



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ- ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΙΚΟ ΟΞΥ: ΝΕΟ
ΠΡΟΪΟΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Τσολάκου Άννια

Γεωπόνος

Υπεύθυνος : Αναπληρωτής Καθηγητής Προκόπιος Μαγιάτης

Αθήνα 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη μεταπτυχιακή διατριβή μου από το πρόγραμμα Μ.Δ.Ε. του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Φαρμακευτικό Τμήμα του ΕΚΠΑ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την συμβολή τους στην εκπόνηση και ολοκλήρωση αυτής:

- τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά, την καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, οι οποίοι δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.
- τους καθηγητές κ. Α. Σκαλτσούνη, κ. Β. Ρούσση και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ.Μ. Κουλάδη που δέχτηκαν να εκπονήσω το μεταπτυχιακό μου στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.
- τον υπεύθυνο αυτής της διπλωματικής εργασίας, αναπληρωτή καθηγητή, κ. Προκόπιο Μαγιάτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.
- την ΕΔΙΠ κ. Ελένη Μέλλιου για την επιστημονική και ψυχολογική συμβολή της στην εκπόνηση της εργασίας και για την ευρύτερη συνεργασία.
- το πρόγραμμα INTERREG – MED ARISTOIL, για την δυνατότητα υλοποίησης της παρούσας μελέτης
- τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για τις γνώσεις που μου προσέφεραν, καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.
- τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Αθανάσιο Γκιμίσση από το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για τη και την συμβολή του στις μετρήσεις υγρασίας των δειγμάτων
- τον επίκουρο καθηγητή Feliciano Priego Carote από το τμήμα Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου της Κόρδοβα για την συμβολή του στον προσδιορισμό του MB του ελαιοκανθαλικού οξέος
- τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο μου Παναγιώτη Διαμαντάκο για τη στήριξη και την υπομονή του.

- τις φίλες μου Ηλιάνα, Κατερίνα, Αιμιλία για τις ευχάριστες στιγμές στο εργαστήριο.
- τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας για το ευχάριστο κλίμα.
- την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αγάπη του και την υποστήριξή τους σε κάθε μου βήμα.

Στον Δ. Κ.

Για όλα όσα έχει κάνει ...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΣΚΟΠΟΣ	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
ΕΛΙΑ.....	10
ΚΑΤΑΓΩΓΗ	10
ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ.....	12
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	15
ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	16
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΑ ΟΦΕΛΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ.....	19
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	20
ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	23
ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	28
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	29
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	39
ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	40
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.....	44
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ.....	46
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	50
ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ	51
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	52
ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΕ ΔΡΟΣΕΡΟ ΚΑΙ ΣΚΙΕΡΟ ΜΕΡΟΣ	65
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ 4° C (ΨΥΓΕΙΟ).....	70
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ -18° C (ΚΑΤΑΨΥΞΗ)	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	76
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	77
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΥΓΡΑΣΙΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	82
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	83
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	87
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	88
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	94
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	95
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	95
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΡΟΦΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	112
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	113
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	116
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	128

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εικοσιεννέα δείγματα ελαιολάδου προερχόμενα από 8 διαφορετικές ποικιλίες ελαιόδεντρων αναλύθηκαν ως προς τη φαινολική τους σύσταση με τη χρήση ποσοτικής φασματοσκοπίας ¹ H-NMR και μία ποσότητα από το καθένα αποθηκεύτηκε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: δροσερό και σκιερό μέρος με μέση θερμοκρασία 20° C, 4° C και -18° C. Ακολούθησαν επαναλήψεις των χημικών αναλύσεων ανά 3 μήνες και προσδιορισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης προκειμένου να διερευνηθεί η σταθερότητα των φαινολικών συστατικών. Παράλληλα, διερευνήθηκαν δύο παράγοντες που πιθανόν να επηρεάζουν τη σταθερότητα των φαινολικών συστατικών: η αναλογία των δειγμάτων σε λιπαρά οξέα και τα ποσοστά υγρασίας που περιείχε το κάθε δείγμα μετά την παραγωγή του. Επιπλέον, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε με επιτυχία ένα μοντέλο πρόβλεψης της σταθερότητας των φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν, με την σταθερή θέρμανση των δειγμάτων στους 60° C και τον υπολογισμό του ρυθμού αποδόμησης των φαινολών. Παρατηρώντας τις μετατροπές που προκύπτουν στο φαινολικό κλάσμα των δειγμάτων εντοπίστηκε και απομονώθηκε το ελαιοκανθαλικό οξύ, μία νέα οξειδωμένη μορφή της ελαιοκανθάλης, του οποίου η δομή περιγράφηκε για πρώτη φορά. Τέλος το ελαιοκανθαλικό οξύ, που προτείνεται ως δείκτης γήρανσης του ελαιολάδου, παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την θερμοεξαρτώμενη αντίδραση οξείδωσης της ελαιοκανθάλης.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της σταθερότητας των παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, για 12 μήνες. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τον προσδιορισμό του ποσοστού μείωσης της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο και την διερεύνηση πιθανής συσχέτισής του με ορισμένους παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η αρχική περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, η περιεχόμενη υγρασία και το λιπιδικό προφίλ των δειγμάτων.

ABSTRACT

Twenty nine extra virgin olive oil (EVOO) samples from 8 different olive varieties have been analyzed, using ^1H -NMR, to determine their phenolic content. In order to perform the stability study of tyrosol and hydroxytyrosol derivatives, a portion of each sample was stored at different temperature conditions, specifically 20° C, 4° C and -18° C. At every temperature condition, the samples were analyzed every three months, with a total duration of twelve months. In addition, in this project we explored the possible relation between the stability of phenolic compounds and two other parameters, the lipid profile of the samples and the water content. In order to study the different patterns that occurred from our results, we developed a prediction model that, using mild heating, can predict in a few days the concentration of tyrosol and hydroxytyrosol derivatives after a year of storage at room temperature. Changes that were observed in the phenolic fraction of the samples during their storage, led to the isolation and structure elucidation of oleocanthalic acid, a new oleocanthal oxidation product. This compound can be used as an EVOO ageing marker, since its concentration increases in time, although it was also detected in samples analyzed shortly after their production. Finally, the formation of this new oxidation product was reproduced successfully using oleocanthal heated at a temperature of 60° C for four days.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΑΤΑΓΩΓΗ

Η μακραίωνη ιστορία της ελιάς χάνεται στα βάθη του χρόνου. Το ελαιόδεντρο αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της εξέλιξης των πολιτισμών της Μεσογείου και είναι βασικό στοιχείο της διατροφής, της καθημερινότητας και της οικονομίας, ακόμα και της θρησκείας, των λαών της περιοχής, σε σημείο που να θεωρείται ιερό. Στην ελληνική μυθολογία αναφέρεται ότι η θεά Αθηνά δώρισε την ελιά στον πρώτο βασιλιά της Αθήνας, τον Κέκροπα. Σύμφωνα λοιπόν με τους θρύλους και τις παραδόσεις των μεσογειακών λαών, η ελιά έλκει την καταγωγή της από τη λεκάνη της Μεσογείου και τα αρχαιολογικά ευρήματα έρχονται να στηρίξουν την άποψη αυτή.

Πολλοί βοτανικοί θεωρούν ως πιθανότερο τόπο προέλευσης της ελιάς τις μεσογειακές περιοχές, αν και διαφωνούν ως προς το ποιες είναι οι χώρες αυτές. Ο De Candolle [1] υποστηρίζει ότι η πατρίδα της ελιάς είναι μάλλον η περιοχή της Συρίας και της Μ. Ασίας διότι, σύμφωνα με παρατηρήσεις, οι πλαγιές των βουνών στη Β. Συρία, κοντά στα σύνορα με την Τουρκία, είναι σκεπασμένες με άγριες ελιές. Επιπλέον, η περιοχή της Συρίας/Παλαιστίνης/Ισραήλ θεωρείται τόπος καταγωγής της ελιάς καθώς εκεί παρατηρείται η μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα [2]. Σύμφωνα με τον Camps [3], ο οποίος βασίζεται σε αναλύσεις που έγιναν σε άνθρακα και γύρη προερχόμενη από Ιβηρο-Μαυριτανικές περιοχές, στη Β. Αφρική υπήρχαν αγριελιές από τη 12η χιλιετήριδα. Τέλος, ο Fischer [4], αντίθετα από τις παραπάνω απόψεις, ισχυρίζεται ότι η ελιά ήρθε στην ανατολική Μεσόγειο, δια μέσου του Ιράν, από τη Β.Δ. Ινδία, όπου το γένος *Olea* εκπροσωπείται από έναν αριθμό διαφορετικών ειδών. Πάντως, όπως επισημαίνουν και οι Rubio de Casas *et al* [5], η παρουσία άγριων ελαιόδεντρων θεωρείται ο καλύτερος βιοδείκτης προσδιορισμού των περιοχών που καλύπτονται από τη Μεσογειακή χλωρίδα.



Εικόνα 1.1 Απολιθωμένο φύλλο ελιάς από τη Θήρα

Όσον αφορά τον Ελλαδικό χώρο, η αρχαιότερες ενδείξεις ύπαρξης της ελιάς προέρχονται από απολιθώματα φύλλων στις νήσους Θήρα (Σαντορίνη) και Νίσυρο (εικόνα 1.1). Σύμφωνα με τους Pichler & Friedrich [6] , τα απολιθώματα φύλλων χρονολογούνται στα 60.000 χρόνια πριν από σήμερα. Ο Π. Αναγνωστόπουλος το 1939 υποστήριξε ότι, σύμφωνα με ευρήματα ανασκαφών, πατρίδα της ελιάς είναι η Κρήτη. Οι απαρχές της ελαιοκαλλιέργειας τοποθετούνται χρονικά στην πρώιμη Χαλκοκρατία, στην 3η δηλαδή χιλιετία π.Χ. Το προβάδισμα ως προς την ελαιοκαλλιέργεια πληρούσε η Μινωική Κρήτη λόγω του εύκρατου κλίματός της, της γεωμορφολογίας της, αλλά και της εντατικοποίησης της πρωτογενούς γεωργικής παραγωγής της. Μάλιστα η Κρήτη διέθετε ένα δίκτυο εμπορικών συναλλαγών με πολιτισμούς της ανατολικής Μεσογείου όπου υλοποιούνταν η συστηματική εκμετάλλευση της ελιάς, απ' όπου πιθανόν να μεταλαμπαδεύτηκαν στο νησί και οι σχετικές ελαιοκομικές γνώσεις. Οι ανασκαφές στην Κρήτη έφεραν στο φως τεράστιους πίθους για την αποθήκευση του λαδιού (εικόνα 1.2), πιστοποιώντας πως η δύναμη των Μινωιτών βασιλιάδων προερχόταν σε μεγάλο βαθμό και από την εξαγωγή του ελαιόλαδου, τόσο στην Αίγυπτο, όσο και σε άλλες περιοχές της Μεσογείου, καθώς μάλιστα από το 1450 π.Χ. και εξής η εκμετάλλευση του προϊόντος άρχισε βαθμιαία να συστηματικοποιείται. Αναφορές στην εκμετάλλευση της ελιάς, αλλά και τη διακίνηση και την εμπορία του λαδιού στο προϊστορικό Αιγαίο παρέχουν και τα ανακτορικά αρχεία της Κνωσού, της Πύλου και των Μυκηνών στη Γραμμική Β'.



Εικόνα 1.2 Μινωικό πιθάρι για λάδι από το ανάκτορο του Γαλατά. περ. 1500 π.Χ

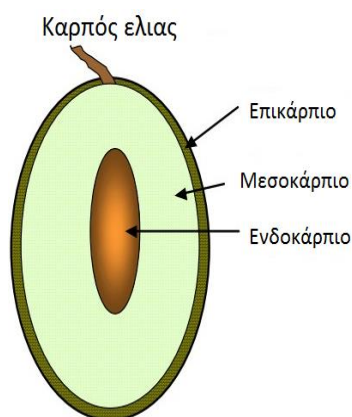
Ο Γ.Δ. Κωστελένος, στο βιβλίο του «Η Καταγωγή και η Εξημέρωση της Ελιάς» αναφέρει ως τόπο της πρώτης κατανάλωσης των ελαιόκαρπων τη Ναξο, στηριζόμενος σε αρχαιολογικά ευρήματα αλλά και την ύπαρξη του προμινωικού δέντρου της εικόνας 1.3. Το δέντρο, που ανάγεται χρονικά στην αφετηρία της παγκόσμιας ελαιοκομίας, ανήκει στην ποικιλία «Θρουμπολιά Αιγαίου» και είναι η μόνη γνωστή ποικιλία ελιάς που οι καρποί της μπορούν κάτω από φυσικές συνθήκες να καταναλωθούν απευθείας από τα δέντρα, χωρίς καμία επεξεργασία. Σύμφωνα με αρχαιολογικά ευρήματα η παλαιότερη αναφορά καλλιέργειας της ελιάς στον πλανήτη είναι στην περιοχή Συρίας-Ισραήλ-Παλαιστίνης το 5800 π.Χ. [7] . Το ίδιο κέντρο καταγωγής της καλλιέργειας της ελιάς εισηγούνται και οι Belaj *et al.* [8].

ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Το γένος *Olea* ανήκει στην οικογένεια Oleaceae η οποία περιλαμβάνει περίπου 30 γένη και 600 είδη [9], κατανεμημένα σε κάθε ήπειρο (εικόνα 1.3). Είναι γενικά αποδεκτό ότι το γένος *Olea* χωρίζεται στα υπογένη *Tetrapilus* (Ασία), *Paniculatae* (Ασία και Αυστραλία) και *Olea* (άγρια και καλλιεργούμενη ελιά-Αφρική και Ευρώπη). Το υπογένος *Olea* χωρίζεται στους τομείς *Ligustroides* (περίπου 10 είδη) και *Olea* (ένα είδος: *O.euroraea*) των οποίων τα είδη ευδοκιμούν στην Ανατολική Αφρική και στα Νησιά του Ειρηνικού. Συγκεκριμένα ο τομέας *Olea* απαντάται επίσης δυτικά της Σαχάρας, στις Κανάριες Νήσους και στη Λεκάνη της Μεσογείου [10] . Στον τομέα *Olea* έχουμε το είδος *O. euroraea* L, το μόνο καλλιεργούμενο για παραγωγή ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών όπου περιλαμβάνονται πάνω από 1000 ποικιλίες. Εντός του είδους *O. euroraea* L. έχουμε τέσσερα υποείδη: το *O. euroraea* ssp. *euroraea* (Λεκάνη της Μεσογείου), το *O. euroraea* ssp. *laperrini* (Σαχάρα), το *O. euroraea* ssp. *cerasiformis* (Κανάριοι Νήσοι και Μαδέρα) και το *O. euroraea* ssp. *cuspidata* (Κίνα, Ινδία, Πακιστάν, Νεπάλ, Ιράν, Αραβική Χερσόνησο και Νοτιοανατολική Αφρική) [11].

Τα τροπικά και υποτροπικά Αφρο- Ασιατικά είδη όπως τα *Olea chrysophilla* Lam. και *Olea excelsa* Ait πιθανότατα συνείσφεραν στην εξέλιξη της Ευρω-Μεσογειακής ελιάς (*O. euroraea* L.) [12]. Η Ευρω-Μεσογειακή ελιά (*O. euroraea* L. ssp. *euroraea*) περιλαμβάνει την άγρια (*var. sylvestris*) και την καλλιεργούμενη ελιά (*var. sativa*). Το γεγονός ότι ένα δέντρο μπορεί να ξεπεράσει τα 1000 χρόνια ζωής (εικόνα 1.4) καθώς και το ότι εδώ και αρκετούς αιώνες ο άνθρωπος συνέχεια βελτιώνει ποικιλίες και διασταυρώνει πληθυσμούς έχει οδηγήσει στην ύπαρξη μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας εντός του είδους.

Ο καρπός είναι δρύπη, σφαιρικός ή ελλειπτικός και αποτελείται από το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο που είναι και το βρώσιμο μέρος και το ενδοκάρπιο όπου βρίσκεται το έμβρυο (εικόνα 1.5). Ο ώριμος καρπός είναι μαύρου χρώματος και το μέγεθός του εξαρτάται από την ποικιλία, τη γονιμότητα του εδάφους, τον αριθμό καρπών ανά δέντρο, τη διαθεσιμότητα νερού και τις καλλιεργητικές τεχνικές. Η παραγωγή καρπών ξεκινάει το 3^ο έτος αλλά η πλήρης απόδοση του δέντρου επιτυγχάνεται μεταξύ 11^{ου} και 12^{ου} έτους για ξηρά εδάφη και μεταξύ 7^{ου} και 8^{ου} έτους για αρδευόμενα. Το ριζικό σύστημα έχει την τάση να αναπτύσσεται οριζόντια παρά κάθετα. Η ελιά είναι ανθεκτική σε αντίξοες συνθήκες και προσαρμόζεται στα περισσότερα είδη εδαφών ακόμα και σε εδάφη φτωχά που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν και είναι ανθεκτική στην ξηρασία [13]. Από την άλεση του ελαιόκαρπου και την εφαρμογή μίας σειράς μηχανικών διαδικασιών προκύπτει ένα από τα σημαντικότερα τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής, το ελαιόλαδο.



Περιέχονται :

- ✓ Επικάρπιο : 1-3%
- ✓ Μεσοκάρπιο : 70 – 80 %
 - 50% νερό
 - 25% υδατάνθρακες
 - 25% έλαιο
- ✓ Ενδοκάρπιο : 18 – 20 %

Εικόνα 1.5 : Σχηματική εγκάρσια τομή ελαιόκαρπου

ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΙΔΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Νομοθεσία

(Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Αγορανομικός Κώδικας και Κανονισμός (ΕΚ) 1513/2001 όπως τροποποίησε τον Κανονισμό 133/1966 (ΕΟΚ))

Ονομασίες και ορισμοί των ελαιόλαδων :

1. Παρθένα ελαιόλαδα

Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες ιδίως θερμικές, οι οποίες δε συνεπάγονται αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της καθίζησης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης, εξαιρουμένων των ελαίων που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και κάθε μίγματος με έλαια άλλης φύσης.

Τα έλαια αυτά κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες και λαμβάνουν τις ακόλουθες ονομασίες:

α) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 6,5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 0,8 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

β) Παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 5,5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 2,0 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. (Μπορεί να χρησιμοποιείται και ο χαρακτηρισμός "εκλεκτό" στο στάδιο της παραγωγής και του χονδρικού εμπορίου).

γ) LAMPANTE ελαιόλαδο

Πρόκειται για παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι ανώτερη των 2,0 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2. Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο

Είναι το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από εξευγενισμό παρθένου ελαιόλαδου, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g και του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. Ο εξευγενισμός περιλαμβάνει αποχρωματισμό, απόσμιση, υδρογόνωση, εξουδετέρωση και λοιπές χημικές επεξεργασίες του ελαιόλαδου.

3. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα

Ελαιόλαδο προερχόμενο από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένου ελαιόλαδου εξαιρουμένου του μειονεκτικού (οξύτητα μειονεκτικού > 3,3g/100g), του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1,0 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

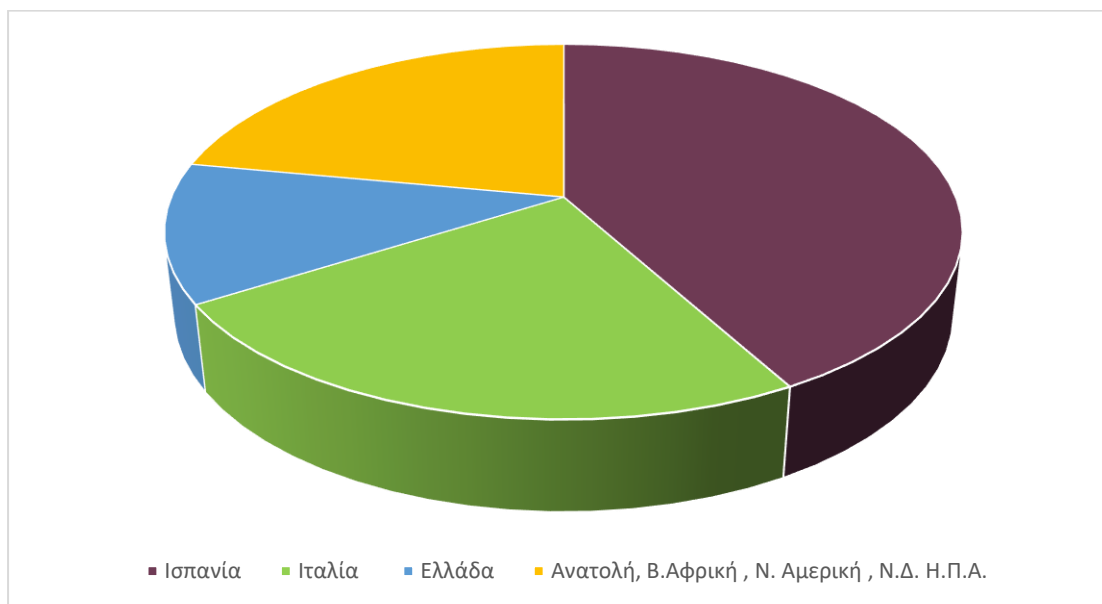
ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Το ελαιόλαδο αποτελεί εάν από τα σημαντικότερα γεωργικά προϊόντα της Ελλάδας από την αρχαιότητα. Το δέντρο της ελιάς στην αρχαία Ελλάδα θεωρούνταν ένα σύμβολο ειρήνης, γονιμότητας, εξαγνισμού, ισχύος, νίκης και μετάνοιας, διαδραματίζοντας ένα βασικό ρόλο στην ιστορία και τον πολιτισμό των αρχαίων. Η σημασία του ελαιολάδου ήταν επίσης ιδιαίτερα μεγάλη, καθώς το λάδι πέρα από την καθημερινή χρήση του στο φαγητό, χρησιμοποιούνταν και σε διάφορες άλλες εφαρμογές, όπως στη βυρσοδεψία, στην υφαντική, στο φωτισμό, στην αρωματοποιία, στη φαρμακευτική, στην ιατρική, αλλά και σε διάφορες λατρευτικές τελετές.

Η διαδικασία της παραγωγής του ελαιολάδου έφερε στο προσκήνιο μία διαρκώς εξελισσόμενη τεχνολογία, όπου οι τραχιές πέτρες έδωσαν τη θέση τους στους ληνούς και έπειτα στους ελαιόμυλους. Έτσι η εκπίεση της ζύμης με τα χέρια πέρασε στη συμπίεση με το λοστό της Θηρασίας, στο πιεστήριο της κλασικής εποχής, τον ατέρμονα κοχλία του Ήρωνα για να ολοκληρωθεί με τους οργανωμένους πλέον «ληνεώνας».

Στη σύγχρονη εποχή, μπορούμε να αφήσουμε τους αριθμούς να καταδείξουν τη σημασία του ελαιόλαδου για τον αγροτικό τομέα, παγκοσμίως, αλλά και για την Ελλάδα. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η καλλιέργεια των ελαιόδεντρων έχει εξαπλωθεί πέρα από τη λεκάνη της Μεσογείου. Παγκοσμίως, το ελαιόλαδο παράγεται και στις 5 ηπείρους, αλλά η παραγωγή του συγκεντρώνεται κατά 84% στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο, με το 69% της ετήσιας παραγωγής να

προέρχεται από τη Νότια Ευρώπη (Εικόνα 1.6). Αναλυτικότερα, για το έτος 2013, η παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου ξεπέρασε τα 2,8 εκατομμύρια τόνους, με τις τρεις πρώτες χώρες να είναι σταθερά η Ισπανία (παραγωγή 1,11 εκατομμ. τόνοι), η Ιταλία (442 χιλ. τόνοι) και η Ελλάδα (306 χιλ. τόνοι). Τη δεκάδα συμπληρώνουν η Τυνησία, η Τουρκία, η Συρία, το Μαρόκο, η Πορτογαλία, η Αλγερία και η Αργεντινή, με μικρότερη παραγωγή από τις τρεις κυρίαρχες.



Εικόνα 1.6 Κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (πηγή FAOSTAT)

Η Ισπανία κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή και την εξαγωγή ελιών και ελαιολάδου ενώ στο έδαφός της καλλιεργούνται περισσότερα από 300 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Από τα 2,1 εκατομμύρια εκτάρια (5,19 εκατομμύρια στρέμματα) ελαιώνων το 92% προορίζεται για παραγωγή ελαιολάδου. Η μέση ετήσια παραγωγή ποικίλλει λόγω του κυκλικού χαρακτήρα της συγκομιδής, αλλά γενικά κυμαίνεται μεταξύ 600.000 και 1.000.000 τόνων, εκ των οποίων εξάγεται το 55%, με βάση τα στοιχεία της FAOSTAT. Περίπου 80% της ισπανικής παραγωγής συγκεντρώνεται στην Ανδαλουσία, (επαρχία Jaén). Στην Ανδαλουσία, την πιο σημαντική ελαιοπαραγωγική περιοχή της επαρχίας Jaén, επικρατεί η ποικιλία Picual, όπως επίσης οι Verdala, Real, και Manzanilla de Jaén, ενώ στην επαρχία Cordoba, οι ποικιλίες Picula, Picual, Lechín, Chorrío, Pajarero, και Hojiblanco. Το ελαιόλαδο κατηγορίας τα "Α" της Ανδαλουσίας έχει μέγιστη οξύτητα 0,4%, ενώ ελαιόλαδα κατηγορίας "Β" έχουν οξύτητα μέχρι 1%. Η Καταλωνία είναι επίσης ελαιοπαραγωγική περιοχή με το ελαιόλαδό της να είναι γενικά ελαφρύτερο. Οι περισσότεροι ελαιώνες βρίσκονται στην περιοχή Les Garrigues, στην επαρχία Lleida, και στην περιοχή Siurana, πολύ κοντά στην επαρχία Tarragona, όπου η κύρια ποικιλία είναι η Arbequina καθώς και οι Real (Royal), Verdiel και Morrut.

Η Ιταλία είναι η δεύτερη ελαιοπαραγωγική χώρα της Ευρώπης, με τα 2/3 της παραγωγής της να ανήκει στην κατηγορία “εξαιρετικά παρθένο”, με 37 είδη με Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης τα οποία παράγονται σε όλη την έκτασή της. Στην Ιταλία υπάρχουν περίπου 6.180 ελαιοτριβεία, με μέση ποσότητα κατεργασμένου ελαιόκαρπου για το 2006/2007 τους 3.500.000 τόνους και παραγωγή περίπου 600.000 τόνους ελαιολάδου. Το 90% της του Ιταλικού ελαιολάδου παράγεται στις νότιες περιοχές, Σικελία, Καλαβρία και Πούλια. Η λειτουργία όλο και περισσότερων σύγχρονων ελαιοτριβείων έχει αυξήσει την παραγωγή και έχει μειώσει την ανάγκη για εργατικό δυναμικό, ενώ έχει κάνει ιδιαίτερα έντονο το πρόβλημα της διάθεσης των αποβλήτων της ελαιοπαραγωγικής διαδικασίας. Τέλος, στην Ιταλία καλλιεργούνται πολλές ποικιλίες ελιάς, με σπουδαιότερες τις Frantoio, Leccino Pendolino, και Moraiolo.

Στην Ελλάδα σχεδόν το 60% του καλλιεργούμενου εδάφους της είναι ελαιώνες. Παγκοσμίως η Ελλάδα είναι πρώτη στην παραγωγή μαύρων ελιών και τρίτη στην παραγωγή ελαιολάδου. Στο έδαφός της καλλιεργούνται περισσότερα από 132 εκατομμύρια ελαιόδεντρα, από τα οποία παράγονται περίπου 350.000 τόνοι ελαιολάδου ετησίως, εκ των οποίων το 75-80% ανήκει στην κατηγορία εξαιρετικά-παρθένο, σύμφωνα με τη FAOSTAT. Στην παραγωγή ελαιόλαδου απασχολείται το 1/3 του εργατικού δυναμικού που εργάζεται στον πρωτογενή τομέα, ενώ η Ελλάδα βρίσκεται και στην πρώτη θέση όσον αφορά την κατά κεφαλήν κατανάλωση. Σύμφωνα με παλαιότερα στοιχεία της έρευνας «California and World Olive Oil Statistics» από το UC Davis, στη χώρα μας κάθε άτομο καταναλώνει σχεδόν 23,7 κιλά ελαιολάδου ετησίως. Ακολουθούν η Ισπανία (13,6 κιλά) και η Ιταλία (12,4 κιλά). Περίπου η μισή από την ετήσια ελληνική παραγωγή ελαιολάδου εξάγεται προς τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κυρίως στην Ιταλία, η οποία απορροφά περίπου τα ¾ του συνόλου της ελληνικής εξαγωγής. Οι πιο σημαντικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές στην Ελλάδα είναι η Κρήτη και η Πελοπόννησος, οι οποίες παράγουν το 39% και το 35% αντίστοιχα της συνολικής παραγωγής.

Ελαιώνες υπάρχουν και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Οι περισσότερο καλλιεργούμενες ποικιλίες στη Γαλλία είναι η Picholine, στην Πορτογαλία η Galega, στην Κροατία η Oblica και η Leccino.

Εκτός Ευρώπης, εξαιρετικής ποιότητας ελαιόλαδο παράγει η Αυστραλία, κυρίως λόγω στις πολύ καλές συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας που επικρατούν και έχουν υιοθετηθεί, το γόνιμο έδαφος και της σημαντικά ελαττωμένης παρουσίας παρασίτων και ασθενειών. Το αυστραλιανό ελαιόλαδο εξάγεται στην Ασία και στην Ευρώπη και εκτιμάται ιδιαίτερα η πολύ καλή και σταθερή ποιότητά του.

Στη Βόρεια Αμερική, τα ιταλικά και ισπανικά ελαιόλαδα είναι αυτά που καταναλώνονται σε μεγαλύτερες ποσότητες, ενώ εξαιρετικά-παρθένα ελαιόλαδα από την Ιταλία, την Ισπανία, την Κροατία και την Ελλάδα πωλούνται σε υψηλές τιμές.

Ένα μεγάλο μέρος των εισαγωγών της Αμερικής προέρχεται από την Ιταλία, την Ισπανία, και την Τουρκία.

Η Βόρειος Αφρική παράγει επίσης εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο με αυξανόμενους ρυθμούς παραγωγής και συνεχή βελτίωση των χαρακτηριστικών του.

Σήμερα στην Ελλάδα, ο κανόνας που ισχύει είναι εξαγωγές χύμα ελαιολάδου. Η χώρα μας στο σύνολο εξάγει μεγάλες ποσότητες παρθένου ελαιολάδου, το οποίο όμως αγοράζεται σε μορφή χύμα από Ιταλικές κυρίως βιομηχανίες. Οι βιομηχανίες αυτές το χρησιμοποιούν ως βελτιωτικό στα διαφόρων ειδών ελαιόλαδα που παράγουν και το προωθούν στην αγορά τυποποιημένο ως Ιταλικό, με αποτέλεσμα η χώρα μας να κατέχει ένα πολύ μικρό μερίδιο αγοράς στο επώνυμο τυποποιημένο παρθένο ελαιόλαδο. Οι εξαγωγές Ελληνικού ελαιολάδου σε μορφή χύμα αντιστοιχούν σε ποσοστό 90% των συνολικών εξαγωγών ελαιολάδου της χώρας. Σύμφωνα με τα στοιχεία της EUROSTAT, το 2012 το 20% του ελληνικού ελαιολάδου κατέληξε σε διεθνείς αγορές, ενώ το 2013 οι εξαγωγές ελαιολάδου έφτασαν το 33%. Στις εξαγωγές παρθένου ελαιολάδου, η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση και πάλι ακολουθώντας την Ισπανία και την Ιταλία, πρώτη και δεύτερη χώρα αντίστοιχα.

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΑ ΟΦΕΛΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Με εφόδιο τις επιστημονικές μελέτες και την προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας για ανάδειξη των μοναδικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου ως τρόφιμο, επιτροπές τροφίμων από όλη την υφήλιο επικυρώνουν τη σημασία της ένταξής του στην ανθρώπινη διατροφή, εκδίδοντας τους ανάλογους κανονισμούς και οδηγίες.

Σχετικά με τα οφέλη των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) στην ανθρώπινη υγεία, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Ποτών αδειοδότησε ποιοτικούς ισχυρισμούς υγείας (health claims), για πρώτη φορά το 2004, τονίζοντας την προστασία που προσφέρουν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου κατά του κινδύνου καρδιοαγγειακών παθήσεων. Συνολικά, τα οφέλη των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου συνοψίστηκαν στο πρώτο Διεθνές Συνέδριο για το Ελαιόλαδο και την υγεία, το 2005 [115].

Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η διατροφική αξία του ελαιολάδου έχει αναγνωριστεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) από το 2006, με την οδηγία υπ' αριθμόν 1924/2006. Αναλυτικά, “η αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών στη διατροφή με ακόρεστα συνεισφέρει στην διατήρηση της χοληστερίνης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο ισχυρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο από τρόφιμα πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως αναγράφονται στο επισυναπτόμενο παράρτημα της οδηγίας (Annex of the Commission Regulation (EU)

432/2012) “. Το ελαιόλαδο φυσικά περιλαμβάνεται στο παράρτημα της οδηγίας, αφού αποτελεί τρόφιμο πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

Εκτός από έλαιο με ωφέλιμη για τον άνθρωπο λιπιδική σύσταση, το ελαιόλαδο είναι και άριστη πηγή συστατικών με εξαιρετικές υγειοπροστατευτικές ιδιότητες. Ο ευρωπαϊκός κανονισμός 432/2012 ξεχωρίζει τα ελαιόλαδα ως προς την επίδρασή τους στην υγεία, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε αυτά τα συστατικά. Πιο συγκεκριμένα αναγνωρίζει πως “οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συνεισφέρουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες. Ο ισχυρισμός υγείας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο από ελαιόλαδο που περιέχει τουλάχιστον 5 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (σύμπλεγμα ελευρωπαίνης και τυροσόλης) ανά 20 g ελαιολάδου. Για τη χρήση του ισχυρισμού υγείας θα πρέπει ο καταναλωτής να ενημερωθεί πως το ωφέλιμο αποτέλεσμα αποκτάται από την ημερήσια πρόσληψη 20 g ελαιολάδου.

Οι παραπάνω κανονισμοί αποτελούν επιπλέον αφορμές για τη μελέτη του ελαιολάδου ως ωφέλιμο τρόφιμο για τον άνθρωπο. Σε επόμενο κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά οι ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου που το καθιστούν έναν πολύτιμο καθημερινό σύμμαχο στην προάσπιση της ανθρώπινης υγείας.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Το ελαιόλαδο λαμβάνεται αποκλειστικά και μόνο από τους καρπούς της ελιάς (*Olea europaea* L.), σε αντίθεση με άλλα έλαια που λαμβάνονται με χρήση οργανικών διαλυτών ή με διαδικασίες επανεστεροποίησης ή με οποιαδήποτε ανάμειξη με έλαια άλλων ειδών (Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου). Το λάδι που αποτελεί το 15–30% του καρπού, βρίσκεται στα κύτταρα του μεσοκαρπίου. Η εξαγωγή του ελαιολάδου περιλαμβάνει το διαχωρισμό του ελαίου από τα στερεά συστατικά και τα φυτικά υγρά των καρπών. Η άλεση του ελαιοκαρπού αποτελεί το πρώτο στάδιο της εξαγωγής του ελαιολάδου. Σήμερα, δύο διαφορετικές διαδικασίες εξαγωγής χρησιμοποιούνται ευρέως, οι οποίες βασίζονται στη φυγοκέντρωση. Τα φυγοκεντρικά συστήματα, ανάλογα με τα προϊόντα που δίνουν στο τέλος της επεξεργασίας, διακρίνονται σε τριών και δύο φάσεων. Τα δύο συστήματα διαφέρουν σημαντικά ως προς το ποσό και τη σύνθεση των υποπροϊόντων που παράγουν. Επιπλέον, εφαρμόζεται ακόμα η λεγόμενη "παραδοσιακή διαδικασία", κατά την οποία το ελαιόλαδο εξάγεται με πίεση σε υδραυλικό πιεστήριο, χωρίς τη χρήση της φυγοκέντρωσης.

Πλύσιμο και ζύγισμα

Μετά την συγκομιδή οι ελιές παραδίδονται στις μεταποιητικές μονάδες για επεξεργασία. Η μεταφορά τους γίνεται σε πλαστικά τελάρα με οπές αερισμού ή διάτρητους σάκους. Η επεξεργασία πρέπει να γίνει το γρηγορότερο δυνατόν. Σε διαφορετική περίπτωση ο καρπός πρέπει να μείνει για μικρό χρονικό διάστημα σε χώρο με καλό αερισμό. Μετά τη συλλογή ο καρπός μεταφέρεται το συντομότερο στο ελαιοτριβείο ώστε να αποφευχθεί η ζύμωση και η ανάπτυξη μούχλας που υποβαθμίζει την ποιότητα του ελαιολάδου. Το πρώτο στάδιο στο ελαιοτριβείο είναι η απομάκρυνση των ξένων υλών (φύλλα, χώμα κ.λπ.). Για το σκοπό αυτό, αρχικά οι ελιές διέρχονται μέσα από αυτόματους φυσητήρες (αποφυλλωτήρια) που απομακρύνουν τα φύλλα. Ο διαχωρισμός των φύλλων από τον καρπό είναι απαραίτητος γιατί η σύνθλιψη του ελαιόκαρπου με μεγάλης ποσότητας φύλλα προσδίδει πικρή γεύση στο ελαιόλαδο και το εμπλουτίζει σε χλωροφύλλη η οποία δρα αρνητικά στην ποιότητά του. Στη συνέχεια, οι καρποί πλένονται με τρεχούμενο νερό για να απομακρυνθεί η σκόνη, το χώμα κ.λπ. και ζυγίζονται, για να είναι γνωστή η ποσότητα του καθαρού καρπού του κάθε παραγωγού.

Άλεση

Μετά το πλύσιμο, ακολουθεί η άλεση των καρπών στον ελαιόμυλο. Είναι το στάδιο που το έλαιο απελευθερώνεται από τα κύτταρα του ελαιόκαρπου, με τη μορφή μικρών σταγονιδίων. Στις σύγχρονες εγκαταστάσεις η άλεση γίνεται σε μεταλλικούς μύλους, σφυρόμυλους και σπαστήρες με αντίθετα περιστροφικούς οδοντωτούς δίσκους ή κυλινδροσπαστήρες, ενώ στα παραδοσιακά ελαιοτριβεία η άλεση του καρπού γίνεται με κυλινδρικές μύλοπετρες. Στους πέτρινους μύλους η έκθλιψη γίνεται χωρίς υπερβολική μηχανική πίεση, χωρίς την επιμόλυνση από ίχνη μετάλλων και την δημιουργία γαλακτωμάτων. Επιπλέον, αποτρέπεται η υπερθέρμανση της ελαιοζύμης, περιορίζοντας έτσι τον κίνδυνο υποβάθμισης της ποιότητας του ελαιολάδου. Με τους μεταλλικούς σπαστήρες είναι δυνατό να ρυθμιστεί το μέγεθος της λειοτρίβησης του ελαιοκαρπού, με τη χρήση ειδικής σίτας που προσαρμόζεται στο σπαστήρα, ανάλογα με το σύστημα εξαγωγής που εφαρμόζεται.

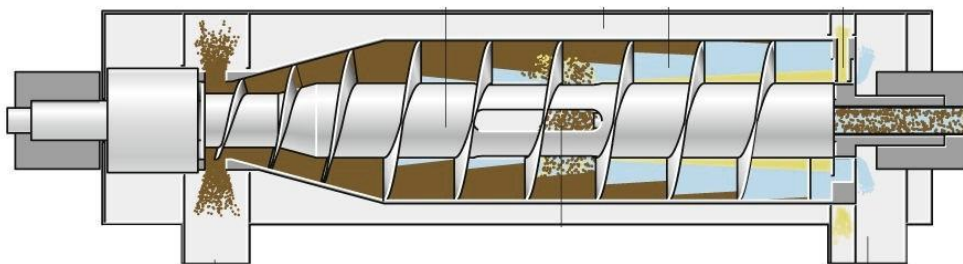
Μάλαξη

Μετά την άλεση του ελαιοκάρπου ακολουθεί η μάλαξη, που γίνεται σε ειδικές ημικυλινδρικές ή ημισφαιρικές δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα με διπλά τοιχώματα, στα οποία κυκλοφορεί νερό, θερμοκρασίας 20 – 30° C περίπου. Στόχος

αυτού του σταδίου είναι η διάσπαση του γαλακτώματος ελαίου/ ύδατος και η συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων σε μεγαλύτερες σταγόνες λαδιού, ώστε να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός τους. Είναι το σημαντικότερο στάδιο της ελαιοπαραγωγής, καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την απόδοση του ελαιόκαρπου σε λάδι και τη σύσταση του τελικού προϊόντος σε φαινολικά συστατικά. Στην περίπτωση όπου η εξαγωγή του λαδιού γίνεται με υδραυλική πίεση, η διάρκεια μάλαξης περιορίζεται στα 20–30 λεπτά.

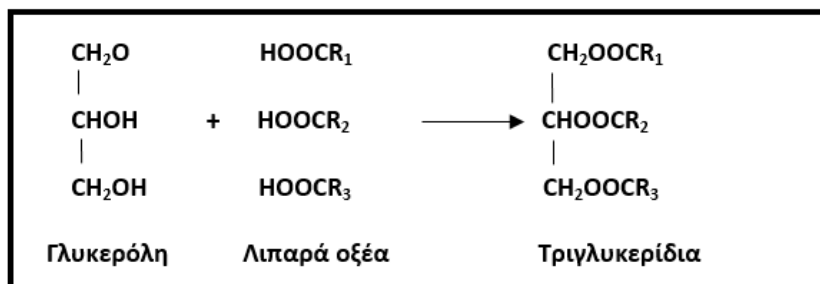
Φυγοκέντρωση

Μετά τη μάλαξη, στα παραδοσιακά πιεστήρια (που πλέον είναι ελάχιστα στην Ελλάδα), με τη βοήθεια ισχυρών υδραυλικών πιεστηρίων, εξάγονται τα υγρά της ελιάς, που είναι μίγμα ελαιολάδου με υδαρή συστατικά του καρπού. Στα σύγχρονα ελαιοτριβεία ο διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά γίνεται με φυγοκέντρωση σε συσκευές που ονομάζονται "ντεκάντερ" (εικόνα 1.7). Το στερεό υποπροϊόν που μένει ονομάζεται "πυρήνας". Τα υγρά που λαμβάνονται από το ντεκάντερ (basικά μίγμα νερού και λαδιού) οδηγούνται σε έναν ή περισσότερους φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες όπου το λάδι διαχωρίζεται από το υδαρές τμήμα λόγω διαφοράς στην πυκνότητα. Τα υδαρή συστατικά που αποβάλλονται ονομάζονται κοινώς "κατσίγαρος" και είναι σκούρου καφέ χρώματος και χαρακτηριστικής οσμής.



Εικόνα 1.7 Λειτουργία ενός φυγοκεντρικού διαχωριστήρα για τον διαχωρισμό του ελαιολάδου από την σάρκα της ελιάς

Το ελαιόλαδο, όπως και κάθε λιπαρή ύλη, είναι κυρίως ένα μείγμα τριγλυκεριδίων. Τα τριγλυκερίδια σχηματίζονται με την ένωση ενός μορίου γλυκερόλης με τρία μόρια λιπαρών οξέων (τριακυλογλυκερόλες) (εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Αντίδραση σχηματισμού τριγλυκεριδίου

Εκτός από τα τριγλυκερίδια, το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο ή σχηματίζονται κατά την παραλαβή του [14], όπως :

- Ελεύθερα λιπαρά οξέα (προϊόντα υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων)
- Φωσφατίδια (ή φωσφολιπίδια)
- Στερόλες
- Αλειφατικές αλκοόλες,
- Φαινόλες
- Τοκοφερόλες
- Χρωστικές
- Πτητικές οργανικές ενώσεις
- Διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες, κ.λ.π.

Τα συστατικά του ελαιόλαδου, διακρίνονται σε σαπωνοποιήσιμα (τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κ.α.) και μη σαπωνοποιήσιμα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α.) (Πίνακας 1.1). Το 98,0-99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο μη σαπωνοποιήσιμα. Παρά το γεγονός ότι το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά μικρό, τα συστατικά του διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό και βιολογικό ρόλο

ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΚΛΑΣΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	ΜΗ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΚΛΑΣΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ
Τριγλυκερίδια	Στερόλες
Διγλυκερίδια (1 – 3 %)	Υδρογονάνθρακες (σκουαλένιο)
Μονογλυκερίδια (0,25%)	Τερπένια
	Τοκοφερόλες (α , β , γ)
	Χλωροφύλλες
	Καροτενοειδή
	Φαινόλες

Πίνακας 1.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Λιπαρά οξέα

Το ελαιόλαδο αποτελείται από μονοακόρεστα, πολυακόρεστα και κορεσμένα λιπαρά οξέα, κυρίως υπό τη μορφή εστέρων με γλυκερόλη, τα τριγλυκερίδια, τα οποία συνιστούν το 98-99% της σύστασης του ελαιολάδου. Η σύσταση του ελαιολάδου καθώς και των άλλων φυτικών ελαίων σε λιπαρά οξέα δεν είναι σταθερή. Εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, οι εδαφικές καθώς και κλιματικές συνθήκες της περιοχής και ο βαθμός ωριμότητας του καρπού . Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου είναι ακόρεστα. Μεταξύ αυτών σε μεγαλύτερη αναλογία απαντά το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C18:1) (εικόνα 1.9). Το δεύτερο σημαντικότερο ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το λινελαϊκό (C18:2) (εικόνα 1.10). Άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα που απαντούν, στο ελαιόλαδο αλλά και σε μικρές ποσότητες είναι λινολενικό (C18:3), αραχιδικό (C20:4) και το παλμιτελαϊκό (C16:1).

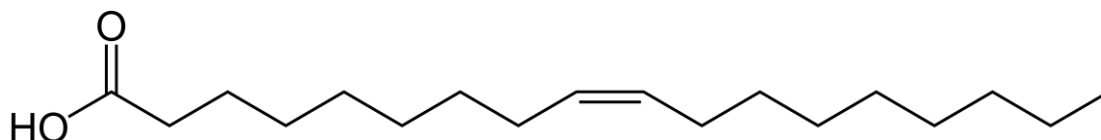
Από τα κορεσμένα οξέα αυτό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία είναι το παλμιτικό (C16:0) (εικόνα 1.11), ακολουθεί το στεατικό (C18:0).

Τα κύρια τριγλυκερίδια του ελαιολάδου είναι αυτά στα οποία απαντά το ελαϊκό οξύ, καθώς αποτελούν 70-80% του βάρους του ελαίου. Εκτός από τα κύρια λιπαρά οξέα που προαναφέρθηκαν, στο ελαιόλαδο απαντούν σε ποσοστό μικρότερο όμως του 0,1% τα οξέα μυριστικό (C14:0), λαουρικό (C12:0) και αραχιδικό (C20:0). Έχουν προσδιοριστεί σε ίχνη και οξέα με είκοσι τέσσερα άτομα άνθρακα (C24). (Colakoglou, 1966)

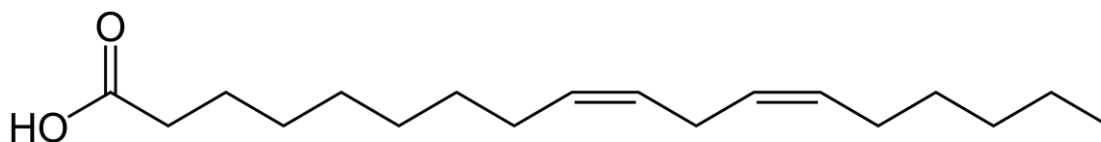
Η επιτροπή Codex Alimentarius το 1970, καθιέρωσε για τα λίπη και τα έλαια τα παρακάτω όρια (ελάχιστα και μέγιστα) για τα βασικά λιπαρά οξέα του ελαιολάδου: ελαϊκό 56-83%, παλμιτικό 7-20% και λινελαϊκό 3-20%. Τα συνήθη όρια μέσα στα οποία κυμαίνεται η περιεκτικότητα του ελαιολάδου στα διάφορα λιπαρά οξέα δίνονται στον πίνακα 1.2

Οξύ	Περιεκτικότητα %	Οξύ	Περιεκτικότητα %
Ελαϊκό	56,0 – 83,0	Μυριστικό	Ίχνη – 0,1
Παλμιτικό	7,5 – 20,0	Αραχιδικό	≤0,8
Λινελαϊκό	3,5 – 20,0	Βεχενικό	≤0,2
Στεατικό	0,5 – 5,0	Λιγνοκερικό	≤1,0
Παλμιτελαϊκό	0,3 – 3,5	Δεκαεπτανοϊκό	≤0,5
Λινολενικό	Ίχνη – 1,5	Δεκαεπτενέϊκό	≤0,6

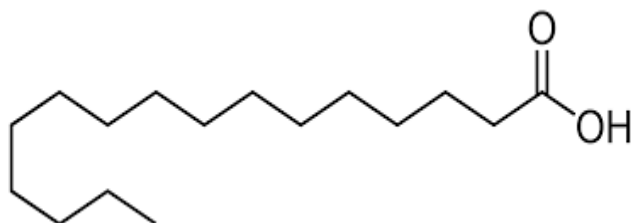
Πίνακας 1.2 Περιεκτικότητα ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα



Εικόνα 1.9 Χημικός τύπος του ελαϊκού οξέος



Εικόνα 1.10 Χημικός τύπος του λινελαϊκού οξέος



Εικόνα 1.11 Χημικός τύπος του παλμιτικού οξέος

Ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Στο ελαιόλαδο πέρα από τα λιπαρά οξέα που αναφέρθηκαν παραπάνω, υπάρχουν και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προέρχονται από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών ως αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι είτε λόγω ασθενειών του ελαιόκαρπου είτε λόγω της κακής μεταχείρισης του ελαιόκαρπου πριν και μετά την διαδικασία της ελαιοποίησης. Το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων συνθέτουν τον όρο της οξύτητας του ελαιόλαδου.

Φωσφολιπίδια Του Ελαιολάδου

Το παρθένο ελαιόλαδο είναι φτωχό σε φωσφολιπίδια. Η συγκέντρωση τους κυμαίνεται από 35 έως 40 mg/kg. Η μεγαλύτερη ποσότητα των φωσφολιπιδίων προέρχεται από το πυρήνα του ελαιοκάρπου. Τα φωσφολιπίδια που απαντούν στο ελαιόλαδο είναι κυρίως η λεκιθίνη και η κεφαλίνη. Το ελαϊκό οξύ είναι το κυριότερο από τα λιπαρά οξέα που συνθέτουν το μόριο των φωσφολιπιδίων του ελαιόλαδου

Ασαπwnοποίητο Κλάσμα

Είναι εξαιρετικά δύσκολο να καθοριστεί η συνολική ποσότητα των μικροσυστατικών εξαιτίας της πολύπλοκης φύσης τους και της χαμηλής συγκέντρωσής τους. Μια απλή προσέγγιση είναι να καθοριστεί το ασαπwnοποίητο κλάσμα. Αυτό ορίζεται ως "το σύνολο των προϊόντων που υπάρχουν στην ουσία που αναλύεται, το οποίο μετά την ασαπwnοποίηση με υδροξείδιο του καλίου και την εξαγωγή με συγκεκριμένο διαλύτη, παραμένει μη πτητικό κάτω από τις καθορισμένες συνθήκες του "τεστ". Περιλαμβάνει λιπίδια φυσικής προέλευσης όπως στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες μεγάλου μοριακού βάρους, χρωστικές και υδρογονάνθρακες καθώς και κάποια ξένα οργανικά συστατικά μη πτητικά στους 103°C .

Η ποσότητα και η σύσταση του κλάσματος των ασαπwnοποίητων συστατικών του ελαιόλαδου εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τον τρόπο με τον οποίο έχει γίνει η παραλαβή του.

Βασικότερα Συστατικά του Ασαπwnοποίητου Κλάσματος

Υδρογονάνθρακες

Δύο υδρογονάνθρακες είναι παρόντες σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο, το σκουαλένιο και β-καροτένιο (το τελευταίο αναπτύσσεται στην παράγραφο των χρωστικών). Το σκουαλένιο είναι η πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση των στερολών. Πρόκειται για πολυακόρεστο υδρογονάνθρακα με τριάντα άτομα ανθρακα. Είναι το συστατικό με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ασαπwnοποίητο κλάσμα (εώς 40% κατά βάρος) .

Χρωστικές

- Οι χλωροφύλλες α και β, και οι φαιοφυτίνες α και β είναι υπεύθυνες για το χρώμα. Η περιεκτικότητά τους στο φυσικό ελαιόλαδο ποικίλει μεταξύ 1 και 20 ppm. Ο συνδυασμός τους, καθώς και η επιμέρους περιεκτικότητά τους στο λάδι είναι οι παράγοντες που καθορίζουν το χρώμα του. Αν τα λάδια έχουν παραχθεί από μαύρες ελιές η φαιοφυτίνη α είναι πρακτικά η μόνη χρωστική

από αυτήν την κατηγορία που θα υπάρχει, ενώ η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες εξαρτάται ως ένα βαθμό από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του λαδιού. Το στάδιο ωριμότητας είναι επίσης σημαντικό για την περιεκτικότητα της χλωροφύλλης στο λάδι.

- Τα κύρια καροτινοειδή που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι η λουτεΐνη, το β-καροτένιο, η βιολαξανθίνη και οι νεοξανθίνη, με κυριότερο τη λουτεΐνη. Προς το τέλος της περιόδου συλλογής αυτό το καροτινοειδές γίνεται το κυρίαρχο συστατικό στις ελιές γιατί κατά την διάρκεια της ωρίμανσης, λαμβάνει χώρα μια σημαντική μείωση των χλωροφυλλών. Τα ολικά καροτινοειδή συνήθως κυμαίνονται μεταξύ 1 και 20 ppm στο ελαιόλαδο. Το β-καροτένιο απαντάται σε ποσότητες από 0.5 ως 4 ppm.

Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την κανονική αύξηση και διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν είναι σε θέση να τις συνθέσει μόνος του. Η ανεπαρκής παρουσία των βιταμινών στον οργανισμό προκαλεί ορισμένες ασθένειες, που είναι γνωστές ως αβιταμινώσεις. Η λιπόφιλη βιταμίνη Ε απαντά στο ελαιόλαδο, όπως και σε όλες σχεδόν τις φυσικές λιπαρές ύλες. Στο ελαιόλαδο απαντά επίσης και η προβιταμίνη Α (β-καροτένιο) [15].

Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι σημαντικά συστατικά του ελαιόλαδου. Πρόκειται για ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Συνεισφέρουν στη σταθερότητα του ελαιόλαδου και η βιταμίνη Ε (α- τοκοφερόλη) εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση. Από τις επί μέρους ομόλογες τοκοφερόλες οι οποίες έχουν βρεθεί στο ελαιόλαδο η α- τοκοφερόλη αποτελεί την κύρια και καλύπτει 88,5% του συνόλου. Η β- μαζί με την γ- αποτελούν το 9,9% και η δ- το 1,6% του συνόλου των τοκοφερολών [14]. Η συνολική συγκέντρωση των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο ποικίλει. Η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε α- τοκοφερόλη κυμαίνεται από 12-150 mg/kg.

Στερόλες

Οι στερόλες είναι σημαντικά μη γλυκεριδικά συστατικά. Σχετίζονται με την ποιότητα του ελαιόλαδου και χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο της αυθεντικότητας του. Πρόκειται για κυκλικές αλκοόλες μεγάλου μοριακού βάρους. Βρίσκονται σε όλες τις φυσικές λιπαρές ύλες είτε ελεύθερες είτε δεσμευμένες με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα. Είναι διαλυτές στα λίπη, στα έλαια και στους μη πολικούς διαλύτες και

αδιάλυτες στο νερό. Αποτελούν την κύρια τάξη των ασαπωνοποιήτων συστατικών των λιπαρών υλών, όταν δεν είναι δεσμευμένες.

Φαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο ελαιόλαδο αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό του. Ωστόσο, λόγω της υψηλής βιολογικής σημασίας τους και του ρόλου που παίζουν στη διαμόρφωση των πλούσιων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ελαιολαδου, κρίνεται σκόπιμο να εξεταστούν αναλυτικότερα.

ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Τα μέλη της οικογένειας *Oleaceae*, στην οποία ανήκει η ελιά (*Olea Oleaceae*), χαρακτηρίζονται από την παρουσία σεκοϊριδοειδών ενώσεων, τα επονομαζόμενα ολεοσίδια, τα οποία περιέχουν στο μόριό τους εστεροποιημένη μία αλειφατική φαινολική ομάδα. Η ελευρωπαΐνη και το λιγκστροσίδιο, τα πιο σημαντικά ολεοσίδια της ελιάς είναι εστέρες του ελενολικού οξέος με την 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και με την 4-υδροξυφαινυλαιθανόλη (τυροσόλη), αντίστοιχα. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε πολυφαινόλες [16]. Οι φαινολικές ενώσεις, ελεύθερες ή εστεροποιημένες, περιέχονται στο πολικό μέρος του ελαιόλαδου, το οποίο λαμβάνεται κατά την εκχύλιση του ελαιόλαδου με τους τρόπους που αναφέρονται στο επόμενο κεφάλαιο. Έχουν απομονωθεί περισσότερες από 20 διαφορετικές πολυφαινόλες σε ελαιόλαδα προερχόμενα από τις διάφορες ποικιλίες ελιάς. Στο ελαιόλαδο ο όρος πολυφαινόλες (όρος δανεισμένος από την παραγωγή κρασιού) χρησιμοποιείται συμβατικά εφόσον, ως επί το πλείστο, αυτές οι ενώσεις δεν είναι πολυμερείς, αλλά μονομερείς ενώσεις με μοριακό βάρος το οποίο μπορεί να φτάσει την τιμή 540 (ελευρωπαΐνη). Ο υψηλός δείκτης συσχέτισης μεταξύ των πολυφαινολών και των γευστικών χαρακτηριστικών του ελαιόλαδου είχε διαπιστωθεί από τον Gutiérrez-Rosales και τους συνεργάτες του, ήδη από το 1974 [17]. Από όλες τις πολυφαινόλες που υπάρχουν στο παρθένο ελαιόλαδο, μεγαλύτερη συσχέτιση με την πικρή γεύση έχουν σεκοϊριδοειδείς ενώσεις στις διάφορες μορφές τους (προϊόντα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου). Πιο συγκεκριμένα η ελαιοκανθάλη (διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσιδίου χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα, p-HPEA-EDA) είναι μια ουσία στην οποία οφείλεται η αίσθηση «καψίματος» στο πίσω μέρος της γλώσσας. Στην πραγματικότητα, κατόπιν έρευνας αποδείχτηκε πως ενεργοποιεί τον αισθητικό υποδοχέα TRPA1 που βρίσκεται στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα, προκαλώντας αυτή την ερεθιστική δράση [18]. Μεταξύ των φαινολικών ουσιών που σχετίζονται με την πικρή γεύση ορισμένων εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων είναι και η ελαιασίνη (διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα, 3,4-DHPEA-EDA) [19], [20], [17], [21]. Μαζί με το άγλυκο της ελευρωπαΐνης και το

άγλυκο του λιγκστροσίδη οι ουσίες αυτές αποτελούν τις κυριότερες φαινολικές ενώσεις με υγειοπροστατευτικές ιδιότητες στο ελαιόλαδο. Πρόσφατη μελέτη φέρνει στο προσκήνιο ισομερείς μορφές του άγλυκου της ελευρωπαϊνης και του άγλυκου του λιγκστροσίδη, με τις ονομασίες ελαιοκορωνάλη, λιγκστροδιάλη, ελαιομισσιονάλη και ελευρωπαϊνδιάλες, και άγνωστες προς το παρόν βιολογικές ιδιότητες [22]. Σε παλαιότερες μελέτες [23], [24] στο παρθένο ελαιόλαδο διαπιστώθηκε ότι οι σεκοϊριδοειδείς ενώσεις δεν παρουσιάζονται με την γλυκοζιτική τους μορφή, λόγω ενζυμικής υδρόλυσης με το ένζυμο β-γλυκοσιδάση, το οποίο έχει ανιχνευτεί στον καρπό της ελιάς. Μάλιστα νεότερη μελέτη επισημαίνει πως η συγκέντρωση του ενζύμου είναι υψηλότερη στα πρώτα στάδια ωρίμανσης του καρπού [25].

Άλλες φαινόλες οι οποίες έχουν ανιχνευτεί στο ελαιόλαδο είναι τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (ο-κουμαρικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σιναπικό οξύ, 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ), τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (*p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, γεντιστικό οξύ), φαινολικές αλκοόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), το σικιμικό οξύ, παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος (*p*-ύδροξυφαινυλοξικό οξύ, ομοβανιλλικό οξύ, ομοπρωτοκατεχικό οξύ), τα μονοτερπένια θυμόλη, καρβακρόλη, φλαβόνες (απιγενίνη, λουτεολίνη), και οι φλαβονόλες καμφερόλη, και κερκετίνη. Τέλος στο παρθένο ελαιόλαδο ανιχνεύτηκαν το 1999, και οι λιγνάνες (+)-1-ακέτοξυπινωρεσινόλη και (+)-πινωρεσινόλη σε σημαντικές ποσότητες [26].

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου εμφανίζουν ιδιαίτερη βιοδιαθεσιμότητα στον άνθρωπο, η οποία συντελεί στην ενίσχυση της άποψης ότι τα φαινολικά συστατικά ασκούν θετική επίδραση στην υγεία. Αν και οι ευεργετικές επιδράσεις του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου είναι γενικά γνωστές, πρόσφατα άρχισαν να ερευνώνται και οι βιολογικές ιδιότητες των μικροσυστατικών του που κατέχουν επίσης σημαντικό ρόλο.

Οι φαινόλες του ελαιόλαδου λειτουργούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και προστατεύουν το ελαιόλαδο από την οξείδωση, όταν αυτό δέχεται την καταστροφική επίθεση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας.

Ένα ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες έχει υψηλό βαθμό προστασίας και αντοχής στον χρόνο, ενώ ταυτόχρονα η κατανάλωσή του προστατεύει τα ανθρώπινα κύτταρα από το οξειδωτικό stress.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες οι οποίες συσχετίζουν την θετική επίδραση του ελαιόλαδου στη υγεία με τη παρουσία φαινολικών συστατικών. Μερικά παραδείγματα θετικών επιδράσεων είναι τα ακόλουθα:

Αντιμικροβιακές Ιδιότητες

Τη μεγαλύτερη απορρόφηση από τον ανθρώπινο οργανισμό εμφανίζουν η το άγλυκο της ελευρωπαΐνης και η ελαιοκανθάλη [31]. Αντίθετα, σύμφωνα με έρευνες, τα φαινολικά παράγωγα που δεν αφομοιώνονται πλήρως από τον οργανισμό μας, εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες προστατεύοντας τον γαστροοισοφαγικό σωλήνα και τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου [32], [33].

Οι φαινόλες του ελαιολάδου δρουν συνεργιστικά κατά 3 παθογόνων που συναντώνται στα τρόφιμα, των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella enteritidis*. Η δράση εντοπίστηκε *in vitro* και ήταν ισχυρότερη από τη δράση που εμφανίζει το κάθε συστατικό ξεχωριστά [34]. Η έρευνα αναδεικνύει τις δυνατότητες του ελαιολάδου ως ασπίδα ενάντια σε τροφικές δηλητηριάσεις.

Αντιοξειδωτικές δράσεις

Δράση κατά των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Η περίσσεια ελεύθερων ριζών μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικές βλάβες σε βιομόρια (λ.χ. λιπίδια και DNA), αυξάνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιων ασθενειών όπως η αρτηριοσκλήρωση, ο καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις, χρόνια φλεγμονή, θρομβώσεις και άλλες εκφυλιστικές ασθένειες [35]. Οι φαινόλες του ελαιολάδου έχουν δείξει εξαιρετικά αποτελέσματα ενάντια στην οξείδωση των λιπιδίων, τις οξειδωτικές αλλοιώσεις του DNA και του οξειδωτικού στρες γενικότερα, *in vitro* και *in vivo*, και έχει αποδειχθεί πως μπορούν δυνητικά να μειώσουν τους κινδύνους εμφάνισης των παραπάνω ασθενειών [36].

Δράση κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL)

Η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (oxLDL) θεωρείται ένας σημαντικός παράγων κινδύνου για την εμφάνιση της αρτηριοσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων, επειδή προκαλεί το σχηματισμό πλακών στα αρτηριακά τοιχώματα. *In vivo* έρευνες σε ανθρώπους και ζώα έχουν συσχετίσει την αύξηση στην κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιολάδου πλούσιο σε φαινολικά παράγωγα με την μείωση των επιπέδων οξείδωσης της LDL [37], [38], [39]. Μελετητές που ερεύνησαν τον μηχανισμό του φαινομένου, απέδειξαν πως τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου προσδένονται στα LDL μόρια, αυξάνοντας έτσι την αντίστασή τους στην οξείδωση [40], [41].

Δράση κατά της οξείδωσης του DNA

Οι οξειδωτικές βλάβες στο ανθρώπινο DNA είναι πρόδρομος της καρκινογένεσης. Η έρευνα σχετικά με τις αλλοιώσεις του DNA (αξιολογώντας με τη χρήση της μεθόδου comet) δείχνει πως η κατανάλωση ελαιολάδου πλούσιου σε φαινόλικά συστατικά μπορεί να περιορίσει τις οξειδωτικές βλάβες στο ανθρώπινο DNA έως 30% [42], [43]. Μελέτες σε πειραματόζωα και *in vitro* έχουν επιβεβαιώσει τα παραπάνω αποτελέσματα [44], [45].

Στο σημείο αυτό οφείλουμε να αναφέρουμε τη δράση του ισχυρότερου αντιοξειδωτικού μορίου του ελαιολάδου, της ελαιασίνης. Μία συνδυαστική μελέτη του 2012 [30] ανέδειξε τις δράσεις της ελαιασίνης κατά της οξείδωσης της LDL, του σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου και της υπερέκφρασης γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της αγγειοτενσίνης II, που δρα ως παράγοντας γήρανσης των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, στη μελέτη αυτή η ελαιασίνη φάνηκε να ενισχύει τη δράση των προγονικών κυττάρων του ενδοθηλίου (EPCs), που λειτουργούν ως παράγοντας επιδιόρθωσης των συμπτωμάτων του οξειδωτικού στρες.

Δράση κατά της οξείδωσης των κυτταρικών μεμβρανών

Σε μελέτες που έχουν γίνει *in vitro*, το ελαιόλαδο έχει αποδειχθεί ένα τρόφιμο με εξαιρετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, το ελαιόλαδο αναστέλλει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και αυξάνει την αντοχή του πλάσματος στην οξείδωση. Επιπλέον, κλινικές μελέτες έχουν παρουσιάσει την αναστολή της λιποξυγενάσης του αραχιδονικού οξέος, την προστασία της γλουταθειόνης από την αντίστοιχη ρεδοукτάση και κατά συνέπεια τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης αρτηριοσκλήρωσης [37], [38]. Τέλος, *in vitro* έρευνες έχουν δείξει πως τα φαινόλικά συστατικά του ελαιολάδου μειώνουν τις ανεπανόρθωτες οξειδωτικές βλάβες στα ερυθροκύτταρα, νεφρικά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα των εντέρων, μετρημένα με βάση τη μορφολογία της κυτταρόλυσης, τα επίπεδα αιμογλοβίνης που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες, το πρωτεϊνικό προφίλ των μεμβρανών και τις αλλαγές στη σύσταση των μεμβρανικών λιπιδίων [46], [47], [48]

Αντιφλεγμονώδεις Ιδιότητες

Είναι αποδεδειγμένο πως η παθοφυσιολογία αρκετών κοινών ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αρθρίτιδα και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες συσχετίζονται με χρόνιες φλεγμονές. Οι φαινόλες του ελαιολάδου αποτελούν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ουσίες με αξιόλογα αποτελέσματα σε *in vivo* και *in vitro* έρευνες, όπου έχει παρατηρηθεί άμεση απόκριση του οργανισμού στην καταπολέμηση της φλεγμονής, μετά τη χορήγηση έξτρα παρθένου ελαιολάδου, πλούσιου σε φαινόλες [49], [50], [51]. *In vitro* έρευνες έχουν αναδείξει το άγλυκο της ελευρωπαΐνης ως αναστολέα του παράγοντα καρκινικής νέκρωσης α (TNFα) και της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP-9) σε μονοκυτταρική σειρά, ένας σημαντικός ρόλος για την αντιμετώπιση ασθενειών που ξεκινούν από φλεγμονές [52].

Η ελαιοκανθάλη έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζει την ίδια αντιφλεγμονώδη δράση, ακόμα και τον ίδιο μηχανισμό δράσης με τη μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ουσία ιβουπροφαίνη [53]. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται και η *in vitro* δράση της ελαιοκανθάλης, που περιλαμβάνει την αναστολή των COX-1 και COX-2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και πιθανή αποτελεσματικότητα μεγαλύτερη της ιβουπροφαίνης. Νεότερη εργασία αναφέρει πως η ελαιοκανθάλη δρα ως αναστολέας του ενζύμου iNOS που συμβάλλει σημαντικά στην παθογένεια συνδυαστικών εκφυλιστικών ασθενειών, που ξεκινάνε από φλεγμονές [54]. Επιπροσθέτως, σε έρευνα του 2011, το άγλυκο της ελευρωπαΐνης φάνηκε να παρεμποδίζει την εξέλιξη της πλευρίτιδας σε ποντίκια, μειώνοντας τις φλεγμονές [64].

Οι Camargo *et al.* το 2009 [65] έδειξαν πως η κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιολάδου πλούσιου σε φαινολικά συστατικά (της τάξης των 400mg/Kg ελαιολάδου) ελαττώνει την έκφραση αρκετών γονιδίων υπεύθυνα για τη δημιουργία φλεγμονών, συμπεριλαμβανομένων των NFκβ και COX-2, ενώ οι Konstantinidou *et al* το 2010 [66] ανέδειξαν την παρόμοια δράση ελαιολάδου με περιεκτικότητα 328mg/Kg σε γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση αρτηριοσκλήρωσης. Πιο πρόσφατη έρευνα αναδεικνύει την συμβολή της ελαιασίνης στην πρόληψη της αρτηριοσκλήρωσης, μέσω της ενίσχυσης της δράσης της αιμογλοβίνης, κατά τη μεταφορά του οξυγόνου στα αιμοφόρα αγγεία [63]. Να σημειωθεί πως σε όλες τις κλινικές μελέτες που αναφέρθηκαν, οι συμμετέχοντες έλαβαν μία ποσότητα ελαιολάδου που εμπίπτει στην μέση κατανάλωση με βάση τη Μεσογειακή διατροφή.

Δράση κατά της νόσου του Alzheimer

Οι έρευνες σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες της ελαιοκανθάλης έχουν αναδείξει μία επιπλέον σημαντική δράση του συγκεκριμένου συστατικού, τη δράση κατά τη νόσου του Alzheimer. Συγκεκριμένα οι ερευνητές υποστηρίζουν πως η ελαιοκανθάλη εντείνει την έκφραση των πρωτεϊνών-μεταφορέων P-gr και LRP1, που εμποδίζουν τη συσσώρευση β-αμυλοειδούς (Αβ) στον εγκέφαλο ποντικών [55]. Άλλες έρευνες υποδεικνύουν ως μηχανισμό δράσης της ελαιοκανθάλης την αλλοίωση στη μορφή των Αβ πεπτιδίων και την παρεμπόδιση της δημιουργίας ινιδίων από την πρωτεΐνη Tau [56], [57]. Επιπλέον, σε πρόσφατη έρευνα, η ανάλυση ανοσοφθορισμού εγκεφαλικού ιστού σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί άγλυκο ελευρωπαΐνης έδειξε σημαντικά μειωμένα επίπεδα β-αμυλοειδούς και οι πλάκες που εμφανίστηκαν ήταν λιγότερες και λιγότερο συμπαγείς [75].

Αντικαρκινικές - Κυτταροτοξικές Ιδιότητες

Η ελαιοκανθάλη επιπλέον εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε καρκινικές σειρές που συσχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του προστάτη [58]. Οι Khanal *et al.* το 2011 [59] παρουσίασαν το μηχανισμό δράσης της

ελαιοκανθάλης στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων. Στην εν λόγω έρευνα αναφέρεται πως η ελαιοκανθάλη καταστέλλει τη φωσφορυλίωση που είναι απαραίτητη για ένζυμα-σήματα, όπως οι κινάσες της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, προωθεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιώντας τα ανάλογα ένζυμα και παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι ίδιοι μηχανισμοί δράσης της ελαιοκανθάλης επιβεβαιώνονται και από μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε *in vitro* και *in vivo*, ενάντια στον καρκίνο του δέρματος (μελάνωμα) [62]. Επιπλέον, μία πρόσφατη εργασία [60] από τους Fogli *et al.* παρουσίασε την επιλεκτική κυτταροτοξική δράση της ελαιοκανθάλης ενάντια σε κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου μελανώματος. Ενώ σε παλαιότερη μελέτη έχει παρουσιαστεί η δράση της ως αναστολέας ανάπτυξης του *Helicobacter pylori*, που έχει συνδεθεί με έλκη και εμφάνιση καρκινικών κυττάρων στο στομάχι [61].

Ένας διαφορετικός μηχανισμός δράσης της ελαιοκανθάλης περιγράφεται σε πρόσφατη έρευνα με θέμα την κυτταροτοξική της δράση [114]. Στην εν λόγω εργασία παρουσιάζεται η επίδραση της ελαιοκανθάλης στην διάτρηση των πρωτεϊνικών μεμβρανών των λυσοσωμάτων σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων μορφών καρκίνου, μόλις 30 λεπτά από την χορήγησή της. Το αποτέλεσμα είναι η απόπτωση και νέκρωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω της αναστολής της όξινης σφιγγομυελινάσης (ASM), παρεμποδίζοντας έτσι την ανταλλαγή πρωτεϊνών-σημάτων που συντελούν στη σταθερότητα της μεμβράνης του λυσοσώματος. Σε μη καρκινικά κύτταρα, με την εφαρμογή της ελαιοκανθάλης, περιορίστηκε ο πολλαπλασιασμός τους, αλλά δεν προκλήθηκε κυτταρικός θάνατος, επισημαίνοντας έτσι την επιλεκτικότητα στην κυτταροτοξική δράση του μορίου.

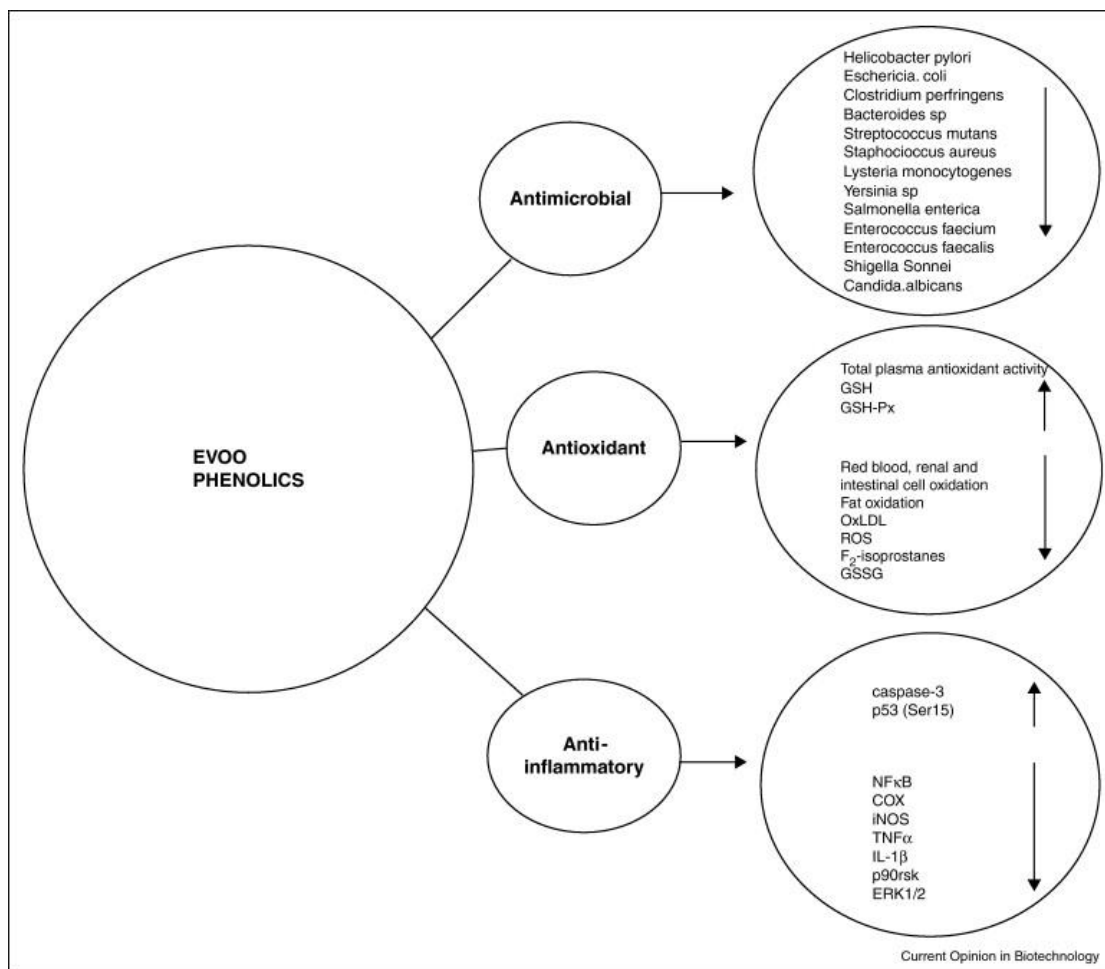
Τέλος, οφείλουμε να αναφέρουμε πως σύμφωνα με μελέτες το άγλυκο του λιγκστροσίδη προκαλεί υψηλά επίπεδα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε υπερεκφραζόμενα καρκινικά κύτταρα μαστού HER2 και έδειξε μέτρια κυτταροτοξικότητα ενάντια σε μια ομάδα 39 ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*. [27]. Το άγλυκο του λιγκστροσίδη ενώ εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα ανάμεσα στα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου, στερείται κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικά κύτταρα.

Δράσεις κατά της οστεοαρθρίτιδας

Δημοσιευμένα στοιχεία υποδηλώνουν πως οι φαινόλες του ελαιολάδου μπορούν να είναι ωφέλιμες και για την οστική μάζα. Οι Liu, *et al.*, το 2014 [67] παρουσίασαν την ενδυνάμωση των οστών σε γυναίκες σε κατάσταση τεχνητής εμμηνόπαυσης, συσχετιζόμενη με την κατανάλωση ελαιολάδου πλούσιου σε φαινολικά συστατικά. Σε άλλη μελέτη παρουσιάστηκε πιο συγκεκριμένα η θετική επίδραση στην πολλαπλασιαστική δυναμικότητα των οστεοβλαστών αυξάνοντας τη δραστηριότητα

της αλκαλικής φωσφατάσης και εναποθέτοντας ιόντα ασβεστίου στη μεμβράνη των κυττάρων [68]. Τέλος, πρόσφατες έρευνες εκθειάζουν τη μεσογειακής διατροφής λόγω της θετικής συσχέτισης με την αύξηση της πυκνότητας των οστών [28]. Ισχυρισμός που ειδικά για το ελαιόλαδο υποστηρίζεται και από κλινικές μελέτες [29]

Συνοψίζοντας, η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου εντείνει τον ισχυρισμό ότι αυτά τα συστατικά ασκούν θετική επίδραση στη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού και την καταπολέμηση κοινών ασθενειών. Αρκετές μελέτες (*in vivo* και *in vitro*) έχουν δείξει πως οι φαινόλες του ελαιολάδου εμποδίζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα, την οξειδωτική διαδικασία και τη δημιουργία φλεγμονών. Οι μηχανισμοί δράσης των ωφέλιμων συστατικών του ελαιολάδου που έχουν μελετηθεί, σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης των ασθενειών που αναφέρθηκαν σε πληθυσμούς γύρω από τη Μεσόγειο, ενισχύουν την θετική άποψη για την επίδραση της κατανάλωσης εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, στο πλαίσιο της Μεσογειακής διατροφής, στην ανθρώπινη υγεία [70].



Εικόνα 1.12 Βιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου

Η χημική σύσταση του ελαιολάδου, είναι ένα μωσαϊκό που επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, ελεγχόμενους και μη. Από την απόδοση των καρπών σε ελαιόλαδο, μέχρι την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινόλες, υπάρχουν πολλά στάδια στην παραγωγή του που μπορούν να μεταβάλλουν κάθε αριθμητική τιμή που χαρακτηρίζει το τελικό προϊόν που φτάνει στον οργανισμό μας. Καθώς τα πολυφαινολικά συστατικά παίζουν πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση της υψηλής ποιότητας του τελικού προϊόντος, θεωρείται δεδομένο ότι πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια για τη διατήρησή τους σε υψηλά επίπεδα.

➤ Ποικιλία

Ο γονότυπος του ελαιόδεντρου μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στο είδος και την περιεκτικότητα των ευεργετικών συστατικών του ελαιολάδου. Με βάση την ποικιλία, οι ελιές κατηγοριοποιούνται σε επιτραπέζιες, για ελαιοποίηση ή μεικτές. Έρευνες έχουν αποδείξει πως κάτι ανάλογο συμβαίνει και με το φαινολικό προφίλ των ελαιολάδων που διαφοροποιείται, ανάλογα με την ποικιλία του είδους *Olea europaea* L. από την οποία προέρχεται [71], [72], [73].

➤ Ωρίμανση του καρπού

Ο καρπός της ελιάς αναπτύσσεται με ταχύ ρυθμό στα αρχικά του στάδια και ακολουθείται από μια περίοδο επιβράδυνσης της ανάπτυξής του, που ακολουθείται από μια άλλη περίοδο ανάπτυξης επιταχυνόμενου ρυθμού, που ισοδυναμεί με την αρχική. Η συσσώρευση των φαινολικών ενώσεων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τη φυσιολογική κατάσταση του καρπού και είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ της βιοσύνθεσης και του περαιτέρω καταβολισμού. Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι, όλες οι φαινολικές ουσίες αρχικά αυξάνονται εκθετικά στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού και στη συνέχεια όταν φτάσουν σε ένα μέγιστο επίπεδο, ακολουθούν μια φθίνουσα πορεία όπου παρατηρείται μείωση των επιπέδων τους όσο η ελιά συνεχίζει να αναπτύσσεται. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι αυξάνεται κατά την ωρίμανση, αλλά είναι γνωστό ήδη από την αρχαιότητα πως το καλύτερης ποιότητας ελαιόλαδο παράγεται από τις άγουρες ελιές και είναι το γνωστό αγουρέλαιο.

➤ Συλλογή και αποθήκευση του ελαιόκαρπου

Η συγκομιδή των καρπών θα πρέπει να γίνεται με όσο το δυνατόν λιγότερο επεμβατικά μέσα, ώστε να αποφευχθεί ο τραυματισμός της σάρκας. Επιπλέον, η ελαιοποίηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε διάστημα λίγων ωρών από τη συγκομιδή και οι καρποί να μην αποθηκεύονται σε ανοξικές συνθήκες, ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών που θα επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα του παραγόμενου ελαιολάδου [74]. Ο σημαντικότερος παράγοντας όμως είναι η εποχή της συγκομιδής του ελαιόκαρπου, αφού θα σημάνει και το τέλος των χημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του, κατά την ωρίμασή του.

➤ Μηχανική επεξεργασία

Από τη στιγμή που η ελιά θα φτάσει στο ελαιοτριβείο και θα ξεκινήσει η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου, κάθε βήμα έχει ξεχωριστή σημασία στην παραγωγή του τελικού προϊόντος. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι το πρωτόκολλο μάλαξης και ο τύπος της φυγοκέντρωσης που θα εφαρμοστεί. Πιο αναλυτικά, τα πιο κοινά συστήματα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την παραγωγή ελαιόλαδου είναι τα φυγοκεντρικά συστήματα τριών φάσεων και δύο φάσεων. Στη μέθοδο τριών φάσεων, η προσθήκη νερού στην πάστα, μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ των δύο υγρών φάσεων και μειώνει τη φαινολική συγκέντρωση στην ελαιώδη φάση, μέσω της αραίωσης στην υδατική φάση. Έτσι, η προσθήκη νερού στο ελαιόλαδο αφαιρεί υδατοδιαλυτές φαινόλες, [21], [76]. Παρατηρείται λοιπόν μικρότερη συγκέντρωση φαινολών, οι οποίες λειτουργούν σαν φυσικά αντιοξειδωτικά, κάτι που οδηγεί σε μειωμένη αντοχή του ελαιόλαδου στην αυτοοξείδωση. Στη μέθοδο δύο φάσεων δεν προστίθεται νερό για την αραίωση της ελαιοζύμης, οπότε δε μεταβάλλεται η αρχική συγκέντρωση πολυφαινολικών συστατικών. Το ελαιόλαδο που προκύπτει με αυτόν τον τρόπο παραγωγής, παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών, με αποτέλεσμα να είναι σταθερότερο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και να ανθίσταται στην αυτοοξείδωση. Κατά συνέπεια είναι πιο ποιοτικό.

Δύο άλλες πολύ σημαντικές παράμετροι που θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη είναι ο χρόνος μάλαξης του ελαιοκαρπού, καθώς και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η επεξεργασία του. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο χρόνος μάλαξης δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 – 30 λεπτά και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η όλη διαδικασία δε θα πρέπει να ξεπερνά τους 35 °C. Παλαιότερες πρακτικές υποστηρίζουν πως η παράταση της διάρκειας μάλαξης του ελαιοκαρπού έως 90 λεπτά και σε θερμοκρασία μέχρι 35 °C, παρέχει αυξημένη απόδοση σε ελαιόλαδο [77]. Παρ' όλα αυτά, νεότερες μελέτες αποδεικνύουν πως η απόδοση σε ποσότητα μπορεί να αυξάνεται αλλά όσον αφορά την ποιοτική σύστασή του παρατηρείται μείωση του ποσοστού ολικών φαινολών και ο-διφαινολών. Συνεπώς επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο η γεύση, όσο και η τελική οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου [21], [76].

Στα ελαιοτριβεία, η θερμοκρασία επεξεργασίας κατά τη διάρκεια μάλαξης συχνά διατηρείται από 35 °C έως 40 °C για οικονομικούς λόγους, δηλαδή για να παράγεται τελικά μεγαλύτερη ποσότητα ελαιόλαδου. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μάλαξης, χημικές και ενζυματικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, μπορεί να τροποποιήσουν αισθητά τη σύνθεση του ελαιόλαδου (απώλεια πτητικών ουσιών, αύξηση της οξύτητας, υποβάθμιση του χρώματος). Ο ρυθμός και η έκταση των αντιδράσεων αυτών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν. Αυτό που μπορούμε να συμπεράνουμε τελικά, είναι ότι η αύξηση του χρόνου μάλαξης αλλά και η υπέρβαση των 35°C κατά την παραγωγική διαδικασία, οδηγεί στη μείωση των πολυφαινολικών ουσιών που περιέχονται στο ελαιόλαδο. Έτσι υποβαθμίζεται κατά πολύ η ποιότητα του ελαιόλαδου. Συνεπώς είναι απαραίτητο να επιτευχθεί μια χρυσή τομή και ένας συμβιβασμός μεταξύ της αυξημένης απόδοσης σε ελαιόλαδο και της εξασφάλισης της ποιότητάς του, που συνήθως θεωρείται η μάλαξη στους 28° C για 30 λεπτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Η ποσότητα και η σύσταση των φαινολικών παραγώγων στο παρθένο ελαιόλαδο μεταβάλλεται κατά την αποθήκευση. Αυτό οφείλεται σε μία σειρά οξειδωτικών και υδρολυτικών διεργασιών. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών, η οποία αναφέρθηκε προηγουμένως, συντελεί στην μείωση της ποσότητάς τους κατά την διάρκεια της αποθήκευσης.

Το 1997 έγινε η πρώτη προσπάθεια μελέτης της υδρόλυσης των σεκοριδοειδών σε παρθένα ελαιόλαδα κατά την αποθήκευση με τον προσδιορισμό της μεταβολής της περιεκτικότητας της ελεύθερης τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης με τον χρόνο αποθήκευσης [78]. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι με μέση θερμοκρασία κατά το χειμώνα και το καλοκαίρι τους 6-12° C. Παρατηρήθηκε αύξηση και στη συνέχεια πτώση της συγκέντρωσης της ελεύθερης υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης. Η πτώση ήταν πιο έντονη για την υδροξυτυροσόλη, η οποία είναι πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό από την τυροσόλη. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το καλοκαίρι, η ταχύτητα της υδρόλυσης αυξήθηκε, λόγω αύξησης της θερμοκρασίας.

Το 2000 οι Pagliarini και συνεργάτες [79] μελέτησαν την υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών ενώσεων σε εμπορικές συνθήκες αποθήκευσης. Η θερμοκρασία του εμπορικού καταστήματος, στο οποίο αποθηκεύτηκαν τα δείγματα, διατηρήθηκε σταθερή στους 20° C για χρονικό διάστημα 21 μηνών. Παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης ελεύθερης τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Πρόχειρη κινητική μελέτη της μεταβολής της συγκέντρωσης των δύο πολυφαινόλων έδειξε ότι αυτή ακολουθεί αντίδραση ψευδο μηδενικής τάξης. Τα διαφορετικά συμπεράσματα των δύο προηγούμενων μελετών σχετικά με την υδρολυτική διάσπαση της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική θερμοκρασία πραγματοποίησης των πειραμάτων.

Το 2001 οι Brenes και συνεργάτες [80] μελέτησαν την υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών ενώσεων σε σταθερή θερμοκρασία 30° C. Παρατηρήθηκε μία γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης τις πρώτες 200 μέρες και στην συνέχεια η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή. Οι διαφορές σε σχέση με τις προηγούμενες μελέτες αποδόθηκαν σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Συγκεκριμένα στους παράγοντες φως, θερμοκρασία, υγρασία, οι οποίοι είναι οξειδωτικοί παράγοντες και συντελούν στην κατανάλωση των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση. Στην ίδια εργασία μετρήθηκαν για πρώτη φορά συγκεντρώσεις των άγλυκων λιγκστροσιδίου και ελευρωπαΐνης, τα οποία είχαν την αντίστροφη εξέλιξη από την ελεύθερη τυροσόλη

και την ελεύθερη υδροξυτυροσώλη όπως και οι λιγνάνες των οποίων η συγκέντρωση έμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Υποστηρίχθηκε ότι άλλοι παράγοντες, οι οποίοι φαίνεται ότι συντελούν σημαντικά στην μείωση των πολυφαινολών, είναι η οξύτητα (ελεύθερα λιπαρά οξέα) και το 'θόλωμα' του ελαιολάδου το οποίο οφείλεται σε σταγονίδια νερού που δεν έχουν κατακαθίσει. Έτσι, σε ελαιολάδα με μεγαλύτερη οξύτητα, οι συνολικές φαινόλες μειώθηκαν περισσότερο από ότι σε ελαιολάδα με μικρότερη οξύτητα. Ακόμα, στην ίδια εργασία παρασκευάστηκαν τεχνητά μίγματα ελαιολάδου με προσθήκη ελεύθερου ελαϊκού οξέος, ώστε να αυξηθεί η συνολική οξύτητα του ελαιολάδου. Τα δείγματα αυτά παρουσίασαν αυξημένη ταχύτητα υδρόλυσης.

Το 2004 οι Morelló και συνεργάτες [81] μελέτησαν την υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών ενώσεων στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να αναφέρεται η μέση θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το λιγκστροσίδιο και η ελευρωπαϊνή παρουσίασαν μείωση της συγκέντρωσής τους, ενώ στην ίδια εργασία μελετήθηκαν και οι λιγνάνες και τα λιπαρά οξέα, που δεν παρουσίασαν καμία απολύτως μεταβολή στη συγκέντρωση ή την αναλογία τους. Το τελικό συμπέρασμα της μελέτης εκφράζει πως όσο αυξάνεται ο χρόνος αποθήκευσης του παρθένου ελαιολάδου, τόσο μειώνεται η περιεκτικότητά του σε σύνθετες μορφές φαινολικών συστατικών (ελαιασίνη, ελαιοκανθάλη, άγλυκο της ελευρωπαϊνης κλπ.) λόγω της ανάπτυξης οξειδωτικών και υδρολυτικών δράσεων. Αντίθετα, αυξάνεται η περιεκτικότητα σε απλές φαινολικές ενώσεις (τυροσώλη, υδροξυτυροσώλη).

Η αποθήκευση του ελαιολάδου σε θερμοκρασίες δωματίου και η παρακολούθηση της περιεκτικότητάς του σε σύνθετες φαινόλες μελετήθηκε και από τους Gómez-Alonso και συνεργάτες, το 2007 [82] σε πληθώρα δειγμάτων. Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης έρευνας συμφωνεί με τις υπόλοιπες, καθώς παρατηρήθηκε μια μείωση στο συνολικό άθροισμα των φαινολικών συστατικών, σε επίπεδα από 43 – 73%, παρατηρώντας πως τα μεγαλύτερα ποσοστά απωλειών εμφανίζονται σε δείγμα που ξεκίνησαν στη μελέτη ως τα πιο πλούσια σε φαινόλες. Σε νεότερη εργασία αναφέρθηκε πως μετά από 18 μήνες αποθήκευσης του ελαιολάδου στους 28° C, η αίσθηση του καψίματος και η πικράδα που οφείλονται στην ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη είναι μειωμένη έντασης, σε αντίθεση με την αποθήκευση των δειγμάτων στους 10° C [83]. Σε παρόμοια εργασία, παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα. Ταυτόχρονα η χημική ανάλυση έδειξε μία μείωση στην περιεκτικότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης. Η έρευνα περιελάμβανε την αποθήκευση των δειγμάτων σε γυάλινα και ανοξείδωτα δοχεία και δεν εντοπίστηκαν διαφορές στα ποσοστά μείωσης των φαινολικών συστατικών [84] .

Οι Lozano-Sánchez et al. το 2013 [88] μελέτησαν τη σταθερότητα των φαινολικών συστατικών σε ένα δείγμα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Στην συγκεκριμένη έρευνα το ελαιολάδο αποθηκεύτηκε για 10 μήνες σε δεξαμενή χωρητικότητας 1000L.

Η υδρόλυση των σύνθετων φαινολικών συστατικών κατά την αποθήκευση οδήγησε σε αύξηση της περιεκτικότητας σε απλές φαινόλες. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, ανάλογη της μείωσης των σεκοϊριδοειδών. Ως πιο ευαίσθητες ενώσεις χαρακτηρίζονται τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης (ελαιασίνη και άγλυκο της ελευρωπαϊνης), υποδεικνύοντας μεγαλύτερη συμμετοχή στις υδρολυτικές και οξειδωτικές αντιδράσεις. Μεταβολές στην ελεύθερη τυροσόλη παρατηρούνται μόνο μετά από 5 μήνες αποθήκευσης, χαρακτηρίζοντας έτσι την ελαιοκανθάλη ως σταθερότερη ένωση, καθώς με την υδρόλυσή της αυξάνονται τα επίπεδα της ελεύθερης τυροσόλης. Αντίθετα με τις υπόλοιπες σύνθετες φαινόλες, στο άγλυκο του λιγκστροσίδη εντοπίστηκε μία μικρή αύξηση της περιεκτικότητας 7 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης.

Σε νεότερη μελέτη διαφοροποιήθηκαν οι συνθήκες της αποθήκευσης με βάση τη διαθεσιμότητα ατμοσφαιρικού οξυγόνου και φωτός για 10 μήνες και η παρακολούθηση των δειγμάτων αφορούσε μόνο την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ελαιοκανθάλη. Από τα 90 mg/kg ελαιοκανθάλη που περιείχε το υπό εξέταση ελαιόλαδο, παρουσία φωτός και οξυγόνου, η περιεκτικότητα αυτή μειώθηκε κατά 37%. Αντίθετα, μόνο παρουσία οξυγόνου, η μείωση αυτή ήταν μόλις 15%. Το τελικό συμπέρασμα της έρευνας υπογραμμίζει τη σταθερότητα της ελαιοκανθάλης, αφού ακόμα και με τους δύο παράγοντες οξειδωτικής καταπόνησης, διατηρήθηκε πάνω από το 60% της ουσίας [86].

Η διαφοροποίηση των συνθηκών αποθήκευσης και η συχέτισή τους με τις μεταβολές στην περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας και για άλλες επιστημονικές ομάδες. Για παράδειγμα, κατά την αποθήκευση δειγμάτων ελαιολάδου για 8 μήνες στους 25° C και στους 40° C το φαινολικό περιεχόμενο μειώθηκε γρηγορότερα σε υψηλότερη θερμοκρασία απ' ό τι στη χαμηλότερη. Οι ερευνητές αναφέρουν επίσης ότι υπήρχε δείγμα συγκεκριμένης ποικιλίας το οποίο δεν έδειξε καμία ουσιαστική μεταβολή στο φαινολικό κλάσμα, ακόμα και στους 40° C. Το λιπιδικό προφίλ επισημαίνεται πως αποτελεί αποτύπωμα της εκάστοτε ποικιλίας ελιάς από την οποία προήλθε το ελαιόλαδο και μελετήθηκε γιατί και η σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα συντελεί στη διατήρηση της ποιότητάς του και της αντοχής στην οξείδωση [87]. Σε άλλη εργασία τα δείγματα ελαιολάδου αποθηκεύτηκαν στους 60° C για 50 μέρες και παρατηρήθηκε πλήρης αποδόμηση των φαινολικών συστατικών σε 3 διαφορετικές ποικιλίες. Οι ερευνητές αναφέρουν πως τα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου συντελούν στη διατήρηση της ποιότητάς του, καθώς λειτουργούν ως αντιοξειδωτική ασπίδα των λιπιδίων, τα οποία οξειδώθηκαν αφού η περιεκτικότητα του δείγματος σε φαινόλες έφτασε σε μηδενικά επίπεδα [89].

Οι Kotsiou και συνεργάτες το 2009 [90] παρακολούθησαν τις μεταβολές στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου θερμαίνοντάς το. Στην έρευνα αυτή τα λάδια θερμαίνονται στους 180° C, όπου σε 30 λεπτά παρατηρήθηκε 60% απώλεια στα παράγωγα υδροξυτυροσόλης και κατά 90% στα 60 λεπτά. Τα παράγωγα τυροσόλης δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη μεταβολή. Στη θέρμανση στους 100° C για 2 ώρες, παρατηρήθηκε μείωση μικρότερη του 20% σε όλα τα φαινολικά συστατικά. Σε αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, με ελάχιστο χώρο στο καπάκι, για 15 μήνες, οι απώλειες που μετρήθηκαν ήταν της τάξης του 30% στα παράγωγα υδροξυτυροσόλης και 10% στα παράγωγα τυροσόλης. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη εργασία ανιχνεύθηκαν 2 παράγωγα οξείδωσης της ελαιασίνης και της ελαιοκανθάλης με μοριακά βάρη 335,2 και 319,2 αντίστοιχα. Η ίδια ερευνητική ομάδα σε νεότερη εργασία της παρουσίασε την μείωση των φαινολικών συστατικών κατά 25% στους 18 μήνες αποθήκευσης και 31 % στους 24 μήνες αποθήκευσης σε δροσερό και σκοτεινό μέρος με σχεδόν μηδενική παρουσία οξυγόνου στα δοχεία αποθήκευσης του ελαιολάδου. Η έρευνα κάνει λόγο και για τον εντοπισμό νέων ενώσεων, ως αποτέλεσμα οξείδωσης των ήδη γνωστών φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου [91]

Αξίζει να αναφερθεί πως η υπέρξη των προϊόντων οξείδωσης πρωτοεμφανίστηκε στη δημοσίευση των Rios et al., το 2005, προβάλλοντας περισσότερο τη χρήση GC-MS για την ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών του [92].

Ένας παράγοντας που έχει μελετηθεί εκτεταμένα είναι το δοχείο αποθήκευσης του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και οι επιπτώσεις που μπορεί να φέρει η χρήση του κάθε υλικού. Οι Mendez και Falque το 2005 [93] παρακολούθησαν τις μεταβολές σε οξύτητα, υπεροξείδια, δείκτες K, ποσοστό σαπωνοποίησης, επίπεδα υγρασίας, συγκέντρωση ιωδίου και περιεκτικότητα σε φαινόλες για 9 μήνες σε διαφορετικά δοχεία αποθήκευσης, σε θερμοκρασία δωματίου και φως 12 ώρες την ημέρα. Τα αποτελέσματα της εργασίας τους υποδεικνύουν πως το καταλληλότερο δοχείο αποθήκευσης για τη μέγιστη διατήρηση των φαινολικών συστατικών είναι τα tetra-brik, ακολουθούμενο από τον αλουμινένιο τενεκέ. Αντίθετα σε άλλη εργασία [94] προτείνονται τα ανοξείδωτα και τα γυάλινα δοχεία ως προτιμώτερο μέσο αποθήκευσης του ελαιολάδου.

Για τους λόγους που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση και τις θεραπευτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, υπάρχει τις τελευταίες δεκαετίες μια αξιοσημείωτη δραστηριότητα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων με στόχο την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο.

Επί μία δεκαετία (1969-1978), για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο, χρησιμοποιείτο η χρωματογραφία επί χάρτου ή/και η χρωματογραφία στήλης. Οι μέθοδοι αυτοί παρουσίαζαν το μειονέκτημα ότι δεν ήταν εξειδικευμένες και προσδιόριζαν μόνο τη ολική ποσότητα πολυφαινολών. Μία άλλη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πολυφαινολών στο πολικό μέρος του ελαιόλαδου είναι η χρωματομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu η οποία στηρίζεται στην απορρόφηση UV των πολυφαινολών [95]. Χρωματομετρικά γίνεται και ο προσδιορισμός της ποσότητας των όρθο-διφαινολών, έπειτα από προσθήκη του αντιδραστήριου Arnow στο πολικό μέρος του ελαιόλαδου [98]. Αυτές οι μέθοδοι είναι απλές και απαιτούν λίγα αντιδραστήρια, αλλά έχουν καθόλου ή μικρή εξειδίκευση, αφού η παρουσία οποιοδήποτε αναγωγικής ουσίας μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση. Η μέθοδοι Folin-Ciocalteu και Arnow προσφέρουν μόνο ποσοτική πληροφορία για τις συνολικές φαινόλες και όρθο-διφαινόλες στο ελαιόλαδο, αντίστοιχα.

Από το 1980, αρχίζουν σημαντικές προσπάθειες ανάπτυξης πιο εξειδικευμένων μεθόδων ανίχνευσης πολυφαινολών, όπως η αέρια χρωματογραφία (GC) [99], και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διάφορους τύπους ανιχνευτών [100]. Η ανάλυση πολυφαινολών με HPLC και ανιχνευτή UV, η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού, είναι πολύ ευαίσθητη και εξειδικευμένη με όριο ανίχνευσης της τάξης των ng. Παρουσιάζει όμως αρκετά μειονεκτήματα: το προς ανάλυση δείγμα καταναλώνεται, απαιτείται προηγούμενη κατεργασία του δείγματος, βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα, ανίχνευση περιορισμένου αριθμού πολυφαινολών και μεγάλη διάρκεια ανάλυσης. Επίσης, δεν έχουν προσδιοριστεί όλες οι κορυφές του πολικού μέρους του ελαιόλαδου στο χρωματογράφημα HPLC και έτσι για μερικές από αυτές δεν μπορεί να γίνει ανάλυση, εφόσον δεν είναι γνωστή η κατάλληλη πρότυπη ουσία, ενώ παράλληλα δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες όλες οι πρότυπες ουσίες για την ανάλυση. Ένα ακόμη πρόβλημα παρουσιάζεται όταν άγνωστες ουσίες έχουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με γνωστές ενώσεις. Για την ανίχνευση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι έκλουσης με διαφορετικές κινητές φάσεις. Αξίζει

να σημειωθεί ότι η χρήση διαφορετικών κινητών φάσεων δίνει διαφορετικά αποτελέσματα όσον αφορά το χρόνο κατακράτησης των πολυφαινολών. Η μέθοδος HPLC έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ανιχνευτή UV, ανιχνευτή φωτοδιόδων DAD (Diode Array Detector), καθώς και με ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάλυσης HPLC με τους τρεις προηγούμενους ανιχνευτές, έχει δείξει ότι ο ανιχνευτής UV με μεταβλητό μήκος κύματος είναι ο πιο κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση. Ο ανιχνευτής DAD φαίνεται πιο κατάλληλος για τη λήψη πληροφοριών για άγνωστα πολυφαινολικά συστατικά, ενώ για τις ευαίσθητες φαινόλες (οι οποίες οξειδώνονται εύκολα) είναι πιο κατάλληλη η χρήση ηλεκτροχημικών ανιχνευτών.

Μια άλλη μεθοδολογία ανάλυσης πολυφαινολών συνδυάζει την υγρή και αέρια χρωματογραφία με τον φασματογράφο μάζας (LC-MS και GC-MS) [98]. Αυτή η μέθοδος είναι περισσότερο επιλεκτική και ευαίσθητη από τις προηγούμενες μεθόδους, αλλά παρουσιάζει τα ίδια σχεδόν μειονεκτήματα. Εκτεταμένα έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολυφαινολών και ιδιαίτερα της ελευρωπαΐνης η φασματοσκοπία μάζας με την τεχνική ion-spray [101] και την τεχνική χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση [102]. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο έχει γίνει μία προσπάθεια χρήσης ηλεκτροχημικών μεθόδων, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τη μέθοδο HPLC-DAD. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν ηλεκτρόδια μίας χρήσης (screen printed), όπως η SPE-DPV (disposable Screen-Printed Electrode coupled with Differential Pulse Voltammetry) με ηλεκτρόδιο γραφίτη, (graphite - based ink), ή με βιοαισθητήρα τυροσινάσης [103], [104]. Η πρώτη μέθοδος είναι ταχεία και αρκετά φθηνή, αλλά απαιτεί βαθμονόμηση. Η δεύτερη μέθοδος είναι γρήγορη, εύκολη, έχει εξειδίκευση και ευαισθησία, όμως υπάρχει ο κίνδυνος απενεργοποίησης του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει τον προσδιορισμό φαινολών με κατειλημμένη την όρθο ή τη μέτα θέση ως προς το υδροξύλιο [105].

Η φασματοσκοπία NMR εμφανίζεται μόλις το 1996 ως αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο [106], [107]. Η εφαρμογή της στην ανάλυση των πολυφαινολών του ελαιόλαδου στα απόνερα των ελαιουργείων, η οποία πραγματοποιήθηκε επίσης το 1996 [108], έδωσε ως επί το πλείστο ποιοτικά αποτελέσματα σε περιορισμένο αριθμό πολυφαινολών, ενώ η πολυπλοκότητα του φάσματος εμπόδισε την ανίχνευση πολλών πολυφαινολών. Η προσπάθεια ανίχνευσης πολυφαινολών με τη φασματοσκοπία NMR του πυρήνα ^{13}C ήταν μάλλον απογοητευτική. Η χαμηλή φυσική αφθονία (μόλις 1,1%) και η χαμηλή ευαισθησία του πυρήνα ^{13}C δεν επέτρεψαν την ανίχνευση άλλων πολυφαινολών, εκτός ίσως από την τυροσόλη και την υδροξυ-τυροσόλη, οι οποίες κυριαρχούν ποσοτικά των άλλων πολυφαινολών στο ελαιόλαδο. Επίσης, η διάρκεια του πειράματος (3-4 ώρες) ήταν μάλλον απαγορευτική σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης.

Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναφερθούμε εκτεταμένα στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού προσδιορισμού και στον τρόπο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE, NMR)

Αρχή της μεθόδου

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν οι πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Όπως τα ηλεκτρόνια, έτσι και οι πυρήνες συγκεκριμένων ατόμων θεωρούνται ότι αυτοστρέφονται (σπιν), δημιουργώντας μαγνητική ροπή κατά μήκος του άξονα της αυτοστροφορμής, με αποτέλεσμα να ενεργούν ως μικροσκοπικοί ράβδοι μαγνητών (δίπολο). Ένας τέτοιος πυρήνας για τον οποίο ενδιαφερόμαστε κυρίως είναι το πρωτόνιο, ο πυρήνας του κοινού υδρογόνου, ^1H . Εντός μαγνητικού πεδίου έντασης B , ένα σωματίδιο με σπιν (spin) μπορεί να απορροφήσει φωτόνιο σε συγκεκριμένη συχνότητα ν . Η συχνότητα εξαρτάται από το γυρομαγνητικό λόγο, γ , του σωματιδίου όπου

$$\nu = \gamma B$$

Με την απορρόφηση του φωτονίου το σωματίδιο (πρωτόνιο) μπορεί να μεταβεί από στάθμη χαμηλότερης ενέργειας σε άλλη υψηλότερης ενέργειας. Η ενέργεια του φωτονίου πρέπει να ταιριάζει ακριβώς στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων. Η ενέργεια ενός φωτονίου E , σχετίζεται με τη συχνότητα ν και τη σταθερά του Planck ($h=6.626 \times 10^{-34}$ Js). Όταν λοιπόν μία ουσία τοποθετηθεί εντός μαγνητικού πεδίου σταθερής συχνότητας ακτινοβολίας και μεταβαλλόμενης έντασης μαγνητικού πεδίου, σε κάποια τιμή έντασης του πεδίου η ενέργεια που απαιτείται για τη μεταπήδηση του πρωτονίου ισοδυναμεί με την ενέργεια της ακτινοβολίας. Τότε λαμβάνει χώρα απορρόφηση και παρατηρείται σήμα. Ένα φάσμα τέτοιων σημάτων αποκαλείται φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Χαρακτηριστικά φάσματος NMR

Χημική μετατόπιση

Η συχνότητα στην οποία απορρόφησε το πρωτόνιο εξαρτάται από το μαγνητικό πεδίο το οποίο «αντιλαμβάνεται» και αυτή η ένταση του πεδίου δεν είναι ίδια με την εφαρμοζόμενη ένταση πεδίου. Η πραγματική ένταση σε κάθε πρωτόνιο εξαρτάται από το περιβάλλον του πρωτονίου, δηλαδή μεταξύ άλλων παραμέτρων από την

ηλεκτρονική πυκνότητα επί του πρωτονίου, καθώς και από την παρουσία άλλων γειτονικών πρωτονίων. Κάθε πρωτόνιο ή ακριβέστερα κάθε σύνολο ισοδύναμων πρωτονίων θα είχε ένα ελαφρώς διαφορετικό περιβάλλον από κάθε άλλο σύνολο πρωτονίων και θα απαιτούσε μία ελαφρώς διαφορετική εφαρμοζόμενη ένταση πεδίου για να παραχθεί η ίδια πραγματική ένταση πεδίου: η μερική ένταση στην οποία λαμβάνει χώρα η απορρόφηση.

Όλοι οι ενεργοί πυρήνες ενός δείγματος δεν συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Η ένταση του μαγνητικού πεδίου φτάνει διαφοροποιημένη σε κάθε πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια σθένους κάποιων ατόμων περιστρέφονται με τη φορά του εφαρμοζόμενου πεδίου. Στους πυρήνες των ατόμων που διευθετούνται αντίθετα στο εφαρμοζόμενο πεδίο η περιστροφή τους προκαλεί ένα μικρότερης έντασης μαγνητικό πεδίο. Το μαγνητικό πεδίο που αισθάνεται ο κάθε πυρήνας (the effective field) είναι τελικώς μικρότερο από το εφαρμοζόμενο πεδίο. Η ένταση του μικρότερου πεδίου είναι $B_1 = \sigma B_0$ (σ : σταθερά θωράκισης/προάσπισης) και η ένταση που δέχεται τελικά ένας ενεργός πυρήνας είναι $B = B_0 - B_1$. Η συχνότητα στην οποία συντονίζεται κάθε πυρήνας και μετράται αναφορικά με τη συχνότητα συντονισμού μίας ένωσης προτύπου, ονομάζεται χημική μετατόπιση και εκφράζεται σε μονάδες δ ppm (parts per million) σε σχέση με την κορυφή απορρόφησης των πρωτονίων του TMS ($\delta=0$).

Χημική μετατόπιση:

$$\delta = \nu_i / \nu_o \quad (\nu_i : \text{συχνότητα συντονισμού του πυρήνα}, \nu_o : \text{συχνότητα του οργάνου})$$

Το σημείο αναφοράς από το οποίο οι χημικές μετατοπίσεις μετρούνται είναι, για πραγματικούς λόγους όχι το σήμα του γυμνού πρωτονίου, αλλά το σήμα μίας πραγματικής ένωσης, συνήθως το τετραμέθυλοσιλάνιο $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Εξ αιτίας της χαμηλής ηλεκτραρνητικότητας του πυριτίου, η προστασία των πρωτονίων στο σιλάνιο είναι μεγαλύτερη από ότι στα άλλα οργανικά μόρια με αποτέλεσμα τα περισσότερα σήματα NMR να εμφανίζονται προς την αντίθετη κατεύθυνση από το σήμα του TMS. Έτσι, για το τετραμέθυλοσιλάνιο η θέση του λαμβάνεται ως 0.0 ppm. Οι περισσότερες χημικές μετατοπίσεις έχουν τιμές δ ανάμεσα στο 0 και το 10

Σύζευξη spin-spin

Σε πολλά ^1H -NMR φάσματα οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών, λόγω της αλληλεπίδρασης του spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται spin spin σύζευξη (coupling) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω των δεσμών του μορίου. Η σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων (ή δύο ομάδων ισότιμων

πυρήνων) χαρακτηρίζεται από τη σταθερά σύζευξης J_{AX} , που είναι η απόσταση σε Hz, των επί μέρους κορυφών των σύνθετων (πολλαπλών) κορυφών των δύο ομάδων. Η σταθερά σύζευξης εξαρτάται μόνο από την ηλεκτρονική και στερεοσκοπική σχέση μεταξύ των αλληλεπιδρώντων πρωτονίων και ως εκ τούτου είναι η ίδια στις δύο ομάδες. Σε αντίθεση με τη σταθερά θωράκισης σ , η σταθερά σύζευξης είναι ανεξαρτητή από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, γι' αυτό και δε δίνεται σε ppm, αλλά σε Hz. Κατά συνέπεια παίρνοντας το φάσμα NMR μίας ένωσης σε δύο συχνότητες μπορούμε να διακρίνουμε τις πολλαπλές κορυφές σε πρωτόνια με διαφορετική χημική μετατόπιση από εκείνες που οφείλονται σε spin-spin σύζευξη.

Εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR.

Από όλα τα είδη των φασμάτων, τις περισσότερες πληροφορίες για τη δομή των ενώσεων δίνουν τα φάσματα NMR, σε συσχετισμό βέβαια με άλλα δεδομένα, που λαμβάνονται με άλλες τεχνικές, όπως φασματομετρία υπεριώδους ή φασματομετρία μαζών. Ο συνδυασμός της χημικής μετατόπισης και της γενικής εικόνας της spin spin σύζευξης παρέχει πληροφορίες για τον προσδιορισμό α) του αριθμού των μετρούμενων πρωτονίων (ή και άλλων ατόμων), β) του χημικού περιβάλλοντος κάθε πρωτονίου γ) των συντακτικών και στερεοχημικών ισομερών και σε μερικές περιπτώσεις των διαμορφομερών και δ) την ύπαρξη προσμίξεων. Ο συνδυασμός των παραπάνω πληροφοριών μπορεί συχνά να μας οδηγήσει στη δομή μίας άγνωστης ένωσης. Η ολοκλήρωση των εμβαδών των κορυφών είναι χρήσιμη στη διερεύνηση της δομής, αφού ο λόγος των εμβαδών παρέχει το σχετικό λόγο των διαφόρων ειδών πρωτονίων. Επιπλέον η ολοκλήρωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποσοτική ανάλυση. Σημαντικές πληροφορίες για τη δομή παρέχει η σταθερά J , το μέγεθος της οποίας διαφέρει για τα διάφορα ισομερή, όρθο- μέτα- και πάρα- , cis-trans κτλ [109].

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού έχει ευρύτατες εφαρμογές στη διερεύνηση της δομής των χημικών ενώσεων, στη χημεία των φυσικών προϊόντων και στη συνθετική οργανική χημεία. Στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών, του DNA/RNA και των πολυσακχαριτών. Στη μελέτη της σχέσης δομής και δραστηριότητας κατά το σχεδιασμό φαρμάκων, στη μελέτη της σύστασης και τη δομής, της συμβατότητας και της δυναμικής στα πολυμερή, συμπολυμερή και στα πολυμερικά μίγματα. Ευρύτατες επίσης είναι οι εφαρμογές στην Ιατρική και στη βιολογία των ζωντανών οργανισμών, στην εγκληματολογία, στον έλεγχο φαρμακοδιέγερσης κ.α.

Έχει παρουσιαστεί επίσης από το εργαστήριό μας η χρήση του NMR για την απευθείας ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ενώσεων στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις μετατοπίσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων των παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στα φάσματα NMR, εκτιμάται με ακρίβεια η περιεκτικότητα των δειγμάτων που αναλύθηκαν στις υπό

έρευνα ουσίες [110]. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, για την παρακολούθηση των επιπέδων των φαινολικών ουσιών στο ελαιόλαδο, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.

Συμπερασματικά, με βάση τη βιβλιογραφία, υπάρχουν σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Με τους κυριότερους να είναι η παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου και η θερμοκρασία αποθήκευσης, η μελέτη βασίστηκε στην αποθήκευση των δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.

Στην παράγραφο αυτή θα περιγραφεί η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη σταθερότητας των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, αλλά και για τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται στα επόμενα κεφάλαια.

Υγρή χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης

Οι διαδικασίες χρωματογραφικού διαχωρισμού και απομόνωσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (Silica gel) διαμέτρου 35-70 μm (flash). Οι διαλύτες που αποτέλεσαν την κινητή φάση ήταν κυκλοεξάνιο (cHex) και οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) σε αναλογίες από 95:5 έως 50:50

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για ποιοτικό έλεγχο και επιβεβαίωση διαχωρισμού συστατικών από την υγρή χρωματογραφία στήλης. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση είναι 100% οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc). Η παρατήρηση των κηλίδων έγινε με εξέταση υπό λυχνία με υπεριώδες φως (254 nm)

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Τα φάσματα πρωτονίου ^1H NMR ελήφθησαν σε συσκευές Bruker Avance 400 MHz (ΕΚΠΑ) και Varian 600 MHz (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) για διπλό έλεγχο των αποτελεσμάτων. Τα φάσματα δύο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) ελήφθησαν σε συσκευή Bruker Avance 400 MHz (ΕΚΠΑ).

Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Τα χρωματογραφήματα ελήφθησαν σε συσκευή LC-MS (Universidad de Córdoba) με στήλη αντίστροφης φάσης, C18 Pursuit XRs Ultra (50 $\times$ 2.0 mm i.d., 2.8 μm μέγεθος κόκκων, Varian), σε θερμοκρασία 30 $^\circ\text{C}$. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1200 Series LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Η κινητή φάση Α που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,1% φορμικό οξύ σε νερό και η κινητή φάση Β ήταν 0,1% φορμικό οξύ σε ακετονιτρίλιο (ACN). Το έκλουσμα ελεγχόταν για αρνητικά ιόντα μέσω του ανιχνευτή Agilent 6460 (LC-QqQ-MS) και η ροή και θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης (N_2) ήταν 10 L/min και 350 $^\circ\text{C}$, αντίστοιχα.

Πολωσίμετρο

Για τη μέτρηση της στροφικής ικανότητας του προϊόντος που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε πολωσίμετρο Perkin Elmer Polarimeter 341, με λυχνία στα 589 nm.

Μετρήσεις Υγρασίας

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας υγρασίας των δειγμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος οξειδοαναγωγικής ογκομέτρησης Karl Fischer, με τη χρήση του οργανου 831 KF COULOMETER της Metrohm™.

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 29 δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, 3 από την Καλιφόρνια των Η.Π.Α. και 26 από τον ελλαδικό χώρο. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν προέρχονται από 8 διαφορετικές ποικιλίες ελαιόδεντρων και τα 26 ελληνικά ελαιόλαδα προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με βάση το φαινολικό τους προφίλ, στοχεύοντας σε ένα μεγάλο εύρος περιεκτικότητας σε παράγωγα τυροσόλης και υδρόξυτυροσόλης. Παρότι η ποικιλία του ελαιόδεντρου, ή η προέλευση των δειγμάτων δεν αποτέλεσαν παράγοντες που καθόρισαν την επιλογή τους, τα στοιχεία αυτά παρατίθενται στο παράρτημα. Όλα τα δείγματα παρήχθησαν μεταξύ Οκτωβρίου και Δεκεμβρίου του έτους 2014. Για να μελετήσουμε τη σταθερότητα των φαινολικών ουσιών που αναλύθηκαν παραπάνω, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια, ερμητικά κλεισμένα και πλήρη, ώστε να αποκλείσουμε την παρουσία οξυγόνου και να αποτρέψουμε την οξείδωση του ελαιολάδου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μία ανάλυση όλων των δειγμάτων πριν τις αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας που λειτούργησε ως σημείο αναφοράς σχετικά με την περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά (Πίνακας 3.1). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης περιλαμβάνουν τις περιεκτικότητες των δειγμάτων σε ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, άγλυκο της ελευρωπαΐνης, άγλυκο του λιγκστροσίδη, ισομερή του άγλυκου του λιγκστροσίδη και ισομερή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης. Επιπλέον, υπολογίστηκε το άθροισμα των παραπάνω ουσιών, καθώς και ο δείκτης D1, που αντιστοιχεί στο άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης για το κάθε δείγμα. Η ανάλυση αυτή από δω και στο εξής θα αναφέρεται ως «σημείο μηδέν». Έπειτα, επαρκείς ποσότητες από κάθε δείγμα αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, χωρίζοντάς τα πλέον σε 3 διαφορετικές ομάδες:

- **Δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε σκιερό και δροσερό μέρος.** Τα δείγματα αυτά πήραν την κωδική ονομασία ANTΝ, ακολουθούμενη από τον αριθμό

επανεξέτασης και τον αύξοντα αριθμό του δείγματος, σταθερός από την αρχή έως το τέλος της μελέτης. Για παράδειγμα το δείγμα 9, κατά την πρώτη επανεξέταση μετά το σημείο μηδέν, έλαβε τον κωδικό ANT_N1_9.

- **Δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4° C.** Τα δείγματα αυτά πήραν την κωδική ονομασία ANTP, ακολουθούμενη από τον αριθμό επανεξέτασης και τον αύξοντα αριθμό του δείγματος, σταθερός από την αρχή έως το τέλος της μελέτης. Αντίστοιχα, με την ίδια λογική, το δείγμα υπ' αριθμόν 12, κατά τη 2^η ανάλυση μετά το σημείο μηδέν, έλαβε τον κωδικό ANTP2_12.
- **Δείγματα που αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη, σε θερμοκρασία -18° C.** Τα δείγματα αυτά πήραν την κωδική ονομασία ANTK, ακολουθούμενη από τον αριθμό επανεξέτασης και τον αύξοντα αριθμό του δείγματος, σταθερός από την αρχή έως το τέλος της μελέτης. Για παράδειγμα το δείγμα υπ' αριθμόν 17, κατά την 3^η ανάλυση μετά το σημείο μηδέν έλαβε τον κωδικό ANTK3_17.

Τη συλλογή και ελαιοποίηση των δειγμάτων ακολούθησε μία χημική ανάλυση για τον προσδιορισμό τους σε φαινόλες, αμέσως μετά την παράδοσή τους στο εργαστήριό μας. Η μελέτη σταθερότητας που πραγματοποιήθηκε και περιγράφεται στην παρούσα εργασία ξεκίνησε με αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων 6 μήνες μετά την παραγωγή τους (Μάρτιος 2015 – Μετρήσεις «σημείο μηδέν»). Μέχρι αυτή τη χρονική στιγμή τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες εργαστηρίου. Στο πρώτο σκέλος των αποτελεσμάτων παρατίθενται τα αποτελέσματα αυτής της χρονικής περιόδου. Η μελέτη που περιγράφεται είναι διάρκειας 12 μηνών, καθώς συμπεριλαμβανομένου του πρώτου 6μηνου, ολοκληρώνεται η διάρκεια ζωής των δειγμάτων που είναι 18 μήνες από την παραγωγή τους.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε φαινολικά συστατικά είναι αυτό που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριό μας το 2012 [110] για την χημική ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδου με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR). Αναλυτικά:

- 5g ελαιολάδου ζυγίζονται και διαλύονται σε 20ml κυκλοεξάνιο (cHex).
- Ανάδευση του δείγματος για 1 min
- Προσθήκη 25ml ακετονιτριλίου (ACN) και έντονη ανάδευση 1min. Με την προσθήκη του ακετονιτριλίου σχηματίζεται διφασικό σύστημα.
- Φυγοκέντρηση του μείγματος για 5 λεπτά στις 4000rpm με σκοπό τον διαχωρισμό των δύο φάσεων και κατ' επέκταση την κατανομή των συστατικών του ελαιολάδου ανάλογα με την πολικότητά τους.

- Συλλογή μέρους (25ml) από την φάση του ακετονιτριλίου
- Προσθήκη 1ml διάλυμα συριγγαλδεΐδης (0,5mg/ml) σε ακετονιτρίλιο.
- Εξάτμιση του διαλύματος μέχρι ξηρού.
- Διάλυση του εκχυλίσματος σε 750μl δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), εκ των οποίων τα 550 μL τοποθετούνται σε σωληνάκι NMR (5mm) για τη λήψη των φασμάτων.

Ως εσωτερική πρότυπη ουσία (IS) χρησιμοποιήθηκε η συριγγαλδεΐδη ή (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde), αφ' ενός γιατί δεν υπάρχει στο ελαιόλαδο και αφετέρου διότι το σήμα που δίνει το πρωτόνιο της αλδεΐδης της στο φάσμα ^1H -NMR βρίσκεται σε περιοχή που δεν επικαλύπτει κανένα σήμα των ουσιών που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα στα 9,81 ppm.

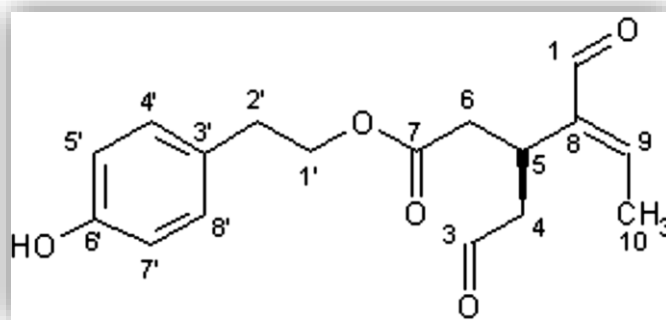
Στα φάσματα ^1H -NMR ελήφθησαν 32 scans σε 32K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time 1.7 s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H -NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ με πρότυπη ουσία αναφοράς το CHCl_3 (δ 7.26). Η διόρθωση της φάσης του φάσματος καθώς και οι ολοκληρώσεις εμβαδού στην κάθε κορυφή πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MestRenova.

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Στον ευρωπαϊκό κανονισμό 432/2012 περιλαμβάνονται η τυροσόλη, η υδροxyτυροσόλη και τα παράγωγά τους. Η τυροσόλη και η υδροxyτυροσόλη δεν εντοπίζονται σε αφθονία στο ελαιόλαδο σε ελεύθερη μορφή. Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τα παράγωγά τους, τα οποία παρουσιάζονται στο παρόν κεφάλαιο αναλυτικά, μαζί με τα σήματά τους σε φάσμα ^1H -NMR, με διαλύτη CDCl_3 . Τα δεδομένα προέρχονται από τις δημοσιευμένες μελέτες των Karkoula et al, 2012 και Diamantakos et al., 2015 από το εργαστήριό μας.

ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ

[Συνώνυμα : Διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος ενωμένη με την p- υδροξυφαινυλαιθανόλη, άγλυκο του δεακετόξυ λιγκστροσίδη, διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα , p-HPEA –EDA, Ty- EDA]



Εικόνα 2.1 Χημικός τύπος ελαιοκανθάλης

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται τα εξής:

- Μια ευρεία απλή κορυφή στα 9.64 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 3.
- Μια διπλή κορυφή στα 9.23 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ($J_{1-5} = 2.0 \text{ Hz}$).
- Μια διπλή κορυφή στα 7.05 ppm που ολοκληρώνει για 2 H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 8' και 4'. Έχουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 5' και 7' ($J_{4'-5' / 7'-8'} = 8.5 \text{ Hz}$).
- Μια διπλή κορυφή στα 6.77 ppm που ολοκληρώνει για 2 H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 5' και 7'. Έχουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 4' και 8' ($J_{5'-4' / 8'-7'} = 8.5 \text{ Hz}$).
- Στα 6.63 ppm εμφανίζεται μια τετραπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 9. Έχει σύζευξη με το H-10 ($J = 7.1 \text{ Hz}$).
- Μια πολλαπλή κορυφή στα 4.22 ppm που ολοκληρώνει για 2 H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1'.
- Στα 3.62 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Έχει σύζευξη με τα H των θέσεων 6, 4 και 1.
- Στα 2.99 ppm και 2.74 ppm εμφανίζονται δυο διπλές- διπλές- διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια, και αντιστοιχούν στα H-4a ($J_{4a-b} = 18.4 \text{ Hz}$, $J_{4a-5} = 8.5 \text{ Hz}$, $J_{4a-3} = 1.0 \text{ Hz}$) και 4β ($J_{4b-a} = 18.4 \text{ Hz}$, $J_{4b-5} = 5.5 \text{ Hz}$, $J_{4b-3} = 2.4 \text{ Hz}$).

- Μια τριπλή κορυφή στα 2.83 ppm, η οποία ολοκληρώνει για 2 H ανήκει στα H της θέσης 2'. Εμφανίζει σύζευξη με τα H της θέσης 1' (J= 6.8 Hz).
- Στα 2.66 ppm έχουμε την πολλαπλή κορυφή του H- 6, η οποία ολοκληρώνει για 2.
- Τέλος, στα 2.08 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή του μεθυλίου της θέσης 10, και η οποία ολοκληρώνει για 3 H και έχει σύζευξη με το H- 9 (J= 7.1 Hz).

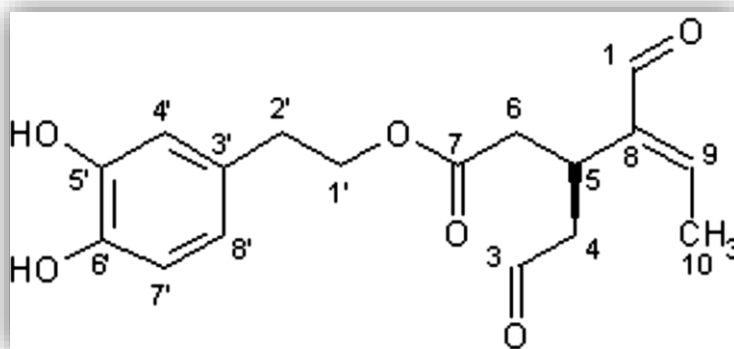
Πρωτόνιο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	9.23 (1H, d, J =2.0 Hz)
3	9.64 (1H, brs)
4a	2.99 (1H, ddd, J= 18.4 Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)
4b	2.74 (1H, ddd , J= 18.4 Hz, 5.5 Hz, 2.4 Hz)
5	3.62 (1H, m)
6	2.66 (2H, m)
7	-
8	-
9	6.63 (1H, q, J= 7.1Hz)
10	2.08 (3H, d, J= 7.1 Hz)
1'	4.22 (2H, m)
2'	2.83 (2H, t, J= 6.8 Hz)
3'	-
4', 8'	7.05 (2H, d, J =8.5 Hz)
5', 7'	6.77 (2H, d, J =8.5 Hz)
6'	-

Πίνακας 2.1 Σήματα του μορίου της ελαιοκανθάλης σε φάσμα ¹H-NMR , διαλύτης CDCl₃

Το σήμα στο φάσμα ¹H-NMR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση του μορίου στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι η διπλή κορυφή στα 9.23 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1.

ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ

[Συνώνυμα : Διαλδεΐδική μορφή του ελενολικού οξέος ενωμένη με την 3,4-δι-υδροξυ-φαινυλαιθανόλη, άγλυκο της δεακετοξυ ελευρωπαϊνης, διαλδεΐδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα , 3,4-DHPEA –EDA, HTγ- EDA]



Εικόνα 2.2 Χημικός τύπος ελαιασίνης

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J Hz)
1	9.19 (1H, d, J =1.8 Hz)
3	9.65 (1H, brs).
4a	2.94 (1H, ddd, J =18.5 Hz, 8.3 Hz, 1.2 Hz)
4b	2.79 (1H, ddd, J =18.5 Hz, 6.0 Hz, 1.0 Hz)
5	3.64 (1H, m)
6a	2.73 (1H, dd , J = 15.7 Hz, 8.9 Hz)
6b	2.62 (1H, dd , J = 15.7 Hz, 6.4 Hz)
7	-
Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J Hz)
8	-
9	6.66 (1H, q, J =7.1Hz)
10	2.08 (3H, d, J = 7.1 Hz)
1'a	4.22 (1H, dt, J = 10.8 Hz, 5.9 Hz)
1'b	4.15 (1H, dt, J = 10.8 Hz, 6.0 Hz)
2'	2.77 (2H, m)
3'	-
4'	6.72 (1H, d, J = 2Hz)
5'	-
6'	-
7'	6.79 (1H, d, J =8 Hz)
8'	6.61 (1H, dd, J =8 Hz, 2Hz)

Πίνακας 2.2 Σήματα του μορίου της ελαιασίνης σε φάσμα $^1\text{H-NMR}$, διαλύτης CDCl_3

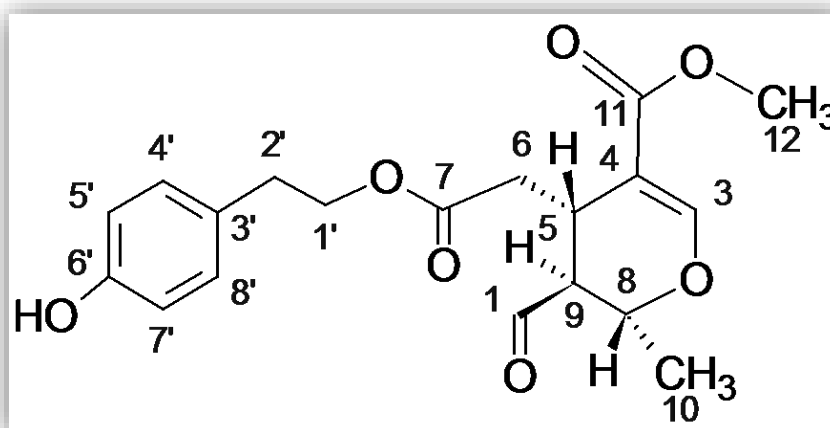
Στο φάσμα **$^1\text{H-NMR}$** παρατηρούνται τα εξής:

- Μια ευρεία απλή κορυφή στα 9.65 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 3.
- Μια διπλή κορυφή στα 9.19 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1 (J_{1-5} = 1.8 Hz).

- Στα 6.79 ppm έχουμε μια διπλή κορυφή για το H- 7' ($J_{7'-8'} = 8.0$ Hz).
- Μια διπλή κορυφή του H- 4' στα 6,72 ppm ($J_{8'-4'} = 2.0$ Hz).
- Στα 6.66 ppm η τετραπλή κορυφή του H- 9 ($J_{9-10} = 7.1$ Hz).
- Η διπλή- διπλή κορυφή του H- 8' εμφανίζεται στα 6.61 ppm ($J_{8'-7'} = 8.0$ Hz, $J_{4'-8'} = 2.0$ Hz).
- Εμφανίζεται μια διπλή -τριπλή κορυφή στα 4.22 ppm που αντιστοιχεί στο H- 1'a ($J_{1'a-b} = 10.8$ Hz, $J_{1'a-2'a/b} = 5.9$ Hz), ενώ η πολλαπλή στα 4.15 ppm είναι η κορυφή του H- 1'b ($J_{1'b-a} = 10.8$ Hz, $J_{1'b-2'a/b} = 6.0$ Hz).
- Στα 3.64 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο 5 και δίνει μια πολλαπλή κορυφή.
- Η διπλή- διπλή- διπλή κορυφή στα 2.94 ppm είναι του H- 4a ($J_{4a-b} = 18.5$ Hz, $J_{4a-5} = 8.3$ Hz, $J_{4a-3} = 1.2$ Hz).
- Το H- 6b συντονίζεται στα 2.62 ppm ($J_{6b-a} = 15.7$ Hz, $J_{6b-5} = 6.4$ Hz).
- Στα 2.77 ppm η κορυφή που ολοκληρώνει για 2, ανήκει στο H- 2'.
- Στα 2.73 ppm η διπλή- διπλή κορυφή του H- 6 ($J_{6a-b} = 15.7$ Hz, $J_{6a-5} = 8.9$ Hz).
- Η διπλή- διπλή- διπλή κορυφή στα 2.79 ppm είναι του H- 4b ($J_{4b-a} = 18.5$ Hz, $J_{4b-5} = 6.0$ Hz, $J_{4b-3} = 1.0$ Hz).
- Τέλος, στα 2.06 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή του μεθυλίου της θέσης 10, και η οποία ολοκληρώνει για 3 H ($J_{10-9} = 7.1$ Hz).

Το σήμα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση του μορίου στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι η διπλή κορυφή στα 9.19 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1.

ΑΛΔΕΪΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ



[Συνώνυμα : p-HPEA –EA, Ty- EA]

Εικόνα 2.3 Χημικός τύπος της αλδεΐδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη (5S, 8R, 9S)

Στο φάσμα **¹H-NMR** παρατηρούνται τα εξής:

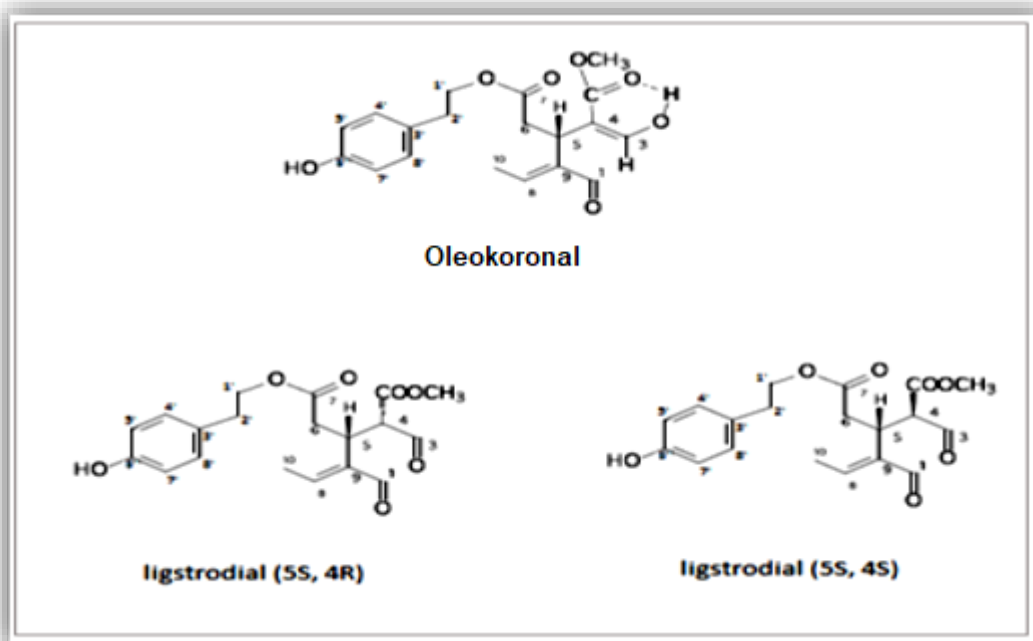
- Μια διπλή κορυφή στα 9.52 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ($J = 1.7 \text{ Hz}$).
- Στα 7.56 ppm η απλή κορυφή ανήκει στο H- 3.
- Η διπλή κορυφή στα 7.06 ppm αντιστοιχεί στα H- 4' και 8' ($J = 8.5 \text{ Hz}$).
- Στα 6.78 ppm συντονίζονται τα H- 5' και 7' ως διπλή κορυφή ($J = 8.5 \text{ Hz}$).
- Στα 4.41 ppm η πολλαπλή κορυφή αντιστοιχεί στο H- 8.
- Εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή στα 4.26 ppm που αντιστοιχεί στα H- 1' ($J_{1'a-1'b} = 12.9 \text{ Hz}$, $J_{1'-2'} = 7.2 \text{ Hz}$).
- Το H- 12 της καρβοξυ-μεθυλομάδας συντονίζεται στα 3.71 ppm.
- Το H- 5 εμφανίζεται στα 3.38 ppm ως πολλαπλή κορυφή.
- Στα 2.83- 2.92 εμφανίζονται τα H- 6a, H- 2'. Πιο συγκεκριμένα, στα 2.89 ppm συντονίζεται το H- 6a και εμφανίζεται ως διπλή-διπλή κορυφή ($J_{6a-b} = 16 \text{ Hz}$, $J_{6a-5} = 3.7 \text{ Hz}$) και στα 2.85 ppm τα H- 2' ως πολλαπλή ($J_{2'-1} = 7.2 \text{ Hz}$).
- Στα 2.50 μέχρι τα 2.58 ppm συντονίζονται τα H- 9, H- 6b. Πιο συγκεκριμένα, στα 2.55 ppm εμφανίζεται το H- 9 ως διπλή τριπλή ($J_{9-5} = 5.7 \text{ Hz}$, $J_{9-1} = 1.7 \text{ Hz}$), ενώ στα 2.52 ppm το H- 6b δίνει μια διπλή διπλή κορυφή ($J_{6b-a} = 16 \text{ Hz}$, $J_{6b-5} = 10 \text{ Hz}$).
- Στα 1.38 ppm έχουμε μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H- 10 ($J_{10-8} = 6.5 \text{ Hz}$).

Πρωτόνιο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	9.52 (1H, d, $J=1.7 \text{ Hz}$)
3	7.56 (1H, s)
4	-
5	3.38 (1H, m)
6a, 6b	2.89 (2H, dd, $J=16 \text{ Hz}$, 3.7 Hz)
7	-
8	4.41 (1H, m)
9	2.55 (1H, dt, $J=5.7 \text{ Hz}$, 1.7 Hz)
10	1.38 (3H, d, $J=6.5 \text{ Hz}$)
11	-
12	3.71 (3H, s)
1'	4.26 (2H, ddd, $J= 12.9 \text{ Hz}$, 7.2 Hz , 2.7 Hz)
2'	2.85 (2H, m, $J= 7.2 \text{ Hz}$)
3'	-
6'	-
4', 8'	7.06 (2H, d, $J=8.5 \text{ Hz}$)
5', 7'	6.78 (2H, d, $J=8.5 \text{ Hz}$)

Πίνακας 2.3 Σήματα του μορίου του άγλυκου του λιγκαστροσίδης (5S, 8R, 9S) σε φάσμα ¹H-NMR, διαλύτης CDCl₃

Το σήμα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση του μορίου στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι η διπλή κορυφή στα 9.52 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1.

Σε πιο πρόσφατη εργασία δημοσιεύθηκε η περιγραφή των ισομερών του μορίου με τη χρήση $^1\text{H-NMR}$ [22]. Τα σήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση των μορίων στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα σήματα των αλδεϋδικών πρωτονίων στη θέση 1. (Πίνακας 2.4)



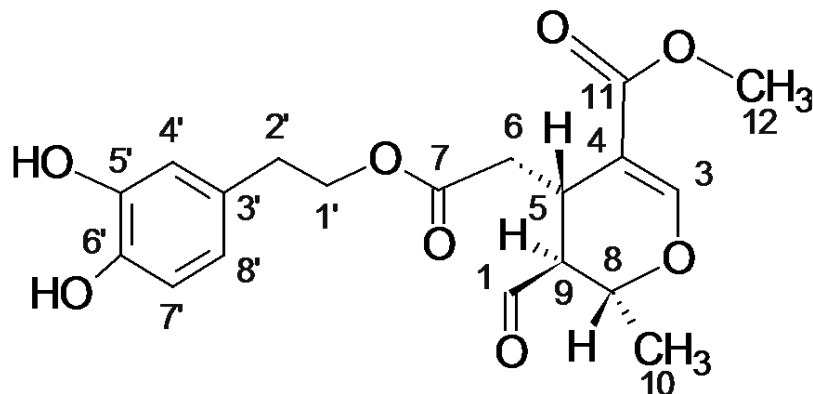
Εικόνα 2.4 Οι τρεις ισομερείς ενώσεις του άγλυκου του Λιγκστροσίδη

	Ligstrodiol (5S,4R)	Ligstrodiol (5S,4S)	Oleokoronal
1	9.212, d, 2.0	9.218, d, 2.0	9.225, d, 1.7
3	9.68, d, 2.7	9.46, d, 2.7	7.386, dd, 12.6, 0.8
4	4.06, dd, 10.5, 2.7	4.11, dd, 10.5, 2.7	-
5	3.83, m, (overlap)	3.83, m (overlap)	4.16, ddd (overlap)
6a	2.81, (overlap)	2.82 (overlap)	2.97, dd, 16.1, 9.6
6b	2.62, (overlap)	2.58 (overlap)	2.78, dd, 16.1, 6.3
8	6.70, q, 7.1	6.72, q, 7.1	6.56, q, 7.1
10	2.055, d, 7.0	2.062, d, 7.1	2.062, d, 7.0
3-OH	-	-	11.75, d, 12.6
OCH3	3.65, s	3.77, s	3.75, s
1'	4.20, m	4.18, m	4.18, m
2'	2.81, m	2.81, m	2.81, m
4', 8'	7.05, d (overlap)	7.05, d (overlap)	7.05, d, (overlap)
5', 7'	6.76, d (overlap)	6.76, d (overlap)	6.76, d (overlap)

Πίνακας 2.4 Σήματα των ισομερών του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε φάσμα $^1\text{H-NMR}$, διαλύτης CDCl_3

ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ

[Συνώνυμα : 3,4-DHPEA –EA, HTγ- EA]



Εικόνα 2.5 Χημικός τύπος της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (5S, 8R, 9S)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται τα εξής:

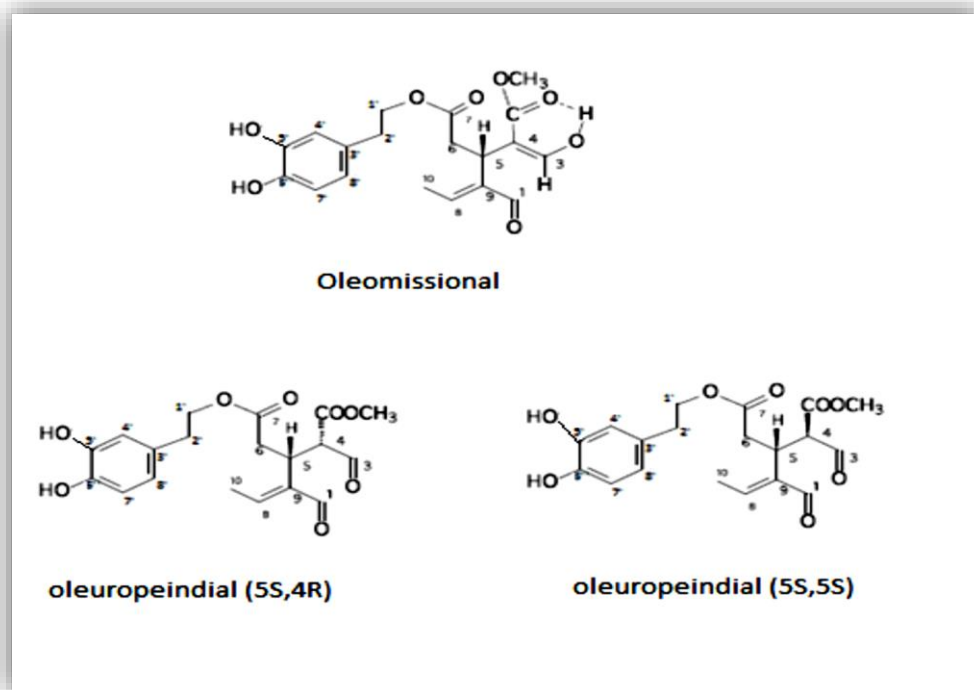
- Μια διπλή κορυφή στα 9.51 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ($J = 1.7 \text{ Hz}$).
- Στα 7.56 ppm η απλή κορυφή ανήκει στο H- 3.
- Η διπλή κορυφή στα 7.06 ppm αντιστοιχεί στα H- 4' και 8' ($J = 8.5 \text{ Hz}$).
- Στα 6.78 ppm συντονίζονται τα H- 5' και 7' ως διπλή κορυφή ($J = 8.5 \text{ Hz}$).
- Στα 4.41 ppm η πολλαπλή κορυφή αντιστοιχεί στο H- 8.
- Εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή στα 4.26 ppm που αντιστοιχεί στα H- 1' ($J_{1'a-1'b} = 12.9 \text{ Hz}$, $J_{1'-2'} = 7.2 \text{ Hz}$).
- Το H- 12 της καρβοξυ-μεθυλομάδας συντονίζεται στα 3.71 ppm.
- Το H- 5 εμφανίζεται στα 3.38 ppm ως πολλαπλή κορυφή.
- Στα 2.83- 2.92 εμφανίζονται τα H- 6a, H- 2'. Πιο συγκεκριμένα, στα 2.89 ppm συντονίζεται το H- 6a και εμφανίζεται ως διπλή-διπλή κορυφή ($J_{6a-b} = 16 \text{ Hz}$, $J_{6a-5} = 3.7 \text{ Hz}$) και στα 2.85 ppm τα H- 2' ως πολλαπλή ($J_{2'-1} = 7.2 \text{ Hz}$).
- Στα 2.50 μέχρι τα 2.58 ppm συντονίζονται τα H- 9, H- 6b. Πιο συγκεκριμένα, στα 2.55 ppm εμφανίζεται το H- 9 ως διπλή τριπλή ($J_{9-5} = 5.7 \text{ Hz}$, $J_{9-1} = 1.7 \text{ Hz}$), ενώ στα 2.52 ppm το H- 6b δίνει μια διπλή διπλή κορυφή ($J_{6b-a} = 16 \text{ Hz}$, $J_{6b-5} = 10 \text{ Hz}$).
- Στα 1.38 ppm έχουμε μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H- 10 ($J_{10-8} = 6.5 \text{ Hz}$).

Το σήμα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση του μορίου στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι η διπλή κορυφή στα 9.51 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1.

Σε πιο πρόσφατη εργασία δημοσιεύθηκε η περιγραφή των ισομερών του μορίου με τη χρήση $^1\text{H-NMR}$ [22]. Τα σήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση των μορίων στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα σήματα των αλδεϋδικών πρωτονίων στη θέση 1. (Πίνακας 2.5)

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J Hz)
1	9.52 (1H, d, J=1.7 Hz)
3	7.58 (1H, s)
4	-
5	3.38 (1H, m)
6a	2.87 (1H, dd, J=16 Hz, 3.4Hz)
6b	2.54 (1H, dd, J=16Hz, 10Hz)
7	-
8	4.46 (1H, m, J= 6.5 Hz)
9	2.57 (1H, dt, J= 5.6 Hz, 1.7 Hz)
10	1.39 (3H, d, J=6.5 Hz)
11	-
12	3.74 (3H, s)
1'	4.25 (2H, m)
2'	2.81 (2H, m , J= 6.6Hz)
3'	-
4'	6.76 (1H, d, J= 2Hz)
5'	-
6'	-
7'	6.80 (1H, d, J=8.2Hz)
8'	6.61 (1H, dd, J=8.2Hz, 2Hz)

Πίνακας 2.5 Σήματα του μορίου του άγλυκου του λιγκστροσίδη (5S, 8R, 9S) σε φάσμα $^1\text{H-NMR}$, διαλύτης CDCl_3



Εικόνα 2.6 Οι τρεις ισομερείς ενώσεις του άγλυκου της Ελευρωπαΐνης

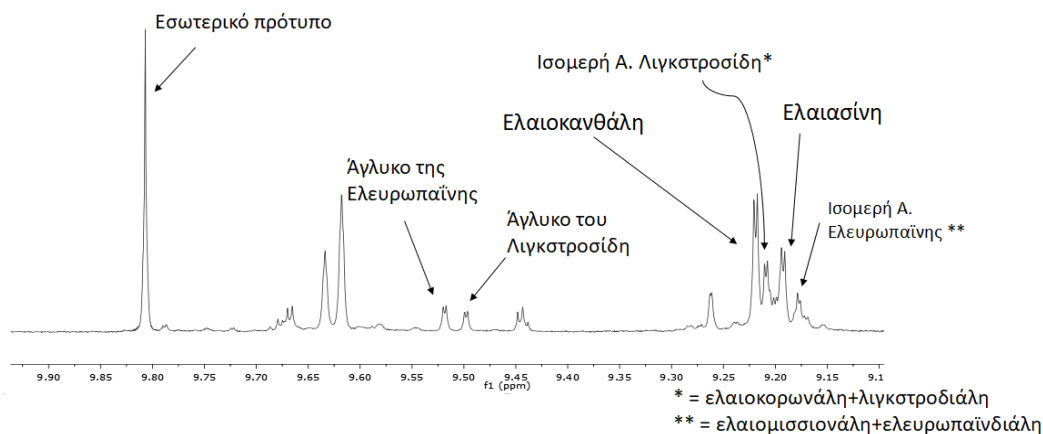
	Oleuropeindial (5S, 4R)	Oleuropeindial (5S, 4R)	Oleomissional
1	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0
3	9.67, d, 2.7	9.44, d, 2.7	7.36, dd, 12.6, 0.8
4	4.04, dd, 10.5, 2.7	4.10, dd, 10.5, 2.7	-
5	3.84, tdd, 10.5, 4.7, 2	3.80, tdd, 10.5, 4.3, 2.0	4.17, ddd (overlap)
6a	2.82, dd, 16.0, 10.5	2.83, dd, 15.8, 10.5	2.98, dd, 15.8, 9.6
6b	2.63, dd, 16.0, 4.7	2.58 dd, 15.8, 4.3	2.77, dd, (overlap)
8	6.70, q, 7.1	6.73, q, 7.1	6.59, q, 7.1
10	2.02, d, 7.1	1.99, d, 7.1	2.05, d, 7.1
3-OH	-	-	11.78, d, 12.6
OCH3	3.65, s	3.78, s	3.74, s
1'	4.21, m	4.12, m	4.16, m
2'	2.75, m	2.75, m	2.75, m
4'	6.68, d 1.8	6.67, d, 1.8	6.71, d, 1.8
7'	6.78, d (overlap)	6.78, d (overlap)	6.78, d (overlap)
8'	6.58	6.58	6.58

Πίνακας 2.6 Σήματα των ισομερών του άγλυκου της ελευρωπαΐνης
σε φάσμα $^1\text{H-NMR}$, διαλύτης CDCl_3

Από την ανάλυση του «σημείου μηδέν» προέκυψε η περιεκτικότητα των δειγμάτων στα φαινολικά συστατικά που αναφέρθηκαν στην πειραματική διαδικασία. Τα αποτελέσματα ποικίλουν, καθώς για την παρούσα εργασία επιλέχθηκαν δείγματα που είναι πλούσια στις φαινόλες που περιλαμβάνονται στον ισχυρισμό υγείας της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αλλά και δείγματα με μικρότερη περιεκτικότητα.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με περιεκτικότητα από 239mg/Kg έως 1600 mg/Kg. Το δείγμα ANT19 είναι ένα δείγμα με πρακτικά μηδενική περιεκτικότητα, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τυχόν επιμολύνσεις κατά την αναλυτική διαδικασία. Αξίζει να σημειωθεί πως στα δείγματα, όπως και στα περισσότερα ελαιόλαδα, η συγκέντρωση του άγλυκου της ελευρωπαϊκής και του άγλυκου του λιγκτοσίδη βρίσκεται σε πολύ μικρά επίπεδα. Γι αυτό και κατά τη μελέτη σταθερότητας και τον υπολογισμό των ποσοστών μείωσης δεν θα ληφθούν υπόψη οι μεταβολές των συγκεκριμένων φαινολικών συστατικών, παρά μόνο η συμβολή τους στο άθροισμα των 6 φαινολικών συστατικών που εξετάζονται. Αλλιώς θα οδηγούμασταν σε «πλασματικά» ποσοστά που θα δυσχέραιναν την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Τέλος, παρατηρούμε πως δεν περιέχουν όλα τα δείγματα όλες τις ουσίες, διαφέρουν δηλαδή ως προς το φαινολικό προφίλ (εικόνα 2.7). Αυτός είναι και ο λόγος που ούτε τα ισομερή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του άγλυκου του λιγκστροσίδη θα υπολογιστούν ως μεμονωμένες μεταβολές, παρά μόνον ως μέρος του αθροίσματος των 6 φαινολικών συστατικών.



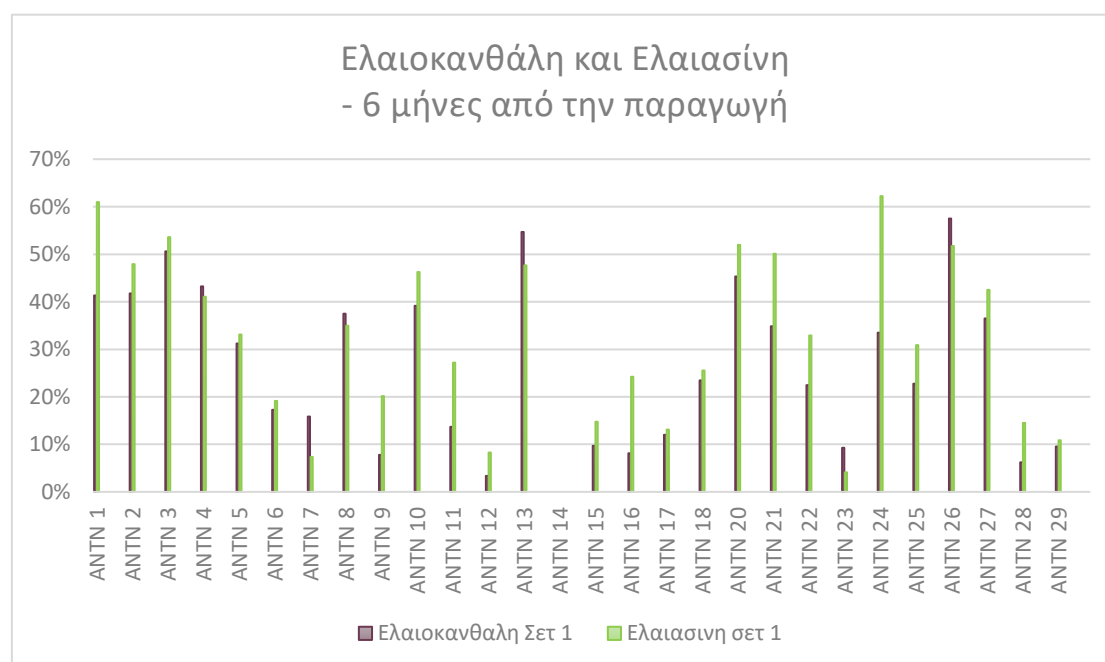
Εικόνα 2.7 Αλδεϋδική περιοχή φάσματος ^1H -NMR σε δείγμα ελαιολάδου που έχει

αναλυθεί με το πρωτόκολλο της παρούσης μελέτης και το φάσμα προέρχεται από μηχανήμα 400 MHz. Δεν εμφανίζονται πάντα όλα τα σήματα που διακρίνονται στην εικόνα.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκτροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαϊνης mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκτροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαϊνης mg/Kg	Άθροισμα
ANTN1	307	68	375	27	43	77	12	533
ANTN2	374	118	493	14	36	54	5	602
ANTN3	258	46	304	0	23	0	0	327
ANTN4	128	29	157	0	26	19	0	202
ANTN5	469	351	819	46	53	93	49	1061
ANTN6	401	225	626	30	40	116	52	864
ANTN7	444	317	761	33	43	129	72	1039
ANTN8	174	68	242	56	63	103	25	490
ANTN9	318	158	475	89	114	349	65	1092
ANTN10	218	116	333	4	13	54	8	413
ANTN11	353	250	602	43	36	194	126	1001
ANTN12	155	124	279	24	26	35	15	379
ANTN13	85	110	195	95	36	194	183	703
ANTN14	58	32	90	24	23	129	38	304
ANTN15	126	32	157	8	19	19	0	203
ANTN16	353	202	555	33	36	223	99	946
ANTN17	336	186	522	40	50	207	82	900
ANTN18	204	76	280	17	26	0	0	324
ANTN19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTN20	188	172	359	43	26	32	15	475
ANTN21	85	54	139	8	13	35	8	203
ANTN22	382	194	576	33	40	126	35	810
ANTN23	53	65	118	0	3	0	0	121
ANTN24	45	20	65	0	40	54	8	167
ANTN25	80	141	221	0	3	0	0	223
ANTN26	142	144	286	134	87	216	139	862
ANTN27	204	60	264	37	50	223	49	621
ANTN28	80	141	221	0	0	0	0	221
ANTN29	155	278	433	0	0	0	0	433

Πίνακας 2.7 Περιεκτικότητες των δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου σε παράγωγα τυροσόλης και υδροxyτυροσόλης στην έναρξη της μελέτης σταθερότητας (σημείο μηδέν).

Έξι μήνες μετά την πρώτη ανάλυση πραγματοποιήθηκε το πρώτο σετ αναλύσεων όλων των δειγμάτων. Κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν τα αποτελέσματα αυτού του σταδίου της παρούσας μελέτης, καθώς αντικατοπτρίζουν την τάση των δειγμάτων αναφορικά με τη διατήρηση των φαινολικών συστατικών τους. Όπως εξηγήθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, θα εξετάσουμε την απώλεια του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών που προσμετρήθηκαν αλλά και ξεχωριστά τα ποσοστά μείωσης της περιεκτικότητας ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης.



Διάγραμμα 2.1 ποσοστά αποδόμησης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης
στο πρώτο τρίμηνο της μελέτης σταθερότητας

- Ποσοστά μείωσης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης

Παρατηρώντας το διάγραμμα, βλέπουμε πως δεν υπάρχει ομοιογένεια στα ποσοστά μείωσης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης. Με μία λεπτομερή εξέταση, μπορούμε να επισημάνουμε πως στα 15 από τα 29 δείγματα έχουμε αυξημένες απώλειες στην περιεκτικότητα ελαιασίνης, σε σχέση με την αρχική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ελαιοκανθάλη. Παρουσιάζεται δηλαδή η ελαιοκανθάλη ως ανθεκτικότερο μόριο στο χρόνο από την ελαιασίνη, όπως έχει αναφερθεί και σε δημοσιευμένες έρευνες [86], [90]. Σε 9 από τα δείγματα της μελέτης συμβαίνει το αντίθετο, η περιεκτικότητα της ελαιασίνης εμφανίζει μια ελαφρώς μικρότερη μείωση από τα αντίστοιχα νούμερα στην περιεκτικότητα της ελαιασίνης. Οφείλουμε να επισημάνουμε εδώ πως στους υπολογισμούς και τα διαγράμματα απεικονίζονται ποσοστά μείωσης και όχι mg/Kg που αλλοιώθηκαν, καθ'ότι τα περισσότερα δείγματα της μελέτης είχαν διαφορετική

περιεκτικότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, αμέσως μετά την παραγωγή τους (Διάγραμμα 2.1)

- Ποσοστά απώλειας στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν

Η αρχική εικόνα του διαγράμματος με τη μεταβολή της περιεκτικότητας στο σύνολο των φαινολικών συστατικών που προσμετρήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, επίσης παρουσιάζει ανομοιογένεια. Δίνει όμως την τάση των δειγμάτων και σημαντικές λεπτομέρειες για τη μετέπειτα πορεία των αποτελεσμάτων. Ακόμα και από το πρώτο τρίμηνο εμφανίζονται σημαντικές απώλειες σε κάποια από τα 29 δείγματα, γεγονός που μας βοηθά να τα διαχωρίσουμε από τα δείγματα που διατηρούν μεγάλο μέρος των φαινολικών τους συστατικών, και να τα χαρακτηρίσουμε ως «ευπαθή». Εφεξής ο χαρακτηρισμός αυτός θα χρησιμοποιείται για δείγματα που η αποδόμηση των φαινολικών τους συστατικών είναι σε ποσοστά μεγαλύτερα του 30%, ενώ τα δείγματα που διατηρούν το 80% των συστατικών τους στο πρώτο τρίμηνο της μελέτης, θεωρούνται τα πιο «ανθεκτικά». Γενικά πάντως, μπορούμε να αναφέρουμε πως στο πρώτο εξάμηνο από την παραγωγή τους, η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασε μείωση στην περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν, της τάξης του 30%. (Διάγραμμα 2.2)



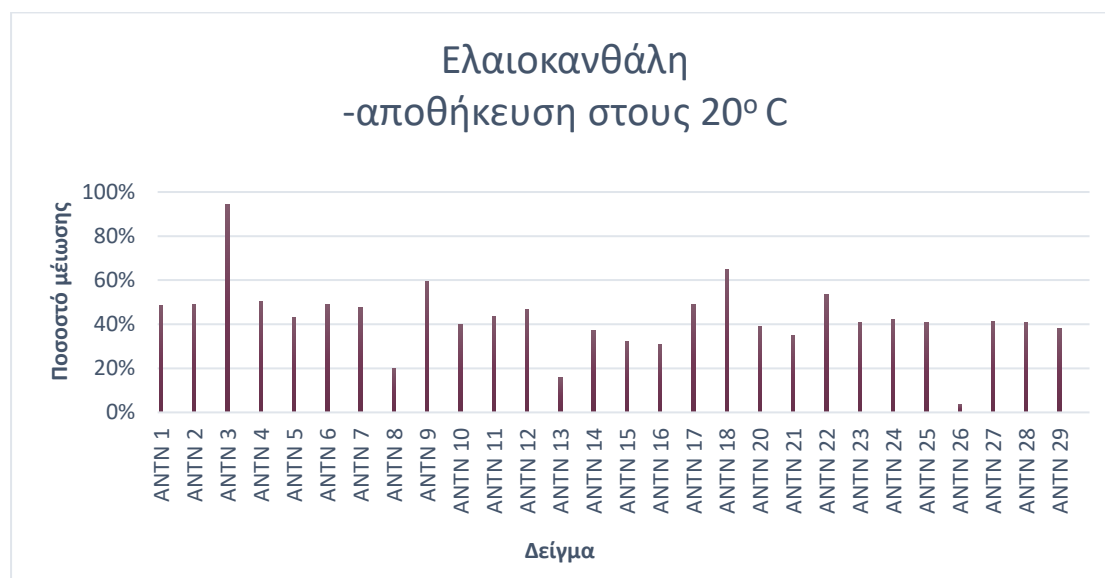
Διάγραμμα 2.2 ποσοστά αποδόμησης του συνόλου των συστατικών που εξετάστηκαν 6 μήνες μετά την παραγωγή των δειγμάτων

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά το πέρας των 12 μηνών και το τέλος και των 145 ξεχωριστών χημικών αναλύσεων συγκεντρώθηκε ένας μεγάλος όγκος δεδομένων, σχετικά με τις περιεκτικότητες των δειγμάτων στα φαινολικά παράγωγα που αναφέρθηκαν. Στο παρόν κεφάλαιο έγινε μία προσπάθεια ομαδοποίησης και εξαγωγής συνολικών συμπερασμάτων, όπου το επιτρέπουν οι αριθμοί.

- Ποσοστά αποδόμησης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης

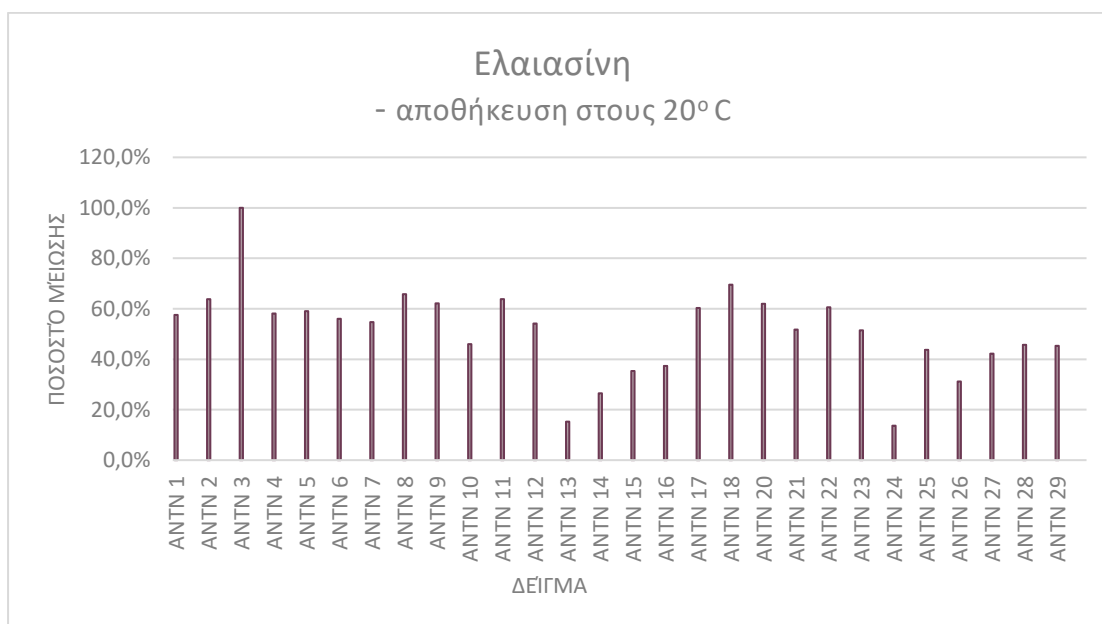
Το πρώτο συμπέρασμα που προκύπτει από τα τελικά αποτελέσματα της 12μηνιας μελέτης είναι μία σχετική ομοιογένεια στα αποτελέσματα. Τα περισσότερα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζουν μία πτώση στην περιεκτικότητά τους σε ελαιοκανθάλη της τάξης του 40%. Περίπου τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και για τις μεταβολές στην περιεκτικότητα ελαιασίνης, μόνο που ο μέσος όρος μείωσης της ελαιασίνης είναι 51%. Και στα δύο διαγράμματα όμως, ενώ τα περισσότερα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοιες μεταβολές στην περιεκτικότητά τους σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη, παρατηρούνται δείγματα που λειτουργούν ως εξαιρέσεις στον κανόνα. Για παράδειγμα, το δείγμα 3, που έχει αποδομηθεί σχεδόν όλη η αρχική ποσότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (ποσοστό μείωσης 94% και 100% αντίστοιχα). Αντίθετα, το δείγμα 16 παρουσίασε μία εξαιρετική σταθερότητα, έχοντας χάσει μόνο το 1/3 της αρχικής περιεκτικότητάς του σε ελαιοκανθάλη και μόνο τη μισή ποσότητα της αρχικής ελαιασίνης (ποσοστά μείωσης 31% και 37,3% αντίστοιχα).



Διάγραμμα 2.3 ποσοστά αποδόμησης ελαιοκανθάλης μετά την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας

Ένα επιπλέον στοιχείο που μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι πως αν και οι μετρήσεις του πρώτου τριμήνου έδωσαν μία πρώτη εικόνα σχετικά με τη σταθερότητα της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης κατά την αποθήκευση των

δειγμάτων στους 20° C, σε μερικές περιπτώσεις τα τελικά αποτελέσματα είναι εμφανώς διαφορετικά. Η παρατήρηση αυτή αφορά σε δείγματα όπως τα 6 και 12. Και τα δύο δείγματα διατήρησαν μεγάλο ποσοστό της αρχικής τους συγκέντρωσης στις 2 ουσίες για 6 μήνες μετά την παραγωγή τους, αλλά με το πέρας των 12 μηνών αποθήκευσης σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες παρουσίασαν 50% μείωση και στα δύο συστατικά. Αξίζει να σημειωθεί πως στο μεν δείγμα 6, η χημική του ανάλυση αμέσως μετά την παραγωγή του έδειξε περιεκτικότητα 485mg/kg ελαιοκανθάλη και 278 mg/Kg ελαιασίνη, ενώ οι αντίστοιχες τιμές του δείγματος 12 ήταν 2 φορές μικρότερες (207 mg/Kg και 151 mg/Kg αντίστοιχα).



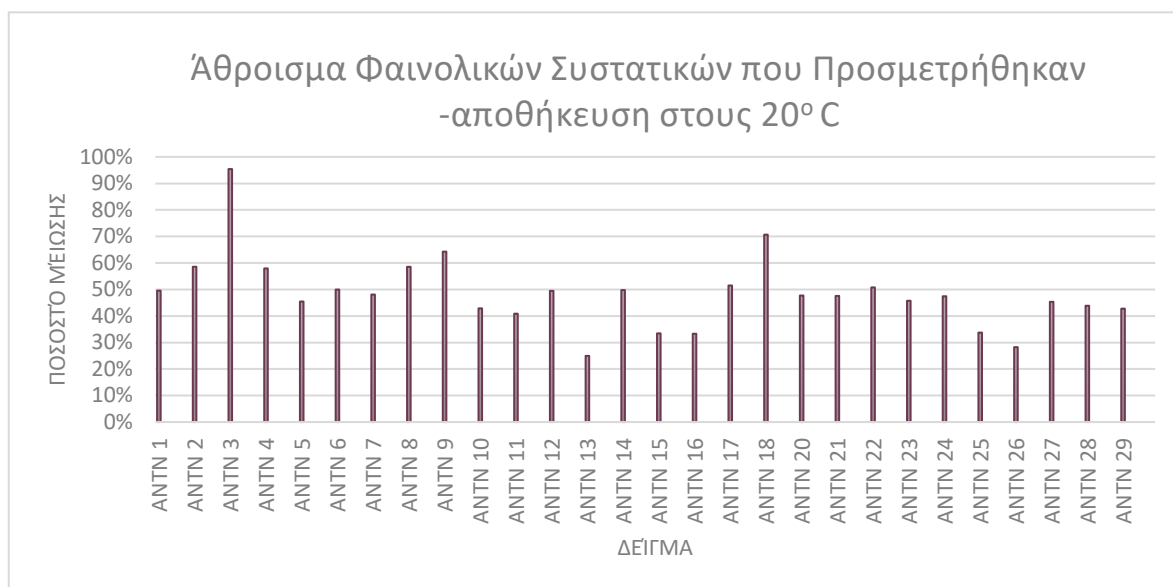
Διάγραμμα 2.4 ποσοστά αποδόμησης ελαιασίνης μετά την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας

- Ποσοστά αποδόμησης στο άθροισμα των συστατικών που προσδιορίστηκαν

Στην παρούσα εργασία, εκτός από την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη, παρακολουθήσαμε και την σταθερότητα των ενώσεων αλδεϋδικη μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη, μαζί με τα ισομερή του, ελαιοκορωνάλη και λιγκστροδιάλες, και την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελαυρωπαΐνης, με τα αντίστοιχα ισομερή ελαιομισσιονάλη και ελευρωπαϊνδιάλες. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, λόγω της πολυμορφίας στο φαινολικό προφίλ του εκάστοτε ελαιολάδου, τα μόρια αυτά μπορεί να βρίσκονται σε μικρές έως μηδαμινές συγκεντρώσεις στα δείγματα και για αυτό το λόγο δεν παρατίθενται τα αντίστοιχα διαγράμμά τους, παρά μόνο το διάγραμμα του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν. Επίσης, θα πρέπει να επισημάνουμε πως οι αριθμοί αυτοί δεν αφορούν σε ολικές φαινόλες, καθώς στο ελαιόλαδο εντοπίζονται και νέα προϊόντα οξείδωσης, όπως το ελαιοκανθαλικό οξύ που περιγράφεται στη συνέχεια,

για τα οποία δεν υφίσταται προς το παρόν καμπύλη αναφοράς, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς του στο ελαιόλαδο.

Διάγραμμα 2.5 ποσοστά αποδόμησης του συνόλου των συστατικών που εξετάστηκαν στο συνολικό διάστημα της μελέτης σταθερότητας



Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης έδωσε έναν μέσο όρο απωλειών, στα φαινολικά συστατικά που εξετάστηκαν, να κυμαίνεται στο 48,5%, ένας αριθμός που είναι παρόμοιος με τα ποσοστά μείωσης σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη. Φυσικό αποτέλεσμα καθώς (πλην ελαχίστων εξαιρέσεων) το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος ενός ελαιολάδου που περιέχει παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, αποτελείται από αυτά τα δύο μόρια. Όπως και στα ποσοστά μείωσης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, έτσι και στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν, δεν ακολουθούν όλα τα δείγματα την ίδια συμπεριφορά. Αν και πάνω από τα μισά δείγματα έχασαν περίπου το 50% της περιεκτικότητάς τους, τα υπόλοιπα είτε διατήρησαν μεγαλύτερο ποσοστό των παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης (όπως τα δείγματα 16 και 17), είτε εμφάνισαν μεγαλύτερες απώλειες (π.χ. τα δείγματα 1 και 2). Σχετικά με τους παράγοντες που οδηγούν σε αυτές τις διαφορές, σε επόμενα κεφάλαια γίνεται μία προσπάθεια συσχέτισης της αναλογίας λιπαρών οξέων και της περιεχόμενης υγρασίας του εκάστοτε δείγματος με τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας. Με τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου όμως μπορούμε να ισχυριστούμε πως η αρχική περιεκτικότητα σε παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης δεν συσχετίζεται απόλυτα, με τη σταθερότητά τους σε συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της ποικιλίας ελιάς από την οποία έχουν παραχθεί τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν και της σταθερότητας των φαινολικών συστατικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα

δείγματα με αριθμούς 2,3 και 4, που ενώ προέρχονται από τον ίδιο παραγωγό, από τον ίδιο ελαιώνα και από την ίδια ποικιλία ελαιόδεντρου, τα ποσοστά μείωσης στο άθροισμα των συστατικών που προσμετρήθηκαν διαφέρουν αρκετά.

Εξετάζοντας αρχικά τα δείγματα με τα μικρότερα ποσοστά μείωσης, το δείγμα 15 είχε περιεκτικότητα 258 mg/Kg σε παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, το δείγμα 17 467 mg/Kg και το δείγμα 16 1085 mg/Kg αμέσως μετά την παραγωγή τους. Παρατηρούμε λοιπόν πως τα 3 σταθερότερα δείγματα της μελέτης, καλύπτουν όλο το εύρος της κλίμακας στην περιεκτικότητα ουσιών που συμβάλλουν στην επαλήθευση του ισχυρισμού υγείας.

Και στα ευπαθή δείγματα όμως, δηλαδή στα δείγματα με την μεγαλύτερη μείωση, βλέπουμε δείγματα με διαφορετική αρχική περιεκτικότητα σε παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Πιο συγκεκριμένα αναφέρουμε ενδεικτικά τα δείγματα 4 με αρχική περιεκτικότητα σε παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης 311 mg/Kg, το δείγμα 2 με αρχική περιεκτικότητα 1042 mg/Kg και το πιο ευπαθές δείγμα της μελέτης, το δείγμα 3 με αρχική περιεκτικότητα 632 mg/Kg. Παρατηρούμε λοιπόν πως και στα δείγματα με μεγάλη μείωση στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν, περιλαμβάνονται δείγματα με μικρή, μέση και υψηλή αρχική περιεκτικότητα στις μελετημένες ουσίες.

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρούμε και στα δείγματα που η μείωση της περιεκτικότητας είναι περίπου 50%, με αντιπροσωπευτικά δείγματα τα 5 (αρχική περιεκτικότητα 1478 mg/Kg), 10 (αρχική περιεκτικότητα 602 mg/Kg) και 28 (αρχική περιεκτικότητα 250 mg/Kg).

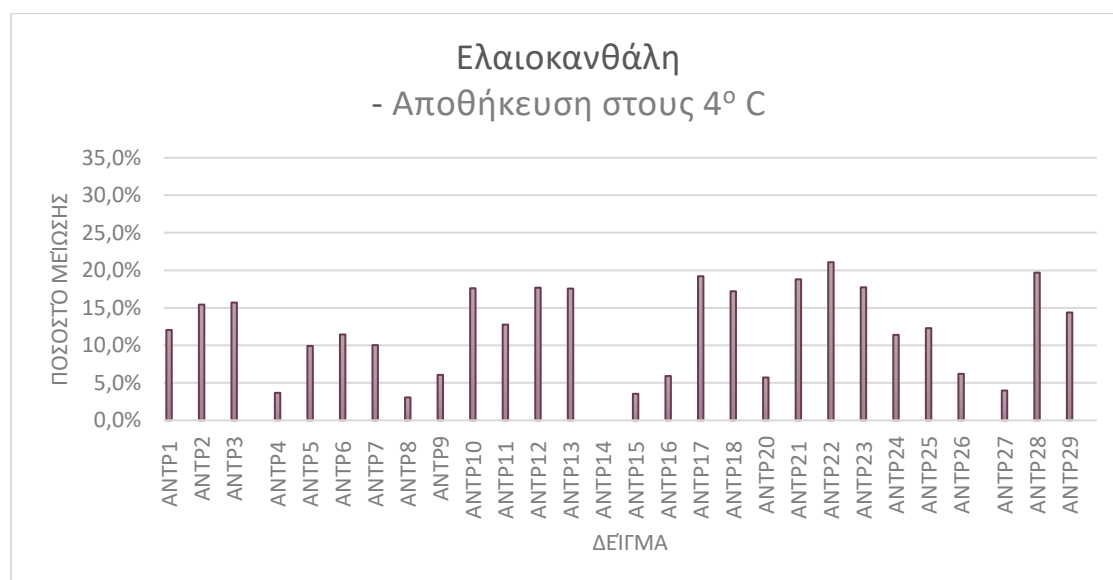
Τα ευρήματα της μελέτης μας βρίσκονται σε αντίθεση με μελέτες που ισχυρίζονται πως ένας καθοριστικός παράγοντας για τη σταθερότητα των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου είναι η αρχική περιεκτικότητα του ελαιολάδου στα συστατικά που προσμετρώνται [82].

Στο παράρτημα της παρούσας μελέτης βρίσκονται καταχωρημένες οι τιμές περιεκτικότητας όλων των φαινολικών συστατικών που προσμετρήθηκαν ξεχωριστά, σε κάθε σετ αναλύσεων, για κάθε διαφορετική συνθήκη αποθήκευσης.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ 4°C (ΨΥΓΕΙΟ)

Όπως ήταν αναμενόμενο με βάση τη βιβλιογραφία [78], [83], [91], μειώνοντας τη θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων, μειώνεται και η ταχύτητα αποδόμησης των φαινολικών συστατικών. Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εφαρμογή της γνώσης αυτής σε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων και η εύρεση των καταλληλότερων συνθηκών αποθήκευσης του ελαιολάδου ώστε να διατηρηθούν οι υγειοπροστατευτικές του ιδιότητες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η ενδιάμεση

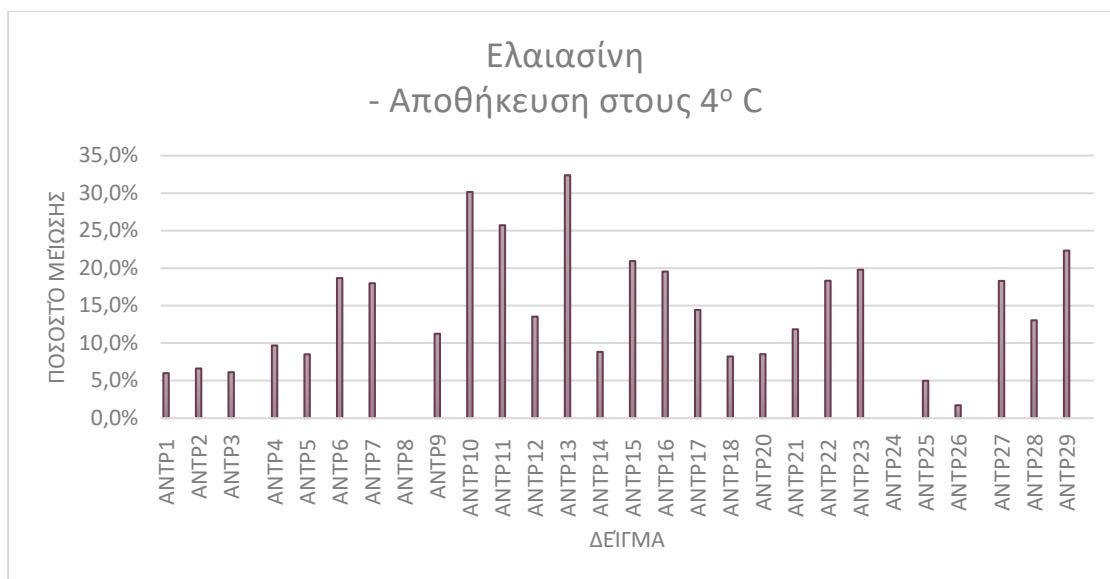
Θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων στην μελέτη μας είναι 4° C, και τα αποτελέσματα σε σχέση με τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος με μέση θερμοκρασία 20° C διαφοροποιούνται αρκετά. Και πάλι, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ποσοστά μείωσης στην περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη και το σύνολο των φαινολικών συστατικών που καταμετρήθηκαν, για λόγους αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 2.6 Ποσοστά αποδόμησης ελαιοκανθάλης μετά την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας

- Ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη

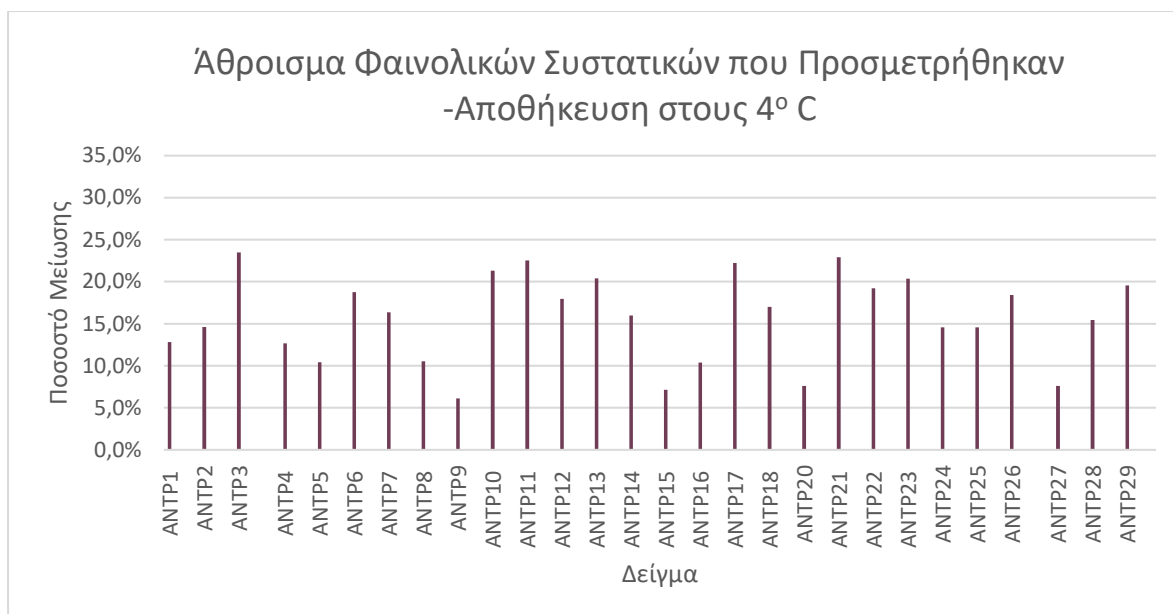
Παρατηρώντας τα διαγράμματα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (Διάγραμμα 2.6 και 2.7 αντίστοιχα) και συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης στις συγκεντρώσεις των δύο μορίων προκύπτουν εμφανή συμπεράσματα. Αρχικά παρατηρούμε πως ο μέσος όρος σε απώλειες απέχει αρκετά από το 50% της προηγούμενης ενότητας, αφού πρόκειται για 11,8% στην ελαιοκανθάλη και 12,5% στην ελαιασίνη. Σε γενικά πλαίσια, και τα δύο φαινολικά μόρια είναι αρκετά πιο ανθεκτικά, μειώνοντας της θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις αποδόμησης τους. Εκτός από τη γενική εικόνα όμως, με μία δεύτερη εξέταση των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε πως και σε αυτή τη θερμοκρασία αποθήκευσης, δεν συμπεριφέρονται όλα τα ελαιόλαδα το ίδιο. Έχουμε δηλαδή ξανά την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε ευπαθή και ανθεκτικά, με τον αριθμό των πρώτων να μην ξεπερνάει το 1/3 του συνολικού αριθμού δειγμάτων, στο διάγραμμα της ελαιοκανθάλης, σε αντίθεση με το διάγραμμα της ελαιασίνης, όπου σχεδόν τα μισά δείγματα παρουσίασαν απώλειες μεγαλύτερες του μέσου όρου.



Διάγραμμα 2.7 ποσοστά αποδόμησης ελαιασίνης μετά την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας

- *Άθροισμα φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν*

Αναλύοντας το διάγραμμα με τη μείωση που παρατηρήθηκε στο άθροισμα της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν, βλέπουμε το ίδιο μοτίβο με τα διαγράμματα της ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης. Μειώνοντας τη θερμοκρασία αποθήκευσης από τους 20° C στους 4° C, μειώθηκαν και οι απώλειες σε μόρια με υγειοπροστατευτικές ιδιότητες, με τη μέση τιμή να κυμαίνεται περίπου στο 16% και με μόνο το 1/3 των δειγμάτων να υπερβαίνει αυτή την τιμή. Ακόμα λιγότερα είναι τα δείγματα που έχασαν το 1/5 της αρχικής τους περιεκτικότητας. Όμως στα τελευταία δείγματα που αναφέρθηκαν παρατηρείται κάτι αξιοσημείωτο. Το μόνο δείγμα το οποίο εμφανίζει απώλειες μεγαλύτερες του μέσου όρου και κατά την αποθήκευσή του σε δροσερό και σκιερό μέρος και κατά την αποθήκευσή του στο ψυγείο, είναι το δείγμα με τον αριθμό 3. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα που εμφανίζονται ως «ευπαθή» κατά την αποθήκευσή τους στους 4° C ανήκουν στα «ανθεκτικά» στις αναλύσεις της προηγούμενης συνθήκης αποθήκευσης. Αποτελέσματα σαν αυτό επισημαίνουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα των ωφέλιμων φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

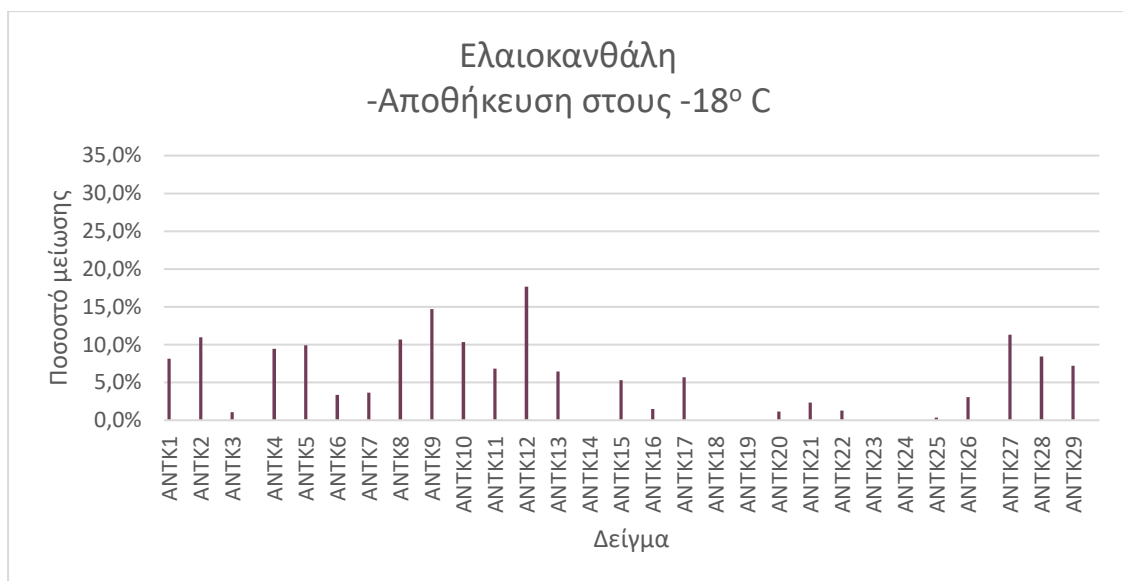


**Διάγραμμα 2.8 ποσοστά αποδόμησης του συνόλου των συστατικών που εξετάστηκαν
στο συνολικό διάστημα της μελέτης σταθερότητας**

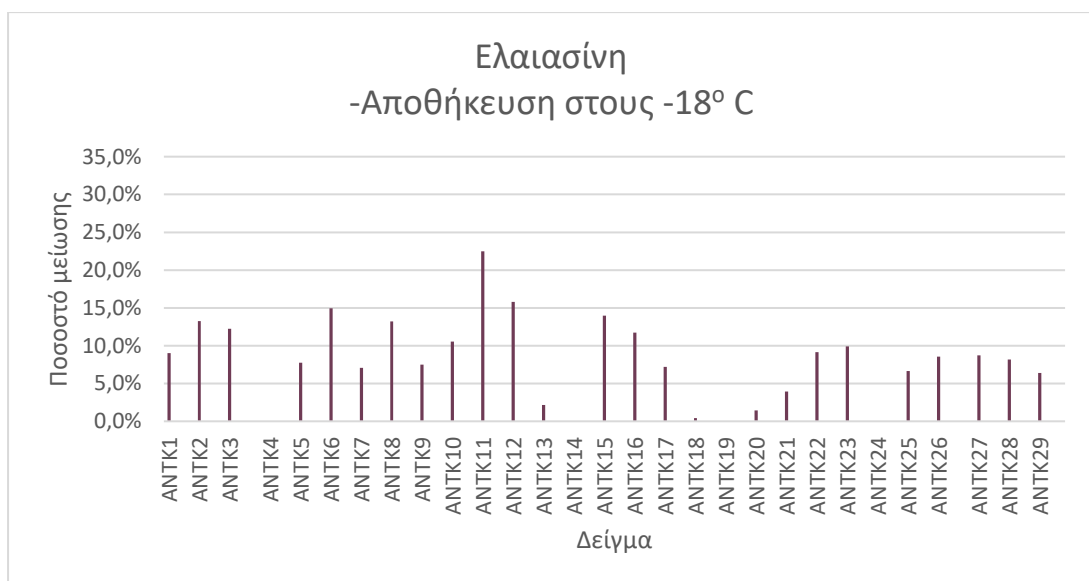
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ -18° C (ΚΑΤΑΨΥΞΗ)

- Ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη

Τελευταίο κομμάτι της 12μηνιαίας μελέτης σταθερότητας που περιγράφεται στην παρούσα εργασία είναι η αποθήκευση των δειγμάτων σε συνθήκες κατάψυξης, στους -18° C. Τα αποτελέσματα που αφορούν τα ποσοστά μείωσης των μορίων ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη στα δείγματα ελαιολάδου είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα από την αποθήκευσή τους σε συνθήκες ψυγείου. Με μία βασική διαφορά: Τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη διατήρησαν μεγαλύτερο μέρος της αρχικής τους περιεκτικότητας σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη, απ' ό,τι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο. Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος στα ποσοστά μείωσης της ελαιοκανθάλης στους -18° C ανέρχεται μόλις στο 6,4%, ενώ ο αντίστοιχος μέσος όρος στα δείγματα του ψυγείου είναι 11,8%. Της δε ελαιασίνης τα αντίστοιχα νούμερα είναι 8% στους -18° C και 12,5% στους 4° C.



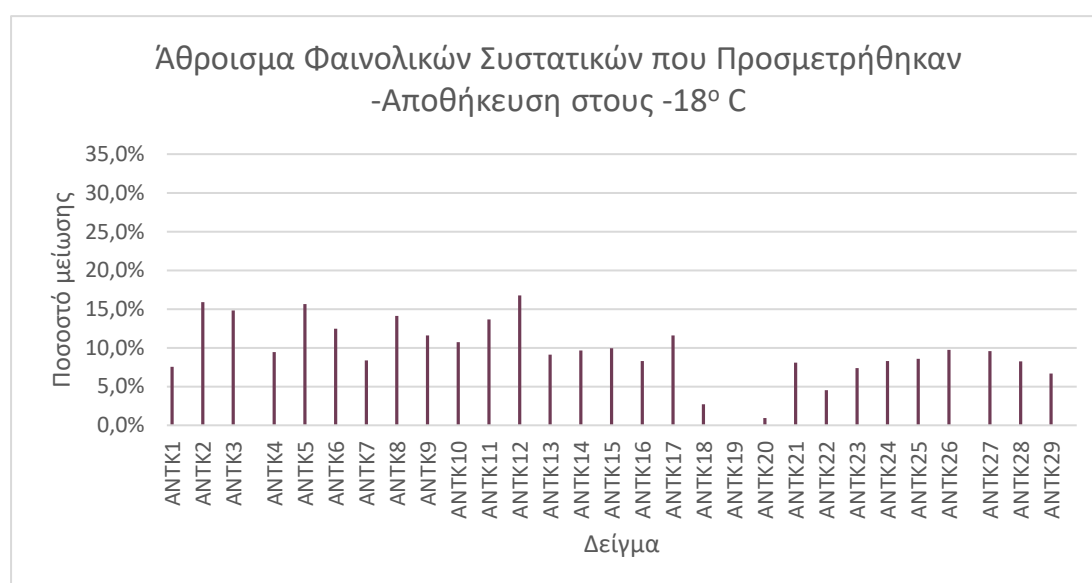
Διάγραμμα 2.9 ποσοστά αποδόμησης ελαιοκανθάλης μετά την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας



Διάγραμμα 2.10 ποσοστά αποδόμησης ελαιασίνης μετά την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας

- Άθροισμα φαινολικών συστατικών που εξετάστηκαν

Το γενικό συμπέρασμα αναφορικά με την αποθήκευση ελαιολάδου σε θερμοκρασία -18°C για 12 μήνες είναι πως μειώνοντας τη θερμοκρασία αποθήκευσης κατά 25°C περίπου, είναι δυνατή η αναστολή των αντιδράσεων αποδόμησης των φαινολικών συστατικών. Σε μικρή μερίδα των δειγμάτων παρατηρήθηκε απώλεια μεγαλύτερη του 10% των κυριότερων φαινολικών συστατικών, αλλά ως επί το πλείστον, το 90% των παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στο κάθε δείγμα διατηρήθηκε ακέραιο για 12 μήνες. Το αποτέλεσμα της μελέτης συμφωνεί και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα των Mulinacci et al., σε δημοσίευσή τους το 2013 [111].



Διάγραμμα 2.11 Ποσοστά αποδόμησης του αθροίσματος των συστατικών που εξετάστηκαν στο συνολικό διάστημα της μελέτης σταθερότητας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

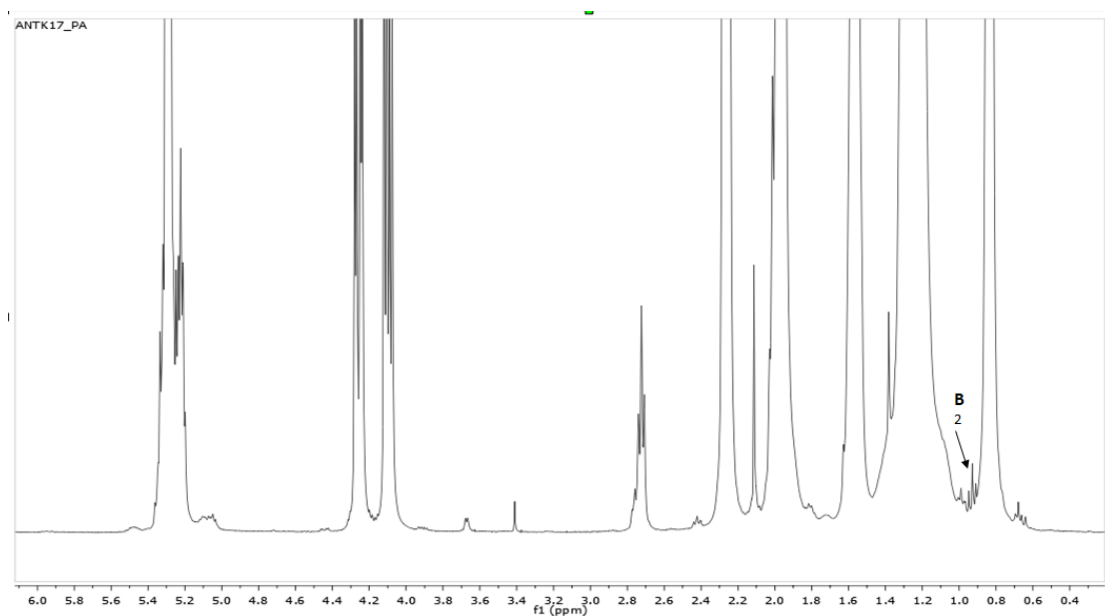
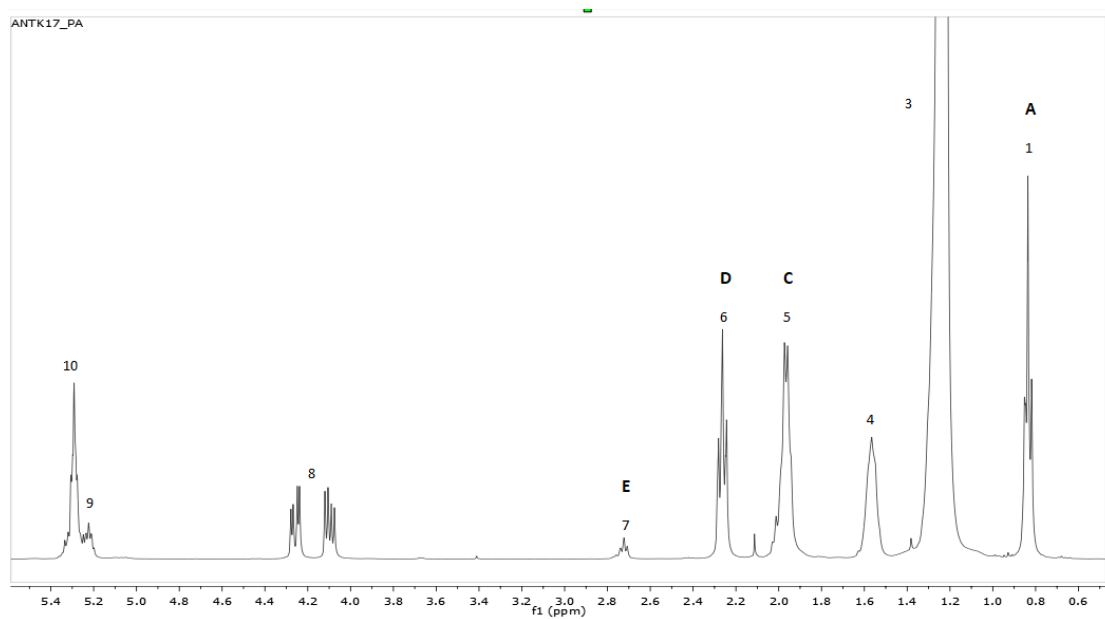
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενα κεφάλαια, το ξεχωριστό λιπιδικό προφίλ του ελαιολάδου το καθιστά ιδανικό τρόφιμο για τη διατήρηση της χοληστερίνης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Το ιδιαίτερο αυτό προφίλ μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, με σκοπό την ανίχνευση κάποιας σύνδεσης ανάμεσα στην αναλογία λιπαρών οξέων και την μεταβολή της περιεκτικότητας σε ελαιοκανθάλη του εκάστοτε δείγματος, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Η ανάλυση του λιπιδικού προφίλ των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του πρωτοκόλλου των Guillén and Ruiz, 2003 [112]. Στην εργασία τους οι επιστήμονες ανέλυσαν 14 διαφορετικά φυτικά έλαια, συμπεριλαμβανομένου του ελαιολάδου και κατέγραψαν την ποσοστιαία αναλογία τους σε λιπαρά οξέα, χρησιμοποιώντας φάσματα $^1\text{H-NMR}$. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, 0.2gr από κάθε δείγμα διαλύθηκαν σε 500 μL δευτεριωμένου χλωροφόρμιο (CDCl_3) και αναλύθηκαν με τη χρήση NMR.

Η μέθοδος βασίζεται στην αντιστοίχιση των σημάτων στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ με τις χαρακτηριστικές ομάδες των λιπαρών οξέων, η οποία δίνεται στον πίνακα 3.1. Χρησιμοποιώντας τα σήματα αυτά μπορεί να γίνει και ο καθορισμός της ποσοστιαίας αναλογίας, καθώς το εμβαδό του κάθε σήματος είναι ανάλογο του αριθμού των αντιστοιχών πρωτονίων στο δείγμα. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η ποσοστιαία αναλογία των δειγμάτων μεταξύ των λιπαρών οξέων ελαϊκό, λινελαϊκό, λινολενικό και κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Signal	Chemical shift (ppm)	Functional group
1	0.83-0.93	$-\text{CH}_3$ (saturated, oleic and linoleic acyl chains)
2	0.93-1.03	$-\text{CH}_3$ (linolenic acyl chains)
3	1.22-1.42	$-(\text{CH}_2)_n-$ (acyl chains)
4	1.52-1.70	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (acyl chains)
5	1.94-2.14	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (acyl chains)
6	2.23-2.36	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ (acyl chains)
7	2.70-2.84	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (acyl chains)
8	4.10-4.32	$-\text{CH}_2\text{OCOR}$ (glyceryl group)
9	5.20-5.26	$>\text{CHOCOR}$ (glyceryl group)
10	5.26-5.40	$-\text{CH}=\text{CH}-$ (acyl chains)

Πίνακας 3.1 Αντιστοίχιση σημάτων στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ με χαρακτηριστικές ομάδες των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου



Εικόνα 3.1 Σήματα σε φάσμα ^1H -NMR ελαιολάδου, που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναλογίας λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός της αναλογίας μεταξύ των ακυλομάδων του Ελαϊκού (O), Λινελαϊκού (L), Λινολενικού (Ln) και κορεσμένων (S) λιπαρών οξέων έγινε με βάση τις εξισώσεις:

$$\text{Ln (\%)} = 100 [B / (A+B)]$$

$$\text{L (\%)} = 100 [(E/D) - 2[B/(A+B)]]$$

$$\text{O (\%)} = 100 [(C/2D) - (E/D) + [B/(A+B)]]$$

$$\text{S (\%)} = 100 [1 - (C/2D)]$$

Όπου:

- Α είναι το εμβαδό της κορυφής 1 του φάσματος (εικόνα), που αντιστοιχεί σε μεθυλικά πρωτόνια κορεσμένων δεσμών μαζί με χαρακτηριστικές ομάδες του ελαϊκού και του λινελαϊκού οξέος
- Β είναι το εμβαδό της κορυφής 2 του φάσματος, που αντιστοιχεί σε μεθυλικά πρωτόνια των ακυλομάδων του λινολενικού οξέος,
- C είναι το εμβαδό της κορυφής 5 του φάσματος, που αντιστοιχεί σε πρωτόνια μεθυλενίου που βρίσκονται δίπλα σε διπλό δεσμό
- D είναι το εμβαδό της κορυφής 6 του φάσματος, που αντιστοιχεί σε πρωτόνια μεθυλενίου που βρίσκονται δίπλα σε καρβοξύλιο
- Ε είναι το εμβαδό της κορυφής 7 του φάσματος, που αντιστοιχεί σε πρωτόνια μεθυλενίου που βρίσκονται ανάμεσα σε δύο διπλούς δεσμούς.

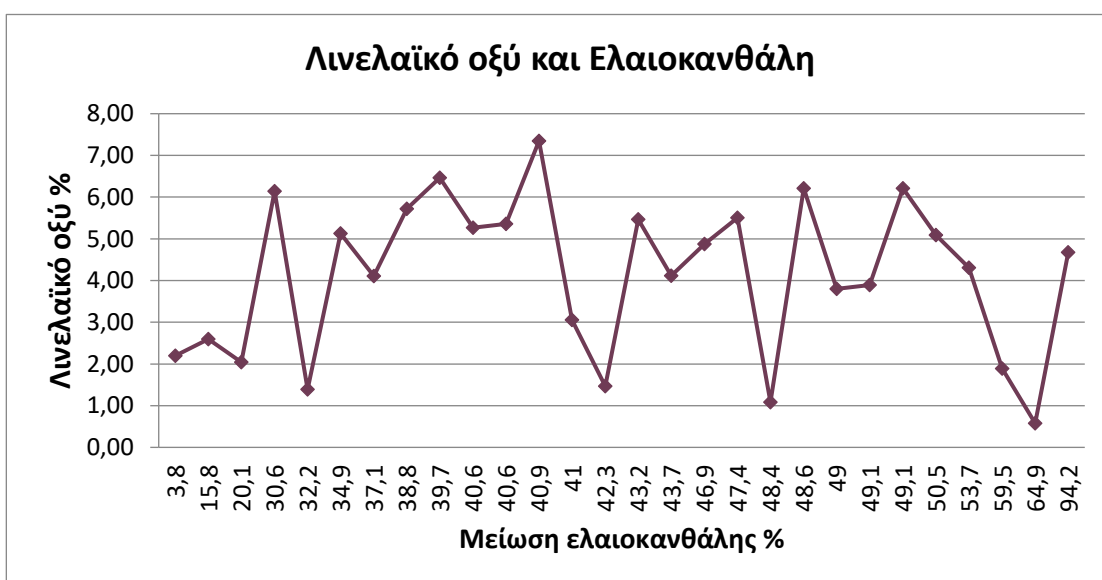
Η παραπάνω ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στα 29 δείγματα της μελέτης, ώστε να ερευνηθεί κάθε πιθανή σύνδεση μεταξύ της ποσοστιαίας αναλογίας των λιπαρών οξέων και της σταθερότητας των φαινολικών συστατικών του εκάστοτε δείγματος, έχοντας ως δείκτη την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ελαιοκανθάλη στο πέρας της μελέτης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την αναλογία των κυριότερων λιπαρών οξέων στα δείγματα ελαιολάδου, σε σχέση με τη μείωση της περιεκτικότητας της ελαιοκανθάλης, στη συνολική διάρκεια της μελέτης. Σε όλα τα διαγράμματα δεν αναγράφεται ο αριθμός του δείγματος, καθώς το σημαντικό στοιχείο της διαδικασίας ανάλυσης του λιπιδικού προφίλ είναι η εύρεση συσχέτισης μεταξύ των δεδομένων που εξετάζονται. Για αυτό το σκοπό, τα δείγματα έχουν ταξινομηθεί με βάση τα επίπεδα αποδόμησης της ελαιοκανθάλης και ερευνάται οποιαδήποτε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αυξανόμενης μείωσης της περιεκτικότητας ελαιοκανθάλης, και την ποσοστιαία αναλογία του κάθε εξεταζόμενου λιπαρού οξέος. Κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί πως τα κυριότερα λιπαρά οξέα είναι το ελαϊκό και το λινελαϊκό, με βάση την αναλογία τους στο ελαιόλαδο, αλλά παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα διαγράμματα του λινολενικού και των κορεσμένων λιπαρών οξέων, παρ' όλο που το ποσοστό του ενός επηρεάζει αντίστροφα και όλα τα υπόλοιπα.



Διάγραμμα 3.1 Αναλογία ελαϊκού οξέος σε σχέση με τα ποσοστά μείωσης της ελαιοκανθάλης, ταξινομημένα κατά αυξουσα σειρά.



Διάγραμμα 3.2 Αναλογία λινελαϊκού οξέος σε σχέση με τα ποσοστά μείωσης της ελαιοκανθάλης, ταξινομημένα κατά αυξουσα σειρά



Διάγραμμα 3.3 Αναλογία Λινολενικού οξέος σε σχέση με τα ποσοστά μείωσης της ελαιοκανθάλης, ταξινομημένα κατά αυξουσα σειρά

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα, δεν παρατηρείται καμία απόλυτως συσχέτιση, γραμμική ή μη, μεταξύ της αναλογίας λιπαρών οξέων και ποσοστού αποδόμησης της ελαιοκανθάλης στα δείγματα που μελετήθηκαν. Η αναλογία των λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο επηρεάζεται κυρίως από την ποικιλία του ελαιόδεντρου [81], [84]. Γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν όμως και τη σύσταση του ελαιολάδου, συμπεριλαμβανομένου του φαινολικού περιεχομένου [71], [84]. Με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης ανάλυσης των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, η σταθερότητα της ελαιοκανθάλης και κατ' επέκταση των υπόλοιπων σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου δεν καθορίζονται από την αναλογία λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο.



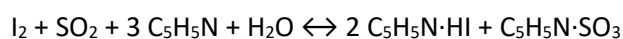
Διάγραμμα 3.4 Αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων σε σχέση με τα ποσοστά μείωσης της ελαιοκανθάλης, ταξινομημένα κατά αυξουσα σειρά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΥΓΡΑΣΙΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Το ελαιόλαδο εκτός από τα συστατικά που περιγράφησαν εκτενώς σε προηγούμενο κεφάλαιο, περιέχει και υγρασία, υπό τη μορφή μικρών σταγονιδίων, παρά τις φυγοκεντρικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται κατά την ελαιοποίηση. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η αποδόμηση των φαινολικών συστατικών οφείλεται είτε σε οξειδωτικούς είτε σε υδρολυτικούς μηχανισμούς. Υπάρχουν μάλιστα ερευνητικές ομάδες που υποστηρίζουν πως με την απομάκρυνση της υγρασίας (φιλτράρισμα του ελαιολάδου), αυξάνεται η σταθερότητα των σεκοϊριδοειδών και επιβραδύνεται η υδρόλυση τους, που οδηγεί στην μετατροπή τους σε απλές φαινόλες [113], [88]. Κρίθηκε σκόπιμο λοιπόν να ερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων υγρασίας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, με τη σταθερότητα των φαινολικών συστατικών τους κατά την αποθήκευση.

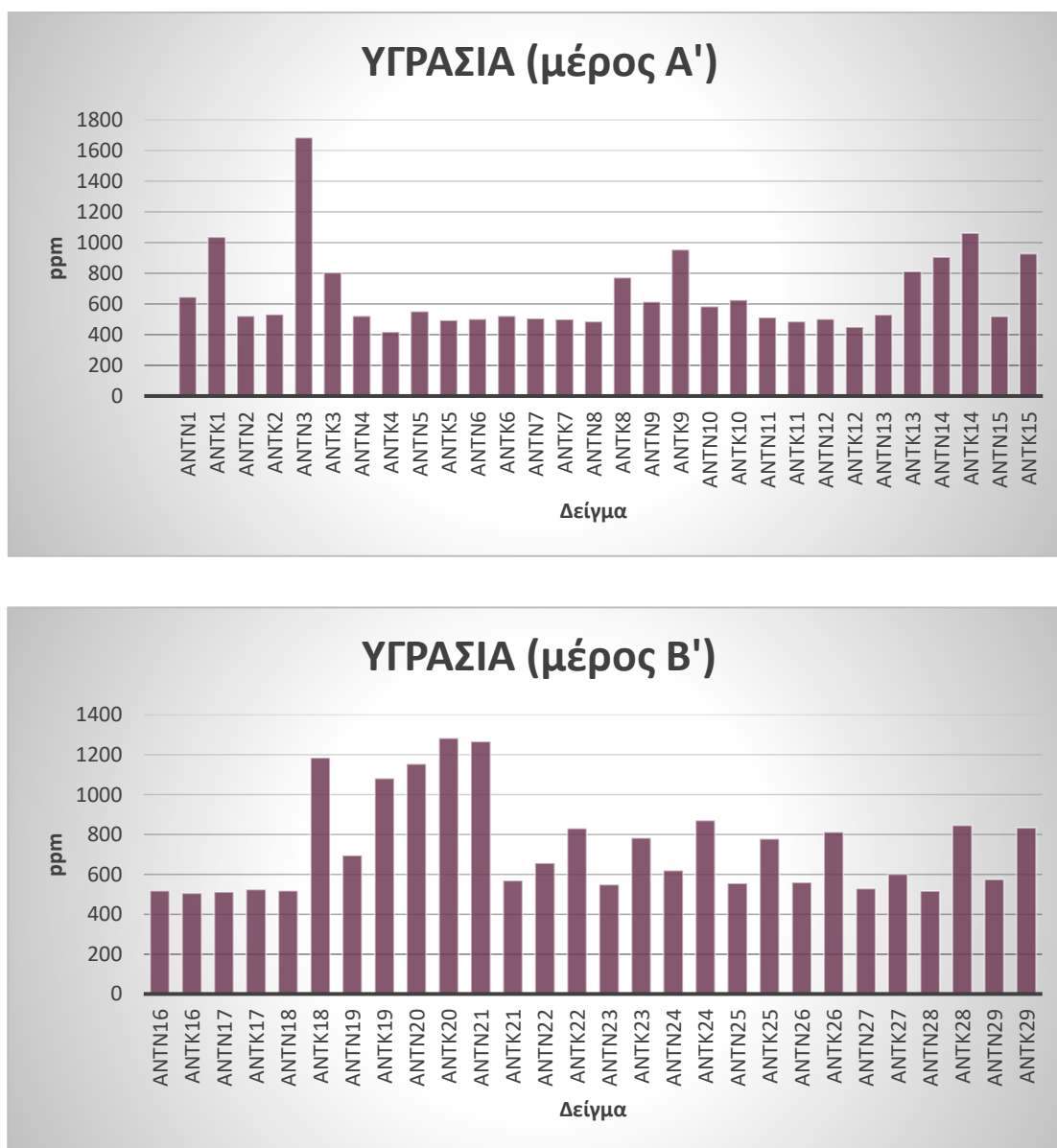
Η μέθοδος Karl Fischer είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της ποσότητας του νερού μέσω οξειδοαναγωγικής ογκομέτρησης. Δημιουργός της ήταν ο χημικός Karl Fischer το 1935. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της υγρασίας σε οργανικούς διαλύτες, στερεές ουσίες, καλλυντικά προϊόντα και τρόφιμα με μικρή περιεκτικότητα σε νερό. Το αντιδραστήριο Karl Fischer είναι διάλυμα ιωδίου και διοξειδίου του θείου σε μίγμα πυριδίνης και απόλυτης μεθανόλης. Η αναλογία ιωδίου, διοξειδίου του θείου και πυριδίνης είναι $I_2 : SO_2 : C_5H_5N = 1 : 3 : 10$. Η πυριδίνη εκτός από διαλύτης, δρα επίσης ως βάση, δηλαδή εξουδετερώνει τα παραγόμενα οξέα και βοηθάει τη μετατόπιση της αντίδρασης προς τα δεξιά. Η αντίδραση οξειδοαναγωγής που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Το τελικό σημείο της ογκομέτρησης αναγνωρίζεται από την αλλαγή του χρώματος του τιτλοδοτούμενου διαλύματος ή μίγματος: Όταν αντιδράσει όλο το νερό τότε η μία σταγόνα του αντιδραστηρίου Karl Fischer που θα πέσει παραπάνω θα βάψει το διάλυμα καστανό λόγω του ιωδίου (I_2). Πλεονέκτημα της μεθόδου Karl Fischer είναι η μεγάλη ακρίβεια. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κουλομετρική μέθοδος προσδιορισμού της υγρασίας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Karl Fischer. Στην περίπτωση αυτή μετράται το ηλεκτρικό φορτίο που απαιτείται ώστε να παρασκευαστεί ηλεκτρολυτικά τόσο ιώδιο ώστε να αντιδράσει όλο το νερό και να χρωματιστεί το διάλυμα καστανό. Έτσι, μέσω υπολογισμών, προσδιορίζεται η ποσότητα του ύδατος που βρίσκεται μέσα στο προς εξέταση δείγμα. Ο προσδιορισμός αυτός γίνεται αυτοματοποιημένα με τη χρήση του οργάνου (coulometer).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για κάθε δείγμα από τα 29 που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη, η τιτλοδότηση Karl-Fischer εφαρμόστηκε δις, μία μέτρηση στο δείγμα που ήταν αποθηκευμένο σε σκιερό και δροσερό μέρος (δείγματα ANTΝ) και μια μέτρηση στο αντίστοιχό του, που ήταν αποθηκευμένο στους -18°C (δείγματα ANΤΚ). Τα αποτελέσματα παρατείνονται στο διάγραμμα

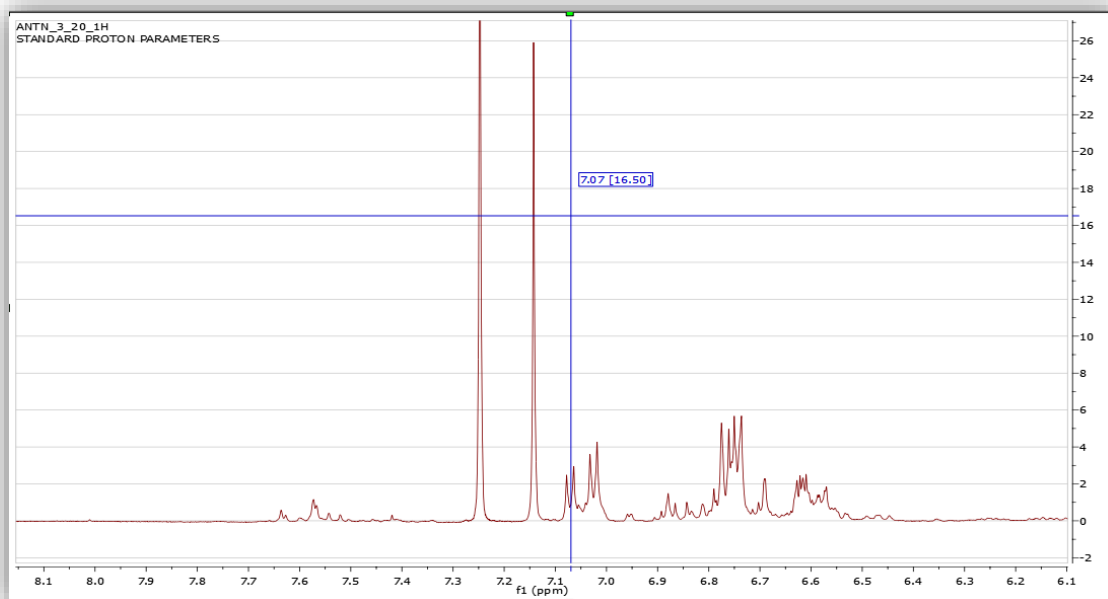


Διάγραμμα 4. Ποσοστά υγρασίας σε όλα τα ελαιόλαδα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη σταθερότητας των κυρίαρχων φαινολικών συστατικών

Παρατηρώντας τις μεταβολές στα επίπεδα ορισμένων υπό μελέτη ουσιών, διερευνήθηκε ο τρόπος της μεταβολής αυτής. Σε ορισμένα από τα δείγματα (πχ τα δείγματα με τους αριθμούς 3, 5 και 20) παρατηρήθηκε στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ αύξηση των επιπέδων ελεύθερης τυροσόλης με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων ελαιοκανθάλης. Εξερευνώντας λοιπόν της πιθανότητα υδρόλυσης της ελαιοκανθάλης με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων τυροσόλης [85], προστέθηκε στην παρούσα μελέτη και η μέτρηση των επιπέδων υγρασίας των ελαιολάδων. Μετρήθηκε η υγρασία των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους -18°C (κατάψυξη) και των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν σε σκιερό και ξηρό μέρος (ντουλάπι με μέση θερμοκρασία 20°C) , στην ανίχνευση πιθανού συσχετισμού ή διαφοροποίησης αναμεσα σε:

- Ποσοστα υγρασίας στα δείγματα κατάψυξης/δροσερού και σκιερού μέρους
- Ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων ελεύθερης τυροσόλης. Η τυροσόλη ανιχνεύτηκε με τη χρήση $^1\text{H-NMR}$, με την εμφάνιση μίας διπλής κορυφής στα 7.08 ppm μετά από ανάλυση των δειγμάτων ελαιολάδου με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας. (εικόνα 4)

Τα αποτελέσματα μέτρησης της υγρασίας έχουν ως στόχο την εύρεση πιθανής συσχέτισης μεταξύ της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε νερό και της αύξησης των επιπέδων ελεύθερης τυροσόλης, απόδειξης πως έχουν ενεργοποιηθεί οι υδρολυτικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην αποδόμηση των φαινολικών συστατικών που μελετώνται στην παρούσα εργασία. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα, πρόκειται για έναν σημαντικό όγκο δεδομένων, χωρίς να υπάρχει μία σαφής εικόνα. Θεωρώντας τη μέση περιεκτικότητα σε νερό τα 520ppm, η προσοχή επικεντρώθηκε στα δείγματα που βρέθηκε να περιέχουν περισσότερη υγρασία, σε σχέση με τα δεδομένα αύξησης της ελεύθερης τυροσόλης.



Εικόνα 4 Φάσμα ^1H -NMR με σημειωμένη την κορυφή που χρησιμοποιήσαμε για την μεταβολή της ελεύθερης τυροσόλης στα δείγματά μας

Από τα 29 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις της περιεχόμενης υγρασίας, 6 δείγματα πληρούν τις δύο προϋποθέσεις που εξετάζονται στο παρόν κεφάλαιο. Η αυξημένη υγρασία των δειγμάτων 1, 3, 14, 20 και 26 συνδυάζεται με την εμφάνιση της κορυφής της ελεύθερης τυροσόλης κατά την χημική ανάλυση των δειγμάτων. Στα υπόλοιπα δείγματα της μελέτης όμως, που παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα υγρασίας, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ελεύθερης τυροσόλης. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε πως η αυξημένη υγρασία ενός δείγματος ελαιολάδου είναι αναγκαία, αλλά όχι απόλυτα ικανή συνθήκη για την πρόωρη αποδόμηση των φαινολικών συστατικών του, μέσω υδρολυτικών μηχανισμών. Καθώς δεν παρατηρήθηκε απόλυτη αντιστοίχιση μεταξύ των δειγμάτων με αυξημένες τιμές υγρασίας, με τα δείγματα που στο φάσμα ^1H -NMR εμφάνισαν την κορυφή ελεύθερης τυροσόλης, μπορούμε να υποθέσουμε πως το μέγεθος των σταγονιδίων υγρασίας είναι ένας επιπλέον παράγοντας που ρυθμίζει την υδρόλυση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

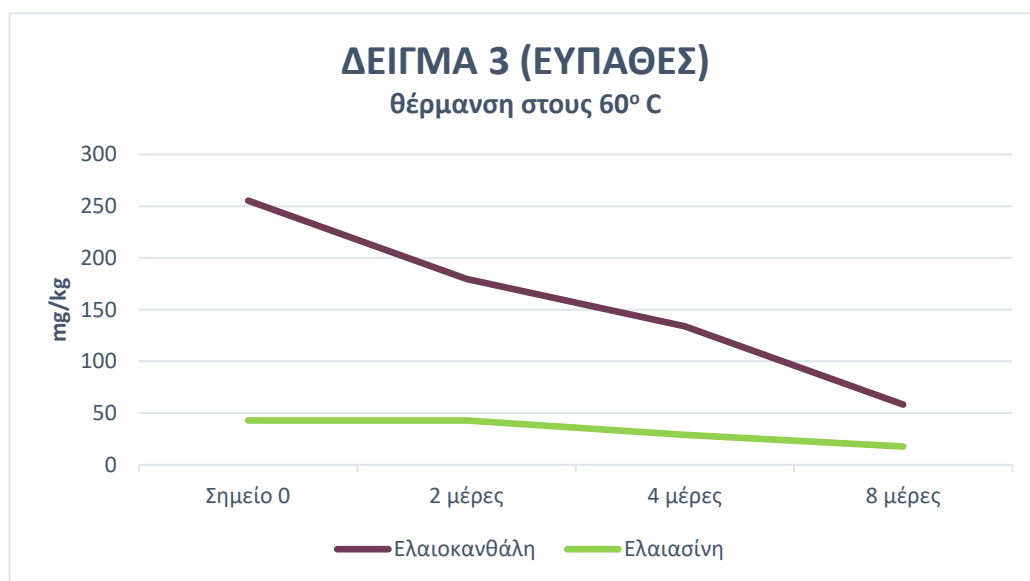
Με βάση τη βιβλιογραφία που παρουσιάστηκε, προκύπτει το συμπέρασμα πως η αποδόμηση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου είναι μία διαδικασία με πολλές μεταβλητές. Οι παράγοντες που την επηρεάζουν, όπως η αναλογία λιπαρών οξέων και η υγρασία μελετήθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια. Στο παρόν στάδιο της μελέτης, έγινε η προσπάθεια αναπαραγωγής των χημικών διαδικασιών που πραγματοποιούνται κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου, αλλά σε μικρότερο χρονικό διάστημα από τις συνηθισμένες συνθήκες. Έγινε δηλαδή μία απόπειρα πρόβλεψης της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά, 12 μήνες μετά την παραγωγή του. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αποθηκευμένα σε βαθιά κατάψυξη που, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, διατηρούν πρακτικά ανεπηρέαστο το φαινολικό τους προφίλ. Η διαδικασία εφαρμόστηκε και σε λάδια που παρήχθησαν 1 μήνα πριν την παρούσα μελέτη, ώστε να διαπιστωθεί η οποιαδήποτε απόκλιση στα αποτελέσματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επιλέχθηκαν 2 δείγματα από την προηγούμενη μελέτη, ένα που χαρακτηρίζεται ως «ευπαθές», καθώς παρουσίασε άμεση μείωση σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη στο πρώτο τρίμηνο της μελέτης και ένα που χαρακτηρίζεται ως «ανθεκτικό», αφού διατήρησε μεγάλο ποσοστό του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με το πέρασμα των 18 μηνών αποθήκευσής του. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν αποθηκεύτηκαν σε σκούρα γυάλινα μπουκαλάκια, ερμητικά κλεισμένα για τον αποκλεισμό του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία στους 60° C. Το κάθε δοχείο περιείχε αρκετό ελαιόλαδο μόνο για μία ανάλυση, ώστε να μην αναλύονται δείγματα αποθηκευμένα “μισογεμάτα”, δηλαδή δείγματα που είχαν έρθει σε επαφή με ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Όπως και στις προηγούμενες εκυλίσσεις, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από το εργαστήριό μας, το οποίο αναφέρθηκε αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο. Οι απευθείας μετρήσεις της περιεκτικότητας ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης έγιναν όπως και σε προηγούμενο κεφάλαιο, με τη χρήση φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$. Οι αναλύσεις και η λήψη των φασμάτων έγιναν πριν την αποθήκευση (0 μέρες), μετά από 2 μέρες στους 60° C, μετά από 4 μέρες στους 60° C και η τελευταία μέτρηση μετά από 8 μέρες στους 60° C.

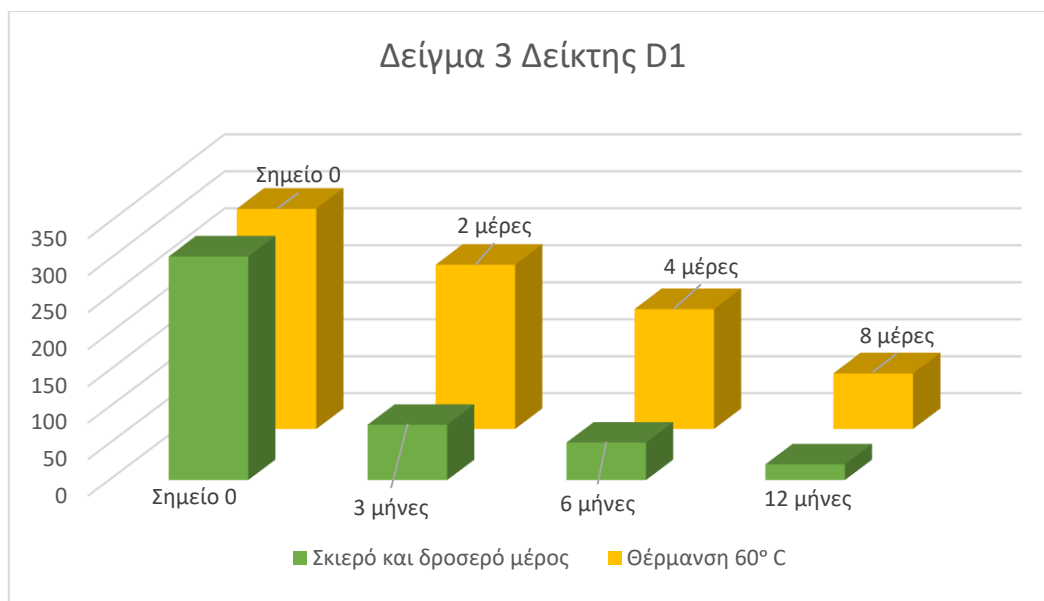
- “Ευπαθές” δείγμα

Το συγκεκριμένο δείγμα ελαιολάδου εμφάνισε μία άμεση μείωση της περιεκτικότητας από το 1^ο τρίμηνο της 18μηνης μελέτης, σε ποσοστό της τάξης του 51%. Ο χαρακτηρισμός του δικαιολογείται πλήρως από την σχεδόν ολοκληρωτική αποδόμηση των φαινολικών συστατικών ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη (σε ποσοστό 95,1%) σε 12 μήνες από την αποθήκευσή του για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας. Το αποτέλεσμα από την εφαρμογή του μοντέλου πρόβλεψης έρχεται να επιβεβαιώσει αυτόν τον χαρακτηρισμό. Κατά την αποθήκευσή του στους 60^ο C, το δείγμα ANTK3, μέσα σε 8 ημέρες έχασε το 77% του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, ή αλλιώς του δείκτη D1. (διάγραμμα 5.1)



Διάγραμμα 5.1 Μεταβολή στην περιεκτικότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης κατά τη θέρμανση στους 60° C

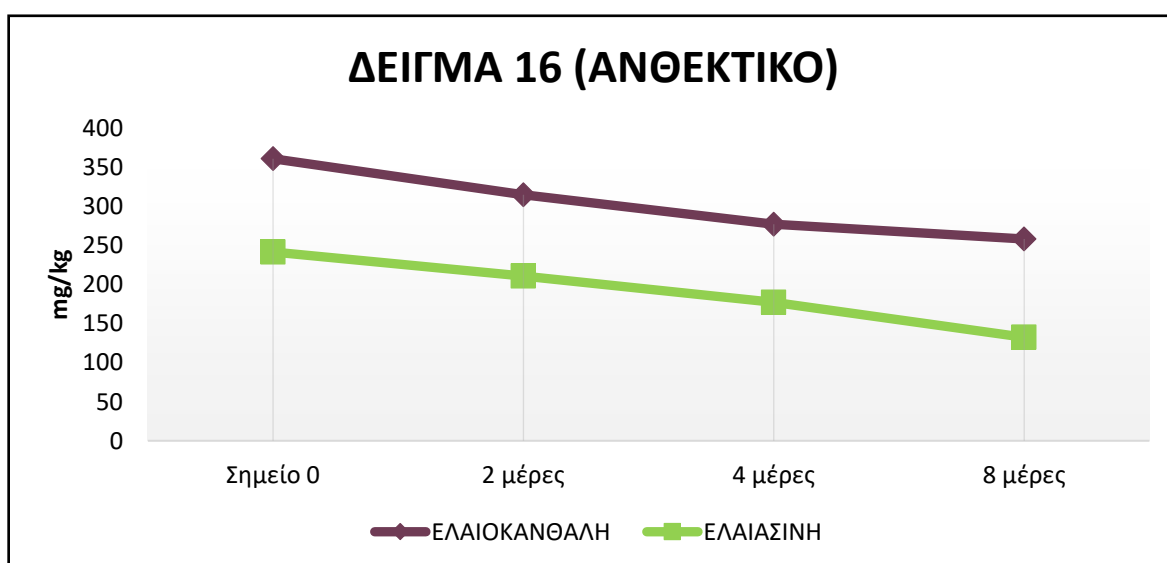
Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στο ρυθμό αποδόμησης των ουσιών που μετρήθηκαν κατά την πρώτη φάση της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, ενώ κατά την αποθήκευσή του σε θερμοκρασία δωματίου παρουσιάστηκε μία πτώση της τάξης του 51%, δύο μέρες με ήπια θέρμανση οδήγησαν στην μείωση του δείκτη D1 μόνο κατά 25%. Στη συνέχεια όμως, η πορεία αποδόμησης των συστατικών ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης ακολουθεί τον ίδιο ρυθμό και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. (διάγραμμα 5.2)



Διάγραμμα 5.2 Σύγκριση του ρυθμού μείωσης του δείκτη D1 για το δείγμα 3, στους 20° C για 12 μήνες και στους 60° C για 8 ημέρες

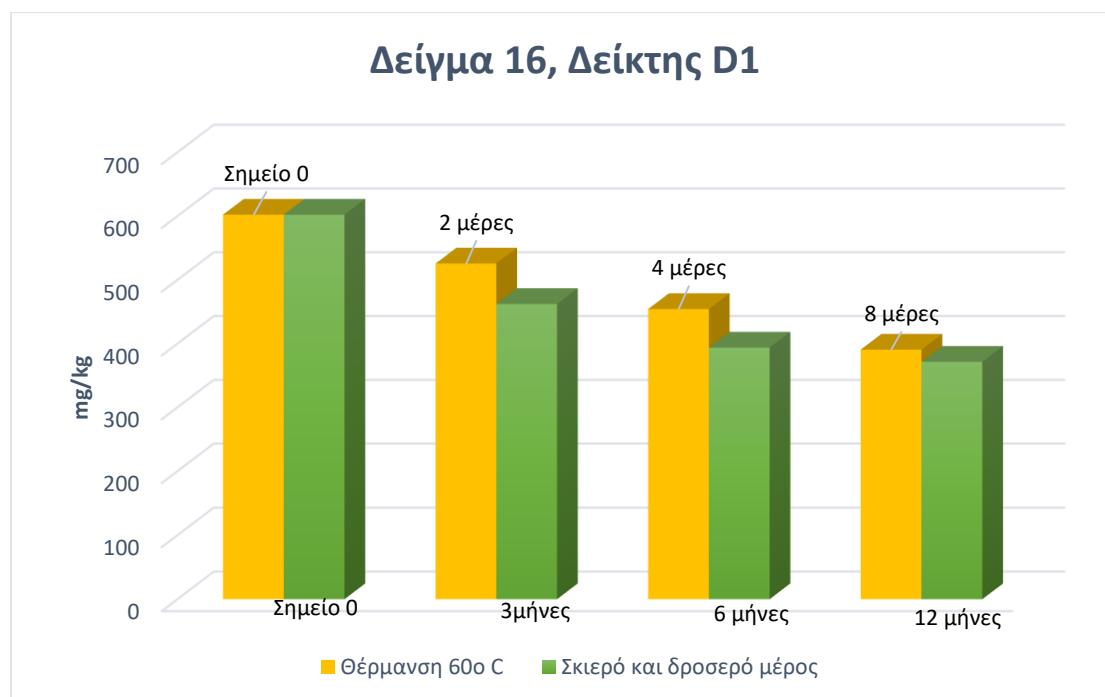
- “Ανθεκτικό” δείγμα

Αντίθετα με το “ευπαθές” δείγμα ελαιολάδου το 2° δείγμα που επελέχθη για το μοντέλο πρόβλεψης έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα κατά τη 18μηνι αποθήκευσή του σε δροσερό και σκιερό μέρος. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο τρίμηνο της μελέτης, στο συγκεκριμένο δείγμα παρατηρήθηκε μία μείωση της τάξης του 15% στο άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, ενώ στο τέλος της μελέτης ο δείκτης D1 μειώθηκε μόνο κατά 33,1%. Η ίδια ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε και κατά τη θέρμανση στους 60° C για 8 ημέρες (διάγραμμα 5.3)



Διάγραμμα 5.3 Μεταβολή στην περιεκτικότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης κατά τη θέρμανση του δείγματος 16 στους 60° C

Σε αντίθεση με το προηγούμενο δείγμα που θερμάνθηκε για 8 ημέρες, το ANTK16 είχε ακριβώς τον ίδιο ρυθμό αποδόμησης σε όλα τα στάδια της θερμικής δοκιμασίας, σε σχέση με την αποθήκευσή τους σε σκιερό και δροσερό μέρος. (διάγραμμα 5.4)



Διάγραμμα 5.4 Σύγκριση του ρυθμού μείωσης του δείκτη D1 για το δείγμα 16, στους 20° C για 12 μήνες και στους 60° C για 8 ημέρες

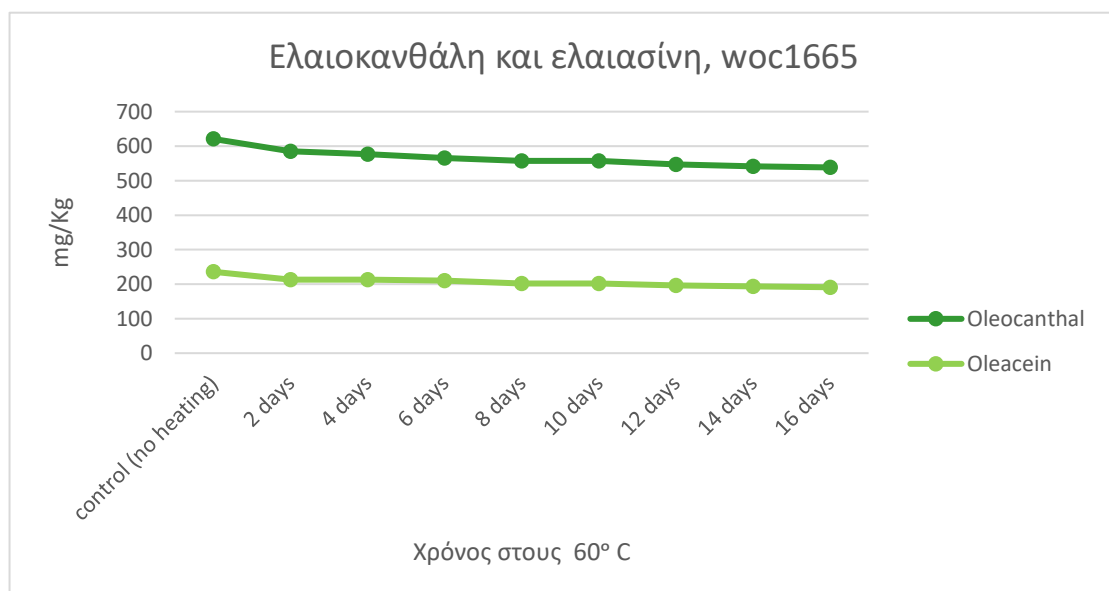
Οι χαρακτηρισμοί «ευπαθές» και «ανθεκτικό» δείγμα επιβεβαιώνονται και από την εφαρμογή της θερμικής καταπόνησης σε δύο τυχαία δείγματα από τον σημαντικό αριθμό δειγμάτων που έχουν αναλυθεί στο εργαστήριο. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι πανομοιότυπη με αυτήν που εφαρμόστηκε στα δείγματα ANTK3 και ANTK16, μόνο που αυτή τη φορά τα δείγματα ήταν ελαιόλαδα παραγωγής της ίδιας χρονιάς και όχι αποθηκευμένα σε ειδικές συνθήκες.

- *Ανθεκτικό φρέσκο λάδι.* (διάγραμμα 5.5)

Το δείγμα woc1665 είναι ένα ελαιόλαδο το οποίο αναλύθηκε από το εργαστήριό μας ώστε να προσδιοριστεί η περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά. Μετά την ανάλυσή του, από την οποία φάνηκε πως είναι πλούσιο στις υπό εξέταση φαινόλες, το ελαιόλαδο αποθηκεύτηκε στους 60° C σε γυάλινα φιαλίδια που περιείχαν αρκετή ποσότητα μόνο για μία εφαρμογή του πρωτοκόλλου των Karkoula *et al.* Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα και καθιστούν σαφές από τις πρώτες κιόλας αναλύσεις πως οι μεταβολές στον δείκτη D1 είναι ουσιαστικά αμελητέες. Γι αυτόν ακριβώς το λόγο, η θερμική καταπόνηση εφαρμόστηκε για διπλάσιο χρόνο σε σχέση με τα δείγματα ANTK3 και ANTK16, δηλαδή για 16 ημέρες αντί για 8. Το αποτέλεσμα όμως δεν μεταβλήθηκε στην πορεία.

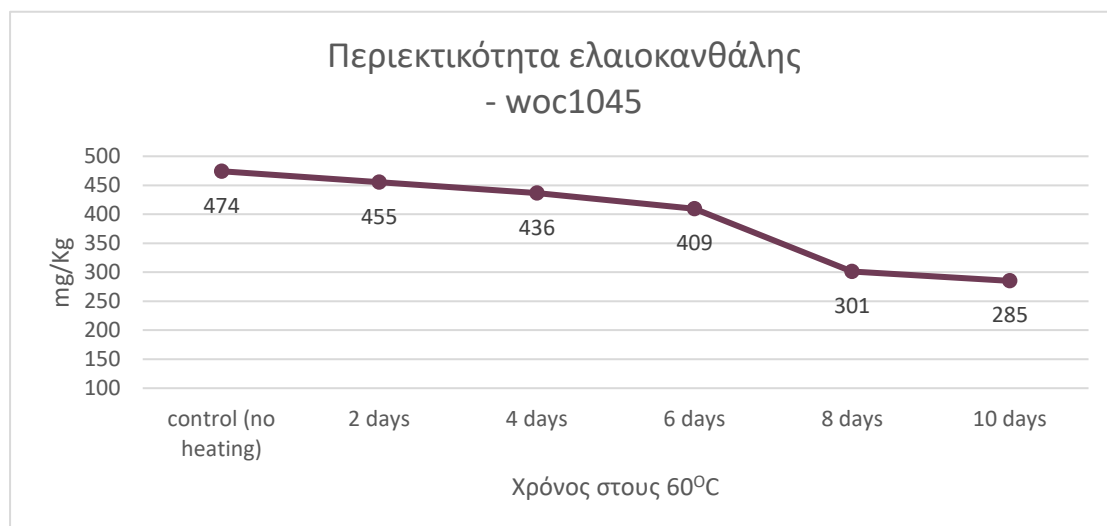
- Ευπαθές φρέσκο λάδι (διάγραμμα 5.6)

Το δείγμα woc1045 είναι ένα ελαιόλαδο που από τα φαινολικά συστατικά που εξετάζονται περιείχε μόνο ελαιοκανθάλη. Όπως και στην περίπτωση του woc1665, το δείγμα αναλύθηκε από το εργαστήριό μας για τον προσδιορισμό του φαινολικού προφίλ του και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε σταθερή θερμοκρασία 60° C για 10 ημέρες. Αντίθετα με το προηγούμενο δείγμα, το woc1045 παρουσίασε από τις πρώτες μέρες της μελέτης μία πτωτική πορεία σε σχέση με την περιεκτικότητα της ελαιοκανθάλης. Πιο συγκεκριμένα, μέσα σε 10 μέρες ήπιας θέρμανσης στους 60°C, από τα 474mg/Kg ελαιοκανθάλης που περιείχε το δείγμα woc1045 διατηρήθηκαν μόνο τα 285mg/Kg, παρουσιάστηκε δηλαδή μία αποδόμηση του 40% της αρχικής ουσίας.



Διάγραμμα 5.5 Μεταβολή στην περιεκτικότητα ελαιοκανθάλης και ελαιαίνης κατά τη θέρμανση στους 60° C

Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από τα δείγματα που υποβλήθηκαν στην δοκιμασία αυτή είναι πως η θέρμανση ενός ελαιολάδου στους 60° C για διάστημα έως 16 ημέρες, μπορεί να μιμηθεί τις μεταβολές στην περιεκτικότητά του σε φαινόλες σε διάστημα αποθήκευσης 18 μηνών, στους 20° C.



Διάγραμμα 5.6 Μεταβολή στην περιεκτικότητα ελαιοκανθάλης
κατά τη θέρμανση στους 60° C

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στη βιβλιογραφία ήδη από το 2005 γίνεται αναφορά σε προϊόντα οξείδωσης των σεκοϊριδοειδών ενώσεων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι Rios et al., το 2005 [92] εφάρμοσαν σε δείγμα ελαιολάδου τη μέθοδο Rancimat και στη συνέχεια προχώρησαν σε εκχύλισή του και απομόνωση (μεταξύ άλλων) των προϊόντων οξείδωσης των σεκοϊριδοειδών που μελετώνται και στην παρούσα εργασία, χωρίς όμως να αποδίσουν συγκεκριμένη δομή. Τα ίδια προϊόντα οξείδωσης περιγράφονται και από τις Kotsiou et al., [91], όπου αναφέρεται η παρατήρησή τους και σε ελαιόλαδα που είχαν υποβληθεί σε επιταχυνόμενη οξείδωση, αλλά και σε δείγματα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία γύρω στους 20° C για 15 μήνες. Στην παρούσα εργασία έγινε απομόνωση και περιγραφή της δομής του ελαιοκανθαλικού οξέος, του προϊόντος οξείδωσης της ελαιοκανθάλης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το δείγμα woc1045 που χρησιμοποιήθηκε κατά την εφαρμογή του μοντέλου πρόβλεψης που αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι ένα ελαιόλαδο που περιέχει μόνο ελαιοκανθάλη, από τα σεκοϊριδοειδή που συμπεριλαμβάνονται στον ισχυρισμό υγείας. Με το πέρας της θερμικής δοκιμασίας εμφανίστηκε στην αλδεϋδικη περιοχή του φάσματος ¹H-NMR του δείγματος, ένα ακόμα αλδεϋδικό πρωτόνιο, με χημική μετατόπιση 9.25 ppm. Το ίδιο σήμα έχει παρατηρηθεί και σε δείγματα της παρούσας μελέτης, με αυξανόμενη συγκέντρωση κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία δωματίου στο εργαστήριο.

Εκχύλιση του ελαιολάδου

Η εκχύλιση του δείγματος ελαιολάδου woc1045 έγινε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριό μας [110]. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο 100g ελαιολάδου διαλύθηκαν σε 400ml κυκλοεξάνιο (cHex). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη 1L και αναδεύτηκε για 1 min. Στην συνέχεια προστέθηκε ποσότητα ακετονιτριλίου (ACN) 500ml και το μίγμα αναδεύτηκε εκ νέου για 1 min. Στην συνέχεια το μίγμα μοιράστηκε σε δόσεις των 50 ml και με την βοήθεια συσκευής φυγόκεντρου, η οποία λειτουργούσε για 5 min στις 4000 rpm, διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις. Ακολούθησε παραλαβή της ακετονιτριλικής φάσης και εξάτμιση μέχρι ξηρού στους 40° C με την βοήθεια συσκευής απόσταξης rotary evaporator.

Με την μέθοδο της υγρής-υγρής εκχύλισης επετεύχθη η απομάκρυνση μεγάλου μέρους άπολων ενώσεων από το ελαιόλαδο και κυρίως ενώσεων όπως τα γλυκερίδια

των λιπαρών οξέων. Είναι όμως πρακτικά αδύνατο να φτάσουμε σε ένα τελικό εκχύλισμα στο οποίο θα απουσιάζουν παντελώς οι ενώσεις αυτές. Για αυτό το λόγο εφαρμόστηκε και χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος, βάρους 116 mg. Η έκλυση της στήλης με την κινητή φάση έγινε με το σύστημα που καταγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 6.1

Κλάσμα	cHex	EtOAc
1-20	95	5
21-40	90	10
41-60	80	20
61-100	70	30
101-125	60	40
126-140	50	50

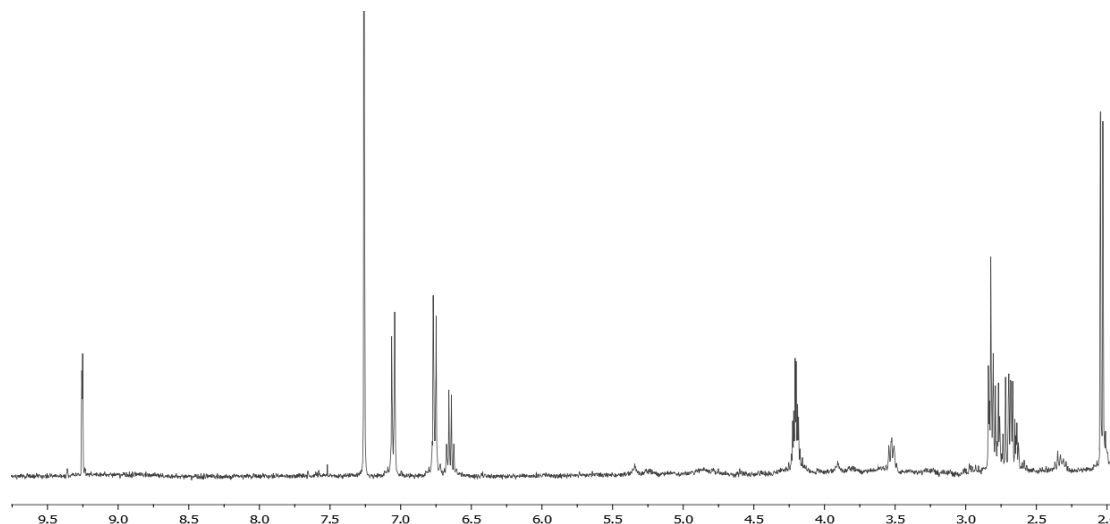
Πίνακας 6.1 Κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε στη χρωματογραφία στήλης

Ελήφθησαν 140 κλάσματα των 12 mL κατά μέσο όρο. Από τα κλάσματα 82-125 απομονώθηκαν 25 mg καθαρής ουσίας. Ακολούθησε η ανίχνευση της υπό εξέταση ουσίας της με φάσμα H^1 -NMR, με διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$).

Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων $1H$ -NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ με πρότυπη ουσία αναφοράς το $CHCl_3$ (δ 7.26). Η διόρθωση της φάσης του φάσματος καθώς και οι ολοκληρώσεις εμβαδού στην κάθε κορυφή πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MestRenova.

Στη συνέχεια η ουσία μελετήθηκε εκτενέστατα με φάσματα NMR δύο διαστάσεων (COSY και HMBC), καθώς και με LC-MS, όπου προσδιορίστηκε το MB της.

Τα χαρακτηριστικά σήματα του μορίου που περιγράφεται στην παρούσα εργασία στο φάσμα ^1H – NMR εμφανίζονται στην εικόνα 6.1.

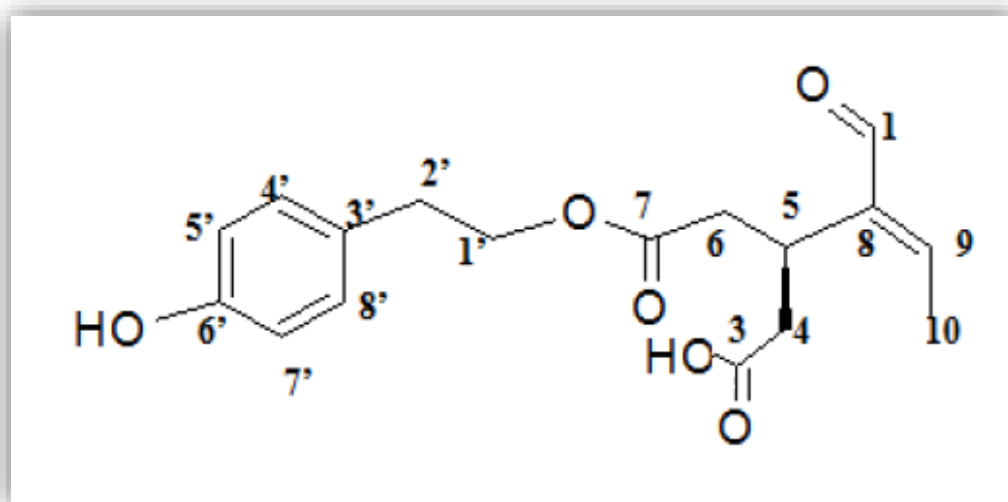


Εικόνα 6.1 Φάσμα ^1H -NMR του ελαιοκανθαλικού οξέος

Στο φάσμα ^1H -NMR παρατηρήθηκαν οι εξής κορυφές:

- Μία διπλή κορυφή στα 9.25 ppm που ολοκληρώνει για ένα H, και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ($J_{1-5}=1.9$ Hz).
- Μία διπλή κορυφή στα 7.05 ppm που ολοκληρώνει για δύο H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 4' και 8'. Εμφανίζουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 5' και 7' του αρωματικού δακτυλίου. ($J_{4'/8'-5'/7'} = 8.5$ Hz)
- Μία διπλή κορυφή στα 6.76 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια αρωματικού πυρήνα, τα πρωτόνια των θέσεων 5' και 7'. Εμφανίζουν όρθο σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 4' και 8'. ($J_{5'/7'-4'/8'} = 8.5$ Hz)
- Μία τετραπλή κορυφή στα 6.65 ppm που ολοκληρώνει για 1 H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 9. Έχει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 10. ($J_{9'-10'} = 7.1$ Hz)
- Μία πολλαπλή κορυφή στα 4.22 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 1'.
- Μία πολλαπλή κορυφή στα 3.53 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5.

- Μία τριπλή κορυφή στα 2.82 ppm που ολοκληρώνει για 2 H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 2'. Εμφανίζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 1' ($J_{2'-1'} = 6.9$ Hz)
- Μία διπλή κορυφή στα 2.04 ppm που ολοκληρώνει για 3 H και αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 10. Εμφανίζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 9 ($J_{10'-9'} = 7.0$ Hz)
- Στα 2,82 ppm και 2,76 ppm εμφανίζονται δυο διπλές- διπλές- διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια, και αντιστοιχούν στα H-4a ($J_{4a-b}=18.4$ Hz, $J_{4a-5}= 8.5$ Hz, $J_{4a-3} =1.0$ Hz) και 4b ($J_{4b-a} =18.4$ Hz, $J_{4b-5}= 5.5$ Hz, $J_{4b-3}=2.4$ Hz).
- Στα 2,65 ppm έχουμε την πολλαπλή κορυφή του H- 6a, η οποία ολοκληρώνει για 1 H, ενώ η πολλαπλή κορυφή του H-6b είναι στα 2,70 ppm



Εικόνα 6.3 Δομή ελαιοκανθαλικού οξέος

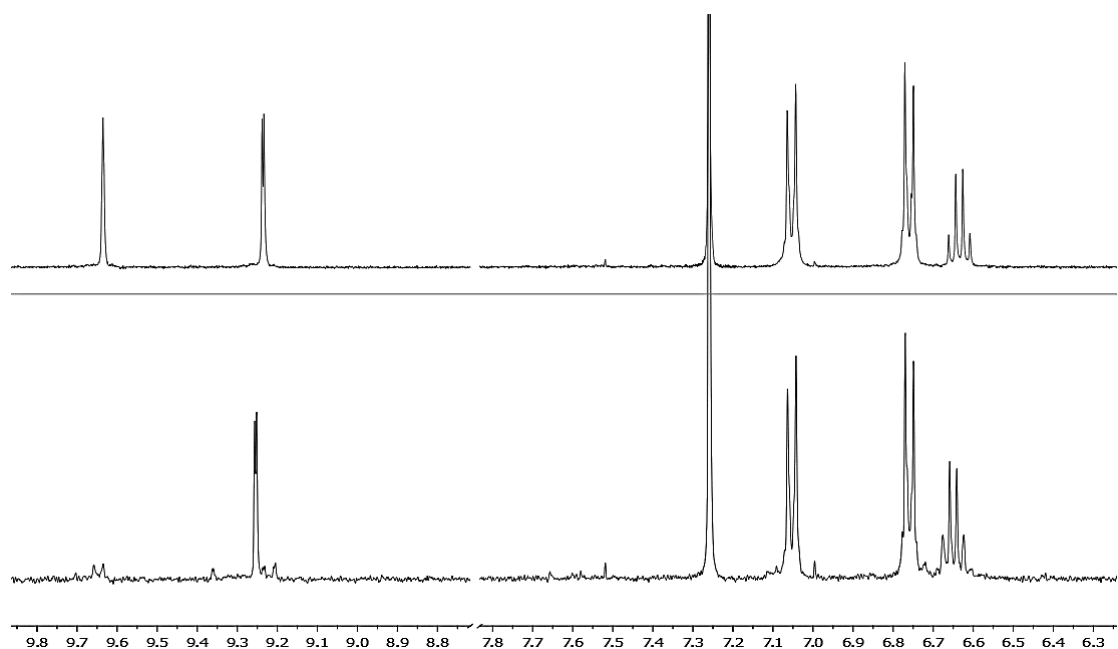
	Oleocanthal $^1\text{H-NMR}$ (δ , ppm, J Hz)	Oleocanthalic acid 1 mg (δ , ppm, J Hz)	Oleocanthalic acid 10 mg (δ , ppm, J Hz)
1	9.23, (1H,d, $J= 2.0$ Hz)	9.25 (1H, d, $J= 1.9$ Hz)	9.22 (1H, d, $J= 1.9$ Hz)
3	9.64, (1H, brs)	-	-
4a	2.99 (1H, ddd, $J=18.4$ Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)	2.82 (1H, ddd, $J=18.4$ Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)	2.75 (1H, ddd, $J=18.4$ Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)
4b	2.74 (1H, ddd, $J= 18.4$ Hz, 5.5 Hz, 2.4 Hz)	2.76 (1H, ddd, $J=18.4$ Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)	2.60 (1H, ddd, $J=18.4$ Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)
5	3.62 (1H, m)	3.53 (1H, m)	3.50 (1H, m)
6a	2.66 (1H, m)	2.65 (1H, m)	2.64 (1H, m)
6b	2.66 (1H, m)	2.71 (1H, m)	2.71 (1H, m)
9	6.63 (1H, q, $J= 7.1$ Hz)	6.63 (1H, q, $J=7.1$)	6.63 (1H, q, $J=7.1$)

10	2.08 (3H, d, J= 7.1 Hz)	2.08 (3H, d, J=7.1)	2.08 (3H, d, J=7.1)
1'	4.22 (2H, m*)	4.22 (2H, m*)	4.20 (2H, m*)
2'	2.83 (2H, t, J= 6.8 Hz)	2.83 (1H, t, J=6.9 Hz)	2.81 (1H, t, J=6,9 Hz)
4',8'	7.05 (2H, d, J=8.5 Hz)	7.05 (2H, d, J= 8.6 Hz)	7.03 (2H, d, J= 8.6 Hz)
5',7'	6.77 (2H, d, J=8.5 Hz)	6.77 (2H, d, J= 8.6 Hz)	6.75 (2H, d, J= 8.6 Hz)

Πίνακας 6.2 Χημικές μετατοπίσεις σε φάσμα ^1H -NMR των πρωτονίων ελαιοκανθάλης και ελαιοκανθαλικού οξέος

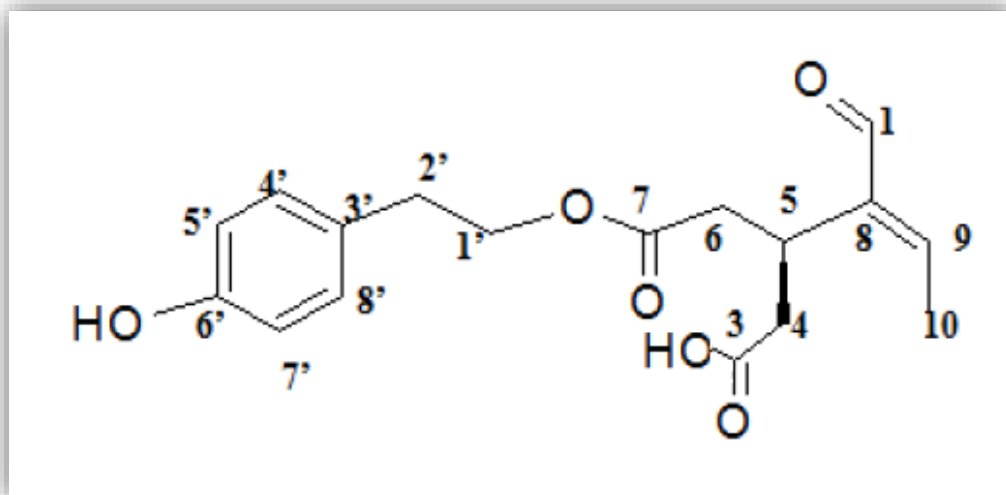
Στον πίνακα 6.2 συνοψίζονται τα σήματα στο φάσμα ^1H -NMR του ελαιοκανθαλικού οξέος. Αν και οι διαφορές είναι μικρές, για λόγους ακριβείας παρατίθενται τα σήματα από φάσμα αραιού διαλύματος της ουσίας (10 mg/600μL CDCl_3) και πυκνού διαλύματος (10 mg/600μL CDCl_3), καθώς η χημική μετατόπιση των σημάτων επηρεάζεται από την πυκνότητα του δείγματος. Τα φάσματα δύο διαστάσεων ελήφθησαν χρησιμοποιώντας το πυκνό διάλυμα της ουσίας.

Συγκρίνοντας τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της ελαιοκανθάλης και του ελαιοκανθαλικού οξέος (πίνακας 6.1), παρατηρούμε μικροαποκλίσεις. Η κυριότερη διαφορά όμως μεταξύ των μορίων έγκειται στο πρωτόνιο του άνθρακα C-3 της ελαιοκανθάλης, του οποίου το σήμα απουσιάζει από το φάσμα του ελαιοκανθαλικού οξέος (εικόνα 6.2).



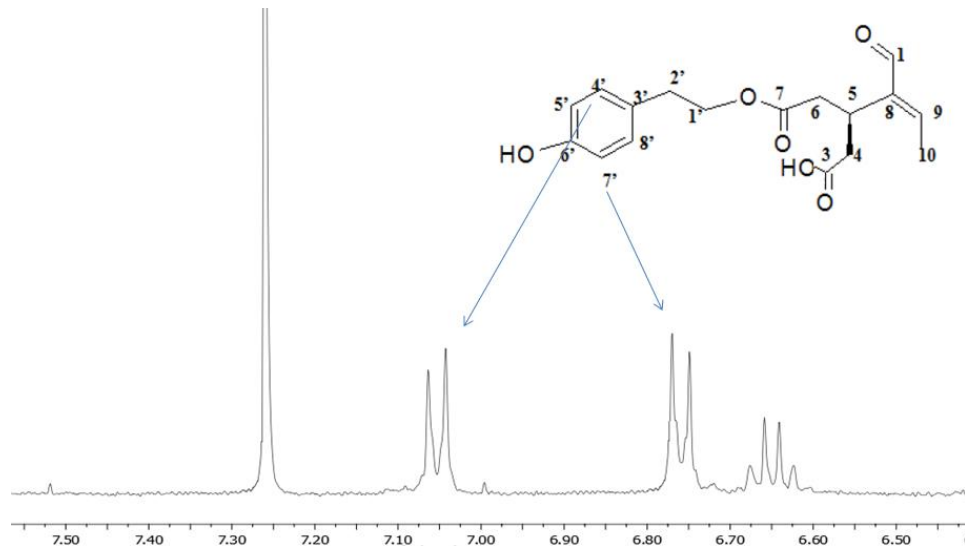
Εικόνα 6.2 Σύγκριση φασμάτων ^1H -NMR της ελαιοκανθάλης (πάνω) και του ελαιοκανθαλικού οξέος (κάτω). Απεικονίζονται η αλδεϋδική και η αρωματική περιοχή.

Προτείνεται λοιπόν η δομή που φαίνεται στην εικόνα 6.3, με τα πειραματικά δεδομένα από φάσματα ^1H -NMR δύο διαστάσεων (COSY και HMBC), να επαληθεύουν τις συσχετίσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων και ανθράκων (εικόνες).

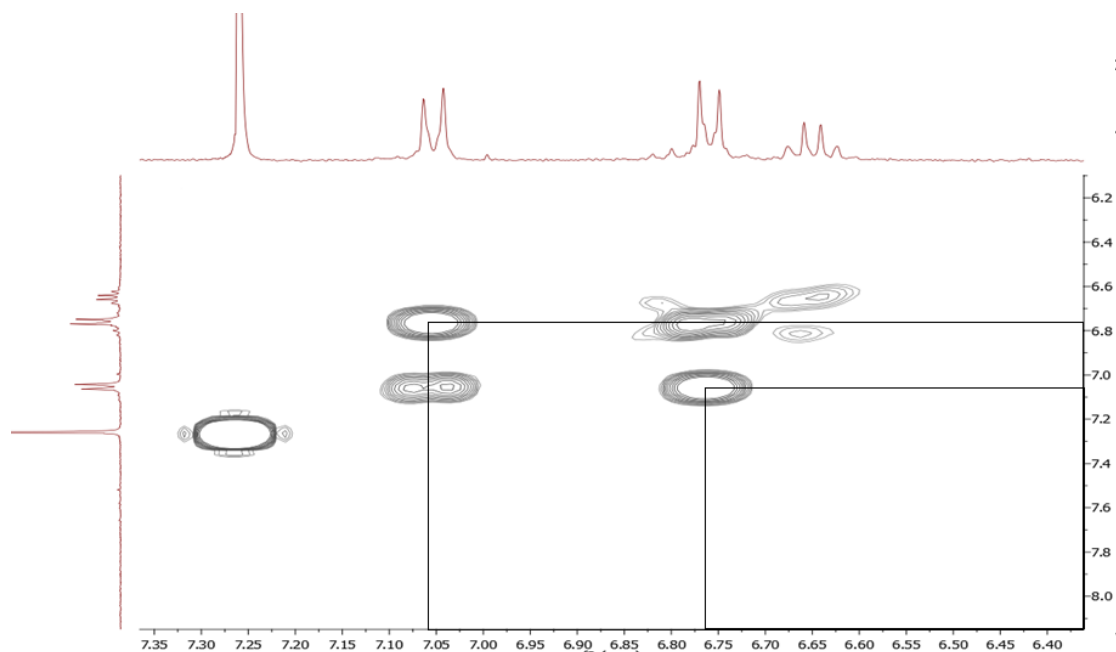


Εικόνα 6.3 Δομή ελαιοκανθαλικού οξέος

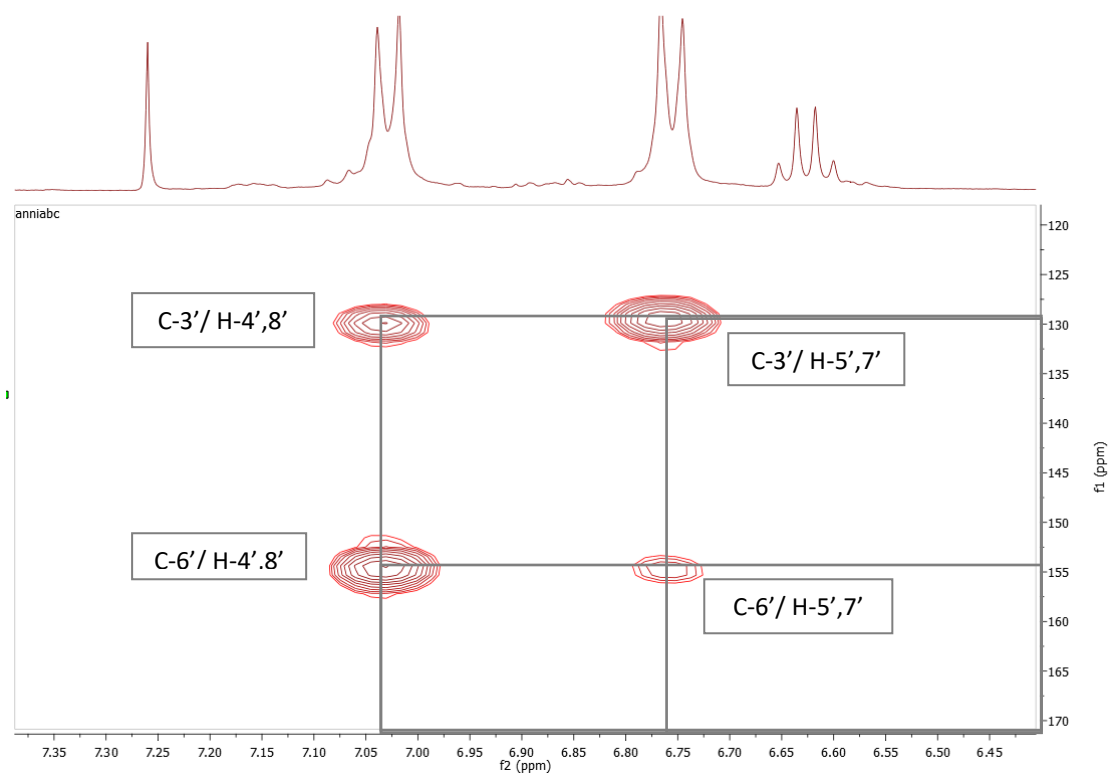
Από τον αρωματικό δακτύλιο διακρίνουμε στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ τα πρωτόνια H-4' - H-8' , τα οποία ως πρωτόνια με ίδιο χημικό περιβάλλον, είναι ισοδύναμα και δίνουν το ίδιο σήμα. Αντίστοιχα, τα πρωτόνια H-5' και H-7' , τα οποία μάλιστα όντας δίπλα σε $-\text{OH}$ είναι και πιο αποθωρακισμένα (εικόνα 6.4). Ως γειτονικά πρωτόνια, τα παραπάνω εμφανίζουν και συσχέτιση μεταξύ τους σε φάσμα δύο διαστάσεων COSY (εικόνα 6.5).



Εικόνα 6.4 Αντιστοίχιση των πρωτονίων H-5' , H-7' και H-4' , H-8' με τα σήματά τους στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ελαιοκανθαλικού οξέος.



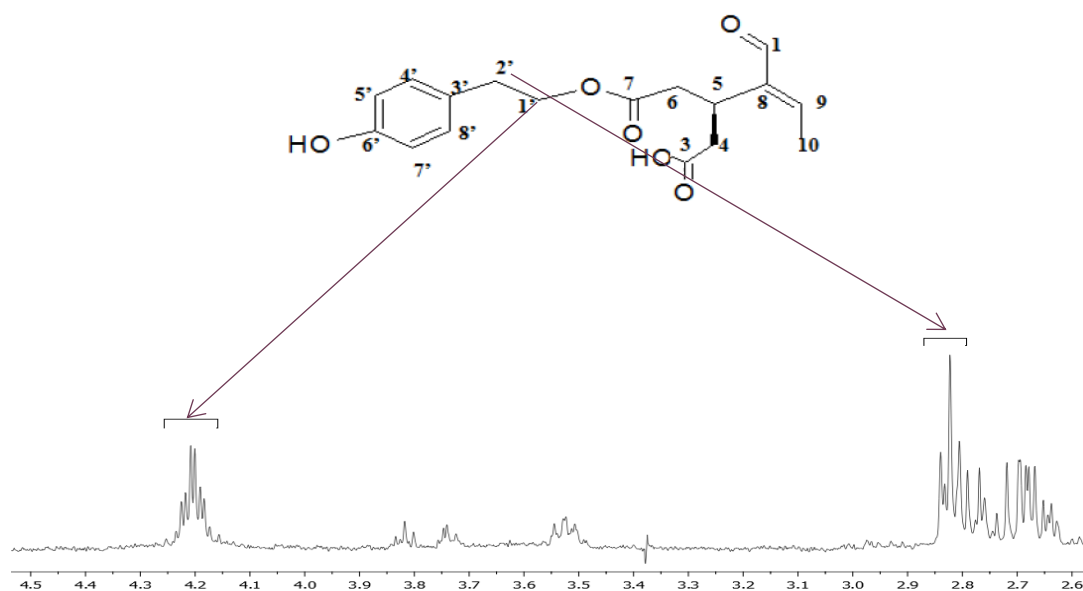
Εικόνα 6.5 Συσχέτιση των πρωτονίων H-5', H-7' με τα H-4', H-8' σε φάσμα COSY του ελαιοκανθαλικού οξέος.



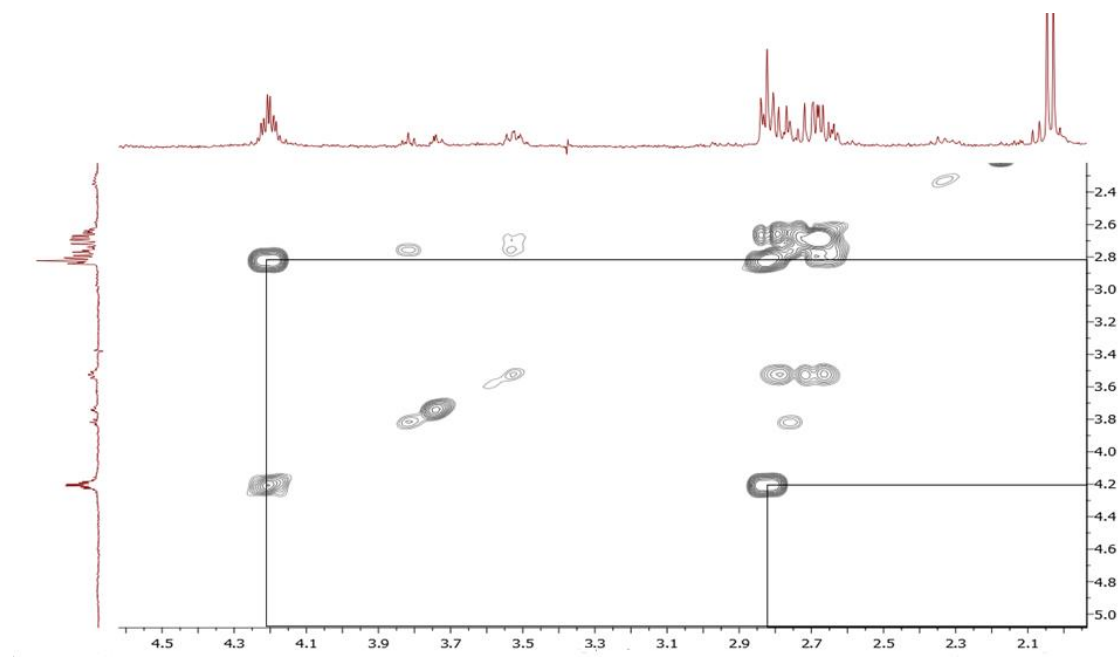
Εικόνα 6.6 Συσχέτιση των ανθράκων C-3', C-6' με τα ισοδύναμα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου σε φάσμα δύο διαστάσεων HMBC.

Επιπλέον, από φάσμα δύο διαστάσεων HMBC, εντοπίστηκε και το σήμα της συσχέτισης του άνθρακα C-3' με τα πρωτόνια H-4', H-8' και H-5', H-7' (εικόνα 6.6). Στην ίδια εικόνα εντοπίζεται και η συσχέτιση του άνθρακα της θέσης C-6 με τα πρωτόνια H-4', H-8' και H-5', H-7'.

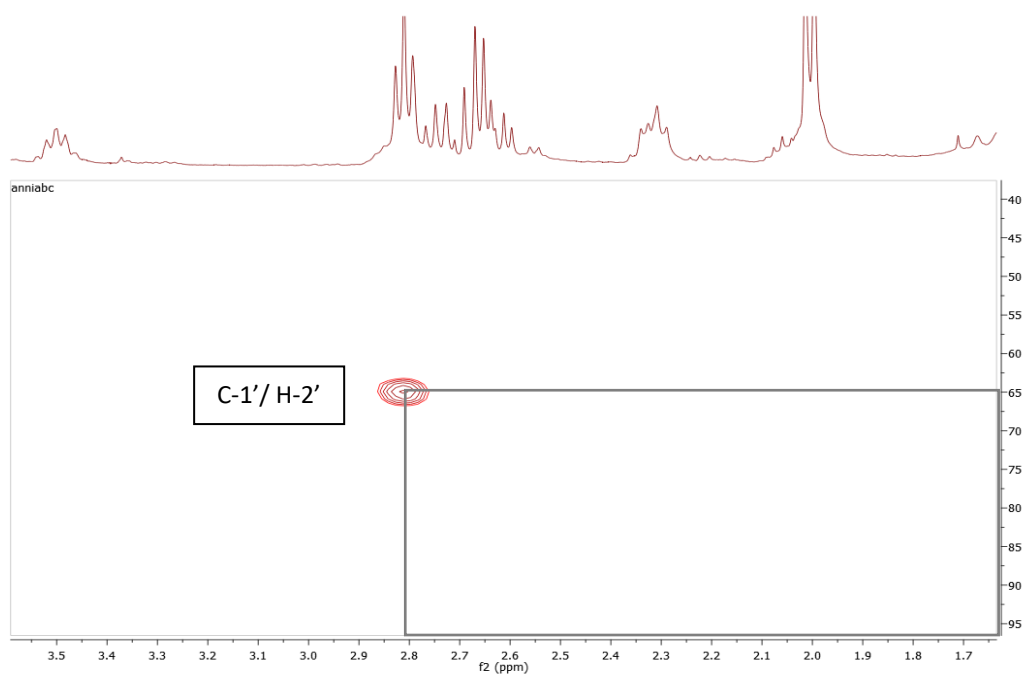
Στη συνέχεια απεικονίζονται τα σήματα των πρωτονίων της θέσης H-2', που εντοπίζονται ως μία τριπλή κορυφή, καθώς εμφανίζουν συσχέτιση με τα πρωτόνια της θέσης H-1' (εικόνα 6.8). Επίσης απεικονίζονται τα σήματα των πρωτονίων της θέσης H-1', που ως γειτονικά σε -O- είναι πιο αποθωρακισμένα (εικόνα 6.7). Επιπλέον, στο φάσμα δύο διαστάσεων HMBC ο άνθρακας της θέσης C-2' εμφανίζει μία συσχέτιση με τα πρωτόνια H-4'/8' (εικόνα 6.10) και ο άνθρακας της θέσης C-1' με τα πρωτόνια της θέσης H-2' (εικόνα 6.9).



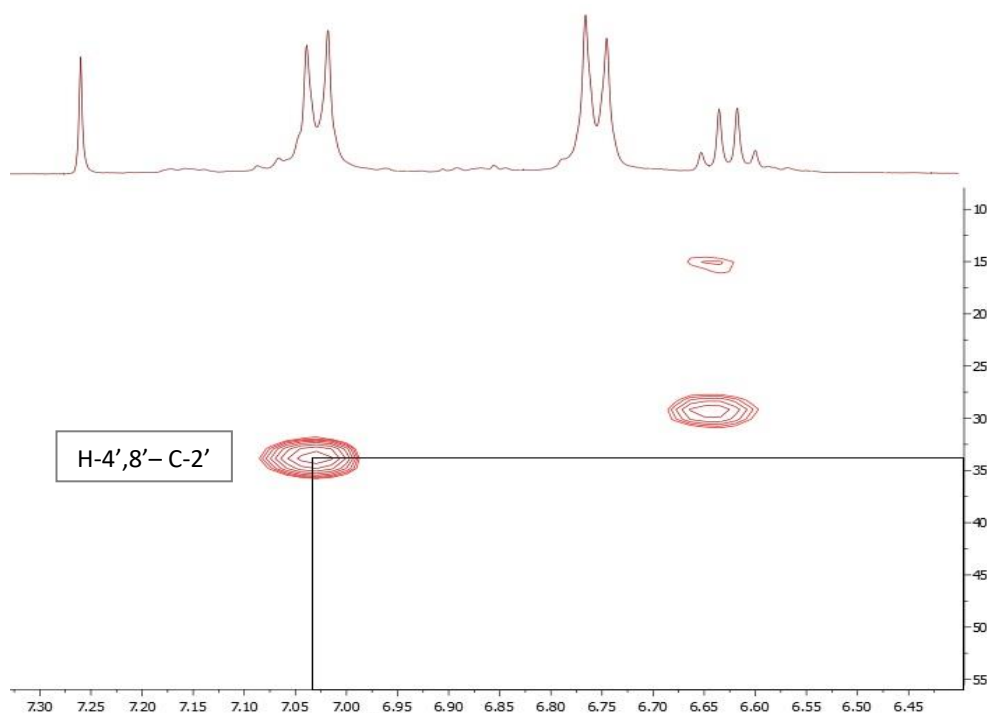
Εικόνα 6.7 Αντιστοίχιση των πρωτονίων H-1' και H-2' με τα σήματά τους στο φάσμα ^1H -NMR του ελαιοκανθαλικού οξέος



Εικόνα 6.8 Συσχέτιση των πρωτονίων H-1' με τα H-2' σε φάσμα COSY του ελαιοκανθαλικού οξέος.

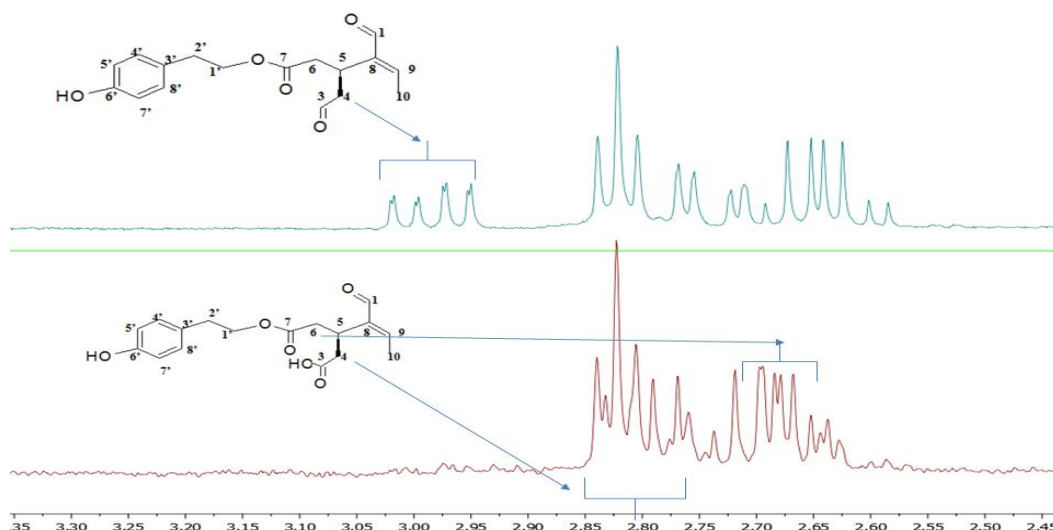


Εικόνα 6.9 Συσχέτιση του πρωτονίου της θέσης 2' με τον άνθρακα της θέσης C-1'

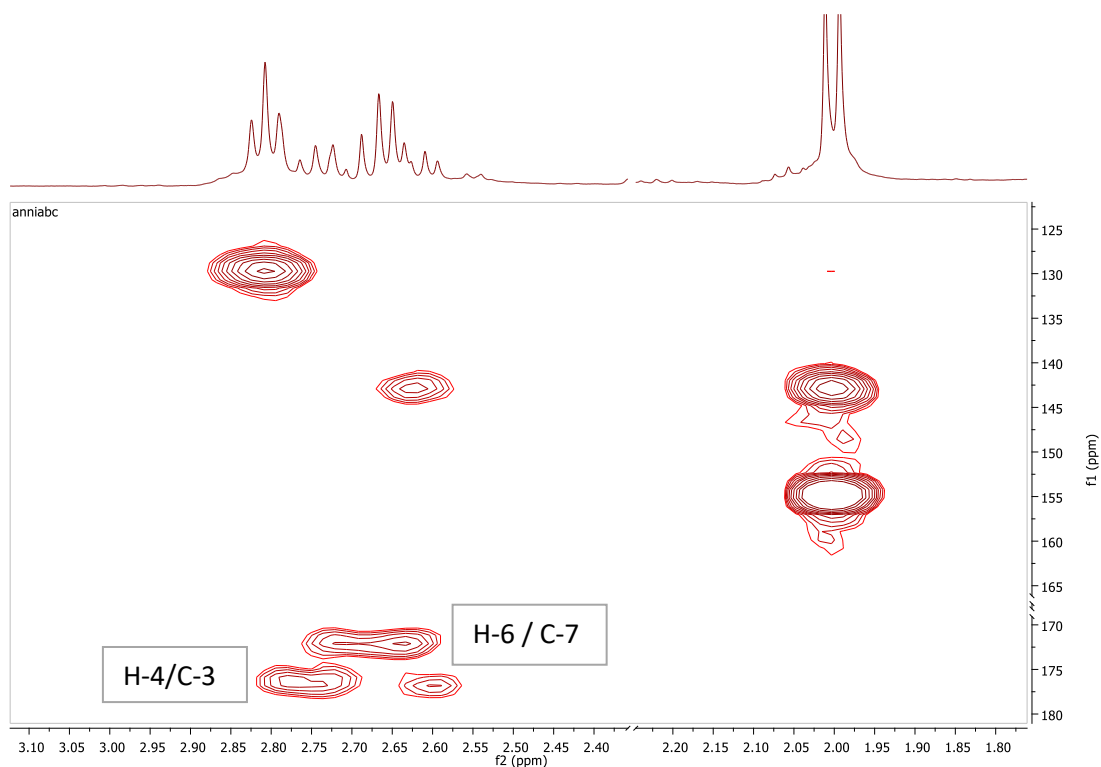


Εικόνα 6.10 Συσχέτιση των H-4',8' με τον άνθρακα C-2'.

Τα πρωτόνια της θέσης 4 στο φάσμα της ελαιοκανθάλης εμφανίζονται πιο αποθωρακισμένα σε σχέση με του ελαιοκανθαλικού οξέος, και είναι ευδιάκριτα, με χημική μετατόπιση 2.99 ppm το 4b και 2.74 ppm το 4a. Στο φάσμα του ελαιοκανθαλικού οξέος τα αντίστοιχα σήματα είναι στα 2.82 και 2.76 ppm (εικόνα 6.11). Η αντιστοίχιση αυτή επιβεβαιώνεται και από τη συσχέτιση των πρωτονίων της θέσης 4 και της θέσης 6 με τους άνθρακες, C-7 και C-3 αντίστοιχα, από το φάσμα δύο διαστάσεων HMBC. (εικόνα 6.12)

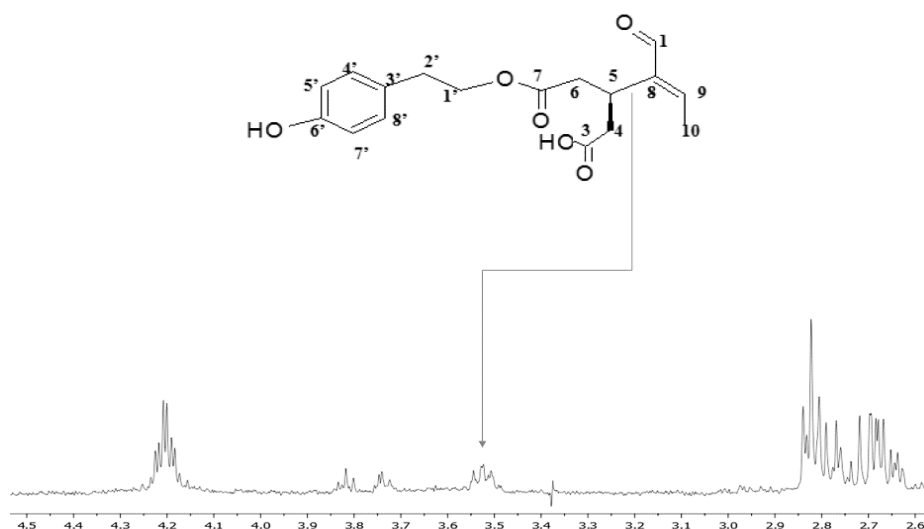


Εικόνα 6.11 Αντιστοίχιση πρωτονίων H-4 της ελαιοκανθάλης (πάνω) και πρωτονίων H-4 και H-6 του ελαιοκανθαλικού οξέος (κάτω) με τα σήματά τους στα φάσματα ^1H -NMR των καθαρών ενώσεων

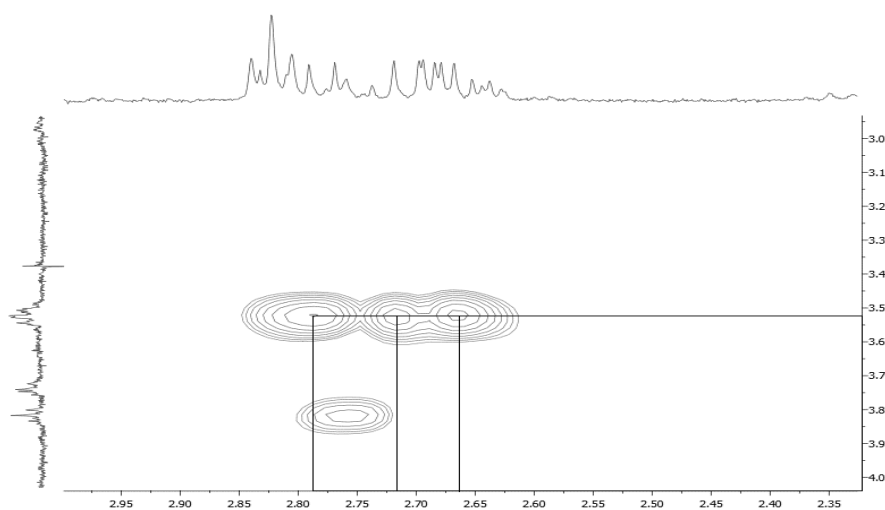


Εικόνα 6.12 Συσχέτιση των πρωτονίων H-4 και H-6 του ελαιοκανθαλικού οξέος με τους άνθρακες C-7 και C-3 σε φάσμα δύο διαστάσεων HMBC.

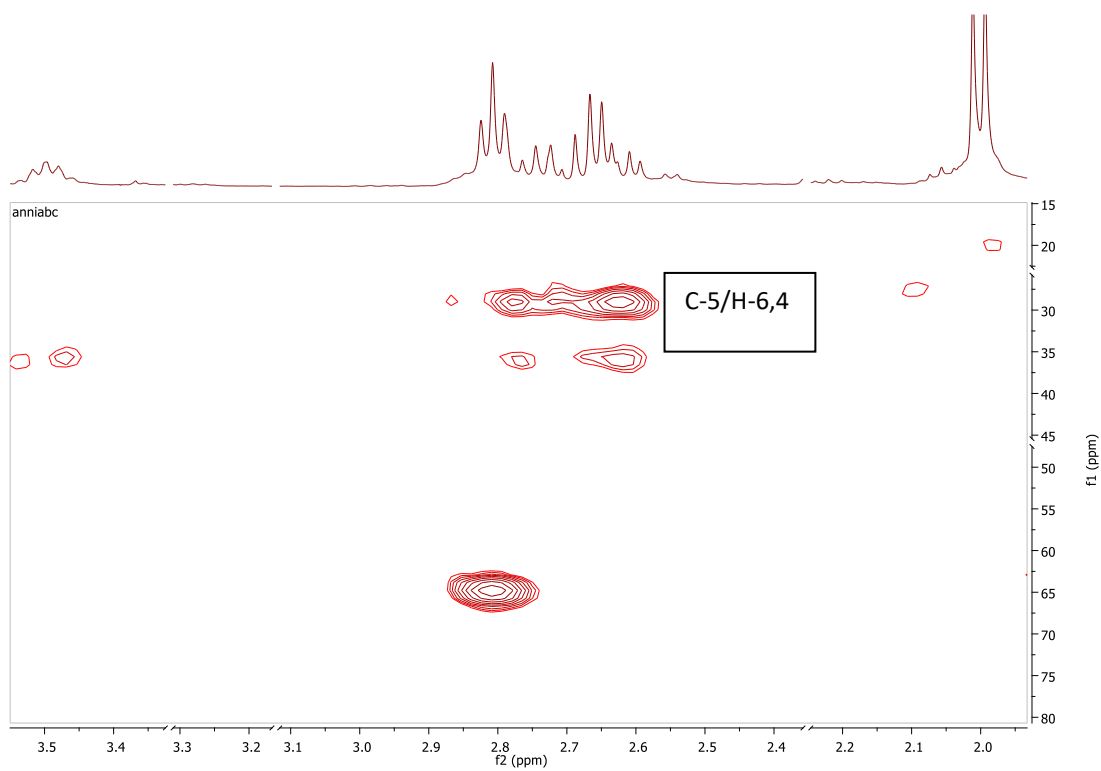
Το πρωτόνιο της θέσης 5, εμφανίζεται ως μία πολλαπλή κορυφή με χημική μετατόπιση 3.66 ppm (εικόνα 6.13). Η πολλαπλότητα οφείλεται στη συσχέτιση που παρουσιάζει με τα γειτονικά πρωτόνια της θέσης 4 και της θέσης 6, μία συσχέτιση που επαληθεύτηκε με τη χρήση φάσματός δύο διαστάσεων COSY (εικόνα 6.14). Επιπλέον, σε φάσμα δύο διαστάσεων HMBC εντοπίστηκε η συσχέτιση του άνθρακα C-5 με τα πρωτόνια H-6, όπως φαίνεται στην εικόνα 6.15.



Εικόνα 6.13 Αντιστοίχιση του πρωτονίου της θέσης 5 με το σήμα στο φάσμα ^1H -NMR του ελαιοκανθαλικού οξέος



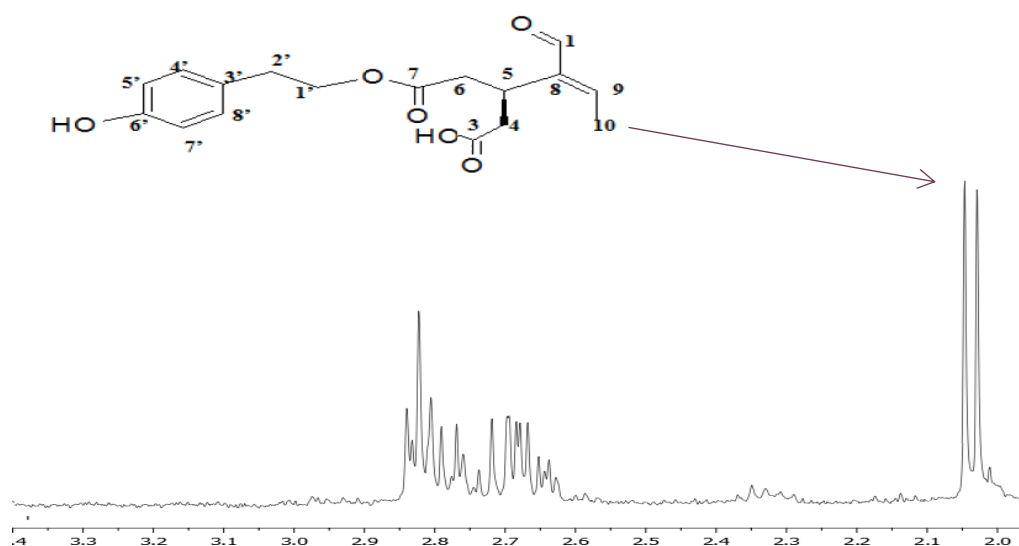
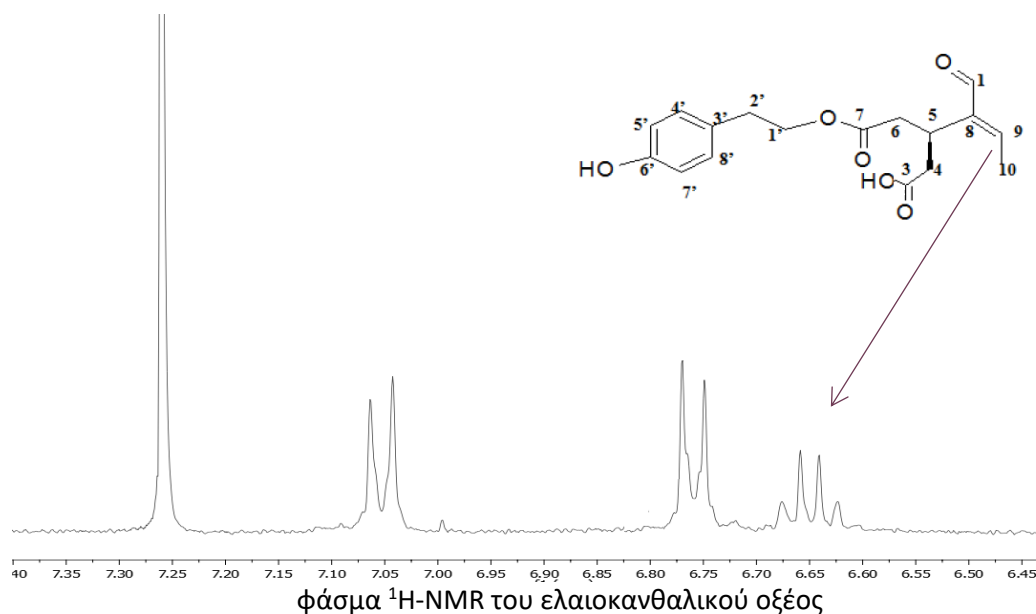
Εικόνα 6.14 Συσχέτιση των πρωτονίων H-4 και H-6 του ελαιοκανθαλικού οξέος με το πρωτόνιο της θέσης H-5 σε φάσμα δύο διαστάσεων COSY.



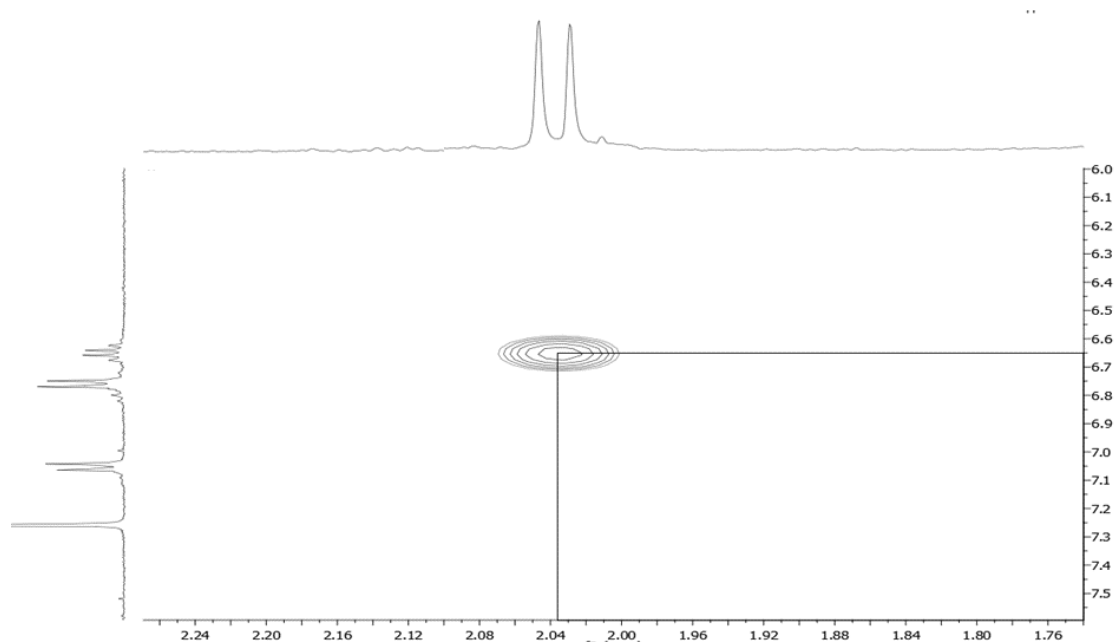
Εικόνα 6.15 Συσχέτιση των πρωτονίων της θέσης 6 και 4 με τον άνθρακα C-5

Το πρωτόνιο της θέσης H-9 του ελαιοκανθαλικού οξέος εντοπίζεται στο φάσμα ^1H -NMR ως μία πολλαπλή κορυφή στα 6.63 ppm (εικόνα 6.16) και η πολλαπλότητα της κορυφής αυτής οφείλεται στη συσχέτιση του H-9 με τα πρωτόνια του μεθυλίου που βρίσκεται στη θέση 10 (εικόνα 6.17). Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώθηκε και με φάσμα δύο διαστάσεων COSY (εικόνα 6.18). Επίσης, παρουσιάζεται στην εικόνα 6.19 η συσχέτιση των H-10 με τον C-8, και τον C-9, από φάσμα δύο διαστάσεων HMBC. Στην ίδια εικόνα εμφανίζεται και η συσχέτιση του C-8 με το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1.

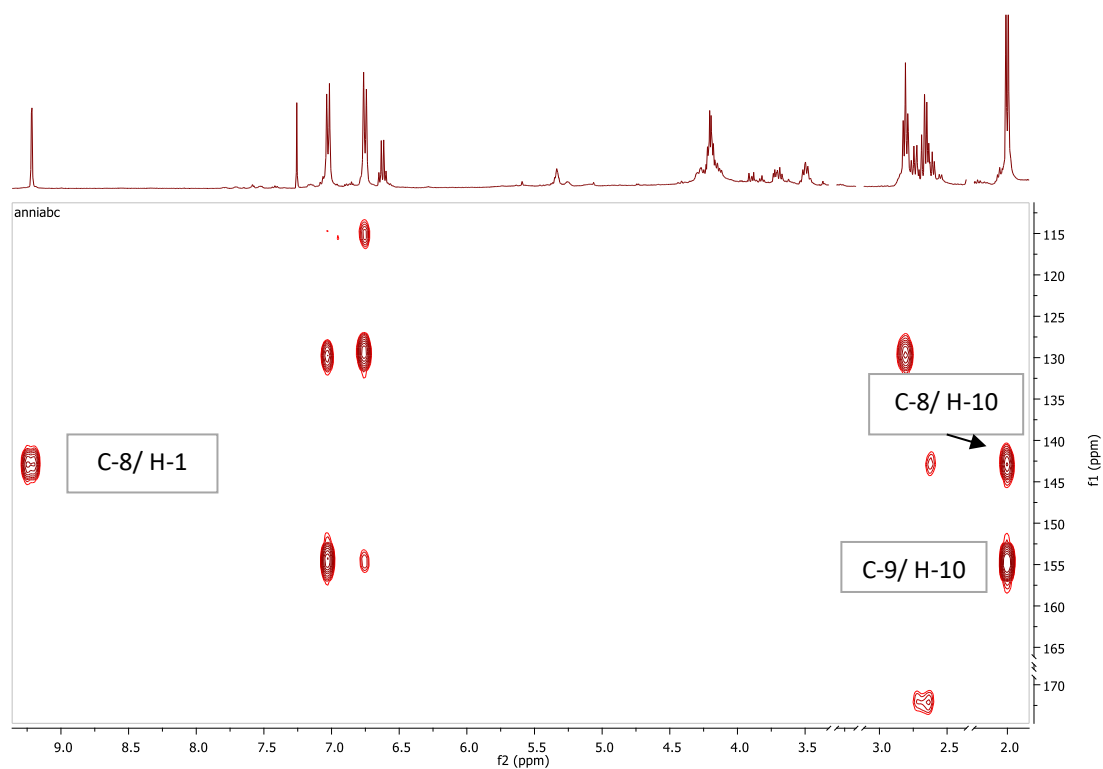
Εικόνα 6.16 Αντιστοίχιση του πρωτονίου της θέσης 9 με το σήμα στο



Εικόνα 6.17 Αντιστοίχιση του πρωτονίου της θέσης 10 με το σήμα στο φάσμα ^1H -NMR του ελαιοκανθαλικού οξέος

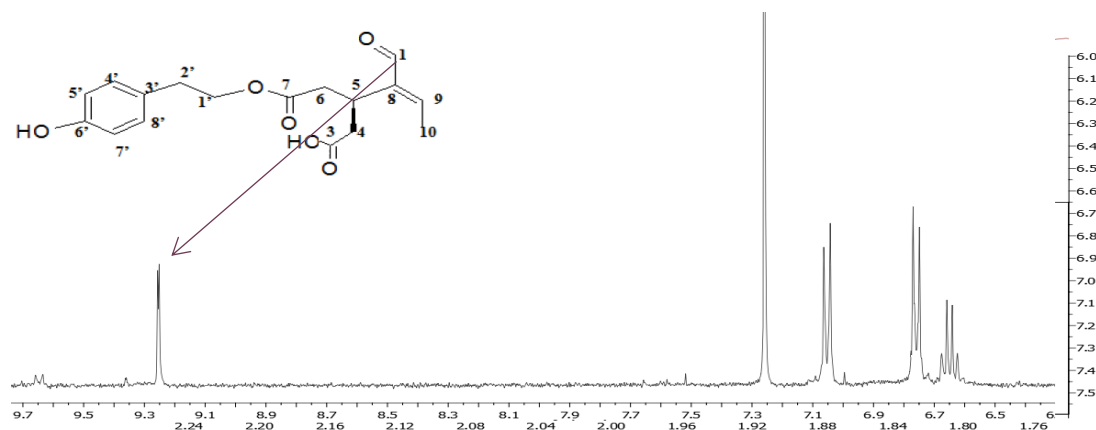


Εικόνα 6.18 Συσχέτιση του πρωτονίου H-9 του ελαιοκανθαλικού οξέος με το πρωτόνιο της θέσης H-10 σε φάσμα δύο διαστάσεων COSY.

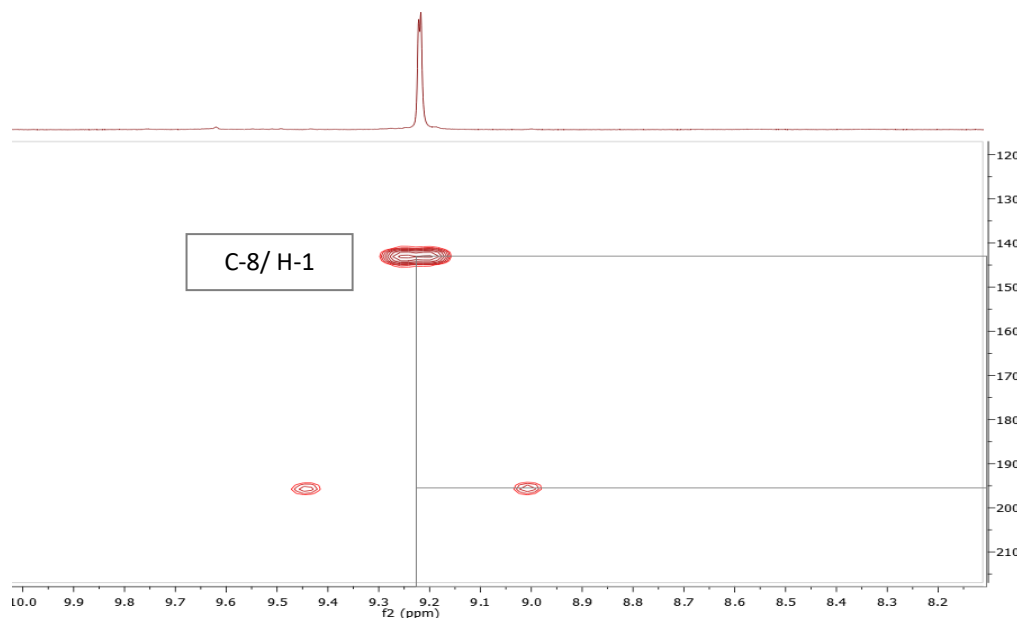


Εικόνα 6.19 Συσχέτιση του πρωτονίου της θέσης 10 με τον C-9 και C-8 (HMBC). Στο σχήμα φαίνεται και η συσχέτιση του του άνθρακα C-8 με το αλδεϋδικό πρωτόνιο της θέσης 1.

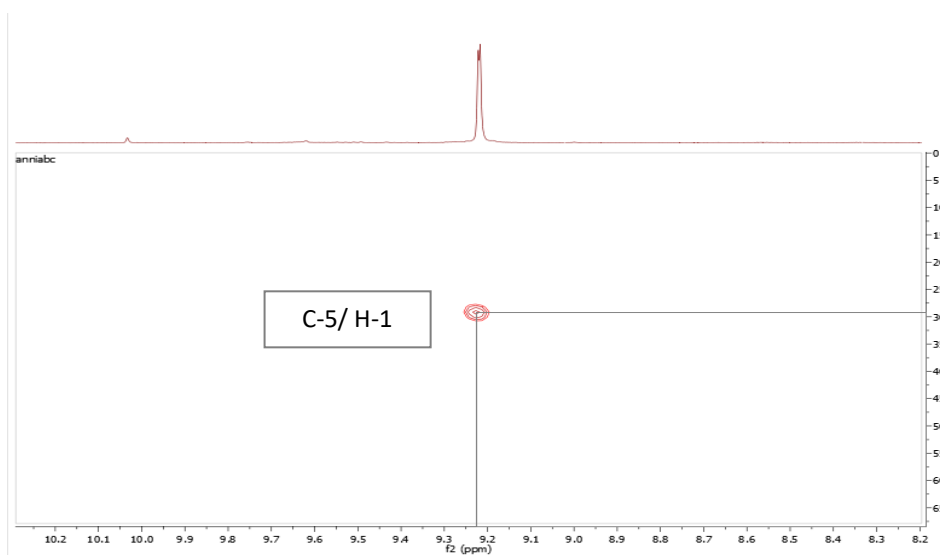
Τέλος, το πιο χαρακτηριστικό σήμα του μορίου είναι η διπλή κορυφή στην αλδεϋδική περιοχή του φάσματος, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1 (εικόνα 6.20) . Στο φάσμα COSY εντοπίστηκε και μία J^4 σύζευξη του πρωτονίου H-1 με το H5 (εικόνα 6.23), ενώ σε φάσμα δύο διαστάσεων HMBC το σήμα του αλδεϋδικού πρωτονίου εντοπίζεται ως δύο δορυφόροι στη χημική μετατόπιση του αντίστοιχου άνθρακα C-9 (εικόνα 6.21). Στην ίδια εικόνα εμφανίζεται και η συσχέτιση του αλδεϋδικού πρωτονίου H-1 με τον άνθρακα της θέσης C-8, ενώ στην εικόνα 6.22 εμφανίζεται η συσχέτιση του αλδεϋδικού πρωτονίου H-9 με τον άνθρακα της θέσης C-5.



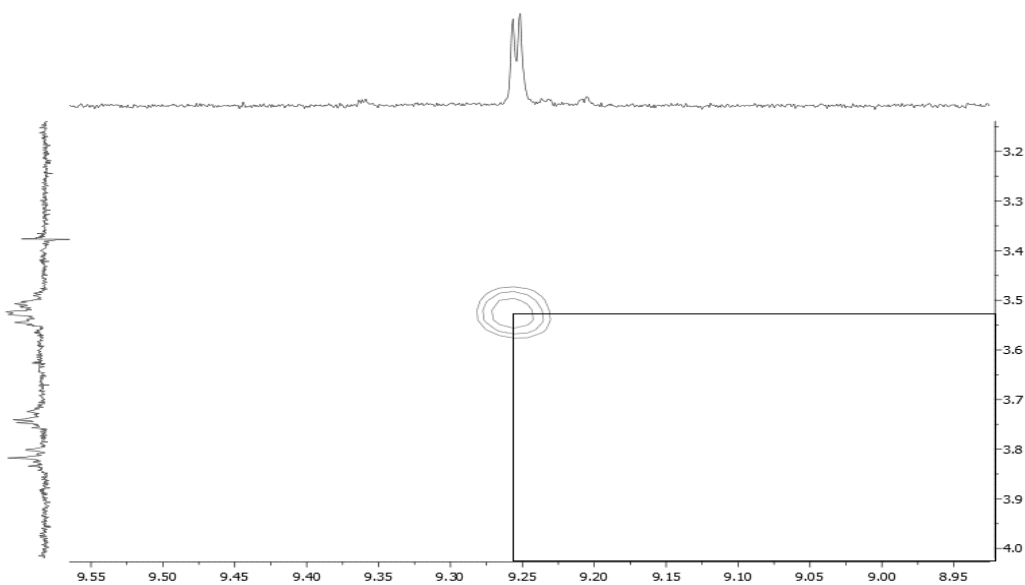
Εικόνα 6.20 Αντιστοίχιση του πρωτονίου της θέσης 1 με το σήμα στο φάσμα ^1H -NMR του ελαιοκανθαλικού οξέος



Εικόνα 6.21 Συσχέτιση του πρωτονίου της θέσης 1 με τον C-8. Στο σχήμα φαίνονται και οι δορυφόροι του πρωτονίου H-1 στη χημική μετατόπιση του αντίστοιχου άνθρακα C-1.



Εικόνα 6.22 Συσχέτιση του αλδεϋδικού πρωτονίου της θέσης 1 με τον C-5 (HMBC).



Εικόνα 6.23 Συσχέτιση του πρωτονίου H-1 του ελαιοκανθαλικού οξέος με το πρωτόνιο της θέσης H-5 σε φάσμα δύο διαστάσεων COSY.

Από το φάσμα δύο διαστάσεων HMBC του ελαιοκανθαλικού οξέος εντοπίστηκαν και οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου, χρησιμοποιώντας τις συσχετίσεις με τα πλησιέστερα σε αυτά πρωτόνια (πίνακας 6.3)

	Oleocanthal 13C-NMR (δ ppm)	Oleocanthalic acid 13C-NMR
1	200.25	195.8
3	195.09	177.0
4	46.2	36.4
5	26.97	29.3
6	36.82	36.4
7	171.99	172.3
8	143.39	143.1
9	153.82	154.5
10	15.25	15.3
1'	64.72	64.9
2'	34.24	34.2
3'	129.86	129.9
4', 8'	130.14	130.1
5', 7'	115.37	115.8
6'	154.0	154.4

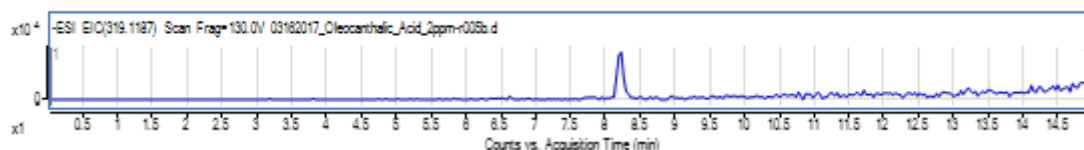
Πίνακας 6.3 Χημικές μετατοπίσεις ανθράκων ελαιοκανθάλης και ελαιοκανθαλικού οξέος

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΡΟΦΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

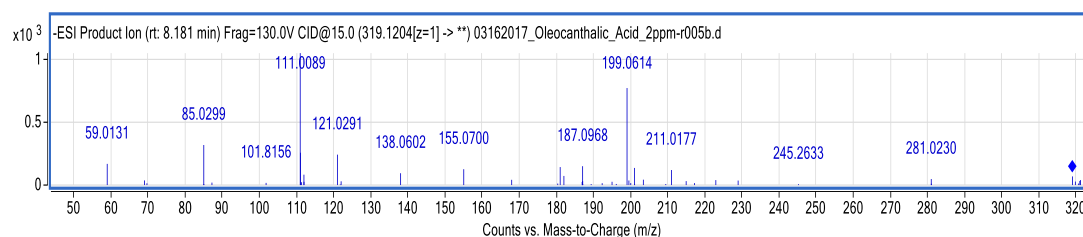
Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της ουσίας που περιγράφεται στην παρούσα εργασία έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματοφωτόμετρο μάζας (LC-MS). Η υγρή χρωματογραφία ήταν αντίστροφης φάσης και ο ανιχνευτής (ESI) παρήγαγε αρνητικά φορτισμένα ιόντα.

5μL από το δείγμα αναλύθηκαν από στήλη αντίστροφης φάσης. Το εκχύλισμα του ελαιοκανθαλικού οξέος αναλύθηκε με τη χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας 1200 Series LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή, τετραπολική παγίδα ιόντων, Agilent 6460 (LC-QqQ-MS) με πηγή ηλεκτροψεκασμού ιόντων (ESI). Στην εικόνα 6.24 παρουσιάζεται η κορυφή έκλουσης του ελαιοκανθαλικού οξέος από το σύστημα της στήλης χρωματογραφίας.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης μας έδωσαν το μοριακό βάρος του ελαιοκανθαλικού οξέος, το οποίο είναι 320.12 (εικόνα 6.25). Ο αριθμός αυτός επιβεβαιώνει τη δομή του προϊόντος οξείδωσης της ελαιοκανθάλης, καθώς πρόκειται για το μοριακό βάρος της ελαιοκανθάλης με την προσθήκη ενός –OH.



Εικόνα 6.24 Κορυφή έκλουσης του ελαιοκανθαλικού οξέος στην υγρή χρωματογραφία



Εικόνα 6.25 Αποτέλεσμα ανιχνευτή MS, μοριακό βάρος ελαιοκανθαλικού οξέος

Στροφική ικανότητα

Για τη μέτρηση της στροφικής ικανότητας του ελαιοκανθαλικού οξέος χρησιμοποιήθηκε πολωσίμετρο και το αποτέλεσμα, μετά από τους απαιτούμενους υπολογισμούς είναι $[\alpha]_D^{25} = -2,6^\circ$ ($c = 0.9g/100ml$ $CHCl_3$). Καθώς η τιμή είναι παραπλήσια με την στροφική ικανότητα της ελαιοκανθάλης, επιβεβαιώνεται πως τα δύο μόρια έχουν το ίδιο κέντρο ασυμμετρίας.

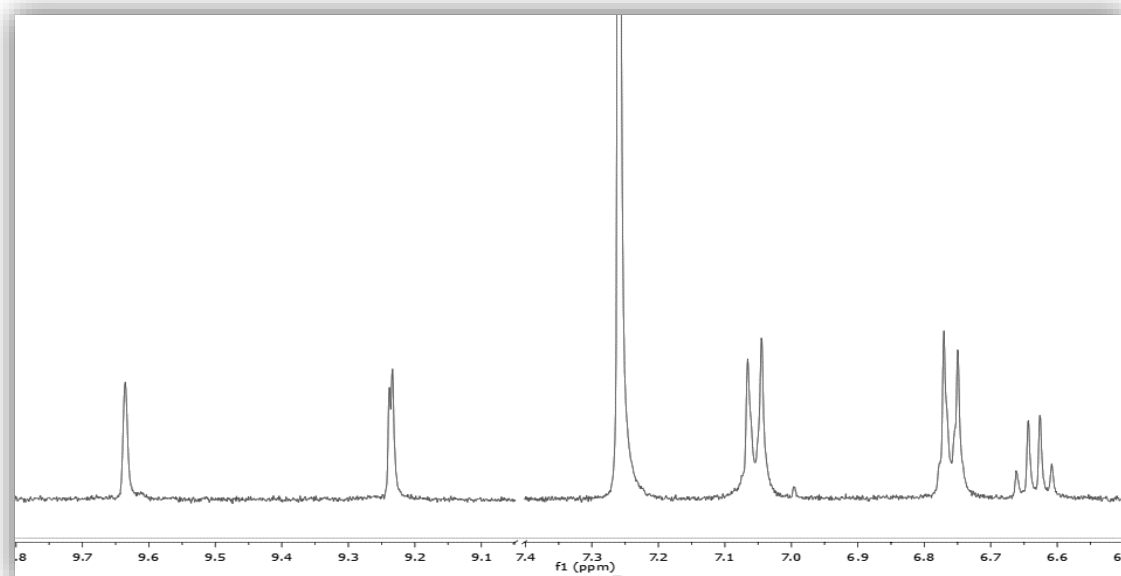
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το ελαιοκανθαλικό οξύ είναι ένα νέο προϊόν οξείδωσης της ελαιοκανθάλης. Στο παρόν στάδιο της μελέτης έγινε η παραγωγή του, χρησιμοποιώντας καθαρή ελαιοκανθάλη ως πρόδρομο μόριο, ώστε να διαπιστωθούν οι συνθήκες κατά τις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση οξείδωσης.

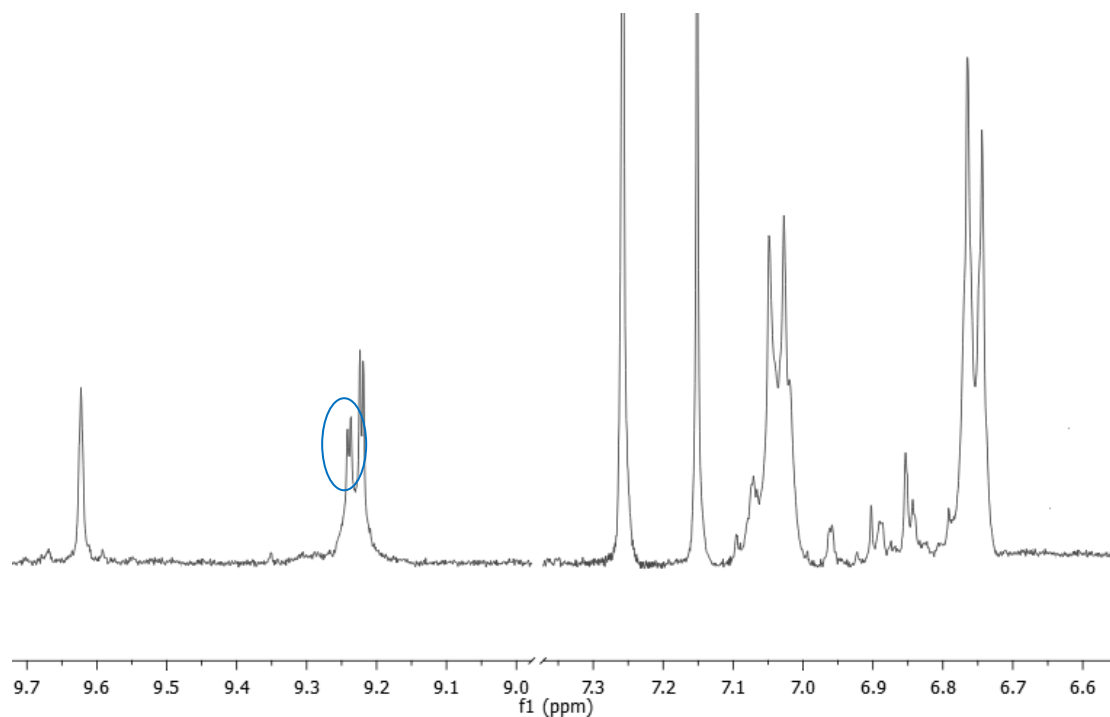
Για το σκοπό αυτό, 2 mg ελαιοκανθάλης διαλύθηκαν σε 2mL δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και αποθηκεύτηκαν για 4 ημέρες σε σταθερή θερμοκρασία 60°C . Η επιλογή του διαλύτη στηρίζεται στην δυνατότητα άμεσης λήψης φάσματος $^1\text{H-NMR}$ στο πέρας των τεσσάρων ημερών και στον περιορισμό των απωλειών κατά την ανάκτηση του εκχυλίσματος από άλλον διαλύτη. Επιπλέον, γνωρίζουμε πως το CDCl_3 διαλύει πλήρως την ελαιοκανθάλη και δεν επάγει αλλαγές στη δομή της. Μετά το πέρας των τεσσάρων ημερών, ακολούθησε η λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (εικόνα 6.24)

Εικόνα 6.24 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ελαιοκανθάλης σε CDCl_3 , για 4 ημέρες στους 60°C



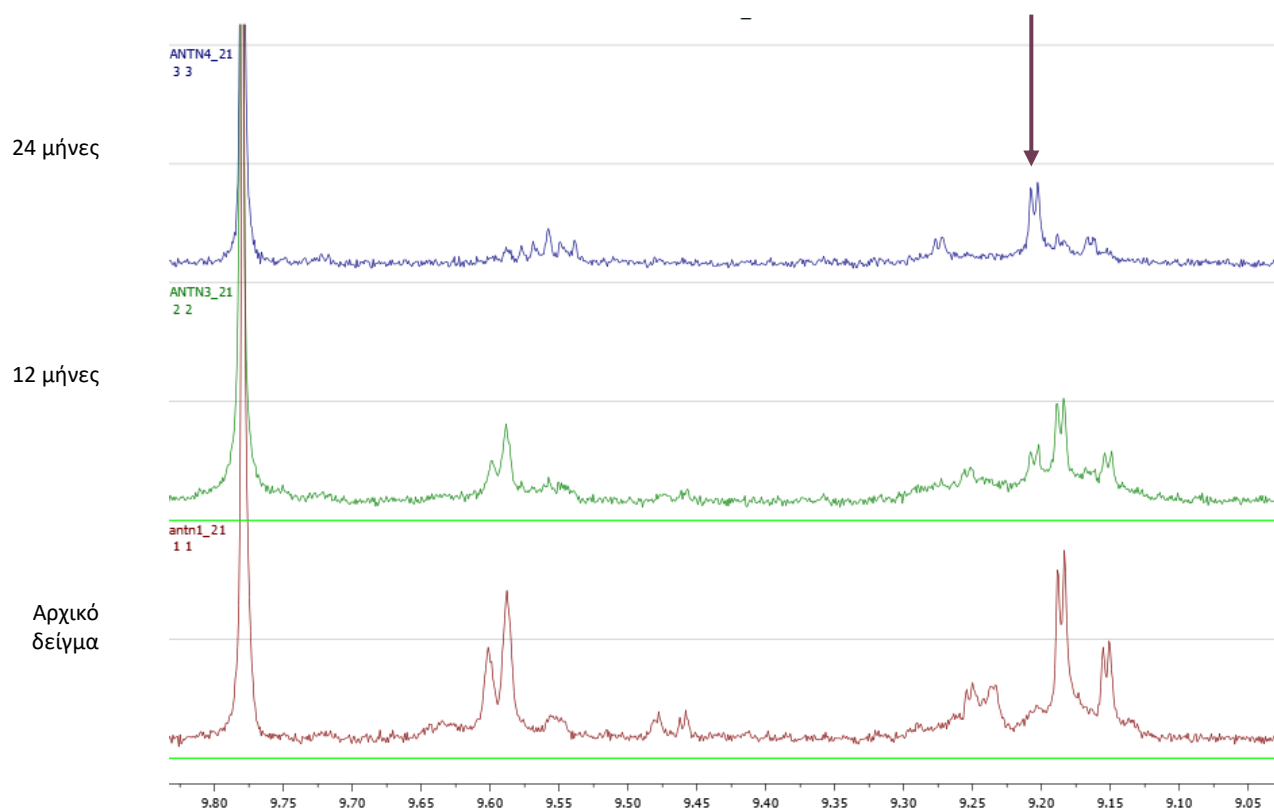
Όπως φαίνεται και από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της εικόνας, η ελαιοκανθάλη δεν έχει υποστεί καμία αλλαγή. Στη συνέχεια, 2 mg καθαρή ελαιοκανθάλη διαλύθηκαν σε 5 gr ελαιόλαδο με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινόλες και θερμάνθηκε στους 60°C για τέσσερις ημέρες. Το ελαιόλαδο στη συνέχεια εκχυλίστηκε με 4:5 cHex:ACN και ακολούθησε η λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$, όπως και στην προηγούμενη δοκιμή. Από αυτή τη δοκιμασία τα αποτελέσματα είναι θεαματικά (εικόνα 6.25)





Εικόνα 6.25 Φάσμα ^1H -NMR ελαιοκανθάλης σε ελαιόλαδο, για 4 ημέρες στους 60°C

Μέσα σε μόλις 4 ημέρες, έχει ξεκινήσει η οξείδωση της ελαιοκανθάλης και ο σχηματισμός του ελαιοκανθαλικού οξέος. Η διαδικασία αυτή μιμείται τη φυσική ροή των αντιδράσεων αποδόμησης της ελαιοκανθάλης που παρατηρήθηκε σε δείγματα που περιείχαν ελαιοκανθάλη κατά την παραγωγή τους και αποθηκεύτηκαν για 2 χρόνια σε δροσερό και σκιερό μέρος. Το νέο προϊόν οξείδωσης της ελαιοκανθάλης παρατηρήθηκε και σε σύντομο χρονικό διάστημα από την παραγωγή ορισμένων δειγμάτων, αλλά η συγκέντρωσή του στα δείγματα που εμφανίζεται αυξάνεται με την παροδο του χρόνου. Πρακτικά, όσο παρατηρείται μείωση στην περιεκτικότητα της ελαιοκανθάλης, λόγω οξειδωτικών μηχανισμών, τόσο παρατηρείται αύξηση στην περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ελαιοκανθαλικό οξύ (εικόνα 6.26).



Εικόνα 6.26 Σχηματισμός του ελαιοκανθαλικού οξέος στο πέρασμα του χρόνου στο ίδιο δείγμα (από κάτω προς τα πάνω). Το βέλος επισημαίνει την χαρακτηριστική κορυφή του μορίου σε φάσμα ^1H -NMR, διαλύτης CDCl_3 .

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Από την αποθήκευση των δειγμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες προκύπτει πως η μείωση της θερμοκρασίας αποθήκευσης οδηγεί σε επιβράδυνση διάσπασης των φαινολικών συστατικών που παρουσιάζουν υψηλή βιολογική σημασία στο ελαιόλαδο
- Παρατηρήθηκε επίσης πως δεν εμφανίζουν όλα τα ελαιόλαδα το ίδιο ρυθμό στην μεταβολή της περιεκτικότητάς τους στις μελετημένες φαινόλες, αν και προς το παρόν δεν γνωρίζουμε τις αιτίες του φαινομένου
- Από τα ποσοστά μείωσης των φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν, κατά την αποθήκευση των δειγμάτων στους 20° C προκύπτει ένας “Χρυσός Κανόνας” : Για να διατηρήσει ένα ελαιόλαδο τον ισχυρισμό υγείας για 18 μήνες από την παράγωγη (ή 12 μήνες από την εμφιάλωση), πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 500mg/kg άθροισμα ολικών φαινολών (παράγωγα υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης). Ακόμα και σε αυτόν τον κανόνα όμως, υπήρχαν ελάχιστα δείγματα που εμφάνισαν αποκλίσεις.
- Υποβάλλοντας τυχαία δείγματα ελαιολάδου σε θερμική καταπόνηση καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως με θέρμανση στους 60° C για 8-16 ημέρες μπορούμε να προβλέψουμε σε πολύ σημαντικό βαθμό το χημικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 12-18 μήνες.
- Αναλύοντας το λιπιδικό προφίλ των δειγμάτων καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως παρόλο που και η αναλογία των λιπαρών οξέων και η σύσταση του φαινολικού κλάσματος επηρεάζονται μεταξύ άλλων από την ποικιλία του ελαιόδεντρου, δεν εμφανίζεται κάποια συσχέτιση μεταξύ τους
- Με τις μετρήσεις της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε νερό που πραγματοποιήθηκαν μπορούμε να πούμε ότι η αυξημένη υγρασία είναι αναγκαία αλλά όχι πάντα ικανή συνθήκη για την πρόωρη ενεργοποίηση των υδρολυτικών μηχανισμών που αποδομούν τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου.
- Παρατηρήθηκε η εμφάνιση νέου προϊόντος οξείδωσης της ελαιοκανθάλης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης ορισμένων δειγμάτων ελαιολάδου. Ο σχηματισμός του προϊόντος προέρχεται από μία θερμοεξαρτώμενη αντίδραση, και η συγκέντρωσή του στο ελαιόλαδο αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Για αυτό και προτείνεται ως χημικός δείκτης γήρανσης του ελαιολάδου.
- Το νέο προϊόν, για το οποίο προτείνεται η ονομασία ελαιοκανθαλικό οξύ, απομονώθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά με τη χρήση φασμάτων ¹H-NMR, COSY, HMBC. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους έγινε με LC-MS, και μετρήθηκε η στρωφική του ικανότητα.
- Τέλος, το ελαιοκανθαλικό οξύ μπορεί να παρασκευαστεί με τη θέρμανση καθαρής ελαιοκανθάλης διαλυμένης σε ελαιόλαδο στους 60° C για 4 ημέρες.

Βιβλιογραφία

- [1] De Candolle, A. (1883). *Origine des plantes cultivées* (Vol. 43). G. Baillière et cie.
- [2] Damania, A. B. (1995). Olive, the plant of peace, reigns throughout Mediterranean. *DIVERSITY-ARLINGTON THEN WASHINGTON-*, 11, 131-132.
- [3] Camps, G. (1974). *Les civilisations préhistoriques de l'Afrique du Nord et du Sahara*. Doin.
- [4] Fischer, H. (1919). Wirtschaftsgeographie von Syrien. *Zeitschrift des Deutschen Palästina-Vereins* (1878-1945), (H. 1/2), 1-112.
- [5] Rubio, R., Balaguer, L., Manrique, E., Pérez, M. E., & Vargas, P. (2002). On the historical presence of the wild olive [*Olea Europaea* L. var. *Sylvestris* (Miller): Lehr.(Oleaceae)] in the Eurosiberian region of the Iberian Peninsula. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 59, No. 2). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- [6] Pichler, H., and Friedrich, W., (1976). "Radiocarbon dates of Santorini volcanics.": 373-374.
- [7] Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press on Demand.
- [8] Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., & Trujillo, I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 736-744.
- [9] Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press..
- [10] Green, P. S. (2002). A revision of *Olea* L.(Oleaceae). *Kew Bulletin*, 91-140.
- [11] Green, P. S., & Wickens, G. E. (1989). The *Olea europaea* complex..
- [12] Zohary, D. (1993, September). The wild genetic resources of the cultivated olive. In *II International Symposium on Olive Growing* 356 (pp. 62-65).
- [13] Therios I. (2008). "Olives, Crop Production Science in Horticulture", CABI Publishing
- [14] Fedeli, E. (1977). Lipids of olives. *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, 15(1), 57-74.

- [15] Gimeno, E., Calero, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventos, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2000). Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 255-259.
- [16] Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., & Lagiou, A. (1999). Mediterranean diet and coronary heart disease: Are antioxidants critical?. *Nutrition reviews*, 57(8), 253.
- [17] Gutiérrez-Rosales, F., Rios, J. J., & Gomez-Rey, M. L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6021-6025.
- [18] des Gachons, C. P., Uchida, K., Bryant, B., Shima, A., Sperry, J. B., Dankulich-Nagrudny, L., & Breslin, P. A. (2011). Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *Journal of Neuroscience*, 31(3), 999-1009.
- [19] Andrewes, P., Busch, J. L., de Joode, T., Groenewegen, A., & Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1415-1420.
- [20] Czerwińska, M., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M. (2012). A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food chemistry*, 131(3), 940-947.
- [21] Inarejos-García, A. M., Santacatterina, M., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Gómez-Alonso, S. (2010). PDO virgin olive oil quality—Minor components and organoleptic evaluation. *Food Research International*, 43(8), 2138-2146..
- [22] Diamantakos, P. , Velkou, A. , Killday, B. , Gimisis, T. , Melliou, E., Magiatis, P., (2015). Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil. *OLIVAE*, 122, 22-33.
- [23] Ciafardini, G., & Zullo, B. A. (2002). Microbiological activity in stored olive oil. *International journal of food microbiology*, 75(1), 111-118.
- [24] Marsilio, V., & Lanza, B. (1998). Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines(phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(4), 520-524..
- [25] Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., & Hatzopoulos, P. (2015). A defence-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent. *Journal of experimental botany*, 66(7), 2093-2106..

- [26] Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46(7), 976-988.
- [27] Busnena B.A., Foudah A.I., Melancon T., El Sayed K.A. (2013). "Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 2117–2127.
- [28] Savanelli, M. C., Barrea, L., Macchia, P. E., Savastano, S., Falco, A., Renzullo, A. & Somma, C. (2017). Preliminary results demonstrating the impact of Mediterranean diet on bone health. *Journal of translational medicine*, 15(1), 81.
- [29] García-Gavilán, J. F., Bulló, M., Canudas, S., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Giardina, S. & Salas-Salvado, J. (2017). Extra virgin olive oil consumption reduces the risk of osteoporotic fractures in the PREDIMED trial. *Clinical Nutrition*.
- [30] Parzonko, A., & Naruszewicz, M. (2012). Oleacein protects endothelial progenitor cells against angiotensin II–induced oxidative stress. *Planta Medica*, 78(11), PD88.
- [31] García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Nevedomskaya, E., Mayboroda, O. A., Deelder, A. M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Exploratory analysis of human urine by LC–ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(1), 463-475.
- [32] de la Torre, R. (2008). Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology*, 16(5), 245-247..
- [33] Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6485-6501..
- [34] Karaosmanoglu, H., Soyer, F., Ozen, B., & Tokatli, F. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Turkish extra virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8238-8245.
- [35] Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- [36] Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. (2008). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(3), 218-236.
- [37] Covas, M. I., Nyyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J. F., Kieseewetter, H., ... & Nascetti, S. (2006). The Effect of Polyphenols in Olive Oil on

Heart Disease Risk FactorsA Randomized TrialOlive Oil Polyphenols and Heart Disease Risk. *Annals of internal medicine*, 145(5), 333-341.

[38] Weinbrenner, T., Fito, M., de la Torre, R., Saez, G. T., Rijken, P., Tormos, C., & Marrugat, J. (2004). Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *The Journal of nutrition*, 134(9), 2314-2321.

[39] Gimeno, E., de la Torre-Carbot, K., Lamuela-Raventós, R. M., Castellote, A. I., Fitó, M., de la Torre, R., & López-Sabater, M. C. (2007). Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *British journal of nutrition*, 98(6), 1243-1250.

[40] de la Torre-Carbot, K., Chávez-Servín, J. L., Jaúregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Fitó, M., & López-Sabater, M. C. (2007). Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 583(2), 402-410..

[41] de la Torre-Carbot, K., Chávez-Servín, J. L., Jaúregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Nurmi, T., & Kieseewetter, H. (2010). Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *The Journal of nutrition*, 140(3), 501-508..

[42] Machowetz, A., Poulsen, H. E., Gruendel, S., Weimann, A., Fitó, M., Marrugat, J. & Nascetti, S. (2007). Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *The FASEB Journal*, 21(1), 45-52..

[43] Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., & Galli, C. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 95(4), 742-751.

[44] Jacomelli, M., Pitozzi, V., Zaid, M., Larrosa, M., Tonini, G., Martini, A., & Giovannelli, L. (2010). Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(4), 290-296..

[45] Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The Journal of nutrition*, 138(8), 1411-1416.

[46] Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Rocha, S., Nascimento, H., Vitorino, R., Amado, F., & Santos-Silva, A. (2009). Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular nutrition & food research*, 53(5), 609-616..

- [47] Nakbi, A., Dabbou, S., Champion, S., Fouchier, F., Mehri, S., Attia, N., & Hammami, M. (2011). Modulation of the superoxide anion production and MMP-9 expression in PMA stimulated THP-1 cells by olive oil minor components: Tyrosol and hydroxytyrosol. *Food research international*, 44(2), 575-581.
- [48] Cioffi, G., Pesca, M. S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., & De Tommasi, N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(1), 105-111..
- [49] Corona, G., Spencer, J. P. E., & Dessi, M. A. (2009). Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicology and industrial health*, 25(4-5), 285-293.
- [50] Konstantinidou, V., Covas, M. I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., & Mendez, M. V. R. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *The FASEB Journal*, 24(7), 2546-2557..
- [51] Khymenets, O., Fitó, M., Covas, M. I., Farré, M., Pujadas, M. A., Muñoz, D. & Torre, R. D. L. (2009). Mononuclear cell transcriptome response after sustained virgin olive oil consumption in humans: an exploratory nutrigenomics study. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 13(1), 7-19.
- [52] Dell'Agli, M., Fagnani, R., Galli, G. V., Maschi, O., Gilardi, F., Bellosta, S., & Caruso, D. (2010). Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor- κ B signaling. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4), 2246-2252..
- [53] Beauchamp, G. K., Keast, R. S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q. & Breslin, P. A. (2005). Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437(7055), 45-46.
- [54] Iacono, A., Gómez, R., Sperry, J., Conde, J., Bianco, G., Meli, R. & Gualillo, O. (2010). Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis & Rheumatology*, 62(6), 1675-1682..
- [55] Abuznait, A. H., Qosa, H., Busnena, B. A., El Sayed, K. A., & Kaddoumi, A. (2013). Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. *ACS chemical neuroscience*, 4(6), 973-982.
- [56] Pitt, J., Roth, W., Lacor, P., Smith, A. B., Blankenship, M., Velasco, P. & Klein, W. L. (2009). Alzheimer's-associated A β oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicology and applied pharmacology*, 240(2), 189-197.

- [57] Li, W., Sperry, J. B., Crowe, A., Trojanowski, J. Q., Smith III, A. B., & Lee, V. M. Y. (2009). Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *Journal of neurochemistry*, 110(4), 1339-1351..
- [58] Elnagar, A. Y., Sylvester, P. W., & El Sayed, K. A. (2011). (–)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta medica*, 77(10), 1013-1019..
- [59] Khanal, P., Oh, W. K., Yun, H. J., Namgoong, G. M., Ahn, S. G., Kwon, S. M., ... & Choi, H. S. (2011). p-HPEA-EDA, a phenolic compound of virgin olive oil, activates AMP-activated protein kinase to inhibit carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 32(4), 545-553..
- [60] Fogli, S., Arena, C., Carpi, S., Polini, B., Bertini, S., Digiacomio, M., ... & Nieri, P. (2016). Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. *Nutrition and cancer*, 68(5), 873-877.
- [61] Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 680-686.
- [62] Gu, Y., Wang, J., & Peng, L. (2017). (–)-Oleocanthal exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling pathway. *Oncology reports*, 37(1), 483-491.
- [63] Filipek, A., Czerwińska, M. E., Kiss, A. K., Wrzosek, M., & Naruszewicz, M. (2015). Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. *Phytomedicine*, 22(14), 1255-1261.
- [64] Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzone, E., Paterniti, I., Di Paola, R., Morittu, V. M., & Cuzzocrea, S. (2011). Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(3), 859-869..
- [65] Camargo, A., Ruano, J., Fernandez, J. M., Parnell, L. D., Jimenez, A., Santos-Gonzalez, M. & Perez-Jimenez, F. (2010). Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC genomics*, 11(1), 253.
- [66] Konstantinidou, V., Covas, M. I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., & Mendez, M. V. R. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *The FASEB Journal*, 24(7), 2546-2557.
- [67] Liu, H., Huang, H., Li, B., Wu, D., Wang, F., Hua Zheng, X. & Fan, X. (2014). Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clinical interventions in aging*, 9, 2087.

- [68] García-Martínez, O., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Ruiz, C., Milia, E., Lorenzo, M. L. & Rivas, A. (2016). Phenolic compounds in extra virgin olive oil stimulate human osteoblastic cell proliferation. *PloS one*, 11(3), e0150045..
- [69] García-Martínez, O., Rivas, A., Ramos-Torrecillas, J., De Luna-Bertos, E., & Ruiz, C. (2014). The effect of olive oil on osteoporosis prevention. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(7), 834-840.
- [70] Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 129-135.
- [71] Agiomyrgianaki, A., Petrakis, P. V., & Dais, P. (2012). Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: A study by NMR spectroscopy and biometric analysis. *Food chemistry*, 135(4), 2561-2568..
- [72] Malheiro, R., Rodrigues, N., & Pereira, J. A. (2015). Olive oil phenolic composition as affected by geographic origin, olive cultivar, and cultivation systems. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents; Academic Press and AOCS Press: Waltham, MA, USA*, 93-121.
- [73] Malheiro, R., Rodrigues, N., & Pereira, J. A. (2015). Olive oil phenolic composition as affected by geographic origin, olive cultivar, and cultivation systems. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents; Academic Press and AOCS Press: Waltham, MA, USA*, 93-121.
- [74] Jabeur, H., Zribi, A., Abdelhedi, R., & Bouaziz, M. (2015). Effect of olive storage conditions on Chemlali olive oil quality and the effective role of fatty acids alkyl esters in checking olive oils authenticity. *Food chemistry*, 169, 289-296..
- [75] Grose C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, et al. (2013) The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A β Plaque Pathology. *PLoS ONE* 8(8): e71702.
- [76] Stefanoudaki, E., Koutsaftakis, A., & Harwood, J. L. (2011). Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chemistry*, 127(4), 1481-1486.
- [77] Di Giovacchino, L., Solinas, M., & Miccoli, M. (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1189-1194..
- [78] Cinquanta, L., Esti, M., & Notte, E. L. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American oil chemists' society*, 74(10), 1259-1264..

- [79] Pagliarini, E., Zanoni, B., & Giovanelli, G. (2000). Predictive study on Tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1345-1351.
- [80] Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., & Garrido, A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5609-5614.
- [81] Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- [82] Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100(1), 36-42.
- [83] Esti, M., Contini, M., Moneta, E., & Sinesio, F. (2009). Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. *Food Chemistry*, 113(4), 1095-1100..
- [84] Ben-Hassine, K., Taamalli, A., Ferchichi, S., Mlaouah, A., Benincasa, C., Romano, E. & Malouche, D. (2013). Physicochemical and sensory characteristics of virgin olive oils in relation to cultivar, extraction system and storage conditions. *Food research international*, 54(2), 1915-1925..
- [85] Lozano-Sánchez, J., Bendini, A., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life. *Food Control*, 30(2), 606-615.
- [86] Cicerale, S., Conlan, X. A., Barnett, N. W., & Keast, R. S. (2013). Storage of extra virgin olive oil and its effect on the biological activity and concentration of oleocanthal. *Food research international*, 50(2), 597-602..
- [87] Lavelli, V., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2006). Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(8), 3002-3007..
- [88] Lozano-Sanchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in food science & technology*, 21(4), 201-211..
- [89] Hrncirik, K., & Fritsche, S. (2005). Relation between the endogenous antioxidant system and the quality of extra virgin olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2103-2110..

- [90] Daskalaki, D., Kefi, G., Kotsiou, K., & Tasioula-Margari, M. (2009). Evaluation of phenolic compounds degradation in virgin olive oil during storage and heating. *Journal Of Food & Nutrition Research*, 48(1).
- [91] Kotsiou, K., & Tasioula-Margari, M. (2016). Monitoring the phenolic compounds of Greek extra-virgin olive oils during storage. *Food chemistry*, 200, 255-262.
- [92] Ríos, J. J., Gil, M. J., & Gutiérrez-Rosales, F. (2005). Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A*, 1093(1), 167-176.
- [93] Méndez, A. I., & Falqué, E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food control*, 18(5), 521-529.
- [94] Dabbou, S., Dabbou, S., Chehab, H., Brahmi, F., Taticchi, A., Servili, M., & Hammami, M. (2011). Chemical composition of virgin olive oils from Koroneiki cultivar grown in Tunisia with regard to fruit ripening and irrigation regimes. *International journal of food science & technology*, 46(3), 577-585.
- [95] Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry*, 73(2), 627-650..
- [96] Andersen, J. M., & Pedersen, W. B. (1983). Analysis of plant phenolics by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 259, 131-139.
- [98] Ranalli, A., & Angerosa, F. (1996). Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(4), 417-422.
- [99] Angerosa, F., d'Alessandro, N., Konstantinou, P., & Di Giacinto, L. (1995). GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1802-1807.
- [100] Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*, 44(1), 53-60.
- [101] Perri, E., Raffaelli, A., & Sindona, G. (1999). Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry– selected reaction monitoring. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4156-4160.
- [102] Caruso, D., Colombo, R., Patelli, R., Giavarini, F., & Galli, G. (2000). Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization– mass spectrometry (APCI– MS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1182-1185.

- [103] Mosca, L., De Marco, C., Visioli, F., & Cannella, C. (2000). Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 297-301.
- [104] Campanella, L., Favero, G., Pastorino, M., & Tomassetti, M. (1999). Monitoring the rancidification process in olive oils using a biosensor operating in organic solvents. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(2), 179-186..
- [105] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., & Parenti, A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, 71(4), 553-562.
- [106] Sacchi, R., Patumi, M., Fontanazza, G., Barone, P., Fiordiponti, P., Mannina, L., & Segre, A. L. (1996). A high-field ^1H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(6), 747-758.
- [107] Sacchi, R., Addeo, F., & Paolillo, L. (1997). ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35(13).
- [108] Limioli, R., Consonni, R., Ranalli, A., Bianchi, G., & Zetta, L. (1996). ^1H NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2040-2048.
- [109] Χατζηιωάννου και Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση 1997
- [110] Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., & Magiatis, P. (2012). Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative ^1H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(47), 11696-11703..
- [111] Mulinacci, N., Ieri, F., Ignesti, G., Romani, A., Michelozzi, M., Creti, D., ... & Calamai, L. (2013). The freezing process helps to preserve the quality of extra virgin olive oil over time: A case study up to 18months. *Food research international*, 54(2), 2008-2015.
- [112] Guillén, M. D., & Ruiz, A. (2003). Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 688-696..
- [113] Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J., & Desamparados Salvador, M. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(2), 134-142..
- [114] LeGendre, O., Breslin, P. A., & Foster, D. A. (2015). (-)-Oleocanthal rapidly and selectively induces cancer cell death via lysosomal membrane permeabilization. *Molecular & cellular oncology*, 2(4), e1006077.

[115] Perez-Jimenez, F., Alvarez, D. C. G., Badimon, L., Barja, G., Battino, M., Blanco, A. & Chamorro-Quiros, J. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European journal of clinical investigation*, 35(7), 421-424.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακες με τις περιεκτικότητες των δειγμάτων στα φαινολικά συστατικά που προσμετρήθηκαν για κάθε σετ αναλύσεων, για κάθε συνθήκη

Δείγμα	Ελαιοκανθαλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/Kg	Άγλυκον Της Ελευρωπαϊνης mg/Kg	Άγλυκον Του Λιγκτροσιδη mg/Kg	Ισομερη Άγλυκου Λιγκτροσιδη mg/Kg	Ισομερη Άγλυκου Ελευρωπαϊνης mg/Kg	Άθροισμα mg/Kg
ANTN1	523	174	697	46	58	122	129	1052
ANTN2	643	227	870	13	29	45	86	1042
ANTN3	522	98	621	6	25	0	0	652
ANTN4	241	49	290	0	21	0	0	311
ANTN5	682	524	1206	37	42	64	129	1478
ANTN6	485	278	763	12	25	113	96	1008
ANTN7	528	342	870	12	25	139	197	1242
ANTN8	279	105	384	67	68	168	45	731
ANTN9	344	197	542	88	108	634	227	1599
ANTN10	358	215	573	9	20	0	0	602
ANTN11	409	343	752	37	35	378	328	1530
ANTN12	207	151	358	29	21	35	18	460
ANTN13	188	210	398	77	43	339	402	1259
ANTN14	50	32	82	12	6	161	102	363
ANTN15	163	37	200	7	19	32	0	258
ANTN16	384	267	651	23	31	262	119	1085
ANTN17	197	122	319	4	12	87	45	467
ANTN18	267	103	369	22	31	0	0	422
ANTN19	4	7	11	0	0	0	0	11
ANTN20	344	357	701	80	61	77	35	954
ANTN21	131	108	239	0	0	51	8	298
ANTN22	493	289	782	36	44	181	79	1121
ANTN23	139	32	171	12	24	32	0	239
ANTN24	67	54	121	22	20	93	0	256
ANTN25	103	204	307	0	0	0	0	307
ANTN26	334	297	631	180	106	466	365	1749
ANTN27	321	104	425	43	49	0	0	517
ANTN28	85	165	250	0	0	0	0	250
ANTN29	172	312	484	0	0	0	0	484

Πίνακας Π1. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων αμέσως μετά την παραγωγή τους.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκοτροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαΐνης mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκοτροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαΐνης mg/Kg	Άθροισμα
ANTN1_1	255	60	315	17	36	64	12	444
ANTN1_2	369	102	470	14	36	54	5	580
ANTN1_3	64	12	76	0	16	0	0	92
ANTN1_4	118	20	138	0	23	12	0	173
ANTN1_5	401	283	685	40	50	67	38	880
ANTN1_6	374	205	579	30	43	113	52	817
ANTN1_7	393	264	657	33	43	119	62	914
ANTN1_8	169	65	234	59	73	103	18	488
ANTN1_9	263	116	379	85	107	258	45	875
ANTN1_10	193	107	300	4	13	54	8	380
ANTN1_11	263	194	457	46	46	262	139	951
ANTN1_12	123	93	216	24	26	35	15	316
ANTN1_13	85	110	195	69	36	164	183	648
ANTN1_14	50	26	76	14	19	93	18	221
ANTN1_15	118	32	149	8	19	19	0	195
ANTN1_16	288	174	462	33	36	181	86	798
ANTN1_17	288	135	423	33	50	184	65	755
ANTN1_18	177	57	234	14	26	0	0	274
ANTN1_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTN1_20	166	155	321	43	26	32	5	427
ANTN1_21	85	51	136	8	13	35	1	193
ANTN1_22	339	155	494	30	40	113	35	711
ANTN1_23	50	62	113	0	3	0	0	115
ANTN1_24	37	20	57	0	36	48	0	141
ANTN1_25	66	127	193	0	3	0	0	196
ANTN1_26	53	20	73	108	73	41	32	328
ANTN1_27	174	48	223	33	46	177	42	522
ANTN1_28	64	130	193	0	0	0	0	193
ANTN1_29	115	219	334	0	0	0	0	334

Πίνακας Π2. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 3 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Μάιος 2015) – Αποθήκευση στους 20° C.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκαστροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαϊνης mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκαστροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαϊνης mg/Kg	Άθροισμα
ANTN2_1	236	57	293	14	30	64	12	412
ANTN2_2	272	76	348	4	26	0	0	378
ANTN2_3	42	9	51	0	16	0	0	67
ANTN2_4	93	15	108	0	16	0	0	124
ANTN2_5	85	20	106	0	16	0	0	122
ANTN2_6	347	191	538	30	40	113	52	773
ANTN2_7	366	211	577	24	33	87	52	772
ANTN2_8	155	65	221	50	67	103	18	458
ANTN2_9	263	93	357	85	107	258	45	853
ANTN2_10	169	90	259	4	13	51	8	336
ANTN2_11	77	93	170	50	67	265	18	570
ANTN2_12	99	74	172	17	23	41	8	262
ANTN2_13	83	93	176	66	36	164	183	625
ANTN2_14	50	26	76	14	19	61	18	189
ANTN2_15	101	23	125	4	19	19	0	167
ANTN2_16	247	146	394	24	36	181	49	683
ANTN2_17	118	46	163	4	19	83	25	295
ANTN2_18	123	34	158	1	23	0	0	181
ANTN2_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTN2_20	139	85	224	43	26	28	5	327
ANTN2_21	77	46	123	1	13	25	0	162
ANTN2_22	291	118	409	21	40	126	32	626
ANTN2_23	42	54	96	0	3	0	0	99
ANTN2_24	37	18	54	0	33	41	0	129
ANTN2_25	77	132	209	0	3	0	0	212
ANTN2_26	182	155	337	131	90	210	136	904
ANTN2_27	166	43	209	30	46	161	42	489
ANTN2_28	64	127	190	0	0	0	0	190
ANTN2_29	126	216	342	0	0	0	0	342

Πίνακας Π3. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 6 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Σεπτέμβριος 2015) – Αποθήκευση στους 20° C.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκοτροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαΐνης mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκοτροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαΐνης mg/Kg	Άθροισμα
ANTN3_1	158	29	187	0	16	54	12	269
ANTN3_2	191	43	233	0	16	0	0	249
ANTN3_3	15	0	15	0	0	0	0	15
ANTN3_4	64	12	76	0	9	0	0	85
ANTN3_5	266	144	410	11	30	87	42	579
ANTN3_6	204	99	303	8	26	71	25	432
ANTN3_7	234	144	377	14	26	87	35	539
ANTN3_8	139	23	163	-5	16	28	1	203
ANTN3_9	128	60	188	40	73	71	18	390
ANTN3_10	131	62	194	1	13	28	0	236
ANTN3_11	199	90	289	27	36	164	75	592
ANTN3_12	83	57	139	8	23	22	0	192
ANTN3_13	72	93	165	66	36	148	112	528
ANTN3_14	37	23	60	8	19	58	8	153
ANTN3_15	85	20	106	-2	19	12	0	135
ANTN3_16	245	127	371	17	33	161	49	631
ANTN3_17	172	74	245	4	26	119	42	437
ANTN3_18	72	23	95	0	0	0	0	95
ANTN3_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTN3_20	115	65	180	21	19	28	0	248
ANTN3_21	56	26	82	0	6	19	0	106
ANTN3_22	177	76	253	4	19	93	28	399
ANTN3_23	31	32	63	0	3	0	0	65
ANTN3_24	26	18	43	0	16	28	0	88
ANTN3_25	47	79	127	0	3	19	0	148
ANTN3_26	137	99	235	76	90	139	79	618
ANTN3_27	120	34	155	14	46	103	22	340
ANTN3_28	47	76	124	0	0	0	0	124
ANTN3_29	96	152	248	0	0	0	0	248

Πίνακας Π4. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 12 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Ιανουάριος 2016) – Αποθήκευση στους 20° C.

ΔΕΙΓΜΑ	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκοτροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαΐνης mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκοτροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαΐνης mg/Kg	Άθροισμα
ANTP1_1	328	90	419	30	46	129	15	639
ANTP1_2	420	124	544	14	33	129	12	731
ANTP1_3	201	34	236	1	19	0	0	256
ANTP1_4	142	26	168	0	23	38	0	229
ANTP1_5	490	359	849	59	53	152	69	1182
ANTP1_6	377	225	602	30	40	223	86	980
ANTP1_7	436	281	717	17	26	139	62	961
ANTP1_8	177	85	262	59	67	135	25	548
ANTP1_9	293	132	426	79	104	346	65	1019
ANTP1_10	255	146	402	11	16	54	12	494
ANTP1_11	307	227	534	40	40	304	197	1114
ANTP1_12	126	113	239	24	16	54	18	351
ANTP1_13	101	110	211	76	26	187	180	680
ANTP1_14	58	32	90	21	16	129	42	297
ANTP1_15	153	34	187	4	23	19	0	233
ANTP1_16	355	230	586	40	43	301	106	1075
ANTP1_17	374	183	557	46	53	304	116	1076
ANTP1_18	204	62	267	17	26	54	0	364
ANTP1_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTP1_20	231	186	417	46	26	80	18	588
ANTP1_21	115	71	186	4	9	64	18	282
ANTP1_22	404	211	615	27	36	116	42	836
ANTP1_23	58	82	140	0	0	0	0	140
ANTP1_24	45	7	51	0	-1	106	0	157
ANTP1_25	74	160	235	0	0	0	0	235
ANTP1_26	172	7	179	-9	-1	-1	-9	160
ANTP1_27	201	62	264	33	53	220	45	615
ANTP1_28	91	166	257	0	0	0	0	257
ANTP1_29	182	339	522	0	0	0	0	522

Πίνακας Π5. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 3 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Μάιος 2015) – Αποθήκευση στους 4° C.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκοτροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαϊκής mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκοτροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαϊκής mg/Kg	Άθροισμα
ANTP3_1	296	88	384	21	33	126	18	581
ANTP3_2	355	118	474	11	23	122	12	641
ANTP3_3	218	43	260	0	19	0	0	280
ANTP3_4	142	26	168	0	16	32	0	216
ANTP3_5	442	331	773	43	43	152	69	1079
ANTP3_6	355	183	538	21	26	168	69	821
ANTP3_7	436	281	717	17	26	139	62	961
ANTP3_8	172	85	256	53	60	122	25	516
ANTP3_9	293	132	426	79	97	343	59	1002
ANTP3_10	215	130	344	14	16	54	8	437
ANTP3_11	277	194	471	40	33	252	143	938
ANTP3_12	126	107	233	24	19	51	8	335
ANTP3_13	101	88	189	56	26	161	173	606
ANTP3_14	58	29	87	11	16	106	35	255
ANTP3_15	147	32	179	4	19	19	0	221
ANTP3_16	345	230	575	37	40	294	143	1088
ANTP3_17	307	166	473	27	36	249	116	900
ANTP3_18	169	62	231	11	23	45	0	310
ANTP3_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTP3_20	223	180	403	43	26	74	18	564
ANTP3_21	93	62	156	0	6	54	1	217
ANTP3_22	334	199	533	21	26	109	38	728
ANTP3_23	50	68	118	0	0	0	0	118
ANTP3_24	42	20	62	0	33	90	0	185
ANTP3_25	77	160	237	0	0	0	0	237
ANTP3_26	164	160	324	89	50	242	200	904
ANTP3_27	196	62	258	27	40	220	45	590
ANTP3_28	77	149	226	0	0	0	0	226
ANTP3_29	161	272	433	0	0	0	0	433

Πίνακας Π6. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 12 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Ιανουάριος 2016) – Αποθήκευση στους 4° C.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκαστροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαϊνής mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκαστροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαϊνής mg/Kg	Άθροισμα
ANTK1_1	331	88	419	37	63	100	18	636
ANTK1_2	393	121	514	14	40	129	12	708
ANTK1_3	255	43	298	1	19	0	0	319
ANTK1_4	139	26	165	0	19	38	0	223
ANTK1_5	485	356	841	53	56	158	72	1181
ANTK1_6	396	219	615	30	43	220	86	993
ANTK1_7	434	300	734	14	23	194	62	1026
ANTK1_8	166	85	251	53	63	152	55	574
ANTK1_9	309	149	459	79	107	346	173	1163
ANTK1_10	263	177	441	11	19	54	18	543
ANTK1_11	318	258	576	46	40	320	217	1199
ANTK1_12	134	118	252	24	23	67	45	411
ANTK1_13	123	127	250	69	26	187	180	712
ANTK1_14	58	34	93	17	23	126	35	293
ANTK1_15	145	32	176	4	19	19	0	219
ANTK1_16	361	269	630	43	43	343	133	1192
ANTK1_17	374	188	563	53	56	278	112	1062
ANTK1_18	204	68	272	17	26	61	0	376
ANTK1_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTK1_20	236	197	433	46	26	74	18	598
ANTK1_21	115	68	183	4	9	64	18	279
ANTK1_22	423	239	662	27	36	116	42	882
ANTK1_23	61	85	146	0	0	0	0	146
ANTK1_24	45	20	65	0	40	54	0	159
ANTK1_25	88	163	251	0	0	15	0	266
ANTK1_26	166	135	301	102	77	294	210	984
ANTK1_27	226	93	319	33	53	278	119	802
ANTK1_28	91	166	257	0	0	0	0	257
ANTK1_29	185	342	527	0	0	0	0	527

Πίνακας Π7. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 3 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Μάιος 2015) – Αποθήκευση στους -18° C.

Δείγμα	Ελαιοκανθάλη mg/Kg	Ελαιασίνη mg/Kg	D1 mg/kg	Άγλυκον του λιγκοτροσίδη mg/Kg	Άγλυκον της ελευρωπαΐνης mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Λιγκοτροσίδη mg/Kg	Ισομερή Άγλυκου Ελευρωπαΐνης mg/Kg	Άθροισμα
ANTK3_1	309	85	394	30	50	100	18	592
ANTK3_2	355	110	465	4	26	109	8	613
ANTK3_3	255	40	295	0	16	0	0	312
ANTK3_4	134	29	163	0	23	38	0	224
ANTK3_5	442	334	776	11	13	145	72	1016
ANTK3_6	388	191	579	8	13	200	86	885
ANTK3_7	428	295	723	14	23	174	59	992
ANTK3_8	158	74	232	46	53	135	55	522
ANTK3_9	266	138	404	50	70	346	170	1039
ANTK3_10	234	166	400	8	16	54	18	496
ANTK3_11	296	202	498	11	9	297	230	1046
ANTK3_12	126	104	230	11	9	67	45	363
ANTK3_13	118	127	244	56	26	187	180	694
ANTK3_14	58	34	93	8	16	126	35	277
ANTK3_15	145	34	179	4	13	19	0	215
ANTK3_16	361	253	613	24	30	304	143	1113
ANTK3_17	358	180	538	43	53	258	102	995
ANTK3_18	204	68	272	14	23	54	0	363
ANTK3_19	0	0	0	0	0	0	0	0
ANTK3_20	234	194	428	46	26	74	18	592
ANTK3_21	112	68	180	0	6	54	18	259
ANTK3_22	417	222	639	27	36	116	42	860
ANTK3_23	61	76	137	0	0	0	0	137
ANTK3_24	45	20	65	0	33	54	1	153
ANTK3_25	88	158	245	0	0	9	0	254
ANTK3_26	172	149	321	102	77	294	210	1003
ANTK3_27	212	88	300	27	50	249	109	734
ANTK3_28	88	158	245	0	0	0	0	245
ANTK3_29	0,63	328	329	0	0	0	0	329

Πίνακας Π8. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των δειγμάτων 12 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης σταθερότητας (Μάιος 2015) – Αποθήκευση στους -18° C.

Όλα τα πρωτότυπα φάσματα από τις χημικές αναλύσεις των δειγμάτων που υποστηρίζουν τα παραπάνω αποτελέσματα είναι καταχωρημένα στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

ΚΩΔ. NMR	Στοιχεία
ANTN 1	Αγριελιά Πηλίου
ANTN 2	Μάλαξη t=25min T=28°C Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 3	Μάλαξη t=60min T=38 °C Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 4	Μάλαξη t=40min T=45 °C Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 5	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 6	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 7	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 8	Γερακινή Χαλκιδική
ANTN 9	Χαλκιδικής
ANTN 10	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 11	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 12	Μεγαρίτικη Κοζάνη
ANTN 13	Κορωνέικη Κορώνης
ANTN 14	Χαλκιδικής
ANTN 15	Κορωνέικη Λακωνίας
ANTN 16	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 17	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 18	Κορωνέικη Λακωνίας
ANTN 20	Κορωνέικη Καλαμάτας
ANTN 21	Μεγαρίτικη
ANTN 22	Λιανολιά Κέρκυρας
ANTN 23	Ντόπια Ζακύνθου
ANTN 24	Ντόπια Ζακύνθου
ANTN 25	Arbequina California
ANTN 26	Ντόπια Ζακύνθου
ANTN 27	Αθηνολία Λακωνίας
ANTN 28	Arbequina California
ANTN 29	Arbequina California

Πίνακας Π9. Γεωγραφική προέλευση και ποικιλία ελαιόδεντρου των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη σταθερότητας των φαινολικών συστατικών