίες για τα δείγματα του οίνου από ρόδι και του κόκκινου οίνου από σταφύλια.....	73
Πίνακας 2.6.2.1: Πίνακας αναγραφής των διαφορετικών ειδών δειγμάτων ροδιών και οίνων με το κωδικοποιημένο τους όνομα.....	78
Πίνακας 2.8.1.3.1: Οι ρυθμίσεις της μεθόδου «Poms&Wines».....	89
Πίνακας 2.8.1.3.2: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της μεθόδου «Poms&Wines».....	90
Πίνακας 2.8.2.1: Πρόγραμμα διαλυτών για τη βαθμιδωτή έκλουση των φαινολικών ουσιών μέσω της HPLC και λοιπές ρυθμίσεις.....	91
Πίνακας 2.8.2.2: Συνθήκες που ορίστηκαν για το θετικό (ESI ⁺) και αρνητικό (ESI ⁻) ιοντισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων και για την ύστερη θραυσματοποίησή τους.....	93
Πίνακας 3.1.1.1: Μέσοι όροι των τιμών για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ροδιών. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=80 στις τιμές του ύψους, της διαμέτρου και του βάρους του καρπού και n=10 στα επί τοις εκατό ποσοστά).....	95
Πίνακας 3.1.2.1: Υγρασία και ξηρό υπόλειμμα εκφρασμένα επί τοις εκατό (w/w) στη νωπή ύλη των καρπιδίων, του χυμού και των σπερμάτων της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, και των χυμών από τις ποικιλίες «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=10).....	96
Πίνακας 3.2.1.1: Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά g ξηρού δείγματος και ανά 100 mL χυμού ή κρασιού των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των κρασιών. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=10).....	97
Πίνακας 3.2.2.1: Τιμές της Ικανής Συγκέντρωσης EC ₅₀ (Efficient Concentration) εκφρασμένης σε mg για συγκεκριμένη ποσότητα DPPH [•] , της κατά βάρος αναλογίας «ξηρό δείγμα/DPPH [•] » όπου παρατηρείται η EC ₅₀ , της Ισχύος ενάντια στις ρίζες (Antiradical Power, ARP) εκφρασμένης σε mg ⁻¹ και της Ικανότητας ενάντια στις ρίζες (Antiradical Efficiency, AE) εκφρασμένης σε g ⁻¹ ·min ⁻¹ για τα δείγματα των ροδιών του Βόλου. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=10).....	106
Πίνακας 3.2.2.2: Συγκέντρωση των antiradical ενώσεων εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) ανά g ξηρού δείγματος και ανά 100 mL χυμού ή κρασιού των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των κρασιών. (Μέσος όρος $\pm$ SE, n=10).....	109
Πίνακας 3.2.3.1: Συγκέντρωση των antiradical ενώσεων εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων της Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά g ξηρού δείγματος και ανά 100 mL χυμού ή	114

κρασιού των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των κρασιών. (Μέσος όρος $\pm$ SE, n=10).....	
Πίνακας 3.2.4.1: Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson όπως υπολογίσθηκαν μέσω των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων Folin–Ciocalteu, DPPH [•] και ABTS ^{•+} για τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων.....	118
Πίνακας 3.3.1.1: Καταγραφή των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα των χυμών ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη και στα κρασιά βάσει των πρότυπων φαινολικών ενώσεων.....	123
Πίνακας 3.3.1.2: Καταγραφή των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα των χυμών ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη και στα κρασιά με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας.....	125
Πίνακας 3.3.2.1: Η βιβλιοθήκη με τα $\lambda_{\max}$ (nm), τα θετικά ή αρνητικά ιόντα και τα χαρακτηριστικά θραύσματα (m/z) που συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφία για ανθοκυανιδινικές και μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις, και μερικών βασικών οργανικών οξέων για την ανίχνευσή τους με LC–ESI–MS ⁿ ανάλυση που συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφία και έχουν προηγουμένως ταυτοποιηθεί σε χυμούς από ρόδι, λευκούς και ερυθρούς οίνους από σταφύλια και άλλα τρόφιμα. Καταγραφή των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα των χυμών ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη και στα κρασιά βάσει της βιβλιοθήκης.....	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 Φυτοχημικά – Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών – Φαινολικές ενώσεις φυτών και τροφίμων – Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά

1.1.1 Τα φυτοχημικά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες φαινολικής φύσεως και η λειτουργία / ο ρόλος τους στα φυτά και τα τρόφιμα

Τα φυτοχημικά είναι μια ετερογενής ομάδα ουσιών που βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα και αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φυτοχημικά έχει αναφερθεί ότι προστατεύει από διάφορες εκφυλιστικές ασθένειες. Φυτά και βότανα χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες ως θεραπείες. Πιο πρόσφατα, οι εφαρμογές των φυτοχημικών ουσιών έχουν επεκταθεί και σε άλλες χρήσεις, ιδιαίτερα στα φαρμακοτρόφιμα (nutraceuticals) και τα λειτουργικά τρόφιμα.¹

Τα φυτά συνθέτουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων που παραδοσιακά διαχωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες με βάση το ρόλο που επιτελούν στο φυτικό μεταβολισμό. Στα πρωτογενή συστατικά ανήκουν τα κοινά σάκχαρα, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, οι πουρίνες και πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων, η χλωροφύλλη, οι φυτοστερόλες, τα ακυλολιπίδια, τα νουκλεοτίδια, τα οργανικά οξέα κ.ά. Στα δευτερογενή συστατικά ανήκουν τα εναπομείναντα χημικά στοιχεία των φυτών, όπως τα αλκαλοειδή (που προέρχονται από τα αμινοξέα), τα τερπένια (ομάδα λιπιδίων) και τα φαινολικά (που προέρχονται από τους υδατάνθρακες).² Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τα στοιχεία του πρωτογενούς μεταβολισμού στο ότι είναι μη-αναγκαία στοιχεία για τις βασικές μεταβολικές λειτουργίες της ανάπτυξης και εξέλιξης του φυτού. Είναι, ωστόσο, σαφώς καθοριστικά συστατικά για πολλές σημαντικές φυτικές διεργασίες.³ Οι πρωτογενείς μεταβολίτες παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη φωτοσύνθεση, την αναπνοή, την ανάπτυξη και την εξέλιξη. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες επιτελούν διάφορες λειτουργίες, όπως προστασία των φυτών από φυτοφάγα, έντομα και παθογενείς μολύνσεις (ιοί, μυκόπλασμα, βακτήρια και μύκητες), προσέλκυση επικονιαστών και ζώων που διασκορπίζουν τους σπόρους, λειτουργούν ως αλληλοπαθητικοί παράγοντες, και ενεργούν για την προφύλαξη από την υπεριώδη ακτινοβολία και την άμυνα έναντι άλλων φυτών που διεκδικούν τροφή και φως. Έχουν, επίσης, δομικό ρόλο σε διαφοροποιητικούς, υποστηρικτικούς ή προστατευτικούς ιστούς, καθώς και σηματοδοτικές ιδιότητες, κυρίως στην αλληλεπίδραση του φυτού με το περιβάλλον. Εισαγόμενα στο περιβάλλον έχουν σημαντικές επιδράσεις στη σύσταση του εδάφους και τα μικροπεριβάλλοντα όπου τα φυτά ενδημούν.^{4, 5, 3} Κάποια φυτοχημικά προσδίδουν χρώμα ή οσμή προκειμένου να προσφέρουν μεταμφίεση ή να δράσουν προσελκυστικά, άλλα λειτουργούν ως μόρια επικοινωνίας, ενώ αρκετά θεωρούνται ως φυσικά παρασιτοκτόνα. Ορισμένα από αυτά τα στοιχεία είναι φαρμακολογικώς ενεργά, ενώ άλλα είναι είτε εξαιρετικά δύσγευστα είτε ιδιαίτερα τοξικά.^{1, 6} Αξίζει να σημειωθεί πως τα φυτά ελέγχουν τη σύνθεση και αποθήκευση των φυτοχημικών ουσιών, έτσι ώστε οι περισσότεροι ευαίσθητοι ιστοί, όπως τα νεαρά φύλλα, να περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φυτοχημικών

από όσο οι ώριμοι ιστοί.⁶ Οι φαινολικές ενώσεις είναι σημαντικές για τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, καθώς είναι υπεύθυνες για το χρώμα των κόκκινων φρούτων, χυμών και οίνων, αποτελούν υπόστρωμα για την ενζυματική αμαύρωση, και διαμορφώνουν τη γεύση. Συγκεκριμένα, η στυφή γεύση αποδίδεται στην κατακρήμνιση των σιελογενών πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες. Η πτητική φύση των αιθέριων ελαίων ή η στυφή και πικρή γεύση των τανινών και των αλκαλοϊδών λειτουργούν αντίστοιχα ως αποτρεπτικοί παράγοντες για τα αρπακτικά.^{7, 6}

Γεωργικές πρακτικές που επηρεάζουν τη φυτοχημική σύνθεση περιλαμβάνουν τη διαλογή σοδειάς και την επιλογή ποικιλίας, τον τύπο του ιστού και το στάδιο ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή, την παροχή λιπασμάτων, τις εποχικές και περιβαλλοντολογικές επιδράσεις, τη βιοτική και αβιοτική καταπόνηση, και τις καλλιεργητικές πρακτικές (βιολογική και συμβατική). Εντούτοις, παράγοντες όπως η επιλογή της ποικιλίας, η αγωγή με λιπάσματα και η μεταχείριση μετά τη συγκομιδή μπορούν εύκολα να αναπροσαρμοστούν στις υπάρχουσες πρακτικές παραγωγής για να αποδώσουν σοδείες με βελτιστοποιημένη φυτοχημική σύσταση.¹

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται ως χρωστικές ίνες, κόλλες, έλαια, κεριά, παραδοσιακά φάρμακα, φίλτρα για την υπεριώδη ακτινοβολία, καλλυντικά και αρώματα, και θεωρούνται πιθανές πηγές για νέα φυτικά φάρμακα, αντιβιοτικά, ζιζανιοκτόνα και παρασιτοκτόνα. Φυτικά εκχυλίσματα που περιέχουν τανίνες χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα στην κατεργασία του ζωικού δέρματος. Πολλά από αυτά, χρησιμοποιούνται και σήμερα, καθώς σε πολλές περιπτώσεις, δεν έχουν βρεθεί κατάλληλα συνθετικά υποκατάστατα με αντίστοιχη αποτελεσματικότητα και φαρμακολογική εξειδίκευση.³ Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών ως συστατικά της τροφής με προληπτική και προστατευτική δράση αναγνωρίζεται ευρέως στην έρευνα για την ανθρώπινη διατροφή. Αντίθετα με τις παραδοσιακές βιταμίνες, δεν είναι τόσο αποτελεσματικά για τη βραχυπρόθεσμη ανάκτηση της καλής φυσικής κατάστασης και υγείας στον άνθρωπο, ωστόσο, υπάρχουν ολοένα αυξανόμενες ενδείξεις για τη θετική επίδραση που έχει η μέτρια μακροχρόνια κατανάλωση στην πρόληψη εμφάνισης καρκίνων και πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο διαβήτης τύπου 2.⁴

Στην κατηγορία των φυτοχημικών απαντώνται και οι ευρέως διαδεδομένοι οξειδοαναγωγικοί δευτερογενείς μεταβολίτες φαινολικής φύσεως, εκ των οποίων, κάποιοι βρίσκονται σε όλα τα φυτά ανεξαιρέτως, και άλλα μόνο σε συγκεκριμένες οικογένειες, είδη και οργανικά μέρη.³ Οι φαινολικές ενώσεις, μεταξύ άλλων, δρουν ως φυτοαλεξίνες, καθορίζουν το χρώμα του φυτού, είναι αντιοξειδωτικά, προσελκύουν επικονιαστές, και προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία.⁸ Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να σχετίζονται πρωτίστως με τις άμυνες των φυτών απέναντι σε ζώα, έντομα, βακτήρια και μύκητες. Οι φλαβονόλες στα επιφανειακά κύτταρα των φύλλων και τη φλούδα των φρούτων παρέχουν προστασία από τις καταστροφικές επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας. Λαμβάνουν, ακόμα, μέρος στη γονιμοποίηση. Οι πολυφαινόλες δίνουν χρώμα στο μίσχο, τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, και οι

ανθοκυανίνες αποτελούν το χρωστικό συστατικό των περισσότερων ερυθρών και κυανών μερών του φυτού. Βρίσκονται στα άνθη και τους ώριμους καρπούς και έχουν ρόλο έλξης και προσέλκυσης κατά τις περιόδους της επικονίασης και της διάδοσης των σπόρων. Συναντώνται, επίσης, πολύ συχνά σε νεαρά φύλλα, όπου πιθανότατα ασκούν απωθητική δράση στα φυτοφάγα έντομα. Οι τανίνες συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού απέναντι σε φυτοφάγα, μύκητες, και απαντώνται στους περισσότερους ιστούς των φυτών από τα πρώιμα εξελικτικά στάδια.^{4, 7}

Παραδοσιακά, το ενδιαφέρον για τις φαινολικές ουσίες και τις πολυφαινόλες είναι κυρίως προσανατολισμένο στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες, όπως το χρώμα, η στυπτικότητα (τανίνες), η πικράδα (φλαβονόλες) και η γεύση γενικότερα.³ Είναι ευρέως γνωστό ότι οι αντιοξειδωτικές και φαρμακολογικές ιδιότητες των φυτών σχετίζονται με την παρουσία φαινολικών ενώσεων. Σήμερα, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για ουσίες που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές δράσεις, και οι οποίες παρέχονται στον ανθρώπινο οργανισμό είτε μέσω της διατροφής ως συστατικά των τροφών είτε ως φαρμακευτικά σκευάσματα. Συνεπώς, τα αντιοξειδωτικά έχουν γίνει αναπόσπαστο κομμάτι της τεχνολογίας των τροφίμων και της σύγχρονης ιατρικής μέριμνας.⁸

1.1.2 Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων βάσει της δομής τους και περιγραφή τους

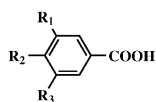
Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται συνήθως σε εδάδιμα και μη φυτά. Αυτές οι φυτοχημικές ενώσεις προκύπτουν από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη και στερούνται οποιασδήποτε λειτουργικής αζωτούχας ομάδας.^{3, 7} Τα φαινολικά μόρια έχουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες συνδεδεμένες υδροξυλικές ομάδες, και η δομή τους ποικίλει από χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις με μονό αρωματικό δακτύλιο έως τις μεγάλες και σύνθετες (με υψηλό πολυμερισμό) τανίνες, και τις πολυφαινόλες.^{3, 4} Μερικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και τα δομικά στοιχεία τους. Σε αυτό το πλαίσιο, οι δύο κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων που διακρίνονται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή μόρια. Η ομάδα των φλαβονοειδών περιλαμβάνει ενώσεις με τη δομή δακτυλίων C₆–C₃–C₆: φλαβανόνες, φλαβόνες, διϋδροφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες, προανθοκυανιδίνες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβόνες κ.ά. Οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις ταξινομούνται βάσει του αριθμού των ατόμων άνθρακα και είναι οι απλές φαινόλες, τα βενζοϊκά οξέα, τα κινναμωμικά οξέα, οι υδρολυόμενες τανίνες, οι ακετοφαινόλες, οι κουμαρίνες, οι βενζοφαινόλες, οι ξανθόνες, τα στιλβένια, οι λιγνάνες, τα σεκοϊριδοειδή κ.ά.^{1, 5} Φαινολικά μόρια μη συνδεδεμένα με μόριο σακχάρου αναφέρονται ως οι άγλυκες μορφές. Φαινολικά μόρια σε μορφή σύζευξης με ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρου ονομάζονται γλυκοζίτες. Οι περισσότερες φαινόλες βρίσκονται στη φύση συνδεδεμένες με μονο- ή πολυ-

σακχαρίτες, ή παράγωγα, όπως οι εστέρες ή μεθυλεστέρες, που μπορούν να υποστούν γλυκοζυλίωση ή ακυλίωση.^{3, 4}

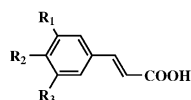
Παρακάτω, επιλέχθηκαν ορισμένες ομάδες μη φλαβονοειδών και φλαβονοειδών ενώσεων για να δοθούν μερικές γενικές πληροφορίες για την καθεμία.

Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

Φαινολικά οξέα: Τα φαινολικά οξέα αντιστοιχούν στο ένα τρίτο των διαιτητικών φαινολών, και βρίσκονται σε φρούτα σε συζευγμένη μορφή. Οι ουσίες αυτές χωρίζονται σε δύο υποομάδες: τα βενζοϊκά και τα κινναμωμικά οξέα. Σε αντίθεση με άλλες φαινολικές ενώσεις, παρουσιάζουν όξινο χαρακτήρα λόγω της παρουσίας μιας καρβοξυλικής ομάδας στο μόριο. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε διάφορα φρούτα, κυρίως ως εστέρες. Τα πιο συνηθισμένα οξέα που απαντώνται στα φρούτα είναι το γαλλικό, βανιλλικό, ελλαγικό, και συριγγικό.⁹ Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως το p-κουμαρικό, καφεϊκό και φερουλικό βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά, συχνά σε εστεροποιημένες μορφές ή συνδεδεμένα με πρωτεΐνες. Συχνά, συσσωρεύονται με τη μορφή των αντίστοιχων τρυγικών εστέρων τους, δηλαδή ως το κουρταρικό, καφταρικό και φερταρικό οξύ, αντίστοιχα, και αναφέρονται συλλογικά ως χλωρογενικά οξέα.^{10, 4} Τα χλωρογενικά οξέα αποτελούν το ~10% των φύλλων του πράσινου μάτε (*Ilex paraguariensis*) και των πράσινων κόκκων του καφέ (*Coffea canephora*).^{10, 4} Συσσωρευμένο στη φλούδα των σταφυλιών, το καφταρικό οξύ είναι το κύριο υδροξυκινναμωμικό οξύ στα κόκκινα και λευκά κρασιά που παράγονται από την άμπελο (*Vitis Vinifera* L.).⁵



Acid		R ₁	R ₂	R ₃
<i>p</i> -Hydrobenzoic	4-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	3,4-Dihydroxybenzoic	OH	OH	H
Vanillic	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic	OCH ₃	OH	H
Syringic	3, 5-Dimethoxybenzoic	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gallie	3,4,5-Trihydroxybenzoic	OH	OH	OH

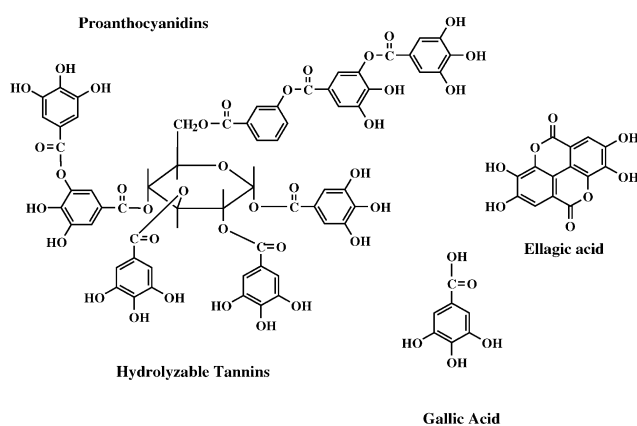


Acid		R ₁	R ₂	R ₃
<i>p</i> -Coumaric	4-Hydroxycinnamic	H	OH	H
Caffeic	3,4-Dihydroxycinnamic	OH	OH	H
Ferulic	4-Hydroxy-3-methoxycinnamic	OCH ₃	OH	H
Sinapic	4-Hydroxy-3,5-dimethoxycinnamic	OCH ₃	OH	OCH ₃

Σχήμα 1.1.2.1: Γενική χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμωμικών οξέων, και παραδείγματα ενώσεων που απαντώνται σε τρόφιμα και φαρμακοτρόφιμα (nutraceuticals).¹¹

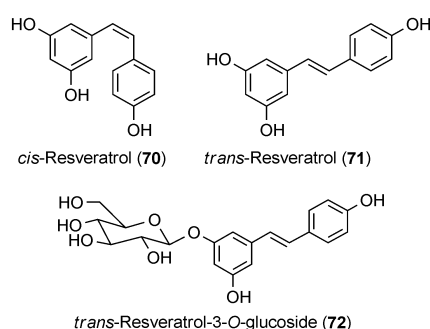
Υδρολύμενες τανίνες: Οι τανίνες, σχετικά υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις, που αποτελούν την τρίτη σημαντικότερη ομάδα των φαινολών, υποδιαιρούνται στις υδρολύμενες και τις συμπυκνωμένες τανίνες. Οι προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες τανίνες) είναι πολυμερή

φλαβονοειδών, ενώ οι υδρολυόμενες αποτελούν παράγωγα του γαλλικού οξέος (3,4,5-τριϋδροξυβενζοϊκό οξύ).⁸ Οι υδρολυόμενες τανίνες παράγονται από τη συμπύκνωση απλών φαινολικών και έχουν ποικιλία μοριακών δομών. Είναι βιολογικά ενεργές ενώσεις με ευεργετικές ή δυσμενείς θρεπτικές επιδράσεις, καθώς είναι εν δυνάμει χηλικοί συμπλοκοποιητές μεταλλικών ιόντων, παράγοντες καθίζησης των πρωτεϊνών και βιολογικά αντιοξειδωτικά.^{12, 8} Είναι συτυπτικές και με πικρή γεύση ουσίες. Η γαλλοτανίνη ή αλλιώς τανικό οξύ είναι μια υδρολυόμενη τανίνη που βρίσκεται στα φρούτα.⁹ Το γαλλικό οξύ είναι η βασική δομική μονάδα των γαλλοτανινών, ενώ το γαλλικό οξύ και η εξαϋδροξυ-δифαινιλο-ομάδα αποτελεί την υπομονάδα των ελλαγιτανινών. Οι γαλλοτανίνες και οι ελλαγιτανίνες, όπως το όνομά τους υπονοεί, διασπώνται εύκολα, απελευθερώνοντας γαλλικό οξύ και/ή ελλαγικό οξύ, ενώ οι συμπυκνωμένες τανίνες δε διασπώνται.^{4, 1}



Σχήμα 1.1.2.2: Χημικές δομές του γαλλικού, του ελλαγικού οξέος και η γενική δομή των υδρολυόμενων τανινών.¹¹

Στιλβένια: Είναι φυτοαλεξίνες και παράγονται από τα φυτά σε παθογενείς συνθήκες ή συνθήκες στρες. Έχουν ανιχνευθεί σε περισσότερα από 70 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων των σταφυλιών, μούρων και φυστικιών.⁸ Τα στιλβένια είναι παρόντα σε φυτά ως *cis* και *trans* ισομερή. Η ρεσβερατρόλη (3,5,4-τριϋδροξυστιλβένιο) είναι το πιο συνηθισμένο στιλβένιο. Απαντάται ως τα ισομερή *cis* και *trans*, κυρίως σε γλυκοζυλιωμένες μορφές, και είναι παρούσα σε φυτικούς ιστούς, κυρίως ως ο 3-Ο-γλυκοζίτης της *trans*-ρεσβερατρόλης, γνωστός ως πικεΐδη. Μια ακόμη ομάδα στιλβενίων, είναι τα πολυμερή της ρεσβερατρόλης, οι βινιφερίνες. Οι

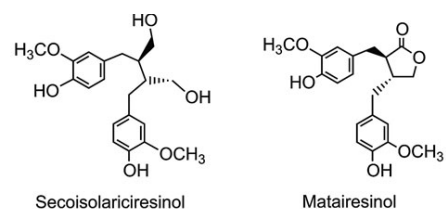


Σχήμα 1.1.2.3: Χημική δομή της *cis* και *trans* ρεσβερατρόλης και του 3-Ο-γλυκοζίτη της *trans*.¹³

σημαντικότερες διαιτητικές πηγές των στιλβενίων περιλαμβάνουν τα σταφύλια, το κρασί, τη σόγια και προϊόντα φυστικιών.^{8, 4, 1} Η ξυλώδης ρίζα του βλαβερού σπόρου *Polygonum cuspidatum* (Ιαπωνικό πολυκόμπι ή Μεξικάνικο μπαμπού) περιέχει ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα *trans*-ρεσβερατρόλης και του γλυκοζίτη της. Τα κόκκινα κρασιά περιέχουν μια ποικιλία παραγώγων των στιλβενίων, αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα

επίπεδα άλλων φαινολικών ενώσεων.⁵

Λιγνάνες: Αποτελούνται από δύο ομάδες φαινυλοπροπανοειδών που συνδέονται μέσω της πλευρικής C8 αλυσίδας, συνήθως σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Οι λιγνάνες είναι μια από τις πιο σημαντικές τάξεις φυτοοιστρογόνων, δηλαδή χημικών όμοιων με τα οιστρογόνα. Στο γαστρεντερικό σύστημα, αυτά τα μόρια μετατρέπονται σε άλλες ενώσεις (εντεροδιόλη και εντερολακτόνη) και έχουν οιστρογονικές και αντιοιστρογονικές ιδιότητες. Τα φρούτα δεν είναι η κύρια διαιτητική πηγή των λιγνανών, και μικρές συγκεντρώσεις τους βρίσκονται στις φράουλες και τα κράνμπερι. Μεγάλες ποσότητες λιγνανών περιέχει ο λιναρόσπορος.⁹ Το ενδιαφέρον για τις λιγνάνες και τα συνθετικά παράγωγά τους αυξάνεται λόγω της ενδεχόμενης εφαρμογής τους στη χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου και άλλων φαρμακολογικών επιδράσεών τους.⁸

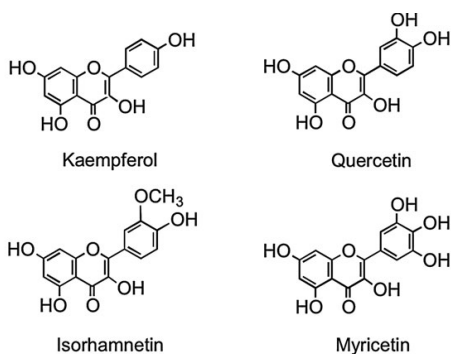


Σχήμα 1.1.2.4: Χημικές δομές της σεκοΐσολαρικιρεσινόλης και της ματερεσινόλης.⁵

Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένοι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες, και αποτελούν κατά προσέγγιση τα δύο τρίτα των διαιτητικών φαινολικών ενώσεων, ενώ είναι παρόντα, κυρίως, ως γλυκοζίτες, και μερικώς ως εστέρες, παρά ως ελεύθερες ενώσεις.⁴ Στα φυτά, τα φλαβονοειδή υπόκεινται σε γλυκοζυλίωση συνήθως με γλυκόζη και ραμνόζη, αλλά μπορούν επίσης να συνδεθούν με αραβινόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικό οξύ ή άλλα σάκχαρα.¹ Τα φλαβονοειδή ή βιοφλαβονοειδή βρίσκονται ευρέως σε φυτά, φρούτα και λαχανικά, και αναγνωρίζονται ως φυσικά αντιοξειδωτικά. *In vitro*, φλαβονοειδή προερχόμενα από αρκετές φυτικές πηγές έχουν επιδείξει δραστηριότητα σάρωσης των ελεύθερων ριζών και προστασία κατά του οξειδωτικού στρες, λόγω του υψηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής και της ικανότητάς τους να λειτουργούν ως χηλικοί συμπλοκοποιητές μετάλλων. Πάνω από 5.000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν ένα πλαίσιο ανθράκων C6–C3–C6 ή πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνουν δεκαπέντε άνθρακες, με δύο αρωματικούς δακτυλίους, συνδεδεμένους με γέφυρα τριών ανθράκων, και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της πλειοψηφίας των κίτρινων, κόκκινων και μπλε χρωμάτων στα φρούτα.^{9, 8, 4} Οι ποικιλίες στα μοτίβα υποκατάστασης του δακτυλίου C καταλήγουν στις κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, όπως οι φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανονόλες, φλαβαν-3-όλες και ανθοκυανιδίνες, εκ των οποίων, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι αυτές που απαντώνται πιο συχνά και ποικίλουν δομικά. Οι υποκαταστάσεις στους δακτυλίους A και B δημιουργούν διαφορετικές ενώσεις σε κάθε κατηγορία φλαβονοειδών.^{8, 5} Άλλες ομάδες φλαβονοειδών, που είναι δευτερεύουσας σημασίας διαιτητικά συστατικά, είναι οι χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, διϋδροφλαβονόλες, φλαβαν-3,4-διόλες και αουρόνες.⁵

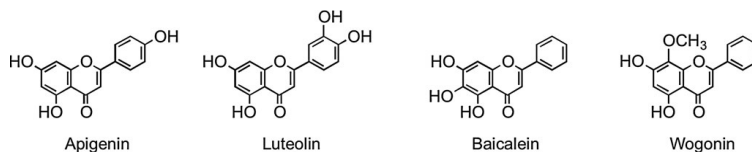
Φλαβονόλες: Οι φλαβονόλες είναι αναμφισβήτητα οι περισσότερο εξαπλωμένες φλαβονοειδείς



Σχήμα 1.1.2.5: Χημικές δομές των φλαβονολών καεμπφερόλη, κερκετίνη, ισοραμνετίνη και μυρικετίνη.⁵

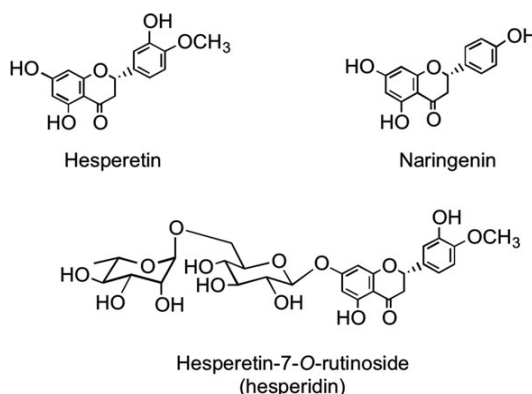
ενώσεις, διασκορπισμένες σε όλο το φυτικό βασίλειο, με εξαίρεση τα μανιτάρια και τα φύκια. Οι φλαβονόλες, όπως η μυρικετίνη, η κερκετίνη, η ισοραμνητίνη και καεμπφερόλη απαντώνται συνήθως ως Ο-γλυκοζίτες.⁴ Τα κίτρινα και τα κόκκινα κρεμμύδια (*Allium cepa*) είναι ιδιαίτερα πλούσια πηγή φλαβονολών και περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις του 4'-Ο-γλυκοζίτη και του 3,4'-Ο-διγλυκοζίτη της κερκετίνης.⁵

Φλαβόνες: Οι φλαβόνες, σε αντίθεση με τις φλαβονόλες, δεν είναι διάχυτες ευρέως. Οι περισσότερες φλαβόνες απαντώνται ως οι 7-Ο-γλυκοζίτες τους. Οι πολυμεθοξυλιωμένες φλαβόνες, όπως η νοβιλετίνη και η τανγκερετίνη, έχουν βρεθεί σε εσπεριδοειδή.⁴ Σημαντικές ποσότητες φλαβονών, όπως η απιγενίνη, η λουτεολίνη, η γογκονίνη και η βαϊκαλεΐνη, έχουν ανιχνευθεί στο σέλινο (*Apium grave olens*), το μαϊντανό (*Petroselinum hortense*) και άλλα βότανα.⁵



Σχήμα 1.1.2.6: Χημικές δομές των φλαβονών απιγενίνη, λουτεολίνη, βαϊκαλεΐνη και γογκονίνη.⁵

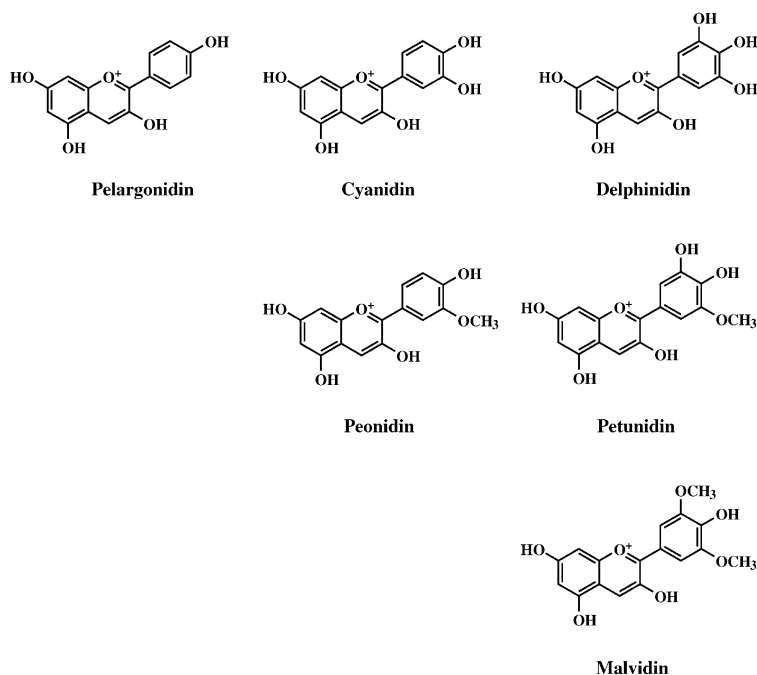
Φλαβανόνες: Είναι διατροφικά στοιχεία που παρουσιάζονται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή.⁴ Οι φλαβανόνες, όπως η ναρινγενίνη και η εσπεριτίνη, χαρακτηρίζονται από την παρουσία χειρικού κέντρου στον C2. Στα φυτά, τα φλαβονοειδή βρίσκονται κυρίως ως το S ή (–)-εναντιομερές. Τα φλαβονοειδή συναντώνται ως υδροξύλο-, γλυκοζυλιωμένα και Ο-μεθυλιωμένα παράγωγα.⁵ Ο πιο κοινός φλαβονοειδής γλυκοζίτης είναι ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της εσπεριτίνης (εσπεριδίνη), η οποία βρίσκεται στο φλοιό των εσπεριδοειδών. Οι ρουτινοζίτες των φλαβανονών είναι άγευστοι. Αντίθετα, τα προϊόντα σύζευξης των νεοεσπεριδοζιτών των φλαβανονών, όπως ο 7-Ο-νεοεσπεριδοζίτης της εσπεριτίνης (νεοεσπεριδίνη) από το πικρό πορτοκάλι (*Citrus aurantium*) και 7-



Σχήμα 1.1.2.7: Χημικές δομές των άγλυκων φλαβανονών εσπερετίνη και ναρινγενίνη, και του φλαβανονικού γλυκοζίτη εσπεριδίνη.⁵

Ο-νεοεσπεριδοζίτης της ναρινγενίνης (ναρινγκίνη) από το φλοιό του γκρέιπφρουτ (*Citrus paradisi*) έχει έντονα πικρή γεύση.⁴

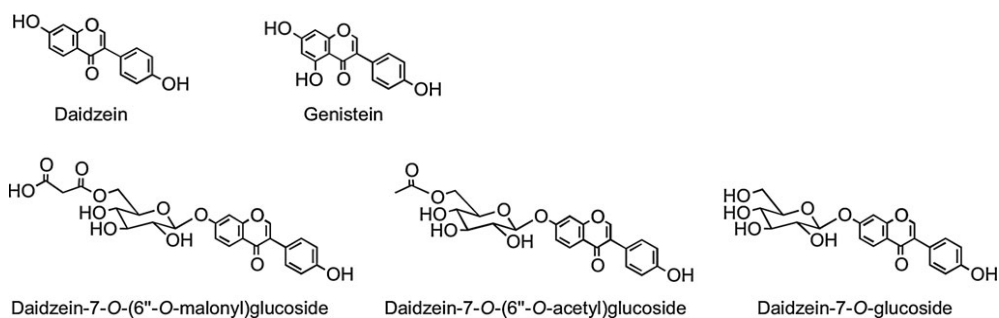
Ανθοκυανιδίνες: Οι ανθοκυανίνες είναι οι υδατοδιαλυτοί γλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών (άγλυκα μόρια). Η ανθοκυανίνη προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «άνθος» και «κυανός» που σημαίνουν λουλούδι και σκούρου μπλε χρώματος, αντίστοιχα. Αυτή η ομάδα φαινολικών ενώσεων αναγνωρίζεται ως η πιο σπουδαία ομάδα χρωστικών ουσιών στη φύση και συνεισφέρουν στα ελκυστικά χρώματα των φρούτων. Πάνω από 635 ανθοκυανίνες έχουν αναγνωρισθεί σε φυτά μέχρι σήμερα.⁹ Οι ανθοκυανίνες



Σχήμα 1.1.2.8: Χημικές δομές των κυριότερων ανθοκυανιδινών (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πετουινιδίνη και μαλβιδίνη) που απαντώνται σε φυτά και τρόφιμα φυτικής προέλευσης.¹⁵

εμφανίζουν κόκκινο, μωβ ή μπλε χρώμα ανάλογα με το pH. Βρίσκονται σε όλους τους ιστούς των δέντρων, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, μίσχων, ριζών και καρπών.^{8, 4} Τα προφίλ των ανθοκυανινών στα φυτά και τα τρόφιμα βασίζονται σε 6 κοινές ανθοκυανιδίνες, εντούτοις έχουν μεγάλη ποικιλομορφία, καθώς ο αριθμός των ανθοκυανινών ποικίλει από 2 (στο ροδάκινο ή το φυστίκι) έως 34 στο ραπανάκι.⁷ Οι ανθοκυανιδίνες που απαντώνται συχνότερα στα φυτά είναι η πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη, η πεονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουινιδίνη, και η μαλβιδίνη. Τα σάκχαρα που συχνά συνδέονται με τις ανθοκυανιδίνες είναι μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, λακτόζη, ραμνόζη και αραμινόζη), και δι-, τρι-σακχαρίτες που σχηματίζονται από το συνδυασμό τεσσάρων διαφορετικών μονάδων σακχάρων. Επιπλέον, πολλές ανθοκυανίνες συνδέονται με σάκχαρα ακυλιωμένα με αρωματικά ή αλειφατικά οξέα. Οι απομονωμένες ανθοκυανίνες είναι πολύ ασταθείς και εύκολα υποκείμενες σε υποβάθμιση. Μπορούν να θεωρηθούν ενδεχόμενα υποκατάστατα για τις απαγορευμένες χρωστικές των τροφών, και αποκτώνται εύκολα από φρούτα και λαχανικά. Επιπλέον, η αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα των ανθοκυανινών, που σχετίζεται με την προστασία από πολλές εκφυλιστικές ασθένειες, παρέχει επιπλέον οφέλη στα τρόφιμα στα οποία προστίθενται.^{8, 4} Σε μερικά προϊόντα, όπως τα ώριμα κόκκινα κρασιά, λαμβάνουν χώρα χημικές και ενζυμικές μετατροπές και ένας αυξανόμενος αριθμός «πολυφαινολών που προέρχονται από ανθοκυανίνες» που συνεισφέρουν στη συνολική πρόσληψη φαινολικών μέσω της διατροφής είναι τώρα γνωστός.^{4, 14}

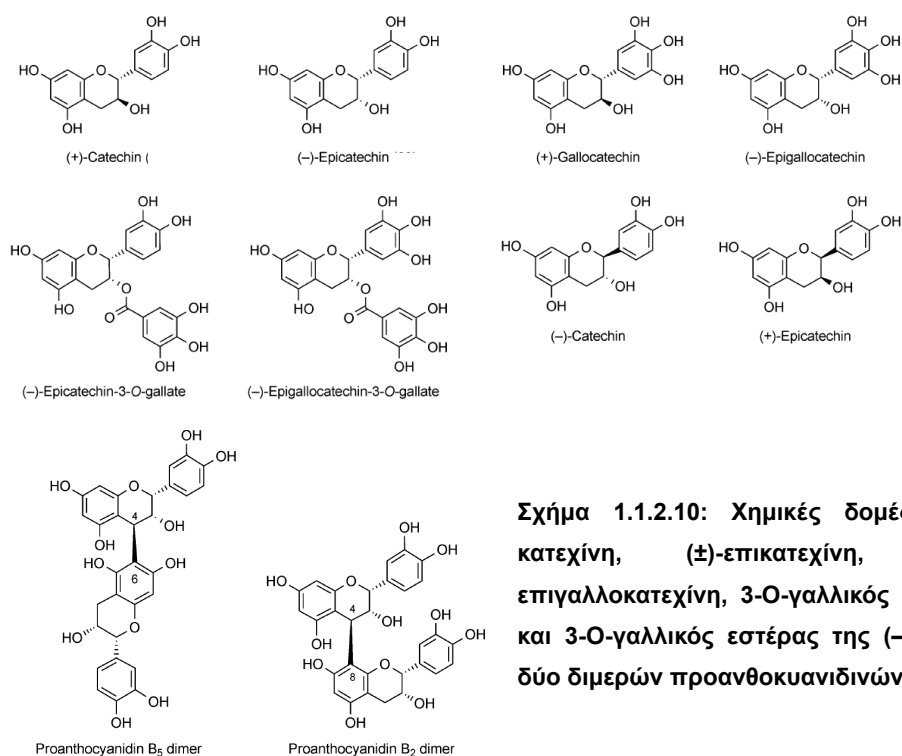
Ισοφλαβόνες: Έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Είναι φυτοχημικά που βρίσκονται σε πολλά φυτά και τρόφιμα που προέρχονται από φυτά στη γηγενή (άγλυκη) μορφή και σε ακετύλο-, μηλονύλο- ή β-γλυκοζυλιωμένες ενώσεις. Σημαντικές επιδράσεις στην υγεία αποδίδονται σε αυτά, και έχει προταθεί ότι πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη ή και θεραπεία ασθενειών όπως η αθηροσκλήρωση ή ο καρκίνος. Μερικές φυσιολογικές λειτουργίες τους αποδίδονται στις δομικές τους ομοιότητες με τις β-οιστραδιόλες, ενώ περιστασιακά αναφέρονται ως «φυτοοιστρογόνα».⁸ Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται, κυρίως, σε όσπρια και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στη σόγια. Η οιστρογονική δραστηριότητα επιδρά σε μεγάλο βαθμό στην αναπαραγωγή των ζώων βοσκής, όπως αγελάδες και πρόβατα. Η δομή αυτών των ισοφλαβονοειδών είναι τέτοια, που φαίνονται να μιμούνται τη στεροειδή ορμόνη οιστραδιόλη.⁴ Οι μη φλαβονοειδείς λιγνάνες, που είναι μια διαφορετική ομάδα ενώσεων ευρισκόμενες σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως σε δημητριακά, επίσης ταξινομούνται ως φυτοοιστρογόνα. Οι λιγνάνες και οι ισοφλαβόνες, δομικά όμοιες με τα οιστρογόνα, μπορεί να έχουν και συναγωνιστική και ανταγωνιστική δράση προς τους υποδοχείς οιστρογόνων.⁵



Σχήμα 1.1.2.9: Χημικές δομές των άγλυκων ισοφλαβονών δαϊδεΐνη και γενιστεΐνη, και τριών Ο-γλυκοζιδίων της δαϊδεΐνης που απαντώνται μεταξύ άλλων σε προϊόντα σόγιας.⁵

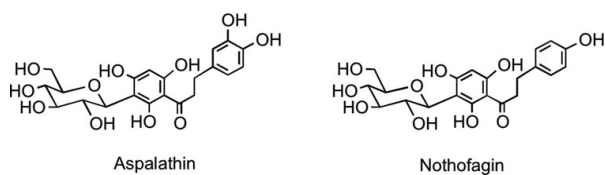
Φλαβαν-3-όλες: Οι φλαβαν-3-όλες ή φλαβανόλες ή κατεχίνες είναι η πιο σύνθετη υποομάδα των φλαβονοειδών που κυμαίνονται από τα απλά μονομερή [π.χ. (+)-κατεχίνη, (–)-επικατεχίνη] στις oligομερείς και πολυμερείς προανθοκυανιδίνες. Η (+)-κατεχίνη και το ισομερές της, η (–)-επικατεχίνη, είναι διάχυτες παντού στη φύση ενώ η (–)-κατεχίνη και το ισομερές της, η (+)-επικατεχίνη είναι σχετικά σπάνιες.⁴ Τα δύο χειρόμορφα κέντρα C2 και C3 της μονομερούς φλαβαν-3-όλης παράγουν 4 ισομέρη.⁵ Οι προανθοκυανιδίνες, οι επονομαζόμενες επίσης συμπυκνωμένες τάνινες, μπορεί να βρεθούν ως πολυμερή των φλαβαν-3-ολών μέχρι τις 50 μονάδες. Επιπλέον, στη διαμόρφωση τέτοιων μεγάλων και σύνθετων δομών, οι φλαβαν-3-όλες υδροξυλιώνονται για να σχηματίσουν τις γαλλοκατεχίνες, και υφίστανται, επίσης, εστεροποίηση με το γαλλικό οξύ. Οι προανθοκυανιδίνες που αποτελούνται αποκλειστικά από μονάδες επικατεχίνης ονομάζονται προκυανιδίνες, και είναι ο πιο άφθονος τύπος προκυανιδίνης στα φυτά. Οι λιγότερο κοινές προκυανιδίνες που περιέχουν μονάδες επιαφζελεχίνης και επιγαλλοκατεχίνης ονομάζονται προπελαργονιδίνες και προδελφινιδίνες, αντίστοιχα. Τα κόκκινα

κρασιά περιέχουν ολιγομερείς προκυανιδίνες και προδελφινιδίνες που προέρχονται κυρίως από τους σπόρους των κόκκινων σταφυλιών, ενώ η μαύρη σοκολάτα είναι πλούσια πηγή προκυανιδινών που προέρχονται από τους ψημένους σπόρους του κακάο (*Theobroma cacao*). Το πράσινο τσάι (*Camellia sinensis*) περιέχει υψηλά επίπεδα φλαβαν-3-ολών, κυρίως της (–)-επιγαλλοκατεχίνης, του γαλλικού εστέρα της (–)-επιγαλλοκατεχίνης και του γαλλικού εστέρα της (–)-επικατεχίνης.⁴ Οι προανθοκυανιδίνες όταν έρχονται σε επαφή με τις πρωτεΐνες του σίλεου, ευθύνονται για τη στυπτικότητα των φρούτων.⁹



Σχήμα 1.1.2.10: Χημικές δομές των φλαβαν-3-ολών (±)-κατεχίνη, (±)-επικατεχίνη, (+)-γαλλοκατεχίνη, (–)-επιγαλλοκατεχίνη, 3-O-γαλλικός εστέρας της (–)-επικατεχίνης και 3-O-γαλλικός εστέρας της (–)-επιγαλλοκατεχίνης και των δύο διμερών προανθοκυανιδινών B₅ και B₂.¹³

Διυδροχαλκόνες: Η μικρότερη ομάδα φλαβονοειδών με δομή ανοιχτού δακτυλίου, είναι περιορισμένης διαιτητικής σημασίας, και περιορίζεται στην παρουσία της φλοριδζίνης στα μήλα (*Malus domestica*), και της ασπαλαθίνης και νοδοφαγίνης στο τσάι rooibos.⁵



Σχήμα 1.1.2.11: Χημικές δομές των γλυκοζιτών των διυδροχαλκόνων ασπαλαθίνη και νοδοφαγίνη.⁵

1.1.3 Οι φυσικές πηγές των φαινολικών ουσιών

Οι περισσότερες φυτικές τροφές περιέχουν φαινολικές ενώσεις, συνήθως σε 0,5–5,0% του ξηρού βάρους.³ Η φαινολική σύσταση των τροφίμων ποικίλλει, και σε αυτήν προστίθεται η πολυπλοκότητα που προκύπτει από τις αντιδράσεις των φυτικών φαινολικών κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση των τροφίμων. Μερικές οικογένειες φαινολικών είναι ευρέως

διαδεδομένες στην ανθρώπινη διατροφή ενώ άλλες περιορίζονται ή και είναι σε αφθονία σε συγκεκριμένα τρόφιμα. Οι προανθοκυανιδίνες είναι παρούσες στα περισσότερα φρούτα, καθώς και στους φρουτοχυμούς, τα κρασιά και τις μπύρες. Καταναλώνονται από το σταφύλι, το μήλο, ή τη φράουλα και βρίσκονται, ακόμα, σε μεγάλες ποσότητες στις κατεργασμένες τροφές, όπως το κόκκινο κρασί και ο μηλίτης. Η διαιτητική έκθεση σε υδατοδιαλυτές τανίνες είναι μάλλον περιορισμένη. Οι κύριες διαιτητικές τους πηγές είναι τα μούρα, όπως το σμέουρο, το βατόμουρο και η φράουλα, αλλά τα επίπεδα που αναφέρονται σε αυτά είναι μάλλον χαμηλά. Οι ελλαγιτανίνες είναι άφθονες στο ρόδι, αλλά βρίσκονται κυρίως στη μη βρώσιμη φλούδα του φρούτου. Όμως, τα ισομερή πουνικαλαγίνης και άλλα παράγωγα ελλαγικών οξέων ανιχνεύθηκαν σε βιομηχανικούς χυμούς ως αποτέλεσμα της εκχύλισής τους από τη φλούδα. Επίσης, μπορούν να παρουσιαστούν σε χαμηλές ποσότητες σε ποτά, όπως το κρασί ή το ούισκυ λόγω της απελευθέρωσής τους από τα ξύλινα βαρέλια. Εκτός από τις γενικές ιδιότητες, μερικές φαινολικές ενώσεις δείχνουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά στην ποιότητα της τροφής. Πολλές φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, όπως οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες. Τελος, οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν γευστικές ιδιότητες, όπως η πικράδα.⁷ Το ποσό και η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων σε τρόφιμα προερχόμενα από φρούτα εξαρτάται από το είδος του φρούτου, την ποικιλία, τη γεωγραφική περιοχή, την ωριμότητα, τη σοδειά των φρούτων καθώς και τις τεχνολογικές διαδικασίες. Τα φαινολικά είναι, επιπλέον, υπεύθυνα για τις αλλαγές που συνήθως παρατηρούνται κατά την αποθήκευση και παλαίωση των τροφίμων. Ενώ το χρώμα του προϊόντος που προέρχεται από το φρέσκο φυτό οφείλεται στο αρχικό περιεχόμενο σε φαινολικά, οι επακόλουθες αλλαγές στο χρώμα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της παλαίωσης σχετίζεται με τη συμπύκνωση των φαινολικών ενώσεων. Αυτές οι μετατροπές καταλήγουν στην αμαύρωση, τον αποχρωματισμό ή τη δημιουργία σκούρου χρώματος.¹⁴

Ποτά όπως φρουτοχυμοί, τσάι και κρασιά είναι σημαντικές πηγές φαινολικών στην ανθρώπινη διατροφή. Οι κύριες φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο τσάι είναι οι κατεχίνες. Το περιεχόμενο τους ποικίλλει ανάλογα με το είδος της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται και στην τεχνολογία συντήρησης. Είναι αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα ότι το κρασί είναι μια από τις πιο σπουδαίες πηγές διαιτητικών πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών, και περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία από φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς ενώσεις. Το κόκκινο κρασί θεωρείται πιο ωφέλιμο για την υγεία από άλλα αλκοολούχα ποτά, πιθανόν επειδή περιέχει πολυφαινόλες που βοηθούν στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Ο καφές παρέχει μια σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών. Το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στον ψημένο καφέ φθάνει το 8%, από το οποίο το χλωρογενικό οξύ κυριαρχεί. Φρουτοχυμοί από το γκρέιπφρουτ, το πορτοκάλι, το μήλο είναι, επίσης, πλούσιες πηγές φυσικών φαινολικών ενώσεων. Γενικά, οι φυσικοί ή του εμπορίου φρουτοχυμοί παρέχουν βιταμίνη C και μια αφθονία φυτοθρεπτικών ουσιών (phytonutrients).⁸

Τα αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα είναι ελκυστικές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών φαινολικής φύσης. Παραπροϊόντα εναπομείναντα μετά την επεξεργασία φρούτων και λαχανικών στη βιομηχανική επεξεργασία διάφορων τροφίμων περιέχουν μεγάλες ποσότητες φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων. Μια από τις πιο πλούσιες πηγές είναι ο φλοιός των σταφυλιών που κατά την παρασκευή κρασιού και χυμού παραμένουν ως φλούδα και γίνονται κομπόστα. Τα υπολείμματα του ελαιολιβερίου είναι επίσης πηγή φαινολικών. Η βιομηχανία εσπεριδοειδών παράγει μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων φλούδας και σπόρων που μπορούν να αποτελέσουν κύρια πηγή φαινολικών ενώσεων, ακόμη και σε σύγκριση με τα βρώσιμα τμήματα των φρούτων.⁸

1.1.4 Η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό

Οι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες έχουν σύνθετους μηχανισμούς για να ελέγχουν την πρόσληψή τους, τη διανομή και το μεταβολισμό τους. Οι ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις στη υγεία εξαρτώνται από την πρόσληψή τους από την τροφή, το μεταβολισμό και τη διανομή τους σε ιστούς στόχους και κύτταρα.⁴ Η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων μπορεί να είναι 100–1.000 φορές χαμηλότερη στο ανθρώπινο σώμα συγκριτικά με το τρόφιμο, σπανίως να υπερβαίνει τις συγκεντρώσεις νανομέτρων στο πλάσμα του αίματος μετά από φυσιολογική διατροφική πρόσληψη. Τα φλαβονοειδή είναι μερικώς βιοδιαθέσιμα στον άνθρωπο όταν καταναλώνονται μέσω τροφίμων, με ένα μέρος να φθάνει στο πλάσμα και να επιτρέπεται η έκθεση στους ιστούς μέσω της περιφερειακής κυκλοφορίας. Η συγκέντρωση των φλαβονοειδών που βρίσκονται *in vivo* είναι, συνήθως, αρκετά υψηλή ώστε να έχει φαρμακολογική δραστηριότητα. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα απορροφώνται ταχέως από το στομάχι ή το λεπτό έντερο. Τα γαλλικό οξύ φαίνεται να απορροφάται πολύ καλά από τον ανθρώπινο οργανισμό σε σύγκριση με άλλες πολυφαινόλες, με τις συζευγμένες του μορφές να φθάνουν συνολικά τα 4 μΜ μετά από λήψη 50 μg γαλλικού οξέος. Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από τη βιοπροσβασιμότητα από τη μήτρα τροφίμων. Το προφίλ και οι ποσότητες των προϊόντων που σχηματίζονται εξαρτώνται σημαντικά από το εάν ο ιστός του φυτού είναι νωπός ή έχει μαγειρευτεί, από τα επίπεδα συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα μητρικά φυτά και από έναν αριθμό άλλων παραγόντων, μερικοί από τους οποίους μπορούν να τροποποιηθούν.^{4, 9} Οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πολυφαινόλες και τα κύτταρα, τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες από το γαστρεντερικό σύστημα και τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητά τους. Πολλές πολυφαινόλες από φρούτα είναι μόνο βιοπροσβάσιμες και βιοδιαθέσιμες στο ανθρώπινο σώμα μέσα από τη δράση εντερικών και ηπατικών ενζύμων και επίσης μέσω της κολονικής μικροχλωρίδας.⁹ Ωστόσο, μετά την κατάποση, οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζονται στο κυκλοφορικό σύστημα, όχι ως οι μητρικές ενώσεις, αλλά ως οι μεταβολίτες τους. Σημαντικές ποσότητες των μητρικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους

περνούν στο παχύ έντερο όπου υποβαθμίζονται από τη δράση της τοπικής μικροχλωρίδας, η οποία οδηγεί κατά κύριο λόγο στην παραγωγή φαινολικών οξέων μικρού μοριακού βάρους και στους καταβολίτες που απορροφώνται στο κυκλοφορικό σύστημα.⁵

1.1.5 Τα φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικές ενώσεις

Τα φυτά παράγουν μια εντυπωσιακή ποικιλία αντιοξειδωτικών ενώσεων.² Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με ένα οξειδωσιμο υπόστρωμα, επιβραδύνουν σημαντικά ή εμποδίζουν την οξείδωση της συγκεκριμένης ουσίας.² Στην επιστήμη των τροφίμων, αντιοξειδωτικά θεωρούνται τα συστατικά που εμποδίζουν το τάγγισμα των λιπών στα τρόφιμα, καθώς και οι διαιτητικές αντιοξειδωτικές ουσίες που μειώνουν τις ανεπιθύμητες συνέπειες των δραστικών ειδών, όπως των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου, στη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού.¹⁶ Θεωρείται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας επειδή οι δικοί μας ενδογενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες δεν παρέχουν παρκή προστασία ενάντια στη συνεχή και αναπόφευκτη πρόκληση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species). Η δημιουργία ελεύθερων ριζών ή δραστικών ειδών οξυγόνου, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού ή άλλων λειτουργιών, πέρα από την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός βιολογικού συστήματος προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Μια ελεύθερη ρίζα περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια. Ένας μέσος άνθρωπος έχει 10.000–20.000 ελεύθερες ρίζες που επιτίθενται σε κάθε κύτταρο κάθε μέρα. Σε μερικές περιπτώσεις, οι ROS παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν ουσιαστικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, είναι παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.² Το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται για μια σειρά από διαταραχές που περιλαμβάνουν την καρδιαγγειακή δυσλειτουργία, το σακχαρώδη διαβήτη, την αθηροσκλήρωση, την ελονοσία, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, το AIDS, το καταρράκτη, καρκίνους, ρευματισμό και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα εκτός από το γήρας. Τα αντιοξειδωτικά είναι απαραίτητα στη δυτική διατροφή καθώς είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία οξειδώνονται εύκολα με το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών. Η μέση καθημερινή δυτική διατροφή περιέχει περίπου 1 g φυσικών αντιοξειδωτικών, ακόμα κι αν δεν έχουν προστεθεί καθόλου φυσικά αντιοξειδωτικά για σταθεροποίηση του λίπους.¹⁷

Τα φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικά, σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες, και μπορούν να εμποδίσουν τον κυτταρικό θάνατο ή την απόπτωση. Τα φυτικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν ως αποσβέστες των ριζών οξυγόνου, καθαριστές ελεύθερων ριζών, αποικοδομητές των υπεροξειδίων και αναχαιτιστές ενζύμων. Στην πραγματικότητα οι όροι «φυτοχημικό» και «αντιοξειδωτικό» είναι συνώνυμοι στην αντίληψη των καταναλωτών και μερικών εμπορικών τμημάτων. Παρόντα σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης οι αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι:

- Αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τροφές, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η

τοκοφερόλη και οι τοκοτριενόλες (βιταμίνη E), βιταμίνες A και B, καροτενοειδή και άλλες χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, η γλουταθειόνη και το λιπτοϊκό οξύ.

- Αντιοξειδωτικά ένζυμα, π.χ. η υπεροξειδική δισμουτάση, η γλουταθειονική υπεροξειδάση, και η γλουταθειονική ρεδουκτάση που καταλύουν τις αντιδράσεις σάρωσης ελεύθερων ριζών.
- Πρωτεΐνες δέσμευσης των μετάλλων, όπως η φερριτίνη, η λακτοφερρίνη, η αλβουμίνη, η κερουλοπλασμίνη που απομονώνουν το ελεύθερο σίδηρο και τα ιόντα χαλκού τα οποία μπορούν να καταλύσουν οξειδωτικές αντιδράσεις.
- Πολυάριθμες άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις παρουσιάζονται σε μεγάλη ποικιλία φυτικών τροφίμων, όπως ίνες, πολυφαινόλες, κινναμωμικά οξέα, βενζοϊκά οξέα, κατεχίνη, ισοφλαβανόνες, λιγνάνες, φυλλικό οξύ, συζευγμένα ισομερή του λινολεϊκού οξέος, ασβέστιο, σελήνιο, χλωροφίλη, σουλφίδια, ουρικό οξύ, ινδόλες, θειοκυανικά άλατα και αναστολείς της πρωτεάσης.

Αυτές οι ενώσεις μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, ως αντικαρκινικοί παράγοντες ή για προστασία της καρδιάς, μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών.^{1, 12, 18, 19}

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων μπορούν να προκληθούν από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

- (i) Σάρωση ριζικών ειδών, όπως των ROS και RNS (RNS, Reactive Nitrogen Species, δραστικά είδη αζώτου),
- (ii) Καταστέλλοντας το σχηματισμό των ROS και RNS παρεμποδίζοντας ορισμένα ένζυμα ή τη χηλική συμπλοκοποίηση ιχνοστοιχείων που εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών,
- (iii) Αυξορυθμίζοντας ή προστατεύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.

Μεταξύ αυτών των μηχανισμών, οι πολυφαινόλες κατέχουν την ιδανική διαρθρωτική χημεία για να δράσουν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, επειδή έχουν φαινολικές υδροξυλομάδες που έχουν την τάση να δώσουν ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα, αλλά και εκτεταμένα συζευγμένα αρωματικά συστήματα για την αποκέντρωση ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου.²⁰

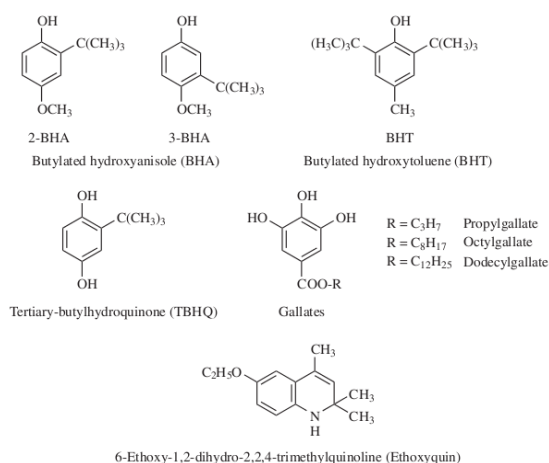
Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να παγιδεύουν ελεύθερες ρίζες εξαρτάται από τη δομή τους, ιδιαίτερα των ατόμων υδρογόνου της αρωματικής ομάδας που μπορεί να μεταφερθεί στις ελεύθερες ρίζες. Οι antiradical ιδιότητες εξαρτώνται από την οξύτητα των φαινολικών υδροξυλικών ομάδων και από τη σταθερότητα της σχηματιζόμενης ρίζας.³ Επιπλέον, ο βαθμός της γλυκοζυλίωσης επηρεάζει άμεσα την αντιοξειδωτική ιδιότητα των φλαβονοειδών. Παραδείγματος χάριν, συνήθως, οι άγλυκες μορφές της μυρικετίνης και της κερκετίνης (φλαβονοειδείς ενώσεις) είναι πιο ενεργές από τις γλυκοζυλιωμένες.⁹ Οι ανθοκυανίνες καθώς και άλλα φαινολικά, μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου σε πολύ δραστικές ρίζες, εμποδίζοντας έτσι τον περαιτέρω σχηματισμό ριζών. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τη διευθέτηση των υδροξυλικών ομάδων και την ικανότητα επέκτασης της δομικής σύζευξης.⁸

1.1.6 Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος σχηματισμού των αντιοξειδωτικών ουσιών είναι η σύνθεσή τους από διάφορους μικροοργανισμούς, μανιτάρια, ακόμη και ζώα, και κατά βάση από τα φυτά. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται φυσικά αντιοξειδωτικά. Ένας άλλος τρόπος παραγωγής αντιοξειδωτικών είναι η σύνθεση ή η βιοσύνθεσή τους από ειδικούς στη βιομηχανία, και ονομάζονται συνθετικά αντιοξειδωτικά. Η τρίτη ομάδα ουσιών περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά όμοια με τους φυσικά, αλλά που συντίθενται στη βιομηχανία, και ονομάζονται αντιοξειδωτικά πανομοιότυπα των φυσικών (nature-identical antioxidants). Σε αντίθεση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά, είναι καθαρές ουσίες, σχετικά φτηνές, εύκολα διαθέσιμες και με ιδιότητες που μπορούν να αναπαραχθούν, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής δράσης.^{2, 17}

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι αρκετά πιο αποτελεσματικά από την α-τοκοφερόλη και άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία συνήθως είναι λιγότερο λιποδιαλυτά. Η υψηλότερη συγκέντρωση προσθήκης συνθετικών αντιοξειδωτικών σε τρόφιμα που επιτρέπεται από το νόμο (0,02% σε βάση λίπους) είναι, συνήθως, επαρκής για τη σταθεροποίηση της πραγματικής τροφής. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι αρκετά πιο πολικά από τα συνθετικά, με εξαίρεση τα καροτένια, τις τοκοφερόλες και τους εστέρες τους, και τις λιγνάνες του σησαμιού. Επομένως, τα φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά δεν είναι συνήθως επαρκώς διαλυτά στη λιπιδική φάση των τροφίμων, και περιορίζεται ένεκα αυτού η αποτελεσματικότητά τους. Επιπλέον, δεν είναι καθαρές ουσίες, έτσι ώστε το καθαρό κλάσμα των αντιοξειδωτικών να είναι συνήθως πολύ χαμηλότερο από την ποσότητα που χρησιμοποιείται, ενώ τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι σχεδόν 100% καθαρές ουσίες. Γενικώς, είναι αναγκαία η προσθήκη φυσικών αντιοξειδωτικών σε υψηλές, σχετικά, συγκεντρώσεις, όπως 0,1–0,5%, ή ακόμα υψηλότερες. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν, εντούτοις, να δράσουν και ως χρωστικές, συντηρητικά, ενώ ορισμένα προσδίδουν θεμιτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα.¹⁷

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι μόρια με φαινολική δομή με διάφορους βαθμούς αλκυλο-υποκατάστασης. Στη βιομηχανία των τροφίμων, τα συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο (BHT), έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως προσθετικά για να συντηρήσουν και να σταθεροποιήσουν τροφές και ζωοτροφές, για φρεσκάδα, αύξηση της θρεπτικής αξίας, γεύση και χρώμα. Η ζήτηση για φυσικά αντιοξειδωτικά έχει αυξηθεί λόγω της αντίληψης που έχουν οι καταναλωτές για τη μακροπρόθεσμη επικινδυνότητα των συνθετικών αντιοξειδωτικών.²¹



Σχήμα 1.1.6.1: Δομές συνθετικών φαινολικών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα.¹⁵

Η χρήση μερικών συνθετικών αντιοξειδωτικών, όπως το BHT και το BHA είναι γνωστό ότι σχετίζεται με κακοήθειες, ηπατικές κακώσεις και τοξικότητες σε πειραματόζωα. Ως εκ τούτου, αυτά τα αντιοξειδωτικά εγκυμονούν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και η χρήση τους ως πρόσθετα τροφίμων είναι περιορισμένη.²²

Στην περίπτωση των φυσικών αντιοξειδωτικών, αυστηρά τεστ ασφαλείας δεν είναι διαθέσιμα, στις περισσότερες περιπτώσεις. Συνήθως, είναι μείγματα μερικών ενεργών ουσιών, η ασφάλεια των οποίων δεν είναι εντελώς γνωστή. Τα φαινορικά συστατικά που καταναλώνονται κατά κόρον στη διατροφή θεωρούνται, γενικώς, ακίνδυνα καθώς δεν έχει σημειωθεί περιστατικά έντονης τοξικότητας. Θεωρείται ότι οι ουσίες που καταναλώνονται για μακρύ χρονικό διάστημα είναι ασφαλείς, καθώς οι άνθρωποι έχουν προσαρμοσθεί σε αυτές, μιας και αποτελούν κομμάτι της διατροφής τους. Αν οποιοδήποτε φυσικό αντιοξειδωτικό καταναλώνεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από όσο συνηθίζεται, τότε τα όρια για τοξικότητα πρέπει να ελέγχονται. Γενικά όμως, τα φυσικά αντιοξειδωτικά θεωρούνται ασφαλή προς κατανάλωση μέσω της διατροφής (GRAS status, Generally Recognized As Safe, Γενικώς Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή).¹⁷

1.1.7 Φυτοχημικά και ανθρώπινη υγεία

Από νωρίς στην ιστορία της ιατρικής, είχε παρατηρηθεί μια άμεση σχέση ανάμεσα στα φυτοχημικά και διάφορες παθογενείς καταστάσεις. Ο Έλληνας γιατρός, Γαληνός της Περγάμου (129–199 μ.Χ.), λέγεται ότι συνταγογραφούσε διάφορες τροφές, συμπεριλαμβανομένου του ξεφλουδισμένου κριθαριού και διάφορων λαχανικών, για τη θεραπεία του καρκίνου. Υπολογίζεται ότι περίπου 8.000 φυτοχημικά βρίσκονται στα τρόφιμα ολικής άλεσης, και πιθανόν να είναι πολύ περισσότερα. Μέσα στους αιώνες, περισσότερα από 3.000 είδη φυτών έχουν χρησιμοποιηθεί για χημειοθεραπεία και χημική πρόληψη. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει εκτιμήσει ότι περίπου το 80% του πληθυσμού σε Ασιατικές και Αφρικανικές χώρες εξαρτάται από την παραδοσιακή ιατρική για την πρόληψη και θεραπεία των ασθενειών, η εφαρμογή της οποίας περιλαμβάνει τη χρήση φυτικών εκχυλίσματα. Τα τερπενοειδή των φυτών έχουν σημαντικό ρόλο στις παραδοσιακές θεραπείες με βότανα και υπόκεινται σε μελέτες για αντιβακτηριακές, αντινεοπλασματικές και άλλες φαρμακευτικές ιδιότητες. Τα φλαβονοειδή είναι τα πιο άφθονα και γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα και τη χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή, λόγω της ευρείας διανομής τους και της σχετικά χαμηλής τοξικότητάς τους. Αποδεικνύεται ότι οι συνδυασμοί φυσικών φυτοχημικών ουσιών είναι πιο αποτελεσματικοί από τις απομονωμένες ουσίες. Επιπρόσθετα, υπάρχουν πιθανά οφέλη από το συνδυασμό τους με χημειο- ή ραδιο-θεραπείες.¹

Μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν αρκετές βιολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένων της σάρωσης των ελεύθερων ριζών, αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξιογόνες, αντικαρκινικές, κατά του ιού HIV, αντιαλλεργικές,

αντιαιμοπεταλιακές δράσεις και αντιοξειδωτικές δράσεις. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών σχετίζεται, συνεπώς, με την προστασία έναντι διάφορων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, καρδιαγγειακών και εγκεφαλοαγγειακές ασθενειών. Όλοι αυτοί οι λόγοι συντείνουν στο αυξανόμενο ενδιαφέρον από τους καταναλωτές και τις βιομηχανίες τροφίμων για τα φαινολικά.^{14, 21}

Η κατανάλωση μέσω της διατροφής της γενιστεΐνης και της δαϊζδεΐνης (ισοφλαβονοειδή) από προϊόντα σόγιας θεωρείται ότι μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και του στήθους.⁴ Μελέτες έχουν αναφέρει σημαντικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση φρούτων, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών επιδράσεων των εσπεριδοειδών, του μύρτιλλου, του σταφυλιού και του ροδιού, τις αντικαρκινικές ιδιότητες του ροδιού και του κράνμπερυ, και τις αντιαλλεργικές ιδιότητες της φράουλας, ανάμεσα στις άλλες προστατευτικές επιδράσεις.⁹ Αντιοξειδωτικά που βρίσκονται σε διάφορα τρόφιμα και μείγματα από αμιγή φαινολικά αντιοξειδωτικά κατάφεραν να μειώσουν το βαθμό οξειδωσης των λιπιδίων στο πλάσμα, ιδιαίτερα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), όπως οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, τα φαινολικά του αμυγδαλού, των μήλων, των φραουλών και των τοματών.¹⁷

1.1.8 Η χρήση των φυτοχημικών στη βιομηχανία

Φυτοχημικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα των τροφών. Οι κύριες τάσεις στον τομέα αυτόν είναι:

- ✓ η χρήση νέων ή μοναδικών ποικιλιών φυτών, πλούσιων σε ένα είδος ή μια οικογένεια φυτοχημικών, έτσι όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία το συνολικό περιεχόμενο σε φυτοχημικά να είναι ακόμα υψηλό,
- ✓ η χρήση καινοτόμων τρόπων επεξεργασίας των τροφίμων που να βελτιώνουν το περιεχόμενό τους σε φυτοχημικά, συγκριτικά με συμβατικούς τρόπους επεξεργασίας, και
- ✓ για να ενισχύσουν τα αρχικά προϊόντα και να βελτιώσουν την ποιότητά τους.

Συμπληρωματικά της τελευταίας αναφερόμενης τάσης, τα φυτοχημικά έχουν χρησιμοποιηθεί και ως συστατικά των τροφίμων για να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και να επιμυκίνουν τη διάρκεια ζωής ενός διατροφικού προϊόντος.¹

Παρακάτω αναφέρονται οι εφαρμογές των φυτοχημικών ουσιών στη βιομηχανία.

- Πρόσθετα τροφίμων: Το ασκορβικό οξύ είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και ταυτόχρονα μπορεί να έχει ευεργετικές δράσεις ως βελτιωτικό της ζύμης σε ψημένα προϊόντα. Μερικά αμινοξέα έχουν, επίσης, σημαντική βιολογική αξία και μπορούν να προσδώσουν πλούσια γεύση στα φαγητά.¹
- Αρτύματα: Τα ενισχυτικά γεύσης είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως προσθετικά στα τρόφιμα για να βελτιώσουν τη γεύση και/ή το άρωμα. Φρούτα, λαχανικά, βότανα και μπαχαρικά περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία πτητικών ενώσεων, μερικές από τις οποίες έχουν

αρωματικές ιδιότητες.¹

- Γλυκαντικά και υποκατάστατα ζάχαρης: Φυτά και φρούτα αποτελούν μεγάλη πηγή φυτοχημικών με γλυκαντικές ιδιότητες, πολλά από τα οποία, περιέργως, δεν είναι σάκχαρα αλλά πρωτεΐνες.¹
- Χρωστικές ουσίες: Χρησιμοποιούνται για να ρυθμίσουν ή να διορθώσουν τον αποχρωματισμό ή τη χρωματική αλλαγή κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης ενός τροφίμου. Ανθοκυανίνες, μπεταλαΐνες, χλωροφύλλες και καροτενοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικές χρωστικές και συντηρητικά στα τρόφιμα, και στην παραγωγή βαφών, χαρτιού και καλλυντικών.^{8, 1}
- Αντιμικροβιακοί παράγοντες και αιθέρια έλαια: Αντιμικροβιακά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είτε για να εξολοθρεύσουν μικροοργανισμούς είτε για να αποτρέψουν την ανάπτυξή τους. Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων στα φυτά, τα απλά φαινολικά και οι πολυφαινόλες, τα τερπενοειδή και τα αλκαλοειδή. Απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα, όπως τα κινναμωμικά και καφεϊκά, έχουν επιδείξει ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε ιούς, βακτήρια και μύκητες.¹
- Αντιοξειδωτικά: Πολλά φυτοχημικά έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αποτρέπουν, δηλαδή, την οξείδωση άλλων μορίων.¹
- Σταθεροποίηση λιπών, λαδιών για τηγάνισμα και τηγανισμένων προϊόντων: Η έναρξη ή η διάδοση ή το ποσοστό της οξείδωσης των λιπιδίων μπορεί να καθυστερήσει ή να επιβραδυνθεί από την παρουσία αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν είτε εμποδίζοντας το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών των λιπιδίων είτε διακόπτοντας τη διάδοση της αντίδρασης δημιουργίας των ελεύθερων ριζών.¹
- Παράγοντες αντι-αμαύρωσης: Παρόλο που η πολυφαινυλοξειδάση είναι φυσιολογικά ικανή να οξειδώσει τις φαινολικές ενώσεις, κάποια φαινολικά οξέα μπορούν να εμποδίσουν τη δραστηριότητά της δεσμεύοντας το ενεργό κέντρο του ενζύμου.¹
- Τρόφιμα εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες: Μερικές εταιρείες ποτών και αφεψημάτων χρησιμοποιούν φλαβονοειδή στοχεύοντας την «αγορά υγιεινών προϊόντων». Τέτοια είναι η περίπτωση της εταιρείας της Coca Cola, που λάνσαρε τον Οκτώβριο του 2007 ανθρακούχο ποτό διαίτης με πρόσθετα αντιοξειδωτικά φαινολικά συστατικά.¹
- Βιοφυτοφάρμακα: Οι γλυκοζινολίτες και τα παράγωγά τους, τα αλκαλοειδή, τα τερπένια, τα φαινυλοπροπανοειδή και τα σεσκιτερπένια είναι μερικά από τα φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης που έχουν επιδείξει φυτοφαρμακευτικές ιδιότητες.¹

1.2 Το δένδρο της ροδιάς (*Punica granatum* L.), το ρόδι και προϊόντα του

1.2.1 Η προέλευση, η ιστορία και η παράδοση της ροδιάς

Το ρόδι είναι εγχώριος καρπός των περιοχών που εκτείνονται από το Ιράν έως τα Ιμαλάια της βόρειας Ινδίας. Η ροδιά ήταν ένα από τα πρώτα φυτά που καλλιεργήθηκε από τον άνθρωπο για πρώτη φορά ανάμεσα στο 4000 και το 3000 π.Χ. Καλλιεργήθηκε στην αρχαία Αίγυπτο και από νωρίς στην Ελλάδα, την Ιταλία και το Ιράκ, και αργότερα, εξαπλώθηκε στις ασιατικές χώρες, τη βόρεια Αφρική και τη μεσογειακή Ευρώπη. Μαζί με τις ελιές, τα σύκα και τα σταφύλια, τα ρόδια είναι ανάμεσα στα παλαιότερα γνωστά βρώσιμα φρούτα, ενώ γίνεται αναφορά για αυτά ακόμα και στη Βίβλο και το Κοράνι. Οι Ισπανοί άποικοι εισήγαγαν το δένδρο στην Καλιφόρνια το 1769, και στις μέρες μας, καλλιεργείται κυρίως για τους καρπούς του στις ξηρές περιοχές της Καλιφόρνιας και της Αριζόνας.^{4, 23, 24, 25} Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια της ροδιάς είναι αρχαιότερη εκείνης της αμυγδαλιάς και της βερικοκιάς και σύγχρονη με την καλλιέργεια της ελιάς, του αμπελιού και της συκιάς. Στην ελληνική γλώσσα, η ροδιά αναφέρεται με πολλά ονόματα και οι ονομασίες «Ροιά», «Ρόα», «Ροά», «Σίδη» και «Σίδα» είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Η ονομασία «Ροιά» φαίνεται ότι καθιερώθηκε από τον Όμηρο και γίνεται ευρεία χρήση αυτής στη μυθολογία.²⁶

Οι καρποί της ροδιάς κατέχουν μια τεράστια εθνοϊατρική ιστορία και αποτελούν μια πλούσια πηγή φυτοχημικών υψηλής ιατρικής αξίας. Το ρόδι είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη γονιμότητα, τη γέννηση και την αιώνια ζωή λόγω των πολλών σπόρων του. Είναι συνυφασμένο με πολλές θρησκείες και τελετουργικά, ενώ θεωρείται σύμβολο της υγείας, της θηλυκότητας, της γνώσης, της αφθονίας, της ευημερίας, της ηθικής και της πνευματικότητας. Στην αρχαία ελληνική μυθολογία, το εδώδιμο μέρος του ροδιού ήταν γνωστό ως ο «καρπός των νεκρών» και ήταν διαθέσιμο για αυτούς που κατοικούσαν στον Άδη. Οι Βαβυλώνιοι θεωρούσαν τους σπόρους του παράγοντα ανάστασης, οι Πέρσες ότι παρέχει το αήτητο στο πεδίο της μάχης και για τους αρχαίους Κινέζους αλχημιστές, ο λαμπερός κόκκινος χυμός θεωρείτο, μυθικά και ποιητικά, το «συμπύκνωμα της ψυχής», συνώνυμο του ανθρώπινου αίματος και συνδεδεμένο με τη μακροζωία και την αθανασία. Επίσης, το ρόδι πρωταγωνιστούσε εμφανώς στις τελετές, την τέχνη, τη μυθολογία των Αιγυπτίων και των Ελλήνων.^{27, 28, 29}

Το πρόσφατο ενδιαφέρον για το ρόδι δεν είναι μονάχα για την ευχάριστη γεύση του, αλλά και λόγω των επιστημονικών ευρημάτων που υποδεικνύουν θεραπευτική δράση αυτού, όπως αντιθηροσκληρωτική, αντιπαρασιτική, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη. Από την αρχαία εποχή, το ρόδι χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα στην παραδοσιακή ιατρική πολλών πολιτισμών ως θεραπευτική τροφή, για την περιποίηση και τη θεραπεία των αφθών, τα έλκη, την ακίδωση, την αιμορραγία, τις μικροβιακές μολύνσεις και τις αναπνευστικές παθολογικές καταστάσεις, αλλά και ως αντιπαρασιτικό και αντιπυρετικό.²⁸ Στην παραδοσιακή ιατρική, χρησιμοποιείται μέχρι τις μέρες μας ως τονωτικό για το αίμα. Λόγω της

ισχυρής στυπτικότητα της φλούδας του χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της δυσεντερίας ή της διάρροιας, όπως επίσης, και ως αντιπαρασιτικός παράγοντας. Άλλες αναφερθείσες παραδοσιακές χρήσεις του ροδιού περιλαμβάνουν τη θεραπεία από τσίμπημα φιδιού, του διαβήτη, των εγκαυμάτων και της λέπρας.²⁵

1.2.2 Η καλλιέργεια της ροδιάς (*Punica granatum* L.) στον κόσμο και την Ελλάδα

Η εκτενής γνώση για τις ιδιότητες του ροδιού στην υγεία και η αυξανόμενη γνώση των καταναλωτών για τα λειτουργικά τρόφιμα οδήγησαν πρόσφατα σε μεγάλη αύξηση της ζήτησης του φρούτου και των υποπροϊόντων του στο δυτικό κόσμο. Ως αποτέλεσμα, αυξήθηκαν σημαντικά οι εκτάσεις των οπωρώνων ροδιάς συμπεριλαμβάνοντας φυτείες σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές με ποικίλες συνθήκες ανάπτυξης. Οι εμπορικές φυτείες των ροδιών καλλιεργούνται τώρα στη λεκάνη της Μεσογείου (Βόρεια Αφρική, Αίγυπτος, Συρία, Λίβανος, Ελλάδα, Ιταλία, Κύπρος, Μαρόκο, Τυνησία και Ισπανία) και την Ασία (Τουρκία, Τουρκμενιστάν, Αζερμπαϊτζάν, Αρμενία, Γεωργία, Ιράν, Ιράκ, Σαουδική Αραβία, Ιορδανία, Αφγανιστάν, Πακιστάν, Ινδία, Κίνα, Μπαγκλαντές, Μιανμάρ, Ιαπωνία και Ταϊλάνδη). Ροδιές καλλιεργούνται, επίσης, στη Ρωσία, τη Βόρεια και Νότια Αμερική (από τις νότιες ΗΠΑ έως τη Χιλή και την Αργεντινή), στα πιο ξηρά μέρη της Καλιφόρνιας και της Αριζόνας και το Μεξικό, ενώ πρόσφατα καινούριες φυτείες δημιουργήθηκαν στη Νότια Αφρική και τη Βραζιλία.^{30, 31, 32, 25, 4, 33} Η επιτυχής προσαρμογή του δένδρου στο μεσογειακό κλίμα προκάλεσε την ευρεία διάδοσή σε πολλές χώρες, έτσι δημιούργησε αρκετούς τοπικούς γενότυπους κατά το πέρασμα των αιώνων.³⁴

Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις (έτος 2010), υπολογίζεται πως η συνολική παγκόσμια παραγωγή ροδιών ανέρχεται σε 3 εκατομμύρια τόνους και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις σε περισσότερα από 3 εκατομμύρια στρέμματα. Στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας αναφέρουν πως στην Ελλάδα το 2007 υπήρχαν 2.000 στρέμματα με ροδιές που βρίσκονταν κυρίως στην Πελοπόννησο, ενώ τα τελευταία χρόνια αδημοσίευτες πληροφορίες αναφέρουν πως τα στρέμματα πιθανόν να έχουν φτάσει τις 15.000. Εμπορικοί οπωρώνες ροδιάς έχουν δημιουργηθεί τελευταία σε πολλές περιοχές της Ελλάδας (Ξάνθη, Σέρρες, Δράμα, Κιλκίς, Πέλλα, Λαμία και άλλες).³⁵

1.2.3 Προϊόντα και παραπροϊόντα προερχόμενα από τη ροδιά (*Punica granatum* L.) και το ρόδι

Το ρόδι βρίσκεται στη 18η θέση στην ετήσια παγκόσμια κατανάλωση φρούτων. Ο καρπός προτιμάται για τα καρπίδια (αρίλια) που περιέχουν το χυμό, το ποσοστό των οποίων ποικίλλει από 50 έως 70% του συνολικού φρούτου και αποτελείται από ~78% χυμό και ~22% σπόρους (σπέρματα).^{25, 36}

Το ρόδι καταναλώνεται και πωλείται ως ολόκληρο φρέσκο φρούτο, ως τα αποχωρισμένα αρίλια (αποξηραμένα, κατεψυγμένα, κονσερβοποιημένα), ως φρέσκος χυμός, ζελέ, σιρόπι (γρεναδίνη), τσάι, μαρμελάδα, πάστα, συσκευασμένο ρόφημα, αλκοολούχα ποτά και γαρνιτούρα. Επίσης, πωλείται το σπορέλαιο του ροδιού.^{25, 37, 28, 38, 23}

Τα αρίλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα για παραγωγή κρασιού, ξυδιού, αποξηραμένων φρούτων και ως εναλλακτική λύση για χρήση ως αρωματική και χρωστική ουσία προστιθέμενες σε ποτά.²⁸ Στην Ινδία, τα αρίλια αφαιρούνται με χειρονακτικό τρόπο από τη φλούδα και τη μεμβράνη του φρούτου, αποξηραίνονται στον ήλιο για 10–15 ημέρες και πωλούνται, έπειτα, ως ένα παραδοσιακό μπαχαρικό που ονομάζεται αναρντάνα.^{39, 40, 28} Τα ρόδια καταναλώνονται ευρέως και ως εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται ως βοτανικό συστατικό σε φυτικά φάρμακα και σε διαιτητικά συμπληρώματα.^{36, 41}

Η κατανάλωση του φρέσκου φρούτου είναι κατά κάποιον τρόπο άβολη εξαιτίας της δυσκολίας να αποχωρισθούν τα βρώσιμα καρπίδια από τον καρπό, για αυτόν το λόγο προτιμώνται οι χυμοί των ροδιών. Ο χυμός καταναλώνεται σε όλον τον κόσμο για το ευχάριστο και μοναδικό του άρωμα, τη γεύση και το χρώμα του.⁴²

Από το 2006 έως το 2008, περίπου 320 προϊόντα που περιείχαν ρόδι ή συστατικά του προωθήθηκαν στην αγορά, ενώ ο χυμός του ροδιού αυτήν τη στιγμή παραμένει ένα από τα πιο διάσημα ποτά στην κατηγορία των σούπερ χυμών.^{43, 44}

Τα διατροφικά συμπληρώματα που περιέχουν εκχυλίσματα από ρόδι είναι διάσημα στο δυτικό κόσμο για τη θεραπεία και την πρόληψη της αρθρίτιδας και άλλων φλεγμονωδών ασθενειών.⁴⁵

Οι φυσικές βαφές από τα άνθη και τους αποξηραμένους καρπούς της ροδιάς χρησιμοποιούνται για το χρωματισμό του μαλλιού, του μεταξιού, του βαμβακιού και άλλων υφασμάτων, ενώ συχνά επιδεικνύουν εξαιρετικές αποσμητικές και αντιβακτηριδιακές δράσεις.^{46, 47}

Ο χυμός από ρόδι είναι ένα από τα τρόφιμα που προωθήθηκαν προσφάτως για τα οφέλη που προσφέρει στην υγεία, αφού είναι ένας απλός και ευχάριστος τρόπος για να καταναλώνει κανείς βιολογικά δραστικές και θρεπτικές ουσίες. Ένα ποτήριο χυμού ροδιού περιέχει περίπου το 40% της Ημερήσιας Συνιστώμενης Πρόσληψης (Recommended Daily Allowance, RDA) της βιταμίνης C, και έχει μια από τις υψηλότερες αντιοξειδωτικές δράσεις συγκρινόμενος με άλλους φρουτοχυμούς, το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι.^{48, 33, 28} Η χυμοποίηση του ροδιού και η συμπύκνωσή του διευκολύνουν το χειρισμό και την αποθήκευσή του, επιτρέποντας τη χρήση του στη βιομηχανία των τροφίμων.⁴⁹ Η μεγάλη ζήτηση που υπάρχει για τα προϊόντα του ροδιού προκάλεσε σημαντική αύξηση στην παραγωγή των χυμών του. Αυτό έφερε στο προσκήνιο τη σημασία της απόδοσης στην παραγωγή του χυμού, όχι μόνο σε οικονομικό πλαίσιο, αλλά και σε σχέση με τις οργανοληπτικές και φυσικοχημικές του ιδιότητες. Τα φαινολικά και πολυφαινολικά συστατικά είναι οι βασικές παράμετροι που καθορίζονται από την απόδοση παραγωγής του χυμού.²⁰

Η φλούδα ή εξωκάρπιο ή φλοιός του ροδιού υποτιμώνται ως γεωργικά απόβλητα, παρόλο που

έχουν ιδιαίτερες σημαντικές εθνοϊατρικές εφαρμογές και στυπτικές ιδιότητες. Η φλούδα του ροδιού συνιστά περίπου το 50% του συνολικού βάρους του φρούτου και συχνά απορρίπτεται ως απόβλητο. Εντούτοις, περιέχει υψηλότερες ποσότητες φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με το χυμό του ροδιού, και έχει βιολογικές δράσεις. Πέραν της υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας, έχει αναφερθεί ότι τα εκχυλίσματα από τη φλούδα έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων συμπεριλαμβανομένης της αντικαρκινικής, αντιμικροβιακής, αντιδιαρροϊκής. Ακόμα, παρουσιάζει αντιγονοτοξική δράση, δράση ενάντια της τυροσινάσης, αντιφλεγμονώδη και αντιδιαβητική.^{50, 51} Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων των συστατικών του ροδιού και των υποπροϊόντων του.⁵² Επιπρόσθετα, η φλούδα του ροδιού είναι απόβλητο φιλικό προς το περιβάλλον, λόγω των πολυάριθμων χρήσεων της, όπως της δράσης της ως αναγικό μέσο, της χρήσης της στην κατασκευή νανοσωματιδίων από άργυρο, ως τροφή για τα βοοειδή, αλλά και για τις χρωστικές της ουσίες.⁵¹ Επιπλέον, η φλούδα του ροδιού είναι ένα αποτελεσματικό και φθηνό προσροφητικό μέσο για την απομάκρυνση του χρωμίου από τα λύματα των υφαντουργικών βιομηχανιών.⁵³

Ένα ακόμα παραπροϊόν του ροδιού, η βγάσση, θεωρείται καλή πηγή φυσικών ενώσεων με σημαντική αντιοξειδωτική δράση και είναι ιδανική για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ως συστατικό σε διατροφικά προϊόντα.⁵⁴

Το έλαιο από τους σπόρους του ροδιού παρουσιάζει βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική και ανοσοποιητική, περιέχει οιστρογονοειδείς ενώσεις, έχει ανασταλτική επίδραση στη φωτογήρανση του δέρματος και την οξειδωση των λιπών. Επομένως, λόγω των προαναφερθείσων φαρμακευτικών και φαρμακοδιατροφικών ιδιοτήτων του, όπως και της μεγάλης ετήσιας συσσώρευσης σπόρων από ρόδια ως παραπροϊόντα από την παραγωγή του χυμού, οι σπόροι θα μπορούσαν να έχουν ποικίλες και χρήσιμες εφαρμογές στους τομείς των τροφίμων και των φαρμάκων.³⁶ Η μελέτη της σύστασης των λιπαρών οξέων του ελαίου αυτού, αποκάλυψε ότι είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, με κύριο το λινολενικό οξύ C18:3, αλλά και οι περιέχει σε αφθονία τη βιταμίνη Ε. Ως εκ τούτου, η υπολιπιδαιμική και αντιοξειδωτική επίδρασή του, αλλά και του συνόλου του σπόρου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή φαρμακοτροφίμων.⁵⁵ Περαιτέρω, τα προϊόντα από την πυρόλυση των σπόρων, που αποτελούν παραπροϊόντα των βιομηχανιών παραγωγής χυμών φρούτων, μπορούν να διατιμηθούν ως μια εναλλακτική και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας. Τα βιοέλαια που παράγονται από τους σπόρους του ροδιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα ή να ανακατευτούν με ορυκτά έλαια. Μπορούν, ακόμα, να θεωρηθούν ως μια πηγή πολύτιμων χημικών ουσιών.⁵⁶

1.2.4 Η βοτανολογική ταξινόμηση της ροδιάς (*Punica granatum* L.)

Η επιστημονική ονομασία του ροδιού *Punica granatum* προέρχεται από τις λατινικές λέξεις

“pomum” (μήλο) και “granatum” (κοκκώδης) και σημαίνει γεμάτο με σπόρους ή κόκκους μήλο.⁴⁰

²³ Το όνομα του γένους Punica ήταν το ρωμαϊκό όνομα για την πόλη της Καρχηδόνας, όπου ήταν γνωστό ότι ευδοκίμοιαν τα καλύτερα ρόδια. Το ρόδι είναι γνωστό στη γαλλική γλώσσα ως grenade” και στην ισπανική ως “granada”, λέξεις που προέρχονται από την πόλη της Γρανάδας.²⁸

Το γένος Punica έχει ξεχωριστά χαρακτηριστικά που το τοποθετούν στην τάξη των Myrtales, κάτω από την υπόταξη Rosidae, μαζί με άλλα φρούτα όπως η γκουάβα και η φειόζα, και είναι πιθανόν ότι προέρχονται από την τάξη των Saxifragales. Πιθανολογείται ότι η οικογένεια Lythraceae είναι η αρχική μορφή, η οποία εισήγαγε τις οικογένειες Sonneratiaceae και Punicaceae. Εντούτοις, το γένος Punica που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1753 από τον Λίνναιο (Σουηδός βοτανολόγος) είχε τροπικούς προγόνους κοντινούς των οικογενειών Lythraceae και Sonneratiaceae.^{51, 23} Η *Punica granatum* ανήκει στη μονογενετική οικογένεια Punicaceae που περιλαμβάνει το γένος και δύο είδη. Το κυρίαρχο είδος είναι η *Punica granatum* και ο σπανιότερος γενετικός πρόγονός του είναι η *Punica protopunica* («ρόδι από τη Σοκότρα»), μια μικρότερη σε μέγεθος εκδοχή της ροδιάς σε θαμνώδη μορφή που βρίσκεται στο νησί Σοκότρα της Υεμένης. Το γένος Punica έχει χαρακτηριστεί ως το μοναδικό της οικογένειάς του λόγω της μοναδικής δομής του φρούτου του.^{46, 51, 57} Η Punica “Nana” μια άλλη εκδοχή της *Punica granatum*, είναι ένα καλλωπιστικό δένδρο και αντιμετωπίζεται συχνά ως το τρίτο είδος του γένους Punica.^{23, 32}

1.2.5 Η μορφολογία του δένδρου της ροδιάς (*Punica granatum* L.) και του ροδιού - Στοιχεία για την καλλιέργεια της ροδιάς

Η ροδιά είναι ένας τροπικός και υποτροπικός θάμνος. Θεωρείται είτε ως ένα μικρό δένδρο είτε ως ένας μεγάλος θάμνος και ο καρπός του λογίζεται συχνά ως ένα μεγάλο μούρο. Ένα πλήρως αναπτυγμένο δένδρο ροδιάς έχει 6–10 m ύψος, αν και είναι γνωστή και η ποικιλία-νάνος.²⁵ Είναι συχνά φυλλοβόλο, αλλά σε συγκεκριμένες περιοχές συμπεριφέρεται σαν αιθαλής. Ο κορμός καλύπτεται από έναν κόκκινο-καφέ φλοιό, ο οποίος με το χρόνο γίνεται χρώματος γκρι. Η ροδιά είναι ιδιαιτέρως μακρόζωη, με δένδρα στην Ευρώπη να ξεπερνούν την ηλικία των 200 χρόνων. Εντούτοις, η ευρωστία της παρακμάζει με την πάροδο των 15 χρόνων περίπου.⁵⁸ Το ρόδι είναι ένας από τους σκληρότερους καρπούς, σφαιρικός σε σχήμα και από 5 έως 12 cm σε διάμετρο, με μια ανθεκτική δερματοειδή επιδερμίδα ή φλούδα ή εξωκάρπιο, που έχει ποικίλα χρώματα, από κίτρινο, πράσινο ή ροζ μέχρι λαμπερό βαθύ κόκκινο, που εξαρτάται από την ποικιλία της ροδιάς και το στάδιο της ωρίμανσης. Ωστόσο, υπάρχουν μερικές ασυνήθιστες ποικιλίες, όπως η μαύρη ροδιά, οι καρποί της οποίας έχουν εξ αρχής μαύρο χρώμα που διατηρούν μέχρι την περίοδο της ωρίμανσης.^{59, 25, 28, 51}



Εικόνα 1.2.5.1: Μορφολογικά και ανατομικά στοιχεία του καρπού της ροδιάς (*Punica granatum* L.), των αριλίων και των σπόρων.⁶⁰

Η φλούδα του ροδιού αποτελείται από δύο μέρη, το περικάρπιο που παρέχει μια στιβάδα επιδερμίδας και ένα ινώδες στρώμα, και το σαρκώδες μεσοκάρπιο (γνωστό ως άλβεδο), που είναι ο λευκός σπογγώδης ιστός (πλακούντας) και το εσωτερικό τοίχωμα του καρπού το οποίο χωρίζεται σε αρκετούς θαλάμους από ένα οριζόντιο διάφραγμα και κάθετες διαφραγματικές μεμβράνες φτιαγμένες από χαρτώδη ιστό. Κάθε θάλαμος είναι γεμάτος από πολλούς σπόρους στριμωγμένους πάνω στον παχύ σπογγώδη πλακούντα. Οι σπόροι (σπέρματα) περιβάλλονται από διαφανείς σάκους γεμάτους με σαρκώδη κόκκινο ή ροζ ή υπόλευκο πολτό, και ονομάζονται αρίλια. Συνιστούν αυτά το edώδιμο τμήμα του καρπού.^{23, 61}

Τα αρίλια έχουν από καιρό εκτιμηθεί από τους καταναλωτές για το γλυκό, όξινο και αναζωογονητικό

χυμό τους.^{25, 4} Το περίβλημα των αριλίων είναι πλούσιο σε οργανικά οξέα και φαινολικές ενώσεις. Ο σπόρος (σπέρμα) που περιέχεται στο αρίλιο είναι κόκκινος ή άσπρος, γωνιώδης, μαλακός ή σκληρός και αποτελείται από το κάλυμμα και, εσωτερικά, από το έμβρυο.^{34, 62, 61}

Τα αρίλια ποικίλουν στο μέγεθος και τη σκληρότητα, ανάλογα με την ποικιλία. Το χρώμα τους ποικίλει ομοίως από άσπρο έως βαθύ κόκκινο, ενώ ο αριθμός των αριλίων στον καρπό του ροδιού μπορεί να φθάσει τα 1.300 ανά καρπό.^{59, 23} Όπως σε πολλά φρούτα, έτσι και οι ποικιλίες των ροδιών διαφέρουν στη γεύση, που μπορεί να είναι από γλυκιά έως ξινή και σχετίζεται άμεσα με την ποιότητα και την ποσότητα των οργανικών οξέων και των σακχάρων. Η επιθυμητή γεύση του ροδιού από τους καταναλωτές διαφέρει, εντούτοις, στις χώρες και τις περιοχές.^{34, 62, 61}

Τα ρόδια καλλιεργούνται σήμερα σε υποτροπικές και τροπικές περιοχές σε πολλές διαφορετικές μικροκλιματικές ζώνες. Τα κλίματα που ομοιάζουν το μεσογειακό είναι τα ιδανικά για την ανάπτυξη των καρπών. Το φυτό της ροδιάς είναι ανεκτικό σε διάφορα εδάφη, αλλά ευδοκίμει σε περιοχές με έντονη ηλιοφάνεια και ήπιους χειμώνες, και ζεστά και ξηρά καλοκαίρια. Η αντοχή της ροδιάς σε δυσμενείς κλιματικές και εδαφικές καταστάσεις την καθιστούν μια ελκυστική επιχειρηματική περίπτωση για άγονα και ημιάγονα κλίματα, όπου τα περισσότερα καρποφόρα δένδρα δεν μπορούν να καλλιεργηθούν για εμπορική εκμετάλλευση.^{62, 30, 61}

Οι καρποί του ροδιού είναι ώριμοι όταν έχουν αναπτύξει ένα συγκεκριμένο χρώμα και δίνουν ένα μεταλλικό ήχο όταν χτυπηθούν ελαφριά.²³ Το ρόδι κατηγοριοποιείται ως ένα μη κλιμακτηρικό φρούτο, δεν παρουσιάζει, δηλαδή, δραστικές αλλαγές στη φυσιολογία και τη σύστασή του μετά τη συγκομιδή. Οπότε, τα φρούτα που συλλέγονται πριν να ωριμάσουν δε συνεχίζουν τη διαδικασία της ωρίμανσης κατά την αποθήκευση και είναι, λοιπόν, κατώτερα σε διατροφική αξία.

Παρά τη μη κλιμακτική φύση του ροδιού, επέρχεται ποιοτική και ποσοτική απώλεια των συστατικών του, εξαιτίας των μεθόδων χειρισμού μετά τη συγκομιδή, με αποτέλεσμα τραυματισμούς και εγκαύματα στη φλούδα του καρπού, απώλεια βάρους και το σάπισμα των καρπών.^{59, 63} Επιπλέον, η ποιότητα του καρπού επηρεάζεται συχνά σε μεγάλο βαθμό από μια φυσιολογική ανωμαλία που ονομάζεται αμαύρωση των αριλίων, κατά την οποία, ένα μέρος ή το σύνολο των αριλίων παρουσιάζει αποχρωματισμό και οι καρποί θεωρούνται ακατάλληλοι προς κατανάλωση.²³

1.2.6 Η χημική σύσταση του ροδιού (*Punica granatum* L.)

Η ροδιά χωρίζεται σε αρκετά ανατομικά τμήματα, και όπως και τα προϊόντα που προέρχονται από τους καρπούς της, είναι πηγή διάφορων φυτοχημικών ενώσεων και έχουν πολλαπλά οφέλη για την υγεία.²⁸

Ο καρπός του ροδιού

Ο καρπός του ροδιού έχει χαρακτηριστεί το «σούπερ φρούτο» της φύσης.⁶⁴ Αποτελεί πηγή ποικίλων βιολογικά ενεργών ενώσεων, όπως της βιταμίνης C και φαινολικών ενώσεων, όπως το ελλαγικό οξύ, οι ανθοκυανίνες, οι γαλλοτανίνες και ελλαγιτανίνες που είναι γνωστό οι δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά.^{41, 65, 66, 67, 68} Άλλα φυτοχημικά που έχουν ταυτοποιηθεί στο ρόδι είναι κάποια οργανικά οξέα, στερόλες, τριτερπενοειδή, λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και αλκαλοειδή.⁶⁶ Ισχυροί συσχετισμοί μεταξύ της φαινολικής σύστασης και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του ροδιού έχουν αναφερθεί σε μελέτες.² Φαινολικά συστατικά όπως τα γαλλικό, ελλαγικό, φερουλικό, καφεϊκό, πρωτοκατεχινικό, χλωρογενικό, κουμαρικό και πουνικικό οξέα, κερκετίνες, κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη, αλλά και ένας πολυσακχαρίτης γαλακτομαννάνης με αντικαρκινική δράση έχουν επίσης ταυτοποιηθεί στο φρούτο αυτό.^{69, 70, 28, 71, 68, 72, 27}

Μια ποικιλία γεύσεων σχετίζεται με τα ρόδια, όπως αυτή του καφέ μπαχαριού, του ξύλου, του μήλου και του μούρου.⁷³ Πληθώρα αρωματικών ενώσεων έχουν βρεθεί στο ρόδι, παραδείγματος χάριν, το λιμονένιο, η *cis*-2-επτανάλη και η *cis*-3-εξανόλη.⁷⁴

Οι παράγοντες που καθορίζουν το περιεχόμενο σε βιοδραστικές ενώσεις στο ρόδι και το χυμό του είναι οι γενετικές ανομοιογένειες, οι κλιματικές συνθήκες, η σύνθεση του εδάφους, οι αγροτικές πρακτικές, η εποχή της συγκομιδής και οι συνθήκες αποθήκευσης των καρπών.⁷⁵ Σύμφωνα με τους Legua κ.ά. (2012), η ποικιλία (γονότυπος) *per se* αποτελεί τον κύριο παράγοντα στη ρύθμιση των σακχάρων, του προφίλ των οργανικών οξέων, των ολικών φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής δράσης στα ρόδια.³⁷

Ρίζες, φλοιός και φύλλα του δένδρου της ροδιάς

Τα φύλλα της ροδιάς περιέχουν μοναδικές τανίνες, όπως η πουνικαλίνη και η πουνικαφολίνη, γλυκοζίτες της λουτεολίνης και της απιγενίνης, μιας φλαβόνης με προγεστερονικές και

αγχολυτικές ιδιότητες.^{28,76} Συγκεκριμένες γαλλοτανίνες και ελλαγιτανίνες βρίσκονται μόνο στο φλοιό και τα φύλλα των ροδιών.⁷⁷ Επιπλέον, οι ρίζες και ο φλοιός του δένδρου αυτού περιέχουν αλκαλοειδή της πιπεριδίνης.²⁸

Τα άνθη του δένδρου της ροδιάς

Το λαμπερό χρώμα των άνθων της ροδιάς οφείλεται στις ανθοκυανίνες. Ωστόσο, μόνον ο 3,5-διγλυκοζιτης της πελαργονιδίνης έχει μέχρι τώρα ταυτοποιηθεί σε αυτά.²⁸ Τα άνθη περιέχουν μια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών, όπως πολυφαινόλες (γαλλικό, ελλαγικό οξύ, μπρεβιφολίνη) και τριτερπενικά οξέα (ολεανολικό, ουρσολικό, μασλινικό και ασιατικό οξύ). Έχει, επίσης, αναγνωρισθεί μια στερόλη, η δαουκοστερόλη, και ένα είδος φλαβονοειδούς, η πουνικαφλαβόνη. Οι ενώσεις αυτές έχουν επιδείξει ισχυρή βιολογική δραστηριότητα.^{28, 78}

Εξωκάρπιο ή φλοιός ή φλούδα του ροδιού

Η φλούδα στο ρόδι αποτελεί το 50–60% του συνολικού του βάρους, και περιλαμβάνει μεγάλη ποσότητα ποικίλων ενώσεων, όπως φαινολικά, φλαβονοειδή, ελλαγιτανίνες, προανθοκυανιδίνες, πολυσακχαρίτες και μέταλλα. Η φλούδα είναι το τμήμα του ροδιού με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, που βρίσκεται σε αναλογία με την υψηλή του περιεκτικότητα σε φαινολικά και πολυφαινολικά συστατικά. Συν τοις άλλοις, οι φλούδες του ροδιού δείχνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τη φλούδα άλλων φρούτων, όπως του μάνγκο, της μπανάνας και της καρύδας.^{79, 28, 50}

Οι υδρολυόμενες τανίνες βρίσκονται βασικά στο φλοιό του ροδιού και το μεσοκάρπιο. Το κλάσμα των τανινών αποτελείται από το γαλλικό οξύ και τους εστέρες του ελλαγικού οξέος μορίων πολυόλης. Ο μεγάλος αριθμός πιθανών συνδυασμών των διαφορετικών μονομερών οδηγεί σε μια τεράστια δομική ποικιλομορφία. Οι δομές αυτές υποδιαιρούνται στις γαλλοτανίνες (τανίνες τύπου I) και τις ελλαγιτανίνες (τανίνες τύπου II), συμπεριλαμβανομένων των μοναδικών γαλλαγυλοεστέρων, όπως είναι η κύρια υδρολυόμενη τανίνη του ροδιού, η πουνικαλαγίνη. Περαιτέρω τάξεις των ελλαγιτανινών αποτελούν οι δεϋδροελλαγιτανίνες (τανίνες τύπου III) και οι μετασχηματισμένες δεϋδροελλαγιτανίνες (τανίνες τύπου IV).⁸⁰

Υδρολυόμενες τανίνες στο φλοιό είναι η πουνικαλίνη, η πουνικαλαγίνη, η πενδουνκουλαγίνη, η καζουαρίνη, η κοριλαγίνη και οι γρανατίνες A και B.^{28, 50, 71, 51} Η πουνικαλίνη και η πουνικαλαγίνη είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά του φλοιού και φθάνουν σε ποσοστό έως το 0,2% του συνόλου.⁵¹ Η πουνικαλαγίνη [2,3-(S)-εξαϋδροξυ-διφαινουλο-4,6-(S,S)-γαλλαγυλο-D-γλυκόζη, MW=1084 g/mol] είναι μια υδατοδιαλυτή ένωση μεγάλου μοριακού βάρους και απαντάται στα δύο της ισομερή, τις πουνικαλαγίνες α και β. Μπορεί να βρεθεί στα σπέρματα, τη φλούδα και το χυμό του ροδιού, αλλά βρίσκεται μόνο σε αυτό το φρούτο.⁷⁹ Τα ισομερή της είναι ελλαγιτανίνες στις οποίες το γαλλαγικό και το ελλαγικό οξύ συνδέονται με ένα μόριο γλυκόζης. Σε διακυμάνσεις του pH, υδρολύονται απελευθερώνοντας ελλαγικό οξύ και πουνικαλίνη.⁶⁹ Η πουνικαλίνη μπορεί ομοίως να υδρολυθεί προς ελλαγικό οξύ, ενισχύοντας έτσι τη βιολογική δράση αυτού.⁷¹ Η εν δυνάμει βιοενεργότητα των πουνικαλαγών εξηγείται από την ικανότητα

υδρόλυσής τους προς ελλαγικό οξύ *in vitro* και *in vivo*.⁸¹

Το έντονο κόκκινο χρώμα της φλούδας στο ρόδι αποδίδεται στις ανθοκυανιδίνες και στις φλαβαν-3-όλες.⁵¹ Τα συζευγμένα με σάκχαρα φλαβονοειδή, συγκεκριμένα η λουτεολίνη, η κερκετίνη, η καεμπφερόλη και η ναρινγενίνη έχουν ταυτοποιηθεί σε υδατικά εκχυλίσματα της φλούδας.⁵⁷ Παρομοίως, οι προδελφινιδίνες (συμπυκνωμένες τανίνες που προκύπτουν από τον πολυμερισμό της γαλλοκατεχίνης) έχουν, επίσης, βρεθεί στη φλούδα του ροδιού.⁶⁹ Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα υψηλότερα ποσοστά φαινολικών οσσιών στο ρόδι περιέχονται στη φλούδα του.⁵¹ Ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί στη φλούδα του ροδιού από διάφορους ερευνητές είναι το γαλλικό, καφεϊκό, φουμαρικό, πρωτοκατεχινικό, χλωρογενικό, p-κουμαρικό, γαλλαγικό και ελλαγικό οξύ, ανθοκυανίνες και ανθοκυανιδίνες (κυανιδίνη, πελαργονιδίνη, δελφινιδίνη).^{69, 51,}

66

Καθώς η φλούδα δεν αποτελεί βρώσιμο μέρος του ροδιού, έχουν δημιουργηθεί φάρμακα, σε μορφή χαπιών, σκόνης, και υγρού για την εύκολη κατανάλωσή των συστατικών της.⁷⁹ Ακόμα, η φλούδα μπορεί να υποβληθεί σε εκχύλιση των φαινολικών της συστατικών και αυτά να προστεθούν σε βιομηχανικά παρασκευασμένους χυμούς από ρόδια ή άλλα φρούτα. Προκύπτει, λοιπόν, μια ενίσχυση του φαινολικού περιεχομένου του χυμού, κυρίως, με ελλαγιτανίνες, γαλλικό και ελλαγικό οξύ, ανθοκυανίνες και κατεχίνες.⁶⁶

Ο χυμός από τα αρίλια και τη φλούδα του ροδιού

Αμινοξέα: προλίνη, βαλίνη, μεθειονίνη²⁸

Βιταμίνες και αντιοξειδωτικά:
νιασίνη (Βιταμίνη Β3),
ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C),
Βιταμίνη E, συνένζυμο Q10,
λιποϊκό οξύ^{23, 79, 71}

Μέταλλα και μεταλλοειδή: Fe, Cu,
Na, Mg, K, Ca, Zn, Mn, P^{71, 25}

Σάκχαρα και πολυσακχαρίτες:
γλυκόζη, φρουκτόζη,
σουκρόζη, σορβιτόλη,
πηκτίνη^{71, 28, 79, 86}

Λιπαρά οξέα: συζευγμένο
λινολενικό οξύ, λινολεϊκό,
πουνικικό, στεατικό οξύ²⁸

Λιγνάνες (φυτοοιστρογόνα):
ισολαρικρεσινόλη, μεδιορεσινόλη,
ματερεσινόλη, πινωρεσινόλη,
σεκοΐσολαρισρεσινόλη, συριγγαρεσινόλη⁹¹

H₂O

Οργανικά οξέα:
κιτρικό, μηλικό,
τρυγικό, ισοκιτρικό,
ηλεκτρικό, φουμαρικό,
οξαλικό οξύ^{71, 79, 28, 82}

Αρωματικές ενώσεις: τερπένια, φουράνια,
εστέρες, οξέα, κετόνες, αλκοόλες, αλδεΐδες,
εξανάλη, λιμονένιο, cis-2-επτενάλη, cis-3-
εξενόλη, β-πιπτενίο, β-καρυοφυλλένιο^{83, 84}

Φλαβονοειδή: λουτεολίνη,
κερκετίνη, καεμπφερόλη,
ναρινγενίνη, φλοριδζίνη^{57, 82}

Υδρολύμενες τανίνες: ελλαγικό
οξύ, γλυκοζίτες και παράγωγα του
ελλαγικού οξέος, γαλλαγικό οξύ,
πουνικαλίνη, γαλλοτανίνες,
γαλλαγυλοεστέρες,
δεϋδροελλαγιτανίνες, ελλαγιτανίνες,
πουνικαλαγίνες, γρανατίνες^{87, 82, 80,}
^{88, 89, 71, 4, 90, 76}

Φλαβαν-3-όλες και
Συμπυκνωμένες τανίνες:
κατεχίνη, επικατεχίνη,
γαλλοκατεχίνες,
επιγαλλοκατεχίνες και
παράγωγά τους^{87, 28, 82, 20}



Ενώσεις που δρουν ως
οιστρογόνα και προ-οιστρογόνα:
κουμεστερόλη, εστρόνη⁸⁵

Σχήμα 1.2.6.1: Ονομαστικά, τα κύρια συστατικά του χυμού από ρόδι που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Το εδώδιμο μέρος του ροδιού αποτελείται από τα αρίλια και από τα σπέρματα. Τα αρίλια περιέχουν περίπου 80% χυμό και 20% σπόρους. Τα αρίλια ως έχουν ή όταν χυμοποιηθούν αποτελούνται από 85% νερό, 10% σάκχαρα, 1,5% πηκτίνη, και από οργανικά οξέα, λιπαρά

οξέα, αμινοξέα και διάφορες βιοδραστικές ενώσεις.^{28, 86} Ποσότητα 100 g αριλίων παρέχουν 72 kcal ενέργειας, 1,0 g πρωτεΐνης, 16,6 g υδατανθράκων, περίπου 400 mg μετάλλων, 0,3 mg νιασίνης και 7 mg βιταμίνης C.²³ Ο χυμός είναι, επίσης, πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως πολυφαινολών, τανινών, βιταμίνης C και E, συνενζύμου Q10 και λιποϊκού οξέος.⁷⁹

Το χρώμα του χυμού από ρόδι κυμαίνεται από κόκκινο σε καφέ, εμφανίζει δε, συχνά, θολερότητα και στερεά υπολείμματα. Οι διακυμάνσεις αυτές καθορίζονται κατά κύριο λόγο από τις διαφορετικές τεχνικές που εφαρμόζονται κατά την τελική επεξεργασία του χυμού.⁸⁴

Ο χυμός του ροδιού είναι πλούσιος σε μεταλλικά στοιχεία, όπως κάλιο, ασβέστιο, νάτριο, φώσφορο και σίδηρο, ιδιαίτερα όταν το φρούτο είναι πλήρως ώριμο.^{28, 25} Το υψηλό αυτό περιεχόμενο σε μέταλλα μπορεί να συμβάλει στην ημερήσια πρόσληψη των συστατικών αυτών στην ανθρώπινη διατροφή.²⁸

Η σύσταση και η συγκέντρωση των οργανικών οξέων καθορίζει σημαντικά την αντίληψη των καταναλωτών για τη γλυκιά και ξινή γεύση που χαρακτηρίζουν κάθε ποικιλία ροδιών. Αρκετά οργανικά οξέα έχουν βρεθεί στο ρόδι και το χυμό του, όπως το κιτρικό, μηλικό, τρυγικό, οξαλικό και ηλεκτρικό οξύ. Γενικότερα, ο χυμός του ροδιού χαρακτηρίζεται από ξινή, γλυκιά, γήινη, φρουτώδη και στυφή γεύση.²⁵ Ποικίλες αρωματικές ενώσεις έχουν αναφερθεί ότι βρίσκονται στο χυμό, συμπεριλαμβανομένων των τερπενίων, φουρανίων, εστέρων, κετονών, αλκοολών και αλδεϋδών.⁸⁴ Οι κυριότερες πτητικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί είναι ο αιθυλο-2-βουτανοϊκός μεθυλεστέρας, η εξανάλη και το λιμονένιο.⁸³

Ο φρεσκός χυμός από ρόδια περιέχει πλήθος βιοδραστικών ουσιών, πρωτίστως φαινολικών οξέων, όπως το γαλλικό, καφεϊκό και κουμαρικό οξύ. Το ασκορβικό οξύ βρίσκεται σε περιεκτικότητα περίπου 10—20 mg ανά 100 g χυμού, καθιστώντας τον σε εξαιρετική πηγή της αντιοξειδωτικής αυτής βιταμίνης. Ο χυμός περιέχει, ακόμα, φλαβονοειδή, μεταξύ άλλων, την κερκετίνη και την φλοριδζίνη.⁸² Συμπυκνωμένες τανίνες δεν απαντώνται συχνά στο χυμό του ροδιού, ενώ οι φλαβαν-3-όλες βρίσκονται μόνο στη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή και περιλαμβάνουν την κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη και παράγωγά τους.²⁰

Έξι ανθοκυανίνες είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα του χυμού και έχουν πολλάκις μελετηθεί σε σύσταση και ποσότητα ως οι 3-μονογλυκοζίτες και οι 3,5-διγλυκοζίτες της κυανιδίνης, δελφινιδίνης και πελαργονιδίνης. Το κόκκινο χρώμα που προσδίνουν εξαρτάται από τη χημική δομή των ανθοκυανιδινών και τη συγκέντρωσή τους στο χυμό. Η απόχρωση σχετίζεται με τις σχετικές συγκεντρώσεις των παραγώγων της δελφινιδίνης (μπλε αποχρώσεις), των παραγώγων της κυανιδίνης (ιώδεις αποχρώσεις) και των παραγώγων της πελαργονιδίνης (πορτοκαλί και κόκκινες αποχρώσεις). Ωστόσο, οι ανθοκυανίνες είναι ασταθείς και ευπαθείς στην αποικοδόμηση έχοντας ως αποτέλεσμα την εμφάνιση καφέ χρώματος κατά την επεξεργασία ή την αποθήκευση του χυμού. Έχει αποδειχθεί πως οι 3,5-διγλυκοζίτες είναι σταθερότεροι των 3-μονογλυκοζιτών, ενώ τα παράγωγα της δελφινιδίνης είναι λιγότερο σταθερά (ευκόλως οξειδούμενα) από τα αντίστοιχα παράγωγα της κυανιδίνης ή της πελαργονιδίνης.^{92, 93,}

Η ομάδα αυτών των έξι (το μέγιστο) σε αριθμό ανθοκυανινών προέρχεται κατά κύριο λόγο από τα αρίλια και είναι χαρακτηριστική του χυμού από ρόδι. Ως εκ τούτου, το προφίλ των ανθοκυανινών μπορεί επιτυχώς να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό έλεγχο και τον έλεγχο για νοθεία των χυμών.^{96, 94}

Ο χυμός από ρόδια του εμπορίου παρασκευάζεται πιέζοντας ολόκληρο τον καρπό μαζί με τη φλούδα, συνεπώς, περνούν οι υδατοδιαλυτές ενώσεις από το σύνολο του φρούτου στο χυμό σε μεγάλο ποσοστό. Σημαντικές ποσότητες των πολυφαινολών της φλούδας εκχυλίζονται στο χυμό, με κύρια την πουνικαλαγίνη.^{94, 33} Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι ο εργαστηριακά παρασκευασμένος χυμός από τα αρίλια του ροδιού περιέχει 10 φορές λιγότερες πουνικαλαγίνες από εκείνον του εμπορίου.⁹⁷ Επομένως, είναι ευνόητο ότι οι χυμοί που προκύπτουν μόνο από τα αρίλια περιέχουν λιγότερες φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις συγκρινόμενοι με τους χυμούς που παράγονται από τα αρίλια μαζί με τη φλούδα.^{95, 80} Εντούτοις, η υπέρμετρα υψηλή συγκέντρωση σε πολυφαινολικά συστατικά επηρεάζει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού. Συγκεκριμένα, εξαιτίας των αλληλοεπιδράσεων μεταξύ των τανινών του χυμού και πρωτεϊνών του σίελου, και μεταξύ των ανθοκυανινών και των πρωτεϊνών του χυμού, αυξάνονται η θολερότητα, η στυφάδα, αλλά και η σταθερότητα του χρώματος του χυμού.^{20, 98}

Η ύπαρξη του ελεύθερου ελλαγικού οξέος στα τρόφιμα είναι ασυνήθης, καθώς τις περισσότερες φορές βρίσκεται συζευγμένο με μια χαρακτηριστική μονάδα γλυκοζίτη, όπως η γλυκόζη, ή συνθέτει μέρος των πολυμερών των ελλαγιτανινών.⁸⁵ Ο χυμός του ροδιού περιέχει γαλλαγικό οξύ, ένα ανάλογο του ελλαγικού οξέος που αποτελείται από τέσσερα μόρια γαλλικού οξέος, και περιέχει, επίσης, την πουνικαλίνη, την κύρια μονομερή υδρολυόμενη τανίνη, στην οποία το γαλλαγικό οξύ είναι συνδεδεμένο με τη γλυκόζη.⁴

Οι ελλαγιτανίνες είναι βιονεργές πολυφαινόλες που βρίσκονται σε αφθονία σε μερικά φρούτα και ξηρούς καρπούς, όπως τα ρόδια, μούρα, βατόμουρα, σμέουρα, φράουλες, καρύδια και αμύγδαλα. Η πουνικαλαγίνη είναι η επικρατέστερη ελλαγιτανίνη και η πιο χαρακτηριστική ένωση στο χυμό του ροδιού, καθώς βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στα ρόδι, ενώ η συγκέντρωσή της στο χυμό μπορεί να φθάσει τα 2 g/L.^{90, 88, 33}

Το φαινολικό περιεχόμενο και η γενική σύσταση του χυμού από το ρόδι συνδέεται άμεσα με την ποικιλία, τις αγρονομικές, περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες, τις γεωγραφικές μεταβλητές, την περίοδο συγκομιδής, το στάδιο ωρίμανσης του φρούτου, τις μετασυγκομιδητικές συνθήκες, την αποθήκευση, αλλά και τον τρόπο παρασκευής και επεξεργασίας του χυμού.^{93, 94, 99}

Οι χυμοί από ρόδι στο εμπόριο επιδεικνύουν τρεις φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι.⁷⁶ Η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα είναι συνυφασμένη με το φαινολικό περιεχόμενο και κυρίως με τη συγκέντρωση των υδρολυόμενων

τανινών και σε μικρότερο βαθμό με τα ελλαγικά οξέα και τις ανθοκυανίνες.^{87, 100, 101} Επιπλέον, η εξέταση των συνολικών επιπέδων των ανθοκυανινών, πουνικαλαγινών, φαινολικών οξέων και του ασκορβικού οξέος είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό έδειξε ότι συσχετίζονται σημαντικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού από αρίλια.^{31, 41, 102}

Ενδέχεται, επίσης, η ύπαρξη συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φαινολικών ενώσεων που πρέπει γενικώς να λαμβάνονται υπ' όψιν. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης του Seeram κ.ά. (2005), η τάση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του χυμού από το ρόδι έχει ως εξής, χυμός ροδιού >ολικές τανίνες >πουνικαλαγίνη >ελλαγικό οξύ, και η ανώτερη βιοδραστικότητα του χυμού σε σχέση με τις απομονωμένες πολυφαινόλες του, απεικονίζει τις πολυπαραγοντικές επιδράσεις και τη χημική συνεργία της δράσης του συνδυασμού ενώσεων συγκριτικά με τα ξεχωριστά ενεργά συστατικά.¹⁰³ Έχει, επίσης, φανεί από έρευνες ότι παρόλο που το ελλαγικό οξύ αναφέρεται ως η ένωση-κλειδί στο χυμό του ροδιού, είναι πιθανό ότι η δράση του ενισχύεται από την παρουσία όλων των υπόλοιπων πολυφαινολών.⁸⁵

Τέλος, αρκετές λιγνάνες έχουν ανιχνευθεί και μελετηθεί σε ποσότητα στο ρόδι και το χυμό του. Οι λιγνάνες συνεισφέρουν στις φερόμενες ευεργετικές διατροφικές ιδιότητες των χυμών από ρόδι, και η αφθονία τους στα αγρο-βιομηχανικά απόβλητα μπορεί να καταστήσει τα παραπροϊόντα του ροδιού μια φθηνή και ανανεώσιμη φυσική πηγή των οφέλιμων αυτών για την υγεία ενώσεων.⁹¹

Οι σπόροι (σπέρματα) και το σπορέλαιο του ροδιού

Οι σπόροι των ροδιών είναι πλούσιοι σε λιπίδια, ενώ το έλαιό τους συνιστά το 12–20% του ολικού βάρους των σπόρων, περιέχει δε, ένα μοναδικό προφίλ λιπαρών οξέων που χαρακτηρίζεται από την υψηλή συγκέντρωση σε ακόρεστα λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένων του ελαϊκού, λινελαϊκού και υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης συζευγμένων λινολενικών λιπαρών οξέων. Το συζευγμένο λινολενικό οξύ (Conjugated Linolenic Acid, CLnA) αποτελεί ένα συλλογικό όρο για τα γεωμετρικά ισομερή και τα ισομερή θέσης του οκταδεκατριενοϊκού οξέος (C18:3). Στη φύση, τα συζευγμένα πολυενοϊκά οξέα δε βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στα ζωικά λίπη, βρίσκονται, όμως, σε πολλά σπορέλαια είτε ως C18 τριένια είτε ως τετραένια του C18. Έχει αποδειχθεί ότι τα ισομερή του CLnA δρουν ως αντιοξειδωτικά και διαθέτουν βιολογική δράση.^{71, 104, 105, 106, 107}

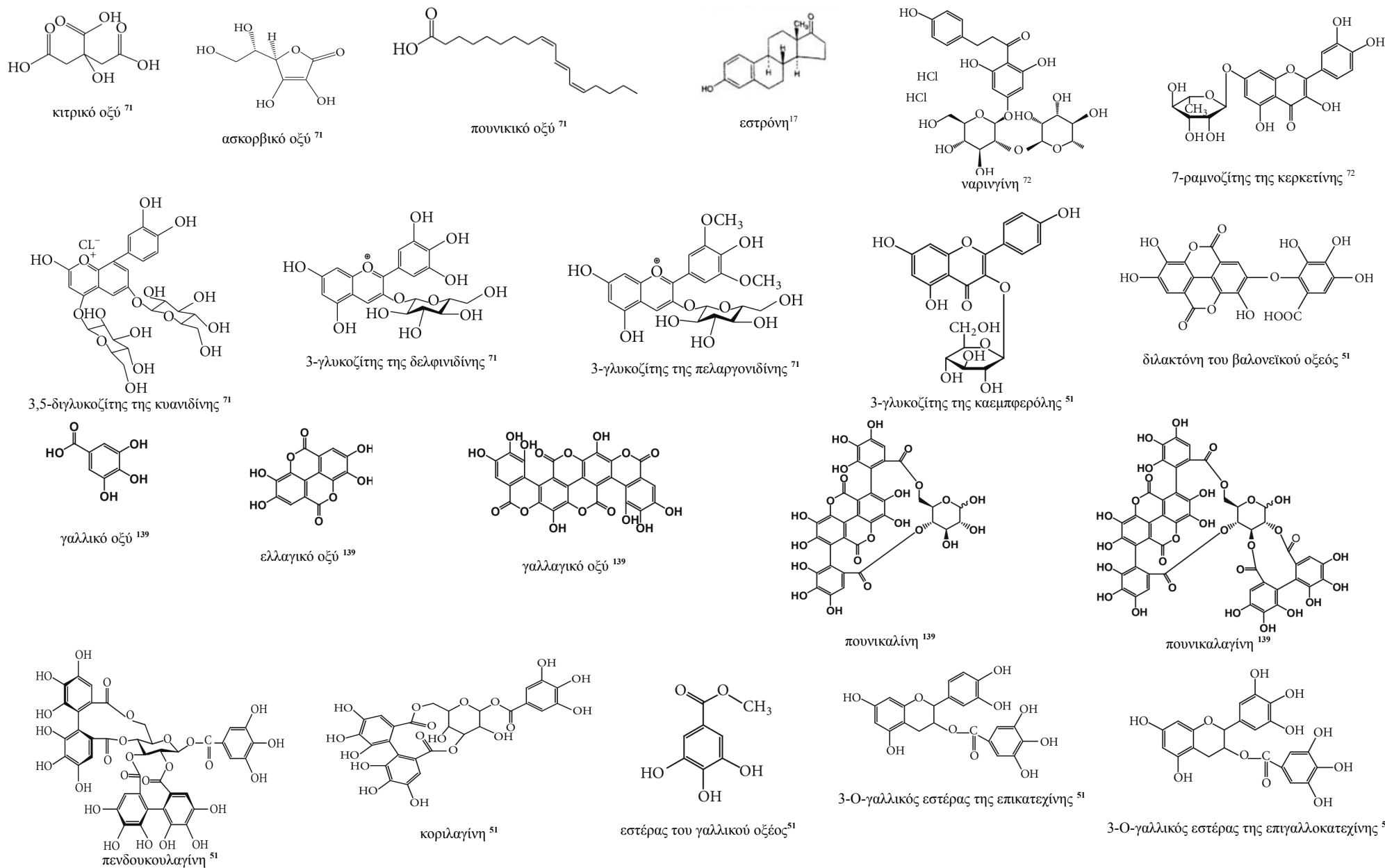
Λοιπά λιπίδια των σπόρων είναι το πουνικικό, στεατικό, α-ελαιοστεατικό, β-ελεοστεατικό, καταλπικό, γαδολεϊκό, αραχιδικό, βεχενικό και παλμιτικό οξύ. Ενδιαφέρο προκαλεί το ότι το πουνικικό οξύ, το οποίο είναι ένα συζευγμένο ισομερές μοναδικό στο σπορέλαιο του ροδιού, αποτελεί περίπου το 80% αυτού. Άλλα δευτερόντα συστατικά είναι οι στερόλες, τα στεροειδή και οι κερεβροζίνες στο σπορέλαιο, και πρωτεΐνες, ίνες, βιταμίνες και ανόργανα συστατικά στο σπόρο ως σύνολο.⁷¹

Το έλαιο των σπόρων του ροδιού περιέχει ακόμα, ισοφλαβόνες, κυρίως τη γενιστεΐνη που συναντάται επίσης στη σόγια, και την κουμπεστερόλη που είναι φυτοοιστρογόνο. Το ρόδι

αποτελεί το μόνο γνωστό καρπό στη φύση που περιέχει το φυλοστεροειδές “εστρόνη” σε συγκέντρωση 17 mg/kg ξηρού σπόρου.^{85, 36, 57}

Ο Elfalleh κ.ά. (2011) βρήκαν ότι το σπορέλαιο του ροδιού περιείχε υψηλά ποσά τοκοφερολών και ότι οι ταυτοποιημένες α-, γ- και δ-τοκοφερόλες συνείσφεραν σε μεγάλο βαθμό στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ελαίου. Άλλωστε, η αφθονία του σπορέλαιου του ροδιού σε βιταμίνη Ε, το καθιστά φυσική πηγή για χρήση σε φαρμακευτικούς και ιατρικούς σκοπούς.⁶⁶

Στο εν λόγω έλαιο, έχουν επίσης βρεθεί ελλαγικό, 3,4-διϋδροξυβενζοϊκό, 4-υδροξυβενζοϊκό, συριγγικό, βανιλλικό και φερουλικό οξύ, στεροειδή οιστρογόνα και μη στεροειδή φυτοοιστρογόνα, συμπεριλαμβανομένων της κουμεστάνης, της κουμοεστρόλης, και των ισοφλαβονών γενιστεΐνη και δαΐδεΐνη. Χάρης στην υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα των σπερμάτων του ροδιού και του ελαίου του, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως φυτοφάρμακα.^{108, 55, 109, 62} Μερικά ακόμα συστατικά των σπόρων είναι η καμπεστερόλη, η 17-α-εστραδιόλη, ενώ τα κύρια ανόργανα στοιχεία είναι το κάλιο, το ασβέστιο και το νάτριο.^{62, 57, 28}



Σχήμα 1.2.6.2: Ενώσεις που απαντώνται στον καρπό του ροδιού και τα προϊόντα του.

1.2.7 Οι φαρμακολογικές ιδιότητες και η ιατρική αξία του ροδιού

Το ρόδι, εκτός από κομμάτι της διατροφής, χρησιμοποιούνταν ως φυτική θεραπεία από τα αρχαία χρόνια. Το ρόδι έχει εκτιμηθεί ως σημαντικότερο φάρμακο, ακόμα και στην αρχαία λογοτεχνία από τον Ιπποκράτη, τον Πλίνιο, τον Σορανό και τον Διοσκουρίδη. Χάρης στις τεράστιες δυνατότητες για οφέλη στην υγεία, το ρόδι έχει κατακτήσει τον τίτλο της «υπερτροφής» (superfood).²³ Όλα τα φυτικά μέρη της ροδιάς έχουν χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσουν πολλές κοινές ασθένειες.¹¹⁰ Στις αραβικές χώρες, οι αποξηραμένη φλούδα του ροδιού χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά για να θεραπεύσει τη διάρροια, το στομαχόπονο και να επουλώσει πληγές.¹¹¹ Στην παραδοσιακή ιατρική, η αποξηραμένη φλούδα και ο χυμός των ροδιών χρησιμοποιούνται ως φάρμακο χορηγούμενο από το στόμα στη θεραπεία του κολικού, της κολίτιδας, της λευκόρροιας, της εμμηνορραγίας, της παράλυσης και της ορθοκλήλης, και με εξωτερική εφαρμογή στον αυχένα σε περιπτώσεις παρωτίτιδας και κεφαλαλγίας. Μια σειρά από τις θεραπευτικές δράσεις των υλικών αυτών έχει καταγραφεί, συμπεριλαμβανομένων της στυπτικής, αντισπασμωδικής, διουρητικής, εφιδρωτικής και εμμηναγωγικής.¹¹² Αρκετά προϊόντα που περιέχουν ρόδι, συμπεριλαμβανομένων των χυμών από ρόδι 100%, των ροφημάτων που περιέχουν ρόδι, υγρά και αποξηραμένα πολυφαινολικά εκχυλίσματα από το ρόδι σε σκόνη, και προϊόντα περιποίησης του δέρματος που περιέχουν σκόνη ή σπορέλαιο ροδιού, έχουν πρόσφατα εισαχθεί στην αγορά των Ηνωμένων Πολιτειών και διαφημίζονται για τα φερόμενα ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία.⁷¹ Κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι αρκετές από τις ενώσεις του χυμού ροδιού χαρακτηρίζονται από αντικαρκινογενετικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιικές δράσεις. Επιπλέον, όπως αναφέρεται σε βιολογικές μελέτες, ο χυμός ροδιού είναι εμπλουτισμένος με αντιαθηροσκληρωτικές και αντιαθηρογενικές ενώσεις, και έχουν φανεί να μειώνουν την αρτηριακή πίεση και την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Αυτές οι δραστηριότητες αποδίδονται στο φαινολικό κλάσμα που περιέχει ένα σημαντικά υψηλό ποσοστό υδρολυόμενων τανινών, καθώς και ανθοκυανίνες που επιδεικνύουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Εξάλλου, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ο χυμός ροδιού περιέχει περισσότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις από άλλους φρουτοχυμούς και ροφήματα.¹¹³ Ο χυμός ροδιού φαίνεται να κατέχει 3 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το κόκκινο κρασί ή το πράσινο τσάι, και 2, 6 και 8 φορές υψηλότερα επίπεδα φαινολικών από τα αντίστοιχα που ανιχνεύθηκαν στο σταφύλι / κράνμπερυ, το γκρέηπ φρουτ και το χυμό πορτοκαλιού, αντίστοιχα.³⁴ Λόγω αυτού, η ζήτηση για ρόδια και τα υποπροϊόντα τους έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια.¹¹³ Είναι αξιοσημείωτο ότι ο χυμός από ρόδι έχει γίνει τόσο δημοφιλής σε πολλές αναπτυγμένες χώρες, ώστε πολλοί καταναλωτές πιστεύουν ότι είναι ένα τρόφιμο που πρέπει να αποτελεί κομμάτι της καθημερινής διατροφής.¹¹⁴ Επακόλουθο ήταν η ανάπτυξη βιομηχανιών που παράγουν χυμό ροδιού, καθώς και φαρμακευτικών που εκχυλίζουν τις ευεργετικές για την υγεία ενώσεις από το φρούτο.¹¹³ Πολλά ωφέλιμες δράσεις σχετίζονται με το ελλαγικό οξύ, τις ελλαγιτανίνες (παραδείγματος χάριν

πουνικαλαγίνες), το πουνικικό οξύ και άλλα λιπαρά οξέα, φλαβονοειδή, τις ανθοκυανιδίνες, τις ανθοκυανίνες, εστρογενικές φλαβονόλες και φλαβόνες, που περιέχονται στο ρόδι και φαίνονται να είναι εξαιρετικά ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία.⁷¹ Τα φυτοχημικά του ροδιού μπορούν να ενδυναμώσουν το σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Έρευνες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει ότι τα συστατικά του ροδιού αυξάνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και μειώνουν το οξειδωτικό στρες, ενώ αποτρέπουν την καταστροφή των κυττάρων εξαιτίας της περίσσειας των ελεύθερων ριζών.^{69, 116} Ο χυμός του ροδιού έχει επιδείξει αντιαθηροσκληρωτικές, αντιυπερτασικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις σε ποντίκια πειραματόζωα και σε ανθρώπους.¹¹⁷ Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο χυμός ροδιού βελτιώνει το προφίλ του αίματος. Η κατανάλωση χυμού ροδιού για 6 εβδομάδες έχει ευεργετικές επιδράσεις στα σάκχαρα του αίματος, στις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL, τη χοληστερόλη και τη δραστηριότητα ενός ενζύμου που συνδέεται (Παραοξανάση-1).^{118, 119} Περαιτέρω, η κατανάλωση χυμού ροδιού για ένα έτος μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες, φλεγμονώδεις καταστάσεις και μολύνσεις σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.¹²⁰

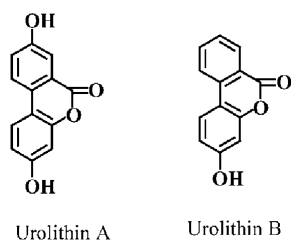
Η κατανάλωση ροδιού συμβάλλει στην αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων, λόγω των πολλαπλών αντιαθηρογονικών δράσεων.⁶⁹ Σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη από τον Lynn κ.ά. (2012), καταναλώνοντας 330 mL χυμού από ρόδι τη μέρα για τέσσερις εβδομάδες μπορεί να μειωθεί ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά νοσήματα.¹²¹ Σε μια πρόσφατη μελέτη του 2012, παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στα επίπεδα της ινσουλίνης και στην αντίστασή της έπεται από κατανάλωση χυμού ροδιού.¹²² Επιπλέον, ο χυμός έχει δράση κατά της νόσου του Αλτσχάιμερ, επειδή οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για νευρική προστασία.²⁸ Ο χυμός από ρόδι συνιστάται, ακόμα, στη θεραπεία για το AIDS (Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας).¹²³ Το ρόδι και τα εκχυλίσματά του έχουν, πιθανώς, επιδράσεις σε πολλές μορφές καρκίνου, όπως του δέρματος, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του στήθους. Ειδικότερα, η πουνικαλαγίνη και το ελλαγικό οξύ έχουν επιδείξει αντιπολλαπλασιαστική δράση ενάντια σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.^{69, 124} Ο χυμός ροδιού και οι απομονωμένες από αυτόν πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.¹⁰³ Το ελλαγικό οξύ θεωρείται αντιμεταλλαξιογόνος και αντικαρκινικός παράγοντας. Η αποτροπή της καρκινογένεσης από την ένωση αυτή έχει μελετηθεί σε ζώα με καρκίνο του οισοφάγου, της γλώσσας, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του συκωτιού και του δέρματος.¹²⁵ Παρόλο που οι καθαρές πολυφαινόλες μελετούμενες ξεχωριστά δείχνουν σημαντικές αντιπολλαπλασιαστικές, αποπτωτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις, η ανώτερη βιοδραστικότητα του χυμού του ροδιού υποδεικνύει την ύπαρξη πολυπαραγοντικών επιδράσεων και χημικής συνεργία όταν υπάρχει συνδυασμός ενώσεων σε σύγκριση με κάθε συστατικό ξεχωριστά.^{103, 64}

Περαιτέρω, τα προϊόντα από το ρόδι έχουν σημαντικές προοπτικές χρήσης ως καλλυντικά χάρις στην προστασία που παρέχουν έναντι των ακτίνων UVB. Αυτή η φωτοπροστασία, πιθανώς, σχετίζεται με το ελλαγικό οξύ μεταξύ άλλων, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι αμβλύνει τις ρυτίδες

και τον ερεθισμό του δέρματος που προκαλούνται από τις ακτίνες UVB.⁶⁹

Οι πολυφαινόλες, ιδιαίτερα οι ελλαγιτανίνες και τα φλαβονοειδή, στο χυμό ροδιού έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα ενάντια σε *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* κ.λπ.²⁰ Επιπρόσθετα, η μελέτη ενός μείγματος από ελλαγικό οξύ, γαλλικό οξύ, πουνικαλίνες και πουνικαλαγίνες που είχαν απομονωθεί από παραπροϊόντα του χυμού από ρόδι αποκάλυψε την αντιμικροβιακή του δράση ενάντια σε παθογενικά *Clostridia* είδη, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* ανθεκτικός στη μεθικιλίνη, *Aspergillus fumigatus*, και *Mycobacterium intra cellulare*, καθώς και αντιελονοσιακή δράση.^{110, 71}

Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το ρόδι είναι διαθέσιμες κατά τη διάρκεια της πέψης σε αρκετά υψηλό ποσό (29%), αν και μερικές από αυτές είτε δε μεταβολίζονται είτε δεν απορροφώνται.^{123, 71} Οι μεταβολίτες *in vivo*, και όχι οι αρχικά παρούσες ενώσεις στο φρούτο είναι πραγματικά υπεύθυνες για τις προστατευτικές επιδράσεις που έπονται της κατανάλωσης ροδιού.⁶⁹ Στην πραγματικότητα, μετά την κατανάλωση χυμού από ρόδια που περιλαμβάνει πουνικαλαγίνες, το ελλαγικό οξύ μπορεί να ανιχνευθεί στο πλάσμα του αίματος αποδεικνύοντας την πραγματοποίηση όξινης υδρόλυσης, τουλάχιστον, μερικών εκ των ελλαγιτανινών, οι οποίες απελευθέρωσαν το ελλαγικό οξύ που απορροφάται κατευθείαν από το στομάχι ή το λεπτό έντερο. Όταν οι ελλαγιτανίνες και/ή το



Σχήμα 1.2.7.1: Χημική δομή των ουρολιθινών A και B.⁹⁰

ελλαγικό οξύ φτάνουν στο λεπτό και το παχύ έντερο, μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου και παράγονται οι ουρολιθίνες A και B, που απορροφώνται μαζί με το ελλαγικό οξύ. Μόλις οι μεταβολίτες αυτοί απορροφηθούν, λαμβάνει χώρα η γλυκουρονιδίωση στα εντερικά κύτταρα, και τα γλυκουρονίδια είναι τελικά οι κύριοι μεταβολίτες που βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος. Οι ενώσεις αυτές μεταβολίζονται περαιτέρω στο συκώτι για να παράγουν διγλυκουρονίδια, και/ή θειικά παράγωγα, για να δημιουργηθεί ένας συνδυασμός μεταβολιτών που εκκρίνεται στη χολή και τα ούρα. Φαίνεται ότι οι ουρολιθίνες απορροφώνται επιλεκτικά και υφίστανται ενεργή εντεροηπατική κυκλοφορία.⁴⁵ Συνολικά, το ελλαγικό οξύ και τα παράγωγά του έχουν αποδειχθεί βιοδιαθέσιμα στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ οι ουρολιθίνες είναι, πιθανώς, οι πιο ενεργές αντιφλεγμονώδεις ενώσεις που προέρχονται από την πέψη του ροδιού σε υγιή υποκείμενα.^{33, 126, 127}

Το ρόδι και τα προϊόντα του έχουν μακρά ιστορία στη διατροφή και την παραδοσιακή ιατρική χωρίς να έχουν παρατηρηθεί παρενέργειες, θεωρείται επίσης GRAS στις Η.Π.Α. Ωστόσο, υπάρχουν μερικές μελέτες που αναφέρουν την πρόκληση αλλεργικών αντιδράσεων όταν χρησιμοποιούνται ή καταναλώνονται ο καρπός ή οι σπόροι του ροδιού, ή επιβλαβείς αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο ρόδι και φάρμακα που λαμβάνονται από ασθενή άτομα.^{28, 57} Παρ'

όλα αυτά, κλινικές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους για την τοξικότητα του ροδιού δεν έχουν αναφέρει παρενέργειες, οπότε θεωρείται γενικά ασφαλές να καταναλώνουμε χυμό, σπορέλαιο ή εκχυλίσματα ροδιού με μέτρο χωρίς κίνδυνο. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν η ασφάλεια αφορά και τις ενώσεις που μπορούν να απομονωθούν από το ρόδι και να χρησιμοποιηθούν σε συμπυκνωμένη μορφή ως συμπληρώματα διατροφής.⁷¹

1.2.8 Ποικιλίες της ροδιάς (*Punica granatum* L.)

Πάνω από 1.000 ποικιλίες ή οικότυποι του είδους *Punica granatum* της ροδιάς έχουν αναγνωρισθεί παγκοσμίως.^{25, 32} Οι περισσότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται σήμερα έχουν προέλθει από τυχαία σπορόφυτα ή μεταλλάξεις, και μερικές μόνο περιπτώσεις από διασταυρώσεις.⁶⁸ Οι επιλογές των τοπικών ποικιλιών προς καλλιέργεια, μέχρι τώρα, έγιναν βάσει των προτιμήσεων των τοπικών πληθυσμών, εφόσον κάθε ποικιλία έχει δικά της χαρακτηριστικά (γλυκύτητα, πικράδα, άρωμα). Επιθυμητά χαρακτηριστικά στη ροδιά είναι η υψηλή απόδοση σοδειάς, η οψιμότητα για να αυξηθεί η διάρκεια διάθεσης των καρπών, το έντονο χρώμα στο φλοιό και των αριλίων ιδιαίτερα όταν προορίζονται για χυμοποίηση, το μεσαίο ή μεγάλο μέγεθος του καρπού και των αριλίων, τα μαλακά σπέρματα (για τις επιτραπέζιες ποικιλίες), η υπόξινη ή γλυκιά γεύση, η δυνατότητα μακροχρόνιας συντήρησης και η αντοχή στο σχίσσιμο, σε εχθρούς και ασθένειες, στον παγετό κ.ά.^{70, 35} Η μεγάλη ζήτηση ροδιών ανά τον κόσμο και η ανάγκη εξαγωγών έχει επηρεάσει τα κριτήρια επιλογής των ποικιλιών ροδιάς και στην Ελλάδα, όπου ενώ οι περισσότερες τοπικές ποικιλίες είναι γλυκές, έχουν αντικατασταθεί σε μεγάλες εκτάσεις από γλυκόξινες ποικιλίες, οι οποίες προορίζονται για εξαγωγή και παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας χυμού. Οι ελληνικές ποικιλίες ροδιάς προέρχονται από σπορόφυτα που έχουν επιλεγεί σε διάφορες περιοχές και είναι κυρίως γλυκές ποικιλίες με πιο γνωστή την ποικιλία «Ερμιόνη», ενώ τελευταία εισήχθησαν και καλλιεργούνται, κυρίως, οι γλυκόξινες ποικιλίες «Wonderful» και «Hicaznar», και λιγότερο οι γλυκές ποικιλίες «Acco» και «Mollar de Elche».³⁵ Οι ροδιές, γενικά, διακρίνονται σε ξινές (>1,8% οξέα), μέσης οξύτητας (0,9–1,8% οξέα) και γλυκές ποικιλίες (< 0,9% οξέα).¹²⁸

1.3 Οίνοι από σταφύλια (*Vitis vinifera* L.) και από ρόδια (*Punica granatum* L.)

1.3.1 Γενικά για τον οίνο από τα σταφύλια της αμπέλου (*Vitis vinifera* L.)

Τα οινοποιήσιμα σταφύλια (είδος *Vitis Vinifera*, οικογένεια Vitaceae) είναι μια από τις πιο σημαντικές σοδειές φρούτων στον κόσμο.^{1, 4} Πάνω από 7.000 γονότυποι της αμπέλου έχουν αναγνωρισθεί και η γενετική τους ποικιλότητα είναι παράλληλη με μια μεγάλη ποικιλία σε διαδικασίες καλλιέργειας και παραγωγής κρασιού.¹²⁹ Το κρασί είναι, ουσιαστικά, ζυμωμένος χυμός σταφυλιού με ένα ελάχιστο επίπεδο αλκοόλ ~8,5% κατ' όγκο. Το άγριο αμπέλι προέρχεται από τη Μεσοποταμία και την Αίγυπτο, ενώ ενδείξεις για παραγωγή κρασιού χρονολογούνται από τη Νεολιθική εποχή. Το κρασί καταναλωνόταν από πολλούς αρχαίους πολιτισμούς συμπεριλαμβανομένων των Μεσοποταμίων, των Αιγυπτίων, των Ελλήνων και των Ρωμαίων. Σήμερα, τα κρασιά παράγονται από πολλές ποικιλίες σταφυλιών, παραδείγματος χάριν Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah, Cinsault, Rondinella, Sangiovese, Nebiolo, Grenache, Tempranillo και Carignan. Οι κύριοι εμπορικοί παραγωγοί βρίσκονται στην Καλιφόρνια, τις Η.Π.Α., τη Γαλλία, την Ιταλία, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, την Ισπανία, τη Χιλή, την Αργεντινή, τη Νότια Αφρική, τη Βουλγαρία, τη Ρουμανία, τη Νότια Βραζιλία, και πιο πρόσφατα στην Κίνα και την Ινδία.⁴

Το κρασί περιέχει περισσότερες από 500 ενώσεις, μερικές εκ των οποίων προέρχονται από τα σταφύλια και άλλες είναι μεταβολικά παραπροϊόντα των ζυμομυκήτων. Οι περισσότερες βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά μερικές ενώσεις απαντώνται σε συγκεντρώσεις πάνω από 100 mg/L. Αυτές είναι το νερό, οι αλκοόλες, τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη. Η πιο σημαντική αλκοόλη στο κρασί είναι η αιθανόλη, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 έως 14%. Η αιθανόλη είναι κρίσιμος παράγοντας για τη σταθερότητα, την παλαίωση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού. Παίζει ρόλο, ακόμα, στην εκχύλιση των χρωστικών ουσιών και τανινών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του φλοιού και του σπόρου των σταφυλιών.¹³⁰

1.3.2 Η σύσταση των φαινολικών ουσιών στους οίνους από τα σταφύλια (*Vitis vinifera* L.)

Τα φαινολικά συστατικά των κρασιών παίζουν σημαντικό ρόλο στις ωφέλιμες επιδράσεις που ακολουθούν τη μέτρια κατανάλωση κρασιού, και είναι υπεύθυνα για το χρώμα, τη γεύση, τη στυπτικότητα, την πικράδα, ενώ τα επίπεδά τους σχετίζονται, γενικώς, με την ποιότητα του κρασιού.¹³¹ Οι κύριες πηγές φαινολικών ουσιών είναι ο μίσχος των σταφυλιών, τα κουκούτσια και η επιδερμίδα (φλούδα) τους. Κατά την παρασκευή του κόκκινου κρασιού, ο ζυμωμένος μούστος μπορεί να περιέχει το 40–60% των φαινολικών που υπάρχουν αρχικά στα σταφύλια.⁴

Μικρές αλλαγές στις φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από τα σταφύλια συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των κρασιών, ιδιαίτερα όταν αυτή γίνεται σε δρύινα βαρέλια ή, όπως συμβαίνει τα τελευταία χρόνια, κατά τη διάρκεια της επαφής τους με ροκανίδια βελανιδιάς.⁴ Γενικά, το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στο κόκκινο κρασί είναι κατά 10 φορές υψηλότερο από εκείνο των λευκών κρασιών, αφού η ερυθρή οينوποίηση προϋποθέτει τη διαβροχή και τη ζύμωση του πολτού με τα στέμφυλα που οδηγεί στην εκχύλιση των φαινολικών ουσιών από τα σταφύλια. Στην πραγματικότητα, η ποσότητα και η κατανομή των φαινολικών που τελικά βρίσκονται στο κρασί δεν είναι μόνο θέμα επιλογής των σταφυλιών, της περιοχής καλλιέργειας της αμπέλου, των τεχνικών αμπελοκαλλιέργειας και οينوποίησης, αλλά και της τιμής του pH, του περιεχόμενου στο κρασί SO₂, της επαφής του κρασιού με το οξυγόνο και της θερμοκρασίας αποθήκευσης.^{132, 133, 134} Πιθανώς, ο πιο καθοριστικός παράγοντας για τη σύσταση του φαινολικού και πολυφαινολικού περιεχομένου στα κόκκινα κρασιά είναι η έκθεση των σταφυλιών στο φως του ήλιου κατά την καλλιέργεια. Τα σταφύλια που εκτίθενται σε αυξημένο φως είναι ικανά για αυξημένη βιοσύνθεση των φλαβονολών, έτσι ώστε τα υψηλά επίπεδα φλαβονολών στους ερυθρούς οίνους να έχουν συσχετισθεί με τα αμπέλια που καλλιεργούνται σε ηλιόλουστα μικροκλίματα.¹³³ Το θέμα περιπλέκεται περισσότερο, καθώς χρησιμοποιούνται σταφύλια που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, και οι διαδικασίες οينوποίησης και παλαίωσης μπορεί, επίσης, να διαφέρουν. Είναι αναμενόμενο, λοιπόν, τα κρασιά να είναι ετερογενή όσον αφορά το χρώμα, τη γεύση, την εμφάνιση και τη χημική σύνθεσή τους.⁴ Τα σταφύλια περιέχουν μη φλαβονοειδείς ενώσεις κυρίως στον πολτό, ενώ οι φλαβονοειδείς ενώσεις βρίσκονται στο δέρμα, τους σπόρους και το κοτσάνι των σταφυλιών.¹³⁵

Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις στον οίνο

Υδροξυβενζοϊκά οξέα: Το γαλλικό οξύ βρίσκεται στα στέρεα μέρη του σταφυλιού είτε σε ελεύθερη μορφή είτε στη μορφή του φλαβονολικού εστέρα (π.χ. 3-O-γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχόλης). Άλλα υδροξυβενζοϊκά οξέα που βρίσκονται στα κρασιά είναι τα p-υδροξυβενζοϊκό, πρωτοκατεχικό, βανιλλικό, συριγγικό, και γεντισικό οξέα. Αρκετά παράγωγα υδροβενζοϊκών οξέων έχουν αναγνωρισθεί στο κρασί Riesling (ποικιλία λευκού κρασιού), συμπεριλαμβανομένων των εστέρων και μεθυλεστέρων του πρωτοκατεχικού και βανιλλικού οξέος, και του εστέρα της γλυκόζης του βανιλλικού οξέος. Οι δύο τελευταίες ενώσεις έχουν ανιχνευθεί και σε κόκκινα κρασιά. Τέλος, οι 3- και 4-O-γλυκοζίτες του γαλλικού οξέος έχουν ταυτοποιηθεί σε λευκά σταφύλια.¹³⁵

Υδροξυκινναμωμικά οξέα: Βρίσκονται στα κενοτόπια των κυττάρων του φλοιού και του πολτού με τη μορφή των τρυγικών εστέρων τους. Τα καφεοϋλοτρυγικό (καφταρικό), p-κουμαροϋλοτρυγικό (κουταρικά) και φεροϋλοτρυγικό (φερταρικό) οξέα απαντώνται στην trans μορφή τους, παρόλο που μικρές ποσότητες cis ισομερών επίσης υπάρχουν. Η παρουσία των εστέρων των γλυκοζιτών των trans p-πουμαρικού και φερουλικού οξέων έχουν αναφερθεί στα σταφύλια.¹³⁵

Το κρασί περιέχει ελεύθερα οξέα και διάφορους εστέρες υδροξυκινναμωμικών οξέων. Στο μόλις ζυμωμένο κρασί Reisling έχει αναφερθεί η παρουσία των ελεύθερων μορφών των trans-καφεϊκού και p-κουμαρικού οξέων και των παραγώγων τους, trans-αιθυλο-καφεϊκό, trans-αιθυλο-p-κουμαρικό και trans-διαιθυλο-καφεοϋλο-τρυγικό οξύ. Η παρουσία των cis ισομερών του p-κουμαρικού οξέος στο κρασί Riesling και του trans-φερουλικού οξέος έχει επίσης αναφερθεί.¹³⁵

Στιλβένια: Τα υδροξυλιωμένα στιλβένια είναι φυτοαλεξίνες που συντίθενται από το φυτό της αμπέλου, κυρίως, στην επιδερμίδα των σταφυλιών, στα φύλλα και τις ρίζες, ως αντίδραση σε λοιμώξεις από μύκητες και στο υπέρυθρο φως (UV). Τα σταφύλια και τα προϊόντα τους θεωρούνται οι πιο σημαντικές διατροφικές πηγές στιλβενίων.^{9,4}

Η ρεσβερατρόλη είναι το πιο κοινό στιλβένιο, παράγεται κυρίως στα αμπέλια έπειτα από τραυματισμό ή προσβολή από μύκητα, και σε φρούτα βρίσκεται βασικά στη φλούδα των κόκκινων σταφυλιών.^{9,4} Η trans και cis ρεσβερατρόλη (3,5,4-τριϋδροξυστυλβένιο), καθώς και τα παράγωγά τους με γλυκόζη (trans και cis πικεΐδη), έχουν ταυτοποιηθεί σε σταφύλια και κρασιά.¹³⁵ Απαντάνται κυρίως ο 3-O-γλυκοζίτης της trans ρεσβερατρόλης (trans πικεΐδη).⁴ Η ρεσβερατρόλη είναι, ακόμα, η μητρική ένωση από την οποία προέρχεται μια οικογένεια πολυμερών που ονομάζονται βινιφερίνες, ενώσεις που εμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων.¹³⁰

Τα κόκκινα κρασιά περιέχουν μια ποικιλία από παράγωγα του στιλβενίου, αλλά κατά κανόνα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με τα επίπεδα των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων.⁵ Τα τελευταία χρόνια, νέα παράγωγα στιλβενίων έχουν βρεθεί στο κρασί. Μια σειρά ενώσεων από μονο-, δι-, και τριτο-υδροξυστυλβένια έχουν αναγνωρισθεί σε αρχικό στάδιο σε κρασιά. Ο 3-O-γλυκοζίτης του 3,5,3,4-τετραϋδροξυστυλβενίου (trans αστρινγίνη) έχει χαρακτηριστεί δομικά σε κόκκινα και λευκά κρασιά. Οι ενώσεις 2-O-γλυκοζίτης του 2,4,6-τριϋδροξυφαινανθρενίου και τα διμερή στιλβένια του διγλυκοζίτη της ε-βινιφερίνης (trans και cis) έχουν απομονωθεί από το κρασί Riesling.¹³⁵

Φλαβονοειδείς ενώσεις στον οίνο

Οι κύριες ομάδες των φλαβονοειδών ενώσεων παρούσες στα σταφύλια και τα κρασιά της *V. vinifera* είναι οι φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες και ανθοκυανίνες και, σε μικρότερο βαθμό, οι φλαβανονόλες και φλαβόνες. Αυτές οι βασικές δομές μπορούν να παρουσιάσουν O-γλυκοζυλίωση, και οι O-γλυκοζίτες, με τη σειρά τους, μπορούν να υποστούν ακυλίωση.¹³⁵

Φλαβόνες: Στα φύλλα της *V. vinifera*, ο 8-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης, η λουτεολίνη, καθώς και οι 7-O-γλυκοζίτες της απιγενίνης και της λουτεολίνης έχουν ταυτοποιηθεί.¹³⁵

Φλαβονόλες: Είναι κίτρινες χρωστικές ουσίες που βρίσκονται, βασικά, στα κενοτόπια των επιδερμικών ιστών των σταφυλιών. Στα σταφύλια της *V. vinifera*, υπάρχουν ως 3-O-γλυκοζίτες τεσσάρων βασικών άγλυκων μορφών, της μυρικετίνης, κερκετίνης, καεμπφερόλης και ισοραμνετίνης. Οκτώ μονογλυκοζίτες φλαβονολών (3-O-γλυκοζίτης της καεμπφερόλης, 3-O-

γλυκουρονίδιο της καεμπφερόλης, 3-O-γαλακτοζίτης της καεμπφερόλης, 3-O-γλυκοζίτης της κερκετίνης, 3-O-γαλακτοζίτης της κερκετίνης, 3-O-γλυκοζίτης της μυρικετίνης, 3-O-γλυκουρονίδιο της μυρικετίνης και 3-O-γλυκοζίτης της ισοραμεντίνης) και τρεις διγλυκοζίτες (3-O-γλυκοζυλο-αραβινοζίτης της καεμπφερόλης, 3-O-γλυκοζυλο-γαλακτοζίτης της κερκετίνης και ο 3-O-γλυκοζυλο-ξυλοζίτης της κερκετίνης) έχουν χαρακτηρησθεί δομικά στη φλούδα των σταφυλιών της *V. vinifera*. Στα φύλλα, βρίσκονται, ακόμα, τα παράγωγα των 3-O-γλυκοζίτη, 3-O-ραμνοζίτη και 3-O-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης και των άγλυκων της καεμπφερόλης, της κερκετίνης και της μυρικετίνης.¹³⁵

Το προφίλ των φλαβονολών στο κρασί ξεχωρίζει από εκείνο των σταφυλιών λόγω της επιπλέον παρουσίας των άγλυκων μορφών, οι οποίες προκύπτουν από την υδρόλυση των γλυκοζυλιωμένων μορίων κατά την οينوποίηση, την ωρίμανση, και/ή την παλαίωση του κρασιού. Οι φλαβονόλες μπορούν να λειτουργήσουν ως συγχρωστικές ουσίες των ανθοκυανινών σε διάφορα λουλούδια, φρούτα και προϊόντα που παράγονται από φρούτα.¹³⁵

Φλαβανονόλες: Μεταξύ των φλαβανονολών που βρίσκονται στα σταφύλια της *V. vinifera*, η αστιλβίνη (3-O-ραμνοζίτης της διϋδροκερκετίνης) και η ενγελετίνη (3-O-ραμνοζίτης της διϋδροκαεμπφερόλης) ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στο φλοιό και το κρασί των λευκών σταφυλιών. Η αστιλβίνη έχει, επίσης, βρεθεί στα στέμφυλα και το μίσχο των σταφυλιών και σε κόκκινα κρασιά. Η παρουσία της αστιλβίνης και της ενγελατίνης έχει αναφερθεί και σε λευκούς οίνους. Άλλες φλαβανονόλες, όπως ο 3-O-ραμνοζίτης της διϋδρομυρικετίνης, η διϋδροκαεμπφερόλη, η διϋδροκερκετίνη (ταξιφολίνη), ο 3-O-γλυκοζίτης της διϋδροκαεμπφερόλης, ο 3-O-γλυκοζίτης της διϋδρο-κερκετίνης και ο 3-O-ξυλοζίτης της διϋδρο-κερκετίνης έχουν ανιχνευθεί σε κόκκινα και Riesling κρασιά.¹³⁵

Ανθοκυανίνες: Βρίσκονται, κατά κύριο λόγο, στη φλούδα των σταφυλιών και είναι οι βασικές υπεύθυνες για το χρώμα των σταφυλιών και των κρασιών τους. Οι ανθοκυανίνες που έχουν βρεθεί στους φλοιούς των σταφυλιών και το κρασί της *V. vinifera* είναι οι 3-O-μονογλυκοζίτες και 3-O-ακυλιωμένοι μονογλυκοζίτες πέντε ανθοκυανιδινών (άγλυκα μόρια): δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουινιδίνη, πεονιδίνη και μαλβιδίνη.¹³⁵ Μικρές ποσότητες του 3-O-γλυκοζίτη της πελαργονιδίνης έχουν ανιχνευθεί στους φλοιούς των σταφυλιών της *Vitis rupestris* και μερικών ποικιλιών *V. vinifera*.¹³⁶ Το μοτίβο γλυκοζυλίωσης των ανθοκυανινών στο σταφύλι είναι εξαιρετικά σύνθετο. Για τις ποικιλίες της *V. vinifera*, η γλυκοζυλίωση εμφανίζεται αποκλειστικά στη θέση 3. Αντιθέτως, γλυκοζυλίωση συμβαίνει στις θέσεις 3 και 5 στα σταφύλια της άγριας *Vitis* και τις υβριδικές ποικιλίες.¹²⁹ Η ακυλίωση γίνεται μέσω εστεροποίησης με οξικό, ρ-κουμαρικό, και καφεϊκό οξύ (ακετυλικές, ρ-κουμαροϋλικές και καφεοϋλικές χαρακτηριστικές ομάδες). Τα τελευταία χρόνια, οι 3-O-γλυκοζίτες, οι 3-O-ακετυλομονογλυκοζίτες, και οι 3-O-ρ-κουμαροϋλομονογλυκοζίτες της δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουινιδίνης, πεονιδίνης, και μαλβιδίνης, καθώς και οι 3-O-καφεοϋλομονογλυκοζίτες της μαλβιδίνης και πεονιδίνης, έχουν ταυτοποιηθεί σε σταφύλια και κρασιά μέσω τεχνικών φασματομετρίας μάζας.¹³⁵

Οι συνήθεις συγκεντρώσεις των ελεύθερων ανθοκυανινών στα πλούσια σε γεύση και άρωμα νέα κόκκινα κρασιά είναι περίπου 500 mg/L, αν και σε μερικές περιπτώσεις είναι υψηλότερες των 2.000 mg/L. Φυσιολογικά, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στην επιδερμίδα των σταφυλιών, με μόνες εξαιρέσεις τα επονομαζόμενα σταφύλια “teinturier” (“βαμμένα”), τα οποία έχουν ανθοκυανίνες στο δέρμα και τον πολτό.¹³⁷ Κατά την οينوποιητική διαδικασία, ιδιαιτέρως κατά τον πρώτο ή δεύτερο χρόνο της ωρίμανσης, οι ανθοκυανίνες εμπλέκονται σε αντιδράσεις οξειδωσης, υδρόλυσης, συμπύκνωσης και πολυμερισμού, οι οποίες είναι ακόμα πιο έντονες κατά την παλαίωση του κρασιού σε ξύλο.^{135, 138} Οι ανθοκυανίνες μπορούν να υποβαθμισθούν και να δώσουν χαμηλότερου μοριακού βάρους μόρια ή να μετατραπούν σε σταθερότερες χρωστικές ενώσεις, κατά την οينوποίηση και την παλαίωση.¹³³ Τότε, προκύπτουν διάφορες νέες χρωστικές ουσίες προερχόμενες από τις ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι πάρα πολύ σημαντικές για τη χρωματική σταθερότητα του οίνου. Συνεπώς, παρόλο που η συγκέντρωση των μονομερών ανθοκυανινών ελαττώνεται συνεχώς στα κόκκινα κρασιά, αυτά μπορούν και πάλι να διατηρήσουν ένα ουσιαστικά κόκκινο χρώμα. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα περιλαμβάνουν σύνθετους μηχανισμούς, κάποιους βραχυπρόθεσμους μεταξύ άλλων, όπως της αυτοσυνένωσης και της συγχρωμάτωσης, και τους σχετικά μακροπρόθεσμους, όπως το σχηματισμό πολυμερών ανθοκυανινών με φλαβάν-3-όλες και προανθοκυανιδίνες, καθώς και το σχηματισμό νέων μορίων χρωστικών, όπως οι πυρανοανθοκυανίνες και των περαιτέρω πολυμερισμένων προϊόντων τους. Σε αντίθεση με άλλες φλαβονοειδείς ενώσεις στα κόκκινα κρασιά, οι ανθοκυανίνες δε συνεισφέρουν εγγενώς στη στυπτικότητα ή την πικράδα στη γεύση. Παρόλο που οι ανθοκυανίνες είναι άοσμες και σχεδόν άγευστες, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αρωματικές ουσίες και να επηρεάσουν τη γεύση και το άρωμα του κρασιού.¹³⁷

Μολονότι, οι αναλογίες των οικογενειών των ανθοκυανινών επηρεάζονται από τις φυσιολογικές διακυμάνσεις, τα προφίλ των ανθοκυανινών στα σταφύλια της *V. vinifera* χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα διακριτικά γνωρίσματα τα οποία περιλαμβάνουν τα εξής:

- (i) Γενική επικράτηση του 3-O-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις όπως εκείνη του κόκκινου σταφυλιού Raboso Piave,
- (ii) επικράτηση του ακετυλιωμένου 3-O-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης συγκριτικά με άλλους ακετυλιωμένους μονογλυκοζίτες ανθοκυανινών,
- (iii) απουσία των 3,5-O-διγλυκοζιτών των ανθοκυανινών,
- (iv) απουσία ακετυλιωμένων 3,5-O-διγλυκοζιτών,
- (v) πολύ χαμηλά επίπεδα ή απουσία 3-O-(6-O-ακετύλο)-γλυκοζιτών, εκτός του 3-O-(6-O-ακετύλο)-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης.¹³⁶

Φλαβαν-3-όλες και Προανθοκυανιδίνες (Συμπυκνωμένες τανίνες): Οι φλαβάν-3-όλες ή φλαβανόλες βρίσκονται στα στέρεα μέρη του σταφυλιού (σπόρος, φλούδα και μίσχος) σε μονομερείς, oligομερείς ή πολυμερείς μορφές, οι δύο τελευταίες μορφές είναι επίσης γνωστές ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες.¹³⁵

Μονομερή φλαβαν-3-ολών: Οι μονομερείς μονάδες των φλαβαν-3-ολών που βρίσκονται στα σταφύλια της *V. vinifera* είναι οι (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, (+)-γαλλοκατεχίνη και (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Όσον αφορά τα διϋδροξυλιωμένα μόρια, η (-)-επικατεχίνη μπορεί να εστεροποιηθεί από το γαλλικό οξύ, καταλήγοντας στο 3-O-γαλλικό εστέρα της (-)-επικατεχίνης. Η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, και ο 3-O-γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης μπορούν να βρεθούν σε ελεύθερη μορφή στους σπόρους και την επιδερμίδα των σταφυλιών. Σε εκχυλίσματα από ολόκληρο το σώμα σταφυλιών διάφορων ποικιλιών του γένους *Vitis*, έχει αναφερθεί η παρουσία του 3-O-γαλλικού εστέρα της (+)-κατεχίνης. Έχει, επίσης, αναφερθεί η ύπαρξη των γλυκοξυλιωμένων μονομερών μορφών. Αναφορικά στις τριϋδροξυλιωμένες μορφές, η (+)-γαλλοκατεχίνη, η (-)-επιγαλλοκατεχίνη και ο 3-O-γαλλικός εστέρας της (+)-γαλλοκατεχίνης έχουν αναγνωρισθεί σε ελεύθερη μορφή σε σταφύλια. Στα κρασιά, έχουν ταυτοποιηθεί οι ελεύθερες διϋδροξυλιωμένες μονομερείς φλαβαν-3-όλες [(+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, και 3-O-γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης] και τα τριϋδροξυλιωμένα μόρια [(+)-γαλλοκατεχίνη και (-)-επιγαλλοκατεχίνη].¹³⁵

Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες: Έχουν την ιδιότητα να απελευθερώνουν τις ανθοκυανιδίνες υπό όξινες συνθήκες με θέρμανση, ως αποτέλεσμα της διάσπασης του ενδοφλαβονικού δεσμού. Στα σταφύλια της *V. vinifera*, δύο ομάδες προανθοκυανιδίων ξεχωρίζουν βάσει της φύσης της απελευθερωμένης ανθοκυανιδίνης (κυανιδίνη ή δελφινιδίνη): οι προκυανιδίνες, που είναι προανθοκυανιδίνες αποτελούμενες από (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη, και οι προδελφινιδίνες, που είναι προανθοκυανιδίνες αποτελούμενες από (+)-γαλλοκατεχίνη (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Οι σπόροι του σταφυλιού περιέχουν μόνον προκυανιδίνες, ενώ στην επιδερμίδα βρίσκονται προκυανιδίνες και προδελφινιδίνες. Μείγμα προανθοκυανιδινών που παρουσιάζουν ταυτόχρονα επικατεχίνες και επιγαλλοκατεχίνες είναι, επίσης, πιθανό να βρεθεί στην επιδερμίδα των σταφυλιών και σε οίνους.¹³⁵

Ολιγομερή προανθοκυανιδινών: Οι ολιγομερείς προκυανιδίνες, που περιλαμβάνουν διμερή, τριμερή και τετραμερή, και αποτελούμενες από δομικές μονάδες της (+)-κατεχίνης, της (-)-επικατεχίνης και του 3-O-γαλλικού εστέρα της (-)-επικατεχίνης, έχουν αναγνωρισθεί στους σπόρους των σταφυλιών της *V. vinifera*, τους φλοιούς, τους μίσχους και το και κρασί, αν και ίχνη μονομερών και διμερών έχουν επίσης βρεθεί στον πολτό. Επιπρόσθετα, διμερείς ενώσεις που σχηματίζονται αποκλειστικά από επιγαλλοκατεχίνες, καθώς και ανάμικτα ολιγομερή που αποτελούνται από μονάδες επικατεχινών και κάποιων επιγαλλοκατεχινών έχουν ανιχνευθεί σε κρασιά, αν και δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί δομικά.¹³⁵

Πολυμερή προανθοκυανιδινών: Οι πολυμερείς προανθοκυανιδίνες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού περιεχομένου σε φλαβαν-3-όλες στα διαφορετικά μέρη του σταφυλιού. Οι σπόροι περιέχουν υψηλότερα ποσά μονομερών, ολιγομερών και πολυμερών φλαβαν-3-ολών συγκριτικά με την επιδερμίδα. Οι τανίνες των σπόρων είναι εν μέρει εστεροποιημένες με γαλλικό οξύ προκυανιδίνες αποτελούμενες από (+)-κατεχίνη, (-)-

επικατεχίνη και 3-O-γαλλικό εστέρα της (-)-επικατεχίνης, ενώ οι τανίνες της επιδερμίδας και των μίσχων περιέχουν (-)-επιγαλλοκατεχίνη και, επομένως, αποτελούνται από προδελφινιδίνες. Ίχνη της (+)-γαλλοκατεχίνης και του 3-O-γαλλικού εστέρα της (-)-επιγαλλοκατεχίνης έχουν βρεθεί και στην επιδερμίδα των σταφυλιών. Η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και ο 3-O-γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης έχουν το ρόλο των τερματικών μονάδων και των μονάδων επέκτασης στις αλυσίδες των τριών προαναφερθέντων μερών των σταφυλιών, ενώ και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη είναι σε αφθονία ως μονάδα επέκτασης των πολυμερών στην επιδερμίδα και το μίσχο. Ανεξάρτητα από το είδος του ιστού, η (-)-επικατεχίνη είναι η μεγαλύτερη μονομερής συστατική μονάδα των τανινών που απαντά στη *V. vinifera*.¹³⁵

Οι προανθοκυανιδίνες είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για τη στυπτικότητα και την πίκραδα του κρασιού. Συμμετέχουν σε χημικές και ενζυμικές οξειδωτικές αντιδράσεις αμαύρωσης, τη δημιουργία θαλερότητας, σε αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες, καθώς και σε πολυάριθμες αντιδράσεις συμπύκνωσης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και παλαίωσης του κρασιού.¹³⁵

1.3.3 Η σπουδαιότητα του οίνου και τα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία

Μεταξύ των διάφορων αλκοολούχων ποτών, το κρασί θεωρείται σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών. Η αντιοξειδωτική δράση των κόκκινων κρασιών οφείλεται στα φλαβονοειδή, κυρίως στις ανθοκυανίνες και τα πολυμερή τους. Οι προκυανιδίνες των κρασιών έχουν ομοίως ευεργετικές δράσεις ενάντια στον καρκίνο.³ Επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι η μέτρια πρόσληψη κόκκινου κρασιού σχετίζεται με πολλαπλά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, όπως η εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών, η ικανότητα χηλικής συμπλοκοποίησης των μετάλλων, η ρύθμιση των ενζύμων, η μείωση της οξείδωσης των LDL *in vitro* και *in vivo*, καθώς και η εμπόδιση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, και η βελτίωση του μεταβολισμού των λιπιδίων.¹⁴² Το κόκκινο κρασί αραιωμένο 1.000 φορές έχει φανεί να εμποδίζει την *in vitro* οξείδωση των ανθρώπινων LDL σε μεγαλύτερο ποσοστό από την α-τοκοφερόλη. Άλλες ευεργετικές για την υγεία δράσεις των κόκκινων κρασιών περιλαμβάνουν την αντιμετώπιση χρόνιων φλεγμονών και θρομβωτικών τάσεων. Οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες έχουν αποδειχθεί *in vitro* αναστολείς της οξείδωσης των LDL, και της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι η κατανάλωση κρασιού αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος στους ανθρώπους.¹⁴³

Εξίσου ωφέλιμη είναι η ρεσβερατρόλη με αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμεταλλαξιακές δράσεις, αλλά λιγότερο σημαντική ως αντιοξειδωτικό μέσο, γιατί είναι δευτερεύον συστατικό.³ Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη έχει την ικανότητα να αποτρέπει στεφανιαίες, νευρολογικές και εκφυλιστικές ασθένειες.⁹ Οι γλυκοζίτες της έχουν φανεί ως συνεισφέροντες στην προστασία της καρδιάς, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση των LDL, δηλαδή να σταματήσει το αρχικό

στάδιο της παρθενογένεσης της αθηροσκλήρωσης.⁴ Επιπρόσθετα, η ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στο κόκκινο κρασί συνδέεται άμεσα με το Γαλλικό Παράδοξο, το γεγονός ότι οι Γάλλοι έχουν σχετικά χαμηλή συχνότητα εμφάνισης της στεφανιαίας καρδιακής νόσου, ακόμα κι αν ακολουθούν μια διατροφή πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά. Πιστεύεται ότι η συνεχής και μέτρια κατανάλωση των προϊόντων που προέρχονται από τα σταφύλια, και ειδικότερα το κόκκινο κρασί, έχει ρόλο-κλειδί στην πρόληψη των καρδιακών ασθενειών.⁹

1.3.4 Ο οίνος από τους καρπούς της ροδιάς (*Punica granatum* L.)

Το ρόδι έχει αποδειχθεί κατάλληλο για την παρασκευή οίνων πλούσιων σε βιοδραστικές ενώσεις.¹⁴⁴ Το κρασί από ρόδι είναι το εθνικό ποτό της Αρμενίας και είναι γνωστό και διαδεδομένο για περισσότερο από 70 χρόνια. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός οινοποιείων που παρασκευάζουν κρασιά από ρόδι. Το ποτό αυτό είναι αποτέλεσμα της ζύμωσης του φρούτου και μόνον, χωρίς προσθήκη αλκοόλης, και παράγεται με παραδοσιακές τεχνικές, ίδιες με αυτές της οινοποίησης των σταφυλιών της αμπέλου. Έπειτα, ξεκινά η διαδικασία της παλαίωσης για ένα έτος σε δρύινα βαρέλια Καυκάσου. Η διαδικασία της παλαίωσης προσφέρει στο τελικό προϊόν ένα λαμπερό, διαυγές, βαθυκόκκινο ελκυστικό χρώμα με πλούσιο αρωμα φρούτων, την πλούσια δομή, πικάντικη γεύση και επίγευση του ροδιού. Το κρασί ροδιού είναι επίσης ένα ποτό που προάγει την ανθρώπινη υγεία.¹⁴⁶ Σημαντικές αλλαγές στη σύσταση λαμβάνουν χώρα κατά τις διαδικασίες παραγωγής κρασιού από ρόδι, καταλήγοντας σε κρασιά με ένα αξιόλογο φυτοχημικό προφίλ.¹⁴⁷ Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία έχουν περιγραφεί για ζυμωμένους χυμούς ροδιού (κρασιά), που πιθανώς σχετίζονται με τη σύστασή του σε φαινολικές ενώσεις.¹⁴⁴ Επιπρόσθετα, οι *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι το κρασί από ρόδι με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ικανό να μειώσει την ανάπτυξη των περιπλοκών που προκαλεί ο διαβήτης τύπου 2, ιδιαίτερα των καρδιαγγειακών επιπλοκών.⁸² Παράλληλα, η οινολάσπη που προκύπτει από τα κρασιά ροδιού είναι πιθανή πηγή για την ανάκτηση βιοδραστικών πολυφαινολών με ενδεχόμενες εφαρμογές σε διαφορετικούς τομείς της βιομηχανίας.¹⁴⁷

1.4 Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης

Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε το ρόδι (*Punica granatum* L.) ως αντικείμενο μελέτης, το οποίο παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια αυξανόμενο διατροφικό, εμπορικό και οικονομικό ενδιαφέρον, τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα. Έχει χαρακτηριστεί ως φρούτο με σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες, και έχουν ήδη δοθεί επιχορηγήσεις για την καλλιέργειά του με αποτέλεσμα να υπάρχουν μεγάλες εκτάσεις οπωρώνων ροδιάς στη χώρα μας. Επιπρόσθετα, διαφορετικά είδη οίνων επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη δεδομένου ότι ο οίνος καταναλώνεται ευρέως και αποτελεί σημαντικό εμπορικό είδος.

Επιλέχθηκαν να μελετηθούν ρόδια δύο νέων ελληνικών ποικιλιών και ρόδια μιας ποικιλίας που καλλιεργείται ευρέως παγκοσμίως, όπως επίσης ένας οίνος από ρόδι και ένας ερυθρός οίνος από σταφύλια. Η σκοπιμότητα της παραπάνω επιλογής ήταν η σύγκριση νέων και κλασικών ποικιλιών ροδιάς, η μελέτη των νέων ελληνικών ποικιλιών, η σύγκριση του οίνου ροδιού και του ερυθρού οίνου, όπως και η σύγκριση μεταξύ των χυμών ροδιών και των οίνων ως προς το προφίλ των φυσικών φαινολικών αντιοξειδωτικών τους.

Συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών στα δείγματα και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους με διαφορετικές φασματοφωτομετρικές μεθόδους, όπως επίσης η μελέτη των φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων με δύο χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης, την αεριοχρωματογραφία και την υγροχρωματογραφία, συνδυασμένες με ανιχνευτή φασματογραφίας μαζών ώστε να γίνει η ταυτοποίηση και ο χημικός χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τις προαναφερθείσες αναλύσεις με στόχο τη συγκριτική αξιολόγηση των δειγμάτων μεταξύ τους και με βιβλιογραφικά δεδομένα.

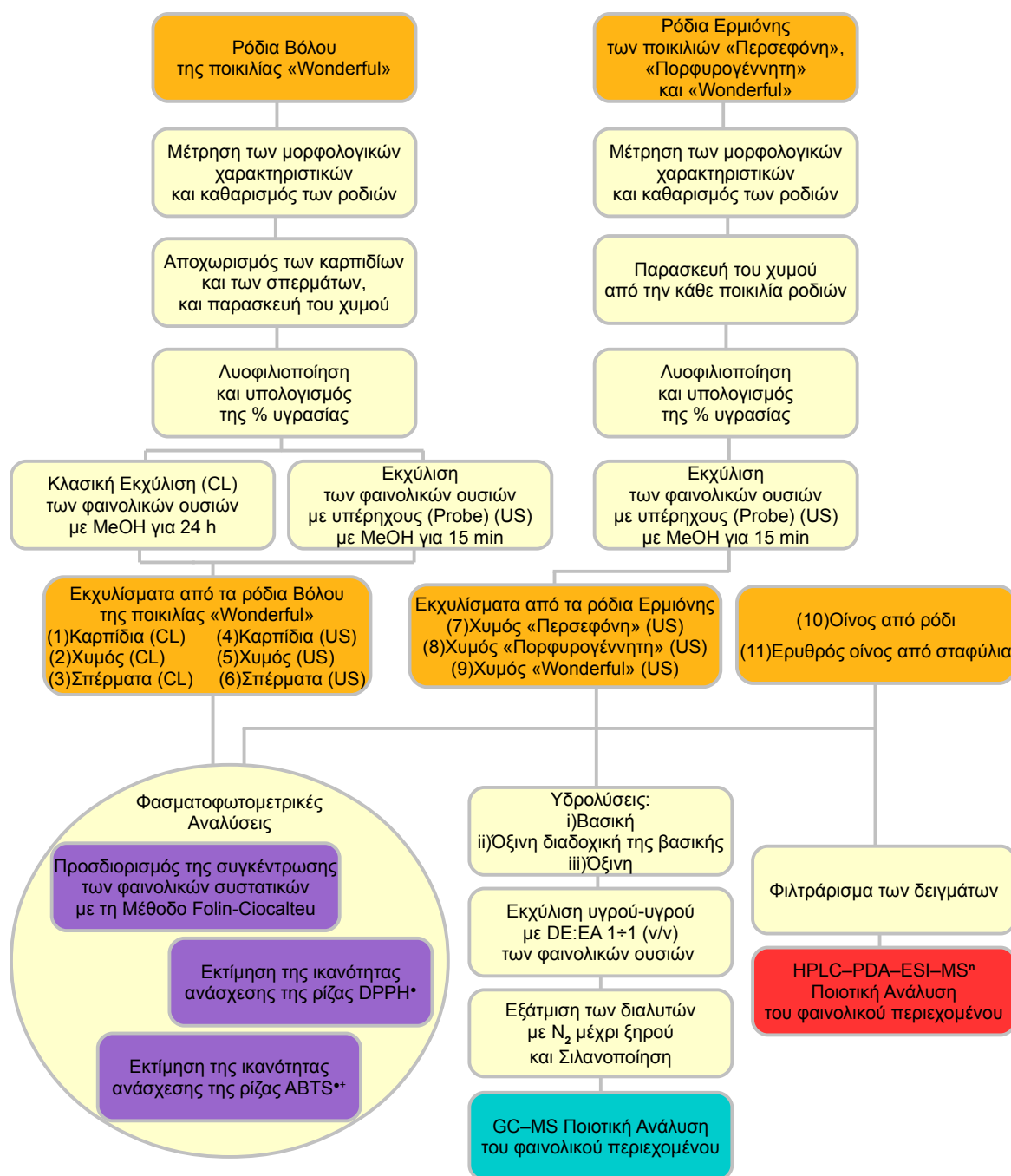
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 Διάγραμμα της πειραματικής πορείας

Το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των δειγμάτων των ροδιών και οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις εκπονήθηκαν στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α.. Οι λυοφιλοποιήσεις και η GC–MS ανάλυση πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθηνών, ενώ οι εκχυλίσεις με υπέρηχους και η HPLC–PDA–ESI–MSⁿ ανάλυση έγιναν στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Ε.Ι.Ε..



Σχήμα 2.1.1: Διάγραμμα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα των ροδιών και των οίνων.

2.2 Αναλύσιμα και οργανολογία

2.2.1 Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

(1) Για τα πειράματα που περιγράφονται στις Παραγράφους 2.4–2.7:

Απεσταγμένο νερό (H₂O)

Μεθανόλη (MeOH): Methanol ≥99,8% (GC), CH₄O, MW=32,04 g/mol, CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich, France

Αιθανόλη (EtOH): Ethanol absolute for analysis, C₂H₅OH, MW=46,07 g/mol, Index-No: 603-002-00-5, Merck KGaA, Germany

Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃): Sodium Carbonate anhydrous, Assay 99,5–100,5%, MW=105,99 g/mol, CAS: 497-19-8, Carlo Erba Reagents, Italy

Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu: Folin–Ciocalteu's phenol reagent, 3H₂O·P₂O₅·14WO₃·4MoO₃·10H₂O & 3H₂O·P₂O₅·13WO₃·5MoO₃·10H₂O, Merck KGaA, Germany

Γαλλικό οξύ (GA): 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid anhydrous 99%, C₇H₆O₅, MW=170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

DPPH ρίζα: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical) 95% powder, C₁₈H₁₂N₅O₆, MW=394,32 g/mol, CAS: 1898-66-4, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C): L-Ascorbic acid, Analytical reagent grade, C₆H₈O₆, MW=176,12 g/mol, CAS: 50-81-7, Fischer Chemical, UK

Υπερθειικό κάλιο (K₂S₂O₈): Potassium persulfate ≥99,0% (RT), MW=270,32 g/mol, CAS: 7727-21-1, Sigma-Aldrich, Germany

ABTS: ABTS 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (Spectrophotometric reagent for free chlorine and use as chromogenic substrate in enzyme-immunoassay) >98,0%, C₁₈H₂₄N₆O₆S₄, MW=548,58 g/mol, CAS: 30931-67-0, TCI Tokyo Chemical Industry Co. LTD, Japan

Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%, C₁₄H₁₈O₄, MW=250,29 g/mol CAS: 53188-07-01, Sigma-Aldrich, Germany

(2) Για τα πειράματα που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.8.1:

2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol 99,8%, CAS: 128-37-0, Acros Organics, Belgium

trans-4-Hydroxycinnamic acid 98%, C₉H₈O₃, MW=164,16 g/mol, CAS: 501-98-4, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

3,4-Dihydroxycinnamic acid predominantly trans 99%, C₉H₈O₄, MW=180,16 g/mol, CAS: 331-39-5, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

(±)-Naringenin 95%, C₁₅H₁₂O₅, MW=272,25 g/mol, CAS: 67804-48-2, Sigma-Aldrich, Product of United Kingdom

Vanillin 99%, C₈H₈O₃, MW=152,15 g/mol, CAS: 121-33-5, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol, Standard for chromatography, $C_8H_{10}O_2$, CAS: 501-94-0, Fluka Analytical, Japan

(±)-Catechin hydrate $\geq 98\%$ (HPLC), $C_{15}H_{14}O_6 \cdot H_2O$, CAS: 225937-10-0, Sigma-Aldrich, Product of China

3,4,5-Trihydroxybenzoic acid anhydrous 99%, $C_7H_6O_5$, MW=170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

Cinnamic acid 99%, $C_9H_8O_2$, MW=148,16, CAS: 140-10-3, Merck KGaA, Germany

4-Hydroxybenzoic acid for synthesis, $C_7H_6O_3$, MW=138,12 g/mol, CAS: 99-96-7, Merck KGaA, Germany

Quercetin dihydrate 97%, $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, MW=338,28 g/mol, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

Μεθανόλη (MeOH): Methanol $\geq 99,8\%$ (GC), CH_4O , MW=32,04 g/mol, CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich, France

Καυστικό νάτριο (NaOH): Sodium hydroxide pellets for analysis ISO, Assay $>99\%$, MW=40,00 g/mol, Merck KGaA, Germany

Υδροχλωρικό οξύ (HCl): Hydrochloric acid 35% A.G., MW=36,46 g/mol, Index No 017-002-01X, Penta, Czech Republic

Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C): L-Ascorbic acid ACS 99+%, $C_6H_8O_6$, MW=176,12 g/mol, CAS: 50-81-7, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

EDTA: Complexone III, Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, Assay 99,0–100,5%, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, MW=372,24 g/mol, CAS: 6381-92-6, Penta, Czech Republic

Οξικός αιθυλεστέρας (EA): Ethyl acetate GR for analysis ACS 99,5%, $CH_3COOC_2H_5$, MW=88,11 g/mol, Merck KGaA, Germany

Διαιθυλαιθέρας (DE): Diethyl ether, Purex analytical grade, $C_{14}H_{10}O$, MW=74,12 g/mol, CAS: 60-29-7, Carlo Erba Reagents SDS, France

Αντιδραστήριο σιλανοποίησης BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide 98+%, $C_8H_{18}F_3NOSi_2$, MW=257,39 g/mol, CAS: 25561-30-2, Acros Organics, Belgium

Καταλύτης TMCS: Chlorotrimethylsilane 98%, C_3H_9ClSi , MW=108,64 g/mol, CAS: 75-77-4, Acros Organics, Belgium

(3) Για τα πειράματα που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.8.2:

Νερό (H_2O): Water LC–MS Grade, MW=18,02 g/mol, CAS: 7732-18-5, Fischer Scientific, UK

Ακετονιτρίλιο (ACN): Acetonitrile hypergrade for LC–MS, LiChrosolv, CH_3CN , MW=41,05 g/mol, CAS: 75-05-8, Merck KGaA, Germany

Φορμικό οξύ: Formic acid, Assay 99%min., ULC/MS Optigrade, $HCOOH$, MW=46,03 g/mol, Index No 607-001-00-0, Promochem, LGC Standards GmbH, Germany

2.2.2 Συσκευές και επιστημονικά όργανα

(1) Για τα πειράματα που περιγράφονται στις Παραγράφους 2.4–2.7:

Συγός ηλεκτρονικός ακρίβειας στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου, AB204-5/FACT, Mettler Toledo, Switzerland

Διαστημόμετρο

Ομογενοποιητής: Omni Mixer Homogenizer, Model No 17106, Omni International, USA

Λυοφιλοποιητής: Modulyo D Freeze Dryer, Thermo Electron Corporation (Αντλία: Thermo Savant ValuPump VLP200), Thermo Fischer, USA

Συσκευή δημιουργίας υπερήχων (US) με Probe: Vibra-cell, Ισχύος 750W, Συχνότητας 20kHz, Sonics (Amplitude), Sonics & Materials, Inc., USA

Κυψελίδες πλαστικές για μέτρηση στο ορατό φάσμα χωρητικότητας 2,5 mL, l=0,1 dm, Kartell, Italy

Υδρόλουτρο με θερμοστάτη, Memmert, Germany

Φασματοφωτόμετρο UV–Vis: Novaspek III visible spectrophotometer, Product code: 80-2118-00, Amersham Biosciences, USA

(2) Για τα πειράματα που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.8.1:

Στήλη διαχωρισμού αεριοχρωματογραφίας: DB-5 ms (μήκος: 30,0 m, διάμετρος: 0,25 mm και πάχος: 0,25 mm) Agilent Technologies, Germany

Αυτόματος δειγματολήπτης για GC: AOC-20i, Shimadzu Corporation, Japan

Μηχάνημα αεριοχρωματογραφίας: GCMS-QP2010 Series, Shimadzu Corporation, Japan

(3) Για τα πειράματα που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.8.2:

Φίλτρα Milex Filter Unit 0,22μm, Durapore PVDF Membrane, Millipore, Ireland

Στήλη διαχωρισμού υγροχρωματογραφίας: Hypersil Gold C₁₈ (μήκος: 100,0 mm, διάμετρος: 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων: 3,0 μm), Part No 25003-102130, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Αυτόματος δειγματολήπτης για LC: Finnigan Surveyor Autosampler Plus Lite, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Μηχάνημα υγροχρωματογραφίας: Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων: Surveyor PDA Plus, UV Accela PDA Detector, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Φασματογράφος μάζας: LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

2.3 Δείγματα των ροδιών και των οίνων που μελετήθηκαν

2.3.1 Δείγματα των ροδιών (*Punica granatum* L.) που μελετήθηκαν

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν να μελετηθούν τρεις ποικιλίες ροδιάς (*Punica granatum* L.). Δύο ελληνικές, η «Περσεφόνη» και η «Πορφυρογέννητη», και η «Wonderful» που είναι ξένη ποικιλία. Από την τοπική αγορά, αγοράστηκαν ~30 kg ρόδια της ποικιλίας «Wonderful» που προέρχονταν από το «Κτήμα Αγγελή» στη Χλόη Βελεστίνου στον Βόλο. Σε δεύτερη χρονικά φάση, ρόδια των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» (~25 kg ρόδια από καθεμία ποικιλία) προμηθεύτηκαν από τα φυτώρια «Σταμάτης Μερτύρης», που βρίσκονται στην Ερμιόνη της Αργολίδας. Ρόδια με ελαττώματα (ηλιακά εγκαύματα, σχισμές, μώλωπες και χαρακιές στο φλοιό) απορρίφθηκαν και επιλέχθηκαν μόνο εκείνα με υγιή εξωτερικά περιβλήματα και ομοιομορφία σε μέγεθος και εμφάνιση, ώστε τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά του είδους και των ποικιλιών.

Η «Wonderful» είναι μια εισαγόμενη ποικιλία ροδιών, της οποίας ο καρπός χρησιμοποιείται κυρίως για χυμοποίηση. Είναι η περισσότερο ευρέως καλλιεργούμενη ποικιλία στις ΗΠΑ. Τα τελευταία χρόνια, φυτεύσεις ροδιών στην Ελλάδα έγιναν χρησιμοποιώντας, κυρίως, αυτήν την ποικιλία. Η εξωτερική εμφάνιση του καρπού και των σπόρων είναι πολύ ελκυστική. Έχει μεγάλο μέγεθος καρπού, ομοιόμορφο κόκκινο χρώμα φλοιού, βαθύ κόκκινο χρώμα σπόρων, ημίσκληρα σπέρματα και γλυκόξινη γεύση. Ο χυμός του διαθέτει μια χαρακτηριστική υπόξινη έως ξινή γεύση.³⁵

Στα φυτώρια ροδιάς «Σταμάτης Μερτύρης», εκτός από την παραδοσιακή ποικιλία «Ερμιόνη», βρίσκονται και άλλες ποικιλίες που παράγουν ρόδια άριστης ποιότητας για επιτραπέζια χρήση, παραγωγή χυμών και πολλές άλλες χρήσεις. Σύμφωνα με πληροφορίες από τον παραγωγό, είναι ποικιλίες απόλυτα προσαρμοσμένες στις συνθήκες της Ελλάδας, αλλά με μεγάλη ικανότητα να προσαρμόζονται σε διάφορες κλιματικές και εδαφολογικές συνθήκες. Επιπλέον, τα ρόδια έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και ο χυμός τους είναι γλυκός (πάνω από 17% περιεκτικότητα σε σάκχαρα).

Η «Περσεφόνη» είναι μια μεσοπρώιμη και μεγαλόκαρπη ποικιλία, επιλεγμένη και εξευγενισμένη από την ποικιλία «Ερμιόνη», εμβολιασμένη ώστε να παράγει ομοιόμορφο καρπό. Το ρόδι της συγκεκριμένης ποικιλίας ζυγίζει περίπου 450 g και μπορεί να συντηρηθεί έως και 3 μήνες. Είναι ποικιλία εμπορεύσιμη και ο καρπός του είναι γλυκός και εύγευστος με περιεκτικότητα χυμού 63%. Έχει έντονο πορφυρό-κόκκινο χρώμα εξωτερικά, με δυνατό βυσσινί-κόκκινο χρώμα στον καρπό, και παράγει γλυκό χυμό.

Η «Πορφυρογέννητη» είναι μια υπερπρώιμη ποικιλία και η παραγωγή ροδιών από αυτήν θα μπορούσε να εξασφαλίσει την εμπορική διάθεση του φρούτου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τις ήδη γνωστές ποικιλίες ροδιάς. Ο καρπός της έχει βαθύ και έντονο πορφυρό χρώμα, και το βάρος του φθάνει τα 300 g. Είναι πολύκαρπη ποικιλία με καλή συμπεριφορά στη συντήρηση, η οποία διαρκεί έως και 5 μήνες. Ο καρπός της είναι γλυκός και εύγευστος με

περιεκτικότητα χυμού 63%. Βάσει πληροφοριών από τον παραγωγό, έχει ήδη εκδηλωθεί ενδιαφέρον για καλλιέργεια της νέας αυτής ποικιλίας από διάφορες περοχές της Ελλάδας, όπως η Κρήτη, η Μυτιλήνη, η Βόρεια Εύβοια, ο Πύργος και η Καλαμάτα. Επιπλέον, έχουν δρομολογηθεί διαδικασίες για την προώθηση των ροδιών της ποικιλίας «Πορφυρογέννητη» στην εγχώρια αγορά, αλλά και για εξαγωγές.

2.3.2 Δείγματα των οίνων που μελετήθηκαν

Το κρασί από ρόδι είναι γνωστό προϊόν της Αρμενίας, καθώς αποτελεί το εθνικό ποτό της χώρας, που παράγεται για εκατοντάδες χρόνων και διατίθεται ευρέως στο εξωτερικό. Το κρασί από ρόδι που επιλέχθηκε, λοιπόν, προς μελέτη είναι αρμένικης προέλευσης. Το κόκκινο κρασί που επιλέχθηκε για να μελετηθεί και να συγκριθεί ποιοτικά με το κρασί ροδιού, είναι επίσης αρμένικο προϊόν, και μάλιστα από την ίδια περιοχή καλλιέργειας και το ίδιο οινοποιείο, καθώς επίσης έχει υποστεί την ίδια καταπόνηση κατά τη μεταφορά του στην Ελλάδα. Θεωρήθηκε, λοιπόν, το πλέον κατάλληλο για σύγκριση με το κρασί ροδιού.

Πίνακας 2.3.2.1: Πληροφορίες για τα δείγματα του οίνου από ρόδι και του κόκκινου οίνου από σταφύλια.

Αλκοολούχο ποτό από ζύμωση ροδιού (οίνος ροδιού) ημίξηρο “Grenade Semi-Sec”, Aramé, έτος εμφιαλώσεως 2012, προϊόν υψηλής ποιότητας της Αρμενίας	Οίνος ερυθρός ξηρός “Grand Reservé”, Aramé, έτος εμφιαλώσεως 2010, προϊόν υψηλής ποιότητας της Αρμενίας
Ποικιλίες ροδιού: ποικιλίες από την περιοχή του Καυκάσου Περιοχή: Αρμαβίρ, Αρμενία Αλκοολικοί βαθμοί: 11,50% vol. Ωρίμανση: 1 χρόνο σε δρύινα βαρέλια από δρυ Καυκάσου Παλαίωση: 5–8 χρόνια Οινοποίηση: Κλασσική οινοποίηση, σε ανοξειδωτες δεξαμενές	Ποικιλίες σταφυλιών: Αρενί (Areni), Νεργκενί (Nerkeni), Γκαρμεραχιούτ (Karmrahyut) και Σαπεραβί (Saperavi) Περιοχή: Αρμαβίρ, Αρμενία Αλκοολικοί βαθμοί: 12,50% vol. Ωρίμανση: 1 χρόνο σε δρύινα βαρέλια από δρυ Καυκάσου Παλαίωση: 5–8 χρόνια Οινοποίηση: Κλασσική ερυθρή οινοποίηση

2.4 Επεξεργασία των δειγμάτων

Αφού παρελήφθησαν τα ρόδια των διάφορων ποικιλιών (~30 kg ρόδια «Wonderful» από τον Βόλο και ~25 kg ρόδια από καθεμία ποικιλία από την Ερμιόνη), μετά από 1–2 ημέρες συντήρησής τους σε συνθήκες ψύξης, άρχισε η επεξεργασία τους προ των αναλύσεων.

Τα δείγματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο, χρησιμοποιήθηκαν για τη

σύγκριση δύο μεθόδων εκχύλισης και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών τους, όπως και για την προκαταρκτική μελέτη μέσω φασματοφωτομετρικών αναλύσεων των διάφορων μερών του ροδιού (καρπίδια, χυμός αριλίων και σπέρματα).

Από τα δείγματα των ποικιλιών της Ερμιόνης επιλέχθηκε να παρασκευασθεί μόνο ο χυμός από τα αρίλια, ως το σημαντικότερο και εμπορικότερο προϊόν του ροδιού, αλλά και το πλουσιότερο σε φαινολικά συστατικά όπως φάνηκε από τη μελέτη της «Wonderful» του Βόλου (Κεφάλαιο 3, Παράγραφος 3.2.1).

Όλες οι εργασίες προετοιμασίας των δειγμάτων έγιναν το δυνατόν ταχύτερα, και σε δροσερό και σκιερό περιβάλλον.

Όσον αφορά τον οίνο από ρόδι και τον ερυθρό οίνο από σταφύλια, ελήφθησαν ποσότητες δείγματος από 10 διαφορετικές φιάλες για κάθε είδος κρασιού. Τα δείγματα των κρασιών δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω προεπεξεργασία.



Εικόνα 2.4.1: Φωτογραφίες από τα δείγματα των ροδιών. Από τα αριστερά προς τα δεξιά, ρόδια της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο, και των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη.

2.4.1 Μέτρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και καθαρισμός των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Τα ρόδια πλύθηκαν με κρύο νερό βρύσης για να απομακρυνθούν υπολείμματα βρομιάς, έπειτα με απεσταγμένο νερό και σκουπίστηκαν καλά. Μετρήθηκε το ολικό βάρος κάθε ροδιού με ηλεκτρονικό ζυγό. Το ύψος (απόσταση μεταξύ των δύο πόλων, εκτός του κάλυκα) και η διάμετρος του ισημερινού των καρπών μετρήθηκαν με διαστημόμετρο. Τα ρόδια κάθε ποικιλίας από τον Βόλο και την Ερμιόνη χωρίστηκαν σε 10 ομάδες βάσει του βάρους τους. Έπειτα, απομακρύνθηκε με ανοξείδωτο μαχαίρι το πάνω και κάτω μέρος των καρπών 8 τυχαία επιλεγμένων ροδιών από την κάθε ομάδα ροδιών για καθεμία ποικιλία, ώστε να αποφευχθεί μικροβιακή μόλυνση. Οι καρποί ανοίχθηκαν, απομακρύνθηκαν ο εξωτερικός δερματώδης φλοιός, οι λευκές μεμβράνες του εσωτερικού του καρπού (πλακούντας) και συλλέχθηκαν με το χέρι μόνο τα καρπίδια κάθε ροδιού (αρίλια με σπέρματα), τα οποία και ζυγίστηκαν. Σε καθεμία ομάδα τα καρπίδια που συλλέχθηκαν από κάθε ρόδι χωριστά αναμείχθηκαν. Συνολικά, τα

καρπίδια των ροδιών για καθεμία ποικιλία χωρίσθηκαν σε 10 ομάδες.

2.4.2 Διαχωρισμός και ομαδοποίηση των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου

Τα καρπίδια καθεμίας από τις 10 ομάδες των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» ισοκατανεμήθηκαν σε 2 μέρη για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

(1) Καρπίδια ολόκληρα: Το πρώτο μέρος των καρπιδίων (~500 g) καθεμίας ομάδας ομογενοποιήθηκε σε μηχανήμα ομογενοποίησης, όπου τα σπέρματα συνθλίβησαν πλήρως.

(2) Χυμός από τα αρίλια: Από το δεύτερο μέρος των καρπιδίων (~700 g) καθεμίας ομάδας παρασκευάστηκε χυμός με οικιακό blender, προσεκτικά, ώστε να μη ραγίσουν τα σπέρματα, αλλά να στραγγίξει ποσοτικά ο χυμός των αριλίων. Μετρήθηκαν, επίσης, το βάρος και ο όγκος του χυμού ώστε να υπολογισθεί η πυκνότητά του. Οι χυμοί φιλτραρίστηκαν σε τουλπάνι για να αποχωρισθούν τα υπολείμματα της πούλπας και τα σπέρματα.

(3) Σπέρματα: Από την παρασκευή του χυμού παρέμειναν άθικτα τα σπέρματα των καρπιδίων, τα οποία αποτέλεσαν την τρίτη ομάδα δειγμάτων. Τα σπέρματα συνεθλίβησαν με πορσελάνινο γουδοχέρι μέχρι να ομογενοποιηθούν. Τα δείγματα συντηρήθηκαν για 1 ημέρα σε συνθήκες κατάψυξης (-9°C) πριν τη λυοφιλοποίησή τους.

2.4.3 Παρασκευή χυμού από τα δείγματα των ροδιών της Ερμιόνης

Οι χυμοί από τα αρίλια των τριών ποικιλιών ροδιάς της Ερμιόνης παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.4.2. Μετρήθηκαν, το βάρος και ο όγκος των χυμών ώστε να υπολογισθούν οι πυκνότητές τους.

2.5 Λυοφιλοποίηση (Freeze drying) των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Τα δείγματα των ροδιών από τον Βόλο (καρπίδια, χυμός αριλίων, σπέρματα) και την Ερμιόνη (χυμοί αριλίων) λυοφιλοποιήθηκαν για λόγους συντήρησης, καθώς με την απομάκρυνση του νερού αναστέλλεται η ενζυμική και η μικροβιακή δράση. Επίσης, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.6, η εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών επιλέχθηκε να γίνει με διαλύτη τη μεθανόλη 100%, οπότε η παρουσία υγρασίας από το τρόφιμο θα άλλαζε τις συνθήκες εκχύλισης. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι ότι το ξηρό δείγμα μπορεί να κονιοποιηθεί πλήρως και ευκολότερα σε σχέση με το νωπό, ενισχύοντας έτσι άμεσα τη διαδικασία της εκχύλισης με την αύξηση της επιφάνειας του υλικού.⁹ Τέλος, με την εφαρμογή της λυοφιλοποίησης, υπολογίζεται και η κατά βάρος υγρασία των δειγμάτων (ο υπολογισμός γίνεται από τη διαφορά των τιμών βάρους του δείγματος πριν και μετά τη λυοφιλοποίησή του).

Η μέθοδος της λυοφιλοποίησης στηρίζεται στην κατάψυξη του υλικού και στην κατά συνέχεια εξάχνωση του πάγου που έχει δημιουργηθεί. Η εξάχνωση επιτυγχάνεται διατηρώντας μια διαφορά τάσης ατμών μεταξύ του μετώπου του πάγου του τροφίμου και του άμεσου περιβάλλοντος. Η πλήρης ξήρανση γίνεται σε τρία στάδια: (α) Με την ψύξη το νερό απομακρύνεται από τα εφυδατωμένα συστατικά της τροφής σχηματίζοντας κρυστάλλους ή ευτηκτικά μίγματα (αυτό συμβαίνει σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης), (β) με την εξάχνωση που πραγματοποιείται στο θάλαμο ξήρανσης απομακρύνεται ο πάγος, και (γ) το υγρό παραμένει στο σύστημα freeze-drying, όπου εξατμίζεται με απλή ανύψωση της θερμοκρασίας.¹⁴⁸

Απαραίτητο είναι να εξασφαλισθούν συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης κάτω από το τριπλό σημείο του νερού, δηλαδή 0°C και 4,7 mm Hg. Το τριπλό σημείο του νερού προκύπτει από διαγράμματα πίεσης-θερμοκρασίας και είναι το σημείο στο οποίο τέμνονται η καμπύλη τάσης των κορεσμένων ατμών, η καμπύλη τήξεως και η καμπύλη εξάχνωσης, και στο οποίο συνυπάρχουν σε ισορροπία και οι τρεις φάσεις (στερό-υγρό-αέριο).

Στην πράξη, η λυοφιλοποίηση γίνεται με πίεση μικρότερη του 1mm στήλης Hg και θερμοκρασία από -4 έως -16°C. Αν το κενό διατηρείται στην περιοχή 0,1–2,0 mm Hg και η θερμοκρασία ελέγχεται ώστε να μην τήκεται ο πάγος, η εξάχνωση προχωρεί από την επιφάνεια, και το μέτωπο του πάγου υποχωρεί προς το κέντρο του τροφίμου.¹⁴⁹

Τα διαφορετικά δείγματα (καρπίδια, χυμός και σπέρματα από τα ρόδια του Βόλου και χυμοί από τα ρόδια της Ερμιόνης) τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -80°C, και ύστερα από 24 h κατάψυξης τοποθετήθηκαν στα ειδικά δοχεία του μηχανήματος του λυοφιλοποιητή και η διαδικασία της λυοφιλοποίησης διήρκεσε 48 h για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας από τα δείγματα. Τέλος, συλλέχθηκε το ξηρό υπόλειμμα κάθε δείγματος.

2.6 Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Η εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων (καρπίδια, χυμός αριλίων, σπέρματα) των ροδιών από τον Βόλο έγινε με δύο διαφορετικές μεθόδους, μια κλασική και μια με τεχνική υψηλής ενέργειας, ώστε να αποτιμηθεί η πρακτική εφαρμογή και χρηστικότητα τους, και βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων να επιλεγεί η μία ως αποδοτικότερη. Η μεθανόλη είναι ένας συνηθισμένος και κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τρόφιμα, και η αναλογία “διαλύτης:δείγμα” 5÷1 (v/w) θεωρήθηκε ικανοποιητική, έπειτα από προκαταρκτικές δοκιμές με αναλογίες “διαλύτη:δείγματος” από 3÷1 έως 10÷1 (v/w), οι οποίες βασίστηκαν σε βιβλιογραφικά δεδομένα.^{12, 150, 151, 8}

2.6.1 Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού–υγρού των φαινολικών συστατικών από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Σε ξεχωριστές κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν 10 g λυοφιλοποιημένου και κονιοποιημένου υλικού καθεμίας από τις 10 ομάδες για κάθε δείγμα (καρπίδια, χυμός αριλίων, σπέρματα) των ροδιών του Βόλου, και προστέθηκαν σε κάθε φιάλη 50,0 mL μεθανόλης για την εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου. Η εκχύλιση διήρκτησε 24 h σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία -10°C για την προφύλαξη των ευαίσθητων φαινολικών ουσιών, ενώ γινόταν ανακίνηση των φιαλών ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Με το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε διήθηση σε χωνί Buchner, ώστε να απομακρυνθεί το στερεό υπόλειμμα και τα διαυγή εκχυλίσματα αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 50,00 mL. Τα εκχυλίσματα φυλάσσονταν στην κατάψυξη σε ερμητικά κλειστά γυάλινα δοχεία όσο διήρκτησε η πειραματική μελέτη.

2.6.2 Εκχύλιση στερεού–υγρού με υπέρηχους (Ultrasound–Assisted Extraction, UAE) των φαινολικών συστατικών από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Η ακτινοβολία υπερήχων διευκολύνει την εκχύλιση οργανικών και ανόργανων ενώσεων από στερεές μήτρες με τη χρήση υγρών διαλυτών. Όταν εφαρμόζονται οι υπέρηχοι, δημιουργείται το «Φαινόμενο της σπηλαίωσης», κατά το οποίο, παράγονται ηχητικά κύματα που δημιουργούν φυσαλίδες, οι οποίες εκρήγνυνται και εκκλύουν ενέργεια. Όσο μικρότερη είναι η ισχύς των υπερήχων τόσο μεγαλύτερη η ενέργεια. Με το σπάσιμο των φυσαλίδων διατρύπωνται τα κυτταρικά τοιχώματα, απελευθερώνοντας έτσι το περιεχόμενό τους.¹⁵² Η τεχνική αυτή έχει



Εικόνα 2.6.2.1:
Συσκευή
δημιουργίας
υπερήχων (US)
με Probe της
Sonics &
Materials (USA).

γενικώς καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με άλλες μεθόδους εκχύλισης, γιατί εξασφαλίζει την άμεση επαφή του δείγματος με το διαλύτη εκχύλισης, μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων και ενισχύει τη μεταφορά μάζας από τα κύτταρα προς το διαλύτη.^{153, 8}

Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων είναι κατάλληλη για την εκχύλιση φαινολικών ουσιών από φρούτα.⁹ Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, η UAE είναι απλή, γρήγορη, και αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης που μπορεί να εφαρμοσθεί και σε μεγάλη κλίμακα για βιομηχανικούς σκοπούς. Επίσης, ο χρόνος που απαιτείται είναι σύντομος, ελαττώνεται η απελευθέρωση των τοξικών ρύπων λόγω της περιορισμένης κατανάλωσης οργανικού διαλύτη, και είναι σχετικά ανέξοδη διαδικασία.^{152, 153} Αποτελεί, λοιπόν, μια εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.⁸

Πορεία πειράματος

Οι φαινολικές ουσίες των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων των ροδιών από τον

Βόλο (καρπίδια, χυμός αριλίων, σπέρματα) και την Ερμιόνη (χυμοί αριλίων) εκχυλίστηκαν με τη βοήθεια των υπερήχων και με διαλύτη τη μεθανόλη. Σε ειδική ωοειδή φιάλη, κάθε φορά, τοποθετούνταν 10 g λυοφιλοποιημένου και κονιορτοποιημένου δείγματος καθεμίας από τις 10 ομάδες για κάθε δείγμα (καρπίδια, χυμός αριλίων, σπέρματα των ροδιών από τον Βόλο, και χυμός αριλίων των ροδιών από την Ερμιόνη) και 50,0 mL μεθανόλης, κι έπειτα, προσαρμοζόταν η συσκευή δημιουργίας υπερήχων probe. Οι συνθήκες της εκχύλισης επιλέχθηκαν βάσει προηγούμενων πειραμάτων στο εργαστήριο για τη βέλτιστη εκχύλιση φαινολικών ουσιών από φυτικά τρόφιμα. Επίσης, η φιάλη ήταν βυθισμένη σε πάγο, ώστε η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης να μην ξεπεράσει τους 35°C και υποβαθμιστούν τα συστατικά των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η ισχύς των υπερήχων κυμάνθηκε σε ποσοστό ~80% {Power=[60–100]%, ώστε $\theta < 35^{\circ}\text{C}$ } και η λειτουργία των παλμών (Pulse mode) ρυθμίστηκε με 10 sec On – 5 sec Off. Συνολικά, ο χρόνος για κάθε εκχύλιση ήταν 15 min.

Με το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε διήθηση σε χωνί Buchner, ώστε να απομακρυνθεί το στερεό υπόλειμμα και τα εκχυλίσματα να είναι διαυγή, ενώ ο τελικός τους όγκος ήταν 50,00 mL. Τα εκχυλίσματα φυλάσσονταν στην κατάψυξη σε ερμητικά κλειστά γυάλινα δοχεία όσο διήρκεσε η πειραματική μελέτη.

Μετά τις εκχυλίσεις και μαζί με τα δείγματα των κρασιών, τα υπό μελέτη δείγματα έφθασαν συνολικά 11 σε αριθμό, οπότε η κωδικοποίησή τους ήταν απαραίτητη. Τα κωδικοποιημένα ονόματα που ακολουθούν στον Πίνακα θα χρησιμοποιούνται χάριν ευκολίας στο υπόλοιπο μέρος της εργασίας.

Πίνακας 2.6.2.1: Πίνακας αναγραφής των διαφορετικών ειδών δειγμάτων ροδιών και οίνων με το κωδικοποιημένο τους όνομα.

Είδος δείγματος	Κωδικό όνομα
Εκχύλισμα από κλασική εκχύλιση των καρπιδίων ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Βόλου)	Aril.CL.Wf
Εκχύλισμα από εκχύλιση με υπέρηχους των καρπιδίων ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Βόλου)	Aril.US.Wf
Εκχύλισμα από κλασική εκχύλιση του χυμού ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Βόλου)	Juice.CL.Wf
Εκχύλισμα από εκχύλιση με υπέρηχους του χυμού ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Βόλου)	Juice.US.Wf
Εκχύλισμα από κλασική εκχύλιση των σπερμάτων ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Βόλου)	Seed.CL.Wf
Εκχύλισμα από εκχύλιση με υπέρηχους των σπερμάτων ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Βόλου)	Seed.US.Wf
Εκχύλισμα από εκχύλιση με υπέρηχους του χυμού ροδιών ποικιλίας «Περσεφόνη» (περιοχή Ερμιόνης)	Juice.Ps

Εκχύλισμα από εκχύλιση με υπέρηχους του χυμού ροδιών ποικιλίας «Πορφυρογέννητη» (περιοχή Ερμιόνης)	Juice.Pg
Εκχύλισμα από εκχύλιση με υπέρηχους του χυμού ροδιών ποικιλίας «Wonderful» (περιοχή Ερμιόνης)	Juice.Wf
Κρασί από ρόδι (χώρα παραγωγής: Αρμενία)	Pom.Wine
Κόκκινο κρασί από σταφύλια (χώρα παραγωγής: Αρμενία)	Red.Wine

2.7 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις στα δείγματα των ροδιών από τον Βόλο και την Ερμιόνη και των οίνων

Το φαινολικό περιεχόμενο πολλών τροφίμων έχει συσχετισθεί με τη δραστικότητα των συστατικών τους έναντι ελεύθερων ριζών.^{154, 54} Υπογραμμίζεται ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ της σημασίας των όρων “ενάντια των ριζών” (antiradical) και “αντιοξειδωτική” (antioxidant) δραστικότητα, και ότι δεν συμπίπτουν απαραίτητως. Η antiradical δράση χαρακτηρίζει την ικανότητα των ενώσεων να αντιδράσουν με συγκεκριμένη ρίζα *in vitro*, ενώ η αντιοξειδωτική δράση είναι ουσιαστικά η ικανότητα αναστολής της διαδικασίας της οξειδωσης μέσα σε ένα σύστημα *in vivo*. Κατά συνέπεια, σε πολλές περιπτώσεις, η antiradical ικανότητα μιας ουσίας ή μείγματος ουσιών, που υπολογίζεται μέσω δοκιμών που χρησιμοποιούν κάποιο είδος ελεύθερης ρίζας, δεν ανταποκρίνεται στην αντιοξειδωτική δράση που έχει η ουσία ή το μείγμα σε κάποιο τρόφιμο ή σε ζωντανό οργανισμό.¹⁵⁵ Είναι λογικό, όμως, να υποθέτουμε ότι εφόσον το υπό εξέταση δείγμα έχει αυξημένη ικανότητα σάρωσης μιας ελεύθερης ρίζας *in vitro*, τότε ενδέχεται να είναι δραστικό αντιοξειδωτικό.¹⁵⁶

Γενικώς, προτείνεται η εφαρμογή πάνω από μία δοκιμών για τον προσδιορισμό της antiradical δράσης, ώστε να εξαχθεί μια ολοκληρωμένη εκτίμηση βασισμένη σε διαφορετικούς μηχανισμούς αντιδράσεων.^{157, 158, 12, 159}

Εντούτοις, συχνά, η σύγκριση των αποτελεσμάτων από τη βιβλιογραφία είναι δύσκολη έως αδύνατη, καθώς υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην εφαρμογή ακόμη και της ίδιας μεθόδου μεταξύ των διάφορων ερευνητικών ομάδων.⁵⁴

Μέσω της φασματοφωτομετρίας προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα των δειγμάτων των ροδιών από τον Βόλο και την Ερμιόνη, και των δύο κρασιών, όπως επίσης η ικανότητά τους να δεσμεύουν δύο διαφορετικές ρίζες (DPPH[•], ABTS^{•+}). Έπειτα από μια σειρά δοκιμών για κάθε φασματοφωτομετρική μέθοδο, κρίθηκε αναγκαίο να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με μεθανόλη. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα Aril.CL.Wf, Aril.US.Wf, Seed.CL.Wf, Seed.US.Wf και Juice.Ps έγινε αραιώση 1÷4 (v/v), ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα, Juice.CL.Wf, Juice.US.Wf, Juice.Pg, Juice.Wf, Pom.Wine και Red.Wine έγινε αραιώση 1÷9 (v/v) με μεθανόλη.

2.7.1 Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων από τα δείγματα των ροδιών του Βόλου (καρπίδια, χυμός αριλίων, σπέρματα) και της Ερμιόνης (χυμοί αριλίων), και των δύο κρασιών υπολογίστηκε με τη χρήση του αντιδραστήριου Folin–Ciocalteu (F–C). Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά το 1972 από τους Folin και Ciocalteu για τη μέτρηση της τυροσίνης, αργότερα, το 1965, προσαρμόστηκε από τους Singleton and Joseph για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ουσιών σε κρασί.⁹

Το αντιδραστήριο F–C αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου (Mo) και του βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται, και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξειδία που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου.¹⁵⁶ Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου.⁹

Παρόλου που ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, η μέθοδος προσδιορισμού είναι απλή, πρακτική και με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.¹⁶

Πορεία του πειράματος

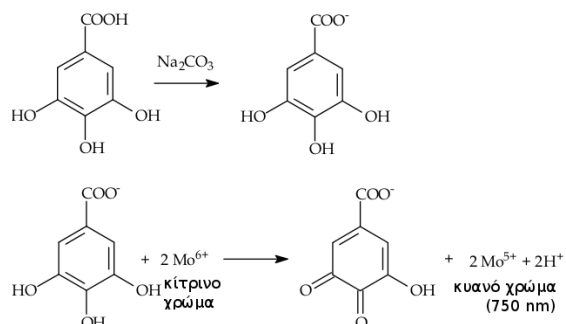
Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη, με ελάχιστες τροποποιήσεις, είναι μια μικρομέθοδος με το δυνατόν ελάχιστη χρήση αντιδραστηρίων και διαλυτών, που εφαρμόζεται ως ανάλυση ρουτίνας σε δείγματα τροφίμων και ποτών.¹⁶⁰

Αρχικά, παρασκευάζεται το κορεσμένο διάλυμα αθρακικού νατρίου Na_2CO_3 ως εξής:

Σε 800,0 mL απεσταγμένου H_2O διαλύονται 200,00 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) με τη βοήθεια του βρασμού. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται ~80 g κρυστάλλων Na_2CO_3 , και το διάλυμα αφήνεται για 24 h. Τέλος, φιλτράρεται και αραιώνεται μέχρι τα 1,00 L απεσταγμένου H_2O . Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ως πρότυπη φαινολική ουσία για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ (gallic acid, GA). Παρασκευάστηκε stock διάλυμα αυτής, συγκέντρωσης 5 g GA/L ως εξής:

0,500 g GA διαλύονται πλήρως σε 10,0mL αιθανόλης, και αραιώνονται με απεσταγμένο H_2O μέχρι τα 100,00 mL. Διατηρείται στο ψυγείο μέχρι 2 εβδομάδες. Από το stock διάλυμα παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα συγκεντρώσεων από 25 μέχρι 500 mg GA/L, κάθε διαφορετική ημέρα σειράς πειραμάτων.



Σχήμα 2.7.1.1: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e^- .²¹

Η μετέπειτα πειραματική πορεία για τα δείγματα των ροδιών και των κρασιών, και των πρότυπων διαλυμάτων περιγράφεται ακολούθως. Σε πλαστικές κυψελίδες των 2,5 mL, με τη χρήση ηλεκτρονικών πιπιετών τοποθετούνται 20,0 μL προτύπου ή αραιωμένου δείγματος (όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.7) 1500,0 μL απεσταγμένου H_2O και 100,0 μL αντιδραστηρίου F–C (βιομηχανικά παρασκευασμένο). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και μετά από αναμονή 8min, προστίθενται 300,0 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , και το μείγμα αναδεύεται ξανά. Έπειτα, οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 min σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 40°C, σε συνθήκες σκότους. Αφού αναπτυχθεί το επιθυμητό μπλε χρώμα και το περιεχόμενο των κυψελίδων αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, τότε μετράται σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση στα 750 nm ($A_{750\text{nm}}$) για κάθε δείγμα ή πρότυπο. Η διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης εξαιτίας του διαλύτη των δειγμάτων και των πρότυπων γίνεται με “τυφλό” δείγμα.

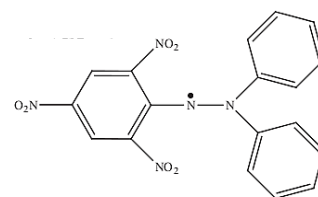
Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά, ενώ διαφορετικές σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια ημέρα, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες.

Έκφραση των αποτελεσμάτων

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται γραφικά η πρότυπη καμπύλη μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE).

2.7.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης / ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

Η πρώτη δοκιμή για τον προσδιορισμό της antiradical ικανότητας των 11 υπό μελέτη δειγμάτων έγινε με τη χρήση της ρίζας DPPH• (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο). Η ρίζα αυτή παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 515–517 nm, έχει δηλαδή χρώμα μωβ. Η DPPH• δε διμερίζεται σε αντίθεση με άλλες ελεύθερες ρίζες, αλλά παραμένει στη μονομερή της μορφή σε διαλύματα, παρουσιάζει σταθερή τιμή απορρόφησης σε μεγάλο εύρος pH και δεν οξειδώνεται εύκολα. Η δοκιμή DPPH• είναι διαδεδομένη για το



Σχήμα 2.7.2.1: Δομή της ρίζας DPPH• που απορροφά στα 516 nm.¹⁵⁶

χαρακτηρισμό των φαινολικών ενώσεων από τους επιστήμονες τροφίμων.¹⁶¹ Παρουσία ενός σαρωτή ελευθέρων ριζών, η ρίζα DPPH• δέχεται ένα ηλεκτρόνιο ή ένα υδρογόνο, γίνεται διαμαγνητικό μόριο και το μωβ χρώμα της χάνεται σταδιακά, κάτι που συνάδει στοιχειομετρικά με τον αριθμό των ηλεκτρονίων ή υδρογόνων που έλαβαν μέρος στην αντίδραση.¹⁵¹

Οι αντιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα είναι οι εξής:



$\text{DPPH}^\bullet$ (μωβ χρώμα) + AH $\rightarrow$ DPPH-H (υποκίτρινο χρώμα λόγω της πικρυλομάδας) + $\text{A}^\bullet$ ^{162, 163}, όπου AH= antiradical ένωση.

Η ρίζα ($\text{A}^\bullet$) που δημιουργείται μπορεί να διμερισθεί ή να αντιδράσει με μια ρίζα $\text{DPPH}^\bullet$ με αποτέλεσμα το σχηματισμό των σταθερών μορίων, A-A ή DPPH-A. ¹⁵⁶

Ο χρόνος που απαιτείται για κάθε ένωση ή μείγμα ενώσεων (π.χ. τρόφιμα) να φθάσουν σε μια κατάσταση ισορροπίας στην παραπάνω αντίδραση ποικίλει από μερικά λεπτά έως πολλές ώρες.

Η πειραματική διαδικασία και ο τρόπος εξαγωγής των αποτελεσμάτων βασίστηκε στη μελέτη των Brand-Williams, Cuvelier και Berset (1995), αλλά και στις προτάσεις των Νενάδη και Τσιμίδου (2002), με κάποιες παραλλαγές που εξαρτήθηκαν από τη φύση των δειγμάτων. ^{161, 162}

Πορεία πειράματος

Καταρχάς, έγινε η αραιώση των δειγμάτων όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.7. Έπειτα, η ριζική μορφή της ουσίας DPPH, που βρίσκεται σε στερεά μορφή, διαλύεται σε μεθανόλη, για να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,001 M (stock διάλυμα). Από αυτό, παρασκευάζεται μεθανολικό διάλυμα 100 μM που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή των δειγμάτων. Τα διαλύματα της ρίζας (stock και αραιώσεις) παρασκευάζονται καθημερινά και φυλάσσονται στο σκοτάδι συνεχώς. Σε πλαστική κυψελίδα, για κάθε δείγμα, τοποθετούνται 10 έως 150,0 μL από τα αραιωμένα δείγματα των ροδιών και κρασιών μαζί με 1500,0 μL από το διάλυμα $\text{DPPH}^\bullet$ 100 μM, έτσι ώστε η αντίδραση αποχρωματισμού της ρίζας να μελετηθεί για ένα μεγάλο εύρος αναλογίας «νωπό ή ξηρό δείγμα/ $\text{DPPH}^\bullet$ » κατά βάρος. Γίνεται ανακίνηση στο σκοτάδι για 1 min, και η ένταση του χρώματος της ρίζας που δεν έχει ουδετεροποιηθεί από τις antiradical ενώσεις προσδιορίζεται από την απορρόφηση στα 516 nm ($A_{516\text{nm}}$). Η παρακολούθηση της αντίδρασης μεταξύ της $\text{DPPH}^\bullet$ και κάθε δείγματος γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να σταθεροποιηθεί η $A_{516\text{nm}}$ σε μια ελάχιστη τιμή, δηλαδή να φθάσει το λεγόμενο plateau χρόνου. ^{161,}

^{162, 16, 158} Ο χρόνος για να φθάσει η αντίδραση το σημείο αυτό, που συμβολίζεται ως T_{plateau} , εξαρτάται από το είδος του δείγματος, τη συγκέντρωσή του, τις συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία και φως) και προφανώς τη συγκέντρωση του DPPH. Παράλληλα, σε κάθε χρονική στιγμή, μετράται η $A_{516\text{nm}}$ $\text{DPPH}^\bullet$ για το καθαρό διάλυμα της ρίζας ώστε να γίνει ο υπολογισμός του ποσοστού ανάσχεσής της. Επίσης, μετρώνται οι τιμές της απορρόφησης για τα δύο “τυφλά” δείγματα που θα χρειαστούν για τη διόρθωση του αρνητικού σφάλματος που προκαλεί ο όγκος του διαλύτη του κάθε δείγματος, αλλά και του θετικού σφάλματος που προκαλείται από το κόκκινο χρώμα των δειγμάτων που δίνει επίσης ένταση στα 516 nm.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης επιλέχθηκε το L-ασκορβικό οξύ (L-ascorbic acid, AA), επειδή αντιδρά πλήρως με το $\text{DPPH}^\bullet$ ταχύτατα και χρειάζεται μόνο μια καταγραφή της τιμής της $A_{516\text{nm}}$. Το stock διάλυμα συγκέντρωσης 1,00 mg/mL παρασκευάζεται από τη διάλυση 0,100 g ασκορβικού οξέος σε 100,00 mL απεσταγμένου H_2O . Με τις κατάλληλες αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα του προτύπου συγκεντρώσεων από 40 έως 320 μg AA/mL. Τα

διαλύματα του AA πρέπει να είναι παρασκευασμένα την ημέρα της διεξαγωγής του πειράματος. Σε πλαστικές κυψελίδες τοποθετούνται 40,0 μL διαλύματος AA για κάθε συγκέντρωση και 1500,0 μL DPPH $\cdot$ 100 μM , αναδεύονται στο σκοτάδι για 1 min και μετράται η $A_{516\text{nm}}$. Παρασκευάζεται, τέλος, το “τυφλό” δείγμα για τη διόρθωση των τιμών της απορρόφησης από το αρνητικό σφάλμα που προκαλεί ο όγκος του H_2O ως διαλύτης.

Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά, ενώ διαφορετικές σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια ημέρα, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες.

Η θερμοκρασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων με την ελεύθερη ρίζα DPPH $\cdot$ ήταν $\sim 18^\circ\text{C}$.

Έκφραση των αποτελεσμάτων

(1) Η Ικανότητα Σάρωσης της Ρίζας (Radical Scavenging Activity, %RSA) επί τοις εκατό υπολογίζεται από τον τύπο: $\%RSA = (A_{516\text{nm}} \text{ DPPH}^\bullet - A_{516\text{nm}} \text{ Tplateau} \times 100\%) / A_{516\text{nm}} \text{ DPPH}^\bullet$,

όπου $A_{516\text{nm}} \text{ Tplateau}$ είναι η τιμή της απορρόφησης του εναπομείνοντος DPPH $\cdot$ αφού έχει ολοκληρωθεί (σε χρόνο $t = T_{\text{plateau}}$) η αντίδραση μεταξύ της ρίζας και των antiradical ουσιών του δείγματος, ενώ $A_{516\text{nm}} \text{ DPPH}^\bullet$ είναι η τιμή της απορρόφησης του καθαρού διαλύματος DPPH $\cdot$ 100 μM .

Για κάθε δείγμα ξεχωριστά, κατασκευάζεται γραφικά η καμπύλη της %RSA συναρτήσει της κατά βάρος αναλογίας «ξηρό δείγμα/DPPH $\cdot$ ». Μέσω αυτών, βρέθηκε η τιμή της Ικανής (απαραίτητης) Συγκέντρωσης EC_{50} (Efficient Concentration), δηλαδή η ποσότητα δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική απορρόφηση του διαλύματος της ρίζας (και άρα η συγκέντρωσή του) κατά 50%. Όσο χαμηλότερη η τιμή της EC_{50} τόσο μεγαλύτερη η antiradical δράση του δείγματος. Η EC_{50} εκφράζεται σε mg για συγκεκριμένη ποσότητα (g) ρίζας DPPH $\cdot$. Η Ισχύς ενάντια στις ρίζες (Antiradical Power, ARP) σε μονάδες mg^{-1} υπολογίστηκε από τον τύπο $\text{ARP} = 1/\text{EC}_{50}$. Προσδιορίστηκε, επίσης, ο $T_{\text{EC}_{50}}$ (min) που είναι ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση του plateau στην EC_{50} . Επιπλέον, από τον τύπο $\text{AE} = 1/(\text{EC}_{50} \times T_{\text{EC}_{50}})$, υπολογίστηκε η Ικανότητα ενάντια στις ρίζες (Antiradical Efficiency) εκφρασμένη σε $\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ για κάθε δείγμα. Όσο υψηλότερες οι τιμές των ARP και AE τόσο πιο δραστικό το δείγμα έναντι της ρίζας DPPH $\cdot$.

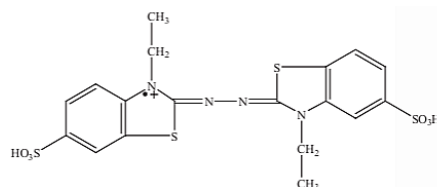
(2) Από την πρότυπη καμπύλη του ασκορβικού οξέος, υπολογίστηκε σε ισοδύναμα του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) η ποσότητα σε antiradical ουσίες για κάθε δείγμα.

Να σημειωθεί ότι για τα δείγματα για τα δείγματα των ροδιών του Βόλου έγινε η αναλυτική έκφραση των αποτελεσμάτων όπως προαναφέρεται, καθώς στόχος ήταν η ενδεδειγμένη μελέτη της antiradical ικανότητας των καρπιδίων, του χυμού και των σπερμάτων από τα ρόδια, ώστε να γίνει η επιλογή του καταλληλότερου για περαιτέρω έρευνα. Επιπλέον, συγκρίθηκαν τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την κλασική μέθοδο και τη μέθοδο με τη βοήθεια υπερήχων, για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητά τους για την εκχύλιση antiradical ενώσεων. Για τα δείγματα των ροδιών από την Ερμιόνη και τα κρασιά υπολογίστηκε μόνο η ποσότητα σε

antiradical ουσίες για κάθε δείγμα ως το αντιπροσωπευτικότερο αποτέλεσμα που προκύπτει από τη δοκιμή με τη ρίζα DPPH[•].

2.7.3 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

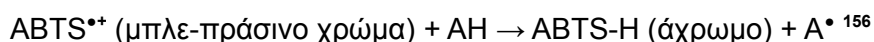
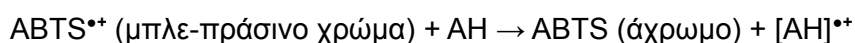
Είναι μια σχετικά πρόσφατα αναπτυσσόμενη δοκιμή από τους Miller κ.ά. (1993) στην οποία χρησιμοποιείται η ρίζα ABTS^{•+} [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβεζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] και εφαρμόζεται εξίσου σε λιπόφιλα και υδρόφιλα αντιοξειδωτικά.^{164, 165} Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την εκτίμηση της antiradical ισχύος



Σχήμα 2.7.3.1: Δομή της ρίζας ABTS^{•+} που απορροφά στα 734 nm.¹⁵⁶

διαφόρων ουσιών, μεταξύ αυτών και των φαινολικών, βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού, όπως και η δοκιμή με τη ρίζα DPPH[•], και έχει βελτιστοποιηθεί από τους Re κ.ά. το 1999.¹⁶⁵ Η μονοκατιοντική ρίζα ABTS^{•+} χρώματος μπλε-πράσινου (μέγιστο απορρόφησης στα 734 nm) σχηματίζεται άμεσα από την οξειδωση του μη ριζικού μορίου ABTS με υπερθειικό κάλιο. Παρουσία μορίων που είναι δότες υδρογόνου, η ρίζα ABTS^{•+} μειώνεται ποσοτικά ανάλογα με τη δραστηριότητα του δότη υδρογόνου, τη συγκέντρωσή του και τη διάρκεια της αντίδρασης.¹⁶⁵

Η σάρωση της ρίζας ABTS^{•+} πραγματοποιείται είτε με τη μεταφορά ενός υδρογόνου είτε με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από μια antiradical ένωση (AH).



Είναι μια γρήγορη, λειτουργικά απλή και ακριβής διαδικασία για τη συστηματική εκτίμηση της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών διάφορων εκχυλισμάτων από φυτικά υλικά και τρόφιμα που μπορεί να εφαρμοσθεί σε μεγάλη κλίμακα.^{166, 16}

Πορεία του πειράματος

Πρώτο στάδιο αποτελεί η δημιουργία της ρίζας ABTS^{•+}. Παρασκευάζεται, λοιπόν, υδατικό διάλυμα που περιέχει εν διαλύσει την ουσία ABTS συγκέντρωσης 7,00 mM και υπερθειικό νάτριο (Na₂S₂O₈) σε συγκέντρωση 2,45 mM. Το μείγμα αφήνεται 16h στο σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου. Η οξείδωση της ABTS από τα υπερθειικά ιόντα ξεκινά κατευθείαν, αλλά η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι 1,0:0,5, οπότε η οξείδωση θα είναι ατελής. Η ρίζα υπό τη μορφή του μονού κατιόντος είναι σταθερή για πάνω από 2 ημέρες αποθηκευμένη σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου.

Στην αρχή κάθε σειράς πειραμάτων, το διάλυμα της ρίζας αραιώνεται κατάλληλα με αιθανόλη ώστε να δίνει τιμή απορρόφησης $A_{734\text{nm}} \cong 0,70 \pm 0,02$. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιείται η Trolox, της οποίας παρασκευάζεται το stock αιθανολικό διάλυμα 0,006 M, και από αυτό

διαλύματα συγκεντρώσεων από 0,20 έως 1,50 mM. Τα διαλύματα της πρότυπης ουσίας πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα. Τα δείγματα των ροδιών και κρασιών αραιώνονται όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.7. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε πλαστικές κυψελίδες 15,0 μ L αραιωμένου δείγματος ή προτύπου με 1500,0 μ L αραιωμένου διαλύματος ABTS^{••} και αναδεύονται στο σκοτάδι για 1 min. Η απορρόφηση A_{734nm} μετράται μετά την πάροδο 5min. Υπολογίζεται, τέλος, μέσω “τυφλών” δειγμάτων το αρνητικό σφάλμα που προκαλείται στις τιμές της απορρόφησης από τον όγκο των διαλυτών των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά, ενώ διαφορετικές σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια ημέρα, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες.

Έκφραση των αποτελεσμάτων

Η δοκιμή της ABTS^{••} παρέχει μια εκτίμηση για τη δραστικότητα των δειγμάτων απέναντι στη συγκεκριμένη ρίζα, η οποία εκφράζεται ως συγκέντρωση αυτών σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE) μέσω της καμπύλης συσχέτισης.

2.8 Ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές συνδυασμένες με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων

Από τη μελέτη με τις φασματοφωτομετρικές δοκιμές των δειγμάτων των ροδιών από τον Βόλο, ο χυμός του ροδιού φάνηκε ως το πλουσιότερο δείγμα σε φαινολικές ουσίες (Κεφάλαιο 3, Παράγραφος 3.2.1) και το ικανότερο ως προς την ανάσχεση των ριζών DPPH[•] και ABTS^{••} (Κεφάλαιο 3, Παράγραφοι 3.2.2 και 3.3.3), άρα είναι πιθανώς το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό. Οπότε, εκτός από τα δύο είδη κρασιού, από τα δείγματα των ποικιλιών των ροδιών της Ερμιόνης επιλέχθηκε ο χυμός τους για την περαιτέρω μελέτη του φαινολικού περιεχομένου με την χρήση χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.

Η φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού της δομής και του μοριακού βάρους των οργανικών ενώσεων. Τα σημερινά μηχανήματα φασματομετρίας μαζών διαθέτουν μεγάλη διαχωριστική χρωματογραφική ικανότητα, ποικίλες τεχνικές ιοντισμού, υψηλής ποιότητας διαχωρισμό των μοριακών θραυσμάτων και ποικιλία ανιχνευτών. Η καταγραφή του φάσματος γίνεται με εξαιρετική ακρίβεια, επιδέχεται διορθώσεις και μπορεί να γίνει ταυτοποίηση της αναζητούμενης δομής από τις τεράστιες βάσεις δεδομένων.¹⁶⁷

Η φασματομετρία μάζας έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάλυση για τις δομικές μελέτες φαινολικών και πολυφαινολικών ενώσεων. Η αρχή της συνίσταται στον ιοντισμό μιας ένωσης για την παραγωγή φορτισμένου μορίου ή θραυσμάτων του αρχικού μορίου, και μέτρηση των

αναλογιών «μάζα προς φορτίο» (mass to charge, m/z) που προκύπτουν.⁸ Η αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με την τεχνική ιοντισμού της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI) χρησιμοποιείται για τη μελέτη, κυρίως, των μικρότερων φαινολικών μορίων, ενώ ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) σε συνδυασμό με την υγροχρωματογραφία επιτρέπει το χαρακτηρισμό πολυφαινολικών ενώσεων.¹³⁵

2.8.1 Ανάλυση με Αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC–MS) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων

Η αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με τη φασματομετρία μαζών είναι κατάλληλη τεχνική για μη στοχευμένη ανάλυση που προσδιορίζει ταυτόχρονα ένα μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, καθώς παρουσιάζει υψηλή ικανότητα διαχωρισμού και επαναλήψιμους χρόνους κατακράτησης με ευαισθησία στην ανίχνευση μάζας.¹⁶⁸ Στα διάφορα τρόφιμα, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε διάφορες μορφές, όπως εστέρες, γλυκοζίτες, σύμπλοκα, έτσι το προφίλ τους γίνεται αρκετά περίπλοκο για να μελετηθεί. Η υδρόλυση των φαινολικών ενώσεων και κάποιο στάδιο καθαρισμού, όπως η εκχύλιση, απλουστεύουν τη διαδικασία προσδιορισμού τους.^{169, 170, 152} Ωστόσο, καθώς οι φαινολικές ενώσεις είναι θερμικά ασταθείς στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για το διαχωρισμό τους ή καθόλου πτητικές, απαιτείται η παραγωγοποίησή τους πριν από την GC–MS ανάλυση.¹⁷¹ Συνήθως, προτιμάται η μετατροπή τους σε τριμεθυλοσιλοπαράγωγα.⁸ Για την ανίχνευση των φαινολικών, η χρήση ενός ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) είναι η πιο κοινή μέθοδος, ενώ η θραυσματοποίηση των ενώσεων στο φασματογράφο μαζών που απαιτείται για να γίνει η ταυτοποίηση των ενώσεων, προκαλείται, συνήθως, από μια δέσμη ηλεκτρονίων με ενέργεια 70 eV.^{152, 172}

2.8.1.1 Υδρόλυση των “δεσμευμένων” φαινολικών συστατικών και εκχύλισή τους

Πρώτο στάδιο της προκατεργασίας των εκχυλισμάτων από τους χυμούς ροδιού και των κρασιών ήταν η υδρόλυση, η οποία εφαρμόστηκε με διαφορετικούς τρόπους βασισμένους στη μελέτη των Ross, Beta και Arntfield (2009).¹⁶⁹ Κατά την υδρόλυση, τα “δεσμευμένα” από σάκχαρα φαινολικά μόρια απελευθερώνονται, καθώς σπάνε οι γλυκοζιτικοί δεσμοί, οπότε το μοριακό βάρος των ζητούμενων ενώσεων μειώνεται. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται εφικτή η απαραίτητη για την GC ανάλυση παραγωγοποίηση των φαινολικών ενώσεων, με σκοπό να γίνουν πτητικά, και η περαιτέρω αναγνώρισή τους μέσω της MS ανάλυσης.

Η βασική υδρόλυση έγινε με υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 4 M και

τα κομμάτια της όξινης υδρόλυσης έγιναν με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) συγκέντρωσης 3 M. Προς αποφυγή της οξειδωσης των συστατικών των δειγμάτων, οι υδρολύσεις εκτελέστηκαν παρουσία ασκορβικού οξέος (Ascorbic acid, AA) και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA). Η παραλαβή των φαινολικών ενώσεων έγινε με εκχύλιση υγρού–υγρού με το μείγμα των διαλυτών διαιθυλαιθέρα (Diethyl ether, DE) και οξικό αιθυλεστέρα (Ethyl acetate, EA) στην αναλογία 1÷1 v/v.

1) Βασική υδρόλυση (Base hydrolysis): Σε 1,5 mL εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού ή 1,5 mL κρασιού προστίθεται 1,5 mL NaOH 4 M – 2% (w/v) AA – 14 mM EDTA. Αναδεύονται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα για 5 min και αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σκότος για 16 h. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της υδρόλυσης, προστίθονται στο υδρόλυμα 2,0 mL DE-EA 1÷1 (v/v). Ακολουθεί ανάδευση για 10 min και δημιουργείται διφασικό σύστημα, όπου η άνω φάση περιέχει τα “απελευθερωμένα” φαινολικά συστατικά σε MeOH και το μείγμα DE-EA, ενώ η κάτω φάση είναι υδατική. Το σύστημα αφήνεται για 10 min σε συνθήκες ψύξης, και τέλος με πιπέττα παραλαμβάνεται η άνω φάση.

2) Όξινη υδρόλυση διαδοχική της βασικής (Acid hydrolysis sequential): Στην κάτω υδατική φάση που προέκυψε από την εκχύλιση με το μείγμα DE-EA μετά τη βασική υδρόλυση, προστίθεται 1,5 mL HCl 3 M – 1% (w/v) AA – 5 mM EDTA και αναδεύονται σε κυκλοαναδευτήρα ισχυρά για 5 min. Η υδρόλυση πραγματοποιείται σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 85°C για 1 h. Με το πέρας της διαδικασίας αυτής, προστίθονται στο υδρόλυμα 2,0 mL DE-EA 1÷1 (v/v) και γίνεται ανάδευση για 10 min. Δημιουργείται το ίδιο διφασικό σύστημα, όπως μετά τη βασική υδρόλυση, το οποίο αφήνεται για 10 min σε συνθήκες ψύξης, και με πιπέττα παραλαμβάνεται η άνω φάση με τις φαινολικές ουσίες.

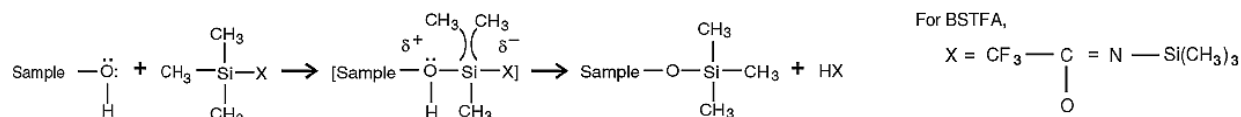
3) Όξινη υδρόλυση (Acid hydrolysis): Σε 1,0 mL εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού ή 1,0 mL κρασιού προστίθεται 1,0 mL HCl 3 M – 1% (w/v) AA – 5 mM EDTA, ακολουθεί ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 5 min και παραμονή για 1h σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 85°C. Η διαδικασία της εκχύλισης για την παραράβή των φαινολικών ακολουθείται ακριβώς όπως περιγράφηκε για τις άλλες μεθόδους υδρόλυσης.

2.8.1.2 Σιλανοποίηση των φαινολικών ενώσεων

Η σιλανοποίηση αποτελεί την ιδανική προεπεξεργασία για την GC ανάλυση μη πτητικών και θερμοασταθών ενώσεων.¹⁷³ Η αντίδραση σιλανοποίησης είναι απλή, χωρίς ανεπιθύμητα παραπροϊόντα και τα προϊόντα που παράγει είναι εξαιρετικά πτητικά.¹⁵² Τα μόρια φαινολικής φύσης είναι σχετικά δραστικά και η λειτουργική τους ομάδα, δηλαδή τα φαινολικά υδρογόνα είναι παραγωγοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο.¹⁷⁴ Κατά τη σιλανοποίηση μιας ουσίας, ένα ενεργό υδρογόνο (όπως των ομάδων -OH, -COOH, =NH, -NH₂ και -SH) αντικαθίσταται από μια ομάδα σιλυλίου, συχνότερα τριμεθυλοσιλυλίου [-Si(CH₃)₃]. Τα παράγωγα είναι γενικά λιγότερο πολικό

και θερμικώς σταθερά.¹⁷⁵ Γενικά, η δραστηριότητα των διάφορων λειτουργικών ομάδων προς σιλανοποίηση και η σταθερότητα των παραγωγοποιημένων μορίων τους ποικίλει. Η βαθμός ευκολίας και η σταθερότητα της παραγωγοποιημένης ένωσης μειώνονται με την ακόλουθη σειρά: υδροξύλιο (αλκοόλη: πρωτοταγής >δευτεροταγής >τριτοταγής) >υδροξύλιο (φαινόλη) >καρβοξυλικό οξύ >αμίνη (πρωτοταγής >δευτεροταγής) >αμίδιο.¹⁷¹

Το αντιδραστήριο σιλανοποίησης που επιλέχθηκε ήταν το N,O-δισ-(τριμεθυλ-σιλυλο)-τριφλουοακεταμίδιο [N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA] και το τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorosilane, TMCS) χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης της αντίδρασης.



Σχήμα 2.8.1.2.1: Ο μηχανισμός της αντίδρασης σιλανοποίησης με το BSTFA.¹⁷⁵

Η διαδικασία της σιλανοποίησης των υδρολυμένων φαινολικών συστατικών για κάθε δείγμα έγινε βάσει των Trigui, Hsouna, Tounsi και Jaoua (2013), ωστόσο έγιναν βελτιστοποιήσεις.¹⁷³ Συγκεκριμένα, για ~1000 µL της άνω φάσης που δημιουργήθηκε μετά από κάθε υδρόλυση σε κάθε δείγμα, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού το μείγμα των διαλυτών με αέριο άζωτο (N₂). Προστέθηκαν έπειτα, 200,0 µL του αντιδραστήριου BSTFA και 80,0 µL του καταλύτη TMCS. Αφού αναδεύτηκαν σε κυκλοαναδευτήρα, η σιλανοποίηση έλαβε χώρα σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 85°C για 45 min. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε σε όλη τη διαδικασία να αποφευχθούν συνθήκες υγρασίας που είναι καταστροφικές για τη σιλανοποίηση.

2.8.1.3 GC–MS Ανάλυση



Εικόνα 2.8.1.3.1: GCMS-QP2010 Series, Shimadzu Corporation, Japan.

Μία και μοναδική μέθοδος αναπτύχθηκε για την ανάλυση των φαινολικών ουσιών που περιέχονται στα εκχυλίσματα από χυμό ροδιού, στο κρασί ροδιού και το κόκκινο κρασί. Η GC–MS μέθοδος ανάλυσης στηρίχτηκε σε αντίστοιχες προηγούμενες αναλύσεις [Roy, Amdekar, Kumar και Singh (2011)¹⁷⁵, Chai κ.ά. (2012)¹⁷⁶, Trigui, Hsouna, Tounsi και Jaoua (2013)¹⁷³], ωστόσο η τελική της μορφή καθορίστηκε μετά από μια μακρά σειρά δοκιμών.

Η GC–MS ανάλυση των φαινολικών ενώσεων συνολικής διάρκειας 40 min έγινε στο μηχάνημα GCMS–QP2010 Series της Shimadzu (Ιαπωνία). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν DB-5 ms της Agilent Technologies, η οποία είναι λίγο πολική και χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό πολλών οργανικών ενώσεων. Ο ανιχνευτής ήταν

ιοντισμού φλόγας (FID), και ο συνδυασμένος με το GC φασματογράφος μάζας λειτουργεί με την τεχνική του ιοντισμού της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI). Ουσιαστικά, δέσμη ηλεκτρονίων ενέργειας 70 eV “χτυπά” τα μόρια των διαφορετικών ενώσεων που φθάνουν διαχωρισμένα από τη στήλη του GC. Αρχικά, δημιουργούνται θετικά ιόντα με την αφαίρεση ενός τουλάχιστον ηλεκτρονίου από το οργανικό μόριο, δηλαδή $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$. Το ιόν M^+ που παράγεται ονομάζεται μοριακό ή μητρικό ιόν, και έχει το ίδιο μοριακό βάρος με το αρχικό μόριο M. Σε δεύτερο στάδιο, τα μοριακά ιόντα υπόκεινται σε νέα διάσπαση παράγοντας θραύσματα ιόντα που είναι χαρακτηριστικά της μοριακής δομής της οργανικής ένωσης. Έχει αποδειχθεί ότι με ενέργεια ηλεκτρονίων περίπου 70 eV πραγματοποιείται συστηματική θραυσματοποίηση δεσμών του μορίου, που μπορεί να αναπαραχθεί σε σημαντικό βαθμό.¹⁶⁷ Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε με τη βοήθεια ειδικών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας (NIST05, NIST05s, NIST08, NIST08s, NIST21, NIST107, WILEY7, PMW_TOX2, SZTERP). Βάσει των φασμάτων μάζας, συγκεκριμένα βάσει των διαφορετικών θραυσμάτων m/z που παρουσιάζει κάθε κορυφή, της έντασής τους και της μεταξύ τους αναλογίας. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα 11 φαινολικών ενώσεων [2,6-δι-τριπ-βουτυλο-4-μεθυλοφαινόλη, trans-4-υδροξυκιναμικό οξύ, 3,4-διυδροξυκιναμικό οξύ, (±)-ναρινγενίνη, βανιλίνη, 2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόλη, (±)-κατεχίνη, 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ, κιναμικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και κερκετίνη] για την ταυτοποίηση των συγκεκριμένων ενώσεων εφόσον υπάρχουν στα δείγματα. Παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα για κάθε ένωση, αλλά και μείγμα αυτών, τα οποία αφού σιλιανοποιήθηκαν, αναλύθηκαν στο GC-MS. Βάσει του συγκεκριμένου χρόνου κατακράτησης (Rt) κάθε ένωσης κατά την GC ανάλυση και των χαρακτηριστικών φασμάτων μάζας έγινε σύγκριση με τα αποτελέσματα της GC-MS ανάλυσης των δειγμάτων.

Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μάζας για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό GCMS Solution Version 2.71 της Shimadzu.

Οι συγκεκριμένες συνθήκες της μεθόδου «Poms&Wines» που εφαρμόστηκε για την ανάλυση των σιλιανοποιημένων φαινολικών συστατικών από τους χυμούς των ροδιών και τα κρασιά αναγράφονται παρακάτω.

Πίνακας 2.8.1.3.1: Οι ρυθμίσεις της μεθόδου «Poms&Wines».

Θερμοκρασία φούρνου: 70,0°C	Συνολική ροή αερίου (He): 6,7 mL/min
Θερμοκρασία εισαγωγέα: 295,00°C	Ροή στήλης: 1,84 mL/min
Όγκος δείγματος: 1,0 µL	Γραμμική ταχύτητα: 49,7 cm/sec
Τρόπος ένεσης: Split	Θερμοκρασία πηγής ιόντων: 200,00°C
Αναλογία split: 1,0÷1,0	Θερμοκρασία interface: 295,00°C
Πίεση: 119,2 kPa	Εύρος m/z: [40,00–1090,00]

Πίνακας 2.8.1.3.2: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της μεθόδου «Poms&Wines».

Ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας (°C/min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	70,0	0,00
17,00	125,0	1,00
9,00	140,0	5,00
5,00	200,0	3,00
5,00	220,0	3,00
15,00	280,0	1,00
15,00	295,0	3,00

2.8.2 Ανάλυση με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Ανιχνευτή Πολλαπλών Διόδων (Photo-Diode Array, PDA) και Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MSⁿ) (HPLC–PDA–ESI–MSⁿ) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων

Για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών ενώσεων σε φρούτα προτιμώμενη μέθοδος είναι η HPLC, και συγκεκριμένα η αντίστροφης φάσης (Reversed Phase, RP).^{8, 9} Μια μικρή ποσότητα οξέος προστίθεται στο σύστημα των διαλυτών για να καταστείλει τον ιοντισμό των φαινολικών και καρβοξυλικών ομάδων, βελτιώνοντας ορισμένες παραμέτρους, όπως το χρόνο κατακράτησης.⁹ Δεδομένης της εγγενούς ύπαρξης συζευγμένων διπλών και αρωματικών δεσμών, κάθε φαινόλη παρουσιάζει υψηλότερη ή χαμηλότερη απορρόφηση στην υπέρυθρη (UV) ή την ορατή (Vis) περιοχή φάσματος.¹⁷⁴ Ο PDA είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής για το χαρακτηρισμό φαινολικών ενώσεων σε φυτικό υπόστρωμα.⁹ Τα μήκη κύματος που επιλέγονται για τον εντοπισμό των διάφορων φαινολικών ομάδων είναι 260–310 nm για το βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, τις κατεχίνες και τα στυλβένια, ~370nm για τα φλαβονοειδή και ~520 nm για τις ανθοκυανίνες.¹³⁸

Η LC–MS τεχνική αποτελεί μια από τις αποτελεσματικότερες αναλυτικές προσεγγίσεις για τη μελέτη φαινολικών. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό δίνει σημαντικές πληροφορίες για το προφίλ των πολυφαινολών σε δείγματα πολύπλοκης σύνθεσης, και ίσως το αποτελεσματικότερο εργαλείο για τη μελέτη της δομής των ανθοκυανών.⁸ Αποτελεί μια ήπια

μορφή ιοντισμού και σπάνια δημιουργεί θραύσματα ιόντων στην πηγή του φασματογράφου μάζας. Στο θετικό ιοντισμό (ESI^+), τα μόρια ιοντίζονται δια πρωτονίωσης ή με το σχηματισμό προϊόντων προσθήκης με μεταλλικά κατιόντα (Na^+ , K^+) ή τεταρτοταγή αμμωνιακά είδη. Στον αρνητικό ιοντισμό των μορίων (ESI^-) γίνεται αποπρωτονίωση και σχηματίζονται ψευδομοριακά ιόντα. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα συμβολίζεται ως $[\text{M}+\text{H}]^+$ ή $[\text{M}+\text{Na}/\text{K}]^+$ ή $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ και τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα συμβολίζεται ως $[\text{M}-\text{H}]^-$.¹⁷⁷ Με τις πολλαπλές διαδοχικές θραυσματοποιήσεις των αρχικά σχηματιζόμενων ιόντων, γίνεται εφικτός ο χαρακτηρισμός του άγλυκου τμήματος της φαινολικής ένωσης, αλλά και του σακχάρου. Συνολικά, η LC–MS ανάλυση επιτρέπει την ταυτοποίηση περίπλοκων δομών, όπως των προκυανιδινών, προανθοκυανιδινών, προδελφινιδινών και τανινών.⁸



Εικόνα 2.8.2.1: LCQ Fleet Ion Trap MSⁿ, Thermo Fisher Scientific (UK) .

Το σύστημα της HPLC–PDA–MS της Thermo Fisher Scientific που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τον αυτόματο δειγματολήπτη (Finnigan Surveyor Autosampler Plus Lite), το μηχάνημα της HPLC (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (UV Accela PDA Detector) και το φασματογράφο μάζας (LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό είναι η Hypersil Gold C_{18} αντίστροφης φάσης της Thermo Fisher Scientific.

Πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα της LC, τα εκχυλίσματα των χυμών ροδιών και τα κρασιά φιλτραρίστηκαν για την απομάκρυνση σωματιδίων. Για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων επιλέχθηκαν ως διαλύτες το ακετονιτρίλιο και το νερό με 0,5% (v/v) φορμικό οξύ.

Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε βασίστηκε στις ερευνητικές εργασίες των Garcia-Beneytez, Cabello και Revilla (2003)¹⁴¹, Gruz, Novák και Strnad (2008)¹⁷⁸ και των Sentandreu, Cerdan-Calero και Sendra (2013)¹¹⁴, και η τελική του μορφή παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.8.2.1.

Πίνακας 2.8.2.1: Πρόγραμμα διαλυτών για τη βαθμιδωτή έκλουση των φαινολικών ουσιών μέσω της HPLC και λοιπές ρυθμίσεις.

Χρόνος (min)	H_2O – 0,5% (v/v) φορμικό οξύ	ACN
0,00	95,0	5,0
2,00	93,0	7,0
4,00	91,0	9,0
6,00	88,0	12,0
8,00	85,0	15,0
9,00	84,0	16,0
10,00	83,0	17,0

11,00	82,0	18,0
12,00	82,0	18,0
13,00	70,0	30,0
14,00	60,0	40,0
15,00	50,0	50,0
17,00	50,0	50,0
17,10	0,0	100,0
23,00	0,0	100,0
23,10	95,0	5,0
29,00	95,0	5,0
Ροή διαλυτών 0,300 mL/min		Όγκος δείγματος 5,0 μ L

Η ανίχνευση με τον PDA έγινε σε εύρος 200–800 nm και σε τρία κανάλια, στα μήκη κύματος 280, 360 και 520 nm για την ξεχωριστή παρακολούθηση των ενώσεων με φαινολικό δακτύλιο, των φλαβονοειδών και ανθοκυανινών, αντίστοιχα.

Για την ταυτοποίηση των ουσιών μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης, ελλείπει πρότυπων φαινολικών ουσιών, δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες ενώσεων ήδη ευρεθέντων μέσω LC–ESI–MSⁿ ανάλυσης φαινολικών ενώσεων με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ιόντα και θραύσματα μάζας. Για τη δημιουργία των εν λόγω βιβλιοθηκών συλλέχθηκαν τα πειραματικά αποτελέσματα από μελέτες που έγιναν για την ταυτοποίηση ανθοκυανιδινικών και μη ανθοκυανιδινικών φαινολικών ενώσεων, όπως και μερικών κύριων οργανικών οξέων, σε χυμούς από ρόδι διάφορων ποικιλιών, σταφύλια, λευκά και κόκκινα κρασιά, και σε άλλα ποτά και τρόφιμα (χυμός από γκρέιπφρουτ, πράσινο τσάι, οινολάσπη από κρασί ροδιού) για να αποτυπωθεί μια πλήρης εικόνα της σύστασης υλικών που είναι συναφή με τα μελετούμενα [Sentandreu, Cerdan-Calero και Sendra (2013)¹¹⁴, Mena κ.ά. (2014)¹⁴⁷, Gómez-Caravaca κ.ά. (2013)⁹³, Garcia-Beneytez, Cabello και Revilla (2003)¹⁴¹, Acevedo De la Cruz κ.ά. (2012)¹²⁹, He κ.ά. (2012)¹³⁷, Serrano-Lourido, Saurina, Hernández-Cassou και Checa (2012)¹³⁸, Jaitz κ.ά. (2010)¹³², Liang κ.ά. (2013)¹⁷⁹, Picariello κ.ά. (2014)¹³⁶, Gruz, Novák και Strnad (2008)¹⁷⁸, Cui κ.ά. (2012)¹⁴²]. Οι μέθοδοι που κατασκευάστηκαν για την ανάλυση στο φασματογράφο μάζας στηρίχθηκαν στις συγκεκριμένες έρευνες, βελτιστοποιημένες για την επίτευξη, όσο το δυνατόν, του ιοντισμού του συνόλου των φαινολικών στα υπό μελέτη δείγματα, αλλά και για τη θραυσματοποίηση των ιόντων για την περαιτέρω MSⁿ ανάλυση. Ο ηλεκτροψεκασμός στη λειτουργία για το θετικό ιοντισμό επικεντρώθηκε στη μελέτη του προφίλ των ανθοκυανινών και για τον αρνητικό στη μελέτη των λοιπών φαινολικών ενώσεων. Η διαδοχική του ιοντισμού MSⁿ ανάλυση έγινε με διαφορετικούς τρόπους, δηλαδή με ξεχωριστές ενέσεις προς ανάλυση για κάθε δείγμα, ώστε να μπορέσει να γίνει η σύγκριση των φασμάτων μάζας με τα δεδομένα της δημιουργηθείσας βιβλιοθήκης. Ειδικότερα, η πολλαπλή θραυσματοποίηση των θετικών και αρνητικών ιόντων συνέβη με την εφαρμογή διαφορετικών ενεργειών πρόσκρουσης ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα προς σύγκριση μοτίβα θραυσμάτων m/z. Οι συνθήκες που ορίστηκαν για το σύνολο

των MS αναλύσεων αναγράφονται στον Πίνακα 2.8.2.2.

Πίνακας 2.8.2.2: Συνθήκες που ορίστηκαν για το θετικό (ESI⁺) και αρνητικό (ESI⁻) ιοντισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων και για την ύστερη θραυσματοποίησή τους.

Ρυθμίσεις MS	Θετικός ιοντισμός (ESI ⁺)	Αρνητικός ιοντισμός (ESI ⁻)
Τάση πηγής (kV)	3,5	4,0
Τάση τριχοειδούς σωλήνα (V)	9	-18
Θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα (°C)	300	300
Ροή αερίου περιβλήματος (αυθαίρετες μονάδες)	50	50
Ροή αερίου σαρώσεως (αυθαίρετες μονάδες)	20	20
Πλήρης μέγιστος χρόνος ιόντων (ms)	300	300
Αριθμός μικροσαρώσεων	3	3
	MSⁿ	MSⁿ
Τύπος ανάλυσης	Ανάλυση δεδομένων εξαρτώμενη από τη σάρωση	Ανάλυση δεδομένων εξαρτώμενη από τη σάρωση
Ενέργεια πρόσκρουσης των MS ⁿ (αυθαίρετες μονάδες)	15, 17, 25, 30, 35	15, 25, 30, 35
Εύρος απόρριψης αναλογίας μάζα προς φορτίο (m/z)	1	1
Αριθμός επανάληψης μετρήματος	2	2
Διάρκεια επανάληψης (min)	0,5	0,5
Μέγεθος λίστας απόρριψης	25	25
Διάρκεια απόκλισης (min)	1,00	1,00
Εύρος απόκλισης μαζών	3,00	3,00
Εύρος m/z	260,0 – 1.000,0	100,0 – 1.600,0

Η επεξεργασία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων από το LC–MS έγινε με το λογισμικό Xcalibur Version 2.1 της Thermo Scientific.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



3.1 Εκτίμηση των γενικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

3.1.1 Μέτρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά [το ύψος (απόσταση μεταξύ των δύο πόλων, εκτός του κάλυκα), η διάμετρος του ισημερινού των καρπών], το βάρος κάθε καρπού, το βάρος του χυμού και των σπερμάτων επί το βάρος των καρπιδίων (αριλίων) επί τοις εκατό] των διαφορετικών ποικιλιών ροδιών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1.1.

Πίνακας 3.1.1.1: Μέσοι όροι των τιμών για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ροδιών. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=80 στις τιμές του ύψους, της διαμέτρου και του βάρους του καρπού και n=10 στα επί τοις εκατό ποσοστά)

Ποικιλία ροδιών	Ύψος (mm)	Διάμετρος (mm)	Βάρος καρπού (g)	Χυμός ροδιού % των καρπιδίων (w/w)	Σπέρματα % των καρπιδίων (w/w)
«Wonderful» Βόλου	76,7 $\pm$ 3,5a	84,2 $\pm$ 3,7a	308,40 $\pm$ 29,12a	75,50 $\pm$ 1,39a	24,50 $\pm$ 1,39a
«Περσεφόνη» Ερμιόνης	72,3 $\pm$ 2,9a	79,7 $\pm$ 2,3a	285,33 $\pm$ 44,42a	74,77 $\pm$ 1,30a	25,23 $\pm$ 1,30a
«Πορφυρογέννητη» Ερμιόνης	78,4 $\pm$ 3,4a	85,5 $\pm$ 2,8a	309,33 $\pm$ 25,76a	75,68 $\pm$ 1,45a	24,32 $\pm$ 1,45a
«Wonderful» Ερμιόνης	81,1 $\pm$ 3,9a	86,2 $\pm$ 3,7a	322,33 $\pm$ 27,48a	76,21 $\pm$ 0,99a	23,79 $\pm$ 0,99a

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p<0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.1.1.1, οι καρποί των ροδιών που προήλθαν από την ποικιλία «Wonderful» από την περιοχή του Βόλου και οι καρποί των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη δεν παρουσίασαν σημαντικές ($p>0,05$) διαφορές στις τιμές των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους (ύψος και διάμετρος καρπού), όπως και στο βάρος του καρπού. Παρομοίως, μη σημαντικές ($p>0,05$) διαφορές υπήρχαν ανάμεσα στις ποικιλίες στα αποτελέσματα από τον υπολογισμό των επί τοις εκατό κατά βάρος ποσοστών του χυμού που παράγεται ανά καρπό στο σύνολο των καρπιδίων, και του βάρους των σπερμάτων που απομένουν μετά την παραγωγή του χυμού επί του βάρους των καρπιδίων.

3.1.2 Προσδιορισμός της υγρασίας στα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης

Η υγρασία επί τοις εκατό των καρπιδίων και των σπερμάτων της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο, όπως και των χυμών που εξήχθησαν από τα ρόδια κάθε ποικιλίας ξεχωριστά υπολογίστηκε μέσω της λυοφιλοποίησης που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.5 του Κεφαλαίου 2.

Πίνακας 3.1.2.1: Υγρασία και ξηρό υπόλειμμα εκφρασμένα επί τοις εκατό (w/w) στη νωπή ύλη των καρπιδίων, του χυμού και των σπερμάτων της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, και των χυμών από τις ποικιλίες «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=10)

Δείγμα	% Υγρασία (w/w)	% Ξηρό υπόλειμμα (w/w)
Καρπίδια «Wonderful» Βόλου	75,89 $\pm$ 0,56a	24,11 $\pm$ 0,56a
Χυμός «Wonderful» Βόλου	84,45 $\pm$ 0,97b	15,55 $\pm$ 0,97b
Σπέρματα «Wonderful» Βόλου	56,14 $\pm$ 1,43c	43,86 $\pm$ 1,43c
Χυμός «Περσεφόνη» Ερμιόνης	83,12 $\pm$ 0,99b	16,88 $\pm$ 0,99b
Χυμός «Πορφυρογέννητη» Ερμιόνης	88,80 $\pm$ 1,65d	13,20 $\pm$ 1,65d
Χυμός «Wonderful» Ερμιόνης	85,33 $\pm$ 1,21b	14,67 $\pm$ 1,21b

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p<0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Η υγρασία που περιείχαν οι χυμοί από ρόδια των ποικιλιών από τον Βόλο και την Ερμιόνη κυμάνθηκε σε υψηλά ποσοστά όπως αναμενόταν, από 84,45 έως 88,80% (w/w), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1.2.1. Ο χυμός της ποικιλίας «Πορφυρογέννητη» παρουσίασε το υψηλότερο ($p<0,05$) ποσοστό υγρασίας που ήταν 88,80 $\pm$ 1,65 % υγρασία (w/w). Τα καρπίδια της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο βρέθηκε να περιέχουν 75,89 $\pm$ 0,56% υγρασία (w/w), ενώ τα σπέρματα αποτελούνταν κατά το ήμισυ περίπου από νερό [56,14 $\pm$ 1,43% υγρασία (w/w)].

3.2 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις στα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων

Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες των εκχυλισμάτων των ροδιών και των δειγμάτων κρασιών προσδιορίστηκε μέσω της χρωματομετρικής τεχνικής φασματοφωτομετρίας Folin–Ciocalteu. Η ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών από τις περιεχόμενες στα δείγματα ουσίες μελετήθηκε με δύο διαφορετικές ρίζες (DPPH $^{\bullet}$ και ABTS $^{•+}$) και σε σύγκριση με πρότυπες αντιοξειδωτικές ενώσεις, ώστε να γίνει μια αρχική εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης

των δειγμάτων.

Για όλες τις μετρήσεις, υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) σε κάθε δείγμα. Οι τιμές επεξεργάστηκαν στατιστικά (δοκιμή t) με το υπολογιστικό πρόγραμμα στατιστικής SPSS v.10.0.

3.2.1 Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στα υπό μελέτη δείγματα περιγράφεται στην Παράγραφο 2.7.1. Μια αντιπροσωπευτική καμπύλη συσχέτισης της πρότυπης ένωσης του γαλλικού οξέος παρατίθεται στο Παράρτημα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ικανοποιητική ($R > 0,95$).

Πίνακας 3.2.1.1: Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά g ξηρού δείγματος και ανά 100 mL χυμού ή κρασιού των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των κρασιών. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=10)

Δείγμα	mg GAE/g ξηρού δείγματος	mg GAE/100 mL
Aril.CL.Wf	5,66 $\pm$ 0,27a	–
Aril.US.Wf	4,92 $\pm$ 0,30b	–
Juice.CL.Wf	12,01 $\pm$ 0,13c	200,74 $\pm$ 2,18a
Juice.US.Wf	11,50 $\pm$ 0,22d	172,51 $\pm$ 3,35b
Seed.CL.Wf	2,85 $\pm$ 0,13e	–
Seed.US.Wf	3,34 $\pm$ 0,26f	–
Juice.Ps	11,48 $\pm$ 0,53d	188,36 $\pm$ 5,75c
Juice.Pg	13,13 $\pm$ 0,47g	215,45 $\pm$ 2,40d
Juice.Wf	12,66 $\pm$ 0,55c,g	207,64 $\pm$ 3,16e
Pom.Wine	Δ.Π.	383,19 $\pm$ 18,22f
Red.Wine	Δ.Π.	296,57 $\pm$ 25,23g

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$)

για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Δ.Π.: Δεν προσδιορίστηκε.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.1.1, ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόστηκε σε κάθε είδος δείγματος των ροδιών από τον Βόλο της ποικιλίας «Wonderful», τα σπέρματα των αριλίων (Seed.CL.Wf, Seed.US.Wf) περιείχαν τη μικρότερη ($p < 0,05$) ποσότητα φαινολικών

συστατικών ανά g ξηρού δείγματος ($2,85 \pm 0,13$ και $3,34 \pm 0,26$ mg GAE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα) συγκριτικά με τα αρίλια (Aril.CL.Wf, Aril.US.Wf) και το χυμό ροδιού (Juice.CL.Wf, Juice.US.Wf), ο οποίος παρουσίασε τη μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά μεταξύ των δειγμάτων (αρίλια, χυμός ροδιού, σπέρματα) από τα ρόδια του Βόλου ($12,01 \pm 0,13$ και $11,50 \pm 0,22$ mg GAE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα).

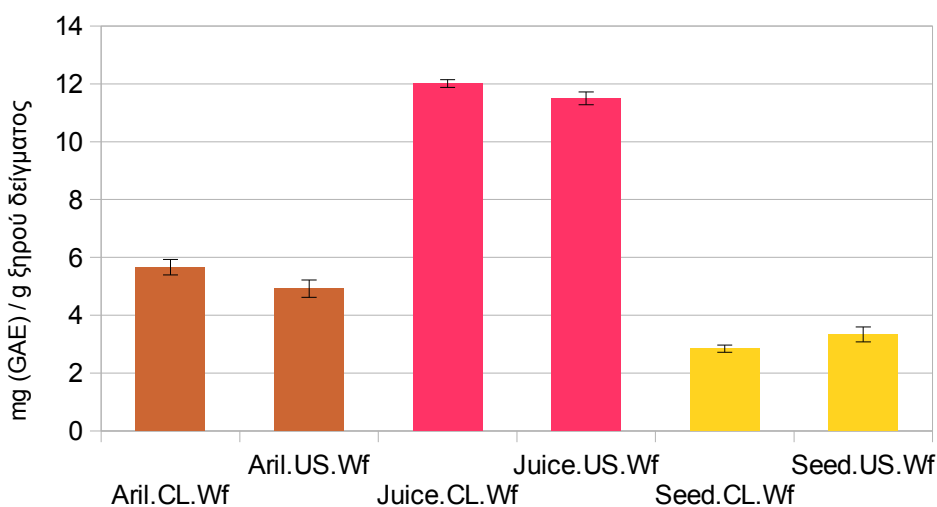
Από τους χυμούς ροδιού των διαφορετικών ποικιλιών από τον Βόλο (Juice.US.Wf) και την Ερμιόνη (Juice.Ps, Juice.Pg, Juice.Wf) των οποίων τα φαινολικά συστατικά εκχυλίσθηκαν με την UAE, ο χυμός της «Περσεφόνης» και ο χυμός της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο φάνηκε να έχουν τη χαμηλότερη ($p < 0,05$) περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες ανά g ξηρού δείγματος ($11,48 \pm 0,53$ και $11,50 \pm 0,22$ mg GAE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα) συγκριτικά με τους χυμούς των υπόλοιπων ποικιλιών. Οι χυμοί από τις ποικιλίες «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη φάνηκαν να είναι πλουσιότεροι ($p < 0,05$) σε φαινολικές ουσίες με συγκέντρωση $13,13 \pm 0,47$ και $12,66 \pm 0,55$ mg GAE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα. Οι διαφορές στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων μεταξύ των μελετούμενων εκχυλισμάτων από χυμούς από ρόδι είναι αναμενόμενες μεταξύ των ροδιών που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες και δεδομένου ότι διαφέρουν ως προς τις γεωργικές πρακτικές, τις περιοχές καλλιέργειας, την εποχή συγκομιδής των καρπών, το στάδιο ωρίμανσης των καρπών, τις κλιματικές συνθήκες και τις συνθήκες αποθήκευσης των ροδιών μετά τη συγκομιδή.^{126, 41, 180, 181, 158, 182, 183, 166, 70} Όσον αφορά τις διαφορετικές ποικιλίες από την Ερμιόνη, τα ρόδια των οποίων καλλιεργήθηκαν στην ίδια περιοχή με τις ίδιες συνθήκες και πρακτικές, ο βασικός παράγοντας που διαφοροποιεί το φαινολικό περιεχόμενό τους είναι η ποικιλία. Όπως έχει επισημανθεί σε αντίστοιχες μελέτες, είναι το διαφορετικό γενετικό υλικό που οδηγεί ουσιαστικά την κάθε ποικιλία σε διαφορετικά μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού για τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων.^{184, 37} Εντούτοις, οι χυμοί από τα ρόδια των ποικιλιών «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» δε φάνηκαν να διαφέρουν σημαντικά ($p > 0,05$) ως προς τη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.1.1, μεταξύ όλων των ποτών που μελετήθηκαν (χυμοί από τις διαφορετικές ποικιλίες ροδιών και οίνοι) και βάσει των υπολογισμών κατ' όγκο για κάθε ποτό, η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερη στα κρασιά. Ιδιαίτερα, το κρασί από ρόδι ($383,19 \pm 18,22$ mg GAE/100 mL) παρουσίασε μεγαλύτερη ($p < 0,05$) περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες από το κόκκινο κρασί ($296,57 \pm 25,23$ mg GAE/100 mL), αλλά και από τους χυμούς ροδιού από τις διάφορες ποικιλίες του Βόλου και της Ερμιόνης, η συγκέντρωση σε φαινολικά των οποίων κυμάνθηκε από $172,51 \pm 3,35$ έως $215,45 \pm 2,40$ mg GAE/100 mL. Αναλυτικότερα, όσον αφορά τα εκχυλίσματα των φαινολικών ενώσεων που παρελήφθησαν με UAE από τους χυμούς των αριλίων, η κατά φθίνουσα σειρά των συγκεντρώσεων σε φαινολικά συστατικά ήταν η εξής: Juice.Pg ($215,45 \pm 2,40$ mg GAE/100 mL) > Juice.Wf ($207,64 \pm 3,16$ mg GAE/100 mL) > Juice.Ps ($188,36 \pm 5,75$ mg GAE/100 mL) >

Juice.US.Wf ($172,51 \pm 3,35$ mg GAE/100 mL).

Στα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.1.1, παρατηρείται ότι οι τιμές των συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των χυμών από ρόδι των διαφορετικών ποικιλιών, που εκφράζονται σε ξηρή βάση (mg GAE/g ξηρού δείγματος), δε συμπίπτουν όσον αφορά τις σημαντικές διαφορές με τις αντίστοιχες τιμές που είναι εκφρασμένες σε νωπή βάση (mg GAE/100 mL χυμού). Συγκεκριμένα, οι τιμές των συγκεντρώσεων σε mg GAE/g ξηρού δείγματος για τα δείγματα Juice.US.Wf και Juice.Ps δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) μεταξύ τους, όπως επίσης και για τα δείγματα Juice.Pg και Juice.Wf. Αντιθέτως, όλα τα δείγματα των χυμών (Juice.CL.Wf, Juice.US.Wf, Juice.Ps, Juice.Pg και Juice.Wf) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) ως προς τις τιμές των συγκεντρώσεων εκφρασμένων σε mg GAE/100 mL χυμού. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο ότι καθεμία ποικιλία ροδιού έχει διαφορετική επί τοις εκατό υγρασία (w/w), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.2.1, κατά συνέπεια οι τιμές των συγκεντρώσεων σε φαινολικές ενώσεις που εκφράζονται σε mg GAE/100 mL χυμού επηρεάζονται αναλόγως. Η παραπάνω συγκριτική μελέτη επί νωπού και ξηρού τροφίμου κρίθηκε αναγκαία για τη διατροφική αξιολόγηση του χυμού ροδιού.

Δοκιμή Folin-Ciocalteu



Σχήμα 3.2.1.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.

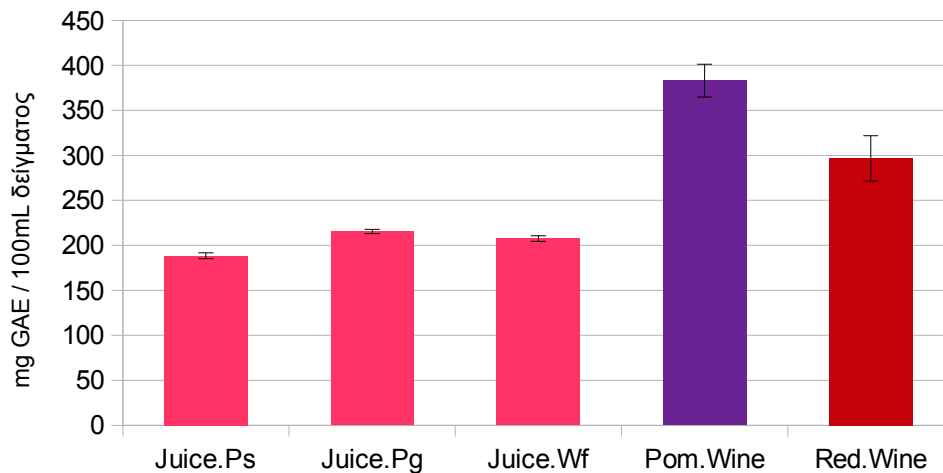
Με βάση το Σχήμα 3.2.1.1 και τον Πίνακα 3.2.1.1., με την κλασική μέθοδο εκχύλισης (CL) φάνηκε να παραλαμβάνεται μεγαλύτερη ($p < 0,05$) ποσότητα φαινολικών ουσιών από τα αρίλια και το χυμό των ροδιών σε σύγκριση με την τεχνική εκχύλισης με υπέρηχους (US). Αντιθέτως, περισσότερα ($p < 0,05$) φαινολικά συστατικά των σπερμάτων φάνηκε να εκχυλίζονται εφαρμόζοντας την τεχνική εκχύλισης με υπέρηχους.

Ο Quanjuan κ.ά. (2013)¹⁵³ που συνέκριναν τις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης αναφέρουν πως η εφαρμογή των υπερήχων ουσιαστικά “τραυματίζει” τα κύτταρα του φυτικού υλικού και δημιουργεί ένα μεγάλο αριθμό “λακκών” στα κυτταρικά τοιχώματα. Καθώς αλλάζει η δομή της επιφάνειας του υλικού, γίνεται ευκολότερη η διείσδυση του διαλύτη εκχύλισης σε αυτό, το περιεχόμενο διαχέεται και είναι πιθανότερο έτσι να εκχυλισθεί. Επιπρόσθετα, οι υπέρηχοι επιταχύνουν την κίνηση των μορίων, φέρνοντας γρήγορα σε επαφή τα μόρια του διαλύτη με αυτά του υλικού. Συγκριτικά, λοιπόν, με την κλασική μέθοδο εκχύλισης όπου απλά γίνεται διαβροχή του υλικού με το διαλύτη και ανάδευση, το ποσοστό και ο ρυθμός μεταφοράς μάζας των επιθυμητών προς εκχύλιση ενώσεων με την τεχνική των υπερήχων είναι σημαντικά αυξημένοι. Η UAE θεωρείται, λόγω των προαναφερθέντων, αποτελεσματικότερη και πλεονεκτεί σε σχέση με την κλασική μέθοδο αφού είναι ταχύτερη.¹⁵³

Στην παρούσα μελέτη, η θεωρία του Quanjuan κ.ά. (2013)¹⁵³ φαίνεται να επιβεβαιώνεται μόνο στην περίπτωση των εκχυλισμάτων που παρελήφθησαν από τα σπέρματα του καρπού των ροδιών, ενώ αντίθετως οι τιμές της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών στα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν από τα καρπίδια και τους χυμούς καταδεικνύουν την απλή κλασική μέθοδο εκχύλισης ως αποτελεσματικότερη. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από το ότι τα σπέρματα μετά τη λυοφιλοποίηση παρέμειναν σε σχετικά μεγάλου μεγέθους συμπαγή κομμάτια τα οποία δεν ήταν δυνατό να κονιορτοποιηθούν πλήρως για να υποβληθούν σε εκχύλιση, σε αντίθεση με τα λυοφιλοποιημένα αρίλια και τους χυμούς που ήταν σε μορφή σκόνης στο μεγαλύτερο μέρος της μάζας τους. Για τα δείγματα των αρίλιων και των χυμών, φάνηκε πως η διαβροχή, η ανάμειξη με το διαλύτη εκχύλισης και η παραμονή σε αυτόν για 24 h αρκούσαν για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών τους σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους υπέρηχους. Στην περίπτωση των σπερμάτων, όπου η διάρρηξη των κυττάρων ήταν πιθανώς περισσότερο απαραίτητη για την έκλυση των φαινολικών ουσιών από το φυτικό υλικό, οι υπέρηχοι έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα.

Εντούτοις, για τα δείγματα των χυμών από ρόδι η διαφορά στην ποσότητα του φαινολικού περιεχομένου που κατάφερε να εκχυλισθεί με τις δύο μεθόδους, αν και στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$), δεν ήταν ποσοστιαία μεγάλη. Συγκεκριμένα, μέσω της κλασικής μεθόδου εκχυλίσθηκε μόνο κατά 4,43% (w/w) μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων, όπως συμπεραίνεται από τον Πίνακα 3.2.1.1. Εφόσον, επίσης, η UAE διαρκεί μόλις 15 min, εκτιμήθηκε πως είναι συμφέρουσα και προτιμήθηκε για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα των χυμών από τα ρόδια της Ερμιόνης που ακολούθησε στην πορεία της πειραματικής μελέτης.

Δοκιμή Folin-Ciocalteu



Σχήμα 3.2.1.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τους χυμούς των ροδιών των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης, του κρασιού από ρόδι και του κόκκινου κρασιού, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος ανά 100 mL δείγματος.

Το φαινολικό περιεχόμενο των χυμών από ρόδι για τις ποικιλίες «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη βρέθηκε $188,36 \pm 5,75$, $215,45 \pm 2,40$ και $207,64 \pm 3,16$ mg GAE/100 mL, αντίστοιχα, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.1.1. Οι τιμές αυτές είναι στα πλαίσια του εύρους αντίστοιχων τιμών για χυμούς ροδιού που έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες, όπως παραδείγματος χάριν 260,2–1008,6 mg GAE/100 mL σε χυμούς του εμπορίου,¹¹⁹ 30,3–132,8 mg GAE/100 mL σε χυμούς από ρόδι διαφορετικών ποικιλιών στην Ιταλία,³⁴ 33.93–350.06 mg GAE/100 mL σε χυμούς από διάφορες ποικιλίες καλλιεργούμενες στην Τυνησία,^{41, 166} 289–450 mg GAE/100 mL σε χυμούς από ποικιλίες ροδιάς στη Νότια Αφρική,¹¹⁵ 237,6–985.32 mg GAE/100 mL σε χυμούς από 28 διαφορετικές ποικιλίες του Ιράν, όπως μελετήθηκαν συνολικά σε δύο ερευνητικές εργασίες,^{185, 184} 67,6–128,0 mg GAE/100 mL σε χυμούς ροδιού από χιλιανές ποικιλίες,¹⁸³ 27.25–84.94 mg GAE/100 mL σε χυμούς ροδιού από ποικιλίες ροδιάς στη Γεωργία,¹⁵⁹ 150–450 mg GAE/100 mL σε χυμούς από ισπανικές ποικιλίες ροδιάς,¹⁸⁶ 757,30–841,30 mg GAE/100 mL σε χυμούς από διάφορες γλυκιές και ξινές ποικιλίες ροδιών από την Κίνα,¹²⁶ 174,2 mg GAE/100 mL σε χυμό ροδιού τούρκικης ποικιλίας,¹⁸⁷ και 160–370 mg GAE/100 mL σε χυμούς από ρόδια αρχαίων ποικιλιών της *Punica granatum* L.¹⁸⁸ Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης σε φαινολικά συστατικά στις μελέτες αυτές και σε σύγκριση με την παρούσα μελέτη οφείλονται, κυρίως, στις διαφορές που παρουσιάζουν οι καρποί των ροδιών των διαφορετικών ποικιλιών, περιοχών καλλιέργειας κ.λπ., όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως. Επιπρόσθετα, ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η παραγωγή του χυμού, δηλαδή

εάν η χυμοποίηση γίνεται μόνο από τα αρίλια ή συμπεριλαμβάνει τη σύνθλιψη του μεσοκάρπιου και της φλούδας του καρπού, παίζει σημαντικό ρόλο στα φαινολικά συστατικά που αυτός θα περιέχει τελικά. Σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών, όταν ολόκληρο το φρούτο συνθλίβεται για την παραγωγή του χυμού, όπως συμβαίνει συνήθως στις βιομηχανίες παραγωγής φρουτοχυμών, οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στη φλούδα και το μεσοκάρπιο του ροδιού, κυρίως οι τανίνες μεγάλου μοριακού βάρους και φλαβονοειδή, εκχυλίζονται και περνούν στο χυμό.^{76, 119, 158, 95, 77, 147} Ο χυμός παρουσιάζει έτσι μεγαλύτερο και περισσότερο ποικίλο φαινολικό περιεχόμενο.

Πρέπει, ακόμα, να σημειωθεί πως στην παρούσα ερευνητική εργασία, ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu, όπως και οι υπόλοιποι προσδιορισμοί με τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους, έγιναν στα μεθανολικά διαλύματα των φαινολικών συστατικών που εκχυλίσθηκαν με τη βοήθεια των υπερήχων από τους χυμούς ροδιού των τριών ποικιλιών από την Ερμιόνη. Ανάλογα με τον πειραματικό σχεδιασμό κάθε μελέτης που αναφέρεται βιβλιογραφικά, οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί έχουν πραγματοποιηθεί είτε απευθείας σε χυμό από ρόδι είτε σε εκχυλίσματα φαινολικών ουσιών που μπορεί να έχουν παραληφθεί με διαφορετικούς τρόπους (διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, διαλύτες ή μείγματα διαλυτών εκχύλισης, συνθήκες κατά την εκχύλιση) κατά περίπτωση.

Οι χυμοί από ρόδι που μελετήθηκαν φαίνεται, επίσης, να υπερτερούν στην περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά συγκριτικά με διάφορους χυμούς από εσπεριδοειδή, όπως μανταρίνια, γλυκά πορτοκάλια, λεμόνια, γκρέιπφρουτ και κινέζικο γκρέιπφρουτ, που έχει αναφερθεί ότι περιέχουν από $75,18 \pm 1,33$ έως $155,55 \pm 1,86$ mg GAE/100 mL.¹⁷²

Η περιεκτικότητα του ροδιού, όπως και του χυμού από ρόδι, σε φαινολικές ενώσεις αποτελεί μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την αξιολόγηση των διαφορετικών ποικιλιών ροδιάς σε σχέση με διατροφική αξία τους, αλλά και την ενδεχόμενη χρήση των ροδιών για διάφορους σκοπούς.⁴¹ Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.1 και σε σύγκριση με αντίστοιχα αποτελέσματα από προηγούμενες έρευνες σε διαφορετικά τρόφιμα όπως προαναφέρονται, συμπεραίνεται πως οι χυμοί από ρόδι των μελετούμενων ποικιλιών («Wonderful» από τον Βόλο, και «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη) φαίνεται να αποτελούν ιδιαιτέρως πλούσια πηγή σε φαινολικά συστατικά και θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής με πολλαπλά οφέλη για την υγεία. Τα καρπίδια του ροδιού από την ποικιλία «Wonderful» από τον Βόλο φαίνεται να είναι επίσης πλούσια σε φαινολικά συστατικά, ενώ τα σπέρματα, που συνήθως απορρίπτονται ως απόβλητα των βιομηχανιών παραγωγής χυμού από ρόδι, θα μπορούσαν πιθανώς να αποτελέσουν μια φυσική πηγή φαινολικών ενώσεων με ενδεχόμενες φαρμακευτικές και ιατρικές εφαρμογές.

Όσον αφορά τα δείγματα των κρασιών και σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.1.1 και το Σχήμα 3.2.1.2, το κρασί από ρόδι φάνηκε να διαφέρει σημαντικά ($p > 0,05$) από το κόκκινο κρασί των σταφυλιών

ως προς την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις. Για το κρασί από ρόδι βρέθηκε η συγκέντρωση $383,19 \pm 18,22$ mg GAE/100 mL και για το κόκκινο κρασί από σταφύλια $296,57 \pm 25,23$ mg GAE/100 mL. Όπως παρουσιάζεται γραφικά στο Σχήμα 3.2.1.2, το κρασί από ρόδι περιείχε σχεδόν διπλάσια ($p > 0,05$) φαινολικά συστατικά σε σχέση με τους χυμούς από τα ρόδια των ποικιλιών της Ερμιόνης που μελετήθηκαν με τη δοκιμή Folin–Ciocalteu.

Για την περίπτωση του προσδιορισμού της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε οίνους με το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu, έχει αναφερθεί ότι τα θειώδη και το διοξείδιο του θείου που περιέχονται στον οίνο αυξάνουν τη δραστηριότητα των φαινολικών ουσιών ως προς το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu, ή ακόμα αντιδρούν τα ίδια με αυτό όπως και οι φαινολικές ενώσεις.¹⁸⁹ Ως εκ τούτου, θεωρείται πιθανό να υπάρξει θετικό σφάλμα στην τιμή της συγκέντρωσης σε φαινολικές ουσίες όπως υπολογίζεται από τη συγκεκριμένη μέθοδο, καθώς το SO₂ όχι μόνο προστίθεται συχνά σε οίνους ως συντηρητικό, αλλά παράγεται επίσης μια μικρή ποσότητα αυτού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Εντούτοις, εάν τα θειώδη περιέχονται στους οίνους για ικανό χρονικό διάστημα, απαντώνται κυρίως σε συζευγμένες μορφές με άλλα μόρια, και συμμετέχουν στην αντίδραση Folin–Ciocalteu σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό.¹⁸⁹

Παρόλο που στους υπό μελέτη οίνους δεν είχαν προστεθεί θειώδη σε πρόσφατο χρόνο προτού προσδιορισθεί η περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu, είναι πιθανό ποσότητα ελεύθερου ή δεσμευμένου θειώδους να δημιούργησε θετικό σφάλμα στις τιμές της συγκέντρωσης σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος, όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.1.1 και το Σχήμα 3.2.1.2. Ωστόσο, στον οίνο από ρόδι και στον ερυθρό οίνο από σταφύλια που μελετήθηκαν είχε προστεθεί η ίδια ποσότητα θειώδους στο οινοποιείο όπου παρήχθησαν, οπότε θα παρουσιάζουν το ίδιο σφάλμα στην τιμή της συγκέντρωσης σε φαινολικές ενώσεις. Συνεπώς, είναι δυνατή η μεταξύ τους σύγκριση, αλλά πιθανώς να μην είναι ορθή η σύγκριση μεταξύ των οίνων και των χυμών από ρόδι όσον αφορά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη δοκιμή Folin–Ciocalteu.

Παρόμοιες με την παρούσα μελέτες προσδιορισμού της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών σε οίνους, όπως αυτή των Rupasinghe και Clegg (2007)¹⁹⁰ που προσδιόρισαν ποσοτικά το φαινολικό περιεχόμενο οίνων από διαφορετικά φρούτα, αναφέρουν ότι η συγκέντρωση και η σύσταση των φαινολικών στα κρασιά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του φρούτου που χρησιμοποιείται, αλλά και από τη μέθοδο οινοποίησης. Λεπτομερώς, οι τιμές της συγκέντρωσης των φαινολικών που αναφέρουν είναι 200,5 mg GAE/100 mL για κόκκινο κρασί Cabernet, 175,3 mg GAE/100 mL για κρασί από σαμπούκο, 167,6 mg GAE/100 mL για κρασί από μύρτιλο, 150,9 mg GAE/100 mL για κρασί από φραγκοστάφυλο, 99,1 mg GAE/100 mL για κρασί από κεράσι, 97,7 mg GAE/100 mL για κρασί από σμέουρο, 97,1 mg GAE/100 mL για κρασί από κράνμπερι, 55,5 mg GAE/100 mL για κρασί από δαμάσκηνο, 45,1 mg GAE/100 mL για κρασί από μήλο, 41,8 mg GAE/100 mL για κρασί από ροδάκινο, 49,3 mg GAE/100 mL για κρασί από σταφύλια Icewine, 28,7 mg GAE/100 mL για λευκό κρασί Chardonnay, 31,0 mg

GAE/100 mL για κρασί από αχλάδι, και 25,0 mg GAE/100 mL για κρασί από σταφύλια Riesling.¹⁹⁰ Συγκέντρωση 491,14±4,81 mg GAE/100 mL των φαινολικών που περιέχονται σε κρασί από ρόδι δίνουν οι Zhuang, Du και Wang (2011).¹²⁶

Σε μια διαφορετική έρευνα, αναφέρεται πως το φαινολικό περιεχόμενο οίνων από την Κροατία που μελετήθηκαν κυμάνθηκε για τους λευκούς οίνους από 19,1 έως 65,2 mg GAE/100 mL, ενώ για τους ερυθρούς οίνους το εύρος των αντίστοιχων τιμών ήταν από 115,6 έως 261,9 mg GAE/100 mL.¹³³ Οι ερυθροί οίνοι παρουσιάζονται ιδιαιτέρως πλούσιοι σε φαινολικά συστατικά σε μια ακόμα μελέτη, όπου οι λευκοί οίνοι από την Αργεντινή και την Ιταλία περιείχαν 21,6–85,4 mg GAE/100 mL, ένας ροζέ ιταλικός οίνος περιείχε 130,4 mg GAE/100 mL, τέλος, συγκεντρώσεις από 161,5 έως 417,7 mg GAE/100 mL είχαν διάφορα δείγματα ερυθρών οίνων από τη Βραζιλία, τη Χιλή, την Πορτογαλία και την Ιταλία.¹⁹¹ Οι διαφορές αυτές εξηγούνται από το γεγονός ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις ποικίλει μεταξύ των οίνων ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση, την ποικιλία των σταφυλιών και το είδος του κρασιού.¹³³ Επίσης, ο τρόπος οινοποίησης, η διαδικασία και ο χρόνος ωρίμανσης του κρασιού, αλλά και τα δοχεία όπου αυτό φυλάσσεται (ειδικώς στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται δρύινα βαρέλια) επηρεάζουν σημαντικά την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που τελικά θα βρίσκονται στο κρασί.¹⁶⁰

Συμπερασματικά, βρέθηκε πως το κρασί από ρόδι και το κόκκινο κρασί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία περιέχουν σημαντικά ($p<0,05$) μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών ουσιών ανά μονάδα όγκου σε σύγκριση με κάποιες προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες, με εξαίρεση μια αναφορά για κρασί από ρόδι (491,14±4,81 mg GAE/100 mL)¹²⁶, αλλά και κάποια κόκκινα κρασιά των οποίων η συγκέντρωση σε φαινολικά έφθανε τα 417,7 mg GAE/100 mL.¹⁹¹ Συμπερασματικά, το κρασί από ρόδι φάνηκε να είναι ένα προϊόν εξαιρετικά πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, άρα ωφέλιμο για την ανθρώπινη υγεία, και καθώς δεν έχει υψηλούς αλκοολικούς βαθμούς (11,50% vol.), θα μπορούσε να αποτελέσει κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής.

Η μέθοδος Folin–Ciocalteu, εκτός από το ότι είναι ως διαδικασία εύκολη στην εφαρμογή και μη χρονοβόρα για τον προσδιορισμό της ποσότητας των φαινολικών συστατικών στα υπό μελέτη δείγματα, τα αποτελέσματα που εξάγονται από αυτήν αποτελούν σημαντική ένδειξη για την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων.⁵⁴ Όταν, λοιπόν, πρόκειται να μελετηθεί η antiradical ή η αντιοξειδωτική ισχύς σε οποιοδήποτε δείγμα ο προσδιορισμός του φαινολικού περιεχομένου του, η μέθοδος Folin–Ciocalteu χρησιμεύει ως ένας προκαταρκτικός έλεγχος, και συνήθως μπορεί να συνδεθεί άμεσα και με σχέση ανάλογων ποσών με την ικανότητά του ως αντιοξειδωτικό. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εν λόγω μέθοδο για τα υπό μελέτη δείγματα μπορούν να εκτιμηθούν συνολικά με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από μεθόδους προσδιορισμού της antiradical ικανότητας των δειγμάτων, όπως είναι οι δοκιμές με τις ρίζες DPPH• και ABTS••.

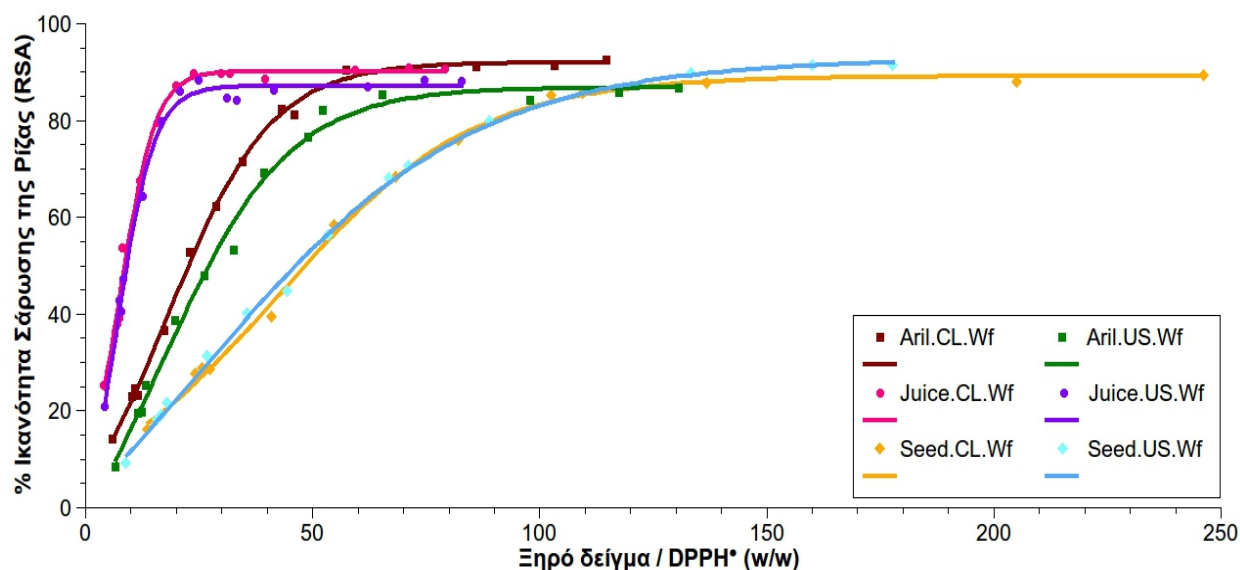
3.2.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων

Στην Παράγραφο 2.7.2 (Κεφάλαιο 2) περιγράφεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για να μελετηθούν τα συστατικά των εκχυλισμάτων των ροδιών, αλλά και τα κρασιά, ως προς την antiradical τους ικανότητα έναντι της ρίζας DPPH•, και ως εκ τούτου να δοθεί μια εκτίμηση για την πιθανή αντιοξειδωτική τους δράση. Εκτός από τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε antiradical ουσίες, συγκριτικά με μια πρότυπη ένωση για κάθε δείγμα, για τα δείγματα των ροδιών του Βόλου έγινε εκτενής μελέτη της antiradical ικανότητας των καρπιδιών, του χυμού και των σπερμάτων, ώστε να γίνει η επιλογή του καταλληλότερου από τα τρία για περαιτέρω έρευνα. Παράλληλα, έγινε σύγκριση μιας κλασικής μεθόδου εκχύλισης με την εκχύλιση με υπέρηχους. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίσθηκαν η Ικανότητα Σάρωσης της Ρίζας (Radical Scavenging Activity, RSA) επί τοις εκατό. Ακολούθως, για κάθε δείγμα ξεχωριστά, οι τιμές της %RSA συναρτήσκει της κατά βάρος αναλογίας «ξηρό δείγμα/DPPH•» τοποθετήθηκαν σε γράφημα, και σιγμοειδείς συναρτήσεις Boltzmann $\{y=A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + \exp[(x - x_0)/dx])\}$ προσαρμόσθηκαν στα δεδομένα. Μέσω των γραφημάτων αυτών, βρέθηκε η τιμή της Ικανής (Απαραίτητης) Συγκέντρωσης EC₅₀ (Efficient Concentration), δηλαδή η ποσότητα δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική απορρόφηση του διαλύματος της ρίζας (και άρα η συγκέντρωσή του) κατά 50%. Η EC₅₀ εκφράσθηκε σε μονάδες mg και αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη ποσότητα (g) της ρίζας DPPH•. Η Ισχύς ενάντια στις ρίζες (ARP), σε μονάδες mg⁻¹ επίσης, υπολογίσθηκε από τον τύπο $ARP=1/EC_{50}$. Προσδιορίσθηκε, επίσης, ο T_{EC50} (min) που είναι ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση του plateau στην EC₅₀. Επιπλέον, από τον τύπο $AE=1/(EC_{50} \times T_{EC50})$, υπολογίσθηκε η Ικανότητα ενάντια στις ρίζες (Antiradical Efficiency) εκφρασμένη σε g⁻¹·min⁻¹, για κάθε δείγμα. Για τις εξειδικευμένες αυτές εκφράσεις της antiradical δράσης, ισχύουν ότι όσο χαμηλότερη η τιμή της EC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η antiradical δράση του δείγματος, ενώ υψηλές τιμές των ARP και AE καταδεικνύουν την ισχυρή δραστηριότητα ενός δείγματος έναντι της ρίζας DPPH•.

Μια αντιπροσωπευτική καμπύλη συσχέτισης της πρότυπης ένωσης του L-ασκορβικού οξέος παρατίθεται στο Παράρτημα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ικανοποιητική (R>0,95).

Σημειώνεται πως η θερμοκρασία κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών με την ελεύθερη ρίζα DPPH• ήταν ~18°C.

Δοκιμή DPPH•



Σχήμα 3.2.2.1: Συγκριτικό γράφημα της επί τοις εκατό Ικανότητας Σάρωσης της Ρίζας DPPH• (Radical Scavenging Activity, RSA) από τα συστατικά που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, συναρτήσει της αναλογίας «ξηρό δείγμα/DPPH•» κατά βάρος. ($\theta \cong 18^{\circ}\text{C}$)

Τα διαφορετικά σημεία των σιγμοειδών συναρτήσεων Boltzmann που έχουν κατασκευασθεί στο Σχήμα 3.2.2.1 αντιπροσωπεύουν τα επί τοις εκατό ποσοστά συγκεκριμένης ποσότητας της ρίζας DPPH• που μπορεί να σαρωθεί από συγκεκριμένη ποσότητα κάθε δείγματος που μελετάται. Το σημείο σε κάθε καμπύλη που αντιστοιχεί στο %RSA=50 δηλώνει την απαραίτητη ποσότητα που απαιτείται για κάθε δείγμα ώστε να γίνει ανάσχεση της μισής από την αρχική ποσότητα της ρίζας DPPH•. Όσο μικρότερη είναι η ποσότητα που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση στην ρίζας κατά 50%, δηλαδή όσο χαμηλότερη η EC_{50} (η κατά βάρος αναλογία «ξηρό δείγμα/DPPH•» που αντιστοιχεί σε %RSA=50 για συγκεκριμένη αρχική ποσότητα της ρίζας) τόσο ισχυρότερο antiradical για την DPPH• θεωρείται το δείγμα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και βάσει του Σχήματος 3.2.2.1, τα εκχυλίσματα από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο επέδειξαν τη μεγαλύτερη ικανότητα σάρωσης της ρίζας DPPH•, ακολουθούμενα από τα εκχυλίσματα των αριλίων, ενώ τα εκχυλίσματα από τα σπέρματα των ροδιών φάνηκαν να περιέχουν τις λιγότερο ισχυρές antiradical ενώσεις. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν προς τα αποτελέσματα που εξήχθησαν μέσω της Folin–Ciocalteu (Πίνακας 3.2.1.1), καθώς τα εκχυλίσματα των χυμών που φάνηκαν να έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα φαινολικών είναι και τα ικανότερα προς σάρωση της ρίζας DPPH•, ενώ τα εκχυλίσματα από τα σπέρματα των αριλίων με τη χαμηλότερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών φαίνονται να έχουν τη χαμηλότερη antiradical ικανότητα.

Λοιπά εξαγόμενα από τις παραπάνω καμπύλες (Σχήμα 3.2.2.1) για κάθε δείγμα που

μελετήθηκε συγκεντρώνονται στον Πίνακα 3.2.2.1.

Πίνακας 3.2.2.1: Τιμές της Ικανής Συγκέντρωσης EC_{50} (Efficient Concentration) εκφρασμένης σε mg για συγκεκριμένη ποσότητα DPPH[•], της κατά βάρος αναλογίας «ξηρό δείγμα/DPPH[•]» όπου παρατηρείται η EC_{50} , της Ισχύος ενάντια στις ρίζες (Antiradical Power, ARP) εκφρασμένης σε mg^{-1} και της Ικανότητας ενάντια στις ρίζες (Antiradical Efficiency, AE) εκφρασμένης σε $g^{-1} \cdot min^{-1}$ για τα δείγματα των ροδιών του Βόλου. (Μέσος όρος $\pm$ SD, n=10)

Δείγμα	EC_{50} (mg) για 1500 μ L DPPH [•] 100 μ M	Ξηρό δείγμα/DPPH [•] (w/w) για EC_{50}	ARP (mg^{-1})	AE ($g^{-1} \cdot min^{-1}$)
Aril.CL.Wf	1,32 $\pm$ 0,04a	22,36 $\pm$ 0,60a	0,76 $\pm$ 0,02a	4,19 $\pm$ 0,11a
Aril.US.Wf	1,61 $\pm$ 0,04b	27,29 $\pm$ 0,62b	0,62 $\pm$ 0,01b	4,43 $\pm$ 0,10b
Juice.CL.Wf	0,50 $\pm$ 0,01c	8,62 $\pm$ 0,11c	1,96 $\pm$ 0,03c	13,08 $\pm$ 0,17c
Juice.US.Wf	0,55 $\pm$ 0,01d	9,28 $\pm$ 0,15d	1,82 $\pm$ 0,03d	15,18 $\pm$ 0,25d
Seed.CL.Wf	2,94 $\pm$ 0,06e	49,53 $\pm$ 1,02e	0,32 $\pm$ 0,01e	1,87 $\pm$ 0,04e
Seed.US.Wf	2,79 $\pm$ 0,06f	47,17 $\pm$ 1,03f	0,36 $\pm$ 0,01f	1,99 $\pm$ 0,04f

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$)

για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Δ.Π.: Δεν προσδιορίστηκε.

Στον Πίνακα 3.2.2.1 αναγράφονται οι τιμές της EC_{50} για τα διαφορετικά εγχυλίσματα από τα αρίλια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο που βρέθηκαν μέσω των σιγμοειδών καμπυλών Boltzmann του Σχήματος 3.2.2.1, δηλαδή η ποσότητα εκφρασμένη σε mg που απαιτήθηκε για να μειωθεί η συγκέντρωση της DPPH[•] στο μισό της αρχικής. Επίσης, για κάθε δείγμα βρέθηκε η αναλογία κατά βάρος «ξηρό δείγμα/DPPH[•]», όπου όταν αυτή ικανοποιείται παρατηρείται σάρωση της ρίζας κατά 50%. Τέλος, υπολογίσθηκε η ισχύς ενάντια στις ρίζες (ARP) που είναι η αντιστρόφως ανάλογη έκφραση της EC_{50} , δηλαδή όσο υψηλότερη η τιμή της τόσο μεγαλύτερη και η ικανότητα για αρωση της ρίζας, και υπολογίσθηκε η ικανότητα ενάντια στις ρίζες (AE) για κάθε εγχύλισμα, η έκφραση της οποίας περιέχει και το χρόνο που χρειάστηκε για να φθάσει το κάθε εξεταζόμενο δείγμα στο plateau του χρόνου και να ολοκληρωθεί η αντίδραση αυτού με τη ρίζα. Οπότε, στην τιμή της antiradical ικανότητας εσωκλείεται το μέγεθος της antiradical ισχύος, αλλά ταυτόχρονα εκφράζει το πόσο γρήγορα καταφέρνει να αντιδράσει κάθε δείγμα με τη ρίζα DPPH[•] πλήρως. Ισχύει πάλι, ότι μεγάλη τιμή της antiradical ικανότητας σημαίνει έντονη δραστηριότητα έναντι της ρίζας.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.2.2.1, για τα μεγέθη EC_{50} , «ξηρό δείγμα/DPPH[•]» (w/w) για την επίτευξη της EC_{50} και ARP, η κατά φθίνουσα σειρά δραστηριότητας κατά της ρίζας για τα εγχυλίσματα των δειγμάτων υπό μελέτη έχει ως εξής: Juice.CL.Wf > Juice.US.Wf > Aril.CL.Wf

>Aril.US.Wf >Seed.US.Wf >Seed.CL.Wf. Η σειρά αυτή είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που πορέκυψαν από τη μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης φαινολικών Folin–Ciocalteu. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα που φάνηκαν να έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικές ουσίες εμφανίστηκαν αναλογικά ως ισχυρότερα για τη σάρωση της ρίζας DPPH*, ενώ τα εκχυλίσματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά φάνηκαν αντίστοιχα να έχουν τη μικρότερη antiradical δράση.

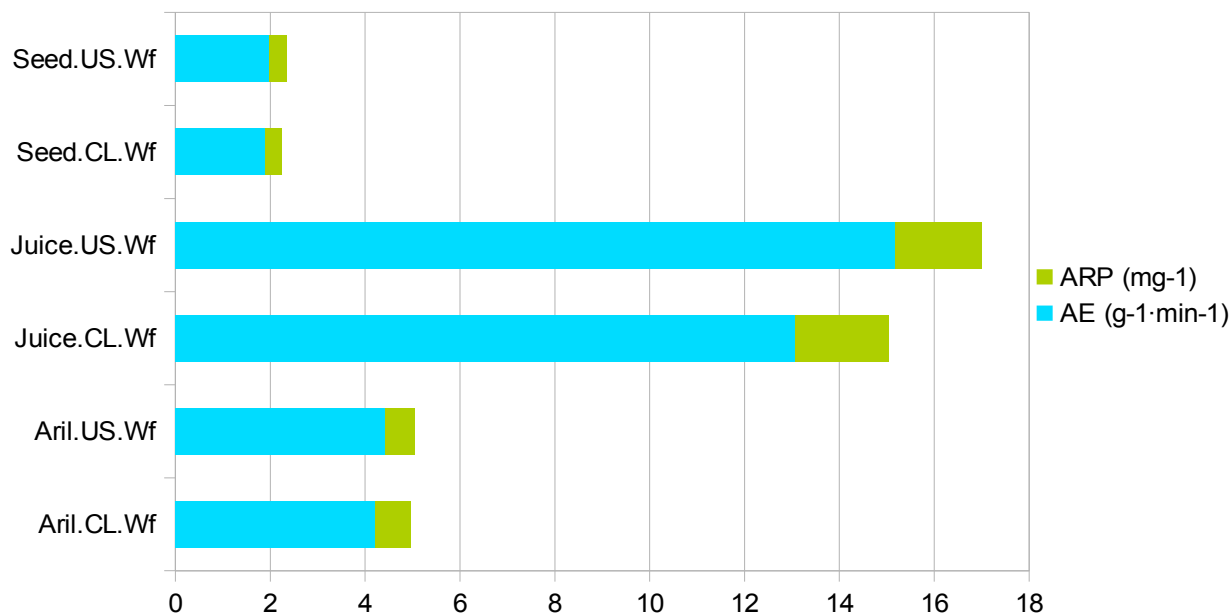
Οι τιμές της antiradical ικανότητας (AE) δεν ταξινομούν τα δείγματα κατά την ίδια ακριβώς σειρά. Τα εκχυλίσματα από τους χυμούς υπερισχύουν και πάλι εκείνων των αριλίων, ενώ τα εκχυλίσματα των σπερμάτων έπονται τελευταία. Η ανάμειξη, όμως, του χρόνου στην έκφραση της AE έχει ως αποτέλεσμα τα εκχυλίσματα από τα αρίλια, τους χυμούς και τα σπέρματα των ροδιών που παρελήφθησαν με τη βοήθεια των υπερήχων να δείχνουν μεγαλύτερη antiradical ικανότητα έναντι εκείνων που παρελήφθησαν με την κλασική μέθοδο εκχύλισης. Συνεπώς, η ταξινόμηση κατά φθίνουσα σειρά για τις τιμές της AE έχει ως εξής: Juice.US.Wf > Juice.CL.Wf > Aril.US.Wf > Aril.CL.Wf > Seed.US.Wf > Seed.CL.Wf. Η διαφορά που παρατηρείται στις τιμές της AE οφείλεται σαφώς στην εμπλοκή του χρόνου στους υπολογισμούς.

Ουσιαστικά, φαίνεται πως τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν από το χυμό και τα αρίλια των ροδιών μέσω της κλασικής μεθόδου αν και πλουσιότερα σε φαινολικά συστατικά και παράλληλα με μεγαλύτερη antiradical ισχύ, χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθεί η αντίδρασή τους με τη ρίζα DPPH*, σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν από το χυμό και τα αρίλια με την UAE. Καθώς είναι σαφές πως το αποτέλεσμα αυτό δε σχετίζεται με την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα, είναι πιθανότερο να υπάρχουν διαφορές στη σύσταση των φαινολικών που εκχυλίζονται με τους υπέρηχους σε σχέση με την κλασική μέθοδο εκχύλισης.

Είναι πιθανό τα εκχυλίσματα Juice.US.Wf και Aril.US.Wf να έχουν διαφορετική σύσταση σε φαινολικές ενώσεις από τα Juice.CL.Wf και Aril.CL.Wf, αντίστοιχα, λόγω των διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης που εφαρμόστηκαν. Παραδείγματα αντίστοιχων περιπτώσεων έχουν ήδη αναφερθεί σε μελέτες σε διάφορες μήτρες.¹⁹² Οπότε, τα φαινολικά των εκχυλισμάτων Juice.US.Wf και Aril.US.Wf θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν γρηγορότερα των Juice.CL.Wf και Aril.CL.Wf, αντίστοιχα, αν και λιγότερα αποτελεσματικά στη σάρωση της ρίζας DPPH*. Μια εναλλακτική εξήγηση πιθανώς να είναι ότι παρόλο που με την UAE επιτυγχάνεται σε μικρότερο ποσοστό η έκλυση των φαινολικών από το χυμό και τα αρίλια σε σχέση με την κλασική μέθοδο, και εάν τα φαινολικά είναι ίδια σε ποιότητα, οι υπέρηχοι πιθανώς να προκαλούν την υδροξυλίωση κάποιων φλαβονοειδών ενισχύοντας την antiradical δράση τους ή ακόμα μπορεί να συμβάλουν στη σταθεροποίηση κάποιων ενώσεων με πιθανή antiradical δράση.^{193, 1} Επιπλέον, τα κύματα των υπερήχων ίσως να προκαλούν τη διάσπαση μερικών από τους δεσμούς μεταξύ των μορίων των σακχάρων και των φαινολικών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των άγλυκων μορφών των φαινολικών, τα οποία επιδεικνύουν συχνά

διαφορετική antiradical και αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τις γλυκοζυλιωμένες μορφές.¹⁹⁴ Συνεπώς, θα ήταν πιθανό, σε αυτήν την περίπτωση, οι μη συζευγμένες μορφές των φαινολικών ενώσεων να αντιδρούν γρηγορότερα, αλλά όχι σε υψηλότερο ποσοστό, με την DPPH•.

Δοκιμή DPPH•



Σχήμα 3.2.2.2: Συγκριτικό γράφημα της Ισχύος ενάντια στις ρίζες (Antiradical Power, ARP) εκφρασμένης σε mg^{-1} και της Ικανότητας ενάντια στις ρίζες (Antiradical Efficiency, AE) σε $\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ που επέδειξαν έναντι της ρίζας DPPH• τα διαφορετικών μεθόδων εκχυλίσματα από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου. ($\theta \cong 18^\circ\text{C}$)

Πίνακας 3.2.2.2: Συγκέντρωση των antiradical ενώσεων εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) ανά g ξηρού δείγματος και ανά 100 mL χυμού ή κρασιού των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των κρασιών. (Μέσος όρος $\pm$ SE, n=10)

Δείγμα	mg AAE/g ξηρού δείγματος	mg AAE/100 mL
Aril.CL.Wf	4,60 $\pm$ 0,28a	—
Aril.US.Wf	3,90 $\pm$ 0,36b	—
Juice.CL.Wf	13,80 $\pm$ 0,79c	231,64 $\pm$ 13,23a
Juice.US.Wf	12,27 $\pm$ 0,69d,h,i	184,07 $\pm$ 10,37b,c,d
Seed.CL.Wf	2,30 $\pm$ 0,16e	—
Seed.US.Wf	2,74 $\pm$ 0,21f	—
Juice.Ps	10,87 $\pm$ 0,15g	178,46 $\pm$ 2,49c

Juice.Pg	12,03±0,25h	197,33±4,11d
Juice.Wf	11,50±0,21i	188,67±3,51b
Pom.Wine	Δ.Π.	82,65±0,59e
Red.Wine	Δ.Π.	78,18±0,66f

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p<0,05$)

για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Δ.Π.: Δεν προσδιορίστηκε.

Στον Πίνακα 3.2.2.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις σε antiradical και εν δυνάμει αντιοξειδωτικές ενώσεις των δειγμάτων όπως προσδιορίστηκαν μέσω της δοκιμής με τη ρίζα DPPH*, οι οποίες αντανakλούν την ικανότητα των δειγμάτων προς σάρωση της συγκεκριμένης ελεύθερης ρίζας. Παρόλο που οι όροι “antiradical” (δραστικός ενάντια στις ρίζες) και “αντιοξειδωτικός” διαχωρίζονται σημασιολογικά, η antiradical δράση που επιδεικνύει μια ένωση ή ένα δείγμα προς μια ελεύθερη ρίζα *in vitro* αποτελεί, στις περισσότερες των περιπτώσεων, ένδειξη για αντιοξειδωτική δράση *in vivo*, σε κάποιο τρόφιμο ή ζωντανό οργανισμό, που είναι και το ζητούμενο.¹⁵⁶

Από τα δείγματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο, τα εκχυλίσματα των χυμών (Juice.CL.Wf, Juice.US.Wf) φάνηκε να περιέχουν τη μεγαλύτερη ($p<0,05$) ποσότητα antiradical ουσιών σε ισοδύναμα του L-ασκορβικού οξέος (AAE) ανά g ξηρού δείγματος, ακολούθως με μικρότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση εμφανίζονται τα εκχυλίσματα από τα αρίλια, ενώ τα εκχυλίσματα των σπερμάτων είχαν τη μικρότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, αφού βάσει την αποτελεσμάτων της Folin–Ciocalteu ο χυμός από ρόδι φάνηκε να έχει σχεδόν διπλάσια ($p<0,05$) και τετραπλάσια ($p<0,05$) συγκέντρωση σε φαινολικές ουσίες από τα αρίλια και τα σπέρματα των αριλίων, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2.1.1).

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.2.2, εμφανίζονται μερικές στατιστικά σημαντικές ($p<0,05$) διαφορές μεταξύ των τιμών της συγκέντρωσης σε mg AAE/g ξηρού δείγματος των εκχυλισμάτων από τους χυμούς «Wonderful» από τον Βόλο και εκείνων για τα εκχυλίσματα από τους χυμούς των ποικιλιών της Ερμιόνης. Οι συγκεντρώσεις σε AAE για τα εκχυλίσματα των φαινολικών ουσιών που εκχυλίστηκαν με UAE από τους χυμούς των οικιλιών του Βόλου και της Ερμιόνης κυμάνθηκαν από 12,27±0,69 έως 10,87±0,15 mg AAE/g ξηρού δείγματος.

Σύμφωνα με μελέτες, η antiradical και αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η γεωγραφική τοποθεσία, οι καλλιεργητικές τεχνικές, και ειδικότερα το γενετικό υλικό κάθε φυτού. Έχει αποδειχθεί ότι όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών ειδών φυτών, αλλά και των διαφορετικών ποικιλιών του ίδιου είδους, παρουσιάζονται διακυμάνσεις το προφίλ των αντιοξειδωτικών.^{195, 41} Κατά συνέπεια, είναι φυσιολογικό οι διαφορετικές ποικιλίες ροδιών της *Punica granatum* L. που έχουν καλλιεργηθεί σε διαφορετικές περιοχές και με διαφορετικές πιθανώς καλλιεργητικές τεχνικές να μην παρουσιάζουν την ίδια

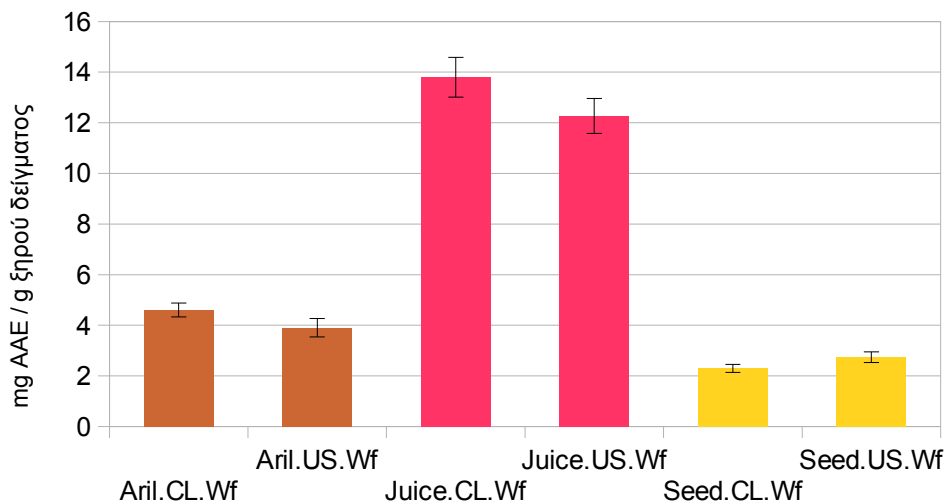
εικόνα σε μια μέθοδο εκτίμησης της antiradical ικανότητας, όπως είναι η δοκιμή με τη ρίζα DPPH•.

Όσον αφορά ξεχωριστά τις ποικιλίες της Ερμιόνης, η «Πορφυρογέννητη» που ήταν πλουσιότερη ($p<0,05$) σε φαινολικό περιεχόμενο (Πίνακας 3.2.1.1) φάνηκε να έχει μεγαλύτερη ($p<0,05$) περιεκτικότητα σε antiradical ενώσεις (Πίνακας 3.2.2.2), ενώ η «Περσεφόνη» με τη χαμηλότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση σε φαινολικά φάνηκε να έχει μικρότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση σε ΑΑΕ.

Συγκρίνοντας τα ποτά (χυμοί από τα ρόδια των ποικιλιών από τον Βόλο και την Ερμιόνη, και οίνοι) που μελετήθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε ισοδύναμα του L-ασκορβικού οξέος, ο οίνος από ρόδι ($82,65\pm0,59$ mg ΑΑΕ/100 mL) και ο ερυθρός οίνος ($78,18\pm0,66$ mg ΑΑΕ/100 mL) εμφάνισαν μικρότερες ($p<0,05$) τιμές σε σχέση με τους χυμούς ροδιού. Όπως φαίνεται από τους Πίνακες 3.2.1.1 και 3.2.2.2, παρόλο που τα δύο είδη κρασιού είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες ($p<0,05$) συγκριτικά με τους χυμούς από ρόδι, επέδειξαν σαφώς χαμηλότερη ($p<0,05$) antiradical ικανότητα για την DPPH• μέσω του προσδιορισμού της συγκέντρωσής τους σε ΑΑΕ.

Η δυσαναλογία που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε antiradical ουσίες στα δείγματα των οίνων, πιθανώς να οφείλεται στο σφάλμα που προκαλεί η παρουσία του θειώδους στους οίνους, καθώς αυτό αντιδρά με το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu, όπως προαναφέρθηκε. Κατά συνέπεια, είναι πιθανόν ο οίνος από ρόδι και ο ερυθρός οίνος να περιέχουν μικρότερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων από αυτήν που προσδιορίσθηκε. Εντούτοις, είναι εξίσου πιθανό οι χυμοί των ροδιών εάν και λιγότερο πλούσιοι σε φαινολικές ουσίες συγκριτικά με τους οίνους, να περιέχουν ενώσεις με μεγαλύτερη ισχύ ανάσχεσης της ρίζας DPPH• ή/και να δημιουργούνται συνεργιστικά φαινόμενα μεταξύ τους ή με άλλες ενώσεις που περιέχονται στο χυμό (π.χ. ασκορβικό οξύ), έχοντας ως αποτέλεσμα οι χυμοί να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ισοδύναμα του L-ασκορβικού οξέος με τη δοκιμή DPPH• σε σχέση με τους οίνους.

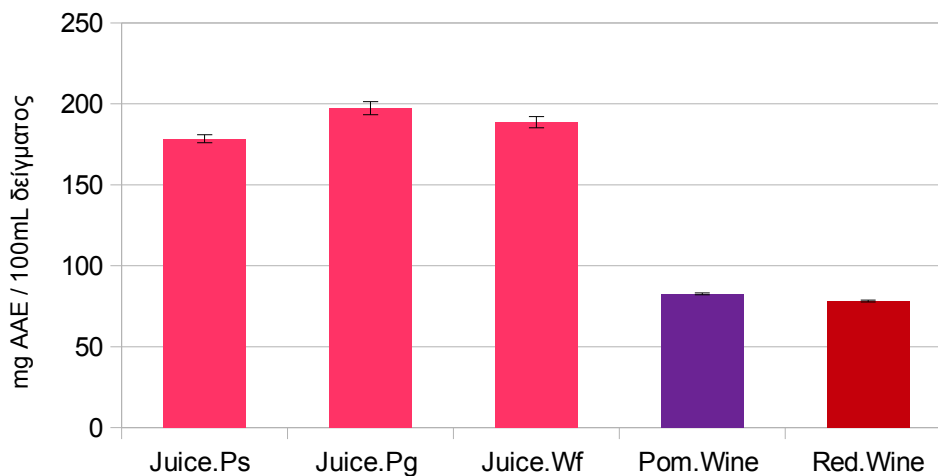
Δοκιμή DPPH•



Σχήμα 3.2.2.3: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) ανά g ξηρού δείγματος. ($\theta \cong 18^{\circ}\text{C}$)

Από το Σχήμα 3.2.2.3 και τα δεδομένα του Πίνακα 3.2.2.2, είναι εμφανές ότι η εφαρμογή της κλασικής μεθόδου εκχύλισης οδήγησε στην παραλαβή εκχυλισμάτων από τα αρίλια και τους χυμούς των ροδιών που φαίνεται να είναι πλουσιότερα σε ενώσεις με antiradical δράση προς την DPPH•, σε σύγκριση με την τεχνική εκχύλισης των φαινολικών συστατικών με υπέρηχους. Το αντίστροφο ισχύει για τα δείγματα των σπερμάτων από τα ρόδια, για τους ίδιους πιθανώς λόγους που αναφέρονται στην Παράγραφο 3.2.1, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα των δύο μεθόδων να εκχυλίσουν το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων. Συνοπτικά, τα εκχυλίσματα από κάθε είδος δείγματος με τη μεγαλύτερη ($p<0,05$) συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά (Aril.CL.Wf, Juice.CL.Wf και Seed.US.Wf) παρουσίασαν, επίσης, υψηλότερες ($p<0,05$) τιμές στη συγκέντρωση ισοδύναμων του L-ασκορβικού οξέος. Άρα, η δοκιμή με τη ρίζα DPPH• υποδεικνύει την κλασική μέθοδο αποτελεσματικότερη από την UAE στην εκχύλιση antiradical και εν δυνάμει αντιοξειδωτικών ουσιών από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα των χυμών από ρόδι. Στην περίπτωση της εκχύλισης των φαινολικών από τα σπέρματα των ροδιών, τα οποία δεν είναι δυνατόν να κονιορτοποιηθούν πλήρως, μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH• η UAE φαίνεται να αποδίδει κατά 12,61% περισσότερο συγκριτικά με την κλασική μέθοδο.

Δοκιμή DPPH•



Σχήμα 3.2.2.4: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών των εκχυλισμάτων από τους χυμούς των ροδιών των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης, του κρασιού από ρόδι και του κόκκινου κρασιού, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalents, AAE) ανά 100 mL δείγματος. ($\theta \cong 18^\circ\text{C}$)

Με βάση τον Πίνακα 3.2.2.2 και το Σχήμα 3.2.2.4 διαπιστώνεται πως τα εκχυλίσματα των φαινολικών ουσιών από τους χυμούς των ποικιλιών της Ερμιόνης και τα δύο είδη οίνων διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) ως προς την περιεκτικότητα σε antiradical και πιθανά αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η «Πορφυρογέννητη» φαίνεται να περιέχει το μεγαλύτερο ($p < 0,05$) ποσοστό AAE ($197,33 \pm 4,11$ mg AAE/100 mL) μεταξύ όλων των δειγμάτων, ακολουθεί η «Wonderful» ($188,67 \pm 3,51$ mg AAE/100 mL), ενώ η ποικιλία «Περσεφόνη» διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τα υπόλοιπα δείγματα με $178,46 \pm 2,49$ mg AAE/100 mL. Το κρασί από ρόδι παρουσίασε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε AAE με $82,65 \pm 0,59$ mg AAE/100 mL και το κόκκινο κρασί με $78,18 \pm 0,66$ mg AAE/100 mL.

Η αντιοξειδωτική και άρα η antiradical ικανότητα πολλών φρούτων και χυμών, μεταξύ αυτών και του χυμού από ρόδι, φαίνεται πως σχετίζεται άμεσα με την παρουσία των φαινολικών ενώσεων σε αυτά.³⁰ Συγκεκριμένα, για το χυμό ροδιού, η αντιοξειδωτική δράση έχει θεωρηθεί πως οφείλεται κυρίως στις υδρολυόμενες τανίνες συμπεριλαμβανομένων των πουνικαλαγινών, αλλά και οι ανθοκυανίνες και τα παράγωγα του ελλαγικού οξέος έχει αποδειχθεί πως συνεισφέρουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση.⁷⁶ Τα ισομερή της πουνικαλαγίνης έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για περίπου τη μισή ή και ακόμα $>90\%$ της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των χυμών από ρόδι, εάν και σύμφωνα με κάποιες μελέτες, θεωρείται πως παρά τις αποδεδειγμένα σημαντικές βιολογικές τους δράσεις και τα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, δε συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική δυναμική των προϊόντων από ρόδι.^{68, 102} Άλλα φαινολικά συστατικά των

χυμών ροδιού, όπως μερικά φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, το ελλαγικό, το γαλλαγικό οξύ και η πουνικαλίνη επιδεικνύουν, επίσης, αντιοξειδωτική ικανότητα.^{68, 75} Εντούτοις, δεν είναι δυνατό να αποκλεισθούν λοιπές ενώσεις, όπως οργανικά οξέα, πρωτεΐνες κ.ά., οι οποίες μπορεί να συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική δράση.⁶⁸ Περαιτέρω, υπάρχει το ενδεχόμενο φαινομένων συνεργίας μεταξύ των διαφορετικών φαινολικών ενώσεων, γεγονός που θα εξηγούσε την υψηλή antiradical και αντιοξειδωτική ικανότητα των χυμών που παράγονται από ρόδια.^{68, 85}

Σύμφωνα με τα ευρήματα ποικίλων μελετών σε χυμούς από ρόδι, ο τρόπος της χυμοποίησης θεωρείται καθοριστικός για την antiradical και αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού προϊόντος, καθώς η δραστηριότητα των χυμών που παράγονται μόνο από τα αρίλια είναι αρκετά χαμηλότερη της αντίστοιχης για τους χυμούς που παράγονται και από τη φλούδα και το μεσοκάρπιο των ροδιών, καθώς αυτά περιέχουν μεγάλες ποσότητες πουνικαλαγινών και άλλων antiradical ενώσεων που συμμετέχουν ενεργά στην αντιοξειδωτική δράση.^{76, 119, 158} Οπότε, οι χυμοί στους οποίους έχουν εκχυλισθεί επιπρόσθετα οι βιοενεργές ενώσεις της φλούδας μπορεί να παρουσιάσουν μέχρι και 20 ή 40 φορές μεγαλύτερη ικανότητα σάρωσης των ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια αναστολής της οξειδωσης σε διάφορα συστήματα.^{196, 30, 146}

Ακόμα, όπως στην περίπτωση του προσδιορισμού της συγκέντρωσης σε φαινολικά συστατικά σε χυμούς από ρόδι, είναι αναμενόμενο οι χυμοί που παράγονται από διαφορετικές ποικιλίες να παρουσιάζουν διαφορές και στο προφίλ της antiradical τους δράσης.^{195, 41}

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, μολονότι οι χυμοί από ρόδι παρήχθησαν μόνο από τα αρίλια, φαίνεται πως τα μεθανολικά τους εκχυλίσματα έχουν εξαιρετικά υψηλή ικανότητα σάρωσης της ρίζας DPPH*, και μάλιστα για τις δύο εκ των ποικιλιών από την Ερμιόνη η ικανότητα αυτή είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των δύο ειδών κρασιού που μελετήθηκαν. Είναι επόμενο να θεωρήσουμε τους χυμούς από τα ρόδια των εν λόγω ποικιλιών σημαντικής διατροφικής αξίας λόγω του υψηλού φαινολικού περιεχομένου τους, αλλά και της μεγάλης antiradical και εν δυνάμει αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Η σύγκριση με άλλες μελέτες που έγιναν σε χυμούς ροδιού με τη δοκιμή της ρίζας DPPH* είναι δύσκολη, καθώς οι διαφορετικές ομάδες ερευνητών ακολουθούν ανόμοιες μεθόδους για την εκτίμηση της antiradical δράσης, καθιστώντας έτσι τα αποτελέσματα των ερευνών που βρίσκονται στη βιβλιογραφία μη συγκρίσιμα μεταξύ τους. Ενδεικτικά, αναφέρεται η μελέτη των Fawole, Opara και Theron (2011) που μελέτησαν τη δράση χυμών από τρεις διαφορετικές ποικιλίες ροδιάς της Νότιας Αφρικής, όπου αυτές βρέθηκαν να περιέχουν συγκέντρωση σε ισοδύναμα του ασκορβικού οξέος 5,91–6,70 mg AAE/100 mL χυμού.¹¹⁵

Όσον αφορά τα δείγματα των κρασιών που μελετήθηκαν, το κρασί από ρόδι περιείχε μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση AAE από το κόκκινο κρασί από σταφύλια. Η εικόνα αυτή συνάδει προς τα αποτελέσματα που δόθηκαν από τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu. Δεν αποκλείεται, όμως, ότι εκτός από τη μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών που περιείχε το κρασί από ρόδι συγκριτικά με το κόκκινο κρασί, και η

σύσταση των φαινολικών να έπαιξε σημαντικό ρόλο στην επίδειξη μεγαλύτερης ικανότητας δράσης έναντι της ρίζας DPPH*, εφόσον είναι δεδομένο ότι οι οίνοι από διαφορετικά φρούτα έχουν διαφορετικά σε ποιότητα φαινολικά συστατικά.¹⁹⁰

3.2.3 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS*⁺ των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων

Μια επιπρόσθετη εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα δείγματα των ροδιών, και των κρασιών που μελετήθηκαν δόθηκε μέσω της δοκιμής με τη χρήση της ρίζας ABTS*⁺, η μεθοδολογία της οποίας περιγράφεται στην Παράγραφο 2.7.3 (Κεφάλαιο 2). Μια αντιπροσωπευτική καμπύλη συσχέτισης της πρότυπης ένωσης της Trolox παρατίθεται στο Παράρτημα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ικανοποιητική (R>0,95).

Πίνακας 3.2.3.1: Συγκέντρωση των antiradical ενώσεων εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων της Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά g ξηρού δείγματος και ανά 100 mL χυμού ή κρασιού των δειγμάτων των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των κρασιών. (Μέσος όρος±SE, n=10)

Δείγμα	mg TE/g ξηρού δείγματος	mg TE/100 mL
Aril.CL.Wf	7,50±0,54a	–
Aril.US.Wf	5,85±0,34b	–
Juice.CL.Wf	13,00±0,47c	218,34±7,95a
Juice.US.Wf	13,87±0,53c	208,06±8,00a
Seed.CL.Wf	3,35±0,12d	–
Seed.US.Wf	3,79±0,10e	–
Juice.Ps	9,75±0,39f	159,92±6,42b
Juice.Pg	12,80±0,46c	209,98±7,47a
Juice.Wf	11,65±0,45g	191,00±7,41c
Pom.Wine	Δ.Π.	90,82±1,96d
Red.Wine	Δ.Π.	87,23±2,01d

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p<0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Δ.Π.: Δεν προσδιορίστηκε.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.2.3.1, φαίνεται πως η δοκιμή με την ελεύθερη ρίζα ABTS*⁺ έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τον προσδιορισμό της ποσότητας των φαινολικών ουσιών Folin–Ciocalteu όσον αφορά τα μεθανολικά εκχυλίσματα από τα διαφορετικά μέρη των

ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο. Ο χυμός του ροδιού φάνηκε να είναι σχεδόν 2 φορές πλουσιότερος ($p<0,05$) σε antiradical ενώσεις σε σχέση με τα αρίλια, και περίπου 4 φορές ($p<0,05$) συγκριτικά με τα σπέρματα των ροδιών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συνάδουν πλήρως προς τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φαινολικές ουσίες, καθώς ο χυμός από ρόδι φάνηκε να έχει σχεδόν διπλάσια ($p<0,05$) και τετραπλάσια ($p<0,05$) συγκέντρωση σε φαινολικές ουσίες από τα αρίλια και τα σπέρματα των αριλίων, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2.1.1). Οι τιμές των συγκεντρώσεων σε ισοδύναμα της ουσίας Trolox, όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.2.3.1, συμφωνούν, επίσης, με εκείνα που εξήχθησαν από τη δοκιμή με τη ρίζα DPPH* (Πίνακας 3.2.2.2).

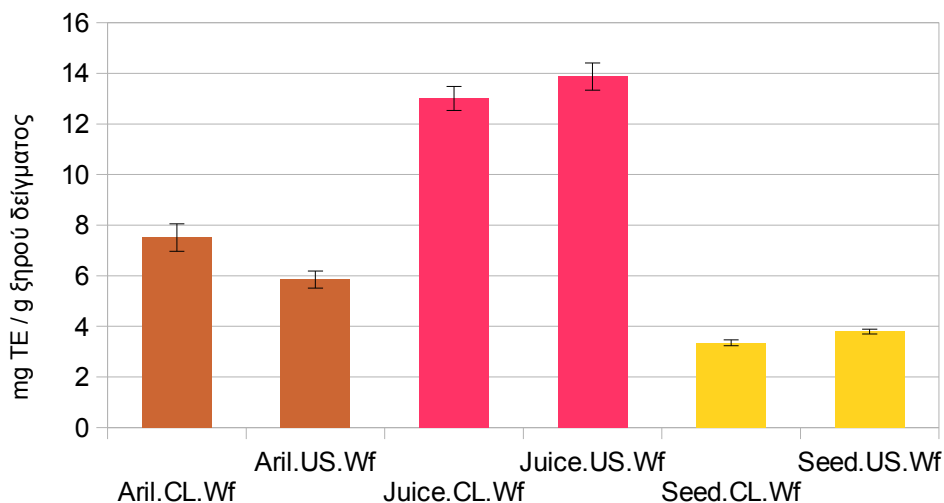
Βάσει των προαναφερθέντων, φαίνεται να σχετίζονται άμεσα τα αποτελέσματα των τριών φασματοφωτομετρικών μεθόδων (Folin–Ciocalteu, DPPH* και ABTS***) και συμπεραίνεται πως για τα συγκεκριμένα δείγματα (αρίλια, χυμός και σπέρματα της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο) όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά σε ένα δείγμα τόσο πιο δραστικό παρουσιάζεται έναντι των ριζών DPPH* και ABTS***.

Βάσει του Πίνακα 3.2.3.1, συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα των φαινολικών συστατικών που παρελήφθησαν με την UAE από τους χυμούς ροδιού των διαφορετικών ποικιλιών του Βόλου και της Ερμιόνης γίνεται φανερό ότι τα ρόδια διαφορετικών ποικιλιών, περιοχών καλλιέργειας κ.λπ. εμφανίζουν αρκετές σημαντικές ($p<0,05$) διαφορές στο προφίλ των antiradical συστατικών τους, όπως αναφέρεται προηγουμένως. Αναλυτικότερα, οι χυμοί από τις ποικιλίες «Wonderful» από τον Βόλο και «Πορφυρογέννητη» από την Ερμιόνη παρουσίασαν την υψηλότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση σε ισοδύναμα της ένωσης Trolox ($13,87\pm0,53$ και $12,80\pm0,46$ mg TE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα), ενώ ο χυμός από την «Περσεφόνη» τη χαμηλότερη ($p<0,05$) που ήταν $9,75\pm0,39$ mg TE/g ξηρού δείγματος.

Από το σύνολο των ποτών (χυμοί από ρόδι και οίνοι) που μελετήθηκαν βάσει τη συγκέντρωσης που υπολογίστηκε σε TE με τη δοκιμή ABTS***. Τα εκχυλίσματα των χυμών από ρόδι ανεξάρτητα από την τεχνική που εφαρμόστηκε για την εκχύλιση, την ποικιλία των ροδιών και την προέλευσή τους φάνηκε να περιέχουν περισσότερες ($p<0,05$) antiradical (εν δυνάμει αντιοξειδωτικές) ενώσεις συγκριτικά με τα κρασιά, ενώ το κόκκινο κρασί από σταφύλια είχε τη μικρότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση σε ισοδύναμα Trolox μεταξύ των μελετούμενων ποτών.

Τα δύο είδη κρασιού παρόλο που φάνηκε να έχουν υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ($p<0,05$) συγκριτικά με τους χυμούς από ρόδι (Πίνακας 3.2.1.1), είχαν αντιθέτως χαμηλότερη ($p<0,05$) συγκέντρωση TE. Όπως και στην περίπτωση του προσδιορισμού της συγκέντρωσης σε antiradical ενώσεις μέσω της δοκιμής DPPH*, φαίνεται πως τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τη δοκιμή με τη ρίζα ABTS*** δεν ταιριάζουν με τις τιμές των συγκεντρώσεων σε φαινολικές ενώσεις στα κρασιά όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu για τους ίδιους ενδεχομένως λόγους που προαναφέρθηκαν.

Δοκιμή ABTS•+

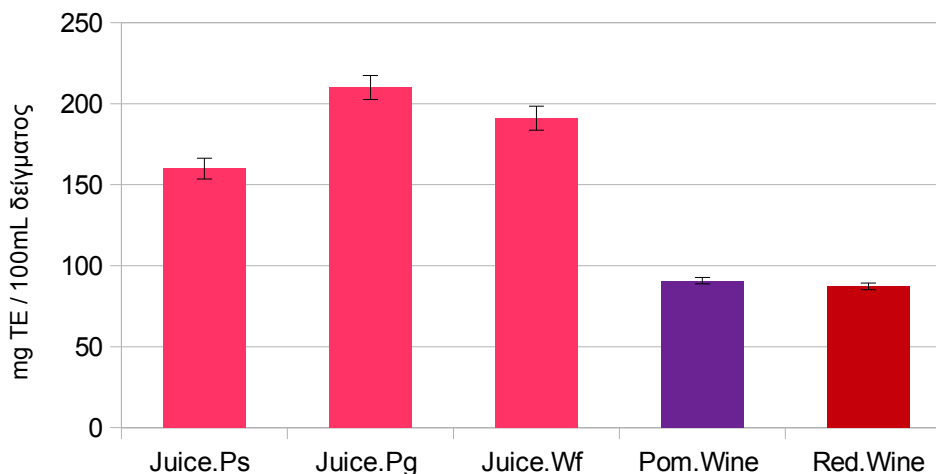


Σχήμα 3.2.3.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών που εκχυλίσθηκαν με διαφορετικές μεθόδους από τα καρπίδια, το χυμό και τα σπέρματα των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» του Βόλου, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων της Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά g ξηρού δείγματος.

Με βάση τον Πίνακα 3.2.3.1 και το Σχήμα 3.2.3.1, το μεθανολικό εκχύλισμα των φαινολικών ενώσεων που παρελήφθη από τα αρίλια των ροδιών της ποικιλίας «Wonderful» από τον Βόλο με την τεχνική των υπερήχων είχε μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση σε TE συγκριτικά με εκείνο από την κλασική μέθοδο εκχύλισης ($7,50 \pm 0,54$ και $5,85 \pm 0,34$ mg TE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα). Αντιθέτως, όσον αφορά τα σπέρματα των ροδιών πλουσιότερο σε antiradical ενώσεις με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) φάνηκε να είναι το εκχύλισμα που παρελήφθη με την κλασική μέθοδο εκχύλισης ($3,79 \pm 0,10$ και $3,35 \pm 0,12$ mg TE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα). Τα διαφορετικά εκχυλίσματα φαινολικών συστατικών του χυμού από ρόδι μετά την κλασική μέθοδο εκχύλισης και την UAE δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) ($13,00 \pm 0,47$ και $13,87 \pm 0,53$ mg TE/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα).

Η τεχνική εκχύλισης με υπέρηχους φαίνεται να είναι αποτελεσματικότερη για την παραλαβή των antiradical ενώσεων για το δείγμα των σπερμάτων του ροδιού, επειδή όπως προαναφέρθηκε η διάρρηξη των κυττάρων που προκαλείται από τους υπέρηχους πιθανώς να είναι απαραίτητη για την έκλυση των φαινολικών ουσιών από το φυτικό υλικό.

Δοκιμή ABTS•+



Σχήμα 3.2.3.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των antiradical συστατικών των εκχυλισμάτων από τους χυμούς των ροδιών των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» της Ερμιόνης, του κρασιού από ρόδι και του κόκκινου κρασιού, εκφρασμένης σε mg ισοδύναμων της Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά 100 mL δείγματος.

Όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.3.1 και το Σχήμα 3.2.3.2, το εκχύλισμα από το χυμό της ποικιλίας «Πορφυρογέννητη» περιείχε τη μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση σε antiradical ενώσεις εκφρασμένη σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox ($209,98 \pm 7,47$ mg TE/100 mL), έπεται η ποικιλία «Wonderful» από την Ερμιόνη με $191,00 \pm 7,41$ mg TE/100 mL, τέλος η «Περσεφόνη» με τη χαμηλότερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση ($159,92 \pm 6,42$ mg TE/100 mL).

Οι διαφορές μεταξύ των τιμών των συγκεντρώσεων σε ισοδύναμα της ένωσης Trolox μεταξύ των τριών ποικιλιών ροδιών από την Ερμιόνη είναι αναμενόμενες, καθώς έχει αποδειχθεί ότι οι χυμοί που παράγονται από διαφορετικές ποικιλίες ροδιών δεν παρουσιάζουν το ίδιο φαινολικό περιεχόμενο, αλλά ούτε την ίδια antiradical δράση.^{195, 41} Ως εκ τούτου, η περιεκτικότητά τους σε antiradical ενώσεις αναμένεται επίσης να διαφέρει.

Ο οίνος από ρόδι, βάσει του Πίνακα 3.2.3.1 και του Σχήματος 3.2.3.2, βρέθηκε να περιέχει από 1,5 έως 2 φορές χαμηλότερη συγκέντρωση σε TE σε σχέση με τους χυμούς από ρόδι, αλλά μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκριτικά με τον ερυθρό οίνο.

3.2.4 Συσχετισμοί των αποτελεσμάτων από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους Folin–Ciocalteu, DPPH• και ABTS•+

Για να εκτιμηθεί ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ των τριών διαφορετικών φασματοφωτομετρικών προσδιορισμών και των εξεταζόμενων μεγεθών των δειγμάτων υπολογίστηκαν οι συντελεστές

συσχέτισης αυτών κατά Pearson.

Πίνακας 3.2.4.1: Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson όπως υπολογίσθηκαν μέσω των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων Folin–Ciocalteu, DPPH• και ABTS για τα δείγματα των ροδιών του Βόλου και της Ερμιόνης και των οίνων.**

Συντελεστές συσχέτισης	Folin–Ciocalteu	DPPH•	ABTS**
Folin–Ciocalteu	1	0,91240	0,93422
DPPH•	0,91240	1	0,99794
ABTS**	0,93422	0,99794	1

Οι θετικές, γραμμικές και υψηλές συσχετίσεις μεταξύ των δύο μεθόδων προσδιορισμού της antiradical ικανότητας, DPPH• και ABTS**, και του προσδιορισμού της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών Folin–Ciocalteu υποδεικνύουν ότι οι φαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν σημαντικά στην antiradical, άρα και την εν δυνάμει αντιοξειδωτική, δράση των ροδιών και των κρασιών. Η υψηλή τιμή του συντελεστή συσχέτισης για τις δοκιμές με τις ρίζες DPPH• και ABTS** φανερώνει, πιθανώς, τον κοινό μηχανισμό αντίδρασης μεταξύ των antiradical ενώσεων και των δύο ριζών. Παρόμοια αποτελέσματα με υψηλές τιμές συσχέτισης των εν λόγω μεθόδων έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες για χυμούς από ρόδι, κρασί από ρόδι και κρασιά από σταφύλια.^{126, 12, 41, 190}

3.3 Ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές συνδυασμένες με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων

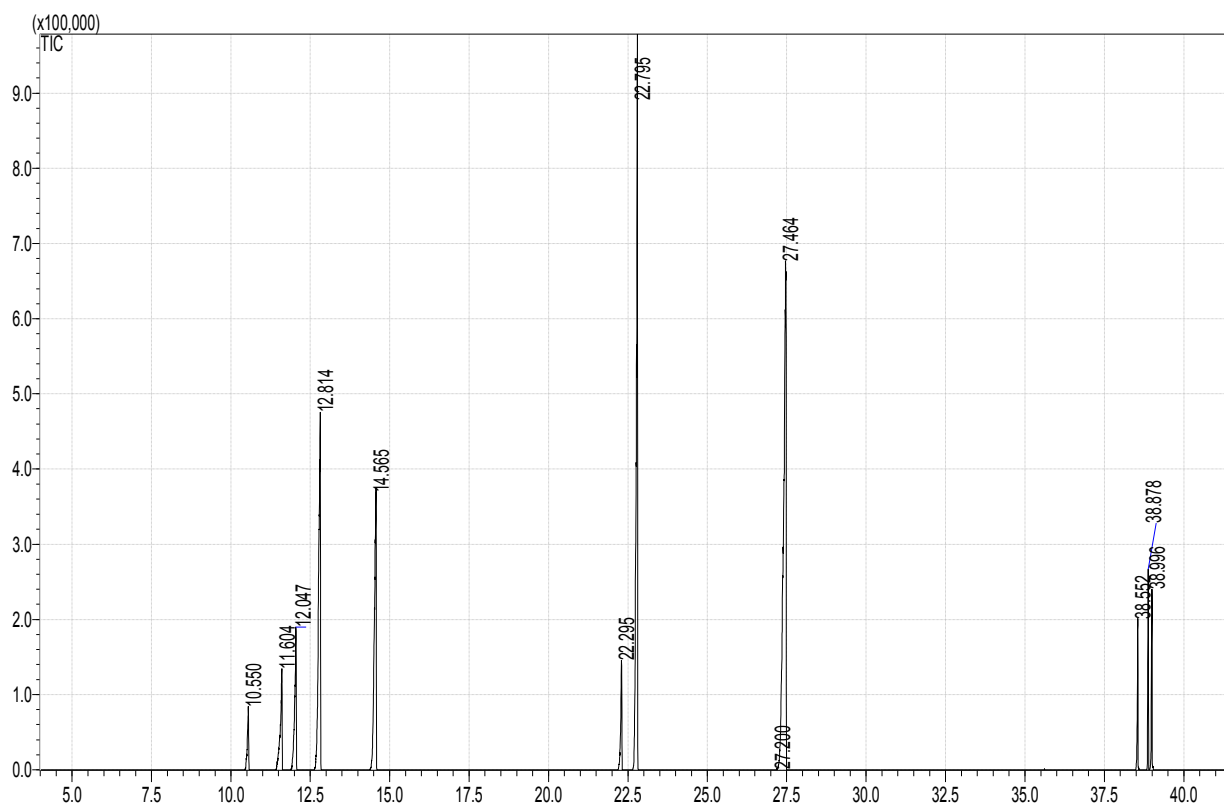
Δύο χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης, μια αεριοχρωματογραφία και μια υγροχρωματογραφία, συνδυασμένες με ένα φασματογράφο μαζών επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό της σύστασης του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων από τους χυμούς ροδιού των ποικιλιών από την Ερμιόνη, όπως και των κρασιών.

Η αρχή μεθόδου και οι συνθήκες των διαφορετικών μεθόδων για την ανάλυση της ποιότητας των φαινολικών ουσιών που ορίστηκαν για τις GC-MS και την HPLC–PDA–ESI–MSⁿ τεχνικές ανάλυσης περιγράφονται στις Παραγράφους 2.8.1 και 2.8.2 (Κεφάλαιο 2), αντιστοίχως.

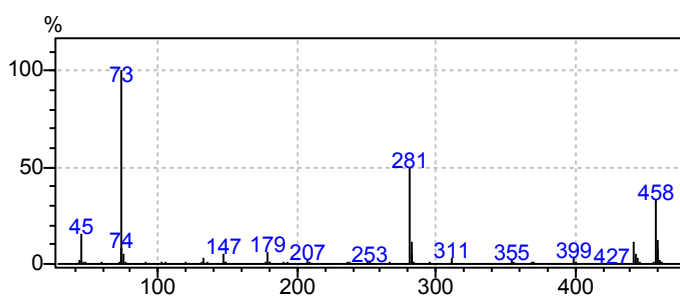
3.3.1 Ανάλυση με Αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC–MS) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων

Μέσω της GC-MS ανάλυσης προσδιορίσθηκαν σε σύσταση οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονταν στα υπό μελέτη δείγματα (μεθανολικά εκχυλισμάτα φαινολικών ουσιών από τους χυμούς των ποικιλιών της Ερμιόνης και κρασιά). Προηγήθηκαν, κατά πρώτον, οι διαφορετικού τύπου υδρόλύσεις με μια ισχυρή βάση (NaOH) και ένα ισχυρό οξύ (HCl), ώστε με το σπάσιμο των γλυκοζιτικών δεσμών στις γλυκοζυλιωμένες μορφές των φαινολικών μορίων, να απελευθερωθούν οι άγλυκες ενώσεις. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά μια βασική υδρόλυση, μια όξινη υδρόλυση διαδοχική της βασικής, και μια όξινη υδρόλυση. Έπειτα, οι φαινολικές ενώσεις παρελήφθησαν με εκχύλιση υγρού-υγρού από ένα μείγμα διαλυτών DE-EA. Ακολούθως, μέσω της διαδικασίας της σιλανοποίησης οι φαινολικές ουσίες μετατράπηκαν στα πτητικά τριμεθυλοσιλοπαράγωγά τους. Με την εισαγωγή τους στον αεριοχρωματογράφο διαχωρίσθηκαν στη χρωματογραφική στήλη και ανιχνεύθηκαν μέσω ενός ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID). Στη συνέχεια, οι ενώσεις εισήλθαν στο φασματογραφό μάζας, και θραυσματοποιήθηκαν από μια δέσμη ηλεκτρονίων ενέργειας 70 eV.

Τα είδη των θραυσμάτων m/z και η σχετική ένταση αυτών στο φάσμα μάζας κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση της δομής και την ταυτοποίηση των ενώσεων, με τη βοήθεια ειδικών βιβλιοθηκών με φάσματα μάζας. Επιπλέον, ένα μείγμα 11 πρότυπων φαινολικών ενώσεων υποβλήθηκε στην GC-MS ανάλυση, ώστε να μπορέσει να επιβεβαιωθεί η τυχόν παρουσία αυτών στα δείγματα που μελετήθηκαν.



Σχήμα 3.3.1.1: GC-FID χρωματογράφημα των 11 πρότυπων φαινολικών ενώσεων που αναλύθηκαν.



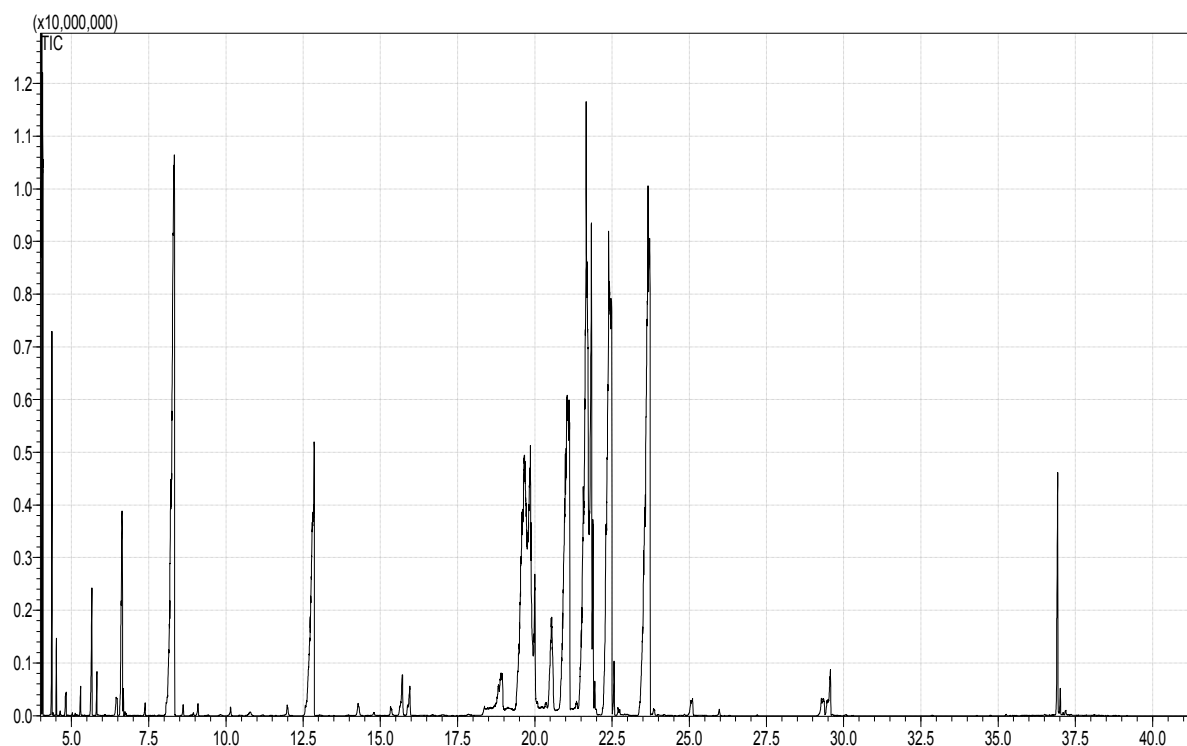
Σχήμα 3.3.1.2: Το φάσμα μαζών m/z όπως προκύπτει από την ανάλυση του MS και που είναι χαρακτηριστικό για την ένωση του τριμεθυλοσιλυλο-παραγώγου του γαλλικού οξέος (3,4,5-τριϋδροξυβενζοϊκό οξύ).

Στο Σχήμα 3.3.1.1 παρουσιάζονται οι κορυφές των πρότυπων φαινολικών ουσιών που αναλύθηκαν με GC-MS. Η σειρά με την οποία εκλούσθηκαν οι πρότυπες φαινολικές ενώσεις ήταν η εξής: 2,6-δι-tert-βουτυλο-4-μεθυλοφαινόλη (BHT) (10,55 min), βανιλίνη (11,60 min), κινναμικό οξύ (12,04 min), 2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόλη (12,81 min), 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (14,56 min), trans-4-υδροξυκινναμικό οξύ (p-κουμαρικό οξύ) (22,29 min), 3,4,5-τριϋδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ) (22,79 min), (±)-κατεχίνη (27,46 min), 3,4-διϋδροξυκινναμικό οξύ (καφεϊκό οξύ) (38,55 min), κερκετίνη (38,87 min) και (±)-ναρινγενίνη (38,99 min).

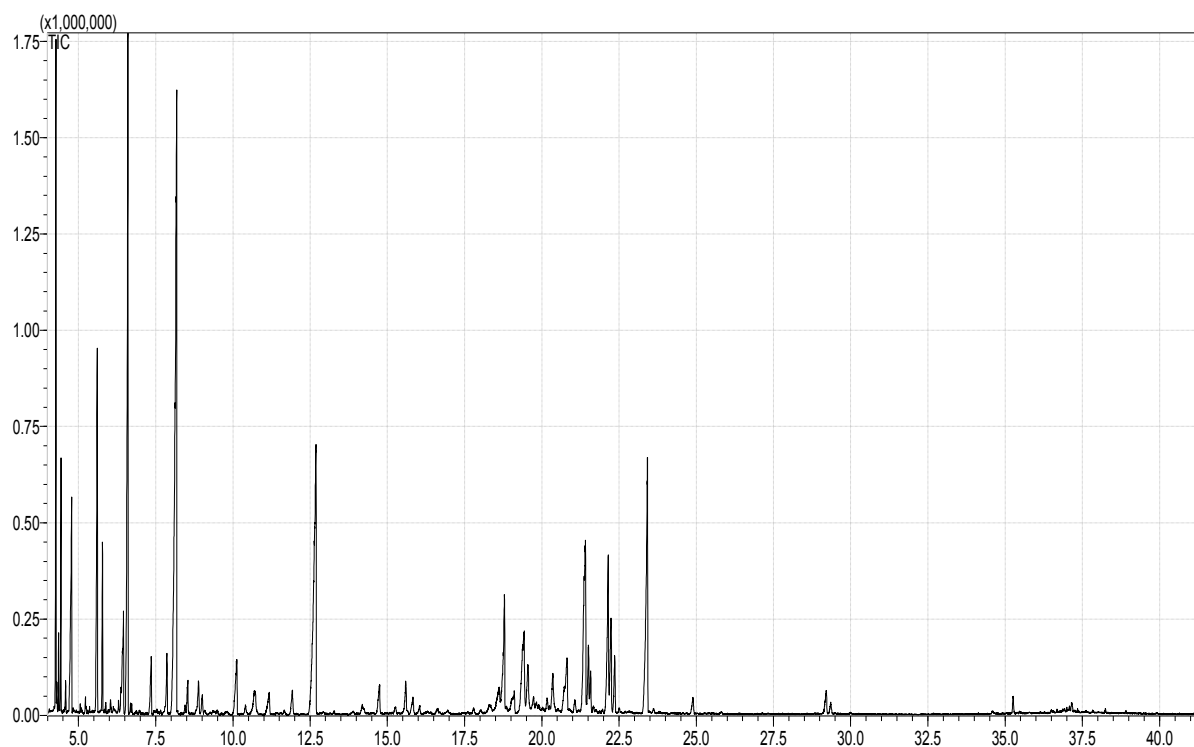
Στο Σχήμα 3.3.1.2 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας που προκύπτει από τη θραυσματοποίηση με δέσμη ηλεκτρονίων 70 eV του γαλλικού οξέος, όπως καταγράφεται από το φασματογράφο

μάζας κατά την GC-MS ανάλυση. Τα είδη των ιόντων m/z και η μεταξύ τους σχετική αναλογία είναι χαρακτηριστικά για την ένωση του γαλλικού οξέος, και βάσει αυτών γίνεται η ταυτοποίησή του κατά την MS ανάλυση.

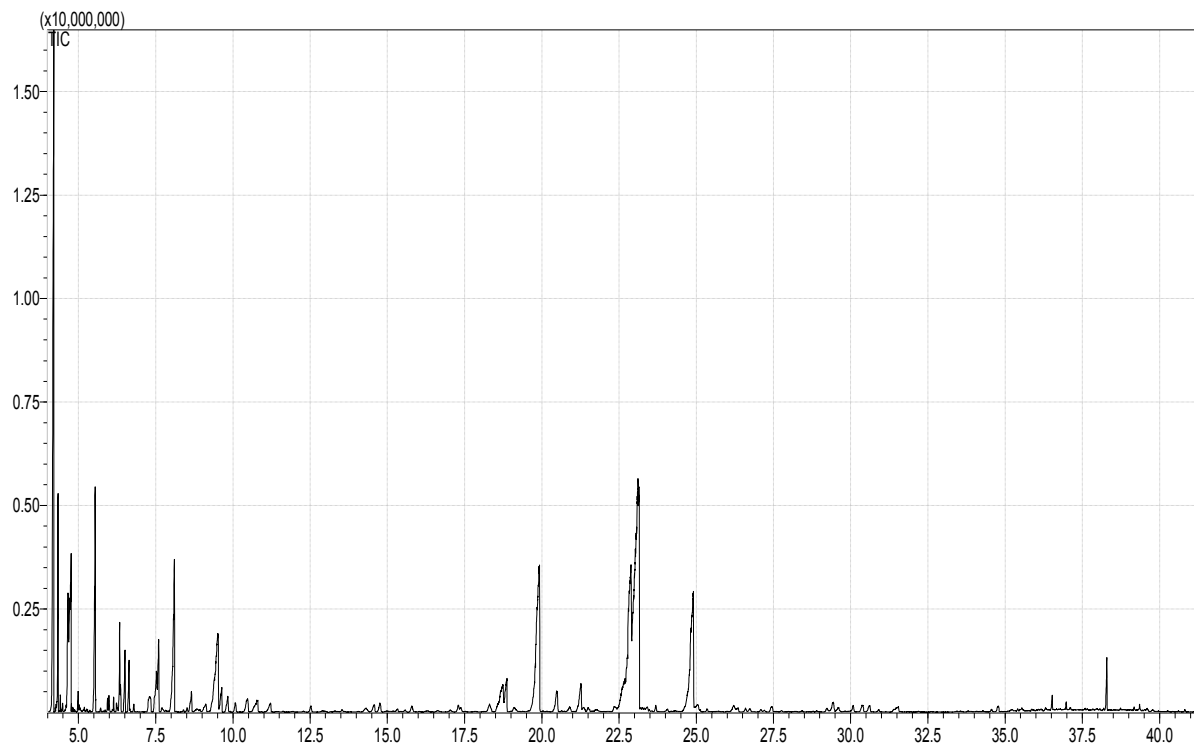
Παρακάτω, στα Σχήματα 3.3.1.3–5 παρατίθενται αντιπροσωπευτικά χρωματογράφημα από την GC-FID ανάλυση στο εκχύλισμα των φαινολικών ουσιών από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά τους διαφορετικούς τύπους της υδρόλυσης που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό της σύστασης των φαινολικών ενώσεων στο δείγμα.



Σχήμα 3.3.1.3: GC-FID χρωματογράφημα από την ανάλυση του εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά τη βασική υδρόλυση, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τη σιλανοποίηση.



Σχήμα 3.3.1.4: GC-FID χρωματογράφημα από την ανάλυση του εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά την όξινη υδρόλυση διαδοχική της βασικής, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τη σιλανοποίηση.



Σχήμα 3.3.1.5: GC-FID χρωματογράφημα από την ανάλυση του εκχυλίσματος από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Wonderful» μετά την όξινη υδρόλυση, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τη σιλανοποίηση.

Πίνακας 3.3.1.1: Καταγραφή των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα των χυμών ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη και στα κρασιά βάσει των πρότυπων φαινολικών ενώσεων.

Πρότυπη φαινολική ένωση	Juice.Ps			Juice.Pg			Juice.Wf			Pom.Wine			Red.Wine		
	Base	Acid Seq.	Acid	Base	Acid Seq.	Acid	Base	Acid Seq.	Acid	Base	Acid Seq.	Acid	Base	Acid Seq.	Acid
BHT										+		+	+	+	+
βανιλίνη													+		
κινναμικό οξύ		+		+		+	+						+		
2-(4- υδροξυφαινυλο) αιθανόλη											+				
4- υδροξυβενζοϊκό οξύ		+						+				+			
p-κουμαρικό οξύ	+			+			+	+		+			+		
γαλλικό οξύ		+	+		+	+		+	+		+	+	+		
(±)-κατεχίνη													+		
καφεϊκό οξύ					+			+			+	+	+		
κερκετίνη										+	+		+	+	
(±)-ναρινγενίνη															
Σύνολο	1	3	1	2	2	2	2	4	1	3	4	4	8	2	1

Η ταυτοποίηση των φαινολικών ουσιών όπως καταγράφεται στον Πίνακα 3.3.1.1, έγινε βάσει των αντίστοιχων πρότυπων ουσιών, συγκεκριμένα, βάσει του χρόνου κατακράτησης (Rt) και του χαρακτηριστικού για κάθε ένωση φάσματος μάζας. Αναλυτικά, στο εκχύλισμα από το χυμό ροδιού της ποικιλίας «Περσεφόνη» ταυτοποιήθηκαν μετά τη βασική υδρόλυση το p-κουμαρικό οξύ, μετά την όξινη υδρόλυση διαδихική της βασικής ταυτοποιήθηκαν το κινναμικό, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ, ενώ μετά την όξινη υδρόλυση στο στο εκχύλισμα του χυμού ανιχνεύθηκε μόνο το γαλλικό οξύ. Στο εκχύλισμα του χυμού ροδιού της ποικιλίας «Πορφυρογέννητη», ανιχνεύθηκαν το κινναμικό και το p-κουμαρικό οξύ μετά τη βασική υδρόλυση. Το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ ταυτοποιήθηκαν στην «Πορφυρογέννητη» μετά την όξινη υδρόλυση που διαδέχθηκε τη βασική, ενώ μετά την όξινη υδρόλυση βρέθηκαν το κινναμικό και το γαλλικό οξύ. Στο δείγμα από την ποικιλία «Wonderful» ταυτοποιήθηκαν μετά τη βασική υδρόλυση το κινναμικό και το p-κουμαρικό οξύ, και μετά τη διαδοχική αυτής υδρόλυση με ισχυρό οξύ ταυτοποιήθηκαν το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το p-κουμαρικό, το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. Τέλος, μετά την όξινη υδρόλυση στο μεθανολικό εκχύλισμα από το χυμό της «Wonderful» ανιχνεύθηκε μόνο το γαλλικό οξύ.

Όσον αφορά το κρασί από ρόδι, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3.1.1, μετά τη βασική υδρόλυση

ταυτοποιήθηκαν το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT, το p-κουμαρικό οξύ και η κερκετίνη, ενώ μετά την όξινη υδρόλυση διαδοχική της βασικής ανιχνεύθηκαν η 2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόλη, το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ και η κερκετίνη. Οι φαινολικές ενώσεις που βρέθηκαν στο κρασί από ρόδι μετά την όξινη υδρόλυση ήταν η συνθετική ένωση BHT, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. Στον ερυθρό οίνο από σταφύλια, μετά τη βασική υδρόλυση ανιχνεύθηκαν 8 φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ήταν το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT, η βανιλίνη, το κινναμικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η (±)-κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ και η κερκετίνη.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.3.1.1, σε κανένα από τα δείγματα των εκχυλισμάτων από τους χυμούς ροδιού και των κρασιών δεν ανιχνεύθηκαν το συνθετικό φαινολικό αντιοξειδωτικό BHT, όπως αναμενόταν, η βανιλίνη, η 2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόλη, η (±)-κατεχίνη, η κερκετίνη και η (±)-ναρινγενίνη. Η βανιλίνη, το κινναμικό οξύ, η (±)-κατεχίνη και η (±)-ναρινγενίνη δεν ανιχνεύθηκαν στο κρασί από ρόδι, ενώ στο κόκκινο κρασί από σταφύλια, που βρέθηκε να περιέχει τις περισσότερες από τις φαινολικές ουσίες των διαθέσιμων προτύπων, δεν ανιχνεύθηκαν η 2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόλη, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και (±)-ναρινγενίνη. Η (±)-ναρινγενίνη δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα. Η συνθετική ουσία BHT που ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα των κρασιών, πιθανώς να προστέθηκε στο οиноποιείο για τη συντήρηση των κρασιών, εξάλλου είναι διαδεδομένη η χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο συντηρητικό.

Εκτός από την ανίχνευση των φαινολικών ουσιών που πραγματοποιήθηκε στα μελετούμενα δείγματα βάσει της GC-MS ανάλυσης με τις πρότυπες ενώσεις, μερικές ακόμα φαινολικές ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια των ειδικών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας. Από αυτήν την επεξεργασία βρέθηκαν, για κάθε δείγμα και κάθε τύπο υδρόλυσης, οι φαινολικές ενώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1.2.

Πίνακας 3.3.1.2: Καταγραφή των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα των χυμών ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη και στα κρασιά με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας.

Δείγμα	Τύπος υδρόλυσης	Φαινολική ένωση
Juice.Ps	Base	κατεχόλη, φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, φερουλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, φθαλικό οξύ, 1,3-διϋδροξυ-12h-βενζο[b]ξανθεν-12-όνη
	Acid Seq.	2-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχινικό οξύ, βανιλλικό οξύ
	Acid	φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, φθαλικό οξύ
Juice.Pg	Base	φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, φερουλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, φθαλικό οξύ, 3,5-δι-tert-βουτυλοβενζοϊκό οξύ, κατεχόλη, (9R-cis)-10-αιθοξυ-9-υδροξυ-8,8-διμεθυλο-9,10-διϋδροπυρανο-(2,3-f)χρωμεν-2(8H)-όνη

	Acid Seq.	πρωτοκατεχινικό οξύ, ισοβανιλλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ
	Acid	φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, 3-(1-βενζοφουρανο-2-υλ)-7-μεθοξυ-4H-χρωμεν-4-όνη
Juice.Wf	Base	κατεχόλη, βανιλλικό οξύ, φθαλικό οξύ, 1,3-διϋδροξυ-12h-βενζο[b]ξανθεν-12-όνη
	Acid Seq.	ισοβανιλλικό οξύ, 3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ, 2',4',6'-τριϋδροξυχαικόννη, 3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχινικό οξύ, χρυσίνη
	Acid	φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, φθαλικό οξύ, βανιλλυλοαμυγδαλικό οξύ
Pom.Wine	Base	3-O-γλυκοζιτης της κερκετίνης, 3-O-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης, λουτεολίνη, φθαλικό οξύ
	Acid Seq.	4-υδροξυ-φαινυλ-αιθανόλη, 2-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχινικό οξύ, 4-διϋδροξυ-φλαβανόλη
	Acid	φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, αμυγδαλικό οξύ, φθαλικό οξύ
Red.Wine	Base	3-O-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης, κουμαραν-5,6-διολ-3-όνη, 3-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ
	Acid Seq.	2-υδροξυλο-φαινυλο-αιθανόλη
	Acid	2-υδροξυλο-φαινυλο-αιθανόλη, 3-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ

Οι φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν περαιτέρω για κάθε δείγμα μετά από κάθε τύπο υδρόλυσης βάσει την φασμάτων μάζας που προέκυψαν από την MS ανάλυση αναφέρονται στον Πίνακα 3.3.1.2.

Αξίζει να σημειωθεί, πως οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν μέσω της GC-MS ανάλυσης μετά τις διαφορετικές υδρόλύσεις που εφαρμόστηκαν στα δείγματα των ροδιών και των κρασιών, είναι πιθανό να βρίσκονται αυτούσιες στα δείγματα ή/και να αποτελούν κομμάτι άλλων μεγαλύτερων μορίων (π.χ. γλυκοζυλιωμένων φαινολικών ενώσεων, τανινών και άλλων πολυμερών). Η υδρόλυση αναμένεται να έχει προκαλέσει θραύσεις των πολυφαινολών, συγκεκριμένα θεωρείται πως λύνει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς, αποδεσμεύοντας έτσι τα άγλυκα μόρια των φαινολικών. Παραδείγματος χάριν, το γαλλικό οξύ που ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, εκτός από την ελεύθερη μορφή του που είναι γνωστό πως απαντάται σε χυμούς από ρόδι και σε ερυθρούς οίνους, αποτελεί επίσης δομική μονάδα των γαλλοτανινών και ελλαγιτανινών που έχουν βρεθεί σε δείγματα ροδιών.^{115, 197} Ακόμα, το γαλλικό οξύ είναι υπομονάδα των προανθοκυανιδινών που απαντώνται σε οίνους.¹⁹⁷

Συνολικά, από τους Πίνακες 3.3.1.1 και 3.3.1.2 φαίνεται πως για τα δείγματα των ποικιλιών ροδιών μετά τη βασικά υδρόλυση ανιχνεύθηκαν 10 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Μετά την όξινη υδρόλυση που διαδέχθηκε τη βασική, ανιχνεύθηκαν 13 διαφορετικές ενώσεις στα δείγματα των ροδιών, και μετά την όξινη ανιχνεύθηκαν 7 διαφορετικές ενώσεις. Όσον αφορά τα δείγματα των κρασιών, ανιχνεύθηκαν 14 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις μετά τη βασική υδρόλυση, και 9 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις μετά την όξινη διαδοχική της βασικής υδρόλυσης. Τέλος, στα δείγματα των κρασιών μετά την όξινη υδρόλυση ταυτοποιήθηκαν 9 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της GC-MS ανάλυσης για τα δείγματα των ροδιών, συμπεραίνεται πως με την εφαρμογή της όξινης διαδοχικής υδρόλυσης ανιχνεύθηκαν περισσότερες φαινολικές ενώσεις συγκριτικά με τη βασική και την όξινη υδρόλυση. Όσον αφορά τα δείγματα των κρασιών, μετά τη βασική υδρόλυση ανιχνεύθηκε μεγαλύτερος αριθμός ενώσεων σε σχέση τη διαδοχική της βασικής όξινη υδρόλυση και την όξινη υδρόλυση. Συμπερασματικά, φαίνεται πως για τα διαφορετικά δείγματα με το κάθε είδος υδρόλυσης επιτεύχθηκε η απελευθέρωση διαφορετικών άγλυκων μορίων φαινολικών ουσιών από τις γλυκοζυλιωμένες μορφές τους.

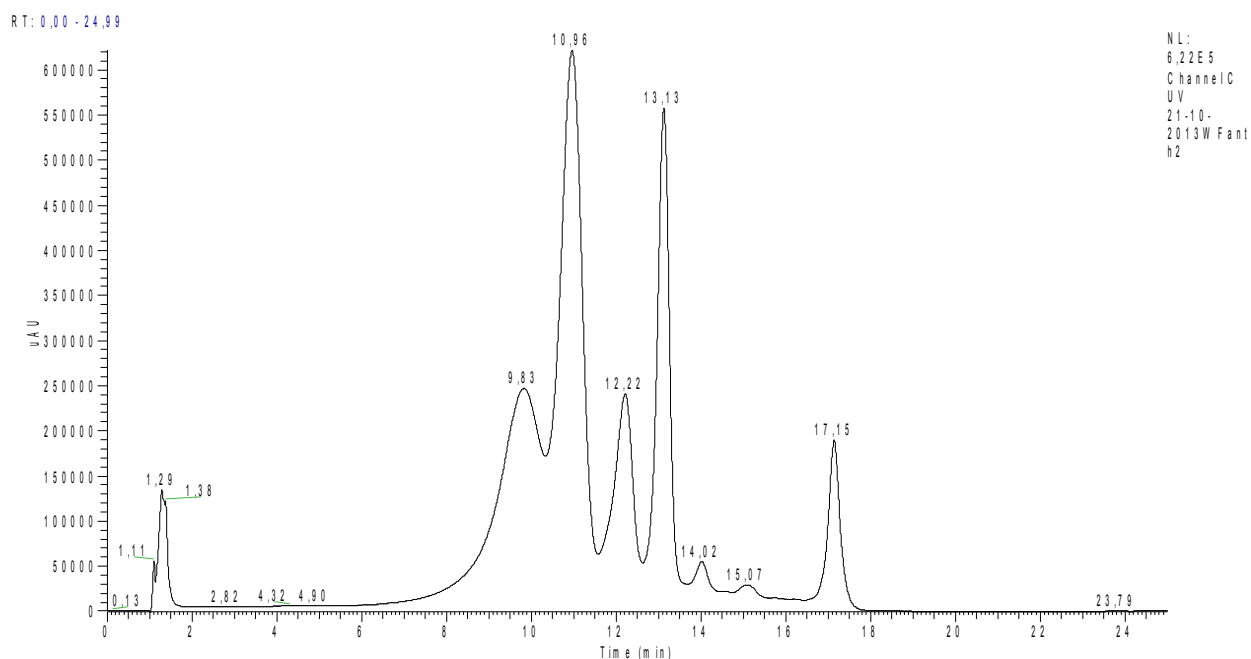
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την GC-MS ανάλυση των εκχυλισμάτων από τα κρασιά συμφωνούν με εκείνα των Ross, Beta και Arntfield (2009), που μελέτησαν τη σύσταση των φαινολικών οξέων σε δείγματα φασολιών με HPLC ανάλυση μετά από μια βασική υδρόλυση, μια όξινη βασική της διαδοχικής υδρόλυση και μια όξινη υδρόλυση, και αναφέρουν πως η πλειονότητα των φαινολικών οξέων φάνηκε να εκχυλίζεται μετά τη βασική υδρόλυση.¹⁶⁹ Αντιθέτως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την ανάλυση της σύστασης των εκχυλισμάτων από τους χυμούς ροδιού φαίνεται πως, για τα συγκεκριμένα δείγματα, μεγαλύτερος αριθμός ενώσεων ανιχνεύονται μετά την όξινη υδρόλυση που διαδέχεται τη βασική. Ωστόσο, όπως αναφέρεται στη μελέτη των Ross, Beta και Arntfield, μετά τους δύο τύπους όξινης υδρόλυσης ανιχνεύθηκαν φαινολικές ενώσεις οι οποίες δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθούν με την εφαρμογή της βασικής υδρόλυσης στα δείγματα των φασολιών.¹⁶⁹

Συμπερασματικά, το είδος της υδρόλυσης που εφαρμόζεται πριν την ανάλυση σε ποιότητα των φαινολικών ουσιών σε μήτρες φυτικής προέλευσης φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων με GC-MS ανάλυση.

3.3.2 Ανάλυση με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Ανιχνευτή Πολλαπλών Διόδων (Photo-Diode Array, PDA) και Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS^n) (HPLC–PDA–ESI– MS^n) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων των ροδιών της Ερμιόνης και των οίνων

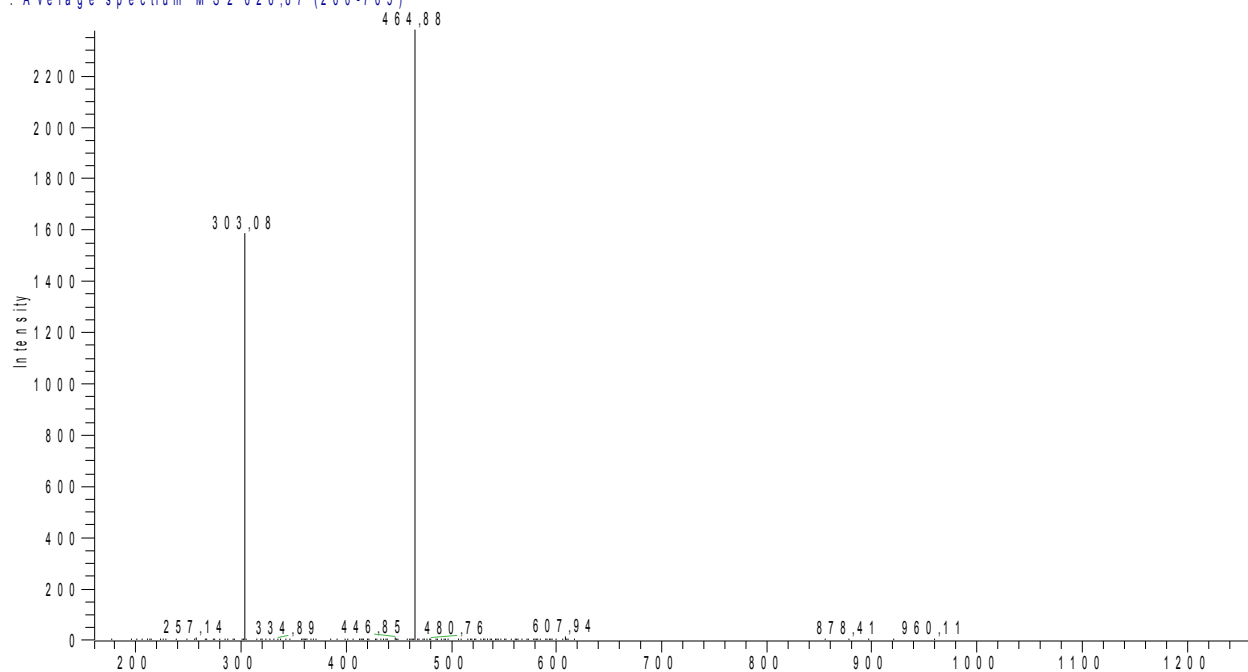
Η τεχνική HPLC–PDA–ESI– MS^n ανάλυσης εφαρμόστηκε για τη μελέτη της σύστασης των φαινολικών ενώσεων στα μεθανολικά εκχυλίσματα από τους χυμούς ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την περιοχή της Ερμιόνης, όπως και σε έναν οίνο από ρόδι και έναν ερυθρό οίνο από σταφύλια. Για την ταυτοποίηση των φαινολικών ουσιών μέσω της φασματομετρίας μαζών κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες φαινολικών ενώσεων ήδη ευρεθέντων μέσω HPLC–PDA–ESI– MS^n ανάλυσης. Για κάθε ένωση αναφέρονται τα στοιχεία που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία, όπως το λ_{max} (nm), το ιόν που δημιουργείται από το θετικό (ESI^+) ή τον αρνητικό (ESI^-) ιοντισμό και τα θραύσματα μάζας (m/z) που δημιουργούνται στο φασματογράφο και είναι χαρακτηριστικά για κάθε ένωση. Για τη δημιουργία των εν λόγω βιβλιοθηκών, συλλέχθηκαν τα πειραματικά αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες που έγιναν για την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων σε χυμούς από ρόδι διάφορων ποικιλιών, σταφύλια, λευκά και κόκκινα κρασιά, και σε άλλες μήτρες (χυμός από γκρέιπφρουτ, πράσινο τσάι, οινολάσπη από κρασί ροδιού) [Sentandreu, Cerdan-Calero και Sendra (2013),¹¹⁴ Mena κ.ά. (2014),¹⁴⁷ Gómez-Caravaca κ.ά. (2013),⁹³ Garcia-Beneytez, Cabello και Revilla (2003),¹⁴¹ Acevedo De la Cruz κ.ά. (2012),¹²⁹ He κ.ά. (2012),¹³⁷ Serrano-Lourido, Saurina, Hernández-Cassou και Checa (2012),¹³⁸ Jaitz κ.ά. (2010),¹³² Liang κ.ά. (2013),¹⁷⁹ Picariello κ.ά. (2014),¹³⁶ Gruz, Novák και Strnad (2008),¹⁷⁸ Cui κ.ά. (2012)¹⁴²]. Η αρχή της μεθόδου και οι συνθήκες που ορίστηκαν για την LC–ESI– MS^n ανάλυση των ανθοκυανινών και των υπόλοιπων φαινολικών ουσιών στα υπό μελέτη δείγματα παρουσιάζεται στην Παράγραφο 2.8.2 (Κεφάλαιο 2).

Στο Σχήμα 3.3.2.1 που ακολουθεί, παρατίθεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε από την HPLC-PDA ανάλυση του εκχυλίσματος του χυμού ροδιού της ποικιλίας «Wonderful», με ανίχνευση στα 520 nm όπου παρατηρείται το μέγιστο (λ_{max}) της απορρόφησης για τις ανθοκυανίνες.



Σχήμα 3.3.2.1: HPLC-PDA χρωματογράφημα (ανίχνευση στα 520 nm) των ανθοκυανινών από την ανάλυση του εκχυλίσματος του χυμού ροδιού της ποικιλίας «Wonderful».

1-10-2013 W Fant h2 #260-765 RT: 4,36-13,10 AV: 16 NL: 2,37E3
: Average spectrum MS 2 626,87 (260-765)



Σχήμα 3.3.2.2: Το φάσμα μαζών m/z όπως προκύπτει από την ανάλυση του MS και που είναι χαρακτηριστικό για την ένωση του 3,5-O-διγλυκοζίτη της δελφινιδίνης.

Στο Σχήμα 3.3.2.2 παρουσιάζεται το φάσμα μαζών με τα χαρακτηριστικά θραύσματα m/z για τον 3,5-Ο-διγλυκοζίτη της δελφινιδίνης, που προέκυψε από τη θραυσματοποίηση του αρχικά σχηματιζόμενου θετικού ιόντος της μητρικής ένωσης κατά την ανάλυση στο φασματογράφο μάζας.

Το είδος του ιόντος που σχηματίζεται (θετικό ή αρνητικό) κατά τον ιοντισμό κάθε ουσίας που πραγματοποιείται στο πρώτο στάδιο της MS ανάλυσης και τα θραύσματα m/z που προκύπτουν από τις περαιτέρω διαδοχικές θραυσματοποιήσεις της ιοντισμένης μητρικής ένωσης, όπως και το χαρακτηριστικό για κάθε ουσία λ_{max} , χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για την ταυτοποίηση των διάφορων ενώσεων στα δείγματα.

Πίνακας 3.3.2.1: Η βιβλιοθήκη με τα $\lambda_{\max}$ (nm), τα θετικά ή αρνητικά ιόντα και τα χαρακτηριστικά θραύσματα (m/z) που συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφία για ανθοκυανιδινικές και μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις, και μερικών βασικών οργανικών οξέων για την ανίχνευσή τους με LC–ESI–MSⁿ ανάλυση που συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφία και έχουν προηγουμένως ταυτοποιηθεί σε χυμούς από ρόδι, λευκούς και ερυθρούς οίνους από σταφύλια και άλλα τρόφιμα. Καταγραφή των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα των χυμών ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» από την Ερμιόνη και στα κρασιά βάσει της βιβλιοθήκης.

Βιβλιοθήκη Φαινολικών Ενώσεων							Δείγμα				
Ανθοκυανιδινικές ενώσεις	$\lambda_{\max}$ (nm)	M+ (m/z)	MS2 (m/z)	MS3 (m/z)	MS4 (m/z)	Βιβλιογραφική αναφορά	Juice. Ps	Juice. Pg	Juice. Wf	Pom. Wine	Red. Wine
Cyanidin		287	269, 241, 213, 177, 113			147					+
Cyanidin-3,5-caffeoyl-hexoside		611	465, 449, 303, 287	465 → 303 449 → 287		114					
Cyanidin-3,5-O-diglucoside	516, 513, 277	611	449, 287	287		136, 114, 147, 137, 129, 179	+	+	+		
Cyanidin-3,5-pentoside-hexoside	516, 273	581	449, 419, 287	287		114, 93		+	+		
Cyanidin-3-hexoside		449	287			114	+	+	+	+	
Cyanidin-3-O-(6-O-acetyl)-5-O-diglucoside	516	653	611, 449, 287			129, 137, 136					
Cyanidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	514	491	449, 287			51, 50, 63, 59					+
Cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-pentoside	528	727				59					+
Cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglucoside	524	757	611, 595, 449, 287			51, 63, 56					
Cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-glucoside	522, 308	595	449, 287			51, 47, 63, 56, 50, 59					+
Cyanidin-3-O-caffeoylglucoside		611	449, 287			63	+	+	+		
Cyanidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside		773	611, 449, 287			63					
Cyanidin-3-O-monoglucoside	514-6, 280	449	287			50, 47, 52, 59, 51, 63, 56, 96	+	+	+	+	
Cyanidin-3-pentoside		419	287			47		+	+		+
Cyanidin-3-rutinoside	503, 274	595	449, 287	287		96, 47					+
Cyanidin-caffeoyl		449	287			47	+	+	+	+	
Cyanidin-trihexoside		773	611, 449, 287	449, 287		47					
Delphinidin-3,5-caffeoyl-hexoside		627	465, 303	303		47		+	+		
Delphinidin-3,5-dihexoside		627	465, 303	303		47		+	+		
Delphinidin-3,5-O-diglucoside	519-21, 277	627	465, 303			63, 59, 51, 56, 96, 47, 52		+	+		
Delphinidin-3,5-pentoside-hexoside		597	465, 435, 303	303		47			+		
Delphinidin-3-O-(6-O-acetyl)glucoside	521-2, 525	507	465, 303			59, 51, 63, 50					
Delphinidin-3-O-(6-O-feruloyl)-5-O-diglucoside		803	465, 303			63, 59					
Delphinidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucoside	530, 527, 312	611	465, 303			59, 50, 63, 56, 50, 51					

Delphinidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglucoside	530	773	627, 611, 465, 303			51, 56, 63, 61, 59					
Delphinidin-3-O-acetylglucoside-5-O-glucoside		669	507, 465, 303			63, 56					
Delphinidin-3-O-caffeoylglucoside		627	465, 303			63		+	+		
Delphinidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside		789	507, 465, 303			63					
Delphinidin-3-O-monoglucoside	521-3, 277	465	303			59, 47, 52, 50, 51, 63, 56, 96	+	+	+	+	+
Delphinidin-3-(p-coumaryl)hexoside		611	303			47					
Delphinidin-3-pentoside		435	303			47		+	+		
Delphinidin-3-rutinoside		611	465, 449, 303, 287	465 → 303 449 → 287		47					
Delphinidin-caffeoyl		465	303			47	+	+	+	+	+
Delphinidin-trihexoside		789	627, 465, 303	465, 303		47					
(Epi)afzelechin-cyanidin-3,5-dihexoside		883	721, 559	559	541, 433, 423, 329, 287	47					
(Epi)afzelechin-cyanidin-3-hexoside		721	559	541, 433, 423, 329, 287		47					
(Epi)afzelechin-delphinidin-3-hexoside	528, 526, 330, 326, 286, 282	737	575, 557, 439	557, 449, 439, 345, 303		47, 96					
(Epi)afzelechin-pelargonidin-3-hexoside		705	543	525, 417, 407, 313, 271		47					
(Epi)catechin-cyanidin-3,5-dihexoside		899	737, 575	575	557, 449, 423, 329, 287	47			+	+	
(Epi)catechin-cyanidin-3-hexoside	534, 328, 286	737	575, 557, 423	557, 449, 423, 329, 287		96, 47					
(Epi)catechin-delphinidin-3,5-dihexose		915	753, 591	591	573, 465, 439, 345, 303	47	+	+			
(Epi)catechin-delphinidin-3-hexoside		753	591	573, 465, 439, 345, 303		47					
(Epi)catechin-pelargonidin-3-hexoside		721	559	541, 433, 407, 313, 271		47					
(Epi)galocatechin-cyanidin-3,5-dihexose		915	753, 591	591	573, 465, 423, 329, 287	47	+		+	+	
(Epi)galocatechin-cyanidin-3,5-dihexoside		815	753, 591	591	573, 465, 423, 329, 287	47					
(Epi)galocatechin-cyanidin-3-hexoside	532, 276	753	591, 573, 423	573, 465, 423, 329, 287		96, 47					
(Epi)galocatechin-delphinidin-3,5-dihexoside		931	769, 607	607	589, 481, 439, 345, 303	47	+		+	+	
(Epi)galocatechin-delphinidin-3-hexoside		769	607	589, 481, 439, 345, 303		47					
(Epi)galocatechin-pelargonidin-3-hexoside	530, 272	737	575, 449, 407	557, 449, 407, 313, 271		96, 47					
Malvidin-3,5-O-diglucoside	524-5	655	493, 331			63, 51, 56, 59					+
Malvidin-3-O-(6-O-acetyl)-5-O-diglucoside	530	697	655, 535, 493, 331			51, 63, 56					+
Malvidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	527, 521	535	493, 331			51, 63, 50, 59					

Malvidin-3-O-(6-O-p-caffeoyl)glucoside	524	655	493, 331			56, 50, 63, 59					
Malvidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglucoside	530	801	655, 639, 493, 331			59, 56, 63, 51					
Malvidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucoside	532, 521, 317	639	493, 331			59, 51, 63, 56, 50					
Malvidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside		817	655, 493, 331			56, 63					+
Malvidin-3-O-cis-p-coumarylglucoside	532, 317	609	331			50					
Malvidin-3-O-feurlylglucoside	532	669	493, 331			63					
Malvidin-3-O-monoglucoside	530, 526, 524, 520	493	331			50, 53, 59, 61, 63, 56					+
Malvidin-3-O-monoglucoside-acetaldehyde		517	355			56					+
Pelargonidin-3,5-caffeoyl-hexoside		595	433, 271	271		47	+	+	+		+
Pelargonidin-3,5-O-diglucoside		595	433, 271			63, 47, 52, 96	+	+	+		+
Pelargonidin-3,5-pentoside-hexoside		565	433, 403, 271	271		47					
Pelargonidin-3-O-acetylglucoside		475	433, 271			63					
Pelargonidin-3-O-acetylglucoside-5-O-glucoside		637	595, 433, 271			63					
Pelargonidin-3-O-caffeoylglucoside		595	433, 271			63	+	+	+		+
Pelargonidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside		757	595, 433, 271			63					
Pelargonidin-3-O-coumarylglucoside		579	433, 271			63					+
Pelargonidin-3-O-coumarylglucoside-5-O-glucoside		741	595, 433, 271			63					
Pelargonidin-3-O-monoglucoside	505, 503, 274	433	271			63, 47, 52, 96	+	+	+	+	
Pelargonidin-3-pentoside		403	271			47					
Peonidin-3,5-O-diglucoside	513	625	463, 301			63, 51, 56, 59					
Peonidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	529, 522, 518	505	463, 301			51, 63, 50, 59					
Peonidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglucoside	532, 520	771	625, 463, 301			63, 56, 59					+
Peonidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucoside	522-3, 311	609	463, 301			50, 51, 59, 63, 56					
Peonidin-3-O-acetylglucoside-5-O-glucoside		667	625, 463, 301			63					
Peonidin-3-O-caffeoylglucoside	525	625	463, 301			63, 56					
Peonidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside		787	625, 463, 301			63					+
Peonidin-3-O-monoglucoside	517, 515	463	301			63, 50, 59, 51, 56					+
Peonidin-3-O-monoglucoside-pyruvid acid		531	463, 369			56					+
Peonidin-3-O-trans-p-coumarylglucoside	522, 311	639	301			50					
Petunidin-3,5-O-diglucoside	523, 520	641	479, 317			59, 63, 51, 56					
Petunidin-3-O-(6-O-acetyl)-5-O-diglucoside	530	683	641, 479, 317			51, 63, 56					
Petunidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	530, 522	521	479, 317			51, 50, 63, 59					
Petunidin-3-O-(6-O-p-caffeoyl)-5-O-diglucoside		803	641, 479, 317			63, 59					+
Petunidin-3-O-(6-O-p-caffeoyl)-glucoside		641	479, 317			63, 59					
Petunidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglucoside	530, 529	787	641, 625, 479, 317			51, 63, 56, 59					
Petunidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)-glucoside	531-2, 313	625	479, 317			63, 51, 50					

Petunidin-3-O-monoglucoside	526, 524, 522	479	317			50, 59, 51, 63					+
Σύνολο ανθοκυανιδινικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν							14	19	22	9	23
Μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις	λ_{max} (nm)	[M-H]⁻ (m/z)	MS2 (m/z)	MS3 (m/z)		Βιβλιογραφική αναφορά	Juice. Ps	Juice. Pg	Juice. Wf	Pom. Wine	Red. Wine
2-Hydroxycinnamic acid (o-Coumaric acid)		163	119			60					
3,5-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid)		153	109			60					
3-Hydroxybenzoic acid (m-Hydroxybenzoic acid)		137	93			60					
3-Hydroxycinnamic acid (trans m-Coumaric acid)		163	119			60					
4-Hydroxybenzoic acid (p-Hydroxybenzoic acid)		137	93			60, 61					
Apigenin-rhamnoside (detected as formic acid adduct)		461	415	269, 161		47	+	+	+	+	+
Brevifolin carboxylic acid		291	247	203		47			+	+	
Caffeic acid (3,4-Dihydroxycinnamic acid)		179	161, 135			61, 60, 55, 56	+	+		+	+
Caffeic acid-hexoside		341	179, 161, 135	135		47			+	+	
Caftaric acid		311	179, 149			56					+
(+)-Catechin		289	261, 245, 205, 203, 179	203, 227, 187, 161, 217		52, 55, 56, 61					+
Chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic acid)		353	217, 191			60					
cis-Cinnamic acid		147	129			56					+
cis p-Coumaric acid (cis 4-Hydroxycinnamic acid)		163	119, 93			55					
Coumaric acid-hexoside		325	187, 163, 145, 119	119		47					+
Digalloyl-gallagyl-hexoside		1085	933, 915, 719, 601, 575, 549	781, 721, 601, 549, 299		47					
Digalloyl-hexoside		483	331, 313, 169	271, 211, 193, 169		47					
Digalloyl-HHDP-hexoside		785	633, 615, 483, 301	301, 257, 229		47	+	+	+	+	
Dihydrokaempferol-3-O-glucoside		449	287			56	+				
Dihydrokaempferol-3-O-rhamnoside		433	269, 179, 151			56					+
Dihydrokaempferol-hexoside		449	431, 287, 269, 259	287, 269, 241		52, 47	+				
Dihydroquercetin-O-hexoside		465	447, 339, 151			56					+
Dihydroquercetin-O-xyloside		435	303, 285, 151			56					
Dimeric procyanidin	280	577	425			53	+				+
Dimers of tergallic-O-hexoside		631	933, 961, 451, 301, 299, 271	257, 229		52				+	
Ellagic acid	367, 275	301	301, 257, 229, 185	301, 284, 257, 229		96, 47, 52	+	+	+	+	
Ellagic acid deoxyhexose	360	447	302, 301, 300	301, 257, 229		96, 47	+	+	+	+	
Ellagic acid-dihexoside		625	463, 301	301, 257, 191		47		+	+	+	+
Ellagic acid-galloyl-hexoside		615	463, 301	301, 257		47	+	+	+		
Ellagic acid glucoside	361, 252	463	301			96	+	+	+		

Ellagic acid-hexoside		463	301, 300	301, 300, 283, 257, 229	52, 47	+	+	+		
Ellagic acid-hexoside dimmer		927 / 463	927 → 463, 301 463 → 301	301, 257, 229	47	+	+	+		
Ellagic acid-(p-coumaryl) hexoside		609	463, 445, 301	463 → 301 301 → 257	47					
Ellagic acid pentoside	360, 255	433	301, 200	301, 300, 257, 229	96, 47					
Ellagic acid-rhamnoside		447	301, 300	301, 300, 257, 229	47	+	+	+		
Ellagitannin I		593	445, 301	301, 300, 257	47					
Ellagitannin II		643	48	355, 319, 301, 257, 193, 175	47		+	+		+
Ellagitannin III		643	481, 463, 355, 301, 283	301, 300, 283	47		+	+		+
Ellagitannin IV		649	605, 301	481, 421, 301	47					
Ellagitannin V		801	757, 481, 301, 275	481, 301, 275	47					
Ellagitannin VI		805	643, 625, 481, 463	517, 481, 463, 355, 301, 283	47					
Ellagitannin VII		951	907	889, 783, 605, 481, 301, 271	47		+	+	+	
Ellagitannin VIII		953	935, 463, 301	891, 463, 343, 301	47		+		+	
Ellagitannin IX		969	925, 881, 623, 481, 399	881, 579, 481, 399, 301	47					
Ellagitannin X		1417	785, 765, 633, 613, 451	483, 419, 401, 301, 275, 231	47					
Epicatechin		289	261, 245, 205, 203, 179	203, 227, 187, 161, 217	55, 56, 52, 61					+
Epicatechin-3-O-gallate		441	289, 169		56					
Epigallocatechin		305	179, 137		56					
Ethyl caffeate		207	179, 135		56		+		+	+
Ethyl gallate	280	197	169, 125		53, 53				+	+
Ferulic acid-hexoside (Hexose ester of ferulic acid)		355	217, 193, 175	134	52, 56	+	+			
Ferulic acid (trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid)		193	178, 149, 134		61, 60, 55, 56					
Gallagic acid		601	299, 271, 243	271	47, 52				+	
Gallagyl ester		1083	1065, 1021, 807, 721, 601, 575	763, 601, 575, 549, 425, 301, 299	47				+	
Gallagyl ester		1083	1065, 1021, 959, 807, 601, 575	301, 299	47				+	

Gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid)	280	169	125	125	53, 52, 55, 60, 61				+	+
Gallic acid derivative		239	169, 125	125	52					
Gallic acid derivative		243	169, 225, 151, 139, 125	125	52					
(+)-Gallocatechin		305	261, 221, 219, 179	164, 151, 137	52					
Gallotannin		803	759, 483, 275	483, 331, 275	47					
Galloyl-bis-HHDP-hexoside (Casuarinin)		935	659, 633, 571, 301	571, 301	47			+		
Galloyl-hexoside		331	241, 223, 169, 125	125, 169	52					
Galloyl-hexoside		331	271, 169	211, 169	52, 47					
Galloyl-HHDP-DHHDP-hexoside (Granatin B)		951	933, 613, 301	915, 897, 613, 445, 301	52	+	+	+	+	
Galloyl-HHDP-hexose	365, 266	633	615, 463, 421, 301, 275	301, 275, 229	47, 96		+	+		
Galloyl-HHDP-hexoside		633	301, 275, 249	301, 257, 229	47		+	+	+	
Galloyl-punicalin (Galloyl-gallagyl-hexoside) (Pedunculagin III)		933	915, 781, 721, 601	601	52, 47					
Gentisic acid		153	109		60, 61					
Glucoside ester of coumaric acid		325	163, 145, 119		56					+
Granatin A / Lagerstannin A		799	781, 479, 301	461, 451, 435, 299, 287, 273	47					
Granatin B	365, 274	951	933, 631, 613, 301	933 → 631, 613, 301 613 → 301, 299	96, 47	+	+	+	+	
Hexose ester of vanillic acid		329	191, 167		56	+				
Hexose ester of protocatechuic acid		315	153		56					
HHDP-hexoside		481	301, 275	301, 257, 229	47					
HHDP-hexoside		481	437, 419, 329, 299, 275	419, 341, 299	52					
Isorhamnetin-3-O-rhamnoside		461	315		56					
Kaempferol-3-O-galactoside		447	285		56					
Kaempferol-3-O-glucoside		447	285, 255, 327		56	+				
Kaempferol-3-O-rhamnoside		431	285		56					
Kaempferol-3-O-rutinoside		593	285		56					
Kaempferol-O-hexoside		447	285		56	+				
Lagerstannin C		649	497, 301	301, 257, 229	47					
Laricitrin-3-O-glucoside		493	331		56					+
Luteolin		285			61					
Monogalloyl-hexoside	276	331	271, 211, 193, 169, 151, 125	125	47, 96					
Myricetin	370	317	179, 151		53, 55, 61					
Myricetin-3-O-galactoside		479	317		56					+

Myricetin-3-O-glucoside	310	479	317, 179		53, 56			+		+
Naringenin-like compound		271	177, 165, 151, 125, 107	107, 151, 83, 65	52					
Non identified		366			53					
o-Coumaric acid (2-Hydroxycinnamic acid)		163	119		56					
Pallidol		453	359, 265		56					
p-Coumaric acid (trans 4-Hydroxycinnamic acid)		163	119, 93		61, 55, 60					
Pedunculagin I (Bis-HHDP-hexoside)	377, 253	783	765, 481, 301, 275	765 → 746, 301, 299 301 → 301, 275, 229	47, 96, 52	+	+	+	+	
Pedunculagin I isomer		783	631, 451, 425, 301	433	52	+	+	+	+	
Pedunculagin I derivative I		951	907	783, 481, 301	47				+	
Pedunculagin I derivative II		1265	1247, 933, 783, 763, 745	301, 275, 245, 229	47					
Pedunculagin I derivative III		1415	1397, 933, 783, 763, 633, 613	721, 645, 481, 341, 301	47					
Phellatin or Amurensin	330, 284	533	515, 447, 371		96					
Phlorizin	280	435	297, 273, 167		96					
Pinoresinol		357	327, 311, 151, 136	136, 151	52					
Protocatechuic aldehyde		137			61					
Punicalagin	378, 258	1083 / 541	781, 721, 601, 575	781 → 721, 601, 299 601 → 299, 271	47, 96, 52			+	+	
Punicalin derivative		1101	1057, 781, 721, 601	721, 601	47					
Punicalin α or β		781	721, 601	299, 271	52	+			+	
Punigluconin	375, 268	801	649, 499, 347, 301	765 → 746, 301, 299 301 → 275, 229	96, 47					
Pyrogallol		125	106, 97, 81		52					
Quercetin		301	178, 151		55, 61					
Quercetin-3-O-galactoside		463	301		56					
Quercetin-3-O-glucoside		463	301		56	+	+	+		
Quercetin-3-O-glucuronide	370	477	301		53, 56					+
Quercetin-3-O-rhamnoside		447	301		56	+	+	+		+
Quercetin-3-O-rutinoside		609	301		56					
Quercetin-O-xyloside		433	301		56					+
Resveratrol (cis or trans)		227	159, 143		61, 55					+
Salicylic acid (2-Hydroxybenzoic acid)		137	93		60					
Sinapic acid (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)		223	208, 164, 149		60					
Syringetin-3-O-glucoside		507	345		56	+	+			+
Syringetin-hexoside	272	507	312, 295		96		+			+

Syringetin-hexoside		507	345, 327, 315	345 → 327, 315 327 → 312, 296, 283, 268		47, 52	+	+			+
Syringic acid		197	182, 167, 123			60, 61					+
trans-Cinnamic acid		147	103			60					+
trans-coumaryltartaric acid	310	295	163			53					+
Piceid acid (cis or trans)	310	389	227			53					
Tri-HHDP-hexoside		1085	783, 765	597, 301, 275		47			+		
Unknown ellagitannin at m/z 1113		557	783, 763, 466, 331, 191	765, 721, 481, 299		52					
Valoneic acid bilactone		469	425	425, 407, 300		47	+		+	+	
Vanillic acid (4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid)		167	152, 123, 108			60, 61					
Vanillic acid-4-O-hexoside		329	269, 209, 181, 167	152, 123, 108		47	+				
Vanillic acid-dihexoside (detected as formic acid adduct)		537	491, 329, 167	209, 167		47	+		+		
Vitisin A	520	561	399			53					
<i>Σύνολο μη ανθοκυανιδινικών φαινολικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν</i>							29	29	29	26	30
Οργανικά οξέα		[M-H]⁻ (m/z)	MS2 (m/z)	MS3 (m/z)		Βιβλιογραφική αναφορά	Juice. Ps	Juice. Pg	Juice. Wf	Pom. Wine	Red. Wine
Amber acid		117				61				+	+
Citric acid		191	173, 111	111, 67		61, 52, 47	+	+	+	+	+
L-malic acid		133	115, 87	71		52, 61	+	+			+
Tartaric acid		149				61					+
<i>Σύνολο οργανικών οξέων που ανιχνεύθηκαν</i>							2	2	1	2	4

Στον Πίνακα 3.3.2.1 παρουσιάζεται η βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε για την ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των χυμών ροδιού από τις ποικιλίες της Ερμιόνης και στα κρασιά. Σε κάθε ένωση αντιστοιχεί το θετικό ή αρνητικό ιόν που προκύπτει από τον ιοντισμό της με τον ηλεκτροψεκασμό και τα χαρακτηριστικά θραύσματα που προκύπτουν από τη διαδοχική θραυσματοποίησή της στο MS. Επίσης, αναφέρεται το $\lambda_{\max}$ (nm) για όσες ενώσεις ήταν διαθέσιμο βιβλιογραφικά. Ακόμα, εκτός από τις ανθοκυανιδινικές και μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις που έχουν καταγραφεί, η βιβλιοθήκη περιέχει 4 οργανικά οξέα που απαντώνται ευρέως σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3.2.1, στα εκχυλίσματα από χυμό ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» ανιχνεύθηκαν, αντιστοίχως, 14, 19 και 22 ανθοκυανιδινικές ενώσεις. Επίσης, στα ίδια δείγματα ανιχνεύθηκαν 29, 28 και 29 μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις, και 2, 2 και 1 οργανικά οξέα, αντίστοιχα. Το κρασί από ρόδι και το κόκκινο κρασί από σταφύλια φάνηκαν να περιέχουν αντιστοίχως, 9 και 23 ανθοκυανιδινικές ενώσεις, 26 και 30 μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις, και 2 και 4 οργανικά οξέα.

Πιο αναλυτικά, οι 3-μονο- και 3,5-διγλυκοζίτες της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης και της πελαργονιδίνης που συνθέτουν το χαρακτηριστικό ανθοκυανικό προφίλ των χυμών από ρόδι, ανιχνεύθηκαν στους χυμούς όλων των ποικιλιών («Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful»), με εξαίρεση τον 3,5-Ο-διγλυκοζίτη της δελφινιδίνης που δεν ανιχνεύθηκε στο χυμό της ποικιλίας «Περσεφόνη».

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3.2.1, οι 3-Ο-καφεοϋλογλυκοζίτες της κυανιδίνης και της πελαργονιδίνης, που έχουν ταυτοποιηθεί σε ερυθρούς οίνους της *Vitis vinifera*, ανιχνεύθηκαν στους χυμούς των 3 ποικιλιών ροδιάς. Επιπλέον, μόνο στην ποικιλία «Wonderful» βρέθηκε ο 3,6-πεντοζίτης-εξοζίτης της δελφινιδίνης, που έχει ανιχνευθεί επίσης σε χυμό της ίδιας ποικιλίας σε προηγούμενη μελέτη.¹¹⁴ Στην ποικιλία «Περσεφόνη» φάνηκε να υπάρχουν οι επιγαλλοκατεχίνες των 3,5-διεξοζιτών της κυανιδίνης και της δελφινιδίνης, ενώ οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν ταυτοποιήθηκαν στις υπόλοιπες ποικιλίες.

Στον ερυθρό οίνο ανιχνεύθηκαν 14 περισσότερες ανθοκυανιδινικές ουσίες που έχουν καταγραφεί στη βιβλιοθήκη συγκριτικά με τον οίνο από ρόδι. Συγκεκριμένα, στον ερυθρό οίνο ανιχνεύθηκαν ουσίες που έχουν βρεθεί σε σταφύλια του γένους *Vitis*^{129,141}, σε ερυθρούς οίνους^{141, 137, 179, 136}, όπως είναι ο 3-Ο(6-Ο-ακετυλο)γλυκοζίτης της κυανιδίνης, ο 3-Ο-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, ο 3,5-Ο-διγλυκοζίτης της μαλβιδίνης, ο 3-Ο-καφεοϋλογλυκοζίτης της πελαργονιδίνης και ο 3-Ο-μονογλυκοζίτης της πεονιδίνης συζευγμένος με πυροσταφυλικό οξύ. Επίσης, ανιχνεύθηκε στον ερυθρό οίνο η ανθοκυανιδίνη της κυανιδίνης που έχει σε προηγούμενη μελέτη¹⁴⁷ ανιχνευθεί σε οινολάσπη από οίνο ροδιού, ο 3-πεντοζίτης και ο 3-ρουτινοζίτης της κυανιδίνης, ο εστέρας του καφεϊκού οξέος της δελφινιδίνης και ο 3,5-καφεοϋλο-εξοζίτης της πελαργονιδίνης που σύμφωνα με μελέτες έχουν ανιχνευθεί σε χυμούς

από ρόδι.^{114, 93}

Στον οίνο από ρόδι, βάσει των δεδομένων του Πίνακα 3.3.2.1, μερικές από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν οι 3-O-μονογλυκοζίτες της κυανιδίνης και της δελφινιδίνης, και επικατεχίνες των 3,5-διεξοζιτών της κατεχίνης και της δελφινιδίνης που έχουν απαντηθεί σε χυμούς από ρόδι σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές.¹¹⁴

Συγκεκριμένες ανθοκυανιδινικές ενώσεις φάνηκαν να περιέχονται στα εκχυλίσματα από χυμό ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful», αλλά και στα δύο είδη οίνων. Αυτές ήταν ο 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, που έχει εξάλλου ανιχνευθεί σε χυμούς από ρόδι^{114, 93} οινολάσπη από οίνο ροδιού,¹⁴⁷ σταφύλια^{136, 141, 129, 179} και ερυθρούς οίνους,^{141, 137} και ο εστέρας του καφεϊκού οξέος της δελφινιδίνης που έχει απαντηθεί σε χυμό από ρόδι της ποικιλίας «Wonderful» σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη.¹¹⁴

3.4 Συμπεράσματα από την παρούσα μελέτη

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η σύσταση των φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε τρεις ποικιλίες ροδιών (ποικιλίες «Wonderful», «Πορφυρογέννητη» και «Περσεφόνη» της *Punica granatum* L.), και σε δύο οίνους, έναν από ρόδι και έναν ερυθρό οίνο από σταφύλια.

Καταρχάς, μελετήθηκε μια κλασική και ευρέως καλλιεργούμενη παγκοσμίως ποικιλία ροδιών («Wonderful» από την περιοχή του Βόλου) ως προς το φαινολικό περιεχόμενο και την antiradical δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων που παρελήφθησαν από τα αρίλια, το χυμό και τα σπέρματα των καρπών. Εφαρμόστηκαν ξεχωριστά δύο τεχνικές εκχύλισης, μια κλασική και μια υψηλής ενέργειας, ώστε να επιλεγεί η αποδοτικότερη για την εκχύλιση των φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων των δειγμάτων. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορισμού της συνολικής συγκέντρωσης σε φαινολικά συστατικά (δοκιμή Folin–Ciocalteu) και εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης με τη χρήση των ελεύθερων ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+}, βρέθηκε ότι με την κλασική μέθοδο τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν από τα αρίλια και το χυμό ροδιού ήταν πλουσιότερα σε φαινολικές ουσίες και επέδειξαν μεγαλύτερη ικανότητα ανάσχεσης των ριζών. Αντιθέτως, η τεχνική υψηλής ενέργειας με τη χρήση υπερήχων φάνηκε να εκχυλίζει περισσότερες φαινολικές αντιοξειδωτικές ενώσεις από τα δείγματα των σπερμάτων σε σχέση με την κλασική. Εντούτοις, η εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων δεδομένης της πολύ μικρής χρονικής διάρκειάς της (15 min) έναντι της κλασικής μεθόδου προτιμήθηκε ως αποτελεσματικότερη συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για την παραλαβή των φαινολικών ενώσεων από χυμούς που ακολούθησε σε επόμενο στάδιο της πειραματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, έγινε συγκριτική μελέτη των αριλίων, του χυμού και των σπερμάτων των ροδιών ως προς την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και την antiradical δράση, με στόχο να προσδιορισθεί για διατροφικούς λόγους το μέρος του ροδιού που έχει το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο σε συνδυασμό με μεγάλη αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορισμού, οι χυμοί των ροδιών είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων και την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Με κριτήριο τα προαναφερθέντα συμπεράσματα, ακολούθησε η μελέτη των εκχυλισμάτων φαινολικών ενώσεων από τους χυμούς των δύο νέων ελληνικών ποικιλιών ροδιών («Πορφυρογέννητη» και «Περσεφόνη» από την περιοχή της Ερμιόνης) και από το χυμό ροδιού της κλασικής ποικιλίας («Wonderful» από την περιοχή της Ερμιόνης), με σκοπό τη μεταξύ τους σύγκριση. Παράλληλα, μελετήθηκαν ένας οίνος από ρόδι και ένας ερυθρός οίνος από σταφύλια συγκριτικά μεταξύ τους, αλλά και ως προς τους χυμούς των ροδιών. Τα αποτελέσματα δόθηκαν επί νωπού δείγματος δεδομένου ότι σχετίζονται με την εδώδιμη μορφή των συγκεκριμένων διατροφικών ειδών.

Από το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων για τα

παραπάνω δείγματα, βρέθηκε ότι οι οίνοι περιείχαν σημαντικά περισσότερες φαινολικές ουσίες σε σχέση με τους χυμούς των ροδιών, ενώ ο οίνος από ρόδι ήταν πλουσιότερος σε φαινολικά από τον ερυθρό οίνο. Τα αποτελέσματα αυτά τεκμηριώθηκαν λαμβάνοντας υπ'όψιν την ενδεχόμενη αναγωγική δράση του διοξειδίου του θείου στους οίνους κατά την αντίδραση των φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu. Επίσης, από τα εκχυλίσματα των χυμών ροδιού για τις ποικιλίες που μελετήθηκαν, το φαινολικό περιεχόμενό τους επί νωπής βάσης και κατά φθίνουσα κλίμακα διαμορφώθηκε ως εξής: Juice.Pg > Juice.Wf > Juice.Ps > Juice.US.Wf.

Στις δοκιμές των ελεύθερων ριζών με φασματοφωτομετρική ανάλυση, τα εκχυλίσματα των χυμών ροδιού επέδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα κατά των ριζών συγκριτικά με τους οίνους. Από τις διαφορετικές ποικιλίες ροδιού, η «Πορφυρογέννητη» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση σε antiradical ουσίες επί νωπής βάσης και η «Περσεφόνη» τη χαμηλότερη.

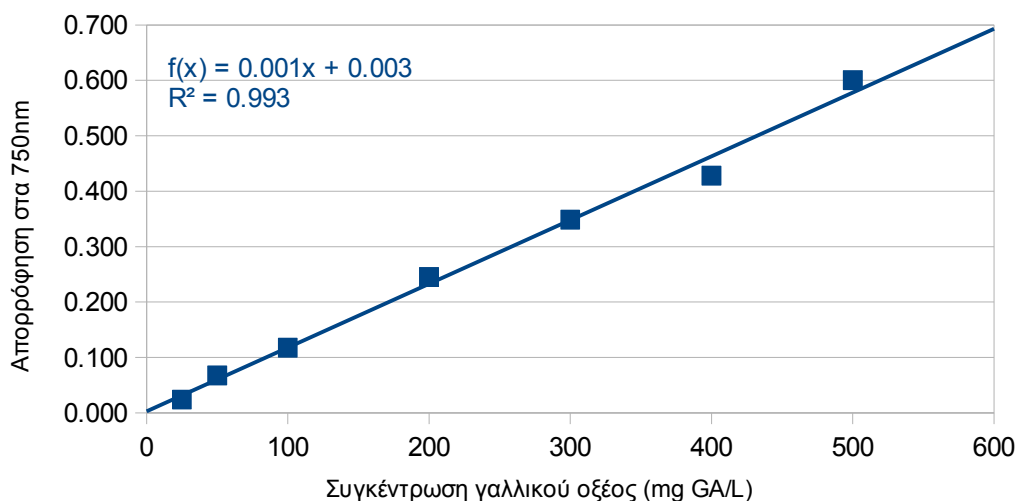
Συμπερασματικά, οι δύο νέες ελληνικές ποικιλίες ροδιών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή χυμών με υψηλή διατροφική αξία, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας αυτών σε φαινολικά συστατικά και της υψηλής antiradical τους ισχύος.

Αξιοσημείωτο, επίσης, είναι ότι ο οίνος ροδιού βρέθηκε να έχει υψηλότερη antiradical ικανότητα σε συνδυασμό με υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο από τον ερυθρό οίνο, οπότε με δεδομένο ότι έχουν παραχθεί με τις ίδιες συνθήκες οινοποίησης εκτιμάται ότι ο οίνος από ρόδι θα μπορούσε να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα πρόταση για την οικονομική εκμετάλλευση των ροδιών.

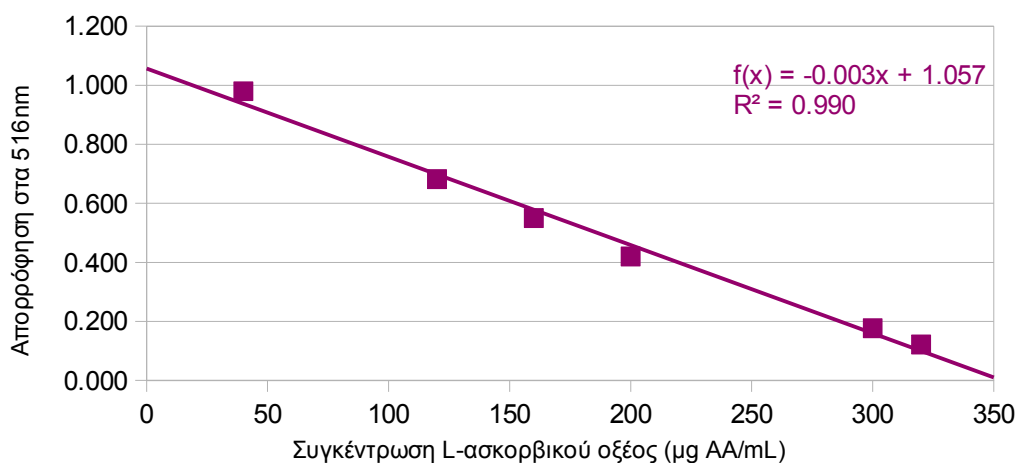
Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε μια μέθοδος GC-MS ανάλυσης για τον προσδιορισμό της σύστασης του φαινολικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα από τους χυμούς των ροδιών και στους οίνους. Δοκιμάστηκαν διαφορετικών τύπων υδρολύσεις με ισχυρή βάση και ισχυρό οξύ ώστε να γίνει η απαραίτητη “απελευθέρωση” των φαινολικών μορίων από τις γλυκοζυλιωμένες μορφές τους για την ακόλουθη ταυτοποίησή τους ως τριμεθυλοσιλυλοπαράγωγα μέσω της GC-MS ανάλυσης. Βάσει των φασμάτων μάζας αναγνωρίστηκαν οι δομές διάφορων φαινολικών μορίων στα υπό μελέτη δείγματα με τη βοήθεια ειδικών βιβλιοθηκών και σε σύγκριση με τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα μάζας μειγμάτων πρότυπων φαινολικών ενώσεων. Εξήχθη το συμπέρασμα πως οι χυμοί ροδιού από τις διαφορετικές ποικιλίες, όπως και τα δύο είδη οίνων, διαφέρουν ως προς τη σύσταση σε φαινολικές ενώσεις. Επιπλέον, φάνηκε πως ο τύπος της υδρόλυσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών ουσιών με GC-MS ανάλυση. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή διαδοχικών υδρολύσεων, βασικής και όξινης, ανιχνεύθηκαν περισσότερες φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα των χυμών ροδιού, συγκριτικά με την εφαρμογή βασικής και όξινης υδρόλυσης ξεχωριστά. Αντιθέτως, όσον αφορά τα δείγματα των οίνων, μεγαλύτερος αριθμός φαινολικών ενώσεων ανιχνεύθηκε μετά από την εφαρμογή βασικής υδρόλυσης.

Τέλος, παράλληλα με την GC-MS ανάλυση για τον προσδιορισμό της σύστασης των φαινολικών ενώσεων στα υπό μελέτη δείγματα (εκχυλίσματα από τους χυμούς ροδιών και οίνοι), πραγματοποιήθηκε HPLC-PDA-ESI-MSⁿ ανάλυση, ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω φαινολικές δομές μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Για το σκοπό αυτόν, συλλέχθηκαν τα πειραματικά δεδομένα από προηγούμενες μελέτες που έγιναν για την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων σε διάφορες μήτρες φυτικής προέλευσης, και κατασκευάστηκαν ειδικές βιβλιοθήκες με τη χρήση των οποίων έγινε η ανίχνευση φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα από τους χυμούς των ροδιών και στους οίνους. Αναλυτικότερα, στα εκχυλίσματα από χυμό ροδιού των ποικιλιών «Περσεφόνη», «Πορφυρογέννητη» και «Wonderful» ανιχνεύθηκαν, 14, 19 και 22 ανθοκυανιδινικές ενώσεις, αντίστοιχα. Στα ίδια δείγματα ανιχνεύθηκαν άνω των 30 επιπλέον ενώσεων που χαρακτηρίστηκαν ως μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις και οργανικά οξέα. Ο οίνος ροδιού και ο ερυθρός οίνος από σταφύλια περιείχαν αντιστοίχως, 9 και 23 ανθοκυανιδινικές ενώσεις, και άνω των 30 επιπλέον ενώσεων που χαρακτηρίστηκαν ως μη ανθοκυανιδινικές φαινολικές ενώσεις και οργανικά οξέα.

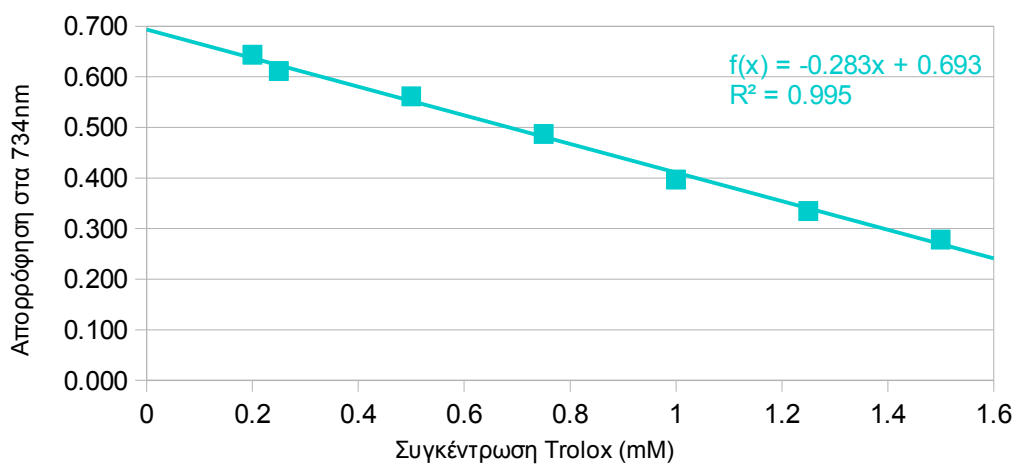
Παράρτημα



Σχήμα Π1: Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin-Ciocalteu.



Σχήμα Π2: Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του L-ασκορβικού οξέος (AA) για τη δοκιμή DPPH*.



Σχήμα Π3: Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας Trolox για τη δοκιμή ABTS**.

Αρκτικόλεξα, ακρωνύμια και ξενόγλωσσοι όροι

AAE	Ascorbic Acid Equivalents	Ισοδύναμα του ασκορβικού οξέος
AE	Antiradical Efficiency	Ικανότητα ενάντια στις ρίζες
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
ARP	Antiradical Power	Ισχύς ενάντια στις ρίζες
BHA	Butylated hydroxyanisole	Βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη
BHT	Butylated hydroxytoluene	Βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	N,O-δισ-(τριμεθυλ-σιλυλο)-τρι-φλουοοακεταμίδιο
CLnA	Conjugated Linolenic Acid	Συζευγμένο Λινολενικό Οξύ
DE	Diethyl ether	Διαιθυλαιθέρας
EA	Ethyl acetate	Οξικός αιθυλεστέρας
EC ₅₀	Efficient Concentration	Ικανή (απαραίτητη) Συγκέντρωση
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EI	Electron Impact	Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων
ESI	Electrospray Ionization	Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό
F–C	Folin–Ciocalteu	
FID	Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής Ιοντισμού Φλόγας
GAE	Gallic Acid Equivalents	Ισοδύναμα του γαλλικού οξέος
GC	Gas Chromatography	Αεριοχρωματογραφία
GRAS	Generally Recognized As Safe	Γενικώς Αναγνωρισμένος ως Ασφαλής
HDL	High Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες Υψηλής Πυκνότητας
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
LDL	Low Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες Χαμηλής Πυκνότητας
m/z	mass to charge	μάζα προς φορτίο
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
MS ⁿ		Πολλαπλές θραυσματοποιήσεις
MW	Molecular Weight	Μοριακό Βάρος
PDA	Photo-Diode Array	Ανιχνευτής Πολλαπλών Διόδων
RDA	Recommended Daily Allowance	Ημερήσια Συνιστώμενη Πρόσληψη

RNS	Reactive Nitrogen Species	Δραστικά Είδη Αζώτου
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικά Είδη Οξυγόνου
RP	Reversed Phase	Αντίστροφη φάση
RSA	Radical Scavenging Activity	Ικανότητα Σάρωσης της Ρίζας
Rt	Retention Time	Χρόνος κατακράτησης
SD	Stantard Deviation	Τυπική Απόκλιση
TBHQ	tert-Butylhydroquinone	Τριτοταγής βουτυλο-υδροκινόνη
TE	Trolox Equivalents	Ισοδύναμα του Trolox
TMCS	Trimethylchlorosilane	Τριμεθυλο-χλωροσιλάνιο
TPC	Total Phenolic Content	Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο
UAE	Ultrasound–Assisted Extraction	Εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων
UV	Ultraviolet	Υπέρυθρο
Vis	Visible	Ορατό
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
	Acid hydrolysis	Όξινη υδρόλυση
	Acid hydrolysis sequential	Όξινη υδρόλυση διαδοχική της βασικής
	Base hydrolysis	Βασική υδρόλυση
	plateau	πλατό
	antiradical	δραστικός ενάντια στις ρίζες
	Freeze drying	Λυοφιλοποίηση
	teinturier	βαμμένα
	superfood	υπερτροφή
	nature-identical antioxidants	αντιοξειδωτικά πανομοιότυπα των φυσικών
	phytonutrients	φυτοθρεπτικές ουσίες
	nutraceuticals	φαρμακοτρόφιμα

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Tiwari, B. K., Brunton, N. P., and Brennan, C. S. (2013). *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*, Wiley-Blackwell.
2. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., and Bono, A. (2007). Phytochemical antioxidants for health and medicine – A move towards nature. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(4): 97–104.
3. Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Sáez-Plaza, P., Muñoz, A. M., José Navas, M., and Asuero, A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2): 102–125.
4. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2007). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Wiley-Blackwell.
5. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14): 1818–92.
6. Acamovic, T., and Brooker, J. D. (2007). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(03): 403–412.
7. Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3): 153–177.
8. Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4): 1821–1835.
9. Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., and Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10): 2023–2044.
10. Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque A. L., and Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants, *Phytochemistry: Advances in Research 2006*. Research Signpost Publication, 105–135.
11. Naczk, M., and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2): 95–111.
12. Xu, B. J., and Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2): 159–166.
13. Crozier, A., Jaganath, I. B., and Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry,

- bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8): 1001–43.
14. Nour-Eddine Es-Safi (2012). Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties, *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Rao, V. (Ed.). InTech, 181–206.
 15. Wanasundara, P. K. J. P. D., and Shahidi, F. (2005). Antioxidants: Science, Technology, and Applications, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effect* (6.ed., v.1). John Wiley & Sons, Inc.. 431–489.
 16. Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841–56.
 17. Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6): 629–642.
 18. Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., and Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(6): 638–47.
 19. Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S., and Nema, R. K. (2009). Antioxidants : A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1): 102-104
 20. Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Dereli, U., and Özkan, M. (2013). Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. *Food Chemistry*, 138(2-3): 1810–8.
 21. Pereira, X., Souza, F., Guedes, J. R., Julianeli Tolentino, J. Luciano Augusto de Araújo, L. A., Quintans, L. J., and Barbosa, J. M. (2012). Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products, *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Rao, V. (Ed.). InTech, 1–21.
 22. Kaneria, M. J., Bapodara, M. B., and Chanda, S. V. (2011). Effect of Extraction Techniques and Solvents on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Leaf and Stem. *Food Analytical Methods*, 5(3): 396–404.
 23. Teixeira da Silva, J. A., Rana, T. S., Narzary, D., Verma, N., Meshram, D. T., and Ranade, S. A. (2013). Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*, 160: 85–107.
 24. Ismail, T., Sestili, P., and Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2): 397–405.
 25. Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2013). Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Scientia Horticulturae*, 159: 152–161.

26. Στυλιανίδης, Δ., Σιμώνης, Α., Σωτηρόπουλος, Θ., και Κουκουρίκου, Μ. (2009). Το δέντρο της ροδιάς. Ιστορία, Μύθοι, Λαϊκή παράδοση. *Νιάουστα*, 3: 30–34.
27. Joseph, M. M., Aravind, S. R., George, S. K., Varghese, S., and Sreelekha, T. T. (2013). A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. *Carbohydrate Polymers*, 98(2): 1466–75.
28. Akpınar-bayazit, A., Özcan, T., and Yılmaz-ersan, L. (2012). The Therapeutic Potential of Pomegranate and Its Products for Prevention of Cancer, *Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefits*, Dr. Alexandros G. Georgakilas (Ed.). InTech.
29. Türk, G., Sönmez, M., Aydın, M., Yüce, A., Gür, S., Yüksel, M., Aksu, E. H., Aksoy, H. (2008). Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clinical Nutrition*, 27(2): 289–96.
30. Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Wlesman, Z., Tripler, E., Bar-Ilan, I.a, Fromm, H., Borochoy-Neori, H., Holland, D., and Amir, R. (2009). Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19): 197–209.
31. Mena, P., Vegara, S., Martí, N., García-Viguera, C., Saura, D., and Valero, M. (2013). Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice. *Food Chemistry*, 141(3): 2122–2129.
32. Jbir, R., Hasnaoui, N., Mars, M., Marrakchi, M., and Trifi, M. (2008). Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. *Scientia Horticulturae*, 115(3): 231–237.
33. Mertens-Talcott, S. U., Jilma-Stohlawetz, P., Rios, J., Hingorani, L., and Derendorf, H. (2006). Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23): 8956–8961.
34. Ferrara, G., Cavoški, I., Pacifico, A., Tedone, L., and Mondelli, D. (2011). Morpho-pomological and chemical characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes in Apulia region, Southeastern Italy. *Scientia Horticulturae*, 130(3): 599–606.
35. Δρογούδη, Π., Βασιλακάκης, Μ., Θωμίδης, Θ., Ναβροζίδης, Ε., και Παντελίδης, Γ. (2012). *Εγχειρίδιο για την καλλιέργεια της ροδιάς*. Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός “Δήμητρα”, Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων.
36. Goula, A. M., and Adamopoulos, K. G. (2012). Processing A method for pomegranate seed application in food industries : Seed oil encapsulation. *Food and Bioproducts*, 90(4): 639–652.

37. Legua, P., Melgarejo, P., Abdelmajid, H., Martínez, J. J., Martínez, R., Ilham, H., Hafida, H., and Hernández, F. (2012). Total phenols and antioxidant capacity in 10 Moroccan pomegranate varieties. *Journal of Food Science*, 77(1): 115–20.
38. Wetzstein, H. Y., Ravid, N., and Wetzstein, M. E. (2011). Characterization of Attributes Related to Fruit Size in Pomegranate. *HortScience*, 46(6): 908–912.
39. Doymaz, İ. (2011). Prediction of Drying Characteristics of Pomegranate Arils. *Food Analytical Methods*, 5(4): 841–848.
40. Jaiswal, V., DerMarderosian, A., and Porter, J. R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*, 118(1): 11–16.
41. Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., and Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 40: 81–89.
42. Filannino, P., Azzi, L., Cavoski, I., Vincentini, O., Rizzello, C. G., Gobbetti, M., and Di, R. (2013). Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 163: 184–192.
43. Perati, P. R., De Borba, B., Rohrer, J. S. (2011). Fast Determination of Anthocyanins to Authenticate Pomegranate Juice. *LC-GC North America*, p29
44. Miguel, M. G., Neves, M. A., and Antunes, M. D. (2010). Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review. *Journal of Medicinal Plants*, 4(25): 2836–2847.
45. Neyrinck, A. M., Van Hée, V. F., Bindels, L. B., De Backer, F., Cani, P. D., and Delzenne, N. M. (2013). Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *The British Journal of Nutrition*, 109(5): 802–9.
46. Chauhan, R. D., and Kanwar, K. (2012). Biotechnological advances in pomegranate (*Punica granatum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(6): 579–594.
47. Lee, Y.-H., Hwang, E.-K., Baek, Y.-M., Lee, M.-S., Lee, D.-J., Jung, Y.-J., and Kim, H.-D. (2013). Deodorizing and antibacterial performance of cotton, silk and wool fabrics dyed with *Punica granatum* L. extracts. *Fibers and Polymers*, 14(9): 1445–1453.
48. Koppel, K., Chambers IV, E., Vázquez-Araújo, L., Timberg, L., Carbonell-Barrachina, T. A., and Suwonsichon, S. (2014). Cross-country comparison of pomegranate juice acceptance in estonia, spain, thailand, and united states. *Food Quality and Preference*,

31(1): 116–123.

49. Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S. M. A., and Askari, G. R. (2011). Comparing the Effects of Microwave and Conventional Heating Methods on the Evaporation Rate and Quality Attributes of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice Concentrate. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4): 1328–1339.
50. Fawole, O. A., Makunga, N. P., and Opara, U. L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12.
51. Middha, S.K., Usha, T. and Pande, V. (2013). A Review on Antihyperglycemic and Antihepatoprotective Activity of Eco-Friendly *Punica granatum* Peel Waste. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
52. Haghayeghi, K., Shetty, K., and Labbé, R. (2013). Inhibition of foodborne pathogens by pomegranate juice. *Journal of Medicinal Food*, 16(5): 467–470.
53. El Nemr, A. (2007). Pomegranate husk as an adsorbent in the removal of toxic chromium from wastewater. *Chemistry and Ecology*, 23(5): 409–425.
54. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., and Pérez-Álvarez, J. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5): 1217–1223.
55. Elbandy, M.A. and Ashoush, I.S. (2012). Phytochemicals in Pomegranate Seeds and Their Effect as Hypolipidemic Agent in Hypercholesterolemic Rats. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 7(1): 85–92.
56. Uçar, S. and Karagöz, S. (2009). The slow pyrolysis of pomegranate seeds: The effect of temperature on the product yields and bio-oil properties. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 84(2): 151–156.
57. Kim, N. D, Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., and Lansky, E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1(3): 203–17.
58. Facciola, S. (1990). *Cornucopia: a Source Book of Edible Plants*. Kampong Publications, 166-167.
59. Caleb, O.J., Opara, U.L. and Witthuhn, C.R. (2011). Modified Atmosphere Packaging of Pomegranate Fruit and Arils: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1): 15–30.
60. Köhler, F. E. (1887). *Medizinal Pflanzen*. Gera-Utermhaus.

61. Fawole, O. a. and Opara, U.L., (2013). Fruit growth dynamics, respiration rate and physico-textural properties during pomegranate development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 157: 90–98.
62. Zamani, Z., Fatahi, R., Mousavi, A., and Salami, S. A. (2013). A Mechanical Method of Determining Seed-Hardness in Pomegranate. *Journal of Crop Improvement*, 27(4): 444–459.
63. Fawole, O.A. and Opara, U.L., 2013. Harvest discrimination of pomegranate fruit: postharvest quality changes and relationships between instrumental and sensory attributes during shelf life. *Journal of food science*, 78(8): 1264–1272.
64. Adhami, V. M., Khan, N., and Mukhtar, H. (2009). Cancer chemoprevention by pomegranate: Laboratory and clinical evidence. *Nutrition and Cancer*, 61(6): 811–815.
65. Türkmen, İ. and Ekşi, A. (2011). Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food Chemistry*, 127(3): 1404–1407.
66. Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M., and Ferchichi, A. (2011). Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Journal of food science*, 76(5): 707–713.
67. Wang, Y., Zhang, H., Liang, H., and Yuan, Q. (2013). Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food chemistry*, 138(1): 437–43.
68. González-Molina, E., Moreno, D. a. and García-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(4): 1364–1372.
69. Mena, P., Diego, A.G. and Cristina, A.M. (2011). Pomegranate Fruit for Health Promotion : Myths and Realities. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 5(2): 33–42.
70. Caliskan, O. and Bayazit, S. (2012). Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Scientia Horticulturae*, 147:81–88.
71. Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., and Bassaganya-Riera, J. (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, Article ID 789764 .
72. Smrke, S. and Vovk, I. (2013). Comprehensive thin-layer chromatography mass spectrometry of flavanols from *Juniperus communis* L. and *Punica granatum* L. *Journal of chromatography. A*, 1289: 119–26.
73. Koppel, K. and Chambers IV, E. (2010). Development and Application of a Lexicon To Describe the Flavor of Pomegranate Juice. *Journal of Sensory Studies*, 25(6): 819–837.

74. Mayuoni-kirshinbaum, L., Tietel, Z., Porat, R., and Ulrich, D. (2012). Identification of aroma-active compounds in “wonderful” pomegranate fruit using solvent-assisted flavour evaporation and headspace solid-phase micro-extraction methods. *European Food Research and Technology*, 235(2): 277–283.
75. Karaaslan, M., Vardin, H., Varlıklöz, S., and Yılmaz, F. M. (2014). Antiproliferative and antioxidant activities of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1): 82–90.
76. Gil, M.I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., and Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10): 4581–9.
77. Fischer, U., Carle, R., and Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food chemistry*, 127(2): 807–21.
78. Zhang, L., Fu, Q. and Zhang, Y. (2011). Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(4): 1444–1449.
79. Al-Muammar, M.N. and Khan, F. (2012). Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*, 28(6): 595–604.
80. Box, P. O. (2013). Effect of sonication on anthocyanins , total phenolic content , and antioxidant capacity of pomegranate juices. *International Food Research Journal*, 20(4): 1703–1709.
81. Lu, J., Ding, K. and Yuan, Q. (2008). Determination of Punicalagin Isomers in Pomegranate Husk. *Chromatographia*, 68(3-4): 303–306. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-008-0699-y> [Accessed March 25, 2014].
82. Banihani, S., Swedan, S. and Alguraan, Z. (2013). Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition research* (New York, N.Y.), 33(5): 341–8.
83. Caleb, O. J., Opara, U. L., Mahajan, P. V., Manley, M., Mokwena, L., and Tredoux, A. G. J. (2013). Effect of modified atmosphere packaging and storage temperature on volatile composition and postharvest life of minimally-processed pomegranate arils (cvs. “Acco” and “Herskawitz”). *Postharvest Biology and Technology*, 79: 54–61.
84. Vázquez-Araújo, L., Koppel, K., Chambers IV, E., Adhikari, K., and Carbonell-Barrachina, A. A. (2011). Instrumental and sensory aroma profile of pomegranate juices from the USA: differences between fresh and commercial juice. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(2): 129–138.
85. Rosillo, M. A., Sánchez-Hidalgo, M., Cárdeno, A., Aparicio-Soto, M., Sánchez-Fidalgo, S.,

- Villegas, I., de la Lastra, C. A. (2012). Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 66(3): 235–42.
86. Yang, H., Qi, X., Lv, C., Deng, J., and Zhao, G. (2012). Identification of seven water-soluble non-storage proteins from pomegranate (*Punica granatum* Linn.) seeds. *Food science and technology international*, 18(4): 329–38.
 87. Vegara, S., Mena, P., Martí, N., Saura, D., and Valero, M. (2013). Approaches to understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices. *Food chemistry*, 141(3): 1630–6.
 88. Boggia, R., Casolino, M. C., Hysenaj, V., Oliveri, P., and Zunin, P. (2013). A screening method based on UV-Visible spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices. *Food chemistry*, 140(4): 735–41.
 89. Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., and Del Rio, D. (2012). Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSⁿ. *Molecules*, 17(12): 14821-14840.
 90. Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., and Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *The Journal of nutrition*, 136(10): 2481–2485.
 91. Bonzanini, F., Bruni, R., Palla, G., Serlataite, N., and Caligiani, A. (2009). Identification and distribution of lignans in *Punica granatum* L. fruit endocarp, pulp, seeds, wood knots and commercial juices by GC–MS. *Food Chemistry*, 117(4): 745–749.
 92. Hernández, F., Melgarejo, P., Tomás-Barberán, F. A., and Artés, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, 210(1): 39–42.
 93. Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Toselli, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Caboni, M. F. (2013). Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 61(22): 5328–37.
 94. Borochoy-Neori, H., Judeinstein, S., Harari, M., Bar-Ya'akov, I., Patil, B. S., Lurie, S., and Holland, D. (2011). Climate effects on anthocyanin accumulation and composition in the pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit arils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10): 5325–34.
 95. Turfan, Ö., Türkyilmaz, M., Yemiş, O. and Özkan, M. (2012). Effects of Clarification and Storage on Anthocyanins and Color of Pomegranate Juice Concentrates. *Journal of Food*

96. Türkyılmaz, M. (2013). Anthocyanin and organic acid profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from registered varieties in Turkey. *International Journal of Food Science & Technology*, 48: 2086–2095.
97. Zhang, Y., Wang, D., Lee, R. P., Henning, S. M., and Heber, D. (2009). Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial Pomegranate extracts: implications for standardization and quality control. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16): 7395–4700.
98. Oziyici, H. R., Karhan, M., Tetik, N. and Turhan, I. (2013). Effects of processing method and storage temperature on clear pomegranate juice turbidity and color. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 899–906.
99. Varasteh, F., Arzani, K., Barzegar, M. and Zamani, Z. (2012). Changes in anthocyanins in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 130(2): 267–272.
100. Turfan, Ö., Türkyılmaz, M., Yemiş, O. and Özkan, M. (2011). Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry*, 129(4):1644–1651.
101. Hayrapetyan, H., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23(1): 66–72.
102. Laribi, A. I., Palou, L., Intrigliolo, D. S., Nortes, P. A., Rojas-Argudo, C., Taberner, V., Bartual, J., and Pérez-Gago, M. B. (2013). Effect of sustained and regulated deficit irrigation on fruit quality of pomegranate cv. “Mollar de Elche” at harvest and during cold storage. *Agricultural Water Management*, 125: 61–70.
103. Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., and Heber, D. (2005). *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(6): 360–7.
104. Sassano, G., Sanderson, P., Franx, J., Groot, P., van Straalen, J., and Bassaganya-Riera, J. (2009). Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(6):1046–1052.
105. Sen Gupta, S., Ghosh, S., Maiti, P., and Ghosh, M. (2012). Microencapsulation of conjugated linolenic acid-rich pomegranate seed oil by an emulsion method. *Food science and technology international*, 18(6): 549–558.

106. Soetjipto, H., Pradipta, M. and Timotius, K. H. (2010). Fatty Acids Composition of Red and Purple Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprvention*, 1(2): 74–77.
107. Parashar, A. (2010). Lipid Content and Fatty Acid Composition of Seed Oils from Six Pomegranate Cultivars. *International Journal of Fruit Science*, 10(4): 425–430.
108. Monsefi, M., Parvin, F. and Talaei-Khozani, T. (2012). Effects of pomegranate extracts on cartilage, bone and mesenchymal cells of mouse fetuses. *The British journal of nutrition*, 107(5): 683–90.
109. Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L., and Yu, L. (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chemistry*, 132(3): 1457–1464.
110. Opara, L. U., Al-Ani, M. R. and Al-Shuaibi, Y. S. (2008). Physico-chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 2(3): 315–321.
111. Al-Zoreky, N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*, 134(3): 244–8.
112. Ricci, D., Giamperi, L., Bucchini, A., and Fraternali, D. (2006). Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits.. *Fitoterapia*, 77(4): 310–2.
113. Cassano, A., Conidi, C., and Drioli, E. (2011). Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *Journal of Food Engineering*, 107(3-4): 366–373.
114. Sentandreu, E., Cerdán-Calero, M., and Sendra, J. M. (2013). Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1): 32–40.
115. Fawole, O. A., Opara, U. L., and Theron, K. I. (2011). Chemical and Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Three Pomegranate Cultivars Grown in South Africa. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7): 2934–2940.
116. Mansour, S. W., Sangi, S., Harsha, S., Khaleel, M. A. and Ibrahim, A. R. N. (2013). Sensibility of male rats fertility against olive oil, Nigella sativa oil and pomegranate extract. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(7): 563–568.
117. Stowe, C.B. (2011). The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complementary therapies in clinical practice*, 17(2): 113–5.
118. Parsaeyan, N., Mozaffari-Khosravi, H., and Mozayan, M. R. (2012). Effect of pomegranate juice on paraoxonase enzyme activity in patients with type 2 diabetes. *Journal of diabetes*

and metabolic disorders, 11(1): 11.

119. Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., and Erim F. B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(3): 873–877.
120. Shema-Didi, L., Sela, S., Ore, L., Shapirom, G., Geron, R., Moshem, G., and Kristal, B. (2012). One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: a randomized placebo-controlled trial. *Free radical biology and medicine*, 53(2): 297–304.
121. Lynn, A., Hamadeh, H., Leung, W. C., Russell, J. M., and Barker, M. E. (2012). Effects of pomegranate juice supplementation on pulse wave velocity and blood pressure in healthy young and middle-aged men and women. *Plant foods for human nutrition* (Dordrecht, Netherlands), 67(3): 309–14.
122. Tsang, C., Smail, N. F., Almoosawi, D., Davidson, I., and Al-Dujaili, E. A. S. (2012). Intake of polyphenol-rich pomegranate pure juice influences urinary glucocorticoids, blood pressure and homeostasis model assessment of insulin resistance in human volunteers. *Journal of Nutritional Science*, 1:9.
124. Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Syed, D. N., Lall, R. K., and Mukhtar, H. (2012). Oral infusion of pomegranate fruit extract inhibits prostate carcinogenesis in the TRAMP model. *Carcinogenesis*, 33(3): 644–51.
125. Robledo, A., Aguilera-Carbó, A., Rodriguez, R., Martinez, J. L., Garza, Y., and Aguilar, C. N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 35(6): 507–13.
126. Zhuang, H., Du, J., and Wang, Y. (2011). Antioxidant capacity changes of 3 cultivar Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and corresponding wines. *Journal of food science*, 76(4): 606–611.
127. Rosillo, M.A., Sánchez-Hidalgo, M., Cárdeno, A., Aparicio-Soto, M., Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., and de la Lastra, C. A. (2012). Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 66(3): 235–42.
128. Δρογούδη, Π., Τσιπουρίδης, Κ. και Πανταζής, Σ. (2007). Η καλλιέργεια της ροδιάς. *Γεωργία - Κτηνοτροφία*, 1:24–29.
129. Acevedo De la Cruz, A., Hilbert, G., Rivière, C., Mengin, V., Ollat, N., Bordenave, L., Decroocq, S., Delaunay, J. C., Delrot, S., Mérillon, J. M., Monti, J. P., Gomès, E., and

- Richard, T. (2012). Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC-MS and LC-NMR. *Analytica chimica acta*, 732: 145–52.
130. van de Wiel, A., van Golde, P. H., and Hart, H. C. (2001). Blessings of the grape. *European Journal of Internal Medicine*, 12(6): 484–489.
 131. Borges, G. and Crozier, A. (2012). Short communication HPLC – PDA – MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages. *Food Chemistry*, 135(3): 1863–1867.
 132. Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., and Hann, S. (2010). LC–MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*, 122(1): 366–372.
 133. Rastija, V. and Srećnik, G. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, 115(1): 54–60.
 134. Aznar, O., Checa, A., Oliver, R., Hernández-Cassou, S., and Saurina, J. (2011). Determination of polyphenols in wines by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *Journal of separation science*, 34(5): 527–35.
 135. Monagas, M., Bartolomé, B. and Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(2): 85–118.
 136. Picariello, G., Ferranti, P., Garro, G., Manganiello, G., Chianese, L., Coppola, R., and Addeo, F. (2014). Profiling of anthocyanins for the taxonomic assessment of ancient purebred *V. vinifera* red grape varieties. *Food chemistry*, 146: 15–22.
 137. He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., and Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(2): 1571–601.
 138. Serrano-Lourido, D., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., and Checa, A. (2012). Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. *Food chemistry*, 135(3): 1425–31.
 139. Chen, G., Zhang, M., Pang, M., Hou, X., Su, H., and Zhang, J. (2012). Extracts of *Punica granatum* Linne husk as green and eco-friendly corrosion inhibitors for mild steel in oil fields. *Research on Chemical Intermediates*, 39(8): 3545–3552.
 140. King, R. E., Bomser, J. A. and Min, D. B. (2015). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 65–70
 141. García-Beneytez, E., Cabello, F. and Revilla, E. (2003). Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(19): 5622–

142. Cui, Y., Li, Q., Liu, Z., Geng, L., Zhao, X., Chen, X., and Bi, K. (2012). Simultaneous determination of 20 components in red wine by LC-MS: application to variations of red wine components in decanting. *Journal of separation science*, 35(21): 2884–91.
143. Teissedre, P.-L. and Landrault, N. (2000). Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*, 33(6): 461–467.
144. Andreu-Sevilla, A. J., Mena, P., Martí, N., Viguera, C. G., and Carbonell-Barrachina, A. A. (2013). Volatile composition and descriptive sensory analysis of pomegranate juice and wine. *Food Research International*, 54(1): 246–254.
146. Wasila, H., Wasila, H., Li, X., Liu, L., Ahmad, I., and Ahmad, S. (2013). Peel effects on phenolic composition, antioxidant activity, and making of pomegranate juice and wine. *Journal of food science*, 78(8): 1166–1172.
147. Mena, P., Ascacio-Valdés, J. A., Gironés-Vilaplana, A., Del Rio, D., Moreno, D. A., García-Viguera, C. (2014). Assessment of pomegranate wine lees as a valuable source for the recovery of (poly)phenolic compounds. *Food chemistry*, 145: 327–34.
148. Κωμαΐτης, Μ.Ε. (1998). Ειδικά Κεφάλαια Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις.
149. Μπόσκου, Δ.Γ. (2002). Στοιχεία Τεχνολογίας Τροφίμων. Θεσσαλονίκη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις.
150. Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., and Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3): 1523–1527.
151. Middha, S.K., Usha, T. and Pande, V. (2013). HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from *Punica granatum* Fruit Peel. *Advances in pharmacological sciences*, 2013, Article ID 296236.
152. Khoddami, A., Wilkes, M. A., and Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(2): 2328–75.
153. Fu, Q., Zhang, L., Cheng, N., Jia, M., and Zhang, Y. (2013). Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers. *Food and Bioproducts Processing*.
154. Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., and Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4): 986–993.
155. Tirzitis, G. and Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity:

- basic principles and new insights. *Acta biochimica Polonica*, 57(2): 139–42.
156. Craft, B.D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., and Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2): 148–173.
 157. Böhm, V., and Schlesier, K. (2004). Methods to Evaluate the Antioxidant Activity, *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. Springer Netherlands, 55–71
 158. Çam, M., Hışıl, Y. and Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3): 721–726.
 159. Rajasekar, D., Akoh, C. C., Martino, K. G., and MacLean, D. D. (2012). Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia. *Food Chemistry*, 133(4): 1383–1393.
 160. Piljac, J., Martinez, S. and Valek, L. (2005). A Comparison of Methods Used to Define the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Croatian Wines. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3): 271–276.
 161. Nenadis, N. and Tsimidou, M. (2002). Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12): 1191–1195.
 162. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25–30.
 163. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211–219.
 164. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4): 407–12.
 165. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231–1237.
 166. El Kar, C., Ferchichi, A., Attia, F., Bouajila, J. (2011). Pomegranate (*Punica granatum*) juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. *Journal of food science*, 76(6): 795–800.
 167. Βαλαβανίδης, Α. (2006). Φασματομετρία Μαζών, *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων*.

168. Liu, Z. and Rochfort, S. (2013). A fast liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for quantification of major polar metabolites in plants. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 912: 8–15.
169. Ross, K. A., Beta, T. and Arntfield, S. D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113(1): 336–344.
170. Tura, D. and Robards, K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975(1): 71–93.
171. Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C., and Hankemeier, T. (2011). Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics*, 7(3): 307–328.
172. Xu, G., Liua, D., Chena, J., Yea, X., Maa, Y., and Shic, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2): 545–551.
173. Trigui, M., Hsouna, A. B., Tounsi, S., and Jaoua, S. (2013). Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41: 150–157.
174. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18): 3268–3295.
175. Roy, P., Amdekar, S., Kumar, A., and Singh, V. (2011). Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *BMC complementary and alternative medicine*, 11: 69.
176. Chai, C., Ju, H. K., Kim, S. C., Park, J. H., Lim, J., Kwon, S. W., and Lee, J. (2012). Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation of their bioactivities. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 880(1): 42–9.
177. Lutz, N. W., Sweedler, J. V., and Wevers, R. A. (2013). *Methodologies for Metabolomics: Experimental Strategies and Techniques*. Cambridge: Cambridge University Press.
178. Gruz, J., Novák, O. and Strnad, M. (2008). Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 111(3): 789–794.
179. Liang, N.-N., Pan, D.-H., He, F., Wang, J., Reeves, M. J., and Duan, C.-Q. (2013). Phenolic profiles of *Vitis davidii* and *Vitis quinquangularis* species native to China. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(25): 6016–6027.

180. Fawole, O. A. and Opara, U. L. (2013). Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. Ruby) fruit at five maturity stages. *Scientia Horticulturae*, 150: 37–46.
181. Di Nunzio, M., Toselli, M., Verardo, V., Caboni, M. F., and Bordoni, A. (2013). Counteraction of oxidative damage by pomegranate juice: influence of the cultivar. *Journal of the science of food and agriculture*, 93(14): 3565–73.
182. Fawole, O.A. and Opara, U.L. (2013). Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. “Bhagwa”). *South African Journal of Botany*, 85: 23–31.
183. Sepúlveda, E., Sáenz, C., Pena, A., Robert, P., Bartolomé, B., and Gómez-Cordovés, C. (2010). Influence of the genotype on the anthocyanin composition , antioxidant capacity and color of chilean pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(1): 50–57.
184. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., and Vazifeshenas, M. R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126(2): 180–185.
185. Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., and Khodaparast, M. H. H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, 115(4): 1274–1278.
186. Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., and Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(10): 1893–906.
187. Pala, Ç. U. and Toklucu, A. K. (2011). Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6): 790–795.
188. Calani, L., Beghè, D., Mena, P., Del Rio, D., Bruni, R., Fabbri, A., Dall'Asta, C. and Galaverna, G. (2013). Ultra-HPLC–MSn (Poly)phenolic Profiling and Chemometric Analysis of Juices from Ancient *Punica granatum* L. Cultivars: A Nontargeted Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23): 5600–5609.
189. Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
190. Rupasinghe, H. P. V. and Clegg, S. (2007). Total antioxidant capacity, total phenolic

- content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2): 133–137.
191. Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., and Durán, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82(3): 409–416.
192. Soria, A.C. and Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7): 323–331.
193. Petridis, A., Koukourikou, M., Sotiropoulos, T., and Stylianidis, D. (2010). Antioxidant Activity of Fruits Produced in Northern Greece. *HortScience*, 45: 1341–1344.
194. Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., and Amir, R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23): 9559–70.
195. Sentandreu, E., Navarro, J. L., and Sendra, J. M. (2011). Identification of New Coloured Anthocyanin–Flavanol Adducts in Pressure-Extracted Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 5(4): 702–709.

