

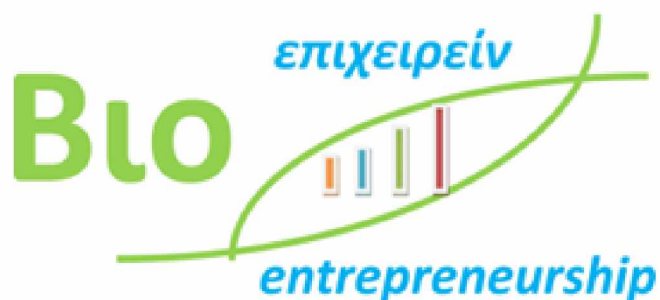


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΣΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΚΟΚΚΙΝΑ ΚΡΑΣΙΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ

---

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ  
ΚΑΡΑΓΙΟΒΑΝΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ  
Α.Μ. 00083 ΛΑΡΙΣΑ, 2021

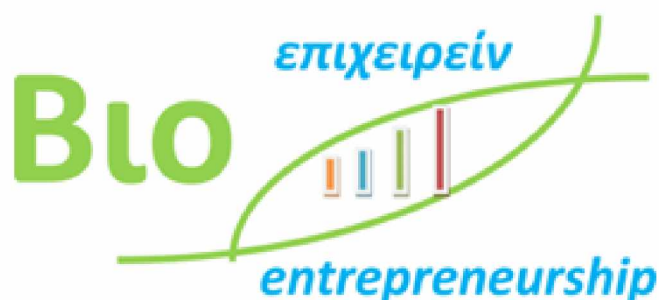


UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION  
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES  
IN  
BIOENTREPRENEURSHIP**



**MASTER THESIS**

---

**ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLIC  
POWDER FROM RED WINES OF DIFFERENT GRAPE VARIETIES**

---

**SUPERVISOR: ASSISTANT PROFESSOR, ANIMAL PHYSIOLOGY**

**STAGOS DIMITRIOS  
KARAGIOVANIDIS CHARALAMPOS  
A.M: 00083 LARISA, 2021**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

## **ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Εγκρίθηκε την ..... από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ</b>	<b>ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
(Επιβλέπων)	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ	
(Μέλος 1)	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ	
(Μέλος 2)	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ	

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο υπό την επίβλεψη του κ. Στάγκου Δημητρίου, Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου διατριβής.



## Περιεχόμενα

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>6</b>
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	6
1.1.2 Οξειδωτικό στρες.....	7
1.1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες- αντιοξειδωτική δράση.....	8
1.2 ΚΡΑΣΙ .....	9
1.2.1 Ιστορική αναδρομή .....	9
1.2.2 Χημική σύσταση .....	10
1.2.3 Οφέλη στην υγεία .....	11
1.3 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ .....	13
1.3.1 Πολυφαινόλες και Alzheimer .....	17
1.3.2 Πολυφαινόλες και Καρδιαγγειακά.....	20
1.3.3 Πολυφαινόλες και Καρκίνος .....	22
<b>2.ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>25</b>
2.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	25
2.2. Δείγματα κρασιών .....	25
2.3. Παρασκευή πολυφαινολικών σκονών .....	26
2.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ABTS .....	27
Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	29
2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU .....	30
2.6 Αποτελέσματα.....	32
2.6.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών σκονών κόκκινου κρασιού μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS+ .....	32
2.6.2 Προσδιορισμός ολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	62
<b>3.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>66</b>
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν πολυφαινολικές σκόνες από ελληνικά κόκκινα κρασιά και ενθυλακώθηκαν σε φυτική ίνα (ΦΙ) πορτοκαλιού με κρυοξήρανση (freeze-drying). Η ΦΙ πορτοκαλιού βρίσκονταν στις σκόνες σε ποσοστό 5% ή 10%. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 25 κόκκινα κρασιά ελληνικής παραγωγής. Ορισμένα κρασιά ήταν μονοποικιλιακά, ενώ άλλα προέρχονταν από συνδυασμούς ποικιλιών. Οι τύποι κρασιών που μελετήθηκαν ήταν τα μονοποικιλιακά Merlot, Cabernet, Syrah, Μοσχάτο, Λημνιώνα καθώς και οι συνδυασμοί ποικιλιών Merlot-Cabernet, Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο, Λημνιώνα-Merlot, Αγιωργίτικο-Λημνιώνα. Ορισμένα δείγματα κρασιών προέρχονταν από ίδιες ποικιλίες σταφυλιών αλλά διέφεραν ως προς τη χρονολογία ή την περιοχή παραγωγής τους. Οι σκόνες εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο ABTS και για το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι πολυφαινολικές σκόνες παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS. Οι τιμές IC<sub>50</sub> των δειγμάτων κυμαίνονταν από 0,04 (Merlot 2019 5% ΦΙ) μέχρι 0,45 mg/mL (Λημνιώνα 2018 2 5% ΦΙ). Οι τιμές ολικών πολυφαινολών κυμαίνονταν από 7,1 mg/g βάρους GAE (Λημνιώνα 2018 2 10% ΦΙ) έως 57,4 mg/g βάρους GAE (Syrah 2008 5% ΦΙ). Επίσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα σε κάποια δείγματα η ποιοτική σύσταση των πολυφαινολών τους ήταν πιο σημαντική για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, ενώ σε άλλα η συνολική ποσότητα των πολυφαινολών. Επιπλέον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρησιμοποίηση της ΦΙ πορτοκαλιού ως ενθυλακωτικού μέσου πολυφαινολών κρασιού φαίνεται να αποδίδει καλύτερα όσον αφορά τα βιοδραστικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης σκόνης σε περιεκτικότητα 5% σε σύγκριση με τη 10%. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου γίνεται ενθυλάκωση πολυφαινολών κρασιού σε ΦΙ πορτοκαλιού. Γενικότερα, αποτελεί μία από τις ελάχιστες μελέτες ενθυλάκωσης πολυφαινολών από κρασί, έτσι ώστε να δημιουργηθούν βιοδραστικές σκόνες οι οποίες θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής, ως φυσικά αντιοξειδωτικά τροφίμων, για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων και καλλυντικών. Επίσης, η προτεινόμενη αξιοποίηση των πολυφαινολών κρασιού μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας των οινοποιείων για αδιάθετες ποσότητες κρασιού ή για κρασιά χαμηλής ποιότητας με χαμηλή τιμή πώλησης. Η ΦΙ πορτοκαλιού αποδείχτηκε ένα κατάλληλο ενθυλακωτικό μέσο για πολυφαινόλες κρασιού, όπου οδήγησε στη δημιουργία σκονών ελευθέρως ροής, με υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έπιπλέον, η χρησιμοποίηση της ΦΙ από φλούδα πορτοκαλιού ως ενθυλακωτικού μέσου έχει το όφελος ότι αξιοποιεί ένα απόβλητο για τη δημιουργία ενός προϊόντος με υψηλή προστιθέμενη αξία.

## ABSTRACT

In the present study, polyphenolic powders from Greek red wines were isolated and encapsulated in orange fiber powder (FI) by freeze-drying. Orange FI was present in powders at a percentage of 5% or 10%. 25 red wines of Greek production were used in the study. Some wines were single-variety, while others came from combinations of varieties. The types of wines studied were the single varieties Merlot, Cabernet, Syrah, Moschato, Limniona as well as the combinations of varieties Merlot-Cabernet, Cabernet-Merlot-Agiorgitiko, Limniona-Merlot and Agiorgitiko-Limniona. Some wine samples came from the same grape varieties but differed in date or region of production. The powders were tested for their antioxidant activity by the ABTS method and for their polyphenolic content by the Folin-Ciocalteu method. The results showed that all polyphenolic powders had the ability to neutralize the ABTS radical. The IC<sub>50</sub> values of the samples ranged from 0.04 (Merlot 2019 5% FI) to 0.45 mg / mL (Limniona 2018 2 5% FI). The values of total polyphenols ranged from 7.1 mg / g weight GAE (Limniona 2018 2 10% FI) to 57.4 mg / g weight GAE (Syrah 2008 5% FI). Also, according to the results in some samples the quality of their polyphenols was more important for their antioxidant capacity, while in others the total amount of polyphenols. In addition, the results showed that the use of orange FI as a wall material for the encapsulation of wine polyphenols seems to perform better in terms of the bioactive characteristics of the powder produced at a content of 5% compared to 10%. In conclusion, the present study is the first to encapsulate wine polyphenols in orange FI. In general, it is one of the few studies on the encapsulation of polyphenols in wine, so as to create bioactive powders that can be used as dietary supplements, as natural food antioxidants, to create biofunctional foods and cosmetics. Also, the proposed use of wine polyphenols can be an alternative high added value product of wineries for unavailable quantities of wine or for low quality wines with low selling price. Orange FI proved to be a suitable wall material for the encapsulation of wine polyphenols, since it led to the creation of free flow powders with high polyphenolic content and strong antioxidant activity. In addition, the use of orange peel FI for the encapsulation has the benefit of using a waste to make a product with high added value.

## **ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:**

**ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ, ΚΡΑΣΙ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ, ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ, ΦΥΤΙΚΗ ΙΝΑ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ**

## **ΣΚΟΠΟΣ**

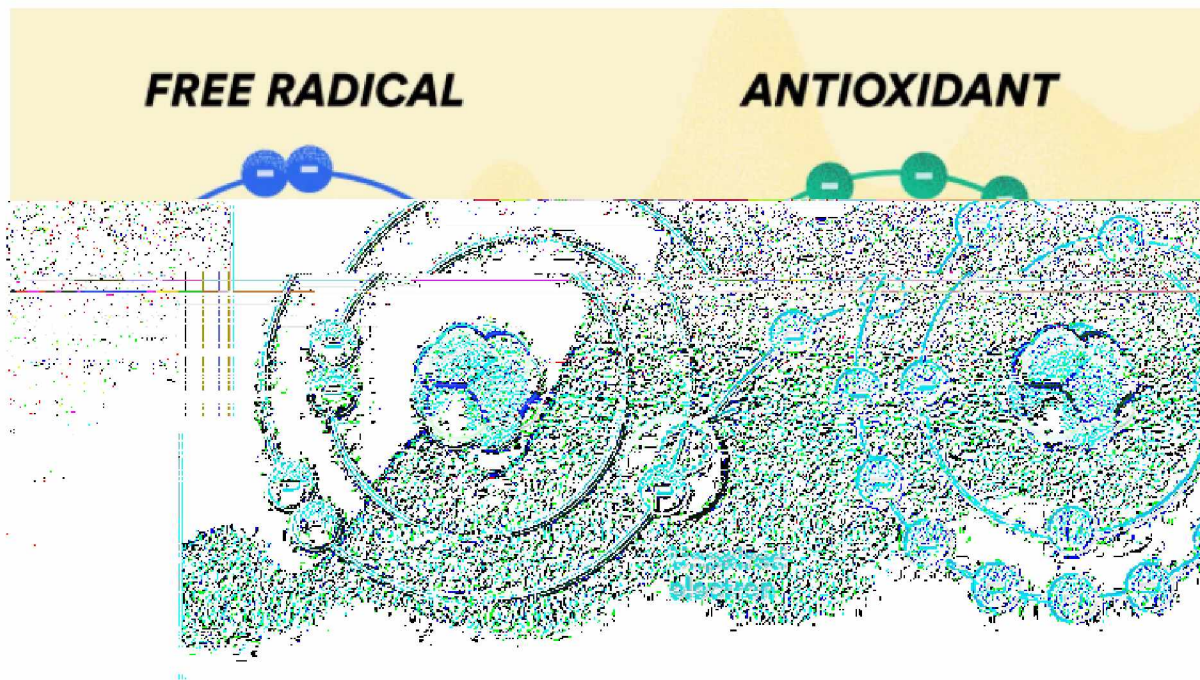
Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παραγωγή πολυφαινολικών σκονών από κόκκινα κρασιά και η ενθυλάκωσή τους σε φυτική ίνα από φλούδα πορτοκαλιού, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα, για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων και καλλυντικών. Οι πολυφαινολικές σκόνες παρήχθησαν από κρασιά των ποικιλιών αμπέλου Merlot, Syrah, Cabernet, Λημνιώνα, Μοσχάτο καθώς και από τα πολυποικιλιακά κρασιά Αγιωργίτικο-Λημνιώνα, Merlot-Cabernet, Λημνιώνα-Merlot, Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο. Όλα τα δείγματα κρασιού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από περιοχές των Νομών Πέλλας και Λάρισας. Η παραγωγή των πολυφαινολικών σκονών έγινε με κρυοξήρανση (freeze-drying) των κρασιών όπου χρησιμοποιήθηκε φυτική ίνα από φλούδα πορτοκαλιού σε ποσοστό 5% και 10%. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε στις σκόνες το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και η αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο ABTS<sup>+</sup>.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες ορίζονται ως μόρια ή άτομα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα, τα οποία έχουν δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (Halliwell, 1990). Χαρακτηριστικό των ελευθέρων ριζών είναι η υψηλή αστάθεια τους, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μεγάλη τους δραστικότητα, και συνήθως προσβάλουν βιολογικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια με συνέπεια να διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. (Παπαγαλάνης, 2014). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Αν όμως, μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου, δηλαδή ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species, ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου, δηλαδή ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το άζωτο (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Halliwell, 1990).

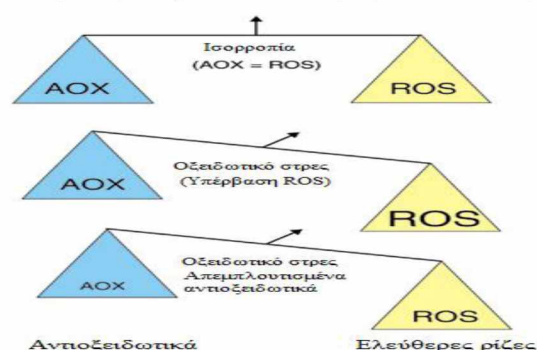
Σημειώνεται ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι ένα φυσικό υποπροϊόν και δεν μπορούν να εξαλειφθούν πλήρως. Ακόμη, μπορούν να σχηματιστούν είτε φυσικά στο σώμα μέσω κανονικών μεταβολικών διεργασιών είτε από εξωτερικούς παράγοντες όπως ακτίνες Χ, κάπνισμα τσιγάρων, ατμοσφαιρικούς ρύπους και βιομηχανικές χημικές ουσίες. Όταν συσσωρεύονται ελεύθερες ρίζες, μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Ενώ η οξειδωση είναι μια φυσιολογική και ουσιαστική διαδικασία, το υπερβολικό οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι επιβλαβές (**Εικόνα 1**) (Walton et al, 2015).



Εικόνα 1: Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά (Walton et al, 2015).

### 1.1.2 Οξειδωτικό στρες

Σε έναν υγιή οργανισμό θα πρέπει να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Η κατάσταση κατά την οποία οι οξειδωτικοί παράγοντες υπερτερούν των αντιοξειδωτικών ονομάζεται οξειδωτικό στρες και μπορεί να προκαλέσει βλάβη (Εικόνα 2). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί με τρεις τρόπους, είτε λόγω μειωμένης δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, είτε λόγω αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών, είτε λόγω παρουσίας τοξικών ουσιών που μεταβολίζονται και παράγουν ελεύθερες ρίζες (Lobo et al., 2010).



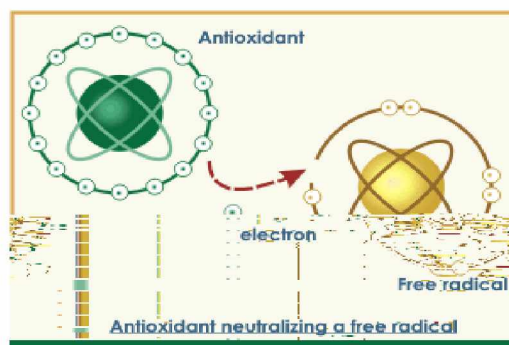
Εικόνα 2: Οξειδωτικό στρες (Lobo et al., 2010).

Μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις με συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού

υποστρώματος. Έτσι, σύμφωνα με μελέτες ο κατάλογος των ασθενειών με των οποίο σχετίζονται οι ελεύθερες ρίζες, άλλες σε μικρότερο και άλλες σε μεγαλύτερο βαθμό είναι ήδη μεγάλος και ολοένα και μεγαλώνει. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι κ.α (Willett 2002).

### 1.1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες- αντιοξειδωτική δράση

Σύμφωνα με τους Halliwell & Gutteridge (1989) ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε συστατικό το οποίο όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με εκείνη ενός προς οξείδωση υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος. Σκοπός των αντιοξειδωτικών είναι να περιορίσουν τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών και να εμποδίσουν την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από αυτές (Εικόνα 3). Πιο συγκεκριμένα η δράση των αντιοξειδωτικών στηρίζεται είτε στην προσφορά του ηλεκτρονίου ή του υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες έτσι ώστε να εμποδίσουν την δράση τους, είτε στην ενεργοποίηση των ενδογενών αμυντικών συστημάτων (Halliwell , 1990).



Εικόνα 3 Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών (Willett 2002).

Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- Ενζυμικοί
- Μη Ενζυμικοί

Στους ενζυμικούς ανήκουν ένζυμα τα οποία δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες από τις δραστικές μορφές του οξυγόνου και τις μετατρέπουν σε μη δραστικά μόρια ή μειώνουν την παραγωγή τους. Στους μη ενζυμικούς παράγοντες περιλαμβάνονται μικρομόρια που παράγονται από τον οργανισμό ή συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες, το ουρικό οξύ και το συνένζυμο Q<sub>10</sub> (Willett 2002).



## 1.2 Κρασί

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Για να βρει κανείς την πρώτες καταγεγραμμένες αναφορές σχετικά με την ιστορία του κρασιού θα πρέπει να γυρίσει περίπου 7000 χρόνια πίσω και πιο συγκεκριμένα περί το 5400-5000 π.Χ. Η αναγνώριση του προέκυψε από την παρουσία του άλατος ασβεστίου του τρυγικού οξέος, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα μόνο στα σταφύλια και στη ρητίνη του δέντρου *terebinth* το οποίο κατά την αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν ευρέως στο κρασί ως πρόσθετο για την αναστολή της δράσης των βακτηρίων. Ταυτόχρονα, έχουν βρεθεί αρχαίοι σπόροι οι οποίοι χρονολογούνται το 8000 π.Χ και αποτελούν την πρώτη επιστημονική καταγραφή του κρασιού ως μέρος την ανθρώπινης κουλτούρας. Επίσης, πιστεύεται πως η ανακάλυψη της οινοποίησης, ή έστω η αρχή της εξέλιξης της, έλαβε χώρα στο Νότιο Καύκασο και στη συνέχεια ταξίδεψε στη Παλαιστίνη, τη Συρία, την Αίγυπτο και την Μεσοποταμία. Το κρασί, ωστόσο, εκείνη την περίοδο φαίνεται να χρησιμοποιούνταν για μυστηριακούς σκοπούς και όχι προς κατανάλωση. Για να φτάσουμε στην σύγχρονη εποχή και σε αυτό που εμείς σήμερα εννοούμε κρασί θα πρέπει να ταξιδέψουμε μέχρι το δέκατο-έβδομο αιώνα όπου αρχίζει η παραγωγή κρασιού σε βαρέλια με την χρήση θείου για καλύτερη ποιότητα αλλά και μεγαλύτερο χρόνο ζωής (Soleas et al, 1997).

Όσον αφορά την Αμερική η παραγωγή κρασιού χρονολογείται 200 χρόνια πριν, ενώ τον δέκατο-ένατο αιώνα και όταν το φυτό *Phylloxera vitifoliae* μεταφέρεται από την Αμερική στην Ευρώπη απειλείται με ολική καταστροφή η παραγωγή κρασιού καθώς περίπου ένα εκατομμύριο εκτάρια καταστρέφονται. Τελικά η κατάσταση αναστρέφεται με την αναφύτευση δέντρων ανθεκτικών στην *Phylloxera vitifoliae* τα οποία έρχονται από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και εμβολιάζουν τα ήδη υπάρχοντα αμπέλια (Soleas et al, 1997).

## 1.2.2 Χημική σύσταση

Οι γνώσεις για τη χημική σύνθεση των σταφυλιών και του κρασιού έχει εξελιχθεί πολύ τα τελευταία 30-40 χρόνια. Παρόλο που έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος, πολλά ακόμη παραμένουν μυστήριο. Είναι γεγονός ότι αυξήθηκε δραματικά ο αριθμός των ενώσεων που προσδιορίζονται στο κρασί με την ανάπτυξη της χρωματογραφίας αερίου (GC), την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), τη χρωματογραφία (TLC), τη χρωματογραφία αντίθετου ρεύματος σταγονιδίων (DCCC), την υπέρυθη φασματοσκοπία (IRS) και τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR). Η διεπαφή της φασματομετρίας μάζας (MS) ως GC και HPLC υπήρξε ιδιαίτερα πολύτιμη για τον προσδιορισμό άγνωστων ενώσεων (Brun et al, 1986).

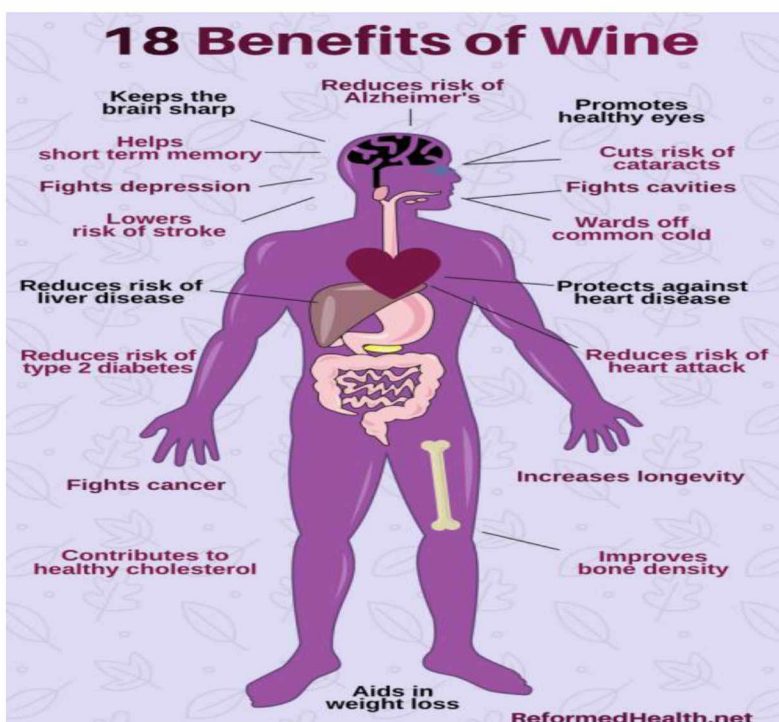
Ακόμη, περισσότερες από 500 ενώσεις έχουν αναγνωρισθεί στο κρασί μέχρι στιγμής, εκ των οποίων 160 είναι εστέρες. Η πλειοψηφία τους κυμαίνεται μεταξύ συγκεντρώσεων  $10^{-1}$  και  $10^{-6}$  mg/L. Σε αυτά τα επίπεδα, οι μεμονωμένες ενώσεις παίζουν πολύ λίγο ή καθόλου ρόλο στην ανθρώπινη οργανοληπτική αντίληψη (γεύση), αλλά συλλογικά μπορεί να είναι πολύ σημαντική.

Τα κρασιά περιέχουν γενικά 0,8–1,2 g αρωματικών ενώσεων ανά λίτρο, εκ των οποίων το μεγαλύτερο κοινό είναι οι αλκοόλες fusel, τα πτητικά οξέα και οι εστέρες λιπαρών οξέων. Οι αλκοόλες Fusel αποτελούν συχνά το 50% όλων των πτητικών ουσιών σε μεμονωμένα κρασιά. Καρβονύλια, φαινόλες, λακτόνες, τερπένια, ακετάλες, υδρογονάνθρακες, θειούχες και αζωτούχες ενώσεις, αν και υπάρχουν σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, είναι σημαντικότερες ποιοτικά και συμβάλλουν σε συγκεκριμένες αισθήσεις που σχετίζονται με το άρωμα ενός κρασιού (Soleas et al, 1997).

Η αίσθηση γεύσης και αίσθησης στο στόμα οφείλεται κυρίως σε λίγες ενώσεις που εμφανίζονται ξεχωριστά σε συγκεντρώσεις > 100 mg / L. Αυτά περιλαμβάνουν νερό, αιθανόλη, οργανικά οξέα, σάκχαρα, και γλυκερόλη. Οι τανίνες εμφανίζονται στο κόκκινο κρασί και σπάνια σε σημαντικές ποσότητες σε λευκά κρασιά (Soleas et al, 1997).

### 1.2.3 Οφέλη στην υγεία

Επιδημιολογικά στοιχεία από πολλές μελέτες, που περιλαμβάνουν εκατοντάδες χιλιάδες ανθρώπους και των δύο φύλων, υποστηρίζουν την άποψη ότι η μικρή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με τη μείωση της συνολικής θνησιμότητας, κυρίως λόγω μειωμένου κινδύνου καρδιαγγειακής ασθένειας (CHD) (Εικόνα 4). Έχουν προταθεί αρκετοί λόγοι για αυτή τη καρδιοπροστατευτική επίδραση του αλκοόλ. Περίπου το ήμισυ της μείωσης στη CHD θνησιμότητα μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά του να αυξάνει τη συγκέντρωση της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL). Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο είναι η ικανότητα του αλκοόλ να αναστέλλει ή να μειώνει τα αιμοπετάλια για την πήξη του αίματος (Renaud et al, 1992).



Εικόνα 4: Οφέλη του κρασιού στην υγεία (Reformedhealth.net, 2017).

Οι ερευνητές έχουν δείξει, τόσο in vitro όσο και in vivo, ότι η μειωμένη πήξη αιμοπεταλίων, και άρα η μειωμένη συγκέντρωση παραγόντων πήξης και ο αλλοιωμένος μεταβολισμός του εικοσανοειδούς οδηγεί σε μείωση της σύνθεσης θρομβοξάνης σε συνδυασμό με αυξημένη σύνθεση αγγειοδιασταλτικής προστακυκλίνης. Άλλοι μηχανισμοί μπορεί να μειώσουν την πιθανότητα αθηροσκλήρωσης, όπως η αναστολή της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), η εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών και η ρύθμιση του μεταβολισμού των εικοσανοειδών. Η αιθανόλη, η οποία αποτελεί το δεύτερο σε ποσότητα συστατικό του κρασιού, δεν λειτουργεί μέσω αυτών των υποτιθέμενων μηχανισμών. Ωστόσο, τα κρασιά περιλαμβάνουν πολυφαινόλες και ειδικά φλαβονοειδή (Veenstra, 1990).

Το 1979, οι St. Leger et al, 1979 περιέγραψαν μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ θνησιμότητας CHD και κατανάλωσης κρασιού σε 18 Δυτικές χώρες. Άλλες εκθέσεις βασισμένες στην ανάλυση των παγκόσμιων δεδομένων επιβεβαίωσαν αυτήν την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των δύο παραγόντων. Τα αποδεικτικά στοιχεία προήλθαν από την παρατήρηση ότι η συχνότητα θνησιμότητας CHD στη Γαλλία είναι η χαμηλότερη μεταξύ των βιομηχανικών χωρών, παρά την υψηλή συχνότητα παραγόντων κινδύνου όπως το κάπνισμα, η δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και η έλλειψη άσκησης που αποδίδεται γενικά στους πολίτες της. Αυτό το φαινόμενο πιστεύεται ότι οφείλεται στην κατανάλωση κρασιού από κοινού με τη μεσογειακή διατροφή πλούσια σε λαχανικά. Μερικοί συγγραφείς που μελέτησαν αυτήν τη σχέση σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό έδειξαν ότι το κρασί μπορεί να είναι πιο ισχυρό από άλλα αλκοολούχα ποτά στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της CHD (Leger et al, 1979).

Ακόμη, οι εγγενείς αντιβακτηριακές ιδιότητες του κρασιού έχουν πρόσφατα αποδειχθεί από τους Weisse et al, 1995. Τα τελευταία χρόνια, το κρασί χρησιμοποιήθηκε παγκοσμίως ως βάση για φαρμακευτικά παρασκευάσματα σε συνδυασμό με διάφορα βότανα (Weisse et al, 1995).

Μία από τις πιο σημαντικές ενδείξεις της ανωτερότητας του κόκκινου κρασιού σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά για την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης παρέχεται από τους Klurfeld και Kritchevsky. Σε κουνέλια δόθηκε δίαιτα υψηλής χοληστερόλης μαζί με νερό (έλεγχος) ή ένα από τα πέντε διαφορετικά ποτά που περιέχουν ίσες ποσότητες αιθανόλης. Μετά από 3 μήνες, όλα τα κουνέλια που έπιναν μπύρα είχαν αναπτύξει αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις στις στεφανιαίες αρτηρίες. Όλα τα αλκοολούχα ποτά, εκτός από την μπύρα, μείωσαν την επίπτωση των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων, αλλά το κόκκινο κρασί έδειξε το πιο δραματικό αποτέλεσμα, μειώνοντας τη συχνότητα στο 40% (Klurfeld et al, 1981).

Ακόμη, υπήρξε σημαντική μείωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης σε αρουραίους που τρέφονται με δίαιτα υψηλής χοληστερόλης, χορηγώντας ταυτόχρονα πολυφαινόλες που περιέχονται στο κόκκινο κρασί και εκχυλίζοντας πολυμερείς τανίνες από σπόρους σταφυλιών. Ταυτόχρονα, οι τανίνες σπόρων σταφυλιών προστάτευαν επίσης τους αρουραίους από την επανεμφάνιση συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων μετά από οξεία μείζονα κατάποση αλκοόλ (Weisse et al, 1995).

Σημειώνεται ότι το κόκκινο κρασί και ο χυμός σταφυλιού, αλλά όχι το λευκό κρασί, κατήργησαν τις κυκλικές μειώσεις ροής αίματος που προκλήθηκαν με περιοδικό σχηματισμό θρόμβου λόγω οξείας αύξησης των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, χρειάστηκε τρεις φορές περισσότερος χυμός

σταφυλιών κατ' όγκο για την επίτευξη των ίδιων προληπτικών αποτελεσμάτων (Weisse et al, 1995).

Επίσης, μετά από μία μελέτη σε 20 υγιείς άνδρες, 10 εκ των οποίων κατανάλωναν 400 mL λευκού και τα υπόλοιπα 400 mL ερυθρού κρασιού την ημέρα για 2 εβδομάδες, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πρόσληψη κόκκινου κρασιού αύξησε σημαντικά τη HDL πλάσματος και την apo A-I στο πλάσμα έως 26% και 12%, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν μετά την πρόσληψη λευκού κρασιού (Soleas et al, 1997).

Σε μία άλλη κλινική έρευνα, μελετήθηκαν 17 υγιείς άνδρες που χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: 8 έλαβαν 400 mL κόκκινο κρασί / ημέρα για 2 εβδομάδες και 9 έλαβαν την ίδια ποσότητα λευκού κρασιού. Η κατανάλωση κόκκινου κρασιού για 2 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 20% της τάσης του πλάσματος να υποστεί υπεροξειδωση λιπιδίων παρουσία ελευθέρων ριζών. Παράλληλα, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων LDL μετά από απόκριση σε ιόντα χαλκού κατά 46%, 72% και 54% όπως προσδιορίστηκε με μείωση της περιεκτικότητας σε TBARS, υπεροξειδία λιπιδίων, και συζευγμένα διένια, αντίστοιχα. Αντίθετα, η διαιτητική κατανάλωση λευκού κρασιού για 2 εβδομάδες οδήγησε σε αύξηση της τάσης του πλάσματος για υπεροξειδωση των λιπιδίων (Soleas et al, 1997).

### 1.3 Πολυφαινόλες

Η σωστή διατροφή είναι απαραίτητη για την προώθηση και τη διατήρηση της καλής υγείας καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, ενώ επίσης είναι γνωστό ότι είναι ζωτικής σημασίας ως παράγοντας πρόληψης για χρόνιες ασθένειες. Η κατανάλωση τροφίμων που προέρχονται από φυτικά προϊόντα όπως κρασί, φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί, δημητριακά, όσπρια, μπαχαρικά συνδέονται με ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία και προστατευτικό ρόλο κατά της ανάπτυξης και εξέλιξης ασθενειών, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) (Visioli et al, 2020).

Η ικανότητα ορισμένων φυτικών τροφών να μειώσουν τον κίνδυνο ασθένειας έχει συσχετιστεί με την παρουσία δευτερευόντων μεταβολιτών (φυτοχημικών ουσιών) στους οποίους αποδίδεται μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων. Αυτοί οι μεταβολίτες έχουν μέτρια ισχύ ως βιοδραστικές ενώσεις και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με τα φάρμακα, αλλά όταν καταναλώνονται τακτικά και σε σημαντικές ποσότητες μπορεί να έχουν αισθητές μεσοπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες φυσιολογικές επιπτώσεις. Τα φυτοχημικά συστατικά που περιέχονται σε τρόφιμα και σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία περιλαμβάνουν γλυκοσινολιικά, τερπενοειδή και μια μεγάλη ομάδα φαινολικών ενώσεων (ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβον-3-όλη, στυλβένια κ.λπ.) οι οποίες είναι συνολικά γνωστές ως πολυφαινόλες (Visioli et al, 2020).

Το σταφύλι είναι ένα φυτό πλούσιο σε πολυφαινόλες, και οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται κυρίως στη φλούδα, το στέλεχος, τα φύλλα και τους σπόρους του σταφυλιού, παρά στα χυμώδη μεσαία τμήματα (**Εικόνα 5**). Η συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών στη φλούδα των σταφυλιών ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, τη σύνθεση του εδάφους, το κλίμα, τη γεωγραφική προέλευση και τις πρακτικές καλλιέργειας ή την έκθεση σε ασθένειες, όπως οι μυκητιασικές λοιμώξεις. Στο κόκκινο κρασί, οι ανθοκυανίνες και τα флаβονοειδή είναι οι δύο κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων, ενώ η κατεχίνη είναι ένα άφθονο флаβονοειδές. Οι ανθοκυανίνες είναι οι κύριες πολυφαινόλες στα κόκκινα σταφύλια, ενώ οι флаβανόλες είναι πιο άφθονες σε λευκές ποικιλίες. Η ρεσβερατρόλη είναι η πιο γνωστή πολυφαινολική ένωση που εμφανίζεται στα σταφύλια και το κρασί. Τα επίπεδα ρεσβερατρόλης που βρίσκονται στο κρασί ποικίλλουν πολύ, αλλά γενικά είναι περισσότερο άφθονη στα κόκκινα σταφύλια και στο κόκκινο κρασί (Rodrigo et al., 2011).

Compound	Source					
	Seed	Skin	Leaf	Stem	Raisin	Red wine
Resveratrol		x		x		x
(+)-catechin	x					x
(-)-epicatechin	x					
Quercetin		x	x	x	x	x
Myricetin		x	x			
Malvidin						x
Kaempferol		x	x			
Gallie acid	x		x			
Procyanidin	x					x
Proanthocyanidins	x	x				
Rutin				x		
Others		x	x	x	x	x
References	[29-32]	[29,30]	[29]	[33]	[34]	[35-37]

**Εικόνα 5:** Κύριες πολυφαινόλες κρασιού (Rodrigo et al, 2011).

Όσον αφορά τη χημική του σύσταση, και το κρασί περιέχει πολλές φαινολικές ουσίες. Οι φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια και το κρασί ομαδοποιούνται στις ακόλουθες μεγάλες τάξεις: στιλβένια, флаβανόλες, флаβονόλες, ανθοκυανίνες, υδροξυβενζοϊκά οξέα, προκυανιδίνες και υδροξυκινναμικές οξέα (**Εικόνα 6**).



Wine polyphenolics chemical classification in decreasing content order.

Category	Compound
Flavonols	quercetin
	myricetin
	kaempferol
Anthocyanins	isorhamnetin
	cyanidin
	malvidin
	petunidin
	delphinidin
	peonidin
Hydroxycinnamic acids	pelargonidin
	caffeic
	ferulic
	p-coumaric
Hydroxybenzoic acids	chlorogenic
	gallic
	ellagic
	protocatechic
	vanillic
	syringic
	3,4-dihydroxybenzoic
Flavanols	p-hydroxybenzoic
	(+)-catechin
	(-)-epicatechin
Stilbenes	resveratrol
	piceid
Procyanidins	procyanidins A2, B1, B2, B3, B4

**Εικόνα 6:** Χημική ταξινόμηση πολυφαινολικών κρασιών με φθίνουσα σειρά περιεχομένου (Rodrigo et al, 2011).

Σημειώνεται ότι το κρασί είναι ένα αλκοολούχο ποτό που περιέχει μεγάλη ποσότητα διαφορετικών πολυφαινολών που εξάγονται από σταφύλια κατά τις διαδικασίες της οινοποίησης. Αυτά τα μόρια είναι υπεύθυνα για το χρώμα, την οξύτητα, τη γεύση και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κρασιού. Το κόκκινο κρασί έχει το πιο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα λόγω του υψηλού πολυφαινολικού του περιεχομένου, ενώ οι προκυανιδίνες είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες. Ωστόσο, η φαινολική σύνθεση του κρασιού δεν εξαρτάται μόνο από την ποικιλία των σταφυλιών από την οποία παρασκευάζεται, αλλά και από ορισμένες εξωτερικούς παράγοντες όπως το κλίμα και η οινοποίηση. Ακόμη, οι σπόροι του σταφυλιού περιέχουν κυρίως φαινόλες όπως προανθοκυανιδίνες. Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δύναμη των προανθοκυανιδινών είναι 20 φορές μεγαλύτερη από τη βιταμίνη E και 50 φορές μεγαλύτερη από τη βιταμίνη C (Shi et al, 2003).

Αρκετές μελέτες έδειξαν ταχεία απορρόφηση πολυφαινολών, όπως οι προκυανιδίνες, η κερκετίνη και οι φλαβανόλες στο πλάσμα, με μέγιστες συγκεντρώσεις 2 ή 3 ώρες μετά την κατάποση. Η εντερική απορρόφηση πολυφαινολών συμβαίνει με παθητική μεταφορά μέσω μεμβρανών που καθορίζονται κυρίως από τη λιποφιλικότητα της ουσίας. Η απορρόφηση είναι κυρίως μεγαλύτερη από 60%, αλλά αυτό δεν θεωρείται βέβαιο, αφού τα πειραματικά δεδομένα είναι αντιφατικά. Οι βιολογικές επιδράσεις των πολυφαινολών εξαρτώνται από τη βιοδιαθεσιμότητα τους που διαφέρει σε κάθε πολυφαινόλη. Ακόμη, υπάρχει σχέση μεταξύ της ποσότητας των πολυφαινολών στα τρόφιμα και τη βιοδιαθεσιμότητα τους στο ανθρώπινο σώμα. Γενικά, οι



αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο. Ωστόσο, οι περισσότερες πολυφαινόλες είναι παρούσες σε τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοζιτών ή πολυμερών που δεν μπορούν να απορροφηθούν σε εγγενή μορφή. Πριν από την απορρόφηση, αυτές οι ενώσεις υδρολύονται από εντερικά ένζυμα ή από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, οι πολυφαινόλες υφίστανται εκτεταμένες τροποποιήσεις. Μετά από 2 εβδομάδες καθημερινής χαμηλής έως μέτριας κατανάλωσης κόκκινου κρασιού, τα επίπεδα των συνολικών φαινολικών συγκεντρώσεων στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά, καθώς και μεταβολιτών τους, κυρίως γλυκουρονιδίων και μεθυλιωμένων παραγώγων (π.χ. ανιχνεύθηκαν γλυκουρονίδια της κατεχίνης και επικατεχίνης). Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις θα μπορούσαν να απορροφηθούν από το ανθρώπινο σύστημα πέψης, και να εισέλθουν με επιτυχία στο αίμα (Shi et al, 2003)..

Είναι απαραίτητο να διεξαχθούν μελέτες προκειμένου να αναγνωριστεί πως οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, υπάρχουν προβλήματα στη μελέτη τους, γιατί οι πολυφαινόλες είναι ικανές να τροποποιηθούν από τους οργανισμούς προτού αλληλεπιδράσουν με στόχους ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και να μην έχουν ενιαίο φαρμακολογικό μηχανισμό δράσης (Εικόνα 7).

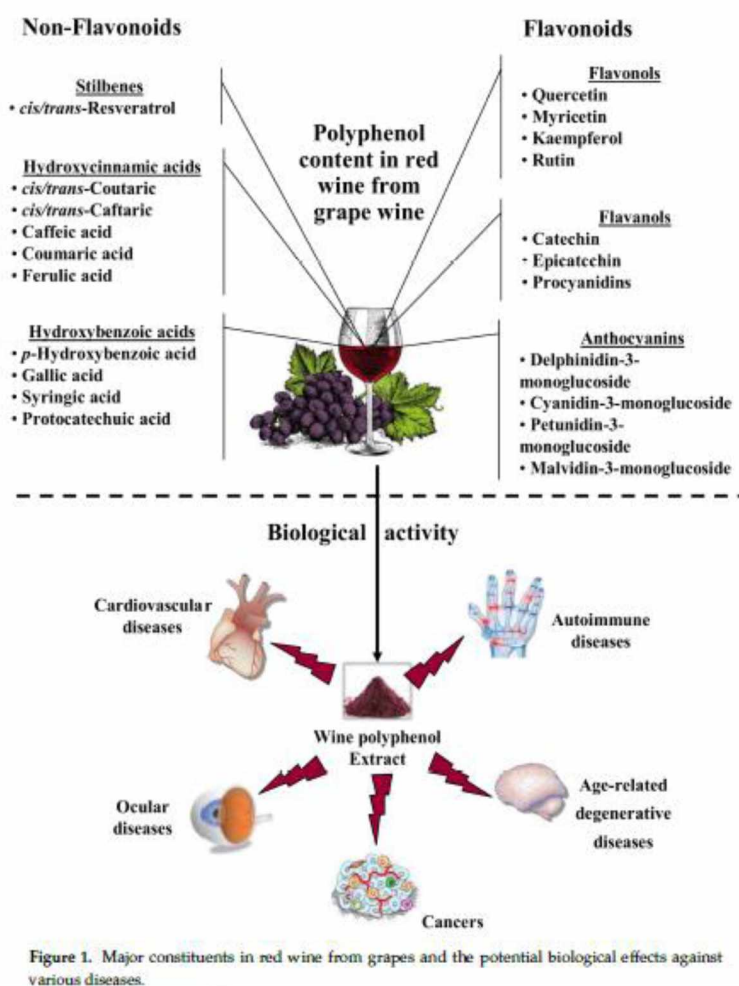


**Εικόνα 7:** Σχηματική επισκόπηση των τρεχουσών προβλημάτων στην έρευνα των πολυφαινολών του κρασιού (Visioli et al, 2020).

Συμπερασματικά, μετά από 30 χρόνια εντατικής έρευνας, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη επαρκών στοιχείων που να επιβεβαιώνουν τις βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών του κρασιού. Μελλοντική έρευνες είναι απαραίτητες για να διευκρινιστούν οι δράσεις τους, έτσι ώστε τελικά να υποστηριχτούν οι τρέχουσες συστάσεις για υπεύθυνη κατανάλωση μέτριων ποσοτήτων κρασιού μαζί με τα γεύματα (Visioli et al, 2020).

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ευεργετικές επιδράσεις από την κατανάλωση κρασιού στην εμφάνιση εκφυλιστικών παθολογικών καταστάσεων, όπως για παράδειγμα ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία (AMD), η άνοια και διάφοροι τύποι καρκίνου. Ακόμη,

έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για τον προσδιορισμό των ευεργετικών επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία διαφορετικών παρασκευασμάτων εμπλουτισμένων με πολυφαινολικά εκχυλίσματα σταφυλιού (Εικόνα 8) (Amor et al, 2018).



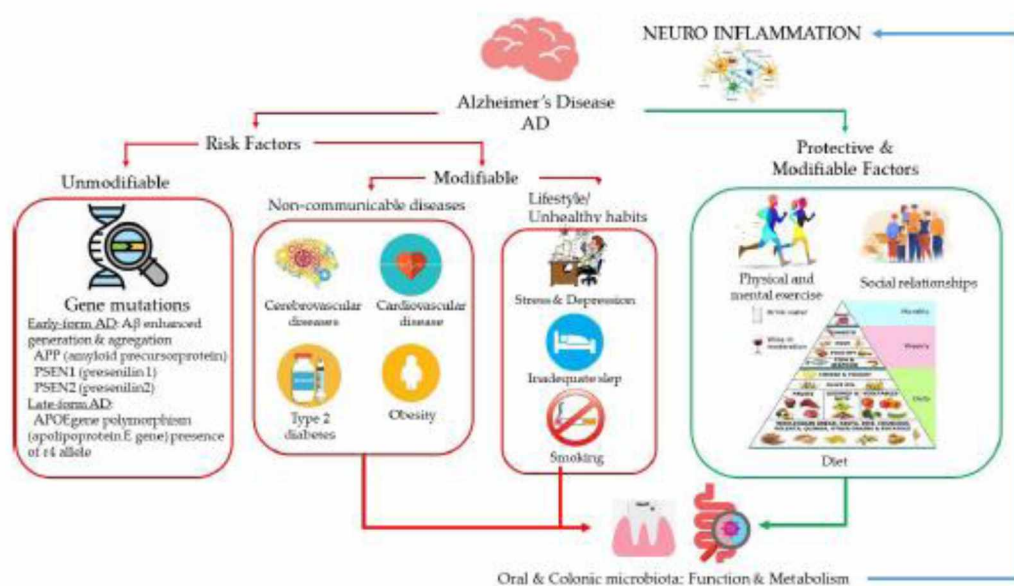
**Εικόνα 8** Κύρια συστατικά στο κόκκινο κρασί από σταφύλια και πιθανές βιολογικές επιπτώσεις σε διάφορες ασθένειες (Amor et al, 2018).

### 1.3.1 Πολυφαινόλες και Alzheimer

Ο υγιής ανθρώπινος εγκέφαλος περιέχει ογδόντα έξι χιλιάδες εκατομμύρια νευρώνες, ενώ κάθε νευρώνας μπορεί να επικοινωνήσει με χιλιάδες ή και δεκάδες χιλιάδες άλλους. Οι νευρώνες στέλνουν μηνύματα μεταξύ διαφόρων τμημάτων του εγκεφάλου, και από τον εγκέφαλο στους μυς και τα όργανα του σώματος. Η νόσος του Alzheimer (AD) διαταράσσει αυτήν την επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων, με αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας τους και τον κυτταρικό θάνατο. Η συγκέντρωση στοιχείων δείχνει ότι οι βασικοί νευροπαθολογικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την έναρξη του AD αρχίζουν έως και 20 χρόνια πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα, με σταδιακές αλλαγές στον εγκέφαλο που περνούν απαρατήρητες στο άτομο που επηρεάστηκε πριν από την

εμφάνιση ήπιας γνωστικής βλάβης. Ως προοδευτική κατάσταση, το AD διακόπτει συνήθως τις νευρωνικές συνδέσεις σε μέρη του εγκεφάλου που εμπλέκεται η μνήμη. Αργότερα επηρεάζονται περιοχές στον εγκεφαλικό φλοιό υπεύθυνες για τη γλώσσα, τη συλλογιστική και την κοινωνική συμπεριφορά. Με την πάροδο του χρόνου, ένα άτομο με Alzheimer χάνει σταδιακά την ικανότητά του να ζει και να λειτουργεί ανεξάρτητα (Alzheimer's Association, 2019).

Οι αιτίες του AD δεν είναι πλήρως κατανοητές, αλλά πιστεύεται ότι περιλαμβάνουν συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (**Εικόνα 9**). Δεδομένου ότι είναι άγνωστο πώς διαφορετικά γονίδια που προδιαθέτουν σε AD μπορούν να οδηγήσουν σε ασθένεια (ή να προστατεύσουν από αυτήν) ούτε πώς αλληλεπιδρούν με διάφορες περιβαλλοντικές καταστάσεις, αρκετές μελέτες προσπαθούν να διερευνήσουν περισσότερο τις αλληλεπιδράσεις του γονιδιακού περιβάλλοντος. Το πρώιμο AD συμβαίνει συνήθως λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια APP (πρόδρομος αμυλοειδής πρωτεΐνη), PSEN1 (πρεσενιλίνη 1) και PSEN2 (πρεσενιλίνη 2). Επιπλέον, γενετικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι μεμονωμένες διαφορές του AD θα μπορούσαν να προκύψουν από πολλαπλά γονίδια και από τις παραλλαγές τους, επηρεάζοντας διάφορες βιολογικές λειτουργίες σε συντονισμό αυξάνοντας τον κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου (Hokama et al, 2014).



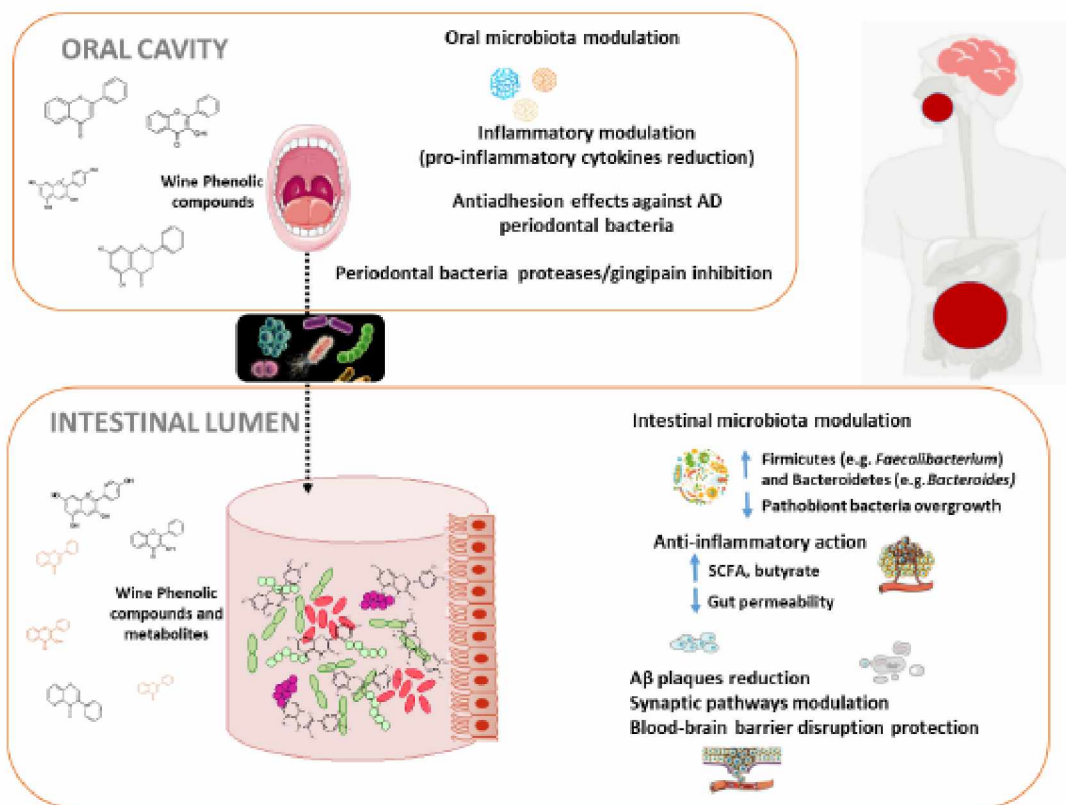
**Εικόνα 9:** Γενετικοί κα περιβαλλοντικοί παράγοντες γνωστοί για τον καθορισμό λειτουργιών του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην έναρξη της νόσου του Alzheimer (AD) (Moreno-Arribas et al, 2020).

Ωστόσο, η κατανόηση των βασικών υποψήφιων γονιδίων και μοριακών μονοπατιών που σχετίζονται με την παθογένεση του AD εξακολουθεί να είναι ελλιπής και, επομένως, δεν επιτρέπει καμία παρέμβαση μέχρι τώρα (Moreno-Arribas et al, 2020).

Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι πολυφαινόλες του κρασιού θα μπορούσαν να



προστατέψουν από AD, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων με το ανθρώπινο μικροβίωμα (Εικόνα 10) (Moreno-Arribas et al, 2020).



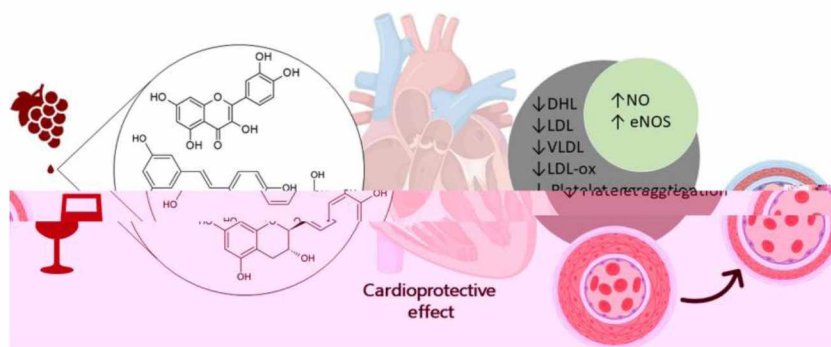
**Εικόνα 10** Σχηματική άποψη που απεικονίζει τους πιθανούς μηχανισμούς που διέπουν την αλληλεπίδραση του κρασιού και την προστασία από τη νόσο του Alzheimer (Moreno-Arribas et al, 2020).

Πιο συγκεκριμένα, το μικροβίωμα της στοματικής κοιλότητας και του γαστρεντερικού φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του AD. Αν και το AD είναι μία περίπλοκη ασθένεια και η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να μην είναι η μόνη αιτία, το μικροβίωμα του οργανισμού μπορεί να παρέχει νέους στόχους για την πρόληψη και τη θεραπεία αυτής της νευροεκφυλιστικής νόσου (Moreno-Arribas et al, 2020). Ωστόσο, χρειάζονται *in vitro* και ιδιαίτερα *in vivo* καλά διεξαγόμενες μελέτες για διερεύνηση των επιδράσεων των πολυφαινόλων στο ανθρώπινο μικροβίωμα. Οι τρέχουσες πειραματικές αποδείξεις δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες κόκκινου κρασιού δρουν με πολλούς τρόπους. Για παράδειγμα *in vitro* και *in vivo* μελέτες αναφέρουν ότι η αλληλεπίδραση μακροφάγων-πολυφαινόλων κρασιού επηρεάζει την εγκεφαλική λειτουργία και την προστασία από AD. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν τη διαμόρφωση της σύνθεσης του μικροβιώματος του εντέρου και των λειτουργιών του, οδηγώντας σε σημαντικές επιδράσεις στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων σε παράγοντες που ρυθμίζουν τη συναπτική πλαστικότητα και τη νευρική λειτουργία, και τη ρύθμιση φλεγμονωδών οδών που επηρεάζονται από

πολυφαινολικούς μεταβολίτες του κρασιού. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών των μελετών και την επίδρασή τους στον άνθρωπο, δεδομένου ότι έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα.

### 1.3.2 Πολυφαινόλες και Καρδιαγγειακά

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού με την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD) σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Σύμφωνα με τις επιδημιολογικές μελέτες, αυτές οι περιοχές με υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού και μεσογειακή δίαιτα δείχνουν χαμηλό επιπολασμό της CVD. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα έχει αποδοθεί σε πολυφαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα ερυθρά κρασιά. Από την άλλη πλευρά, τα υποπροϊόντα που λαμβάνονται κατά την οινοποίηση αποτελούν επίσης σημαντική πηγή πολυφαινολικών ενώσεων. Το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα του κόκκινου κρασιού και των υποπροϊόντων του σχετίζεται κυρίως με την ικανότητά τους να αποτρέπουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, να τροποποιούν το προφίλ των λιπιδίων και να προάγουν την αγγειοδιαστολή. Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και το πολυφαινολικό προφίλ φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων από το κόκκινο κρασί και τα υποπροϊόντά της, εμπλέκεται στην πρόληψη της δημιουργίας ROS και στην τροποποίηση των λιπιδίων για την αποτροπή της οξειδωσης της LDL. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν επίσης, να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων για να προκαλέσουν την παραγωγή NO και την αγγειοδιαστολή. Συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις όπως η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη σχετίζονται με την αύξηση του NO και με την αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Παρ' όλα αυτά, η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων που προκαλεί αυτές τις επιδράσεις είναι πολύ διαφορετική από εκείνη στα κόκκινα κρασιά. Τα συνεργικά όμως και προσθετικά αποτελέσματα ενός μείγματος φαινολικών ενώσεων θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα του κόκκινου κρασιού και των υποπροϊόντων του (Εικόνα 11) (Muñoz-Bernal, 2021).



Εικόνα 11: Πολυφαινόλες και καρδιαπροστατευτική δράση (Muñoz-Bernal, 2021).

Με βάση μελέτες *in vivo* και *in vitro*, επιδημιολογικά δεδομένα και πολλαπλές κλινικές δοκιμές υποδηλώνεται συσχέτιση μεταξύ χαμηλής έως μέτριας, κανονικής κατανάλωσης αλκοολούχων ποτών, ιδιαίτερα κόκκινου κρασιού και χαμηλότερου κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) (Muñoz-Bernal, 2021). Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της συνολικής θνησιμότητας και της κατανάλωσης οινοπνευματωδών ποτών ακολουθεί μια καμπύλη U λόγω των ευεργετικών επιπτώσεων της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ που είναι ακόμη μεγαλύτερη από την πλήρη αποχή από το αλκοόλ, αν και αυτές οι επιπτώσεις χάνονται όταν η κατανάλωση είναι υπερβολική. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση 30-50 g αλκοόλ ανά ημέρα θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο ισχαιμικών καρδιακών παθήσεων στους άνδρες κατά 42%. Ομοίως, 5-24 g πρόσληψης αλκοόλ ημερησίως μειώνουν τον κίνδυνο ισχαιμικής καρδιακής νόσου σε μεσήλικες γυναίκες κατά 40% και τα εγκεφαλικά επεισόδια κατά 40-50% (Ditano-Vázquez et al, 2019).

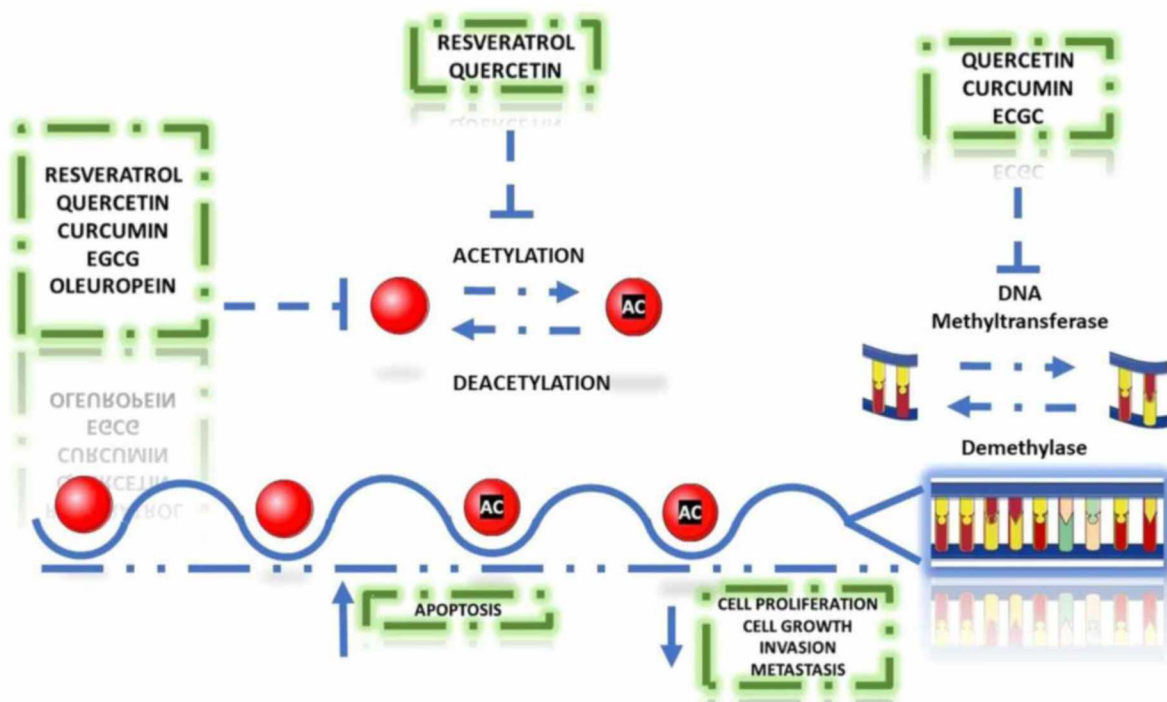
Πριν από περίπου 50 χρόνια, οι επιδημιολογικές μελέτες πρότειναν την αντίστροφη σχέση μεταξύ αλκοόλ και χαμηλότερης συχνότητας εμφάνισης CVD. Αργότερα, εισήχθη η έννοια του «Γαλλικού Παράδοξου». Δηλαδή, ενώ στη Γαλλία η πρόσληψη κορεσμένων λιπών και η συγκέντρωση χοληστερόλης στον ορό ήταν τόσο υψηλή όσο στις ΗΠΑ ή το Ηνωμένο Βασίλειο, η θνησιμότητα από CVD ήταν πολύ χαμηλότερη, πιθανώς λόγω της μέτριας κατανάλωσης κόκκινου κρασιού. Έκτοτε, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το κόκκινο κρασί - 3 έως 5 ποτήρια ημερησίως - είναι το πιο ευεργετικό στη μείωση του κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου και της ολικής θνησιμότητας σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά, όπως οινοπνευματώδη ποτά, μπύρα και λευκό κρασί (Niki et al, 2014). Παρόλο που η πρόσληψη αλκοόλ έχει δείξει τόσο κινδύνους όσο και οφέλη για την υγεία, οι πολυφαινολικές ενώσεις από το κόκκινο κρασί ασκούν ευνοϊκή επίδραση στη βελτίωση της θνησιμότητας από CVD σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Collaborators, G.B.D.R.F., 2018).

### 1.3.3 Πολυφαινόλες και Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτου στον κόσμο και ευθύνεται για περίπου 10 εκατομμύρια θανάτους. Οι πιο συνηθισμένοι καρκίνοι επηρεάζουν εξίσου τον πνεύμονα και το στήθος, με 2,09 εκατομμύρια περιπτώσεις, το παχύ έντερο (1,80 εκατομμύρια περιπτώσεις), τον προστάτη (1,28 εκατομμύρια περιπτώσεις), το δέρμα (μη μελάνωμα) (1,04 εκατομμύρια περιπτώσεις) και το στομάχι (1,03 εκατομμύρια περιπτώσεις). Η χρήση καπνού, η κατάχρηση αλκοόλ, η ανθυγιεινή διατροφή, και η σωματική αδράνεια περιγράφονται ως μείζονες παράγοντες κινδύνου καρκίνου παγκοσμίως και η τροποποίηση ή αποφυγή αυτών των βασικών παραγόντων κινδύνου μπορεί να μειώσει σημαντικά (30% -50%) τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι μια πλούσια σε φρούτα, λαχανικά δίαιτα μπορεί να αποτρέψει το 30% -40% των συνολικών τύπων καρκίνου. Επίσης, η υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών από φρούτα, λαχανικά και δημητριακά ολικής αλέσεως σχετίζεται αντιστρόφως με τον κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου. Τέτοια οφέλη έχουν αποδοθεί εν μέρει στη παρουσία σημαντικών ποσοτήτων πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών σε φρούτα και λαχανικά και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη χημειοπροστατευτική δράση τους, ιδίως στο παχύ έντερο. Ως εκ τούτου, αρκετές μελέτες (in vitro και in vivo) έχουν αποδείξει το αντικαρκινικό δυναμικό των πολυφαινολών του κρασιού (δηλαδή, ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, και κατεχίνη) (Araujo et al, 2011).

Επίσης, το επιστημονικό ενδιαφέρον για τον πιθανό χημειοπροφυλακτικό ρόλο διαφόρων φυτοχημικών που υπάρχουν στα τρόφιμα αυξάνεται. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα φυτοχημικά ασκούν την αντικαρκινική τους δράση περιλαμβάνουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, την πρόκληση απόπτωσης και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, μπορούν να ρυθμίσουν τις οδούς σηματοδότησης και να επηρεάσουν επιγενετικές αλλαγές, όπως η μεθυλίωση του DNA και τα πρότυπα έκφρασης των miRNAs. Συγκεκριμένα, ορισμένες πολυφαινόλες (λυκοπένιο, EGCG) δρουν μέσω της ρύθμισης διαφορετικών οδών μεταγωγής σήματος. Επίσης, η σουλφοραφάνη φαίνεται να ασκεί αντικαρκινική δράση μέσω πολλών δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδη, αντι-αγγειογενετική και αντι-μεταστατική (**Εικόνα 12**) (Amor et al, 2018).





**Εικόνα 12:** Οι πολυφαινόλες δρουν σε επιγενετικούς μηχανισμούς αναστέλλοντας τη δράση της μεθυλτρανσφεράσης που απορρυθμίζεται σε καρκινικά κύτταρα (Amor et al, 2018).

Με αυτόν τον τρόπο, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού ασκεί προστατευτική επίδραση από τον καρκίνο του παχέος εντέρου τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Εξάλλου, άλλες μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ του κρασιού και της μεσογειακής διατροφής, σε σύγκριση με χαμηλότερο κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου και ορισμένων άλλων καρκίνων, όπως όγκων του ουροποιητικού συστήματος. Ωστόσο, μια μελέτη δεν βρήκε μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του μέτριας πρόσληψης κόκκινου κρασιού. Αυτή η αντίθεση πιθανώς προκύπτει από την ποσότητα και την ποιότητα των πολυφαινολών που υπάρχουν στο κόκκινο κρασί. Πράγματι, το κόκκινο κρασί περιέχει διάφορες βιολογικά ενεργές πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινολικών οξέων, των τριυδροξυστιλβενίων και των φλαβονοειδών. Ακόμη, έχει διαπιστωθεί ότι ένα μείγμα εκχυλίσματος πολυφαινόλης αμπέλου λόγω της συνέργειας των πολυφαινολών καταδεικνύει περισσότερη μείωση στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου από ότι από μόνη της η ρεσβερατρόλη (Colin et al, 2009).

Η παραγωγή του κρασιού είναι ένας πολύπλοκος και μοναδικός συνδυασμός που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία της αμέλου και οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες. Έτσι, η ποσότητα των πολυφαινολών στο κρασί, αν και ποικίλλει σημαντικά, εκτιμάται ότι είναι περίπου 190-290 mg/L σε λευκά κρασιά και 900-2500 mg/L σε κόκκινα κρασιά. Για παράδειγμα, μία μελέτη έδειξε ότι η επιμήκυνση του χρόνου διαβροχής αύξησε τις πολυφαινόλες ενός ερυθρού

κρασιού. Σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα κόκκινου κρασιού, των οποίων ο χρόνος διαβροχής ήταν μικρότερος και επομένως του οποίου η σύνθεση πολυφαινόλης ήταν χαμηλότερη, το εκχύλισμα κρασιού που προέκυψε από τις συνθήκες μακρύτερης διαβροχής έδειξε πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση σε κύτταρα του παχέος εντέρου (Mazue et al, 2014).

Ακόμη, μερικές πολυφαινόλες δεν δρουν συνεργικά αλλά μάλλον προσθετικά και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αντίθετα αποτελέσματα. Αυτά τα δεδομένα αναδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο της πολυφαινολικής σύστασης του κρασιού, όπου μία αλλαγή στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών ενός κρασιού μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τα ευεργετικά του αποτελέσματα (Mazue et al, 2014). Κατά συνέπεια, οι επιπτώσεις της κατανάλωσης κρασιού, ιδίως σε έναν υγιή πληθυσμό, μπορεί να εξαρτώνται από τη πολυφαινολική σύσταση του κρασιού καθώς και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Οι πολυφαινόλες ασκούν ευεργετικά αποτελέσματα είτε σε τοπικό επίπεδο (π.χ. παχύ έντερο) άμεσα, κατά τη διέλευση τους μέσω της στοματικής κοιλότητας και της γαστρεντερικής οδού, είτε σε συστηματικό επίπεδο αφού απορροφηθούν και εισέλθουν στο κυκλοφορικό (Forester et al, 2009). Επομένως, ένα από τα όργανα που μπορούν να αποτελέσουν στόχο των πολυφαινολών για προστασία από καρκίνο είναι το λεπτό έντερο και το παχύ έντερο. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) είναι η τρίτη πιο κοινή μορφή καρκίνου που εμφανίζεται παγκοσμίως. Καταγράφονται συνολικά 1,8 εκατομμύρια περιπτώσεις κάθε χρόνο. Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου μπορεί να αποδοθεί κυρίως σε πολυπαραγοντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Amor et al, 2018). Πράγματι, η κατανάλωση υψηλών επιπέδων ερυθρού κρέατος και λίπους μαζί με χαμηλά επίπεδα φρούτων και λαχανικών έχει προταθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο CRC. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η καθιέρωση διατροφικής πρόληψης θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Όπως τεκμηριώνεται στη βιβλιογραφία, τα οφέλη της μεσογειακής διατροφής περιλαμβάνουν προστασία από διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην προστασία έναντι της CRC από ασθενείς που ακολουθούν τη μεσογειακή διατροφή δεν είναι πλήρως αναγνωρισμένοι και κατανοητοί (Amor et al, 2018).

## 2. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεθόδους ABTS και FOLIN ήταν τα:

- ❖ ABTS
- ❖ Ένζυμο HRP
- ❖ Υπεροξειδίο του υδρογόνου  $H_2O_2$
- ❖ Άνυδρο ανθρακικό νάτριο  $NA_2CO_3$
- ❖ Folin-Ciocalteu
- ❖ Gallic Acid
- ❖ Φυτική ίνα
- ❖ Οξειδίο του πυριτίου

### 2.2. Δείγματα κρασιών

Για την παραγωγή πολυφαινολικών σκονών χρησιμοποιήθηκαν ερυθρά κρασιά μονοποικιλιακά αλλά προερχόμενα και από συνδυασμούς ποικιλιών σταφυλιών με κύριες διαφορές μεταξύ τους ως εκτός από την ποικιλία σταφυλιού, τη χρονολογία παραγωγής και την περιοχή καλλιέργειας των σταφυλιών. Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τους Νομούς Πέλλας και Λάρισας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα δείγματα κρασιών που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας.** Χαρακτηριστικά δειγμάτων κρασιού.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΑΜΠΕΛΟΥ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
MERLOT	2009	Πέλλας
MERLOT	2010	Πέλλας
MERLOT	2016	Πέλλας
MERLOT	2018	Πέλλας
MERLOT	2019	Λάρισας
MERLOT	2020	Λάρισας
SYRAH	2008	Πέλλας
SYRAH	2009	Πέλλας
SYRAH	2016	Λάρισας
SYRAH	2017	Λάρισας
SYRAH	2019	Λάρισας
SYRAH	2020	Λάρισας
ΛΗΜΝΙΩΝΑ	2016	Λάρισας
ΛΗΜΝΙΩΝΑ	2017	Λάρισας
ΛΗΜΝΙΩΝΑ	2018	Λάρισας
ΛΗΜΝΙΩΝΑ	2019	Λάρισας
ΛΗΜΝΙΩΝΑ	2020	Λάρισας
ΜΟΣΧΑΤΟ	2019	Λάρισας
ΜΟΣΧΑΤΟ	2020	Λάρισας
CABERNET	2008	Πέλλας
CABERNET	2009	Πέλλας
ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ-ΛΗΜΝΙΩΝΑ	2017	Λάρισας
MERLOT-CABERNET	2018	Λάρισας
ΛΗΜΝΙΩΝΑ-MERLOT	2019	Λάρισας
CABERNET-MERLOT-ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	2016	Λάρισας

### 2.3. Παρασκευή πολυφαινολικών σκονών

Οι σκόνες πολυφαινολών προέκυψαν από τα κρασιά μέσω της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης. Από κάθε φιάλη κρασιού προέκυψαν δύο δείγματα σκόνης τα οποία

διαφοροποιούνται ως προς την περιεκτικότητά τους σε φυτική ίνα (5% w/v και 10% w/v). Αν δηλαδή η κάθε φιάλη περιείχε 700mL κρασιού, τότε για το πρώτο δείγμα σκόνης χρησιμοποιούνταν 17,5g φυτικής ίνας (5% w/v), και για το δεύτερο 35g φυτικής ίνας (10% w/v). Η ομογενοποίηση του κρασιού με την ίνα επιτεύχθηκε με την χρήση μπλέντερ και στη συνέχεια το δείγμα τοποθετήθηκε στον θάλαμο του λυοφιλοποιητή σε αλουμινένιους δίσκους. Μετά το τέλος την διαδικασίας το προϊόν πολτοποιήθηκε με την προσθήκη οξειδίου του πυριτίου έτσι ώστε να διαλυθούν οι σβόλοι παραχθεί καλύτερης ποιότητας σκόνης.

### Κρυοξήρανση-Λυοφιλίωση

Η κρυοξήρανση ή λυοφιλοποίηση είναι μία μέθοδος αφυδάτωσης, που χρησιμοποιείται συνήθως για την διατήρηση ευαίσθητων υλικών ή για πιο ασφαλή μεταφορά αυτών (Jennings A., 1999). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε εμπορικά στα τέλη του 1930 για τη διατήρηση του πλάσματος του αίματος, χωρίς την ανάγκη ψύξης και την παραγωγή στιγμιαίου καφέ. Από τότε, η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για τη διατήρηση εκατοντάδων διαφορετικών ειδών τροφίμων και φαρμάκων. Η σύγχρονη τεχνική λυοφιλίωσης πραγματοποιείται με τη χρήση μιας ειδική μηχανής, του λυοφιλιωτή ο οποίος αποτελείται από ένα μεγάλο θάλαμο για κατάψυξη και από μία αντλία κενού για απομάκρυνση της υγρασίας.

Η λειτουργία του λυοφιλιωτή είναι η εξής: Κατεβάζοντας σε μεγάλο βαθμό την θερμοκρασία (έως  $-110^{\circ}\text{C}$ ) και ελαττώνοντας την πίεση που περιβάλλει το υλικό, με τη βοήθεια αντλίας, το νερό που βρίσκεται στο υλικό, από την στερεά φάση, μεταβαίνει κατευθείαν στην αέρια φάση (εξάχνωση). Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (1-4%), προλαμβάνοντας έτσι την ανάπτυξη βακτηριδίων και μούχλας, αλλά και τη δράση των ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις αλλοίωσης στο προς ξήρανση υλικό. Όσον αφορά τις πολυφαινολικές σκόνες η ψύξη του μείγματος έγινε στους  $-35^{\circ}\text{C}$ , ενώ η δημιουργία κενού επιτεύχθηκε με πίεση 0,5 mbar για 18 ώρες με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας έως τους  $35^{\circ}\text{C}$ . Επίσης, λόγω της ταχείας ψύξης δημιουργούνται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Η αργή ψύξη θα σχημάτιζε μεγάλους κρυστάλλους και θα κατάστρεφε τη δομή του προϊόντος. Τα λυοφιλιωμένα προϊόντα έχουν μακρά διάρκεια ζωής, σε σφραγισμένη συσκευασία που προστατεύονται από την υγρασία, το φως και το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια.

## **2.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ABTS**

Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans για την εκτίμηση της

αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού, μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS (Rise-Evans C. A., 1996). Χρησιμοποιείται βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonocacid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS<sup>•+</sup> (κατιόν), η οποία έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για να γίνει εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να παραχθεί η ρίζα και στην συνέχεια να προστεθεί η εξεταζόμενη ουσία, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> ανάγεται, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET), είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm. (Prior et al., 2005)

#### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων σκονών σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 μg/ml).

**Διάλυμα ABTS (1mM):** Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H<sub>2</sub>O.

**Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 μM):** Για τελική συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8,8 M αραιώνουμε με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM.

**Διάλυμα Horseradish peroxidase (6 μM):** Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση. Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη της σκόνης στις διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε σκόνη ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των δειγμάτων ακολουθεί ανάδευση

και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράτε η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

Πίνακας 1. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
H <sub>2</sub> O	550μl	500μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl
ABTS	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100μl	50μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
HRP	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Τελικός Όγκος	1000 μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl
Σκόνη πολυφαινολών	-	-		100μl	100μl	100μl	100μl	100μl

#### Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_d) / A_0] \times 100$$

όπου:

A<sub>0</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A<sub>d</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS<sup>•+</sup> κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Η φυτική ίνα που χρησιμοποιήθηκε για τις ενθυλακώσεις στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση.



## 2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU

Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινολών των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu., το οποίο είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση κατά την οποία τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται ενώ ταυτόχρονα τα ετεροπολυμερή οξέα ανάγονται. Το προϊόν είναι μπλε χρώματος και αποτελεί ένα σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου το οποίο δίνει απορρόφηση στα 765 nm. Ως ρυθμιστής αλκαλικότητας χρησιμοποιείται κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), το οποίο δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης καθώς αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) την ημέρα του πειράματος. Στη συνέχεια σε eppendorf tubes προστίθενται διαδοχικά νερό, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το εκχύλισμα. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

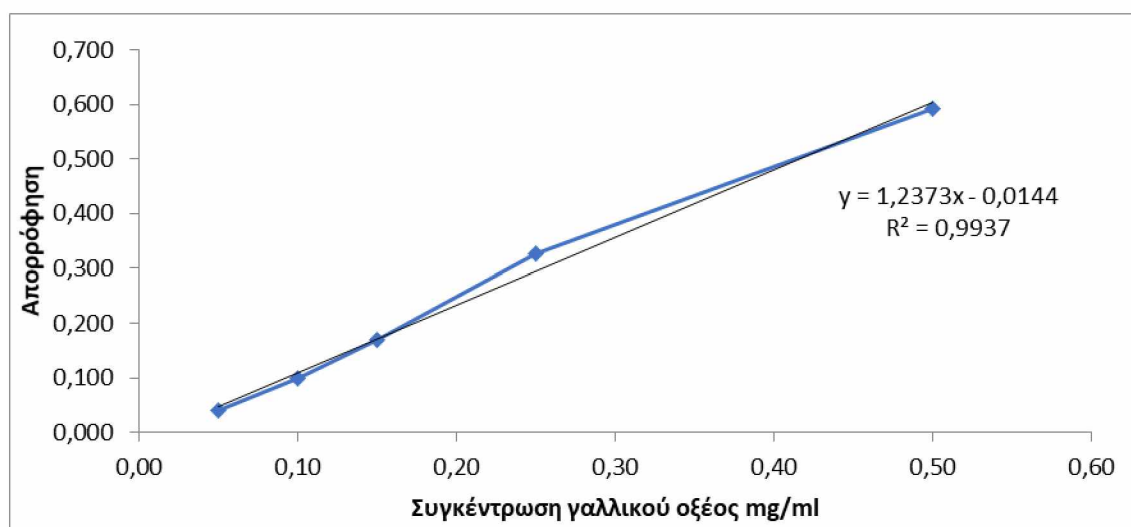
*Πίνακας 2. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων*

	<b>Τυφλό</b>	<b>Negative control</b>	<b>C<sub>1</sub></b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,02ml	1,1ml	1ml
<b>Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu</b>	100μl	-	100μl
<b>Σκόνη πολυφαινολών</b>	-	20μl	20μl

Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μίγμα προστίθενται 280μl  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (25% w/v) και 600μl απιονισμένο νερό και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετράται η απορρόφηση στα 765nm (Priftis et al., 2015). Η φυτική ίνα που χρησιμοποιήθηκε για τις ενθυλακώσεις στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζει πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να

χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος έγινε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση της  $y = 1,2373x - 0,0144$  με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman  $R^2 = 0,9937$ . Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g σκόνης. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 1. Το διάγραμμα απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

## 2.6 Αποτελέσματα

### 2.6.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών σκονών κόκκινου κρασιού μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>+</sup> .

Συνολικά παρήχθησαν με κρυοξήρανση (freeze-drying) 50 σκόνες πολυφαινολών ελευθέρως από ελληνικά κρασιά. Οι πολυφαινόλες των κρασιών ενθυλακώθηκαν σε φυτική ίνα πορτοκαλιού, έτσι προέκυψαν 25 σκόνες περιεκτικότητας 10% σε φυτική ίνα και 25 σκόνες περιεκτικότητας 5% σε φυτική ίνα.

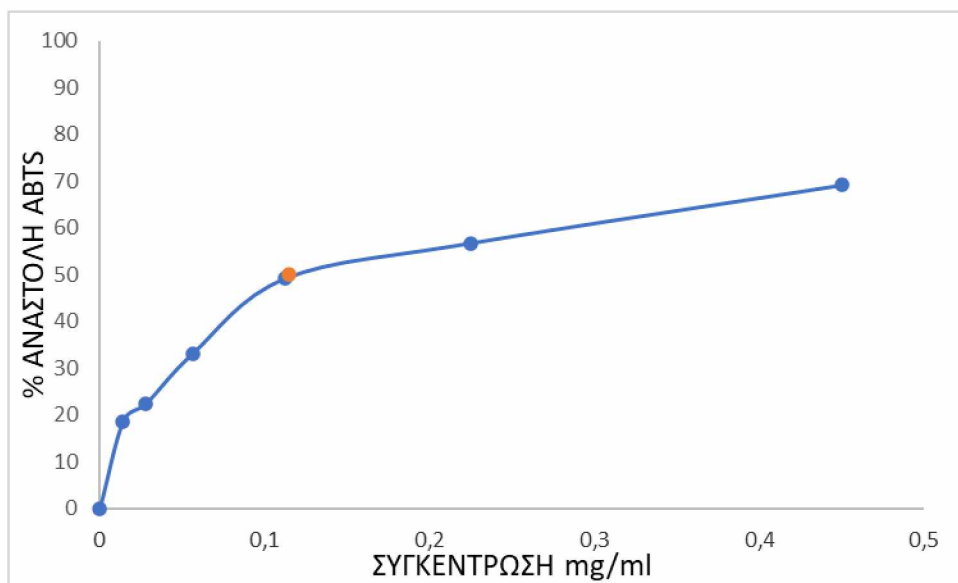
Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε σκόνης εξετάστηκε με τη μέθοδο ABTS και υπολογίζεται με την χρήση της τιμής IC<sub>50</sub>. Η τιμή IC<sub>50</sub> εκφράζει τη συγκέντρωση της κάθε πολυφαινολικής σκόνης που ανέστειλε κατά 50% την ελεύθερη ρίζα. Άρα, όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η πολυφαινολική σκόνη που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και κατά συνέπεια την μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> είναι η σκόνη Merlot 2019 10% φυτική ίνα με τιμή IC<sub>50</sub> 0,04 mg/mL και ακολουθεί η σκόνη Cabernet 2009 5% φυτική ίνα με IC<sub>50</sub> 0,05mg/mL.

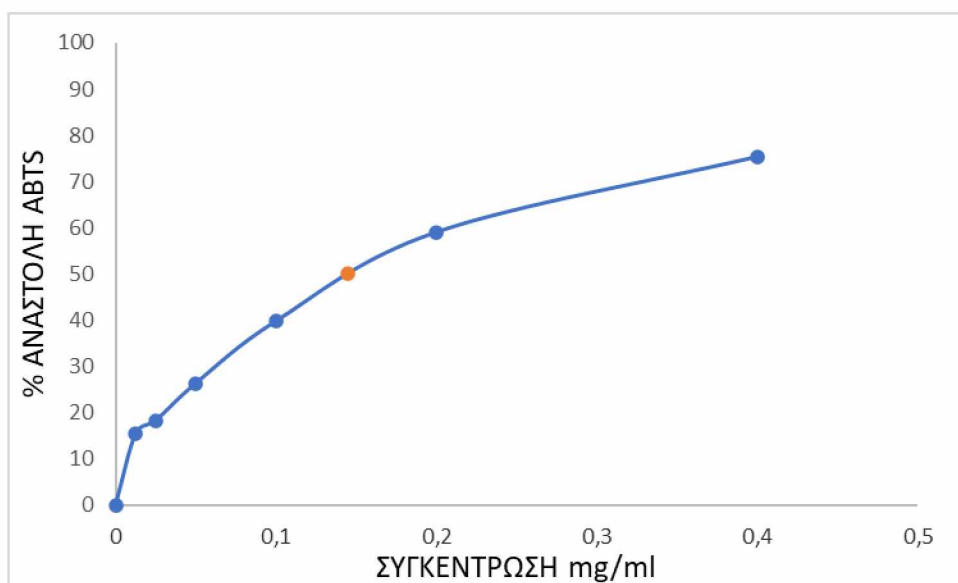
Όσον αφορά τα δείγματα με περιεκτικότητα 10% φυτική ίνα ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζουν επίσης τα Merlot 2016 και Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο 2016 με τιμή IC<sub>50</sub> τα 0,08 mg/ML.

Τέλος, στις τρεις πιο ισχυρές σκόνες περιεκτικότητας 5% σε φυτική ίνα συγκαταλέγονται και το Λημνιώνα-Merlot 2019 και Μοσχάτο 2019 με τιμή IC<sub>50</sub> 0,07mg/mL.

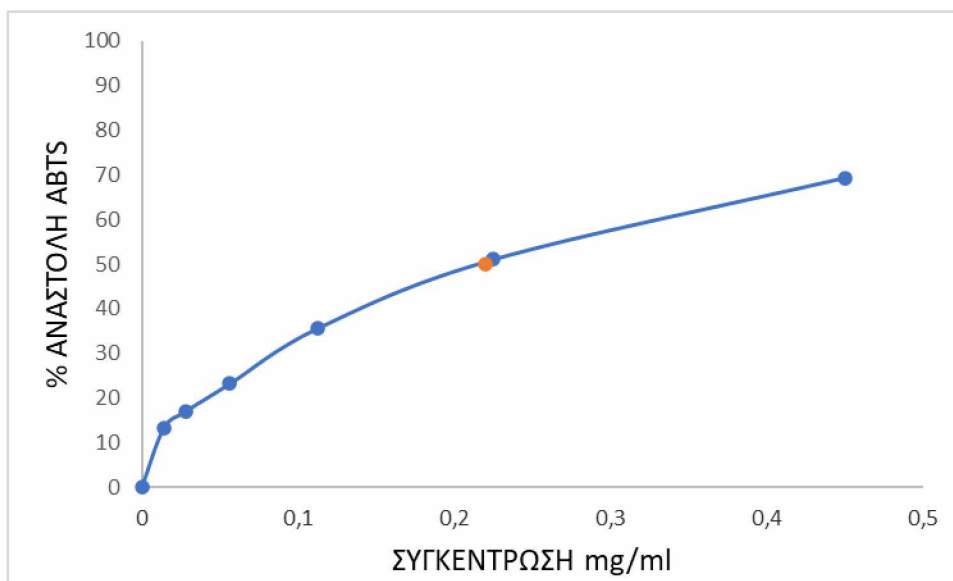
Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα και οι τιμές IC<sub>50</sub> κάθε σκόνης μεμονωμένα, αλλά και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα.



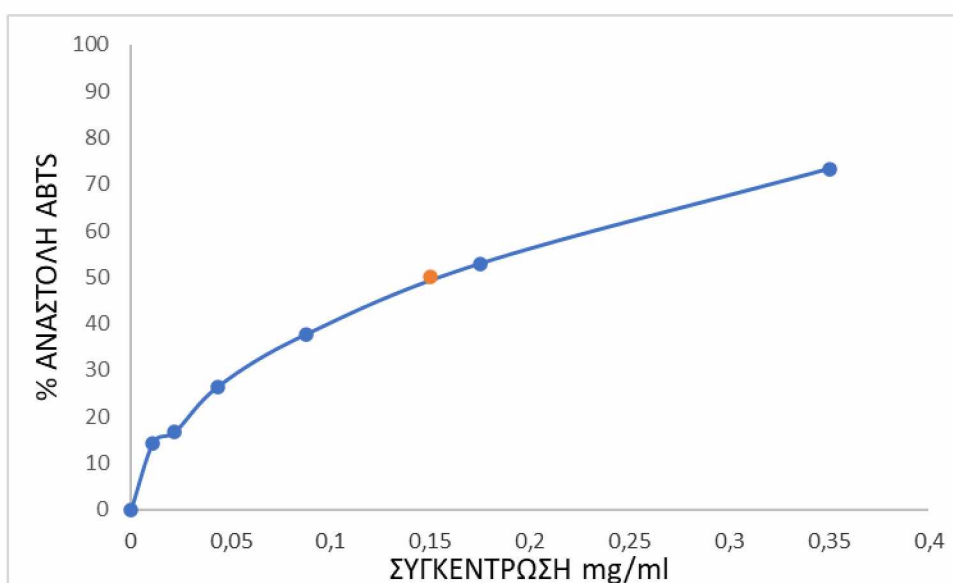
Διάγραμμα 2.1. Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2016 σε 10% φυτική ίνα.



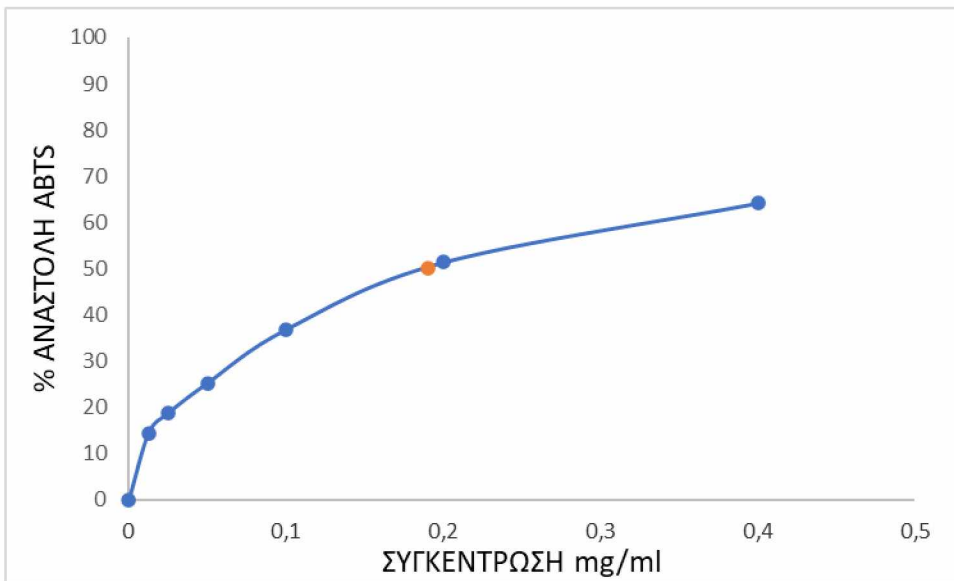
Διάγραμμα 2.2. Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2016 5% φυτική ίνα.



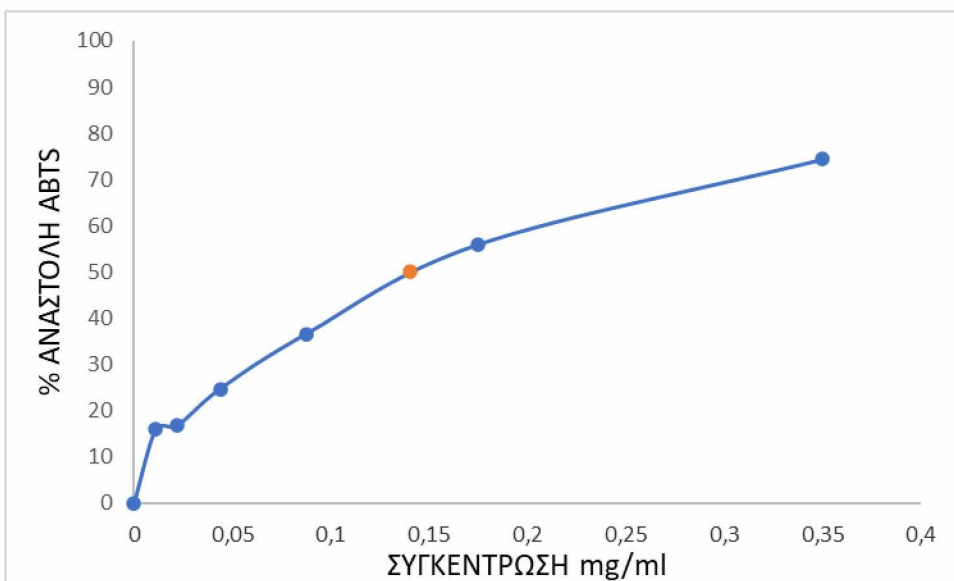
Διάγραμμα 3.1. Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώνα 2017 10% φυτική ίνα.



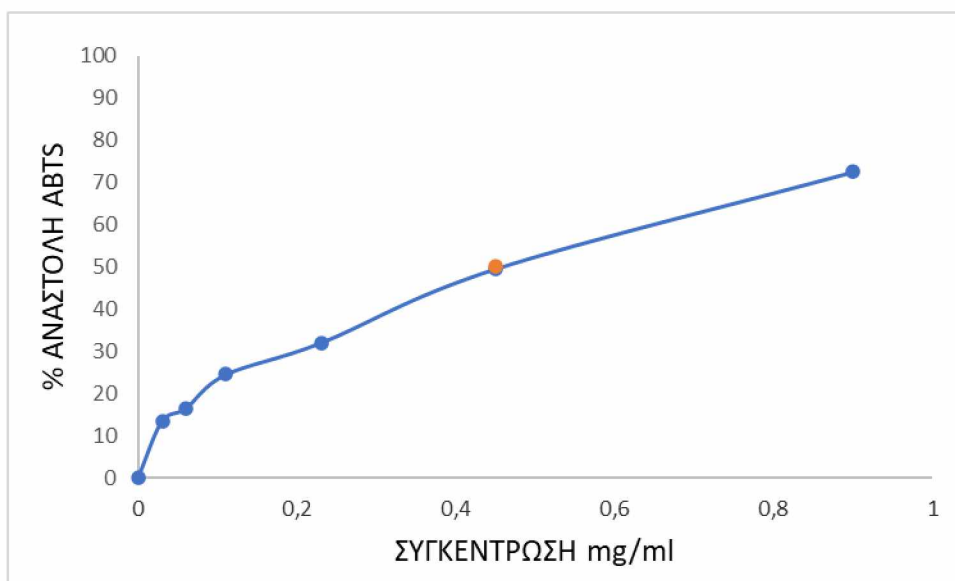
Διάγραμμα 3.2. Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώνα 2017 5% φυτική ίνα..



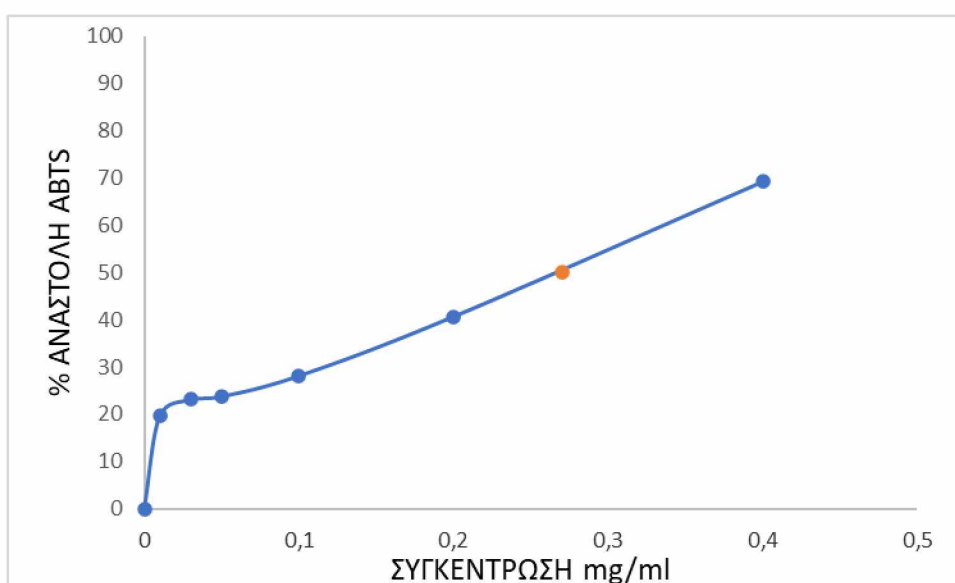
Διάγραμμα 4.1. Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2018 10% φυτική ίνα (1ο δείγμα)



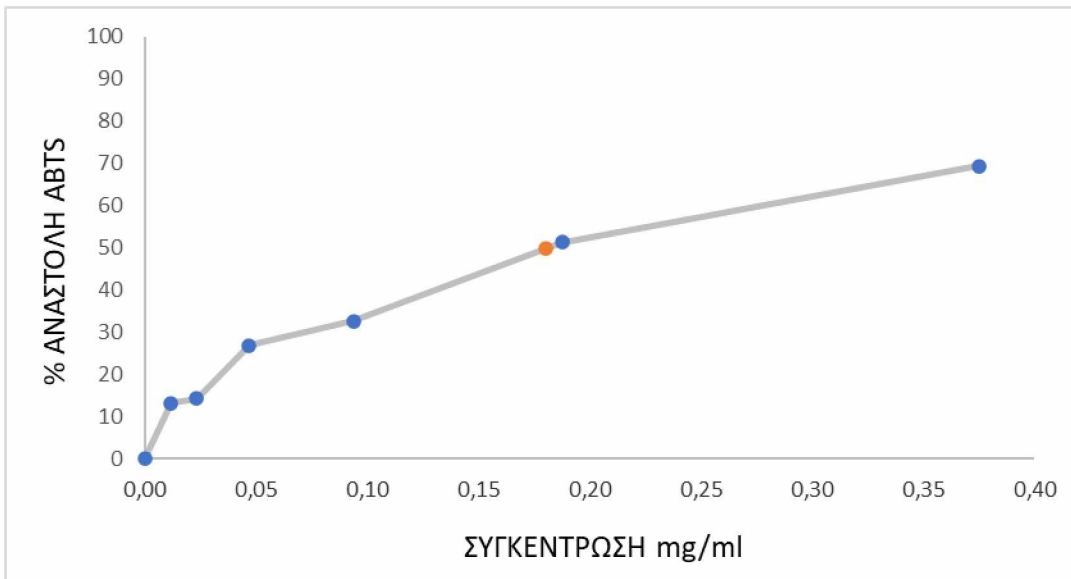
Διάγραμμα 4.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2018 5% φυτική ίνα (1ο δείγμα)



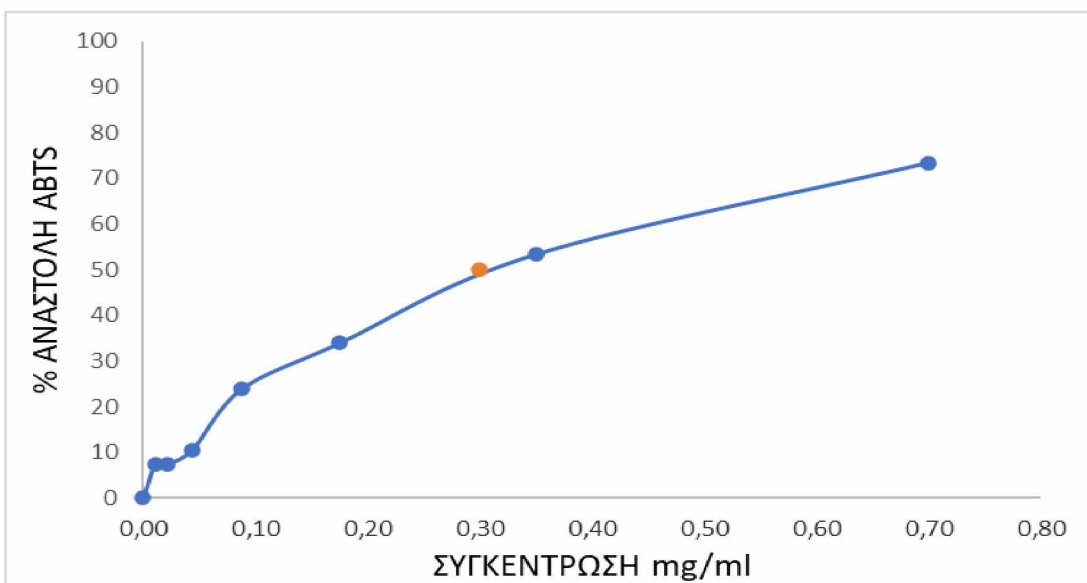
Διάγραμμα 5.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2018 10% φυτική ίνα (2ο δείγμα)



Διάγραμμα 5.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2018 5% φυτική ίνα (2ο δείγμα)

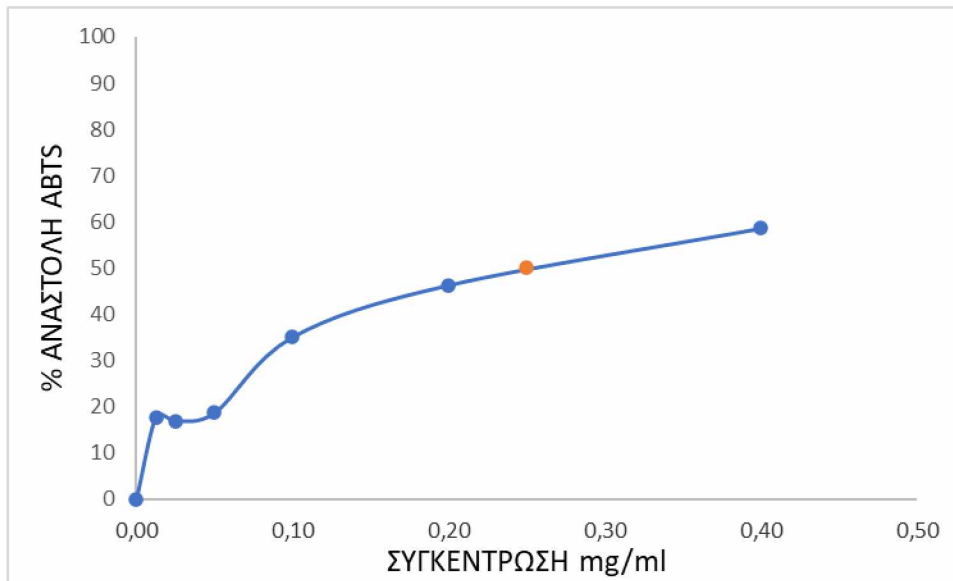


Διάγραμμα 6.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώνα 2019 10% φυτική ίνα

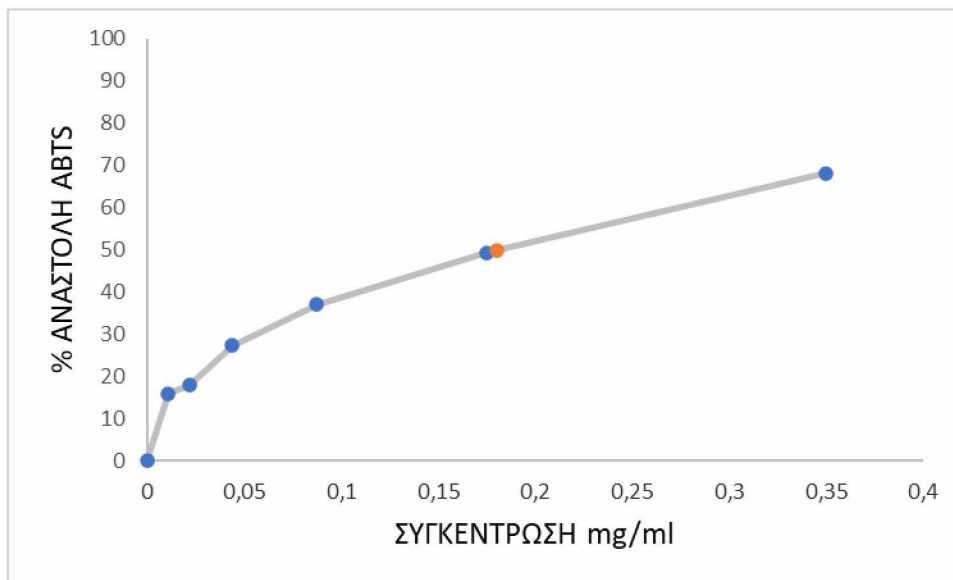


Διάγραμμα 6.2 Ανασταλτικής συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώνα 2019 5% φυτική ίνα

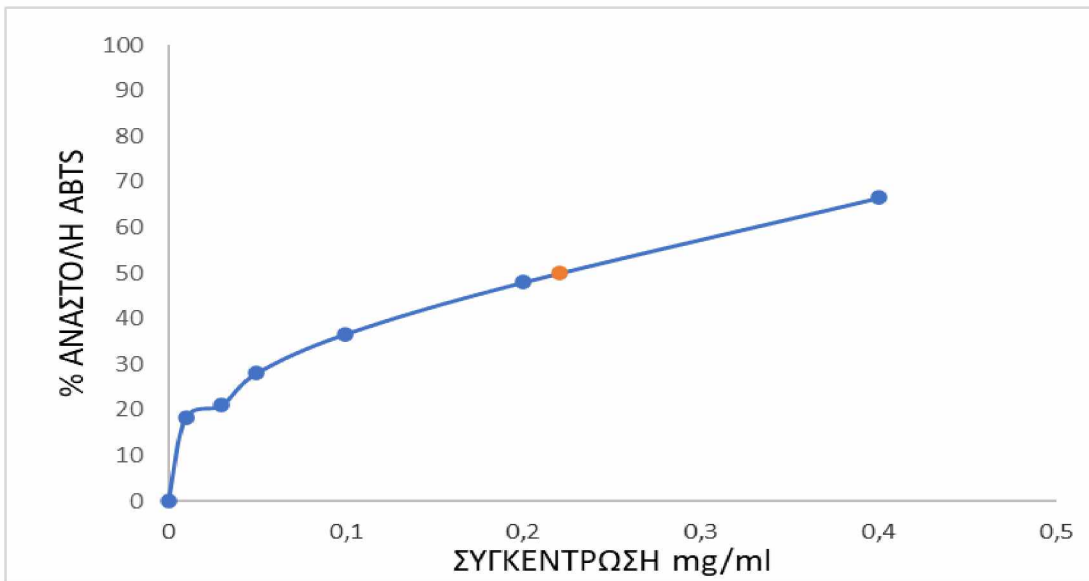




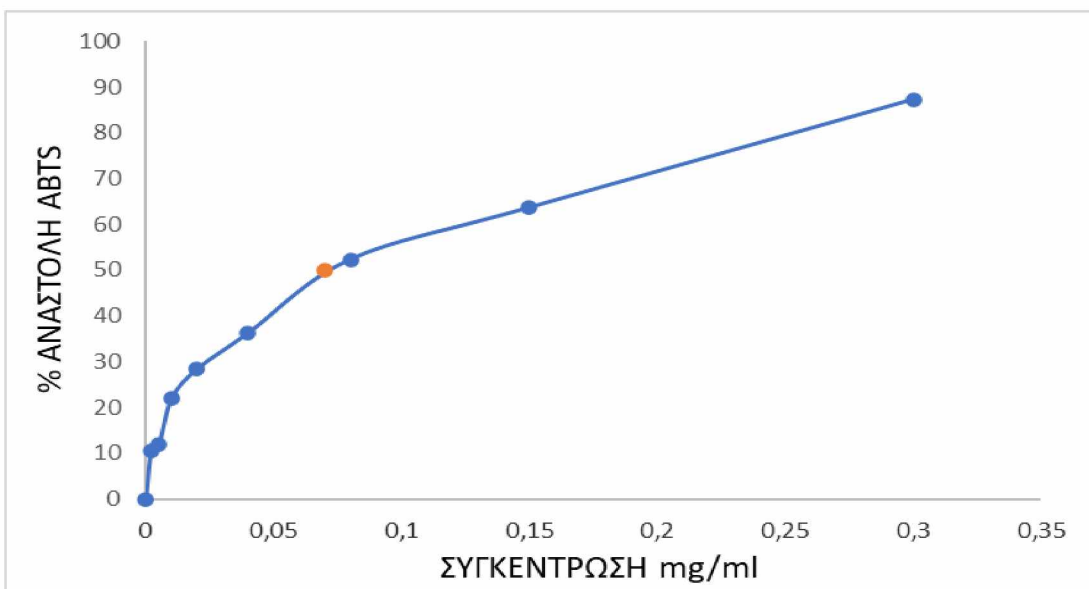
Διάγραμμα 7.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2020 10% φυτική ίνα



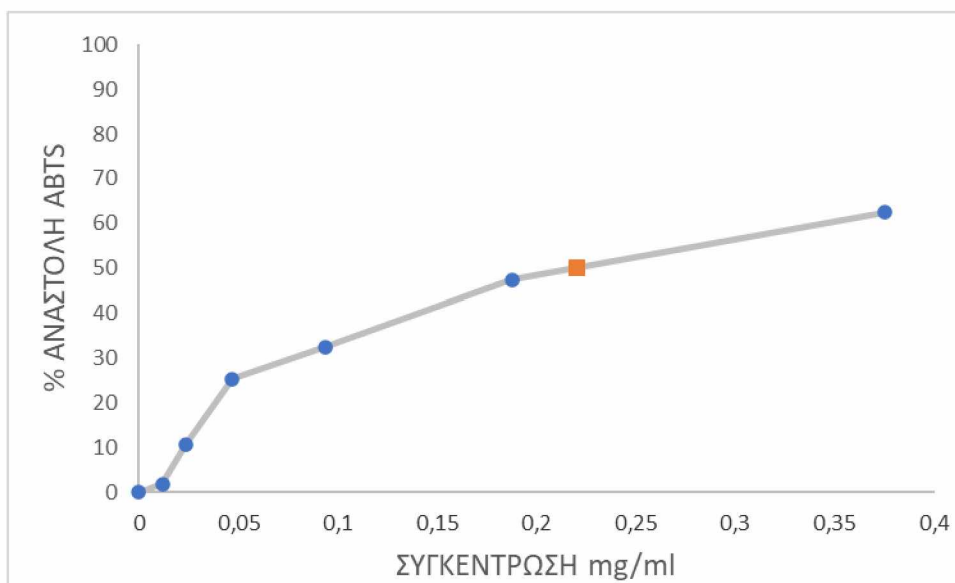
Διάγραμμα 7.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Λημνιώννα 2020 5% φυτική ίνα



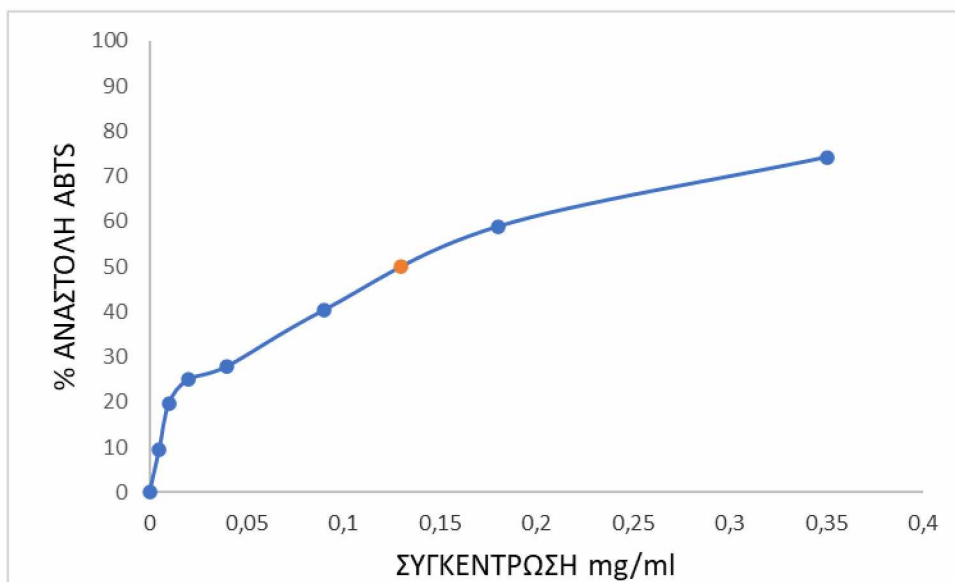
Διάγραμμα 8.1 Ανασταλτική συγκέντρωση IC<sub>50</sub> Μοσχάτο 2019 10% φυτική ίνα



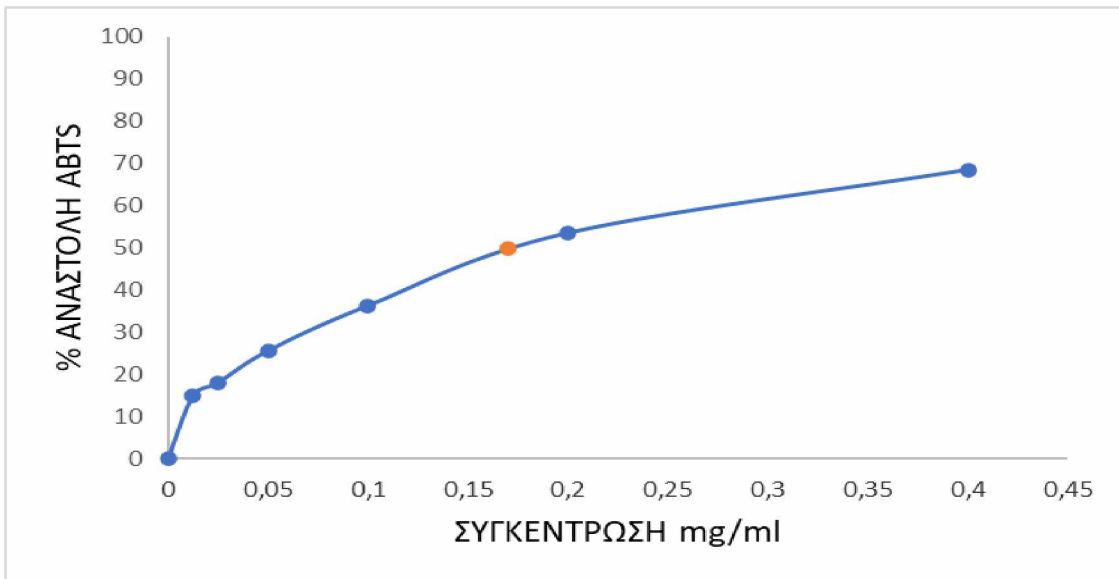
Διάγραμμα 8.2 Ανασταλτική συγκέντρωση IC<sub>50</sub> Μοσχάτο 2019 5% φυτική ίνα



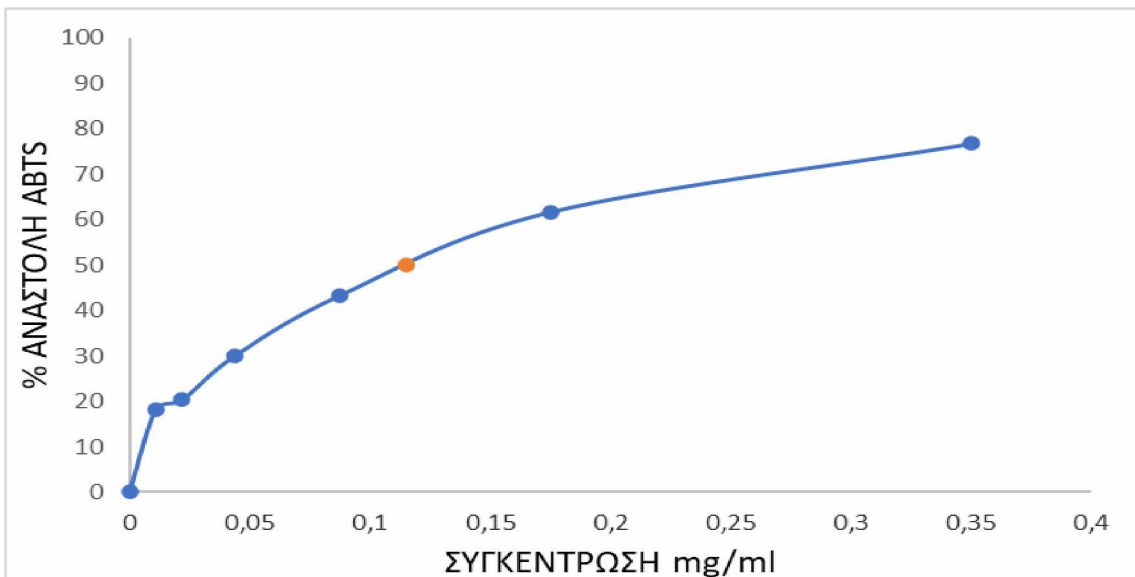
Διάγραμμα 9.1 ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Μοσχάτο 2020 10% φυτική ίνα



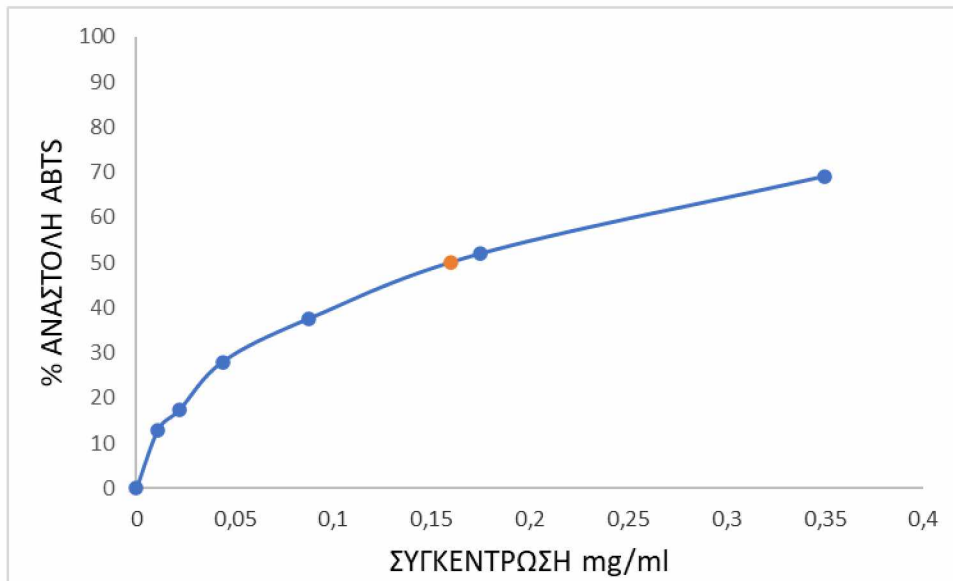
Διάγραμμα 9.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Μοσχάτο 2020 5% φυτική ίνα



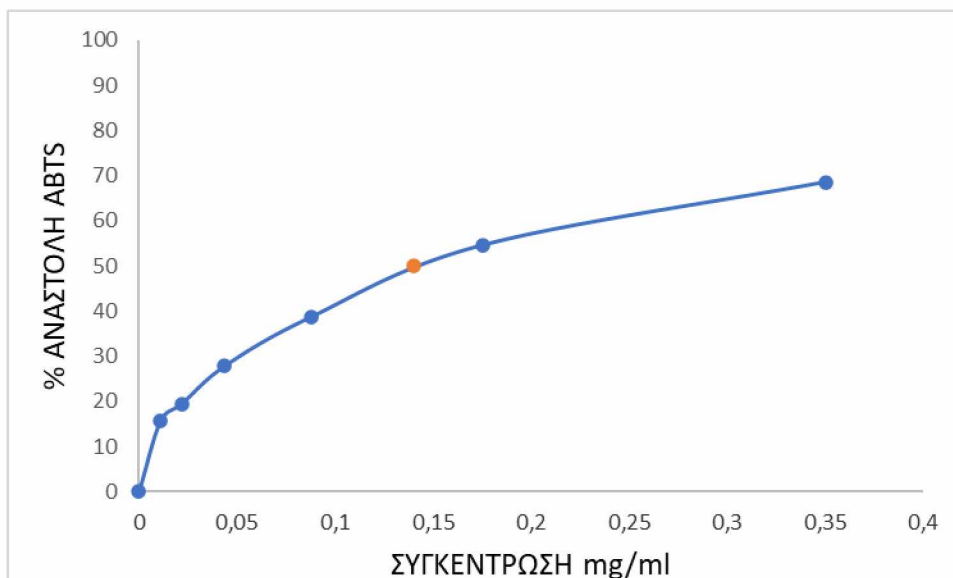
Διάγραμμα 10.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2009 10% φυτική ίνα



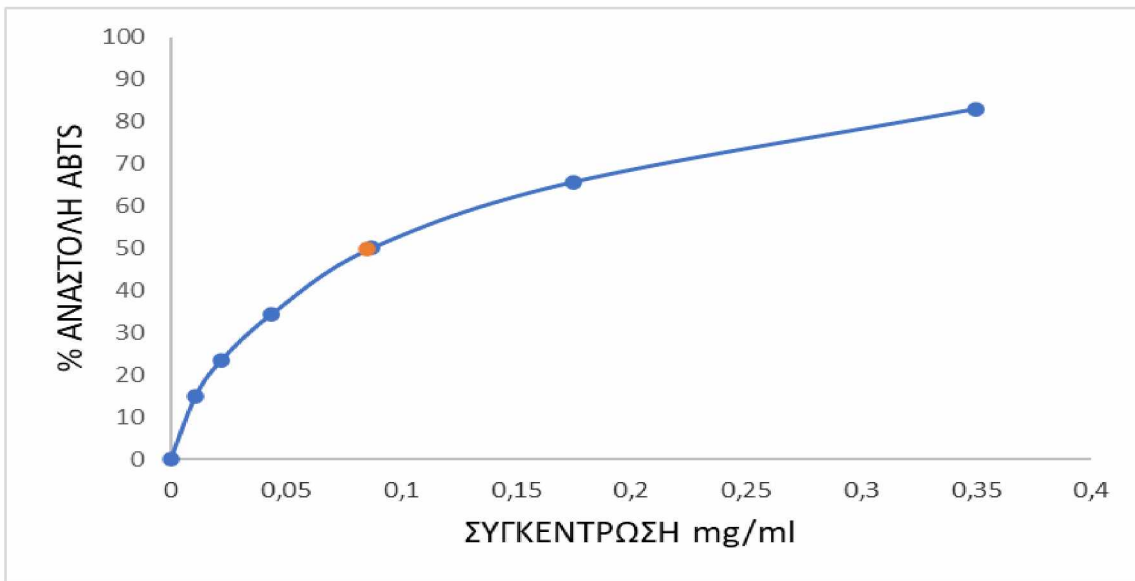
Διάγραμμα 10.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2009 5% φυτική ίνα



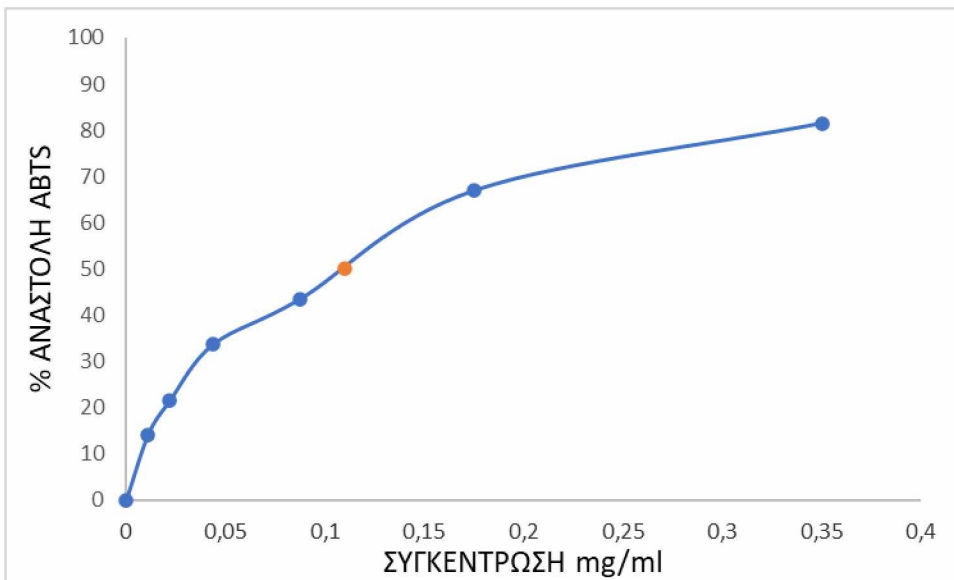
Διάγραμμα 11.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2010 10% φυτική ίνα



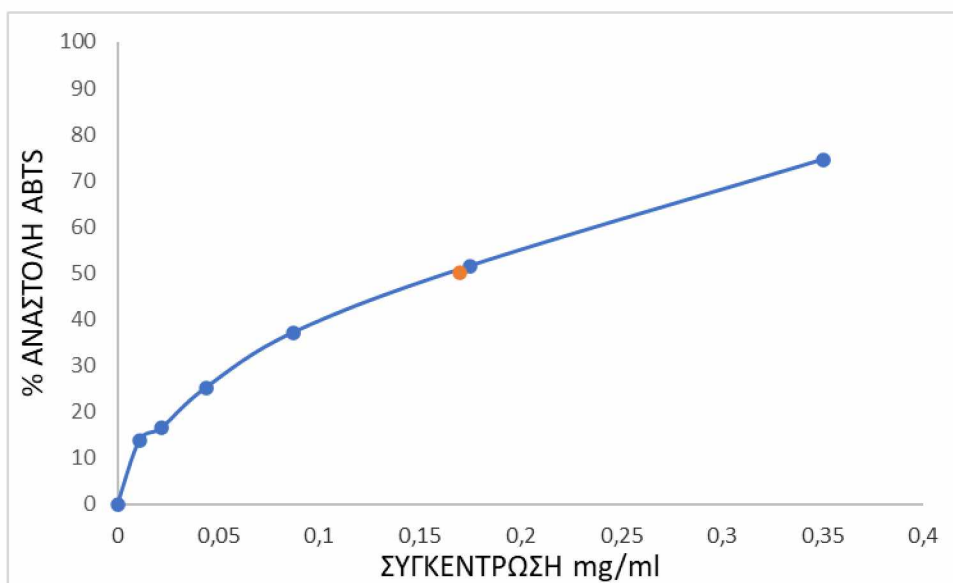
Διάγραμμα 11.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2010 5% φυτική ίνα



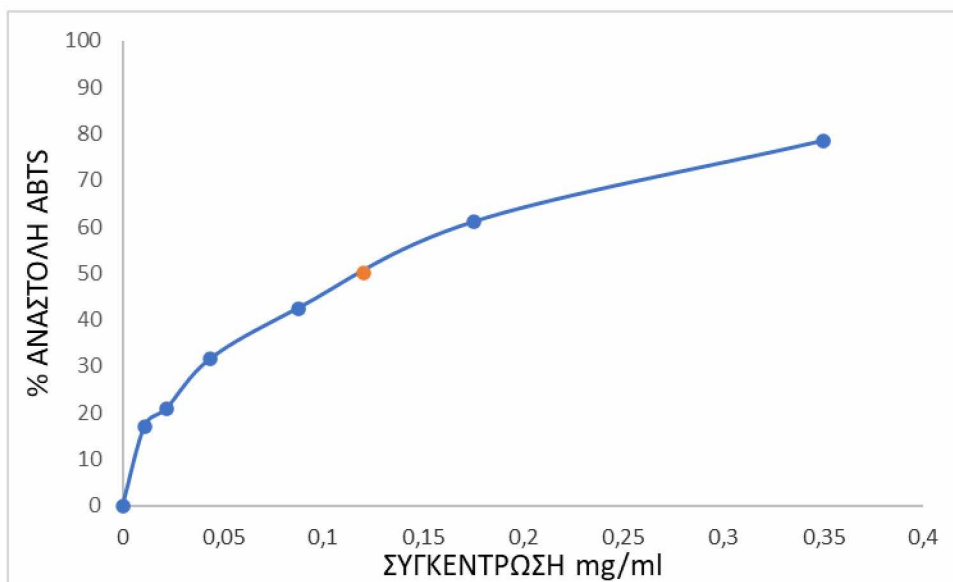
Διάγραμμα 12.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2016 10% φυτική ίνα



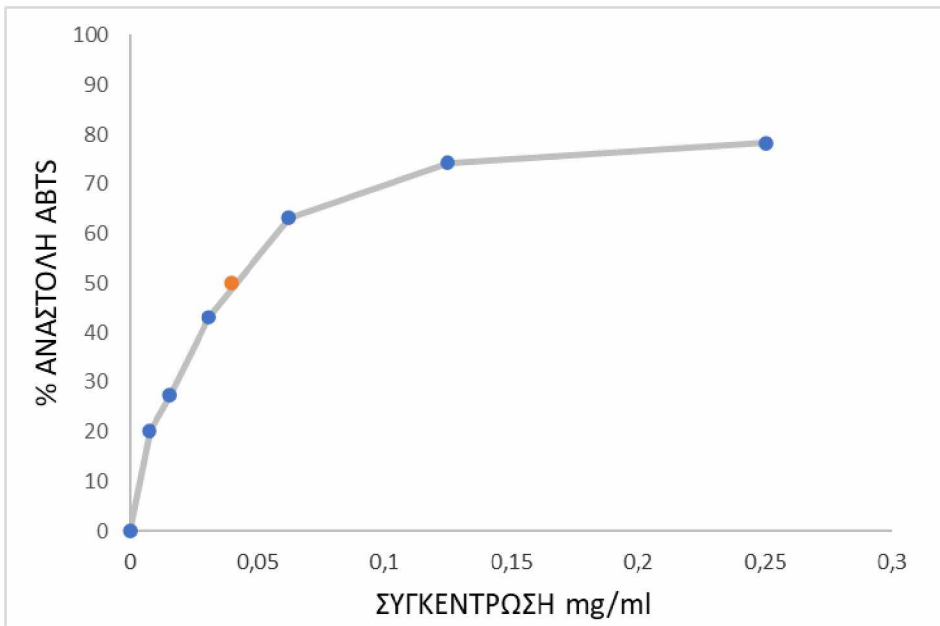
Διάγραμμα 12.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2016 5% φυτική ίνα



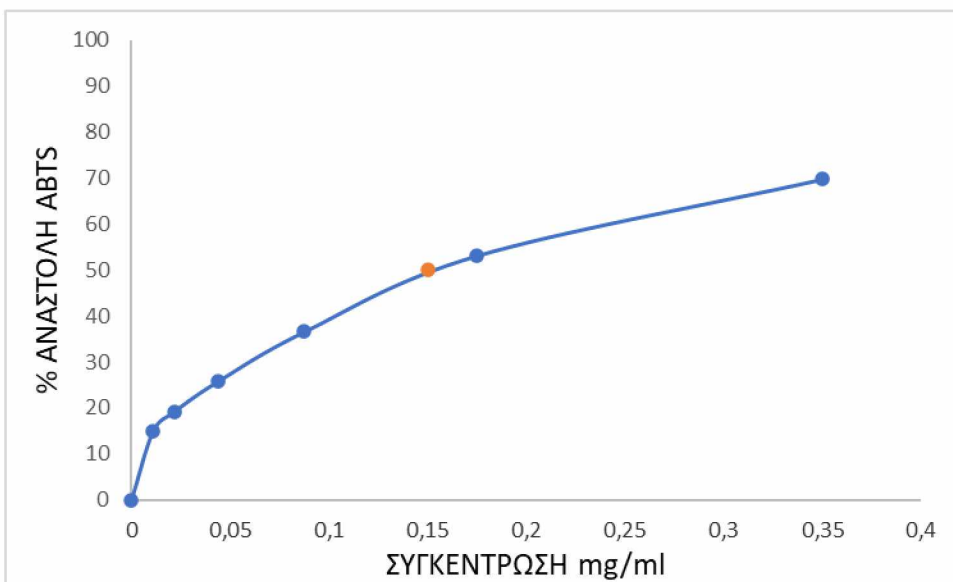
Διάγραμμα 13.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2018 10% φυτική ίνα



Διάγραμμα 13.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2018 5% φυτική ίνα

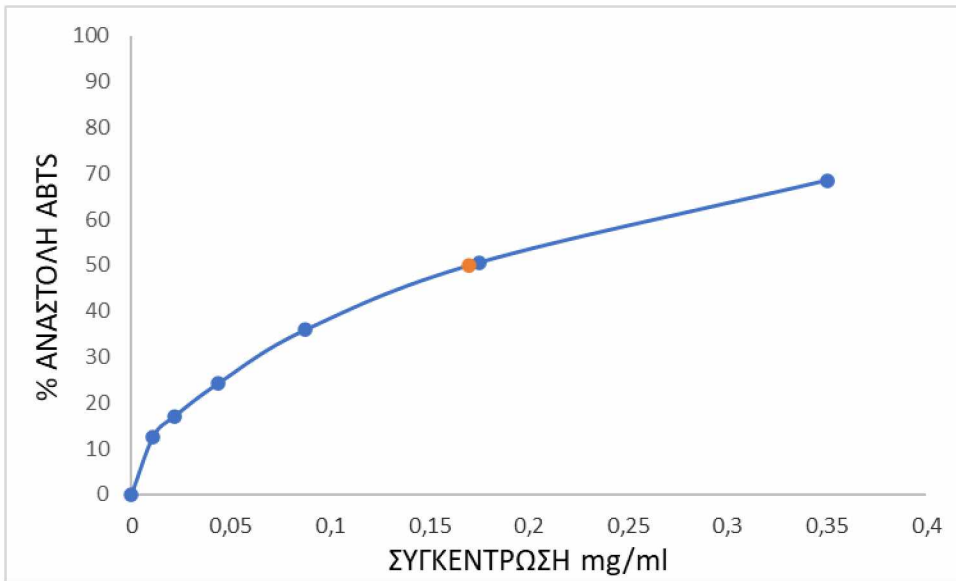


Διάγραμμα 14.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2019 10% φυτική ίνα

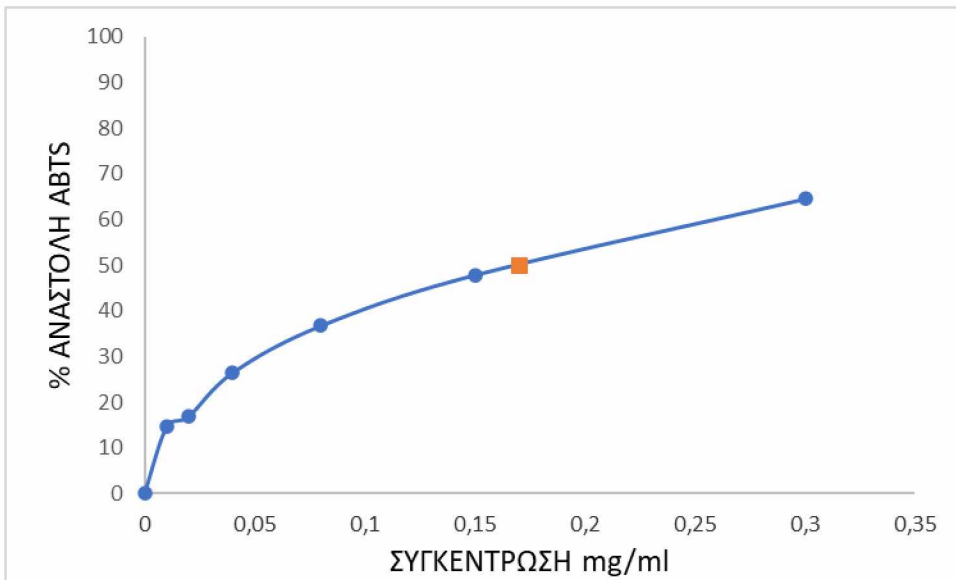


Διάγραμμα 14.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2019 5% φυτική ίνα

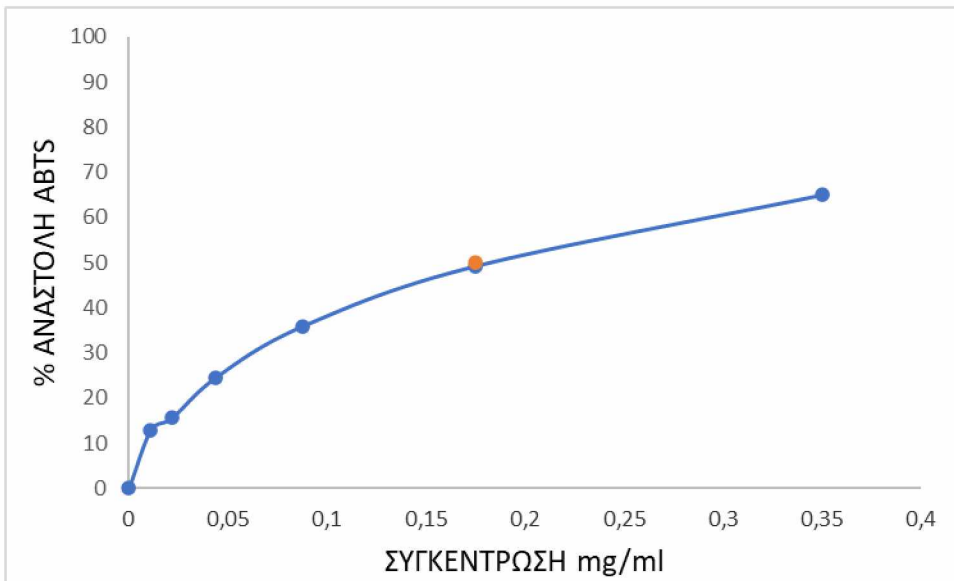




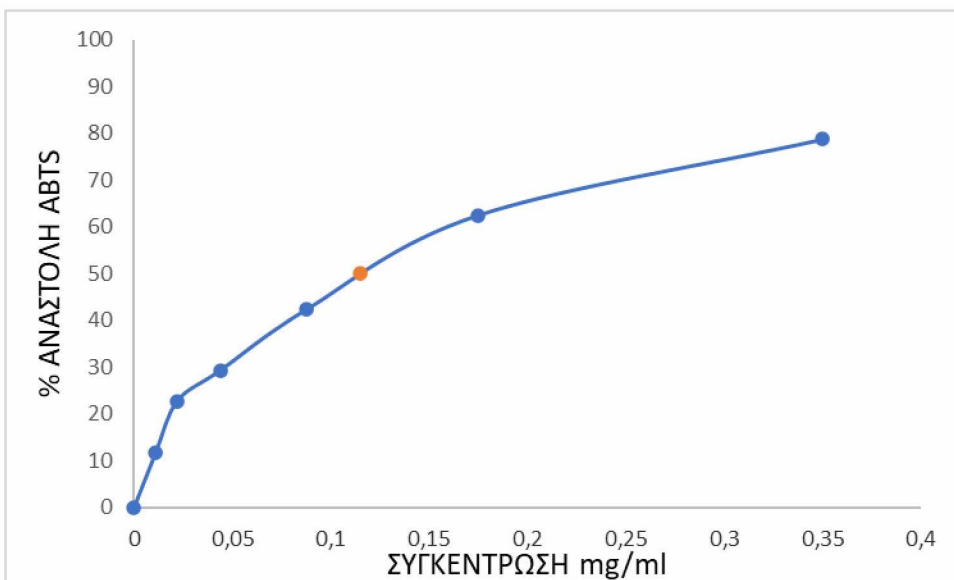
Διάγραμμα 15.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2020 10% φυτική ίνα



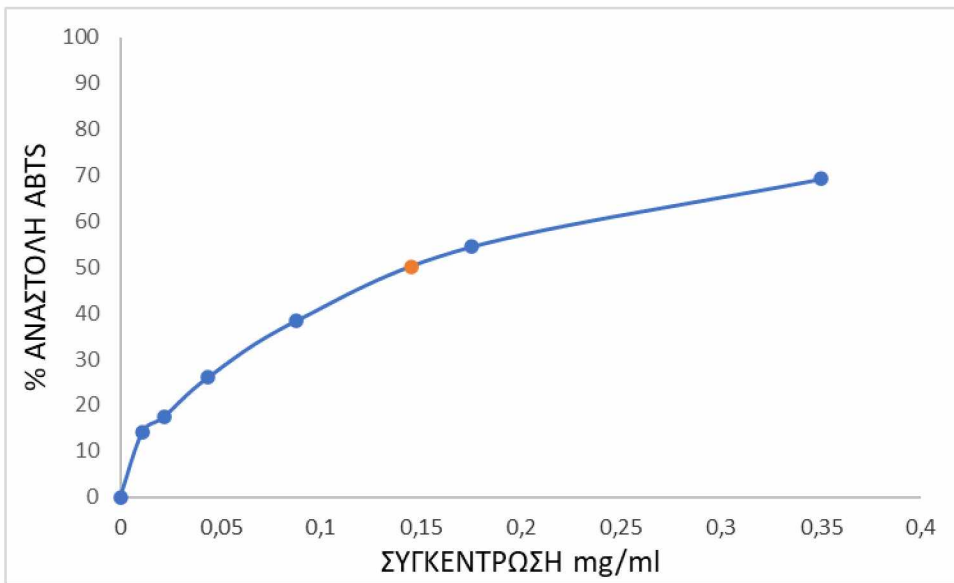
Διάγραμμα 15.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot 2020 5% φυτική ίνα



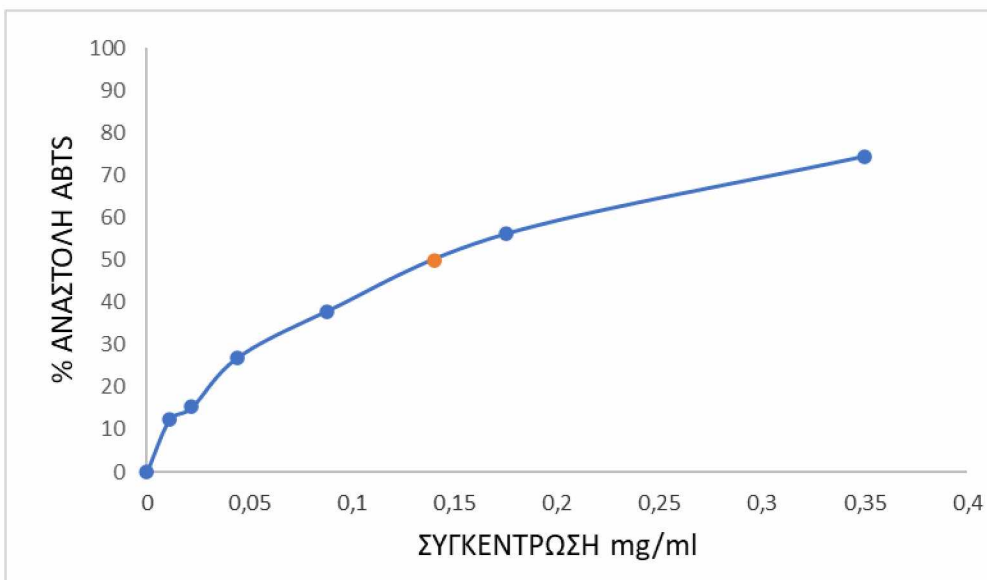
Διάγραμμα 16.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2008 10% φυτική ίνα



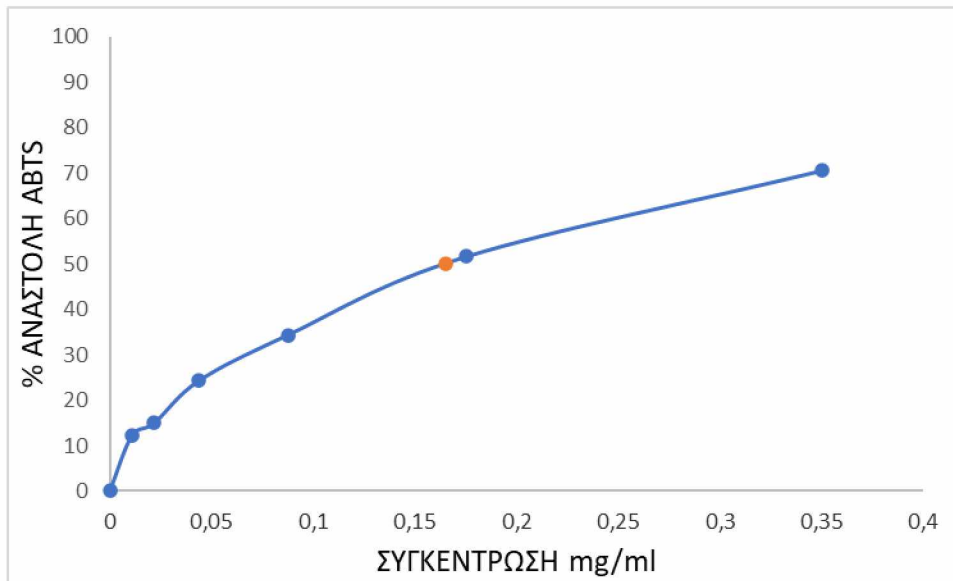
Διάγραμμα 16.2 Ανασταλτικής συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2008 5% φυτική ίνα



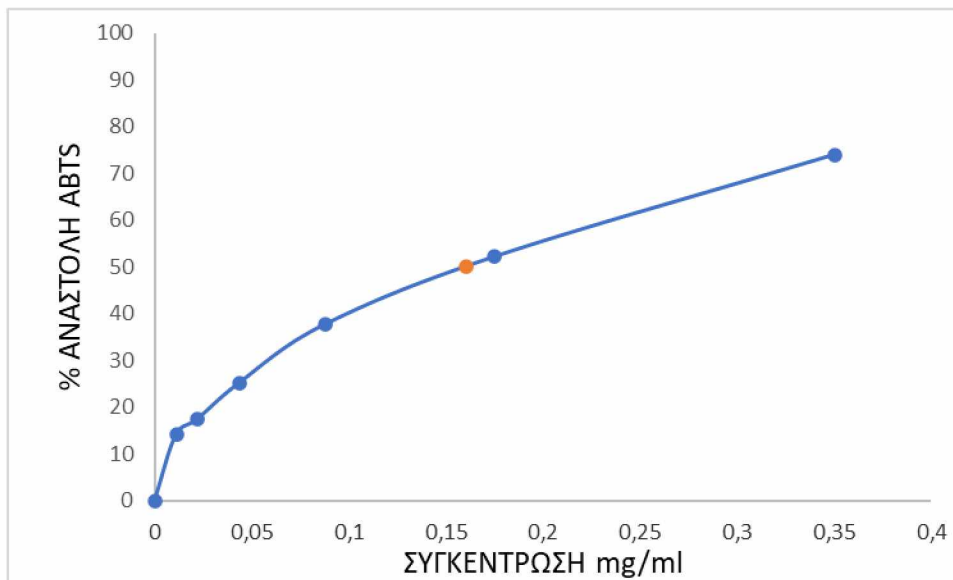
Διάγραμμα 17.1 Ανασταλτικής συγκέντρωσης  $IC_{50}$  Syrah 2009 10% φυτική ίνα



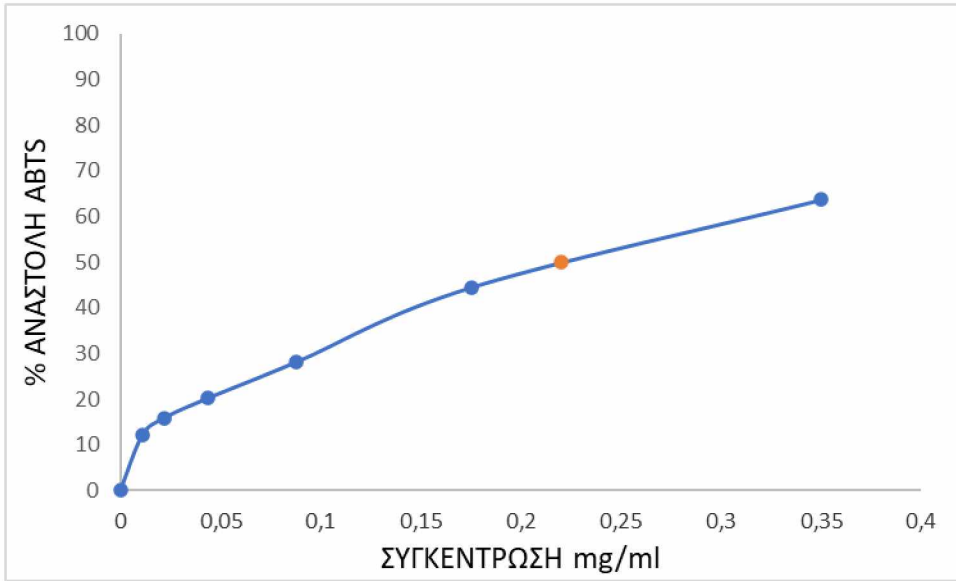
Διάγραμμα 17.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2009 5% φυτική ίνα



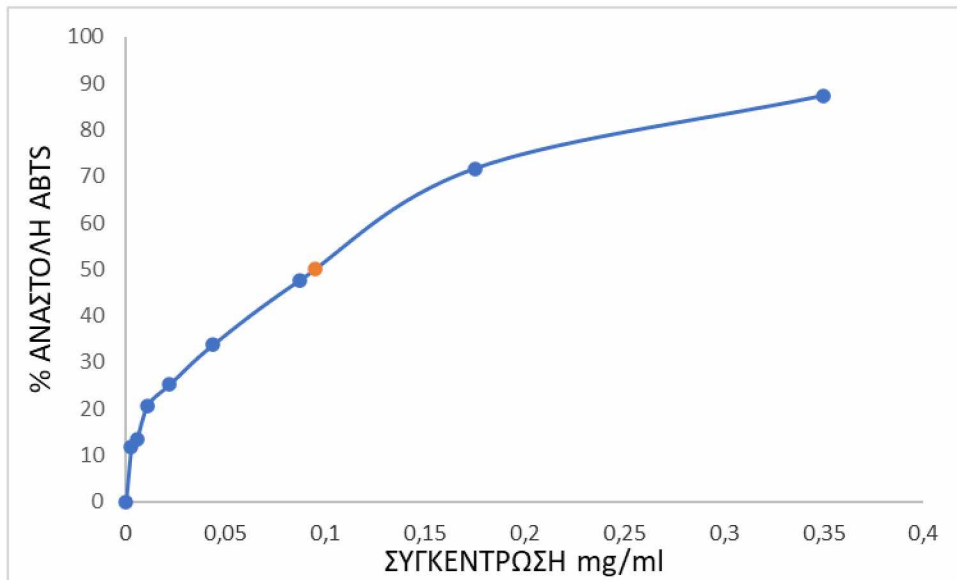
Διάγραμμα 18.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2016 10% φυτική ίνα



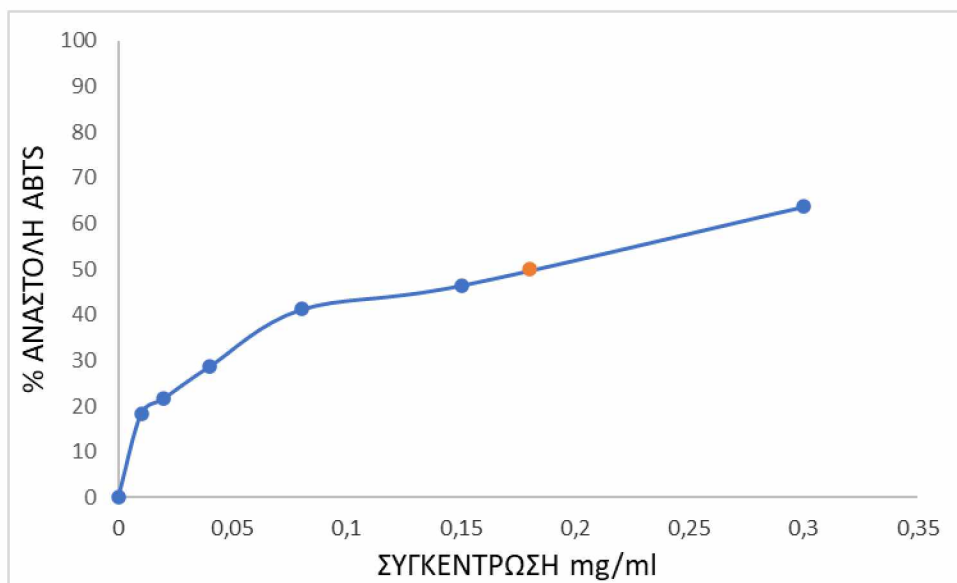
Διάγραμμα 18.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2016 5% φυτική ίνα



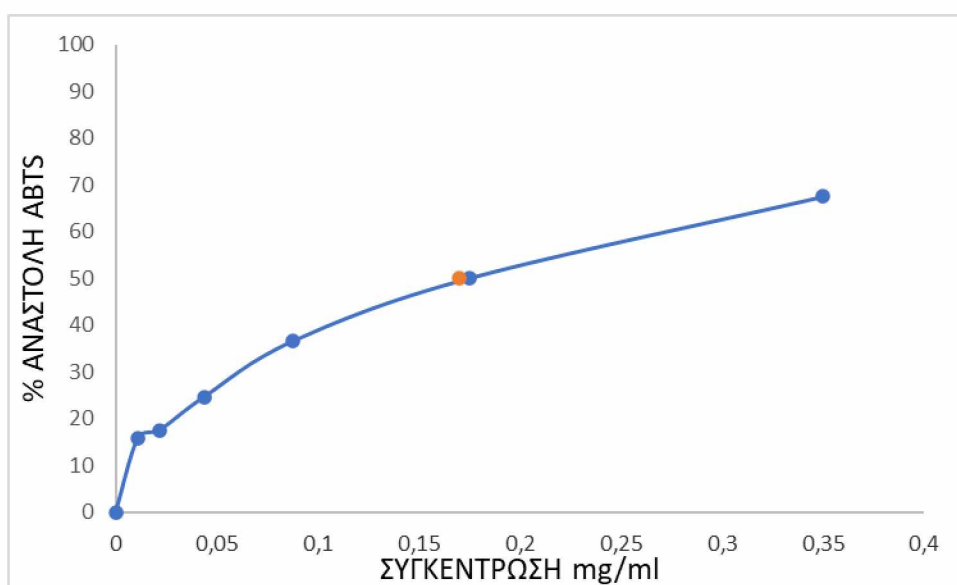
Διάγραμμα 19.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2017 10% φυτική ίνα



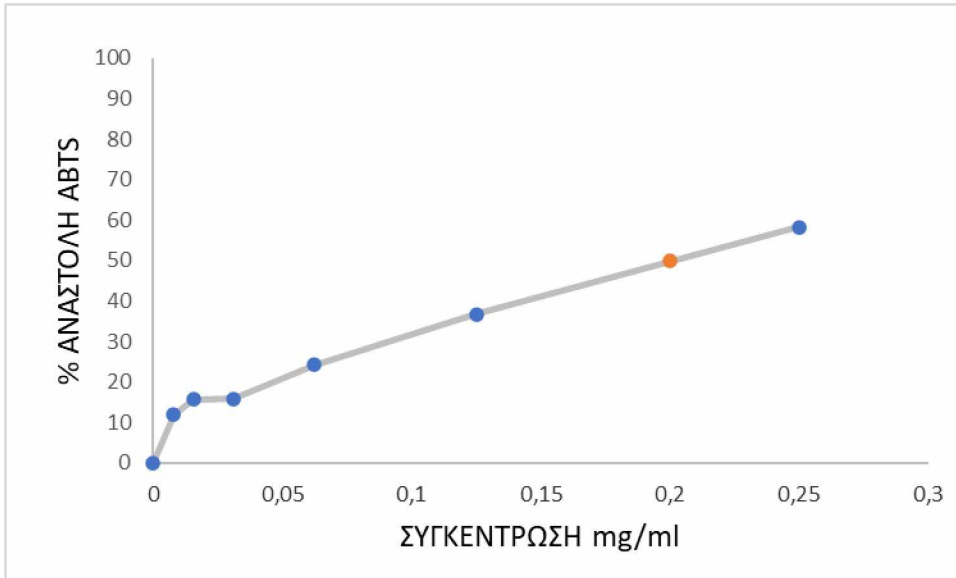
Διάγραμμα 19.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2017 5% φυτική ίνα



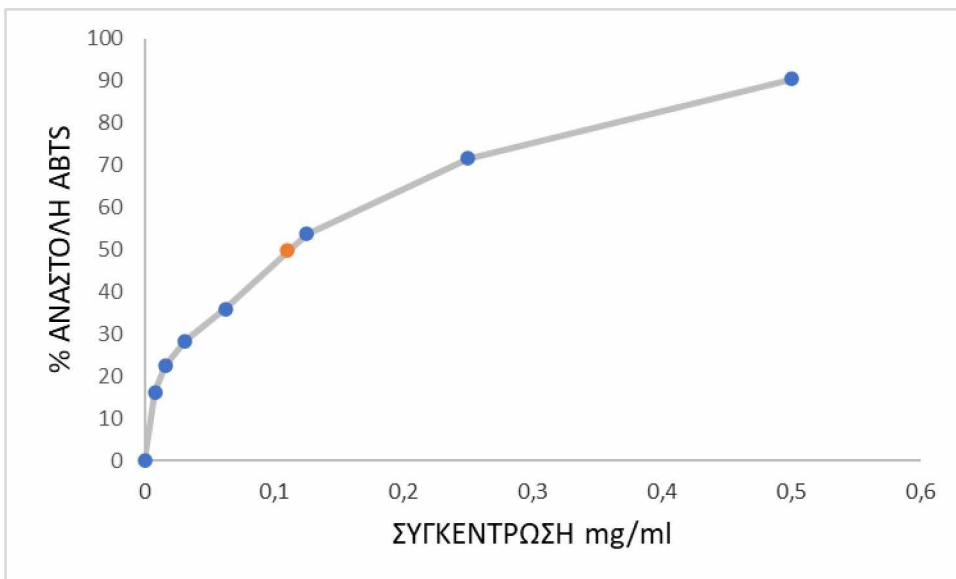
Διάγραμμα 20.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2019 10% φυτική ίνα



Διάγραμμα 20.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2019 5% φυτική ίνα

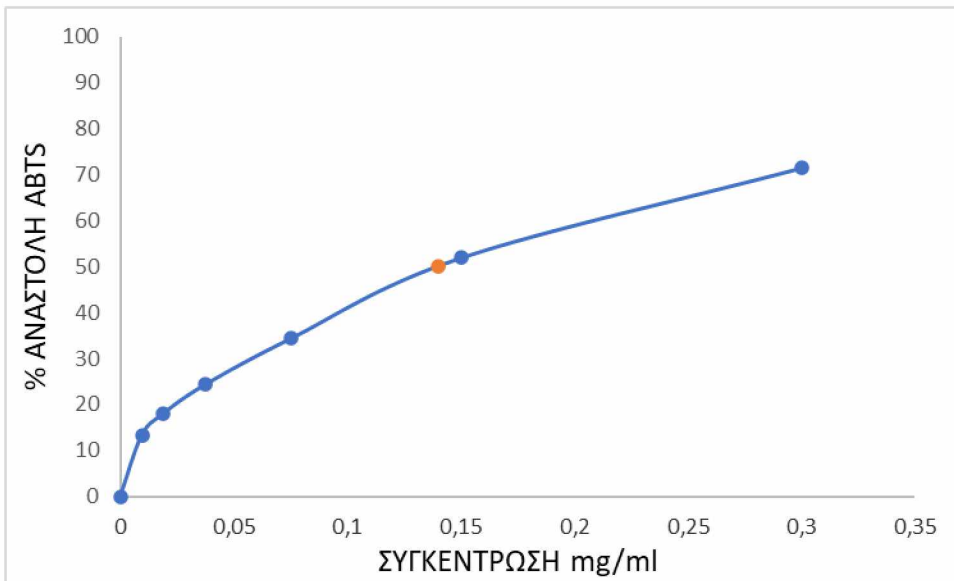


Διάγραμμα 21.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2020 10% φυτική ίνα

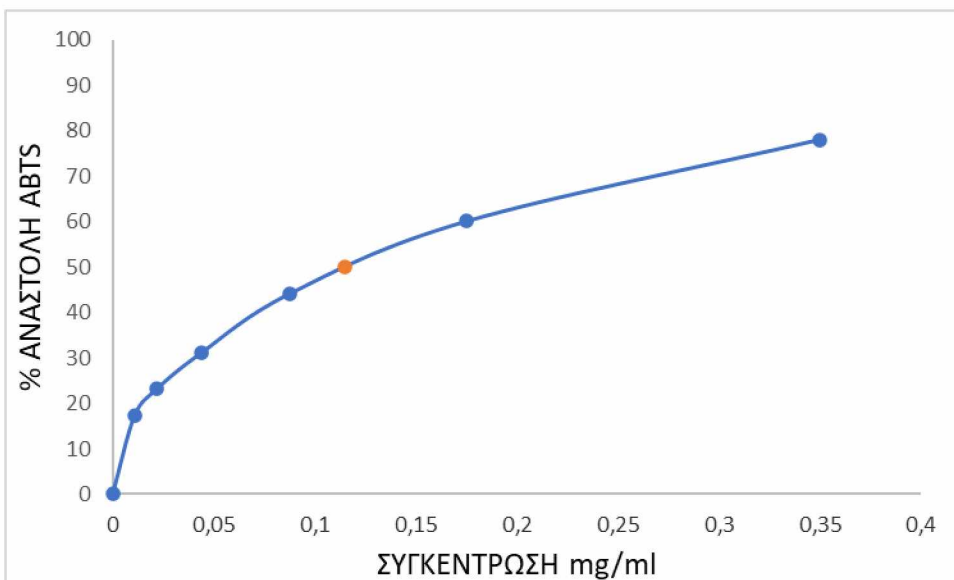


Διάγραμμα 21.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Syrah 2020 5% φυτική ίνα

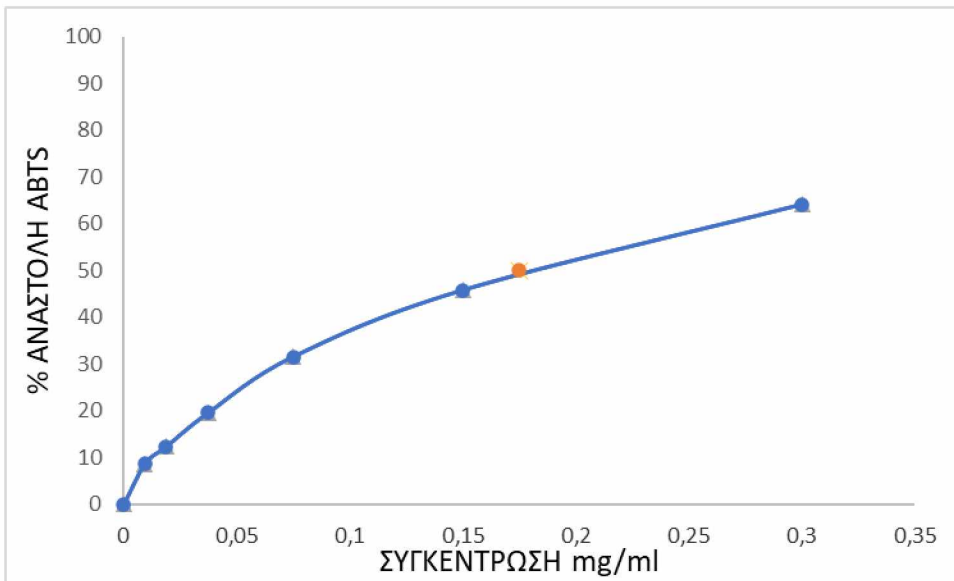




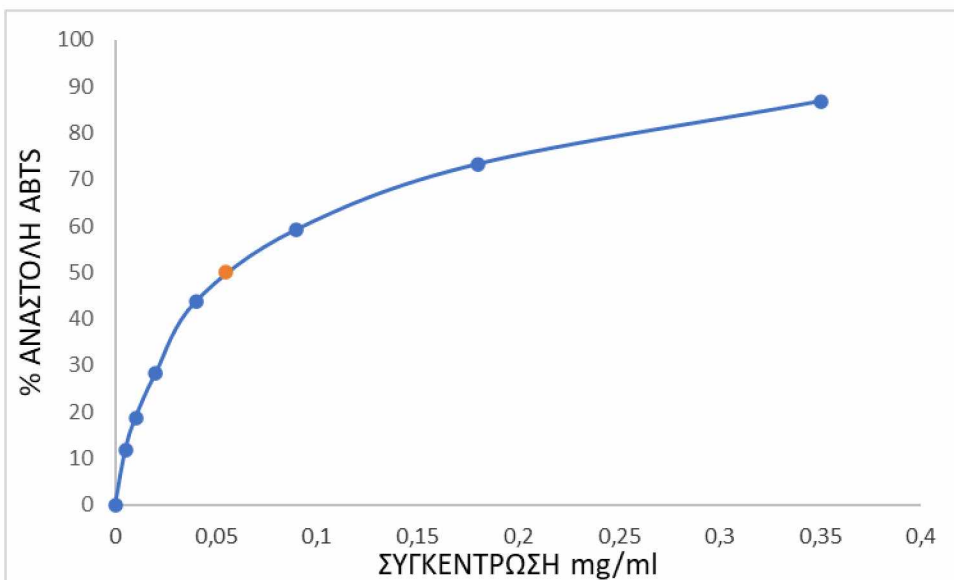
Διάγραμμα 22.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Cabernet 2008 10% φυτική ίνα



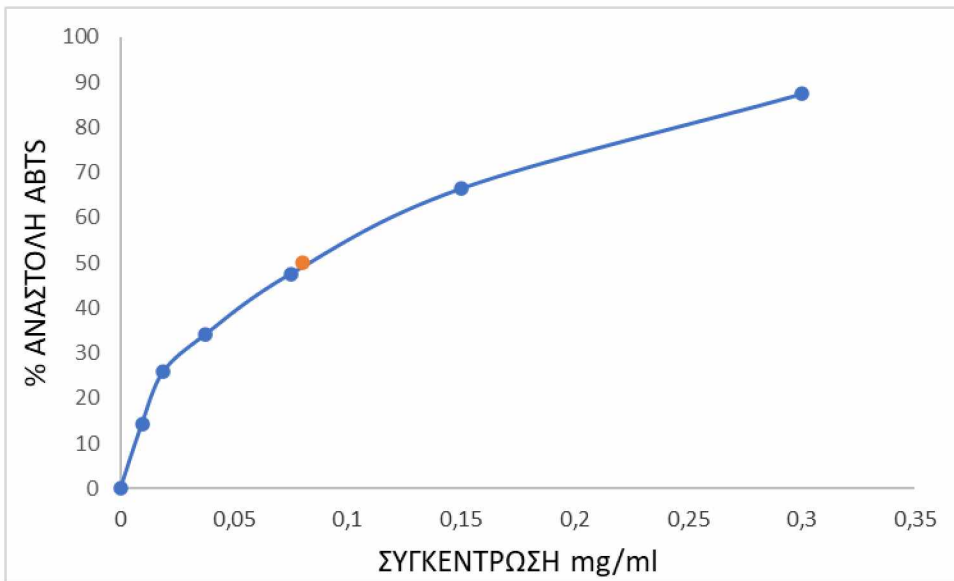
Διάγραμμα 22.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Cabernet 2008 5% φυτική ίνα



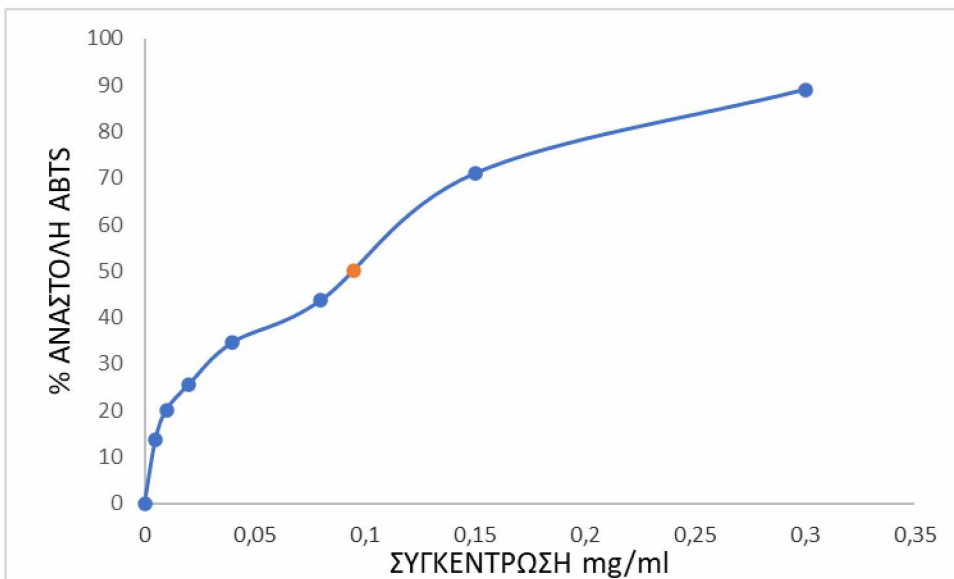
Διάγραμμα 23.1 Ανασταλτικής συγκέντρωσης  $IC_{50}$  Cabernet 2009 10% φυτική ίνα



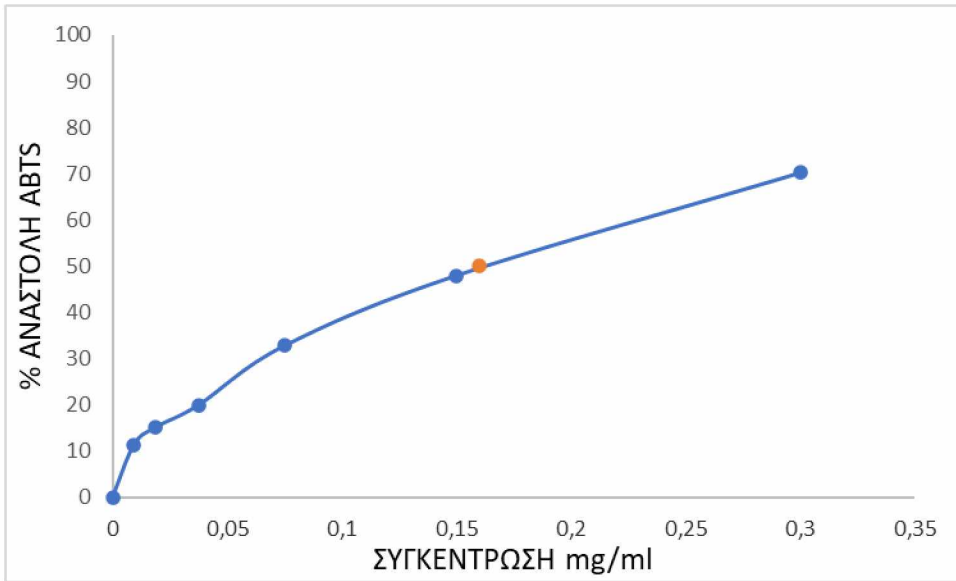
Διάγραμμα 23.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Cabernet 2009 5% φυτική ίνα



Διάγραμμα 24.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο 2016  
10% φυτική ίνα

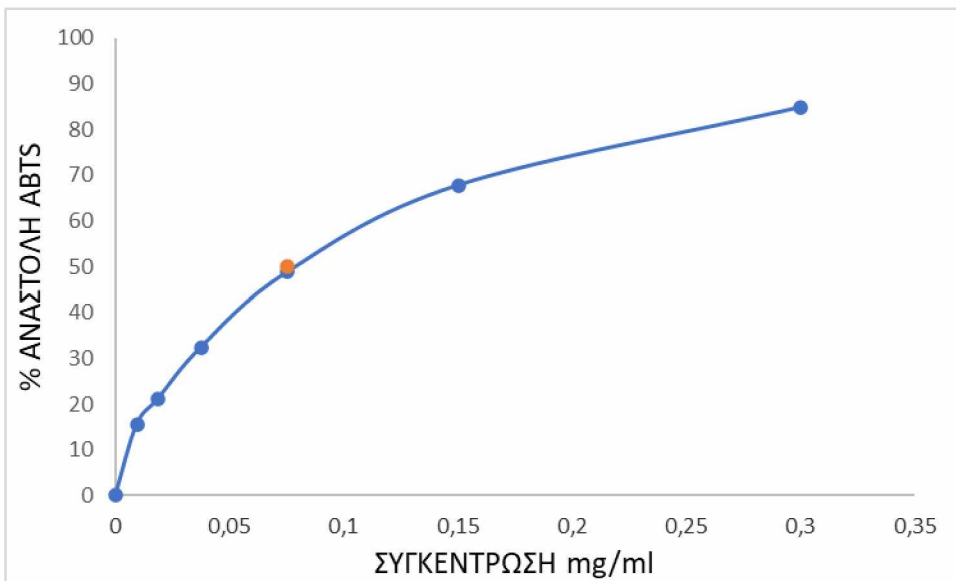


Διάγραμμα 24.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο 2016  
5% φυτική ίνα



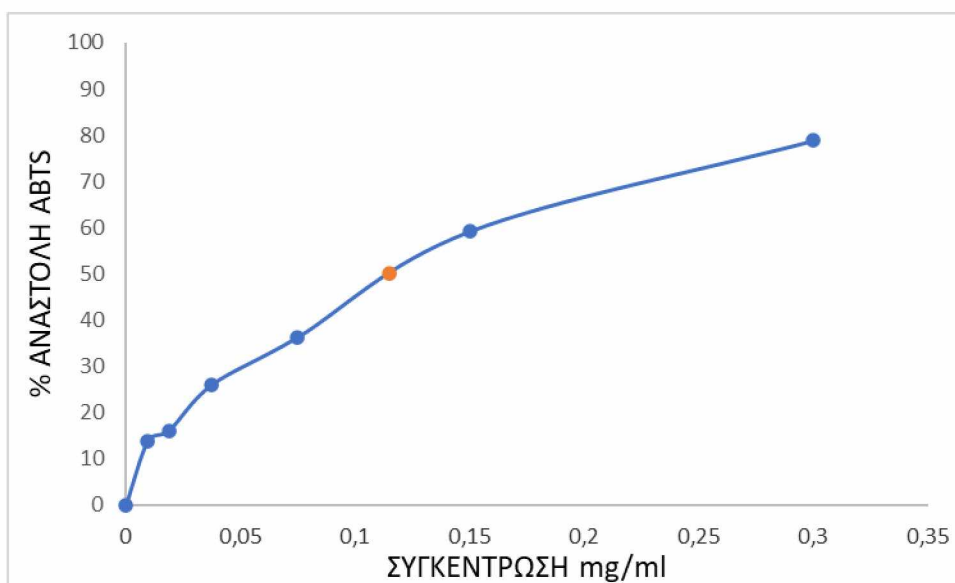
Διάγραμμα 25.1 Ανασταλτική συγκέντρωση IC<sub>50</sub> Λημνιώννα-Merlot 2019 10% φυτική

ίνα



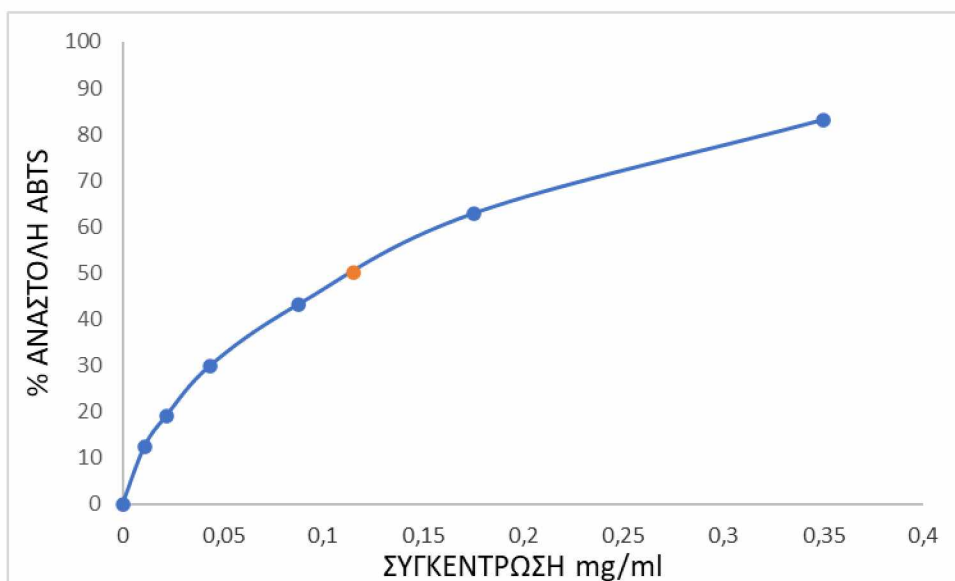
Διάγραμμα 25.2 Ανασταλτική συγκέντρωση IC<sub>50</sub> Λημνιώννα-Merlot 2019 5% φυτική

ίνα



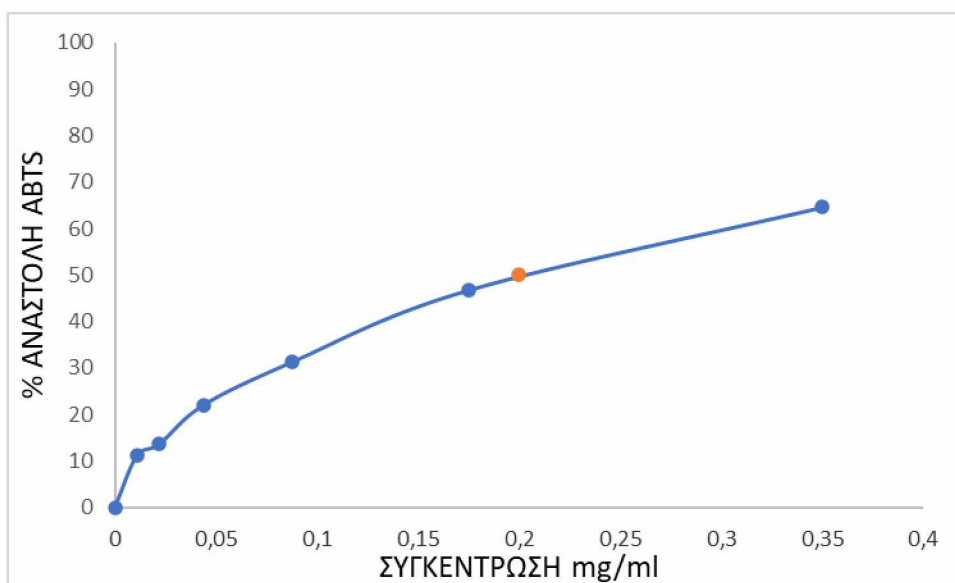
Διάγραμμα 26.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Αγιωργίτικο-Λημνιώννα 2017 10%

φυτική ίνα



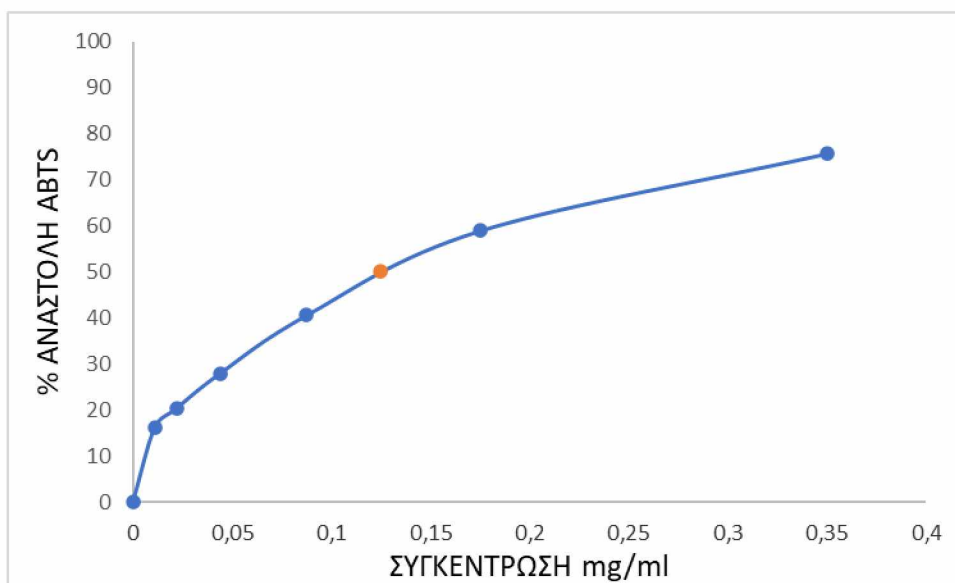
Διάγραμμα 26.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Αγιωργίτικο-Λημνιώννα 2017 5%

φυτική ίνα



Διάγραμμα 27.1 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot-Cabernet 2018 10%

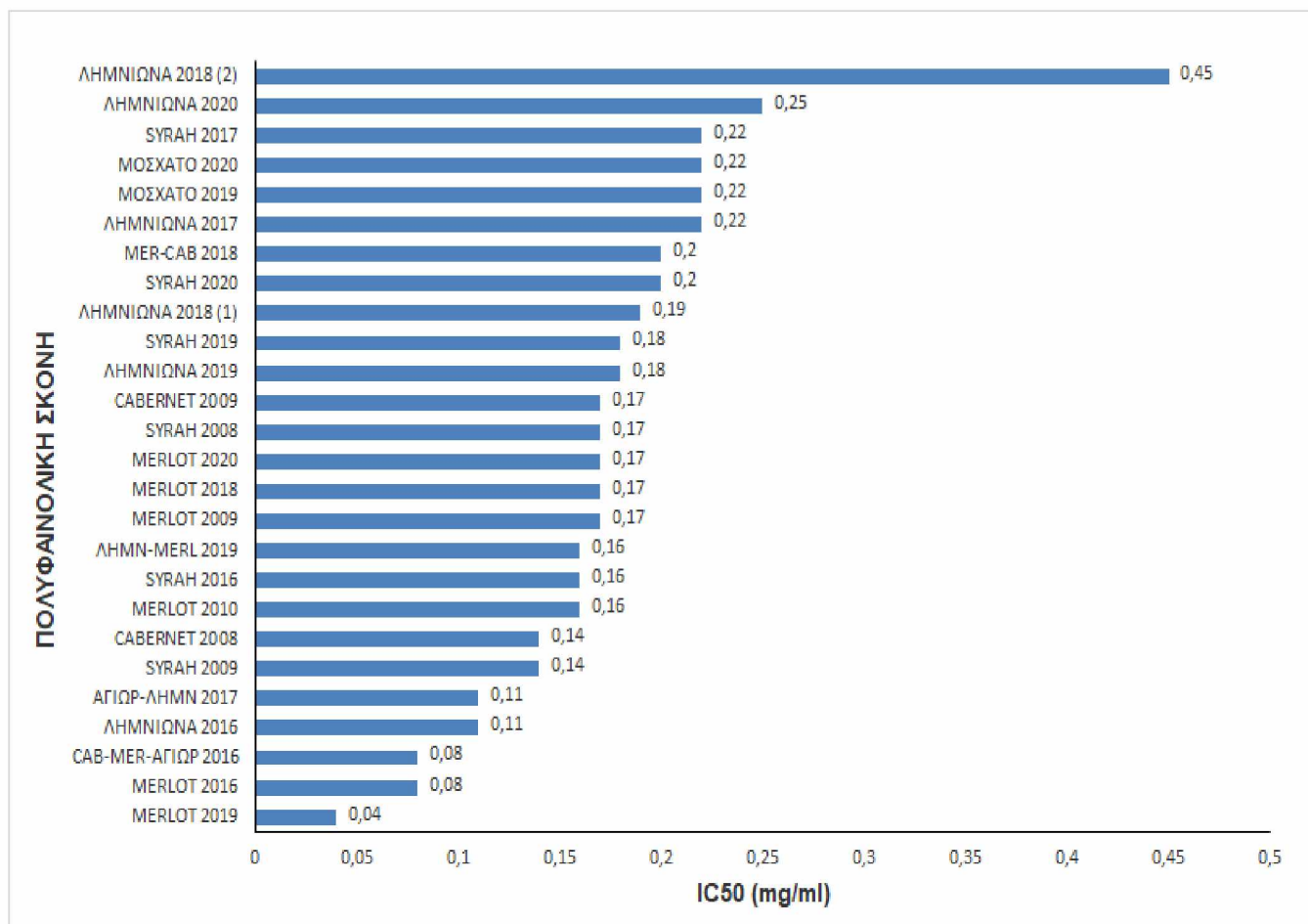
φυτική ίνα



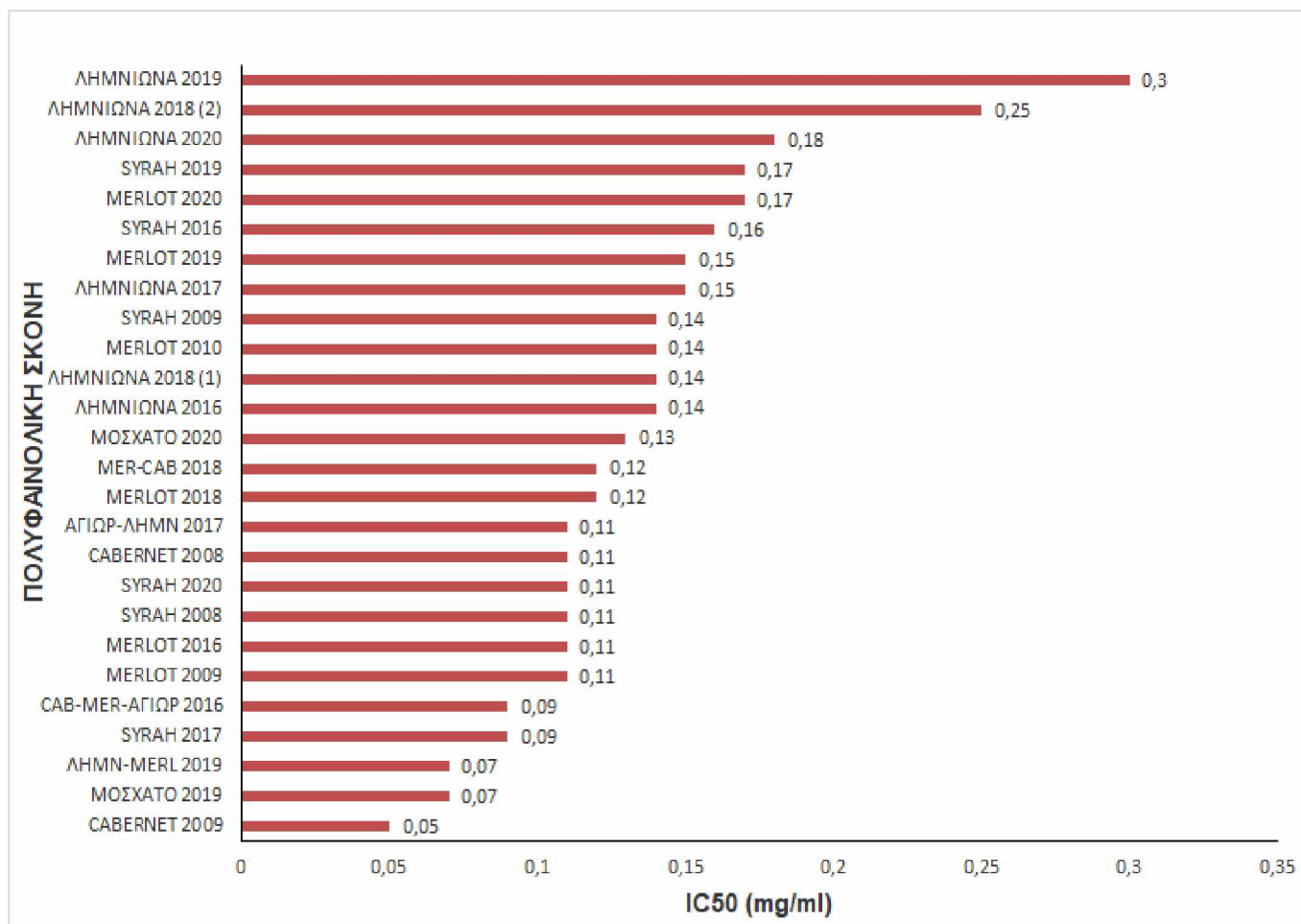
Διάγραμμα 27.2 Ανασταλτική συγκέντρωση  $IC_{50}$  Merlot-Cabernet 2018 5% φυτική

ίνα

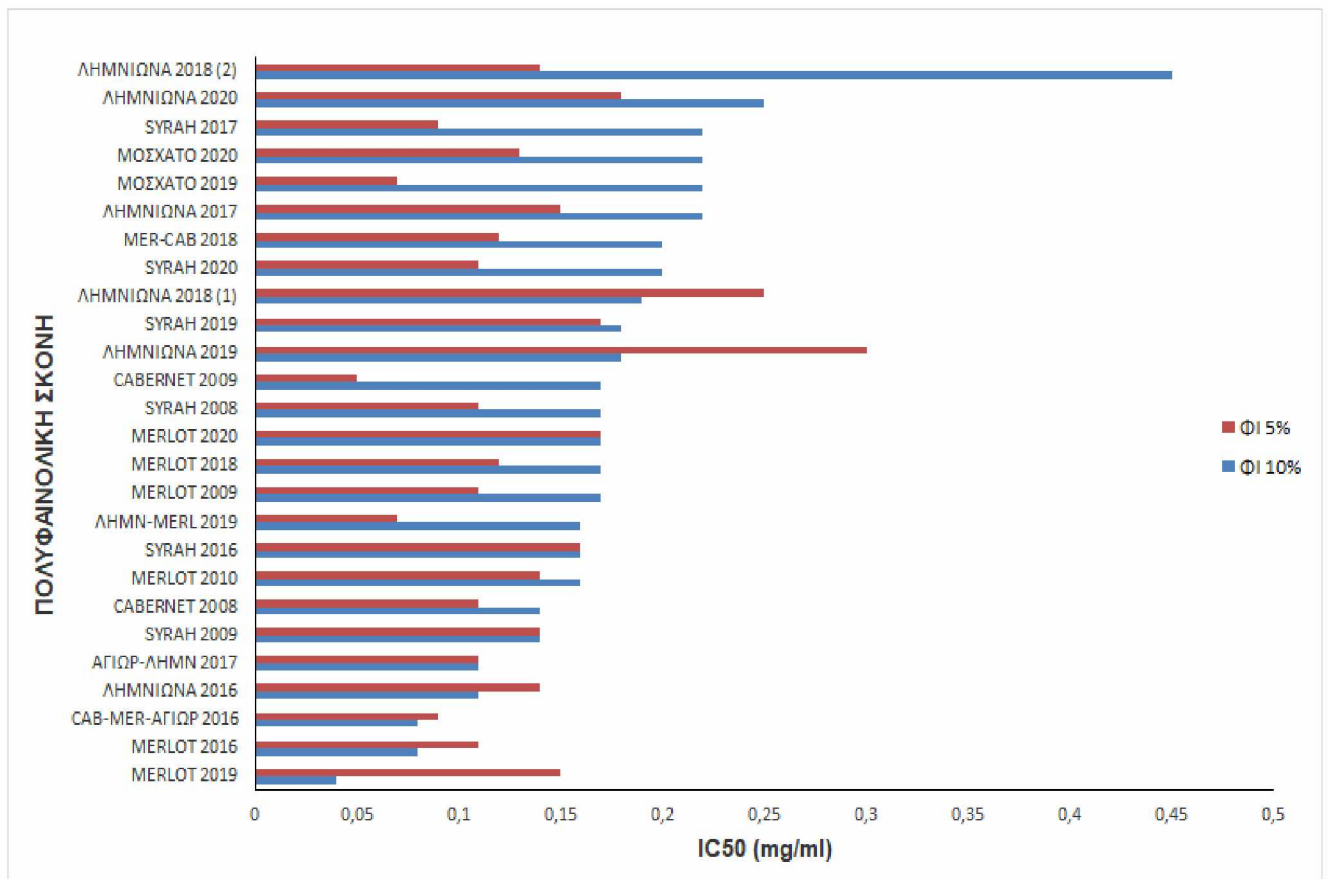




Διάγραμμα 28.1 Συγκεντρωτικό διάγραμμα τιμών IC<sub>50</sub> κρασιών περιεκτικότητας 10% σε φυτική ίνα.



Διάγραμμα 28.2 Συγκεντρωτικό διάγραμμα τιμών IC<sub>50</sub> κρασιών περιεκτικότητας 5% σε φυτική ίνα



Διάγραμμα 29. Συγκεντρωτικό διάγραμμα τιμών  $IC_{50}$  κρασιών περιεκτικότητας 5% και 10% σε φυτική ίνα.

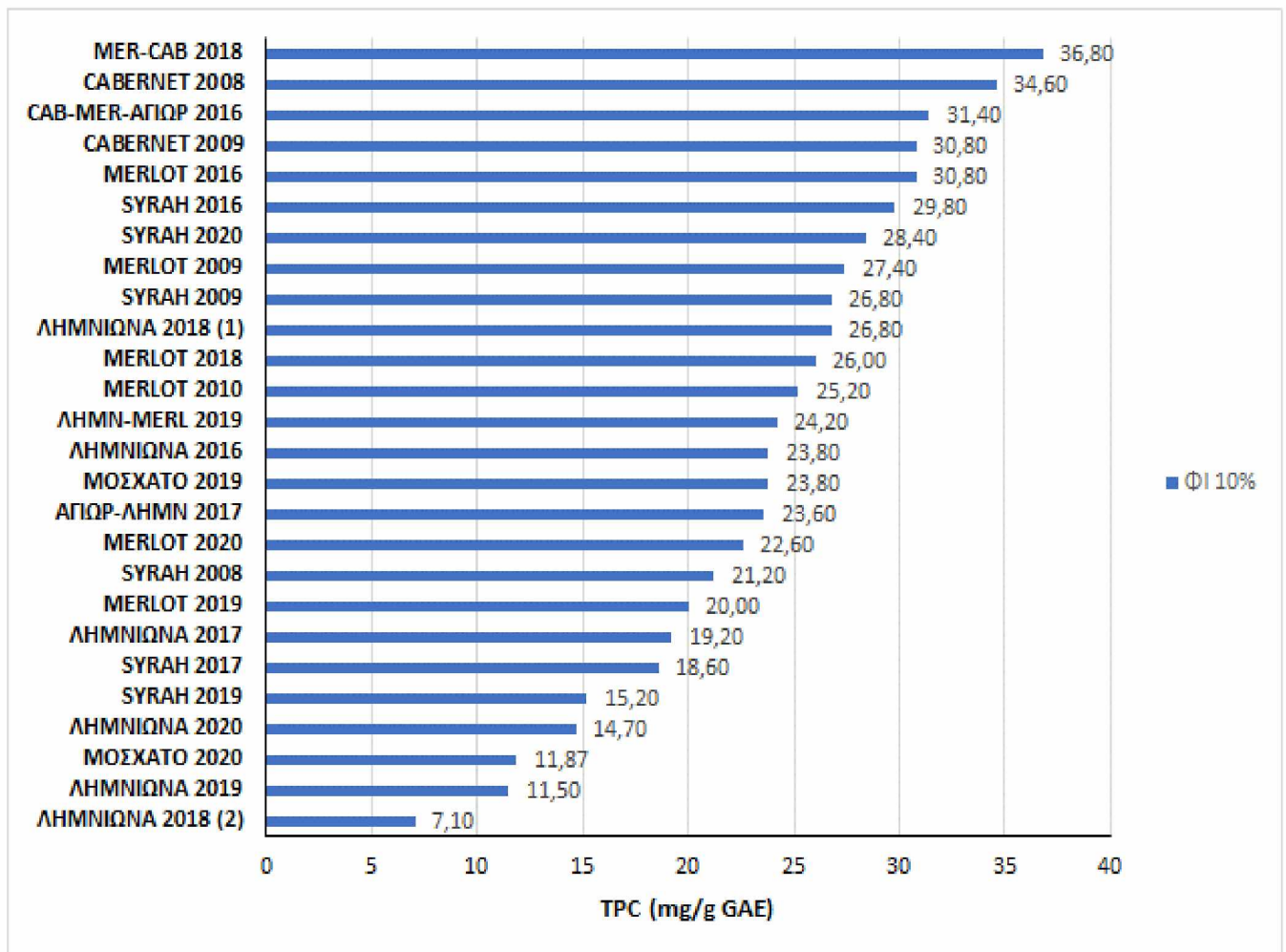
## 2.6.2 Προσδιορισμός ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Ο προσδιορισμός του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των σκονών από τη λυοφιλοποίηση των κρασιών έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

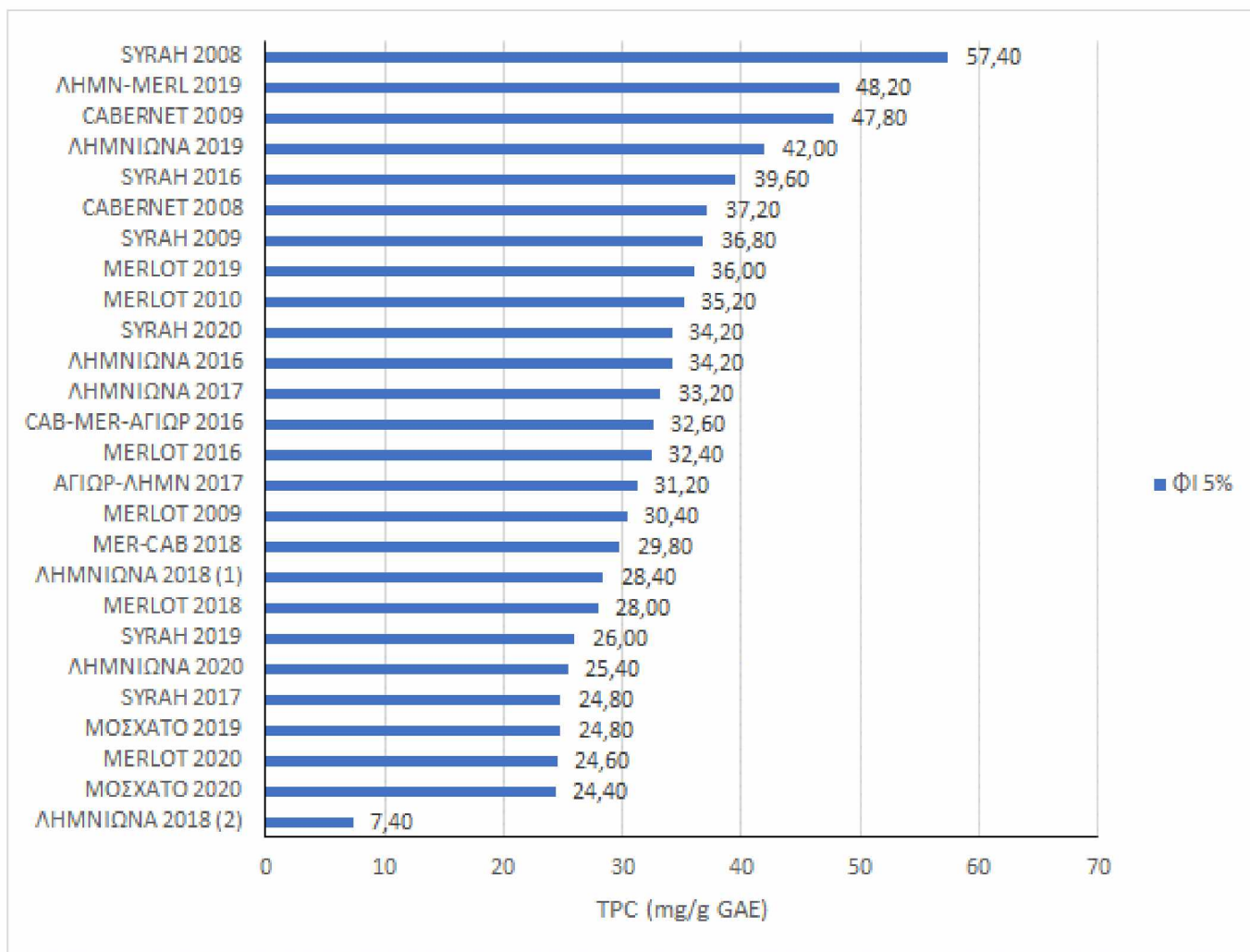
Η πολυφαινολική σκόνη με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα πολυφαινολών είναι η σκόνη Syrah 2008 5% φυτική ίνα με τιμή 57,4 mg/g βάρους GAE, ενώ υψηλές τιμές παρουσιάζουν επίσης τα Λημνιώννα-Merlot 2019 με τιμή 48,2 mg/g βάρους GAE και το Cabernet 2009 5% φυτική ίνα με τιμή 47,8 mg/g βάρους GAE. Και οι τρεις αυτές σκόνες προέκυψαν από ενθυλάκωση σε 5% φυτική ίνα.

Στα δείγματα περιεκτικότητας 10% φυτική ίνα οι τρεις σκόνες με το περισσότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο ήταν το Merlot-Cabernet 2018, Cabernet 2008, Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο με τιμές 36,8, 34,6 και 31,4 mg/g βάρους GAE, αντίστοιχα.

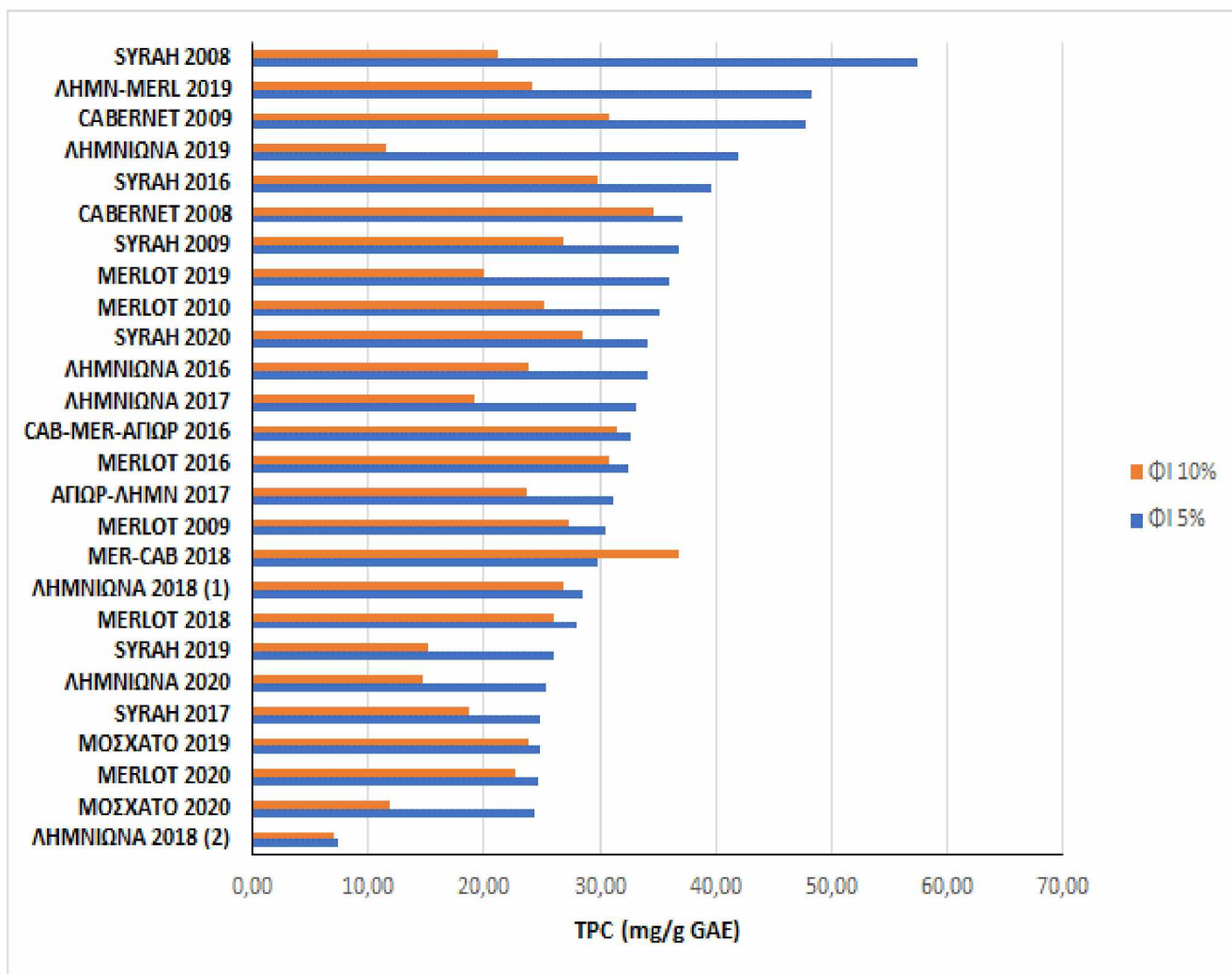
Στα παρακάτω διαγράμματα 31.1, 31.2 και 31.3 απεικονίζονται οι τιμές ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου για τις πολυφαινολικές σκόνες με 5% και 10% φυτική ίνα.



Διάγραμμα 31.1 Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποτελεσμάτων περιεκτικότητας ολικών πολυφαινόλων στις σκόρες με 10% φυτική ίνα.



Διάγραμμα 31.2 Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποτελεσμάτων περιεκτικότητας ολικών πολυφαινόλων στις σκόνες με 5% φυτική ίνα.



Διάγραμμα 32. Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποτελεσμάτων περιεκτικότητας ολικών πολυφαινολών στις σκόνες με 5% και 10% φυτική ίνα.



### 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κατανάλωση κόκκινου κρασιού έχει αποδειχθεί σημαντικός παράγοντας για την πρόληψη διάφορων σημαντικών ασθενειών του ανθρώπου όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος και το Alzheimer (Visioli et al, 2020, Rodrigo et al., 2011). Αυτές οι ευεργετικές του για την ανθρώπινη υγεία δράσεις αποδίδονται κυρίως στις πολυφαινόλες που περιέχει (Visioli et al, 2020, Rodrigo et al., 2011). Ωστόσο η κατανάλωση κρασιού προκειμένου να υπάρξει εκμετάλλευση των ιδιοτήτων των πολυφαινόλων του παρουσιάζει προβλήματα όπως: i) η κατανάλωση του πρέπει να είναι μέτρια για να αποφευχθούν προβλήματα υγείας από την αιθανόλη που περιέχει και ii) ηθικοί και θρησκευτικοί λόγοι μπορεί να αποτρέπουν ομάδες πληθυσμού από κατανάλωση κρασιού. Ενώ αν απομονωθούν από το κρασί οι πολυφαινόλες του σε μορφή σκόνης μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα ή να προστεθούν σε βιολειτουργικά τρόφιμα. Μία αποτελεσματική μέθοδος για τη δημιουργία πολυφαινολικών σκονών είναι η κρυοξηρανση (freeze-drying) με την οποία προστατεύονται από θερμοδιάσπαση ή χημικές αλλαγές (π.χ. οξειδωση) (Fang et al., 2010). Έτσι, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή πολυφαινολικών σκονών από κρασιά ελληνικής παραγωγής οι οποίες ενθυλακώθηκαν σε φυτική ίνα πορτοκαλιού (ΦΙ), έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα και για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων ή καλλυντικών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 25 κόκκινα κρασιά ελληνικής παραγωγής. Ορισμένα κρασιά ήταν μονοποικιλιακά ενώ άλλα προέρχονταν από συνδυασμούς ποικιλιών. Οι τύποι κρασιών που μελετήθηκαν ήταν τα μονοποικιλιακά Merlot, Cabernet, Syrah, Μοσχάτο, Λημνιώνα καθώς και οι συνδυασμοί ποικιλιών Merlot-Cabernet, Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο, Λημνιώνα-Merlot, Αγιωργίτικο-Λημνιώνα. Ορισμένα δείγματα κρασιών προέρχονταν από ίδιες ποικιλίες σταφυλιών αλλά διέφεραν ως προς τη χρονολογία ή την περιοχή παραγωγής τους.

Για την παρασκευή των πολυφαινολικών σκονών από τα κρασιά χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κρυοξηρανσης (freeze-drying), η οποία μέσω εξάχνωσης μας επέτρεψε να παραλάβουμε υψηλής ποιότητας πολυφαινολική σκόνη οι οποίες ενθυλακώθηκαν σε φυτική ίνα πορτοκαλιού, η οποία βρισκόταν σε ποσοστό 5% ή 10% στις σκόνες.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολικών σκονών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ABTS. Για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε η τιμή  $IC_{50}$ , δηλαδή η συγκέντρωσή του στην οποία αναστέλλει κατά 50% τη ρίζα ABTS. Η εξέταση έδειξε ότι όλες οι πολυφαινολικές σκόνες παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS. Οι τιμές  $IC_{50}$  των δειγμάτων κυμαίνονταν από 0,04 (Merlot 2019 5% ΦΙ) μέχρι 0,45 mg/mL (Λημνιώνα 2018 2 5% ΦΙ). Λόγω του ότι στα κρασιά η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως στις φυτικές τους πολυφαινόλες υπολογίστηκε στις παραγόμενες σκόνες το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο με τη

μέθοδο Folin-Ciocalteu. Οι τιμές ολικών πολυφαινολών κυμαίνονταν από 7,1 mg/g βάρους GAE (Λημνιώνα 2018 2 10% ΦΙ) έως 57,4 mg/g βάρους GAE (Syrah 2008 5% ΦΙ).

Η πολυφαινολική σκόνη με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σύμφωνα με την μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>+</sup> για τα δείγματα με 10% ΦΙ ήταν από το κρασί Merlot 2019 με τιμή IC<sub>50</sub> 0,04 mg/mL ενώ αυτή με τη μικρότερη από το Λημνιώνα 2018 (2) με τιμή 0,45 mg/mL. Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν επίσης τα Merlot 2016 και Cabernet-Merlot-Αγιωργίτικο 2016 με τιμή IC<sub>50</sub> 0,08 mg/ml. Επίσης, σε αυτή την κατηγορία σκονών οι πολυφαινόλες κυμαίνονταν από 7,1 mg/g βάρους GAE (Λημνιώνα 2018 2) έως 36,8 mg/g βάρους GAE (Merlot-Cabernet 2018). Παρατηρούμε ότι η σκόνη με το λιγότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, το Λημνιώνα 2018 2, είχε και τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση. Επομένως στα εξεταζόμενα η αντιοξειδωτική δράση καθοριζόταν από την ποσότητα των πολυφαινολών. Ωστόσο, το δείγμα Merlot 2019 που έδειξε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είχε μέτρια ποσότητα πολυφαινολών. Αυτό σημαίνει ότι το είδος των πολυφαινολών που περιείχονταν σε αυτό το δείγμα καθόριζαν την ισχυρή του δράση και άρα σε κάποια δείγματα η ποιοτική σύσταση των πολυφαινολών τους ήταν πιο σημαντική για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τα συμπεράσματα αυτά έχουν αναφερθεί αρκετές φορές και σε μελέτες με πολυφαινολικά εκχυλίσματα αμπέλου (Apostolou et al., 2013).

Αντίστοιχα, για τα δείγματα με περιεκτικότητα ΦΙ 5% μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να έχει το Cabernet 2009 με τιμή IC<sub>50</sub> 0,05 mg/mL και ακολουθούν τα Λημνιώνα-Merlot 2019 και Μοσχάτο 2019 με τιμή τα 0,07 mg/mL. Τη μικρότερη δράση είχε το Λημνιώνα 2019 με τιμή 0,3 mg/mL. Σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, η πολυφαινολική σκόνη με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών πολυφαινολών είναι το Syrah 2018 (57,4 mg/g βάρους GAE), ενώ αυτή με τη μικρότερη το Λημνιώνα 2018 2 (7,4 mg/g βάρους GAE). Όπως και στις σκόνες με 10% ΦΙ, υπάρχουν δείγματα που είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο (π.χ. Cabernet 2009, Λημνιώνα-Merlot 2019), αλλά και δείγματα με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και μέτριο πολυφαινολικό περιεχόμενο (π.χ. Μοσχάτο 2019) στα οποία παίζει ρόλο προφανώς η πολυφαινολική τους σύσταση για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Συγκρίνοντας τις δύο κατηγορίες πολυφαινολικών σκονών με διαφορετική περιεκτικότητα σε μεταξύ τους σε ΦΙ παρατηρούμε ότι όπως ήταν αναμενόμενο όλες οι σκόνες (εκτός από το Merlot-Cabernet 2018) με 5% ΦΙ είχαν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από αυτές με 10% ΦΙ, αφού είχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό λυοφιλοποιημένο κρασί (95% έναντι 90%). Όσον αφορά τις διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των δύο κατηγοριών σκονών, σε 9 από τα 25 δείγματα κρασιού οι διαφορές ήταν αμελητέες. Επίσης, σε 13 δείγματα οι σκόνες με 5% ΦΙ είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτές με 10% ΦΙ, προφανώς λόγω του μεγαλύτερου πολυφαινολικού περιεχομένου τους. Ωστόσο, υπήρχαν και 3 δείγματα όπου οι σκόνες με 10% ΦΙ είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτές με 5% ΦΙ. Συμπερασματικά, η χρησιμοποίηση της ΦΙ πορτοκαλιού ως ενθυλακωτικού μέσου πολυφαινολών κρασιού φαίνεται να αποδίδει

καλύτερα όσον αφορά τα βιοδραστικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης σκόνης σε περιεκτικότητα 5% σε σύγκριση με τη 10%.

Ακόμη, συγκρίνοντας τα δείγματα ως προς τη χρονολογία παραγωγής τους, δηλαδή δείγματα κρασιού που προέρχονται από διαφορετικές χρονιές παραγωγής αλλά από την ίδια ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται σε συγκεκριμένη περιοχή, παρατηρούμε ότι σε πολλές περιπτώσεις (π.χ. Merlot 2009 και 2010, Merlot 2016 και 2018) δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά το πολυφαινολικό περιεχόμενό τους και την αντιοξειδωτική τους δράση. Ωστόσο, υπήρξαν και σημαντικές διαφορές μεταξύ τέτοιων δειγμάτων στο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο και στην αντιοξειδωτική τους δράση (π.χ. Syrah 2019 και 2020) που πιθανώς οφείλονται στην επίδραση των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών ανάμεσα σε διαφορετικές χρονιές (Apostolou et al., 2013). Παρατηρήθηκε δηλαδή το γενικότερο πρόβλημα που αφορά τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων με βιοδραστικές ιδιότητες σχετικά με τη σταθερή διατήρηση της σύστασης των βιοδραστικών συστατικών τους ανάμεσα σε διαφορετικές καλλιεργητικές περιόδους.

Επίσης, συγκρίνοντας σκόνες από δείγματα κρασιού που προέρχονταν από την ίδια ποικιλία σταφυλιού που είχε όμως καλλιεργηθεί σε διαφορετικές περιοχές (π.χ. Merlot 2009, 2010 και Merlot 2016, 2018) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά το πολυφαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική δράση. Είναι όμως γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι συνθήκες του εδάφους (*terroir*) μπορούν να επηρεάσουν την πολυφαινολική σύσταση μίας ποικιλίας σταφυλιού (Cosme et al., 2020).

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στην οποία έγινε ενθυλάκωση πολυφαινολών κρασιού σε ΦΙ πορτοκαλιού. Σε άλλες μελέτες έχει γίνει ενθυλάκωση πολυφαινολών κόκκινου κρασιού με 20% μαλτοδεξτρίνη (ένα πολύ κοινό ενθυλακωτικό μέσο) με freeze-drying (Sanchez et al., 2013). Σε εκείνη τη μελέτη είχε χρησιμοποιηθεί κρασί από την ποικιλία Cabernet και η παραγόμενη σκόνη είχε ποσότητα πολυφαινολών 8,45 mg/g βάρους GAE (το 98% των πολυφαινολών του κρασιού είχαν κατακρατηθεί μετά το freeze-drying. Σε μία άλλη μελέτη έγινε ενθυλάκωση πολυφαινολών κόκκινου κρασιού Cabernet με freeze-drying μαλτοδεξτρίνη/αραβικό κόμμι (Rocha-Parra et al., 2018). Σε αυτή τη μελέτη το πολυφαινολικό περιεχόμενο της παραγόμενης σκόνης ήταν 3,1 mg/g βάρους GAE. Μάλιστα σε αυτή τη μελέτη η πολυφαινολική σκόνη προστάτευσε καλλιέργειες ανθρώπινων νευρικών κυττάρων από οξειδωτικό στρες (Rocha-Parra et al., 2018). Στις περισσότερες σκόνες της δικής μας μελέτης το πολυφαινολικό περιεχόμενό τους ήταν πολύ υψηλότερο από αυτό των προαναφερόμενων μελετών, αλλά αυτό μπορεί να εξαρτάται από το αρχικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των κρασιών που χρησιμοποιήσαμε και όχι από το ότι η δική μας μέθοδος ενθυλάκωσης ήταν πιο αποτελεσματική.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου γίνεται ενθυλάκωση πολυφαινολών κρασιού σε ΦΙ πορτοκαλιού. Γενικότερα, αποτελεί μία από τις ελάχιστες μελέτες ενθυλάκωσης πολυφαινολών από κρασί, έτσι ώστε να δημιουργηθούν βιοδραστικές σκόνες οι οποίες θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής, ως φυσικά αντιοξειδωτικά τροφίμων,

για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων και καλλυντικών. Επίσης, η προτεινόμενη αξιοποίηση των πολυφαινολών κρασιού μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας των οινοποιείων για αδιάθετες ποσότητες κρασιού ή για κρασιά χαμηλής ποιότητας με χαμηλή τιμή πώλησης. Η ΦΙ πορτοκαλιού αποδείχτηκε ιδιαίτερα σε 5% περιεκτικότητα ένα κατάλληλο ενθυλακωτικό μέσο για πολυφαινόλες κρασιού, όπου οδήγησε στη δημιουργία σκονών ελευθέρως ροής, με υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ένα επιπλέον όφελος από τη χρησιμοποίηση της ΦΙ από φλούδα πορτοκαλιού ως ενθυλακωτικού μέσου είναι ότι αξιοποιεί ένα απόβλητο για τη δημιουργία ενός προϊόντος με υψηλή προστιθέμενη αξία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου 26, 151–194.
- Alzheimer's Association, (2019). Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimer's Dement. 15, 321–387.
- Amor, S., Châlons, P., Aires, V., & Delmas, D. (2018). Polyphenol Extracts from Red Wine and Grapevine: Potential Effects on Cancers. *Diseases*, 6(4), 106. doi: 10.3390/diseases6040106
- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol.* 2013 61:60-8.
- Araujo, J.R., Goncalves, P., Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.*, 31, 77–87.
- Brun S, Cabanis JC, Mestres JP: (1986). Analytical chemistry. *Experientia* 42:893–904.
- Collaborators, G.B.D.R.F. (2018) Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, 392, 1923–1994.
- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J.C., Solary, E., Latruffe, N., Delmas, D. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer*, 124, 2780–2788.
- Cosme F, Vilela A, Moreira L, Moura C, Enríquez JAP, Filipe-Ribeiro L, Nunes FM. Terroir Effect on the Phenolic Composition and Chromatic Characteristics of Mencía/Jaen Monovarietal Wines: Bierzo D.O. (Spain) and Dão D.O. (Portugal). *Molecules.* 2020 25(24):6008.
- Diego Rocha-Parra., Jorge Chirife., Clara Zamora., Sonia de Pascual-Teresa (2018). Chemical Characterization of an Encapsulated Red Wine Powder and Its Effects on Neuronal Cells. *Molecules* 2018, 23, 842.
- Ditano-Vázquez, P., Torres-Peña, J., Galeano-Valle, F., Pérez-Caballero, A., Demelo-Rodríguez, P., & Lopez-Miranda, J. et al. (2019). The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role

of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. *Nutrients*, 11(11), 2833. doi: 10.3390/nu11112833

- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523.
- Forester, S.C., Waterhouse, A.L., (2009) Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics, 139, 1824S–1831S
- Halliwell, B, Gutteridge, J.M.C.(1990). Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme* bgy 186.
- Hokama, M., Oka, S., Leon, J., Ninomiya, T., Honda, H., Sasaki, K., Iwaki, T., Ohara, T., Sasaki, T. LaFerla, F. (2014). Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer’s disease brains: The Hisayama study. *Cereb. Cortex*, 24, 2476–2488.
- Jennings Thomas A., “Lyophilization: Introduction and Basic Principles”. 1999. Phase Technologies, Pennsylvania, USA.
- Klurfeld DM, Kritchevsky D (1981) Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits. *Exp Mol Pathol* 34:62– 71.
- Leger AS, Cochrane AL, Moore F. (1979) Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1:1017–1020.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*.
- Mazue, F., Delmas, D., Murillo, G., Saleiro, D., Limagne, E., Latruffe, N. (2014) Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis, 5, 663–670.
- Moreno-Arribas, M., Bartolomé, B., Peñalvo, J., Pérez-Matute, P., & Motilva, M. (2020). Relationship between Wine Consumption, Diet and Microbiome Modulation in Alzheimer’s Disease. *Nutrients*, 12(10), 3082. doi: 10.3390/nu12103082.
- Munin, M., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3, 793–829.
- Muñoz-Bernal, Ó., Coria-Oliveros, A., de la Rosa, L., Rodrigo-García, J., del Rocío Martínez-Ruiz, N., Sayago-Ayerdi, S., & Alvarez-Parrilla, E. (2021). Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *Food Research International*, 140, 110069. doi: 10.1016/j.foodres.2020.110069
- Niki, K., Konstantinos, T., Dimitri, P.M. (2014). Alcohol and the Cardiovascular System: A Double-Edged Sword. *Curr. Pharm. Des.* 20, 6276–6288.
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green

and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302.

- Prior R, Xianli W, Schaich K, “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”. 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53 (6) : 1841-1856.
- Renaud SC, Beswick AD, Fehily AM, Sharp DS, Elwood PC. (1992). Alcohol and platelet aggregation: The Caerphilly prospective heart disease study. *Am J Clin Nutr* 55:1012–1017.
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(5-6), 410-424. doi: 10.1016/j.cca.2010.11.034
- Sanchez, V., Baeza, R., Galmarini, M.V. et al. Freeze-Drying Encapsulation of Red Wine Polyphenols in an Amorphous Matrix of Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol* 6, 1350–1354 (2013).
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *J Med Food*, 6:291–9.
- Soleas, G., Diamandis, E., & Goldberg, D. (1997). Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal Of Clinical Laboratory Analysis*, 11(5), 287-313. doi: 10.1002/(sici)1098-2825(1997)11:5<287::aid-jcla6>3.0.co;2-4.
- Rocha-Parra D, Chirife J, Zamora C, de Pascual-Teresa S. Chemical Characterization of an Encapsulated Red Wine Powder and Its Effects on Neuronal Cells. *Molecules*. 2018 23(4):842.
- Reformedhealth.net (2017) 18 Benefits of Wine for Your Health and Emotional Well Being | Reformed Health. Retrieved 17 May 2021, from <https://reformedhealth.net/benefits-of-wine/>
- Visioli, F., Panaite, S., & Tomé-Carneiro, J. (2020). Wine’s Phenolic Compounds and Health: A Pythagorean View. *Molecules*, 25(18), 4105. doi: 10.3390/molecules25184105
- Veenstra J, Kluit C, Ockhuizen T, Pol HVD, Wedel M, Schaafsma G (1990) Effects of moderate alcohol consumption on platelet function, tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Thromb Haemost* 63:345–348.
- Walton, J., & Williams, F. (2015). The Games Radicals Play: Special Issue on Free Radicals and Radical Ions. *Molecules*, 20(2), 2831-2834. doi: 10.3390/molecules20022831
- Weisse ME, Eberly B, Person DA (1995) Wine as a digestive aid: Comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *Br Med J* 311:1657–1660.

- Willett WC. (2002) Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*. 296:695-698.