



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ - ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΤΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ 2D-NMR ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ
ΜΟΝΟΠΟΙΚΙΛΙΑΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΤΗΣ ΖΑΚΥΝΘΟΥ**

**ΚΑΚΟΛΥΡΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΤΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ 2D-NMR ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ
ΜΟΝΟΠΟΙΚΙΛΙΑΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΤΗΣ ΖΑΚΥΝΘΟΥ**

ΚΑΚΟΛΥΡΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

A.M.: 41602

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Λιούνη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λιούνη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μαγιάτης Προκόπης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κοΐνης Σπύρος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 20/06/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της ρεσβερατρόλης και του παραγώγου της, γλυκοζίτη της ρεσβερατρόλης, που απαντώνται στον οίνο, με μία νέα μέθοδο προσδιορισμού με χρήση φασματοσκοπίας NMR. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η ολική συγκέντρωση της trans-ρεσβερατρόλης (trans-ρεσβερατρόλη και γλυκοζίτης trans-ρεσβερατρόλης) σε διάφορους μονοποικιλιακούς οίνους που παράγονται στη Ζάκυνθο. Αναλύθηκαν τέσσερις τοπικές ποικιλίες σταφυλιών και συγκρίθηκαν με βάση την ποικιλία, το κλίμα και το υψόμετρο.

Η trans-ρεσβερατρόλη είναι μία στιλβеноειδής ένωση φυτικής προέλευσης που ανήκει στην κατηγορία των φυτοαλεξινών και χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Βρίσκεται κυρίως σε διάφορα μέρη του φυτού της αμπέλου όπου από εκεί περνά στον οίνο και η παραγωγή της είναι αυξημένη υπό συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες.

Για τον προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης, αρχικά έγινε απομόνωση του φαινολικού κλάσματος του οίνου με τη βοήθεια στήλης πακεταρισμένης με ρητίνη ιονανταλλαγής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με χρήση φασματοσκοπίας NMR. Πρώτα, έγινε λήψη των φασμάτων NMR μίας διάστασης (^1H -NMR), αλλά λόγω της πολυπλοκότητάς τους που δυσκολεύουν τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση της ένωσης μας χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (^1H - ^1H COSY), ώστε να μπορούμε να προσδιορίσουμε την ολική ποσότητά της χωρίς την παρουσία άλλων σημάτων που αλληλεπικαλύπτονται με το δικό της. Αφού ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές με βάση τη συχνότητα συντονισμού, έγινε επεξεργασία των φασμάτων με κατάλληλο λογισμικό.

Η τεχνική ανάλυσης NMR μίας και δύο διαστάσεων μπορεί να δώσει μία πολύ καλή εικόνα για την ολική συγκέντρωση της trans-ρεσβερατρόλης, καθώς επίσης και πληροφορίες για τη σύσταση του οίνου σε φαινολικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως «δακτυλικό αποτύπωμα» για την ταυτοποίηση της κάθε ποικιλίας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ποσοτικός προσδιορισμός ρεσβερατρόλης, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ρεσβερατρόλη, Γλυκοζίτης ρεσβερατρόλης, Μονοποικιλιακοί οίνοι Ζακύνθου, Φασματοσκοπία NMR, Ποσοτική ανάλυση.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the quantitative analysis of resveratrol and its derivative piceid found in wine with a new method of determination using NMR Spectroscopy. In particular, the total concentration of trans-resveratrol (trans-resveratrol and trans-piceid) was determined in various unicellular wines produced in Zakynthos. Four local grape varieties were analyzed and compared based on variety, climate and altitude.

Trans-resveratrol is a stilbenoid compound of plant origin belonging to the category of phytoalexins and is characterized by increased anti-oxidative and anti-inflammatory action. It's mainly found in various parts of the vineyard plant from where it's transferred to the wine and its production is increased under conditions of biotic and abiotic stress.

In order to determine the resveratrol, initially the phenolic fraction of the wine was isolated by means of a column packed with an ion-exchange resin. Next analysis was performed using NMR spectroscopy. First, were obtained one-dimensional NMR spectra (^1H -NMR) but due to their complexity that makes it difficult to determine and quantitatively analyze our compound was used a two-dimensional NMR spectroscopy (^1H - ^1H COSY) in order to determine its total amount without the presence of other overlapping signals. After the identification of peaks based on the resonance frequency, the phases were processed with the appropriate software.

The one-dimensional and two-dimensional NMR analysis techniques can give a very good picture of the total concentration of trans-resveratrol as well as information about the composition of the wine concerning phenolic substances which can serve as a «fingerprint» for the identification of each variety.

SUBJECT AREA: Quantitative analysis of resveratrol, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

KEYWORDS: Resveratrol, Piceid, Unicellular wines of Zakynthos, NMR Spectroscopy, Quantitative analysis.

Στους γονείς μου και στους λίγους πραγματικούς μου φίλους.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τα άτομα εκείνα που συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Κατά κύριο λόγο θα ήθελα να εκφράσω εγκάρδιες ευχαριστίες στην επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τομέα Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ Μ. Λιούνη που με ενέπνευσε να γνωρίσω το θαυμαστό κόσμο της οινολογίας. Επίσης, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία αυτή, τις πολύτιμες συμβουλές και σημαντικές υποδείξεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ Π. Μαγιάτη και την Ε.Δι.Π. του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ Ε. Μέλιου για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχαν κατά την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους και κυρίως όσον αφορά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς επίσης και τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του Εργαστηρίου του Κου Μαγιάτη για την αμέριστη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των φασματοσκοπικών μετρήσεων NMR.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του ΠΔΑ Η. Νεραντζή για την επιλογή του συγκεκριμένου θέματος καθώς και τις πολύτιμες πληροφορίες που μου παρείχε.

Ακόμα, ευχαριστώ το οινοποιείο του Ν. Αφianές για την προσφορά δειγμάτων οίνων γνωστής συγκέντρωσης ρεσβερατρόλης για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου που αναπτύξαμε, καθώς επίσης και τα οινοποιεία Κλήμα Γράμψα των Τ. Γράμψα και Χ. Γράμψα και Τέχνη και Οίνος του Γ. Γιατρά Γκούμα για την προσφορά των δειγμάτων οίνων που αναλύσαμε.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω μέσα απ' την καρδιά μου τους γονείς μου για τη ψυχολογική και όχι μόνο υποστήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	23
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΦΥΤΟΑΛΕΞΙΝΕΣ	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΣΤΙΛΒΕΝΟΕΙΔΗ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ.....	33
4.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	33
4.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ	37
4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	39
4.3.1 ΑΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	39
4.3.2 ΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	40
4.4 ΠΗΓΕΣ	41
4.5 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ - ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ	42
4.6 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	43
4.6.1 ΚΑΡΔΙΑ	47
4.6.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	49
4.6.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2	53
4.6.4 ΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΞΑΣΘΕΝΙΣΗ	54
4.6.5 ΜΑΚΡΟΖΩΙΑ	56
4.6.6 ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	57
4.7 ΑΣΦΑΛΕΙΑ	60
4.7.1 ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	60
4.7.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	61
4.7.3 ΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ ΣΕ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	62
4.8 ΧΡΗΣΕΙΣ	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR.....	63
5.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ NMR	63
5.2 ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ SPIN	64
5.3 ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΡΟΠΗ.....	66
5.4 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	67
5.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ (ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ)	68
5.6 ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ NMR.....	69
5.7 ΦΑΣΜΑΤΑ NMR.....	73
5.7.1 ΦΑΣΜΑΤΑ 1D-NMR	73
5.7.2 ΦΑΣΜΑΤΑ 2D-NMR	75
5.7.3 ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΖΑΚΥΝΘΟΥ.....	79
6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΝΗΣΙ	79
6.2 ΡΟΜΠΟΛΑ.....	81
6.3 ΓΟΥΣΤΟΛΙΔΙ	82
6.4 ΠΑΥΛΟΣ	82
6.5 ΑΥΓΟΥΣΤΙΑΤΗΣ.....	83
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	87
7.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ	87
7.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	87
7.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ	87
7.3.1 ΛΙΣΤΑ ΚΩΔΙΚΩΝ	87
7.3.2 ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	88
7.4 ΣΤΑΔΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....	90
7.4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΤΗΛΗΣ	90
7.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ	91

7.4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	92
7.4.4 ΕΚΠΛΥΣΗ ΣΤΗΛΗΣ	93
7.4.5 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗ	94
7.4.6 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ	95
7.4.7 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR	96
7.4.8 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	97
7.4.9 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	98
7.5 ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ ΠΡΑΞΕΙΣ	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	105
8.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	105
8.1.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR	105
8.1.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ^1H -NMR ΚΑΙ ^1H - ^1H COSY-NMR	105
8.1.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	119
8.1.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	121
8.2 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	122
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	131
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	132
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	133
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	135

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Η χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης (αριστερά) και της δ-βινιφερίνης (δεξιά).....	30
Σχήμα 2: Η χημική δομή του στιλβενίου	31
Σχήμα 3: Η φωτοκυκλοποίηση του στιλβενίου	31
Σχήμα 4: Η χημική δομή της αμπελοψίνης Α (πάνω) και της αμπελοψίνης Β (κάτω)...	32
Σχήμα 5: Οι χημικές δομές της trans- και cis-ρεσβερατρόλης και των γλυκοζιδίων τους	34
Σχήμα 6: Οι χημικές δομές του γλυκοζίτη της trans- (πάνω) και cis- (κάτω) ρεσβερατρόλης.....	34
Σχήμα 7: Ο φωτοϊσομερισμός της trans-ρεσβερατρόλης.....	35
Σχήμα 8: Συγκριτικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μετά από ακτινοβόληση της trans-ρεσβερατρόλης. 1) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μετά από ακτινοβόληση για 5 min στα 25 cm. 2) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μετά από ακτινοβόληση για 25 min στα 5 cm. 3) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μη-αναγνωρισμένου φωτοπροϊόντος ρεσβερατρόλης. Όπου, t: trans-ρεσβερατρόλη, c: cis-ρεσβερατρόλη και p: μη-αναγνωρισμένο φωτοπροϊόν.....	36
Σχήμα 9: Η χημική δομή του 2,4,6-τριυδροξυ-φαινανθρένιου.....	36
Σχήμα 10: Οι δύο κύριοι μηχανισμοί σχηματισμού ρίζας της ρεσβερατρόλης	47
Σχήμα 11: Οι δύο επιτρεπόμενες καταστάσεις spin ενός πρωτονίου	66
Σχήμα 12: Οι καταστάσεις spin ενός πρωτονίου απουσία και παρουσία μαγνητικού πεδίου	66
Σχήμα 13: Η διαδικασία ενεργειακής απορρόφησης ενός πρωτονίου κατά το φαινόμενο NMR	67
Σχήμα 14: Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων spin ως συνάρτηση της ισχύος του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου	67
Σχήμα 15: Η περιστροφική κίνηση μίας σβούρας υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου της Γης (αριστερά) και η περιστροφική κίνηση ενός πυρήνα οφειλόμενη στην επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (δεξιά)	68

Σχήμα 16: Η διαδικασία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Απορρόφηση πραγματοποιείται όταν $\nu=\omega$	69
Σχήμα 17: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών στοιχείων που απαρτίζουν τον φασματογράφο NMR.....	70
Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της θέσης υποδοχής ενός σωληνίσκου NMR	72
Σχήμα 19: Σχηματική απεικόνιση ενός ομοπυρηνικού πειράματος ^1H - ^1H COSY (αριστερά) και ενός φάσματος COSY με σήματα διαγώνιου D και κορυφές διασταύρωσης C (δεξιά).....	77
Σχήμα 20: Το φάσμα ^1H -NMR της ρεσβερατρόλης (D_2O , 600 MHz)	78
Σχήμα 21: Η χημική δομή της XAD-4	91
Σχήμα 22: Η χημική δομή της συριγγαλδεύδης	95
Σχήμα 23: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των προτύπων διαλυμάτων (MeOD, 400 MHz).....	105
Σχήμα 24: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των προτύπων διαλυμάτων σε μεγέθυνση (MeOD, 400 MHz)	106
Σχήμα 25: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT1 (MeOD, 400 MHz).	106
Σχήμα 26: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT1N (MeOD, 400 MHz).....	107
Σχήμα 27: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT1N σε μεγέθυνση (MeOD, 400 MHz).....	107
Σχήμα 28: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT2 (MeOD, 400 MHz)	108
Σχήμα 29: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz)	108
Σχήμα 30: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT4 (MeOD, 400 MHz)	109
Σχήμα 31: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW1A και NKZW2A (MeOD, 400 MHz).....	109
Σχήμα 32: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW3A και NKZW4A (MeOD, 400 MHz).....	110
Σχήμα 33: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW5A και NKZW6A (MeOD, 400 MHz).....	110
Σχήμα 34: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW7AN και NKZW8A (MeOD, 400 MHz).....	111

Σχήμα 35: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW9AN και NKZW10AN (MeOD, 400 MHz).....	111
Σχήμα 36: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των δειγμάτων οίνων του 2015 (MeOD, 400 MHz).....	112
Σχήμα 37: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των δειγμάτων οίνων του 2016 (MeOD, 400 MHz).....	112
Σχήμα 38: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW1A (MeOD, 400 MHz)	113
Σχήμα 39: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW2A (MeOD, 400 MHz)	113
Σχήμα 40: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW3A (MeOD, 400 MHz)	114
Σχήμα 41: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW4A (MeOD, 400 MHz)	114
Σχήμα 42: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW5A (MeOD, 400 MHz)	115
Σχήμα 43: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW6A (MeOD, 400 MHz)	115
Σχήμα 44: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW7AN (MeOD, 400 MHz).....	116
Σχήμα 45: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW8A (MeOD, 400 MHz)	116
Σχήμα 46: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW9AN (MeOD, 400 MHz).....	117
Σχήμα 47: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW10AN (MeOD, 400 MHz).....	117
Σχήμα Π1. Φάσμα ^1H -NMR του PROT1 (MeOD, 400 MHz)	133
Σχήμα Π2. Φάσμα ^1H -NMR του PROT1N (MeOD, 400 MHz)	133
Σχήμα Π3. Φάσμα ^1H -NMR του PROT2 (MeOD, 400 MHz).....	134
Σχήμα Π4. Φάσμα ^1H -NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz).....	134
Σχήμα Π5. Φάσμα ^1H -NMR του PROT4 (MeOD, 400 MHz)	134

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η βιοσύνθεση της trans-ρεσβερατρόλης.....	38
Εικόνα 2: Ο χάρτης της Ζακύνθου.....	79
Εικόνα 3: Οι ποικιλίες Ρομπόλα (πάνω αριστερά), Γουστολίδι (πάνω δεξιά), Παύλος (κάτω αριστερά) και Αυγουσιτιάτης (κάτω δεξιά).....	84
Εικόνα 4: Η μορφή της ρητίνης XAD-4	91
Εικόνα 5: Η διέλευση δείγματος οίνου από τη στήλη (αριστερά και κέντρο) και η παραλαβή του φαινολικού κλάσματος με μεθανόλη (δεξιά).....	92
Εικόνα 6: Η εξάτμιση του διαλύτη (μεθανόλη) από το φαινολικό κλάσμα με περιστροφικό εξατμιστήρα (αριστερά) και με αντλία κενού (δεξιά).....	93
Εικόνα 7: Το φαινολικό κλάσμα παρουσία (αριστερά) και απουσία (δεξιά) διαλύτη (μεθανόλη).....	93
Εικόνα 8: Στήλη με καθαρή ρητίνη πριν τη διέλευση δείγματος οίνου (αριστερά), μετά τη διέλευση λευκού οίνου (κέντρο) και μετά τη διέλευση ερυθρού οίνου (δεξιά)	94
Εικόνα 9: Η δημιουργία ιζήματος κατά την προσθήκη διαλύματος ακεταλδεύδης σε ακετονιτρίλιο.....	95
Εικόνα 10: Ένας σωληνίσκος NMR με το δείγμα φαινολικού κλάσματος (αριστερά) και ο φασματογράφος NMR 400 MHz (δεξιά)	96
Εικόνα 11: Η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων trans-ρεσβερατρόλης	99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά και ιδιότητες της ρεσβερατρόλης.....	33
Πίνακας 2: Η περιεκτικότητα σε trans-ρεσβερατρόλη ορισμένων προϊόντων αμπέλου. Παρουσιάζεται η μέση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή της σε 100 g ή ml προϊόντος.....	42
Πίνακας 3: Οι κβαντικοί αριθμοί spin ορισμένων κοινών πυρήνων.....	65
Πίνακας 4: Αντιστοίχιση κωδικών και αγνώστων δειγμάτων ή προτύπων διαλυμάτων.. ..	88
Πίνακας 5: Πληροφορίες δειγμάτων οίνων.....	89
Πίνακας 6: Παράμετροι λήψης φάσματος ^1H - ^1H COSY NMR.....	97
Πίνακας 7: Η ποσότητα απιονισμένου νερού για αραίωση και ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ανάλογα την περιεκτικότητα σε αιθανόλη.....	100
Πίνακας 8: Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των προτύπων διαλυμάτων.....	104
Πίνακας 9: Οι χημικές μετατοπίσεις των υδρογόνων της trans- και cis-ρεσβερατρόλη.....	118
Πίνακας 10: Οι κορυφές διασταύρωσης της trans- και cis- ρεσβερατρόλης.....	118
Πίνακας 11: Παρουσίαση αποτελεσμάτων των μετρήσεων των προτύπων διαλυμάτων.....	121
Πίνακας 12: Παρουσίαση αποτελεσμάτων των μετρήσεων των άγνωστων δειγμάτων.....	121
Πίνακας 13: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίες των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	131
Πίνακας 14: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	132

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Η καμπύλη αναφοράς της κορυφής διασταύρωσης (7.37,6.78)..... 120

Διάγραμμα 2. Η καμπύλη αναφοράς της κορυφής διασταύρωσης (6.78,7.37)..... 120

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Γενικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιομηχανική Χημεία - Οίνος και Αλκοολούχα Ποτά» του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ. Τα πειράματα απομόνωσης του φαινολικού κλάσματος και σύνθεσης των προτύπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οινολογίας του Τομέα Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ. Η εκτέλεση των μετρήσεων με φασματοσκοπία NMR πραγματοποιήθηκαν στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σπουδαιότητα του οίνου είναι γνωστή από αρχαιστάτους χρόνους. Πρώτοι οι αρχαίοι Έλληνες μελέτησαν τις ιδιότητές του και το συμπεριέλαβαν στα πέντε βασικά στοιχεία της διατροφής τους μαζί με το νερό, το αλάτι, το λάδι και τα δημητριακά. Αυτό παρότρυνε πολλούς ερευνητές να μελετήσουν σε βάθος τόσο τον οίνο όσο και το σταφύλι γενικότερα. Έτσι τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες που έχουν ως αντικείμενο μελέτης το σταφύλι και τον οίνο και συγκεκριμένα τη θρεπτική τους αξία και τα οφέλη τους στην ανθρώπινη υγεία.

Το σταφύλι όπως και ο οίνος είναι πλούσια σε σπουδαία συστατικά και ένα από αυτά είναι η ρεσβερατρόλη. Παρακάτω θα μάθουμε ορισμένες πληροφορίες για αυτή την ουσία, όπως το τι είδους ένωση είναι και σε τι μορφές υπάρχει, πως συντίθεται και από τι παράγοντες επηρεάζεται η βιοσύνθεση της, σε ποια τρόφιμα και σε τι συγκεντρώσεις βρίσκεται και πως απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό, και θα αναφερθούμε στη μεγάλη αξία και την τεράστια φαρμακευτική της δράση στην υγεία του ανθρώπου σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΦΥΤΟΑΛΕΞΙΝΕΣ

Οι φυτοαλεξίνες είναι ουσίες που συντίθενται από τα φυτά ως αποτέλεσμα μόλυνσης ή στρες. Η λέξη «φυτοαλεξίνη» αποτελείται από τα συνθετικά «φυτό» και «αλέξω», δηλαδή προστασία του φυτού. Είναι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις με αντιμικροβιακές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και συχνά αντιοξειδωτικές ιδιότητες. [1] Οι φυτοαλεξίνες είναι χημικώς ποικίλες ουσίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά για συγκεκριμένα είδη φυτών. Επειδή περιλαμβάνουν διάφορες κατηγορίες ενώσεων, όπως τα τερπENOειδή, τα γλυκοστεροειδή και τα αλκαλοειδή, οι ερευνητές επεκτείνουν τον ορισμό ώστε να συμπεριλάβουν όλα τα φυτοχημικά που αποτελούν μέρος του αμυντικού οπλοστασίου του φυτού. [2]

Οι φυτοαλεξίνες που παράγουν τα φυτά δρουν ως τοξίνες στον επιτιθέμενο οργανισμό. Μπορούν να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα, να καθυστερήσουν την ανάπτυξη, να διαταράξουν το μεταβολισμό ή να εμποδίσουν την αναπαραγωγή του εν λόγω παθογόνου παράγοντα. Το πόσο σπουδαίος είναι ο ρόλος τους στην άμυνα των φυτών φαίνεται από την αύξηση της επιδεκτικότητας σε μόλυνση του φυτού όταν αναστέλλεται η βιοσύνθεσή τους. Τα μεταλλαγμένα είδη φυτών δεν είναι ικανά να παράγουν φυτοαλεξίνες και παρουσιάζουν πιο εκτεταμένες προσβολές από παθογόνους οργανισμούς σε σύγκριση με τα φυσικά μη μεταλλαγμένα είδη. Επίσης, υπάρχουν παθογόνα που προσβάλουν συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές και είναι ικανά να αποικοδομούν τις φυτοαλεξίνες τους, γι' αυτό και είναι πιο μολυσματικά από τα υπόλοιπα παθογόνα. [3]

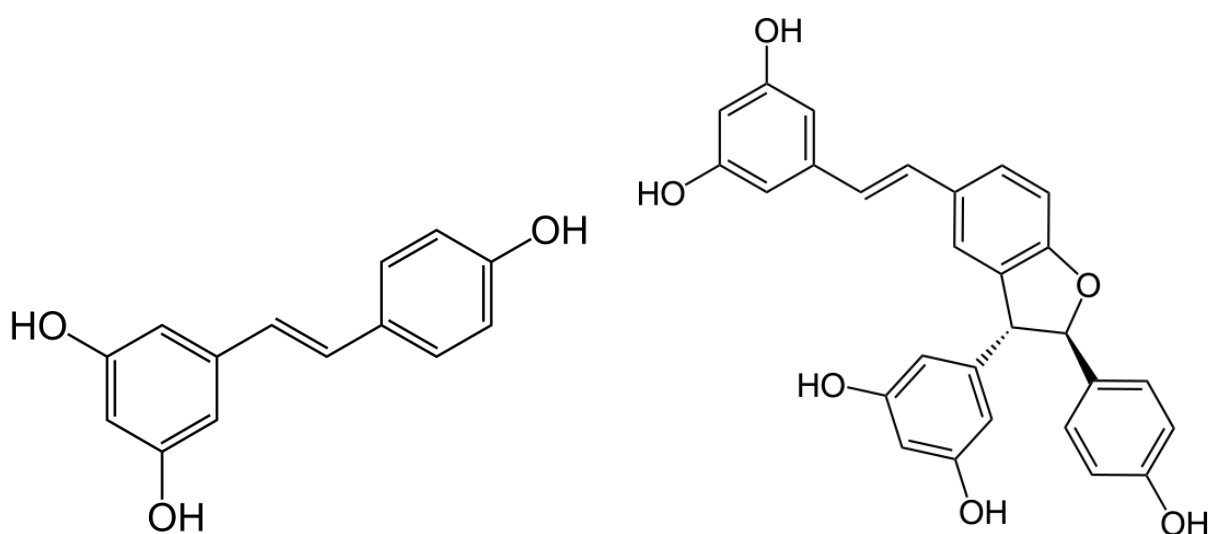
Οι φυτοαλεξίνες συσσωρεύονται γρήγορα στα φυτά σε περιοχές μόλυνσεως από παθογόνα. Η ταχύτητα της συσσώρευσης φυτοαλεξίνης συνδέεται με την ανθεκτικότητα του φυτού σε ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες και βακτήρια. Να αναφέρουμε ότι οι φυτοαλεξίνες είναι μόνο ένα μέρος των πολύπλοκων μηχανισμών άμυνας των φυτών στις ασθένειες. Έτσι όταν ένα φυτικό κύτταρο αναγνωρίζει έναν παθογόνο οργανισμό, το φυτό ξεκινά μια αντίσταση δύο επιπέδων, μια γενική βραχυπρόθεσμη απόκριση και μια καθυστερημένη ειδική μακροπρόθεσμη απόκριση. [1]

Κατά τη βραχυπρόθεσμη απόκριση, το φυτό παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species), όπως το σουπεροξειδίο (O_2^-) και το υπεροξειδίο (O_2^{2-}) του

υδρογόνου, για να εξοντώσουν τα εισβάλλοντα κύτταρα. Σημαντικό είναι ότι στο στάδιο αυτό τα κύτταρα που περιβάλλουν τη θέση της λοίμωξης οδηγούνται σε απόπτωση ή αλλιώς προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, προκειμένου να αποτραπεί η εξάπλωση του παθογόνου στο υπόλοιπο φυτό. [1]

Η μακροπρόθεσμη απόκριση ή αλλιώς συστηματική επίκτητη αντίσταση, περιλαμβάνει την επικοινωνία του κατεστραμμένου φυτικού ιστού με το υπόλοιπο μέρος του φυτού χρησιμοποιώντας φυτικές ορμόνες, όπως το ιασμονικό οξύ, το αιθυλένιο και το σαλικυλικό οξύ. Η λήψη του σήματος προκαλεί μια σειρά από αλλαγές στο εσωτερικό του φυτού, οι οποίες προκαλούν κωδικοποίηση γονιδίων υπεύθυνα για την προστασία από την περαιτέρω εισβολή των παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή φυτοαλεξινών. Συχνά, εάν οι ενώσεις του ιασμονικού οξέος ή το αιθυλένιο, που είναι ορμόνες σε αέρια μορφή, απελευθερώνονται από ένα φυτικό ιστό, τα γειτονικά φυτά παράγουν επίσης φυτοαλεξίνες σε απόκριση. [1]

Οι πολυφαινόλες, και ιδιαίτερα τα ισοφλαβονοειδή και οι παρόμοιες ουσίες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών έναντι των παθογόνων οργανισμών. Στο φυτό *Vitis vinifera* παράγονται διάφορες φυτοαλεξίνες. Μία από αυτές είναι η trans-ρεσβερατρόλη, η οποία συντίθεται σε περιπτώσεις ανάπτυξης παθογόνων μυκήτων, όπως ο *Botrytis cinerea*. [4] Μία άλλη φυτοαλεξίνη της αμπέλου είναι η δ-βινιφερίνη, η οποία είναι διμερές της ρεσβερατρόλης και συντίθεται μετά από μόλυνση του πρέμνου από το *Plasmopara viticola*, που είναι ένας ωομύκητας και ο αιτιώδης παράγοντας του περονόσπορου. [5]

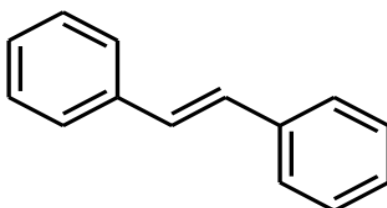


Σχήμα 1: Η χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης (αριστερά) και της δ-βινιφερίνης (δεξιά)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

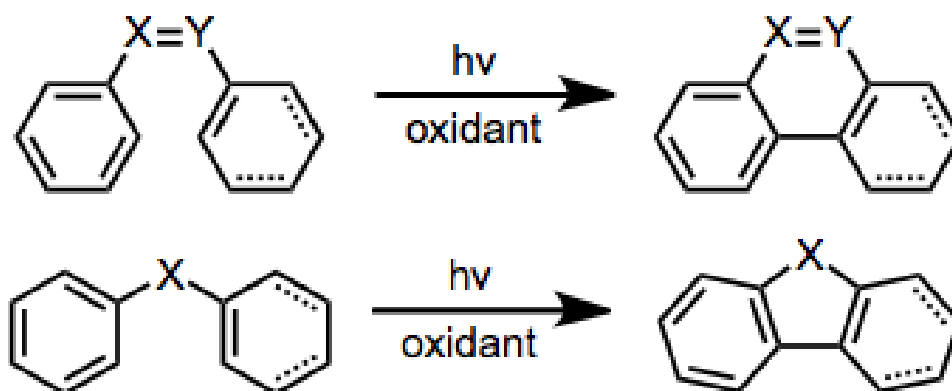
ΣΤΙΛΒΕΝΟΕΙΔΗ

Τα στιλβενοειδή είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα του στιλβενίου και έχουν μια δομή του τύπου C₆-C₂-C₆. Ανήκουν στην οικογένεια των φαινυλοπροπανοϊδών, η οποία είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που συντίθενται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. [6][7] Τα στιλβενοειδή παράγονται από φυτά και βακτήρια.



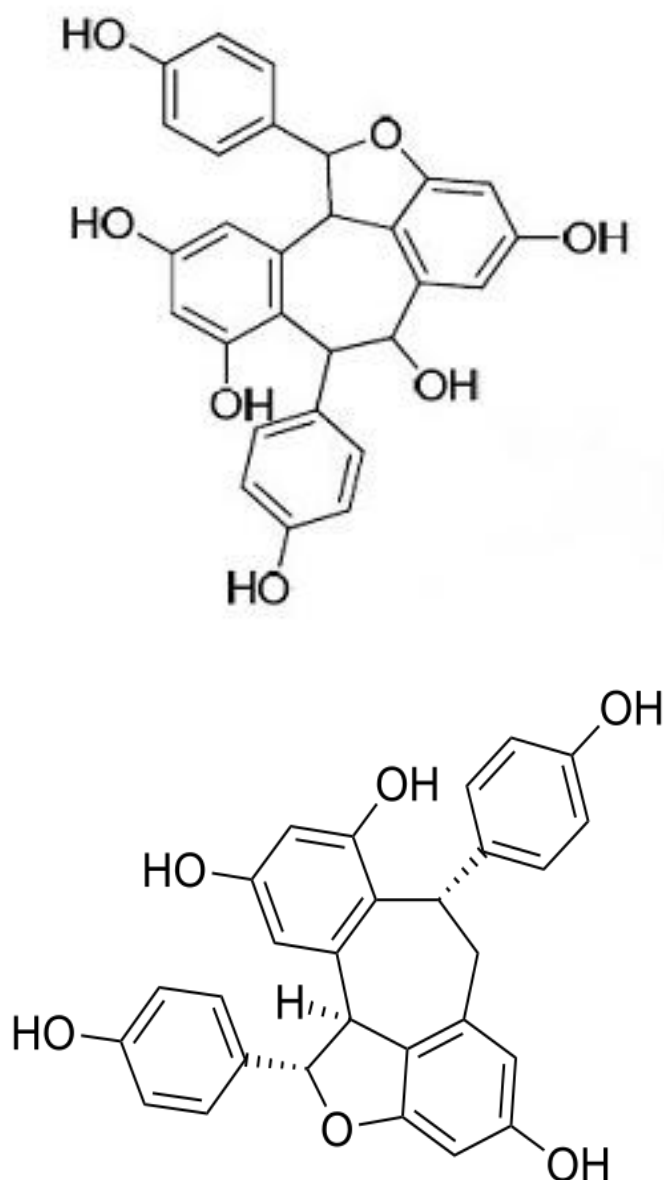
Σχήμα 2: Η χημική δομή του στιλβενίου

Υπό υπεριώδη ακτινοβολία, το στιλβένιο και τα παράγωγά του υφίστανται ενδομοριακή κυκλοποίηση, που ονομάζεται φωτοκυκλοποίηση στιλβενίου, για τον σχηματισμό φαινανθρενοειδών ενώσεων. [6][8] Η φωτοκυκλοποίηση του στιλβενίου είναι η σύζευξη δύο αρωματικών ανθράκων. Η αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό πολυκυκλικών αρωματικών και ετεροαρωματικών υδρογονανθράκων. [8] Επίσης, να αναφέρουμε ότι οι ολιγομερείς μορφές των στιλβενοειδών είναι γνωστές ως ολιγοστιλβενοειδή και ορισμένα μόρια είναι αρκετά μεγάλα για να θεωρηθούν πολυφαινόλες και αποτελούν μια κατηγορία ταννινών. [9]



Σχήμα 3: Η φωτοκυκλοποίηση του στιλβενίου

Υπάρχουν δύο τύποι στυλβενοειδών, οι αγλυκόνες και οι γλυκοζίτες. Στην πρώτη κατηγορία μεταξύ άλλων ανήκει και η trans-ρεσβερατρόλη, ενώ στην δεύτερη ο γλυκοζίτης της, ο οποίος είναι παράγωγο της trans-ρεσβερατρόλης. Τα στυλβενοειδή παράγονται σε διάφορα φυτά και ορισμένα μπορούν να δράσουν ως φυτοαλεξίνες. [6] Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η trans-ρεσβερατρόλη, που παράγεται από το φυτό *Vitis vinifera*, και η αμπελοψίνη A και B, οι οποίες είναι διμερή της ρεσβερατρόλης και παράγονται από το φυτό *Ampelopsis glandulosa*. [6][10]



Σχήμα 4: Η χημική δομή της αμπελοψίνης A (πάνω) και της αμπελοψίνης B (κάτω)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

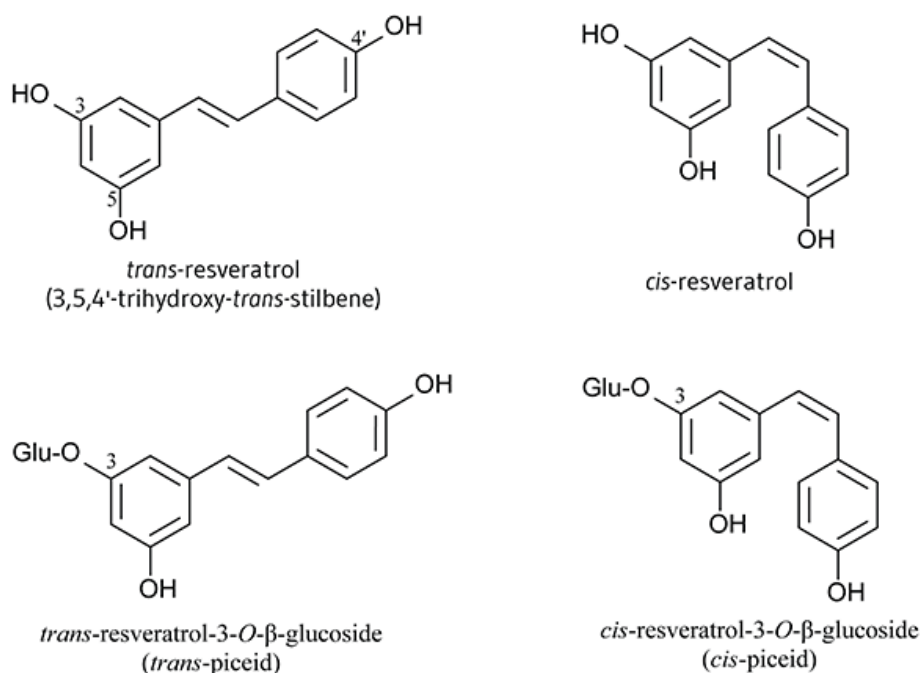
4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η ρεσβερατρόλη είναι μία φυσική πολυφαινόλη που ανήκει στα στιλβενοειδή, δηλαδή είναι ένα παράγωγο του στιλβενίου. [11] Η ρεσβερατρόλη είναι μια φυτοαλεξίνη που παράγεται από διάφορα φυτά ως απόκριση σε τραυματισμό ή προσβολή από παθογόνους οργανισμούς ή στρεσαρίσματος του φυτού. [12] Η πρώτη αναφορά της ρεσβερατρόλης έγινε σε ένα ιαπωνικό άρθρο του περιοδικού «Journal of the Chemical Society of Japan» με τίτλο «Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*» το 1939 από τον Michio Takaoka, ο οποίος την απομόνωσε από την ποικιλία *grandiflorum* του φυτού *Veratrum album*, που είχε συλλεχθεί από το νησί Hokkaido, και αργότερα το 1963 από τις ρίζες του φυτού *Falloria japonica*. [13] Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται μερικά στοιχεία για την ένωση αυτή.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά και ιδιότητες της ρεσβερατρόλης [14]

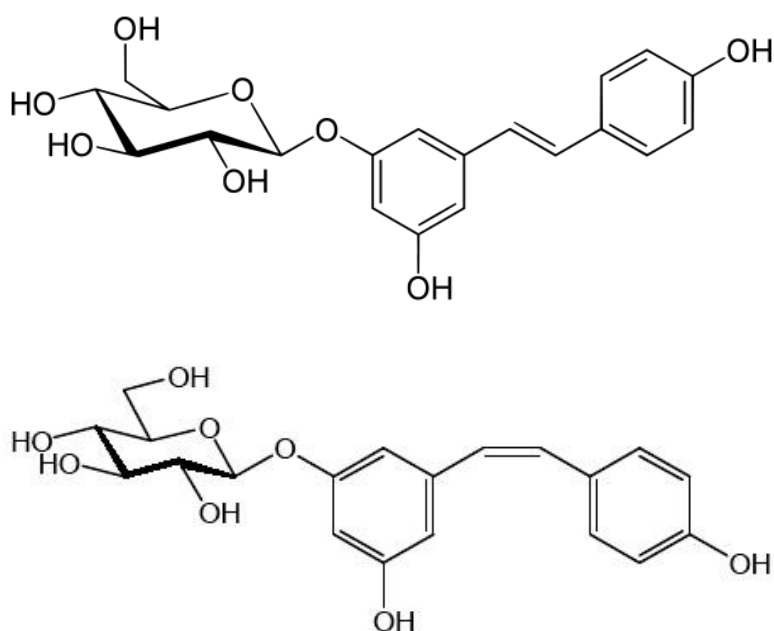
Ονοματολογία	3,5,4'-Trihydroxystilbene, 5-(p-Hydroxystyryl)resorcinol, 5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol, 3,4',5-Stilbenetriol
Συντακτικός τύπος	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Μοριακό βάρος	228.247 g/mol
Μορφή	λευκή σκόνη
Σημείο τήξης	261-263 °C
Διαλυτότητα σε νερό	0.03 g/L
Διαλυτότητα σε αιθανόλη	50 g/L
Φάσμα UV-Vis ($\lambda_{\max}$)	trans-resveratrol: 304nm, cis-resveratrol: 286nm (σε νερό)

Η ρεσβερατρόλη είναι μια λιποδιαλυτή ένωση και έχει δύο γεωμετρικά ισομερή, την cis-ρεσβερατρόλη και την trans-ρεσβερατρόλη. Αυτές οι δύο μορφές της ρεσβερατρόλης μπορεί να είναι είτε ελεύθερες είτε συνδεδεμένες με ένα μόριο γλυκόζης σχηματίζοντας τον γλυκοζίτη της cis- και trans-ρεσβερατρόλης. [15][16]



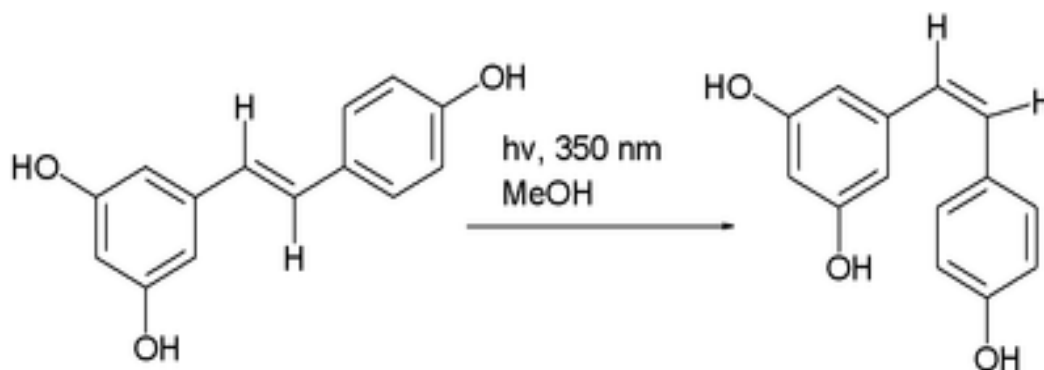
Σχήμα 5: Οι χημικές δομές της *trans*- και *cis*-ρεσβερατρόλης και των γλυκοζιτών τους

Ο γλυκοζίτης της ρεσβερατρόλης (piceid) είναι ένας στιλβενοειδής γλυκοζίτης και παράγωγο της ρεσβερατρόλης. Ο *trans*-γλυκοζίτης ρεσβερατρόλης σχηματίζεται από την *trans*-ρεσβερατρόλη και ο *cis*-γλυκοζίτης ρεσβερατρόλης από την *cis*-ρεσβερατρόλη. [17] Η ρεσβερατρόλη μπορεί να παραχθεί από τον γλυκοζίτη της όταν υποστεί ζύμωση από τον *Aspergillus oryzae*, ο οποίος είναι ένα είδος μύκητα που παράγει μια piceid-b-D-γλυκοσιδάση. [18][19]



Σχήμα 6: Οι χημικές δομές του γλυκοζίτη της *trans*- (πάνω) και *cis*- (κάτω) ρεσβερατρόλης

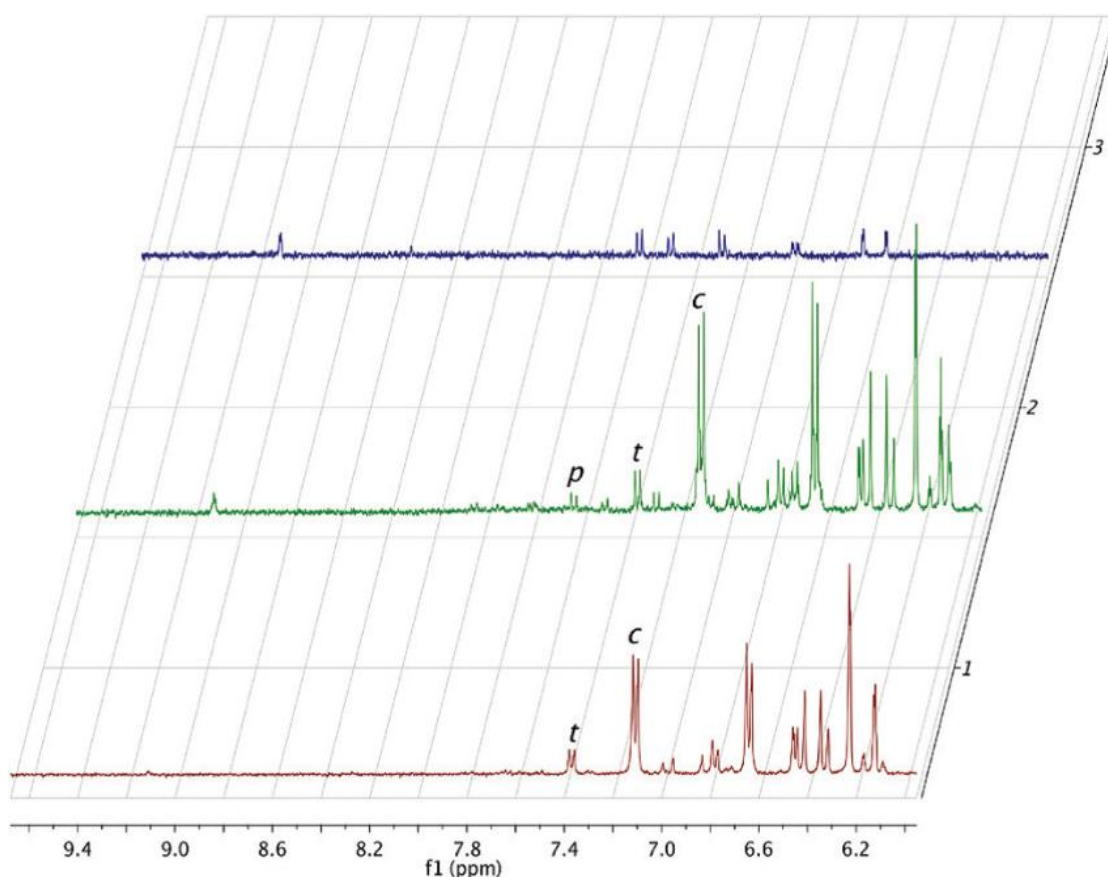
Από τα δύο στερεοϊσομερή της ρεσβερατρόλης, το *trans*-ισομερές είναι το πιο σταθερό και πιο άφθονο στη φύση, αλλά και τα δύο συνυπάρχουν σε διάφορες αναλογίες στον οίνο και σε άλλα τρόφιμα. [20] Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τη μέτρηση της απόλυτης και σχετικής ποσότητας των δύο ισομερών στα προϊόντα διατροφής και έχει βρεθεί ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη, υφίσταται ισομερισμό αλλάζοντας στην *cis*- μορφή όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. [20][21] Αυτή η διαδικασία ονομάζεται φωτοϊσομερισμός. [22]



Σχήμα 7: Ο φωτοϊσομερισμός της *trans*-ρεσβερατρόλης

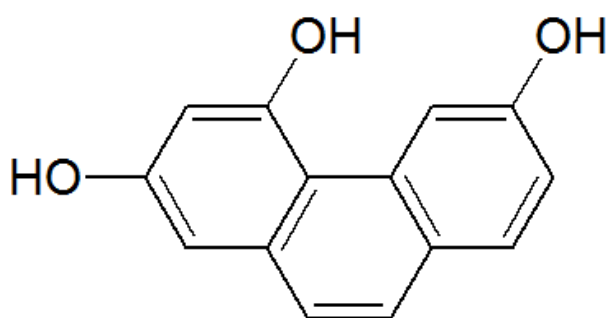
Σύμφωνα με έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολίας ενός διαλύματος *trans*-ρεσβερατρόλης και παρατηρήθηκε ότι η αντίδραση φωτοϊσομερισμού της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της αντίδρασης, όπως η πηγή της ενέργειας, η συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης, ο χρόνος ακτινοβολίας κλπ. Έτσι όταν επιδιώκεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της ρεσβερατρόλης μερικές φορές τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι αντιφατικά. [20]

Έχουν παραγματοποιηθεί διάφορες πειραματικές μελέτες για το φωτοϊσομερισμό της ρεσβερατρόλης. Οι Mark et al. μελέτησαν τον φωτοϊσομερισμό της ρεσβερατρόλης σε διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολίας. Σε σύντομο χρόνο ακτινοβολίας ανίχνευσαν δύο κορυφές με τη χαρακτηριστική μάζα της ρεσβερατρόλης (229,2 m/z) που αντιστοιχούσαν στα *trans* και *cis* ισομερή, αντίστοιχα. Σε μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβολίας εμφανίστηκε και μια τρίτη κορυφή που ξεχώρισε σημαντικά από εκείνες της *trans*- και *cis*- ρεσβερατρόλης. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, πρότειναν ότι το τρίτο φωτοπροϊόν είναι παράγωγο της ρεσβερατρόλης. Αυτό το άγνωστο φωτοπροϊόν απομονώθηκε και από τους López-Hernández et al. [20]



Σχήμα 8: Συγκριτικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μετά από ακτινοβόληση της *trans*-ρεσβερατρόλης. 1) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μετά από ακτινοβόληση για 5 min στα 25 cm. 2) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μετά από ακτινοβόληση για 25 min στα 5 cm. 3) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μη-αναγνωρισμένου φωτοπροϊόντος ρεσβερατρόλης. Όπου, t: *trans*-ρεσβερατρόλη, c: *cis*-ρεσβερατρόλη και p: μη-αναγνωρισμένο φωτοπροϊόν [20]

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η φωτοχημική δραστηριότητα της *trans*-ρεσβερατρόλης είναι πολύ πιο πολύπλοκη από έναν απλό ισομερισμό *trans-cis* και ότι η ακτινοβόληση της με υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί περαιτέρω φωτοχημική αντίδραση οδηγώντας στο φωτοχημικό μετασχηματισμό της σε μια νέα, εξαιρετικά φθορίζουσα ένωση. Η ένωση αυτή, χαρακτηρίστηκε ως 2,4,6-τριυδροξυ-φαινανθρένιο. [20]



Σχήμα 9: Η χημική δομή του 2,4,6-τριυδροξυ-φαινανθρένιου

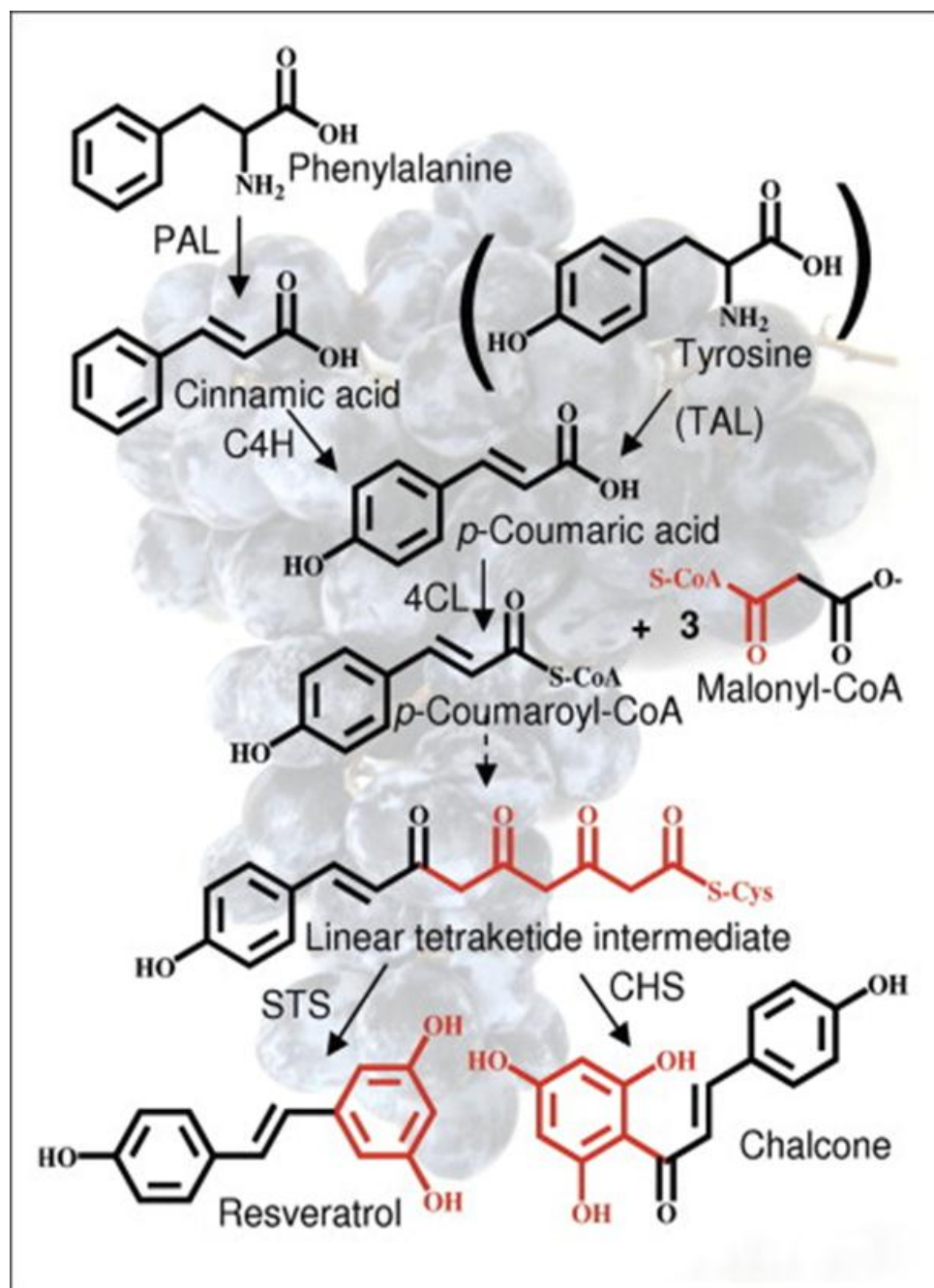
Η φασματοφωτομετρία και ο φθορισμός σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της επίδρασης των μεταφορικών πρωτεϊνών β-λακτοσφαιρίνη και αλβουμίνη στον trans-cis μετασχηματισμό της ρεσβερατρόλης. Οι φασματοσκοπικές μετρήσεις ποσοτικοποιούν τη συγκέντρωση των ισομερών μορφών της μετά από 2 ώρες ακτινοβολήσης στα 340 nm, υποδεικνύοντας ότι η αναλογία τους εξαρτάται γραμμικά από τη θερμοκρασία μεταξύ 20 και 50 °C. Έτσι και οι δύο πρωτεΐνες προστατεύουν την trans-ρεσβερατρόλη από την αποικοδόμηση. Οι υπολογιστικές τεχνικές διευκρινίζουν τις λεπτομέρειες της σύνδεσης της trans-ρεσβερατρόλης στις πρωτεΐνες. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι μεταφορικές πρωτεΐνες είναι βιώσιμοι φορείς για να σταθεροποιούν και να παραδίδουν τη ρεσβερατρόλη in vivo στη βιολογικά αποτελεσματική trans-μορφή. [23]

Η trans-ρεσβερατρόλη σε μορφή σκόνης βρέθηκε ότι είναι σταθερή υπό επιταχυνόμενη σταθερότητας συνθήκες με 75% υγρασία και 40 °C υπό την παρουσία αέρα. Οι μελέτες επιταχυνόμενης σταθερότητας είναι μελέτες που γίνονται για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής μιας ουσίας, με επιτάχυνση του ρυθμού αποσύνθεσής της, κατά προτίμηση αυξάνοντας τη θερμοκρασία των συνθηκών αντίδρασης. [24]

4.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ

Η trans-ρεσβερατρόλη όπως αναφέραμε είναι μία φυτοαλεξίνη που συνθέτει το φυτό της αμπέλου ως απόκριση σε διάφορες προσβολές και στρεσάρισμα του. Η ένωση αυτή παράγεται σε πολλά σημεία του φυτού. Ένα από αυτά είναι ο φλοιός του σταφυλιού, όπου από εκεί περνάει στον οίνο, στον οποίο έχει βρεθεί η παρουσία της. Η ποσότητα της trans-ρεσβερατρόλης στους φλοιούς των σταφυλιών ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών, τη γεωγραφική τους προέλευση και την έκθεση σε προσβολή από μύκητες. Ο χρόνος κατά τη ζύμωση που ένας οίνος μένει σε επαφή με τα στέμφυλα είναι επίσης ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της περιεκτικότητάς του σε trans-ρεσβερατρόλη. Η trans-ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί επίσης στα γίγαρτα του σταφυλιού. Τα γίγαρτα περιέχουν πολυφαινολικά παράγωγα του στιλβενίου, όπως η trans-ρεσβερατρόλη, οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες. Ακόμα άλλο σημείο στο οποίο συντίθεται είναι τα φύλλα της αμπέλου. Τα φύλλα περιλαμβάνουν διάφορα αντιοξειδωτικά, μεταξύ αυτών είναι και η trans-ρεσβερατρόλη και η δ-βινιφερίνη, η οποία είναι ένα διμερές παράγωγο της πρώτης που περιέχεται και στα δάκρυα των κληματίδων

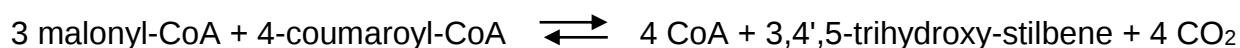
του πρέμνου, τα οποία σχηματίζονται μετά το χειμερινό κλάδεμα του φυτού, πράγμα που είναι λογικό αφού είναι και αυτή μια φυτοαλεξίνη και το φυτό έχει πληγωθεί. [25]



Εικόνα 1: Η βιοσύνθεση της *trans*-ρεσβερατρόλης

Η βιοσύνθεση της γίνεται με τη δράση ενός ενζύμου, της συνθάσης της ρεσβερατρόλης. Η συνθάση της ρεσβερατρόλης είναι μία συνθάση τριυδροξυσιλβενίου. Αυτό το ένζυμο ανήκει στην οικογένεια των τρανσφερασών. Συγκεκριμένα αυτές οι ακυλοτρανσφεράσες μεταφέρουν ομάδες διαφορετικές από τις αμινοακυλικές. Η συστηματική ονομασία αυτής της κατηγορίας ενζύμων είναι η μηλονυλο-συνένζυμο Α: 4-κουμαροϋλο-συνένζυμο Α μηλονυλοτρανσφεράση. Άλλα

ονόματα που χρησιμοποιούνται είναι η συνθάση της ρεσβερατρόλης και η συνθάση του στιλβενίου. Αυτό το ένζυμο συμμετέχει στη βιοσύνθεση φαινυλοπροπανοειδών. Στην ενζυμολογία, μια συνθάση τριυδροξυστιλβενίου είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη παρακάτω χημική αντίδραση. Όπως βλέπουμε τα δύο υποστρώματα αυτού του ενζύμου είναι το μηλονυλο-συνένζυμο Α και το 4-κουμαροϋλο-συνένζυμο Α, ενώ τα τρία προϊόντα που παράγονται είναι το συνένζυμο Α, το 3,4',5-τριυδροξυ-στιλβένιο (trans-ρεσβερατρόλη) και το διοξείδιο του άνθρακα. [26]



4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Τα φυτά υποβάλλονται σε πολλαπλές καταπονήσεις κατά τη διάρκεια της ζωής τους, όπως όταν βλάπτονται από κλαδέματα, εκτίθενται σε ακραίες κλιματικές συνθήκες και μολύνονται από οργανισμούς. Η trans-ρεσβερατρόλη είναι μια φυτοαλεξίνη, που όπως προαναφέραμε είναι μία κατηγορία ενώσεων που παράγονται από πολλά φυτά συμπεριλαμβανομένου και της αμπέλου όταν στρεσάρονται. Οι παράγοντες που οδηγούν στη σύνθεσή της χωρίζονται σε αβιοτικούς και βιοτικούς. [27]

4.3.1 ΑΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το αβιοτικό στρες ορίζεται ως ο αρνητικός αντίκτυπος των μη ζωντανών παραγόντων στους ζώντες οργανισμούς, στη συγκεκριμένη περίπτωση την αμπέλο, σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. [28] Οι αβιοτικές μεταβλητές μεταβάλλουν το περιβάλλον πέρα από το κανονικό εύρος διακύμανσης και επηρεάζουν αρνητικά την απόδοση ενός οργανισμού σε σημαντικό βαθμό. [29] Το αβιοτικό στρες επηρεάζει έντονα τα φυτά αφού εξαρτώνται άμεσα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το αβιοτικό στρες είναι ο πιο επιβλαβής παράγοντας που αφορά την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των καλλιεργειών παγκοσμίως και είναι ουσιαστικά αναπόφευκτο. [30]

Οι παράγοντες αβιοτικού στρες είναι φυσικοί, συχνά άυλοι, παράγοντες. Οι πιο συνηθισμένοι από τους αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες είναι οι αντίξοες κλιματικές συνθήκες, οι εναλλαγές θερμοκρασίας, οι δυνατοί άνεμοι, η ξηρασία, τα ακραία καιρικά φαινόμενα, όπως το χαλάζι και οι ανεμοστρόβιλοι, και άλλες φυσικές καταστροφές, όπως οι πυρκαγιές. Αλλά υπάρχουν και πολλοί άλλοι, λιγότερο αναγνωρίσιμοι παράγοντες που

επηρεάζουν συνεχώς το περιβάλλον. Οι λιγότερο γνωστοί παράγοντες στρες εμφανίζονται γενικά σε μικρότερη κλίμακα και περιλαμβάνουν κακές εδαφικές συνθήκες, όπως βραχώδη εδάφη και μη φυσιολογικά επίπεδα αλατότητας και pH, και υψηλή ακτινοβολία, ειδικά υπεριώδης. [31] Η έρευνα έχει επίσης δείξει ότι οι αβιοτικοί στρεσογόνοι παράγοντες είναι οι πιο επιβλαβείς όταν συμβαίνουν ταυτόχρονα, σε συνδυασμούς παραγόντων αβιοτικού στρες. [32]

Το αβιοτικό στρες, ως φυσικό μέρος κάθε οικοσυστήματος, θα επηρεάσει τους οργανισμούς με διάφορους τρόπους. Η αντιμετώπιση των φυτών ενάντια στο στρες εξαρτάται από τον ιστό ή το όργανο που επηρεάζεται. Στην άμπελο ένας από τους πολλούς μηχανισμούς αντιμετώπισης είναι και η παραγωγή των φυτοαλεξινών, όπως η trans-ρεσβερατρόλη.

4.3.2 ΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το βιοτικό στρες είναι η αντίδραση η οποία εμφανίζεται ως αποτέλεσμα βλάβης που προκαλείται σε έναν οργανισμό, στη συγκεκριμένη περίπτωση την άμπελο, από άλλους ζώντες οργανισμούς. Αυτοί οι οργανισμοί μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, ιοί, παράσιτα, έντομα, ζιζάνια και άλλου τύπου φυτά. [33] Αν και υπάρχουν πολλά είδη βιοτικού στρες, η πλειοψηφία των φυτικών νόσων προκαλούνται από μύκητες. [34] Οι τύποι βιοτικών παραγόντων που επιβάλλονται σε έναν οργανισμό εξαρτώνται από το κλίμα στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό καθώς και από την ικανότητά του να αντιστέκεται σε διάφορες καταπονήσεις.

Τα φυτά έχουν εξελιχθεί με τα παράσιτά τους για αρκετά εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια. Αυτή η συνεξελικτική διαδικασία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος φυτικών άμυνων κατά των προσβαλλόντων οργανισμών που δρουν για να ελαχιστοποιήσουν τη συχνότητα και την επίπτωση της επίθεσης. Αυτές οι άμυνες περιλαμβάνουν τόσο φυσικές όσο και χημικές προσαρμογές. [35] Από την άλλη, οι βλαβεροί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να ξεπεράσουν την αντίσταση σε συγκεκριμένα είδη φυτών-ξενιστών. [36] Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι trans-ρεσβερατρόλη που μπορεί να βιομετατραπεί σε άλλες ενώσεις από διάφορους οργανισμούς. Για παράδειγμα, το βακτήριο του εδάφους *Bacillus cereus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετασχηματίσει την trans-ρεσβερατρόλη στον γλυκοζίτη της. [37] Επίσης, ο παθογόνος μύκητας της αμπέλου *Botrytis cinerea* είναι ικανός να οξειδώσει

την trans-ρεσβερατρόλη, με τα παράγωγα που θα δημιουργηθούν να εμφανίζουν εξασθενημένες αντιμυκητιακές ιδιότητες. Αυτά περιλαμβάνουν διάφορα διμερή της ρεσβερατρόλης, τη δ-βινιφερίνη και άλλες ενώσεις. [38] Άρα, προκειμένου να κατανοήσουμε πλήρως και να χειριστούμε την ανθεκτικότητα των φυτών, απαιτείται μια λεπτομερής γνώση των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο.

Είναι ενδιαφέρον το ότι οι επιπτώσεις που προκαλούν οι αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες μπορεί να είναι παρόμοιες. Στην περίπτωση αυτή ακόμη και με προσεκτική παρατήρηση, η ακριβής διάγνωση είναι δύσκολη. Επίσης, να αναφέρουμε ότι τα φυτά εκτίθενται σε πολλούς παράγοντες στρες, αβιοτικούς και βιοτικούς, οι οποίοι μειώνουν την απόδοση των καλλιεργούμενων φυτών ή επηρεάζουν την ποιότητα των συγκομισθέντων προϊόντων. Τέλος, τα στοιχεία δείχνουν ότι ένα φυτό που υφίσταται πολλαπλές καταπονήσεις, τόσο αβιοτικές όσο και βιοτικές, είναι κάτι που μπορεί να έχει θετική επίδραση στην απόδοσή του, μειώνοντας την ευαισθησία του στο βιοτικό στρες σε σύγκριση με τον τρόπο που αντιδρά στις μεμονωμένες καταπονήσεις. [39]

4.4 ΠΗΓΕΣ

Μια από τις σημαντικότερες πηγές trans-ρεσβερατρόλης είναι ο φλοιός του σταφυλιού και κατ' επέκταση και τα προϊόντα του, όπως ο οίνος και ο χυμός σταφυλιού. Η σαμπάνια και το ξύδι περιέχουν επίσης αξιόλογα επίπεδα trans-ρεσβερατρόλης. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της trans-ρεσβερατρόλης στα διάφορα προϊόντα της αμπέλου. Οι τιμές υπολογίστηκαν συγκεντρώνοντας δεδομένα από διαφορετικά δείγματα από διάφορες δημοσιεύσεις που έχουν γίνει, γι' αυτό στον πίνακα αναφέρονται η μέση τιμή περιεκτικότητας σε trans-ρεσβερατρόλη καθώς και οι ελάχιστες και μέγιστες τιμές συγκεντρώσεων της. [40]

Ο ερυθρός οίνος περιέχει 0,2-5,8 mg/L trans-ρεσβερατρόλη, ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών. Ο λευκός οίνος έχει πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτό οφείλεται στο ότι ο ερυθρός οίνος σε αντίθεση με το λευκό ζυμώνεται με τα στέμφυλα, στα οποία βρίσκεται η trans-ρεσβερατρόλη, και έτσι εμπλουτίζεται περισσότερο σε αυτή. [41] Η περιεκτικότητα σε trans-ρεσβερατρόλη του οίνου είναι διαφορετική από εκείνη των σταφυλιών, αφού η εκχύλιση της ουσίας αυτής από τα σταφύλια εξαρτάται από τη διάρκεια της επαφής με τα στέμφυλα και ο γλυκοζίτης της ρεσβερατρόλης υδρολύεται εν μέρει αποδίδοντας τόσο την trans-ρεσβερατρόλη όσο και τη cis-ρεσβερατρόλη, πράγμα

το οποίο θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα διάσπασης της των σακχάρων κατά τη ζύμωση. Επίσης, σε αντίθεση με τον οίνο η κυρίαρχη μορφή της ρεσβερατρόλης στο χυμό των σταφυλιών είναι ο γλυκοζίτης της. [42][43]

Παρόλο που υπάρχει σε περισσότερα από 70 είδη φυτών, τα σταφύλια και ο οίνος είναι οι κυριότεροι διαιτητικοί συντελεστές της trans-ρεσβερατρόλης, που ευθύνονται για το 98% της ημερήσιας πρόσληψης. [44] Άλλες πηγές στις οποίες περιέχεται η ρεσβερατρόλη είναι ορισμένα είδη βατόμουρου, όπως το Bilberry, το European cranberry, το Lingonberry και το Redcurrant, και οι οίνοι που παράγονται από μούρα. Ρεσβερατρόλη περιέχεται επίσης και σε φρούτα, όπως η φράουλα, καθώς και στο κακάο και τη σοκολάτα. Τέλος, έχει βρεθεί σε ξηρούς καρπούς, όπως για παράδειγμα τα αράπικα φιστίκια και τα φιστίκια Αιγίνης, και στο φιστικοβούτυρο. [40]

Πίνακας 2: Η περιεκτικότητα σε trans-ρεσβερατρόλη ορισμένων προϊόντων αμπέλου. Παρουσιάζεται η μέση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή της σε 100 g ή ml προϊόντος [40]

Προϊόν	Συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης
Μαύρο σταφύλι	0.15 / 0.02-0.58 mg/100 g
Πράσινο σταφύλι	0.02 / 0.00-0.04 mg/100 g
Ερυθρός οίνος	0.27 / 0.00-2.78 mg/100 ml
Ροζέ οίνος	0.12 / 5.00 10^{-3} -0.29 mg/100 ml
Λευκός οίνος	0.04 / 0.00-0.17 mg/100 ml
Αφρώδης οίνος	9.00 10^{-3} / 8.00 10^{-3} -1.00 10^{-2} mg/100 ml
Χυμός πράσινου σταφυλιού	5.08 10^{-3} / 0.00-1.00 10^{-2} mg/100 ml
Ξύδι	4.57 10^{-3} / 0.00-1.00 10^{-2} mg/100 ml

4.5 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ - ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η απορρόφηση της ρεσβερατρόλης από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι υψηλή ενώ η βιοδιαθεσιμότητά της είναι αρκετά χαμηλή. Η βιοδραστικότητα των μεταβολιτών που προέρχονται από τη ρεσβερατρόλη και η συσσώρευση της ρεσβερατρόλης σε ζωτικά όργανα είναι ακόμη υπό μελέτη, αλλά υπάρχουν υψηλές προσδοκίες θετικών αποτελεσμάτων. [45]

Σύμφωνα με μελέτες φαρμακοκινητικής, η ρεσβερατρόλη όταν λαμβάνεται από το στόμα σε δόσεις από 5 έως 25 mg με τη μορφή trans-ρεσβερατρόλης απορροφάται καλά από τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά η βιοδιαθεσιμότητά της είναι σχετικά χαμηλή λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της. [46] Έτσι βρίσκονται μόνο ίχνη της μη μεταβολισμένης ρεσβερατρόλης στον οργανισμό του ανθρώπου. Επίσης, η χορήγηση μέσω του στόματος δόσεων των 25 mg trans-ρεσβερατρόλης σε υγιείς εθελοντές είχε ως αποτέλεσμα μέγιστες συγκεντρώσεις της ολικής ρεσβερατρόλης, δηλαδή της trans-ρεσβερατρόλης μαζί με τους μεταβολίτες της, στο αίμα με τιμές ανάλογες του είδους τροφίμου (οίνος, χυμός λαχανικών ή σταφυλιών) περίπου 60 min αργότερα. [47]

Μερικές μελέτες εξέτασαν την επίδραση του είδους της τροφής στην απορρόφηση της ρεσβερατρόλης και τη βιοδιαθεσιμότητα της. [48] Μία από αυτές ανέφερε ότι η βιοδιαθεσιμότητα της trans-ρεσβερατρόλης από τον ερυθρό οίνο δεν διέφερε όταν ο οίνος καταναλώθηκε μαζί με ή χωρίς ένα γεύμα χαμηλής ή μεγάλης περιεκτικότητας σε λιπαρά. [49] Ωστόσο, σε άλλη μελέτη, η απορρόφηση συμπληρώματος ρεσβερατρόλης βρέθηκε να καθυστερεί, αλλά όχι να μειώνεται, λόγω της παρουσίας τροφής στο στομάχι. [50] Μια τρίτη έρευνα διαπίστωσε ότι η βιοδιαθεσιμότητα του συμπληρώματος ρεσβερατρόλης μειώθηκε από την ποσότητα λίπους στη διατροφή, αλλά όχι από τη συγχορήγηση της πολυφαινόλης κερσετίνης ή της αλκοόλης. [51]

4.6 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η ρεσβερατρόλη είναι μια πολυφαινόλη που παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές διαταραχές και έχει μελετηθεί για διάφορες ασθένειες. Η έρευνα για τη συγκεκριμένη ουσία ξεκίνησε από το «γαλλικό παράδοξο», το οποίο περιγράφεται παρακάτω. [52] Από τότε, η ρεσβερατρόλη έχει μελετηθεί ευρέως και έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ποικίλες βιοχημικές και φυσιολογικές δράσεις, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιπολλαπλασιαστική και αντιαγγειογόνα δράση. [52][53]

Ο όρος «γαλλικό παράδοξο» (French paradox) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο περιοδικό «The Letter», το ενημερωτικό δελτίο του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου, το 1986 και αναφέρεται στη φαινομενικά παράδοξη παρατήρηση ότι οι Γάλλοι παρουσιάζουν σχετικά χαμηλά ποσοστά στεφανιαίας καρδιοπάθειας, ενώ έχουν διατροφή σχετικά πλούσια σε κορεσμένα λίπη, γεγονός που έρχεται σε αντίφαση με την πεποίθηση ότι η υψηλή κατανάλωση τέτοιων λιπών αποτελεί παράγοντα κινδύνου για

στεφανιαία καρδιοπάθεια. Το παράδοξο είναι ότι εάν η σχέση που συνδέει τα κορεσμένα λιπαρά με τη στεφανιαία καρδιοπάθεια είναι έγκυρη, στη Γαλλία θα έπρεπε να σημειώνονται υψηλότερα ποσοστά στεφανιαίας καρδιοπάθειας από άλλες χώρες όπου η κατανάλωση τέτοιων λιπών είναι χαμηλότερη. [54]

Το 1991 ο Serge Renaud, επιστήμονας στο Πανεπιστήμιο του Bordeaux, στη Γαλλία, παρουσίασε τα πραγματικά επιστημονικά δεδομένα και τα αποτελέσματα της επιστημονικής μελέτης του σχετικά με τον όρο «γαλλικό παράδοξο». Οι παρατηρήσεις του σχετικά με την προφανή σύνδεση μεταξύ της υψηλής κατανάλωσης κορεσμένων λιπαρών και των χαμηλών ποσοστών καρδιαγγειακών παθήσεων ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών. Παρόλο που το συνολικό λίπος που καταναλώνουν οι Γάλλοι είναι λίγο παραπάνω από αυτό που καταναλώνουν οι Αμερικανοί, οι πρώτοι καταναλώνουν πολύ περισσότερο κορεσμένο λίπος ενώ οι δεύτεροι καταναλώνουν πολύ μεγαλύτερο ποσοστό λίπους με τη μορφή φυτικών ελαίων. Ωστόσο, σύμφωνα με τα στοιχεία του British Heart Foundation το 1999 τα ποσοστά θανάτου από στεφανιαία νόσο ανδρών ηλικίας 35-74 ετών ήταν 115 ανά 100.000 άτομα στις ΗΠΑ και μόνο 83 ανά 100.000 στη Γαλλία. Το 1991, ο Renaud επεκτείνει τις έρευνες του σε συνεργασία με τον καρδιολόγο Michel de Lorgeril και τη διαιτολόγο Patricia Salen καταλήγοντας στο γεγονός ότι μια δίαιτα βασισμένη στη νοτιοδυτική μεσογειακή κουζίνα, η οποία είναι υψηλή σε ω-3 λιπαρά οξέα, αντιοξειδωτικά και περιλαμβάνει μέτρια κατανάλωση ερυθρού οίνου, παρουσιάζει κατώτερα κρούσματα καρκίνου, εμφράγματος του μυοκαρδίου και καρδιαγγειακής νόσου εν μέρει μέσω της αύξησης της HDL και μείωση της LDL χοληστερόλης. Η αναζήτηση εξηγήσεων για το παράδοξο οδήγησε επίσης σε κάποια πρόσθετη έρευνα. [54]

Αν η σχέση μεταξύ των κορεσμένων λιπών και της στεφανιαίας καρδιοπάθειας είναι έγκυρη, αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι ένας πρόσθετος παράγοντας στη γαλλική διατροφή ή τον τρόπο ζωής των Γάλλων μετριάζει αυτόν τον κίνδυνο. Έχει προταθεί ότι η υψηλή κατανάλωση ερυθρού οίνου στη Γαλλία αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα της τάσης. [54]

Οι πολυφαινόλες έχουν προταθεί ότι προσφέρουν προστασία στα ανθρώπινα αγγειακά κύτταρα. [55] Επίσης, άλλες έρευνες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες που περιέχονται στον ερυθρό οίνο μειώνουν την απορρόφηση της μαλονδιαλδεΐδης (μηλονική διαλδεΐδη), η οποία εμπλέκεται στην αύξηση των επιπέδων της LDL

χοληστερόλης και στην έναρξη της αρτηριοσκλήρωσης. [56] Ωστόσο, από τη στιγμή που αφομοιώνονται και μεταβολίζονται, δεν μπορεί να προσδιοριστεί ο ρόλος τους για την επιβεβαίωση των πιθανών επιδράσεών τους στην υγεία του ανθρώπου. [57] Παρόλο που οι πολυφαινόλες θεωρούνται ότι αποτελούν μέρος της επίδρασης της κατανάλωσης οίνου στην υγεία, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αποδείξεις ότι η κατανάλωσή τους προσφέρει πραγματικά οφέλη για την υγεία. [58]

Πιστεύεται ότι μία από τις συνιστώσες του ερυθρού οίνου που σχετίζεται ενδεχομένως με το παραπάνω φαινόμενο είναι η ρεσβερατρόλη. [59] Ωστόσο, οι συντάκτες μιας μελέτης του 2003 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ποσότητα ρεσβερατρόλης που απορροφά ο οργανισμός των καταναλωτών ερυθρού οίνου είναι αρκετά μικρή ώστε είναι απίθανο να εξηγήσει το παράδοξο. [60] Ο οίνος αποτελεί πηγή χαμηλών επιπέδων ρεσβερατρόλης. Οι υψηλές δόσεις ρεσβερατρόλης έχουν συνδεθεί με τη μακροζωία και την πρόληψη διαφόρων ασθενειών. [61] Αν και η έρευνα με τη ρεσβερατρόλη συνεχίζεται, η συγκέντρωση στον οίνο φαίνεται να είναι πολύ χαμηλή για να αιτιολογήσει το «γαλλικό παράδοξο». [54]

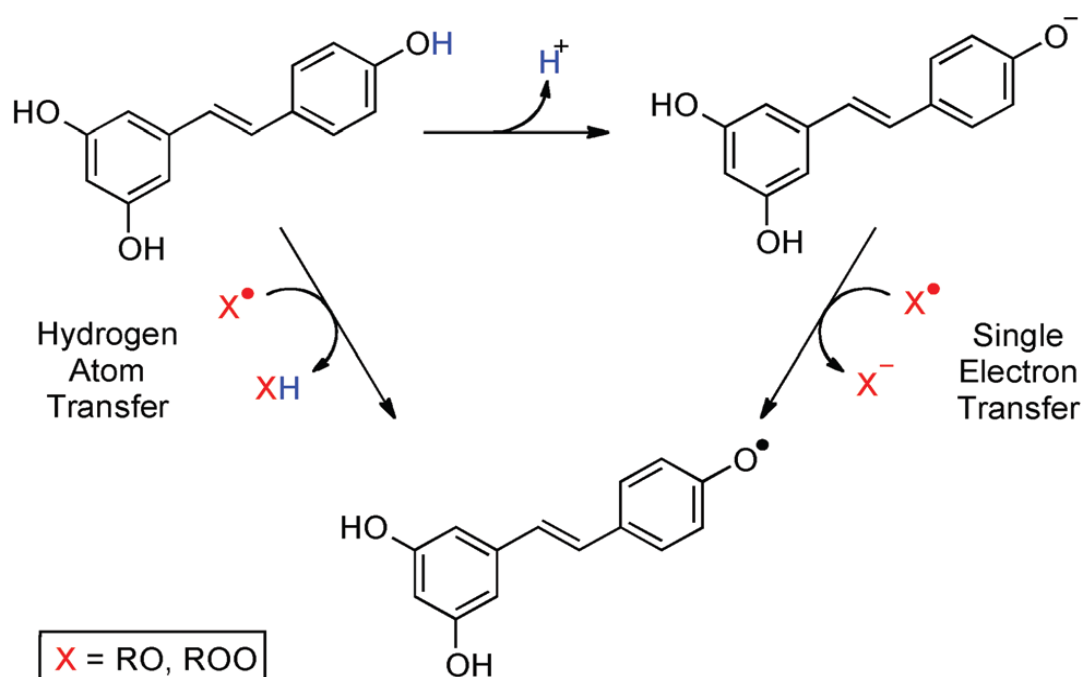
Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, όταν διαπιστώθηκε η παρουσία ρεσβερατρόλης στον ερυθρό οίνο, η επιστημονική κοινότητα διερευνά τις επιδράσεις της στην υγεία. [41] Το 1992, οι Renaud και De Lorgeril σύνδεσαν πρώτοι τις πολυφαινόλες του οίνου, συμπεριλαμβανομένης και της ρεσβερατρόλης, με τα πιθανά οφέλη για την υγεία που αποδίδονται στην τακτική και μέτρια κατανάλωση του οίνου. Έκτοτε, η ρεσβερατρόλη έλαβε όλο και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, οδηγώντας σε έρευνα σχετικά με τις βιολογικές δράσεις της, καθώς και σε μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων. [44] Οι αναφορές σχετικά με τις δυνατότητες της ρεσβερατρόλης για την πρόληψη ασθενειών και την παράταση της διάρκειας ζωής σε πειραματικά μοντέλα συνέχισαν να προκαλούν επιστημονικό ενδιαφέρον.

Η χορήγηση ρεσβερατρόλης με δίαιτα υψηλής θερμιδικής αξίας έχει αυξήσει τη διάρκεια ζωής διαφόρων οργανισμών, όπως ζύμες, σκουλήκια, έντομα, ψάρια και ποντίκια, αλλά δεν είναι γνωστό αν έχει παρόμοια αποτελέσματα στον άνθρωπο. [62] Η βιολογική σημασία της ρεσβερατρόλης έχει διερευνηθεί κυρίως σε δοκιμαστικούς σωλήνες και σε καλλιέργειες κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό σε ζωικά μοντέλα. Είναι σημαντικό να έχουμε κατά νου ότι πολλές από τις βιολογικές δραστηριότητες που συζητούνται παρακάτω παρατηρήθηκαν σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης από εκείνες που καταναλώνει ένας άνθρωπος μέσω της γαστρικής οδού.

Η ρεσβερατρόλη μπορεί να είναι ευεργετική σε πολλές διαταραχές, ιδιαίτερα σε όσες σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, το οποίο είναι πιθανότατα το γενεσιουργό αίτιο πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Το πιο ενδιαφέρον είναι τα μονοπάτια σηματοδότησης που επηρεάζονται από τη ρεσβερατρόλη. [52] Η ρεσβερατρόλη προσελκύει αυξημένη προσοχή λόγω των οφελών της για την υγεία, ιδίως στις κοινές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. [53] Αναφέρεται η συμμετοχή της ιδιαίτερα στις καρδιαγγειακές παθήσεις, στον καρκίνο, στο διαβήτη τύπου 2, στις νευρολογικές-νευροεκφυλιστικές παθήσεις και ενδεχομένως στη μακροζωία. [52][53] Με βάση τα παραπάνω έχουν γίνει πολυάριθμες έρευνες για τη ρεσβερατρόλη και τα παράγωγά της με περισσότερα υδροξύλια. Επιστημονικές έρευνες έχουν μελετήσει τα οφέλη της για τον ανθρώπινο οργανισμό, τα οποία φαίνονται παρακάτω. [52]

Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ποικίλες επιδράσεις στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων της πρόληψης ή και θεραπείας καρδιαγγειακών παθήσεων, καρκίνου, διαβήτη, φλεγμονής, νευροεκφυλισμού και γήρανσης. Οι κυτταρικές αμυντικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης μπορούν να εξηγηθούν μέσω της ικανότητάς της να εξουδετερώνει άμεσα τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) (reactive oxygen / nitrogen species), που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες, και να ρυθμίζει έμμεσα την έκφραση κυτταρικών αμυντικών γονιδίων. [63]

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, η ρεσβερατρόλη απομακρύνει τις ROS και RNS καθώς και δευτεροταγείς οργανικές ελεύθερες ρίζες μέσω μηχανισμών μεταφοράς ατόμων υδρογόνου και ηλεκτρονίων, προστατεύοντας έτσι τα κυτταρικά βιομόρια από οξειδωτική βλάβη. [63] Συγκεκριμένα είναι ικανή να αντιδρά με αυτές μέσω απομάκρυνσης ενός ατόμου υδρογόνου από μία από τις ομάδες υδροξυλίου της σχηματίζοντας σταθερές ρίζες. Η ομάδα υδροξυλίου στην para-θέση είναι η πιο δραστική λόγω της χαμηλότερης ενέργειας διάσπασης δεσμού μεταξύ του υδρογόνου και του οξυγόνου. Επίσης, η ρίζα που σχηματίζεται είναι η πιο σταθερή ενεργειακά. Έχουν περιγραφεί δύο κύριοι μηχανισμοί, ο ένας βασίζεται στη μεταφορά μιας ρίζας ενός ατόμου υδρογόνου και ο άλλος στην απώλεια ενός πρωτονίου και την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου, προς σχηματισμό μιας ρίζας της ρεσβερατρόλης, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. [20]



Σχήμα 10: Οι δύο κύριοι μηχανισμοί σχηματισμού ρίζας της ρεσβερατρόλης [20]

Η ρεσβερατρόλη ενισχύει επίσης τη γονιδιακή έκφραση διαφόρων αμυντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η οξυγενάση της αιμης 1, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η δισμουτάση του υπεροξειδίου, και ρυθμίζει το επίπεδο της γλουταθειόνης μέσω επαγωγής της έκφρασης, που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Τέτοιες άμυνες μπορούν να επιτευχθούν με τη ρύθμιση διαφόρων οδών σηματοδότησης ανάλογα την κάθε ασθένεια-διαταραχή. [63]

4.6.1 ΚΑΡΔΙΑ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις και κυρίως η στεφανιαία καρδιακή νόσος είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η πρόγνωση για ασθενείς με στεφανιαία καρδιακή νόσο εξαρτάται κυρίως από την εξέλιξη της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης. Στόχος μίας μελέτης ήταν η επίδραση της ρεσβερατρόλης στις παραμέτρους της αιμοδυναμικής και της ισχαιμίας του μυοκαρδίου σε ασθενείς με στεφανιαία καρδιακή νόσο. Η έρευνα περιλάμβανε 85 ασθενείς με στεφανιαία καρδιακή νόσο, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, έρευνας και σύγκρισης. Οι ασθενείς της ομάδας σύγκρισης έλαβαν τη συνήθη θεραπεία για στεφανιαία καρδιακή νόσο (β-αναστολείς, στατίνες, ασπιρίνη), ενώ οι ασθενείς της ομάδας έρευνας έλαβαν ρεσβερατρόλη σε δόση 100 mg ανά ορό ημερησίως. Πριν και 2 μήνες μετά τη συνταγογραφούμενη θεραπεία στους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογραφία

και 24 ωρών ηλεκτροκαρδιογραφία με συσκευή Holter. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης και την εφαρμογή της για τη θεραπεία ασθενών με στεφανιαία καρδιακή νόσο. [64]

Παρά τις μεγάλες προόδους στις θεραπείες που παρατηρήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες, η καρδιακή ανεπάρκεια παρέμεινε ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας στις δυτικές χώρες. Σε ορισμένα ζωικά μοντέλα με καρδιακή ανεπάρκεια η ρεσβερατρόλη ήταν σε θέση να αποτρέψει την καρδιακή υπερτροφία και να προκαλέσει τη ελάττωση της δυσλειτουργίας και την αναδιαμόρφωση. Διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί πιστεύεται ότι εμπλέκονται στις προστατευτικές επιδράσεις της, όπως η αναστολή μορίων σηματοδότησης, η ρύθμιση του Ca^{2+} του μυοκαρδίου, η ρύθμιση της αυτοφαγίας και η μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής. Σε μία μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση της ρεσβερατρόλης σε συγκεκριμένα μονοπάτια προσβολής και σηματοδότησης στρες, στο οξειδωτικό στρες, στη λειτουργία της αριστερής κοιλίας καρδιάς, στην υπερτροφία και στην ίνωση σε ένα επαγόμενη από ισοπροτερενόλη μετεμφραγματικής καρδιακής ανεπάρκειας μοντέλο ποντικού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά η ρύθμιση αυτών των οδών επηρεάζεται από τη ρεσβερατρόλη και μπορεί να συμβάλει στην ευεργετική επίδρασή της στην καρδιακή ανεπάρκεια. [65]

Σε μία άλλη μελέτη αξιολογήθηκε κατά πόσον η προστατευτική επίδραση της ρεσβερατρόλης ήταν ικανή να βελτιώσει την καρδιαγγειακή λειτουργία σε αρουραίους με διαβήτη. Εξετάστηκαν οι επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στη γλυκόζη του αίματος, στο σωματικό βάρος, στην αναλογία βάρους καρδιάς/σώματος, στα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, στους καρδιακούς παλμούς, στην αναλογία τρανσαμινάσης ασπαρτικού-αλανίνης και στην ολική ινσουλίνη του πλάσματος. Επίσης, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα φλεγμονής και οξειδωτικού στρες καθώς και μέσω αναλύσεων η γονιδιακή έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα και της φωσφορυλιωμένης (p)-p38 πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης σε αρουραίους με σχετιζόμενο με διαβήτη έμφραγμα του μυοκαρδίου μείωσε σημαντικά τη γλυκόζη στο αίμα, το σωματικό βάρος, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, τους καρδιακούς παλμούς και την αναλογία τρανσαμινάσης ασπαρτικού-αλανίνης. Επιπλέον, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των παραγόντων φλεγμονής και της μηλονικής διαλδεΰδης, η οποία είναι δείκτης του οξειδωτικού στρες. Ακόμα, αύξησε σημαντικά την γονιδιακή έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου και κατέστειλε την γονιδιακή έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα και της φωσφορυλιωμένης

(p)-p38 πρωτεΐνης. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η θεραπεία με ρεσβερατρόλη είναι ικανή να βελτιώσει την καρδιαγγειακή λειτουργία. [66]

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί συμπληρωματικό δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου. Η ρεσβερατρόλη βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία σε ζώα, ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές είναι περιορισμένες. Σύμφωνα με έρευνα, η οξεία κατανάλωση συμπληρώματος ρεσβερατρόλης βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία σε υπερτασικούς ασθενείς με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Σε αυτή συμμετείχαν 24 υπερτασικοί ασθενείς ηλικίας 45-65 ετών με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Τα άτομα έλαβαν μία απλή δόση 300 mg trans-ρεσβερατρόλης. Οι μετρήσεις της πίεσης του αίματος υπό συστολή και διαστολή αρτηριών πραγματοποιήθηκαν πριν και 1,5 ώρα μετά τη λήψη της ρεσβερατρόλης. Η μελέτη έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη προήγαγε μια βελτίωση στην ενδοθηλιακή λειτουργία, ιδιαίτερα στις γυναίκες και κυρίως σε εκείνες με υψηλότερη LDL χοληστερόλη, παρά τις αλλαγές στη πίεση του αίματος. [67]

Ο σκοπός μιας άλλης μελέτης ήταν να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων *in vitro*. Τα λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα εκτέθηκαν σε 10^{-6} - 10^{-4} M ρεσβερατρόλης και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αξιολογήθηκε με απαρίθμηση αυτών. Διεξήχθη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και προσδιορίστηκε η απόπτωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων βόειας αορτής κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση. Η χαμηλότερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης που οδήγησε σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων ήταν 10^{-5} M. Η θεραπεία με ρεσβερατρόλη κατέληξε επίσης σε μια εξαρτώμενη από τη δόση απόπτωση λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων αλλά δεν είχε επιπτώσεις στη μορφολογία αυτών. Έτσι συμπεραίνουμε ότι ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων θα μπορούσε να ανασταλεί από τη ρεσβερατρόλη και από την αύξηση της απόπτωσης. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την εικασία ότι η κατανάλωση ερυθρού οίνου μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση στην καρδιαγγειακή θνησιμότητα. [68]

4.6.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτων στον κόσμο. [69] Η ανάπτυξη του καρκίνου σε έναν οργανισμό είναι μια εξέλιξη όπου τα φυσιολογικά κύτταρα

αποκτούν μεταλλάξεις στη γενετική τους σύνθεση, γεγονός που τα αναγκάζει να αναπτύσσονται-πολλαπλασιάζονται συνεχώς ανεξέλεγκτα και πιθανόν να μετασταθούν σε άλλα όργανα. [70] Η ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και η αντοχή στην απόπτωση χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα δύο κύρια χαρακτηριστικά ξεκινούν σε καρκινικά κύτταρα μέσω μεταλλάξεων σε βασικά μόρια σηματοδότησης, τα οποία εμπλέκονται άμεσα στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. [71] Δεδομένης της μεγάλης πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου κατά τη διάρκεια της ζωής, η χημειοπροφύλαξη του καρκίνου παρέχει μια θεραπευτική στρατηγική για την καθυστέρηση ή την αναστροφή αυτής της διαδικασίας. [72] Οι ενώσεις που ρυθμίζουν αυτές τις ογκογόνες διεργασίες μπορούν να θεωρηθούν ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες. [70] Οι τρέχοντες χημειοθεραπευτικοί παράγοντες συσχετίζονται με σοβαρές παρενέργειες σε ασθενείς, συνεπώς οι ερευνητές προσπαθούν να βρουν έναν εναλλακτικό παράγοντα που να είναι αποτελεσματικός κατά του καρκίνου αλλά και λιγότερο τοξικός. [69] Η ρεσβερατρόλη έχει αναγνωριστεί από το 1997 ότι διαθέτει αντικαρκινική δράση. [73] Πιστεύεται ότι δρα ως παράγοντας χημειοπροφύλαξης προκαλώντας την απόπτωση των κυττάρων, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την άρση του πολλαπλασιασμού και της φλεγμονής. [69][71]

Η ρεσβερατρόλη βρέθηκε ότι μεσολαβεί στη χημειοπροφύλαξη του καρκίνου σε μοντέλο ποντικού μέσω μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της διαδικασίας καρκινογένεσης. Αυτό ώθησε στο να πραγματοποιηθούν πολλές μελέτες. Όπως φαίνεται σε μοντέλα *in vitro* και κυτταροκαλλιέργειας, η ρεσβερατρόλη λειτουργεί μέσω μιας πληθώρας μηχανισμών, η οποία μπορεί να ποικίλει από μοντέλο σε μοντέλο. Ανεξάρτητα από τον ακριβή μηχανισμό, απέδειξε την αποτελεσματικότητά της και σε ζωικά μοντέλα. [72]

Για να καθοριστεί εάν η ρεσβερατρόλη είναι αποτελεσματική ως αντικαρκινικός παράγοντας μία έρευνα ανασκόπησης εξέτασε τόσο μελέτες σε ζώα όσο και σε ανθρώπους, οι οποίες περιορίστηκαν εντός 10 χρόνων. Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες υποστήριξαν ότι η ρεσβερατρόλη δρα ως αντικαρκινικός παράγοντας κυρίως μέσω προαποπτωτικών, αντιπολλαπλασιαστικών και αντιφλεγμονωδών μηχανισμών. Οι φαρμακοκινητικές μελέτες σε ανθρώπους υποδηλώνουν καλή ανεκτικότητα σε υγιή άτομα, αν και έχουν χαμηλά απορροφητικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η επίδραση χημειοπροφύλαξης της ρεσβερατρόλης εξαρτάται από τη δόση και τη διάρκεια και ότι έχει συνεργιστική δράση με αντικαρκινικά φάρμακα *in vitro*. [69]

Η ρεσβερατρόλη προκαλεί ευρύ φάσμα επιδράσεων στον φαινότυπο των κυττάρων. Σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές έχει χρησιμοποιηθεί η ρεσβερατρόλη για να προκαλέσει αναστολή ανάπτυξης κυττάρων, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου και επαγωγή απόπτωσης. [74] Σύμφωνα με γονιδιωμιακές μελέτες η ρεσβερατρόλη δρα ως αντικαρκινικός παράγοντας μεσολαβώντας σε αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων. Σύμφωνα με συστηματική ανασκόπηση αυτών των μελετών που διεξάχθηκε, τα γονίδια που επηρεάζονται από τη ρεσβερατρόλη συνδέονται με τον κυτταρικό κύκλο, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν πρόκειται για πρωταρχικούς και ειδικούς στόχους της ρεσβερατρόλης. [75] Όλα αυτά είναι σημαντικά για τη θεραπεία του καρκίνου και πραγματοποιούνται μέσω ενός πολύπλοκου φάσματος κυτταρικών διεργασιών. Εκτός από αυτά, έχει αναφερθεί ότι η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει και άλλες ιδιότητες οι οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες στη θεραπεία του καρκίνου, όπως η αύξηση της ραδιοευαισθησίας και της χημειοευαισθησίας. [74] Παρακάτω φαίνονται οι επιδράσεις της σε μια ποικιλία καρκίνων, που συνοδεύονται από διάφορες κλινικές δοκιμές, οι οποίες έδειξαν ότι είναι ένας ελπιδοφόρος θεραπευτικός παράγοντας. [70]

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένας κακοήθης όγκος που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη στον πνευμονικό ιστό. Είναι ο συνηθέστερος καρκίνος μεταξύ των ανδρών τόσο στην εμφάνιση όσο και στη θνησιμότητα. Μεταξύ των γυναικών, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο τρίτος υψηλότερος σε συχνότητα και ο δεύτερος στη θνησιμότητα μετά τον καρκίνο του μαστού. Η ρεσβερατρόλη αλληλεπιδρά με πολλά μόρια-στόχους και διάφορα μόρια σηματοδότησης και επιδρά θετικά στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα μέσω διάφορων κυτταρικών διεργασιών. Έχει μελετηθεί ως θεραπεία σε διάφορα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα καθώς επίσης έχουν γίνει και αρκετές *in vitro* μελέτες που εξετάζουν την επίδρασή της ως μέρος μιας θεραπείας συνδυασμού με άλλες ενώσεις. Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τα αποτελέσματα της θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα με ρεσβερατρόλη *in vivo*. [71]

Ο καρκίνος των οστών είναι ένας κακοήθης όγκος στα οστά με διάφορους τύπους, όπως το οστεοσάρκωμα, το χονδροσάρκωμα, το σάρκωμα του Ewing και το ινοσάρκωμα. Παρά την κλινική αποτελεσματικότητα των συμβατικών θεραπειών του καρκίνου των οστών, οι περισσότεροι ασθενείς τελικά υποτροπιάζουν και η ασθένεια παραμένει ανίατη. Η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει πολλαπλές δραστηριότητες καταστολής καρκινικών όγκων στα οστά επηρεάζοντας μια σειρά από κρίσιμα σημεία. Έχει

προστατευτική δράση έναντι της οξειδωτικής βλάβης και αντιπολλαπλασιαστική δράση και προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Η ρεσβερατρόλη είναι μια καλή επιλογή για τη θεραπεία διαφόρων τύπων οστικών και νωτιαίων καρκίνων. [76]

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί ένα από τα πιο κοινά κακοήγη και κύρια αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο στους άνδρες και είναι ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας, ιδιαίτερα κατά τη γήρανση του ανθρώπου, καθώς συνήθως διαγιγνώσκεται σε άνδρες ηλικίας άνω των 50 ετών. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατόλη καθορίζει την γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP, DU-145 και PC-3 καθώς επίσης ενισχύει την ευαισθησία τους στην ιοντίζουσα ακτινοβολία και στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Αρκετές μελέτες σχετικά με την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη δείχνουν επίσης ότι η ρεσβερατρόλη είναι σε θέση να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την καρκινογένεση στον προστάτη. Το αντικαρκινικό δυναμικό της ρεσβερατρόλης έχει τεκμηριωθεί σε πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, όμως δεν υπάρχουν αποτελέσματα από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους σχετικά με τις θεραπευτικές επιδράσεις της σε ασθένειες του προστάτη. [74]

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη ανθρώπινων κυττάρων του γαστρικού καρκινώματος με την επαγωγή της απόπτωσης ως έναν σημαντικό μηχανισμό. Ωστόσο, το αν η μιτοχονδριακή οδός εμπλέκεται στην επαγόμενη από ρεσβερατρόλη απόπτωση στο ανθρώπινο γαστρικό καρκίνο δεν ήταν πολύ σαφές. Σε μία μελέτη που έγινε *in vivo*, διαπιστώθηκε η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η επαγόμενη από ρεσβερατρόλη απόπτωση σε συγκεκριμένα κύτταρα του ανθρώπινου γαστρικού καρκινώματος. Το συμπέρασμα ήταν ότι η ρεσβερατρόλη πράγματι προκαλεί απόπτωση μέσω της μιτοχονδριακής οδού στα κύτταρα αυτά, ενισχύοντας έτσι το ότι δρα ως αντικαρκινικός παράγοντας για τη θεραπεία του καρκίνου. [77]

Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει δραστικότητα αναστολής του καρκίνου και σε διάφορα άλλα καρκινικά μοντέλα, όπως αυτά του αδενώματος, του δέρματος, του μαστού, του παχέος εντέρου, του οισοφάγου, του γλοιώματος, του εντέρου, του ήπατος και του νευροβλαστώματος. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί έναν ελπιδοφόρο παράγοντα πρόληψης του καρκίνου. [72]

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ρεσβερατρόλη επιδρά στο μεταβολισμό των καρκινικών φαρμάκων. Ο μεταβολισμός των φαρμάκων διαιρείται σε δύο φάσεις, που περιλαμβάνουν διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων. Η ρεσβερατρόλη ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση και την ενεργότητα πολλών ενζύμων που μεταβολίζουν φάρμακα. [78] Έχει αναφερθεί επίσης ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να αναστρέψει την ανθεκτικότητα σε φάρμακα που εμφανίζουν διάφορα καρκινικά κύτταρα και, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κλινικά χρησιμοποιούμενα φάρμακα, μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στους συνήθεις χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Διάφορες ανάλογες της ρεσβερατρόλης ενώσεις έχουν αναπτυχθεί με βελτιωμένη αντικαρκινική δράση, βιοδιαθεσιμότητα και φαρμακοκινητικό προφίλ. [36] Στόχος μίας *in vitro* μελέτης ήταν η μέτρηση των ενισχυμένων αντικαρκινικών επιδράσεων της ρεσβερατρόλης στην πακλιταξέλη, η οποία είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο, σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου ήπατος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ρεσβερατρόλη μπορεί να αυξήσει την αντικαρκινική δράση της πακλιταξέλης στα καρκινικά ηπατικά κύτταρα και να χρησιμοποιηθεί ως ένας καλός ευαισθητοποιητικός παράγοντας για αυτή. [79]

4.6.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

Η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και απαιτούνται νέες θεραπευτικές στρατηγικές για την πρόληψη και τη θεραπεία του. Έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να αποτρέψει το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με στόχευση της πρωτεΐνης Sirtuin 1. Σε μία μελέτη, με τη χορήγηση ενέσεων υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και στρεπτοζοτοκίνη σε αρουραίους προκλήθηκε η εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Οι μετρήσεις της γλυκόζης του αίματος και της ινσουλίνης επιβεβαίωσαν την επιτυχή καθιέρωση του μοντέλου. Η ρεσβερατρόλη χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία των αρουραίων και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αναστρέφει τις προκαλούμενες από τη στρεπτοζοτοκίνη ρυθμίσεις. Επιπλέον, ρυθμίζει τη δραστηριότητα ενώσεων, οι οποίες σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Σε μία άλλη *in vitro* δοκιμή, κύτταρα υποβλήθηκαν σε προκατεργασία με παλμιτικό οξύ για την προσομοίωση ενός περιβάλλοντος με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Το αποτέλεσμα ήταν ότι το παλμιτικό οξύ καταστέλλει την γονιδιακή έκφραση με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση και το χρόνο και μεταβάλλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων. Η θεραπεία με ρεσβερατρόλη βελτίωσε τις επαγόμενες από το παλμιτικό οξύ μεταβολές στην έκφραση αυτών των γονιδίων μέσω της πρωτεΐνης

Sirtuin 1. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι η ρεσβερατρόλη συμμετέχει στην πρόληψη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ρυθμίζοντας την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων που σχετίζονται με τη βιογένεση, τον μεταβολισμό λιπιδίων και τα β-κύτταρα μέσω της πρωτεΐνης Sirtuin 1. [80]

Η αντίσταση του οργανισμού στην ινσουλίνη προκαλεί τη διαταραχή του γλυκαιμικού ελέγχου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, μειώνοντας την εισροή γλυκόζης στο αίμα και αυξάνοντας την εκροή γλυκόζης στο ήπαρ. Οι πρωτεΐνες GLUT4 και GLUT2 διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στη ροή της γλυκόζης στους μυς και το ήπαρ, αντίστοιχα. Η ρεσβερατρόλη υποδεικνύεται ότι δρα ως ευαισθητοποιητής ινσουλίνης και μπορεί να βελτιώσει το γλυκαιμικό έλεγχο με την αποκατάσταση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών GLUT4 και GLUT2 στους μυς και το ήπαρ. Σε μία μελέτη, αναπτύχθηκε σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 σε ποντίκια με έγχυση γλουταμινικού νατρίου και στη συνέχεια τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ρεσβερατρόλη. Ακολούθησε μια σειρά από αναλύσεις που έδειξαν ότι όλες οι αλλοιώσεις αποκαταστάθηκαν με τη θεραπεία με ρεσβερατρόλη. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι η ρεσβερατρόλη βελτιώνει το γλυκαιμικό έλεγχο στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και περιλαμβάνει αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης GLUT4 στους μύες και μείωση της γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης GLUT2 στο ήπαρ. [81]

4.6.4 ΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΞΑΣΘΕΝΙΣΗ

Η γνωστική εξασθένηση είναι αποτέλεσμα ενός σύνθετου δικτύου μοριακών μηχανισμών που τελικά οδηγούν σε άνοια. [82] Τα πιθανά νευροπροστατευτικά αποτελέσματά της ρεσβερατρόλης αποτελούν αντικείμενο πολλών ερευνών σήμερα. Σκοπός μίας έρευνας ήταν η ανασκόπηση των αποτελεσμάτων της ρεσβερατρόλης και πιο συγκεκριμένα εκείνων που σχετίζονται με την ικανότητά της να προσφέρει προστασία έναντι του νευροεκφυλισμού που σχετίζεται με διάφορες παθήσεις και τραυματικές βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Έχουν βρεθεί νευροπροστατευτικά αποτελέσματα σε μοντέλα νευροεκφυλισμού, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η νόσος του Huntington και διάφορες νευροπάθειες, ισχαιμίας και βλάβης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Παρόλο που έχουν διεξαχθεί λίγες μελέτες στον άνθρωπο, τα πρόσφατα ευρήματα σε πειραματικά μοντέλα νευρολογικής παθολογίας είναι ενθαρρυντικά. [83]

Η νόσος του Alzheimer είναι μια ευρέως διαδεδομένη νευροεκφυλιστική κατάσταση που οδηγεί σε προοδευτική νοητική δυσλειτουργία τον ηλικιωμένο πληθυσμό. Παρά τις διάφορες προσπάθειες, οι αποτελεσματικές θεραπείες αντιμετώπισης της νόσου αυτής είναι εξαιρετικά περιορισμένες. [84] Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι παίζει νευροπροστατευτικό ρόλο στη νευροεκφυλιστική διαδικασία που προκαλεί η νόσος του Alzheimer και βελτιώνει τη λειτουργία της μνήμης στην περίπτωση άνοιας. [85] Το νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα της έχει συσχετισθεί έντονα με τον αποπολυμερισμό αμυλοειδών β-ινιδίων. [84] Η in vivo επίδραση της ρεσβερατρόλης στη μάθηση και τη μνήμη σε κανονικά μοντέλα γήρανσης έχει μελετηθεί. Σε μία μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της ρεσβερατρόλης στην γνωστική εξασθένηση αρουραίων που προκαλείται από τη γήρανση. Αρσενικοί αρουραίοι διαιρέθηκαν σε τέσσερις ομάδες. Δόση 50 mg/kg σώματος ρεσβερατρόλης την ημέρα δόθηκε στις δύο ομάδες για 12 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη επιδρά θετικά αντιμετωπίζοντας το σχετιζόμενο με την ηλικία πρόβλημα στη μάθηση και τη μνήμη. Επίσης, υποδεικνύουν ότι η ρεσβερατρόλη είναι αποτελεσματική στην πρόληψη του γνωστικού ελλείμματος σε ηλικιωμένους αρουραίους παρεμποδίζοντας την παραγωγή φλεγμονής. [85]

Η τραυματική βλάβη εγκεφάλου περιλαμβάνει πρωτογενείς και δευτερογενείς τραυματισμούς που υποκρύπτουν καθυστερημένη νευρική δυσλειτουργία και καταστροφή νευρών, οδηγώντας σε μακροχρόνο γνωστικό ελλείμμα. Μία έρευνα μελέτησε εάν η χορήγηση 100 mg/kg σώματος ρεσβερατρόλης ήταν ικανή να ενισχύσει σημαντικά τη λειτουργική ανάκτηση σε ένα μοντέλο αρουραίου με τραυματική βλάβη εγκεφάλου και αν η θεραπεία με ρεσβερατρόλη ήταν ικανή να ρυθμίσει την γονιδιακή έκφραση μιας ειδικής πρωτεΐνης και να καταστείλει την αυτοφαγία νευρώνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καθημερινή θεραπεία με ρεσβερατρόλη μείωσε το εγκεφαλικό οίδημα που προκάλεσε η τραυματική βλάβη εγκεφάλου και βελτίωσε τη γνωστική λειτουργία και τη νευρολογική δυσλειτουργία στους αρουραίους. Η γονιδιακή έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μειώθηκε μετά τη τραυματική βλάβη εγκεφάλου, φαινόμενο το οποίο αντιστράφηκε εν μέρει με θεραπεία με ρεσβερατρόλη. Επομένως, αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ρεσβερατρόλη αντιπροσωπεύει μια νέα θεραπεία για την τραυματική βλάβη εγκεφάλου. [86]

Οι νευρώνες είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι σε βλάβη που προκαλείται από οξειδωτικές ουσίες, η οποία μπορεί να οφείλεται στον υψηλό ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου και σε χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών αμυντικών ενζύμων. Ως τώρα ήταν

γνωστό ότι οι προστατευτικές δράσεις της ρεσβερατρόλης στη διαβητική πολυνευροπάθεια οφείλονται στις εγγενείς ιδιότητές της για απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών. Ωστόσο, πρόσφατα έχουν προταθεί και πολλοί άλλοι μηχανισμοί που δρουν μεμονωμένα ή συνδυαστικά για την ευεργετική επίδρασή της κατά της νευρικής δυσλειτουργίας. [87]

Στόχος μίας μελέτης ήταν να διερευνήσουν τις επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στη γνωστική εξασθένηση σε διαβητικούς αρουραίους. Εξήντα υγιείς αρσενικοί αρουραίοι διαιρέθηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες, την ομάδα φυσιολογικού ελέγχου, την ομάδα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με ρεσβερατρόλη, την ομάδα διαβητικών αρουραίων και την ομάδα διαβητικών αρουραίων σε αγωγή με ρεσβερατρόλη. Η στρεπτοζοτοκίνη χρησιμοποιήθηκε για να καθιερωθεί το διαβητικό μοντέλο. Μία εβδομάδα μετά την επαγωγή του διαβητικού μοντέλου, οι αρουραίοι της δεύτερης και τέταρτης ομάδας έλαβαν ρεσβερατρόλη μια φορά την ημέρα για 4 διαδοχικές εβδομάδες. Η δοκιμή λαβύρινθου Morris εφαρμόστηκε για να εκτιμηθεί η επίδραση της ρεσβερατρόλης στη μάθηση και τη μνήμη. Η ρεσβερατρόλη δεν είχε εμφανή επίδραση στους φυσιολογικούς αρουραίους, αλλά βελτίωσε σημαντικά τη γνωστική εξασθένηση στους αρουραίους με σακχαρώδη διαβήτη. [88]

Σύμφωνα με έρευνα, δοκιμάστηκε εάν η κατανάλωση ρεσβερατρόλης θα μπορούσε να βελτιώσει την εγκεφαλοαγγειακή λειτουργία, τη μάθηση και τη διάθεση σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Αφού πέρασαν 8 εβδομάδες από την έναρξη της εμμηνόπαυσης, γυναίκες ηλικίας 45-85 ετών ομαδοποιήθηκαν και έλαβαν trans-ρεσβερατρόλη ή εικονικό φάρμακο (placebo) για 14 εβδομάδες και αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις της σε διάφορες παραμέτρους. Ετοιμάστηκαν επίσης ερωτηματολόγια διάθεσης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η τακτική κατανάλωση μίας μέτριας δόσης ρεσβερατρόλης μπορεί να ενισχύσει τόσο την εγκεφαλοαγγειακή λειτουργία όσο και τη γνωστική λειτουργία σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, μειώνοντας ενδεχομένως τον αυξημένο κίνδυνο επιδείνωσης της γνωστικής τους ικανότητας και προσφέροντας μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική αγωγή. [89]

4.6.5 ΜΑΚΡΟΖΩΙΑ

Η ρεσβερατρόλη έχει ευεργετικά αποτελέσματα ως αντιγηραντική ένωση μέσω της διαμόρφωσης των παραμέτρων της γήρανσης, συμπεριλαμβανομένων της οξειδωτικής

βλάβης, της φλεγμονής, της φθοράς των τελομερών και της γήρανσης των κυττάρων. [90] Πρόσφατα, αρκετές μελέτες περιγράφουν την ρεσβερατρόλη ως ένωση κατά της γήρανσης. [91] Θέματα μιας μελέτης ήταν η σχέση μεταξύ της ρεσβερατρόλης και ενός πιθανού βιολογικού δείκτη γήρανσης, η θετική επίδρασή της στη διάρκεια ζωής, η νόσος που σχετίζεται με τη γήρανση και η διατήρηση της υγείας. Εκεί συνοψίζονται μια ποικιλία σημαντικών μηχανισμών που ρυθμίζονται από τη ρεσβερατρόλη, οι οποίοι είναι πιθανώς εμπλεκόμενοι στην εξασθένηση των σχετιζόμενων με την ηλικία διαταραχών. Επίσης, περιγράφεται το δυναμικό της ρεσβερατρόλης για την πρόληψη ή τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, που σχετίζονται με την ηλικία μέσω διαμόρφωσης μοριακών μηχανισμών σχετικών με την ηλικία. [90] Σύμφωνα με μία ανασκόπηση, που επικεντρώθηκε στις αντιγηραντικές πτυχές της ρεσβερατρόλης, στους πιθανούς μηχανισμούς δράσης και στις αναδυόμενες αντιπαραθέσεις σχετικά με την ικανότητα παρατεταμένης ζωής, φαίνεται ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να προκαλέσει την έκφραση αρκετών γονιδίων μακροζωίας, συμπεριλαμβανομένων των SIRT1, SIRT3, SIRT4, FOXO1, FOXO3a και PBEF, αλλά δεν μπορεί να επηρεάσει την πραγματική διάρκεια ζωής των ποντικών. [91] Επίσης, σε μία έρευνα αξιολογήθηκε η επίδρασή της *in vitro* και *in vivo* στο γονίδιο SIRT1 που σχετίζεται με τη μακροζωία και αποτελεί ρυθμιστή γενετικών πληροφοριών. Μια ομάδα κυττάρων υποβλήθηκε σε αγωγή με AAPH για την καθιέρωση του κυτταρικού μοντέλου γήρανσης και αρουραίοι υποβλήθηκαν σε αγωγή με D-γαλακτόζη για την καθιέρωση του ζωικού μοντέλου γήρανσης. Η ρεσβερατρόλη παρουσίασε αντιγηραντική δράση και διέγερση της σηματοδότησης του γονιδίου SIRT1, που αποδεικνύεται από την αναστολή της γήρανσης και της απόπτωσης και την αποκατάσταση της γνωστικής εξασθένησης και της οξειδωτικής βλάβης. Το συμπέρασμα είναι ότι η ρεσβερατρόλη είναι μία ισχυρή θεραπευτική ουσία κατάλληλη για την καταπολέμηση της γήρανσης. [92]

4.6.6 ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Η ρεσβερατρόλη έχει αναγνωριστεί ως υπεύθυνη κυρίως για τις παραπάνω φαρμακευτικές δράσεις που προάγουν την υγεία. Όμως υπάρχουν και πολλές ακόμα, όπως αυτές που ακολουθούν.

Η ίνωση του ήπατος είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας που προκαλεί περίπου 1,4 εκατομμύρια θανάτους ετησίως. Συνδέεται με φλεγμονή, οξειδωτικό στρες, νέκρωση και καταλήγει σε κίρρωση, καρκίνο του ήπατος και ηπατική ανεπάρκεια. Ως εκ τούτου, μια μελέτη πραγματοποιήθηκε για να διερευνήσει το προστατευτικό αποτέλεσμα της

ρεσβερατρόλης ενάντια στην ηπατική ίνωση. Αρουραίοι έλαβαν θειοακεταμίδη για να προκληθεί ίνωση του ήπατος. Η ρεσβερατρόλη χορηγήθηκε για 1 μήνα πριν και άλλο 1 μήνα κατά τη διάρκεια της χορήγησης θειοακεταμίδης. Κατά τη διάρκεια του πειράματος αξιολογήθηκαν τα σωματικά βάρη και το ποσοστό θνησιμότητας. Οι ηπατικές λειτουργίες προσδιορίστηκαν στον ορό του αίματος, ενώ οι ιστοί του ήπατος αναλύθηκαν για οξειδωτικούς και ινωτικούς βιοδείκτες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ιστολογικές εξετάσεις με βιοψίες ήπατος. Η ρεσβερατρόλη ήταν σε θέση να ενισχύσει τις λειτουργίες του ήπατος, να αποτρέψει το οξειδωτικό στρες και να εξαλείψει την ίνωση του ήπατος. Ως εκ τούτου, τα παρόντα δεδομένα υπογραμμίζουν το θεραπευτικό δυναμικό της ρεσβερατρόλης ως προστατευτικού παράγοντα κατά της ίνωσης του ήπατος. [93]

Η αναστροφή των καταστροφικών επιπτώσεων του τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης έχει γίνει το πιο εξέχον θέμα της νευροεπιστήμης. Παρόλο που εξετάζονται πολλές θεραπευτικές παρεμβάσεις, δεν υπάρχει ακόμη οριστική θεραπεία για τον τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης. Ενόψει αυτού, διεξήχθη μια πειραματική μελέτη σε αρουραίους μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης για να ελεγχθούν τα αποτελέσματα της ρεσβερατρόλης. Χρησιμοποιήθηκαν 18 αρουραίοι, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες. Όλες οι ομάδες υποβλήθηκαν σε θωρακική λαμινεκτομή. Η πρώτη ομάδα δεν έλαβε άλλη παρέμβαση. Η δεύτερη και η τρίτη ομάδα υπέστησαν τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης. Η τρίτη ομάδα έλαβε ρεσβερατρόλη. Μετά τη θανάτωση των αρουραίων, παραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση μαζί με μετρήσεις ορισμένων βιοχημικών παραμέτρων. Το συμπέρασμα αυτού του πειράματος ήταν ότι η ρεσβερατρόλη αποδεικνύεται ότι έχει σημαντικά νευροπροστατευτικά αποτελέσματα σε τραυματισμένη σπονδυλική στήλη. [94]

Οι ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος είναι κοινές και μείζονες ασθένειες που θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Η ρεσβερατρόλη συμβάλει στην αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος. Οι έρευνες που έχουν γίνει αποδεικνύουν ότι συμβάλει στη σωστή λειτουργία του πνέυμονα. Αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι παίζει προστατευτικό ρόλο στις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος. Σύμφωνα με έρευνα διαπιστώθηκε ότι η ρεσβερατρόλη διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στο αναπνευστικό σύστημα μέσω διάφορων μηχανισμών και έτσι μπορεί να γίνει ένα νέο φάρμακο για τη θεραπεία ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος. [95]

Σε μία μελέτη, με τη χρήση διπλοστιβάδας DPPC παρουσία ρεσβερατρόλης, δημιουργήσανε έναν χάρτη απεικόνισης της θέσης και του προσανατολισμού της

εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Διαπιστώθηκε ότι η ρεσβερατρόλη αυξάνει την επιφανειακή περιοχή ανά λιπίδιο και μειώνει το πάχος της μεμβράνης, το οποίο είναι το αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό της χοληστερόλης στην υγρή φάση DPPC. Το πιο σημαντικό είναι ότι, με βάση την παρατήρηση ότι η ρεσβερατρόλη πιθανότατα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με ορισμένες εστερικές ομάδες, ανακαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο η ρεσβερατρόλη προστατεύει τους εστερικούς δεσμούς αυτών των ομάδων με τις διπλοστοιβάδες DPPC και DSPC από τη διάσπαση από τις φωσφολιπάσες A1 και A2. Η μελέτη αυτή διασαφηνίζει ένα νέο μοριακό μηχανισμό των δυνητικών οφελών της ρεσβερατρόλης στην υγεία. [96]

Η καταθλιπτική διαταραχή είναι μια διαταραχή ψυχικής υγείας που μπορεί να οφείλεται στη δυσλειτουργία αναγέννησης των νεύρων, η οποία συχνά έχει ως αποτέλεσμα γνωστικές διαταραχές. Τα στοιχεία έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη παρέχει οφέλη για τη θεραπεία της καταθλιπτικής διαταραχής. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε διερευνήθηκαν τα θεραπευτικά αποτελέσματα της ρεσβερατρόλης και αναλύθηκαν οι δυνητικοί μηχανισμοί που μεσολάβησαν κατά τη θεραπεία με ρεσβερατρόλη σε κύτταρα νευρώνων ιππόκαμπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θεραπεία με ρεσβερατρόλη κατέστειλε την απόπτωση των κυττάρων νευρώνων ιππόκαμπου λόγω ρύθμισης της έκφρασης των αντιαποπτωτικών γονιδίων. Τα αποτελέσματα της *in vivo* δοκιμασίας έδειξαν ότι η θεραπεία με ρεσβερατρόλη οδήγησε σε βελτιώσεις στη γνωστική ικανότητα, στην ικανότητα μάθησης και στο άγχος σε μοντέλο καταθλιπτικής διαταραχής ποντικού. Συμπερασματικά, η θεραπεία με ρεσβερατρόλη είχε προστατευτικά αποτελέσματα έναντι του οξειδωτικού στρες και της νευροφλεγμονώδους παθογένειας υποδηλώνοντας ότι είναι ένας πιθανός αντικαταθλιπτικός παράγοντας για τη θεραπεία της καταθλιπτικής διαταραχής. [97]

Η ρεσβερατρόλη παίζει σημαντικό ρόλο και στη θεραπεία άλλων ασθενειών. [98] Εκτός από τις άλλες ιδιότητες, η ρεσβερατρόλη δρα ως αναλγητικό, λειτουργεί ως αναστολέας της αγγειογένεσης, η οποία υποστηρίζει την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων σε νεόπλαστους όγκους διαμέτρου 2-3 mm, και προστατεύει από την απώλεια ακοής. Έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τους τραυματισμούς στα νεφρά, στο νωτιαίο μυελό, στο συκώτι, στους πνεύμονες, στο έντερο και το κόλον. [78] Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και αναστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων, την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και τη συσσώρευση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Άλλες δράσεις της

ρεσβερατρόλης περιλαμβάνουν την απομάκρυνση ελεύθερων ριζών και την αγγειοσυσταλτική και οιστρογονική δράση. [99] Επιπλέον, οι καρδιαγγειακές προστατευτικές ικανότητες της ρεσβερατρόλης συσχετίζονται με πολλαπλούς μοριακούς στόχους και μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την αθηροσκλήρωση, την ισχαιμία, το μεταβολικό σύνδρομο και την καρδιακή ανεπάρκεια. [98] Ακόμα, η ρεσβερατρόλη είναι ικανή να καταστείλει την υπέρταση πνευμονικής αρτηρίας που προκαλείται από πνευμονική θρομβοεμβολή. [66] Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές για την επίδραση της ρεσβερατρόλης στην παχυσαρκία. [100] Αυτά τα πρόσθετα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα προστατευτικά αποτελέσματα της ρεσβερατρόλης δεν περιορίζονται μόνο στην καρδιά και τον εγκέφαλο. [78] Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η αντιοξειδωτική δράση της trans-ρεσβερατρόλης είναι 7 φορές ισχυρότερη από της cis-ρεσβερατρόλης, καθώς επίσης και ότι αντιφλεγμονώδη δράση έχει μόνο το trans-ισομερές.

Ενώ υπάρχει πληθώρα *in vitro* και *in vivo* αποδείξεων ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να είναι ένας ελπιδοφόρος θεραπευτικός παράγοντας είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περισσότερες κλινικές δοκιμές που θα επιβεβαιώσουν το δυναμικό της. Μέχρι στιγμής οι περισσότερες από τις κλινικές δοκιμές της ρεσβερατρόλης έχουν επικεντρωθεί στις καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, το διαβήτη και τις νευρολογικές διαταραχές και έχει διαπιστωθεί ότι η ρεσβερατρόλη ήταν καλά ανεκτή και επηρέασε ευεργετικά τους βιοδείκτες της κάθε νόσου. [100]

4.7 ΑΣΦΑΛΕΙΑ

Η ρεσβερατρόλη παρόλο που έχει σπουδαία φαρμακευτική δράση μπορεί να παρουσιάσει παρενέργειες αν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες επαναλαμβανόμενα για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Επίσης, μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα φάρμακα και να αναστείλει τη δράση τους προκαλώντας προβλήματα στον οργανισμό μας.

4.7.1 ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Η ρεσβερατρόλη δεν είναι γνωστό ότι προκαλεί τοξικότητα ή έχει σημαντικές ανεπιθύμητες επιδράσεις στον άνθρωπο, αλλά μέχρι στιγμής έχουν γίνει λίγες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες. [101] Μια φαρμακοκινητική μελέτη κλιμακούμενης δόσης

ρεσβερατρόλης έδειξε ότι μία εκ του στόματος δόση των 5 g δεν είχε σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. [102] Σε μια μελέτη επαναλαμβανόμενων δόσεων ρεσβερατρόλης που έγινε σε συμμετέχοντες, οι οποίοι κατανάλωναν πάνω από 1 g ρεσβερατρόλης την ημέρα για 29 συνεχόμενες ημέρες, αναφέρθηκαν ήπιες έως μέτριες γαστρεντερικές παρενέργειες, όπως ναυτία, κοιλιακό άλγος, μετεωρισμός και διάρροια. [103] Ήπια διάρροια αναφέρθηκε επίσης σε 6 από τα 8 άτομα που κατανάλωναν 2 g ρεσβερατρόλης 2 φορές ημερησίως για 2 περιόδους των 8 ημερών σε μία άλλη μελέτη που έγινε. [104]

4.7.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Η ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *in vitro*. Θεωρητικά, η υψηλή λήψη ρεσβερατρόλης θα μπορούσε να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης μώλωπα και αιμορραγίας όταν λαμβάνεται με αντιπηκτικά, αντιαιμοπεταλιακά και μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. [105]

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) είναι ένζυμα βιομετατροπής που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ενός ευρέος φάσματος ενώσεων, από ενδογενή μόρια έως θεραπευτικούς παράγοντες. Η πλέον άφθονη ισόμορφη του CYP στο ανθρώπινο ήπαρ και έντερο είναι το κυτόχρωμα P450 3A4 (CYP3A4), το οποίο καταλύει το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων. [106] Η ρεσβερατρόλη έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα του CYP3A4 *in vitro* και σε υγιή άτομα. Συνεπώς, η υψηλή πρόσληψη της θα μπορούσε δυνητικά να μειώσει τη μεταβολική κάθαρση των φαρμάκων που υποβάλλονται σε εκτεταμένο μεταβολισμό από το CYP3A4, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα και τον κίνδυνο τοξικότητας αυτών των φαρμάκων. [107][108][109] Άλλα ένζυμα του CYP, όπως τα CYP2D6 και CYP2C9, μπορεί επίσης να αναστέλλονται με ρεσβερατρόλη. [110] Τέλος, η ρεσβερατρόλη βρέθηκε ότι είναι ένας ασθενής επαγωγέας της γονιδιακής έκφρασης και της δραστηριότητας του CYP1A2, που καταλύει το μεταβολισμό αρκετών φαρμάκων, όπως για παράδειγμα των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Αυτό υποδηλώνει ότι μπορεί να παρεμβαίνει στο μεταβολισμό του φαρμάκου με τη μεσολάβηση του CYP1A2 αυξάνοντας την μεταβολική κάθαρση του φαρμάκου, ενδεχομένως μειώνοντας τις συγκεντρώσεις του στον οργανισμό κάτω από τα θεραπευτικά επίπεδα. [106][109]

4.7.3 ΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ ΣΕ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μέχρις ότου να είναι γνωστά περισσότερα σχετικά με την οιστρογονική δράση της ρεσβερατρόλης στον άνθρωπο, οι γυναίκες με ιστορικό ευαίσθητων σε οιστρογόνα καρκίνων, όπως οι καρκίνοι του μαστού, των ωοθηκών και της μήτρας, θα πρέπει να αποφεύγουν τα συμπληρώματα ρεσβερατρόλης. [111]

4.8 ΧΡΗΣΕΙΣ

Η ρεσβερατρόλη είναι μια ένωση με σπουδαίες φαρμακευτικές ιδιότητες, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στην παρασκευή καλλυντικών προϊόντων και λαμβάνεται ως συμπλήρωμα διατροφής. Όπως ήδη αναφέραμε τα γίγαρτα περιέχουν trans-ρεσβερατρόλη. Από αυτά μεταφέρεται στο γιγαρτέλαιο, το οποίο χρησιμοποιείται στην κοσμετολογία σε μία τεράστια γκάμα καλλυντικών προϊόντων από κορυφαίες φαρμακευτικές εταιρίες. [25] Τα περισσότερα συμπληρώματα ρεσβερατρόλης που διατίθενται περιέχουν εκχυλίσματα της ρίζας του φυτού *Fallopia japonica*. [111] Τα εκχυλίσματα ερυθρού οίνου και σταφυλιών από το φυτό *Vitis vinifera*, που περιέχουν trans-ρεσβερατρόλη και άλλες πολυφαινόλες, χρησιμοποιούνται επίσης για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής. Τα συμπληρώματα ρεσβερατρόλης περιέχουν από λιγότερο του 1 έως 500 mg trans-ρεσβερατρόλης ανά δισκίο ή κάψουλα και ποικίλλουν σε καθαρότητα, συγκεκριμένα μπορούν να περιέχουν trans-ρεσβερατρόλη σε ποσοστά από 50 έως 99 %. Οι πωλήσεις συμπληρωμάτων ρεσβερατρόλης αυξήθηκαν το 2006 μετά από μελέτες, οι οποίες όμως δεν έγιναν σε ανθρώπους. [112]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

5.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ NMR

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) είναι μια φασματοσκοπική τεχνική για την παρατήρηση τοπικών μαγνητικών πεδίων γύρω από πυρήνες ατόμων. Η φασματοσκοπία NMR είναι μία φασματοσκοπία απορρόφησης κατά την οποία ένα δείγμα απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ραδιοκύματα) υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου σε χαρακτηριστικές του παρατηρούμενου πυρήνα συχνότητες. [113][114]

Η μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με αυτοστροφορμή, δηλαδή πυρήνων με ατομικό ή και μαζικό αριθμό περιττό. Για παράδειγμα, πυρήνες όπως ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O και ^{19}F μπορούν να μελετηθούν με τη μέθοδο NMR. Αντίθετα, πυρήνες με ζυγό ατομικό και μαζικό αριθμό, όπως τα πιο διαδεδομένα ισότοπα του άνθρακα και οξυγόνου, ^{12}C και ^{16}O , δεν ανιχνεύονται με την μέθοδο αυτή γιατί στερούνται αυτοστροφορμής. [113][115]

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός είναι ένα φαινόμενο όπου οι περιστρεφόμενοι πυρήνες των ατόμων των μορίων λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Υπό την επίδραση ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες του δείγματος προσανατολίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα προς αυτό. Στη συνέχεια, διεγείρονται ενεργειακά με την επίδραση ραδιοπαλμών και κατά την αποδιέγερσή τους εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε χαρακτηριστικές για αυτά συχνότητες. [116]

Η μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ανακαλύφθηκε το 1945. [113] Δύο ομάδες, η ομάδα του Purcell στο Πανεπιστήμιο του Χάρβαρντ και η ομάδα του Bloch στο Πανεπιστήμιο του Στάνφορντ, ανέπτυξαν ανεξάρτητα την φασματοσκοπία NMR στα τέλη της δεκαετίας του 1940 και στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Ο Edward Mills Purcell και ο Felix Bloch μοιράστηκαν το βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1952 για τις ανακαλύψεις τους. [117]

Είναι μία πολύ χρήσιμη μέθοδος προσδιορισμού της δομής ενώσεων από την οποία αντλούμε πληροφορίες, αφού παρέχει μία εικόνα του ολικού ανθρακικού σκελετού

μαζί με τα υδρογόνα του για διάφορα οργανικά μόρια. [116] Δεδομένου ότι τα μαγνητικά πεδία είναι μοναδικά ή ιδιαίτερα χαρακτηριστικά για μεμονωμένες ενώσεις, στη σύγχρονη πρακτική της οργανικής χημείας, η φασματοσκοπία NMR είναι μία μέθοδος για την οριστική ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων. Η τεχνική έχει ευρεία εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως η Φυσική, η Χημεία, η Βιοφυσική, η Βιοχημεία, η Μοριακή Βιολογία, η Φαρμακευτική και η Ιατρική. [113][116] Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες με ανάλυση NMR είναι η χημική μετατόπιση (δ), οι χρόνοι αποδιέγερσης (T_1 , T_2), η σταθερά σύζευξης (J) και οι συζεύξεις γειτνιαζόντων πυρήνων στο χώρο (Πυρηνική επίδραση Overhauser / Nuclear Overhauser Effect-NOE). [113]

Το NMR έχει αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τις παραδοσιακές δοκιμές υγρής χημείας, η οποία είναι μια μορφή αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιεί κλασσικές μεθόδους για την ανάλυση υλικών και ονομάζεται έτσι αφού οι περισσότερες αναλύσεις γίνονται στην υγρή φάση, και την τυπική χρωματογραφία για ταυτοποίηση. Ένα μειονέκτημα της είναι ότι απαιτείται μια σχετικά μεγάλη ποσότητα, από 2 έως 50 mg, μιας ουσίας σε καθαρή μορφή, αν και μπορεί να ανακτηθεί μέσω επεξεργασίας. Το NMR γενικά δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο για ουσίες σε μικρές ποσότητες, αν και στις υψηλότερες συχνότητες, η ευαισθησία είναι υψηλότερη.

5.2 ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ SPIN

Το πυρηνικό spin είναι διαφορετικό από το spin των ηλεκτρονίων. Το πυρηνικό spin αντιπροσωπεύει τη συνολική στροφορμή του πυρήνα. Ο πυρήνας αν και αποτελείται από νετρόνια και πρωτόνια ενεργεί σαν να είναι μια ενιαία οντότητα που έχει εγγενή στροφορμή.

Το πυρηνικό spin εξαρτάται από τον μαζικό αριθμό ενός ατόμου. Οι καταστάσεις πυρηνικού spin μπορούν να πάρουν οποιαδήποτε τιμή, κλάσμα ή ακέραιο αριθμό. Αν για έναν πυρήνα, το σύνολο των νετρονίων του και το σύνολο των πρωτονίων του είναι ζυγοί αριθμοί, τότε ο πυρήνας δεν έχει καταστάσεις spin. Εάν το άθροισμα των νετρονίων και των πρωτονίων του πυρήνα είναι περιττός αριθμός, δηλαδή ένα από τα δύο σύνολα είναι περιττός αριθμός και το άλλο ζυγός αριθμός, τότε ο πυρήνας έχει μισό ακέραιο spin ($1/2$, $3/2$, $5/2$, ...). Αν το σύνολο των νετρονίων του πυρήνα και το σύνολο των πρωτονίων του είναι περιττοί αριθμοί τότε ο πυρήνας έχει ακέραιο spin (1, 2, 3, ...). Με άλλα λόγια,

ο πυρήνας με περιττό αριθμό ή πρωτονίων ή και νετρονίων θα έχει πυρηνικό spin, ενώ εάν και τα δύο είναι ζυγοί αριθμοί δεν θα έχει πυρηνικό spin. [118]

Για κάθε πυρήνα που έχει spin, ο αριθμός των επιτρεπτών καταστάσεων spin που μπορεί να πάρει είναι κβαντισμένος και καθορίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin, I . Ο αριθμός αυτός είναι μία φυσική σταθερά για κάθε πυρήνα. Για ένα πυρήνα με κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin I , υπάρχουν $(2I+1)$ επιτρεπτές καταστάσεις spin που κυμαίνονται από $+I$ έως $-I$. Συγκεκριμένα οι τιμές ακολουθούν την σειρά: [115][118]

$$-I, (-I+1), \dots, (I-1), I$$

Στην περίπτωση του υδρογόνου ισχύει ότι $I=1/2$ και συνεπώς οι επιτρεπόμενες καταστάσεις spin του πυρήνα είναι 2. Με τον ίδιο τρόπο αν η τιμή του I ενός στοιχείου είναι γνωστή μπορούμε να βρούμε τις επιτρεπόμενες καταστάσεις spin του πυρήνα αυτού του ατόμου. Στον πίνακα 3 βλέπουμε τις τιμές του I και τον αριθμό των επιτρεπτών καταστάσεων spin για μερικούς πυρήνες ατόμων. Υπάρχουν βέβαια και ορισμένα στοιχεία για τα οποία η τιμή του I είναι άγνωστη.

Πίνακας 3: Οι κβαντικοί αριθμοί spin ορισμένων κοινών πυρήνων

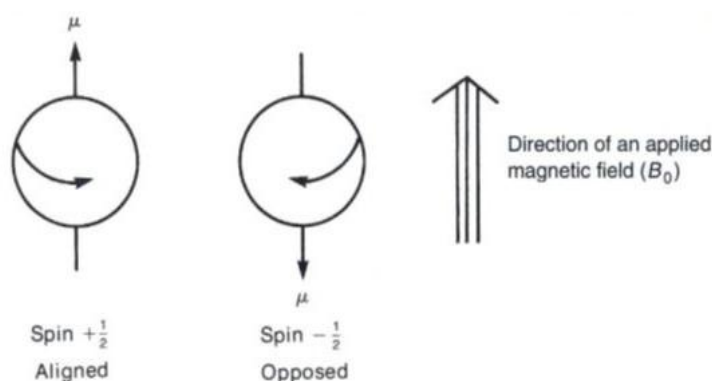
Element	^1H	^2H	^{12}C	^{13}C	^{14}N	^{15}N	^{16}O	^{19}F	^{31}P	^{32}S
Nuclear spin quantum number (I)	1/2	1	0	1/2	1	1/2	0	1/2	1/2	0
Number of spin states	2	3	1	2	3	2	1	2	2	1

Για την εύρεση του κβαντικού αριθμού πυρηνικού spin ενός δεδομένου ατόμου υπάρχουν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού, όπως για παράδειγμα το πείραμα Stern-Gerlach. Το πείραμα πήρε το όνομά του από τους Otto Stern και Walther Gerlach και διεξάχθηκε από αυτούς το 1922. Αυτή ήταν η πρώτη απόπειρα για να αποδειχθεί ότι τα στοιχειώδη σωματίδια κατέχουν τις κβαντικές ιδιότητες. Το πείραμα Stern-Gerlach χρησιμοποιείται για την εύρεση του ηλεκτρονιακού και του πυρηνικού spin των στοιχείων. [119]

5.3 ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΡΟΠΗ

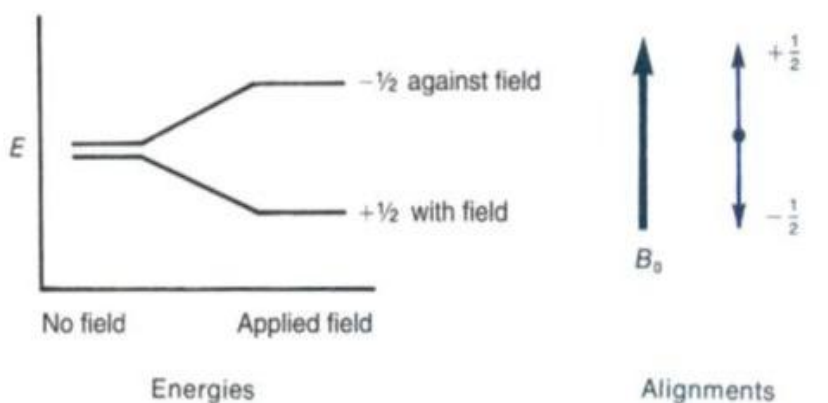
Οι καταστάσεις spin δεν είναι ενεργειακά ισοδύναμες εντός εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, διότι ο πυρήνας είναι ένα φορτισμένο σωματίδιο και κάθε περιστρεφόμενο φορτίο δημιουργεί μαγνητικό πεδίο από μόνο του. Επομένως, ο πυρήνας έχει μαγνητική ροπή (μ) που δημιουργείται από το φορτίο του και το spin του. [115]

Για παράδειγμα, ο πυρήνας του υδρογόνου μπορεί να έχει δεξιόστροφο ($+1/2$) ή αριστερόστροφο ($-1/2$) spin και η πυρηνική μαγνητική ροπή, μ , στις δύο αυτές περιπτώσεις έχει αντίθετη φορά. Όταν εφαρμόζουμε ένα μαγνητικό πεδίο, όλα τα πρωτόνια θα έχουν μαγνητική ροπή είτε παράλληλη είτε αντιπαράλληλη προς αυτό. [115]



Σχήμα 11: Οι δύο επιτρεπόμενες καταστάσεις spin ενός πρωτονίου

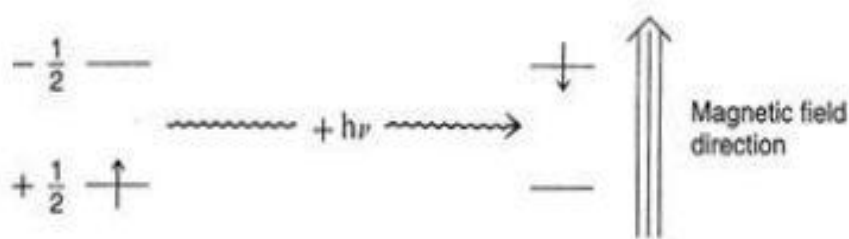
Ο πυρήνας του υδρογόνου μπορεί να προσανατολιστεί μόνο προς την μία ή την άλλη διεύθυνση σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η κατάσταση με spin $+1/2$ είναι χαμηλότερης ενέργειας διότι είναι ευθυγραμμισμένη με το πεδίο, ενώ η κατάσταση με spin $-1/2$ είναι υψηλότερης ενέργειας καθότι αντιτίθεται στο εφαρμοζόμενο πεδίο. [115][118]



Σχήμα 12: Οι καταστάσεις spin ενός πρωτονίου απουσία και παρουσία μαγνητικού πεδίου

5.4 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Το φαινόμενο του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού συμβαίνει όταν πυρήνες ευθυγραμμιζόμενοι με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο απορροφούν ενέργεια και αλλάζουν φορά spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο πεδίο. [115]

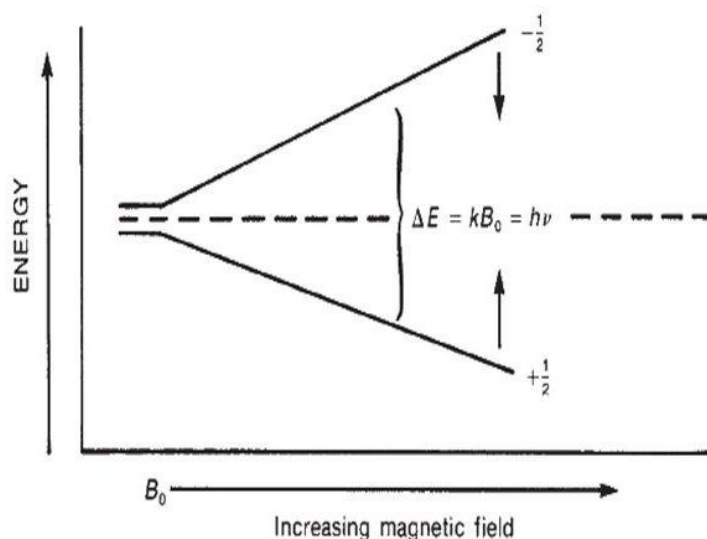


Σχήμα 13: Η διαδικασία ενεργειακής απορρόφησης ενός πρωτονίου κατά το φαινόμενο NMR

Η απορροφούμενη ενέργεια ισούται με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων spin, όπως φαίνεται και στην παρακάτω σχέση: [115]

$$E_{\text{abs.}} = (E_{-1/2} - E_{+1/2}) = h\nu$$

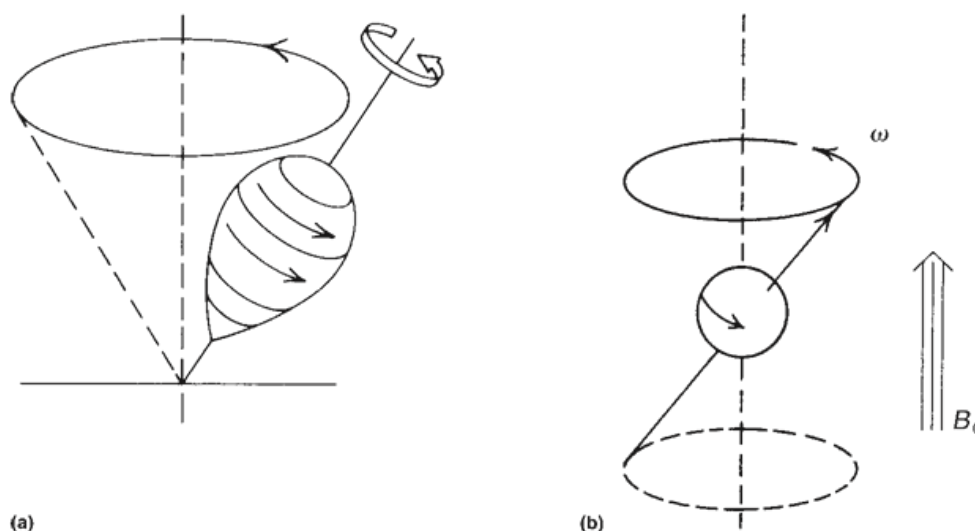
Πρακτικά η ενεργειακή διαφορά είναι συνάρτηση της ισχύος του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, B_0 . Συγκεκριμένα, όσο ισχυρότερο είναι το μαγνητικό πεδίο, τόσο μεγαλύτερη είναι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων spin. [115]



Σχήμα 14: Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων spin ως συνάρτηση της ισχύος του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου

5.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ (ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ)

Η ενέργεια απορροφάται από τους πυρήνες ατόμων εξαιτίας του γεγονότος ότι αυτά περιστρέφονται υπό γωνία κυκλικά στο εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η κίνηση αυτή είναι παρόμοια με τη κίνηση μίας σβούρας καθώς αυτή δεν περιστρέφεται κάθετα στην επιφάνεια του εδάφους αλλά υπό γωνία κυκλικά υπό την επίδραση του βαρυτικού πεδίου. [115]

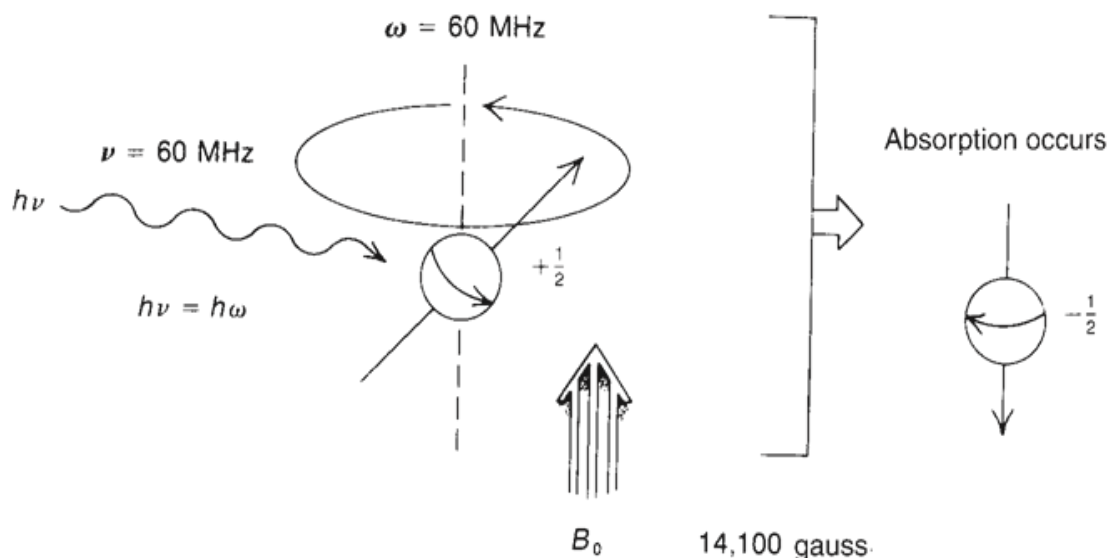


Σχήμα 15: Η περιστροφική κίνηση μίας σβούρας υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου της Γης (αριστερά) και η περιστροφική κίνηση ενός πυρήνα οφειλόμενη στην επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (δεξιά)

Όταν εφαρμόζεται το μαγνητικό πεδίο, ο πυρήνας αρχίζει να περιστρέφεται γύρω από τον άξονά του με γωνιακή συχνότητα, ω , η οποία ονομάζεται και συχνότητα Larmor. Η συχνότητα με την οποία ένας πυρήνας περιστρέφεται είναι ανάλογη με την ισχύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Όσο ισχυρότερο είναι το εφαρμοζόμενο πεδίο, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός της περιστροφής, δηλαδή η γωνιακή συχνότητα. Για ένα πρωτόνιο, εάν το εφαρμοζόμενο πεδίο είναι 1,41 Tesla (14,100 Gauss), η συχνότητα της περιστροφής είναι περίπου 60 MHz. [115][118]

Δεδομένου ότι ο πυρήνας έχει φορτίο λόγω της γωνιακής περιστροφής παράγεται ένα ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο ίδιας συχνότητας με αυτή. Εάν κύματα ραδιοσυχνοτήτων της ίδιας συχνότητας παρέχονται στο πρωτόνιο η ενέργεια μπορεί να απορροφηθεί. Δηλαδή, όταν η συχνότητα των ραδιοκυμάτων της εισερχόμενης ακτινοβολίας ταιριάζει ακριβώς με τη συχνότητα του ταλαντευόμενου ηλεκτρικού πεδίου που παράγεται από τον πυρήνα τα δύο πεδία μπορούν να συζευχθούν και η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί από την εισερχόμενη ακτινοβολία στον πυρήνα, δημιουργώντας

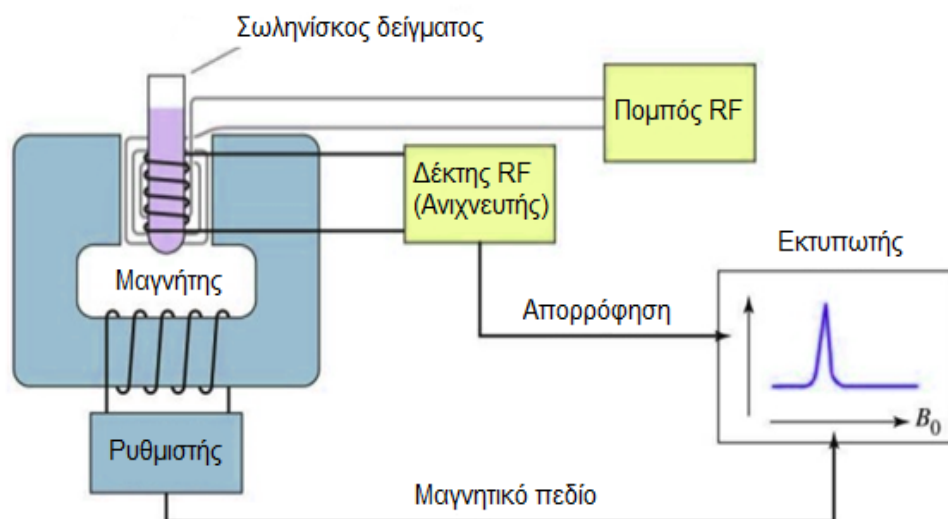
έτσι αλλαγή του spin. Αυτή η συνθήκη ονομάζεται συντονισμός και λέμε ότι ο πυρήνας έχει συντονισμό με το εισερχόμενο ηλεκτρομαγνητικό κύμα, όπως φαίνεται στο σχήμα 16. [115]



Σχήμα 16: Η διαδικασία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Απορρόφηση πραγματοποιείται όταν $\nu = \omega$

5.6 ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ NMR

Οι βασικές μονάδες από τις οποίες αποτελείται ένας φασματογράφος NMR είναι ο μαγνήτης, το σύστημα εκπομπής ραδιοσυχνοτήτων, ο δέκτης ραδιοσυχνοτήτων με έναν ανιχνευτή και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής. [113] Ο μαγνήτης, ο οποίος έχει σωληνοειδές σχήμα και περιέχει υπεραγωγίμο υλικό, είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία πολύ ισχυρού μαγνητικού πεδίου. Το σύστημα εκπομπής ραδιοσυχνοτήτων με τη βοήθεια ενός ταλαντωτή παράγει παλμούς συγκεκριμένης συχνότητας και διάρκειας, οι τιμές των οποίων μπορούν να μεταβάλλονται. Ο δέκτης ραδιοσυχνοτήτων περιλαμβάνει ένα πηνίο που ανιχνεύει τις μεταβολές στη μαγνήτιση των πυρήνων υπό την επίδραση των ραδιοσυχνοτήτων. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής αποθηκεύει τα δεδομένα, τα επεξεργάζεται και ελέγχει τις περισσότερες λειτουργίες του φασματογράφου. [113] Ένας φασματογράφος NMR περιλαμβάνει επίσης μία περιστρεφόμενη θέση στην οποία τοποθετείται το δείγμα και η οποία βρίσκεται μέσα στο μαγνήτη, καθώς και προαιρετικά πηνία κλίσης για μέτρηση της διάχυσης και ηλεκτρονικά συστήματα ελέγχου. [120]



Σχήμα 17: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών στοιχείων που απαρτίζουν τον φασματογράφο NMR

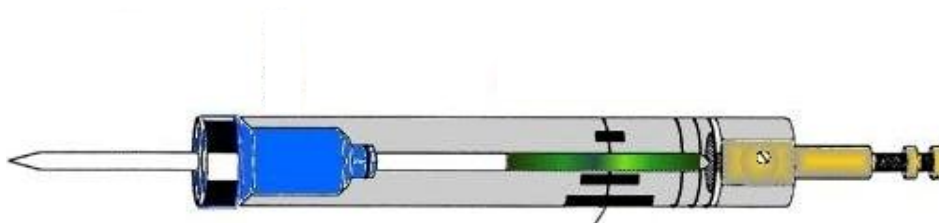
Κατά την ανάλυση με φασματοσκοπία NMR καταγράφεται η συμπεριφορά των ατομικών πυρήνων υπό την επίδραση δύο μαγνητικών πεδίων. Το πρώτο έχει ένταση B_0 και συχνότητα ν_0 και προσανατολίζει τους πυρήνες προκαλώντας μαγνήτιση, ενώ το δεύτερο έχει ένταση B_1 και συχνότητα ν_1 και επιδρά στους πυρήνες με παλμούς ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κατάλληλων συχνοτήτων. Ο αισθητήρας ο οποίος βρίσκεται στο κέντρο του φασματογράφου αποτελείται από συντονιζόμενα κυκλώματα για την εκπομπή παλμών υψηλών συχνοτήτων προς το δείγμα ώστε να διεγερθούν οι παρατηρούμενοι πυρήνες και να λάβουμε την κυματομορφή αποδιέγερσης. Η σειρά παλμών περιλαμβάνει το πιθανό εύρος συχνοτήτων που θα διεγείρουν όλους τους πυρήνες του παρατηρούμενου χημικού στοιχείου (συνήθως $^1\text{H}_1$ ή $^{13}\text{C}_6$). Έτσι έχουμε συντονισμό όλων των πυρήνων που μελετάμε. Μετά τη διέγερση του δείγματος με παλμό ραδιοσυχνότητας από 60 έως 1000 MHz (στη φασματοσκοπία μίας διάστασης απαιτείται συνήθως ένας απλός παλμός), παρατηρείται μία απόκριση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και ακολουθεί ανίχνευση της Ελεύθερης Επαγόμενης Απόσβεσης (Free Induction Decay, FID), η οποία έχει τη μορφή μίας φθίνουσας ταλάντωσης. Είναι ένα πολύ ασθενές σήμα και απαιτεί τη λήψη ευαίσθητων δεκτών ραδιοσυχνοτήτων. Η αποδιέγερση των πυρήνων δηλαδή επάγει στο πηνίο παρατήρησης ένα ρεύμα το οποίο ενισχύεται και καταλήγει στο δέκτη όπου αναδιαμορφώνεται. Το επαγόμενο σε αυτό ηλεκτρικό ρεύμα καταγράφεται με τη μορφή αναλογικού σήματος, το οποίο μετατρέπεται σε ψηφιακό και υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier, όπου με τη μαθηματική αυτή επεξεργασία λαμβάνεται το φάσμα συχνοτήτων του προς μελέτη δείγματος. Ένα φάσμα

από ένα μόνο FID έχει χαμηλό λόγο σήματος προς θόρυβο, αλλά βελτιώνεται εύκολα με περισσότερες επαναλήψεις. Καλά φάσματα ^1H -NMR μπορούν να ληφθούν με 16 επαναλήψεις, οι οποίες διαρκούν μόνο μερικά λεπτά. Ωστόσο, για στοιχεία βαρύτερα από το υδρογόνο, ο χρόνος είναι μεγαλύτερος διαρκώντας από αρκετά λεπτά μέχρι και ώρες και έτσι η απόκτηση φασμάτων τέτοιων στοιχείων μπορεί να είναι χρονοβόρα. Η άθροιση πολλών FIDs απαιτείται προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία. Επίσης, για να ληφθεί καλύτερο φάσμα, εφαρμόζονται περισσότεροι παλμοί. Τέλος, γίνεται βελτίωση του φάσματος μέσω διορθώσεων-ρυθμίσεων με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων του υπολογιστή, καθώς και ολοκλήρωση των κορυφών για να πάρουμε πληροφορίες για τον αριθμό πρωτονίων της ένωσης μας σε φάσματα ^1H -NMR. Πρέπει να τονίσουμε ότι ο αριθμός των παρατηρούμενων πυρήνων είναι ανάλογος προς την ένταση ή το ολοκλήρωμα του σήματος NMR μόνο στα πολύ απλά μονοδιάστατα πειράματα ^1H -NMR. Σε πιο πολύπλοκα πειράματα, όπως για παράδειγμα, τα πειράματα ^{13}C -NMR, το ολοκλήρωμα των κορυφών εξαρτάται από παράγοντες που είναι ελάχιστα γνωστοί και επομένως, το ολοκλήρωμα του σήματος NMR είναι πολύ δύσκολο να ερμηνευθεί. Έτσι λαμβάνεται το φάσμα στην τελική του μορφή. [113]

Για την ανίχνευση των χημικών μετατοπίσεων, το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο πρέπει να είναι σταθερό σε όλο τον όγκο του δείγματος. Οι φασματογράφοι NMR υψηλής ανάλυσης χρησιμοποιούν μία ειδική συσκευή η οποία λέγεται «shim» για να ρυθμίσουν την ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου σε μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb) σε έναν όγκο λίγων κυβικών εκατοστών. Προκειμένου να ανιχνευθεί και να αντισταθμιστεί η ανομοιογένεια στο μαγνητικό πεδίο, ο φασματογράφος διατηρεί ένα «κλείδωμα» στη συχνότητα του δευτερίου του διαλύτη με μια ξεχωριστή μονάδα κλειδώματος. Καθώς η συχνότητα παρατήρησης εξαρτάται από το πεδίο, όταν ο δέκτης ραδιοσυχνοτήτων του δευτερίου παρατηρεί μια διακύμανση πεδίου μέσω μιας αλλαγής της συχνότητας παρατήρησης του δευτερίου (συχνότητα κλειδώματος) τότε μπορεί να διορθώσει την ισχύ του πεδίου. Αυτό ονομάζεται «κλείδωμα πεδίου-συχνότητας». Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και άλλος πυρήνας για το κλείδωμα, όπως παλαιότερα το ^{19}F , αλλά το δευτέριο είναι το πιο βολικό. Στους σύγχρονους φασματογράφους NMR ρυθμίζεται αυτόματα η αντιστάθμιση ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ο χειριστής πρέπει να βελτιστοποιήσει χειροκίνητα τις παραμέτρους του shim για να επιτύχει την καλύτερη δυνατή ανάλυση. [121]

Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με διάλυση αυτών σε δευτεριωμένο διαλύτη και μεταφορά σε σωληνίσκο κατάλληλης διαμέτρου, ο οποίος εισάγεται στον

αισθητήρα. [113] Η πλειοψηφία των πυρήνων σε ένα διάλυμα ανήκουν στον διαλύτη, που απαντάται σε μεγαλύτερη ποσότητα, και οι περισσότεροι από αυτούς είναι υδρογονάνθρακες με πρωτόνια που αλληλεπιδρούν με το NMR. Υπάρχουν δύο λόγοι για τη χρήση δευτεριωμένων διαλυτών στα πειράματα NMR. Ο ένας είναι ότι οι σύγχρονοι φασματογράφοι NMR μετρούν την απορρόφηση του δευτερίου του διαλύτη για τη σταθεροποίηση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Ο άλλος λόγος είναι ότι καθώς υπάρχει πάντοτε περισσότερη ποσότητα διαλύτη από την ουσία που μας ενδιαφέρει στο δείγμα που πρόκειται να ελεγχθεί, χρησιμοποιείται ένας δευτεριωμένος διαλύτης αντί του συνηθισμένου διαλύτη που περιέχει ^1H για να αποφευχθεί η τεράστια απορρόφηση του διαλύτη που θα αλλοιώσει το φάσμα ^1H -NMR. Ο πλέον χρησιμοποιούμενος δευτεριωμένος διαλύτης είναι το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), επίσης συνηθισμένη είναι η χρήση δευτεριωμένου βενζολίου, ενώ για υδρόφιλους αναλύτες χρησιμοποιείται το οξείδιο του δευτερίου (D_2O) και το δευτεριωμένο DMSO (DMSO-d_6). Οι χημικές μετατοπίσεις είναι ελαφρώς διαφορετικές σε κάθε διαλύτη, γι' αυτό τα φάσματα συχνά βαθμονομούνται με βάση τη γνωστή χημική μετατόπιση δ , του πρωτονίου του διαλύτη αντί του τετραμεθυλοσιλανίου (TMS) που συνήθιζε να χρησιμοποιείται ως ένωση αναφοράς παλαιότερα.



Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της θέσης υποδοχής ενός σωληνίσκου NMR

Οι φασματογράφοι NMR είναι σχετικά ακριβοί. Οι σύγχρονοι φασματογράφοι NMR έχουν έναν πολύ ισχυρό, μεγάλο και ακριβό υγρό ηλιακό υπεραγωγίμο μαγνήτη, επειδή η ανάλυση εξαρτάται άμεσα από τη δύναμη του μαγνητικού πεδίου. Λιγότερο δαπανηρές μηχανές, που χρησιμοποιούν μόνιμους μαγνήτες και χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη ανάλυση, είναι επίσης διαθέσιμες και παρέχουν επαρκείς επιδόσεις για ορισμένες εφαρμογές. Υπάρχουν ακόμη φασματογράφοι NMR Benchtop, οι οποίοι είναι σημαντικά πιο συμπαγείς από τους συμβατικούς ισοδύναμους έτσι ώστε να είναι φορητοί και να μπορούν να τοποθετηθούν σε έναν εργαστηριακό πάγκο. Οι φασματογράφοι NMR χαμηλής ανάλυσης παράγουν ευρύτερες κορυφές, οι οποίες μπορούν εύκολα να

επικαλύπτονται μεταξύ τους προκαλώντας προβλήματα στον προσδιορισμό σύνθετων δομών. Η χρήση ισχυρότερων μαγνητικών πεδίων έχει ως αποτέλεσμα την καθαρή ανάλυση των κορυφών και είναι το πρότυπο στη βιομηχανία. [122]

5.7 ΦΑΣΜΑΤΑ NMR

Τα φάσματα NMR διακρίνονται σε μίας διάστασης (1D) και δύο διαστάσεων (2D). [116] Στο πείραμα μίας διάστασης λαμβάνονται οι συντονισμοί των προς μελέτη πυρήνων, ενώ στο πείραμα δύο διαστάσεων λαμβάνονται πληροφορίες για το ποιοι από αυτούς συνδέονται μέσω δεσμών ή βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στο χώρο. Για να αναλύσουμε ένα δείγμα με φασματοσκοπία NMR λαμβάνουμε αρχικά τα φάσματα μίας διάστασης ($^1\text{H}_1$ και $^{13}\text{C}_6$). Αν η ταυτοποίηση δεν είναι πλήρης τότε λαμβάνουμε φάσματα δύο διαστάσεων (COSY, NOESY, HMQC, HMBC κτλ.). [113]

5.7.1 ΦΑΣΜΑΤΑ 1D-NMR

Ένα μονοδιάστατο φάσμα NMR είναι ένα διάγραμμα της έντασης του σήματος συναρτήσει της συχνότητας, όπου τα σήματα έχουν τη μορφή κορυφών. Η λήψη των φασμάτων γίνεται εντός μαγνητικού πεδίου. Η συχνότητα συντονισμού, η ενέργεια απορρόφησης και η ένταση του σήματος είναι ανάλογες της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Η ένταση του πεδίου καθορίζει επίσης τη ευκρίνεια των ληφθέντων φασμάτων, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση τόσο αυξάνεται η ευκρίνεια. [113] Τα φάσματα NMR είναι μοναδικά και συχνά εξαιρετικά προβλέψιμα για μικρά μόρια. Διαφορετικές λειτουργικές ομάδες είναι προφανώς διακριτές και ταυτόσημες λειτουργικές ομάδες με διαφορετικούς γειτονικούς υποκαταστάτες δίνουν ακόμα πιο διακριτά σήματα. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι φασμάτων 1D-NMR είναι τα φάσματα ^1H -NMR και ^{13}C -NMR.

Μία από τις βασικές έννοιες της φασματοσκοπίας NMR μίας διάστασης είναι η χημική μετατόπιση δ (chemical shift), η οποία αφορά τις συχνότητες συντονισμού των προς μελέτη πυρήνων και προκαλείται από πολύ μικρά μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια που περιβάλλουν τους πυρήνες και ως αποτέλεσμα διαφοροποιούν το τελικό μαγνητικό πεδίο που επιδρά σε αυτούς. Δηλαδή ακόμη και αν όλοι οι εξεταζόμενοι πυρήνες έχουν τις ίδιες μαγνητικές ροπές, δεν εμφανίζουν κορυφές στις ίδιες τιμές δ . Η διαφορά αυτή προκύπτει από τα διαφορετικά ηλεκτρονικά

περιβάλλοντα του εξεταζόμενου πυρήνα. Με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, αυτά τα ηλεκτρόνια κινούνται ως απόκριση στο πεδίο και παράγουν τοπικά μαγνητικά πεδία που αντιτίθενται στο πολύ ισχυρότερο εφαρμοσμένο πεδίο. Αυτό το τοπικό πεδίο «προστατεύει» τον πυρήνα από το εφαρμοσμένο μαγνητικό πεδίο και επομένως πρέπει να αυξηθεί η ένταση του πεδίου για να επιτευχθεί συντονισμός. Τέτοιες αυξήσεις είναι πολύ μικρές, συνήθως της τάξης των ppm. Έτσι οι συχνότητες ίδιων πυρήνων είναι διαφορετικές ανάλογα το χημικό τους περιβάλλον. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το ενδομοριακό μαγνητικό πεδίο γύρω από ένα άτομο σε ένα μόριο αλλάζει τη συχνότητα συντονισμού, παρέχοντας έτσι πρόσβαση σε λεπτομέρειες της ηλεκτρονιακής δομής ενός μορίου και των επιμέρους λειτουργικών του ομάδων. Η θέση των κορυφών NMR εξαρτάται από την εξωτερική ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τη συχνότητα αναφοράς (τα σήματα αναφέρονται σε σχέση με ένα σήμα αναφοράς, συνήθως αυτό του TMS ή του διαλύτη). Επιπλέον, επειδή η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα εξαρτάται από τη συχνότητα του φασματογράφου, αυτές οι συχνότητες διαιρούνται μεταξύ τους. Ωστόσο, δεδομένου ότι διαιρούμε το Hz ανά MHz, ο αριθμός που θα προκύψει θα είναι πολύ μικρός και επομένως πολλαπλασιάζεται επί ένα εκατομμύριο. Έτσι η χημική μετατόπιση δ εκφράζεται ως η συχνότητα συντονισμού προς τη συχνότητα του οργάνου και μετράται σε μονάδες δ ή ppm που δεν εξαρτώνται από το φασματογράφο που χρησιμοποιείται. [116]

Επίσης βασική έννοια είναι η σταθερά σύζευξης J (coupling constant), η οποία ισούται με την απόσταση μεταξύ των υποκορυφών μία πολλαπλής κορυφής και είναι χαρακτηριστική των γειτονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πυρήνων που συνδέονται μέσω μικρού αριθμού ομοιοπολικών δεσμών. Η ακριβής τιμή της εξαρτάται από τη γεωμετρία του μορίου. Έτσι για δύο πολλαπλές κορυφές με ίδια τιμή J πιθανότατα τα πρωτόνια που αντιστοιχούν σε αυτές βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις στο μόριο. [116] Μερικές από τις πιο χρήσιμες πληροφορίες για τον προσδιορισμό της δομής μίας ένωσης σε ένα μονοδιάστατο φάσμα NMR προέρχονται από τη σταθερά σύζευξης J μεταξύ πυρήνων που αλληλεπιδρούν με το NMR. Αυτή η σύζευξη προκύπτει από την αλληλεπίδραση γειτονικών πυρήνων μέσω των χημικών δεσμών ενός μορίου και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των κορυφών NMR. Για ένα πρωτόνιο, το τοπικό μαγνητικό πεδίο είναι ελαφρώς διαφορετικό ανάλογα με το αν ένας γειτονικός πυρήνας δείχνει προς το μαγνητικό πεδίο του φασματογράφου ή αντίθετα σε αυτό, γεγονός που δημιουργεί δύο κορυφές ανά πρωτόνιο αντί για ένα. Αυτή η σύζευξη παρέχει λεπτομερή εικόνα της συνδεσιμότητας των ατόμων σε ένα μόριο. Η σύζευξη σε συνδυασμό με τη χημική

μετατόπιση μας λέει όχι μόνο για το χημικό περιβάλλον των πυρήνων, αλλά και για τον αριθμό των γειτονικών πυρήνων εντός του μορίου. Σε πιο σύνθετα φάσματα με πολλαπλές κορυφές με παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις ή σε φάσματα πυρήνων διαφορετικών από το ^1H , η σύζευξη είναι συχνά ο μόνος τρόπος για να διακρίνουμε διαφορετικούς πυρήνες.

Μία άλλη βασική έννοια είναι η πολλαπλότητα κορυφών, η οποία δείχνει τον αριθμό των γειτονικών πυρήνων και δίνεται από τη σχέση $(n+1)$, όπου n ο αριθμός των γειτονικών πυρήνων. [116] Η σύζευξη με n ισοδύναμους πυρήνες διαιρεί το σήμα σε ένα $(n+1)$ πολλαπλό με αναλογίες έντασης ακολουθώντας το τρίγωνο Pascal. Η σύζευξη με επιπλέον ισοδύναμους πυρήνες διαφορετικούς από τον πρώτο με σημαντικά διαφορετικές σταθερές σύζευξης θα οδηγήσει σε περαιτέρω διαχωρισμό κάθε κορυφής της πολλαπλής. Σημειώστε ότι η σύζευξη μεταξύ πυρήνων που είναι χημικώς ισοδύναμοι, δηλαδή έχουν την ίδια χημική μετατόπιση δ , δεν έχει καμία επίδραση στα φάσματα NMR και οι συζεύξεις μεταξύ πυρήνων που βρίσκονται μακριά ο ένας από τον άλλον (συνήθως πάνω από 3 δεσμοί μεταξύ των πρωτονίων) είναι συνήθως πολύ μικρές για να προκαλέσουν διαχωρισμό κορυφών, αλλά μπορούν συχνά να παρατηρηθούν σε κυκλικές και αρωματικές ενώσεις, δίνοντας πιο σύνθετα μοτίβα πολλαπλών κορυφών.

Τέλος, η ολοκλήρωση των φασματικών κορυφών αποτελεί βασική έννοια της φασματοσκοπίας μίας διάστασης αφού με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε ποσοτικά τα πρωτόνια της κάθε ένωσης. [116] Όπως αναφέραμε και παραπάνω ο αριθμός των παρατηρούμενων πυρήνων είναι ανάλογος προς την ένταση ή το ολοκλήρωμα του σήματος NMR μόνο στα πολύ απλά μονοδιάστατα πειράματα ^1H -NMR. Σε πιο πολύπλοκα πειράματα, όπως για παράδειγμα, τα πειράματα ^{13}C -NMR, το ολοκλήρωμα των κορυφών εξαρτάται και από άλλους παράγοντες που είναι ελάχιστα γνωστοί οπότε είναι πολύ δύσκολο να ερμηνευθεί.

5.7.2 ΦΑΣΜΑΤΑ 2D-NMR

Η φασματοσκοπία 2D-NMR είναι μία φασματοσκοπία συσχέτισης, η οποία αποτελεί μια πιο αναπτυγμένη μορφή NMR. Στη φασματοσκοπία συσχέτισης, η εκπομπή οφείλεται σε ένα πυρήνα όπου το μαγνητικό του πεδίο συσχετίζεται με έναν άλλο πυρήνα μέσω σύζευξης λόγω σύνδεσης ή εγγύτητας στο χώρο. Έτσι σε ένα δισδιάστατο φάσμα NMR παρατηρούνται συσχετισμένοι συντονισμοί. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση των

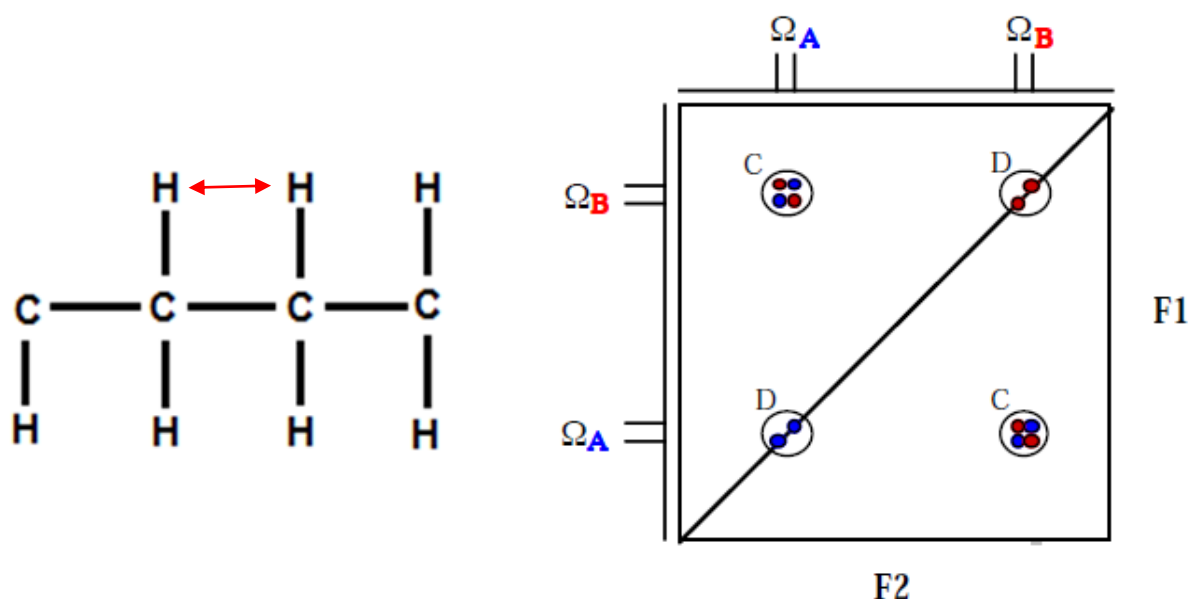
γειτονικών πυρήνων που μελετάμε και την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση των συντονισμών. Υπάρχουν επίσης πιο σύνθετες μέθοδοι τριών και τεσσάρων διαστάσεων και μια ποικιλία μεθόδων σχεδιασμένων για τον αποκλισμό ή την ενίσχυση συγκεκριμένων τύπων συντονισμών.

Τα δισδιάστατα φάσματα NMR παρέχουν περισσότερες πληροφορίες για ένα μόριο από τα μονοδιάστατα φάσματα NMR και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τον προσδιορισμό της δομής ενός μορίου, ιδιαίτερα για ενώσεις ή μείγματα ενώσεων που είναι πολύ περίπλοκες για να αναλυθούν με χρήση μονοδιάστατου NMR. Ένας περιορισμός στη χρήση αυτής της τεχνικής είναι η εγγενής μικρή ευαισθησία της τεχνικής που έχει ως συνέπεια την αύξηση του χρόνου λήψης του φάσματος.

Τα φάσματα δύο διαστάσεων παρέχουν τη δυνατότητα εντοπισμού αλληλεπιδράσεων πυρήνων ανάλογων της δομικής διάταξης των μορίων και της γειτνίασης των ατόμων στο χώρο. [116] Σε ένα δισδιάστατο φάσμα NMR καταγράφονται δύο διαφορετικές πληροφορίες σε δύο άξονες συχνότητων που ονομάζονται άμεσος (F2) και έμμεσος (F1). Στον άμεσο άξονα οι συχνότητες των κορυφών προκύπτουν απευθείας από τον ανιχνευτή ενώ στον έμμεσο προκύπτουν από δεύτερο μετασχηματισμό Fourier. Στον έναν άξονα καταγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα ($^1\text{H}_1$ ή $^{13}\text{C}_6$) και στον άλλον άξονα είτε η σταθερά σύζευξης J είτε οι χημικές μετατοπίσεις άλλων πυρήνων που αλληλεπιδρούν με τους προηγούμενους. [113]

Το πρώτο δισδιάστατο πείραμα ήταν το COSY και προτάθηκε από τον Jean Jeener, καθηγητή του Πανεπιστημίου Libre de Bruxelles, το 1971. [123][124] Αυτό το πείραμα εφαρμόστηκε αργότερα από τους Walter P. Aue, Enrico Bartholdi και Richard R. Ernst, οι οποίοι δημοσίευσαν το έργο τους το 1976. [125] Στα φάσματα συσχέτισης πυρήνων, και οι δύο άξονες του φάσματος περιέχουν απορροφήσεις πυρήνων. [113][116] Στα ομοπυρηνικά φάσματα COSY-NMR περιέχονται απορροφήσεις του ίδιου πυρήνα ($^1\text{H}_1$ - $^1\text{H}_1$ ή $^{13}\text{C}_6$ - $^{13}\text{C}_6$), ενώ στα ετεροπυρηνικά φάσματα COSY-NMR περιέχονται απορροφήσεις διαφορετικών πυρήνων ($^1\text{H}_1$ - $^{13}\text{C}_6$). [113] Τα πιο συνηθισμένα είναι τα ομοπυρηνικά φάσματα COSY-NMR, τα οποία παρέχουν πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων πυρήνων (συνήθως του $^1\text{H}_1$) με το γειτονικό τους περιβάλλον, δηλαδή γειτονικών ομοειδών πυρήνων που παρουσιάζουν σύζευξη spin-spin μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Η διαγώνιος του φάσματος περιλαμβάνει τις κορυφές που είναι η προβολή των απορροφήσεων των ίδιων πυρήνων στους δύο άξονες και οι εκτός διαγώνιου κορυφές αντιστοιχούν σε γειτονικούς πυρήνες που αλληλεπιδρούν

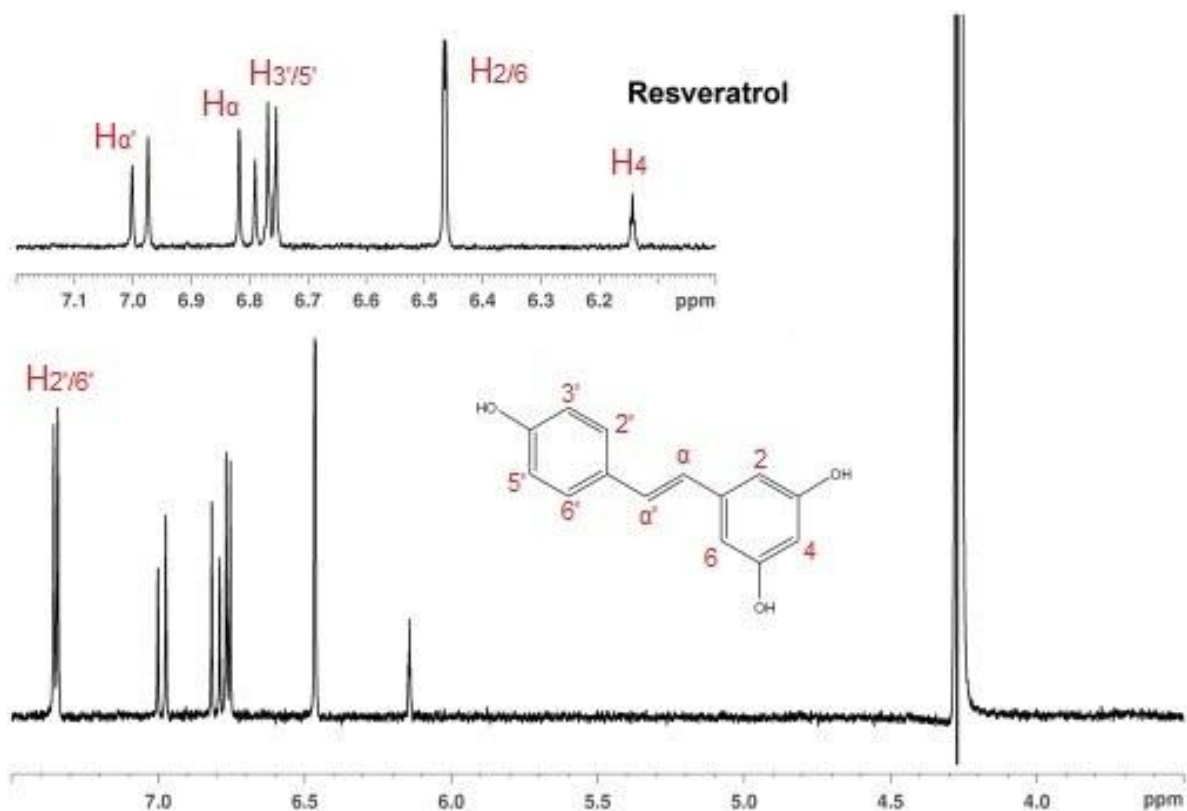
μέσω ομοιοπολικών δεσμών και έχουν μία σταθερά σύζευξης J . [116] Έτσι ένα φάσμα COSY-NMR δίνει πληροφορίες για τις συζεύξεις του κάθε πυρήνα μέσω ομοιοπολικών δεσμών και κατ' επέκταση τη δομή του κάθε μορίου. [113]



Σχήμα 19: Σχηματική απεικόνιση ενός ομοπυρηνικού πειράματος ^1H - ^1H COSY (αριστερά) και ενός φάσματος COSY με σήματα διαγώνιου D και κορυφές διασταύρωσης C (δεξιά)

5.7.3 ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

Η ρεσβερατρόλη, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 20, εμφανίζει 6 κορυφές στο φάσμα ^1H -NMR. Το H_4 παρουσιάζει μία τριπλή κορυφή με μικρή τιμή σταθεράς J λόγω σύζευξης με τα H_2 και H_6 που είναι απομακρισμένα από αυτό. Τα H_2 και H_6 είναι ισοδύναμα και παρουσιάζουν μία διπλή κορυφή με μικρή τιμή J λόγω σύζευξης με το H_4 . Τα H_3' και H_5' είναι ισοδύναμα μεταξύ τους (para-υποκατάσταση αρωματικού δακτυλίου) και παρουσιάζουν μία διπλή κορυφή λόγω σύζευξης με τα H_2' και H_6' , αντίστοιχα. Το H_α παρουσιάζει μία διπλή κορυφή λόγω σύζευξης με το $\text{H}_{\alpha'}$ και το $\text{H}_{\alpha'}$ παρουσιάζει μία διπλή κορυφή λόγω σύζευξης με το H_α . Τέλος, τα H_2' και H_6' είναι και αυτά ισοδύναμα μεταξύ τους (para-υποκατάσταση αρωματικού δακτυλίου) και παρουσιάζουν μία διπλή κορυφή λόγω σύζευξης με τα H_3' και H_5' , αντίστοιχα. Οι συχνότητες συντονισμού άρα και οι χημικές μετατοπίσεις των υδρογόνων της ρεσβερατρόλης διαφέρουν για την trans- και cis-μορφή. Επίσης, οι συχνότητες συντονισμού των υδρογόνων μεταβάλλονται λίγο όταν χρησιμοποιούμε διαφορετικούς διαλύτες κατά τη λήψη του φάσματος, οπότε και οι κορυφές θα είναι ελαφρώς μετατοπισμένες. [126]



Σχήμα 20: Το φάσμα ^1H -NMR της ρεσβερατρόλης (D_2O , 600 MHz) [126]

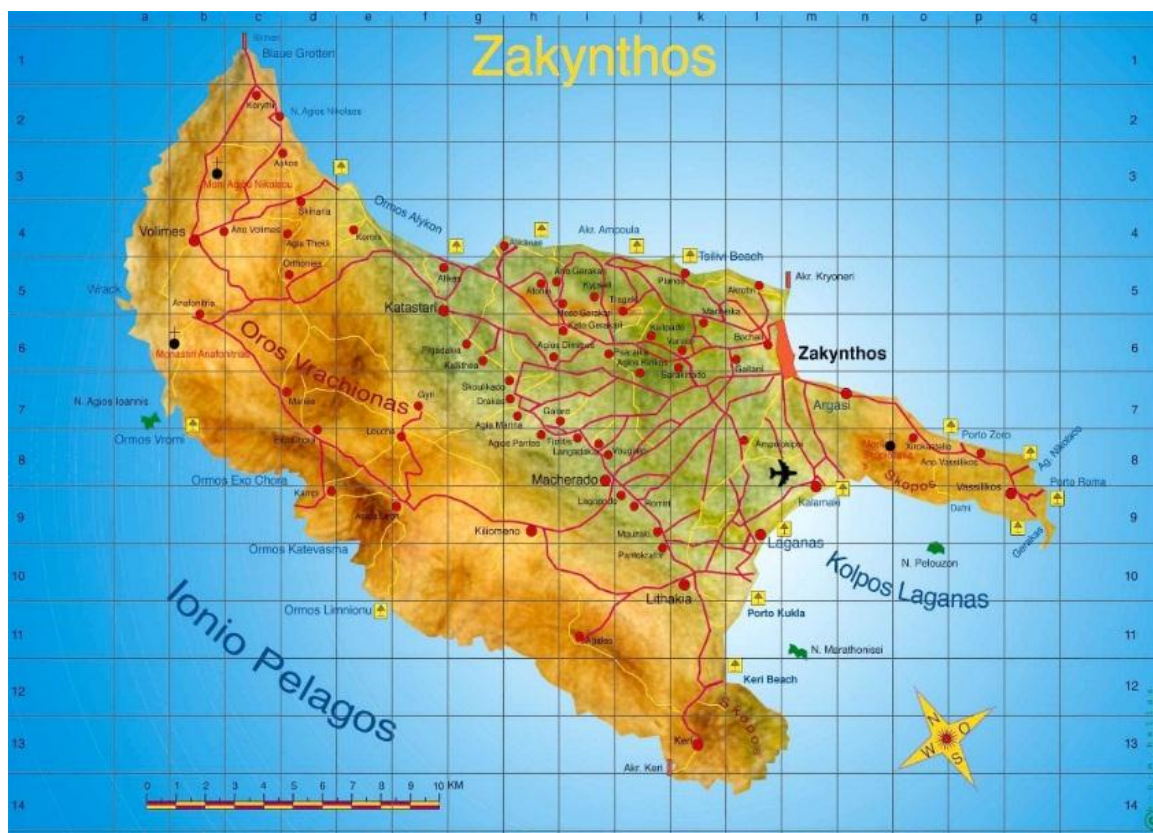
Στο δισδιάστατο φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR της ρεσβερατρόλης θα εμφανίζονται 3 κορυφές διασταύρωσης. Η μία θα αντιστοιχεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των γειτονικών υδρογόνων $\text{H}_{2'/6'}$ και $\text{H}_{3'/5'}$ (^3J), η δεύτερη στην αλληλεπίδραση μεταξύ των γειτονικών υδρογόνων $\text{H}_{\alpha'}$ και H_{α} (^3J), και η Τρίτη στην αλληλεπίδραση μεταξύ των υδρογόνων $\text{H}_{2/6}$ και H_4 (^4J) της ρεσβερατρόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΖΑΚΥΝΘΟΥ

6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΝΗΣΙ

Η Ζάκυνθος, γνωστή διεθνώς και με το όνομα Φιόρο του Λεβάντε (Άνθος της Ανατολής) κατά τους Βενετσιάνους, είναι ένα από τα νησιά των Επτανήσων. Είναι το ενδέκατο σε έκταση ελληνικό νησί με συνολική έκτασή 405.6 km², από τα οποία τα 178.3 km² είναι πεδινές εκτάσεις, τα 223.7 km² είναι ημιορεινές εκτάσεις και τα 3.6 km² είναι ορεινές εκτάσεις. Το υψόμετρο του νησιού φτάνει τα 758 m. Το κλίμα της Ζακύνθου είναι ήπιο, θαλάσσιο-μεσογειακό και υγρό με πολλές βροχές από το Νοέμβριο μέχρι τον Ιανουάριο και μεγάλη ηλιοφάνεια όλο το έτος, αν και έχει επηρεαστεί από τις παγκόσμιες κλιματικές αλλαγές. Έχει πλούσια βλάστηση και είναι νησί με σημαντική αγροτική παραγωγή, στηριγμένη κυρίως στην καλλιέργεια της ελιάς, των εσπεριδοειδών, του σταφυλιού και της σταφίδας. Η γεωργική γή καλύπτει το 42,2% του εδάφους της (171.5 km²). [127]



Εικόνα 2: Ο χάρτης της Ζακύνθου

Η Ζάκυνθος έχει μεγάλες εκτάσεις με αμπελώνες, όπου καλλιεργείται ένα απίστευτα ευρύ φάσμα ποικιλιών σταφυλιών, από τις οποίες παράγεται μία μεγάλη ποικιλία οίνων. [128][129] Δεν είναι τυχαίο άλλωστε το γεγονός ότι, η Ζάκυνθος θεωρείται ένα από τα πιο πολυποικιλιακά σε σταφύλια νησί της Μεσογείου. [130] Το ήπιο κλίμα της με τις άφθονες βροχοπτώσεις ευνοεί σημαντικά την ανάπτυξη των σταφυλιών. [129] Επίσης, αποδείχτηκε ένα εξαιρετικό μέρος για την παραγωγή σταφυλιών εξαιτίας του χαμηλού υψομέτρου. [130] Να σημειώσουμε ακόμα ότι στη Ζάκυνθο υπάρχουν σήμερα αμπέλια μεγάλης ηλικίας, των οποίων η καλλιέργεια παραμένει παραδοσιακή, ήπια και μάλιστα χωρίς τη χρήση ζιζανιοκτόνων. [131]

Παραδοσιακά, η καλλιέργεια των σταφυλιών είναι μια από τις κύριες ασχολίες των Ζακυνθινών. Η ασχολία αυτή ξεκινάει από τους αρχαίους χρόνους, από τότε, η Ζάκυνθος ήταν γνωστή για τους οίνους της. [128] Αργότερα οι Ενετοί, αφού είδαν ότι το μέρος αυτό ήταν ιδανικό και λόγω των εδαφοκλιματικών συνθηκών αλλά και για εμπόριο, φρόντισαν κατά τον χρόνο της κυριαρχίας τους για την εντατική καλλιέργεια των σταφυλιών. [128][130] Κατά τη διάρκεια της έλλειψης οίνου στην Ευρώπη εξαιτίας της κρίσης από τη φυλλοξήρα, ένα μεγάλο μέρος της παραγωγής της Ζακύνθου εξαγόταν σε πολλές χώρες. [130]

Η οινοπαραγωγική περιοχή ξεκινά από τον Κόλπο των Αλυκών, και εκτείνεται προς τον Κόλπο του Λαγανά. Αυτή είναι η εύφορη πεδιάδα του νησιού, όπου παράγονται οι πιο πλούσιοι σε γεύση και άρωμα τοπικοί οίνοι. Το έδαφος της Ζακύνθου δίνει στα σταφύλια μια πολύ ιδιαίτερη γεύση, όπως και στον παραδοσιακό οίνο Βερντέα. [128]

Η παραδοσιακή Βερντέα Ζακύνθου είναι ο πιο γνωστός οίνος του νησιού και ανήκει στην κατηγορία των οίνων ΠΓΕ. [132] Πρόκειται για ένα λευκό πολυποικιλιακό οίνο. [129] Οι απόψεις δίστανται ως προς τη γεωγραφική προέλευση, τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία και το πότε παρασκευάστηκε ο οίνος Βερντέα. Κατά τον 15^ο αιώνα ήταν ευρύτατα γνωστός και πιθανότατα παραγόταν από την ποικιλία *Verdea d' arcetri*. Δεν υπάρχουν όμως στοιχεία για την παρουσία αυτής της ποικιλίας στη Ζάκυνθο. Πιο πιθανό είναι ότι η ονομασία του οφείλεται στο πρασινωπό χρώμα του (*verde* = πράσινο). Την άποψη αυτή ενισχύει το γεγονός ότι, ο οίνος αυτός είναι πολυποικιλιακής σύνθεσης και συγκεκριμένα από σταφύλια με διαφορετικό χρόνο ωρίμανσης. [133] Παραδοσιακά, ο οίνος αυτός ήταν ξηρός, με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη, παλαιωμένος σε δρύινα βαρέλια. Οι περισσότεροι οίνοι του νησιού διανέμονται ως παραδοσιακή Βερντέα. [129] Όμως, στη Ζάκυνθο, εκτός των λευκών ποικιλιών που

συμμετέχουν στην παραγωγή της Βερντέα, καλλιεργούνται και πολλές άλλες λευκές και ερυθρές γηγενείς και εν πολλοίς, σπάνιες ποικιλίες αμπέλου. Παρακάτω αναφέρονται τέσσερις από τις πιο γνωστές ποικιλίες του νησιού που καλλιεργούνται περισσότερο. [132]

6.2 ΡΟΜΠΟΛΑ

Η Ρομπόλα είναι μία παλαιά λευκή ποικιλία οινοποιίας, η οποία είναι γνωστή από τον 12^ο αιώνα. Πρόκειται για γηγενή ποικιλία των νησιών του Ιονίου. Ονομάζεται Ρομπόλα άσπρη ή Ρομπόλα κέρινη για να διακρίνεται από τις δύο χρωματικές παραλλαγές της, την Κοκκινόρομπόλα και τη Ρομπόλα μαύρη ή Μαυρορομπόλα. [133] Παλαιότερα η Ρομπόλα είχε θεωρηθεί ότι είναι η ίδια με τη Ribolla gialla της Ιταλίας ή τη Rebula της Σλοβενίας. Ωστόσο, φυλογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η ελληνική, επτανησιακή Ρομπόλα αποτελεί ξεχωριστή ποικιλία, έχοντας περισσότερες γενετικές ομοιότητες με το ζακυνθινό Γουστολίδι, το οποίο αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω. [131]

Η Ρομπόλα είναι ίσως η πιο εκλεκτή ελληνική ποικιλία σταφυλιού. Συνδέεται κατά κύριο λόγο με την Κεφαλονιά, καθώς είναι η μόνη ποικιλία ΠΟΠ. Ωστόσο, καλλιεργείται σε μικρότερο βαθμό και στα άλλα νησιά του Ιονίου, όπως την Κέρκυρα, την Ιθάκη και φυσικά τη Ζάκυνθο, όπου αποτελεί ένα μικρό κομμάτι των λευκών καλλιεργούμενων ποικιλιών (κυριαρχούν οι ποικιλίες Σκιαδόπουλο και Παύλος). Επίσης, η Ρομπόλα καλλιεργείται και σε ορισμένες ημιορεινές περιοχές της δυτικής και κεντρικής Ελλάδας. [131] Η καλλιέργεια της καταλαμβάνει έκταση περίπου 3000 στρ.. [133]

Η Ρομπόλα παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα και ευδοκίμει σε ξηρά, σχετικά φτωχά, χαλικώδη, πετρώδη εδάφη με ασβεστόλιθο, σε ημιορεινές πλαγιές που ευνοούνται από το μικροκλίμα, ένεκα της εγγύτητας με τη θάλασσα, με τις θερμές ημέρες του καλοκαιριού να εξισορροπούνται από τη βραδινή δροσιά και βεβαίως τις αρκετές χειμωνιάτικες βροχές. [131][133] Τοποθεσίες με τέτοιες συνθήκες προσφέρουν τα Ιόνια νησιά. [131] Η Ρομπόλα παρουσιάζει σημαντική ευαισθησία στην ανθόρροια και έχει μεγάλη ευαισθησία σε ασθένειες. [131][133] Τα αμπέλια Ρομπόλας έχουν χαμηλές προς μέτριες στρεμματικές αποδόσεις και ωριμάζουν προς τα τέλη του Αυγούστου. [131] Η ράγα είναι μικρή έως μέτρια με κίτρινο του ήλεκτρου ή κιτρινοπράσινο χρώμα. [133]

Η Ρομπόλα αποτελεί μια πραγματικά μοναδική ποικιλία. Το σταφύλι αυτό αν καλλιεργηθεί και οινοποιηθεί σωστά, δίνει λευκό ξηρό οίνο με υψηλό αλκοολικό βαθμό και μέτρια έως υψηλή οξύτητα. [133] Ο οίνος που παράγεται από αυτή την ποικιλία έχει ανοιχτό χρυσοπράσινο χρώμα και ιδιαίτερα φρουτώδη αρώματα. [131]

6.3 ΓΟΥΣΤΟΛΙΔΙ

Το Γουστολίδι είναι μία παλαιά ελληνική λευκή ποικιλία οινοποιίας των Ιόνιων νησιών. Αναφέρεται και ως Γουστουλίδι, Αυγουστολίδι, Βοστολίδι και Βοστυλίδι. Παλαιότερα αποτελούσε τη σπουδαιότερη και πλέον διαδεδομένη ποικιλία της Ζακύνθου, όμως σήμερα η καλλιέργεια της έχει περιοριστεί αισθητά. Επίσης, αποτελούσε βασική ποικιλία από την οποία παραγόταν ο οίνος Βερντέα, μέχρι που αντικαταστάθηκε από την ποικιλία Σκιαδόπουλο. Θεωρείται συγγενής με την ιταλική ποικιλία Giustulisa bianca και εφάμιλλη των γαλλικών ποικιλιών. [133]

Πρόκειται για μία ανθεκτική ποικιλία στην ξηρασία που προσαρμόζεται άριστα σε φτωχά, χαλικώδη εδάφη. Είναι ευαίσθητη σε ορισμένες ασθένειες και ανθεκτική σε άλλες, ενώ παρουσιάζει τάση στην ανθόρροια. Η ποικιλία αυτή ωριμάζει νωρίτερα από τις υπόλοιπες και η ράγα της είναι μικρή έως μέτρια με κιτρινοχρυσίζων χρώμα και φακίδια στο φλοιό. [133]

Το Γουστολίδι είναι ποικιλία με ιδιαίτερο χαρακτήρα, που δίνει οίνους με πλούσιο άρωμα. Παρά το γεγονός ότι η καλλιέργεια της έχει περιοριστεί αρκετά, βρίσκεται και σε μονοποικιλιακές ετικέτες, σε παλαιωμένη ή μη μορφή.

6.4 ΠΑΥΛΟΣ

Πρόκειται για μία σπάνια γηγενής λευκή ποικιλία που συναντάτε στα Ιόνια νησιά και περισσότερο στη Ζάκυνθο. Συμμετέχει στον οίνο κατά παράδοση Βερντέα μαζί με άλλες ποικιλίες αλλά και πολύ σπάνια βρίσκεται και σε μονοποικιλιακές ετικέτες. Η ποικιλία Παύλος ωριμάζει αργά το Σεπτέμβρη και δίνει μεγάλη παραγωγή. Ο οίνος που παράγεται από αυτή την ποικιλία έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και μέτρια οξύτητα. [130]

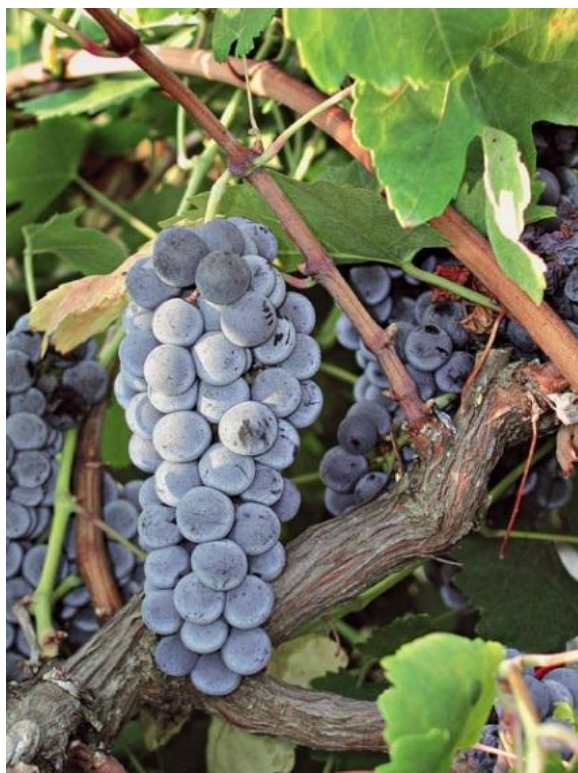
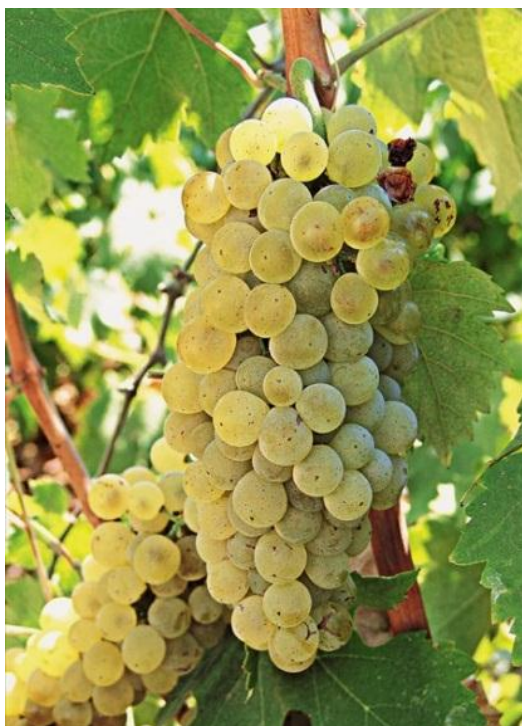
6.5 ΑΥΓΟΥΣΤΙΑΤΗΣ

Ο Αυγουσιτιάτης είναι μία παλαιά ερυθρή ποικιλία οινοποιίας της Δυτικής Ελλάδας και των Ιονίων νησιών, άγνωστης προέλευσης. Χρονολογείται ότι εισήχθει στη Δυτική Ευρώπη και στη Ζάκυνθο τον 14^ο αιώνα. [133][134]

Η ποικιλία αυτή απαντάται σε πολύ συγκεκριμένες τοποθεσίες, όπως στη Δυτική πλευρά της Πελοποννήσου και τη Ζάκυνθο όπου αποτελεί χαρακτηριστική ποικιλία του νησιού. Ο Αυγουσιτιάτης είναι στενά συνδεδεμένος με το νησί της Ζακύνθου, καθώς αποτελεί σημαντικό μέρος της αμπελοκαλλιέργειας ερυθρών σταφυλιών, καλύπτοντας εκτάσεις πάνω από 1800 στρ.. [134]

Πρόκειται για μία ποικιλία ανθεκτική στην ξηρασία, η οποία παράγει άριστα σε εδάφη χαλικώδη, αμμοαργιλώδη, αργιλοπηλώδη, μέσης σύστασης και γονιμότητας, καλώς αποστραγγιζόμενα. [133][134] Επίσης, παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντοχή σε ασθένειες. [133] Η καλλιέργειά της έχει μικρές αποδόσεις. [134] Η ράγα της είναι μέτρια σε μέγεθος με ερυθρομέλανο φλοιό. [133][134]

Χάρη στο μικροκλίμα και τις ημιορεινές τοποθεσίες καλλιέργειάς του, ο Αυγουσιτιάτης δίνει κυρίως ξηρούς αλλά και γλυκούς λιαστούς οίνους με βαθύ και ζωηρό κόκκινο χρώμα και έντονα αρώματα. Ο οίνος που παράγεται από την ποικιλία αυτή ωριμάζει συνήθως σε δρύινο βαρέλι, είναι πλούσιος σε ταννίνες που τον καθιστούν στυφό, και έχει μέτρια προς υψηλή οξύτητα και περιεκτικότητα σε αλκοόλη. [134] Ο ξεχωριστός αρωματικός χαρακτήρας αυτής της ποικιλίας την καθιστά χρήσιμη για παραγωγή τοπικών οίνων με συνοινοποίηση με άλλες ποικιλίες. [133] Έτσι, αρκετοί οινοποιοί παράγουν οίνους συνδυάζοντας τον Αυγουσιτιάτη με άλλες, ελληνικές ή ξένες ποικιλίες, εξ ου και η σπανιότητά του σε μονοποικιλιακές εμφιαλώσεις. Ο Αυγουσιτιάτης κατατάσσεται στην κατηγορία των εξεζητημένων οίνων, λόγω της σπάνιας ποικιλίας σταφυλιού, της παραδοσιακής καλλιέργειας αυτού και της μικρής παραγωγής του. [134]



Εικόνα 3: Οι ποικιλίες Ρομπόλα (πάνω αριστερά), Γουστολίδι (πάνω δεξιά), Παύλος (κάτω αριστερά) και Αυγουσιιάτης (κάτω δεξιά)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

7.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

- ✓ Απιονισμένο νερό
- ✓ Αιθανόλη (99.99%, Fisher Scientific)
- ✓ Μεθανόλη (99.9%, Carlo Erba)
- ✓ Δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD 99.8%, Euriso-Top)
- ✓ Ακεταλδεΐδη (99.5%, Riedel-de Haën)
- ✓ Συριγγαλδεΐδη (>98.0%, Alfa Aesar)
- ✓ Ακετονιτρίλιο (99.9 %, Merck)
- ✓ Trans-Πεσβερατρόλη (>99.0%, TCI)
- ✓ Ρητίνη XAD-4 (Rohm and Haas)

7.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ✓ Φασματογράφος NMR Bruker DRX 400
- ✓ Περιστροφικός εξατμιστήρας
- ✓ Αντλία κενού
- ✓ Λουτρό υπερήχων

7.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται πληροφορίες για τα δείγματα οίνων που μελετήσαμε βάσει των οποίων θα τα συγκρίνουμε μεταξύ τους στο επόμενο κεφάλαιο.

7.3.1 ΛΙΣΤΑ ΚΩΔΙΚΩΝ

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι κωδικοί που δόθηκαν στα άγνωστα δείγματα μονοποικιλιακών οίνων και στα πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν.

Πίνακας 4: Αντιστοίχιση κωδικών και αγνώστων δειγμάτων ή προτύπων διαλυμάτων

Κωδικός	Άγνωστο δείγμα / Πρότυπο διάλυμα
PROT1	Πρότυπο διάλυμα 0.1 mg/L
PROT1N	Πρότυπο διάλυμα 0.25 mg/L
PROT2	Πρότυπο διάλυμα 0.5 mg/L
PROT3	Πρότυπο διάλυμα 1.0 mg/L
PROT4	Πρότυπο διάλυμα 1.5 mg/L
NKZW1A	Άγνωστο δείγμα Ρομπόλα 2015
NKZW2A	Άγνωστο δείγμα Ρομπόλα 2016
NKZW3A	Άγνωστο δείγμα Γουστολίδι 2015
NKZW4A	Άγνωστο δείγμα Γουστολίδι 2016
NKZW5A	Άγνωστο δείγμα Παύλος 2015
NKZW6A	Άγνωστο δείγμα Παύλος 2016
NKZW7AN	Άγνωστο δείγμα Αυγουσιιάτης 2015
NKZW8A	Άγνωστο δείγμα Αυγουσιιάτης 2016
NKZW9AN	Άγνωστο δείγμα Αυγουσιιάτης 2015
NKZW10AN	Άγνωστο δείγμα Αυγουσιιάτης 2016

7.3.2 ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για το κάθε δείγμα μονοποικιλιακού οίνου που αναλύθηκε, απαντήθηκε το παρακάτω ερωτηματολόγιο. Στον πίνακα 5 καταγράφονται όλες οι πληροφορίες που προκύπτουν από αυτό.

- 1) Ποιο είναι το όνομα του οινοποιείου;
- 2) Ποιο είναι το όνομα του παραγωγού;
- 3) Ποιο είναι το όνομα του οίνου;
- 4) Από ποια ποικιλία σταφυλιού παράγεται ο οίνος;
- 5) Ποιο είναι το έτος παραγωγής του οίνου;
- 6) Πότε είναι η περίοδος του τρύγου;
- 7) Πόσος είναι χρόνος παλαίωσης και που γίνεται (βαρέλι, μεταλλική δεξαμενή);
- 8) Ποια είναι η ηλικία του αμπελιού;
- 9) Τι μόρφωση έχει το πρέμνο;
- 10) Ποια είναι η περιοχή καλλιέργειας της ποικιλίας σταφυλιού;
- 11) Σε τι υψόμετρο γίνεται η καλλιέργεια;
- 12) Πόση είναι η κλίση του εδάφους;
- 13) Τι δομή έχει το έδαφος;

Πίνακας 5: Πληροφορίες δειγμάτων οίνων

Κωδικός δείγματος	NKZW1A	NKZW2A	NKZW3A	NKZW4A	NKZW5A	NKZW6A	NKZW7AN	NKZW8A	NKZW9AN	NKZW10AN
Όνομα οиноποιείου	Τέχνη & Οίνος	Τέχνη & Οίνος	Κλήμα Γράμψα	Κλήμα Γράμψα	Κλήμα Γράμψα	Κλήμα Γράμψα	Τέχνη & Οίνος	Τέχνη & Οίνος	Κλήμα Γράμψα	Κλήμα Γράμψα
Όνομα παραγωγού	Γιάννης Γιατράς Γκούμας	Γιάννης Γιατράς Γκούμας	Τάσος & Χρήστος Γράμψας	Τάσος & Χρήστος Γράμψας	Τάσος & Χρήστος Γράμψας	Τάσος & Χρήστος Γράμψας	Γιάννης Γιατράς Γκούμας	Γιάννης Γιατράς Γκούμας	Τάσος & Χρήστος Γράμψας	Τάσος & Χρήστος Γράμψας
Όνομα οίνου	Μαΐστρος	Μαΐστρος	Novita	Novita	Παύλος	Παύλος	Γραίγος	Γραίγος	Αυγουσιάτης στη ρίζα του βουνού	Αυγουσιάτης στη ρίζα του βουνού
Ποικιλία σταφυλιού	Ρομπόλα	Ρομπόλα	Γουστολίδι	Γουστολίδι	Παύλος	Παύλος	Αυγουσιάτης	Αυγουσιάτης	Αυγουσιάτης	Αυγουσιάτης
Έτος παραγωγής	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
Περίοδος τρύγου	Τέλη Αυγούστου	Τέλη Αυγούστου	Τέλη Αυγούστου	Τέλη Αυγούστου	Τέλη Αυγούστου	Τέλη Αυγούστου	Αρχές Σεπτέμβρη	Αρχές Σεπτέμβρη	Αρχές-μέσα Σεπτέμβρη	Αρχές-μέσα Σεπτέμβρη
Χρόνος παλαίωσης	4-5 μήνες (δρύινα βαρέλια)	4-5 μήνες (δρύινα βαρέλια)	όχι (μεταλλική δεξαμενή)	όχι (μεταλλική δεξαμενή)	όχι (μεταλλική δεξαμενή)	όχι (μεταλλική δεξαμενή)	8-12 μήνες (δρύινα βαρέλια)	8-12 μήνες (δρύινα βαρέλια)	12 μήνες (δρύινα βαρέλια)	12 μήνες (δρύινα βαρέλια)
Ηλικία αμπελιού	20-25 χρονών	20-25 χρονών	10-15 χρονών	10-15 χρονών	10-15 χρονών	10-15 χρονών	7 χρονών	7 χρονών	20-30 χρονών	20-30 χρονών
Μόρφωση πρέμνου	Γραμμικό	Γραμμικό	Γραμμικό	Γραμμικό	Κύπελο	Κύπελο	Γραμμικό	Γραμμικό	Κύπελο	Κύπελο
Περιοχή καλλιέργειας	Μαριές Ζακύνθου	Μαριές Ζακύνθου	Λαγωπόδο Ζακύνθου	Λαγωπόδο Ζακύνθου	Λαγωπόδο Ζακύνθου	Λαγωπόδο Ζακύνθου	Μαριές Ζακύνθου	Μαριές Ζακύνθου	Λαγωπόδο Ζακύνθου	Λαγωπόδο Ζακύνθου
Υψόμετρο	350 m	350 m	Πεδινό	Πεδινό	Πεδινό	Πεδινό	450 m	450 m	Πεδινό-Ημιορεινό	Πεδινό-Ημιορεινό
Κλίση εδάφους	Λαγκάδι-όχι πλαγιά	Λαγκάδι-όχι πλαγιά	Επίπεδο	Επίπεδο	Επίπεδο	Επίπεδο	Μικρή κλίση	Μικρή κλίση	Μικρή κλίση	Μικρή κλίση
Δομή εδάφους	Πετρώδης	Πετρώδης	Αμμώδης	Αμμώδης	Αμμώδης	Αμμώδης	Πετρώδης	Πετρώδης	Πετρώδης	Πετρώδης

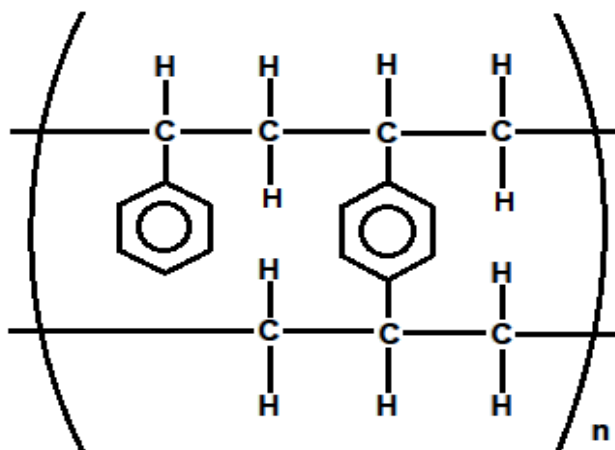
7.4 ΣΤΑΔΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφονται με αναλυτικό τρόπο οι προαναλυτικές διεργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα οίνου, η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε. Τα στάδια της προετοιμασίας της στήλης και των δειγμάτων καθώς και της απομόνωσης του φαινολικού κλάσματος πραγματοποιήθηκαν με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται στην μελέτη με τίτλο «¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data», εν μέρει τροποποιημένη.

7.4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Για τον προσδιορισμό της trans-ρεσβερατρόλης απομονώνουμε το φαινολικό κλάσμα του δείγματος, δηλαδή το σύνολο των πολυφαινολών, με τη βοήθεια στήλης πακεταρισμένης με ρητίνη προσρόφησης. Ως στήλη χρησιμοποιούμε προχοίδα των 50 mL με διάμετρο 1.0 cm η οποία είναι πακεταρισμένη με 15 g ρητίνης XAD-4. Οι ρητίνες XAD είναι μη πολικές πολυμερικές ρητίνες που χρησιμοποιούνται για την προσρόφηση υδρόφοβων οργανικών ουσιών από υδατικά συστήματα και πολικούς διαλύτες. Η XAD-4 είναι μία υδρόφοβη μη ιοντική πολυαρωματική ρητίνη χωρίς λειτουργική ομάδα, αποτελούμενη από αλυσίδες πολυστυρενίου που είναι διασταυρωμένες με διβινυλοβενζόλιο, η οποία προσροφά ουσίες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Το μέγεθος των πόρων της είναι κατάλληλο για την προσρόφηση οργανικών ενώσεων με σχετικά χαμηλό μοριακό βάρος. Η ρητίνη αρχικά βρίσκεται υπό μορφή λευκών αδιάλυτων σφαιριδίων σε υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου και ανθρακικού νατρίου για να επιβραδύνουν την βακτηριακή ανάπτυξη. Αυτά τα άλατα πρέπει να εκπλυθούν με απιονισμένο νερό πριν από τη χρήση της. Στη συνέχεια, προς αποφυγή δημιουργίας μονομερών ή ολιγομερών ενώσεων, η ρητίνη τοποθετείται σε αιθανόλη. Πριν την χρήση της, διηθούμε ορισμένη ποσότητα υπό κενό με χωνί Buchner, αφήνοντας να είναι εν μέρει υγρή ώστε να παραμείνει ενεργοποιημένη. Κάνουμε μερικές εκπλύσεις με 30 mL απιονισμένου νερού τη φορά ενώ παράλληλα σπάμε το κενό και αναδεύουμε ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη από τη ρητίνη και διηθούμε. Τέλος, ζυγίζουμε 15 g της ποσότητας και την τοποθετούμε στη στήλη αφού πρώτα βάλουμε λίγο βαμβάκι στο κάτω μέρος της στήλης για να μην φράξει. Για το πακετάρισμα προσθέτουμε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού στο ποτήρι με τη ρητίνη και αδειάζουμε στη στήλη με τη στρόφιγγα ανοιχτή για να περνάει το νερό, επαναλαμβάνουμε μέχρι να μεταφερθεί όλη η ποσότητα.

Φροντίζουμε επίσης η στήλη να έχει απιονισμένο νερό και η στάθμη του να είναι περίπου 10 cm πάνω από την επιφάνεια της ρητίνης ώστε να μην απενεργοποιηθεί.



Σχήμα 21: Η χημική δομή της XAD-4



Εικόνα 4: Η μορφή της ρητίνης XAD-4

7.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ

Για την προετοιμασία του δείγματος, χρησιμοποιώντας ογκομετρικούς κυλίνδρους των 10, 100 και 200 mL, αραιώνουμε 150 mL οίνου με απιονισμένο νερό μέχρι το τελικό διάλυμα να έχει 5% κατ' όγκο περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Αυτό γίνεται ώστε η αιθανόλη να μην παρασύρει τις πολυφαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης και της trans-ρεσβερατρόλης που μας ενδιαφέρει, κατά τη διέλευση του δείγματος από την στήλη και η ρητίνη να μπορέσει να κατακρατήσει το φαινολικό κλάσμα.

7.4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ

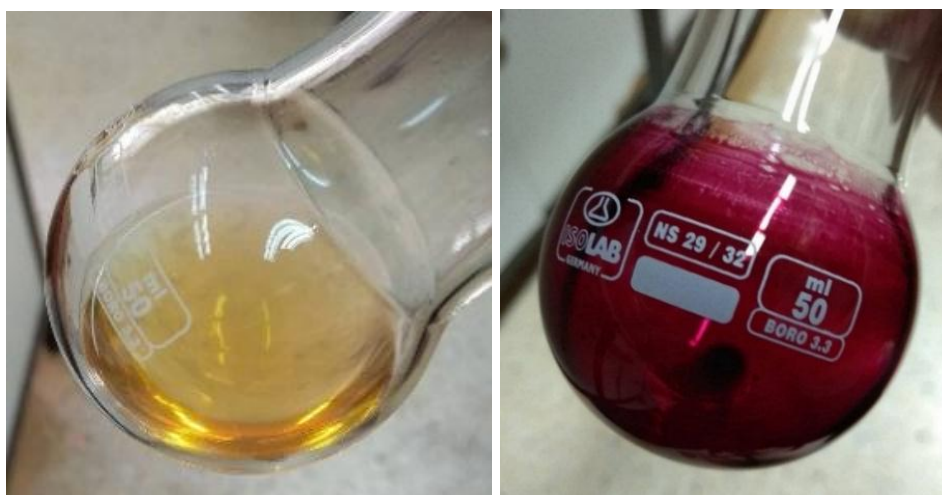
Μετά την προετοιμασία του δείγματος οίνου, περνάμε το αραιωμένο διάλυμα από τη στήλη ρυθμίζοντας τη ροή στα 1,5 mL/min. Αφού περάσει όλο το δείγμα, με τη βοήθεια πουάρ που τοποθετούμε στο πάνω μέρος της στήλης εφαρμόζουμε ρεύμα αέρα για να παρασυρθούν και οι τελευταίες σταγόνες. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε τη στήλη με 60 mL απιονισμένου νερού μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL με τον ίδιο ρυθμό ροής για την αποβολή των σακχάρων και εφαρμόζουμε μετά ρεύμα αέρα με τη βοήθεια πουάρ ώστε να στεγνώσει καλά η ρητίνη. Το φαινολικό κλάσμα παραλαμβάνεται με 60 mL μεθανόλης μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL με ρυθμό ροής 2,0 mL/min, η οποία αποδεσμεύει τις πολυφαινόλες από τη ρητίνη, και τοποθετείται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Στο τέλος εφαρμόζουμε και πάλι ρεύμα αέρα με τον ίδιο τρόπο όπως και πριν για την ανάκτηση και των τελευταίων σταγόνων μεθανόλης. Ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό κενό στους 40 °C χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστήρα και μετά απομακρύνουμε την υγρασία και τυχόν υπολείμματα διαλύτη με τη βοήθεια αντλίας κενού, όπου ο χρόνος παραμονής εκεί είναι 10 min. Η φιάλη με το φαινολικό κλάσμα ζυγίζεται και φυλάσσεται στη κατάψυξη αφού πρώτα την πωματίσουμε με parafilm.



Εικόνα 5: Η διέλευση δείγματος οίνου από τη στήλη (αριστερά και κέντρο) και η παραλαβή του φαινολικού κλάσματος με μεθανόλη (δεξιά)



Εικόνα 6: Η εξάτμιση του διαλύτη (μεθανόλη) από το φαινολικό κλάσμα με περιστροφικό εξατμιστήρα (αριστερά) και με αντλία κενού (δεξιά)



Εικόνα 7: Το φαινολικό κλάσμα παρουσία (αριστερά) και απουσία (δεξιά) διαλύτη (μεθανόλη)

7.4.4 ΕΚΠΛΥΣΗ ΣΤΗΛΗΣ

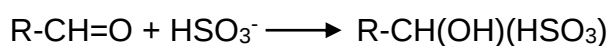
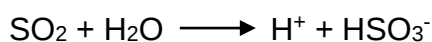
Μετά την παραλαβή του φαινολικού κλάσματος με τη μεθανόλη, η στήλη εκπλένεται με 300 mL απιονισμένου νερού και αφήνεται με τη στάθμη του νερού να βρίσκεται περίπου 10 cm πάνω από την επιφάνεια της ρητίνης όπως αναφέραμε παραπάνω. Επίσης, πριν ξαναχρησιμοποιήσουμε τη στήλη για άλλο δείγμα οίνου καλό είναι να κάνουμε μία έκπλυση με ορισμένη ποσότητα μεθανόλης σε χαμηλή ροή, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν υπάρχουν υπολείμματα φαινολών από το προηγούμενο δείγμα, και μία έκπλυση στο τέλος με 300 mL απιονισμένου νερού όπως είπαμε παραπάνω. Πριν τη χρήση της να αναφέρουμε ακόμη ότι αδειάζουμε το νερό που περιέχει και εφαρμόζουμε ρεύμα αέρα με τη βοήθεια πουάρ για να στεγνώσει καλά η ρητίνη.



Εικόνα 8: Στήλη με καθαρή ρητίνη πριν τη διέλευση δείγματος οίνου (αριστερά), μετά τη διέλευση λευκού οίνου (κέντρο) και μετά τη διέλευση ερυθρού οίνου (δεξιά)

7.4.5 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΑΚΕΤΑΛΔΕΥΔΗ

Παίρνουμε τη σφαιρική φιάλη που ήταν φυλαγμένη στην κατάψυξη και την αφήνουμε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Προσθέτουμε με τη βοήθεια μικροπιπέτας 505 μL διαλύματος ακεταλδεύδης σε ακετονιτρίλιο αναλογίας 1:100 και εξατμίζουμε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Αυτό γίνεται ώστε τα θειώδη που περιέχονται στον οίνο να μην αντιδράσουν με το εσωτερικό πρότυπο που είναι μία αλδεύδη, αλλά αντίθετα με την ακεταλδεύδη, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



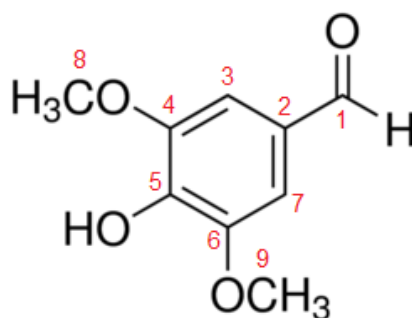
Αν το εσωτερικό πρότυπο αντιδράσει με τα θειώδη, το υδρογόνο της αλδεύδομάδας θα συντονίζεται σε διαφορετική συχνότητα και θα έχει διαφορετική χημική μετατόπιση δ (από τα 9.7 στα 5.5 ppm), οπότε θα έχουμε σφάλμα κατά την ποσοτικοποίηση της trans-ρεσβερατρόλης. Να σημειώσουμε ότι με την προσθήκη ακετονιτριλίου δημιουργείται ίζημα στη σφαιρική φιάλη. Μετά την εξάτμιση του όμως το δείγμα φαινολικού κλάσματος είναι και πάλι διαυγές. Για τυχόν σημεία που εξακολουθεί να παρατηρείται θόλωμα προσθέτουμε μικρή ποσότητα μεθανόλης και εξατμίζουμε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και μετά στην αντλία κενού.



Εικόνα 9: Η δημιουργία ιζήματος κατά την προσθήκη διαλύματος ακεταλδεύδης σε ακετονιτρίλιο

7.4.6 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

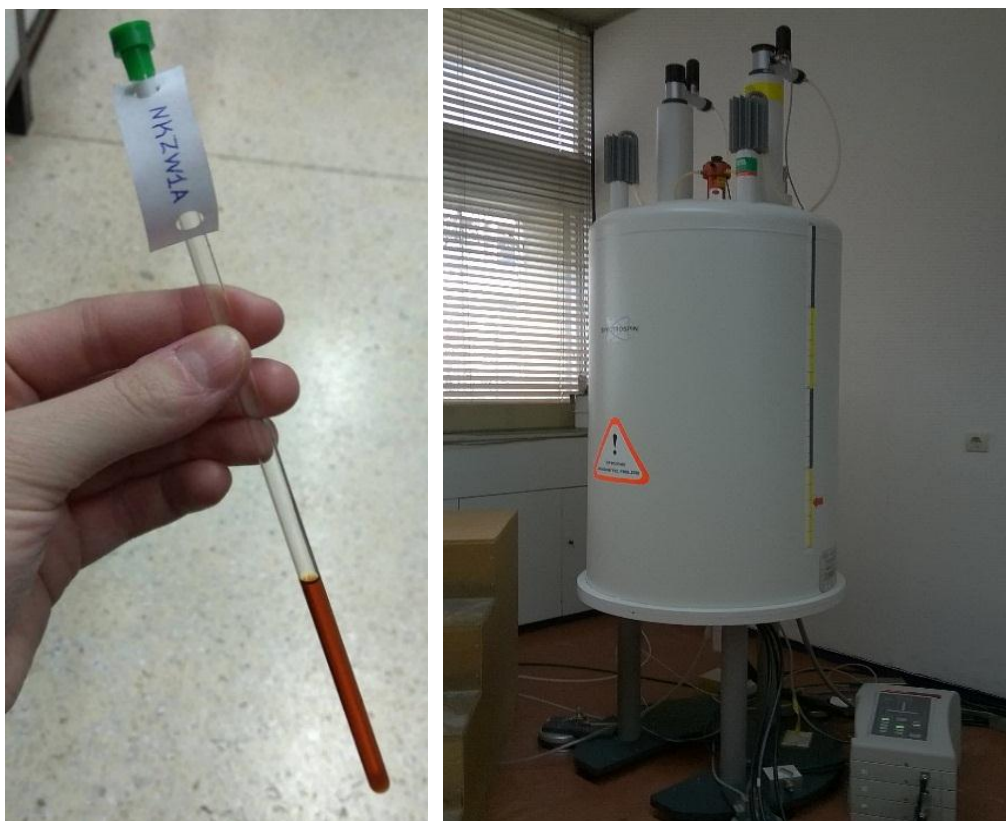
Μετά την προκατεργασία με την ακεταλδεύδη, προσθέτουμε το εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση της *trans*-ρεσβερατρόλης. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιούμε συριγγαλδεύδη (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde), η οποία εμφανίζει στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μία απλή κορυφή στα 9.74 ppm, που οφείλεται σε συντονισμό του υδρογόνου της αλδεϋδομάδας (H_1) και είναι απαλλαγμένη από την παρουσία άλλων σημάτων. Εκτός αυτής, εμφανίζει και άλλες δύο απλές κορυφές στο φάσμα NMR στα 3.94 και 7.25 ppm που αντιστοιχούν στα ισοδύναμα υδρογόνα των μεθυλομάδων (H_8 και H_9) και του αρωματικού δακτυλίου (H_3 και H_7), αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε με τη βοήθεια μικροπιπέτας 500 μL διαλύματος συριγγαλδεύδης σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0,5 mg/mL και εξατμίζουμε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και μετά στην αντλία κενού για 10 min. Το δείγμα φαινολικού κλάσματος τοποθετείται στην κατάψυξη με parafilm μέχρις ότου να πάρουμε το φάσμα NMR. Να αναφέρουμε ότι και σε αυτό το στάδιο παρατηρείται δημιουργία ιζήματος λόγω του ακετονιτρίλιου και ισχύει ότι και παραπάνω.



Σχήμα 22: Η χημική δομή της συριγγαλδεύδης

7.4.7 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR

Μετά την εισαγωγή του εσωτερικού προτύπου το δείγμα φαινολικού κλάσματος είναι έτοιμο προς ανάλυση με φασματοσκοπία NMR. Σε περίπτωση που το δείγμα ήταν φυλαγμένο στην κατάψυξη, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τοποθετείται για 10 min στην αντλία κενού. Με τη χρήση σύριγγας εισάγουμε στη φιάλη 700 μL δευτεριωμένη μεθανόλη, αναδεύουμε και βάζουμε για 1 min το δείγμα στο λουτρό υπερήχων για καλύτερη διαλυτοποίηση. Μετά μεταφέρουμε ορισμένη ποσότητα στο σωληνίσκο του NMR με τη βοήθεια γυάλινου σταγονόμετρου και τον πωματίζουμε. Το δείγμα είναι έτοιμο για τη λήψη των φασμάτων ^1H -NMR και ^1H - ^1H COSY-NMR με τη βοήθεια φασματογράφου Bruker DRX 400. Ο χρόνος που απαιτείται για τη λήψη φάσματος ^1H -NMR είναι 5 min ενώ για ^1H - ^1H COSY-NMR 20 min. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων που ισχύουν κατά τη λήψη του φάσματος ^1H - ^1H COSY NMR.



Εικόνα 10: Ένας σωληνίσκος NMR με το δείγμα φαινολικού κλάσματος (αριστερά) και ο φασματογράφος NMR 400 MHz (δεξιά)

Πίνακας 6: Παράμετροι λήψης φάσματος ^1H - ^1H COSY NMR

Acquisition Parameters	F2	F1
PULPROG	cosygp	-
TD	1024	256
NS	4	-
DS	16	-
ND0	-	1
IN0	-	0.00019200 sec
SW	13.0165 ppm	13.0165 ppm
SWH	5208.333 Hz	5208.316 Hz
FIDRES	5.086263 Hz	20.344986 Hz
FW	90000.00 Hz	-
AQ	0.0983540 sec	-
RG	256	-
DW	96.000 usec	-
DWOV	4.000 usec	-
DECIM	24	-
DR	18	-
DDR	2	-
DE	8.00 usec	-
QNP	1	-
NUC1	^1H	^1H
O1	1879.60 Hz	-
SFO1	400.1318796 MHz	400.1318796 MHz
O1P	4.697 ppm	-
BF1	400.1300000 MHz	-
GRDPROG	1squa	-
LOCNUC	^2H	-
SOLVENT	MeOH	-
PROBHD	11:5mmMultinucl.	-
EXP	PS done	-
RO	20 Hz	-
MASR	0	-
NBL	1	-
TE	300.0 K	-
V9	5.00 %	-
WBST	1024	-
WBSM	4.0000000 MHz	-

7.4.8 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

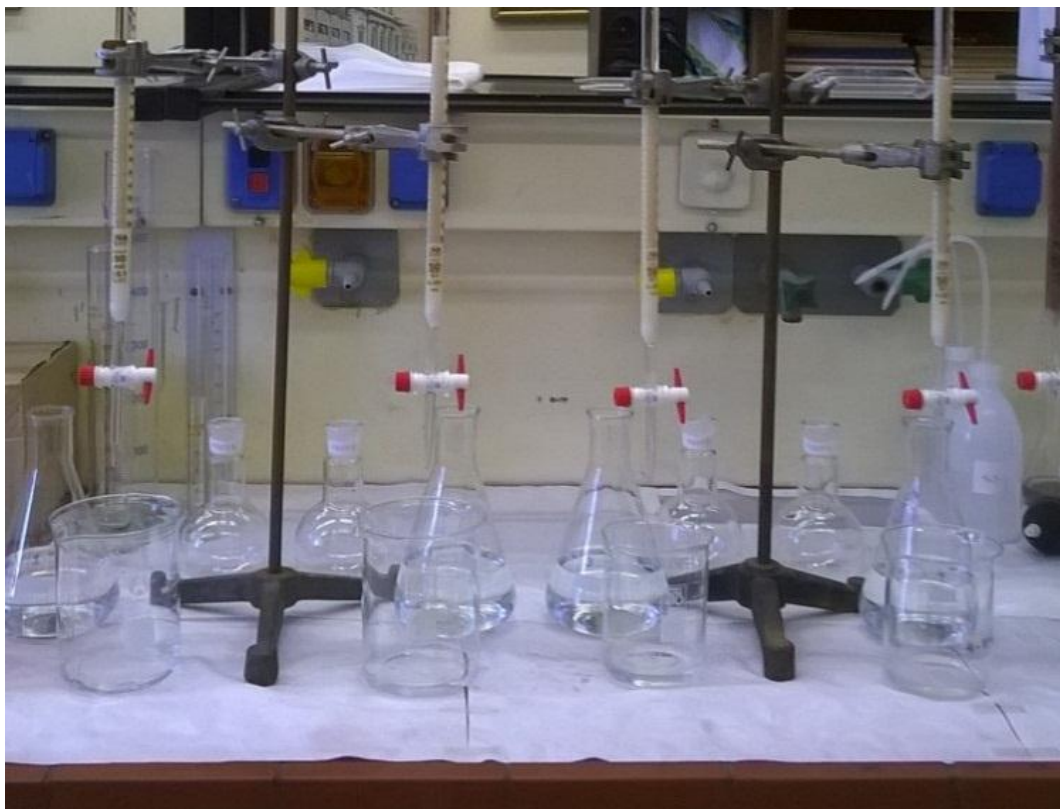
Μετά τη λήψη των φασμάτων η ποσότητα στο σωληνίσκο του NMR μεταφέρεται σε φιαλίδιο κάνοντας 2-3 εκπλύσεις με μικρή ποσότητα μεθανόλης. Επίσης, παίρνουμε τυχόν

υπολείμματα φαινολικού κλάσματος που υπάρχουν στη σφαιρική φιάλη που περιείχε το δείγμα μας με γυάλινο σταγονόμετρο κάνοντας και πάλι 2-3 εκπλύσεις. Τοποθετούμε το φιαλίδιο μέσα σε σφαιρική φιάλη και εξατμίζουμε το διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα ή εναλλακτικά αφήνουμε το φιαλίδιο στον εργαστηριακό απαγωγό για 2-3 μέρες. Μετά το φιαλίδιο μέσα σε σφαιρική φιάλη αφήνεται για 10 min στην αντλία κενού. Τέλος, αφού το πωματίσουμε, φυλάσσεται στην κατάψυξη.

7.4.9 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για την προετοιμασία των προτύπων διαλυμάτων, παρασκευάζουμε ένα αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης σε αιθανόλη συγκέντρωσης 50 mg/L. Ζυγίζουμε ποσότητα 5 mg trans-ρεσβερατρόλης, την οποία διαλύουμε σε λίγη αιθανόλη. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε όλη την ποσότητα σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL κάνοντας μερικές εκπλύσεις και συμπληρώνοντας με αιθανόλη μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται στο ψυγείο. Η διαδικασία που θα ακολουθήσουμε πρέπει να προσομοιάζει αυτή των άγνωστων δειγμάτων, γι' αυτό τα πρότυπα διαλύματα εκτός από συγκεκριμένης συγκέντρωσης πρέπει να είναι και συγκεκριμένης ποσότητας, δηλαδή 150 mL με 13% κατ' όγκο περιεκτικότητα σε αιθανόλη (μέση συγκέντρωση αιθανόλης στα δείγματα οίνων) και αραίωση έως 5% κατ' όγκο περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Προετοιμάζουμε τα πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 και 1.5 mg/L μεταφέροντας ορισμένες ποσότητες για το καθένα από το αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης με τη βοήθεια μικροπιπέτας, προσθέτοντας ορισμένες ποσότητες για το καθένα αιθανόλης και αραιώνοντας με απιονισμένο νερό ώστε η περιεκτικότητα σε αιθανόλη να είναι τελικά 5% κατ' όγκο. Αμέσως μετά περνάμε τα πρότυπα διαλύματα από τη στήλη. Ακολουθούμε ακριβώς την ίδια διαδικασία με τα άγνωστα δείγματα όπως περιγράψαμε παραπάνω, εκτός της προκατεργασίας με την ακεταλδεΐδη που δεν χρειάζεται αφού δεν έχουμε θειώδη. Επίσης, να τονίσουμε ότι η έκπλυση της ρητίνης με απιονισμένο νερό πριν την παραλαβή του φαινολικού κλάσματος (στην περίπτωση των προτύπων διαλυμάτων μόνο της trans-ρεσβερατρόλης) με μεθανόλη πραγματοποιείται παρόλο που τα πρότυπα διαλύματα δεν έχουν σάκχαρα, ώστε να συμπεριλάβουμε τυχόν απώλειες trans-ρεσβερατρόλης που έχουμε στο στάδιο αυτό κατά την επεξεργασία των άγνωστων δειγμάτων. Ακόμα, το χρονικό διάστημα διεκπεραίωσης του κάθε σταδίου είναι ίδιο για όλα τα δείγματα οίνων και τα πρότυπα διαλύματα.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε, όπως θα δούμε και παρακάτω, το ότι για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς χρειαζόμασταν 4 σημεία που το καθένα αντιστοιχεί σε μία συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος. Το πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 0.1 mg/L δεν παρουσίασε καμία κορυφή της ρεσβερατρόλης στα φάσματα ^1H -NMR και ^1H - ^1H COSY-NMR λόγω χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου, γι' αυτό το λόγο παρασκευάσαμε νέο πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 0.25 mg/L, το οποίο εμφάνισε κορυφές.



Εικόνα 11: Η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων *trans*-ρεσβερατρόλης

7.5 ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ ΠΡΑΞΕΙΣ

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι αριθμητικές πράξεις που χρειάστηκαν να γίνουν για την παρασκευή των άγνωστων δειγμάτων και των προτύπων διαλυμάτων.

- Υπολογισμοί για την αραίωση των άγνωστων δειγμάτων:

Έστω Calc % κατ' όγκο η περιεκτικότητα του οίνου σε αιθανόλη.

Τα 100 mL οίνου περιέχουν Calc mL αιθανόλης

Τα 150 mL οίνου περιέχουν x mL αιθανόλης

Άρα, $x = 150 \cdot \text{Calc} / 100 = 1,5 \text{ Calc mL}$ αιθανόλης

Θέλουμε να αραιώσουμε το δείγμα μας ώστε να έχει τελικά 5 % κατ' όγκο περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

Τα 100 mL αραιωμένου οίνου περιέχουν 5 mL αιθανόλης

Τα y mL αραιωμένου οίνου περιέχουν x mL αιθανόλης

Άρα, $y = 100 \cdot x / 5 = 100 \cdot 1,5 \text{ Calc} / 5 = 30 \text{ Calc mL}$ αραιωμένου οίνου

Η ποσότητα του απιονισμένου νερού που θα προσθέσουμε για την αραιώση θα ισούται με την ποσότητα του αραιωμένου οίνου μείον της αρχικής του ποσότητας.

Οπότε, $z = y - 150 = 30 \text{ Calc} - 150 \text{ mL}$ απιονισμένου νερού

Με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς προκύπτουν οι τιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Η ποσότητα απιονισμένου νερού για αραιώση και ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ανάλογα την περιεκτικότητα σε αιθανόλη

Κωδικός	$C_{\text{alc}} \% \text{ } ^\circ/\text{v}$ Αιθανόλη	Όγκος απιονισμένου νερού	Όγκος αραιωμένου δείγματος
NKZW1A	13 %	240 mL	390 mL
NKZW2A	13 %	240 mL	390 mL
NKZW3A	13 %	240 mL	390 mL
NKZW4A	13 %	240 mL	390 mL
NKZW5A	12.5 %	225 mL	375 mL
NKZW6A	13 %	240 mL	390 mL
NKZW7AN	13.5 %	255 mL	405 mL
NKZW8A	13.5 %	255 mL	405 mL
NKZW9AN	14 %	270 mL	420 mL
NKZW10AN	14 %	270 mL	420 mL

- Υπολογισμοί για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων:

Όπως προαναφέραμε τα πρότυπα διαλύματα πρέπει να προσομοιάζουν με τα άγνωστα δείγματα. Έτσι όπως και στα άγνωστα δείγματα αρχικά θα έχω θεωρητικά 150 mL πρότυπου διαλύματος με περιεκτικότητα 13 % κατ' όγκο (μέση τιμή) σε αιθανόλη.

Τα 100 mL πρότυπου διαλύματος περιέχουν 13 mL αιθανόλης

Τα 150 mL πρότυπου διαλύματος περιέχουν x mL αιθανόλης

Άρα, $x = 150 \cdot 13 / 100 = 19,5$ mL αιθανόλης

Στη συνέχεια, όπως και στα άγνωστα δείγματα το παραπάνω διάλυμα αραιώνεται θεωρητικά ώστε να έχει τελικά 5 % κατ' όγκο περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

Τα 100 mL αραιωμένου πρότυπου διαλύματος περιέχουν 5 mL αιθανόλης

Τα y mL αραιωμένου πρότυπου διαλύματος περιέχουν 19,5 mL αιθανόλης

Άρα, $y = 100 \cdot 19,5 / 5 = 390$ mL αραιωμένου πρότυπου διαλύματος

Η ποσότητα του απιονισμένου νερού που θα προσθέσουμε για την αρραίωση θα ισούται με την ποσότητα του αραιωμένου πρότυπου διαλύματος μείον της αρχικής του ποσότητας.

Οπότε, $z = y - 150 = 390 - 150 = 240$ mL απιονισμένου νερού

Όμως τα 150 mL πρότυπου διαλύματος αποτελούνται από 19,5 mL αιθανόλης και $(150 - 19,5) = 130,5$ mL απιονισμένου νερού.

Άρα συνολικά χρειαζόμαστε 240 mL απιονισμένου νερού για αρραίωση και 130,5 mL απιονισμένου νερού για το θεωρητικό αρχικό πρότυπο διάλυμα.

Δηλαδή, $\omega = 240 + 130,5 = 370,5$ mL απιονισμένου νερού

Οπότε, τελικά στην πράξη τα πρότυπα διαλύματα θα έχουν όγκο 390 mL με περιεκτικότητα 5 % κατ' όγκο σε αιθανόλη και θα αποτελούνται από 370 mL απιονισμένου νερού και 19,5 mL αιθανόλη.

Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης που παρασκευάσαμε είναι 5 mg trans-ρεσβερατρόλης ανά 100 mL αιθανόλης. Δηλαδή:

$$5 \text{ mg} / 100 \text{ mL} = 0,05 \text{ mg/mL} = 50 \text{ }\mu\text{g/mL}$$

Το πρότυπο διάλυμα 1 (PROT1) έχει συγκέντρωση σε trans-ρεσβερατρόλη 0,1 mg/L ή 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Το 1 mL αιθανόλης περιέχει 0,1 μg trans-ρεσβερατρόλης

Τα 150 mL αιθανόλης περιέχουν x μg trans-ρεσβερατρόλης

Άρα, $x = 150 \cdot 0,1 / 1 = 15$ μg trans-ρεσβερατρόλης

Το αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης έχει συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/mL}$ και για την παρασκευή του PROT1 θα πάρουμε από αυτό ποσότητα με όγκο:

$$V = m/C = 15 \text{ }\mu\text{g} / 50 \text{ }\mu\text{g/mL} = 0,3 \text{ mL}$$

Θεωρώντας ότι η ποσότητα της trans-ρεσβερατρόλης είναι αμελητέου όγκου και τα 0,3 mL είναι αιθανόλη, αφαιρούμε την ποσότητα αυτή από τα 19,5 mL αιθανόλης που θα περιέχει τελικά το αραιωμένο διάλυμα του PROT1, ώστε η περιεκτικότητα σε αιθανόλη να παραμείνει 5 % κατ' όγκο.

$$19,5 - 0,3 = 19,2 \text{ mL αιθανόλης}$$

Άρα, τελικά το PROT 1 θα αποτελείται από 0,3 mL αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης, 19,2 mL αιθανόλης και 370,5 mL απιονισμένου νερού.

Αφού όπως είπαμε το PROT1 δεν εμφάνισε καμία κορυφή της trans-ρεσβερατρόλης χρειάστηκε να παρασκευάσουμε νέο πρότυπο διάλυμα 1 (PROT1N). Το νέο πρότυπο διάλυμα 1 (PROT1N) έχει συγκέντρωση σε trans-ρεσβερατρόλη 0,25 mg/L ή 0,25 μg/mL.

Το 1 mL αιθανόλης περιέχει 0,25 μg trans- ρεσβερατρόλης

Τα 150 mL αιθανόλης περιέχουν x μg trans-ρεσβερατρόλης

$$\text{Άρα, } x = 150 \cdot 0,25 / 1 = 37,5 \text{ μg trans-ρεσβερατρόλης}$$

Το αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης έχει συγκέντρωση 50 μg/mL και για την παρασκευή του PROT1N θα πάρουμε από αυτό ποσότητα με όγκο:

$$V = m/C = 37,5 \text{ μg} / 50 \text{ μg/mL} = 0,75 \text{ mL}$$

Θεωρώντας και πάλι ότι η ποσότητα της trans-ρεσβερατρόλης είναι αμελητέου όγκου και τα 0,75 mL είναι αιθανόλη, αφαιρούμε την ποσότητα αυτή από τα 19,5 mL αιθανόλης που θα περιέχει τελικά το αραιωμένο διάλυμα του PROT1N, ώστε η περιεκτικότητα σε αιθανόλη να παραμείνει 5 % κατ' όγκο.

$$19,5 - 0,75 = 18,75 \text{ mL αιθανόλης}$$

Άρα, τελικά το PROT1N θα αποτελείται από 0,75 mL αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης, 18,75 mL αιθανόλης και 370,5 mL απιονισμένου νερού.

Το πρότυπο διάλυμα 2 (PROT2) έχει συγκέντρωση σε trans-ρεσβερατρόλη 0,5 mg/L ή 0,5 μg/mL.

Το 1 mL αιθανόλης περιέχει 0,5 μg trans-ρεσβερατρόλης

Τα 150 mL αιθανόλης περιέχουν x μg trans-ρεσβερατρόλης

$$\text{Άρα, } x = 150 \cdot 0,5 / 1 = 75 \text{ μg trans-ρεσβερατρόλης}$$

Το αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης έχει συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/mL}$ και για την παρασκευή του PROT2 θα πάρουμε από αυτό ποσότητα με όγκο:

$$V = m/C = 75 \mu\text{g} / 50 \mu\text{g/mL} = 1,5 \text{ mL}$$

Όπως και πριν θεωρώντας ότι η ποσότητα της trans-ρεσβερατρόλης είναι αμελητέου όγκου και τα 1,5 mL είναι αιθανόλη, αφαιρούμε την ποσότητα αυτή από τα 19,5 mL αιθανόλης που θα περιέχει τελικά το αραιωμένο διάλυμα του PROT2, ώστε η περιεκτικότητα σε αιθανόλη να παραμείνει 5 % κατ' όγκο.

$$19,5 - 1,5 = 18,0 \text{ mL αιθανόλης}$$

Άρα, τελικά το PROT 2 θα αποτελείται από 1,5 mL αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης, 18,0 mL αιθανόλης και 370,5 mL απιονισμένου νερού.

Το πρότυπο διάλυμα 3 (PROT3) έχει συγκέντρωση σε trans-ρεσβερατρόλη 1,0 mg/L ή 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Το 1 mL αιθανόλης περιέχει 1,0 μg trans-ρεσβερατρόλης

Τα 150 mL αιθανόλης περιέχουν x μg trans-ρεσβερατρόλης

$$\text{Άρα, } x = 150 \cdot 1,0 / 1 = 150 \mu\text{g trans-ρεσβερατρόλης}$$

Το αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης έχει συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/mL}$ και για την παρασκευή του PROT3 θα πάρουμε από αυτό ποσότητα με όγκο:

$$V = m/C = 150 \mu\text{g} / 50 \mu\text{g/mL} = 3,0 \text{ mL}$$

Θεωρώντας ξανά ότι η ποσότητα της trans-ρεσβερατρόλης είναι αμελητέου όγκου και τα 3,0 mL είναι αιθανόλη, αφαιρούμε την ποσότητα αυτή από τα 19,5 mL αιθανόλης που θα περιέχει τελικά το αραιωμένο διάλυμα του PROT3, ώστε η περιεκτικότητα σε αιθανόλη να παραμείνει 5 % κατ' όγκο.

$$19,5 - 3,0 = 16,5 \text{ mL αιθανόλης}$$

Άρα, τελικά το PROT3 θα αποτελείται από 3,0 mL αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης, 16,5 mL αιθανόλης και 370,5 mL απιονισμένου νερού.

Το πρότυπο διάλυμα 4 (PROT4) έχει συγκέντρωση σε trans-ρεσβερατρόλη 1,5 mg/L ή 1,5 $\mu\text{g/mL}$.

Το 1 mL αιθανόλης περιέχει 1,5 μg trans-ρεσβερατρόλης

Τα 150 mL αιθανόλης περιέχουν x μg trans-ρεσβερατρόλης

Άρα, $x = 150 \cdot 1,5 / 1 = 225 \text{ } \mu\text{g trans-ρεσβερατρόλης}$

Το αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης έχει συγκέντρωση $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$ και για την παρασκευή του PROT4 θα πάρουμε από αυτό ποσότητα με όγκο:

$$V = m/C = 225 \text{ } \mu\text{g} / 50 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4,5 \text{ mL}$$

Θεωρώντας και εδώ ότι η ποσότητα της trans-ρεσβερατρόλης είναι αμελητέου όγκου και τα $4,5 \text{ mL}$ είναι αιθανόλη, αφαιρούμε την ποσότητα αυτή από τα $19,5 \text{ mL}$ αιθανόλης που θα περιέχει τελικά το αραιωμένο διάλυμα του PROT4, ώστε η περιεκτικότητα σε αιθανόλη να παραμείνει $5 \text{ } \%$ κατ' όγκο.

$$19,5 - 4,5 = 15,0 \text{ mL αιθανόλης}$$

Άρα, τελικά το PROT4 θα αποτελείται από $4,5 \text{ mL}$ αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης, $15,0 \text{ mL}$ αιθανόλης και $370,5 \text{ mL}$ απιονισμένου νερού.

Στον πίνακα 8 συνοψίζονται οι τιμές που προέκυψαν από τους παραπάνω υπολογισμούς.

Πίνακας 8: Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των προτύπων διαλυμάτων

Πρότυπο διάλυμα	Όγκος αρχικού διαλύματος trans-ρεσβερατρόλης	Όγκος αιθανόλης	Όγκος απιονισμένου νερού
PROT1	0.3 mL	19.2 mL	370,5 mL
PROT1N	0.75 mL	18.75 mL	370.5 mL
PROT2	1.5 mL	18.0 mL	370.5 mL
PROT3	3.0 mL	16.5 mL	370.5 mL
PROT4	4.5 mL	15.0 mL	370.5 mL

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

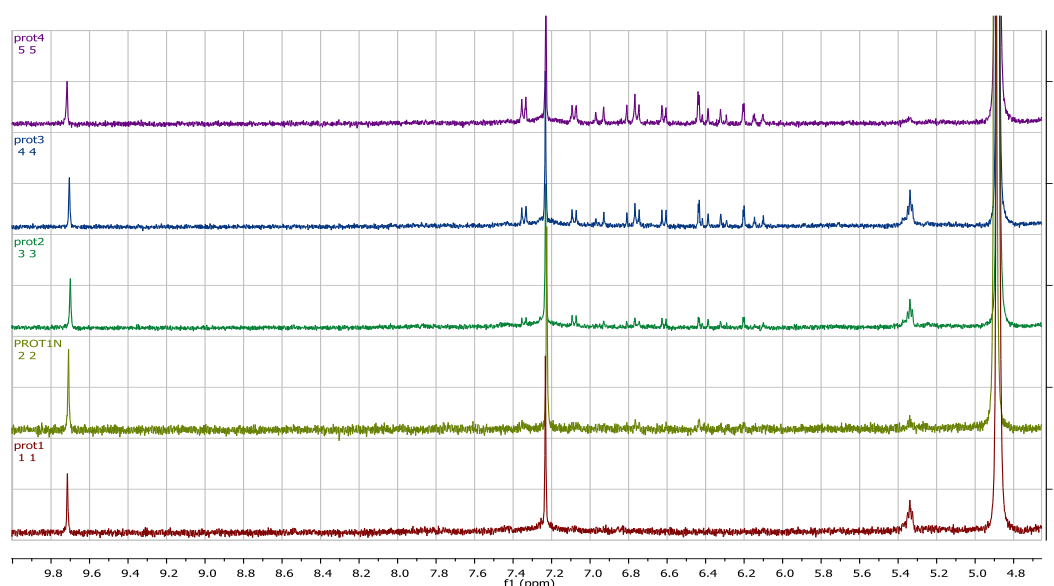
Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφεται η επεξεργασία των φασμάτων NMR μετά τη λήψη τους και η δημιουργία της καμπύλης αναφοράς με τη βοήθεια της οποίας γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της *trans*-ρεσβερατρόλης. Επίσης, παρατίθενται τα φάσματα που προκύπτουν από την ανάλυση με χρήση φασματοσκοπίας NMR.

8.1.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR

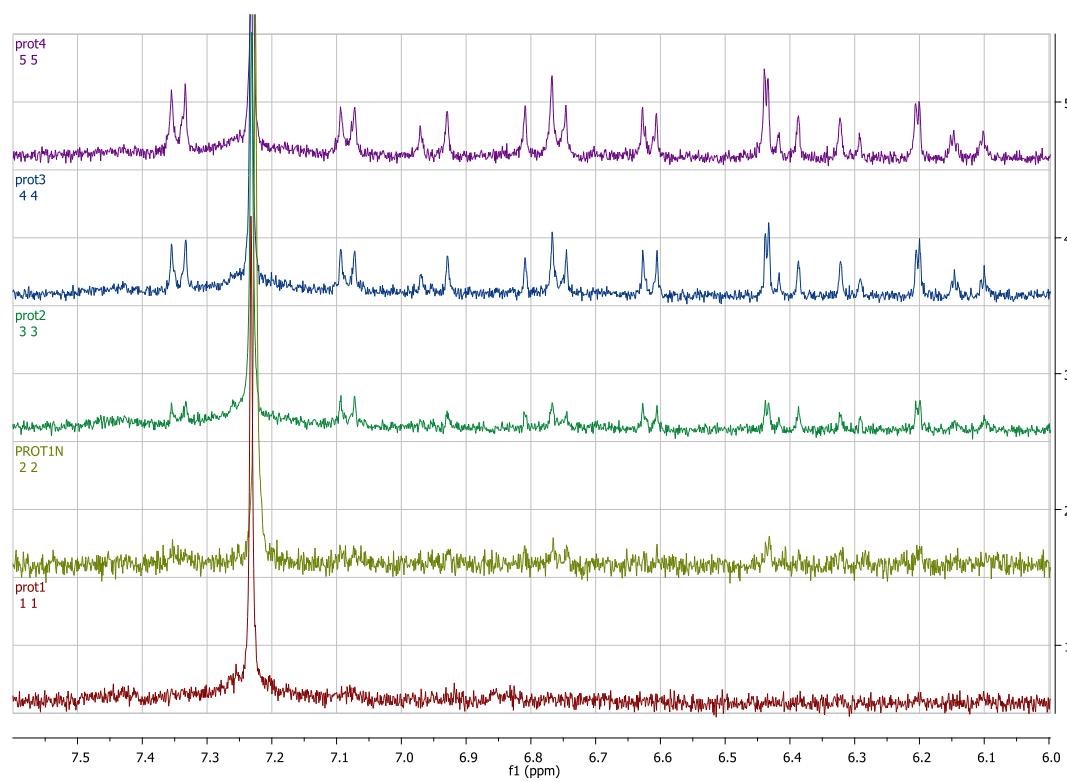
Μετά τη λήψη των φασμάτων NMR των άγνωστων δειγμάτων και των προτύπων διαλυμάτων, ακολουθεί επεξεργασία αυτών με τη χρήση ειδικού προγράμματος κάνοντας κατάλληλες ρυθμίσεις. Στα φάσματα ^1H - ^1H COSY ορίζοντας μία τιμή αναφοράς για το σήμα διαγωνίου (9.74,9.74) της συριγγαλδεύδης (π.χ. 100) λαμβάνουμε τιμές για τα σήματα τις ρεσβερατρόλης.

8.1.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ^1H -NMR ΚΑΙ ^1H - ^1H COSY-NMR

- Φάσματα ^1H -NMR προτύπων διαλυμάτων:

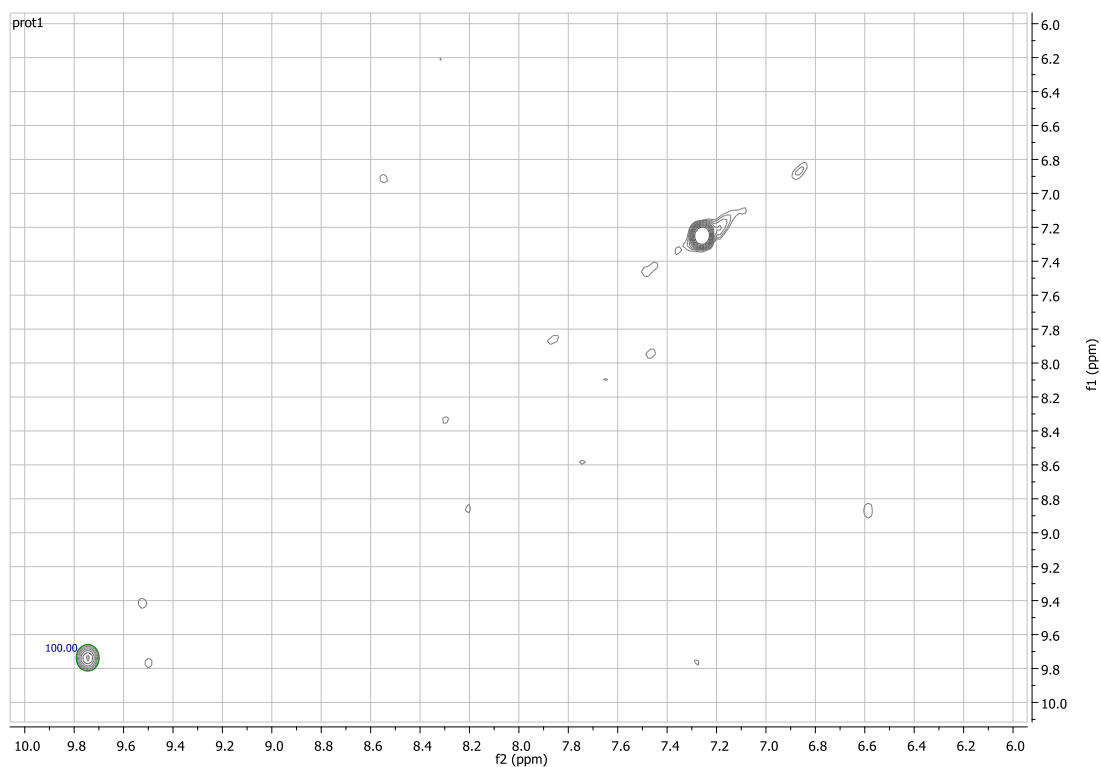


Σχήμα 23: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των προτύπων διαλυμάτων (MeOD, 400 MHz)

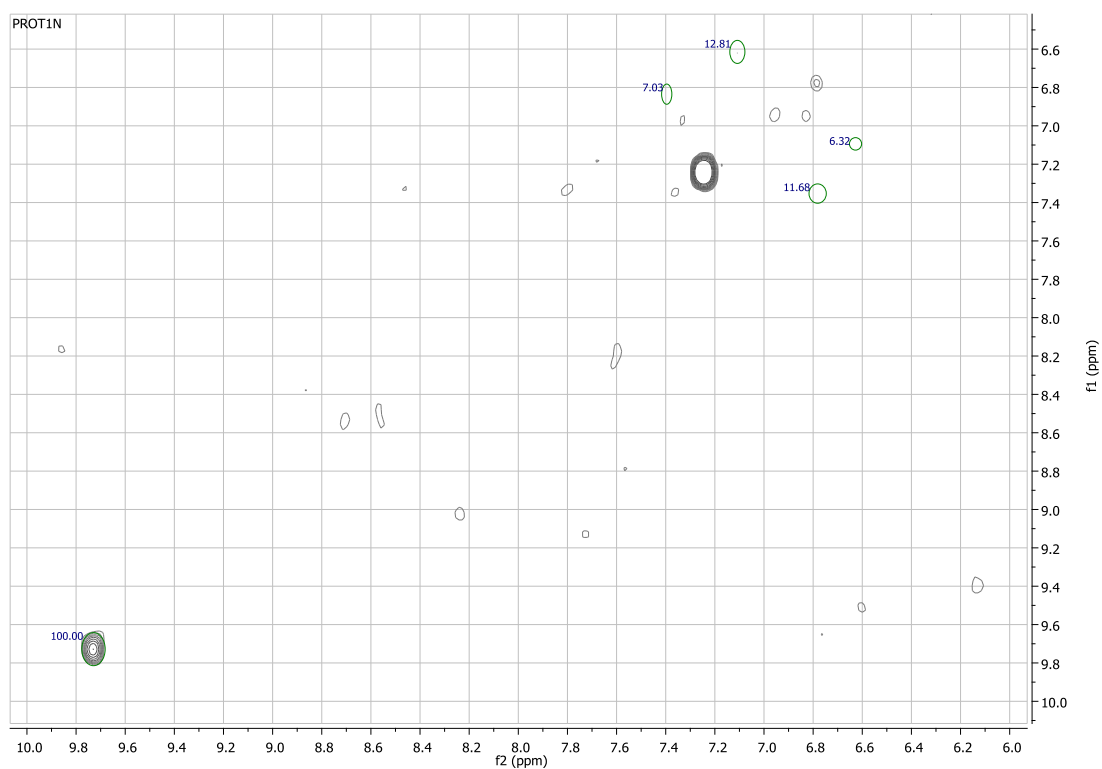


Σχήμα 24: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των προτύπων διαλυμάτων σε μεγέθυνση (MeOD, 400 MHz)

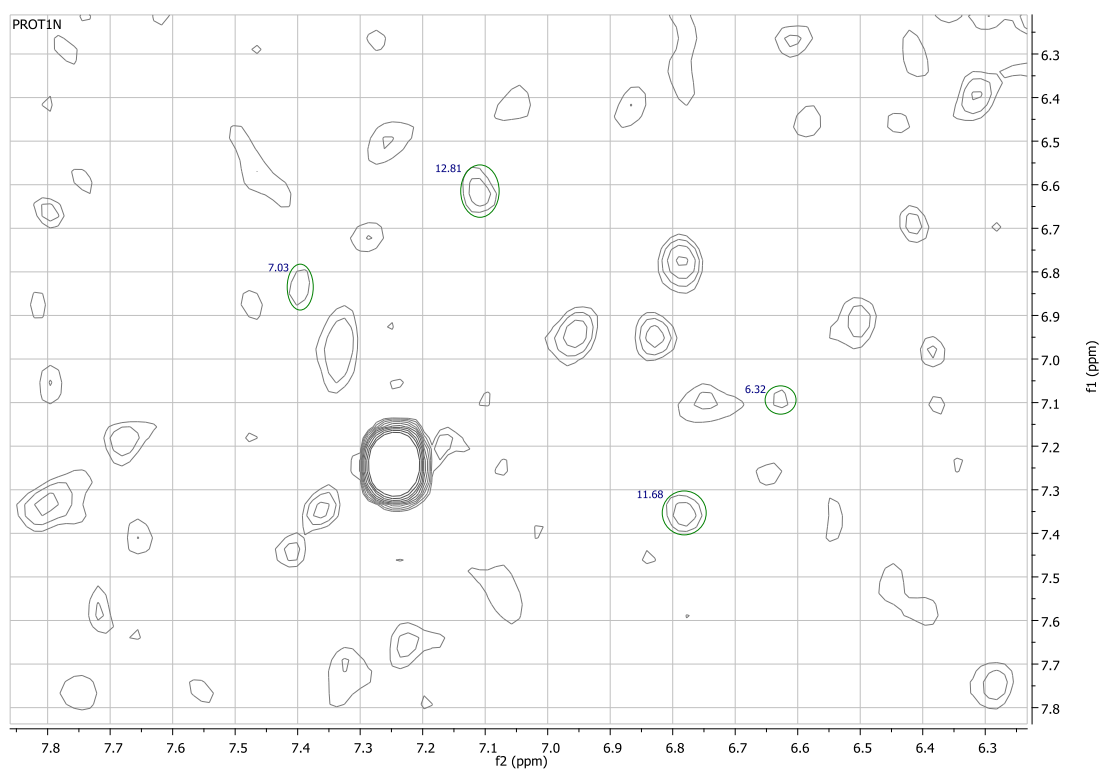
- Φάσματα ^1H - ^1H COSY-NMR προτύπων διαλυμάτων:



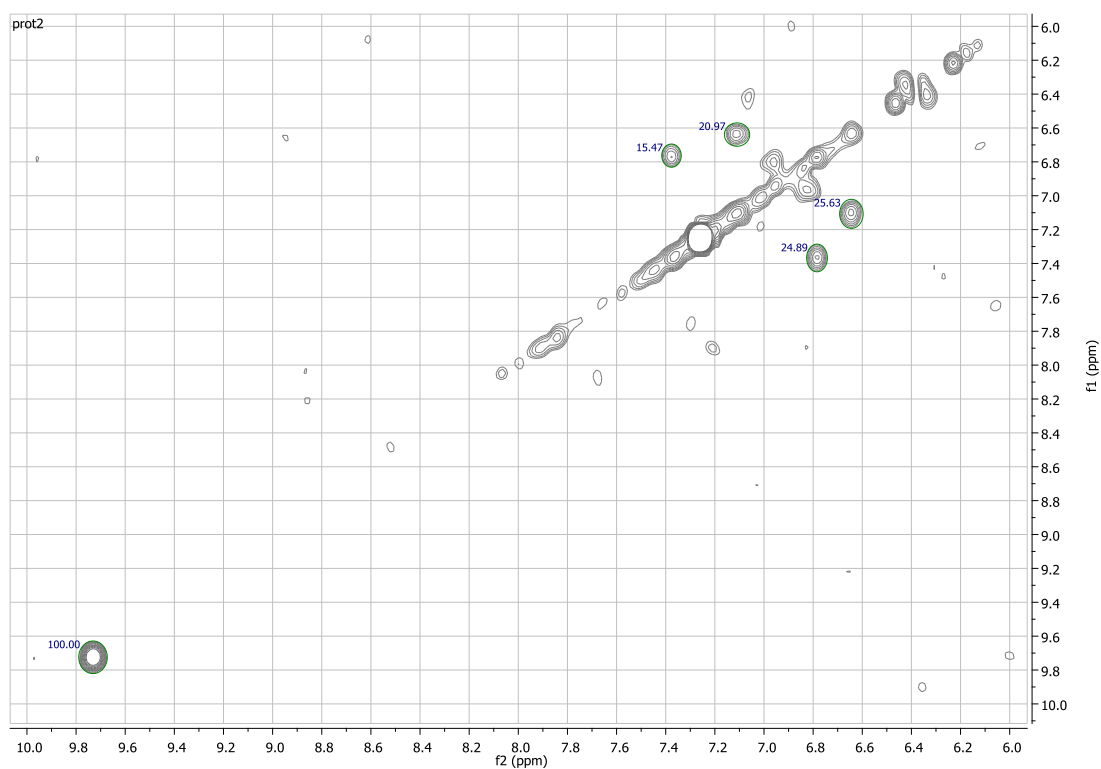
Σχήμα 25: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT1 (MeOD, 400 MHz)



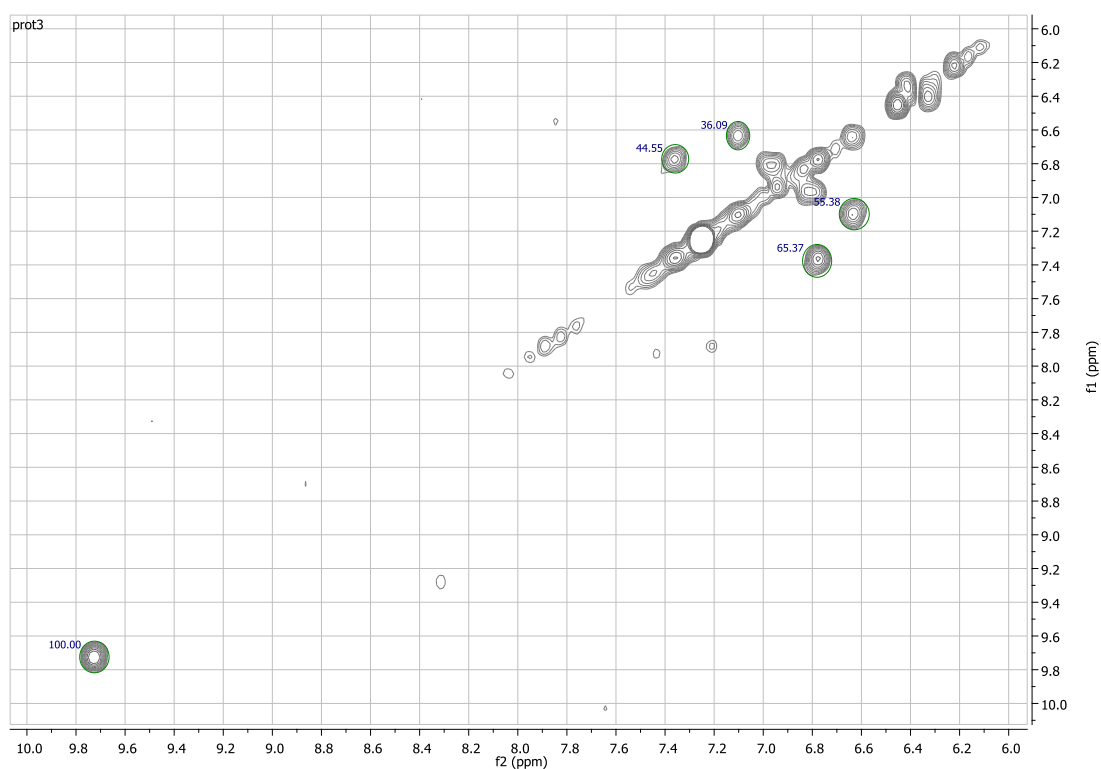
Σχήμα 26: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT1N (MeOD, 400 MHz)



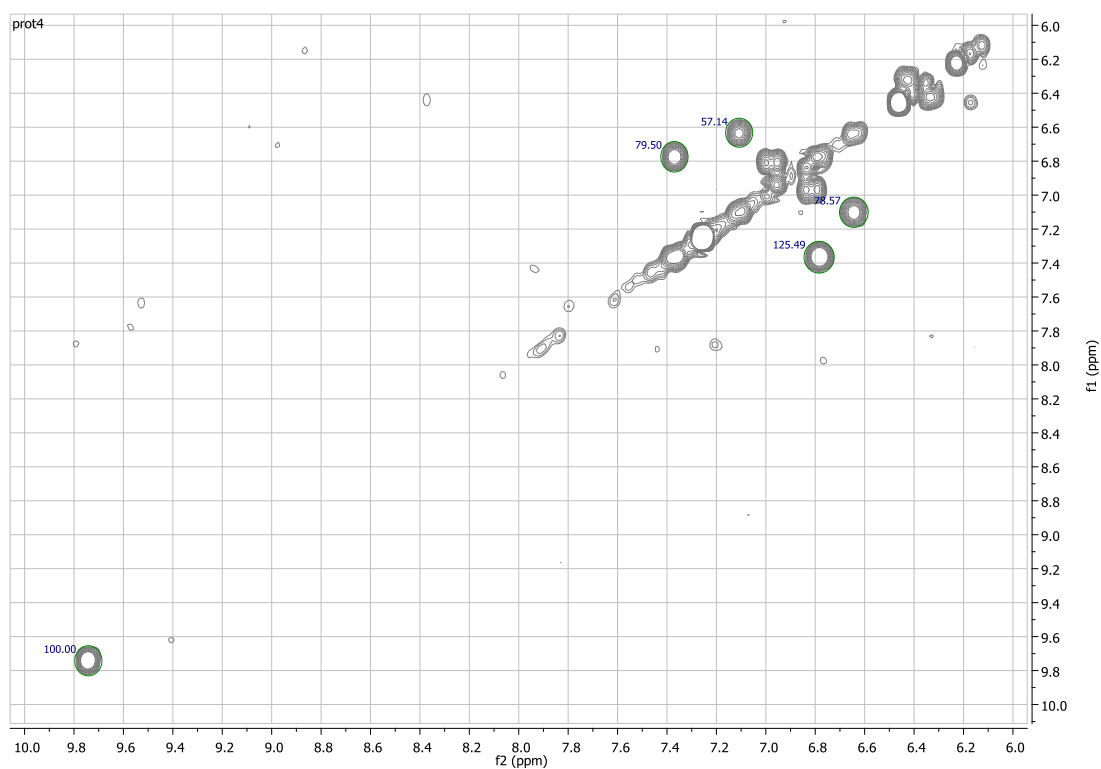
Σχήμα 27: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT1N σε μεγέθυνση (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα 28: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT2 (MeOD, 400 MHz)

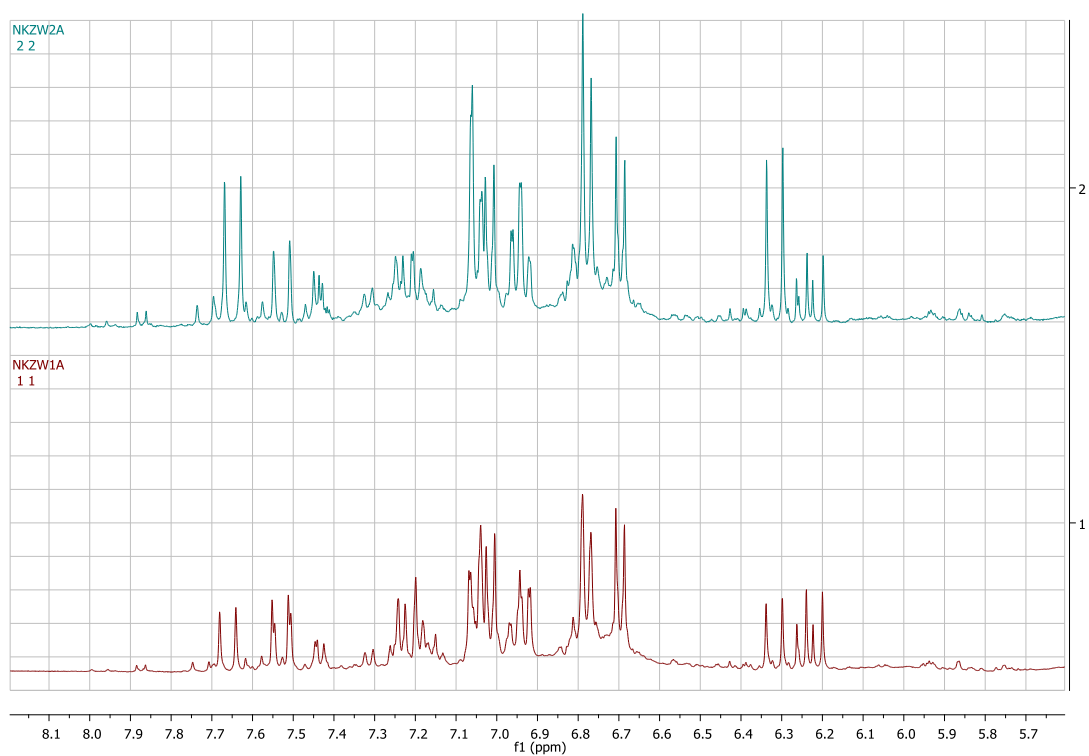


Σχήμα 29: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz)

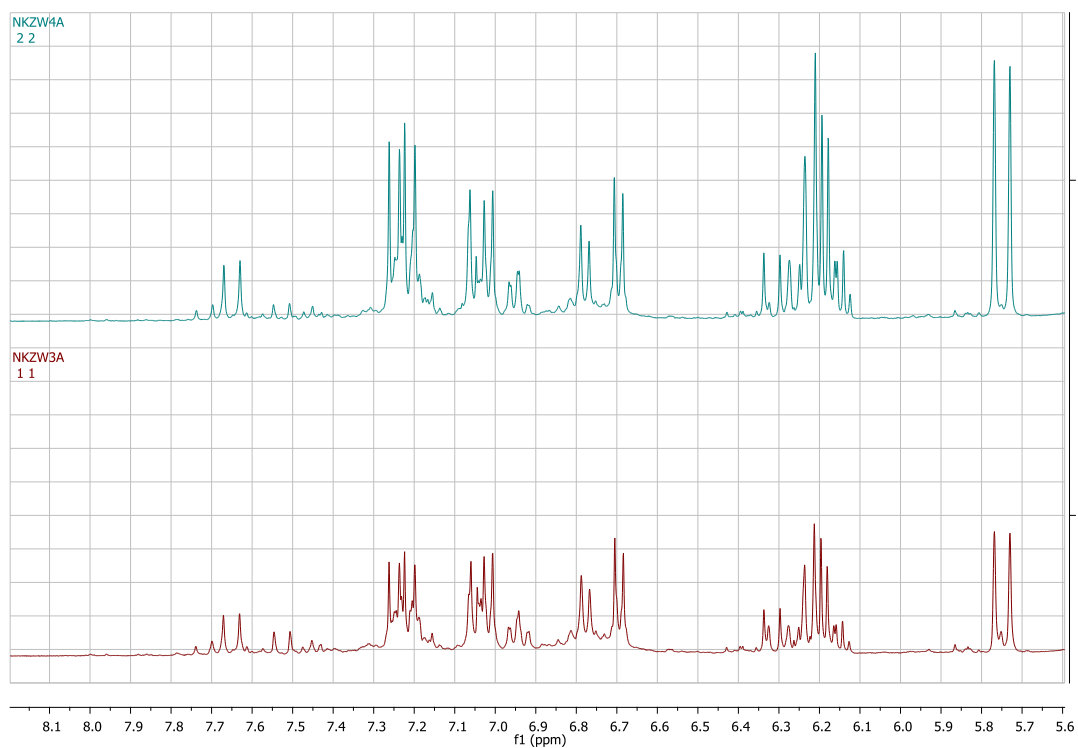


Σχήμα 30: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του PROT4 (MeOD, 400 MHz)

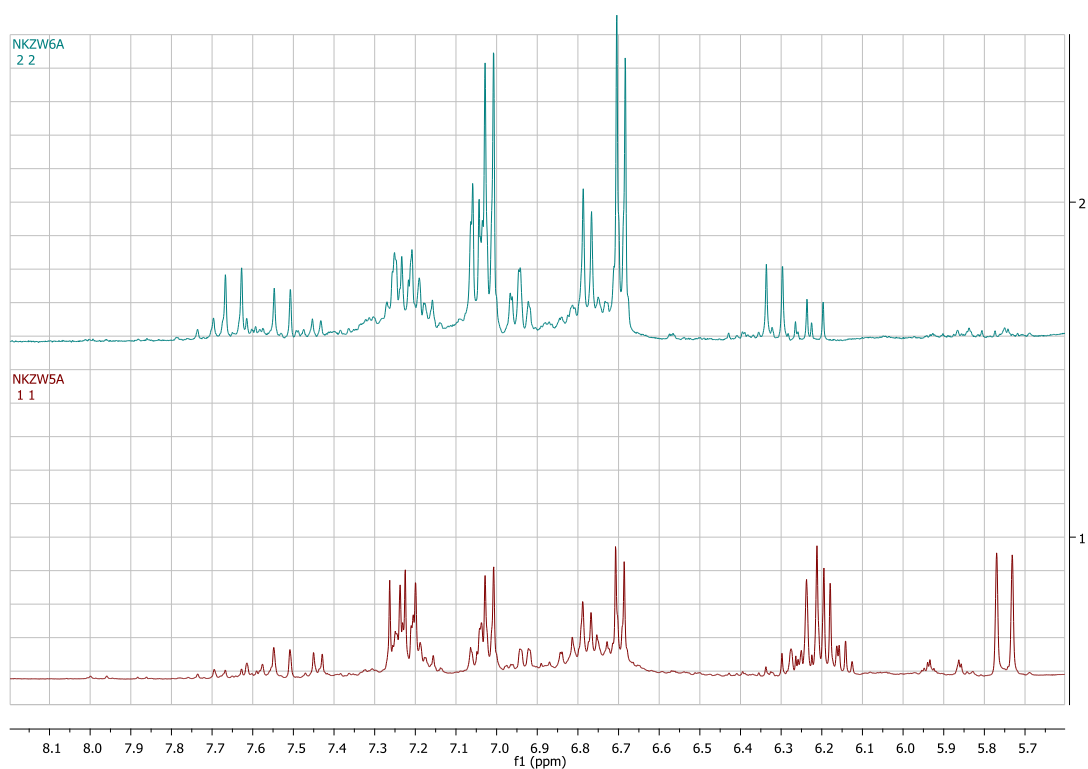
- Φάσματα ^1H -NMR άγνωστων δειγμάτων:



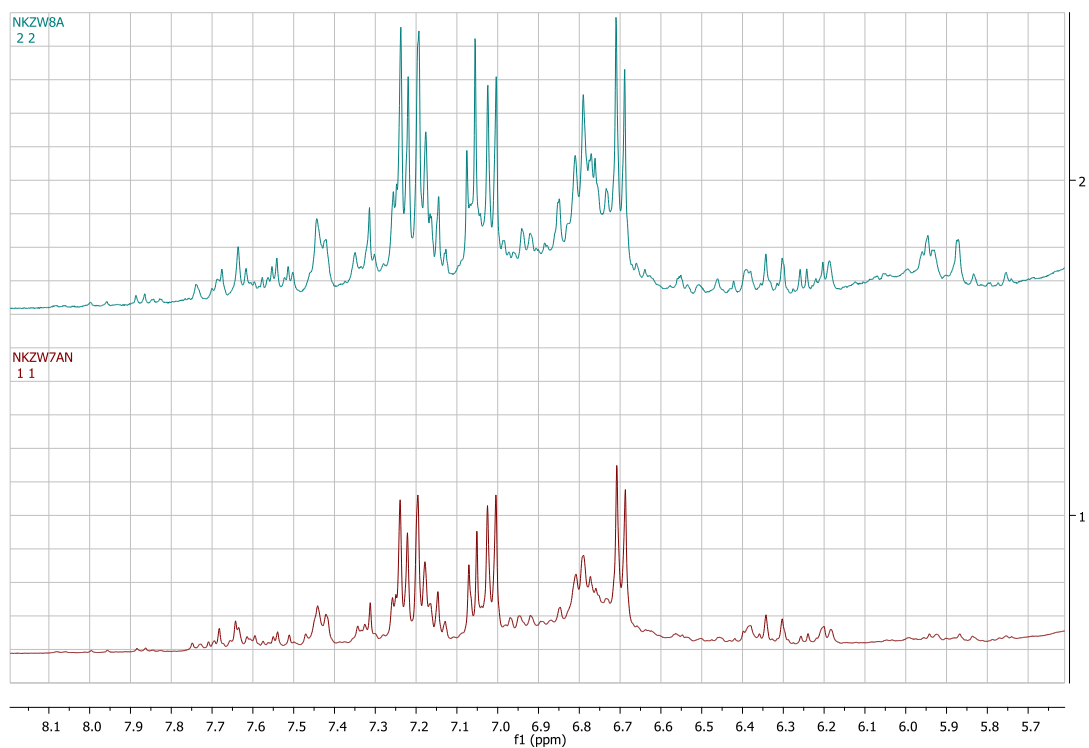
Σχήμα 31: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW1A και NKZW2A (MeOD, 400 MHz)



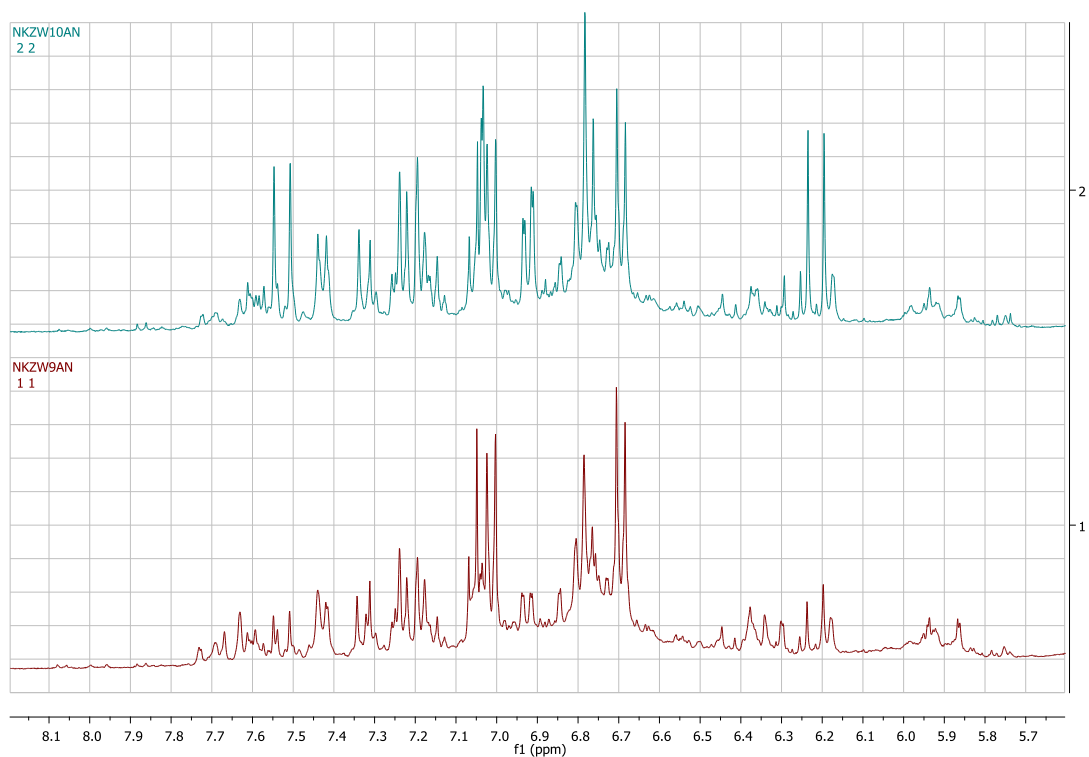
Σχήμα 32: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW3A και NKZW4A (MeOD , 400 MHz)



Σχήμα 33: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW5A και NKZW6A (MeOD , 400 MHz)



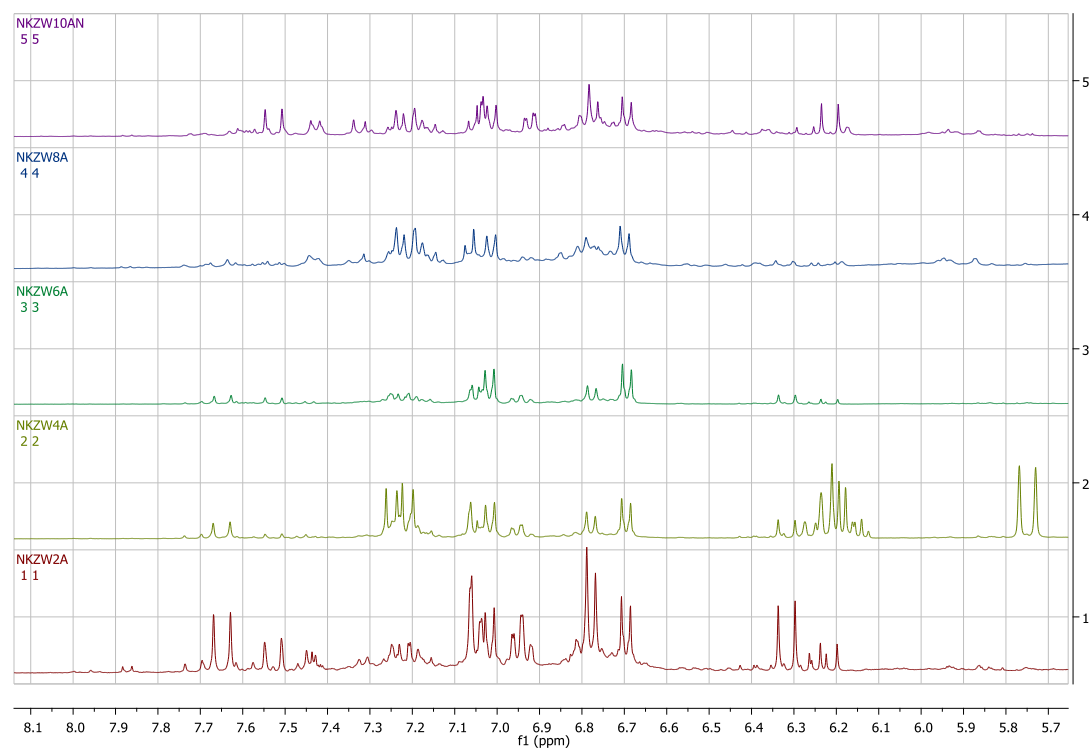
Σχήμα 34: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW7AN και NKZW8A (MeOD , 400 MHz)



Σχήμα 35: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των NKZW9AN και NKZW10AN (MeOD , 400 MHz)

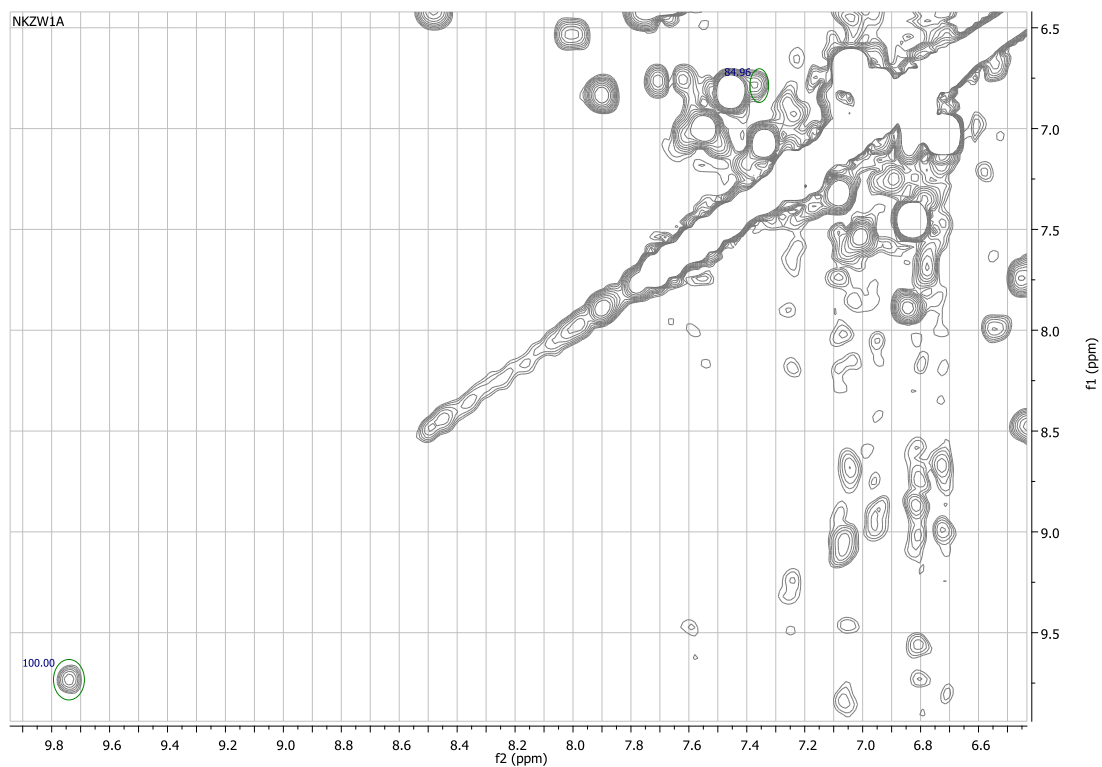


Σχήμα 36: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των δειγμάτων οίνων του 2015 (MeOD, 400 MHz)

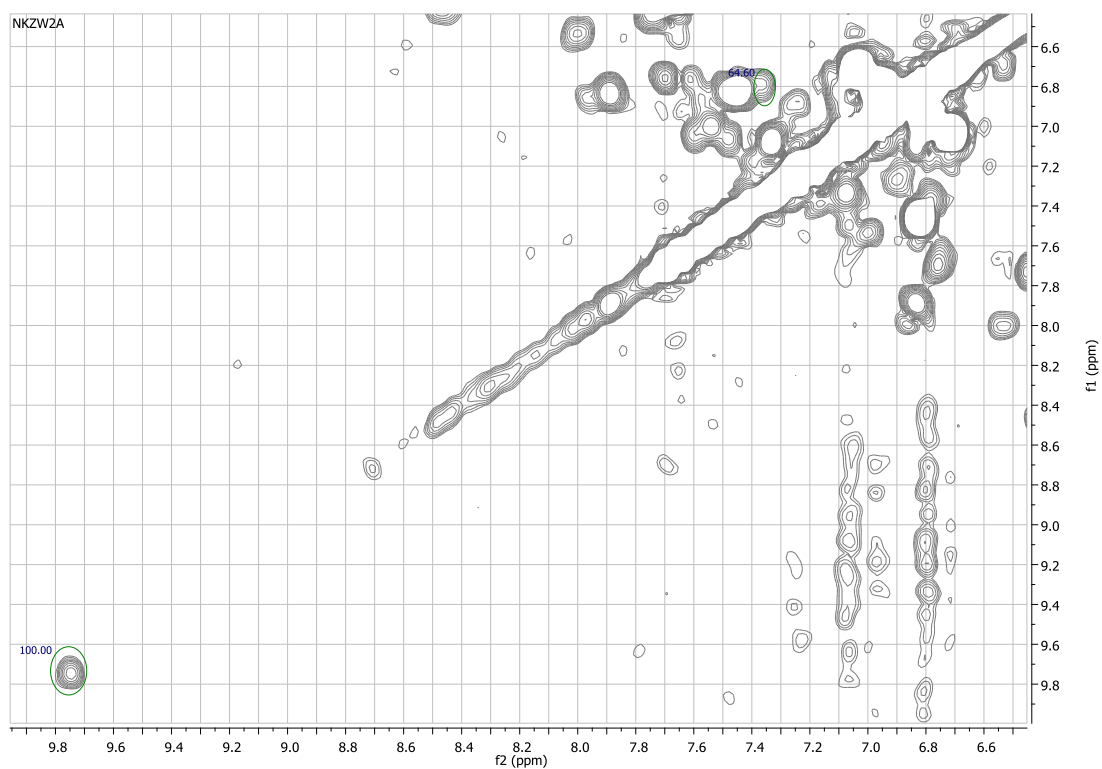


Σχήμα 37: Συγκριτικό φάσμα ^1H -NMR των δειγμάτων οίνων του 2016 (MeOD, 400 MHz)

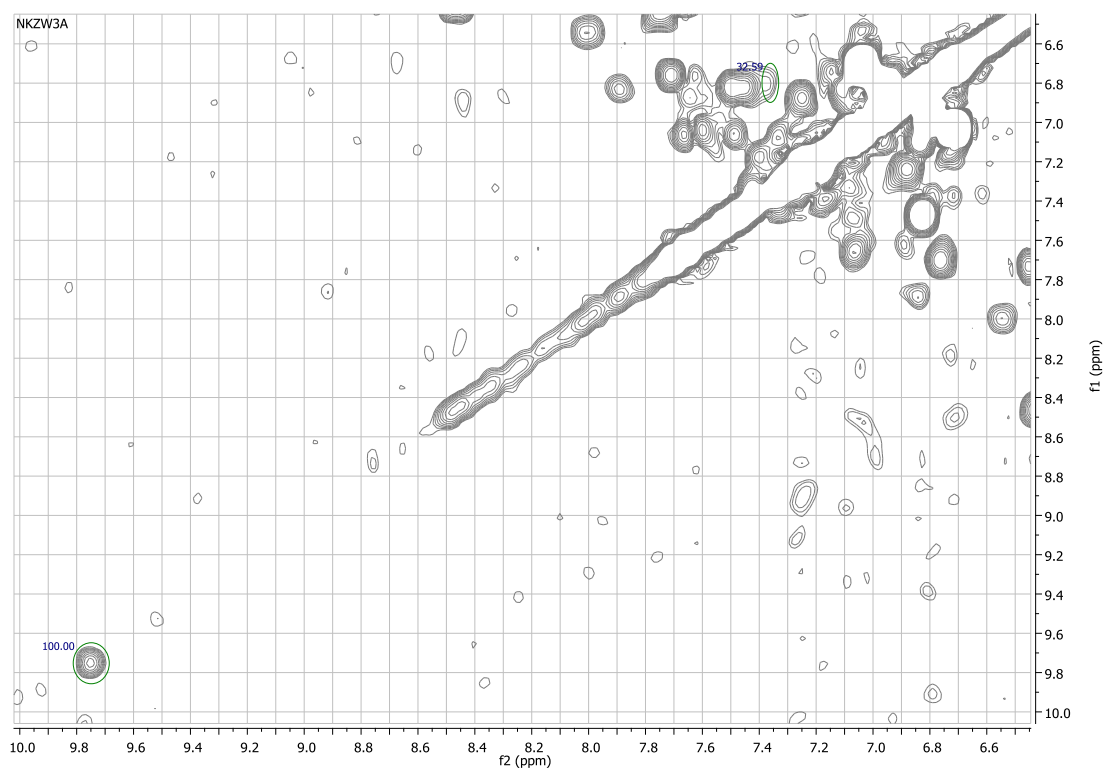
- Φάσματα ^1H - ^1H COSY-NMR άγνωστων δειγμάτων:



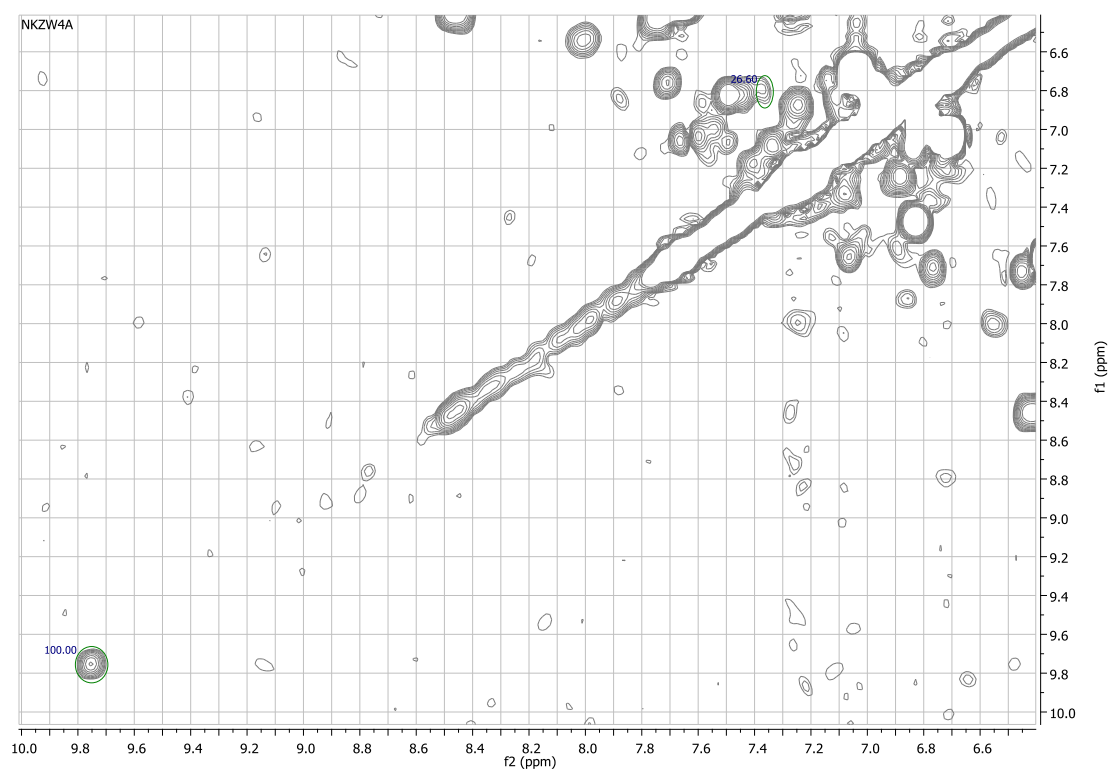
Σχήμα 38: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW1A (MeOD, 400 MHz)



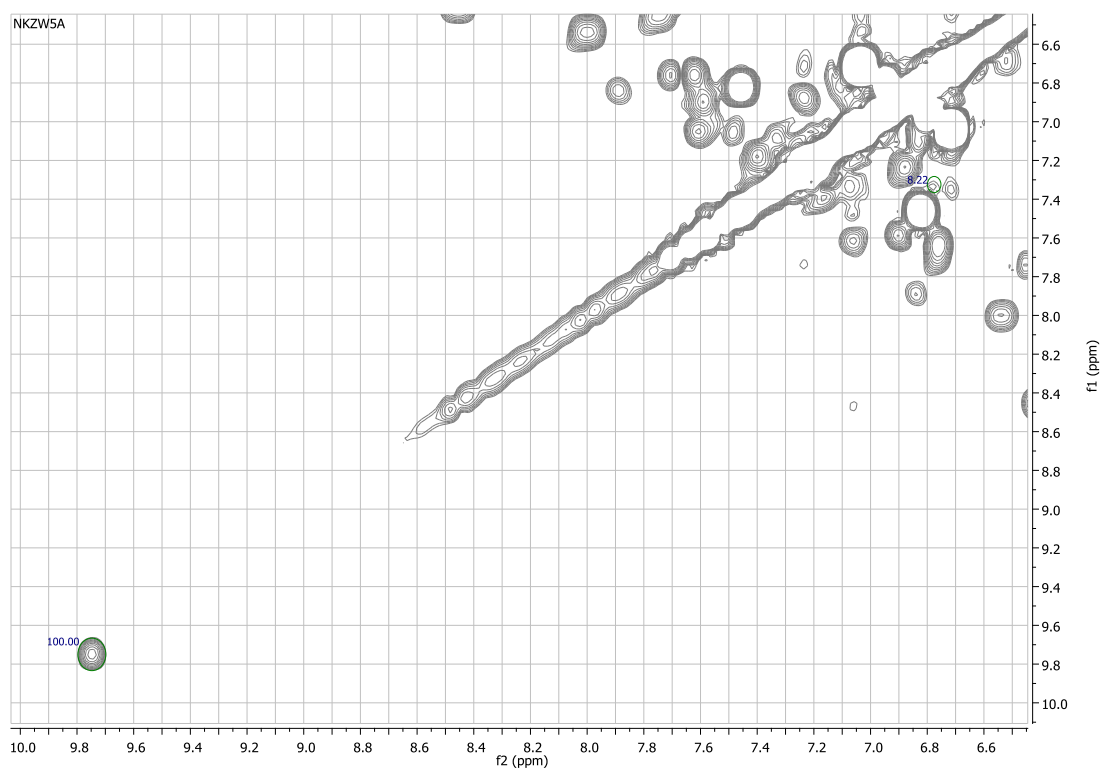
Σχήμα 39: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW2A (MeOD, 400 MHz)



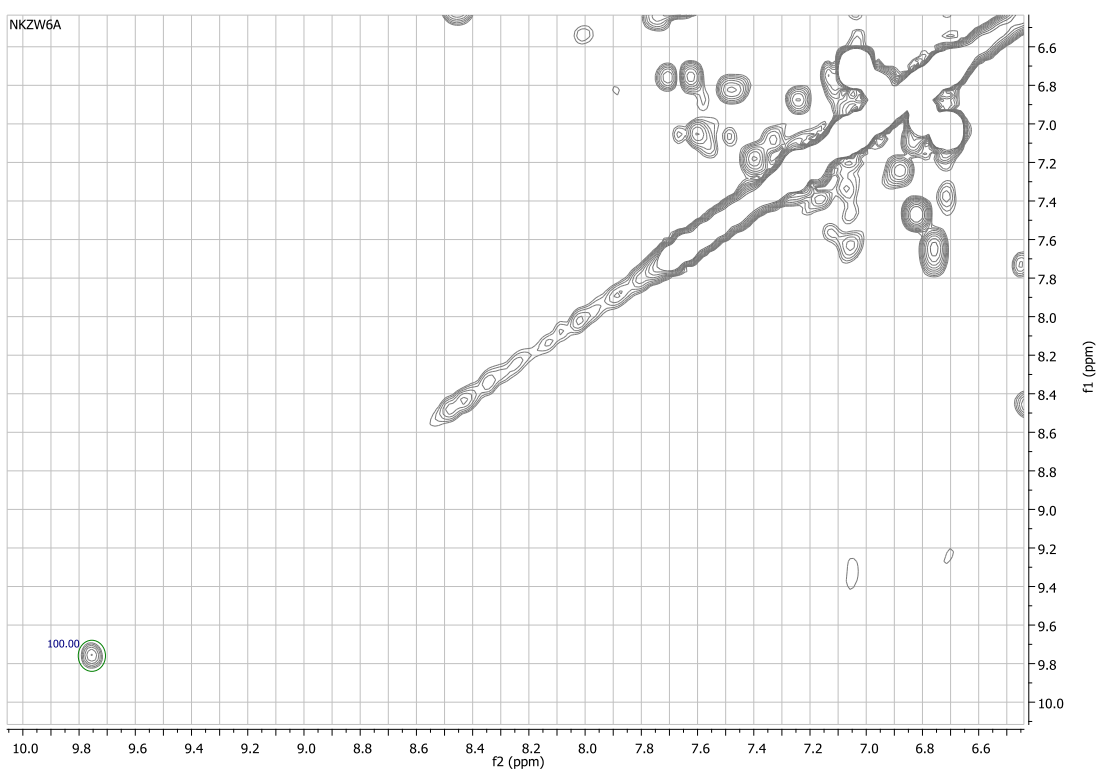
Σχήμα 40: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW3A (MeOD, 400 MHz)



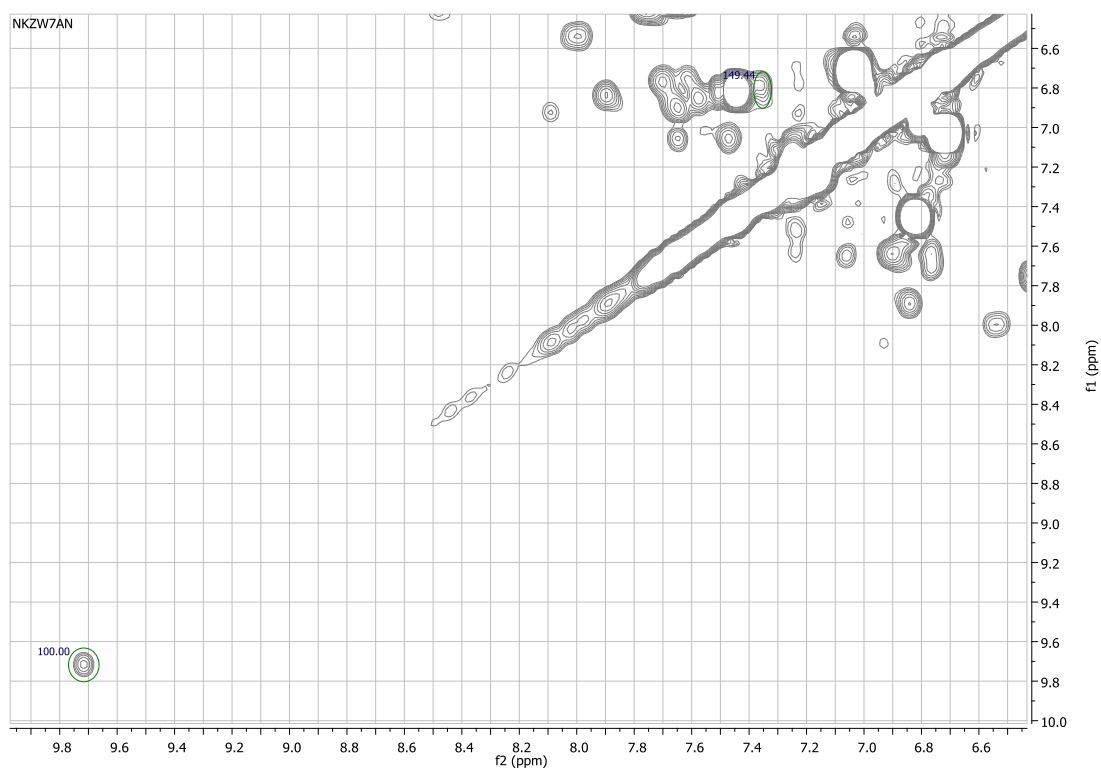
Σχήμα 41: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW4A (MeOD, 400 MHz)



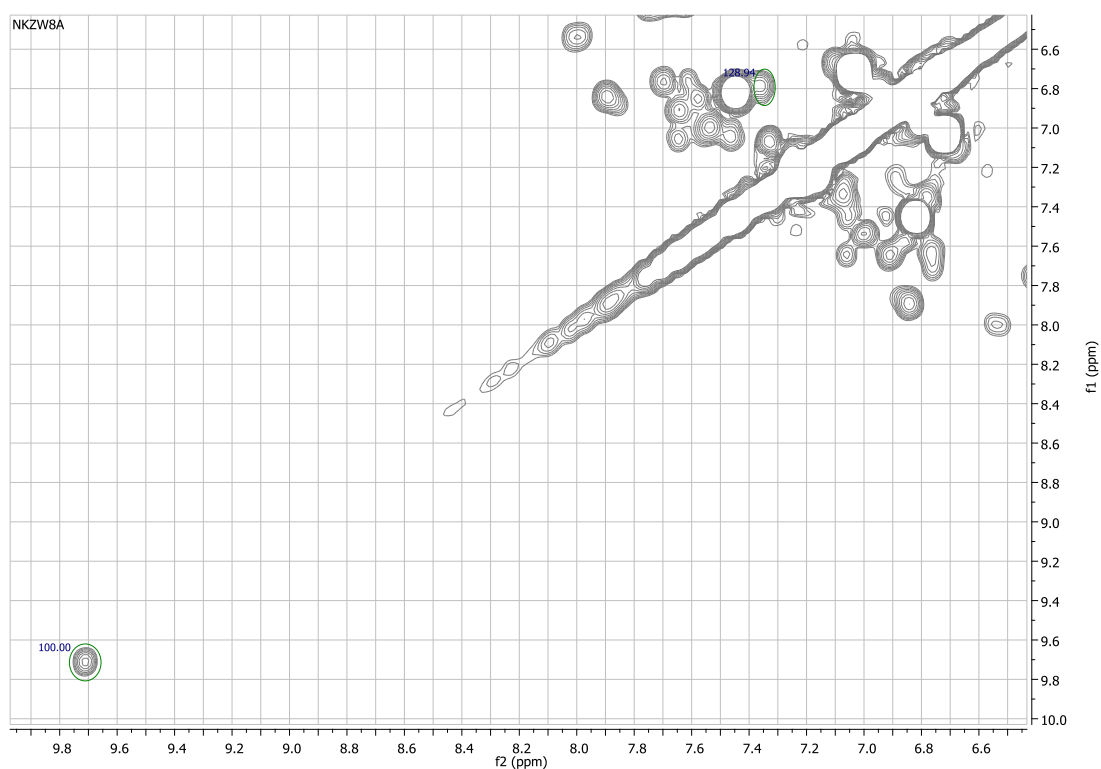
Σχήμα 42: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW5A (MeOD, 400 MHz)



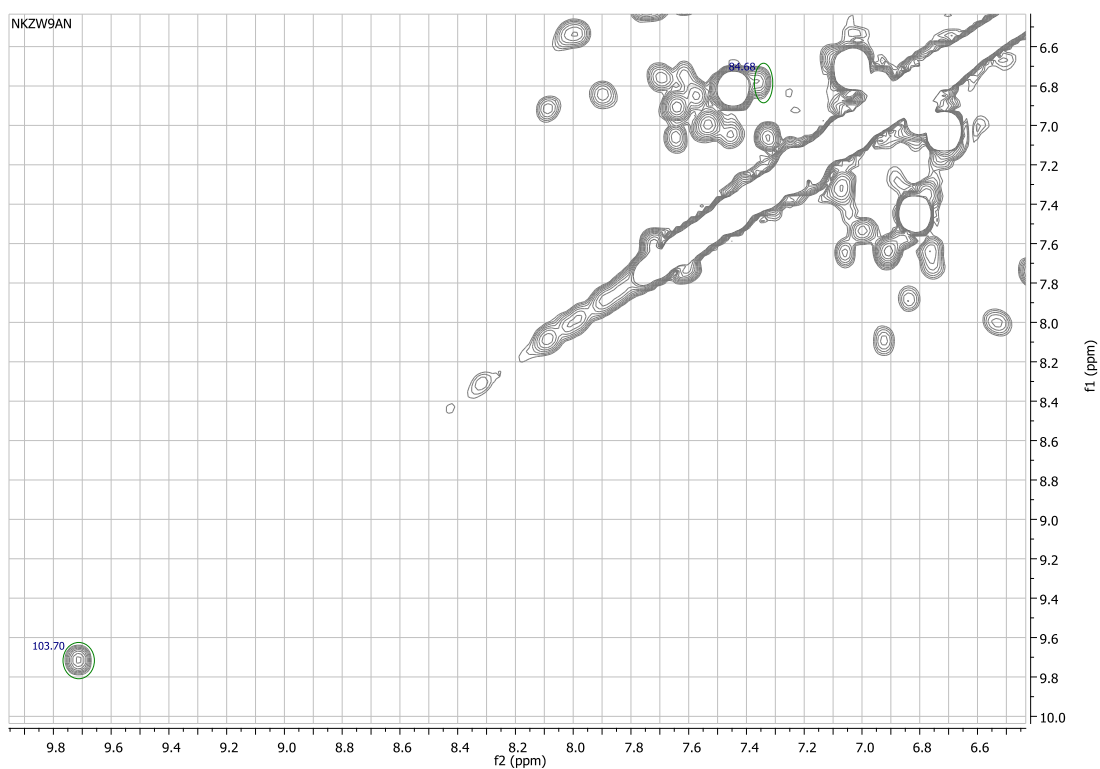
Σχήμα 43: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW6A (MeOD, 400 MHz)



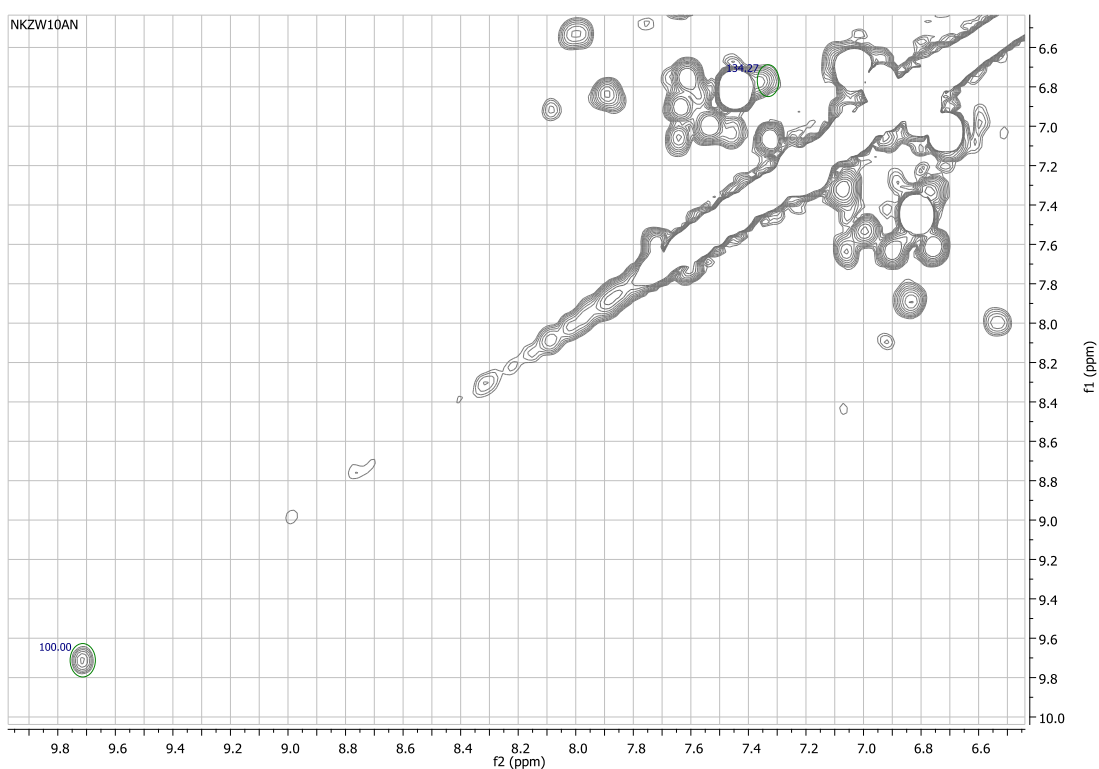
Σχήμα 44: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW7AN (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα 45: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW8A (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα 46: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW9AN (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα 47: Φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του NKZW10AN (MeOD, 400 MHz)

Στα φάσματα ^1H -NMR των προτύπων διαλυμάτων εμφανίζονται 12 κορυφές, από τις οποίες οι 6 αντιστοιχούν στα υδρογόνα της trans-ρεσβερατρόλης και οι άλλες 6 στα υδρογόνα της cis-ρεσβερατρόλης. Στον πίνακα 9 αναγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις των υδρογόνων της trans- και cis-ρεσβερατρόλης.

Πίνακας 9: Οι χημικές μετατοπίσεις των υδρογόνων της trans- και cis- ρεσβερατρόλης

^1H	δ (ppm)
cis- H_4	6.12
trans- H_4	6.17
cis- $\text{H}_{2/6}$	6.23
cis- H_α	6.32
cis- $\text{H}_{\alpha'}$	6.42
trans- $\text{H}_{2/6}$	6.46
cis- $\text{H}_{3'/5'}$	6.64
trans- $\text{H}_{3'/5'}$	6.78
trans- H_α	6.81
trans- $\text{H}_{\alpha'}$	6.98
cis- $\text{H}_{2'/6'}$	7.10
trans- $\text{H}_{2'/6'}$	7.37

Στα φάσματα ^1H - ^1H COSY-NMR των προτύπων διαλυμάτων εμφανίζονται 6 κορυφές διασταύρωσης, 3 για την trans-ρεσβερατρόλη και 3 για την cis-ρεσβερατρόλη. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 10, οι κορυφές (7.37,6.78) και (7.10,6.64) αντιστοιχούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ των $\text{H}_{2'/6'}$ και $\text{H}_{3'/5'}$, οι κορυφές (6.98,6.81) και (6.42,6.32) αντιστοιχούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ των $\text{H}_{\alpha'}$ και H_α , και οι κορυφές (6.46,6.17) και (6.23,6.12) αντιστοιχούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ των $\text{H}_{2/6}$ και H_4 της trans- και cis- ρεσβερατρόλης, αντίστοιχα.

Πίνακας 10: Οι κορυφές διασταύρωσης της trans- και cis- ρεσβερατρόλης

Αλληλεπίδραση	Κορυφή
cis- $\text{H}_{2/6}$ και H_4	(6.23,6.12)
trans- $\text{H}_{2/6}$ και H_4	(6.46,6.17)
cis- $\text{H}_{\alpha'}$ και H_α	(6.42,6.32)
trans- $\text{H}_{\alpha'}$ και H_α	(6.98,6.81)
cis- $\text{H}_{2'/6'}$ και $\text{H}_{3'/5'}$	(7.10,6.64)
trans- $\text{H}_{2'/6'}$ και $\text{H}_{3'/5'}$	(7.37,6.78)

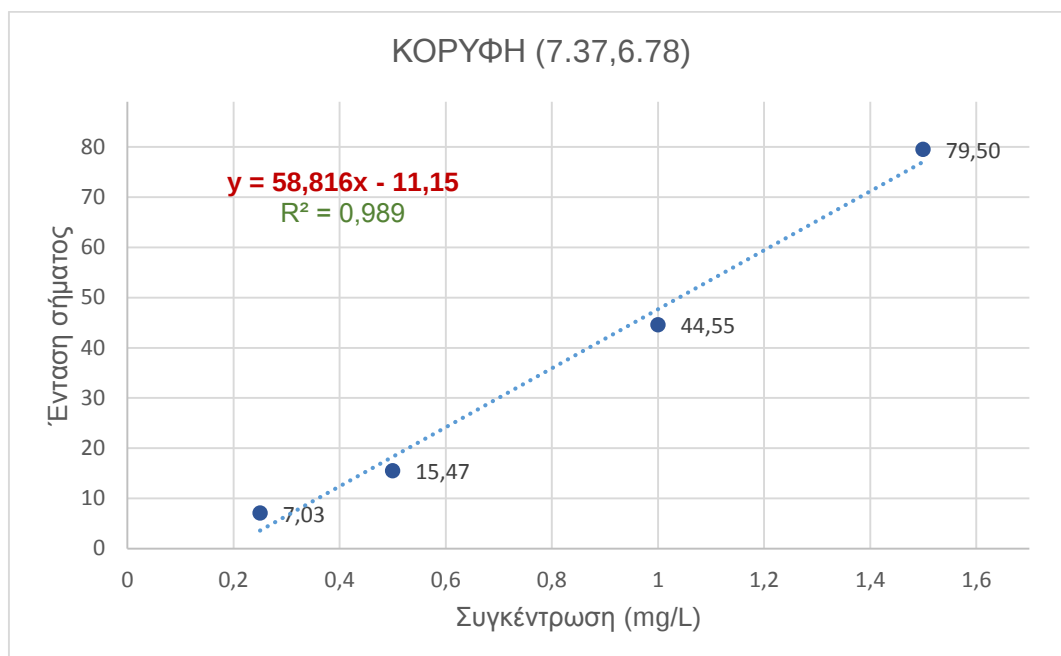
8.1.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η χρήση της φασματοσκοπίας 2D-NMR για ποσοτικούς σκοπούς πλεονεκτεί έναντι της φασματοσκοπίας 1D-NMR λόγω της δυνατότητας διάκρισης των κορυφών, ιδιαίτερα στην περίπτωση πολύπλοκων μειγμάτων, όπως το φαινολικό κλάσμα, οι οποίες στην τελευταία επικαλύπτονται. Η ποσοτικοποίηση με χρήση της φασματοσκοπίας 2D-NMR επιτυγχάνεται με τρόπο αντίστοιχο με τη φασματοσκοπία 1D-NMR. Ωστόσο, υπάρχει μία ουσιαστική διαφορά. Στα φάσματα 2D-NMR δεν υπάρχει άμεση αντιστοίχιση μεταξύ του σήματος και της ποσότητας του αναλύτη, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα 1D-NMR. Αυτό οφείλεται στην επίδραση πολλών παραγόντων στη διαμόρφωση του σήματος, όπως ο τρόπος αποδιέγερσης, η πολλαπλότητα της κορυφής και το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης J. Παρόλα αυτά το σήμα παρουσιάζει γραμμική εξάρτηση από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Έτσι για να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση με τη χρήση φασματοσκοπίας 2D-NMR είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη χρήση προτύπων ουσιών και εσωτερικού προτύπου. Στη συνέχεια μετρώντας την αναλογία του σήματος του αναλύτη ως προς το αντίστοιχο του εσωτερικού προτύπου σε άγνωστα δείγματα, είναι δυνατή η αντιστοίχιση σε συγκεκριμένη ποσότητα αναλύτη μέσω της καμπύλης αναφοράς.

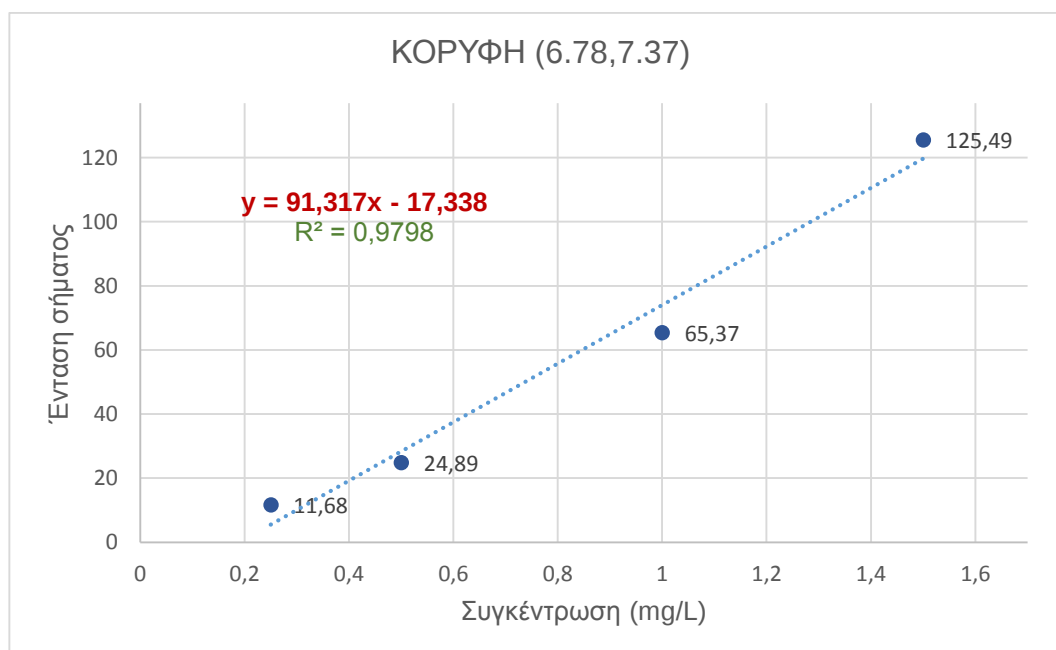
Από τις τιμές που παίρνουμε από τα φάσματα ^1H - ^1H COSY-NMR για όλες τις γνωστές συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων, 0.25, 0.5, 1.0 και 1.5 mg/L, για τις κορυφές διασταύρωσης (7.37,6.78) και (6.78,7.37) της trans-ρεσβερατρόλης, που είναι οι πιο ευδιάκριτες, σε αναλογία με την τιμή αναφοράς που ορίσαμε για το σήμα διαγωνίου (9.74,9.74) της συριγγαλδεύδης, φτιάχνουμε τις καμπύλες αναφοράς με την βοήθεια του Microsoft Excel και βρίσκουμε τις εξισώσεις των ευθειών. Έτσι κατά την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων έχοντας τις τιμές της trans-ρεσβερατρόλης σε σχέση με το εσωτερικό πρότυπο και με την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για κάθε κορυφή διασταύρωσης μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της ολικής trans-ρεσβερατρόλης από τις κορυφές (7.37,6.78) και (6.78,7.37). Να υπενθυμίσουμε ότι το πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 0.1 mg/L δεν εμφάνισε καμία κορυφή της ρεσβερατρόλης στα φάσματα NMR και γι' αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης.

Να σημειώσουμε ότι, θεωρητικά από τις κορυφές (7.10,6.64) και (6.64,7.10) μπορεί να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής cis-ρεσβερατρόλης στα άγνωστα δείγματα αν έχουν παρασκευαστεί πρότυπα διαλύματα cis-ρεσβερατρόλης και έχει φτιαχτεί καμπύλη αναφοράς. Πρακτικά όμως αυτό δεν γίνεται διότι τα φάσματα από τα προς μέτρηση δείγματα είναι πιο πολύπλοκα και έχουμε αλληλεπικάλυψη των κορυφών διασταύρωσης

της cis-ρεσβερατρόλης με κορυφές άλλων φαινολικών ενώσεων. Έτσι δεν μπορούμε να διακρίνουμε τις κορυφές (7.10,6.64) και (6.64,7.10) που αντιστοιχούν στην cis-ρεσβερατρόλη ώστε να την ποσοτικοποιήσουμε. Η ποσοτικοποίηση θα ήταν εφικτή μόνο αν απομονώναμε την trans- και cis-ρεσβερατρόλη από τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις.



Διάγραμμα 1: Η καμπύλη αναφοράς της κορυφής διασταύρωσης (7.37,6.78)



Διάγραμμα 2: Η καμπύλη αναφοράς της κορυφής διασταύρωσης (6.78,7.37)

Πίνακας 11: Παρουσίαση αποτελεσμάτων των μετρήσεων των προτύπων διαλυμάτων

Πρότυπο διάλυμα	Συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης	Τιμή μέτρησης trans-ρεσβερατρόλης	
		Κορυφή (7.37,6.78)	Κορυφή (6.78,7.37)
PROT1	0.1 mg/L	-	-
PROT1N	0.25 mg/L	7.03	11.68
PROT2	0.5 mg/L	15.47	24.89
PROT3	1.0 mg/L	44.55	65.37
PROT4	1.5 mg/L	79.50	125.49

8.1.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Με βάση τις εξισώσεις που προκύπτουν από τις καμπύλες αναφοράς και τις μετρήσεις των άγνωστων δειγμάτων σε αναλογία με το εσωτερικό πρότυπο υπολογίζεται η συγκέντρωση της ολικής trans-ρεσβερατρόλης (trans-ρεσβερατρόλη και trans-γλυκοζιτης ρεσβερατρόλης). Πιο ευδιάκριτη είναι η κορυφή διασταύρωσης (7.37,6.78) σε όλα τα δείγματα εκτός του NKZW5A που είναι η κορυφή (6.78,7.37). Έτσι, η ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια των καμπυλών αναφοράς αυτών των δύο κορυφών, από τις οποίες προκύπτουν οι τιμές συγκέντρωσης της ολικής trans-ρεσβερατρόλης που παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Παρουσίαση αποτελεσμάτων των μετρήσεων των άγνωστων δειγμάτων

Άγνωστο δείγμα	Τιμή μέτρησης trans-ρεσβερατρόλης	Μετρούμενη κορυφή	Συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης
NKZW1A	84.96	(7.37,6.78)	1.63 mg/L
NKZW2A	64.60	(7.37,6.78)	1.29 mg/L
NKZW3A	32.59	(7.37,6.78)	0.74 mg/L
NKZW4A	26.60	(7.37,6.78)	0.64 mg/L
NKZW5A	8.22	(6.78,7.37)	0.28 mg/L
NKZW6A	-	-	-
NKZW7AN	149.44	(7.37,6.78)	2.73 mg/L
NKZW8A	128.94	(7.37,6.78)	2.38 mg/L
NKZW9AN	84.68	(7.37,6.78)	1.63 mg/L
NKZW10AN	134.27	(7.37,6.78)	2.47 mg/L

8.2 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

- Στο φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR του δείγματος NKZW6A δεν παρουσιάστηκε καμία κορυφή διασταύρωσης της ρεσβερατρόλης. Λογικά αυτό οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης ήταν μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.
- Τα δείγματα NKZW7AN και NKZW9AN κατά τη λήψη των φασμάτων τους δεν παρουσίασαν την κορυφή της συριγγαλδεύδης ούτε στο φάσμα ^1H -NMR ούτε στο φάσμα ^1H - ^1H COSY-NMR. Για αυτό το λόγο ξαναπροσθέσαμε εσωτερικό πρότυπο και ξαναπήραμε τα φάσματα χωρίς κανένα πρόβλημα αυτή τη φορά. Πιθανότατα πραγματοποιήθηκε κάποια αντίδραση που είχε ως αποτέλεσμα την κατανάλωση της συριγγαλδεύδης, όπως για παράδειγμα με τα θειώδη παρόλο που είχε γίνει προκατεργασία με ακεταλδεύδη. Στα δείγματα NKZW8A και NKZW10AN, τα οποία παράγονται από την ίδια ποικιλία με τα παραπάνω, δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των προτύπων διαλυμάτων, στην περιοχή συχνοτήτων από 6.0 έως 7.4 ppm εμφανίζονται 6 κορυφές διασταύρωσης οι οποίες αντιστοιχούν στην trans-ρεσβερατρόλη και 6 κορυφές τα οποία αντιστοιχούν στην cis-ρεσβερατρόλη. Το ύψος των κορυφών των υδρογόνων της trans-ρεσβερατρόλης είναι σχεδόν ίσο με το αντίστοιχο αυτών της cis-ρεσβερατρόλης. Όπως ξέρουμε, στο φυτό της αμπέλου παράγεται μόνο η trans-ρεσβερατρόλη, ενώ η cis-ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Άρα συμπεραίνουμε ότι κατά τον προσδιορισμό της trans-ρεσβερατρόλης ένα μέρος μετατρέπεται σε cis-ρεσβερατρόλη μέσω αντίδρασης φωτοϊσομερισμού παρουσία της μεθανόλης, όπως επιβεβαιώνεται και από τις έρευνες των R.A. Rodriguez et al. με τίτλο «Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization» και των V. Nour et al. με τίτλο «Ultraviolet irradiation of trans-resveratrol and HPLC determination of trans-resveratrol and cis-resveratrol in Romanian red wines». Αυτό δημιουργεί πρόβλημα στην ποσοτικοποίηση της trans-ρεσβερατρόλης, το οποίο δεν θα μας απασχολούσε αν μετράγαμε την ολική ποσότητα ρεσβερατρόλης αθροίζοντας τις τιμές συγκεντρώσεως που προκύπτουν από τις κορυφές διασταύρωσης της trans- και cis-μορφής, πράγμα που είναι αδύνατο αφού οι κορυφές διασταύρωσης της cis-ρεσβερατρόλης δεν είναι ευδιάκριτες. Το πειραματικό αυτό σφάλμα ελαχιστοποιείται αφού για τα πρότυπα διαλύματα ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία, οι ίδιες συνθήκες και οι ίδιοι χρόνοι διεκπεραίωσης των σταδίων.
- Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των άγνωστων δειγμάτων, στην περιοχή συχνοτήτων από 5.8 έως 8.1 ppm, εμφανίζονται κορυφές διασταύρωσης που αντιστοιχούν στις φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης και της ρεσβερατρόλης, που περιέχονται στον οίνο και που απομονώσαμε. Η φύση των δειγμάτων, λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασής τους, δυσκολεύουν τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση της ένωσης μας με χρήση φασματοσκοπίας 1D-NMR. Γι' αυτό το λόγο η ανάλυση έγινε με φασματοσκοπία 2D-NMR ώστε να μπορούμε να μετρήσουμε την ολική ποσότητα της ουσίας που μας ενδιαφέρει χωρίς την παρουσία άλλων κορυφών που αλληλοεπικαλύπτονται με το δικό της. Παρόλα αυτά, από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$

μπορούμε να πάρουμε χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το φαινολικό περιεχόμενο του οίνου, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «δακτυλικό αποτύπωμα» για την επιβεβαίωση και ταυτοποίηση της κάθε ποικιλίας. Στα φάσματα αυτά φαίνεται:

- Η εντυπωσιακή επαναληψιμότητα στις κορυφές που υπάρχει μεταξύ των οίνων ίδιων ποικιλιών από διαφορετικές χρονιές παραγωγής. Συγκεκριμένα, στα σχήματα 31-35, όπου συγκρίνονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ κάθε μονοποικιλιακού οίνου για τις χρονιές 2015 και 2016, φαίνεται καθαρά το ίδιο μοτίβο κορυφών με διαφορές μόνο στις εντάσεις των σημάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το σχήμα 33, στο οποίο συγκρίνονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των οίνων που παράγονται από την ποικιλία Παύλος για τις χρονιές 2015 και 2016. Εκεί βλέπουμε ότι για τη χρονιά του 2015 στα 6.2 και 5.75 ppm εμφανίζονται κορυφές που μοιάζουν πολύ με τις αντίστοιχες των οίνων που παράγονται από την ποικιλία Γουστολίδι, όπως φαίνεται στο σχήμα 32. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε μίξη των δύο ποικιλιών. Φυσικά για να είμαστε σίγουροι και να βγει ένα σίγουρο συμπέρασμα χρειάζεται να γίνουν περισσότερες αναλύσεις σε περισσότερα δείγματα οίνων.
- Η παρουσία κορυφών που διαφοροποιούν τις ποικιλίες μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, στα σχήματα 36 και 37 όπου συγκρίνονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ όλων των μονοποικιλιακών οίνων για τις χρονιές 2015 και 2016, αντίστοιχα, παρατηρούμε ότι υπάρχουν μικρές διαφορές στα μοτίβα κορυφών μεταξύ των διάφορων ποικιλιών.
- Σύμφωνα με τιμές της βιβλιογραφίας, οι οποίες έχουν προκύψει από αναλύσεις με χρωματογραφία HPLC, οι λευκοί ελληνικοί οίνοι περιέχουν από 0.03 έως 0.1 mg/L trans-ρεσβερατρόλης και οι ερυθροί οίνοι από 0.3 έως 2,5 mg/L trans-ρεσβερατρόλης. Όπως βλέπουμε οι τιμές των σημάτων που προκύπτουν από την ανάλυση με φασματοσκοπία 2D-NMR είναι μεγαλύτερες από αυτές της βιβλιογραφίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν μετράμε μόνο την trans-ρεσβερατρόλη αλλά και το γλυκοζύτη της. Άρα, η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού με ομοπυρηνικό πείραμα $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY που αναπτύξαμε μετράει την ολική trans-ρεσβερατρόλη στον οίνο. Επίσης, σύμφωνα με τους Soleas et al. η διαφορά ανάμεσα στην προκατεργασία και την ανάλυση του δείγματος οίνου ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού που ακολουθείται μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα.

- Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού συσχέτισης πυρήνων έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Βάση των μετρήσεων προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:
- Οι τιμές συγκέντρωσης της ολικής trans-ρεσβερατρόλης στους ερυθρούς οίνους είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες στους λευκούς οίνους, το οποίο είναι λογικό αφού στην πρώτη περίπτωση ο μούστος παραμένει με τα στέμφυλα για περισσότερο χρόνο και έτσι περνά από το φλοιό των σταφυλιών στον οίνο περισσότερη trans-ρεσβερατρόλη. Συγκεκριμένα οι οίνοι που παράγονται από την ποικιλία Αυγουσιάτη παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές και ακολουθούν αυτοί από τις ποικιλίες Ρομπόλα, Γουστολίδι και Παύλος.
 - Οι τιμές συγκέντρωσης της trans-ρεσβερατρόλης στους οίνους που παράγονται από την ποικιλία Ρομπόλα είναι διπλάσιες από τις αντίστοιχες των οίνων από την ποικιλία Γουστολίδι και εξαπλάσιες από αυτές των οίνων από την ποικιλία Παύλος. Αυτό οφείλεται και στην ποικιλία την ίδια αλλά και στο ότι η Ρομπόλα καλλιεργείται σε μεγαλύτερο υψόμετρο, σε πιο πετρώδη και φτωχά εδάφη, με μεγαλύτερη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και γενικά πιο αντίξοες συνθήκες, πράγμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα το φυτό να στρεσσάρεται περισσότερο και να έχουμε αυξημένη παραγωγή trans-ρεσβερατρόλης. Αν και οι ποικιλίες αυτές είναι διαφορετικές ώστε να τις συγκρίνουμε με βάση το υψόμετρο και για να βγει ένα τέτοιο συμπέρασμα, το υψόμετρο επιδρά σημαντικά στην παραγωγή της trans-ρεσβερατρόλης πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση των οίνων που παράγονται από την ποικιλία Αυγουσιάτη από διαφορετικά υψόμετρα. Ο Αυγουσιάτης που καλλιεργείται σε ημιορεινή περιοχή παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές trans-ρεσβερατρόλης στον οίνο από τον αντίστοιχο σε πεδινή-ημιορεινή περιοχή. Επίσης, μία από τις τιμές του τελευταίου είναι ίση με τις αντίστοιχες του οίνου που παράγεται από την ποικιλία Ρομπόλα, η οποία αν και λευκή ποικιλία λόγω του υψόμετρου έχει αυξημένη συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης.
 - Οι τιμές συγκέντρωσης της trans-ρεσβερατρόλης είναι λίγο μεγαλύτερες στους οίνους που παράχθηκαν το έτος 2015 από τους αντίστοιχους του έτους 2016. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο κλίμα. Οι αντίξοες καιρικές συνθήκες, οι αυξομειώσεις στη θερμοκρασία, οι εναλλαγές του καιρού και οι μειωμένες βροχοπτώσεις, στρεσσάρουν

το φυτό της αμπέλου με αποτέλεσμα να βιοσυντίθεται μεγαλύτερη ποσότητα trans-ρεσβερατρόλης. Η καρπόδεση του σταφυλιού αρχίζει το Μάιο και ο τρυγητός γίνεται τον Αύγουστο και το Σεπτέμβρη. Βασιζόμενοι σε αυτό για να συγκρίνουμε τις τιμές της trans-ρεσβερατρόλης στον οίνο μιας ποικιλίας με βάση το κλίμα θα πρέπει να μελετήσουμε τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν κατά τα διαστήματα Μάιος - Σεπτέμβρη του 2015 και το 2016. Παρακάτω παρουσιάζονται κλιματολογικά στοιχεία σύμφωνα με την Ε.Μ.Υ. για τα χρονικά αυτά διαστήματα.

Μάιος 2015: Ο Μάιος είχε ένα αρκετά ζεστό ξεκίνημα και ένα κρύο κλείσιμο. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (1.3) από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν κάτω (12%) από τις κανονικές τιμές.

Μάιος 2016: Ο Μάιος είχε σημαντικές αυξομειώσεις στη θερμοκρασία αλλά και εναλλαγές μεταξύ κακοκαιρίας και περιόδων αίθριου ουρανού. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (0.1) από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (129%) από τις κανονικές τιμές.

Όπως βλέπουμε, ο Μάιος του 2015 χαρακτηρίζεται από εναλλαγή στη θερμοκρασία, αυξημένη μέση θερμοκρασία και μειωμένες βροχοπτώσεις, ενώ ο Μάιος του 2016 από αυξομειώσεις στη θερμοκρασία, εναλλαγές μεταξύ κακοκαιρίας και αίθριου καιρού. Οι συνθήκες που επικράτησαν και τους δύο αυτούς μήνες θα μπορούσαν να στρεσάρουν το φυτό της αμπέλου εξίσου.

Ιούνιος 2015: Ο Ιούνιος ήταν γενικά δροσερός, με εξαίρεση ένα ζεστό διάστημα στα μέσα της περιόδου. Η ελάχιστη θερμοκρασία παρουσίασε αρνητική απόκλιση από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (153%) από τις κανονικές τιμές.

Ιούνιος 2016: Ο Ιούνιος είχε σημαντικές εναλλαγές μεταξύ μικρών διαστημάτων κακοκαιρίας και περιόδων αίθριου ουρανού. Η ελάχιστη θερμοκρασία παρουσίασε αρνητική απόκλιση από τις κανονικές τιμές. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (1.6) από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (69%) από τις κανονικές τιμές. Κύριο χαρακτηριστικό οι ισχυρές βροχές και καταιγίδες κατά διαστήματα και ειδικά το διήμερο 25-26/6.

Όπως βλέπουμε, ο Ιούνιος του 2015 παρουσίασε εναλλαγή στη θερμοκρασία και χαμηλότερη ελάχιστη θερμοκρασία, ενώ ο Ιούνιος του 2016 εμφάνισε σημαντικές εναλλαγές μεταξύ μικρών διαστημάτων κακοκαιρίας και περιόδων αίθριου καιρού και

υψηλότερη μέση θερμοκρασία. Οι συνθήκες που επικράτησαν το μήνα αυτό το 2016 ήταν περισσότερο στρεσσογόνες για το φυτό της αμπέλου.

Ιούλιος 2015: Ο Ιούλιος ήταν σχετικά δροσερός στην αρχή αλλά αρκετά ζεστός στο τέλος. Η μέγιστη θερμοκρασία παρουσίασε θετική απόκλιση από τις κανονικές τιμές. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (3.1) από τις κανονικές τιμές.

Ιούλιος 2016: Ο Ιούλιος είχε την τυπική εικόνα του συγκεκριμένου καλοκαιρινού μήνα στην Ελλάδα. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (1.9) από τις κανονικές τιμές.

Όπως βλέπουμε, ο Ιούλιος του 2015 σημείωσε εναλλαγή θερμοκρασίας και αυξημένη μέγιστη και μέση θερμοκρασία, ενώ ο Ιούλιος του 2016 σημείωσε λιγότερο αυξημένη μέση θερμοκρασία. Οι συνθήκες που επικράτησαν το μήνα αυτό το 2015 ήταν περισσότερο στρεσσογόνες για το φυτό της αμπέλου.

Αύγουστος 2015: Ο Αύγουστος ήταν αρκετά ζεστός στο ξεκίνημα του αλλά σχετικά ψυχρός προς το τέλος. Η μέγιστη θερμοκρασία παρουσίασε θετική απόκλιση από τις κανονικές τιμές. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (3.0) από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (209%) από τις κανονικές τιμές. Κύριο χαρακτηριστικό ήταν οι ισχυρές βροχές και καταιγίδες το πρώτο δεκαήμερο (15mm 4/8).

Αύγουστος 2016: Ο Αύγουστος ξεκίνησε με αρκετή ζέστη. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (1.7) από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (1%) από τις κανονικές τιμές.

Όπως βλέπουμε, ο Αύγουστος του 2015 παρουσίασε εναλλαγή θερμοκρασίας και αυξημένη μέγιστη και μέση θερμοκρασία, ενώ ο Αύγουστος του 2016 εμφάνισε λιγότερο αυξημένη μέση θερμοκρασία. Οι συνθήκες που επικράτησαν το μήνα αυτό το 2015 ήταν περισσότερο στρεσσογόνες για το φυτό της αμπέλου.

Σεπτέμβριος 2015: Ο Σεπτέμβρης ήταν αρχικά ζεστός. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω (2.0) από τις κανονικές τιμές. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (244%) από τις κανονικές τιμές. Κύριο χαρακτηριστικό ήταν οι ισχυρές βροχές μεγάλης διάρκειας και οι έντονες καταιγίδες κατά διαστήματα το τρίτο δεκαήμερο (40mm 26/9).

Σεπτέμβριος 2016: Ο Σεπτέμβρης χαρακτηρίζεται από έντονα καιρικά φαινόμενα. Τα ποσά βροχοπτώσεων που σημειώθηκαν ήταν πάνω (508%) από τις κανονικές τιμές.

Κύριο χαρακτηριστικό οι ισχυρές βροχές και καταιγίδες το πρώτο δεκαήμερο (71mm 8/9).

Όπως βλέπουμε, ο Σεπτέμβρης του 2015 σημείωσε εναλλαγή θερμοκρασίας, αυξημένη μέση θερμοκρασία, και αλλαγή καιρού προς το τέλος με έντονες βροχοπτώσεις κατά διαστήματα, ενώ ο Σεπτέμβρης του 2016 παρουσίασε από τις αρχές έντονες βροχοπτώσεις. Οι συνθήκες που επικράτησαν το μήνα αυτό το 2015 ήταν περισσότερο στρεσογόνες για το φυτό της αμπέλου.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, σχετικά με το χρονικό διάστημα Μάιος - Σεπτέμβριος, και κατά τις δύο χρονιές οι καιρικές συνθήκες ήταν κατά διαστήματα αντίξοες, πράγμα που συμβαδίζει και με τις μικρές διαφορές τιμών στα αποτελέσματα μας. Στη διαφορά αυτή περισσότερο ρόλο πιθανότατα έπαιξαν οι συνθήκες που επικράτησαν κατά τους τελευταίους μήνες πριν τον τρυγητό, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβρη (για την ποικιλία Αυγουσιτιάτη) και οι οποίες ήταν περισσότερο στρεσογόνες το 2015, το οποίο δικαιολογεί το γεγονός ότι οι οίνοι αυτής της χρονιάς εμφάνισαν μεγαλύτερη συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης. Επίσης, να σημειώσουμε ότι το κλίμα δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει την βιοσύνθεση της trans-ρεσβερατρόλης από το φυτό. Για παράδειγμα, ένας άλλος πιθανός στρεσογόνος παράγοντας είναι η προσβολή από διάφορους μικροοργανισμούς, πράγμα το οποίο θα μπορούσε να αιτιολογήσει και τη σημαντικά μεγαλύτερη τιμή της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης στο δείγμα οίνου από την ποικιλία Αυγουσιτιάτη του 2016 από το χαμηλότερο υψόμετρο. Γι' αυτό για να βγεί ένα πιο σίγουρο συμπέρασμα σχετικά με τον παράγοντα κλίμα, πρέπει να γίνουν μελέτες σε περισσότερα δείγματα οίνων από διαφορετικές χρονιές.

- Μέχρι τώρα ο ποσοτικός προσδιορισμός της ρεσβερατρόλης στον οίνο γινόταν με χρωματογραφία HPLC. Σύμφωνα με μία μελέτη με τίτλο «The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines» πραγματοποιήθηκε αρχικά ένα στάδιο εκχύλισης στερεάς φάσης, όπου απομονώθηκε η trans-ρεσβερατρόλη, και στη συνέχεια ακολούθησε ένα στάδιο ταχείας ποσοτικοποίησης με HPLC. Σύμφωνα με δύο άλλες μελέτες με τίτλους «Trans-Resveratrol Concentration in Wines Produced in Greece» και «trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties» έγινε απευθείας έγχυση του δείγματος στο χρωματογράφο HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της trans-ρεσβερατρόλης. Σε αυτές έγινε και ποιοτικός προσδιορισμός

της *cis*-ρεσβερατρόλης, όπου τα πρότυπα διαλύματα *cis*-ρεσβερατρόλης παρασκευάστηκαν μετά από ακτινοβόληση διαλύματος *trans*-ρεσβερατρόλης με υπεριώδη ακτινοβολία κατά τη διάρκεια μίας νύχτας.

Η χρωματογραφία HPLC είναι μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος με καλή ακρίβεια, έχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και διακρίνει την *trans*-ρεσβερατρόλη από το γλυκοζίτη της στα δείγματα οίνων σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία NMR. Παρόλα αυτά, η τεχνική ανάλυσης NMR μίας και δύο διαστάσεων μπορεί να δώσει μία πολύ καλή εικόνα για την ολική συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης καθώς επίσης και της *cis*-ρεσβερατρόλης εφόσον γίνει απομόνωση από τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις. Ακόμα μας δίνει πληροφορίες για την ποιοτική σύσταση του οίνου σε φαινολικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως «δακτυλικό αποτύπωμα» για την ταυτοποίηση της κάθε ποικιλίας. Τέλος, να αναφέρουμε ότι η χρήση της μεθόδου που αναπτύξαμε δεν περιορίζεται μόνο στον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης αλλά έχει εφαρμογή και στις υπόλοιπες φαινολικές ουσίες του οίνου. Γι' αυτό το λόγο η ανάπτυξη μίας τέτοιας μεθόδου ως δεύτερη εναλλακτική αποτελεί επιτακτική ανάγκη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 13: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

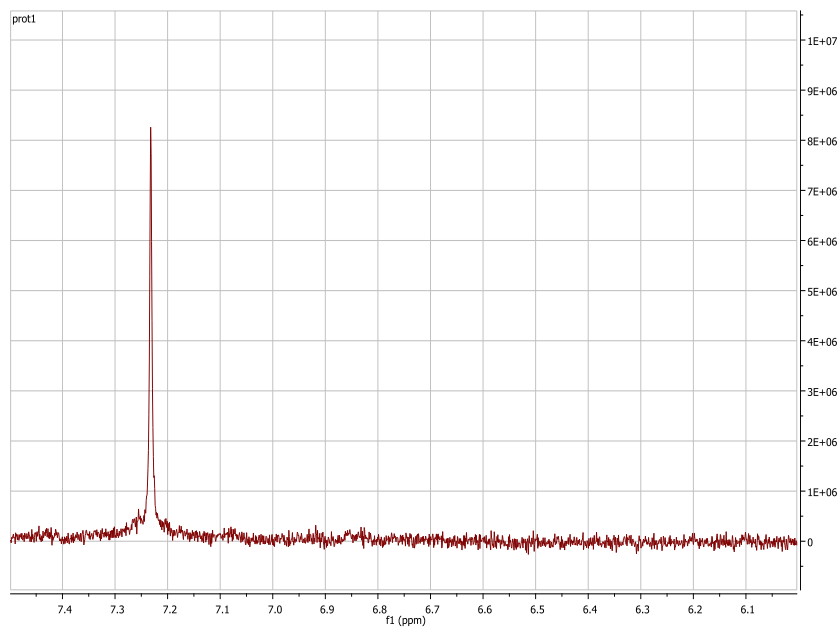
Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Piceid	Γλυκοζίτης ρεσβερατρόλης
French paradox	Γαλλικό παράδοξο
Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
Reactive Nitrogen Species	Δραστικές μορφές αζώτου
Placebo	Εικονικό φάρμακο
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
Chemical shift	Χημική μετατόπιση
Coupling constant	Σταθερά σύζευξης
Free Induction Decay	Ελεύθερη Επαγόμενη Απόσβεση

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

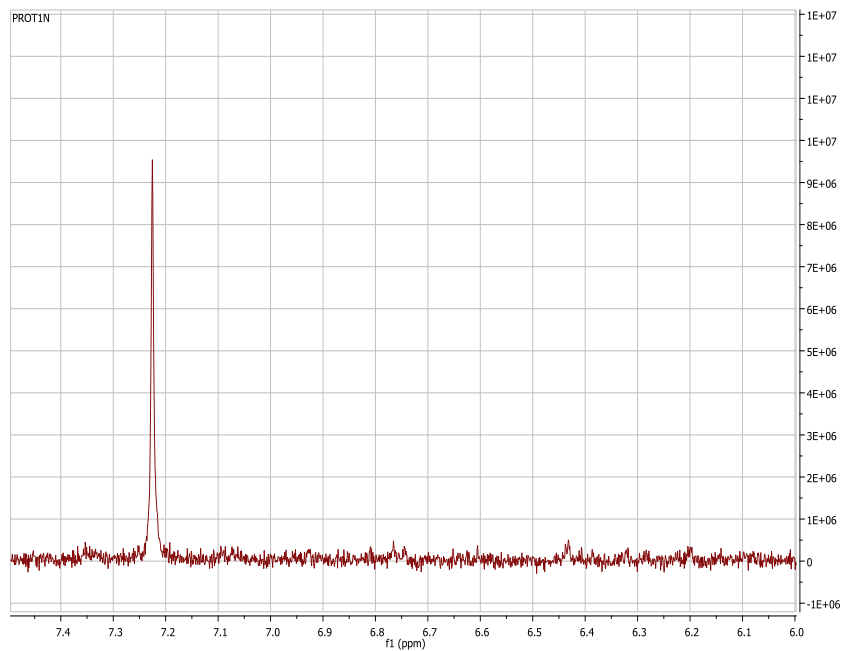
Πίνακας 14: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
FID	Free Induction Decay
COSY	Correlation Spectroscopy
ΠΓΕ	Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη
ΠΟΠ	Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης
Ε.Μ.Υ.	Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography

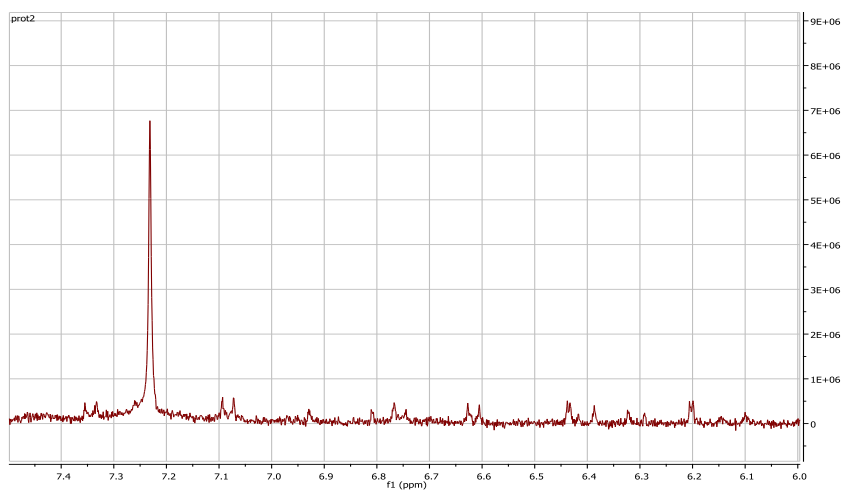
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



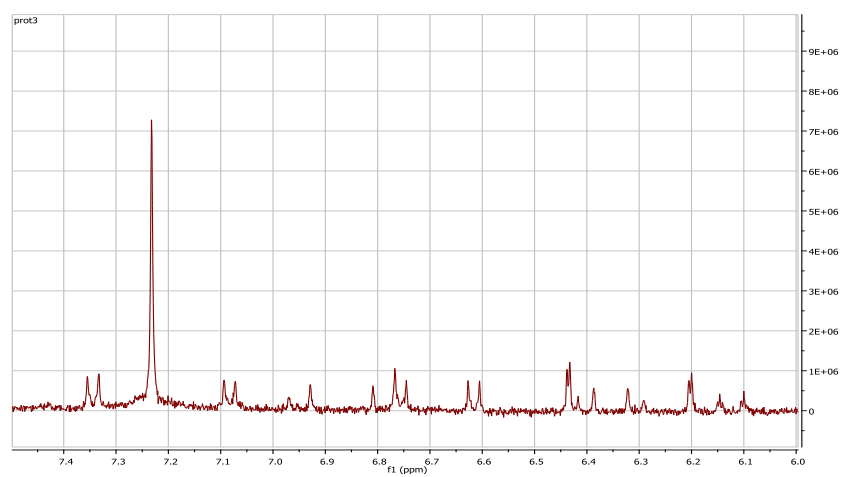
Σχήμα Π1. Φάσμα ^1H -NMR του PROT1 (MeOD, 400 MHz)



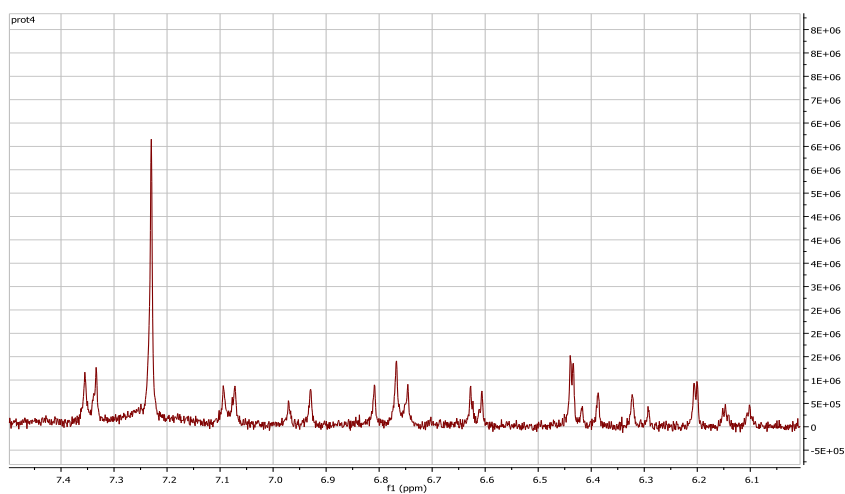
Σχήμα Π2. Φάσμα ^1H -NMR του PROT1N (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα Π3. Φάσμα ^1H -NMR του PROT2 (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα Π4. Φάσμα ^1H -NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz)



Σχήμα Π5. Φάσμα ^1H -NMR του PROT4 (MeOD, 400 MHz)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. J. Kuc, Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants, Annual Review of Phytopathology, vol. 33, 1995, pp. 275-297.
2. Phytoalexin, ScienceDirect, <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/phytoalexin>
3. J. Glazebrook and F.M. Ausubel, Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, no. 19, 1994, pp. 8955-8959.
4. F. Favaron, M. Lucchetta, S. Odorizzi, A.T. Pais da Cunha and L. Sella, The role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape PR proteins, Journal of Plant Pathology, vol. 91, no. 3, 2009, pp. 579-588.
5. A.M. Timperio, A. D'Alessandro, M. Fagioni, P. Magro and L. Zolla, Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions, Plant Physiology and Biochemistry, vol. 50, no.1, 2012, pp. 65-71.
6. Stilbenoid, ScienceDirect, <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/stilbenoid>
7. J. Barros, J.C. Serrani-Yarce, F. Chen, D. Baxter, B.J. Venables and R.A. Dixon, Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis, Nature Plants, vol. 2, no. 6, 2016, p. 16050.
8. K.B. Jorgensen, Photochemical Oxidative Cyclisation of Stilbenes and Stilbenoids - The Mallory-Reaction, Molecules, vol. 15, 2010, pp. 4334-4358.
9. A. Rahman, Bioactive Natural Products (Part D), Elsevier Science, Vol. 23, 2000.
10. Y. Oshima, Y. Ueno, H. Hikino, L.L. Yang and K.Y. Yen, Ampelopsins A, B and C, new oligostilbenes of *ampelopsis brevipedunculata* VAR. *Hancei*, Tetrahedron, Elsevier, vol. 46, no. 15, 1990, pp. 5121-5126.
11. G.J. Soleas, E.P. Diamandis and D.M. Goldberg, Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?, Clinical Biochemistry, vol. 30, no. 2, 1997, pp. 91-113.

12. B.B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R.S. Aggarwal, N.P. Seeram, S. Shishodia and Y. Takada, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research*, vol. 24, no. 5A, 2004, pp. 2783-2840.
13. M. Takaoka, Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*, *Journal of the Chemical Society of Japan*, vol. 60, no. 11, 1939, pp. 1090-1100.
14. Resveratrol, PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/resveratrol>
15. A.I. Romero-Perez, M. Ibern-Gomez, R.M. Lamuela-Raventos and M.C. de La Torre-Boronat, Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 4, 1999, pp. 1533-1536.
16. F. Mattivi, F. Reniero and S. Korhammer, Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, no. 7, 1995, pp. 1820-1823.
17. Piceid, PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piceid#section=Top>
18. H. Wang, L. Liu, Y.X. Guo, Y.S. Dong, D.J. Zhang and Z.L. Xiu, Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 75, no. 4, 2007, pp. 763-768.
19. Z. Chunzhi, L. Dai, Y. Hongshan, B. Zhang and J. Fengxie, Purification and characterization of piceid-b-D-glucosidase from *Aspergillus oryzae*, *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 1, 2007, pp. 83-88.
20. R.A. Rodríguez, I.R. Lahoz, O.N. Faza, M.M. Cid and C.S. Lopez, Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization, *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 10, 2012, p. 9175.
21. R.M. Lamuela-Raventos, A.I. Romero-Perez, A.L. Waterhouse and M.C. de la Torre-Boronat, Direct HPLC Analysis of cis- and trans-Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red *Vitis vinifera* Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, no. 2, 1995, pp. 281-283.
22. E. Bernard, P. Britz-McKibbin and N. Gernigon, Resveratrol Photoisomerization: An Integrative Guided-Inquiry Experiment, *Journal of Chemical Education*, vol. 84, no. 7, 2007, p. 1159.
23. M. Pantusa, R. Bartucci and B. Rizzuti, Stability of trans-Resveratrol Associated with Transport Proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 19, 2014, pp. 4384-4391.

24. J. Prokop, P. Abrman, A. L. Seligson and M. Sovak, Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols, *Journal of Medicinal Food*, vol. 9, no. 1, 2006, pp. 11-4.
25. S. E. Edwards, I.C. Rocha, E.M. Williamson and M. Heinrich, *Phytopharmacy: An Evidence-Based Guide to Herbal Medicinal Products*, Wiley-Blackwell, UK 2015.
26. N. Rupprich and H. Kindl, Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases, I Enzymatic synthesis of 3,5,4-trihydroxystilbene from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, vol. 359, no. 2, 1978, pp. 165-172.
27. J.M. Sales and A.V. Resurreccion, Resveratrol in peanuts, *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 54, no. 6, 2014, pp. 734-770.
28. Abiotic Stress, *Biology Online Dictionary*, last edited on 2007.
29. R.D. Vinebrooke, K.L. Cottingham, J. Norberg, M. Scheffer, S.I. Dodson, S.C. Maberly and U. Sommer, Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance, *Oikos*, vol. 104, no. 3, 2004, pp. 451-457.
30. J.P. Gao, D.Y. Chao and H.X. Lin, Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice, *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 49, no. 6, 2007, pp. 742-750.
31. J.P. Palta and K. Farag, Methods for enhancing plant health, protecting plants from biotic and abiotic stress related injuries and enhancing the recovery of plants injured as a result of such stresses, *United States Patent 7101828*, 2006.
32. R. Mittler, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends in Plant Science*, vol. 11, no. 1, 2006, pp. 15-19.
33. A. Shafique, S. Rehman, A. Khan and A.G. Kazi, Chapter 1: Improvement of Legume Crop Production Under Environmental Stresses Through Biotechnological Intervention of Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, *Academic Press*, vol. 2, 2014, pp. 1-22.
34. L.M. Carris, C. R. Little and C.M. Stiles, *Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor*, The American Phytopathological Society, 2012.
35. A.C. Hörger, H.N. Fones and G.M. Preston, The current status of the elemental defense hypothesis in relation to pathogens, *Frontiers in Plant Science*, vol. 4, 2013, p. 395.

36. R.K. Roberts and P.L. Grubb, The Consequences of Nursing Stress and Need for Integrated Solutions, *Rehabilitation Nursing*, vol. 39, no. 2, 2013.
37. R.H. Cichewicz and S. A. Kouzi, Biotransformation of resveratrol to piceid by *Bacillus cereus*, *Journal of Natural Products*, vol. 61, no. 10, 1998, pp. 1313-1314.
38. R.H. Cichewicz, S.A. Kouzi and M.T. Hamann, Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*, *Journal of Natural Products*, vol. 63, no. 1, 2000, pp. 29-33.
39. I.B. Rejeb, V. Pastor and B. Mauch-Mani, Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms, *Plants*, vol. 3, no. 4, 2014, pp. 458-475.
40. All foods in which the polyphenol Resveratrol is found, Phenol-Explorer 3.6 Database on polyphenol content in foods, <http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/592>
41. E.H. Siemann and L.L. Creasey, Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 43, no. 1, 1992, pp. 49-52.
42. A.I. Romero-Perez, M. Ibern-Gomez, R.M. Lamuela-Raventos and M.C. de La Torre-Boronat, Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 4, 1999, pp. 1533-1536.
43. D.M. Goldberg, A. Karumanchiri, E. Ng, J. Yan, P. Eleftherios and G. Soleas, Direct gas chromatographic-mass spectrometric method to assay cis-resveratrol in wines: preliminary survey of its concentration in commercial wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, no. 5, 1995, pp. 1245-1250.
44. R.F. Pastor, P. Restani, C. Di Lorenzo, F. Orgiu, P.L. Teissedre, C. Stockley, J.C. Ruf, C.I. Quini, N. Garcia Tejedor, R. Gargantini, C. Aruani, S. Prieto, M. Murgo, R. Videla, A. Penissi and R.H. Iermoli, Resveratrol, human health and winemaking perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 5, 2017, pp. 1-19.
45. R.F. Guerrero, M.C. García-Parrilla, B. Puertas and E. Cantos-Villar, Wine, resveratrol and health: a review, *Natural Product Communications*, vol. 4, no. 5, 2009, pp. 635-58.
46. T. Walle, Bioavailability of resveratrol, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1215, no. 1, 2011, pp. 9-15.
47. D.M. Goldberg, J. Yan and G.J. Soleas, Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects, *Clinical Biochemistry*, vol. 36, no. 1, 2003, pp. 79-87.

48. J. Tome-Carneiro, M. Larrosa, A. Gonzalez-Sarrias, F.A. Tomas-Barberan, M.T. Garcia-Conesa and J.C. Espin, Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence, *Current Pharmaceutical Design*, vol. 19, no. 34, 2013, pp. 6064-6093.
49. P. Vitaglione, S. Sforza, G. Galaverna, C. Ghidini, N. Caporaso, P.P. Vescovi, V. Fogliano and R. Marchelli, Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans, *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 49, no. 5, 2005, pp. 495-504.
50. M. Vaz-da-Silva, A.I. Loureiro, A. Falcao, T. Nunes, J.F. Rocha, C. Fernandes-Lopes, E. Soares, L. Wright, L. Almeida and P. Soares-da-Silva, Effect of food on the pharmacokinetic profile of trans-resveratrol, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 46, no. 11, 2008, pp. 564-570.
51. C. la Porte, N. Voduc, G. Zhang, I. Seguin, D. Tardiff, N. Singhal and D.W. Cameron, Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects, *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 49, no. 7, 2010, pp. 449-454.
52. B. Catalgol, S. Batirel, Y. Taga and N.K. Ozer, Resveratrol: French paradox revisited, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 3, 2012, p. 141.
53. W. Yu, Y.C. Fu and W. Wang, Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 113, no. 3, 2012, pp. 752-759.
54. J. Ferrières, The French paradox: lessons for other countries, *Heart*, vol. 90, no. 1, 2004, pp. 107-111.
55. R. Corder, W. Mullen, N.Q. Khan, S.C. Marks, E.G. Wood, M.J. Carrier and A. Crozier, Oenology: Red wine procyanidins and vascular health, *Nature*, vol. 444, no. 7119, 2006, p. 566.
56. J. Kanner, S. Gorelik, S. Roman and R. Kohen, Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low-density lipoprotein modification: The stomach as a bioreactor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 36, 2012, pp. 8790-8796.
57. J. Higdon, V.J. Drake, B. Delage and A. Crozier, Flavonoids, Linus Pauling Institute, Micronutrient Information Center, Oregon State University, reviewed in 2016, <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>

58. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, EFSA Journal, vol. 8, no. 2, 2010, p. 1489.
59. Potentially Universal Mechanism Of Aging Identified, Harvard Medical School, ScienceDaily, 2008, <https://www.sciencedaily.com/releases/2008/11/081126122203.htm>
60. D.M. Goldberg, J. Yan and G.J. Soleas, Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects, Clinical Biochemistry, vol. 36, no. 1, 2003, pp. 79-87.
61. B.L. Liu, X. Zhang, W. Zhang and H.N. Zhen, New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy, Cancer biology & therapy, vol. 6, no. 12, 2007, pp. 1833-1836.
62. L.K. Heilbronn and E. Ravussin, Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans, The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 78, no. 3, 2003, pp. 361-369.
63. V.L. Truong, M. Jun and W.S. Jeong, Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress, BioFactors, vol. 44, no. 1, 2018, pp. 36-49.
64. N.I. Chekalina, Resveratrol has a positive effect on parameters of central hemodynamics and myocardial ischemia in patients with stable coronary heart disease, Wiadomosci Lekarskie, vol. 70, no. 2 pt 2, 2017, pp. 286-291.
65. A. Riba, L. Deres, B. Sumegi, K. Toth, E. Szabados and Halmosi R, Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2017, 2017.
66. F. Yan, X. Sun and C. Xu, Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes / Experimental and Therapeutic Medicine, vol. 15, no. 2, 2018, pp. 1728-1734.
67. B.C.A.A. Marques, M. Trindade, J.C.F. Aquino, A.R. Cunha, R.O. Gismondi, M.F. Neves and W. Oigman, Beneficial effects of acute trans-resveratrol

supplementation in treated hypertensive patients with endothelial dysfunction, *Clinical and Experimental Hypertension*, vol. 12, 2018, pp. 1-6.

68. B. Poussier, A.C. Cordova, J.P. Becquemin and B.E. Sumpio, Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis, *Journal of Vascular Surgery*, vol. 42, no. 6, 2005, pp. 1190-1197.
69. J.K. Aluyen, Q.N. Ton, T. Tran, A.E. Yang, H.B. Gottlieb and R.A. Bellanger, Resveratrol: potential as anticancer agent, *Journal of Dietary Supplements*, vol. 9, no. 1, 2012, pp. 45-56.
70. J.H. Ko, G. Sethi, J.Y. Um, M.K. Shanmugam, F. Arfuso, A.P. Kumar, A. Bishayee and K.S. Ahn, The Role of Resveratrol in Cancer Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 12, 2017.
71. M. Yousef, I.A. Vlachogiannis and E. Tsiani, Effects of Resveratrol against Lung Cancer: In Vitro and In Vivo Studies, *Nutrients*, vol. 9, no. 11, 2017, p. 1231.
72. J.M. Pezzuto, Resveratrol as an Inhibitor of Carcinogenesis, *Pharmaceutical Biology*, vol. 46, no. 7-8, 2008, pp. 443-573.
73. M.A. Valentovic, Evaluation of Resveratrol in Cancer Patients and Experimental Models, *Advances in Cancer Research*, vol. 137, 2018, pp. 171-188.
74. M. Jasiński, L. Jasinska and M. Ogródowczyk, Resveratrol in prostate diseases - a short review, *Central European Journal of Urology*, vol. 66, no. 2, 2013, pp. 144-149.
75. L. Huminieck and J. Horbanczuk, The functional genomic studies of resveratrol in respect to its anti-cancer effects, *Biotechnology Advances*, 2018.
76. G. Chen, H. Xia, Z.G. Zhang and H.L. Yu, Resveratrol in management of bone and spinal cancers, *Natural Product Research*, 2017, pp. 1-11.
77. Y. Yang, X. Huang, S. Chen, G. Ma, M. Zhu, F. Yan and J. Yu, Resveratrol induced apoptosis in human gastric carcinoma SGC-7901 cells via activation of mitochondrial pathway, *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 2018.
78. J.A. Baur and D.A. Sinclair, Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence, *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, 2006, pp. 493-506.
79. Q. Jiang, M. Yang, Z. Qu, J. Zhou and Q. Zhang, Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, 2017, p. 477.

80. M. Cao, X. Lu, G.D. Liu, Y. Su, Y.B. Li and J. Zhou, Resveratrol attenuates type 2 diabetes mellitus by mediating mitochondrial biogenesis and lipid metabolism via Sirtuin type 1, *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 15, no. 1, 2018, pp. 576-584.
81. C.Y. Yonamine, E. Pinheiro-Machado, M.L. Michalani, A.B. Alves-Wagner, J.V. Esteves, H.S. Freitas and U.F. Machado, Resveratrol Improves Glycemic Control in Type 2 Diabetic Obese Mice by Regulating Glucose Transporter Expression in Skeletal Muscle and Liver, *Molecules*, vol. 22, no. 7, 2017.
82. A. Granzotto and P. Zatta, Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition, *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 6, 2014, p. 95.
83. V. López-Miranda, M.L. Soto-Montenegro, G. Vera, E. Herradón, M. Desco and R. Abalo, Resveratrol: a neuroprotective polyphenol in the Mediterranean diet, *Revista De Neurologia*, vol. 54, no. 6, 2012, pp. 349-56.
84. S. Mohan, T. Gobinath, A. Salomy, M. Nisha, M. Kandasamy, M.M. Essa, K.S. Jayachandran and M. Anusuyadevi, Biophysical interaction of resveratrol with sirtuin pathway: Significance in Alzheimer's disease, *Frontiers in Bioscience-Landmark Ed*, vol. 23, 2018, pp. 1380-1390.
85. S.S. Gocmez, N. Gacar, T. Utkan, G. Gacar, P.J. Scarpace and N. Tumer, Protective effects of resveratrol on aging-induced cognitive impairment in rats, *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 131, 2016, pp. 131-136.
86. Y. Feng, Y. Cui, J.L. Gao., R. Li, X.H. Jiang, Y.X. Tian, K.J. Wang, M.H. Li, H.A. Zhang and J.Z. Cui, Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in rats: Involvement of synaptic proteins and neuronal autophagy, *Molecular Medicine Reports*, vol. 13, no. 6, 2016, pp. 5248-5254.
87. A. Kumar, G. Negi and S.S. Sharma, Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: concepts & mechanisms, *Current Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 36, 2013, pp. 4640-4645.
88. Z. Tian, J. Wang, M. Xu, Y. Wang, M. Zhang and Y. Zhou, Resveratrol Improves Cognitive Impairment by Regulating Apoptosis and Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 40, no. 6, 2016, pp. 1670-1677.

89. H.M. Evans, P.R. Howe and R.H. Wong, Effects of Resveratrol on Cognitive Performance, Mood and Cerebrovascular Function in Post-Menopausal Women; A 14-Week Randomised Placebo-Controlled Intervention Trial, *Nutrients*, vol. 9, no. 1, 2017.
90. Y.R. Li, S. Li and C.C. Lin, Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity, *BioFactors*, vol. 44, no. 1, 2018, pp. 69-82.
91. D.K. Das, S. Mukherjee and D. Ray, Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity, *Heart Failure Reviews*, vol. 15, no. 5, 2010, pp. 467-477.
92. J. Li, C.X. Zhang, Y.M. Liu, K.L. Chen and G. Chen, A comparative study of anti-aging properties and mechanism: resveratrol and caloric restriction, *Oncotarget*, vol. 8, no. 39, 2017, pp. 65717-65729.
93. A.F. Hessin, R.R. Hegazy, A.A. Hassan, N.Z. Yassin and S.A. Kenawy, Resveratrol prevents liver fibrosis via two possible pathways: Modulation of alpha fetoprotein transcriptional levels and normalization of protein kinase C responses, *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 49, no. 4, 2017, pp. 282-289.
94. S. Senturk, M.E. Yaman, H.E. Aydin, G. Guney, I. Bozkurt, K. Paksoy and A.A. Abdioglu, Effects of Resveratrol on Inflammation and Apoptosis after Experimental Spinal Cord Injury, *Turkish Neurosurgery*, 2017.
95. X.D. Zhu, X.P. Lei and W.B. Dong, Resveratrol as a potential therapeutic drug for respiratory system diseases, *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 11, 2017, pp. 3591-3598.
96. Q. Fei, D. Kent, W.M. Botello-Smith, F. Nur, S. Nur, A. Alsamarah, P. Chatterjee, M. Lambros and Y. Luo, Molecular Mechanism of Resveratrol's Lipid Membrane Protection, *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, 2018, p. 1587.
97. F. Wang, J. Wang, J. An, G. Yuan, X. Hao and Y. Zhang, Resveratrol ameliorates depressive disorder through the NETRIN1-mediated extracellular signal-regulated kinase/cAMP signal transduction pathway, *Molecular Medicine Reports*, vol. 17, no. 3, 2018, pp. 4611-4618.
98. A. Rauf, M. Imran, H.A.R. Suleria, B. Ahmad, D.G. Peters and M.S. Mubarak, A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol, *Food & Function*, vol. 8, no. 12, 2017, pp. 4284-4305.

99. L. Fremont, Biological effects of resveratrol, *Life Sciences*, vol. 66, no. 8, 2000, pp. 663-673.
100. A.Y. Berman, R.A. Motechin, M.Y. Wiesenfeld and M.K. Holz, The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials, *NPJ Precision Oncology*, vol. 1, 2017, p. 35.
101. American Academy of Pediatrics, Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders, *Pediatrics*, vol. 106, no. 2, 2000, pp. 358-361.
102. D.J. Boocock, G.E. Faust, K.R. Patel, A.M. Schinas, V.A. Brown, M.P. Ducharme, T.D. Booth, J.A. Crowell, M. Perloff, A.J. Gescher, W.P. Steward and D.E. Brenner, Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 16, no. 6, 2007, pp. 1246-1252.
103. V.A. Brown, K.R. Patel, M. Viskaduraki, J.A. Crowell, M. Perloff, T.D. Booth, G. Vasilinin, A. Sen, A.M. Schinas, G. Piccirilli, K. Brown, W.P. Steward, A.J. Gescher and D.E. Brenner, Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis, *Cancer Research*, vol. 70, no. 22, 2010, pp. 9003-9011.
104. C. la Porte, N. Voduc, G. Zhang, I. Seguin, D. Tardiff, N. Singhal and D.W. Cameron, Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects, *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 49, no. 7, 2010, pp. 449-454.
105. C.R. Pace-Asciak, S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas and D.M. Goldberg, The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease, *Clinica Chimica Acta*, vol. 235, no. 2, 1995, pp. 207-219.
106. X.F. Koe, T.S. Tengku Muhammad, A.S. Chong, H.A. Wahab and M.L. Tan, Cytochrome P450 induction properties of food and herbal-derived compounds using a novel multiplex RT-qPCR in vitro assay, a drug-food interaction prediction tool, *Food Science & Nutrition*, vol. 2, no. 5, 2014, pp. 500-520.
107. B. Piver, F. Berthou, Y. Dreano and D. Lucas, Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components, *Toxicology Letters*, vol. 125, no. 1-3, 2001, pp. 83-91.

108. G. Regev-Shoshani, O. Shoseyov and Z. Kerem, Influence of lipophilicity on the interactions of hydroxy stilbenes with cytochrome P450 3A4, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 323, no. 2, 2004, pp. 668-673.
109. H.H. Chow, L.L. Garland, C.H. Hsu, D.R. Vining, W.M. Chew, J.A. Miller, M. Perloff, J.A. Crowell and D.S. Alberts, Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study, *Cancer Prevention Research*, vol. 3, no. 9, 2010, pp. 1168-1175.
110. P. Detampel, M. Beck, S. Krahenbuhl and J. Huwyler, Drug interaction potential of resveratrol, *Drug Metabolism Reviews*, vol. 44, no. 3, 2012, pp. 253-265.
111. S.S. Hendler and D.M. Rorvik, *PDR for Nutritional Supplements*, Thomson Reuters, 2nd edition, USA, 2008.
112. Z.M. Seward, Quest for youth drives craze for 'wine' pills, *The Wall Street Journal*, 2006.
113. Θ. Μαυρομούστακος και Ι. Ματσούκας, *NMR: Χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στο Σχεδιασμό και στη Σύνθεση Φαρμακευτικών Μορίων, στην Ιατρική, στη Χημεία Τροφίμων και Ποτών*, 1998.
114. N. Shah, A. Sattar, M. Benanti, S. Hollander and L. Cheuck, Magnetic resonance spectroscopy as an imaging tool for cancer: a review of the literature, *The Journal of the American Osteopathic Association*, vol. 106, no. 1, 2006, pp. 23-27.
115. D.L. Pavia, G.M. Lampman and G.S. Kriz Jr, *Introduction to Spectroscopy: A guide for students of Organic Chemistry*, Saunders College Publishing, USA, 1979.
116. Θ. Μαυρομούστακος και Ι. Ματσούκας, *NMR: Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων και Ποτών*, Εκδόσεις Γ. Β. Παρισιάνος, Αθήνα, 2006.
117. J.S. Rigden, Quantum states and precession: The two discoveries of NMR, *Reviews of Modern Physics*, vol. 58, no. 2, 1986, pp. 433-448.
118. R.M. Silverstein, G.C. Bassler and T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Ltd., 4th Edition, Canada, 1981.
119. A. Franklin and S. Perovic, Appendix 5: Right Experiment, Wrong Theory: The

Stern-Gerlach Experiment, Stanford Encyclopedia of Philosophy, 2015, <https://plato.stanford.edu/entries/physics-experiment/app5.html>

120. C.S. Johnson Jr., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, vol. 34, 1999, pp. 203-256.
121. A.E. Derome, Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Pergamon Press Ltd., 1987.
122. W. Paudler, Nuclear Magnetic Resonance, Allyn and Bacon Chemistry Series, 1974, pp. 9-11.
123. W.P. Aue, Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, The Journal of Chemical Physics, vol. 64, 1976, p. 2229.
124. J. Jeener, Jeener, Jean: Reminiscences about the Early Days of 2D NMR, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
125. G.E. Martin and A.S. Zekter, Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity, VCH Publishers, Inc., New York, 1988, p. 59.
126. T. Richard, H. Temsamani, E. Cantos-Villar and J.P. Monti, Application of LC-MS and LC-NMR Techniques for Secondary Metabolite Identification, Advances in Botanical Research, vol. 67, 2013, pp. 67-98.
127. Δήμος Ζακύνθου, <http://www.zakynthos.gov.gr/zakynthos-island/genika.html>
128. Ζακυθνικά κρασιά, EcoZante, <https://ecozante.com/gr/wine-in-zakynthos>
129. Νησιά του Ιονίου Πελάγους, Σύνδεσμος Ελληνικού Οίνου, <http://greekwinefederation.gr/gr/content/show/&tid=61>
130. K. Lazarakis, The Wines of Greece, Octopus Publishing Group Ltd., Great Britain, 2005.
131. Ποικιλία Ρομπόλα, Τέχνη και Οίνος, <http://www.artandwine.gr/gr-robola.php>
132. ΠΓΕ Ζάκυνθος, Επώνυμο Ελληνικό Κρασί, http://www.newwinesofgreece.com/lista_oionon_pge_perifereiakon_enotiton/en_pge_zakun8os.html
133. Μ.Ν. Σταυρακάκης, Αμπελογραφία, Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα, 2015.
134. Αυγουσιάτης - Κόκκινη Ποικιλία, Τέχνη και Οίνος, <http://www.artandwine.gr/gr-avgoustiatis.php>