ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Συγκριτική μελέτη της επεξεργασίας αποβλήτου εκπίκρανσης ξηράλατης θρούμπας Θάσου με διάφορες ρητίνες τύπου AMBERLITE XAD<sup>TM</sup>



Αθανάσιος Πέτρου

Αθήνα 2019

## Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## Σχολή Επιστημών Υγείας

## Τμήμα Φαρμακευτικής

## Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

### Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:

Απομόνωση-Ανάπτυξη-Παραγωγή και έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

## Τίτλος Εργασίας:

Συγκριτική μελέτη της επεξεργασίας αποβλήτου εκπίκρανσης ξηράλατης θρούμπας Θάσου με διάφορες ρητίνες τύπου AMBERLITE XADTM<sup>TM</sup>

## Φοιτητής: Αθανάσιος Πέτρου, Γεωπόνος

**A.M.:** 161704

## Επιβλέπων Καθηγητής:

Αναπλ. Καθηγητής Νεκτάριος Αληγιάννης

## Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Νεκτάριος Αληγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Καθηγητής ΕΚΠΑ Μουρτζίνος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΑΠΘ

### Αθήνα 2019

### Ευχαριστίες

- Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της μεταπτυχιακής εργασίας, τον Καθηγητή Σκαλτσούνη Λέανδρο-Αλέξιο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αληγιάννη Νεκτάριο και τον Επίκουρο Καθηγητή Μουρτζίνο Ιωάννη
- Ευχαριστώ εκ βαθέων τον αναπληρωτή Καθηγητή Αληγιάννη Νεκτάριο, επιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την αποδοχή και ένταξή μου στην ερευνητική του ομάδα, για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας, την υπομονή του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τη δυνατότητα περαιτέρω επιστημονικής κατάρτισης που μου προσέφερε, μέσω της άριστης συνεργασίας μας
- τον διδάκτορα Διονύση Αμπάτη για την ευρεία παροχή γνώσεων και την όλη συνεργασία
- την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Ντίνα, για την πολύτιμη βοήθεια της τόσο στην εκτέλεση των χρωματογραφιών HPTLC και των *in vitro* ελέγχων TPC και DPPH όσο και καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, τη συνεχή καθοδήγηση και τον αμέριστο ζήλο της για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας
- τον Επίκουρο Καθηγητή Ευάγγελο Γκίκα για την βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία των κριτηρίων επιλογής ρητίνης
- την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Νίκου Θωμαίδη στο Εργ. Αναλυτικής Χημείας του Τμ. Χημείας του ΕΚΠΑ και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Reza Aalizadeh και την μεταδιδάκτορα Μαρία-Χριστίνα Νίκα, για την εκτέλεση των πειραμάτων LC-HRMS και την στατιστική επεξεργασία των προσωρινών αποτελεσμάτων καθώς και για την συνέχιση των αναλύσεων μέχρι την ολοκλήρωσή τους
- την Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Καβάλας (ΕΑΣΚ) για την προμήθεια του υδατικού αποβλήτου και για την συνεχιζόμενη συνεργασία μας
- την μεταδιδάκτορα Χείλαρη Αντιγόνη για την πολύτιμη βοήθεια της εντός του εργαστηρίου και την προθυμία της να παρέχει τις γνώσεις και συμβουλές της
- όλους τους συμφοιτητές μου και όλα τα μέλη του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και επικοινωνίας.
- Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και τους στενούς φίλους μου για τη συμπαράστασή τους

#### Σκοπός

Η έρευνα για εναλλακτικές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών, αποκτά συνεχώς όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ειδικά λόγω των αντιφατικών πληροφοριών που υπάρχουν σχετικά με την ασφάλεια χρήσης των συνθετικών αντιοξειδωτικών και των επιδράσεων που μπορεί να έχουν στην υγεία των καταναλωτών. Επιπλέον, η επεξεργασία υποπροϊόντων που προκύπτουν από γεωργικές και βιομηγανικές διαδικασίες επεξεργασίας τροφίμων, αποτελεί την κύρια κατεύθυνση στην εύρεση νέων πηγών φυσικών αντιοξειδωτικών χαμηλού κόστους. Η αποτελεσματική γρησιμοποίηση αυτών των πηγών, γρησιμοποιώντας φιλικές μεθόδους προς το περιβάλλον έχει καταστεί μείζον στόχος. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του εμπλουτισμένου σε φαινόλες εκχυλίσματος, το οποίο προκύπτει από το απόβλητο της ξηράλατης εκπίκρανσης της ελιάς Θρούμπας Θάσου μετά από επεξεργασία με μακρόπορες πολυμερικές ρητίνες AMBERLITE XAD διαφόρων τύπων. Η αρχική πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί ένα είδος αποβλήτου ελαιοκομίας που απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στον Ελλαδικό χώρο. Επιπρόσθετα, οι ρητίνες AMBERLITE XAD έχουν την ιδιότητα να προσροφούν στις πορώδεις επιφάνειές τους φαινολικά και άλλα οργανικά μόρια που είναι διαλυμένα σε υδατικά διαλύματα. Με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου τύπου ρητίνης, από τον οποίο προκύπτει το πιο πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ουσίες έκλουσμα, πραγματοποιήθηκαν in vitro δοκιμασιών TPC και DPPH, ενώ η μελέτη της ποιοτικής σύστασης του επιλεγμένου τελικού εκγυλίσματος έλαβε γώρα με τη γρήση της τεγνικής LC-MS. Απώτερος στόχος είναι η διερεύνηση της χρήσης του τελικού ξηρού εκχυλίσματος ως φυσικό αντιοξειδωτικό είτε αντικαθιστώντας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά διαφόρων προϊόντων διατροφής, είτε ως συστατικό «λειτουργικών τροφίμων» (functional foods) κυρίως λόγω των ευεργετικών του ιδιοτήτων για την υγεία του ανθρώπου, αλλά και ως συντηρητικό συντελώντας στην επέκταση της διάρκειας ζωής των τελικών προϊόντων. Ταυτόχρονα και σε συνέχεια με προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο μας, η επιλογή της πιο αποτελεσματικής ρητίνης στην προσρόφηση και άρα στην απομάκρυνση του υψηλού φαινολικού φορτίου από το απόβλητο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την μείωση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης που προκύπτει από τη διαχείρισή του.

### Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε το υδατικό απόβλητο που προκύπτει από την επεξεργασία της ξηράλατης εκπίκρανσης της επιτραπέζιας ελιάς 'Θρούμπας Θάσου' (THR), μίας μεθόδου η οποία εφαρμόζεται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα στην Ελλάδα. Επομένως, η μελέτη της επεξεργασίας του συγκεκριμένου υποπροϊόντος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε βιοδραστικά (αντιοξειδωτικά) συστατικά, σε σύγκριση με άλλα απόβλητα που προκύπτουν από διαφορετικές μεθόδους εκπίκρανσης της επιτραπέζιας ελιάς (Μακρυγιαννάκης, 2016). Έτσι, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές επεξεργασίας με οκτώ διαφορετικά είδη μακρόπορων πολυμερικών ρητινών τύπου Amberlite XAD: XAD – 4, XAD – 7HP, XAD – 18, XAD – 1180, XAD – 1600, XAD – 16N, XAD – 16HPN και XAD – 761.

Αρχικά, έλαβε χώρα η συγκριτική μελέτη μεταξύ των προαναφερόμενων ρητινών, ως προς τη μάζα των κλασμάτων 'Απόβλητο', 'Έκπλυση' και 'Αποδέσμευση' που αποτελούν τα τρία στάδια της έκλουσης του αποβλήτου εκπίκρανσης από τις ρητίνες. Στη συνέχεια έγινε μελέτη του φυτοχημικού προφίλ, όλων των κλασμάτων που προέκυψαν, με χρωματογραφία HPTLC. Ακολούθησε μελέτη με χημειομετρικές δοκιμασίες, σχετικά με (α) τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού φορτίου των κλασμάτων «Αποδέσμευσης» με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και (β) την αντιοξειδωτική τους δράση με τη χρήση της μεθόδου DPPH, τόσο σε 96-τρυπες πλάκες όσο και με τη χρήση της «βιοαυτογραφίας». Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω μελέτες, επεξεργάστηκαν με βάση την εξίσωση επιθυμητότητας 'Derringer', η οποία συνδυάζοντας τις επιλεγμένες αποκρίσεις 'Απόδοση ανάκτησης', '% Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας DPPH' και 'Ολικό φαινολικό φορτίο - TPC' των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης', αναδεικνύει τον τύπο ρητίνης με τη βέλτιστα αποτελέσματα. Με βάση τα δεδομένα της προαναφερόμενης μελέτης αποδείγτηκε ότι οι ρητίνες Amberlite XAD-761 και XAD-7HP προσφέρουν τα πιο ελπιδοφόρα τελικά εκχυλίσματα. Επιλέγοντας την ΧΑΟ-761, επιχειρήθηκε η μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών έκλουσης και κυρίως η εύρεση του σημείου κορεσμού της. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' των ρητινών με τη τεχνική LC-HRMS-TOF, με σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων συστατικών, αλλά και τη συγκριτική μελέτη του περιεχομένου των εκλουσμάτων των οκτώ δοαφορετικών τύπων ρητίνης.

Λέξεις κλειδιά: απόβλητο, ρητίνη, φαινολικό φορτίο, επιτραπέζιες ελιές

#### Abstract

In the present work the raw material used was the aqueous effluent resulting from the processing of the salt table olive Thruba Thassos (THR), a method almost exclusively applied in Greece. Therefore, the study of the processing of this by-product is of particular interest, as there are indications that it is particularly rich in bioactive (antioxidant) components, compared to other wastes resulting from different methods of debbitering process the table olives (Makrygiannakis, 2016). Thus, processing experiments with eight different types of Amberlite XAD polymeric resins: XAD - 4, XAD - 7HP, XAD - 18, XAD - 1180, XAD - 1600, XAD - 16N, XAD - 16HPN and XAD - 761 were performed.

Initially, a comparative study was carried out between the abovementioned resins in terms of the masses of the "Waste fraction", "Wash fraction" and "Release fraction", which are the three stages of the waste extraction from the resins. A phytochemical profile of all the resulting classes was then investigated by HPTLC chromatography. A chemometric assay was conducted on (a) the determination of the total phenolic charge of the "Release" fractions by the Folin-Ciocalteu method, and (b) their antioxidant activity using the DPPH method, both on 96-well plates as well as with the use of 'bioabography'. The results obtained from the above studies were processed on the basis of an equation resulting from the Derringer's equation, which combines the selected responses "Recovery Percentage", "DPPH free radical neutralization" and "Total phenolic load TPC" of the "Release" fractions, the type of resin with the best results. Based on the data from the above study, Amberlite XAD-761 and XAD-7HP resins offer the most promising final extracts. By choosing XAD-761, the study of optimization of elution conditions and especially of its saturation point was attempted. In addition, analysis of the "Release" fractions of the resins by the LC-HRMS-TOF technique was carried out in order to detect and identify as many components as possible, as well as the comparative study of the content of the eluates of the eight different types of resin.

Keywords: waste, resin, phenolic content, table olives

## Περιεχόμενα

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	ΠΟΔΛΗΤΑ ΕΠΕΔΕΓΙ ΑΖΙΑΖ ΤΓΟΨΙΝΙ\$2Ν	•••••
Н ЕЛІА		•••••
2.1.	Ιστορία της ελιάς	•••••
2.1.1.	Μυθολογία	•••••
2.1.2.	Θάσος	•••••
2.2.	Η ελιά σήμερα	•••••
2.3.	Βοτανικά χαρακτηριστικά	•••••
2.3.1.	Βοτανική ταξινόμηση	•••••
2.3.1.1.	Η άγρια ελιά	•••••
2.3.1.2.	Η καλλιεργούμενη ελιά	•••••
2.3.1.3.	Ο καρπός της ελιάς	•••••
2.4.	Προϊόντα επεξεργασίας ελαιόκαρπου	•••••
2.4.1.	Το ελαιόλαδο	•••••
2.4.2.	Επιτραπέζια ελιά	•••••
2.4.2.1.	Κατάταξη της επιτραπέζιας ελιάς στη παγκόσμια αγορά	•••••
2.4.2.2.	Μέθοδοι επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς	•••••
2.4.2.2	1 Ισπανική μέθοδος	
2.4.2.2	2 Μέθοδος Καλιφόρνιας	
2.4.2.2	3 Φυσικές Μαύρες ελιές – Ελληνική μέθοδος	
2.4.2.2	4Ξηράλατη μέθοδος – Θρούμπας Θάσου	
2.4.2.3.	Υγρά απόβλητα επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς	•••••
2.4.2.3	1Χαρακτηριστικά και σύνθεση υγρών αποβλήτων επιτρ	οαπέζ
ελιάς		
2.4.2.3	2 Διαχείριση υγρών αποβλήτων επιτραπέζιας ελιάς	
2.4.2.3	3 Υφιστάμενη διεργασίες επεξεργασίας των υγρών απο	οβλήτ
της επι	τραπέζιας ελιάς	•••••
2.4.3.	Κυριότερες ομάδες συστατικών ελαιόκαρπου και βιολο	γικές
ιδιότη	τές τους	•••••
2.4.3.1.	Γριτερπένια	•••••
2.4.3.2.	Σεκοϊριδοειδή	•••••
2.4.3.2	1Ολευρωπεΐνη	
2.4.3.3.	Φαινολικές ενώσεις	•••••
2.4.3.3	1 Σημασία φαινολικών για την ελιά	
2.4.3.3	2 Βιολογικές δράσεις φαινολικών	
2.4.3.3	3Φαινολικές αλκοόλες	
2.4.3	.3.3.1 Υδροξυτυροσόλη – Τυροσόλη	
2.4.3.3	4Φαινολικά οξέα	
2.4.3.3	5Φλαβονοειδή	
2.4.3.3	6Λιγνάνια	
2.4.3	.3.6.1 Πινορεσινόλη – 1-Ακετόξυπινορεσινόλη	
2.5.	Ι εχνολογια ρητινων	•••••

2.5.2.1.1Εφαρμογές μακρόπορων ρητινών 7 2.5.2.2. Προσροφητικές μη ιονικές πολυμερικές ρητίνες Amberlite XAD	o
2.5.2.2. Προσροφητικές μη ιονικές πολυμερικές ρητίνες Amberlite XAD	ð
	L
2.5.2.2.1Μακροπορώδη ρητίνη XAD – 761 8	5
2.5.2.2.2Εφαρμογές της μακροπορώδους ρητίνης XAD – 761 8	6
2.6. Χρωματογραφικές μέθοδοι8	8
2.6.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	8
2.6.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)	0
263 - Υνοή γοωματογοαφία-φασματομετοία μάζας (I CMS) 0	ń
2.6.5. Γερη χρωματογραφια-φασματομετρια μαζας (ΕΕΜΕ)	2
2.0.5.1. ME0000051 CA	2
$2.7. \qquad Blowly integrations of the second of the second$	3
2.7.1. Ελεγχος αντιοζειοωτικής ομασής με τη μεσοού	2
οιφαινυλοπικρυλυοραζυλιου (DPPH)	3
2.7.2. Ελεγχος ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά με τη	_
μέθοδο Folin-Ciocalteu (TPC)9	5
2.7.3. Βιοαυτογραφική μέθοδος9	7
2.7.3.1. Βιοαυτογραφική μέθοδος με τη χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPF 	1 8
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	
3. ΥΛΙΚΟ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΚΠΙΚΡΑΝΣΗΣ ΘΡΟΥΜΠΟΕΛΙΑΣ	9
<b>3.1.</b> Διαλύτες9	9
3.2. Τεχνικές επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν10	2
3.2.1. Τεχνική προσρόφησης σε ρητίνες Amberlite XAD10	2
3.2.1.1. Κριτήριο απορρίψεως τιμών πειραματικών δεδομένων που	
προκύπτουν από το πείραμα επεξεργασίας υλικού με τις ρητίνες10	5
3.3. Χρωματογραφικές μέθοδοι10	6
3.3.1. Χρωματογραφικά αντιδραστήρια10	6
3.3.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	6
3.3.3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)	,
10 	6
<b>334</b> Υνοή γοωματογοαωία-ωασματομετοία μάζας (LCMS) 10	7
3 3 4 1 Αναλυτική διαδικασία HR-FSI(-)MS	7
$3.4 \qquad Biolowicz Sociuje 11$	' ?
3.41   T) a mos a music base a first so for a number of the second sec	4
5.4.1. Ελεγχος αντιοςειοωτικής ομασής με τη μεσοου	2
342 Element of more than $342$ Element of more than $342$	4
5.4.2. Ελεγχος ολικου περιεχομενου σε φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocolteu (TPC)	2
3/3 Program avagant uter $40000$ res and $20000$ res and $20000$	4
3.4.3. Βισαυτογραφική μεσοσος με τη χρηση της εκευσερής ρίζας ΠΟΡΗ	2
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	,
<b>4. ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>	4
4.1. Μέτοηση Ξηρού βάρους μακρόπορων πολυμερικών ουτινών	
	_

4.2. Μέτρηση μάζας ολικού οργανικού φορτιού (Ο.Ο.Φ) αρχικού δείγματος αποβλήτου.....122 Αυοφιλοποποίηση & Έκπλυση υλικού αποβλήτου εκπίκρανσης 4.2.1. THR Υγρή- υγρή εκγύλιση υλικού αποβλήτου εκπίκρανσης THR.123 4.2.2. 4.2.3. Σύγκριση ανάκτησης οργανικού φορτίου, από την επεξεργασία του THR με υγρή-υγρή εκχύλιση και λυοφιλοποίηση ......125 Φυσικογημικά χαρακτηριστικά των ρητινών Amberlite XAD<sup>™</sup> 4.3. **που χρησιμοποιήθηκαν** ......126 Δοκιμασία οκτώ τύπων ρητινών Amberlite XAD<sup>®</sup> για την 4.4. επεξεργασία του υδατικού αποβλήτου Θρούμπας Θάσου (THR)......127 4.4.1. 4.4.2. 4.4.3. 4.4.4. 4.4.5. 4.4.6. 4.4.7. 4.4.8. Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων ξηρού βάρους κλασμάτων. 4.5.1. 4.6. Σύγκριση φυτοχημικού & αντιοξειδωτικού προφίλ των κλασμάτων 'Απόβλητο', 'Έκπλυση' και 'Αποδέσμευση' σε όλες τις ρητίνες με ΗΡΤLC ......140 **Βιολογικές δοκιμές DPPH & TPC στα κλάσματα** 4.6.1. «Αποδέσμευσης» των ρητινών.....151 Αξιολόγηση της επαναληψιμότητας των κλασμάτων 4.6.2. 'Απόβλητο', 'Έκπλυση' και 'Αποδέσμευση' των ρητινών Amberlite ΧΑD με επιλογή των ΧΑD-4, ΧΑD-7ΗΡ και ΧΑD-761 με τη χρήση Αξιολόγηση ρητινών βάση της εξίσωση επιθυμητότητας ......157 4.7. Εύρεση ορίου κορεσμού και βελτιστοποίηση των συνθηκών 4.8. έκλουσης για την ρητίνη Amberlite XAD-761......161 1η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκους 4.8.1. αποβλήτου από 20mL έως 240mL ......162 2η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα 4.8.2. κλασματοποίησης με όγκο αποβλήτου 300mL ......165 4.8.3. 3η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκο 4η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκο 4.8.4. 5<sup>η</sup> πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκο 4.8.5. 4.9. Πείραμα των procedural Blanks όλων των ρητινών......179 Βιολογικές δοκιμές DPPH & TPC κλασμάτων 4.9.1. «Αποδέσμευσης» procedural Blank ρητινών ......180

4.10	LC-HRESI-MS ανάλυση των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' και
των	«τυφλών» (procedural blanks) όλων των ρητινών
4.10	1. Ανίχνευση περιεχόμενων συστατικών στα επεξεργασμένα
κλά	σματα 'Αποδέσμευσης' με LC-HR(ESI-)-MS (στοχευμένη ανάλυση)
4.10	2. LC-HRMS ανάλυση των «τυφλών» δειγμάτων (procedural
blan	ks) των ρητινών196
4.11	Συνολικά Αποτελέσματα – Συμπεράσματα
4.12	Μελλοντικοί Στόχοι - Προοπτικές
ΒΙΒΛΙΟΓΑΦ	DIA

# Θεωρητικό Μέρος

### 1. Υγρά απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων

Η ολοένα ταχύτερη παγκόσμια πληθυσμιακή άνοδος και η επακόλουθη αύξηση στην παραγωγή τροφίμων, με σκοπό την κάλυψη των αναγκών τηες κοινωνίας, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή όλο και μεγαλύτερων ποσοτήτων αποβλήτων στη βιομηχανία τροφίμων,. Η ταχεία αστικοποίηση, σε συνδυασμό με την αργή εξέλιξη στην ανάπτυξη και τη διαχείριση αποβλήτων και την έλλειψη μέτρων αποτελεσματικής διαχείρισής τους, έχει οδηγήσει στην ανεπαρκή εκμετάλλευση και τη συσσώρευσή τους. Έρευνα της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2010 απεκάλυψε ότι περισσότερα από 90 εκατομμύρια τόνων αποβλήτων απορρίπτονται από τη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων κάθε χρόνο (Di Mauro *et al.*, 2017; Ravindran and Jaiswal, 2016).

Η νομοθεσία σχετικά με τη διαχείριση αποβλήτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση ξεκίνησε το 1970 με την Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα, πρόδρομο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, να προσπαθεί να ορίσει το «απόβλητο» ως βάση για την εκπόνηση νομοθεσίας και κανονισμών όσον αφορά την παραγωγή, το χειρισμό, την αποθήκευση, τη μεταφορά και τη διάθεση των αποβλήτων, ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία και το περιβάλλον. Σύμφωνα με τη νομοθεσία, τα απόβλητα τροφίμων διαχειρίζονται με τον ίδιο τρόπο όπως τα ευρύτερα απόβλητα, υπό την προϋπόθεση ότι δεν αποκτούν ιδιότητες, οι οποίες τα καθιστούν επιβλαβή (European Parliament and Council, 2008).

Η οδηγία 2008/98/ΕΚ εγκρίθηκε με σκοπό την εισαγωγή μιας νέας προσέγγισης διαχείρισης των αποβλήτων. Σύμφωνα με αυτή, υποστηρίζεται η πρόληψη παραγωγής αποβλήτων, καθώς και η επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση αυτών, αναφέροντας ως τελευταία εναλλακτική την εναπόθεσή τους στο περιβάλλον (**Eικ.** <u>1</u>). Οι κύριοι στόχοι που τέθηκαν σχετικά με τα απόβλητα τροφίμων είναι: (α) να πραγματοποιείται ξεχωριστή συλλογή τους, (β) να εξασφαλίζεται με την επεξεργασία τους η προστασία του περιβάλλοντος και (γ) να αναπτύσσονται τεχνικές διαχείρισης προς παραγωγή μη επιβλαβών περιβαλλοντικά προϊόντων. Το 2010, η κομποστοποίηση και η αναερόβια χώνεψη αποτέλεσαν πολλά υποσχόμενα μέτρα διαχείρισης των αποβλήτων, κάτι που όμως σταμάτησε να υποστηρίζεται τα επόμενα χρόνια (Ravindran and Jaiswal, 2016).



Εικ. 1: Ιεραρχία πορείας διαγείρισης αποβλήτων (Ravindran and Jaiswal, 2016)

Η συστηματική ενασχόληση της επιστημονικής κοινότητας με τα απόβλητα τροφίμων άρχισε το 1990 (Mirabella et al., 2014). Πλέον κύριος στόχος της διαχείρισης των αποβλήτων από τρόφιμα αποτελεί η παραγωγή προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη αξία. Στα πλαίσια αυτά έχουν αναπτυχθεί διάφοροι όροι, όπως ο όρος «βιοοικονομία -Food waste to value» (αξιοποίηση αποβλήτων που προκύπτουν από τρόφιμα) και ο όρος «zerowaste κοινωνία και οικονομία» (κοινωνία και οικονομία όπου δεν υπάρχουν απόβλητα – κοινωνία μηδενικών αποβλήτων), μεταξύ των οποίων ο πρώτος αποτελεί μια νέα ιδέα που θεσπίστηκε από την ΕΕ το 2012 για την υποστήριξη μετατροπής ανανεώσιμων πηγών ενέργειας σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας και βιοενέργεια. Βασίζεται σε τρεις βασικούς πυλώνες: (i) επενδύσεις στην έρευνα, την καινοτομία και τις δεξιότητες, (ii) ενίσχυση της πολιτικής αλληλεπίδρασης και (iii) ενίσχυση της αγοράς και της ανταγωνιστικότητας (Ravindran and Jaiswal, 2016). Ο δεύτερος όρος, εκφράζει την 'αξιοποίηση' ως μια ευρέως αποδεκτή έννοια στον τομέα διαχείρισης των αποβλήτων που προέρχονται από την επεξεργασία τροφίμων, προάγοντας τις αρχές της αειφόρου ανάπτυξη. Επίσης, η επιδίωξη για μια κοινωνία και μια οικονομία «μηδενικών αποβλήτων» προωθεί την ιδέα χρήσης των αποβλήτων ως πρώτη ύλη για νέες εφαρμογές (Mirabella et al., 2014). Κύριοι στόχοι αξιοποίησης των αποβλήτων από την επεξεργασία τροφίμων είναι οι απαντήσεις σε θέματα που αφορούν την αυξανόμενη ζήτηση τροφίμων, την εξάντληση των φυσικών πόρων, τον αντίκτυπο στο περιβάλλον, την κλιματική αλλαγή καθώς και τη μετέπειτα ανάκτηση εμπορικής αξίας συστατικών (Di Mauro et al., 2017). Απώτερος στόχος είναι η διαχείριση των αποβλήτων να προσφέρει οφέλη στην βιομηχανία, το περιβάλλον και την κοινωνία (Hang et al., 2004).

Στις επιχειρήσεις επεξεργασίας τροφίμων, λοιπόν, τα απόβλητα παράγονται κατά τον διαχωρισμό επιθυμητών προϊόντων από μη επιθυμητά προϊόντα, γνωστά ως πάραπροϊόντα ή απόβλητα (by-products ή wastes). Πολυάριθμες είναι οι προσπάθειες για τη διαχείριση των αποβλήτων από την επεξεργασία τροφίμων (Food Processing Waste -FPW). Τα FPW μπορούν να είναι σε στερεή, υγρή ή ημι-στερεή μορφή. Τα υγρά απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων (Food Processing Wastewater - FPWW) είναι αποτέλεσμα της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων νερού σε διάφορα στάδια επεξεργασίας (όπως ο έλεγχος θερμοκρασίας, το πλύσιμο για απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών, η μεταφορά, κ.ά.). Το περιεχόμενο των αποβλήτων αποτελείται από στερεά, οργανικά στοιχεία και άζωτο, λίπη, έλαια και ανόργανα στοιχεία. Παραδείγματα FPWW αποτελούν ο ορός πρωτεΐνης που προκύπτει κατά την επεξεργασία τυριού και γιαουρτιού, υγρά απόβλητα στη βιομηγανία αρτοποιίας, σόδας, επεξεργασίας πατάτας και μήλου, καθώς και τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων και της επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς. Κάποια από τα κύρια στερεά απόβλητα προκύπτουν από την επεξεργασία τομάτας, μήλου, πατάτας, κατά την οινοποίηση, καθώς και από την επεξεργασία προϊόντων ελαιοκομίας (Hegde et al., 2018). Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων FPW έχει αντίκτυπο στο περιβάλλον, όπως το νερό, το έδαφος, την βιοποικιλότητα της χλωρίδας και της πανίδας των περιοχών στις οποίες απορρίπτονται, προκαλώντας μολύνσεις, δυσάρεστες οσμές και άλλα περιβαλλοντικά προβλήματα, καθώς λόγω του πλούσιου θρεπτικού περιεχομένου τους αποτελούν πηγή βακτηριακής ανάπτυξης (Van Dyk et al., 2013). Λόγω περιβαλλοντικών ανησυχιών, επιδιώκεται η μείωση και η διαχείριση των παραγόμενων αποβλήτων κατά την επεξεργασία τροφίμων μέσω της ανάπτυξης νέων μεθόδων. Πολλές τεχνικές επεξεργασίας, φυσικές, χημικές ή και συνδυασμός των δύο, εφαρμόζονται ώστε να καταστούν τα υγρά απόβλητα ικανά για απόρριψη. Κύριες είναι είτε η βιολογική επεξεργασία και η απόρριψη σε χώρους υγειονομικής ταφής, κάτι το οποίο φορολογείται σε κάποιες χώρες και προσθέτει κόστος στη διαδικασία διαγείρισής τους, είτε η χρήση για πότισμα εφόσον επιδιώκεται η επαναχρησιμοποίησή τους (Blaschek, 1992; Hang, 2004; Sean X. Liu, 2014; Van Dyk et al., 2013). Τα FPWW μπορούν να θεωρούνται μη τοξικά, όταν είναι ελεύθερα από επιβλαβή και μη-βιοαποικοδομήσιμα υλικά. Το κύριο περιεχόμενό τους είναι το οργανικό φορτίο, το οποίο λόγω της υψηλής

συγκέντρωσης καθιστά το απόβλητο επιβλαβές (Blaschek, 1992). Το οργανικό φορτίο εκφράζεται ως η ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την οξείδωση όλου του οργανικού περιεχομένου (chemical oxygen demand - COD). Έχει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του αποβλήτου και την ανάκτηση της εμπορικής αξίας προϊόντων, καθώς όσο πιο υψηλό είναι, τόσο υψηλότερη είναι η διατροφική αξία του αποβλήτου, αλλά τόσο είναι πιο δύσκολη και η επεξεργασία του. Ωστόσο, πριν την οποιαδήποτε επεξεργασία αποβλήτων για την παραγωγή προϊόντων, απαιτείται να γίνει ο χαρακτηρισμός της ποσότητας και του τύπου των εμπεριεχόμενων μακροστοιχείων (Hegde et al., 2018; Mirabella et al., 2014). Η αξιοποίηση των FPW για την ανάπτυξη εμπορικών προϊόντων όχι μόνο προσφέρει οικονομικά οφέλη, αλλά και μία λύση στα προβλήματα που προκαλούνται από τη διαδικασία απόρριψής τους στο περιβάλλον (Sean X. Liu, 2014). Πολλές είναι οι εναλλακτικές για τη διαχείριση των FPW, καθώς διάφορα από τα εμπορικά προϊόντα που έχουν παραχθεί μέσω αυτών των επεξεργασιών είναι βιοκαύσιμα, ένζυμα, οργανικά οξέα, βιοπολυμερή, θρεπτικά συστατικά και διαιτητικές ίνες και γενικά συστατικά εμπορικής αξίας, τα οποία μπορούν να τύχουν πολλών εφαρμογών για ανθρώπινη χρήση (όπως αντιοξειδωτικά, πολυσακχαρίτες, έλαια, χρωστικές, αρωματικές ουσίες, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, για ζωική χρήση, ως λιπάσματα κ.α.) (Hang, 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ανάκτηση προστιθέμενης αξίας χημικών συστατικών όπως τα αντιοξειδωτικά και οι διαιτητικές ίνες από απόβλητα προερχόμενα από επεξεργασία φυτικών υλικών, αποτελεί ένα τομέα που αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον και πλέον είναι τόσο δημοφιλής όσο η παραγωγή βιοκαυσίμων (Ravindran and Jaiswal, 2016; Hegde et al., 2018).

Μια ιδιαίτερα σημαντική γεωργική - βιομηχανική δραστηριότητα για την οικονομία πολλών Μεσογειακών χωρών, η οποία σχετίζεται με την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων αποβλήτων, αποτελεί η επεξεργασία των κύριων προϊόντων ελιάς: του ελαιόλαδου και της επιτραπέζιας ελιάς. Τα απόβλητα που παράγονται κατά την επεξεργασία αυτή, έχουν βρεθεί να είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά, παρουσιάζοντας σημαντικό βιολογικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον, χάρη στις αντιοξειδωτικές και όχι μόνο ιδιότητες τους. Ποσοτικές και ποιοτικές αναλύσεις των έχουν δείξει ότι τα προαναφερόμενα απόβλητα θα μπορούσαν, χάρη στο περιεχόμενό τους, να αποτελέσουν σημαντικές φυσικές πηγές φαινολικών συστατικών, οι οποίες μετά από κατάλληλη επεξεργασία ανάκτησης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά τροφίμων, ή ως συστατικά διατροφικών προϊόντων με φαρμακολογικές ιδιότητες («nutraceuticals»), ή σε λειτουργικά τρόφιμα («functional foods») χάρη στις τεχνολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες τους (Mirabella et al., 2014). Πολυάριθμές είναι οι έρευνες στις οποίες οι θρεπτικές και υψηλής εμπορικής αξίας βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από διάφορα τμήματα του ελαιόδεντρου και των παραπροϊόντων επεξεργασίας του καρπού του, καθώς και οι βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητές τους (Ghanbari et al., 2012).

### **2.** Η Ελιά

#### 2.1. Ιστορία της ελιάς

Η ιστορία της ελιάς χάνεται στα βάθη των αιώνων. Το δέντρο της ελιάς (Olea europea L.), αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και από αρχαιοτάτων χρόνων καλλιεργούμενα δέντρα των Μεσογειακών χωρών (Loumou and Giourga, 2003). Αποτελεί ακόμα και σήμερα σύμβολο ειρήνης μεταξύ των πολιτισμών. Η προέλευση της ελιάς θεωρείται ότι ξεκινάει από τη Συρία ή και από την Αφρική. Βάση αρχαιολογικών και γενετικών μελετών η καλλιέργειά της φτάνει μέχρι και 6000 χρόνια πριν, επεκτεινόμενη στις χώρες της Μεσογείου, από τη Μέση Ανατολή μέχρι τη Συρία και την Τουρκία (Diez et al., 2015)(Vossen, 2007). Η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώθηκε χάρη στις ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου και την υψηλή οικονομική του αξία, στην Αίγυπτο, τη Γαλλία, το Ισραήλ, την Ιταλία, το Λίβανο, το Μαρόκο και την Τυνησία. Ακόμα, έχει επεκταθεί στη Χιλή, την Καραϊβική, το Περού, την Αργεντινή, τη Βραζιλία, το Μεξικό και την Καλιφόρνια, καθώς επίσης και στην Κίνα, την Αυστραλία και την Αφρική (Rhizopoulou, 2007).

Βάση καταγραφών, ελαιοτριβεία, δοχεία αποθήκευσης και άλλα σχετιζόμενα ευρήματα έχουν βρεθεί στην Ελλάδα, την Αίγυπτο και την Τουρκία. Παράδειγμα αποτελεί το παλάτι της Κνωσού, όπου πολυάριθμες είναι οι αναπαραστάσεις με στοιχεία ελιάς. Οι Φοίνικες (1000 π.Χ.) και οι Έλληνες φαίνεται να συνέβαλαν στη διάδοση της καλλιέργειας από την Ισπανία στη Βόρεια Αφρική και την Ιταλία

αντίστοιχα, ενώ οι Ρωμαίοι συνετέλεσαν στην εξάπλωση της καλλιέργειας σε όλη της περιοχή της Μεσογείου. Κατά το Μεσαίωνα, η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώνεται σημαντικά στην Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της ελιάς Γραμμική Β γραφή



χρονολογείται για πάνω από 3.500 χρόνια (Loumou and Giourga, 2003), καθώς έχουν βρεθεί αναπαραστάσεις των λέξεων ελιά, ελαιολάδου και ελαιοκάρπου στη β' γραμμική γραφή (**Εικ. 2**). Το 19° και τον 20° αιώνα έφτασε



Εικ. 3: Ψηφιδωτό κλάδου ελιάς

να αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες καθώς αποτελεί πηγή ενέργειας και διατροφής. Οι Μεσογειακές χώρες κατέχουν το 95% της παγκόσμιας καλλιέργειας ελαιόδεντρων (Loumou and Giourga, 2003) (Vossen, 2007) (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).

Οι ποικιλίες της καλλιεργήσιμης ελιάς είναι πάρα πολλές και πολύ σύνηθες είναι πολλές χώρες να έχουν τις ίδιες ποικιλίες με διαφορετικά ονόματα ή ακόμα και διαφορετικές ποικιλίες με ίδια ονόματα.



Εικ. 4: Αναπαράσταση μαζέματος ελιάς κατά την αρχαιότητα.

Για πολλά χρόνια οι ελιές χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή λαδιού ως υλικό καύσης στη παραγωγή φωτός και τη μαγειρική, καθώς και στο εμπόριο ως βάση για φαρμακευτικές αλοιφές και καλλυντικά για το δέρμα και τα μαλλιά (Vossen, 2007). Τα βασικά διατροφικά στοιχεία της Μεσογειακής διατροφής είναι το κριθάρι, τα κρασί και το ελαιόλαδο. Ακόμα, η ελιά αποτελεί αναπόσπαστο

στοιχείο της θρησκείας, όπως φαίνεται και από την αναφορά στη Βίβλο και το Κοράνι ως το πιο ιερό, σεβαστό και λατρευτό δέντρο (Rhizopoulou, 2007). Από τον 7° αιώνα π.Χ. στους Ολυμπιακούς αγώνες, οι ολυμπιονίκες στεφανώνονταν με στεφάνι κατασκευασμένο από κλαδί ελιάς. Επίσης, αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της τέχνης (Kapellakis et al., 2008).



Εικ. 6: Μία από τις δέκα ελιές του Van Gogh



Εικ. 5: Αναπαράσταση ολυμπιονίκη ο οποίος στεφανώνεται με στεφάνι κλάδου ελιάς

#### 2.1.1. Μυθολογία

Η ελιά αποτελούσε σύμβολο ολόκληρης της Μεσογείου εκ αρχαιοτάτων χρόνων, ενώ ο ελαιόκαρπος αποτελούσε πηγή τροφής και ελαιολάδου. Μεγάλος ήταν ο σεβασμός ως προς το δέντρο της ελιάς, το οποίο μαζί με το δέντρο της δρυός αποτελούσαν τα δύο πιο σημαντικά δέντρα της ελληνικής μυθολογίας.

Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία, η σημερινή πρωτεύουσα της Ελλάδας έχει το όνομα της θεάς Αθηνάς. Την εποχή εκείνη, οι θεοί αποφάσισαν να λάβουν υπό την προστασία τους τις πόλεις της Ελλάδας, ώστε να χτίζουν οι άνθρωποι ναούς και να τους προσφέρουν θυσίες. Για την πόλη της Αθήνας, αντιμέτωποι βρέθηκαν η Αθηνά και ο Ποσειδώνας. Για τη λήψη του τίτλου του προστάτη της πόλης, άρχισαν έναν αγώνα μεταξύ τους, με



Εικ. 8: Αγγειογραφία που αναπαριστά τη διαμάχη του θεού Ποσειδώνα και της <u>θεάς Αθηνάς για την ονομασία της</u> <u>πόλης της Αθήνας</u>

κριτήριο ποιος θα κάνει το πιο χρήσιμο δώρο στη πόλη. Βασιλιάς της Αθήνας τότε ήταν ο Κέκροπας, ο οποίος θεωρείται μάρτυρας ή/ και κριτής της φιλονικίας μαζί με τους άλλους 10 θεούς. Οι αντίπαλοι ανέβηκαν στον βράχο της Ακρόπολης, παρουσία των θεών. Πρώτος ο Ποσειδώνας, στάθηκε στη μέση του βράχου και με την τρίαινά του έδωσε ένα δυνατό χτύπημα στο έδαφος, απ' όπου ξεπήδησε ένα κύμα αλμυρού νερού που σχημάτισε μια λίμνη, την «Ερεχθηίδα θάλασσα». Η Αθηνά, με τη σειρά της, αφού κάλεσε και τον Κέκροπα ως μάρτυρα, φύτεψε μια ελιά πάνω στον βράχο, που ξεπετάχτηκε γεμάτη καρπό. Επρόκειτο για ένα δέντρο που θα σωζόταν για πολλά χρόνια αργότερα. Έπειτα, ο Δίας κήρυξε το τέλος του αγώνα και είπε στους άλλους



Εικ. 7: Αναπαράσταση δυτικού αετώματος Παρθενώνα, διαμάχης μεταξύ της Αθηνάς και του Ποσειδώνα για τη διεκδίκηση της Αθήνας

θεούς να κρίνουν σε ποιον θα δοθεί η πόλη. Συγχρόνως ζήτησαν τη μαρτυρία και τη γνώμη του Κέκροπα. Αυτός από το βράχο ψηλά έριξε μια ματιά τριγύρω, αλλά όπου να γύριζε, τα μάτια του αντίκριζαν αλμυρό νερό. Το δέντρο όμως που είχε κάνει η Αθηνά να

φυτρώσει ήταν το πρώτο σε όλη τη χώρα και αποτελούσε για την πόλη μια υπόσχεση για πλούτο, δόξα και ευτυχία. Κρίθηκε λοιπόν ότι το δώρο της Αθηνάς ήταν πιο χρήσιμο και της δόθηκε η κυριαρχία της πόλης. Από την πρώτη ελιά της Αθηνάς

θεωρείται πως βλάστησαν όλα τα άλλα ελαιόδενδρα της ελληνικής γης, όπως και οι δώδεκα ελιές της Ακαδημίας του Πλάτωνος, καθώς και ο Ελαιώνας των Αθηνών. Έτσι, γεννήθηκε η μυθολογία γύρω από την ελιά και το ελαιόλαδο, τα οποία χαρακτηρίζονται ως «θεϊκά χαρίσματα» ( Κακριδής, 1987; Loumou and Giourga, 2003).

Άλλος ένα μύθος γύρω από την ελιά αναφέρει ότι ο Ηρακλής, όντας νέος σε ηλικία, κατάφερε να νικήσει το λιοντάρι της Νεμέας χρησιμοποιώντας μόνο τα χέρια του και το ρόπαλό του το οποίο ήταν κατασκευασμένο από ξύλο αγριελιάς. Έτσι το δέντρο της ελιάς συνδέθηκε με δύναμη και αντοχή.



#### 2.1.2. Θάσος

Η Θάσος είναι ένα νησί του Βόρειου Αιγαίου. Σύμφωνα με το μύθο, ο βασιλιάς Αγήνωρ της Φοινίκης και η σύζυγός του Τηλεφάσσα, απέκτησαν τέσσερις γιούς, τον Κάδμο, το Φαίνικα, τον Κίλικα και το Θάσο, καθώς και μια κόρη, την Ευρώπη. Μετά την απαγωγή της Ευρώπης από το θεό Δία, ο βασιλιάς Αγήνωρ διέταξε τους γιους του να αναζητήσουν την αδερφή τους και να μην επιστρέψουν αν δεν τη βρουν. Τα αδέρφια δεν είχαν τύχη στην προσπάθεια αναζήτησης για τη χαμένη τους αδερφή και αποφάσισαν να εγκατασταθούν σε άλλους τόπους, μη μπορώντας να επιστρέψουν χωρίς την Ευρώπη. Στους τόπους αυτούς ίδρυσαν αποικίες και πόλεις με τα ονόματα τους. Από εκεί πήρε το όνομα της η νήσος Θάσος. Η Θάσος από αρχαιοτάτων χρόνων είναι γνωστή ελαιοπαραγωγός περιοχή με την πιο χαρακτηριστική ποικιλία του νησιού να είναι η ελιά θρούμπα.

#### 2.2. Η ελιά σήμερα

Η ελιά (Olea europea) είναι ευρέως καλλιεργούμενη για την παραγωγή ελαιολάδου και επιτραπέζιας ελιάς και έχει μεγάλη οικονομική σημασία. Οι επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διατροφής, αλλά καταναλώνονται ευρέως και σε όλο τον κόσμο. Σήμερα όλο και μεγαλύτερο γίνεται το ενδιαφέρον για τη μεσογειακή διατροφή και τα τρόφιμα που περιλαμβάνονται σε αυτή, καθώς πολυάριθμες είναι οι ευεργετικές ιδιότητες που αποδίδονται σε αυτή σχετικά με την πρόληψη διαφόρων παθήσεων (Boskou, 2015). Οι θρεπτικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των προϊόντων ελιάς αποδίδονται στο υψηλό φαινολικό περιεχόμενό τους, το οποίο είναι αυτό που προσδίδει τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά και αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά του (Uylaşer and Yildiz, 2014).

Όσον αφορά φαρμακευτικές χρήσεις των προϊόντων ελιας, το εκχύλισμα των φύλλων, στην παραδοσιακή ιατρική έχει χρησιμοποιηθεί ως διουρητικό, ρυθμιστικό του καρδιαγγειακού συστήματος, ρυθμιστικό της ρηνικής συμφώρησης. Επίσης, αναφέρεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση του ανοσσοποιητικού συστήματος, ως αντιμικροβιακό, αντιικό, αντιοξειδωτικό, ως υπογλυκαιμικός παράγοντας και σε καρδιαγγειακά προβλήματα. Επίσης, πολυάρυθμες είναι οι μελέτες στον ΕΜΑ και σχετίζονται που αναφέρονται με τις μυοχαλαρωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιικές, αντιοξειδωτικές, αντιπολλαπλασιαστικές, αντιυπεργλυκαιμικές, υπολιπιδαιμικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες (EMA, 2017). Τα φύλλα ελιάς, βάση ΕΜΑ, φαρμοκολογικά αναγνωρίζονται ως παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν, που χρησιμοποιείται για να προάγει τη διούρηση, σε συνθήκες ήπιας κατακράτησης υγρών. Όλες οι δράσεις αποδίδονται στα βιοδραστικά συστατικά που εμπεριέχονται τόσο στα φύλλα, όσο και στο ελαιόλαδο και το ελαιόκαρπο. Το ελαιόλαδο, χρησιμοποιούταν από παλιά καρδιοπροστατευτικό, ως γαστροπροστατευτικό και εντεροπροστατευτικό. Επίσης ο καρπός της ελιάς χρησιμοποιείται ως φορέας των παραπάνω ευεργετικών επιδράσεων. Επομένως, τα προϊόντα ελιάς γάρις στο φαινολικό περιεγόμενο τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή και υγεία, καθώς παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και έχουν ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, οι φαινόλες αποτελού φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων (Uylaşer and Yildiz, 2014) (Gilani et al., 2006).

Τα εμπορικά προϊόντα ελιάς προέρχονται από ελιές του γένους Olea europea subsp. europea var. europea και μόνο αυτό το υποείδος του γένους Olea παράγει βρώσιμους καρπούς (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).

Χάρη στο μεγάλο ενδιαφέρον για τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στην ελιά και τα προϊόντα της, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) το 2011 έχει αναφέρει τους ισχυρισμούς υγείας οι οποίοι τους αποδίδονται και είναι οι ακόλουθοι (Panel and Nda, 2011):

- «Προστασία σωματιδίων LDL από την οξειδωτική βλάβη»
- «Διατήρηση των συγκεντρώσεων HDL στο αίμα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις»
- «Διατήρηση πίεσης αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα»
- «Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (σχετικά με την οστεοαρθρίτιδα και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα)»
- «Συμβολή στην υγεία του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος»
- «Συμβολή στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του γαστρεντερικού σωλήνα»
- «Συμβολή στην προστασία του σώματος από εξωτερικούς παράγοντες».

### 2.3. Βοτανικά χαρακτηριστικά

#### 2.3.1. Βοτανική ταξινόμηση

Οι απόψεις για τη γενετική προέλευση της καλλιεργούμενης ελιάς διίστανται. Πολλοί υποστηρίζουν ότι η Ευρωπαϊκή ελιά είναι αυτή που παράγει το βρώσιμο καρπό και πιστεύεται ότι αποτελεί υβρίδιο ενός ή περισσότερων ειδών. Άλλοι υποστηρίζουν ότι το γένος *Olea* και το είδος *O. europea* αντιπροσωπεύουν μια ομάδα διαφορετικών φυτών με υποείδη που απαντώνται σε διαφορετικές περιοχές (Vossen, 2007).

Η ελιά (Olea europea L.) ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, η οποία περιέχει 30 γένη και 600 είδη. Τα γένη εξαπλώνονται από την Ευρώπη μέχρι την Ασία και την Αφρική. Η μεσογειακή Olea europea subsp. europea, περιλαμβάνει την άγρια ποικιλία (Olea europea subsp. europea var. sylvestris) και την καλλιεργούμενη ποικιλία (Olea europea subsp. europea var. europea).

Τα γένη της οικογένειας Oleaceae είναι τα ακόλουθα: Fraxinus (ash), Forsythia (golden bell), Forestiera (F. neomexicana, η καλιφορνέζικη άγρια ελιά), Ligustrum (privet), Syringa (lilac) και Olea (ελιά). Όλα τα είδη του γένους Olea έχουν τον ίδιο

αριθμό χρωμοσωμάτων (46) και οι διασταυρώσεις μεταξύ τους έχουν συνήθως επιτυχία (Vossen, 2007). Η βοτανική ταξινόμηση του συμπλέγματος Olea europea, όπου αναγνωρίζονται έξι υποείδη, καταγράφονται στον Σφάλμα! Λανθασμένη αναφορά σελιδοδείκτη στον εαυτό του. (Adriana Chiappetta et al, 2012).

#### Πίν. 1: Ταξινομική κατάταξη της Olea europea L

Kingdom: Plantae Phylum: Class: Order:

Magnoliophyta Rosopsida Lamiales

Family: Oleaceae Oleideae Sub-family:



Genus: Olea

Sub-genera:

Paniculatae Tetrapilus Olea

#### Sections:Ligustroides

Olea

Sub-species:

cuspidata laperrinei maroccana cerasiformis guanchica europaea varieties: sylvestris (wild olive) europaea (cultivated olive)

#### **2.3.1.1.** Η άγρια ελιά

Από τα πολυάριθμα είδη ελαιόδεντρου, δύο προϋπήρχαν των άλλων και αυτά είναι η άγρια ελιά (Olea europea subsp. europea var. sylvestris) και η καλλιεργούμενη ελιά (Olea europea subsp. europea var. europaea) (Uylaşer and Yildiz, 2014). Η ποικιλία Olea europea subsp. europea var. sylvestris είναι ένα συνηθισμένο δέντρο των Μεσογειακών περιοχών και δασών. Το δέντρο είναι δρυς και η διάρκεια ζωής του μπορεί να υπερβεί τα 1000 χρόνια. Ο κορμός συνήθως είναι περιστρεφόμενος και μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 15 μέτρα σε ύψος. Τα κλαδιά είναι πολυάριθμα και η θέση τους όρθια, προς τα κάτω ή και ενδιάμεση. Ο φλοιός είναι γκρίζου χρώματος, περισσότερο ή λιγότερο μαλακός στα νεαρά δέντρα και γίνεται τραχύς με το πέρας των χρόνων. Τα φύλλα είναι αντίθετα, με υφή δέρματος και μαλακά στο περιθώριο. Το έλασμα είναι ελλειψοειδούς σχήματος και πράσινο, γυαλιστερό, με μικρές ασημί αποχρώσεις. Τα άνθη είναι λευκά, πολυάριθμα και ομαδοποιημένα σε ταξιανθίες. Ο κάλυκας έχει τέσσερα ωοειδή φύλλα και η λευκή στεφάνη αποτελείται από τέσσερα πέταλα. Υπάρχουν δύο στήμονες ανά άνθος, το στίγμα είναι αμφιβληστροειδούς σχήματος και οι ωοθήκες έχουν τέσσερις κόγχες. Ο καρπός είναι ωοειδής- σφαιρικού σχήματος, με διάμετρο 10-15 mm, πράσινος ενώ σκουραίνει κατά την ωρίμανση. Το ενδοκάρπιο είναι σκληρό και ξυλώδες, με έναν ή δύο σπόρους (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).

#### 2.3.1.2. Η καλλιεργούμενη ελιά

Η ποικιλία Olea europea subsp. europea var. europaea είναι ένα δέντρο αειθαλές,



Εικ. 10: Σχηματική απεικόνηση ελιάς

διατηρεί τα φύλλα του για τρία χρόνια, ενώ κάθε χρόνο ανανεώνει μερικώς μέρος αυτών. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό και επιβιώνει σε περιοχές με ελάχιστες βροχοπτώσεις. Είναι δέντρο ερμαφρόδιτο που ανθίζει την άνοιξη. Τα άνθη παράγουν τη γύρη και επικονιάζονται με τον άνεμο. Η ελιά λοιπόν, ευδοκιμεί και καρποφορεί σε ξηροθερμικές περιοχές αλλά και σε πετρώδη, άγονα εδάφη ή ακόμα και σε αμμώδη εδάφη. Το δέντρο της ελιάς απαιτεί ψυχρές, ζεστές και ξηρές συνθήκες, δεν προτιμά την υγρασία κατά την ανθοφορία και οδηγεί σε καλύτερη παραγωγή

μετά από συνθήκες στρες. Για το λόγο αυτό, το δέντρο της ελιάς ανέκαθεν επιβίωνε σε περιοχές όπου δύσκολα επιβιώνουν άλλες καλλιέργειες (Vossen, 2007). Σε περιοχές

γόνιμες και αρδευόμενες, το δέντρο της ελιάς έχει μεγάλη απόδοση και παρουσιάζει γρήγορη και πλούσια ανάπτυξη. Το ελαιόδεντρο έχει την ικανότητα να βλασταίνει ξανά, ακόμα και αν τραυματιστεί ή καταστραφεί το υπέργειο τμήμα του.

Η καλλιεργούμενη ελιά μπορεί να φτάσει το ύψος των 15-20m. Ο φλοιός είναι γκριζωπός, περισσότερο ή λιγότερο αδρός, ανάλογα με την ηλικία του δέντρου. Τα κλαδιά είναι πολυάριθμα χωρίς αγκάθια. Το ριζικό σύστημα είναι ρηχό και εξαπλώνεται σε 0,9-1,2m, ακόμα και σε βαθιά εδάφη (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).



Εικ. 11: Κορμός – ριζικό σύστημα – φύλλα & καρπός ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς είναι μικρά, λεπτά, ωοειδή, με υφή δέρματος και αντιδιαμετρκά τοποθετημένα. Το χρώμα τους στην επάνω επιφάνεια είναι σκουροπράσινο ενώ αργυρόλευκο στην κάτω. Το αργυρό χρώμα στο κάτω μέρος του φύλλου της ελιάς οφείλεται στο μεγάλο αριθμό πολυκυττάριων λεπιοειδών τριχών που υπάρχουν στην κάτω επιδερμίδα και τα οποία συμβάλλουν στον περιορισμό της εξάτμισης της υγρασίας. Τα φύλλα έχουν στόματα μόνο από τη μια πλευρά της επιδερμίδας τους και είναι τοποθετημένα έτσι ώστε να εμποδίζουν την απώλεια νερού και να προσδίδουν ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Τα φύλλα συνήθως διατηρούνται για 2-3 χρόνια (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).

Οφθαλμοί φέρονται σε κάθε μασχάλη φύλλου. Συνήθως ο κάθε οφθαλμός σχηματίζεται την τρέχουσα περίοδο και γίνεται ορατός την επόμενη χρονιά. Οι οφθαλμοί μπορεί να είναι αδρανείς για πάνω από ένα χρόνο και στην συνέχεια αναπτύσσονται και σχηματίζουν ταξιανθίες. Κάθε ταξιανθία μπορεί να φέρει 15-30 άνθη, ανάλογα με την ποικιλία (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).

Τα άνθη είναι μικρά, κιτρινοπράσινα, με μικρό κάλυκα τεσσάρων οδόντων και αναπτύσσονται σε ταξιανθίες στις μασχάλες των φύλλων. Αναπτύσσονται σε αξονική



Εικ. 12: Άνθη ελιάς

θέση κατά μήκος του βλαστού. Βγαίνουν συνήθως σε βλαστούς της προηγούμενης χρονιάς και, πιο σπάνια, σε βλαστούς μεγαλύτερης ηλικίας. Τα άνθη διακρίνονται σε δύο είδη, τα τέλεια (κανονικά) και ατελή. Το πρώτο είδος (τέλεια), έχει κανονικά ανεπτυγμένους τους στήμονες και τον ύπερο. Το άλλο είδος (ατελή), περιέχει μόνο στήμονες και ο ύπερος είναι ατροφικός. Η σχετική αναλογία των δύο τύπων ανθέων κυμαίνεται ανάλογα με την ποικιλία και τις αλλαγές των καιρικών συνθηκών κατά τη διάρκεια του έτους. Η άνθιση ξεκινάει το Νοέμβριο και τα άνθη αρχίζουν να παίρνουν μορφή κατά το Μάρτιο (Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017).

Μετά την άνθηση, ο καρπός μέσα σε 6-8 μήνες αποκτά το μέγιστο μέγεθός του και αυτό ακολουθείται από διαφοροποιήσεις στη φυσιολογία του, με την αλλαγή χρώματος σε σκούρο μωβ στο τέλος της ωρίμανσης. Διακρίνεται η πράσινη και μαύρη ωρίμανση, όπου χαρακτηριστικό της πράσινης ωρίμανσης είναι η μείωση των χλωροφυλλών και της μαύρης ωρίμανσης είναι η μεν μείωση των χλωροφυλλών, η δε αύξηση των ανθοκυανών στις οποίες οφείλεται το μαύρο χρώμα (Amiot et al., 1989; Ryan et al., 1999a)

### 2.3.1.3. Ο καρπός της ελιάς

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, με σχήμα ωοειδές που συχνά καταλήγει σε μυτερό άκρο και μορφολογικά ομοιάζει με το αμύγδαλο, το βερίκοκο, το κεράσι, το νεκταρίνι και το δαμάσκηνο.(Elizabeth F. Rangel and Carvalho, 2017) Ο ελαιόκαρπος αποτελείται από τρία επίπεδα και τον πυρήνα: το δέρμα ή επικάρπιο, το εσωτερικό μεσοκάρπιο επίπεδο που αποτελεί την σάρκα, και το εσωτερικό ενδοκάρπιο το οποίο σχηματίζει το πέτρινο/ξυλώδες τοίχωμα γύρω από τον πυρήνα (Charoenprasert and Mitchell, 2012a).



Εικ. 13: Τμήματα ελαιόκαρπου σε εγκάρσια τομή.

Ο καρπός έχει ωοειδές σχήμα, με διάμετρο 2-3cm και αναλογία μήκους σάρκας/πυρήνα 3/6,5cm. Το επικάρπιο ή επιδερμίδα ή μεμβράνη, καλύπτεται με κηρούς και κατά την ωρίμανση μεταβάλλεται το χρώμα του από ανοιχτό πράσινο (λόγω χλωροφυλλών) σε μωβ και τελικά μαύρο. Το μεσοκάρπιο ή σάρκα, καλύπτει το 84-90% του καρπού και,

τέλος, το ενδοκάρπιο ή πυρήνας καλύπτει το υπόλοιπο μέρος του καρπού. Το ενδοκάρπιο ή πυρήνας αποτελείται από το ξυλώδες τμήμα, με συνήθως ένα και, πολύ σπάνια, δύο σπέρματα και καλύπτει το 13-30% του συνολικού βάρους. Ο καρπός είναι αρχικά πράσινος και έπειτα μετατρέπεται κατά την ωρίμανση ίνεται καφέ-μαύρος. Ο σπόρος περιέχει 2-4g ελαίου/100g και το συνολικό βάρος του καρπού κυμαίνεται στα 2-20g αναλόγως της ποικιλίας (Ghanbari et al., 2012).

Η ανάπτυξη του καρπού της ελιάς μέχρι την πλήρη ωρίμανσή του χρειάζεται περίπου 5 μήνες σε ευνοϊκές συνθήκες καθώς οι ψυχρές συνθήκες δεν ευνοούν την ανάπτυξή του. Η σύσταση του καρπού αποτελείται από νερό (50%), πρωτεΐνη (1,6%) (Manoukas et al., 1973), έλαιο/λιπίδια (22%), υδατάνθρακες (19%), κυτταρίνη (5,8%), ανόργανα στοιχεία (1,5%) και φαινολικά συστατικά (1-3%), καθώς και πηκτίνη, οργανικά οξέα και χρωστικές.(Ghanbari et al., 2012) Το λιπιδικό περιεχόμενο περιλαμβάνει μονο-, δικαι τρι- ακυλογλυκερόλες, λιπαρά οξέα, στερόλες, φωσφολιπίδια, τριτερπενικά οξέα, τριτερπενικές αλκοόλες, τοκοφερόλες και υδρογονάνθρακες. Η διαμόρφωση του περιεχόμενου του καρπού της ελιάς εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες.

Οι μεγαλόκαρπες ποικιλίες, των οποίων οι καρποί περιέχουν μικρό ποσοστό ελαιολάδου και μεγάλο ποσοστό σακχάρων, χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή βρώσιμης ελιάς, γνωστή ως επιτραπέζια ελιά. Αντίθετα, ποικιλίες με μεγάλο ποσοστό ελαιολάδου χρησιμοποιούνται για ελαιοποίηση. Οι ποικιλίες ελιάς που είναι

κατάλληλες για την παραγωγή ελαιολάδου έχουν συνήθως μέσο μέγεθος καρπού. Πολλές φορές, η ίδια ποικιλία χρησιμοποιείται τόσο για ελαιοποίηση, όσο και για παρασκευή επιτραπέζιας ελιάς (π.χ. Μεγαρίτικη, Χαλκιδικής, Θρούμπα Θάσου κ.α.) (Boskou, 2015).



Εικ. 14: Ελαιόλαδο & επιτραπέζιες ελιές

#### 2.4. Προϊόντα επεξεργασίας ελαιόκαρπου

#### **2.4.1.** Το ελαιόλαδο

Μέσα στους αιώνες, το ελαιόλαδο έχει γίνει ένα από τα ευρέως αποδεκτά και χρησιμοποιούμενα έλαια για μαγειρική χρήση. Το ελαιόλαδο έχει εξαπλωθεί ως τρόφιμο χάρη στη μοναδική του γεύση, το υψηλό φαινολικό περιεχόμενο, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και την παρουσία πολυάριθμων βιοδραστικών δραστικών συστατικών (Uylaşer and Yildiz, 2014). Αποτελεί το κύριο παραγόμενο προϊόν ελιάς, παράγεται με μηχανικό τρόπο, και εκτιμάται σε όλο τον κόσμο για τις ευεργετικές του επιδράσεις στην υγεία και τις θρεπτικές του ιδιότητες του χάρη στα λιπαρά και τα φαινολικά συστατικά του. Περιέχει μεταξύ άλλων αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες, στερόλες, υδροξυκαρβοξυλικές ενώσεις, πτητικά και αντιοξειδωτικά συστατικά, όπου τα φαινολικά αποτελούν την κυριότερη ομάδα αντιοξειδωτικών (Taamalli et al., 2012).

Σύμφωνα με το «Διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου» (IOC), το ελαιόλαδο είναι το έλαιο που παράγεται αποκλειστικά από τους καρπούς της ελιάς (Olea europaea L.), εξαιρουμένων ελαίων λαμβανόμενων με διαλύτες ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και κάθε μείγματος ελαίων άλλων τύπων. Το ελαιόλαδο που είναι κατάλληλο για κατανάλωση διακρίνεται σε: εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (με οξύτητα εκφρασμένη σε ισοδύναμα ολεϊκού οξέος, < 0,8g/100g), παρθένο ελαιόλαδο (με οξύτητα < 2g/100g) και ελαιόλαδο (με οξύτητα < 3,3g/100g). Υπάρχουν και άλλοι τύποι ελαιολάδου όπως το ραφιναρισμένο, το πυρηνέλαιο, τα οποία δεν είναι κατάλληλα για κατανάλωση (International Olive Council, 2012)<sup>•</sup>(Uylaşer and Yildiz, 2014).

Το ελαιόλαδο έχει χρησιμοποιηθεί ως τροφή, φάρμακο και καλλυντικό για πολλούς αιώνες στις χώρες της Μεσογείου. Για τους κατοίκους της Μεσογείου το ελαιόλαδο αποτελούσε τη βασική πηγή πρόσληψης θρεπτικών λιπαρών συστατικών. Αρχαία έγγραφα δηλώνουν ότι η αξία του ελαιολάδου ήταν πέντε φορές μεγαλύτερη από αυτή του κρασιού και δυόμιση φορές μεγαλύτερη από άλλα έλαια (Vossen, 2007). Η σημασία του ελαιολάδου για την αγορά είναι πολύ μεγάλη καθώς αποτελεί το 90% του παραγόμενου προϊόντος από τις ελιές (Ryan and Robards, 1998). Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, είναι το πιο δημοφιλές για τις θρεπτικές και ευεργετικές ιδιότητές του κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων, χάρη στην υψηλή περιεκτικότητα μονοακόρεστων λιπαρών, καθώς και φαινολικών συστατικών, φυτοστερολών, τοκοφερολών, καροτενοειδών, χλωροφυλλών και σκουαλενίου (Ghanbari et al., 2012).

To 2004, ο οργανισμός (Food and Drug Administration FDA) των ΗΠΑ επέτρεψε τον ισχυρισμό για το ελαιόλαδο όσον αφορά τις ευεργετικές του ιδιότητες, για πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων με την κατανάλωση δύο κουταλιών ελαιολάδου ημερησίως (23g), ιδιότητα η οποία οφείλεται στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs) που περιέχει το ελαιόλαδο (FDA,2004).

Κύρια αντιοξειδωτικά των προϊόντων ελιάς είναι οι λιπόφιλες και υδρόφιλες φαινόλες και άλλες ουσίες όπως τα καροτενοειδή (Gökalp, 2017). Από τις φαινόλες, οι οδιφαινόλες έχουν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου (Gambacorta et al., 2010). Τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, οι υδροξυ-ισογρωμόνες, τα φλαβονοειδή, τα λιγνάνια και τα σεκοϊριδοειδή αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις (Gökalp, 2017). Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο περιέχει φαινολικές ενώσεις όπως: γαλλικό, καφεϊκό, βανιλλινικό, π-κουμαρικό, συρινγκικό, φερουλικό, ομοβανιλλικό, π-υδροξυβενζοϊκό και πρωτοκατεχικό οξύ, υδροξυτυροσόλη ((3,4)DHPEA) και τυροσόλη (p-HPEA) που προέρχονται από την υδρόλυση της ολευρωπεΐνης και του λιγκστροσίδη αντίστοιχα, τα λιγνάνια 1ακετοξυπινορεσινόλη και πινορεσινόλη καθώς και σύμπλοκα σεκοϊριδοειδών κυρίως στην διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συζευγμένο με το 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA), ισομερή του άγλυκου της ολευρωπεΐνης (3,4-DHPEA-EA), τη διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συζευγμένη με τυροσόλη (p-HPEA-EDA) (Gambacorta et al., 2010), καθώς και ενώσεις ολεασίνη και ολεοκανθάλη (Karkoula et al., 2012)<sup>,</sup>(Montedoro et al., 1993).

Η πλούσια φαινολική χημική σύσταση του παρθένου ελαιολάδου προσδίδει σε αυτό πολυάριθμες ευεργετικές ιδιότητες. Αυτές σχετίζονται κυρίως στην ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς τα φαινολικά συστατικά αναστέλλουν ή και αποτρέπουν την οξείδωση λιπιδίων, διασπώντας αλυσίδες και προσφέροντας άτομα οξυγόνου στα σχηματιζόμενα αλκυλοϋπεροξείδια τα οποία παράγονται από την λιπιδική οξείδωση (Gökalp, 2017). Επομένως, συμβάλλουν στην αποτροπή εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, στη μείωση της φλεγμονής και την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του αγγειακού ενδοθηλίου, αποτρέποντας την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης. Ακόμα, ρυθμίζει τα επίπεδα LDL χοληστερόλης και οδηγεί σε αύξηση της HDL χοληστερόλης,

παρεμποδίζει την απορρόφηση της LDL από το έντερο (λόγω παρουσίας σιτοστερόλης), καθώς επίσης ρυθμίζει τη συστολή και διαστολή της αιματικής πίεσης (Uylaşer and Yildiz, 2014), ενώ συμβάλλει στη μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (Gökalp, 2017). Συμμετέχουν λοιπόν στην πρόληψη πληθώρας ασθενειών και την αντιγήρανση.

### 2.4.2. Επιτραπέζια ελιά

Με βάση τα αρχαιολογικά ευρήματα που έχουν εντοπιστεί σε περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου, και ειδικά στη Συρία, τη Λιβύη, την Παλαιστίνη και το Ισραήλ. (Vossen, 2007), η βρώσιμη ή αλλιώς επιτραπέζια ελιά πιστεύεται ότι εμφανίστηκε εδώ και 5.000 με 6.000 χρόνια, ήδη από την εποχή του Χαλκού (3000-1200 π.Χ.).

Ως επιτραπέζια ελιά, σύμφωνα με το «Διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου» (International Olive Oil Council, 2004) ορίζεται το προϊόν το οποίο:

- i. έχει παρασκευαστεί από τους υγιείς καρπούς των ποικιλιών της καλλιεργούμενης ελιάς (Olea europaea L.). Μάλιστα αναφέρεται ότι για την παραγωγή τους είναι απαραίτητο να έχουν επιλεγεί ελιές των οποίων ο όγκος, το σχήμα, η αναλογία σάρκας προς τον πυρήνα, η εμφάνιση της σάρκας, η γεύση, η σταθερότητα και η ευκολία απομάκρυνσης του πυρήνα τους, τις καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλες για την περαιτέρω επεξεργασία.
- ii. έχει υποβληθεί σε επεξεργασία ώστε να απομακρυνθεί η πικρή γεύση και διατηρείται με φυσική ζύμωση ή με θερμική επεξεργασία ή/και με άλλα μέσα, ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση και να εξασφαλιστεί η σταθερότητα του προϊόντος υπό κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης με ή χωρίς την προσθήκη συντηρητικών.

iii. συσκευάζεται με ή χωρίς υγρό πλήρωσης.

Οι επιτραπέζιες ελιές ταξινομούνται με βάση τον τύπο ελαιοκάρπου και την εμπορική επεξεργασία που εφαρμόζεται σε αυτόν.

- Ι. Με βάση τον τύπο ελαιόκαρπου, οι επιτραπέζιες ελιές ταξινομούνται ανάλογα με το βαθμό ωριμότητας των νωπών καρπών σε:
  - Πράσινες ελιές: οι καρποί που συλλέγονται κατά την περίοδο ωρίμανσης, πριν από το χρωματισμό και όταν έχουν φθάσει στο κανονικό τους μέγεθος

- Ελιές που αλλάζουν χρώμα: οι καρποί που συλλέγονται πριν από το στάδιο επίτευξης πλήρους ωρίμανσης, κατά την αλλαγή χρώματος.
- iii. Μαύρες ελιές: οι καρποί συλλέγονται όταν έχουν πλήρως ωριμάσει ή λίγο πριν από την πλήρη ωρίμανση.
- II. Με βάση την εμπορική επεξεργασία, οι επιτραπέζιες ελιές ταξινομούνται σε:
  - i. Ελιές που έχουν υποστεί επεξεργασία: πράσινες ελιές, ελιές που αλλάζουν χρώμα ή μαύρες ελιές που υπόκεινται σε επεξεργασία με αλκαλικό μέσο (αλκαλική επεξεργασία). Στη συνέχεια συσκευάζονται σε άλμη μέσα στην οποία υφίστανται πλήρη ή μερική ζύμωση και διατηρούνται με την προσθήκη ή μη παραγόντων οξίνισης. Οι πιο κοινές προετοιμασίες είναι: α) Επεξεργασμένες πράσινες ελιές σε άλμη, β) Επεξεργασμένες ελιές που αλλάζουν χρώμα σε άλμη, γ) επεξεργασμένες μαύρες ελιές και δ) Πράσινες ώριμες ελιές.
  - ii. Φυσικές ελιές: Πράσινες ελιές, ελιές που αλλάζουν χρώμα ή μαύρες ελιές, οι οποίες τοποθετούνται απευθείας σε άλμη, στην οποία υφίστανται σε πλήρη ή μερική ζύμωση και διατηρούνται με ή χωρίς την προσθήκη παραγόντων οξίνισης. Οι πιο συνήθεις είναι οι α) Φυσικές πράσινες ελιές – Ελληνικές ελιές, β) Φυσικές ελιές που αλλάζουν χρώμα και οι β) Φυσικές μαύρες ελιές.
  - iii. Ελιές αφυδατωμένες ή/και συρρικνωμένες: Πράσινες ελιές, ελιές που αλλάζουν χρώμα ή μαύρες ελιές, οι οποίες υπόκεινται σε επεξεργασία με αλκαλικό μέσο, διατηρούνται σε άλμη ή αφυδατώνονται σε ξηρό άλας ή/και με θέρμανση ή με οποιαδήποτε άλλη τεχνολογική μέθοδο. Διακρίνονται σε: α) Αφυδατωμένες ή/και συρρικνωμένες πράσινες ελιές, β) Αφυδατωμένες ή/και συρρικνωμένες πράσινες ελιές που αλλάζουν χρώμα και γ) Αφυδατωμένες ή/και συρρικνωμένες μαύρες ελιές.
  - Ελιές οι οποίες μαυρίζουν (σκουραίνουν) με οξείδωση: Πράσινες ελιές
    ή ελιές που αλλάζουν χρώμα, οι οποίες διατηρούνται σε άλμη,
    ζυμώνονται ή όχι και μαυρίζουν με οξείδωση με ή χωρίς αλκαλικό μέσο.
    Το χρώμα τους πρέπει να είναι ομοιόμορφο μαύρο. Οι ελιές που
    μαυρίζουν με οξείδωση θα πρέπει να διατηρούνται σε ερμητικά

σφραγισμένους περιέκτες και να υποβάλλονται σε αποστείρωση με θερμότητα. Αυτές οι ελιές είναι γνωστές και ως «Μαύρες ελιές».

Άλλων ειδικών χαρακτηριστικών: Οı ελιές v. μπορούν να παρασκευαστούν μέσω διαφορετικών μέσων, ή σύμφωνα με αυτά που παρατίθενται παραπάνω. Αυτές οι «ιδιαιτερότητες» διατηρούν το όνομα «ελιά» καθώς ο καρπός που χρησιμοποιείται ανταποκρίνεται στους γενικούς ορισμούς βάση του παρόντος προτύπου. Τα ονόματα που χρησιμοποιούνται για αυτές τις κατηγορίες (specialties), πρέπει να είναι επαρκώς σαφή ώστε να αποφεύγεται η οποιαδήποτε σύγχυση από πλευράς των καταναλωτών, όσον αφορά την προέλευση και τη φύση των προιόντων. (International Olive Oil Council, 2004)

Οι επιτραπέζιες ελιές αποτελούν ένα εξαιρετικό «λειτουργικό τρόφιμο» με ισορροπημένη περιεκτικότητα σε λιπαρά συστατικά, κυρίως αποτελούμενα από μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ. Η κατανάλωσή τους παρέχει επίσης ενέργεια, φυτικές ίνες, βιταμίνες, μέταλλα και συμβάλλει στην κάλυψη της ημερήσιας πρόσληψης αντιοξειδωτικών. Αποτελούν ένα αναπόσπαστο στοιχείο της μεσογειακής διατροφής και αποτελούν κύριο συστατικό σε εκατοντάδες «πιάτα». Η επιτραπέζια ελιά θεωρείται ως πλούσια πηγή ολευρωπεΐνης και άλλων βιοδραστικών συστατικών, όπως είναι το μασλινικό και το ολεανολικό οξύ.

#### 2.4.2.1. Κατάταξη της επιτραπέζιας ελιάς στη παγκόσμια αγορά

Σε πολλές χώρες της Μεσογείου η παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εθνική οικονομία. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται παγκόσμια αύξηση της παραγωγής και κατανάλωσής της (**Εικ. 15**). Από το 2013 μέχρι και το 2018, οι κύριες παραγωγές χώρες επιτραπέζιας ελιάς παγκοσμίως με βάση το «Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου» 'ηταν: η Αίγυπτος με μέσο όρο 471.2 χιλ. τόνους (καταλαμβάνοντας περίπου το 24% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής), η Τουρκία με μέσο όρο παραγωγής 414.4 χιλ. τόνους (με το 17% περίπου της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής), η Αλγερία με μέσο όρο 247.1 χιλ. τόνους ( με περίπου 10% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής) και το Μαρόκο με την Αργεντινή με περίπου 108 χιλ.τόνους (με περίπου 4.5% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής).



Εικ. 15: Γραφική αναπαράσταση ετήσιας συμπεριφοράς παγκόσμιας παραγωγής και κατανάλωσης επιτραπέζιας ελιάς

Σύμφωνα με το IOC (International Olive Council), οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) που διακρίνονται σχετικά με την παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς είναι: η Ισπανία, με μέσο όρο παραγωγής κατά τα έτη 2013 – 2018 τους 570 χιλ. τόνους ( 63% της ολικής ετήσιας παραγωγής των Ευρωπαϊκών χωρών), η Ελλάδα με μέσο όρο 198 χιλ. τόνους (29% της ετήσιας παραγωγής) και η Ιταλία με 53 χιλ. τόνους (6% ετησίως).

Επίσης οι κύριες χώρες της ΕΕ που εξάγουν τις επιτραπέζιες ελιές είναι: η Ισπανία, με μέσο όρο εξαγωγών κατά τα έτη 2013-2018, τους 190 χιλ.τόνους (65% των ολικών εξαγωγών των ευρωπαϊκών χωρών ετησίως) και η Ελλάδα με 70 χιλ. τόνους (24% των ετήσιων εξαγωγών).

Ακόμα, όσον αφορά την κατανάλωση της επιτραπέζιας ελιάς στις Ευρωπαϊκές χώρες διακρίνονται: η Ισπανία, με μέσο όρο κατανάλωσης κατά τα έτη 2013-2018 τους 179 χιλ. τόνους (46% της παγκόσμιας ετήσιας κατανάλωσης), η Γαλλία με 63 χιλ. τόνους (16% της παγκόσμιας ετήσιας κατανάλωσης), η Ιταλία με 117 χιλ. τόνους (30% της παγκόσμιας ετήσιας κατανάλωσης) και η Ελλάδα, με 16 χιλ. τόνους (4% της παγκόσμιας ετήσιας κατανάλωσης).

Πιο συγκεκριμένα η ετήσια παραγωγή, οι εξαγωγές και η κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς για την Ελλάδα κατά τα έτη 2013-2018 φαίνονται στο παρακάτω γράφημα (Εικ. 16):



Εικ. 16: Γραφική αναπαράσταση ετήσιας συμπεριφοράς παραγωγής, εξαγωγής και κατανάλωσης επιτραπέζιας ελιάς στον Ελλαδικό χώρο

#### 2.4.2.2. Μέθοδοι επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ένα από τα κύρια προϊόντα τουρσιού που παρασκευάζονται σε όλο τον κόσμο. Βέβαια, ο ελαιόκαρπος δεν είναι βρώσιμος μόλις συλλεχθεί από το δέντρο καθώς η σάρκα είναι σκληρή και πικρή. Για να καταστεί βρώσιμος ο ελαιόκαρπος απαραίτητη είναι η επεξεργασία του με διάφορες μεθόδους, οι οποίες αποσκοπούν στην απομάκρυνση των φυσικών πικρών φαινολικών συστατικών αυτού και κυρίως του γλυκοζίτη 'ολευρωπεΐνη' μετά από κατάλληλη υδρόλυση. Επίσης, οι διάφοροι μέθοδοι επεξεργασίας που εφαρμόζονται συμβάλλουν στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής του προϊόντος καθώς ο νωπός ελαιόκαρπος αλλοιώνεται εύκολα. Οι μέθοδοι επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς ποικίλλουν στα διάφορα μέρη του κόσμου και συνήθως παίρνουν το όνομα του τόπου όπου αναπτύχθηκαν. Επίσης, οι μέθοδοι επεξεργασίας ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία, τον βαθμό ωρίμανσης και τις καταναλωτικές συνήθειες. Διακρίνονται τρεις κύριες μέθοδοι, οι οποίες είναι η Ισπανική μέθοδος και η μέθοδος Καλιφόρνιας για την επεξεργασία πράσινων ελιών, καθώς και η Ελληνική μέθοδος για την επεξεργασία φυσικών ώριμων μαύρων ελιών (Bianchi, 2003). Ακόμα μια ιδιαίτερη μέθοδος επεξεργασίας ώριμων μαύρων ελιών με παράδοση στον Ελλαδικό χώρο, είναι η ξηράλατη μέθοδος. Ιδιαιτερότητα αυτής της μεθόδου είναι ότι εφαρμόζεται για την ελληνική ποικιλία «Θρουμποελιά Θάσου», η οποία αποτελεί τη μοναδική ποικιλία ελιάς που καθίσταται βρώσιμη κατά το τέλος της ωρίμασής της και επομένως η επεξεργασία της αποτελεί κυρίως μέθοδο συντήρησης αυτής (Sánchez Gómez et al., 2006; Κυριτσάκης, 2017).

Μια ακόμα μέθοδος επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς που εφαρμόζεται σε κάποιες περιοχές της Ιταλίας είναι η ξήρανση ελιών σε φούρνο. Σε αυτή τη μέθοδο, οι ελιές αφού υποστούν θερμική επεξεργασία με ζεμάτισμα, αλατίζονται και έπειτα τοποθετούνται σε φούρνο όπου και λαμβάνει χώρα η ξήρανσή τους (Borzillo et al., 2000; Marsilio et al., 2000).

Οι προαναφερόμενες μέθοδοι επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς είναι να επιδράσουν στο ολικό φαινολικό φορτίο του ελαιόκαρπου (Ryan and Robards, 1998).

#### 2.4.2.2.1. Ισπανική μέθοδος

Η μέθοδος Ισπανικού τύπου, αποτελεί χαρακτηριστική μέθοδο επεξεργασίας για τις πράσινες ελιές. Το βασικό διακριτικό στοιχείο της μεθόδου είναι η επεξεργασία του ελαιόκαρπου με γαλακτική ζύμωση σε άλμη, ύστερα από απομάκρυνση της πικρής γεύσης του με χρήση διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (αλισίβα). Αρχικά, οι πράσινες ελιές συλλέγονται όταν φτάσουν στο μέγιστο μέγεθός τους στην αρχή της ωρίμανσης και έπειτα μεταφέρονται στο χώρο επεξεργασίας όπου και γίνεται μια πρώτη ταξινόμηση με βάση το μέγεθος. Ακολουθεί η επεξεργασία του ελαιόκαρπου με αλκαλικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 2-5% (w/v) στους 15-25°C για 8-12 ώρες, με σκοπό την υδρόλυση του πικρού γλυκοσίδη ολευρωπεΐνη σε υδροξυτυροσόλη, σε ενώσεις οι οποίες δεν είναι πικρές. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελέγγεται πόσο έχει διεισδύσει η αλισίβα στη σάρκα του ελαιόκαρπου και όταν έχει φτάσει στα 2/3 της, οι ελιές πλένονται με νερό, περίπου 4 φορές, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της αλισίβας, καθώς και για την εξουδετέρωση της αλκαλικότητας του μέσου, το οποίο επιτυγχάνεται και με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος ή μέσω της διογέτευσης CO2 (Bianchi, 2003). Έπειτα, οι ελιές μεταφέρονται σε δεξαμενές ζύμωσης με άλμη σε συγκέντρωση 10% w/v. Η επεξεργασία με την αλισίβα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της άλμης στη σάρκα και έτσι τα συστατικά μεταφέρονται στην άλμη. Κατά τη ζύμωση, τα σάκχαρα των ελιών μετατρέπονται σε γαλακτικό οξύ. Στην αρχή της ζύμωσης, επικρατούν τα αρνητικά κατά gram βακτήρια στην άλμη, και με στην πορεία, μειώνεται ο πληθυσμός τους και αυξάνεται ο πληθυσμός των βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Για τη βέλτιστη ζύμωση απαραίτητο είναι να ελέγχονται παράμετροι όπως ο πληθυσμός των βακτηρίων, η θερμοκρασία, η οξύτητα, η σάρκα του ελαιόκαρπου και η συγκέντρωση της άλμης στη σάρκα. Η ζύμωση διαρκεί 1-2 μήνες. Η οξύτητα του τελικού προϊόντος κυμαίνεται στα 0,7-1% γαλακτικού οξέος, με pH 3.8-4.0 και συγκέντρωση άλατος 5-6%. Με το τέλος

της ζύμωσης, οι ελιές αποθηκεύονται σε άλμη με αυξημένη συγκέντρωση άλατος, πάνω από 8% w/v, για αποφυγή ανάπτυξης του βακτηρίων του γένους *Propionibacterium* το οποίο ευθύνεται για αλλοιώσεις του προϊόντος, ενώ στο τέλος συσκευάζονται ολόκληρες, χωρίς κουκούτσι ή και γεμιστές και τελικά διανέμονται στην αγορά (Bianchi,



Εικ. 17: Γεμιστές πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου

2003; Sánchez Gómez et al., 2006; Charoenprasert and Mitchell, 2012a; R et al., 2013).

#### 2.4.2.2.2. Μέθοδος Καλιφόρνιας

Η μέθοδος Καλιφόρνιας χρησιμοποιείται κυρίως για την εκπίκρανση ελαιόκαρπου ο οποίος διαθέτει έναν κίτρινο - σταρένιο προς πράσινο χρωματισμό. Ο ελαιόκαρπος αφού συλλεχθεί και ταξινομηθεί μερικώς, μεταφέρεται σε δεξαμενές άλμης συγκέντρωσης 4-9% w/v, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες και τη κατάσταση του ελαιόκαρπου, μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία. Για την αποφυγή της μικροβιακής δραστηριότητας στην άλμη, προστίθεται 1.5-3.0% v/v οξικό οξύ, ενώ και για την αποφυγή αλλοίωσης της δομής της σάρκας προστίθεται 0.1-0.3% χλωριούχου ασβεστίου (CaCl<sub>2</sub>) (Brenes et al., 1994). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου αποτελεί η επεξεργασία του εμβαπτισμένου στην άλμη ελαιόκαρπου με τη διαδικασία της οξείδωσης, η οποία αποσκοπεί στην απομάκρυνση της πικρής γεύσης του ελαιόκαρπου και στη μεταβολή του χρώματος σε σκούρο μαύρο, μέσω της χρήσης



Εικ. 18: Μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας αλισίβας, CO<sub>2</sub> και αέρα. Ο αριθμός των επεξεργασιών με αλισίβα κυμαίνεται σε 2-5 ανάλογα με την ωριμότητα και την ποικιλία του καρπού καθώς σταματάει μόλις η αλισίβα διεισδύσει μέχρι τον πυρήνα. Μεταξύ των διαφόρων σταδίων επεξεργασίας με αλισίβα, οι ελιές εκπλένονται με νερό στο οποίο διοχετεύεται αέρας, ώστε να επιτευχθεί οξείδωση που οδηγεί στο σχηματισμό ενώσεων που προσδίδουν μαύρο χρώμα (Brenes-Balbuena et al., 1992; Vincenzo Marsilio et al., 2001). Αφού γίνει και η

τελευταία επεξεργασία με αλισίβα, οι ελιές εκπλένονται με νερό ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αλισίβας. Στο τέλος της διεργασίας, προστίθενται στην τελική δεξαμενή αποθήκευσης άλατα σιδήρου για τη διατήρηση του μαύρου χρώματος. Στη συνέχεια, οι ελιές συσκευάζονται μέσα σε άλμη 2-4% w/v με γλυκονικό σίδηρο και παστεριώνονται. Το pH της σάρκας όταν το χρώμα είναι το επιθυμητό είναι περίπου 7.0. Σε πολλές περιπτώσεις γίνεται προσθήκη γαλακτικού οξέος ή γλυκονικού οξέος στην άλμη ώστε να μειωθεί αρκετά το pH στο 4.6 και εφαρμόζεται παστερίωση για τη συντήρηση του προιόντος (Bianchi, 2003; Charoenprasert and Mitchell, 2012a; R et al., 2013; Sánchez Gómez et al., 2006).
#### 2.4.2.2.3. Φυσικές Μαύρες ελιές – Ελληνική μέθοδος

Η μέθοδος για φυσικές μαύρες ελιές αποτελεί μια παραδοσιακή επεξεργασία του ελαιόκαρπου στον Ελλαδικό χώρο. Χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η εμβάπτιση του ελαιόκαρπου σε άλμη με υψηλή συγκέντρωση άλατος. Βέβαια η διάρκεια της διεργασίας είναι μεγαλύτερη από τις προηγούμενες, καθώς δεν έχει γίνει επεξεργασία με αλισίβα και επομένως η ολευρωπεΐνη και άλλα πικρά συστατικά απομακρύνονται με πιο αργό ρυθμό. Για την εφαρμογή της μεθόδου, το ιδανικό στάδιο συλλογής του ελαιόκαρπου είναι όταν είναι πλήρως ώριμος ή όταν έχει φτάσει λίγο πριν από την πλήρη ωρίμανση, ώστε να έχει την κατάλληλη συνεκτικότητα για να δώσει ένα επιθυμητό τελικό προϊόν. Μετά τη συλλογή, μεταφέρονται στο χώρο επεξεργασίας, γίνεται μια γρήγορη έκπλυση για απομάκρυνση ξένων σωματιδίων, ταξινομούνται και ακολουθεί η εμβάπτιση του ελαιόκαρπου σε άλμη συγκέντρωσης 8-10% w/v, όπου και γίνεται η ζύμωση. Η ζύμωση διαρκεί 8-12 μήνες. Η ζύμωση μπορεί να γίνει κάτω από αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. Γίνεται συμπλήρωση άλατος συνεχώς καθώς αυτό μειώνεται κατά την εξέλιξη της ζύμωσης. Οι ζύμες αποτελούν του κύριους μικροοργανισμούς της ζύμωσης, ενώ επίσης παρατηρείται μια αύξηση στον πληθυσμό των αρνητικών κατά gram και γαλακτικών βακτηρίων, η οποία αύξηση υπό αναερόβιες συνθήκες, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του CO2 και τελικά σε αλλοίωση των ελιών. Για αυτό απαιτείται η διέλευση αέρα στις δεξαμενές ζύμωσης, ώστε να απομακρύνεται το CO2. Με τον αερισμό επίσης μειώνεται και η διάρκεια της όλης επεξεργασίας στους

4-5 μήνες, αφού επιταχύνεται η μεταφορά σακχάρων και πικρών συστατικών και ακόμα βελτιώνεται και το χρώμα, το άρωμα και η υφή. Με το τέλος της ζύμωσης, ο ελαιόκαρπος συσκευάζεται με δύο τρόπους ανάλογα τον τύπο ελιάς, δηλαδή για Ελληνικού τύπου, συσκευάζεται σε pH 4-4.2 και άλμη συγκέντρωσης 6-8% w/v, ενώ για ελιές



Εικ. 19: Φυσικές ελιές Ελληνικού τύπου

τύπου Καλαμών συσκευάζεται σε μίγμα ελαιολάδου με ξίδι. Για την καλύτερη διατήρηση του προϊόντος συνήθως εφαρμόζεται παστερίωση ή προσθήκη σορβικού οξέος συγκέντρωσης 0.05% ως συντηριτικό (Bianchi, 2003; Charoenprasert and Mitchell, 2012a; R et al., 2013; Sánchez Gómez et al., 2006).

# 2.4.2.2.4. Ξηράλατη μέθοδος - Θρούμπας Θάσου

Η ξηράλατη μέθοδος επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς εφαρμόζεται σε ώριμες μαύρες ελιές, οι οποίες μετά τη συλλογή τους, εκπλένονται για απομάκρυνση τυχόν ξένων σωματιδίων και έπειτα ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε δεξαμενές, σχηματίζοντας εναλλασσόμενα στρώματα αυτών με ξηρό αλάτι. Σε αυτές τις συνθήκες παραμένουν για 20



Εικ. 20: Εναλασσόμενα στρώματα θρούμπας Θάσου με γοντρό αλάτι

έως και 60 ημέρες, αναλόγως της ποικιλίας. Η επεξεργασία αυτή επιφέρει την αφυδάτωση των ελιών, οι οποίες στο τέλος εμφανίζονται ζαρωμένες. Αυτές οι ελιές όταν καταναλώνονται είναι αλμυρές και με ελαφριά πικρή επίγευση (Bianchi, 2003).

Μια ιδιαίτερη εφαρμογή της ξηράλατης μεθόδου αποτελεί η χρήση της για την επεξεργασία της ποικιλίας «Θρουμποελιά Θάσου - Θρούμπα» (Olea europea media oblonga) (Spanier et al., 2001; Theodosiou, T. Valsamidis et al., 2004). Η ποικιλία αυτή απαντάται μόνο στο νησί της Θάσου και γνώρισμά της, το οποίο τη διακρίνει από τις υπόλοιπες ποικιλίες ελιάς, είναι ότι καθίσταται βρώσιμη στο τέλος της ωρίμανσής της. Αξίζει να σημειωθεί πως η ποικιλία της Θάσου, είναι ένας κλώνος της Θρουμποελίας (Thrubolea) που απαντάται στην Κρήτη, η οποία επίσης χρησιμοποιείται για την παρασκευή ξηράλατων ελιών με την ονομασία «φυσικές μαύρες ελιές τύπου θρούμπας». Η «Θρούμπα Θάσου» αποτελεί προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) από το 1994 (Εικ. 21) ("ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ," 1994).



Εικ. 21: Αναγνώρηση προστατετόμενης ονομασίες προέλευσης επιτραπέζιων ελιων Θρούμπα Θάσου

Όταν επέλθει η πλήρης ωρίμανση, το χρώμα του ελαιόκαρπου γίνεται καφέ και λαμβάνει χώρα άμεσα το ξεπίκρισμα του καρπού ενόσω βρίσκεται πάνω στο δέντρο γωρίς να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία. Υποστηρίζεται πως το ξεπίκρισμα του ελαιόκαρπου οφείλεται στην παρουσία του μύκητα Phoma oleae, ο οποίος αναπτύσσεται στη σάρκα και υδρολύει την ολευρωπείνη (Panagou, 2006). Ακόμα, έχει υποδειχθεί το πλούσιο βιοφαινολικό προφίλ της επιτραπέζιας ελιάς Θάσου, χαρακτηριζόμενο από υψηλή περιεκτικότητα σε ολευρωπεΐνη και παράγωγά της, σε υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και γλυκοσίδες τους, καθώς και καφεϊκό οξύ και άλλα φαινολικά οξέα (Bastoni et al., 2001; Melliou et al., 2015). Οι Zoidou et al., σε συγκριτική έρευνα που πραγματοποίησαν σε παραδοσιακές ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς, υπέδειξαν ότι η ποικιλία «Θρούμπα Θάσου» έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολευρωπεΐνη (1.2 mg/ καρπό), χαρακτηρίζοντάς την ως πηγή υψηλής περιοκτικότητας στη βιοδραστική αυτή ουσία. Επομένως, καθώς η συνιστόμενη ημερήσια πρόσληψη ολευρωπεΐνης για ανθρώπινη χρήση είναι 25 mg, συνιστούν ότι η κατανάλωση 20 ελιών Θρούμπας Θάσου ημερησίως μπορεί να συμπληρώσει αυτή τη δόση σε μια κανονική διατροφή (Zoidou et al., 2010).



Η «Θρούμπα Θάσου» χρησιμοποιείται για την παρασκευή ενός παραδοσιακού προϊόντος γνωστό ως «φυσικές μαύρες ξηράλατες ελιές». Η ετήσια παραγωγή φτάνει τους 1500 τόνους, από τις οποίες το 50% εξάγεται κυρίως στο Ισραήλ και ένα μικρό ποσοστό εξάγεται στην Αμερική, την Αυστραλία και σε χώρες της Ευρωπαϊκής

Ένωσης (Panagou et al., 2002). Η συγκομιδή του ελαιόκαρπου, η οποία γίνεται με το χέρι ή χτυπώντας το δέντρο με ράβδο, λαμβάνει χώρα από τον Δεκέμβριο μέχρι τον Ιανουάριο κατά το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης και όταν το χρώμα είναι πλήρως μαύρο. Η παραδοσιακή μέθοδος επεξεργασίας περιλαμβάνει τα εξής στάδια (**Εικ. 24**): τη συγκομιδή, τη μεταφορά στο εργοστάσιο, την ταξινόμηση και το διαχωρισμό ελαττωματικών καρπών και τελικά την έκπλυση με υπό πίεση νερό ώστε να απομακρυνθούν ξένα υλικά. Στη συνέχεια, ο ελαιόκαρπος τοποθετείται σε δεξαμενές από σκυρόδεμα με χοντρό αλάτι σε αναλογία των 40g αλατιού/100g ελαιόκαρπου. Ως απόρροια της υψηλής ωσμωτικής πίεσης που προκαλείται από το αλάτι, επέρχεται σταδιακά η εκπίκρανση του ελαιόκαρπου και η συρρίκνωσή του, καθώς απομακρύνεται το νερό και υδατοδιαλυτά συστατικά, περιλαμβάνοντας τον γλυκοσίδη της ολευρωπεΐνης, από τον καρπό ο οποίος τελικά καθίσταται βρώσιμος μέσα σε 30-40 ημέρες (Spanier et al., 2001). Το τελικό προϊόν, διαχωρισμένο κατά μέγεθος και ταξινομημένο, συσκευάζεται είτε σε γυάλινους περιέκτες είτε σε πλαστικές σακούλες χωρίς άλμη, καθώς η χαμηλή ενεργότητα νερού σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση άλατος εξασφαλίζει την μικροβιολογική σταθερότητά του κατά τη διάρκεια αποθήκευσής του. Μερικές φορές, προστίθεται λίγο ελαιόλαδο και αρωματίζεται με μπαχαρικά ώστε να βελτιωθούν οι οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Η γεύση διαφοροποιείται τελείως από τις άλλες επιτραπέζιες ελιές που προέρχονται από άλλες μεθόδους επεξεργασίας, ενώ οργανοληπτικά έχει μία σκληρή υφή ( όπως των δαμάσκηνων) και μια γλυκόπικρη και αλμυρή γεύση την ίδια



στιγμή. Αποτελούν τον ιδανικό τύπο ελιών για τους καταναλωτές που επιθυμούν πλήρως γευστικές επιτραπέζιες ελιές (Kailis and Harris, 2007). Παρ' όλα αυτά, όσον αφορά την διεθνή αγορά, το προϊόν αυτό λαμβάνει μικρή ανταπόκριση από τους καταναλωτές, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης

άλατος στη σάρκα η οποία αντιτίθεται στις νεωτεριστικές τάσεις των καταναλωτών που επιδιώκουν να υιοθετήσουν μια μειωμένη κατανάλωση αλατιού στην διατροφή τους. Συνέπεια αυτού είναι ο περιορισμός της ξηράλατης επιτραπέζιας ελιάς στο χώρο της Μεσογείου, ενώ εκτιμάται από τους καταναλωτές τόσο στον Ελλαδικό χώρο όσο και σε άλλες περιοχές όπως η Αλγερία, η Τουρκία και το Μαρόκο (Panagou, 2006).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ξηράλατων ελιών		
Ενεργότητα νερού (aw)	0.75-0.85	
рН	4.5-5.5	
Περιεκτικότητα σε έλαιο	35-39g/100g	
Υγρασία	30-35g/100g	
Σάκχαρα	2-2.5g/100g	
Περιεκτικότητα NaCl στη σάρκα	4-10g/100g	

Η ξηράλατη επεξεργασία αλλάζει τη μηχανική συνεκτικότητα του ελαιόκαρπου. Ο ιστός γίνεται σκληρότερος (4.5 φορές) και αποκτά πιο σκούρο χρώμα σε σχέση με τις μη-επεξεργασμένες ελιές. Επίσης, επιδρώντας στους πολυσακχαρίτες, προκαλεί την αυξημένη διαλυτοποίηση των πολυμερών αραβινόζης και τη μεταφορά τους στο υγρό σχηματίζεται. Βέβαια, παρατηρήθηκε πως στα πολυμερή απόβλητο που γαλακτουρονικού οξέος, τα οποία παραμένουν στον ελαιόκαρπο και μετά την επεξεργασία του, φαίνεται να οφείλεται και η βελτίωση της υφής της σάρκας, πιθανόν λόγω σταθεροποίησής τους στα κυτταρικά τοιχώματα, μέσω μείωσης των ηλεκτροστατικών απωθήσεων μεταξύ των όξινων ομάδων των πολυσακχαριτών λόγω των ιόντων νατρίου (Cardoso et al., 2008). Σύμφωνα με τους Marsillo et al., η ξηράλατη επεξεργασία οδηγεί σε μια ελάχιστη, σε αντίθεση με τις άλλες επεξεργασίες, μείωση όσον αφορά την περιεκτικότητα του ελαιόκαρπου σε σάκχαρα και πολυόλες, ενώ η συνολική συγκέντρωση σε σάκγαρα μειώνεται, λόγω της απώλειας νερού και λόγω επιβράδυνσης μεταβολικών μονοπατιών (V. Marsilio et al., 2001).



Εικ. 24: Πορεία επξεργασίας Θρούμπας Θάσου με τη ξηράλατη μέθοδο

Όπως είναι κατανοητό, οι παραπάνω επεξεργασίες επιτραπέζιας ελιάς διαφοροποιούν κατά μεγάλο μέρος το φαινολικό περιεχόμενο του τελικού προϊόντος. Γενικότερο αποτέλεσμα τόσο της επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς όσο και της ευρύτερης επεξεργασίας ελαιοκομικών προϊόντων (ελαιόλαδο), είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού υγρών αποβλήτων που αποτελούν όμως πηγές βιοδραστικών συστατικών.

Πλέον, υψηλό ενδιαφέρον έχει η διαχείριση αποβλήτων γεωργίας ως πολύτιμη πηγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι πολυφαινόλες ελιάς, ήδη αποτελούν ενεργά συστατικά διαφόρων αξιόλογων καλλυντικών και διατροφικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων για την αντιμετώπιση και πρόληψη διαφόρων φλεγμονωδών παθήσεων.

# 2.4.2.3. Υγρά απόβλητα επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς

Τόσο η καλλιέργεια όσο και η διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου και επιτραπέζιας ελιάς, έχει ως απόρροια την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων στερεών και υγρών αποβλήτων (σπέρμα ελιάς, φύλλα, σάρκα, υγρά απόβλητα). Τα απόβλητα αυτά αποτελούν μια πλούσια πηγή πολύτιμων συστατικών, όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα οργανικά οξέα, τα ιχνοστοιχεία, τα έλαια, οι φυτικές ίνες και οι φαινόλες (π.χ. ολευρωπεΐνη, η υδροξυτυροσόλη κ.ά.). Ωστόσο, μόνο τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να γίνονται συστηματικές προσπάθειες για την εύρεση τρόπων επεξεργασίας τους, ώστε να καθίστανται μη επιβλαβή για το περιβάλλον, ενώ ιδιαίτερη έμφαση δίδεται στην ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών που περιέχουν για την περαιτέρω αξιοποίησή τους.

Τα υγρά απόβλητα που παράγονται κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς, η παραγωγή της οποίας επεκτείνεται πλέον σε όλο τον κόσμο, αποτελούν το λιγότερο μελετημένο σε σχέση με τα προαναφερθέντα παραγόμενα παραπροϊόντα/απόβλητα. Οι κύριες διαδικασίες επεξεργασίας που εφαρμόζονται για την εκπίκρανση των καρπών, οι οποίες περιλαμβάνουν είτε τη χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου είτε τη ζύμωση σε άλμη, έχουν ως αποτέλεσμα τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων νερού και παράγουν μεγάλο όγκο υγρών αποβλήτων, των οποίων ο χειρισμός είναι δύσκολος. Τα υγρά απόβλητα, λοιπόν, της επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς, προέρχονται από το διάλυμα εκπίκρανσης καυστικού νατρίου, το νερό εκπλύσεων για απομάκρυνση του καυστικού νατρίου, και το νερό ζύμωσης της άλμης, όπως επίσης και από το υγρό απόβλητο που παράγεται από την επεξεργασία με την ξηράλατη μέθοδο, το οποίο αποτελείται από τα υγρά του ίδιου του ελαιόκαρπου.

# 2.4.2.3.1. Χαρακτηριστικά και σύνθεση υγρών αποβλήτων επιτραπέζιας ελιάς

Όσον αφορά τη σύσταση των υγρών αποβλήτων της επιτραπέζιας ελιάς, αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε NaOH και NaCl, έχουν χαρακτηριστική δυσάρεστη όξινη οσμή, ανοιχτό έως σκούρο καφέ χρώμα και υψηλό οργανικό περιεχόμενο, το οποίο εφράζεται ως COD (Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο). Στο οργανικό φορτίο περιλαμβάνονται σάκχαρα, πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις (κυρίως υδροξυτυροσόλη), αζωτούχες ενώσεις, ταννίνες, υπολείμματα ελαίου και άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις όπως αλάτι και ιχνοστοιχεία (Parinos et al., 2007)(Papadaki and Mantzouridou, 2016)<sup>.</sup> Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί ή και ανιχνευτεί στα υγρά απόβλητα επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς:

Φαινολική ένωση	Συνώνυμα	Δομή	Βιβλιογραφία
		Βεζνοϊκά οξέα	
Βενζοϊκό οξύ		HO	(Parinos et al., 2007) (Kyriacou et al., 2005)
π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ		HO HO	(Brenes et al., 1990)
2,4-Διυδροξυβενζοϊκό οξύ	Ρεσοκυκλικό οξύ	HO HO OH	(Gargouri et al., 2017)
3,4-Διμεθοζυβενζοϊκό οξύ	3,4-διμεθυλο- πρωτοκατεχϊκό οξύ / Βερατρικό οξύ	H <sub>3</sub> C OH CH <sub>3</sub>	(Parinos et al., 2007)
3-Μεθοξυ-4- υδροξυβενζοϊκό οξύ	Βανιλλικό οξύ	H <sub>3</sub> C O H	(Parinos et al., 2007) (Kyriacou et al., 2005) (Brenes et al., 1990)

Πίν. 3: Φαινολικά συστατικά που έχουν ανιχνευθεί σε υγρά απόβλητα επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς.

3,4-Διυδροξυβενζοϊκό οζύ	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	H O H	(Parinos et al., 2007) (Bouaziz et al., 2008a) (Kyriacou et al., 2005)
3,5-διμεθοζυ-4- υδροζυβενζοϊκό οξύ	Συριγγικό οξύ	H <sub>3</sub> C O CH <sub>3</sub>	(Parinos et al., 2007) (Kyriacou et al., 2005)
3,4,5-τρι- υδροξυβενζοϊκό οξύ	Γαλλικό οξύ		(Parinos et al., 2007) (Gargouri et al., 2017) (Kyriacou et al., 2005)
Κινναμωμικά οξέα			
4-Υδροξυκινναμωμικό οξύ	π-υδροξυκινναμωμικό οξύ / π-κουμαρικό οξύ	H H H	(Bouaziz et al., 2008a; Brenes et al., 1995b, 1990; De Castro and Brenes, 2001; Gargouri et al., 2017; Kyriacou et al., 2005; Parinos et al., 2007)
3-Μεθοξυ-4-υδροξυ- κινναμωμικό οξύ	Φερουλικό οξύ		(Bouaziz et al., 2008a; Kyriacou et al., 2005; Parinos et al., 2007)
3,4-Διυδροξυ- κινναμωμικό οξύ	Καφεϊκό οξύ		(Bouaziz et al., 2008a; Brenes et al., 1995b, 1990; De Castro and Brenes, 2001; Parinos et al., 2007)
<i>trans-</i> Κινναμωμικό οξύ	3-Φαινυλο-2- προπενοϊκό οξύ	H H	(Parinos et al., 2007) (Kyriacou et al., 2005)

Φαινυλαιθυλαλκοόλες και παράγωγα			
3,4-Διυδροζυφαινυλ- αιθανόλη	Υδροξυτυροσόλη	но	<ul> <li>(Bouaziz et al., 2008a; Brenes et al., 1990; De Castro and Brenes, 2001; Ferrer-Polonio et al., 2017a; Gargouri et al., 2017; Kyriacou et al., 2005; Mousouri et al., 2014; Parinos et al., 2007; Sánchez et al., 1995; Xynos et al., 2015)</li> </ul>
4- <i>0</i> -γλυκοπυρανοσυλο- 3,4-διυδροζυφαινυλ- αιθανόλη			(Mousouri et al., 2014)
4-Υδροξυφαινυλ- αιθανόλη	π- Υδροξυφαινυλαιθανόλ η Τυροσόλη	OH OH	(Bouaziz et al., 2008a; Brenes et al., 1990; De Castro and Brenes, 2001; Ferrer-Polonio et al., 2017a; Gargouri et al., 2017; Kyriacou et al., 2005; Mousouri et al., 2014; Parinos et al., 2007; Xynos et al., 2015)
2-Φαινοξυαιθανόλη	Μονοφαινυλαιθέρας αιθυλενογλυκόλης	ОН	(Kyriacou et al., 2005; Parinos et al., 2007)
Ακτεοσίδης	Βερμπασκοσίδης		(Xynos et al., 2015)
Άλλες απλές ενώσεις			
Βανιλλίνη	3-Μεθοζυ-4- υδροζυβενζαλδεϋδη / 4-Υδροζυ-μ- ανισαλδεϋδη / βανιλλική αλδεΰδη	HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO H	(Brenes et al., 1990)

Φαινυλοξικό οξύ		OH	(Kyriacou et al., 2005)
3,4- Διυδροξυφαινυλ- οξικό οξύ		НО ОН	(Brenes et al., 1990)
Κυκλοεξυλοκαρβο- ξυλικό οξύ		OH	(Kyriacou et al., 2005)
Ρενγγιοζίτης		но ОН	(Mousouri et al., 2014)
Ρενγγιοζίτης Β			(Mousouri et al., 2014)
Φθαλικός διβουτυλεστέρας		H <sub>3</sub> C O	(Parinos et al., 2007)
Ελενολίδιο			(Brenes et al., 1995b)
Κατεχόλη	ο-Διυδροξυβενόλιο / ο-Βενζενδιόλη / ο-Υδροξυφαινόλη	HO	(Brenes et al., 1990)



## 2.4.2.3.2. Διαχείριση υγρών αποβλήτων επιτραπέζιας ελιάς

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων παραγωγήε της επιτρπέζιας ελιάς καθιστούν δύσκολη τη διαχείρισή τους και η συνήθης πορεία τους, ειδικά στην Μεσόγειο, είναι ανάλογη των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, δηλαδή εναποτίθενται σε ρυάκια, ποταμούς ή στη θάλασσα. Η μεταφορά τους γίνεται μέσα σε λεκάνες εξάτμισης, όπου λαμβάνει χώρα η αναερόβια αποικοδόμηση, με επαγόμενες δυσάρεστες συνέπειες, όπως είναι η δημιουργία δυσάρεστων οσμών, λόγω του φαινομένου ζύμωσης που λαμβάνει χώρα, η προσέλκυση εντόμων, ο κίνδυνος μόλυνσης υπόγειων υδάτων κ.ά. Επίσης, υψίστης σημασίας είναι η υψηλή αντιμικροβιακή δράση και η φυτοτοξικότητα των αποβλήτων, οι οποίες τα καθιστούν τοξικά για τους ζώντες οργανισμούς (Capasso et al., 1992; DellaGreca et al., 2001; Kapellakis et al., 2008; Papadaki and Mantzouridou, 2016).

βιομηχανία παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς υπογρεούται να ακολουθεί Η περιβαλλοντικούς κανονισμούς σχετικά με την τελική εναπόθεση και διαγείριση τών αποβλήτων (Kapellakis et al., 2006). Μέγρι τώρα γίνονται προσπάθειες για την εξάλειψη της τοξικότητας των αποβλήτων, με σκοπό την ασφαλή περαιτέρω διαγείριση τους, είτε αυτή περιλαμβάνει την απόρριψη αυτών στο περιβάλλον είτε τη κομποστοποίηση τους. Ωστόσο, η ανάκτηση υψηλής αξίας βιοδραστικών συστατικών και νερού αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις για τη βιώσιμη εκμετάλλευση των αποβλήτων. Αυτό ενθαρρύνεται τόσο από την περιορισμένη διαθεσιμότητα των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όσο και το αυξημένο πλέον ενδιαφέρον για φυσικά βιομόρια (Allouche et al., 2004; Bouaziz et al., 2008b), τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, καλλυντικά καθώς και ως πρόσθετα σε διατροφικά προϊόντα. Επίσης, ένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της προοπτικής είναι η ελαχιστοποίηση της τοξικότητας των αποβλήτων. Έτσι, καλείται η επιστήμη να προτείνει διαφορετικές μεθόδους για την αποσύνθεση του οργανικού φορτίου ή τη μείωσή του, με παράλληλη αξιοποίησή του. Το πιθανό οικονομικό όφελος από την διαδικασία αυτή, καθιστά την επεξεργασία των αποβλήτων ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα (DellaGreca et al., 2001; Papadaki and Mantzouridou, 2016).

**48** 

# 2.4.2.3.3. Υφιστάμενη διεργασίες επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων της επιτραπέζιας ελιάς

Πολλές τεχνικές και μέθοδοι έχουν προταθεί για την αναγέννηση και την επαναγρησιμοποίηση των υγρών αποβλήτων κατά τη διαδικασία παραγωγής της επιτραπέζιας ελιάς, ώστε να μειωθεί η τελική ποσότητα του χρησιμοποιούμενου νερού, να επιτευχθεί ανάκτηση συστατικών με οικονομικό ενδιαφέρον και περιοριστεί η προκαλούμενη μόλυνση (Romero Barranco et al., 2001). Μία από τις μεθόδους που γρησιμοποιούνται είναι η βιολογική επεξεργασία, μετά από προεργασία των αποβλήτων, η οποία περιλαμβάνει την αερόβια και την αναερόβια κατεργασία τους και χαρακτηρίζεται ως οικονομική και αποτελεσματική (Aggelis et al., 2001; Beltran et al., 2008; Brenes et al., 2000a; Ferrer-Polonio et al., 2016, 2015). Άλλες μέθοδοι που έχουν προταθεί διακρίνονται σε: (α) φυσικές μεθόδους, όπως η υγρή-υγρή εκχύλιση (Bouaziz et al., 2008a), και (β) φυσικοχημικές μεθόδους, όπως η χρήση ενεργού άνθρακα, η κροκίδωση (coagulation), η οζονοποίηση (Benitez et al., 2001) και η οξείδωση Fenton (Ayed et al., 2017; Benitez et al., 2003). Επιπλέον, ενισχυμένες μέθοδοι χημικής οξείδωσης έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως είναι η ηλεκτροχημική οξείδωση (Chatzisymeon et al., 2008; Deligiorgis et al., 2008) και η οξείδωση με εξάτμιση (wet air oxidation) (Katsoni et al., 2008). Ωστόσο, η τεγνολογία των μεμβρανών (Garcia-Ivars et al., 2015; Patsios et al., 2016), μέσω διαδικασιών μικροδιήθησης, υπερδιήθησης, νανοδιήθησης και αντίστροφης ώσμωσης, καθώς και η χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών (Raiti and Hafidi, 2015), εφαρμόζονται ολοένα και περισσότερο καθώς αποτελούν πολλά υποσχόμενες και περιβαλλοντικά φιλικές τεχνικές. Ακόμα, ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων, όπως βιολογικές με χημικές ή βιολογικές με μεθόδους μεμβρανών ή και περισσότερες από μία χημικές μέθοδοι στη σειρά, έχει δοκιμαστεί ώστε να σχεδιαστούν επεξεργασίες που να έχουν χαμηλό κόστος και αυξημένη αποτελεσματικότητα (Beltran-Heredia et al., 2000; Ferrer-Polonio et al., 2017b; Javier Benitez et al., 2001; Kyriacou et al., 2005; Tatoulis et al., 2016). Παρόλα αυτά, πολλές από τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν παρουσιάζουν μειονεκτήματα όσον αφορά το κόστος, τη χρήση τοξικών και εύφλεκτων διαλυτών. Επίσης, επάγουν τη δευτερογενή μόλυνση, δεν επιφέρουν ικανοποιητική μείωση του οργανικού φορτίου και επομένως απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία του τελικού προϊόντος, ώστε να μπορέσει να καταστεί ανακυκλώσιμο. Επιπλέον σε αρκετές από τις προαναφερόμενες

μεθόδους λαμβάνει χώρα η πλήρης αποικοδόμηση των βιοδραστικών συστατικών με αποτέλεσμα τη μη αξιοποίησή τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος της προσρόφησης-εκρόφησης από ρητίνες (adsorption-desorption) αποτελεί μία μέθοδο παραλαβής συστατικών από ολικά εκχυλίσματα και υγρά απόβλητα, τα οποία παράγονται από αγροτικές δραστηριότητες και επεξεργασίες τροφίμων. Είναι μία αποτελεσματική και συμβατικά οικονομική μέθοδος επεξεργασίας, η οποία παρουσιάζει πολλαπλά οφέλη για το περιβάλλον, την υγεία και την οικονομία.

# 2.4.3. Κυριότερες ομάδες συστατικών ελαιόκαρπου και βιολογικές ιδιότητές τους

Όπως προαναφέρθηκε, ο καρπός της ελιάς αποτελεί μία πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών, τα οποία ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, όπως τερπένια, ιριδοειδή, απλές φαινόλες, φλαβονοειδή κ.ά.

# 2.4.3.1. Τριτερπένια

Στον καρπό της ελιάς, τα τριτερπένια είναι κυρίως συγκεντρωμένα στο επικάρπιο και δομικά χαρακτηρίαζονται από την παρουσία του βασικού σκελετού του ολεανολικού οξέος. Μεταξύ των ενώσεων της κατηγορίας αυτής περιλαμβάνονται το ολεανολικό οξύ (στο επικάρπιο) και το 2-υδρόξυ- παράγωγό του, το μασλινικό οξύ (1,5-3,0 mg/g σάρκας). Με την ωρίμανση του καρπού, η συγκέντρωση του ολεανολικού οξέος μειώνεται ενώ του μασλινικού αυξάνεται. Άλλα τριτερπένια τα οποία έχουν ανιχνευτεί στον καρπό σε μικρότερη ποσότητα είναι η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη, τα οποία απαντώνται στις πράσινες ελιές ενώ απουσιάζουν από τις μαύρες ελιές έγκειται στο γεγονός ότι τα τριτερπένια ουβαόλη και ερυθροδιόλη απαντώνται μόνο στις πράσινες, ενώ μεγαλύτερες ποσότητες των υπόλοιπων πεντακυκλικών τριτερπενίων απαντώνται στις μαύρες (Bianchi et al., 1994, 1992; Bianchi and Vlahov, 1994; Guinda et al., 2010).

Τα πεντακυκλικά τριτερπένια είναι φυτικοί μεταβολίτες, που βιοσυντίθενται μέσω της μετατροπής του οξικού/μεβαλονικού οξέος προς (3S)-2,3-εξειδοσκουαλένιο, το οποίο μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις καταλήγει στο σχηματισμό των πεντακυκλικών τριτερπενίων. Το ολεανολικό οξύ (3β-υδροξυολεαν-12-εν-28-ικό οξύ) και το ισομερές του ουρσολικό οξύ (3β-υδροξυουρσαν-12-εν-28-ικό οξύ), είναι δύο τριτερπένια που αποτελούν τη βάση σημαντικού αριθμού τριτερπενικών σαπωνινών (Guinda et al., 2010).

Δομικά, το ολεανολικό και το μασλινικό οξύ είναι δύο υδροξυ- πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα, ενώ η ουβαόλη και η ερυθροδιόλη είναι τριτερπενικές αλκοόλες, των οποίων η δομή διαφοροποιείται στην παρουσία μεθυλενοϋδρόξυομάδας αντί για καρβοξυλομάδα στη θέση C-17 (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.). Το μασλινικό οξύ έχει δύο γειτονικές ομάδες υδροξυλίων στους άνθρακες C-2 και C-3. Τα προαναφερόμενα τριτερπένια απαντώνται στη σάρκα του ελαιόκαρπου και τα φύλλα του ελαιόδενδρου.



Εικ. 25: Χημικές δομές ολεανολικού οξέος, μασλινικού οξέος και των δυο αλκοολών ουβαόλης και ερυθροδιόλης (Sánchez-Quesada C.et al., 2013)

Πολυάριθμες είναι οι δράσεις που αποδίδονται στις τριτερπενικές ενώσεις όπως η αντιοξειδωτική, η αντιϊκή (αντι-ΗΙV), η αντιβακτηριακή, η αντιμυκητιασική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιαλλεργική, η ηπατοπροστατευτική, η γαστροπροστατευτική, η υπολιπιδαιμική, η αντιαθηροσκληρωτική και η αντιδιαβητική δράση. Ακόμα, έχουν αντιπολλαπλασιαστική και αντικαρκινική δράση, παρεμβαίνοντας σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου, αναστέλλοντας τη γένεση και την εξέλιξη των όγκων και προκαλώντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Sánchez-Quesada C.et al., 2013).

# 2.4.3.2. Σεκοϊριδοειδή

Τα σεκοϊριδοειδή απαντώνται σε μερικά μόνο είδη βρώσιμων πρώτων υλών, όπως είναι ο ελαιόκαρπος. Προέρχονται από τα ιριδοειδή και χαρακτηρίζονται από το άνοιγμα του κυκλοπεντανικού δακτυλίου. Τα ιριδοειδή είναι μονοτερπένια με ένα χαρακτηριστικό δικυκλικό σύστημα που περιέχει έναν 6-μελή ετεροκυκλικό δακτύλιο συνδεμένο με έναν κυκλοπεντανικό δακτύλιο. Το κύριο μονοπάτι βιοσύνθεσης των ιροδοειδών στην οικογένεια Oleaceae, είναι η οδός σύνθεσης του δεοξυλογανικού οξέος από την ιριδοδιάλη μέσω της ιριδοτριάλης. Τα περισσότερα ιριδοειδή του γένους Oleaceae είναι σεκοϊριδοειδή και προέρχονται από το δεοξυλογανικό οξύ, ενώ πολλά άλλα παράγονται απευθείας από τη λογανίνη και τη σεκολογανίνη, καθώς η 7-επι-λογανίνη και το 7-επι-λογανικό οζύ είναι τα βασικά ενδιάμεσα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των περισσότερων ολεοσιδών. Τα σεκοϊριδοειδή όπως η ολευρωπεΐνη, προέρχονται από συνδυασμό του μονοπατιού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέος, μέσω του οποίου συντίθεται το τερπενικό μέρος, αλλά και του μονοπατιού βιοσύνθεσης του φαινυλοπροπανοϊκού οξέος, μέσω του οποίου συντίθεται το φαινολικό τμήμα της ένωσης (Σφάλμα! Το αργείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.). Χαρακτηρίζονται από μια εξωκυκλική 8,9-ολεφινική περιοχή και ονομάζονται ολεοσιδικά σεκοϊριδοειδή ή ολεοσίδες. Η ολευρωπεΐνη και ο λιγκστροσίδης αποτελούν τους κύριους ολεοσίδες της Olea europea και είναι εστέρες του ελενολικού οξέος με την 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-αιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και τη 2-(4υδροξυφαινυλο)-αιθανόλη (τυροσόλη), αντίστοιχα, με δομές που είναι παρόμοιες (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.) (Gariboldi et al., 1986)(Charoenprasert and Mitchell, 2012b; Obied et al., 2008)<sup>7</sup>.



Εικ. 26: Διαγραμματική απεικόνιση πορείας της σύνδεσης του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (Obied et al., 2008)

Άλλα παράγωγά τους είναι η δεμεθυλολευρωπεΐνη, το άγλυκο ολευρωπεΐνης, το ελενολικό οξύ και ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (Amiot et al., 1989) (Charoenprasert and Mitchell, 2012a).



Εικ. 27: Χημική δομή σεκοιριδοειδών ολευρωπεΐνης, λιγκστροσίδη, διμέθυλολευρωπεΐνης και 3,4-DHPEA-EDA.(Charoenprasert and Mitchell, 2012a)

# **2.4.3.2.1.** Ολευρωπεΐνη

Η ολευρωπεΐνη είναι υπεύθυνη σε μεγάλο βαθμό για την πικρή γεύση του ελαιόκαρπου και αποτελεί την κυρίαρχη φαινολική ένωση στην ακατέργαστη ελιά. Δομικά αποτελεί έναν εστέρα της υδροξυτυροσόλης με τον 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη. Αποτελεί ένα πολύ πικρό συστατικό και χρειάζεται να απομακρυνθεί από τον καρπό για να καταστεί βρώσιμος. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με υδρόλυση της ολευρωπεΐνης σε λιγότερο πικρά συστατικά, όπως είναι η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη (Charoenprasert and Mitchell, 2012a). Έτσι, όταν ο καρπός ωριμάζει η ολευρωπεΐνη σταδιακά μειώνεται και φτάνει σε ένα ποσοστό 14% επί του ξηρού καρπού (Amiot et al., 1986), ενώ μέχρι το τέλος της ωρίμανσης το ποσοστό αυτό μειώνεται ακόμη περισσότερο. Γενικά, οι μικρόκαρπες ποικιλίες ελιάς χαρακτηρίζονται από υψηλό περιεχόμενο ολευρωπεΐνης από την αρχή μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης, σε αντίθεση με μεγαλόκαρπες ποικιλίες (Bianchi, 2003). Μπορεί να φτάσει τα 140 mg/g επί ξηρού καρπού.

Δύο είναι τα προτεινόμενα βιοσυνθετικά μονοπάτια σχηματισμού της ολευρωπεΐνης στην οικογένεια Oleaceae. Τα ένα βασίζεται στην οδό του μεβαλονικού οξέος, στην οποία ο λιγκστροσίδης είναι η πρόδρομη ένωση σχηματισμού της ολευρωπεΐνης (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.) και η δεύτερη εναλλακτική οδός που έχει προταθεί, σχετίζεται με το σχηματισμό της ολευρωπεΐνης

μέσω της τυροσίνης (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.) (Obied et al., 2008).



Εικ. 28: Προτεινόμενο βιοσυνθετικο μονοπάτι σχηματισμού της ολευρωπεΐνης της Olea europaea (Alagna et al., 2016; Obied et al., 2008)



Εικόνα 29: Προτεινόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι σχηματισμού της ολευρωπεΐνης της Olea europaea (Alagna et al., 2016; Obied et al., 2008)

Άξιες αναφοράς αποτελούν οι πολυάριθμες βιολογικές δράσεις της ολευρωπεΐνης, καθώς έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει μία σειρά σημαντικών ιδιοτήτων. Κύρια βιολογική δράση της είναι η αντιοξειδωτική (Serreli et al., 2017), με όλες τις επακόλουθες δράσεις λόγω αυτών που προαναφέρθηκαν. Επίσης έχει αναφερθεί η προοξειδωτική της δράση, παρέχοντας έναν μηγανισμό που προάγει αποπτωτικές, κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις (Odiatou et al., 2013). Η αντιφλεγμονώδης δράση της ολευρωπεΐνης έχει αποδειχθεί και κατ' επέκταση έχει αναφερθεί για τη προληπτική συμβολή της έναντι χρόνιων ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις και μορφές καρκίνου (Cicerale et al., 2009). Μελέτες έχουν υποδείξει την καρδιοπροστατευτική δράση πλούσιων σε ολευρωπεΐνη εκχυλισμάτων, καθώς φαίνεται πως ρυθμίζεται η πίεση του αίματος, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της LDL χολιστερόλης (M.-I. Covas et al., 2006; Susalit et al., 2011). Σημαντικές είναι οι νευροπροστατευτικές δράσεις της ολευρωπεΐνης και των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών της ελιάς, που υποστηρίζονται με βάση πολυάριθμες μελέτες (Mohagheghi et al., 2011; Pasban-aliabadi et al., 2013). Ακόμα έχει αναφερθεί για την ολευρωπεΐνη η υπατοπροστατευτική της δράση (Domitrović et al., 2012), η γαστροπροστατευτική (Motilva et al., 2008), η υπογλυκαιμική (Visen et al., 2009), καθώς και η προστατευτική της δράση κατά της οστεοπόρωσης (Puel et al., 2007, 2004).

#### 2.4.3.3. Φαινολικές ενώσεις

Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι φέρουν αρωματικούς δακτυλίους και έναν ή περισσότερους υποκατάστατες υδροξυλίου. Βιοσυνθετικά προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μεταβολισμό των φαινυλοπροπανοειδών (Ryan and Robards, 1998). Δομικά οι φαινολικές ενώσεις ποικίλουν από απλά φαινολικά μόρια με έναν αρωματικό δακτύλιο μέχρι πολύπλοκα με πολλαπλούς αρωματικούς δακτυλίους, φέροντας σε αυτούς έναν ή περισσότερους υποκατάστατες υδροξυλίου. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στη φύση είναι συζευγμένες με μονο- και πολυσακχαρίτες (γλυκοσίδες), συνδεδεμένους με μία ή περισσότερες από τις φαινολικές ομάδες, ενώ απαντώνται και με τη μορφή άλλων βιοδραστικών παραγώγων τους, όπως οι εστέρες και οι μεθυλαιθέρες (Ajila et al., 2011). Λόγω της παρουσίας των υδροξυλομάδων, αλλά και σακχάρων στην περίπτωση των γλυκοσιδών, οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι συνήθως υδατοδιαλυτές. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και οι κρεσόλες που είναι λιποδιαλυτές. Τα φαινολικά στην ελιά αποτελούν το 1-3% του βάρους της σάρκας. Οι κύριες τάξεις φαινολικών ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή και τα λιγνάνια (Charoenprasert and Mitchell, 2012a; Ghanbari et al., 2012).

Κύριο χαρακτηριστικό των φαινολικών ενώσεων αποτελούν οι ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους, οι οποίες τους επιτρέπουν να δρουν ως παράγοντες εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και γενικότερα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Επίσης, δρουν ως χηλικοποιητές μεταλλικών ιόντων, αποτρέποντας την επιτάχυνση των οξειδωτικών διεργασιών (Cardinali et al., 2012). Σημαντική για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων είναι η παρουσία ενός 3,4διυδροξυ- αρωματικύ συστήματος, ενώ η δραστικότητα εξαρτάται από τη πολικότητα της φαινολικής ένωσης (Uylaşer and Yildiz, 2014). Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρεμποδίζουν την οξείδωση λιπιδίων και άλλων μορίων με ταχεία προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου σε ρίζες όπως φαίνεται στις ακόλουθες εξισώσεις (Ajila et al., 2011):

#### ROO\*+PPH-->ROOH+PP\*

#### RO\*+PPH-->ROH+PP\*

Οι ενδιάμεσα σχηματιζόμενες ρίζες φαινοξυλίου είναι σχετικά σταθερές και δεν είναι εύκολη η ενεργοποίηση νέων αλυσιδωτών αντιδράσεων μέσω ελευθέρων ριζών. Η ενδιάμεση φαινόξυ- ρίζα δρα επίσης ως αναστολέας της οδού διάδοσης της οξείδωσης, αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες και σχηματίζοντας αδρνείς ενώσεις (Ajila et al., 2011):

## ROO\*+PP\*-->ROOPP

Η ανισορροπία μεταξύ της αυξημένης παραγωγής ROS και της ανεπαρκούς αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός οργανισμού οδηγεί σε μια κατάσταση οξειδωτικού στρες (Cardinali et al., 2012).

#### 2.4.3.3.1. Σημασία φαινολικών για την ελιά

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρουσία των φαινολικών για το ελαιόδενδρο, καθώς δρουν ως αμυντικοί παράγοντες κατά της φωτοοξείδωσης που προκαλείται από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, ως αντιμικροβιακά συστατικά κατά των βακτηρίων,

μυκήτων και ιών και γενικά προσφέρουν προστασία υπό συνθήκες στρες (πληγές, μολύνσεις κ.ά.). Τα φαινολικά συστατικά συμμετέχουν ακόμη στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ελαιόκαρπου καθώς επιδρούν στο χρώμα και τη γεύση και μέσω της συγκέντρωσης ορισμένων από αυτά, όπως η ολευρωπεΐνη, διαμορφώνουν την πικράδα του ελαιόκαρπου. Επιδρούν και στις αντιδράσεις αμαύρωσης, καθώς με την υδρόλυση της ολευρωπεΐνης και την επακόλουθη η ενζυμική οξείδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες, οδηγεί στο σχηματισμό του μαύρου χρώματος του καρπού (Ryan and Robards, 1998). Επομένως, η συγκέντρωση και το είδος των φαινολικών συστατικών σχετίζονται με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων της ελιάς, όπως το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές.

Βέβαια, πολυάριθμοι είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποικιλία και τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στον ελαιόκαρπο, όπως η καλλιέργεια και η ποικιλία, ο βαθμός ωρίμανσης, το κλίμα και οι αγρονομικές πρακτικές. Επίσης, τεχνολογικές επεξεργασίες μπορεί να προκαλούν σημαντικές αλλαγές στο φαινολικό περιεχόμενο (Charoenprasert and Mitchell, 2012b; Romero et al., 2004; Ryan et al., 1999a; Ryan & Robards, 1998).

Η κύρια φαινολική ένωση των ελιών είναι η ο-διφαινόλη ολευρωπεΐνη, της οποίας η συγκέντρωση μειώνεται με την ωρίμανση του καρπού. Με τη μείωση της ολευρωπεΐνης, παρατηρείται αύξηση του προιόντος υδρόλυσης της (υδροξυτυροσόλη), ένωση η οποία είναι η επικρατέστερη στις μαύρες ώριμες ελιές. Γενικά τα φαινολικά συστατικά που απαντώνται στον ελαιόκαρπο είναι: ανθοκυανίνες (γλυκοσίδες κυανιδίνης και δελφινιδίνης), φλαβονόλες (κυρίως ρουτινοσίδης-3-κερκετίνης), φλαβόνες (γλυκοσίδες λουτεολίνης και απιγενίνης), φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά, κ.ά.), φαινολικές αλκοόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη), υδρόξυκιναμικά σεκοϊριδοειδή (ολευρωπεΐνη, δεμεθυλολευρωπεΐνη, λιγκστροσίδης, νουζενίδης), βερμπασκοσίδης (παράγωγο υδροξυκιναμμωμικού οξέος) και λιγνάνια. Άλλα βιοδραστικά συστατικά αποτελούν οι τοκοφερόλες καθώς και διάφορα μη φαινολικά συστατικά, όπως τα υδροξυτερπενικά οξέα και οι τριτερπενικές αλκοόλες (ολεανολικό οξύ, ερυθροδιόλη, μασλινικό οξύ, ουρσολικό οξύ, ουβαόλη), το σκουαλένιο, οι φυτοστερόλες και τα καροτενοειδή (Bianco and Uccella, 2000; Romero et al., 2004).

#### 2.4.3.3.2. Βιολογικές δράσεις φαινολικών

Μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα, έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με ορισμένες κοινές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, αναγνωρίζεται ως αιτιολογικός παράγοντας πτώσης της ανοσολογικής λειτουργίας και πρόκλησης αθηροσκλήρωσης. Ειδικότερα, οι δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και η ρίζα υδροξυλίου (OH•), έχουν αναφερθεί ότι δρουν ως κυτταροτοξικοί παράγοντες και βλάπτουν τα ακόρεστα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών (Cardinali et al., 2012). Οι ελεύθερες ρίζες δεν προάγουν μόνο την υπεροξείδωση των λιπιδίων, αλλά προωθούν και την οξείδωση κυτταρικών βιομορίων όπως το DNA και οι πρωτεϊνες (Moskovitz et al., 2002; Stadtman, 2006).

Πολυάριθμες είναι οι βιολογικές δράσεις που αποδίδονται τόσο στη γενικότερη ομάδα των φαινολικών συστατικών όσο και στις φαινόλες που απαντώνται στα προϊόντα ελιάς. Η κύρια μεταξύ των βιολογικών ιδιοτήτων, όπως προαναφέρθηκε, είναι η αντιοξειδωτική δράση, ενώ άλλες ευεργετικές επιδράσεις είναι η αντιφλεγμονώδης, η αντιμικροβιακή, η αντιαλλεργική, η αντιθρομβωτική, η καρδιοπροστατευτική, η αγγειοδιασταλτική, η αντιδιαβητική κ.ά (Ajila et al., 2011). Αλληλοεπιδρώντας με ένα ευρύ φάσμα μοριακών στόχων συμβάλλουν στην αναστολή της λειτουργίας κυτταρικών ενζύμων, όπως τα PLA2, COX και LOX, ώστε τελικά μειώνεται η παραγωγή του αραγιδονικού οξέος, των προσταγλαδινών και των λευκοτριενίων, δηλαδή των προφλεγμονωδών παραγόντων και έτσι ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση (Puel et al., 2008)(Casaburi et al., 2013)<sup>7</sup>. Η ενεργοποίηση μοριακών σημάτων τα οποία αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση σε πολλά ογκογόνα καρκινικά κύτταρα, όπως αυτά που σχετίζονται με τη λευχαιμία, τον καρκίνο παχέος εντέρου, τον καρκίνο του μαστού και άλλες μορφές, τους προσδίδουν αντικαρκινική δράση (Casaburi et al., 2013). Ακόμα, υποστηρίζεται η εγγενής οιστρογονική δράση κάποιων φαινολικών ενώσεων (π.χ. υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη ελαιολάδου), οι οποίες, χάρη στη ρύθμιση τόσο των φλεγμονωδών διεργασιών όσο και της ανοσοαπόκρισης, καθίστανται αποτελεσματικές στην πρόληψη της οστικής απώλειας (Puel et al., 2008). Η προστασία των αντιοξειδωτικών αυτών ενώσεων έναντι της οξείδωσης της LDL, συντελεί στην αναστολή των κυτταρικών διεργασιών που οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβων και επομένως εμφανίζουν προληπτική επίδραση έναντι των

αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων (Cardinali et al., 2012) και ασκούν αντιθρομβωτική δράση (Fernández-bolaños et al., 2008).

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως οι πολυφαινόλες, προσελκύουν αυξημένη προσοχή λόγω της δυνητικής τους διατροφικής και θεραπευτικής αξίας και της ασφάλειας κατανάλωσης τους. Για το λόγο αυτό, αναπτύσσονται συνεχώς νέες διεργασίες για την ανάκτηση φαινολικών και άλλων βιοδραστικών συστατικών από φυσικές πηγές με σκοπό την περαιτέρω αξιοποίησή τους.

#### 2.4.3.3.3. Φαινολικές αλκοόλες

Οι κύριες φαινολικές αλκοόλες στον ελαιόκαρπο είναι η υδροξυτυροσόλη (3,4διυδροξυφαινυλαιθανόλη), η τυροσόλη (π-υδροξυφαινυλαιθανόλη) και οι γλυκοσίδες τους. Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη μπορεί να φτάνουν τα 76 mg / 100g ελιάς και 20 mg / 100g ελιάς, αντίστοιχα (Ghanbari et al., 2012). Η υδροξυτυροσόλη παράγεται με υδρόλυση της ολευρωπεΐνης και η τυροσόλη από την υδρόλυση του λιγκστροσίδη (**Εικ. 30**) (Brenes et al., 1995a). Επομένως γίνεται κατανοητό ότι κατά την ωρίμανση του καρπού, η επερχόμενη μείωση της ολευρωπεΐνης και του λιγκστροσίδη συνεπάγεται την αύξηση της συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης.



Εικ. 30: Υδρόλυση της ολευρωπεΐνης και του λιγκστροσίδη σε υδρόξυτυροσόλη και τυροσόλη (Charoenprasert and Mitchell, 2012a)

# 2.4.3.3.3.1. Υδροξυτυροσόλη – Τυροσόλη

Η υδροξυτυροσόλη απαντάται στα προϊόντα ελιάς, είτε ως απλή φαινόλη είτε εστεροποιημένη με το μόριο ελενολικού οξέος προς σχηματισμό της ολευρωπεΐνης και του άγλυκού της, αλλά και ως δομική ομάδα του ακτεοσίδη. Επίσης, απαντώνται διάφοροι γλυκοσίδες της, οι οποίοι διαφοροποιούνται στη θέση και τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων (Romero et al., 2002). Η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητά της αποδίδεται στην παρουσία του ο-διδροξυφαινυλίου, το οποίο ξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες (Fernández-bolaños et al., 2008) (Aruoma et al., 1998). Η υδροξυτυροσόλη έχει τμήμα κατεχόλης στο μόριο της, δρα κυρίως ως δότης υδρογόνου στις παραγόμενες ρίζες αλκυλοϋπεροξυδίου κατά το στάδιο οξείδωσης των λιπιδίων και αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό με ποικίλες επιδράσεις. Αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδίων στην οποία οφείλεται η οξείδωση της LDL χολιστερόλης (Fernández-bolaños et al., 2008). Η υποχοληστερολαιμική της δράση αποδίδεται στην ικανότητα μείωσης των επιπέδων ολικής χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης στο αίμα, καθώς και στην επιβράδυνση υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Fki et al., 2007). Επίσης, η υδροξυτυροσόλη ασκεί προστατευτική δράση έναντι των βλαβών του DNA, ενώ πιστεύεται ότι η αντικαρκινική της δράση σχετίζεται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων, η οποία εκδηλώνεται μέσω της αποπτωτικής και αντιπολλαπλασιαστικής επίδρασής τους (Terzuoli et al., 2017). Επίσης, έχει αναφερθεί η καρδιοπροστατευτική της δράση, η οποία έχει συσχετισθεί με τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και τη βελτίωση του λιπιδικού προφίλ (Fernández-Mar et al., 2012). Ακόμα, η υδροξυτυροσόλη έχει φανεί ότι ασκεί προστατευτικό ρόλο έναντι της αύξησης των δεικτών οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την υπεριώδη (UVA) ακτινοβολία και επομένως παρέχει προστασία στο δέρμα (D'Angelo et al., 2005). Ισχυρή είναι η αντιβακτηριακή δράση και η αντιμυκητιασική εκχυλισμάτων πλούσιων σε υδροξυτυροσόλη έναντι διαφόρων μικροβιακών στελεχών (Furneri et al., 2004; Markín et al., 2003). Μελέτες έγουν δείξει ότι φαινόλες, όπως είναι η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη, συμβάλλουν στον σχηματισμό προϊόντων, τα οποία αλληλοεπιδρούν με υποδοχείς και ρυθμίζουν χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις όπως ο διαβήτης τύπου ΙΙ, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι γαστρεντερικές φλεγμονές (Fernández-Mar et al., 2012), ενώ η υδροξυτυροσόλη θεωρείται και πιθανός νευροπροστατευτικός παράγοντας (González-Correa et al., 2008). Όπως φαίνεται, πολυάριθμες είναι οι βιολογικές δράσεις αποδιδόμενες στο μόριο της υδροξυτυροσόλης κάτι που προσδίδει αξία στις πρώτες ύλες στις οποίες απαντάται.





Η τυροσόλη είναι μια ενδιαφέρουσα φαινολική ένωση για τη βιομηχανία, καθώς τόσο η ίδια όσο και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών οργανικών ενώσεων. Αποτελεί πιθανή πρόδρομο ένωση της υδροξυτυροσόλης (Bernini et al., 2008), η οποία έχει πλούσιο βιοδραστικό προφίλ όπως προαναφέρθηκε. Η τυροσόλη από μόνη της, έχει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, περιλαμβάνοντας τον προστατευτικό ρόλο έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων (Bernini et al., 2008), της οστεοπενίας (Puel et al., 2008), της μελανογέννεσης (Liu et al., 2007), ενώ εμφανίζει και αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της επίδρασής της σε προφλεγμονωδεις παράγοντες (Lu et al., 2013). Η τυροσόλη απαντάται σε πλήθος φυσικών προϊόντων όπως στο ελαιόλαδο, τις επιτραπέζιες ελιές και το κρασί, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι μια πλούσια πηγή τυροσόλης όπως και υδροξυτυροσόλης είναι τα παραπροϊόντα - απόβλητα επεξεργασίας ελαιολάδου και επεξεργασίας επιτραπέζιων ελιών (De Marco et al., 2007; González-Hidalgo et al., 2012).

# **2.4.3.3.4.** Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την πιο απλή μορφή φαινολικών ενώσεων στον ελαιόκαρπο και δομικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία φαινολικού δακτυλίου και καρβοξυλομάδας. Ταξινομούνται σε διάφορες υποομάδες, όπως είναι τα παράγωγα βενζοϊκού οξέος (C6-C1), τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος (C6-C3) κ.ά. Τα φαινολικά οξέα που παρουσιάζονται στον ελαιόκαρπο είναι το καφεϊκό, το φερουλικό, το βανιλλικό, το κουμαρικό και το συρινγκικό οξύ (Sivakumar et al., 2005), ενώ μεταξύ των παραγώγων τους ξεχωρίζει ο βερμπασκοσίδης ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των φαινυλοπροπανοϊκών οξέων (**Εικ. 32**) (Charoenprasert and Mitchell, 2012a) (Campestre et al., 2002; Vincenzo Marsilio et al., 2001; Ryan et al., 2002, 1999b).



Εικ. 32: Δομές κύριων φαινολικών οξέων που απαντώνται στην Olea europaea L

Ο βερμπασκοσίδης απαντάται κυρίως στον ελαιόκαρπο και τα φύλλα (Fu et al., 2010). Προκύπτει από την υδρόλυση της ολευρωπείνης, επομένως καθίσταται ανιγνεύσιμος κατά την επερχόμενη ωρίμανση του καρπού και δύσκολα ανιχνεύεται στους νεαρούς καρπούς. Αποτελεί ένα αντιοξειδωτικό φυσικό προϊόν (Aldini et al., 2006), το οποίο διαθέτει ισχυρότερη δράση από την υδροξυτυροσόλη και το καφεϊκό οξύ, το οποίο θεωρείται από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά (Obied et al., 2009). Αποτελείται από μονάδες καφεϊκού οξέος και 3,4-υδροξυφαινυλαιθανόλης (υδροξυτυροσόλη), οι οποίες συνδέονται με μία μονάδα β-D-γλυκοπυρανόσης, μέσω ενός εστερικού και γλυκοσιδικού δεσμού αντίστοιγα (Seidel et al., 2000). Η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στην συνεργιστική δράση των δυο φαινολικών τμημάτων του, του καφεϊκού οξέος και της υδροξυτυροσόλης (Ciriminna et al., 2016). Διάφορες βιολογικές ιδιότητες έχουν αναφερθεί για τον βερμπασκοσίδη και το αγλυκό του, όπως η αντιφλεγμονώδης (Seidel et al., 2000), η αντιμικροβιακή, η αντιθρομβωτική και η αντιοξειδωτική (Guillermo Avila et al., 1999). Δρα ως εξουδετερωτής ελευθέρων ριζών και έχει άμεση επίδραση στην υγεία του δέρματος, εξαιτίας της ικανότητάς του να αποτρέπει τις οξειδωτικές βλάβες που σχετίζεται με το σχηματισμό ρυτίδων, τη λέπτυνση και την αφυδάτωση του δέρματος. Για τον λόγο αυτό έχει αποτελέσει βασικό συστατικό σε καλλυντικά και άλλα προϊόντα προστασίας του δέρματος (Ciriminna et al., 2016). Ο βερμπασκοσίδης είναι μια υδατοδιαλυτή ένωση, η οποία παρά τον υδρόφιλο χαρακτήρα της, παρουσιάζει σημαντική συγγένεια με τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες των φωσφολιπιδίων, γεγονός που εξηγεί την πιθανή προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων (Funes et al., 2010). Επίσης έχει αναφερθεί η δράση του έναντι της προκαλούμενης από χαλκό οξείδωση της LDL (Seidel et al., 2000).

#### **2.4.3.3.5.** Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή, έχουν ως βασικό σκελετό του μορίου τους τη δομή του διφαινυλοπροπανίου ή φλαβανίου (C6-C3-C6). Εμφανίζονται ως γενίνες, γλυκοσίδες και ως μεθυλιωμένα παράγωγα. Η γενίνη φλαβονοειδούς αποτελείται από ένα βενζολικό δακτύλιο (A), συζευγμένο με έναν εξαμελή δακτύλιο (C), ο οποίος φέρει ως υποκαταστάτη στη θέση 2 ένα δεύτερο αρωματικό δακτύλιο (Narayana et al., 2001). Με βάση τα ιδιαίτερα δομικά τους χαρακτηριστικά κατατάσσονται σε διάφορες υποκατηγορίες, όπως είναι οι φλαβανόλες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβόνες, τα ισοφλανοεϊδή και οι ανθοκυανιδίνες. Οι κύριες φλαβόνες και φλαβονόλες είναι αυτές οι οποίες φέρουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 5 και 7 του δακτυλίου A, όπως επίσης και υδροξύλια στις θέσεις 3' και 4' θέση του Β. Η γλυκοσυλίωση υφίσταται συχνότερα στην 3-θέση και σπανιότερα στην 7-θέση. Σύνηθες σάκχαρο είναι η γλυκόση, ενώ επίσης απαντώνται και η γαλακτόση, η ραμνόση, η ξυλόζη και η αραβινόση (Rice-Evans et al., 1996).

Τα φλαβονοειδή που απαντώνται στον ελαιόκαρπο είναι ο 7-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης, ο 3-Ο-γλυκοσίδης της κυανιδίνης, ο 3-Ο-ρουτινοσίδης της κυανιδίνης, η ρουτίνη, ο 7-Ο-γλυκοσίδης της απιγενίνης, ο 3-Ο-ραμνοσίδης της κερκετίνης και η λουτεολίνη (**Εικ. 33**) (Romani et al., 1999; Vinha et al., 2005; Vlahov, 1992).



Εικ. 33: Δομές κύριων φλαβονοειδών ενώσεων που απαντώνται στην Olea europaea L

Τα φλαβονοειδή διαθέτουν πολυάριθμες βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις, ενώ έχουν και καλή βιοθεσιμότητα στον οργανισμό (Stoclet and Schini-Kerth, 2011). Αποτελούν αντιοξειδωτικές ενώσεις (Nijveldt et al., 2001; Sandhar et al., 2011) και έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία εκδηλώνεται μέσω της αναστολής του ενζύμου φωσφολιπάση A2, των κυκλοξυγενασών και οι λιπογεναςών, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση των προφλεγμονωδών παραγόντων, προσταγλαδινών και λευκοτριενίων (Kim et al., 2004). Επίσης, εμπλέκονται και σε άλλους αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς όπως στην αναστολή απελευθέρωσης της ισταμίνης,

της φωσφοδιεστεράσης, των πρωτεϊνικών κινασών και στην ενεργοποίηση της μεταγραφάσης (Rathee et al., 2009). Άλλες εξίσου σημαντικές ιδιότητές τους είναι οι αντιβακτηριακές (Rice-Evans et al., 1996), οι αντιαλλεργικές, οι αντιϊκές (Preethi Soundarya et al., 2017), οι αγγειοδιασταλτικές (Stoclet and Schini-Kerth, 2011), οι αντικαρκινικές- αντιπολλαπλασιαστικές (Delmulle et al., 2006; Zava and Duwe, 1933), και οι οιστρογονικές. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι προάγουν την οστεοβλαστογένεση, ασκώντας προστατευτική δράση στα οστά (Preethi Soundarya et al., 2017).

### 2.4.3.3.6. Λιγνάνια

Ο όρος λιγνάνια πρωτοαναφέρθηκε από τον Haworth το 1936, για την περιγραφή μιας ομάδας διμερών φαινυλοπροπανοειδών στην οποία τα τμήματα C6-C3 συνδέονται με ένα κεντρικό άνθρακα (β ή 8) της προπυλομάδας τους. Κατά τον IUPAC, τα λιγνάνια είναι 8,8 συζευγμένα διμερή της κονιφερυλικής ή κιναμιλικής αλκοόλης (Dar and Arumugam, 2013). Η ευρύτερη ομάδα των λιγνανίων χωρίζεται σε λιγνάνια (περιλαμβάνουν δύο τμήματα C6-C3 συζευγμένα από ένα 3β-(8-8') δεσμό), νεολιγνάνια (περιλαμβάνουμ δύο C6-C3 ομάδες αλλά όχι ενωμένα με 3β δεσμό) και υβριδικά λιγνάνια (που περιλαμβάνουν ένα C6-C3 τμήμα ενωμένο με κάποια άλλη δομή, όπως το σκελετό της βενζο-γ-πυρόνης των φλαβονοειδών στα φλαβανολιγνάνια). Τα τελευταία, διαχωρίζονται με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά, όπως το βασικό σκελετό, την παρουσία οξυγόνου και τον τύπο κυκλοποίησης, σε 8 κύριους τύπους:

- φουροφουράνια (πινορεσινόλη, σισαμίνη),
- φουράνια (λαρισιρεσινόλη, ολιβίλη),
- διβενζυλοβουτάνια (σεκοϊσολαρισιρεσινόλη),
- διβενζυλοβουτυρολακτόνες (ματαιρεσινόλη),
- αρυλοτετρακυκλίνες (ποδοφυλοτοξίνη,
- διβενζυλοκυκλοκταδιένια και
- διβενζυλβουτυρολακτόλες.

Στην κατηγορία των λιγνανίων απαντώνται ποικίλες χημικές δομές, όπως τα (8-Ο-4') νεολιγνάνια (ή 8,4'-οξυνεολιγνάνια), όπου δύο C6-C3 τμήματα είναι ενωμένα με ένα αιθερικό οξυγόνο, τα κυκλολιγνάνια τα οποία περιέχουν ένα καρβοξυλικό δακτύλιο, τα 'seco'- προσαρμοσμένα λιγνάνια τα οποία έχουν έναν δακτύλιο ή τα μη προσαρμοσμένα λιγνάνια όπου ένα ή παραπάνω άτομα άνθρακα λείπουν από τον σκελετό (Kiyama, 2016). Παρακάτω παρατίθενται οι βασικές δομές των λιγνανίων (Suzuki and Umezawa, 2007):



Εικ. 34: Βασικές δομές λιγνανίων.

Η βιοσύνθεση των λιγνανίων γίνεται από τα μονομερή φαινυλοπροπανοειδών, μέσω της κονιφερυλικής αλκοόλης με τη βοήθεια ενζύμων, όπως η ρεδουκτάση, η δεϋδρογενάση, η υδροξυλάση, η μεθυλοτρανσφεράση και η οξυγενάση μέσω οξειδωτικής σύζευξης (MacRae and Towers, 1984). Τα νορ-λιγνάνια («norlignans») θεωρούνται ότι βιοσυντίθενται μέσω της προαναφερόμενης οδού με απώλεια ενός άνθρακα, ή με κατάλληλες τροποποιήσεις των φαινυλοπροπανοειδικών μονομερών. Μετά τη βιοσύνθεσή τους (**Εικ. 35**), τα λιγνάνια και τα «norlignans» εναποτίθενται στη καρδιά του κορμού των δέντρων και το προστατεύουν από την γήρανση (Suzuki and Umezawa, 2007).



Εικ. 35: Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι λιγνανίων

Αυτές οι πολυφαινολικές ενώσεις απαντώνται σε μεγάλο εύρος ειδών στο φυτικό βασίλειο, όπως στα πτεριδόφυτα, τα αγγειόσπερμα και τα γυμνόσπερμα (Dar and Arumugam, 2013). Κύρια πηγή τους μέχρι σήμερα αποτελεί ο λιναρόσπορος (López-Biedma et al., 2016). Υπάρχουν δύο γενικοί τύποι λιγνανίων:

- αυτά που απαντώνται σε σπόρους φυτών όπως ο διγλυκοσίδης σεκοϊσολαρισιρεσινόλης, η ισολαρισιρεσιρεζινόλη, η ματερεζινόλη, η λαρισιρεζινόλη και η πινορεζινόλη (secoisolariciresinol diglucoside, isolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol).
- 2) αυτά που απαντώνται στα ζώα και τους ανθρώπους, γνωστά ως λιγνάνια θηλαστικών, τα οποία υπάρχουν γενικά απαντώνται στα πλούσια σε φυτικές ίνες φυτικά είδη (Setchell et al., 2014). Τα λιγνάνια αποτελούν μέλος της κατηγορίας των φυτοοιστρογόνων, τα οποία είναι γνωστά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες για την υγεία (Muhammad I. et al., 2015).

Πολλά υποσχόμενες είναι οι ευεργετικές ιδιότητες που αποδίδονται στα λιγνάνια και τα παράγωγα τους χάρη στις πολυάριθμες βιολογικές δράσεις τους (Adlercreutz, 2007). Μελέτες αποδέχονται πως η πρόσληψη φυτικών λιγνανίων ή η υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα των εντερολιγνανίων, συσχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης παθήσεων, όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι προαναφερόμενες δράσεις των λιγνανίων σχετίζονται με τις φυτοοιστρογόνες ιδιότητές τους, την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και με τις αντιμικροβιακές, τις αντιϊκές και τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους (Barbary et al., 2010; During et al., 2012; E Silva et al., 2014; Kernan et al., 1997; Li et al., 2009; Saleem et al., 2005) (López-Biedma et al., 2016). Αναφέρεται πως τα λιγνάνια μπορεί να επηρεάσουν τον ηπατικό μεταβολισμό, να αυξήσουν την απομάκρυνση της LDL από τα κύτταρα του ήπατος, να ρυθμίσουν τη δράση της τρανσφεράσης χοληστερόλης ακέτυλο-CoA (*«acyl-CoA»*), η οποία μπορεί να συμβάλει στη μείωση των επιπέδων της LDL και των τριγλυκεριδίων. Τα λιγνάνια επιδρούν στο μεταβολισμό του θυρεοειδούς, αυξάνοντας την απέκκριση και μειώνοντας την απορρόφηση της διαιτητικής χοληστερόλης (Figueiredo et al., 2017). Ακόμη, τα λιγνάνια έχουν υποδείξει νευροπροστατευτική δράση (Y. Xu et al., 2017), αντιστρεσογόνο δράση (MacRae and Towers, 1984), καθώς και υπογλυκαιμική δράση (Wikul et al., 2012).

Αξίζει να σημειωθεί η οιστρογονική δράση των λιγνανίων. Τα λιγνάνια και οι γλυκοσίδες τους, κατά την πέψη τους στο παχύ έντερο σχηματίζουν τον διγλυκοσίδη σεκοϊσολαρισιρεσινόλης (SDG), ο οποίος έπειτα μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα σε εντεροδιόλη (enterodiol-ED) και εντερολακτόνη (enterolactone-EL) (Heinonen et al., 2001), γνωστά ως εντερολιγνάνια, τα οποία δρουν προσδενόμενα στους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs). Δρουν αναστέλλοντας την υπερέκφραση των αναπτυσσόμενων όγκων, αναστέλλοντας την αγγειογέννεση και την απόπτωση (Heinonen et al., 2001). Η δομική ομοιότητα της EL και της ED με την οιστραδιόλη, επιτρέπει σε αυτά τα λιγνάνια να δεσμεύονται με υποδοχείς οιστρογόνων και να εμφανίζουν οιστρογονική ή αντι-οιστρογονική δράση (Figueiredo et al., 2017).

Η σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα των λιγνανίων καθορίζεται αμετάβλητη και ο μεταβολισμός τους εξαρτάται από τον χρόνο και την ποσότητα αλλά όχι από την επεξεργασία που τυχόν υφίστανται (Muhammad I. et al., 2015).

## 2.4.3.3.6.1. Πινορεσινόλη – 1-Ακετόξυπινορεσινόλη

Τα λιγνάνια που έχουν απομονωθεί από τον ελαιόκαρπο είναι η πινορεσινόλη και η 1ακετοξιπινορεσινόλη (**Εικ. 36**) (López-Biedma et al., 2016). Φυσικά λιγνάνια, όπως η πινορεσινόλη (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>) και τα παράγωγά της, έχουν απομονωθεί από τις ρίζες, τα φύλλα, τα άνθη, τον πυρήνα, και κυρίως από το φλοιό ελαιόδεντρων (Zhang et al., 1994), καθώς και από το ελαιόλαδο (Brenes et al., 2000b). Χημικά συσχετίζονται με τα πολυμερή λιγνίνης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης, η 1ακετοξυπινορεσινόλη (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>), οι γλυκοσίδες της και οι γλυκοσίδες της 1υδροξυπινορεσινόλης έχουν απομονωθεί μόνο από το φλοιό ελαιόδεντρων και τον ελαιόκαρπο. Ο γλυκοσίδης πινορεσινόλης συζευγμένος με τον 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη, σεκοϊριδοειδές παράγωγο της ολευρωπεΐνης, έχει απομονωθεί από φυτά της οικογένειας Oleaceae. Οι επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο αποτελούν τις μόνες βρώσιμες πηγές 1-ακετοξυπινορεσινόλης και επομένως αποτελούν τις μόνες τροφές που μπορούν να παρέχουν τις ευεργετικές ιδιότητές της (López-Biedma et al., 2016). Επίσης η 1-ακετοξυπινορερσινόλη δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη.

Η πινορεσινόλη και η 1-ακετοξυπινορσινόλη είναι που έχουν δύο φαινολικές ομάδες στο μόριο τους. Και δύο είδη δακτυλίων συσχετίζονται με ευεργετικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις (During et al., 2012; Sok et al., 2009). Η βιοσύνθεση της πινορεσινόλης περιλαμβάνει το σχηματισμό της στερεοειδικού σύζευξης δύο μορίων κονιφερυλικής ομάδας υπό την παρουσία μιας πρωτεΐνης που δρα ως διεγέρτης. Έπειτα μεταβολίζεται μέσω της αναγωγάσης πινορεσινόληςλαρισιρεσινόλης σε λαρισιρεσινόλη και σεκοϊσολαρισιρεσινόλη ή σε πιπεριτόλη και σισαμίνη, μέσω της συνθάσης πιπεριτόλης/σισαμίνης. Δεν υπάρχουν αναφορές για την βιοσύνθεση της 1-ακετοξυπινορεσινόλης (Kim et al., 2009; Umezawa, 2003).



Εικ. 36: Χημική δομή πινορεσινόλης και 1-ακετόξυπινορεσινόλης

Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι, τα προαναφερόμενα λιγνάνια είναι ενώσεις που απουσιάζουν από τα σπορέλαια, ενώ απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις (από 10mg/kg έως και 60 mg/kg) στα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα. Τα λιγνάνια πιθανόν
να προέρχονται από τη δράση της β-γλυκοσιδάσης και τις όξινες συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία ελαιολάδου ή και επιτραπέζιας ελιάς (López-Biedma et al., 2016). Έτσι τα λιποδιαλυτά λιγνάνια που περιέχονται στα ελαιόλαδα, προέρχονται από την υδρόλυση ενώσεων παρόμοιων με τα λιγνάνια που είναι συζευγμένα με τον γλυκοσίδη του σεκοϊριδοειδούς. Η τυροσόλη και τα λιγνάνια φαίνονται να είναι τα πιο σταθερά φαινολικά συστατικά κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου (López-Biedma et al., 2016).

Τα λιγνάνια του ελαιόκαρπου έχουν ιδιαίτερο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Ειδικότερα, η πινορεσινόλη και η 1-ακετοξυπινορεσινόλη έχουν πολυάριθμες ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία. Δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών, με την 1ακετοξυπινορεσινόλη να έχει δείξει ισχυρότερη δράση από την ανάλογη των κατεχολικών παραγώγων του καφεϊκού οξέος, της υδροξυτυροσόλης και της ολευρωπεΐνης (Owen et al., 2000). Η πινορεσινόλη έχει δείξει ισχυρότερη προοξειδωτική δράση σε σχέση με την 1-ακετοξυπινορεσινόλη, κάτι που οφείλεται μάλλον στην παρουσία της ομάδας -COOCH3 στην 1-ακετοξυπινορεσινόλη, η οποία απουσιάζει από την πινορεσινόλη και η οποία ομάδα δεν αποτελεί δότη ηλεκτρονίων. Επίσης, η παρουσία ατόμων οξυγόνου στον κεντρικό δακτύλιο ενισχύει την προοξειδωτική δράση (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). Έχουν συσχετιστεί με αντιθρομβωτικές ιδιότητες και με αναστολή τόσο της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων στο δέρμα, το στήθος, τον προστάτη, το κόλον και τους ιστούς του πνεύμονα, όσο και της έκφρασης πρωτεϊνών και μορίων, τα οποία εμπλέκονται στον καρκίνο (Menendez J. A. et al., 2009). Ακόμα, έγουν αναφερθεί οι ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της πινορεσινόλης, ειδικά μέσω αναστολής του νιτρικού οξειδίου (NO), αλλά και μέσω αναστολής φλεγμονωδών παραγόντων, όπως οι προσταγλαδίνες PGE2, οι COX-2, TNFα, IL1β, IL-6 και NF-κβ (During et al., 2012; Jung et al., 2010; López-Biedma et al., 2016). Η αντιφλεγμονώδης δράση της πινορεσινόλης αποδίδεται στην ύπαρξη του φουροφουρανικού δακτυλίου και υποστηρίζεται η πιθανή χρήση της ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας ειδικά για φλεγμονές σχετιζόμενες με υπερπαραγωγή του NO. Επιπλέον, έχει δείξει αντιμυκητιασική δράση (Carpinella et al., 2003) έναντι διαφόρων παθογόνων μυκήτων στον άνθρωπο, καθώς επίσης νευροπροστατευτικές (Υ. Xu et al., 2017) και υπογλυκαιμικές ιδιότητες (Wikul et al., 2012). Οι γλυκοσίδες πινορεσινόλης έχουν προταθεί ως αντιυπερτασικά και αντιοξειδωτικά, για τα λίπη στα τρόφιμα και τους ζώντες οργανισμούς (López-Biedma et al., 2016). Ιδιαίτερο

ενδιαφέρον παρουσιάζει ο διγλυκοσίδης της πινορεσινόλης, ο οποίος έχει απομονωθεί από το κινέζικο φαρμακευτικό φυτό *Eucomnia ulmoides* και φαίνεται να είναι το δραστικό συστατικό για την αντιυπερτασική δράση (MacRae and Towers, 1984).

## 2.5. Τεχνολογία ρητινών

### 2.5.1. Τεχνική προσρόφησης

Η προσρόφηση (adsorption) είναι μια φυσικοχημική διεργασία που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια μιας στερεής φάσης, στην οποία δεσμεύονται με διάφορους τύπους χημικών αλληλεπιδράσων (όχι μόνιμα) ουσίες που περιέχονται σε υγρό διάλυμα κατά την επαφή του τελευταίου με τη στερεή φάση. Το φαινόμενο της προσρόφησης μπορεί να αξιοποιηθεί για να απομακρύνει διάφορα συστατικά από ένα διάλυμα (προς την στερεά φάση), τα οποία πολλές φορές είναι δύσκολο να απομακρυνθούν με άλλη μέθοδο, όπως συμβαίνει με τα απόβλητα από την επεξεργασία των προϊόντων ελιάς.

Η προσρόφηση όπως και η απορρόφηση (absorption), ανήκουν σε μια κατηγορία φυσικοχημικών διεργασιών που ονομάζονται διεργασίες ρόφησης (sorption) και αποτελούν δύο διαφορετικά φαινόμενα. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο, έγκειται στον τύπο της ισορροπίας που εγκαθίσταται. Πιο συγκεκριμένα, αν είναι ομογενής, πρόκειται για απορρόφηση (absorption), ειδάλλως πρόκειται για προσρόφηση (adsorption) (Liu, 2014). Τα πιθανά στάδια της διαδικασίας προσρόφησης είναι: η μεταφορά μάζας από την υδατική φάση στην εξωτερική επιφάνεια των σωματιδίων της στερεής φάσης, η διόγκωση των πόρων της στερεής φάσης και η μεταφορά της διαλυμένης ουσίας στο εσωτερικό των πόρων (Perez-Larrán et al., 2017). Η προσρόφηση μπορεί να είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων είτε «φυσικών» (π.χ.δυνάμεις van der Waals, μη μόνιμη), είτε «χημικών» (π.χ. ομοιοπολικοί δεσμοί, μόνιμη), ανάλογα με τις λειτουργικές ομάδες του προσροφητή και του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Είναι πολύ πιθανό και τα δύο είδη ρόφησης να συνυπάρχουν κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων (Liu, 2014).

Γενικά, τα υλικά που προσροφώνται ονομάζονται προσροφόμενα (adsorbates), ενώ τα υλικά που προσροφούν τα προσροφόμενα υλικά ονομάζονται προσροφητές (adsorbents) (Kammerer et al., 2011). Οι τύποι αλληλεπιδράσεων που έχουν ταυτοποιηθεί στην προσρόφηση είναι:

- 1) χημειορόφηση
- 2) δεσμοί υδρογόνου
- 3) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και
- 4) δυνάμεις van der Waals.

Όταν οι αλληλεπιδράσεις είναι αδύναμες, οι διαλυμένες ουσίες μπορούν εύκολα να προσροφηθούν και να ανακτηθούν για περαιτέρω χρήση. Βέβαια, οι μηχανισμοί προσρόφησης των συστατικών στο πολυμερικό δίκτυο δεν είναι πλήρως γνωστοί, καθώς η προσροφητική συμπεριφορά κάθε ένωσης εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά του διαλύματος, του προσροφητή και των περιεχόμενων συστατικών (Kammerer et al., 2010).

Η πλειοψηφία των προσροφητών που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων είναι στερεά. Αυτά τα υλικά μπορούν να διαιρεθούν σε τρείς κύριες κατηγορίες: με βάση τον άνθρακα (carbon), τα ανόργανα υλικά και τα συνθετικά πολυμερή. Προσροφητές με βάση τον άνθρακα, όπως ο ενεργός άνθρακας, είναι οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι προσροφητές. Είναι αποτελεσματικοί, δεν κοστίζουν και μπορούν να παραχθούν από γεωργικά απόβλητα. Ανόργανα υλικά που γρησιμοποιούνται για προσρόφηση περιλαμβάνουν το ενεργό αλουμίνιο και το ζεόλιθο. Αυτά τα υλικά κοστίζουν και λειτουργούν επιλεκτικά ως προς το μέγεθος ή το είδος των συστατικών που προσροφούνται. Βρίσκουν εφαρμογές σε διάφοες διεργασίες γημικών, φαρμακευτικών και άλλων εταιρίών (Liu, 2014). Οι ρητίνες αποτελούν τα πιο μελετημένα προσροφητικά υλικά, παρουσιάζοντας χαμηλή τοξικότητα, χημική σταθερότητα, υψηλή προσροφητική ικανότητα, επιλεκτικότητα και εύκολη αναγέννηση σε ρυθμιζόμενες θερμοκρασίες. Κατηγορίες ρητινών όπως οι πολυμερικές ή μακρόπορες μη-ιονικές ρητίνες, οι ρητίνες ιοντοανταλλαγής, οι συνθετικές ρητίνες και οι πολυμερικές ρητίνες τρισδιάστατης διασταυρούμενης δομής, επιλέγονται για προσρόφηση εμπορικής αξίας συστατικών από φυτικά εκχυλίσματα, ακόμα και για επιλεκτική προσρόφηση συστατικών στόχων ή για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών που αλλοιώνουν τη γεύση και τα οργανοληπτικά συστατικά εκχυλισμάτων (Perez-Larrán et al., 2017).

#### 2.5.2. Τεχνολογία ιοντοανταλλακτικών ρητινών

Οι ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (Ion-exchange resins) είναι ιονικά πολυμερή, τα οποία χρησιμοποιούνταν για δεκαετίες για την απομάκρυνση επιλεγμένων ιόντων από το νερό και τα υγρά απόβλητα. Η ιοντοανταλλαγή είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα ιόντα ενός διαλύματος, αντικαθίστανται από ιόντα όμοιου φορτίου, μέσω προσκόλλησής τους σε μία αδιάλυτη ρητίνη (R. M. Wheaton and, 2000). Οι μη-ιονικές ρητίνες (nonionic resins) δεν χρησιμοποιούνταν για διαχείριση νερού και υγρών αποβλήτων, μέχρι την πρώτη αναφορά για τέτοιου είδους εφαρμογή τη δεκατετία του 1960. Μετά από τέσσερις δεκαετίες, οι πορώδεις ρητίνες θεωρούνται πλέον αποτελεσματικά προσροφητικά υλικά, όχι μόνο για τη διαχείριση υγρών βιομηχανικών αποβλήτων, αλλά και για την ανάκτηση οργανικών συστατικών από αυτά (Li and Chase, 2010; Luisa et al., 2011; Z. Xu et al., 2017).

Οι μη-ιονικές ρητίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρείς κατηγορίες: τύπου γέλης (gel type), μακρόπορες ρητίνες (macroporous) και υπερ-διασταυρωμένες (hypercrosslinked). Οι τύπου γέλης ρητίνες έχουν μία ομοιογενή μη πορώδη δομή, όπου το πολυμερικό δίκτυο της ρητίνης μπορεί να διογκωθεί, υπό την παρουσία διαλύτη ικανού να διαλυτοποιεί τα μονομερή. Παρ' όλα αυτά οι ρητίνες αυτές είναι ανεπαρκή προσροφητικά υλικά και με μικρή χρήση στη διαχείριση νερού και υγρών αποβλήτων. Οι μακρόπορες ρητίνες αποτελούν αποτελεσματικά προσροφητικά υλικά οργανικών συστατικών, χάρη στο πορώδες πολυμερικό τους δίκτυο, ενώ έχει αναφερθεί ότι έγουν γρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική ανάκτηση πολυάριθμων συστατικών, όπως κετόνες, αλκοόλες, πολυφαινόλες κ.ά. από υδατικά μέσα. Οι υπερδιασταυρωμένες ρητίνες αποτελούν μία νέα τεχνολογία. Αυτά τα προσροφητικά υλικά παρασκευάζονται με διασταύρωση πολυμερικών μακρόπορων ρητινών υπό την παρουσία κατάλληλου διαλύτη. Η διασταύρωσή τους, σταθεροποιεί και ενισχύει τη δομή του πολυμερικού δικτύου και τροποποιεί τις επιφανειακές του ιδιότητες, με αποτέλεσμα τα προσροφητικά χαρακτηριστικά των ρητινών αυτών να διαφέρουν σημαντικά από αυτά των μακρόπορων. Έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απομάκρυνση και ανάκτηση συστατικών από νερό και υγρά απόβλητα. Ένα από τα πλεονεκτήματα των μακρόπορων και υπερ-διασταυρωμένων ρητινών προσρόφησης είναι η δυνατότητα ελέγχου της δομής τους, της εσωτερικής τους επιφάνειας και της διαμέτρου των πόρων τους. Αυτό επιτυγχάνεται αλλάζοντας τις συνθήκες πολυμερισμού, κυρίως με αλλαγή των μονομερών και των παραγόντων διαμόρφωσης των πόρων που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση πολυμερισμού. Κατασκευάζονται επομένως για επιλεκτική προσρόφηση. Επίσης πέρα από τη διαχείριση νερού και υγρών αποβλήτων, οι πορώδεις ρητίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση (solidphase extraction – SPE) (Rodríguez et al., 2000), βιοδιαχωρισμούς και καθαρισμό αίματος (Li and Chase, 2010; Luisa et al., 2011; Z. Xu et al., 2017).

#### 2.5.2.1. Πολυμερικές - Μακρόπορες μη ιονικές ρητίνες

Παράγονται με συμπολιμερισμό μονομερών και παραγόντων διασύνδεσης. Το πιο κοινά μονομερή είναι το μονομερές στυρενίου (styrene), το μονομερές ακρυλίου (acrylate) και το μονομερές βινυλπυριδίνης (vinylpyridine). Ο παράγοντας διασταύρωσης που χρησιμοποιείται για σχεδόν όλους τους συμπολιμερισμούς είναι το διβινυλοβενζόλιο (DVB). Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες ρητίνες είναι οι πολυστυρενίου - διβινυλοβενζολίου (DVB) και πολυακρυλαμυλικού διβινυλοβενζολίου (PA-DVB), με υδρόφιλο και υδρόφοβο χαρακτήρα αντίστοιχα (Adachi and Isobe, 2004). Μετά τον πολυμερισμό, ο παράγοντας σχηματισμού πόρων απομακρύνεται από το πολυμερικό δίκτυο, έχοντας δημιουργήσει μια πορώδη δομή με μηχανική σταθερότητα (Li and Chase, 2010; Luisa et al., 2011; Z. Xu et al., 2017).

Το πολυμερές που αποτελεί την πρώτη ύλη των ιοντοανταλλακτικών πορώδων ρητινών, αποτελείται από ανόργανες ενώσεις, πολυσακχαρίτες ή συνθετικές ρητίνες και μια λειτουργική ομάδα, που καθορίζει την κύρια συμπεριφορά της ρητίνης. Εξαρτώμενες από το θετικό ή το αρνητικό φορτίο των ιοντοανταλλακτικών ομάδων, οι ρητίνες λειτουργούν ως ανταλλάκτες κατιόντων ή ανιόντων και ανάλογα με τη συγγένεια με τα αντίθετα ιόντα, κάθε τύπος μπορεί να δρα ως ισχυρός ή ασθενής ανταλλάκτης. Οι ισχυροί ανταλλάκτες κατιόντων, περιέχουν σουλφονικό οξύ ως λειτουργική ομάδα και οι ασθενείς κατιοντοανταλλάκτες έχουν καρβοξυλικό οξύ ως λειτουργική ομάδα. Οι ισχυροί ανιοντοανταλλάκτες έχουν τεταρτοταγές αμμώνιο και οι ασθενείς έχουν υποκατάστατα τριτοταγούς αμίνης (Liu, 2014; R. M. Wheaton and -, 2000). Με την κατάλληλη βιομηχανική πρακτική, η πορώδης δομή και η επιφανειακή πολικότητα των ρητινών μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να δρούν επιλεκτικά σε συγκεκριμένες ομάδες ενώσεων, οι οποίες προσροφώνται σε αυτές. Οι πορώδεις ρητίνες προσροφούν συστατικά με δύο μηχανισμούς: (α) με προσρόφηση στην επιφάνειά τους, μέσω διάφορων μοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, ιονική έλξη και σύνθετους σχηματισμούς, και (β) με προσρόφηση στο διογκωμένο πολυμερικό δίκτυο, καθώς με τη διόγκωση τα εσωτερικά ενεργά τμήματα της ρητίνης γίνονται πιο προσβάσιμα. Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα προσρόφησης είναι: τα χαρακτηριστικά των χημικών συστατικών (π.χ. το μοριακό βάρος, ο μοριακός όγκος, η διαλυτότητα, η πολικότητα), οι προσροφητές (π.γ. η επιφάνεια, το μέγεθος πόρων, η κατανομή, το πορώδες, η πολικότητα) και οι συνθήκες (π.χ. η θερμοκρασία, το pH, η ροή, η τροφοδοσία

77

δείγματος, η ιονική δύναμη, η διαθεσιμότητα οξυγόνου, η παρουσία άλλων ανταγωνιστικών οργανικών και ανόργανων υλικών). Αξίζει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία και το pH αποτελούν δύο από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την προσρόφηση/εκρόφηση των συστατικών στόχων στις μη ιονικές πολυμερικές ρητίνες (Adachi and Isobe, 2004; Geng et al., 2009; Kammerer et al., 2007; Scordino M., Mauro A., 2004; Wang et al., 2012). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι είναι δυνατή η αναγέννηση της ρητίνης μετά τον κορεσμό της, η οποία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με έκλουση διαλυτών καθώς και με προσαρμογή του pH.. Η δυνατότητα αναγέννησης της ρητίνης σε μη υψηλές θερμοκρασίες, πέρα από τη μείωση του απαιτούμενου κόστους ενέργειας, επιτρέπει την εφαρμογή της στον τομέα τροφίμων και το φαρμακευτικό τομέα (Luisa et al., 2011). Ακόμα, μετά την αναγέννηση της ρητίνης, τα οργανικά συστατικά που έχουν προσροφηθεί σε αυτή ανακτώνται και καθίστανται αξιοποιήσιμα, ενώ και η ρητίνη μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Οι πορώδεις ρητίνες έχουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον, σε εύρος θερμοκρασιών και σε ποικίλα οργανικών και ανόργανων συστατικών των υγρών αποβλήτων. Έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής καθώς έχει αναφερθεί ότι ετησίως απορρίπτεται λιγότερο από το 5% αυτών. Η διαδικασία προσρόφησης είναι απλή και χαμηλού κόστους (Li and Chase, 2010; Luisa et al., 2011; Z. Xu et al., 2017).

#### 2.5.2.1.1. Εφαρμογές μακρόπορων ρητινών

Οι μακρόπορες ρητίνες μπορούν να προσροφούν επιλεκτικά τα συστατικά στόχους από υδατικά και μη υδατικά συστήματα, με αλληλεπιδράσεις μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων van der Waals (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις), συμπλόκων, και ηλεκτροστατικών δυνάμεων, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο τον διαχωρισμό βάση συγγένειας των συστατικών προς τα προσροφητικά υλικά. Χάρη στα πολυάριθμα πλεονεκτήματα τους, που είναι η υψηλή αποτελεσματικότητα τους, η σταθερή και ανθεκτική δομή τους (η οποία μπορεί να είναι πολική, μη πολική ή ενδιάμεσης πολικότητας), η υψηλή προσροφητική ικανότητα, το χαμηλό κόστος, η λειτουργικότητα τους, η μικρή κατανάλωση διαλυτών, η μεγάλη διάρκεια ζωής και η ικανότητα αναγέννησής τους, καθιστούν πλέον τις μακρόπορες ρητίνες ευρέως εφαρμόσιμες (Luisa et al., 2011). Πολυάριθμες είναι οι εφαρμογές των μακρόπορων ρητινών που αφορούν κυρίως την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από φυτά, όπως είναι οι απλές φαινολικές ενώσεις (Ammerer et al., 2010; Chen et al., 2016; Kammerer et al., 2007; Pompeu et al., 2017; Weisz et al., 2010; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2008), τα φλαβονοειδή (Accarone, 2003; Li et al., 2015; Ribeiro and Silveira, 2002; Zhang et al., 2017), οι ανθοκυανίνες (Chandrasekhar et al., 2012; Chang et al., 2012; Jampani et al., 2014; Matera et al., 2012; Sandhu and Gu, 2013; Taylor et al., 2013; Trikas et al., 2017; Yao et al., 2015), τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη) (Xiong et al., 2014), οι εστέρες καφεϊκού οξέος (χλωρογενικό οξύ) (Liu et al., 2016; Sun et al., 2015), (καφεΐνη) (Hooshyar Ottens, 2014), κατεχίνες and 01 γλυκοσίδες 01 φαινυλοπροπανοειδών ( Liu B. et al., 2013), οι τριτερπενικές σαπωνίνες (Chen, 2015; Kong et al., 2010), τα καροτενοειδή (κροκίνη) (Ellis et al., 2007), καθώς και ολευρωπεΐνη και ρουτίνη από φύλλα ελιάς (Ayraktar, 2007) και σάκχαρα για τη χρήση τους ως γλυκαντικά και ως χρωστικές (Scordino et al., 2007), όπως επίσης και μεταβολίτες από θαλασσίους οργανισμούς (Kim et al., 2014) και βακτήρια ( Liu C. et al., 2013b, 2013a). Μεγάλο είναι το εύρος εφαρμογών των μακρόπορων ρητινών και στη διαχείριση παραπροϊόντων και αποβλήτων, τα οποία προέρχονται από διεργασίες επεξεργασίας φυσικών προϊόντων, για την απομάκρυνση και ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών (Li and Chase, 2010). Παραδείγματα αποτελούν τα φαινολικά συστατικά από απόβλητα που προκύπτουν από την επεξεργασία ηλίανθου (Weisz et al., 2013), το κατακάθι καφέ (Pavlovic and Buntic, 2015), την επεξεργασία τσαγιού (Liu et al., 2012), την παραγωγή του οίνου (Kammerer and Gajdos, 2005), την παραγωγή ελαίων (H. Li et al., 2012; Tang et al., 2014). Συνεχείς είναι οι προσπάθειες ενσωμάτωσής τους σε διαδικασίες βιομηχανικής κλίμακας, καθώς γίνονται συγκριτικές μελέτες μεταξύ διάφορων τύπων ρητινών για εύρεση της βέλτιστης ρητίνης ως προς την ικανότητα προσρόφηση και ως προς την επιλεκτικότητά τους, σχετικά με τα συστατικά στόχους (Ammerer et al., 2010; Datta et al., 2011; Liu et al., 2010, 2011). Συνήθως επιδιώκεται η ανάπτυξη αυτοματοποίημένων μεθόδων (Schuldt and Schembecker, 2013), η τροποποίηση των ρητινών ως προς την επιλεκτικότητά τους (Paper, 2014; Yang and Tan, 2008) και ο συνδυασμός τους με άλλα μέσα για βελτίωση της απόδοσής τους (Η. Passosa, 2014; Lu et al., 2012). Για παράδειγμα, ο συνδυασμός επεξεργασίας υγρών αποβλήτων παραγωγής ελαιολάδου με τις τεχνολογίες των μεμβρανών και των ρητινών, κατέστησε επαναγρησιμοποιήσιμο το 62% του συνολικού νερού που χρησιμοποιήθηκε κατά την διεργασία ελαιοποίησης (Savarese et al., 2016).

Επιπλέον η χρήση των ρητινών ως ένα αποτελεσματικό προσροφητικό μέσο για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από φυτικούς πόρους, ενισχύεται και από την την

αποδοχή για ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα, σύμφωνα με τις εγκρίσεις της αμερικάνικης υπηρεσίας τροφίμων και φαρμάκων – FDA (U.S. Food and Drug Administration) και του Ευρωπαίκου Συμβουλίου (Council of Europe) και νομοθεσίες οι οποίες προβλέπουν περιορισμούς και γενικές απαιτήσεις για τη χρήση τους:

- Συμβούλιο της Ευρώπης, Ψήφισμα ΑΡ (2004) 3, σχετικά με τις ιοντοανταλλακτικές και προσροφητικές ρητίνες στη μεταποίηση τροφίμων, που εγκρίθηκε από την Επιτροπή Υπουργών την 1<sup>η</sup> Δεκεμβρίου 2004 κατά την 907<sup>η</sup> συνεδρίαση των αντιπροσώπων των υπουργών (αντικαθιστώντας το ψήφισμα ΑΡ (97) 1) (Συμβούλιο της Ευρώπης, nd) (Εικ. 37)

Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων, Κώδικας Ομοσπονδιακού Κανονισμού Τίτλος 21 - Τρόφιμα και Φάρμακα - Αναθεωρήθηκε από την 1<sup>η</sup> Απριλίου 2010. Μέρος 173, δευτερογενή πρόσθετα πρόσθετα τροφίμων που επιτρέπονται σε τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. (Εικ. 38)

Επομένως, τα ανακτώμενα προϊόντα μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω με ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα ή άλλα σκευάσματα ώστε να καταστεί ικανή και ασφαλής η κατανάλωσή τους και επομένως η αξιοποίησή τους (J. Li et al., 2012; Sandhu and Gu, 2013) (Datta et al., 2011).



Εικ. 37.: Άρθρο έγκρισης χρήσης ρητινών ιοντοανταλλαγής σε επεξεργασίες τροφίμων (Συμβούλιο Ευρώπης)



Εικ. 38: Άρθρο έγκρισης χρήσης ρητινών ιοντοανταλλαγής σε επεξεργασίες τροφίμων (FDA)

#### 2.5.2.2. Προσροφητικές μη ιονικές πολυμερικές ρητίνες Amberlite XAD

Οι προσροφητικές ρητίνες Amberlite XAD<sup>®</sup>, είναι σκληρά, αδιάλυτα σφαιρίδια ενός πορώδους πολυμερούς. Κάθε σφαιρίδιο σχηματίζεται από μικροσφαιρίδια που ενώνονται μεταξύ τους κατά τον πολυμερισμό, ο οποίος προσδίδει στη ρητίνη μια μακροπορώδη δομή και μεγάλη επιφάνεια επαφής για κάθε σωματίδιο. Στην παρακάτω **Εικ. 39**, απεικονίζεται η φυσική δομή ενός κόκκου ρητίνης XAD<sup>®</sup>.



Εικ. 39: Φυσική δομή ενός κόκκου ρητίνης ΧΑD

Τα πορώδη σφαιρικά προσροφητικά πολυμερή Amberlite XAD<sup>®</sup> βασίζονται στη διασταύρωση συμπυκνωμένων πολυμερών με δίκτυο πολυστυρενίου, αλειφατικό ή φαινυλοφορμαλδεϋδης (Ahmad et al., 2015). Με βάση το πολυμερικό δίκτυο τους μπορούν να διακριθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες (**Εικ. 40**):

 ρητίνες δομής πολυστερενίου-διβινυλοβενζολίου (π.χ. XAD-4/ 16N/ 16HPN/ 1600 ....1180/ 18) (Εικόνα 41a)

- 2) ρητίνες δομής εστέρα πολυακρυλικού οξέος (π.χ. XAD-7HP) (Εικόνα 41b) και
- 3) ρητίνες δομής φαινυλοφορμαλδεϋδης (π.χ. XAD-761) (Εικόνα 41c).



Εικ. 40: Δομή ρητίνης a) πολυστυρενίου-διβινυλβενζενίου (π.χ. XAD-4) (Zhaoyi X., 2003), b) πολυακρυλική – διβινυλβενζενίου (π.χ. XAD-7) (Zhaoyi X., 2003) και c) φαινόλης φορμαλδεΰδης (π.χ. XAD-761) (Wołowicz and Hubicki, 2010)

Οι φυσικές ιδιότητες των προσροφητικών ρητινών Amberlite XAD που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (

). Επίσης, το πολυμερές χαρακτηρίζεται από μία ποικιλία ιδιοτήτων επιφάνειας, πορώδους και μεγέθους πόρων, ανάλογα με τον τρόπο κατασκευής. Χάρη στη διαφοροποίηση των επιφανειακών χαρακτηριστικών τους, αυτά τα πολυμερικά προσροφητικά υλικά παρουσιάζουν ένα εύρος προσροφητικής συμπεριφοράς (μέσω δυνάμεων van der Waals) και μπορούν να χρησιμοποιούνται τόσο σε υδατικά όσο και σε μη υδατικά συστήματα. Η μακροπορώδης δομή τους, με τις ιοντοανταλλακτικές της ιδιότητες, έχει ως αποτέλεσμα τις καλές υδραυλικές ιδιότητές τους και γρήγορες κινητικές προσρόφησης. Επίσης οι ρητίνες είναι διαθέσιμες σε ένα εύρος πολικοτήτων και έτσι μπορούν να έχουν εφαρμογή στην προσρόφηση άπολων συστατικών από

διαλύματα. Ένας βασικός περιορισμός είναι το μέγεθος των μορίων-στόχων για προσρόφηση. Εφόσον η συνολική επιφάνεια των πόρων της ρητίνης αυξάνει με τη μείωση της διαμέτρου των πόρων της, για την προσρόφηση μεγάλων μορίων είναι απαραίτητη η χρήση προσροφητών με μεγάλους πόρους και επομένως μικρότερη συνολική επιφάνεια, ώστε η μοριακή διάχυση να συμβεί πιο γρήγορα (Crook et al., 1975; Moore and Karasek, 2006). Μεταξύ των πιο κοινών μακρόπορων ρητινών, οι ρητίνες πολυστυρενίου-διβινυλβενζενίου είναι μη πολικές και έτσι υδρόφοβες, ενώ οι πολυακρυλαμιδίου-διβινυλβενζενιου είναι πολικές και υδρόφιλες. Οι ρητίνες πολυστυρενίου-διβινυλβενζενιου είναι πολικές και υδρόφιλες. Οι ρητίνες πολυσκριλαμιδίου-διβινυλοβενζολίου είναι μηχανικά λιγότερο σταθερές, από ότι οι πολυακριλαμιδίου-διβινυλοβενζολίου, λόγω της μικρότερης αλληλεπίδρασης του διβινυλοβενζολίου και του πολυστυρενίου κατά τη διαδικασία συμπολιμερισμού. Έχει αναφερθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις προσροφώνται στις Amberlite XAD<sup>®</sup> ρητίνες χάρη στην υδροφοβικότητα των τελευταίων. Μέθοδοι διαχωρισμού βασισμένοι σε συνθετικά προσροφητικά μέσα εφαρμόζονται όλο και περισσότερο στη Φαρμακευτική, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και για διαχωρισμό πολυφαινολών (Ζ. Xu et al., 2017).

Όπως προαναφέρθηκε, ένας απλός κόκκος αποτελείται από συσσωματώματα πολύ μικρών σφαιρών. Η δομή του πόρου μοιάζει με ανοικτό κύτταρο και συνεπώς το νερό μπορεί εύκολα να διεισδύει σε αυτόν. Η ρητίνη XAD έχει μια συνεχή φάση γέλης και μια συνεχή πορώδη φάση. Κατά την προσρόφηση, το υδρόφοβο τμήμα του μορίου προσροφάται στην υδρόφοβη επιφάνεια της ρητίνης, ενώ το υδρόφιλο προσανατολίζεται προς την υδατική φάση.

Συνήθως, τα προσροφημένα μόρια δεν εισχωρούν σημαντικά στη φάση των μικροσφαιρών, αλλά συγκρατούνται στην επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η εκρόφηση (αποδέσμευση) και οι τεχνικές αναγέννησης (βλέπε θεωρητικό μέρος). Κατά τη τεχνική στήλης, η ρητίνη τοποθετείται σε κατακόρυφο σωλήνα με πορώδη πυθμένα και τα υγρά τροφοδοτήσεως και αναγεννήσεως της στήλης ρέουν από πάνω προς τα κάτω.

83

#### **AMBERLITE<sup>TM</sup>** AMBERLITE **AMBERLITE<sup>TM</sup>** AMBERLITE TM **AMBERLITE<sup>TM</sup> AMBERLITE<sup>TM</sup> AMBERLITE<sup>TM</sup> AMBERLITE<sup>TM</sup> ХА<b>Д**<sup>ТМ</sup> 4 **ХАД<sup>тм</sup>1180N** Ρητίνη XAD7HP XADTM16N ХА**Д™16НР** N ХАДтм18 **ХАД<sup>тм</sup>1600N ХАД<sup>тм</sup> 761** Μακροπορώδες Μακροπορώδες Μακροπορώδες Μακροπορώδες Μακροπορώδες Μακροπορώδες Μακροπορώδες Μακροπορώδες διασταυρούμενο διασταυρούμενο αλειφατικό αρωματικό αρωματικό αρωματικό αρωματικό αρωματικό αρωματικό πολυμερές διασταυρούμενο διασταυρούμενο διασταυρούμενο διασταυρούμενο διασταυρούμενο διασταυρούμενο αρωματικό Δομή φαίνυλοπολυμερές πολυμερές πολυμερές πολυμερές πολυμερές πολυμερές πολυμερές φορμαλδεϋδικής δομής (πολυστυρενίου -(πολυπροπυλενίου-(πολυστυρενίου -(πολυστυρενίου -(πολυστυρενίου -(πολυστυρενίου -(πολυστυρενίου -(ενεργές ομάδες διβινυλβενζενίου) διβινυλβενζολίου) ακρυλικού εστέρα) διβινυλβενζολίου) διβινυλβενζολίου) διβινυλβενζολίου) διβινυλβενζολίου ) μεθυλόλης) 679g/L 655g/L 720g/L 675g/L 690 g/L 660 g/L 615 g/L Βάρος περίπου 690 g/L Ειδικό βάρος 1.01 - 1.031.06 - 1.08 1.015 - 1.025 1.015 - 1.025 1.015 - 1.025 1.015 - 1.025 1,070 - 1,130 0.350 - 0.600 mm Μέσο μέγεθος 0.49 - 0.69mm 0.56 - 0.71mm 0.56 - 0.71mm 0.600 - 0.750mm $0,425 \pm 0,050$ mm $0,400 \pm 0,50 \text{ mm}$ 0,560 - 0,760 mm Εμβαδό $\geq 750 \mathrm{m}^2/\mathrm{g}$ $\geq$ 380m<sup>2</sup>/g $\geq 800 \text{m}^2/\text{g}$ $\geq 800 \text{m}^2/\text{g}$ $\geq$ 800m<sup>2</sup>/g $\geq$ 450 m<sup>2</sup>/g $\geq 700 \text{ m}^2/\text{g}$ 150 - 250 m^2/g προσροφητικής επιφάνειας $\geq 0.55 \text{mL/Ml}$ 0,95 - 1,18 mL/mL $\geq 0.50$ ml/ml $\geq 0.50 \text{mL/Ml}$ $\geq 0.6 \text{mL/mL}$ ≥1.4 mL/mL ≥ 1.4 mL/mL Πορώδες Μέση διάμετρος 100A° 300-400A° 200A° 200A° 150A° 300-400A° 200A° 600 A° πόρου Εύρος pH 0 - 140 - 140 - 140 - 141 - 141 - 14 1 - 14 >8 Μέγιστη→ 80°C (ουδέτερο ή όξινο μη Μέγιστο όριο οξειδωμένο μέσο)/ 150°C 150°C 80 to 100°C 150°C 150°C 4 - 150°C 150°C μέγιστο→40°C (ισχυρό θερμοκρασίας αλκαλικό μέσο με ή απουσία οξειδωτικών)

#### Πίν. 4: Φυσικές ιδιότητες των πολυμερικών προσρφητικών ρητινών Amberlite

#### 2.5.2.2.1. Μακροπορώδη ρητίνη XAD - 761

Η μακροπορώδης ρητίνη XAD – 761 (παλιά γνωστή ώς Duolite και πλέον γνωστή ως Amberlite) (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.), είναι μια πολική ρητίνη (Gao et al., 2018) και αποτελεί προϊόν πολυμερισμού φαινόλης και φορμαλδεΰδης, το οποίο δεν περιέχει άλλους τύπους λειτουργικών ομάδων ανταλλαγής ιόντων, πέρα από φαινολικούς (Shelkovnikova et al., 2010)



ενεργοποιημένης ρητίνης Amberlite XAD-761

(Εικ. 42). Το μέγεθος των σωματιδίων της πολυμερικής ρητίνης κυμαίνεται μεταξύ 20 με 60 mesh. Αναγεννάται εύκολα για πολλούς κύκλους προσρόφησης-εκρόφησης με καλή επαναληπτική ικανότητα σχετικά με τα χαρακτηριστικά προσρόφησης (Ciftci et al., 2016).



#### Εικ. 42: Δομή της ρητίνης Amberlite XAD-761.

Οι προσροφητικές και ιοντικές ρητίνες με βασική δομή φαινόλης - φορμαλδεΰδης (PFRs) έχουν υψηλή προσροφητική ικανότητα για μεγαλομορικές οργανικές ουσίες και υψηλότερη πυκνότητα από τις ρητίνες δομής πολυστυρενίου. Επομένως, υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στη χρήση τους. Οι προσροφητικές ρητίνες που βασίζονται σε δομή PFRs επιδεικνύουν υψηλότερη εκλεκτικότητα σε μίγματα αλκαλικών μεταλλικών ιόντων σε σχέση με άλλους τύπους οργανικών στοιχείων. Ωστόσο, μεγάλη εκλεκτικότητα εμφανίζεται όσον αφορά ανταλλαγή ιόντων στην με φαινολικές/αρωματικές ομάδες σε αλκαλικά διαλύματα από όχι τόσο για τις αλειφατικές ενώσεις (Shelkovnikova et al., 2010). Επίσης, ο βαθμός της προσρόφησης τείνει να αυξάνεται με το μοριακό βάρος σε μια δεδομένη ομόλογη σειρά.

Η μακροπορώδη ρητίνη XAD-761 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα, είτε για τον εμπλουτισμό δειγμάτων σε συγκεκριμένα συστατικά, είτε για τον αποχρωματισμό χυμών και υδατικών αποβλήτων. Επίσης, η συγκεκριμένη ρητίνη κρίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματική στην απομάκρυνση χρωστικών και συστατικών τα οποία προσδίδουν δυσάρεστη οσμής και γεύση σε διάφορα οργανικά διαλύματα βιομηχανιών τροφίμων και φαρμάκων. Είναι εφικτή η απομάκρυνση χρωστικών, πρωτεϊνών, συμπλόκων σιδήρου, ταννινών, υδροξυμεθυλ-φουρφουράλης και άλλων συστατικών τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δυσάρεστη γεύση και οσμή (Technical sheet of the Duolite Company) (Grade and Exchange, 2008). Πλέον η ανάκτηση έγχρωμων ενώσεων και χρωστικών από αγροβιομηχανικά προϊόντα αποτελεί μια κοινή πρακτική.

#### 2.5.2.2.2. Εφαρμογές της μακροπορώδους ρητίνης ΧΑD - 761

Πολυάριθμες είναι οι ερευνητικές εφαρμογές της ρητίνης XAD – 761, όπως για παράδειγμα είναι η χρήση της ως αρωματικός προσροφητής για τον αποχρωματισμό υδατικού αποβλήτου που προκύπτει από την επεξεργασία ελαιολάδου (Zouari, 1998). Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε αποτελεσματικότητα της ρητίνης, η οποία ελαττώθηκε με την αύξηση του όγκου του υδατικού αποβλήτου προς επεξεργασία λόγω κορεσμού, για την ανάκτηση και συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών από βλητα οινοποιείου (Soto et al., 2012).

Επίσης, συγκριτικές μελέτες έχουν γίνει μεταξύ διαφόρων ρητινών του τύπου Amberlite, μεταξύ των οποίων και η XAD–761, σχετικά με την ικανότητα προσρόφησης ανθοκυανιδινών και ολικών φαινολικών (Gao et al., 2018; Sandhu and Gu, 2013). Σημειώθηκε ότι η XAD–761 αν και έδειξε από τις χαμηλότερες γενικές αποδόσεις ως προς την προσρόφηση καθώς είναι μια πολική ρητίνη (και όπου η XAD 7HP έδειξε τη βέλτιστη), είχε υψηλή αποδεσμευτική ικανότητα σε ολικά φαινολικά σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ρητίνες (Gao et al., 2018). Επίσης παρατηρήθηκε ότι η χαμηλή προσροφητική ικανότητα ανθοκυανινών, πιθανόν να οφείλεται στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις των πολικών υδροξυλίων των ανθοκυανινών του διαλύματος και του προσροφητικού υλικού (Sandhu and Gu, 2013).

Χάρις στις ιδιότητες των μακροπορωδών ρητινών, κυρίως του μεγάλου όγκου πορώδους και των ποικίλων μεγεθών με μεγάλη επιφάνεια επαφής, καθίστανται κατάλληλες ώς υποστρώματα για στήριξη οργανικών αμινών. Η ρητίνη XAD-761,

χάρη στις ιδιότητές της έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα φόρτωσης φαινυλοαιθυλαμίνης ώστε να παρασκευαστούν στερεά προσροφητικά υλικά αμίνης (Liu et al., 2017). Επίσης, η ρητίνη XAD–761, έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ώς υπόστρωμα για την προσρόφηση ενζύμων και την ακινητοποίηση αυτών, καθώς οι ρητίνες Amberlite χαρακτηρίζονται για την υψηλή αποτελεσματικότητα ενζυμικού μετασχηματισμού (Solutions, n.d.). Για παράδειγμα αναφέρουμε την περίπτωση το πείραμα ενσωμάτωσης του ενζύμου α-αμυλάση που παράχθηκε από το βακτήριο *Aspergillus oryzae*, όπου και μελετήθηκαν οι διάφοροι παράμετροι που παίρνουν μέρος στην προσροφητική διεργασία (Bautista et al., 2003, 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι, με την ακινητοποίηση των ενζύμων σε φορείς, όπως η ρητίνη XAD–761, είναι δυνατή η τροποποίηση των ιδιοτήτων των ενζύμων και η μετατροπή τους σε μια καταλληλότερη μορφή με τη χρήση στη βιοτεχνολογία (Tweddell et al., 1999).

Ακόμα, όπως όλες οι ρητίνες, έτσι και η XAD – 761 έχει χρησιμοποιηθεί ως στάδιο προεπεξεργασίας, ύστερα από κατάλληλη τροποποίηση με σύμπλοκα ώστε να επέλθει η κατάλληλη βελτίωση της επιλεκτικότητάς της ως προς τα στοιχεία στόχους, για την απομάκρυνση, διαχωρισμό και προσδιορισμό ιόντων μετάλλων και χηλικών ενώσεων από διάφορα δείγματα. Όπως είναι τα ιόντα αλουμινίου σε δείγματα νερού (Ciftci et al., 2016; Ciftci and Er, 2013), ιόντα σιδήρου, ψευδαργύρου, μόλυβδου σε τρόφιμα (Ghaedi et al., 2013, 2010), ιόντων ψευδαργύρου και χαλκού σε δείγματα νερού (Ciftci et al., 2011), διαφόρων ιχνοστοιχείων σε τρόφιμα (Marahel et al., 2011), ιόντων κοβαλτίου σε δείγματα τροφίμων (Ciftci, 2010a), ιόντων καδμίου σε δείγματα νερού (Ciftci, 2010b), ιόντων καισίου και ρουβιδίου από αλκαλικά υδατικά διαλύματα (Shelkovnikova et al., 2009) κ.ά.

Σε όλες τις προαναφερόμενες μελέτες που έγιναν σχετικά με τη ρητίνη XAD-761, έλαβε χώρα η διερεύνηση των λειτουργικών χαρακτηριστικών της ρητίνης, όπως η θερμικής αντοχή, η οποία αποδείχτηκε εξαιρετικά υψηλή καθώς δεν μεταβλήθηκε η αποτελεσματικότητά της με την αύξηση της θερμοκρασίας ακόμη και στους 380°C (Liu et al., 2017), η θερμοκρασιακή απόδοση (Shelkovnikova et al., 2010, 2009) και η σταθερότητα στην αποδοτικότητα ανάκτησης των επιθυμητών συστατικών, η οποία εμφανίστηκε σταθερή για πάνω από 100 κύκλους προσρόφησης και αποδέσμευσης (Ciftci et al., 2016).

## 2.6. Χρωματογραφικές μέθοδοι

#### 2.6.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε από τον Μ. Tswett το 1906 και έκτοτε έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές και μεθοδολογίες. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια τεχνική χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποιοτικό έλεγχο πολύπλοκων μειγμάτων (αναλυτική TLC), αλλά και την απομόνωση των συστατικών τους (παρασκευαστική TLC). Πρόκειται για μια μη χρονοβόρα, χαμηλού κόστους και απλής εφαρμογής τεχνική. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί χρησιμοποιηθεί για: την παρακολούθηση της πορείας μιας αντίδρασης, τον εντοπισμό ενώσεων που εμπεριέχονται σε ένα παρασκεύασμα και τον προσδιορισμό της καθαρότητας μιας ουσίας (Bele, 2011).

Αρχή της μεθόδου: Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιεί μία λεπτή πλάκα υάλου, αλουμινίου ή πλαστικού, επικαλυμμένη με οξείδιο αργιλίου, γέλη πυριτίου 'silica gel' ή κυτταρίνη ως στερεά φάση. Η κινητή φάση είναι ένας ή περισσότεροι διαλύτες σε μίγμα, οι οποίοι επιλέγονται σύμφωνα με τις ιδιότητες των εμπεριεχόμενων συστατικών στο μείγμα. Η επιλογή ενός κατάλληλου διαλύτη εξαρτάται από τη φύση της ουσίας και το προσροφητικό που χρησιμοποιείται στην πλάκα. Ένας διαλύτης ανάπτυξης πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην αντιδρά χημικά με τις ουσίες του εξεταζόμενου μείγματος. Η αρχή της TLC είναι η κατανομή μιας ένωσης ανάμεσα σε μια στερεή φάση (το λεπτό στρώμα) που εφαρμόζεται σε μια πλάκα υάλου, αλουμινίου ή πλαστικού και σε μια υγρή κινητή φάση (ο διαλύτης έκλουσης) που κινείται πάνω στη στερεή φάση. Μια μικρή ποσότητα ενός δείγματος εναποτίθεται σε ένα σημείο εκκίνησης λίγο πάνω από το κάτω άκρο της πλάκας TLC. Στη συνέχεια η πλάκα αναπτύσσεται σε κατάλληλο θάλαμο που περιέχει μικρή ποσότητα της κινητής φάσης, η οποία αρχικά φτάνει λίγο κάτω από το επίπεδο εναπόθεσης του δείγματος. Ο διαλύτης μέσω τριχοειδών φαινομένων κινείται στη πλάκα και παράλληλα παρασύρονται και τα συστατικά του προς ανάλυση μείγματος. Κάθε στιγμή, τα μόρια των περιεχόμενων ουσιών είτε θα παραμένουν στη στερεή φάση είτε θα είναι διαλυμένα στον διαλύτη (κινητή φάση) και θα κινούνται προς την κατεύθυνση που κινείται αυτή. Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στον ανταγωνισμό της διαλυμένης ουσίας και της κινητής φάσης για τη δέσμευση θέσεων στην στατική φάση. Όταν το μέτωπο του διαλύτη έχει μετακινηθεί σε απόσταση περίπου 1 cm από το ανώτερο άκρο της πλάκας,

τότε η πλάκα απομακρύνεται από τον θάλαμο. Αν τα συστατικά του δείγματος είναι χρωματισμένα, μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα. Στη συνέχεια παρατηρούνται οι κηλίδες, οι οποίες εμφανίζονται με τοποθέτηση της πλάκας κάτω από μια λάμπα υπεριώδους-ορατού και τελικά πραγματοποιείαι η εμφάνιση όλων των κηλίδων του χρωματογραφήματος ύστερα από ψεκασμό της πλάκας με κατάλληλο αντιδραστήριο (Bele, 2011).

Η συμπεριφορά μιας μεμονωμένης ένωσης στην TLC χαρακτηρίζεται από τη τιμή Rf και εκφράζεται ως δεκαδικό κλάσμα στην κλίμακα από 0 εως 1. Το Rf υπολογίζεται διαιρώντας την απόσταση που διάνυσε η κηλίδα με την απόσταη που διάνυσε ο διαλύτης (το μέτωπο του διαλύτη). Η τιμή Rf επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η φύση του προσροφητή, η κινητή φάση, η θερμοκρασία, το πάχος της στοιβάδας της στατικής φάσης, ο θάλαμος ανάπτυξης, η ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος, η χρωματογραφική μέθοδος που εφαρμόζεται κ.ά. (Bele, 2011)

#### 2.6.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC), αποτελεί μια εξελιγμένη τεχνική που βασίζεται στις αρχές της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) (Aldhubaib, 2011). Αποτελεί μια βελτιωμένη μορφή της τεχνικής TLC, όπου έχει γίνει η αυτοματοποίηση των βημάτων της όλης διαδικασίας, με στόχο τη βελτίωση της ανάλυσης και την επίτευξη ακριβέστερων ποσοτικών μετρήσεων. Ο αυτοματισμός της όλης χρωματογραφικής διαδικασίας είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για να ξεπεραστεί η αβεβαιότητα που υπάρχει σχετικά με τη ποσότητα του δείγματος που εναποτίθεται και τη θέση των υπό έλεγχο ουσιών σε μια TLC (Morlock et al., 2010).

Η τεχνική της HPTLC χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ενώσεων, την ταυτοποίηση και προσδιορισμό υπολειμμάτων και τον ποσοτικό προσδιορισμό δραστικών συστατικών. Η χρήση σύγχρονων συσκευών (π.χ. σαρωτές, πυκνόμετρα και σύγχρονοι χρωματογραφικοί θάλαμοι), η εφαρμογή πιο αποτελεσματικών τεχνικών διάλυσης και υψηλής αναλυτικής δυνατότητας προσροφητών με επιλεγμένο μέγεθος σωματιδίων ή χημικά τροποποιημένη επιφάνεια, καθώς και η δυνατότητα αποθήκευσης των αποτελεσμάτων και συνδυαστικής αξιοποίησης με δεδομένα άλλων τεχνικών καθιστούν την HPTLC μια σημαντική εναλλακτική μέθοδο έναντι άλλων χρωματογραφικών τεχνικών (Aldhubaib, 2011).

Αποτελεί μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική, η αρχή μεθόδου της οποίας δε διαφέρει από

την TLC, ωστόσο υπερτερεί έναντι αυτής στην μελέτη της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης πολύπλοκων δειγμάτων. Πολυάριθμα τα πλεονεκτήματα της τεχνικής HPTLC όπως είναι η επίτευξη καθαρού χρωματογραφικού προφίλ, λόγω μεγαλύτερων αναλυτικών δυνατοτήτων, αλλά και η ακρίβεια και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Η δυνατότητα διαχείρισης πολλών δειγμάτων στην ίδια ανάλυση, ακόμα και δειγμάτων τα οποία αποκλίνουν ως προς τη φύση και τη σύνθεση τους αποτελεί επίσης ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής. Αποτελεί μια απλή, χαμηλού λειτουργικού κόστους τεχνική, επιτυγχάνει χρονικά γρήγορες αναλύσεις και απαιτεί τη χρήση ελάχιστων ποσοτήτων δειγμάτων και διαλυτών. Η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των δειγμάτων με τη χρήση πυκνομετρίας την καθιστά μια σύγχρονη μέθοδος αναλυτικού διαχωρισμού με εκτεταμένη ευελιξία και μεγάλες δυνατότητες για μελλοντική ανάπτυξη (Aldhubaib, 2011; Ram et al., 2014).

#### 2.6.3. Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LCMS)

Η συζευγμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (LC-MS) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική με πολύ υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Το LC-MS είναι συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας (LC) και της φασματομετρίας μάζας (MS). Με την υγρή γρωματογραφία (LC) μπορεί να γίνει ο διαγωρισμός των συστατικών μέσω της γρωματογραφικής στήλης και στη συνέχεια τα δείγματα που εκλούονται από το LC μεταφέρονται στη φασματομετρία μάζας (MS) όπου η ανίχνευση, η αναγνώριση και ο προσδιορισμός των μαζών των συστατικών καθώς και της δομής τους, μπορεί να γίνει παρουσία άλλων συστατικών (Pratima and Gadikar, 2018). Η βασική αρχή της φασματομετρίας μάζας (MS), είναι η παραγωγή ιόντων από ανόργανες ή οργανικές ενώσεις, ο διαχωρισμός τους με την κατάλληλη μέθοδο και με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) και η ανίχνευσή τους ποιοτικά και ποσοτικά από τα αντίστοιχα m/z και την αφθονία τους. Η αναλυόμενη ουσία μπορεί να ιοντιστεί θερμικά από το ηλεκτρικό πεδίο και να απελευθερώσει ηλεκτρόνια, ιόντα, φωτόνια. Τα ιόντα μπορεί να είναι απλά ιονισμένα άτομα, μόρια ή τα θραύσματα (Shelke P.G., Tripathi A.S., Dewani A.P., Bakal R.L., 2012). Η φασματομετρία μάζας από μόνη της δε δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα ταυτοποίησης μειγμάτων, καθώς ένα μείγμα μπορεί να έχει πολύπλοκο φάσμα, καθώς είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας πολλών συστατικών. Για τον συνδυασμό της υγρή χρωματογραφίας (LC) με τη φασματομετρία μάζας (MS) χρησιμοποιείται μια διεπαφή για τη μεταφορά των εκλουόμενων ουσιών από το LC στο MS (Pratima and Gadikar, 2018).

Μολονότι υπάρχουν διάφοροι τύποι πηγών ιονισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, οι δύο συνηθέστεροι είναι ο ηλεκτροψεκασμός ιονισμού (ESI) και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI). Και οι δύο αυτοί τύποι αποτελούν πλέον τυποποιημένα τμήματα του εξοπλισμού των φασματόμετρων μάζας που χρησιμοποιούνται για εφαρμογές LC-MS. Για τους ESI και APCI, ο ιονισμός συμβαίνει σε ατμοσφαιρική πίεση, επομένως αυτές οι πηγές συχνά αναφέρονται ως πηγές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (API) (Shelke P.G. et al., 2012; Watson et al., 2003). Η ελάχιστη αποικοδόμηση των συστατικών που προκαλούν αυτές οι πηγές ιονισμού, σε συνδυασμό με την ευαισθησία των φασματοφωτομέτρων μάζας, επιτρέπει τον εντοπισμό ακόμα και ιχνών των ενώσεων σε πολλύπλοκες δρόγες (Kruve et al., 2015). Για αμφότερες τις ESI και APCI, χρησιμοποιείται κάποιος συνδυασμός υψηλής τάσης και θερμότητας για την επίτευξη του ιονισμού και την παραγωγή των ιόντων που προσδιορίζονται από το σύστημα MS (Shelke P.G. et al., 2012; Watson et al., 2003).

Όμως, τα συστήματα LC-MS είναι σύνθετα και ένας μεγάλος αριθμός παραμέτρων πρέπει να είναι στις βέλτιστες τιμές ή κοντά σε αυτές προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή απόδοση. Επομένως, αυτό σημαίνει ότι κάθε φορά που αναπτύσσεται μια αναλυτική μέθοδος με βάση το LC-MS, οι επιδόσεις της πρέπει να ελέγχονται και να παρακολουθούνται προσεκτικά. Οι μέθοδοι που βασίζονται στο LC-MS είναι πασίγνωστες για την πολυπλοκότητά τους, αφενός λόγω του ίδιου του οργάνου και αφετέρου επειδή το LC-MS εφαρμόζεται συχνά στα πιο πολύπλοκα δείγματα (Kruve et al., 2015).

Το LC-MS εφαρμόζεται ευρέως για ποιοτικούς αναλυτικούς σκοπούς, όπως είναι ο προσδιορισμός των δραστικών ουσιών στα φαρμακευτικά σκευάσματα ή ο εντοπισμός ενδιάμεσων προϊόντων και υποπροϊόντων τους. Χρησιμοποιείται κυρίως σε μελέτες διαλυτότητας, βιοδιαθεσιμότητας, βιοϊσοδυναμίας και φαρμακοδυναμικής, καθώς και σε διάφορα στάδια ανάπτυξης φαρμάκων, για την αναγνώριση μεταβολιτών, για την ανίχνευση προσμίξεων, για τη χαρτογράφηση πεπτιδίων και γλυκοπρωτεινών. Προπαρασκευαστικά συστήματα LC-MS μπορούν να χρησιμοποιηθούν για γρήγορη μαζική ταυτοποίηση συγκεκριμένων ουσιών από μείγματα που είναι σημαντικά στη βασική έρευνα, στη φαρμακογνωσία και ειδικά στον τομέα της μοριακής φαρμακογνωσίας, στον αγροχημικό τομέα, στη βιομηχανία τροφίμων και σε άλλες βιομηχανίες. Έτσι, δικαιολογημένα θεωρείται από τις πιο σημαντικές τεχνικές στη φαρμακευτική ανάλυση (Kumar et al., 2016; Pratima and Gadikar, 2018; Shelke P.G.,

A.S. et al., 2012).

Κάποια από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής LC-MS έναντι άλλων χρωματογραφικών μεθόδων είναι (Kumar et al., 2016):

- Επιλεκτικότητα: Οι κορυφές που συνεκλούονται μπορούν να απομονωθούν με
  την επιλεκτικότητα της μάζας και δεν περιοριζόμαστε μόνο στο χρωματογραφικό διαχωρισμό.
- Αντιστοίχιση κορυφών: Δημιουργείται ένα μοριακό αποτύπωμα για την υπό μελέτη ένωση, εξασφαλίζοντας τη σωστή εκχώρηση κορυφής όταν μελετώνται πολύπλοκα μείγματα.
- Πληροφορίες για το μοριακό βάρος των ενώσεων: Επιβεβαίωση και ταυτοποίηση γνωστών και άγνωστων ενώσεων.
- Δομικές πληροφορίες: Ο ελεγχόμενος κατακερματισμός επιτρέπει τη δομική διευκρίνηση ενός χημικού προϊόντος.
- Ταχεία ανάπτυξη μεθόδου: Παρέχει εύκολη αναγνώριση των εκλουόμενων αναλυτών χωρίς να βασιζόμαστε μόνο στο χρόνο κατακράτησης.
- Προσαρμοστικότητα στη δομή του δείγματος: Μειώνει το χρόνο προετοιμασίας
  του δείγματος και επομένως εξοικονομεί χρόνο.
- Ποσοτικοποίηση: Τα ποσοτικά και ποιοτικά δεδομένα μπορούν να ληφθούν εύκολα με περιορισμένη βελτιστοποίηση οργάνων.

Τμήματα ενός συστήματος LC-MS: α) Autosampler (φορτώνει τα δείγματα στην HPLC), β) HPLC, γ) πηγή ιονισμού (διεπαφή για το LC προς το MS) και δ) φασματόμετρο μάζας (MS) (Shelke P.G. et al., 2012)

#### 2.6.3.1. Μέθοδος ΡCA

Η βασική ανάλυση συνιστωσών (PCA) είναι μια στατιστική διαδικασία που χρησιμοποιεί έναν ορθογώνιο μετασχηματισμό για να μετατρέψει ένα σύνολο παρατηρήσεων πιθανώς συσχετισμένων μεταβλητών (οντότητες καθεμιά από τις οποίες παίρνει διάφορες αριθμητικές τιμές) σε ένα σύνολο τιμών γραμμικά μη συσχετισμένων μεταβλητών που ονομάζονται κύρια συστατικά. Αυτός ο μετασχηματισμός ορίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε το πρώτο κύριο συστατικό να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση (δηλαδή, επιφέρει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μεταβλητότητα στα δεδομένα) και κάθε επόμενο στοιχείο με τη σειρά του έχει τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση βάση της βαρύτητας του. Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCA χρησιμοποιούνται συχνά οι όροι 'βαθμολογημένοι παράγοντες', για τις μετασχηματισμένες τιμές μεταβλητών που αντιστοιχούν σε ένα συγκεκριμένο σημείο δεδομένων, και 'φορτία', για το βάρος με το οποίο κάθε τυποποιημένη αρχική μεταβλητή πρέπει να πολλαπλασιαστεί για να πάρει το αποτέλεσμα της συνιστώσας. Η PCA χρησιμοποιείται κυρίως ως εργαλείο για τη διερευνητική ανάλυση των δεδομένων και για τη δημιουργία προγνωστικών μοντέλων. Αποτελεί μια απλή πραγματική πολυπαραγοντική ανάλυση. Το μοντέλο αποκαλύπτει την εσωτερική δομή των δεδομένων κατά τρόπο που να εξηγεί καλύτερα τη διακύμανση τους. Η μέθοδος PCA σχετίζεται επίσης με την ανάλυση κανονικής συσχέτισης (CCA) που ορίζει συστήματα συντεταγμένων τα οποία περιγράφουν με τον καλύτερο τρόπο τη διασταυρούμενη συνάφεια μεταξύ δύο συνόλων δεδομένων. Ενώ, η PCA ορίζει ένα νέο ορθογώνιο σύστημα συντεταγμένων που περιγράφει βέλτιστα τη διακύμανση σε ένα ενιαίο σύνολο δεδομένων (Wang et al., 2017).

## 2.7. Βιολογικές δοκιμές

# 2.7.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο'διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου' (DPPH)

Η βιολογική δοκιμή DPPH είναι η παλαιότερη άμεση μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας. Προτάθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 με σκοπό την εύρεση δοτών H<sup>+</sup> σε φυσικά υλικά. Αργότερα, η μελέτη ποσοτικοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό των φαινολικών συστατικών τροφίμων καθώς και βιολογικών δειγμάτων. Η ρίζα του DPPH (2,2-διφαινυλο-1πρυλλυλυδραζύλιο) είναι μια από τις ελάχιστες σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου, η οποία φέρει ένα βαθύ μωβ χρώμα και επίσης είναι εμπορικά διαθέσιμη. Στη βιολογική δοκιμασία 'DPPH', τα αντιοξειδωτικά και οι ενώσεις που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, ανάγουν τη σταθερή ρίζα DPPH σε 2,2-διφαινυλ-1-πρυλλυλυδραζίνη (diphenyl-picrylhydrazine), η οποία φέρει κίτρινο χρωματισμό.

Το DPPH είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό της δυνατότητας των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Η μέθοδος Θεωρείται πως βασίζεται κυρίως στην αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην απόσπαση ατόμων υδρογόνου, ή αλλιώς στην αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών έναντι του DPPH. Η ικανότητα αυτή υπολογίζεται είτε μέσω της φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού είτε μέσω υπολογισμού της ελάττωσης της απορρόφησης. Η ελεύθερη ρίζα DPPH παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 517nm και όταν αλληλεπιδράσει με μια ουσία δότη-πρωτονίου, όπως ένα αντιοξειδωτικό, εξουδετερώνεται με αποτέλεσμα να μειώνεται η απορρόφηση. Η **Εικ. 43** δείχνει τον μηχανισμό, με τον οποίο η ρίζα DPPH δέχεται ένα άτομο υδρογόνου ενός αντιοξειδωτικού. Αυτή η αντίδραση είναι στοιχειομετρική σε σχέση με τον αριθμό των ατόμων υδρογόνου που απορροφώνται. Επομένως, το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί ακολουθώντας τη μείωση της απορρόφησης στο UV στα 517 nm (T., 2009). Η μέθοδος είναι απλή και γρήγορο και απαιτεί μόνο ένα UV-VIS φασματοφωτόμετρο για να διεξαχθεί, γεγονός που εξηγεί την ευρεία εφαρμογή του στον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ωστόσο, τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα μπορεί να επηρεάζονται από ενώσεις οι οποίες απορροφούν στα μήκη κύματος όπου γίνεται η μέτρηση, καθώς και από τη θολερότητα του δείγματος (Gülçin, 2012).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μελετώμενων ενώσεων εκφράζεται ως σχετική ή απόλυτη μείωση της συγκέντρωσης (απορρόφησης στα 517 nm) του DPPH ή ως EC50 (Tirzitis and Bartosz, 2010). Η τιμή EC50 είναι η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για τη μείωση της συγκέντρωσης του DPPH στο 50% (Gülçin, 2012). Ο ρυθμός αντίδρασης των διαφόρων αντιοξειδωτικών με τη ρίζα DPPH διαφέρει. Παρά την ευρεία χρήση του DPPH, σε ορισμένους ελέγχους είναι πιθανόν να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα (Tirzitis and Bartosz, 2010). Ο κύριος περιορισμός του προσδιορισμού του EC50 είναι ότι το ποσοστό των ριζών που δεσμεύονται εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του DPPH (Gülçin, 2012).

Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη βιολογική δοκιμή DPPH, η παρουσία ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μπορεί να δείξει χαμηλή δράση. Κάποιες επιπλοκές μπορεί να προκληθούν από τον μερικό ιονισμό των μελετώμενων ουσιών, ο οποίος επηρεάζει το ποσοστό της αντίδρασης τους με τη ρίζα DPPH, καθιστώντας τη μέθοδο εξαρτώμενη του pH (Tirzitis and Bartosz, 2010).

Επίσης, ένας άλλος τρόπος για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων από διάφορες μελέτες, είναι η μονάδα ισοδύναμου Trolox (TE). Το Trolox είναι μια εμπορική υδατοδιαλυτή βιταμίνη Ε. Η αντιοξειδωτική δράση ενός δείγματος εκφράζεται σε μικρογραμμομόρια ισοδύναμων Trolox ανά 100 g δείγματος (TE / 100 g) (T., 2009).



#### Εικ. 43: Αντίδραση DPPH (Τ., 2009).

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα DPPH διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα ρίζας διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (Sigma-Aldrich) σε αιθανόλη. Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήγων μέχρι πλήρους διάλυσης. Φυλάσσεται σε σκουρόγρωμο περιέκτη σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα διαλύθηκαν στον κατάλληλο διαλύτη σε συγκέντρωση C = 4 και 2 mg/mL. Σε κάθε πηγάδι της 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL και η συγκέντρωση των δειγμάτων αντίστοιχα C = 0.4 και 0.2 mg/mL. Με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του κάθε διαλύτη που γρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση του δείγματος, γρησιμοποιήθηκε τυφλό (control) δείγμα με 10 μL διαλύτη και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Επίσης, αξιολογήθηκε η δραστικότητα του γαλλικού οξέος (10 μL GA + 190 μL διαλύματος DPPH) ως πρότυπου αντιοξειδωτικού παράγοντα σε συγκέντρωση C=0,1 mg/ml. Για όλα τα δείγματα, την ουσία αναφοράς αλλά και τα control δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά (blank), τα οποία αποτελούνταν από 10 μL δείγματος και 190μL EtOH. Η πλάκα επωάστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm, ενώ για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις

## 2.7.2. Έλεγχος ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (TPC)

Η δοκιμασία προσδιορισμού του ολικού φαινολικού φορτίου με χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu αρχικά είχε ως σκοπό τον προσδιορισμό πεπτιδίων, εκμεταλλευόμενη την ομάδα φαινόλης στην τυροσίνη. Ο Singleton και οι συνεργάτες του επέκτειναν αυτή τη μέθοδο στον προσδιορισμό των συνολικών φαινολών στον οίνο. Μολονότι, είναι γνωστή ως βιολογική δοκιμή προσδιορισμού συνολικού φαινολικού περιεχομένου, στην πραγματικότητα προσδιορίζει την αναγωγική ικανότητα του δείγματος (Macdonald-wicks et al., 2006). Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες στα τρόφιμα εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, η οποία στηρίχθηκε στη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις φαινολικές ενώσεις στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FCR) σε αλκαλικό μέσο. Αποτελεί μια μέθοδο απλή και ευρέως χρησιμοποιούμενη (Gülçin, 2012).

Το αντιδραστήριο FCR, είναι ένα μείγμα φωσφομολυβδαινικού και φωσφογλυκτικού άλατος που χρησιμοποιείται για τη χρωματομετρική ανάλυση φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών. Η μελετώμενη ουσία πρέπει να είναι ικανή να αναστέλλει την οξείδωση του αντιδραστηρίου. Το σύστημα δοκιμής είναι το μίγμα του βολφραμικού και του μολυβδαινικού άλατος σε εξαιρετικά βασικό μέσο (5-10% υδατικό Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Τα φαινολικά οξειδώνονται ενεργά σε βασικό μέσο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του O<sup>2-</sup>, το οποίο με τη σειρά του αντιδρά με το μολυβδαινικό άλας προς σχηματισμό οξειδίου του μολυβδαινίου, το οποίο παρουσιάζει πολύ έντονη απορρόφηση κοντά στα 750nm (Gülçin, 2012).

Το αντιδραστήριο FCR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως αντιδραστήριο ψεκασμού σε χρωματογραφικές διαδικασίες (Gülçin, 2012). Αυτή η μέθοδος είναι ακριβής, ευαίσθητη, απλή και μπορεί να είναι χρήσιμη για τον χαρακτηρισμό και τη μελέτη φαινολικών αντιοξειδωτικών (Macdonald-wicks et al., 2006). Επίσης, η μέθοδος αυτή είναι εφαρμόσιμη για υδατικά και μη εφαρμόσιμη για λιπόφιλα συστατικά τροφίμων (Gülçin, 2012).

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: αρχικά παρασκευάζονται τα διαλύματα FCR και Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> με διάλυση κατάλληλης ποσότητα αντιδραστηρίων σε απιονισμένο νερό. Τα διαλύματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης, ενώ στη συνέχεια το διάλυμα του FCR φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο περιέκτη σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα διαλύθηκαν στον κατάλληλο διαλύτη σε συγκέντρωση C = 4 και 2 mg/ml. Σε πηγάδι της 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 25 μL δείγματος, 100 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 125 μL FCR. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 250 μL και η αντίστοιχη συγκέντρωση των δειγμάτων C=0,4 και 0,2 mg/ml. Για όλα τα δείγματα, τον αναστολέα αλλά και τα control δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank) που αποτελούνταν από 25 μL δείγματος και 225μL απιονισμένο νερό. Η πλάκα επωάστηκε στο σκοτάδι, σε

θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 750 nm. Επίσης, προετοιμάστηκε διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης C=1mg/ml σε διαλύτη απιονισμένο νερό και μετά από προετοιμασία διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων, εφαρμόστηκε η προαναφερόμεη μεθοδολογία και από τα αποτελέσματα καταρτίστηκε η καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος, η οποία χρησιμοποιείται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του περιεχομένου σε φαινόλες ως ισοδυνάμων γαλλικού οξέος. Ο έλεγχος όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις.

#### 2.7.3. Βιοαυτογραφική μέθοδος

Ο συνδυασμός της επίπεδης χρωματογραφικής ανάλυσης με βιολογικές δοκιμές ονομάζεται βιοαυτογραφία. Αποτελεί μια αποτελεσματική και φθηνή τεχνική για την ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με σκοπό τον εντοπισμό βιοδραστικών συστατικών. Παρά την ύπαρξη εξελιγμένων τεχνικών υγρής χρωματογραφίας και συζευγμένων βιοπροσδιορισμών, η βιοαυτογραφία προσφέρει μια απλή, γρήγορη και ανέξοδη μέθοδο για την απόκτηση ενός προφίλ της γημικής σύστασης και της βιολογικής δράσης σύνθετων φυτικών εκχυλισμάτων. Το 1946, ο Goodal και ο Levi εισήγαγαν τη χρωματογραφία χάρτου (PC) για πρώτη φορά, ώστε να εκτιμηθεί η καθαρότητα της πενικιλίνης. Το 1961, οι Fisher και Lautner εισήγαγαν τη βιοαυτογραφία βασισμένη στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), ενώ το πρώτο άρθρο ανασκόπησης σχετικά με τη βιοαυτογραφία γράφτηκε από τη Betina το 1973 (Dewanjee et al., 2014). Н βιοαυτογραφία ανήκει στις μεθόδους μικροβιολογικών μελετών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση αντιμικροβιακής δραστικότητας. Η 'γαρτογράφηση' μπορεί να οριστεί ως η πρώτη διαδικασία, η οποία εφαρμόζεται σε ένα αναλυθέν δείγμα, προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία ή η απουσία των υπό εντόπιση βιολογικά δραστικών αναλυτών. Αρκετά συχνά, μέθοδοι ελέγχου (screaning methods) δίνουν μεγαλύτερη ευαισθησία από οποιαδήποτε άλλη μέθοδο. Επιπλέον, αυτοί είναι απλοί, φθηνοί, εξοικονομούν χρόνο και δεν απαιτούν εξελιγμένο εξοπλισμό.(Choma and Grzelak, 2011) Οι τεχνικές της TLC και της PC χρησιμοποιούνται για τη βιοαυτογραφία, αλλά η μέθοδος ανίχνευσης βελτιώνεται σημαντικά εφαρμόζοντας προηγμένες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC), η χρωματογραφία στρώματος υπό πίεση (OPLC) και η επίπεδη ηλεκτροχρωματογραφία (PLC). Τα κύρια πλεονεκτήματα της βιοαυτογραφίας είναι ότι είναι δυνατή η μελέτη της

97

βιοδραστικότητας (π.χ. αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιοξειδωτική, ανασταλτική ενζύμων) ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων, καθώς και ο εντοπισμός και η κατευθυνόμενη απομόνωση των δραστικών ενώσεων (Dewanjee et al., 2014).

### 2.7.3.1. Βιοαυτογραφική μέθοδος με τη χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η σταθερή ελεύθερη ρίζα της 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζίνης (DPPH) έχει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm, το οποίο μειώνεται μετά από αναγωγική αντίδραση με ένα αντιοξειδωτικό παράγοντα. Η αντίστοιχη αλλαγή χρώματος (μώβ  $\rightarrow$  κίτρινο) μπορεί έτσι να παρατηρηθεί σε μια βιολογική δοκιμασία TLC. Το αναπτυγμένο χρωματογράφημα ψεκάζεται με διάλυμα 0,05% (DPPH) σε αιθανόλη. Η πλάκα εξετάζεται στο φως της ημέρας μετά από 30 λεπτά. Οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζονται ως ωχρές - κίτρινες κηλίδες σε ένα πορφυρό φόντο. Η ένταση του κίτρινου χρώματος μπορεί να μετρηθεί με ένα χρωματόμετρο.(Dewanjee et al., 2014)

Παράλληλα, αντίστοιχα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης και με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτός ο προσδιορισμός των κηλίδων που αντιστοιχούν σε βιοδραστικά συστατικά.

## Υλικά και μέθοδοι

## 3. Υλικό Αποβλήτου Εκπίκρανσης Θρουμποελιάς

Το προς μελέτη υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το υγρό απόβλητο που προκύπτει από την επεξεργασία της ξηράλατης επιτραπέζιας ελιάς 'Θρούμπα Θάσου' (Εικ. 44). Προμηθευτήκαμε το υλικό αυτό από το συνεταιρισμό επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς Καβάλας. Αρχικά, εφαρμόστηκε σε αυτό ταχεία διήθηση (χαρτί Whatman) ώστε να απομακρυνθεί τυχόν εναπομένουσα σάρκα ελιάς ή ξένα σωματίδια.



Εικ. 44: Υδατικό απόβλητο ξηράλατης επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς Θρούμπα Θάσου

## 3.1. Διαλύτες

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες: διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (ACN), χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc), κυκλοεξάνιο (Hex-c), αιθανόλη (EtOH) και βουτανόλη (BuOH), ποιότητας A.R. Επίσης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο και απεσταγμένο νερό (H<sub>2</sub>O).

Ακολουθεί η πορεία επεξεργασίας του υδατικού αποβλήτου Θρούμπα Θάσου (THR) (Εικ. 45)(Εικ. 46)

## Πορεία επεξεργασίας υδατικού αποβλήτου Θρούμπας Θάσου



Εικ. 45: Διαγραμματική απεικόνιση επεξεργασίας ΤΗ με ρητίνη



## Πορεία επεξεργασίας υδατικού αποβλήτου Θρούμπας Θάσου

Εικ. 46: Διαγραμματική απεικόνιση πορείας επεξεργασίας κλασμάτων που προκύπτουν από την επεξεργασία THR με ρητί νη

## 3.2. Τεχνικές επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν

## 3.2.1. Τεχνική προσρόφησης σε ρητίνες Amberlite XAD

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την προσρόφηση με ρητίνες είναι η τεχνική στήλης καθώς από προηγούμενη μελέτη έχει φανεί ότι με αυτή την τεχνική επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη προσρόφηση συστατικών, σε σχέση με την τεχνική λουτρού (Μακρυγιαννάκης M., 2016).

Στη τεχνική στήλης συμβαίνουν πολυάριθμες τεχνικές λουτρού στα επάλληλα στρώματα της ρητίνης και έτσι η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης μπορεί να καταστεί ποσοτική, αρκεί να μην υπερβούμε την προσροφητική χωρητικότητα της στήλης.

Για την μελέτη της προσροφητικής ικανότητας κάθε ρητίνης, εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία επεξεργασίας του υδατικού αποβλήτου THR, η οποία αποτελείται από τα εξής στάδια/ βήματα (Σχήμα 1):

Πρώτο βήμα της επεξεργασίας είναι η ενεργοποίηση της κάθε ρητίνης:

- Αρχικά έκπλυση της κάθε ρητίνης με νερό για 10 min, ώστε να απομακρυνθούν
  τα άλατα αντιμικροβιακής συντήρησης που περιέχει (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- Έκπλυση με MeOH και επακόλουθη παραμονή σε MeOH για 5-6 ώρες (υπό ανάδευση όπου με την ανάδευση σε κάποιες ρητίνες παρατηρήθηκε μερική θραύση των σφαιριδίων, λόγω ανάπτυξης τριβών μεταξύ τους, το οποίο οδηγεί και σε τροποποίηση της απόδοσης τους, καθώς και της διάρκειας ζωής τους (Κατσοπρινάκη, 2004),
- Έκπλυση της ρητίνης με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O, διαδικασία η οποία επαναλαμβάνεται τρείς φορές διάρκειας 10 λεπτών τη φορά υπό ανάδευση.
- Η διατήρηση πλέον της ρητίνης γίνεται σε απεσταγμένο H<sub>2</sub>0 και είναι έτοιμη
  για να χρησιμοποιηθεί για το στήσιμο της στήλης.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 6 στήλες για την κάθε ρητίνη ώστε να επιτευχθεί στατιστικώς αποδεκτή σύγκριση των αποτελεσμάτων. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν είναι μήκους 40cm και διαμέτρου 1.5cm, με πορώδη βάση (P0).

Στη συνέχεια για το στήσιμο της κάθε στήλης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

 Τοποθέτηση στην πορώδη βαση της στήλης μικρής ποσότητας βαμβακιού για προστασία του από τυχόν φράξιμο των πόρων της.

- Προσθήκη μικρού στρώματος άμμου, επίσης για προστασία του πορώδους και διευκόλυνση πακτώματος της στήλης.
- Προσθήκη ρητίνης, (20-21 mL), η οποία πακτώνεται αρκετά ώστε να μην υπάρχουν κενά και αέρας μεταξύ των σωματιδίων κάτι που θα μείωνε την αποδοτική λειτουργία της ρητίνης.
- Τοποθέτηση ενός τμήματος διηθητικού χαρτιού στην επιφάνεια της πακτωμένης ρητίνης για προστασία της και
- Τέλος, προσθήκη μικρής ποσότητας άμμου ώστε να βοηθήσει στο σωστό πάκτωμα της στήλης και την αποφυγή της ανατάραξής της κατά την προσθήκη των προς επεξεργασία δειγμάτων.



Εικ. 47: Πληρωμένη στήλη με ρητίνη στο στάδιο της δέσμευσης

Ύστερα από την πλήρωση της στήλης με τον παραπάνω τρόπο, ακολούθησε η προσθήκη του δείγματος αποβλήτου, το οποίο διέρχεται από τη στήλη με σταθερή ροή 0.6-0.8 mL/min (2BV/h). Κατά τη διέλευση του αποβλήτου από τη ρητίνη , επέρχεται συγκράτηση σε αυτή μέρους του οργανικού φορτίου , το οποίο μπορεί να αποδεσμευτεί από τη ρητίνη με διάλυμα MeOH ή EtOH, ενώ οι ουσίες οι οποίες δεν προσροφώνται εκλούονται άμεσα και συλλέγονται σε ξεχωριστό κλάσμα (κλάσμα «Αποβήτου»). Κατά την όλη διαδικασία για κάθε στήλη συλλέχθηκαν τρία κλάσματα:

 το κλάσμα «Απόβλητο» το οποίο αποτελείται από το αρχικό υλικό που έχει διέλθει από τη ρητίνη

- το κλάσμα «Εκπλυση» το οποίο προέρχεται από τη διέλευση απεσταγμένου
  Η<sub>2</sub>0 από τη ρητίνη για απομάκρυνση τυχόν ποσότητας αλατιού από το αρχικό
  υλικό που έχει κατακρατηθεί σε αυτή και το οποίο επιθυμούμε να αποφύγουμε
- και το κλάσμα «Αποδέσμευση» το οποίο προέρχεται από τη διέλευση MeOH
  από τη στήλη και αποτελείται από το οργανικό φορτίο που έχει προσροφηθεί
  προηγουμένως στη ρητίνη. Το κλάσμα αυτό αποτελεί το τελικό εκχύλισμα το
  οποίο στη συνέχεια μελετήθηκε ως προς την αντιοξειδωτική του δράση.



Εικ. 48: Από τα αριστερά προς τα δεξιά, τα στάδια «Αποβλήτου», «Εκπλυσης» και «Αποδέσμευσης» της πορείας προσρόφησης πολυφαινολικών στην ρητίνη.

Οπότε συνολικά έχουμε ένα κλάσμα «Αποβλήτου», ένα κλάσμα «Εκπλυσης» και ένα κλάσμα «Αποδέσμευσης» για κάθε στήλη. Η παραπάνω περιγραφόμενη διαδικασία αποτελεί τον βασικό σκελετό διεξαγωγής των επιμέρους πειραμάτων.

Επεξεργασία κλασμάτων: Τα παραπάνω κλάσματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού με απομάκρυνση των διαλυτών τους υπό ελαττωμένη πίεση σε συσκευή Rotavapor-114 Buchi<sup>®</sup>, ώστε να υπολογιστεί το ξηρό/καθαρό βάρος τους και για μεγαλύτερη ακρίβεια μεταφέρθηκαν σε μικρά φιαλίδια, από τα οποία επίσης μετά την αντίστοιχη συμπύκνωση του υλικού τους υπολογίστηκε το ξηρό βάρος. Για τη μεταφορά του ξηρού δείγματος από τη σφαιρική φιάλη στο φιαλίδιο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα EtOAc/MeOH 80/20 στα κλάσματα «Αποβλήτου» και «Εκπλυσης», ώστε να μη παραληφθεί το αλάτι που είχε περάσει στο δείγμα. Το προαναφερόμενο μίγμα διαλυτώνδεν ευνοεί τη διαλυτοποίηση του αλατιού, το οποίο δημιουργεί ίζημα και απομακρύνεται από το υπόλοιπο δείγμα μετά από διήθησή του από διηθητικό χαρτί. Η παραπάνω επεξεργασία έγινε ώστε στο τελικό δείγμα που εμπεριέχεται στο φιαλίδιο, να έχει τη μικρότερη δυνατή ποσότητα αλατιού. Για τις μεταφορές των κλασμάτων των αποδεσμεύσεων χρησιμοποιήθηκε MeOH και απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Επίσης κατά τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας λήφθηκε υπόψη η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου και κάθε φορά επιδιώχθηκε η ρύθμιση της ροής των στηλών σε 0.6-0.8mL/ min (2BV/h).

Στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ποσότητες υλικού αποβλήτου εκπίκρανσης από την επεξεργασία THR, όπως 20, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 160, 200, 240, 600 και 1000 mL υλικού. Από τη διέλευση των προαναφερόμενων δειγμάτων προέκυψαν ανάλογα κλάσματα «Αποβλήτου», «Εκπλυσης» και «Αποδέσμευσης», ο όγκος των οποιων αναφέρεται στο κάθε πείραμα ξεχωριστά.

## 3.2.1.1. Κριτήριο απορρίψεως τιμών πειραματικών δεδομένων που προκύπτουν από το πείραμα επεξεργασίας υλικού με τις ρητίνες

Από τα δεδομένα μαζών που προέκυψαν από το πέιραμα επεξεργασίας του υλικού THR με της ρητίνες, έγινε ο υπολογισμός του μέσου όρου αυτών, αφού πρώτα απορρίφθηκαν οι αποκλείνουσες τιμές, βάση του κριτηρρίου Q.

Κριτήριο Q: Κατά τη χρησιμοποιήση του, η διαφορά της αμφισβητίσιμης τιμής από την πλησιέστερη γειτονική τιμή διαιρείται με το εύρος των τιμών και η τιμή, που υπολογίζεται με αυτό τον τρόπο, Qπειρ, συγκρίνεται με θεωρητικές τιμές απορρίψεως, Qθεωρ, που δίνονται σε στατιστικούς πίνακες. Εάν οι αμφισβητήσιμες τιμές είναι περισσότερες από μία, οι τιμές αναγράφονται κατά αυξανόμενο μέγεθος x1, x2, x3, ..., Xn-1, ελέγχεται η ελάχιστη τιμή x1, έπειτα η μέγιστη xn κ.o.κ. και σε κάθε περίπτωση έχουμε Qπειp<1. Εάν Qπειp> Qθεωρ. το αμφισβητήσιμο αποτέλεσμα απορρίπτεται (Χατζηϊάννου Π., 1988).

## 3.3. Χρωματογραφικές μέθοδοι

## 3.3.1. Χρωματογραφικά αντιδραστήρια

Τα χρωματογραφήματα TLC και HPTLC παρατηρήθηκαν αρχικά στο υπεριώδες φως (254nm, 366nm). Στη συνέχεια οι TLC ψεκάστηκαν με το ακόλουθο μίγμα αντιδραστηρίων A+B:

Διάλυμα Α: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη,

Διάλυμα Β: H2SO4 5% σε μεθανόλη

Ισοι όγκοι αντιδραστηρίων Α και Β αναμείχθηκαν λίγο πριν τον ψεκασμό και τα χρωματογραφήματα εμφανίστηκαν με θέρμανση για 2 λεπτά σε υψηλή θερμοκρασία (> 100 °C)

## 3.3.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Χρησιμοποιήθηκαν :

 Γέλη οξειδίου του πυριτίου κανονικής φάσεως με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 10 cm. Πάχος στιβάδας 0.1 mm (αναλυτική TLC).

Γέλη οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες
 πλάκες 5 x 10 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (αναλυτική TLC).

 Γέλη οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 10 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (αναλυτική TLC).

Ο έλεγχος των χρωματογραφημάτων έγινε υπό το φως λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος των 254nm και 366nm και ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλλίνης, κάψιμο και παρατήρηση στο ορατό φως.

### 3.3.3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Η διάταξη (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.) που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από:

- CAMAG Automatic TLC sampler 4 (ATS4) για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού.
- CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC 2) για την αυτόματη, επαναλήψιμη και ανεπηρέαστη ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων.

- CAMAG TLC Scanner 3 για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και τη λήψη φασμάτων απορρόφησης.
- CAMAG TLC Visualizer για την απότύπωση του χρωματογραφήματος με τη μορφή έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.
- CAMAG Chromatogram Immersion Device και TLC Plate Heater για την ομοιόμορφη εμβάπτιση και εμφάνιση των χρωματογραφημάτων.



Εικ. 49: Επιμέρους τμήματα συσκευής ΗΡΤLC

## 3.3.4. Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LCMS)

Τα τμήματα της διάταξης LC-MS είναι τα ακόλουθα:

- Autosampler (φορτώνει τα δείγματα στην HPLC).
- Σύστημα HPLC.
- Πηγή ιονισμού (διεπαφή για το LC προς το MS)
- Φασματόμετρο μάζας (MS) (Shelke P.G., Tripathi A.S., Dewani A.P., Bakal R.L., 2012)

Τα δεδομένα που λήφθηκαν από την επεξεργασία των κλασμάτων με τη μέθοδο LC-MS επεξεργάστηκαν στη συνέχεια με τη μέθοδο PCA

## 3.3.4.1. Αναλυτική διαδικασία HR-ESI(-)MS

### <u>Α. Ανάλυση</u>

## Οργανολογικός Εξοπλισμός

-Χρωματογραφικό Σύστημα: Υγροχρωματογράφος υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) με αντλία HPG-3400 (Dionex UltiMate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific).

-Χρωματογραφική Στήλη: Acclaim TM RSLC 120 C18 (100 mm × 2.1 mm, 2.2 μm) (Thermo Scientific).
-Φασματόμετρο μάζας: Υβριδικός αναλυτής μαζών τύπου τετραπόλου χρόνου πτήσης ιόντων (QTOF-MS) (Maxis Impact, Bruker Daltonics)

Διαλύτες – Ρυθμιστικά Διαλύματα

- Υπερκάθαρο νερό, σύστημα MilliQ-UV (Millipore)

- Μεθανόλη, καθαρότητας LC-MS (Merck)

- Μεθανόλη, καθαρότητας [πρόσθετο αντιδραστήριο σε διαλύτες έκλουσης για ανάλυση LC-MS] (Fluka Analytical)

Φορμικό αμμώνιο LC-MS Ultra και οξικό αμμώνιο για φασματομετρία μάζας
[πρόσθετα αντιδραστήρια σε διαλύτες έκλουσης για ανάλυση UHPLC-MS] (Fluka Analytical)

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης :

-Υγροχρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης, Reversed Phase Liquid Chromatography (RPLC)

Θετικός Ιοντισμός:

Υδατικός διαλύτης: H2O/MeOH 90/10 v/v, 5 mM HCOONH4, 0.01% φορμικό οξύ

Οργανικός διαλύτης: MeOH, 5 mM HCOONH4, 0.01% formic acid

Αρνητικός Ιοντισμός:

Υδατικός διαλύτης: H2O/Methanol 90/10 v/v, 5 mM CH3COONH4

Οργανικός διαλύτης: MeOH, 5 mM CH3COONH4

Χρόνος	Ροή	% Υδατικού	% Οργανικού
(min)	(mL min-1)	Διαλύτη	Διαλύτη
0	0.2	99.0	1.0
1	0.2	99.0	1.0
3	0.2	61.0	39.0
14	0.4	0.1	99.9
16	0.48	0.1	99.9
16.1	0.48	99.0	1.0
19.1	0.2	99.0	1.0
20.0	0.2	99.0	1.0

Πίν.5: RPLC Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

#### Θερμοκρασία Στήλης: 30 °C

#### Όγκος Έγχυσης: 5μL

Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε 3 επαναλήψεις, που επιβάλλεται από την ανάγκη της πειραματικής πορείας της μη-στοχευμένης ανάλυσης

#### Πηγή Ιοντισμού:

Το σύστημα του QTOF-MS είναι εξοπλισμένο με σύστημα ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization interface, ESI) που έχει τη δυνατότητα λειτουργίας σε θετικό και σε αρνητικό ιοντισμό.

#### Παράμετροι Φασματογράφου Μάζας

#### -Λειτουργία σάρωσης:

Σάρωση χωρίς προεπιλογή ιόντων (data independent acquisition) – καταγραφή φάσματος MS και MS/MS πλήρους σάρωσης ιόντων χωρίς προεπιλογή. Λειτουργία σάρωσης broad band Collision Induced Dissociation (bbCID) (απόκτηση φάσματος πλήρους σάρωσης MS με ενέργεια θραυσματοποίησης: 4 eV και MS/MS φάσματος με ενέργεια θραυσματοποίησης: 25 eV, σε μία μόνο ένεση)

Σάρωση ιόντων με προεπιλογή (data dependent acquisition) – καταγραφή φάσματος MS πλήρους σάρωσης ιόντων και MS/MS των 5 ιόντων με τη μεγαλύτερη αφθονία

- Εύρος m/z (mass to charge ratio): 50-1000 Da

- Συχνότητα σάρωσης: 2 Hz

#### **<u><b>Β.** Επεξεργασία δεδομένων.</u>

Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σάρωσης μη-στοχευμένης ανάλυσης, (Εικ. 50) για όλα τα δείγματα των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' και της στοχευμένης ανάλυσης οκτώ μεταβολιτών, οι οποίοι απομονώθηκαν στο παρελθόν από το ίδιο υλικό, και αναμενόταν να ανιχνευθούν στα δείγματα των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' των ρητινών. Η επιβεβαίωση της ανίχνευσης των μεταβολιτών στα υπό εξέταση δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

- Ταύτιση του χρόνου ανάσχεσης με πρότυπο διάλυμα
- Ακρίβεια μάζας ≤2mDa/ 5 ppm
- Ταύτιση με το θεωρητικό ισοτοπικό προφίλ, ≤200 mSigma
- Ταύτιση του προφίλ θραυσματοποίησης (MS/MS spectrum)

Στη συνέχεια τα δείγματα επεξεργάστηκαν ακολουθώντας το διάγραμμα ροής της σάρωσης 'ύποπτων' ενώσεων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη σάρωση ενώσεων, οι οποίες βάσει βιβλιογραφίας είναι πιθανό να ανιχνευθούν στα υπό εξέταση δείγματα, αλλά δεν υπάρχει διαθέσιμο πρότυπο αναφοράς για την πλήρη ταυτοποίησή τους. Στο παρόν πείραμα, χρησιμοποιήθηκε μια λίστα με πάνω από 275.000 φυσικές ενώσεις, ένα σημαντικό μέρος των οποίων έχουν αναφερθεί ως συστατικά της ελιάς και των προϊόντων της. Στη διαδικασία αυτή, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη του χρόνου ανάσχεσης με χημειομετρικά εργαλεία βασιζόμενα στη σχέσης δομής – χρόνου ανάσχεσης (Quantitative Structure–Retention Relationship, QSRR) με μέγιστο αποδεκτό όριο απόκλισης τα 1,8 λεπτά, συλλογή πληροφορίας από το φάσμα MS (ισότοπα, ιόντα προσθήκης) με μέγιστη ταύτιση το 100 και σύγκριση του φάσματος MS/MS είτε με *on-line* βιβλιοθήκες φασμάτων ή με τη χρήση *in-silico* μοντέλων πρόβλεψης θραυσματοποίησης.



Εικ. 50: Διαγράμματα ροής για τις σαρώσεις μη στοχευμένης και στοχευμένης ανάλυσης (σάρωση «ύποπτων» ενώσεων). Πηγή: Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 12333–12341. (DOI: 10.1021 /acs.est.5b03454)

Τέλος για κάθε ουσία που ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε παρουσιάζουμε και το επίπεδο αξιοπιστίας της ταυτοποίησης, στη βάση της κατηγοριοποίησης των επιπέδων αξιοπιστίας με HR-MS, όπως φαίνεται στην παρακάτω **Εικ. 51**:



Εικ. 51: Επίπεδα αξιοπιστίας ταυτοποίησης στην ανάλυση HR-MS. Ο συμβολισμός MS2 αναπαριστά θραυσματοποίηση σε οποιοδήποτε επίπεδο και όχι μόνο στο δεύτερο (MSn). Πηγή: Analytical Methods 2014, 6, 2812 (DOI: 10.1039/c3ay41907j).

#### 3.4. Βιολογικές δοκιμές

#### 3.4.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο 'διφαινυλπικρυλυδραζυλίου' (DPPH)

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα DPPH διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα ρίζας διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (Sigma-Aldrich) σε αιθανόλη. Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήγων μέγρι πλήρους διάλυσης. Φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο περιέκτη σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα διαλύθηκαν στον κατάλληλο διαλύτη σε συγκέντρωση C=4 και 2 mg/mL. Σε πηγάδι 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL με συγκέντρωση C=0,4 και 0,2 mg/mL. Με το διαλύτη διάλυσης του κάθε δείγματος δημιουργήθηκε τυφλό (control) δείγμα με 10 μL διαλύτη και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Επίσης, τοποθετήθηκε σε πηγάδι το γαλλικό οξύ (10 μL GA + 190 μL διαλύματος DPPH), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπος αντιοξειδωτικός παράγοντας, τ σε συγκέντρωση C=0,1 mg/ml. Για όλα τα δείγματα, τον αναστολέα αλλά και τα control δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά (blank) που αποτελούνταν από 10 μL δείγματος και 190μL EtOH. Η πλάκα επωάστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm.

# 3.4.2. Έλεγχος ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (TPC)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής: αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα FCR και Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> με διάλυση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίων σε απιονισμένο νερό. Τα διαλύματα μετά από ανάδευση, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης και φυλάχθηκαν σε σκουρόχρωμους περιέκτες σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα διαλύθηκαν στον κατάλληλο διαλύτη σε συγκέντρωση C=4 και 2 mg/ml. Σε κάθε πηγάδι 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 25 μL δείγματος, 100 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 125 μL FCR. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 250 μL και η τελική συγκέντρωση διαμορφώθηκε σε C = 0,4 και 0,2 mg/ml, αντίστοιχα. Για όλα τα δείγματα (blank) που αποτελούνταν από 25 μL δείγματος και 225μL απιονισμένο νερό.. Η πλάκα επωάστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 750 nm. Επίσης, προετοιμάστηκε διάλυμα

γαλλικού οξέος συγκέντρωσης C=1mg/ml σε διαλύτη απιονισμένο νερό και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάσθηκαν διαλύματα γαλλικού οξέος γνωστής συγκέντρωσης, με τα οποία σχηματίστηκε η καμπύλη γαλλικού οξέος, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την έκφαση του φαινολικού περιεχομένου σε ισογύνμα γαλλικού οξέος.

#### 3.4.3. Βιοαυτογραφική μέθοδος με τη χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η σταθερή ρίζα 2, 2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίνης (DPPH) παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm, ενώ η απορρόφηση σε αυτό είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της ελεύθερης ρίζας και μειώνεται με την αντίδραση εξουδετέρωσής της. Η χαρακτηριστική αλλαγή χρώματος (μώβ → κίτρινο) είναι εμφανής και μπορεί να αξιολογηθεί ότανη βιολογική δοκιμασία πραγματοποιείται σε χρωματογραφική πλάκα TLC. Πιο συγκεκριένα, το αναπτυγμένο χρωματογράφημα ψεκάζεται με διάλυμα 0,05% (DPPH) σε μεθανόλη/ ή αιθανόλη. Η πλάκα εξετάζεται στο φως της ημέρας μετά από 30 λεπτά. Οι ουσίες που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες εμφανίζονται ως ωχρές - κίτρινες κηλίδες σε ένα πορφυρό φόντο. Η ένταση του κίτρινου χρώματος μπορεί να μετρηθεί με ένα χρωματόμετρο.(Dewanjee et al., 2014)

Επίσης, η μέθοδος βιοαυτογραφίας συνδυάστηκε με τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο βανιλλίνης για τη μελέτηεμφάνιση του χρωματογραφικού προφίλ των ουσιών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Προετοιμάστηκαν 200 ml διαλύματος βανιλλίνης για την περάτωση της διαδικασίας.

## Πειραματικό Μέρος

#### 4. Κωδικοποίηση δειγμάτων

Για την καλύτερη κατανόηση των πειραματικών αποτελεσμάτων ακολουθούν οι Πίνακες 6 και 7, στους οποίους περιγράφεται η κωδικοποίηση που έχει εφαρμοστεί στα κλάσματα που λήφθηκαν κατά τις πειραματικές διαδικασίες.

Α. Δείγματα από την πειραματική διαδικασία επιλογής ρητίνης.

- <u>4ACc50</u>: Είναι το συνολικό κλάσμα της αποδέσμευσης από την έκλουση 50 mL αρχικού υλικού από ρητίνη XAD-4, κατά την τρίτη επανάληψη (3η στήλη).
- <u>7WCa50U</u>: Είναι το οργανικό μέρος του σταδίου του αποβλήτου της έκλουσης (μετά από το «πλύσιμο» του ξηρού κλάσματος του αποβλήτου της έκλουσης με AcOEt/<u>MeOH</u> 20%, με την βοήθεια υπερήχων και μετά από φυγοκέντρηση) 50 mL αρχικού υλικού από ρητίνη XAD-7HP και κατά την πρώτη επανάληψη (1η στήλη).
- <u>18ECf50</u>: Είναι το οργανικό μέρος του σταδίου της έκπλυσης της έκλουσης (μετά από το «πλύσιμο» του ξηρού κλάσματος της έκπλυσης της έκλουσης με AcOEt/<u>MeOH</u> 20%, με την βοήθεια υπερήχων) 50 mL αρχικού υλικού από ρητίνη XAD-18 και κατά την έκτη επανάληψη (6η στήλη).

<u>Β. Δείγματα από την μελέτη του ορίου κορεσμού της επιλεγμένης ρητίνης.</u>

- <u>761WCa240fr1(10)</u>: Είναι το 1° κλάσμα αποβλήτου όγκου 10ml, από έκλουση 240ml αρχικού υλικού από ρητίνη XAD-761.
- <u>761ACa600fr1(100)</u>: Είναι το πρώτο κλάσμα αποβλήτου, όγκου 100ml, από το πείραμα στο οποίο συνολικά διήλθαν 600ml υλικού αποβλήτου από 20ml ρητίνης XAD-761.

Ρητίνη	Κλάσμα	Στήλη / Αριθμός επανάληψης	Ογκος (mL) αρχικού υλικού που διέρχεται από 20 mL ρητίνης	Αριθμός κλάσματος διαδικασίας βελτιστοποίησης	Όγκος (mL) κλάσματος διαδικασίας βελτιστοποίησης
4 : XAD-4	W : Απόβλητο	C a : Στήλη 1 <sup>η</sup> επανάληψη	20	1 : 1° κλάσμα	10
7 : XAD–7 HP	Ε : Έκπλυση	C b : Στήλη 2 <sup>η</sup> επανάληψη	40	2 : 2° κλάσμα	20
18 : XAD–18N	Α : Αποδέσμευση	C c : Στήλη 3 <sup>η</sup> επανάληψη	50	n : nº κλάσμα	100
1180 : XAD– 1180	Crude : Υγρό απόβλητο εκπίκρανσης (αρχικό υλικό)	C d : Στήλη 4 <sup>η</sup> επανάληψη	60		200
1600 : XAD- 1600N		C e : Στήλη 5 <sup>η</sup> επανάληψη	80		
16N : XAD– 16N		C f : Στήλη 6 <sup>η</sup> επανάληψη	100		
16HPN : XAD– 16HPN			120		
761 : XAD- 761			160		
			200		
			240		
			600		
			1000 (κωδικός=1)		
Blank = procedural ρητινών					
ξ.β. = ξηρό βάρος					
U = άνω φάση που προκύπτει μετά από εκχύλιση με EtOAc/ <u>MeOH</u> 20% και φυγοκέντρηση					

#### Πίν. 6: Πίνακας κωδικοποίησης κλασμάτων – Συντομεύσεις.

#### Πίνα. 7: Αναλυτικός πίνακας κωδικοποίησης δειγμάτων.

Κωδικός δείγματος	Αναλυτική περιγραφή κωδικού δείγματος
XAD-4	Ρητίνη ΧΑD-4
XAD -7 HP	Ρητίνη ΧΑΟ-7
XAD-18	Ρητίνη ΧΑD-18
XAD-1180	Ρητίνη ΧΑD-1180
XAD-1600N	Ρητίνη ΧΑD-1600Ν
XAD-16N	Ρητίνη ΧΑD-16Ν
XAD-16HPN	Ρητίνη ΧΑD-16ΗΡΝ
XAD-761	Ρητίνη ΧΑD-761
	ε.β. αργικού υλικού
Crude a	Αοχικό δείνμα 1 <sup>η</sup> επανάληψη
Crude b	Αρχικό δείνμα 2 <sup>η</sup> επανάληψη
	Υνοή-υνοή εκνύλιση
EtOAc1	Κλάσμα EtOAc υνοήc-υνοήc εκγύλιση. 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
EtOAc2	Κλάσμα EtOAc υνοής-υνοής εκγύλιση, $2^{η_{\rm G}}$ επανάληψης
EtOAc3	Kλάσμα EtOAc υνοής-υνοής εκγύλιση, 3ης επανάληψης
Butanol1	Kλάσμα Butanol υχοής-υχοής εκγύλιση. 1ης επαγάληψης
Butanol2	Kλάσμα Butanol υχοής-υχοής εκγύλιση, 2ης επαγάληψης
Butanol3	Kλάσμα Butanol υγοής-υγοής εκγύλιση, 3ης επαγάληψης
Πειοά	ματα δοκιμής επεξεονασία υλικού THR με ουτίνες
4WCa50	Κάτω ωάση αποβλήτου οπτίνης XAD-4. $1^{η_{5}}$ επαγάληψης
4WCa50U	Ave φάση αποβλήτου οητίνης XAD-4 $1^{\eta\varsigma}$ επανάληψης
4WCb50	Kάτω φάση αποβλήτου οπτίνης XAD-4 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
4WCb50U	Ave eigen αποβλήτου οπτίνης XAD-4 $2^{\eta\varsigma}$ επανάληψης
4WCc50	Kάτω φάση αποβλήτου οπτίνης XAD-4, 2 <sup>η</sup> ς επανάληψης
4WCc50U	$A_{\rm M}$ (μάση αποβλήτου οπτίμης XAD 4, 3 <sup>10</sup> επαιάλημης
4WCd50	$K$ άτοι μάση αποβλήτου οπτίψης XAD 4. $4^{16}$ σπαμάληψης
4WCd50U	$A_{\rm M}$ (μάση αποβλήτου οπτίνης AAD 4, 4 <sup>th</sup> επανάληψης
4WCe50	Kάτοι μάση αποβλήτου οπτίψης XAD 4, 5 <sup>10</sup> επαιμάληψης
4WCo50U	$A_{\rm M}$ μάση αποβλήτου οπτίμης $A_{\rm M}$ -4, 5 <sup>10</sup> επανάληψης
4WCf50	Aver each $\alpha$ and $\beta$
4WCI50	Ave φαση απορλητου pητινής XAD-4, $0^{\circ}$ επαναληψης
4ECa30	Extration proving $XAD = 4$ , 1% encoded by $M = 2$
4EC050	Extraol printing XAD-4, $2^{15}$ entrough printing
4EC30	$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^$
4ECd50	Eκπιοση ρητινής AAD-4, 4 <sup>45</sup> επανάληψης
4ECe50	Eκποση ρητινής AAD-4, $5^{45}$ επαναλήψης
4ACa30	Aποδεόμευση ρητινής AAD-4, $1^{15}$ επανάληψης
4AC050	Aποδεσμεύση ρητινής AAD-4, 2 <sup>th</sup> επανάληψης
4ACC30	Aποδεσμεύση ρητινής AAD-4, $5^{15}$ επανάληψης
4ACd50	Aποδεσμευση ρητινής AAD-4, 4 <sup>16</sup> επαναληψης
4ACe50	Aπooεσμευση ρητινης AAD-4, 5th επαναληψης
	Kατω φαση απορλητου ρητινής XAD-/, 1 <sup>45</sup> επαναληψης
/WCa50U	And fast anoblitou philing XAD- $/$ , 1% eparatic for the fast of t
/WCb50	Κατω φαση αποβλητου ρητινης ΧΑD-/, 2 <sup>45</sup> επαναληψης
7WCb50U	Ανω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-7, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCc50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-7, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCc50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–7, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCd50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-7, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCd50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–7, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCe50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-7, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCe50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-7, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCf50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-7, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
7WCf50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–7, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
7ECa50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-7, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
7ECb50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-7, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
7ECc50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑΟ-7, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης

7EC450	$(\mathbf{E}_{ij})_{ij} = \mathbf{E}_{ij}$
7ECd50	EXALUOT PITUNIÇ AAD $-7$ , 4 <sup>45</sup> ELAVOXI $  \psi   \leq 10^{-10}$
	Eκπλυση ρητινής AAD-7, 5 <sup>th</sup> επαναληψης
	Εκπλυση ρητινής $AD-7$ , 6 <sup>45</sup> επαναληψής
/ACa50	Aποδεσμεύση ρητινής XAD-7, $1^{1/5}$ επαναληψής
7ACb50	Αποδεσμευση ρητινης ΧΑΟ-7, 2% επαναληψης
7ACc50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑΟ-7, 3% επανάληψης
7ACd50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-7, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
7ACe50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–7, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
7ACf50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–7, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCa50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–18, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCa50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–18, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCb50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-18, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCb50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–18, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCc50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-18, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCc50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–18, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCd50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–18, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCd50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–18, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCe50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–18, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCe50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-18, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCf50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-18, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
18WCf50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-18, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
18ECa50	Έκπλυση οητίνης ΧΑΟ-18. 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
18ECb50	Έκπλυση οητίνης ΧΑD-18. 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
18ECc50	Έκπλυση οητίνης XAD-18, $3^{η_{5}}$ επανάληψης
18ECd50	Εκπλυση οητίνης XAD-18 4η επανάληψης
18ECe50	$E_{\rm K}$ ματιματική μπα το, το οπαταλήψης $E_{\rm K}$ πλυση οπτίνης XAD-18, 5 <sup>ης</sup> επανάλημας
18ECf50	Eκαι το μηριτικής μη D 10, 5 επαναληψης Έκπλυση οπτίνης XAD-18, $6^{10}$ επανάληψης
184Ca50	Δποδέσμευση οπτίνης XAD-18, 1 <sup><math>π</math></sup> επανάληψης
18ACb50	Aποδέσμευση ρητίνης XAD 18, 2 <sup>m</sup> επανάληψης
184Cc50	Aποδέσμευση ρητίνης XAD 18 3 <sup>th</sup> επαιάληψης
18ACd50	Aποδέσμευση ρητίνης AAD 18, $4$ <sup>Th</sup> επαινάληψης
18ACa50	Aποδέσμευση ρητινής $AAD$ 18, 5% επανάληψης
18AC50	Aποδέσμευση ρητινής AAD-18, $5^{10}$ επανάληψης
1180WCc50	Aλιοδεομεύοη ρητινής AAD-18, 0 <sup>13</sup> ελιαναλήψης
1180WCa50	Kατω φαση απορλητου ρητινής $AAD-1180$ , 1 <sup>th</sup> επαναληψής
1180WCa50U	Ave fast a construction on the standard of the standard $\chi$
1180WCb50	Kατω φαση απορλητου ρητινής XAD-1180, $2^{45}$ επαναληψής
1180WCb50U	Ave fast applying $AD-1180$ , $2^{45}$ epartury $(2)$
1180WCc50	Κατω φαση αποβλητου ρητινης ΧΑD-1180, 3% επαναληψης
1180WCc50U	Ανω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-1180, 3% επανάληψης
1180WCd50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-1180, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180WCd50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–1180, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180WCe50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–1180, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180WCe50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–1180, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180WCf50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–1180, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180WCf50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–1180, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ECa50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD–1180, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ECb50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-1180, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ECc50	Έκπλυση ρητίνης XAD–1180, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ECd50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-1180, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ECe50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-1180, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ECf50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-1180, 6ης επανάληψης
1180ACa50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑΟ-1180, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ACb50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑΟ-1180, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ACc50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑΟ-1180. 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ACd50	Αποδέσμευση οητίνης ΧΑD-1180. 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
1180ACe50	Aποδέσμευση οπτίνης XAD-1180, 5% επανάληψης
1180ACf50	Aποδέσμευση οπτίνης XAD-1180, 616 επανάληψης
1600WCa50	Κάτω ωάση αποβλήτου οητίνης XAD-1600 1% επανάλημας
1000110000	

1600WCa50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–1600, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCb50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-1600, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCb50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-1600, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCc50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-1600, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCc50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-1600, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCd50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-1600, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCd50U	$A_{VO}$ φάση αποβλήτου οητίνης XAD-1600, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCe50	Kάτω ωάση αποβλήτου οητίνης XAD-1600 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCe50U	Avo φάση αποβλήτου οπτίνης XAD-1600, $5^{η_{\text{c}}}$ επανάληψης
1600WCf50	Kάτω ωάση αποβλήτου οπτίνης XAD-1600, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
1600WCf50U	Avo φάση αποβλήτου οπτίνης XAD-1600, $6^{\eta_{\varsigma}}$ επανάλυψης
1600FCa50	Fκπλυση απόρκητου βητιτής $III ID$ 1000, $O$ επανακήψης
1600ECb50	$Εκαιου [ μ(t), μ(t), μ(t)] = 1000, 1 επανάληψης Έκπλυση οπτίνης XAD-1600, 2^{η_{5}}επανάληψης$
1600ECc50	$E_{\rm Katool}$ pitting MD 1000, 2 επανάληψης
1600ECd50	Eκαισση ρητιής MD 1000, $3^{-1}$ επανάληψης
1600ECe50	$E_{\rm Kintoon}$ priving XAD-1600, $4^{-1}$ επανάληψης
1600ECc50	$E_{\rm KM}$ (μη μη μ
1600AC 350	$\Delta$ ποδέσμευση οπτίνης XAD-1600, 0 επαναλήψης
1600ACb50	Aποδέσμευση ρητινής AAD 1600, 1 εκαναλήψης
1600ACc50	Aποδέσμευση ρητινής AAD $-1000$ , 2 <sup>w</sup> επανάληψης
1600ACd50	Aποδέσμευση ρητίνης AAD $-1000, 5$ "επανάληψης
1600ACa50	Aποδέσμευση ρητινής AAD-1600, 4 $^{\circ\circ}$ επανάληψης
1600ACE50	Anoosome on printing AAD $-1000, 5^{\circ}$ entrough printing
16NWC 50	Kάτοι τάπα στοθλάτου οπτίψης XAD 16N 10 στομάληψης
	Kata φαση απορλητου ρητινής $AD-10N$ , 1 <sup>15</sup> επαναλήψης
	Aνω φαση απορλητου ρητινής AAD-10N, $\Gamma^{15}$ επαναληψης
	Kατω φαση απορλητου ρητινής $AAD-10N$ , 2 <sup>15</sup> επαναλήψης
	Ave quot anophitou pritivity $AD-10N$ , $2^{15}$ emavaling $M$
	Kατω φαση απορλητου ρητινής AAD-10N, 5 <sup>15</sup> επαναληψης
16NWCC50U	Ave fast anophitou pitting XAD-16N, $3^{15}$ emavaling $(2)$
16NWCd50	Kατω φαση αποβλητου ρητινης XAD-16N, $4^{16}$ επαναληψης
16NWCd50U	Aνω φαση απορλητου ρητινής XAD-16N, $4^{15}$ επαναληψης
16NWCe50	Kατω φαση αποβλητου ρητινης XAD-16N, $5^{16}$ επαναληψης
16NWCe50U	Aνω φαση αποβλητου ρητινης XAD-16N, $5^{16}$ επαναληψης
16NWC150	Kατω φαση αποβλητου ρητινης XAD-16N, $6^{16}$ επαναληψης
16NWC150U	Avω φαση αποβλητου ρητινής XAD-16N, $6^{15}$ επαναληψης
16NECa50	Εκπλυση ρητινής XAD-16N, $1^{15}$ επαναληψης
IGNEC 50	Εκπλυση ρητινής XAD-16N, $2^{H_5}$ επαναληψης
16NECc50	Εκπλυση ρητινής XAD-16N, $3^{15}$ επαναληψης
16NECd50	Εκπλυση ρητινής XAD-16N, 4 <sup>-ις</sup> επαναληψης
16NECe50	Εκπλυση ρητινής XAD-16N, $5^{15}$ επαναληψης
16NECI50	$E \kappa \pi \lambda \nu \sigma \eta$ ρητινης XAD-16N, 6% επαναληψης
16NACa50	Αποδεσμευση ρητινης ΧΑD-16Ν, 1% επαναληψης
16NACb50	Αποδεσμευση ρητινης ΧΑD-16Ν, 2% επαναληψης
16NACc50	Αποδεσμευση ρητινης XAD-16N, 3 <sup>-ις</sup> επαναληψης
16NACd50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-16N, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
16NACe50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16Ν, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
16NACf50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16Ν, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCa50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-16HPN, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCa50U	Ανω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-16HPN, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCb50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-16HPN, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCb50U	Ανω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-16HPN, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCc50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-16HPN, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCc50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–16HPN, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCd50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–16ΗΡΝ, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCd50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–16HPN, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCe50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD-16HPN, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCe50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD–16HPN, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης
16HPNWCf50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–16HPN, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης

16HPNWCf50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης ΧΑD–16HPN, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNECa50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑΟ-16ΗΡΝ, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNECb50	Έκπλυση ρητίνης XAD-16HPN, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNECc50	Έκπλυση ρητίνης XAD-16HPN, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNECd50	Έκπλυση ρητίνης XAD–16HPN, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNECe50	Έκπλυση ρητίνης XAD-16HPN, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNECf50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNACa50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNACb50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNACc50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNACd50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNACe50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης		
16HPNACf50	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-16HPN, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCa50	Κάτω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCa50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCb50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCb50U	Άνω φάση αποβλήτου ρητίνης XAD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCc50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761. 3 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCc50U	Άνω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761. 3 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCd50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCd50U	Άνω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCe50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761. 5 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCe50U	Άνω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCf50	Κάτω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761WCf50U	Άνω φάση αποβλήτου οητίνης XAD-761, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ECa50	Έκπλυση οητίνης ΧΑΟ-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ECb50	Έκπλυση οητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ECc50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑΟ-761, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ECd50	Έκπλυση οητίνης ΧΑΟ-761, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ECe50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑΟ-761, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ECf50	Έκπλυση ρητίνης ΧΑΟ-761, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ACa50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ACb50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ACc50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-761, 3 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ACd50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-761, 4 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ACe50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-761, 5 <sup>ης</sup> επανάληψης		
761ACf50	Αποδέσμευση ρητίνης XAD-761, 6 <sup>ης</sup> επανάληψης		
Πρ	ότα πειράματα βελτιστοποίησης της XAD – 761		
761ACa20	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑΟ-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 20 mLυλικού		
761ACb20	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 20 mL υλικού		
761ACa40	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 40mL υλικού		
761ACb40	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 40mL υλικού		
761ACa60	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 60mL υλικού		
761ACb60	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 60mL υλικού		
761ACa80	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 80mL υλικού		
761ACb80	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 80mL υλικού		
761ACa100	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 100mL υλικού		
761ACb100	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 100mL υλικού		
761ACa120	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD–761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 120mL υλικού		
761ACb120	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 120mL υλικού		
761ACa160	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 160mL υλικού		
761ACb160	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 160mL υλικού		
761ACa240	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 1 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 240mL υλικού		
761ACb240	Αποδέσμευση ρητίνης ΧΑD-761, 2 <sup>ης</sup> επανάληψης, με 240mL υλικού		
Πείραμα βελτιστοποίησης της ΧΑD – 761 με 300mL υλικού			
761WCa240fr1(10)	1° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD-761, με 240mL υλικό		
761WCa240fr2(10)	2° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD-761, με 240mL υλικό		
761WCa240fr3(10)	3° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό		

761WCa240fr4(10)	4° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οητίνης ΧΑD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr5(10)	5° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr6(10)	6° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr7(10)	7° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr8(10)	8° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr9(10)	9° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr10(10)	10° κλάσμα 10L αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr11(10)	11° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικού
761WCa240fr12(10)	12° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr13(10)	13° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr14(10)	14° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr15(10)	15° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr16(10)	16° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οπτίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr17(10)	17° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr18(10)	18° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr19(10)	19° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr20(10)	20° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr21(10)	21° κλάσμα 10mL αποβλήτου της οητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr22(10)	22° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr23(10)	23° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr24(10)	24° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr25(10)	25° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr26(10)	26° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr27(10)	27° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr28(10)	28° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr29(10)	29° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761WCa240fr30(10)	30° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr1(20)	1° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr2(20)	2° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr3(20)	3° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr4(20)	4° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr5(20)	5° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr6(20)	6° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 240mL υλικό
761ACa240fr7(20)	7° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr8(20)	8° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 240mL υλικό
761ACa240fr9(20)	9° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr10(20)	10° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr11(20)	11° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 240mL υλικό
761ACa240fr12(20)	12° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 240mL υλικό
761ACa240fr13(20)	13° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 240mL υλικό
761ACa240fr14(20)	14° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 240mL υλικό
Πείραι	ια βελτιστοποίησης της XAD – 761 με 50ml υλικού
761WCa50fr1(10)	1° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761WCa50fr2(10)	2° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761WCa50fr3(10)	3° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761WCa50fr4(10)	4° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761WCa50fr5(10)	5° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761WCa50fr6(10)	6° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761WCa50fr7(10)	7° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761WCa50fr8(10)	8° κλάσμα 10mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό
761ACa50fr1(20)	1° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr2(20)	2° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr3(20)	3° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr4(20)	4° κλασμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr5(20)	5° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr6(20)	6° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr7(20)	7° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό
761ACa50fr8(20)	8° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό

761ACa50fr9(20)	9° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό		
761ACa50fr10(20)	10° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 50mL υλικό		
761ACa50fr11(20)	11° κλάσμα 20mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD-761, με 50mL υλικό		
	Πείραμα μελέτης procedural Blank ρητινών		
4Ablank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD-4 procedural Blank		
7Ablank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD–7HP procedural Blank		
18Ablank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD–18 procedural Blank		
1180Ablank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD-1180 procedural Blank		
1600Ablank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD–1600 procedural Blank		
16NABlank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD–16N procedural Blank		
16HPNABlank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD-16HPN procedural Blank		
761Ablank	Κλάσμα αποδέσμευσης ρητίνης XAD-761 procedural Blank		
Πείραμ	ια βελτιστοποίησης της XAD – 761 με 600mL υλικό		
761WCa600fr1(100)	Κάτω φάση 1 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr2(100)	Κάτω φάση 2 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr3(100)	Κάτω φάση 3 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr4(100)	Κάτω φάση 4 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr5(100)	Κάτω φάση 5 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr6(100)	Κάτω φάση 6 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL		
761WCa600fr7(50)	Κάτω φάση 7 <sup>ου</sup> κλάσματος 50mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL		
761WCa600fr1(100)U	Άνω φάση 1 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr2(100)U	Άνω φάση 2 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL		
761WCa600fr3(100)U	Άνω φάση 3 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr4(100)U	Άνω φάση 4 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr5(100)U	Άνω φάση 5 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr6(100)U	Άνω φάση 6 <sup>ου</sup> κλάσματος 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761WCa600fr7(50)U	Άνω φάση 7 <sup>ου</sup> κλάσματος 50mL αποβλήτου της ρητίνης XAD-761, με 600mL υλικό		
761ECa600fr1(100)	Κλάσμα έκπλυσης 100mL αποβλήτου της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
761ACa600fr1(100)	1° κλάσμα 100mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
761ACa600fr2(100)	2° κλάσμα 100mL αποδέσμευσης της ρητίνης XAD–761, με 600mL υλικό		
Πείρ	αμα βελτιστοποίησης της ΧΑD – 761 με 1L υλικό		
761WCn1fr1(200)	1° κλάσμα 200mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD–761, με 1L υλικό		
761WCn1fr2(200)	2° κλάσμα 200mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD–761, με 1L υλικό		
761WCn1fr3(200)	3° κλάσμα 200mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD-761, με 1L υλικό		
761WCn1fr4(200)	4° κλάσμα 200mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD–761, με 1L υλικό		
761WCn1fr5(200)	5° κλάσμα 200mL αποβλήτου της ρητίνης ΧΑD–761, με 1L υλικό		
761ECn1fr1(100)	1° κλάσμα 100mL έκπλυσης της ρητίνης XAD-761, με 1L υλικό		
761ECn1fr1(100)	2° κλάσμα 100mL έκπλυσης της ρητίνης XAD-761, με 1L υλικό		
761ECn1fr1(100)	3° κλάσμα 100mL έκπλυσης της ρητίνης XAD-761, με 1L υλικό		
761ECn1fr1(100)	4° κλάσμα 100mL έκπλυσης της ρητίνης XAD-761, με 1L υλικό		
761ECn1fr1(100)	5° κλάσμα 100mL έκπλυσης της ρητίνης XAD-761, με 1L υλικό		
/61ACn1fr1(100)	$1^{\circ}$ κλασμα 100mL αποδεσμευσης της ρητίνης XAD-/61, με 1L υλικό		
701ACn1fr1(100)	$2^{\circ}$ κλασμα 100mL αποδεσμευσης της ρητινης XAD-/61, με 1L υλικό		
/01ACn11r1(100)	3 κλασμα 100mL αποσεσμευσης της ρητινής ΧΑD-/61, με 1L υλικο		

## 4.1. Μέτρηση Ξηρού βάρους μακρόπορων πολυμερικών ρητινών Amberlite XAD

Για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους της κάθε ρητίνης, από κάθε ρητίνη λήφθηκαν τρία δείγματα των 20 mL (η κάθε μέτρηση έγινε εις τριπλούν), τα οποία τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο φούρνο μέχρι πλήρους αφυδάτωσης της ρητίνης. Έπειτα έγινε ζύγιση του ξηρού βάρους αυτών όπως φαίνεται παρακάτω.

Ρητίνη	Ξηρό βάρος των 20 mL ρητίνης (g)
XAD-4	5.9731
XAD - 7 HP	4.5456
XAD-18	4.9407
XAD-1180	3.7641
XAD-1600N	2.8390
XAD-16N	4.1105
XAD-16HPN	4.3316
XAD-761	4.7155

Πίν. 8: Ξηρά βάρη ρητινών ΧΑΟ - 4 /7ΗΡ/ 18/1180/1600Ν/ 16/ 16ΗΡΝ και 761.

<u>Αποτελέσματα</u>: Μία κατάταξη ως προς το βάρος μπορεί να είναι η εξής: XAD-4 >18 >761 >7HP >16HPN>16N>1180 >1600N.

## 4.2. Μέτρηση μάζας ολικού οργανικού φορτιού (Ο.Ο.Φ) αρχικού δείγματος αποβλήτου.

Για την μέτρηση της μάζας του Ο.Ο.Φ ακολουθήσαμε δύο μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο ογκομετρήσαμε 50.0 mL αρχικού υλικού, το οποίο διηθήθηκε, λυοφιλοποιήθηκε και στην συνέχεια εκπλύθηκε με οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη. Η δεύτερη μέθοδος περιλάμβανε διαδοχική υγρή-υγρή εκχύλιση του αρχικού υλικού με οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη.

#### 4.2.1. Λυοφιλοποποίηση & Έκπλυση υλικού αποβλήτου εκπίκρανσης THR

Για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους του αποβλήτου, 50.0 mL αρχικού υλικού, φιλτραρίστηκαν από πορώδες Por.3, αραιώθηκαν με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O (1:3) και στην συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν. Το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε εκχυλίστηκε με διάλυμα EtOAc/<u>MeOH</u> 80/20 για την παραλαβή του οργανικού φορτίου απαλλαγμένου από αλάτι.

Δείγμα	ξ.β. μετά τη λυοφιλοποίηση (g)	Μ.Ο. μετά τη λυοφ. (g)	ξ.β. μετά από την έκπλυση με EtOAc/MeOH 20% (g)	Μ.Ο. ξ.β. μετά από την έκπλυση με EtOAc/MeOH 20% (mg)
Crudea	16.057	16.06	0.421	430.6
Crudeb	16.063	10100	0.441	

Πίν. 9: Ξηρό βάρος αρχικού δείγματος αποβλήτου (50.0 mL)

**Αποτελέσματα:** Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) του ξηρού βάρους υπολογίστηκε στα 16.06g και 0.4306g για το στερεό υπόλειμμα και το τελικό οργανικό φορτίο, αντίστοιχα.

#### 4.2.2. Υγρή- υγρή εκχύλιση υλικού αποβλήτου εκπίκρανσης THR

Έγινε επεξεργασία με υγρή-υγρή εκχύλιση του υλικού αποβλήτου εκπίκρανσης της ξηράλατης θρούμπας Θάσου, με σκοπό να μετρηθεί το οργανικό φορτίο που ανακτάται με τη μέθοδο αυτή. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε είναι η εξής: 200mL νέου υλικού αποβλήτου THR, εκχυλίστηκαν διαδοχικά, 10 φορές, με 100mL EtOAc κάθε φορά (συνολικά 1L EtOAc) και στη συνέχεια έγινε εκχύλιση, 3 φορές, με 100mL Βουτανόλης (συνολικά 300mL). Η διαδικασία έγινε εις τριπλούν. Συλλέχθηκαν για την κάθε επανάληψη το οργανικό φορτίο που πέρασε σε 1L EtOAc και σε 300mL Βουτανόλης. Τα κλάσματα αφού συμπυκνώθηκαν, υποβλήθηκαν σε «πλύσιμο» με διάλυμα EtOAc/MeOH 80/20. Τελικά προέκυψαν δύο κλάσματα, ένα του EtOAc και ένα της Βουτανόλης. Στη συνέχεια και αφού συμπυκνώθηκαν τα κλάσματα αυτά και ζυγίστηκαν αποφασίσαμε να τα υποβάλλουμε σε 2<sup>η</sup> έκπλυση με διάλυμα EtOAc/MeOH 80/20 και στην συνέχεια και σε φυγοκέντρηση, για να απομακρύνουμε όσο το δυνατόν πιο ποσοτικά το NaCl. Μετά την φυγοκέντρηση προέκυψαν δύο φάσεις και λήφθηκε η άνω οργανική φάση της οποίας και η μάζα μετρήθηκε μετά την συμπύκνωσή της. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 9.

Πίν. 10: Αποτελέσματα ξ.β. κλασμάτων που προέκυψαν από την υγρή-υγρή εκχύλιση του νέου υλικού αποβλήτου

Κλάσμα	Ξ.β. (mg) μετά από εκχύλιση με EtOAc/MeOH 20%	Ξ.β. (mg) μετά από επανεκχύλιση με ΕtOAc/MeOH 20% και φυγοκέντρηση	Μέσος όρος (mg)
EtOAc 1	211.4	206.5	
EtOAc 2	213.4	215.9	211.3
EtOAc 3	211.4	211.6	
Butanol 1	103.3	85.7	
Butanol 2	110.6	83.8	83.2
Butanol 3	102.6	80.0	

**Αποτελέσματα:** Από τα προαναφερόμενα βάρη, προκύπτει πως το κλάσμα του EtOAc δεν περιείχε αλάτι μετά την πρώτη έκπλυση, καθώς και μετά από τη δεύτερη εκχύλιση με EtOAc/ MeOH 80/20 και φυγοκέντρηση, η μάζα του παραμένει σχεδόν σταθερή. Αντίθετα, το κλάσμα της Βουτανόλης μετά την πρώτη εκχύλιση φαίνεται πως περιείχε αλάτι, το οποίο απομακρύνθηκε μετά από τη δεύτερη εκχύλιση και τη φυγοκέντρηση. Το οργανικό φορτίο που ανακτήθηκε από τον απόβλητο THR με τη τεχνική της διαδοχικής υγρής-υγρής εκχύλισης κατά μέσο όρο, υπολογίστηκε σε 211,3mg/200mL για το κλάσμα του EtOAc και 83,2mg/200mL για το κλάσμα της Boυτανόλης. Συνολικά με την μέθοδο της υγρής-υγρής εκχύλισης (AcOEt και BuOH) ανακτήθηκαν 294,5mg οργανικού φορτίου από 200mL υλικού αρχικού αποβλήτου εκπίκρανσης.

THR.

# 4.2.3. Σύγκριση ανάκτησης οργανικού φορτίου, από την επεξεργασία του THR με υγρή-υγρή εκχύλιση και λυοφιλοποίηση

Μέθοδος	Μέθοδος mL υλικού που		ma/50ml where we	
επεξεργασίας	επεξεργάστηκαν	Avaktijoij os ing		
Lyophilizer	50	430.6	430.6	
L-L(new)	200	(211.3)+(83.2)	73.6	

<u>Αποτελέσματα:</u> Η μάζα του οργανικού φορτίου που ανακτάται ύστερα από λυοφιλοποίηση του υλικού και εκχύλιση του με EtOAc/ MeOH 80/20, υπολογίστηκε στα 430.6mg/50.0mL υλικού. Ενώ, η μάζα του οργανικού φορτίου που ανακτήθηκε ύστερα από υγρή-υγρή εκχύλιση του υλικού με EtOAc και Boutavóλη, υπολογίστηκε στα 73.6mg/ 50mL. Φαίνεται λοιπόν, πως με την υγρή-υγρή εκχύλιση ανακτάται πολύ μικρότερο οργανικό φορτίο από ότι με τη τεχνική της λυοφιλοποίησης/έκπλυσης, καθώς με την υγρή-υγρή εκχύλιση πολύ πιθανόν είναι να μη παραλαμβάνονται πολλά σάκχαρα και άλλα πολικά συστατικά του υλικού. Βέβαια, η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι του αρχικού υλικού, δημιουργεί τον προβληματισμό για το αν στα 430.6mg οργανικού φορτίου που ανακτήθηκαν ύστερα από λυοφιλοποίηση, έχει περάσει ποσότητα αλατιού και αν ναι πόσο από αυτό. Σε κάθε περίπτωση, το οργανικό φορτίο που ανακτάται είναι σημαντικά μεγαλύτερο μετά από λυοφιλοποίηση.

	AMBERLITE <sup>TM</sup>	AMBERLITE™	<b>AMBERLITE<sup>TM</sup></b>	AMBERLITE TM	AMBERLITETM	AMBERLITETM	AMBERLITE <sup>TM</sup>	AMBERLITETM
Ρητίνη	XAD <sup>TM</sup> 4	XAD7HP	XAD <sup>TM</sup> 16N	ХА <b>Д™16НР</b> N	XAD <sup>TM</sup> 18	XAD <sup>TM</sup> 1180N	XAD™1600N	XAD™ 761
Δομή	Μακροπορώδες διασταυρούμενο αρωματικό πολυμερές (πολυστυρενίου – διβινυλβενζολίου )	Μακροπορώδες αλειφατικό διασταυρούμενο πολυμερές (πολυπροπυλενίου- ακρυλικού εστέρα)	Μακροπορώδες αρωματικό διασταυρούμενο πολυμερές (πολυστυρενίου – διβινυλβενζολίου )	Μακροπορώδες αρωματικό διασταυρούμενο πολυμερές (πολυστυρενίου – διβινυλβενζολίου)	Μακροπορώδες αρωματικό διασταυρούμενο πολυμερές (πολυστυρενίου – διβινυλβενζολίου )	Μακροπορώδες αρωματικό διασταυρούμενο πολυμερές (πολυστυρενίου – διβινυλβενζολίου )	Μακροπορώδες αρωματικό διασταυρούμενο πολυμερές (πολυστυρενίου – διβινυλβενζενίου)	Μακροπορώδες διασταυρούμενο αρωματικό πολυμερές φαίνυλο- φορμαλδεϋδικής δομής (ενεργές ομάδες μεθυλόλης)
Βάρος	679g/L	655g/L	720g/L	675g/L	περίπου 690 g/L	690 g/L	660 g/L	615 g/L
Ειδικό βάρος	1.01 - 1.03	1.06 - 1.08	1.015 - 1.025	1.015 - 1.025		1.015 - 1.025	1.015 - 1.025	1,070 - 1,130
Μέσο μέγεθος	0.49 – 0.69mm	0.56 - 0.71mm	0.56 - 0.71mm	0.600 - 0.750mm	0,425 ± 0,050mm	0.350 - 0.600 mm	0,400 ± 0,50 mm	0,560 - 0,760 mm
Εμβαδό προσροφητικής επιφάνειας	$\geq 750 m^2/g$	$\geq$ 380m <sup>2</sup> /g	$\geq 800 m^2/g$	$\geq 800 m^2/g$	≥ 800m²/g	≥ 450 m²/g	≥ 700 m²/g	150 - 250 m^2/g
Πορώδες	≥ 0.50ml/ml	≥ 0.50mL/mL	$\geq 0.55 \text{mL/mL}$	$\geq 0.6 \text{mL/mL}$		≥ 1.4 mL/mL	≥ 1.4 mL/mL	0,95 - 1,18 mL/mL
Μέση διάμετρος πόρου	100A°	300-400A°	200A°	200A°	150A°	300-400A°	200A°	600 A°
Εύρος pH	0 - 14	0 – 14	0 - 14	0 - 14	1 – 14	1 - 14	1 - 14	> 8
Μέγιστο όριο θερμοκρασίας	150°C	80 to 100°C	150°C	150°C	4 - 150°C	150°C	150°C	Μέγιστη→ 80°C (ουδέτερο ή όξινο μη οξειδωμένο μέσο)/ μέγιστο→40°C (ισχυρό αλκαλικό μέσο με ή απουσία οξειδωτικών)

## 4.3. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ρητινών Amberlite XAD<sup>™</sup> που χρησιμοποιήθηκαν

# 4.4. Δοκιμασία οκτώ τύπων ρητινών Amberlite XAD<sup>®</sup> για την επεξεργασία του υδατικού αποβλήτου Θρούμπας Θάσου (THR)

Μετά την εφαρμογή της έκλουσης με την τεχνική της στήλης που περιγράφεται στην παράγραφο Υλικά/Μέθοδοι, καταγράψαμε τις μάζες των κλασμάτων «Αποβλήτου», «Έκπλυσης» και 'Αποδέσμευσης' αφού πρώτα τα κλάσματα αυτά ξηράνθηκαν. Η ξήρανση έγινε για τα μεν κλάσματα 'Αποβλήτου' που ήταν υπέρκορα σε NaCl με λυοφιλοποίηση μετά από αραίωση με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O 1:3, ενώ τα κλάσματα της «Έκπλυσης» συμπυκνώθηκαν αρχικά μέχρι ξηρού με περιστροφική εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση (Rotavapor, Buchi) και στην συνέχεια εκπλύθηκαν με EtOAc/MeOH 20% με την βοήθεια υπερήχων. Οι εκπλύσεις που προέκυψαν συμπυκνώθηκαν με φυγοκεντρική εξάτμιση υπό κενό και θέρμανση (Speedvac, Genevac). Τα κλάσματα της 'Αποδέσμευσης' συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού με περιστροφική εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, αφού διαπιστώθηκε ότι δεν περιείχαν NaCl.

Για να παραλάβουμε το οργανικό φορτίο απαλλαγμένα από NaCl, υποβάλλαμε ειδικά τα ξηρά κλάσματα 'Αποβλήτου' και Έκπλυσης' σε έκπλυση με διάλυμα EtOAc/MeOH 20% με την βοήθεια υπερήχων, ώστε να ληφθεί το οργανικό φορτίο χωρίς NaCl, η παρουσία του οποίου καθιστά περίπλοκη την περαιτέρω επεξεργασία του υλικού και λιγότερο αξιόπιστες τις μετρήσεις των μαζών των δειγμάτων.

Ενώ για τα κλάσματα της «Εκπλυσης» η πρώτη έκπλυση με EtOAc/<u>MeOH</u> 80/20, ήταν αρκετή για την απομάκρυνση του NaCl, οι τιμές των ξηρών μαζών των κλασμάτων

'Αποβλήτου' δείχνουν ότι η απομάκρυνση του NaCl δεν ήταν επαρκής. Για αυτό, αποφασίστηκε να επαναληφθεί η έκπλυση του οργανικού μέρους των κλασμάτων 'Αποβλήτου' με νέο διάλυμα 80/20 EtOAc/MeOH και στην συνέγεια να εφαρμοστεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min, με σκοπό την καθίζηση του NaCl (φωσφορικών και θειϊκών αλάτων Ca, Mg, Na, K. θραυσμάτων σακχάρων/ολιγοσακχαριτών και πρωτεϊνών). Από τη φυγοκέντρηση προέκυψαν δύο φάσεις, η άνω οργανική και η κάτω υδατική φάση



Εικόνα 52: Φάσεις που προκύπτουν μετά από φυγοκέντρηση του εκχυλισμένου κλάσματος «Αποβλήτου» με ΕιΟΑc/MeOH 20%

καθώς επίσης παρατηρήθηκε και ο σχηματισμός ιζήματος NaCl στο πυθμένα του περιέκτη falcon, όπως φαίνεται και στην **Εικ. 52.** Η άνω οργανική φάση είναι αυτή που φέρει το οργανικό φορτίο απαλλαγμένο από τη μεγαλύτερη ποσότητα NaCl και αποτελεί τη φάση που μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο ώστε να υπολογιστεί η τελική μάζα των κλασμάτων «Αποβλήτου». Τα αποτελέσματα όλων των τελικών μαζών των κλασμάτων παρατίθενται στον **Πίν. 20**.

Συνολικά οι τελικές μάζες όλων των κλασμάτων από όλες τις ρητίνες παρατίθενται στα ακόλουθα τμήματα:

Χαρακτηρίσαμε το % ποσοστό του δεσμευμένου οργανικού φορτίου στις ρητίνες (κλάσμα «Αποδέσμευσης») ως προς την συνολική μάζα του αρχικού αποβλήτου εκπίκρανσης της ξηράλατης θρούμπας Θάσου ως «% Απόδοση Ανάκτησης 1» που υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω σχέση:

# $\frac{\mu \acute{\alpha} \zeta \alpha \, "Aποδέσμευσης" \, (mg)}{\mu \acute{\alpha} \zeta \alpha \, \alpha \rho \chi ικού \, υ \lambda ικού μετά από λυοφιλοποίηση \, (mg)} * 100$

Καθώς και ώς προς τη μάζα του οργανικού φορτίου που λήφθηκε μετά από εκχύλιση του λυοφιλοποιημένου αρχικού αποβλήτου εκπίκρανσης της ξηράλατης θρούμπας Θάσου ως «% Απόδοση Ανάκτησης 2» που υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω σχέση:

μάζα "Αποδέσμευσης" (mg) μάζα Ο. Φ. αρχικού υλικού μετά απ λυοφιλοποίηση (mg) \* 100

#### 4.4.1. Amberlite XAD – 4

Κατά την περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD-4, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου συλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 90 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 60 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίν. 11.

Πίν. 11: Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-4

	Κλάσματα «Αποβλήτου»									
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	ξ.β. μετά από 1η έκπλυση (mg)	M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.β2η έκπλυση & φυγοκέντρηση (mg)		M.O. (mg)			
4WCa50	15.6191	92.9		4WCa50U	24	.2				
4WCb50	15.7139	81.5		4WCb50U	35	5.6				
4WCc50	15.8635	84.9	86.4	4WCc50U	34.6		<b>24.8</b> <sub>2</sub>			
4WCd50	16.3676	154.2		4WCd50U	14	.0				
4WCe50	16.6179	229.1	4WCe50U		15.7					
Κλάσματα «Έκπλυσης»										
Δείγμα	ξ.β. μετά από λ	από λυοφιλοποίηση (g)		δ. μετά από έκπί (mg)	λυση	M.O. (	(mg)			
4ECa50	0.	1235		3.6						
4ECb50	0.	1485	4.0							
4ECc50	0.	1355	2.9		3.37		7			
4ECd50	0.0	0684		3.0						
4ECe50	0.	1540		-2.6*						
		Κλάσματα «Α	ποδέσμε	;υσης»						
Δείγμα	ξ.β. μετά από	περιστροφική εξάτ	μιση υπά	кеvó (mg)	Ν	I.O. (mg)				
4ACa50		173.7								
4ACb50		148.4								
4ACc50		155.3			155.	1 (+/- 6.7%	<b>(</b> 0)			
4ACd50		161.2								
4ACe50		155.5								

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τις 5 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD-4, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε στα **155.1mg/ 50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.2. Amberlite XAD – 7HP

Κατά τη περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD – 7 HP, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 60 - 90 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 65 - 95 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 65.

		Κλάσματα	«Αποβλή	του»						
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	ξ.β. μετά από 1η έκπλυση (mg)	M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.β2η έι & φυγοκέ (mg	κπλυση ντρηση )	M.O. (mg)			
7WCa50	16.0663	121.1		7WCa50U	41.9	)		1		
7WCb50	15.,464	78.5		7WCb50U	35.0	)				
7WCc50	15.4463	85.8	02 <b>2</b>	7WCc50U	44.3	;	20.0			
7WCd50	16.1626	57.6	03.2	7WCd50U	57.8	;	38.0			
7WCe50	16.0448	85.2		7WCe50U	27.1					
7WCf50	16.0133	127.2		7WCf50U	21.9	)				
		Κλάσματα	α «Έκπλυσ	σης»						
Δείγμα	ξ.β. μετά από λ	νοφιλοποίηση (g)	ξ.β.	μετά από έκπλυ	ση (mg)	М.О	). (mg)			
7ECa50	0	.0893		9.5						
7ECb50	0.	.1754		8.8						
7ECc50	0	.1812		8.3			00			
7ECd50	0.	.0898		10.2			.90			
7ECe50	0	.1049		10.5						
7ECf50	0	.1063		12.1						
		Κλάσματα «	Αποδέσμε	ευσης»						
Δείγμα	ξ.β. μετά από	ό περιστροφική εξάτ	μιση υπό	к <b>ε</b> νό (mg)	Μ	.O. (mg	)			
7ACa50		88.5								
7ACb50		89.5								
7ACc50		83.8			87	0 (3 /0/				
7ACd50		90.0			0/	.0 (3.470	<i>י</i> י			
7ACe50		83.0								
7ACf50		87.3								

Πίν. 12. Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-7HP

**Αποτελέσματα:** Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD-7HP, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **87.0mg/ 50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.3. Amberlite XAD – 18N

	<u>0.70</u>	οθεομευσης για τη ρ		CHILC AAD-10IN				
		Κλάσματα	«Αποβλή	του»				
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	ξ.β. μετά από 1η έκπλυση (mg)	M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.β2η έ & φυγοκά (mg	κπλυση έντρηση g)	M.O. (mg)	
18WCa50	15.5856	48.9		18WCa50U	39.1	3		
18WCb50	15.6948	95.7		18WCb50U	25.	0		
18WCc50	15.9786	235.1	217 5	18WCc50U	10.	1	01.5	
18WCd50	15.7204	240	217.5	18WCd50U	17.1		21.70	
18WCe50	15.6706	138.2		18WCe50U	25.:	5		
18WCf50	15.8933	177.3		18WCf50U	13.4	4		
		Κλάσματα	ι «Έκπλυσ	σης»				
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυ	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g) ξ.β. μετά από έκ			ση (mg)	М.О.	( <b>mg</b> )	
18ECa50	0.0	492		1.7				
18ECb50	0.0	617		5.9			2 90	
18ECc50	0.0	794		4.1				
18ECd50	0.0	)53		3.4			<i>J</i> 0	
18ECe50	0.0	531		2.4				
18ECf50	0.0	686		2.8				
		Κλάσματα «	Αποδέσμε	ευσης»				
Δείγμα	ξ.β. μετά από α	περιστροφική εξό	τμιση υπ	ό κενό (mg)	Μ	[. <b>O. (mg</b> )		
18ACa50		181.3*						
18ACb50		216.3						
18ACc50		209.1			200 7	7 (1/2 7 7	%)	
18ACd50		209.3			207.1	(17- 2.2	/0/	
18ACe50		210.3						
18ACf50		203.4						

Πίν. 13: Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-18N

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

**Αποτελέσματα:** Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD – 18N, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **209.7mg**/ **50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.4. Amberlite XAD – 1180

Κατά τη περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD – 1180, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 90 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 80 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίν. 14.

	0.770		1000111110					
		Κλάσματα	ι «Αποβλή	του»				
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	ξ.β. μετά από 1η έκπλυση (mg)	M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.β2η έκπλυση & φυγοκέντρησ η (mg)		M.O. (mg)	
1180WCa50	15.8657	101.9		1180WCa50U		25		
1180WCb50	16.0679	177.5		1180WCb50U	1	3.6		
1180WCc50	16.0476	148.4	141.6	1180WCc50U	2	3.6	20.7.	
1180WCd50	16.659	85.7	141.0	1180WCd50U	4	1.5*	20.74	
1180WCe50	15.7766	131.7		1180WCe50U	2	1.5		
1180WCf50	16.1902	144.6		1180WCf50U	2	0.0		
		Κλάσματο	α «Έκπλυσ	σης»				
Δείγμα	ξ.β. μετ λυοφιλοπο	ά από ίηση (g)	ξ.β. με	τά από έκπλυση (mg	;)	М.О.	(mg)	
1180ECa50	0.05	83		9.4				
1180ECb50	0.06	13	8.6					
1180ECc50	0.08	74	9.7			9.70		
1180ECd50	0.07	06	10.2			9.	/0	
1180ECe50	0.06	55		7.5				
1180ECf50	0.07	05		10.7				
		Κλάσματα «	Αποδέσμε	ευσης»				
Δείγμα	ξ.β. μετά αι	τό περιστροφική	εξάτμιση	υπό κενό (mg)		M.O. (m	lg)	
1180ACa50		150.	5					
1180ACb50		158.	8					
1180ACc50		158.	4		15	71(+1)	8%)	
1180ACd50		159.	4		15	/ • <b>•</b> ( +/ • 2	.0 /0)	
1180ACe50		153.	9					
1180ACf50		163.	3					

Πίν. 14: Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-1180

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

**Αποτελέσματα:** Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD – 1180, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **157.4mg**/ **50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.5. Amberlite XAD – 1600

Κατά τη περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD – 1600, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 65-70 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 65 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίν. 15.

		Κλάσματα	ι «Αποβλή	του»					
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	ξ.β. μετά από 1η έκπλυση (mg)	M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.β2η δ φυγοκέ (m	έκπλυση & ντρηση (g)	M.O. (mg)		
1600WCa50	16.2151	197.1		1600WCa50U	8.9	90			
1600WCb50	14.809	186.4		1600WCb50U	13	.6			
1600WCc50	16.2553	264	102.1	1600WCc50U	9.2	20	11.2.		
1600WCd50	15.6435	199.9	192.1	1600WCd50U	14	.7	11.44		
1600WCe50	17.000	284.4		1600WCe50U	9.8	30			
1600WCf50	14.669	185 1600WCf50U 23		28.	2*				
	Κλάσματα «Εκπλυσης»								
Δείγμα	ξ.β. μετ λυοφιλοπο	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g) ξ.β. μετά από έκπλυση (			mg)	M.O.	(mg)		
1600ECa50	0.08	74		32.8*					
1600ECb50	0.07	45		2.2					
1600ECc50	0.05	64		1.1		1			
1600ECd50	0.06	91	1.6		1.		04		
1600ECe50	0.0	8		1.7					
1600ECf50	0.07	44		1.5					
		Κλάσματα «	<Αποδέσμε	ευσης»					
Δείγμα	ξ.β. μετά από	ό περιστροφική ε	ξάτμιση ι	πό κενό (mg)	N	<b>4.0. (mg</b>	)		
1600ACa50		171.8*	:						
1600ACb50		184.3							
1600ACc50		180.6			187	2(1/11	(0/_)		
1600ACd50		184.6							
1600ACe50		179.8							
1600ACf50		181.8							

Πίν. 15: Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-1600

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

**Αποτελέσματα:** Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD – 1600, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **182.2mg**/ **50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.6. Amberlite XAD – 16N

Κατά τη περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD – 16N, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 65 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 65 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίν. 16**.

		Κλάσματα	«Αποβλή	του»				
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	μετά από ουλοποίηση (g) ξ.β. μετά από 1η έκπλυση (mg) (mg) (mg)		Δείγμα	ξ.β2η έκπλυση & φυγοκέντρηση (mg)		M.O. (mg)	
16NWCa50	16.742	102.1		16NWCa50U	25	.8		
16NWCb50	17.685	41.9		16NWCb50U	29	.1		
16NWCc50	16.2068	104.6	109 7	16NWCc50U	46	.5	25.2-	
16NWCd50	16.3075	109.6	100.7	16NWCd50U	23	.9	23.35	
16NWCe50	15.8075	160.7		16NWCe50U	16	.8		
16NWCf50	15.1497	118.4		16NWCf50U	10	.0		
	Κλάσματα «Εκπλυσης»							
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)		ξ.β. με	τά από έκπλυση (	mg)	M.O.	(mg)	
16NECa50	0.08	23		5.1				
16NECb50	0.10	72	8.6					
16NECc50	0.11	32		9.0	8.80			
16NECd50	0.11	91		12.5		0.	00	
16NECe50	0.10	66		35.1				
16NECf50	0.43	23		26.5				
		Κλάσματα «	Αποδέσμε	ευσης»				
Δείγμα	ξ.β. μετά από	ό περιστροφική ε	ξάτμιση ι	πό κενό (mg)	N	4.O. (mg	)	
16NACa50		208.9						
16NACb50		203.0						
16NACc50		190.0*			205	6(1)1	65)	
16NACd50		209.6			205		03)	
16NACe50		204.3						
16NACf50		202.3						

Πίν. 16: Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-16N

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

**Αποτελέσματα:** Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD – 16N, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **205.6mg**/ **50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.7. Amberlite XAD – 16HPN

Κατά τη περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD – 16HPN, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 60 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 60 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίν. 17.

		Κλάσματα	«Αποβλήι				
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίηση (g)	΄ ξ.β. μετά α 1η έκπλυσ (mg)	πό η M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.  έκπ φυγο η	β2η λυση & κέντρησ (mg)	M.O. (mg)
16HPNWCa50	15.4836	60.4		16HPNWCa50U	4	43.5	
16HPNWCb50	13.9926	_**		16HPNWCb50U		_**	
16HPNWCc50	16.0106	40.2	=1.6	16HPNWCc50U	4	47.4	25.2
16HPNWCd50	15.6789	76.4	/1.0	16HPNWCd50U		37	35.24
16HPNWCe50	15.5754	78.1		16HPNWCe50U		31	
16HPNWCf50	15.4887	147.3		16HPNWCf50U		17.3	
Κλάσματα «Εκπλυσης»							
Δείγμα	ξ.β. μετά α λυοφιλοποίησ	ετά από ποίηση (g) ξ.β. μετά από έκπλυση (n			g)	M.O.	(mg)
16HPNECa50	0.2316			7.5			
16HPNECb50	0.1175			2.7			
16HPNECc50	0.0928			6.4		67	70
16HPNECd50	0.3446			11.0	0.70		
16HPNECe50	0.1316			4.1			
16HPNECf50	0.2488			4.6			
	I	Κλάσματα «	Αποδέσμε	υσης»			
Δείγμα	ξ.β. μετά από περιστροφική εξάτμιση υπό κενό (mg) M.O. (m				M.O. (m	g)	
16HPNACa50		187	7.6				
16HPNACb50		170	5.8				
16HPNACc50		194	4.4		10	87(1) 5	20/)
16HPNACd50		176.6 188.7 (+/- 5.3%					J70)
16HPNACe50		199	9.7				
16HPNACf50		197	7.3				

Πίν. 17: Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-16HPN

\*\*απώλεια δείγματος – δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD – 16HPN, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **188.7mg**/ **50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

#### 4.4.8. Amberlite XAD – 761

Κατά τη περάτωση του πειράματος για τη ρητίνη XAD – 761, η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 70 min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 60 min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίν. 18**.

	00000			<u> </u>				_	
		Κλάσματα	«Αποβλήτ	του»					
Δείγμα	ξ.β. μετά από λυοφιλοποίη ση (g)	ξ.β. μετά από 11 έκπλυση (mg)	M.O. (mg)	Δείγμα	ξ.β. έκπλ φυγοκ η (	2η υση & εέντρησ mg)	M.O. (mg)		
761WCa50	15.7395	97.8		761WCa50U	20	5.3		1	
761WCb50	15.792	80.4		761WCb50U	62	2.4			
761WCc50	16.0179	86.2	90.6	761WCc50U	3	1.1	20.7		
761WCd50	15.6344	86.8	89.0	761WCd50U	4	5.9	39.17		
761WCe50	15.879	66	66 761WCe50U		44	4.5			
761WCf50	15.9555	97		761WCf50U	28	3.4			
Κλάσματα «Έκπλυσης»									
Δείγμα	ξ.β. με λυοφιλοπ	ετά από εοίηση (g)	) ξ.β. μετά από έκπλυση (m			M.O.	(mg)		
761ECa50	0.1	578		4.8					
761ECb50	0.1	053		4.0					
761ECc50	0.2	291		3.6		2	02		
761ECd50	0.1	063		3.3		5.	92		
761ECe50	0.0	999		_**					
761ECf50	0.1	322		8.4*					
		Κλάσματα «	Αποδέσμε	υσης»					
Δείγμα	ξ.β. μετά ο	ξ.β. μετά από περιστροφική εξάτμιση υπό κενό (mg)				M.O. (m	ıg)		
761ACa50		110	.6*						
761ACb50		78	.6						
761ACc50		76	.0		75	3 (1/- 3	7%)		
761ACd50		71	.7		75.5 (+/- 3.7%)				
761ACe50		77	.2						
761ACf50		73	.3						

**Πίν. 18:** Αποτελέσματα ξηρού βάρους των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από τις διαδικασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης για τη ρητίνη Amberlite XAD-761

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

\*\*απώλεια δείγματος – δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τις 6 επαναληπτικές στήλες για την ρητίνη Amberlite XAD – 761, ο μέσος όρος ξηρού βάρους της 'Αποδέσμευσης' υπολογίστηκε **75.3mg/ 50.0mL** υλικού αποβλήτου THR.

	νεα εκχυλιση με σιαλ	opu ElOAC	/ WIEOIT 2070 Kut ψυγ	<u>Kevtpijoij</u>		
	č β μετά από την			ξ.β. μετά από την		
Κλάσμα	1 <sup>η</sup> εκνύλιση	M.O.	Κλάσμα	2 <sup>η</sup> εκχύλιση &	M.O.	
i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	(mg)	(mg)	11. The provide state of the st	φυγοκέντρηση (U)	(mg)	
	(1115)			(mg)		
4WCa50	92.9		4WCa50U	24.2		
4WCb50	81.5		4WCb50U	35.6		
4WCc50	84.9	86.4	4WCc50U	34.6	$24.8_2$	
4WCd50	154.2		4WCd50U	14.0		
4WCe50	229.1		4WCe50U	15.7		
7WCa50	121.1		7WCa50U	41.9		
7WCb50	78.5		7WCb50U	35.0		
7WCc50	85.8	83.2	7WCc50U	44.3	38.0	
7WCd50	57.6	05.2	7WCd50U	57.8	50.0	
7WCe50	85.2		7WCe50U	27.1		
7WCf50	127.2		7WCf50U	21.9		
18WCa50	48.9		18WCa50U	39.3		
18WCb50	95.7		18WCb50U	25.0		
18WCc50	235.1	0175	18WCc50U	10.1	01.7	
18WCd50	240	217.5	18WCd50U	17.1	21.70	
18WCe50	138.2		18WCe50U	25.5		
18WCf50	177.3		18WCf50U	13.4		
1180WCa50	101.9		1180WCa50U	25		
1180WCb50	177.5		1180WCb50U	13.6		
1180WCc50	148.4		1180WCc50U	23.6		
1180WCd50	85.7	141.6	1180WCd50U	41.5*	20.74	
1180WCe50	131.7		1180WCe50U	21.5		
1180WCf50	144.6		1180WCf50U	20.0		
1600WCa50	197.1		1600WCa50U	8.90		
1600WCb50	197.1		1600WCb50U	13.6		
1600WCc50	264		1600WCc50U	9.20		
1600WCd50	199.9	192.1	1600WCd50U	14.7	$11.2_{4}$	
1600WCe50	284.4		1600WCe50U	9.80		
1600WCf50	185		1600WCf50U	28.2*		
16NWCa50	102.1		16NWCa50U	20.2		
16NWCb50	102.1		16NWCb50U	23.8		
16NWCo50	41.9		16NWCo50U	29.1		
16NWCd50	104.0	108.7	16NWCd50U	23.0	25.35	
16NWCo50	160.7		16NWCo50U	16.8		
16NWCf50	118.4		16NWCf50U	10.0		
	(0.4			10.0		
16HPNWCa50	60.4		16HPNWCa50U	43.5		
16HPNWCb50	-**		16HPNWCb50U	-**		
10HPINWCC50	40.2	71.6	10HPN WCc50U	4/.4	35.24	
16HPNWCd50	/6.4		16HPNWCd50U	37		
16HPNWCe50	/8.1		16HPNWCe50U	51		
16HPNWC150	147.3		16HPN WCI50U	17.3		
761WCa50	97.8		761WCa50U	26.3		
761WCb50	80.4		761WCb50U	62.4		
761WCc50	86.2	89.6	761WCc50U	31.1		
761WCd50	86.8	02.0	761WCd50U	45.9	39.7 <sub>7</sub>	
761WCe50	66		761WCe50U	44.5		
761WCf50	97		761WCf50U	28.4		

Πίν. 19: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα Ξηρά βάρη των κλασμάτων «Αποβλήτου» από όλες τις ρητίνες μετά από νέα εκχύλιση με διάλυμα EtOAc/MeOH 20% και φυγοκέντρηση

\*δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

\*\*απώλεια δείγματος – δεν υπολογίστηκε στο Μ.Ο.

**Αποτελέσματα:** Παρατηρούμε οτι κατά την 2<sup>η</sup> εκχύλιση με EtOAc/MeOH 20% και την φυγοκέντρηση, το ξ.β. της άνω φάσης είναι σημαντικά μικρότερο από το αντίστοιχο ξ.β. που προέκυψε από την 1<sup>η</sup> εκχύλιση.

Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε NaCl του κλάσματος «Αποβλήτου», το οποίο απομακρύνεται πολύ δύσκολα και επομένως επηρεάζει αρνητικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Επίσης, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι των μαζών, αφού πρώτα αποκλείστηκαν οι αμφισβητούμενες τιμές με βάση το Κριτήριο Qtest.

#### 4.5.1. Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων ξηρού βάρους κλασμάτων.

Ρητίνη	Απόβλητο 1 <sup>η</sup> EtOAc/MeOH (20%) (mg/50ml)	Απόβλητο 2 <sup>η</sup> EtOAc/MeOH (20%) (mg/50ml)	Έκπλυση (mg/50ml)	Αποδέσμευ ση/ (mg/50ml)	Άθροισμα m όλων των κλασμάτων (mg/50ml)	% Απόδοση ανάκτησης 1	% Απόδοση ανάκτησης 2
XAD-4	86.4	24.82	3.37	155.1	183.3	0,97	36.0
XAD-7 HP	83.2	38.00	9.90	87.0	134.9	0,54	20.2
XAD-18	217.5	21.70	2.90	209.7	234.3	1,31	48.7
XAD-1180N	141.6	20.74	9.70	157.4	187.8	0,98	36.6
XAD-1600	192.1	11.24	1.62	182.2	195.1	1,13	42.3
XAD-16N	108.7	25.35	8.80	205.6	239.8	1,28	47.7
XAD-16HPN	71.6	35.24	6.70	188.7	230.6	1,17	43.8
XAD-761	89.6	39.77	3.92	75.3	119.1	0,47	17.5

Πίν. 20: Μέσοι όροι ξηρού βάρους κλασμάτων 'Αποβλήτου»', 'Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης'

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τους παραπάνω υπολογισμούς ξηρού βάρους (ξ.β.) των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης', μπορούν να διακριθούν τρείς κατηγορίες ρητινών, χαρακτηριζόμενοι ως υψηλής, μεσαίας και χαμηλής απόδοσης ανάκτησης, όπου:

- i. Υψηλής προσροφημένης μάζας: XAD-18 > XAD-16N (205-209mg/50mL).
- Μεσαίας προσροφημένης μάζας: XAD-16HPN > XAD-1600 > XAD-1180 > XAD-4 (155-188 mg/50mL).
- iii. Χαμηλής προσροφημένης μάζας: XAD-7 > XAD-761 (75-87 mg/50mL).

Επίσης, αξίζει να τονιστεί η πολύ καλή επαναληψιμότητα των μετρήσεων των μαζών των «Αποδεσμεύσεων», όπου σε πολύ λίγες περιπτώσεις υποχρεωθήκαμε να απορρίψουμε κάποιες αμφισβητούμενες τιμές με βάση το κριτήριο Qtest. (Χατζηϊάννου Θ.Π, Αθήνα 1899)

# 4.6. Σύγκριση φυτοχημικού & αντιοξειδωτικού προφίλ των κλασμάτων 'Απόβλητο', 'Εκπλυση' και 'Αποδέσμευση' σε όλες τις ρητίνες με HPTLC

Το φυτοχημικό και αντιοξειδωτικό προφίλ των κλασμάτων 'Αποβλήτου', "Εκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' των ρητινών - Amberlite XAD: -4, -7HP, -18, -1180N, -1600N, -16Ν, -16ΗΡΝ και -761, μελετήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης HPTLC. Από το κάθε πείραμα ρητίνης, επιλέχτηκε μία από τις έξι επαναλήψεις στήλης που πραγματοποιήθηκαν και ειδικότερα αυτή που έδωσε κλάσμα 'Αποδέσμευσης' με ξ.β πιο κοντά στον μέσο όρο των ξ.β της σειράς της συγκεκριμένης ρητίνης. Επιλέξαμε συνολικά τρία κλάσματα για κάθε τύπο ρητίνης, δηλαδή ένα κλάσμα 'Αποβλήτου', ένα κλάσμα Έκπλυσης' και ένα κλάσμα 'Αποδέσμευσης'. Τα κλάσματα που επιλέχθηκαν είναι τα εξής: 4W/E/ACc50U, 7W/E/ACf50U, 18W/E/ACd50U, 1180W/E/ACc50U, 1600W/E/ACf50U, 16NW/E/ACe50U, 16HPNW/E/ACc50U και 761W/E/ACc50U. Από τα κλάσματα αυτά λήφθηκε κατάλληλη ποσότητα, ώστε να προετοιμαστούν δείγματα αυτών στη συγκέντρωση των 10mg/ mL. Για την παραλαβή των δειγμάτων για την HPTLC τα κλάσματα 'Αποβλήτου', Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης μίγμα MeOH/απεσταγμένου H2O. Τα φυτοχημικά προφίλ των κλασμάτων στην HPTLC, καταγράφησαν μετά από παρατήρηση στα 254 nm και στα 366 nm και μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλλίνη στο ορατό φως και απεικονίζονται στην Εικ. 53. Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε είναι DCM/MeOH 85:15. Στα ίδια κλάσματα διενεργήθηκε και έλεγχος αναστολής του DPPH με την μέθοδο της Βιοαυτογραφίας, ώστε να υπάρξει ανίχνευση συστατικών ή ομάδων συστατικών που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση.

Για την εφαρμογή της μεθόδου Βιοαυτογραφίας, δείγματα από το κάθε κλάσμα επιστρώθηκαν σε TLC, σε συγκέντρωση 10 mg/mL, με τη χρήση του Auto-Sampler (CAMAG), και η ανάπτυξη τους έγινε σε δύο συστήματα διαλυτών ένα με DCM/MeOH 85/15 και ένα με DCM/MeOH 70/30, έτσι ώστε να παρατηρηθούν όλες οι ενδιαφέρουσες ζώνες (και οι πιο πολικές) με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Οι δύο πειραματικές διαδικασίες εκτελέστηκαν την ίδια μέρα ώστε να έχουμε αξιόπιστη συσχέτιση του φυτοχημικού προφίλ και της αντιοξειδωτικής δράσης. Στη συνέχεια ακολούθησε η εμφάνιση της μίας εκ των δύο TLC με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης, ενώ

η άλλη εμβαπτίστηκε σε διάλυμα DPPH σε αιθανόλη, συγκέντρωσης 0,05% w/v. Τα κλάσματα που επιλέχθηκαν είναι τα εξής: 4W/E/ACb50U, 7W/E/ACc50U, 18W/E/ACd50U, 1180W/E/ACc50U, 1600W/E/ACe50U, 16NW/E/ACd50U, 16HPNW/E/ACe50U και 761W/E/ACc50U. Τα συνολικά προφίλ που λήφθηκαν παρατίθενται στις Εικ. 53,54 και 55:



Εικ. 53: Προφίλ κλασμάτων «Αποβλήτου», «Έκπλυσης» και «Αποδέσμευσης» των ρητινών με τη χρήση ΗΡΤLC. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 15%. Παρατήρηση TLC στα 254nm, 366nm και στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης (από πάνω προς τα κάτω). Με τα βέλη επισημαίνουμε τα Rf που αναπτύσσονται οι Tyr, Tyr-OH και Ole.



Εικ. 54: Προφίλ κλασμάτων 'Αποβλήτου', Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' των ρητινών με τη μέθοδο Βιοαυτογραφίας με τη χρήση HPTLC. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 15%. Παρατήρηση TLC στα 254nm, 366nm και στο ορατό μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης και στο ορατό μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα DPPH σε αιθανόλη (από πάνω προς τα κάτω). Οι εναποθετημένες κηλίδες στην TLC αποτελούν τα κλάσματα «Απόβλητο», «Εκπλυση» και «Αποδέσμευση» αντίστοιχα για την κάθε ρητίνη. Με τα βέλη επισημαίνουμε τα Rf που αναπτύσσονται οι Tyr, Tyr-OH και Ole.






Εικ.56: Συγκριτικό προφίλ κλασμάτων Αποδέσμευσης ρητινών ΧΑD-4, ΧΑD-7ΗΡ, ΧΑD-18, ΧΑD-1180, ΧΑD-1600, ΧΑD-16Ν, ΧΑD-16ΗΡΝ, ΧΑD-761 με πρότυπα διαλύματα Tyr-OH (c=1mg/mL, Tyr (c=1mg/mL) και μείγμα Tyr-OH/ Tyr/ Oleuropein (c=1mg/mL). Παρατήρηση της ΗΡΤLC στα 254nm και στο ορατό μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης.

**Αποτελέσματα:** Για να διευκολυνθεί η συγκριτική μελέτη των ΗΡΤLC χρωματογραφικών πλακών (UV, ψεκασμένες με μεθανολικό H<sub>2</sub>SO4 και βιαυτογραφικές DPPH) και η εξαγωγή συμπερασμάτων, τμηματοποιήσαμε τις HPTLC σε τέσσερις ζώνες, με κριτήριο την πολικότητα των μεταβολιτών στην βάση του δ/τη ανάπτυξής τους (15% DCM/<u>MeOH</u>). Η ζώνη 0 περιλαμβάνει τις πλέον άπολες ουσίες των κλασμάτων, η ζώνη 1 τις ουσίες μέτριας-χαμηλής πολικότητας (είναι η ομάδα που περιέχει τις Υδροξυτυροσόλη (Tyr-OH), Τυροσόλη (Tyr) και άλλες παρόμοιας δομής και πολικότητας μεταβολίτες), η ζώνη 2 περιλαμβάνει τους μεταβολίτες μέτριαςυψηλής πολικότητας (αυτή η ομάδα μεταβολιτών περιέχει την Ολευρωπεϊνη, Ole) και τέλος η ζώνη 3 με τους μεταβολίτες της υψηλότερης πολικότητας. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα μέτρησης των μαζών των κλασμάτων των τριών σταδίων του **Πίν. 20**, μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής :

- 1. Με την ολοκλήρωση της έκλουσης του υδατικού αποβλήτου THR από τις ρητίνες XAD, σημαντικά μικρότερη μάζα οργανικού φορτίου μετριέται στα κλάσματα των σταδίων 'Αποβλήτου' και 'Εκπλυσης' από ότι στα κλάσματα του σταδίου της 'Αποδέσμευσης' άρα το μεγαλύτερο μέρος του (τουλάχιστον αυτό που εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες) έχει προσροφηθεί και παρακρατηθεί στην ρητίνη. Επίσης, οι απώλειες σε βιοδραστικές ουσίες (αντιοξειδωτικές) του οργανικού φορτίου, που μας ενδιαφέρει να ανακτηθούν όσο το δυνατόν πιο ποσοτικά στο τελικό αποδεσμευμένο συμπύκνωμα, μπορούν να θεωρηθούν πολύ μικρές έως αμελητέες. Ακόμα πρέπει να σημειώσουμε την πλήρη απομάκρυνση του NaCl από το τελικό αποδεσμευμένο συμπύκνωμα, δεδομένο που ήταν από την αρχή ένας από τους βασικούς στόχους της μεθόδου των ρητινών.
- 2. Στα κλάσματα του σταδίου των «Αποβλήτων» φαίνεται ότι έχουν περάσει ποσότητες ελεύθερων σακχάρων/ολιγοσακχαριτών ή/και μικρό μέρος των υδατοδιαλυτών φαινολικών γλυκοζιτών. Η περιεκτικότητα των κλασμάτων των «Αποβλήτων» σε αντιοξειδωτικό φορτίο είναι σχεδόν μηδενική για όλες τις ρητίνες όπως φαίνεται στις βιοαυτογραφικές-DPPH HPTLC.
- 3. Στα κλάσματα του σταδίου της "Εκπλυσης', φαίνεται επίσης ότι παρασύρεται ένα πολύ μικρό μέρος του βιοδραστικού οργανικού φορτίου το οποίο δεν μπόρεσε να δεσμευτεί ισχυρά από την ρητίνη και απομακρύνθηκε κατά την διάρκεια του σταδίου της έκπλυσης με H<sub>2</sub>O. Τα παραπάνω ισχύουν ανεξάρτητα από την κατηγοριοποίηση των ρητινών σε τρία επίπεδα ως προς το ποσοστό ανάκτησης του οργανικού φορτίου από το αρχικό υλικό.
- 4. Η ερμηνεία που δίνουμε στις διαφοροποιήσεις στα ξηρά βάρη των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' μεταξύ των 8 τύπων ρητινών και η μεταξύ τους κατηγοριοποίηση σε τρεις ομάδες ως προς την μάζα προσροφημένου υλικού και το ποσοστό ανάκτησης είναι η εξής: Για τις ρητίνες XAD-7HP και XAD-761, στις οποίες εμφανίζεται η μικρότερη ανάκτηση, θεωρούμε ότι ένα σημαντικό μέρος του οργανικού φορτίου του αρχικού υλικού δεν μπορεί να αποδεσμευτεί με τις κοινές συνθήκες που επιλέξαμε για όλες τις ρητίνες στο στάδιο της Αποδέσμευσης (χρόνος έκλουσης, αναλογία MeOH/όγκου υλικού). Ωστόσο οι σημαντικότεροι λόγοι του μειωμένου ποσοστού ανάκτησης είναι δύο. Ο πρώτος έχει να κάνει με τα μηχανικά/κατασκευαστικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών ρητινών. Η ρητίνη XAD-7HP εμφανίζει μέση διάμετρο μάκρο-

πόρων 300-400Å και η XAD-761 600 Å σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες (εκτός από την XAD-1180 που έχει επίσης μέση διάμετρο μάκρο-πόρων 300-400Å) που έχουν μέση διάμετρο μάκρο-πόρων που δεν ξεπερνάει τα 200 Å. Επίσης ένα ακόμα μηχανικό/ παρασκευαστικό διαφοροποιητικό χαρακτηριστικό για τις δύο ρητίνες είναι το σημαντικά μικρότερο επιφανειοδραστικό εμβαδό που έχουν (XAD-7HP:380m2/g, XAD-761:150- $250 \text{m}^2/\text{g}$ ) σε σχέση με τις υπόλοιπες (700 ή  $800 \text{m}^2/\text{g}$ ), χαρακτηριστικό που μειώνει την προσροφητική τους ικανότητα. Έπισης, ο δεύτερος λόγος έχει να κάνει με την χημεία του πολυμερούς. Οι δύο ρητίνες είναι οι μόνες που διαφοροποιούνται και ως προς τα βασικά μονομερή των αλυσίδων και ως προς τα μόρια που χρησιμοποιούνται για την διασταύρωση των αλυσίδων του πολυμερούς, ώστε να φτιαχτούν οι μίκρο-πόροι (πόροι γέλης) του τελικού πολυμερούς. Στην ΧΑΟ-7ΗΡ που ο βασικό σκελετός φτιάχνεται από προπυλένιο, ως διασταυρωτής χρησιμοποιείται ακρυλικός εστέρας, ενώ στην XAD-761 οι αλυσίδες είναι φαινολο-φορμαλδεϋδικής δομής με ενεργές μεθυλενουδροξυλομάδες (-CH2-OH). Σε όλες τις υπόλοιπες ρητίνες ο βασικός σκελετός είναι αλυσίδες πολυστυρενίου και το μόριο-διασταυρωτής είναι το διβινυλοβενζόλιο, δηλαδή εντελώς άπολες, χωρίς καμία δυνατότητα σύναψης δεσμών-Η με πολικές ομάδες των μεταβολιτών του υλικού. Ο μοναδικός συνδυασμός των μεγαλύτερων μακροπόρων και της αυξημένης πολικότητας μονάδων του βασικού πολυμερικού σκελετού ή των διασταυρωτών στις ρητίνες ΧΑD-761 και ΧΑD-7ΗΡ, γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη δεσμών-Η που προστίθενται στις βασικές διαμοριακές δυνάμεις (υδρόφοβες/Van der Waals) που προσδίδουν στις ρητίνες την προσροφητικές τους ιδιότητες (η XAD-1180 παρόλο που διαθέτει και αυτή σχετικά μεγάλους μάκρο-πόρους, έχει την ίδια «άπολη» γημεία με όλες τις υπόλοιπες), τις καθιστούν πιθανότατα ικανές να παρακρατούν πολικές ενώσεις μεγαλύτερου Μ.Β (ολιγοσακχαρίτες, μικρά πεπτίδια, μεγαλύτερους γλυκοζίτες φαινολικών/τερπενικών μεταβολιτών, θραύσματα πολυφαινολικών πολυμερών) σχετικά ισχυρότερα από τις υπόλοιπες ρητίνες και πάντως τόσο ισχυρά ώστε αυτές οι ουσίες να μην μπορούν να αποδεσμευτούν στις ίδιες συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε για όλες τις ρητίνες στο στάδιο της 'Αποδέσμευσης'. Σε αυτές λοιπόν τις ουσίες που στον βαθμό που αποδεσμεύτηκαν - αναπτύσσονται κυρίως στην ζώνη 3 των

HPTLC, εκτιμούμε ότι οφείλονται κυρίως οι διαφοροποιήσεις των μαζών των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης'.

Τα MSDS και τα υπόλοιπα τεχνικά δελτία της 'Rohm & Haas' και της 'DOW Chemicals' για τις χρήσεις αυτών των ρητινών (αν και όχι τόσο λεπτομερή, εξαιτίας του καθεστώτος των πατεντών υπό του οποίου κυκλοφορούν), ενισχύουν την ερμηνεία που δίνουμε.

- 5. Οι απώλειες σε οργανικό φορτίο στο 1ο στάδιο της Έκλουσης (ξηρά βάρη 'Αποβλήτου') και στο 2ο στάδιο της Έκπλυσης (ξηρά βάρη Έκπλυσης') είναι για όλες τις ρητίνες παρόμοιες και μικρές όπως είπαμε και παραπάνω. Τις σχετικά μεγαλύτερες απώλειες στο 1ο στάδιο της Έκλουσης (κλάσματα 'Αποβλήτου') τις παρουσιάζουν οι ρητίνες ΧΑD-7HP, ΧΑD-761 και ΧΑD-16HPN. Πιθανά αυτή η μεγαλύτερη απώλεια να ενισχύει την ερμηνεία που δίνουμε στο αποτέλεσμα 3, ως προς την ισχυρότερη παρακράτηση πολικών μεγαλομορίων από τις ρητίνες XAD-7HP, XAD-761 αφού αυτά κορένουν σε έναν βαθμό τους ενεργούς επιφανειοδραστικούς χώρους των ρητινών, με αποτέλεσμα μικρότεροι (βιοδραστικοί ή μη) μεταβολίτες να μην μπορούν να προσροφηθούν. Αυτή η ερμηνεία στηρίζεται επίσης από τις μικρότερες ενεργές επιφάνειες των δύο προαναφερόμενων ρητινών σε σχέση με αυτές των υπολοίπων. Στο 2ο στάδιο της Έκπλυσης τις μεγαλύτερες απώλειες (σε Ο.Φ) τις παρουσιάζουν οι ρητίνες XAD-7HP, XAD-1180 και XAD-16N. Αθροιστικά στα δύο πρώτα στάδια της όλης πορείας οι μεγαλύτερες % απώλειες (ως προς τις μάζες της Αποδέσμευσης) μετρούνται για τις ρητίνες XAD-7HP και XAD-761, ενώ τις μικρότερες απώλειες παρουσιάζει η XAD-1600.
- 6. Στα χρωματογραφήματα HPTLC που έχουν εμφανιστεί με θειϊκή βανιλίνη παρατηρείται επίσης ότι σε όλα τα κλάσματα της 'Αποδέσμευσης' όλων των ρητινών εμφανίζεται μια έντονη, πορτοκαλο-κόκκινη κηλίδα (Rf: 0.56-0.64), η οποία είναι η υδροξυτυροσόλη (Tyr-OH), ενώ ανιχνεύονται και η Τυροσόλη (Tyr, Rf : 0.69-0.73) και η Ολευρωπεϊνη (Ole, Rf : 0.31-0.35) όπως καταφαίνεται και από την συχρωματογράφηση όλων των κλασμάτων αποδέσμευσης με πρότυπα δ/τα Tyr-OH, Tyr και δ/τα μίγματος Tyr-OH/Tyr/Ole (Εικ.56). Η υδροξυτυροσόλη έχει αναγνωριστεί σε όλα τα απόβλητα εκπίκρανσης ανεξάρτητα από την μέθοδο που χρησιμοποιείται. Μάλιστα σε αυτά που έχουν προκύψει με προεπεξεργασία των ελαιοκάρπων με αραιό δ/μα NaOH (σοδάτες) και πριν την επεξεργασία με άλμη, είναι σχεδόν ο

μοναδικός 'πολυφαινολικός' βιοδραστικός μεταβολίτης που ανιχνεύεται στην συνέχεια στο απόβλητο και σε όλα τα στάδια της ζύμωσης (Μ.Δ.Ε Μ. Μακρυγιαννάκης, Αθήνα 2016).

- 7. Σε σχέση με την αντιοξειδωτική δράση, στην Εικ.54 καταφαίνεται ότι εκτός από την Ζώνη 0 (άπολα συστατικά) που εμφανίζουν μηδενική δράση, όλες οι άλλες ζώνες δείχνουν ισχυρή αναγωγή της ελεύθερης ρίζας DPPH. Στην ζώνη 1, φαίνεται καθαρά ότι η πιο ισχυρή αναγωγική ουσία είναι η Tyr-OH και ακολουθεί η Tyr με σαφώς ασθενέστερη δράση. Οι υπόλοιποι μεταβολίτες της ζώνης 1 (με λίγο μικρότερα ή μεγαλύτερα Rfs ) φαίνεται ότι δεν ανάγουν ισχυρά το DPPH. Και η ζώνη 2 αλλά και η ζώνη 3 περιέχουν ομάδες ουσιών που ανάγουν το DPPH, όπως φαίνεται και στην Εικ. 55, όπου η TLC έχει αναπτυχθεί σε πολικότερο σύστημα για να αξιολογηθούν ευκολότερα οι πιο πολικές ουσίες των μιγμάτων.
- 8. Είναι φανερό γενικά (UV παρατήρηση των TLC στην Εικ. 53, όπου το φαινόμενο είναι πιο ευκρινές), ότι στα κλάσματα του σταδίου της Έκπλυσης, υπάρχουν απώλειες σχεδόν από όλα τα συστατικά κυρίως των ζωνών 1 και 2. Η μεγάλη ένταση που εμφανίζουν κάποιες κηλίδες των 'Εκπλύσεων', στις ψεκασμένες TLC, σε σχέση με τις αντίστοιχες του ίδιου Rf στα διπλανά κλάσματα των 'Αποδεσμεύσεων', δεν πρέπει να μας παραπλανά ως προς τις ποσότητες στις οποίες αντιστοιχεί. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα δείγματα και από τα δύο κλάσματα που παρασκευάστηκαν για τις HPTLC, είχαν την ίδια συγκέντρωση 10 mg/mL και αποτέθηκαν στις ίδιες ποσότητες. Έχοντας ως δεδομένο ότι στα κλάσματα των Έκπλύσεων' περιέχονται κυρίως ουσίες των ζωνών 1 και 2 (και πολύ λιγότερο της 0 και 3), όπως και το ότι οι μάζες των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης', είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές των κλασμάτων Έκπλυσης', οι ουσίες στα κλάσματα των 'Αποδεσμεύσεων' είναι πολύ 'αραιωμένες' και άρα εμφανίζονται λιγότερο έντονες στις ψεκασμένες TLC. Προφανώς δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση οι κηλίδες που εμφανίζονται πιο έντονα, να απεικονίζουν όχι ομάδες ενώσεων αλλά μεμονωμένους μεταβολίτες που έχουν πράγματι πολύ μικρή χημική συγγένεια με το πολυμερικό υλικό και άρα εκροφούνται πολύ εύκολα στο 20 στάδιο της Έκπλυσης. Σε κάθε περίπτωση η πλήρης φυτοχημική ανάλυση των κλασμάτων Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' θα διελευκάνει όλες τις παραπάνω υποθέσεις.

Ως προς τον έλεγχο τώρα της πιθανής εκλεκτικότητα που εμφανίζουν οι ρητίνες σε ουσίες ή ομάδες ουσιών, σε συνδυασμό με την αντιοξειδωτική δράση (αναστολή DPPH, βιοαυτογραφικές TLC) μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

- 9. Οι ρητίνες που εμφανίζουν μηδενική απώλεια σε Tyr-OH στο 2ο στάδιο της Έκπλυσης, είναι οι ρητίνες ΧΑD-7ΗΡ, ΧΑD-18 και ΧΑD-1600. Αυτό καταφαίνεται και από τις ψεκασμένες TLC αλλά και από τη βιοαυτογραφική απεικόνιση. Σε όλες τις άλλες ρητίνες υπάρχει εμφανής απώλεια Tyr-OH στις εκπλύσεις. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την Τγr για τις ίδιες ρητίνες και σε αυτό το συμπέρασμα οδηγούμαστε και από τις βιοαυτογραφικές TLC και από τις άλλες δύο εμφανίσεις (UV, ψεκασμός με θεϊκή βανιλίνη) παρόλο που σε πολύ κοντινά Rfs έχουν αναπτυχθεί άλλοι παρόμοιας πολικότητας μεταβολίτες. Μηδενική απώλεια σε Tyr φαίνεται να παρουσιάζει και η XAD-1180, ενώ παρουσιάζει απώλειες σε Tyr-OH. Δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση της εκλεκτικότητας των XAD-7HP, XAD-18 και XAD-1600 στις Tyr-OH και Tyr, με τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, αφού σε όλα τα επίπεδα (χημεία πολυμερούς, μέγεθος μάκρο-πόρων, εμβαδό δραστικής επιφάνειας, κλπ) οι ρητίνες αυτές είναι αρκετά διαφορετικές. Σημαντικό συμπέρασμα εκλεκτικότητας είναι επίσης το ότι ενώ όλες οι άλλες ρητίνες εμφανίζουν απώλειες βιοδραστικών συστατικών της ζώνης 2, οι ρητίνες XAD-7HP, XAD-18 και XAD-1600 εμφανίζουν πολύ μικρή απώλεια στην ζώνη αυτή (μέσηςυψηλής πολικότητας).
- 10. Μπορούμε να παρατηρήσουμε μια εκλεκτικότητα στα κλάσματα των 'Εκπλύσεων' ως προς συγκεκριμένα συστατικά ή ομάδες συστατικών (που αναπτύσσονται στο ίδιο Rf) που δείχνουν να επικρατούν ως προς τις υπόλοιπες ουσίες των ίδιων κλασμάτων. Έχουμε επισημάνει αυτές τις ουσίες/ομάδες ουσιών με κόκκινους κύκλους (κηλίδες A, B, C και D) στις χρωματογραφίες της Εικ. 53. Βρίσκονται αποκλειστικά στις ζώνες 1 και 2. Οι ρητίνες XAD-4, XAD-7HP, XAD-1180 και XAD-1600, εμφανίζουν τις μεγαλύτερες απώλειες στα συστατικά των κηλίδων A, B και C, η XAD-18 στα συστατικά των κηλίδων B και C, ενώ οι ρητίνες XAD-16N, XAD-16HPN και XAD-761 στα συστατικά των κηλίδων A, B, C και D. Η περιεκτικότητα των βιοδραστικών ουσιών της ζώνης 3 στα κλάσματα των 'Εκπλύσεων' είναι πολύ μικρή όπως καταφαίνεται

και από τις βιοαυτογραφικές HPTLC της Εικ. 55 που έχουν αναπτυχθεί σε μίγμα DCM/MeOH 30%.

11. Δεν μπορούμε να εξάγουμε αξιόπιστα συμπεράσματα για τις απώλειες των ρητινών σε Ole (βρίσκεται στην ζώνη πολικότητας 2) στα κλάσματα των 'Εκπλύσεων', όπως με τις Tyr-OH και Tyr, γιατί στην περιοχή Rf της Ole, αναπτύσσονται και άλλοι παρόμοιας πολικότητας μεταβολίτες. Πρέπει πάντως να σημειώσουμε ότι η Ole βρίσκεται κοντά στην περιοχή της κηλίδας C, που περιλαμβάνεται σε αυτές που αντιστοιχούν σε συστατικά τα οποία φαίνεται να υφίστανται τις μεγαλύτερες απώλειες στο στάδιο της 'Έκπλυσης'.

#### 4.6.1. Βιολογικές δοκιμές DPPH & TPC στα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' των ρητινών

Με βάση τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων που παραλήφθηκαν με τη χρήση της HPTLC, καθώς και τη μέθοδο της Βιοαυτογραφίας, αποφασίστηκε ο περαιτέρω βιολογικός έλεγχος των κλασμάτων. Ο έλεγχος των τελικών εκχυλισμάτων, δηλαδή των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης', που παραλήφθηκαν από την κάθε στήλη κάθε ρητίνης, έγινε με τη μελέτη αυτών ως προς την αντιοξειδωτική δράση τους με τη μέθοδο DPPH και ως προς συνολικό φαινολικό τους φορτίο (TPC) με τη μέθοδο Folin– Ciocalteu. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών παρατίθενται στον **Πίν.21**:

Κωδικός δείνματος	DPPH 200ug/mL	DPPH 100ug/Ml	TPC mg GA/g	Απόδοση (g/100g)	DPPH 200ug/mL	DPPH 100ug/mL	TPC mg	Ρητίνη	
		100,00,001,001	0128		2000,8,000		GA/g		
4ACa50	63.91	36.58	78.84						
4ACb50	61.36	31.98	79.97						
4ACc50	68.13	43.35	79.25	0.97	64.44	35.36	75.40	XAD-4	
4ACd50	55.09	24.88	68.23						
4ACe50	64.35	29.52	70.69						
7ACa50	92.30	58.56	125.97						
7ACb50	92.58	67.81	121.31						
7ACc50	92.33	63.30	124.62	0.54	90.73	63 77	123 14	YAD-7HP	
7ACd50	93.00	66.41	118.12	0.34	90.75	03.72	143.14	AAD-/HP	
7ACe50	84.18	67.81	120.99						
7ACf50	90.00	58.44	127.81						
18ACa50	62.17	33.42	81.66		69.05	38.23	84 97		
18ACb50	72.31	33.74	88.70					XAD-18	
18ACc50	68.56	38.43	85.14	1 31					
18ACd50	65.45	33.04	75.00	1.51			07.77	AAD-10	
18ACe50	71.73	46.81	89.78						
18ACf50	74.05	43.93	89.53						
1180ACa50	57.19	32.76	77.65			33.57	8.57 81.66	XAD-1180N	
1180ACb50	66.60	31.66	77.89						
1180ACc50	70.15	35.49	87.94	0.98	67 40				
1180ACd50	66.28	32.51	76.49	0.90	07.40				
1180ACe50	67.15	36.37	84.33						
1180ACf50	66.81	32.61	85.68						
1600ACa50	81.12	56.10	104.67					<b>XAD 1600</b>	
1600ACb50	83.83	47.17	101.20				102.01		
1600ACc50	80.03	46.16	110.67	1 13	80.81	16.16			
1600ACd50	78.82	36.54	100.74	1.15	00.01	40.40	102.01	AAD-1000	
1600ACe50	77.61	46.64	104.10						
1600ACf50	83.48	46.14	95.47						
16NACa50	78.27	39.84	89.14						
16NACb50	38.59	15.47	44.59			35 11			
16NACc50	66.70	37.73	87.20	1 28	71.64		85 96	XAD-16N	
16NACd50	71.73	34.66	82.20	1,20	/ 1.04	55.77	05.70	<b>MAD-1011</b>	
16NACe50	69.10	38.36	88.12						
16NACf50	72.37	26.63	83.13						

Πίν.21: Αποτελέσματα βιολογικών μελετών DPPH & TPC κλασμάτων «Αποδέσμευσης» ρητινών.

16HPNACa50	82.24	40.51	107.44			-	42.29 96.32	
16HPNACb50	92.29	37.92	98.18					
16HPNACc50	80.55	54.48	97.19	1.17	1.17 79.40	42.29		XAD- 16HPN
16HPNACd50	78.02	45.28	95.77					
16HPNACe50	70.39	36.91	88.28					
16HPNACf50	72.92	38.67	9106					
761ACa50	90.72	72.61	157.34		0.47 88.64	64 67.43	141.08	XAD-716
761ACb50	88.17	65.34	13913					
761ACc50	87.25	70.48	154.63	0.47				
761ACd50	89.21	57.16	118.66	0.47				
761ACe50	88.21	72.45	145.71					
761ACf50	88.30	66.56	131.00					

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τις αποκρίσεις των προαναφερόμενων δοκιμών αντιοξειδωτικής δράσης DPPH και ολικού φαινολικού φορτίου TPC, που έγιναν για τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' των ρητινών, επαληθεύεται ότι τα συστατικά που εμπεριέχονται στα κλάσματα της 'Αποδέσμευσης' των ρητινών, είναι αυτά στα οποία αποδίδεται η αντιοξειδωτική δράση αυτών. Όλα τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση και πλούσιο φαινολικό φορτίο και μια κατάταξη των κλασμάτων αυτών στην βάση της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η οποία φαίνεται να συμφωνεί με το συνολικό φορτίο που περιέχεται σε αυτά είναι η εξής: XAD–761> 7HP> 1600> 16HPN> 18> 16N> 4> 1180. Παρατηρείται πως τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' που έδειξαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και το υψηλότερο φαινολικό φορτίο είναι αυτά των ρητινών **Αmberlite XAD–761 & XAD–7HP**.

Επειδή η ρητίνη XAD-7HP, εμφανίζει την μικρότερη μάζα 'Αποδέσμευσης' αλλά κρατάει όλη την ποσότητα της Tyr-OH του αρχικού υλικού (μηδενική απώλεια στο στάδιο της 'Έκπλυσης') διαθέτει έτσι την μεγαλύτερη συγκέντρωση Tyr-OH στο δείγμα της 'Αποδέσμευσης'. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δίνει την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή ολικού φαινολικού φορτίου στο TPC και την δεύτερη μεγαλύτερη αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH. Αυτό είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι η Tyr-OH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ισχύ του υλικού του αποβλήτου. Το γεγονός ότι η XAD-1600 παρόλο που και αυτή είναι μια από τις τρεις ρητίνες με μηδενική απώλεια σε Tyr-OH στο στάδιο της Έκπλυσης, παρουσιάζει μικρότερη τιμή στο TPC και πολύ χαμηλότερη τιμή αναστολής DPPH απ'ότι η XAD-7HP (και η XAD-761), επειδή ακριβώς λόγω της μεγαλύτερης μάζας του κλάσματος 'Αποδέσμευσης' έχει την Tyr-OH σε μικρότερη συγκέντρωση, ενισχύει το παραπάνω συμπέρασμα. Η XAD-761 παρουσιάζει σημαντικές απώλειες σε Tyr-OH, και έχει περίπου την ίδια μάζα κλάσματος 'Αποδέσμευσης' με την XAD-7HP. Παρόλα αυτά παρουσιάζει τις

μεγαλύτερη τιμή TPC και την μεγαλύτερη τιμή αναστολής DPPH. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι έχει δεσμεύσει κι άλλους μεταβολίτες με παρόμοια αντιοξειδωτική ισχύ με την Tyr-OH και αυτός είναι ένας βασικός λόγος που μας οδήγησε να την επιλέξουμε για περαιτέρω μελέτη.

### 4.6.2. Αξιολόγηση της επαναληψιμότητας των κλασμάτων 'Απόβλητο', 'Έκπλυση' και 'Αποδέσμευση' των ρητινών Amberlite XAD με επιλογή των XAD-4, XAD-7HP και XAD-761 με τη χρήση HPTLC

Η επαναληψιμότητα των πειραμάτων στήλης για την κάθε ρητίνη, επιβεβαιώθηκε αρχικά από τη σύγκριση των ξ.β. των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' που λήφθηκαν. Για επιβεβαίωση σχετικά με την επαναληψιμότητα των πειραμάτων αποφασίστηκε να επιλεγθούν τρεις ρητίνες, των οποίων τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης', Έκπλυσης' και 'Αποβλήτου' μελετήθηκαν εκ νέου με γρωματογραφία HPTLC ως προς το φυτογημικό τους προφίλ. Οι ρητίνες των οποίων τα κλάσματα επιλέχθηκαν είναι οι Amberlite XAD -4, -7HP και -761. Η επιλογή αυτή έγινε διότι οι ρητίνες αυτές εμφάνισαν ενδιαφέρον, καθώς ενώ τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' των ΧΑD-7HP και -761 έδειξαν τις υψηλότερες τιμές κατά τους in vitro ελέγχους (DPPH και TPC), εμφάνισαν τη γαμηλότερη απόδοση αποδέσμευσης (κατά βάρος) ως προς το αργικό υλικό. Αντίθετα τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' της XAD-4 εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές κατά τις in vitro δοκιμές, ενώ παρουσίασαν ενδιάμεσο ποσοστό ανάκτησης. Επιλέχθηκαν τα κλάσματα τεσσάρων από τις έξι επαναλήψεις στήλης που έγιναν και αυτά είναι τα εξής: 4W/E/ACa/b/c/e50U, 7W/E/ACa/b/c/d50U και 761W/E/ACb/c/d/e50U. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε συγκέντρωση 10mg/mL και το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε είναι το DCM/MeOH (85:15). Το χρωματογράφημα που λήφθηκε φαίνεται στις Εικ. 57, 58, 59:



Εικ. 57: Προφίλ επαναληψιμότητας ρητίνης Amberlite XAD-4 με χρήση HPTLC. Παρατήρηση TLC πριν την ανάπτυξη στο ορατό και μετά την ανάπτυξη στα 254nm, 366nm και στο ορατό μετά από ψεκασμό σε αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης (από πάνω προς τα κάτω).



Εικ, 58: Προφίλ επαναληψιμότητας ρητίνης Amberlite XAD-7HP με χρήση HPTLC. Παρατήρηση TLC πριν την ανάπτυξη στο ορατό και μετά την ανάπτυξη στα 254nm, 366nm και στο ορατό μετά από ψεκασμό σε αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης (από πάνω προς τα κάτω).



**Εικ. 59**: Προφίλ επαναληψιμότητας ρητίνης Amberlite XAD-761 με χρήση HPTLC. Παρατήρηση TLC πριν την ανάπτυζη στο ορατό και μετά την ανάπτυζη στα 254nm, 366nm και στο ορατό μετά από ψεκασμό σε αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης (από πάνω προς τα κάτω).

Αποτελέσματα: Όπως φαίνεται από τις παραπάνω TLC που λήφθηκαν με την HPTLC, και οι τέσσερις επαναλήψεις στηλών για κάθε μία από τις ρητίνες Amberlite XAD-4, 7HP και 761 παρουσιάζουν το ίδιο ακριβώς προφίλ, που σημαίνει πως η επαναληψιμότητα των στηλών των πειραμάτων είναι πολύ καλή. Επίσης, αξίζει να σχολιαστεί πως όσον αφορά το κλάσμα 'Αποδέσμευσης' της ρητίνης XAD-7HP, φαίνεται και πάλι η μεγάλη επιλεκτικότητα αυτής της ρητίνης προς την υδροζυτυροσόλη του υλικού αποβλήτου θρούμπας Θάσου, Μεταξύ των τριών επιλεγμένων αυτών ρητινών, μια κατάταξη τους ως προς την επιλεκτικότητα της ρητίνης σχετικά με τη δέσμευση της υδροζυτυροσόλη στο τελικό κλάσμα της 'Αποδέσμευσης' είναι: XAD-7HP, με την μεγαλύτερη επιλεκτικότητα, η XAD-761 με μια μικρότερη αλλά και πάλι σημαντική επιλεκτικότητα (παρατηρούνται και άλλα συστατικά στο κλάσμα αυτό) και τέλος η XAD-4 φαίνεται να έχει μικρή επιλεκτικότητα καθώς παρατηρούνται και άλλα συστατικά στο κλάσμα της 'Αποδέσμευσης'.

#### 4.7. Αξιολόγηση ρητινών βάση της εξίσωση επιθυμητότητας

Η τελική σύγκριση / αξιολόγηση των ρητινών Amberlite XAD: 4, 7HP, 18, 1180N, 1600N, 16N, 16HPN, 761, για την επιλογή της ρητίνης η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία του υδατικού αποβλήτου THR και την παραλαβή ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού τελικού εκχυλίσματος, αποφασίστηκε να γίνει με σύγκριση των αποτελεσμάτων 'Απόδοσης Αποδεσμεύσεων', 'DPPH' και ''TPC'. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών, εφαρμόστηκε η μέθοδος 'desirability function', όπου χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της εξίσωσης του Derringer, η οποία λαμβάνει υπόψιν τις προκαθορισμένες μεταβλητές ισότιμα και συγκρίνοντάς τες δίνει τον βέλτιστο συνδυασμό τους. Με αυτόν τον τρόπο έγινε η επιλογή της πιο αποτελεσματικής ρητίνης με βάση τις μετρήσεις των τριών παραμέτρων. Στους Πίν. 22, Πίν. 23 παρατίθενται οι τιμές των παραγόντων ξ.β., αποκρίσεων δοκιμών DPPH και TPC καθώς και οι αποκρίσεις της επεξεργασίας με την εξίσωση. Στις Εικ. 59, 60 απεικονίζονται γραφικά τα αποτελέσματα της παραπάνω επεξεργασίας βάση της εξίσωσης. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε είναι της μορφής:

#### Aπόκριση κατά Derringer = $\sqrt[3]{Aπ}$ όδοση ανάκτησης<sup>3</sup> + DPPH<sup>3</sup> + TPC<sup>3</sup>}



Εικ. 60: Γράφήμα απεικόνιση;ς αποκρίσεων των τριών μεταβλητών Απόδοσης Αποδεσμεύσεων', 'DPPH' και 'TPC' των ρητινών.

Sample	Απόδοση ανάκτησης/ 100ml	DPPH 100µg/ml	TPC mg GA/g	
XAD-4	1.98	35.36	75.40	
XAD-7HP	1.08	63.72	123.14	
XAD-18	2.55	38.23	84.97	
XAD-1180N	1.96	33.57	81.66	Γ
XAD-1600	2.25	46.46	102.81	
XAD-16N	2.53	35.44	85.96	
XAD-16HPN	2.35	42.29	96.32	
XAD-716	1.01	67.43	141.08	

Πίν. 22: Τιμές μεταβλητών «Απόδοσης Ανάκτησης», «DPPH» και «TPC» των ρητινών.

### $\sqrt[3]{Aπ όδοση αν άκτησης<sup>3</sup> + DPPH<sup>3</sup> + TPC<sup>3</sup>}$

Sample	Equation
XAD-4	77.91
XAD-7HP	128.58
XAD-18	87.47
XAD-1180N	83.51
XAD-1600	105.88
XAD-16N	87.92
XAD-16HPN	98.97
XAD-761	146.04

Πίν. 23: Αποκρίσεις εξίσωσης.



Εικ. 61: Γράφημα απόκρισων των τριών μεταβλητών Απόδοσης Αποδεσμεύσεων', 'DPPH' και 'TPC' των ρητινών μετά από την επεξεργασία με την εξίσωση επιθυμητότητας.

**Αποτελέσματα:** Όπως φαίνεται από τα παραπάνω γραφήματα, τα οποία προκύπτουν βάση των αποκρίσεων της εξίσωσης επιθυμητότητας, ο βέλτιστος συνδυασμός των μεταβλητών 'Απόδοσης ανάκτησης', αντιοξειδωτικής δράσης DPPH και ολικού φαινολικού φορτίου TPC, έδειξε πως δύο από τις οχτώ ρητίνες που αξιολογήθηκαν είναι οι πιο αποτελεσματικές για την ανάπτυξη του επιθυμητού παρασκευάσματος. Μια συνολική κατάταξη βάση επιθυμητών αποτελεσμάτων είναι XAD- 761> 7HP> 1600> 16HPN> 16N> 18> 1180> 4. Επομένως, οι ρητίνες Amberlite XAD - 761 και XAD -7HP, διαθέτουν τις πιο αποδεκτές συνδυαστικές αποκρίσεις, με την XAD-761 να έχει δείζει τα καλύτερα συνδυαστικά αποτελεσματα.

Επιλέξαμε για περαιτέρω μελέτη (εύρεση σημείου κορεσμού, εύρεση βέλτιστης αναλογίας ρητίνης/υλικού, βελτιστοποίηση συνολικά συνθηκών έκλουσης) τη ρητίνη XAD-761, επιπλέον από το αποτέλεσμα της στατιστικής επεξεργασίας, γιατί :

- Στους in vitro ελέγχους αναστολής του DPPH και του ολικού φαινολικού φορτίου, το κλάσμα της 'Αποδέσμευσης' της ρητίνης αυτής είχε τις καλύτερες αποδόσεις, μεγαλύτερες και από αυτές των αντίστοιχων κλασμάτων της XAD-7HP ή της XAD-1600N, παρόλο που στην HPTLC είδαμε οτι υπήρξε απώλεια Tyr-OH στο στάδιο της έκπλυσης για την XAD-761, ενώ δεν υπήρχε για τις XAD-7HP και XAD-1600N.
- 2. Είναι μοναδική από όλες τις XAD<sup>®</sup> ως προς την χημεία του πολυμερούς αλλά και ως προς τα υπόλοιπα μορφολογικά/φυσικοχημικά της χαρακτηριστικά και

είναι η πρώτη φορά που αυτή η ρητίνη αξιοποιείται από την ερευνητική μας ομάδα.

Σε δεύτερη φάση σκοπεύουμε να εφαρμόσουμε την ίδια πορεία βελτιστοποίησης και για την XAD-7HP, ρητίνη που αξιοποιούμε ήδη στο εργαστήριό μας εδώ και αρκετά χρόνια σε διάφορες εφαρμογές, όπως και για το απόβλητο της εκπίκρανσης της θρουμποελιάς σε προηγούμενη εργασία της ομάδας μας ( Μακρυγιαννάκης Μ., 2016).

### 4.8. Εύρεση ορίου κορεσμού και βελτιστοποίηση των συνθηκών έκλουσης για την ρητίνη Amberlite XAD-761

Αφού επιλέξαμε την ρητίνη Amberlite XAD-761, αποφασίστηκε να γίνει μελέτη βελτιστοποίησης της απόδοσης της, όσον αφορά στην επεξεργασία του υδατικού αποβλήτου της ξηράλατης ελιάς Θρούμπας Θάσου (THR). Περιγράφουμε εδώ, μέσω μιας σειράς πειραμάτων, την προσπάθεια για την εύρεση αρχικά της μέγιστης ποσότητας υλικού που μπορεί να υποστεί επεξεργασία από μια συγκεκριμένη ποσότητα ρητίνης, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα όλης της διαδικασίας, δηλαδή μελετήθηκε με ποιά ποσότητα υδατικού αποβλήτου επέρχεται ο κορεσμός της ρητίνης.

Η μακρόπορη πολυμερική ρητίνη XAD – 761 (παλιά γνωστή ώς Duolite και πλέον εμπορεύσιμη ως Amberlite), είναι μια πολική ρητίνη (Gao et al., 2018) και αποτελεί προϊόν πολυμερισμού φαινόλης και φορμαλδεΰδης, το οποίο δεν περιέχει άλλους τύπους λειτουργικών ομάδων πέρα από τις φαινολικές (Shelkovnikova et al., 2010). Το μέγεθος των σωματιδίων της πολυμερικής ρητίνης κυμαίνεται μεταξύ 20 με 60 mesh.

Αναγεννάται εύκολα για πολλούς κύκλους προσρόφησης-εκρόφησης, με καλή επαναληπτική ικανότητα σχετικά με τα χαρακτηριστικά προσρόφησης (Ciftci et al., 2016). Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ρητίνης Amberlite XAD-761, παρατίθενται στο κεφάλαιο **2.5.2.2.1**.



Εικ. 62: Μορφή ενεργοποιημένης ρητίνης <u>Amberlite XAD-761</u>

# 4.8.1. 1η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκους αποβλήτου από 20mL έως 240mL

Στο πρώτο πείραμα βελτιστοποίησης της διαδικασίας δέσμευσης του φαινολικού φορτίου με τη ρητίνη Amberlite XAD-761, χρησιμοποιήθηκαν 16 στήλες μηδενικού πορώδους, οι οποίες πληρώθηκαν με 20ml ρητίνης, ενώ η μόνη παράμετρος που αλλάζει κατά την έκλουση είναι η ποσότητα του υδατικού αποβλήτου THR που διέργεται από την κάθε στήλη. Εκτελέστηκαν οι εξής επαναλήψεις για κάθε όγκο αποβλήτου: 2 για 20mL αποβλήτου, 2 για 40mL αποβλήτου, 2 για 60mL αποβλήτου, 2 για 80mL αποβλήτου, 2 για 100mL αποβλήτου, 2 για 120mL αποβλήτου, 2 για 160mL αποβλήτου και 2 για 240mL αποβλήτου. Η επεξεργασία που έλαβε χώρα είναι η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε κατά τη συγκριτική μελέτη των ρητινών. Στη συνέχεια, για κάθε στήλη μετά την έκλουση του αποβλήτου και την παραλαβή των κλασμάτων 'Αποβλήτου', διήλθαν 100 mL απεσταγμένο H2O (κλάσμα Έκπλυση') για την απομάκρυνση του NaCl και άλλων τυχόν στερεών μικροσωματιδίων που έχουν εγκλωβιστεί στην ρητίνη και τέλος ακολούθησε η αποδέσμευση των προσροφημένων στη ρητίνη μεταβολιτών, η οποία επιτεύχθηκε με διέλευση 100 ml MeOH από τη στήλη (κλάσματα 'Αποδέσμευσης'). Έπειτα, τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' συμπυκνώθηκαν κατάλληλα, υπολογίστηκε το ξ.β. τους και η τελική απόδοση ως προς το αργικό υλικό (τα κλάσματα 'Αποβλήτου' και Έκπλυσης' μπήκαν στην κατάψυξη και στην συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν). Στη συνέχεια τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο 'DPPH' καθώς και ως προς το ολικό φορτίο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu (TPC). Τα αποτελέσματα ως προς τις αποδόσεις και τις βιολογικές μελέτες παρατίθενται στον Πίν.24:

Πίν.24: Αποτελέσματα 1° <sup>0</sup> πειράματος των 22 στηλών βελτιστοποίησης της ρητίνης Amberlite XAD - 761, όπου
χρησιμοποιήθηκαν 20 ml ρητίνης και διάφοροι όγκοι υδατικού αποβλήτου THR (20, 40, 60, 80, 100, 120, 160,
200, 240 ml)

		200, 2	<u> </u>		
Sample	Average mg Αποδέσμευσης	Average DPPH 200µg/ml	Average DPPH 100μg/ml	Average -TPC mg GA/g (4mg/ml)	Sample
XAD-761 (20ml)	43.05	80.60	45.27	188.77	XAD-761 (20ml)
XAD-761 (40ml)	62.75	86.27	55.51	195.37	XAD-761 (40ml)
XAD-761 (60ml)	76.45	90.66	65.58	186.29	XAD-761 (60ml)
XAD-761 (80ml)	87.90	91.00	67.62	205.80	XAD-761 (80ml)
XAD-761 (100ml)	100.80	90.21	65.99	200.44	XAD-761 (100ml)
XAD-761 (120ml)	114.50	91.93	72.16	198.24	XAD-761 (120ml)
XAD-761 (160ml)	144.40	88.98	65.18	199.11	XAD-761 (160ml)
XAD-761 (240ml)	180.60	92.00	72.93	202.78	XAD-761 (240ml)

Αποτελέσματα: Όπως φαίνεται από τα δεδομένα των πειραμάτων προσδιορισμού της βέλτιστης αναλογίας υλικού ξεπικρίσματος με ρητίνη Amberlite XAD-761, παρατηρείται μια συνεχής αύξηση του ξηρού βάρους των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' καθώς αυξάνεται ο όγκος του υδατικού αποβλήτου THR, που διέρχεται από την στήλη των 20mL. Βάση αυτών των αποτελεσμάτων φαίνεται πως η ρητίνη μέχρι και τη διέλευση των 240mL υλικού THR φαίνεται να μην παρουσιάζει κορεσμό, αλλά αντιθέτως φαίνεται να δεσμεύει ολοένα και περισσότερα συστατικά με την αύξηση του όγκου του αποβλήτου που εκλούεται. Επίσης, από τα αποτελέσματα των δοκιμών DPPH και TPC φαίνεται πως τόσο η αντιοξειδωτική δράση όσο και το συνολικό φαινολικό φορτίο των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' παραμένει σχεδόν σταθερό με μικρή αλλά υπαρκτή αυξητική τάση. Αυτό δείχνει πως το σύνολο των συστατικών τα οποία έχουν παραληφθεί στο κλάσμα της 'Αποδέσμευσης', παρουσιάζει μικρή αλλά σταθερή αύξηση τόσο στην αντιοξειδωτική δράση όσο και στο ολικό φαινολικό φορτίο. Συμπερασματικά, βάση αυτών των δεδομένων, τα κλάσματα αποδέσμευσης που λαμβάνονται μέχρι και τα 240mL THR, είναι το ίδιο πλούσια σε συνολικό φαινολικό φορτίο, ενώπαρουσιάζουν και την ίδια ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Επομένως,

κρίνεται πως η ρητίνη των 20ml δεν παρουσίασε κορεσμό ακόμη και μετά την διέλευση των 240mL THR και συνεχίζει να προσροφά βιοδραστικά συστατικά.

Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των επαναλήψεων του πειράματος βελτιστοποίησης της ρητίνης Amberlite XAD-761 για κάθε όγκο υλικού-αποβλήτου παρατίθενται στον **Πίν. 25:** 

Δείγμα	ξ.β. μετά από συμπύκνωση (mg)
761ACa20	42.0
761ACb20	44.1
761ACa40	60.1
761ACb40	69.6
761ACa60	72.8
761ACb60	80.1
761ACa80	90.1
761ACb80	89.0
761ACa100	110.5
761ACb100	100.8
761ACa120	111.8
761ACb120	118.6
761ACa160	164.2
761ACb160	140.7
761ACa240	173.2
761ACb240	180.6

Πίν. 25: Αποτελέσματα πειράματος βελτιστοποίησης 22 στηλών, της ρητίνης Amberlite XAD - 761

# 4.8.2. 2<sup>η</sup> πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα κλασματοποίησης με όγκο αποβλήτου 300mL

Καθώς από τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος δεν παρατηρήθηκε κορεσμός της ρητίνης, αλλά αντιθέτως φάνηκε αυτή να διατηρεί ως ένα βαθμό τη προσροφητική ικανότητά της και να συνεχίζει να δεσμεύει βιοδραστικά συστατικά από το υδατικό απόβλητο THR, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί 20 πείραμα προσδιορισμού του ορίου κορεσμού με 300mL THR.

Σε αυτό το πείραμα όγκος αποβλήτου 300mL εκλούστηκε ξανά από 20mL ρητίνης XAD-761, αυτήν την φορά όμως με λήψη κλασμάτων των 10mL κατά τη συλλογή του κλάσματος 'Απόβλητο', κλασμάτων των 40mL για το 2ο στάδιο της 'Εκπλυσης' και κλασμάτων των 20 mL για το 3ο στάδιο της 'Αποδέσμευσης'. Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου συλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 7,5h για το στάδιο Έκλουσης και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 2h για το στάδιο της 'Αποδέσμευσης'. Εκπλυσης' και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 2h για το στάδιο της 'Αποδέσμευσης' και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 2h για το στάδιο της 'Αποδέσμευσης' και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 2h για το στάδιο της 'Αποδέσμευσης' και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 2h για το στάδιο της 'Αποδέσμευσης' προκειμένου να παρατηρηθεί η συμπεριφορά της ρητίνης καθ' όλη την διαδικασία. Η ροή στο πείραμα ήταν περίπου 0,5 mL/ min. Τα κλάσματα 'Αποβλήτου' και τα κλάσματα 'Αποβλήτου' και τα κλάσματα 'Αποβλήτου' και τα κλασμάτω του πειράματος κλασματοποίησης παρατίθενται στον μελετήθηκαν ως προς το ξ.β. είναι τα κλάσματα 'Αποβλήτου' και τα κλασματα στον Πίν. 26:

<u>300 ml</u>

Κλάσμα	ξ.β. μετά τη	ξ.β. μετά από την εκχύλιση με
κλασμα	κνωση (g)	EtOAc/MeOH 20% για
$7(1WC_{2})40f_{1}(10)$	0 1021	τα κλάσματα (g)
761 WCa240If1(10)	0.1031	-
701  wCa240I12(10)	2 122	2.1
701  wCa240I13(10)	2.125	2
761 WCa24014(10) 761 WCa240fr5(10)	2.4490	2.5
761WCa240II3(10)	2.00	2.8
761 WCa24010(10)	2.017	2.0
$761WC_{a}24017(10)$	2.304	2.7
$761WC_{a}240H8(10)$	2 060	25
$761WC_{2}240fr(10)$	2.909	2.3 17 7
$761WC_{2}240fr11(10)$	2.7477	31
$761WC_{2}240fr12(10)$	2.5707	1.8
$761WC_{2}240fr12(10)$	3.3355	1.0
$761WC_{2}240fr14(10)$	2 8100	4.5
$761WC_{2}240fr15(10)$	2.0177	3.0
$761WC_{2}240fr16(10)$	2.9391	27
$761WC_{2}240fr17(10)$	2 0583	37
$761WC_{2}240fr18(10)$	2.9303	27
$761WC_{2}240fr19(10)$	3 3682	2.1
761WCa240fr20(10)	3.5002	2.4
761WCa240fr20(10)	3 1306	25
761WCa240fr22(10)	2 9594	2.5
761WCa240fr23(10)	2.9318	3.5
761WCa240fr24(10)	3 2352	3.2
761WCa240fr25(10)	3.4612	2.8
761WCa240fr26(10)	3 9885	2.8
761WCa240fr27(10)	-	-
761WCa240fr28(10)	1.455	2.5
761WCa240fr29(10)	2.123	5.8
761WCa240fr30(10)	0.8888	3.2
, 01 ( 042 10110 0(10)		TotalW=97.6mg
761ACa240fr1(20)	2.6	1 owner ( ) total
761ACa240fr2(20)	72.9	
761ACa240fr3(20)	13.0	
761ACa240fr4(20)	6.7	
761ACa240fr5(20)	5.6	
761ACa240fr6(20)	3.6	
761ACa240fr7(20)	2.8	
761ACa240fr8(20)	2.9	
761ACa240fr9(20)	2.9	
761ACa240fr10(20)	2.8	
761ACa240fr11(20)	2.4	
761ACa240fr12(20)	1.8	
761ACa240fr13(20)	1.6	
761ACa240fr14(20)	4.3	
	TotalA=125.9	

Αποτελέσματα: Όσον αφορά στα επιμέρους κλάσματα του 'Αποβλήτου' παρατηρείται μια σταθερότητα ως προς το ξ.β. των τελικών κλασμάτων, επομένως δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς το όριο κορεσμού, παρά μόνο ότι η ποσότητα του οργανικού φορτίου που περιέχεται στα κλάσματα αποβλήτου είναι πολύ μικρή που σημαίνει πως το κύριο Ο.Φ. δεσμεύτηκε στη ρητίνη. Όσον αφορά στα επιμέρους κλάσματα 'Αποδέσμευσης', ως προς το ξ.β. παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση του στο δεύτερο κλάσμα και έπειτα ακολουθεί μια συνεχόμενη μείωση και σταθεροποίησή του σε χαμηλές τιμές. Από αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη αποδέσμευση συστατικών που έχουν προσροφηθεί στη ρητίνη επιτυγχάνεται μέχρι και το πέμπτο κλάσμα και από εκεί και πέρα στα υπόλοιπα κλάσματα η αποδέσμευση θεωρείται μικρής σημασίας καθώς από το ξ.β. φαίνεται ότι το οργανικό φορτίο είναι πολύ μικρό. Επομένως ένα ασφαλές συμπέρασμα που μπορούμε να εξάγουμε από αυτήν την πειραματική διαδικασία είναι ότι το μεγαλύτερο μέρος της αποδέσμευσης μπορεί να επιτευχθεί με τα πρώτα 100 ml MeOH, όσον αφορά τουλάχιστον σε μεταβολίτες μικρότερου και μεσαίου μεγέθους.

Τα επιμέρους κλάσματα 'Αποδέσμευσης' μελετήθηκαν και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και το ολικό φαινολικό φορτίο με τους *in vitro* ελέγχους DPPH και TPC, ώστε να έχουμε πιο ασφαλή δεδομένα ως προς τον κορεσμό της ρητίνης. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον **Πίν. 27:**  Πίν. 27: Αποτελέσματα επεξεργασίας επιμέρους κλασμάτων «Αποδέσμευσης» πειράματος με όγκο αποβλήτου

Sample Code	Αποδέσμευση (mg)	DPPH 200µg/ml	DPPH 100µg/ml	TPC mg GA/g
761ACa240fr1(20)	2.6	53.17	29.99	127.33
761ACa240fr2(20)	72.9	75.08	68.38	171.51
761ACa240fr3(20)	13.0	87.42	57.65	157.15
761ACa240fr4(20)	6.7	93.40	70.36	182.90
761ACa240fr5(20)	5.6	88.78	65.73	156.58
761ACa240fr6(20)	3.6	89.51	71.71	168.74
761ACa240fr7(20)	2.8	90.73	43.40	155.49
761ACa240fr8(20)	2.9	88.79	50.34	154.95
761ACa240fr9(20)	2.9	91.45	40.18	144.53
761ACa240fr10(20)	2.8	78.32	55.62	150.02
761ACa240fr11(20)	2.4	86.40	64.26	167.02
761ACa240fr12(20)	1.8	80.82	45.10	124.61
761ACa240fr13(20)	1.6	89.70	59.47	134.77
761ACa240fr14(20)	4.3	85.49	73.78	161.56

<u>300mL</u>

<u>Αποτελέσματα</u>: Τα δεδομένα των αποκρίσεων των ελέγχων DPPH και TPC, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των ξ.β, δείχνουν πως όλα τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' παρουσιάζουν σχετικά σταθερή αντιοξειδωτική δράση όπως και ολικό φαινολικό φορτίο, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι η ρητίνη συνεχίζει να αποδεσμεύει συνεχώς ουσίες με ισχυρή δράση, σε μικρότερες ποσότητες μετά το πέρας των 100 mL MeOH.

# 4.8.3. 3η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκο αποβλήτου 50mL

Έγινε επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας με τη διαφορά ότι από τα 20mL ρητίνης διήλθαν 50mL υδατικού αποβλήτου THR και ότι τα κλάσματα που λήφθηκαν μελετήθηκαν μόνο ως προς το ξ.β. Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου συλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 90min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 60min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίν. 28**:

Κλάσμα	ξ.β. μετά τη λυοφιλοποίηση/συμπύ κνωση (g)	ξ.β. μετά από την εκχύλιση με EtOAc/MeOH 20% για τα κλάσματα (g)
761WCa50fr1(10)	_*	16
761WCa50fr2(10)	1.2542	5.2
761WCa50fr3(10)	1.9962	1.9
761WCa50fr4(10)	2.4661	2.7
761WCa50fr5(10)	2.504	30.5
761WCa50fr6(10)	2.4102	3.1
761WCa50fr7(10)	2.516	2
761WCa50fr8(10)	2.1114	3.5
761ACa50fr1(20)		10.5
761ACa50fr2(20)		28.6
761ACa50fr3(20)		5.3
761ACa50fr4(20)		2.6
761ACa50fr5(20)		1.8
761ACa50fr6(20)	Δεν έχινε	1.5
761ACa50fr7(20)	λυοφιλοποίηση αλλά	1.7
761ACa50fr8(20)	απευθείας	0.7
761ACa50fr9(20)	συμπύκνωση	0.5
761ACa50fr10(20)		1
761ACa50fr11(20)		2.4

Πίν. 28: Αποτελέσματα πειράματος κλασματοποίησης ρητίνης Amberlite XAD - 761 50 mL

\*απώλεια ζύγισης

<u>Αποτελέσματα</u>: τα αποτελέσματα οδηγούν στα ίδια συμπεράσματα που προέκυψαν από το πείραμα κλασματοποίησης των 300 mL.

Για την παρατήρηση ενός προφίλ των επιμέρους κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' έγινε TLC αυτών, οι οποίες φαίνονται στην Εικ. 63:



Εικ. 63: TLC κλασμάτων αποδέσμευσης 300ml & 50ml υλικού. Ανάπτυξη σε DCM/MeOH 15%. Από πάνω προς τα κάτω: ψεκασμός με θειϊκή βανιλίνη- εμφάνιση στα 254 nm - εμφάνιση στα 366 nm

**Αποτελέσματα:** Από τις παραπάνω TLC των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' των δύο τελευταίων πορειών, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον εντοπισμό του σημείου κορεσμού, παρατηρείται ότι μετά το τρίτο, επαναλαμβάνεται σε όλα τα κλάσματα μια συγκεκριμένη κηλίδα (με Rf ~ 0.5), που αποτελεί σημαντικό νέο δεδομένο. Εμφανίζεται στα 366 nm και υπάρχει σε όλα σχεδόν τα κλάσματα της 'Αποδέσμευσης' και την οποία δεν είχαμε ανιχνεύσει σε κανένα από τα προηγούμενα πειράματα έκλουσης της XAD-761. Ταυτόχρονα φαίνεται επίσης ότι πράγματι το κύριο πλήθος των προσροφημένων συστατικών αποδεσμεύεται στα τρία πρώτα κλάσματα.

## 4.8.4. 4η πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκο αποβλήτου 600mL

Καθώς τα παραπάνω πειράματα δεν προσδιόρισαν τον κορεσμό της ρητίνης, ακολούθησε το 4° πείραμα κλασματοποίησης για τη ρητίνη XAD–761, κατά το οποίο 600mL υδατικού αποβλήτου THR εκλούστηκαν από 20mL ρητίνης, με σκοπό τη λήψη κλασμάτων των 100mL κατά το 1° στάδιο της Έκλουσης. Η χρονική διάρκεια συλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 60min για το στάδιο Έκλουσης' και τη συλλογή των κλασμάτων 'Αποβλήτου' και 90min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'.

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε με σκοπό στα κλάσματα 'Αποβλήτου' που λήφθηκαν να επεξεργαστούν αρχικά με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί από αυτά όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα NaCl. Η επεξεργασία έγινε με έκπλυση των ξηρών κλασμάτων ύστερα από λυοφιλοποίηση με διάλυμα EtOAc/MeOH 80/20. Στη

συνέχεια, μετά την έκπλυση το διάλυμα που λήφθηκε φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 15 min και προέκυψαν δύο φάσεις, μια EtOAc/MeOH (άνω) και μια υδατική (κάτω), καθώς στο πυθμένα συγκεντρώθηκε ίζημα NaCl. Αφού ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων, η άνω φάση αφού συμπυκνώθηκε, διαλυτοποιήθηκε σε MeOH και απεσταγμένο H<sub>2</sub>0, ώστε να αποκτήσει το τελικό δείγμα συγκέντρωση 4mg/mL. Έπειτα έγιναν δοκιμές DPPH και TPC στα παραπάνω κλάσματα ώστε να παρατηρηθεί σε πιο στάδιο σταματάει η δέσμευση βιοδραστικών συστατικών λόγω κορεσμού της ρητίνης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους Πίν.29, Πίν. 30:



Εικ. 64: Φάσεις που δημιουργούνται μετά από εκχύλιση του κλάσματος «Απόβλητο» με ΕtOAc/MeOH 80/20 & φυγοκέντρηση.

Πίν.29: Απο	τελέσματα κλαα	σμάτων 'Αποβ	Βλήτου' π	ειράματος	κλασματοποίι	ησης	; XAD -7	61 600 ml
								/

Κλάσμα	Μάζα (mg)
761WCa600fr1(100)	592.6
761WCa600fr2(100)	417.4
761WCa600fr3(100)	577.3
761WCa600fr4(100)	699.8
761WCa600fr5(100)	858.4
761WCa600fr6(100)	664.5
761WCa600fr7(50)	424.8
761WCa600fr1(100)U	34.0
761WCa600fr2(100)U	39.7
761WCa600fr3(100)U	36.0
761WCa600fr4(100)U	40.6
761WCa600fr5(100)U	37.2
761WCa600fr6(100)U	99.1
761WCa600fr7(50)U	59.3
761ECa600fr1(100)	120.6
761ACa600fr1(100)	332.6
761ACa600fr2(100)	33.5

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τα παραπάνω δεδομένα όσον αφορά στα κλάσματα 'Αποβλήτου' βλέπουμε ότι δεν μπορεί να προσδιοριστεί όριο κορεσμού καθώς οι τιμές ξ.β. είναι όλες κοντινές μεταξύ τους χωρίς να υπάρχει κάποια σημαντική αυξητική διαφοροποίηση στην ποσότητα οργανικού φορτίου που μεταφέρεται σε αυτά, ιδιαίτερα στα τελευταία κλάσματα. Την μέτρηση των 99.1 mg για τα τελευταία 100mL από τα συνολικά 600mL αποβλήτου, ακολούθησε μια μείωση στα 59.3 mg, (για το επόμενα 50 mL) γεγονός που επιβεβαιώνει το παραπάνω αρνητικό μας συμπέρασμα.

Όσον αφορά στο κλάσμα της "Εκπλυσης' (761ECa600fr1(100)) φαίνεται ότι απομακρύνεται σημαντική ποσότητα οργανικού φορτίου σε αυτό, αρκετά μεγαλύτερη από αυτήν που μετρήσαμε στην συγκριτική αξιολόγηση των ρητινών (4.4.8), στο οποίο εκτός από συστατικά που δεν έχουν προσροφηθεί ισχυρά στη ρητίνη, μπορει να περιέχει και υπολείμματα NaCl από τα οποία δεν απαλλαγήκαμε ικανοποιητικά μετά την εκχύλιση με AcOEt/MeOH 20% v/v. Επίσης στα κλάσματα 'Aποδέσμευσης' παρατηρείται για άλλη μια φορά ότι το κύριο μέρος των προσροφημένων στη ρητίνη συστατικών αποδεσμεύεται στα πρώτα 100 mL MeOH που χρησιμοποιούνται για αποδέσμευση τους, ενώ στα επόμενα 100 mL που χρησιμοποιούνται φαίνεται ότι τα επιπλέον συστατικά που αποδεσμεύονται - απομακρύνονται από τη ρητίνη είναι της τάξης του 10% αυτών που αποδεσμεύτηκαν κατά τα πρώτα 100 mL MeOH.

Πίν. 30: Αποτελέσματα δοκιμών DPPH & TPC στα κλάσματα του πειράματος κλασματοποίησης XAD - 761

6	0	0	m	n1
$\sim$	0	$\overline{\mathbf{v}}$	11	

Sample Code	Ολικό ξηρό βάρος (mg)	DPPH 4mg/ml	TPC mg GA/g
761WCa600fr1(100)	592.6	1.58	-2.48
761WCa600fr2(100)	417.4	1.47	0.17
761WCa600fr3(100)	577.3	-0.58	4.99
761WCa600fr4(100)	699.8	-0.42	5.45
761WCa600fr5(100)	858.4	8.67	8.93
761WCa600fr6(100)	664.5	7.45	12.30
761WCa600fr7(50)	424.8	5.13	8.35
	Οργανικό φορτίο (mg)		
761WCa600fr1(100)U	34.0	7.61	5.11
761WCa600fr2(100)U	39.7	12.29	15.56
761WCa600fr3(100)U	36.0	23.72	45.33
761WCa600fr4(100)U	40.6	23.02	59.00
761WCa600fr5(100)U	37.2	38.19	76.36
761WCa600fr6(100)U	99.1	18.38	47.67
761WCa600fr7(50)U	59.3	17.24	49.31
761ECa600fr1(100)	120.6	65.25	178.46
	222 6	01.55	202.44
761ACa600fr1(100)	332.6	91.57	203.44
761ACa600fr2(100)	33.5	92.33	173.63

<u>Αποτελέσματα</u>: Τα στοιχεία από τους *in vitro* ελέγχους υποστηρίζεται το συμπέρασμα που εξάγουμε από τις μετρήσεις των ξηρών βαρών, ότι δηλαδή δεν μπορεί να προσδιοριστεί το όριο κορεσμού της ρητίνης XAD-761 αφού παρατηρούμε ότι ακόμα και το τελευταίο κλάσμα 'Αποβλήτου' παρουσιάζει παρόμοιο χαμηλό ολικό φαινολικό φορτίο και παρόμοια χαμηλή αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH, πάντα σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης'. Ακόμα από τους in vitro ελέγχους σχετικά με το κλάσμα της Έκπλυσης' παρατηρείται σε αυτό τόσο ποσότητα φαινολικού οργανικού φορτίου όσο και αντιοξειδωτική δράση αυτού. Οπότε αυτή η συμπεριφορά δείχνει πως πιθανόν η προσρόφηση του οργανικού φορτίου δεν γίνεται σωστά, αλλά μέρος αυτού αντί να προσροφάται φαίνεται να παρακρατάται στα μεσοδιαστήματα της ρητίνης και για αυτό απομακρύνεται κατά την έκπλυση με νερό. Τα στοιχεία αυτά δεν οδηγήσαν στο να καταλάβουμε αν έχουμε κορεσμό της ρητίνης επομένως εφαρμόσαμε ένα επόμενο πείραμα.

Αξίζει να σημειωθεί πως λαμβάνοντας υπόψιν το συνολικό φαινολικό φορτίο των κλασμάτων 'Αποβλήτων', 'Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' παρατηρήσαμε πως ποσοστίαια χάνουμε περίπου το 10% του οργανικού φορτίου στο στάδιο αποβλήτου, δηλαδή στα κλάσματα 'Αποβλήτου', ενώ ένα 19,5% αυτού μεταφέρεται στο κλάσμα 'Έκπλυσης' και όπως φαίνεται μπορούμε με την συγκεκριμένη ρητίνη να επιτύχουμε ανάκτηση της τάξης 66,6% ως προς το οργανικό φορτίο που δεσμεύται στη ρητίνη και μεταφέρεται στο κλάσμα 'Αποδλήτου με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

# 4.8.5. 5<sup>η</sup> πορεία εύρεσης του ορίου κορεσμού - Πείραμα με όγκο αποβλήτου 1L

Αποφασίστηκε να γίνει 5° πείραμα προσδιορισμού του ορίου κορεσμού της ρητίνης XAD-761, κατά το οποίο αυτήν την φορά εκλούστηκε 1 L υδατικού αποβλήτου THR από 20mL ρητίνης, συλλέγοντας κλάσματα των 200mL κατά το 1ο στάδιο (κλάσματα 'Αποβλήτου'), των 100mL κατά το 2ο στάδιο (κλάσματα Έκπλυσης') και των 100mL κατά το 3ο στάδιο (κλάσματα 'Αποδέσμευσης'). Η πορεία επαναλήφθηκε τρείς φορές και είγε την εξής διαφορά σε σγέση με τις προηγούμενες 4 πορείες: μετά το πέρας 200mL υλικού THR κάθε φορά από τη στήλη, ακολουθούσε το στάδιο της έκπλυσης της στήλης με 100mL απεσταγμένου H2O ώστε να απομακρυνθεί από τη στήλη το NaCl που έχει επικαθίσει στη ρητίνη και συστατικά που προσροφούνται ασθενώς και παρεμποδίζουν την συνέχεια της έκλουσης. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε στη συνέχεια για τα κλάσματα 'Αποβλήτου' και Έκπλυσης' ήταν η ίδια που εφαρμόσαμε σε όλες τις προηγούμενες πειραματικές πορείες. Λυοφιλιοποίηση ώστε να απομακρυνθεί το H<sub>2</sub>O των κλασμάτων και στη συνέχεια έκπλυση των δειγμάτων με διάλυμα EtOAc/MeOH 80/20, ώστε να μεταφερθεί το οργανικό φορτίο στο διάλυμα απαλλαγμένο από NaCl. Στη συνέχεια, φυγοκέντρηση του διαλύματος που προέκυψε στις 4000 rpm για 15 min, σγηματισμός δύο φάσεων EtOAc/MeOH (άνω), υδατική (κάτω) μαζί με ίζημα NaCl. Αφού έγινε διαχωρισμός των δύο φάσεων, η άνω φάση του δείγματος συμπυκνώθηκε και διαλυτοποιήθηκε σε MeOH/H2O, ώστε να αποκτήσει το τελικό δείγμα συγκέντρωση 4mg/mL. Έπειτα έγιναν δοκιμές DPPH και TPC στο παραπάνω δείγμα ώστε να παρατηρηθεί σε πιο στάδιο σταματάει η δέσμευση βιοδραστικών συστατικών από τη ρητίνη και επομένως αυτά μεταφέρονται στο κλάσμα του αποβλήτου. Επίσης, μελετήθηκαν τα κλάσματα Έκπλυσης' ώστε να ελεγχθεί η αντιοξειδωτική συμπεριφορά των συστατικών που έχουν χαμηλότερη χημική συγγένεια με τη ρητίνη. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίν. 31. Επιπλέον όλα τα κλάσματα των στηλών b και c αναλύθηκαν με HPTLC για να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη συγκριτική εικόνα για όλα τα στάδια του πειράματος. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε συγκέντρωση 10 mg/mL και το σύστημα ανάπτυξης των TLC που χρησιμοποιήθηκε είναι DCM/MeOH 85/15 (Εικ. 65).

Δείγμα	ΣτήληΑ				ΣτήληΒ				ΣτήληC			
	Ξ.β.	DPPH	DPPH	TPC mg	Ξ.β.	DPPH	DPPH	TPC mg	Ξ.β.	DPPH	DPPH	TPC mg
(όπου n=a,b,c)	(mg)	200µg/	100µg/	GA/g	(mg)	200µg/	100µg/	GA/g	(mg)	200µg/	100µg/	GA/g
		ml	ml	(4mg/m		ml	ml	(4mg/m		ml	ml	(4mg/m
				1)				1)				1)
761WCn1fr1(200)	21.8	22.93		33.98	37.90	10.88		25.31	64.00	5.23		13.82
761WCn1fr2(200)	36.5	33.52		82.43	41.30	44.10		91.17	42.90	45.06		92.42
761WCn1fr3(200)	9.5	14.28		60.14	31.10	21.81		88.47	30.00	16.49		64.32
761WCn1fr4(200)	90.8	24.05		88.03	52.50	26.32		83.52	59.60	21.79		68.68
761WCn1fr5(200)	31.1	7.77		38.47	31.20	16.96		68.68	34.90	15.60		66.27
761ECn1fr1(100)					77.50	32.64		134.03	14.70	21.72		122.42
761ECn1fr1(100)	Τα κλάσ	ματα Έκπί	λυσης' της	στήληςΑ	87.50	43.43		196.04	50.90	39.39		192.72
761ECn1fr1(100)	δεν μελετήθηκαν				46.60	27.79		176.56	81.20	32.06		184.51
761ECn1fr1(100)					29.60	31.02		206.35	9.00	31.86		183.42
761ECn1fr1(100)					85.10	38.86		186.64	83.50	17.37		116.83
761ACn1fr1(100)	324.4	82.19	58.76	185.36	292.80	86.13	59.61	196.00	275.40	88.35	61.75	195.64
761ACn1fr1(100)	29.2	84.17	58.25	173.95	31.40	91.53	67.27	183.84	30.40	86.02	59.52	181.07
761ACn1fr1(100)	20.5	77.64	48.59	172.61	21.90	83.03	50.47	174.40	20.40	89.21	62.55	176.79

Πίν. 31: Αποτελέσματα βιολογικών DPPH & TPC στα κλάσματα του πειράματος κλασματοποίησης XAD - 761 1 L



Εικ. 65: Προφίλ κλασμάτων 'Αποβλήτου', Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' πειράματος 1L/20ml ρητίνης XAD – <u>761, Στήλες b και c, με τη χρήση HPTLC. Παρατήρηση TLC στα 254nm, 366nm και στο ορατό μετά από</u> <u>γεκασμό σε αντιδραστήριο θεϊικής βανιλλίνης.</u>

<u>Αποτελεσματα</u>: Αρχικά επισημαίνουμε την καλή επαναληψιμότητα της όλης διαδικασίας παρατηρώντας τα αντίστοιχα αποτελέσματα και των τριών στηλών (a,b,c) της XAD-761 στον Πίν. 29 και στην Εικ.63.

Διαφαίνεται ότι στα κλάσματα Έκπλυσης' υπάρχει σημαντική απώλεια φαινολικού φορτίου (οι τιμές TPC είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης'), η οποία όμως δεν συνδυάζεται με μια επακόλουθη σημαντική αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH, πάντα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης', ώστε να προκύπτουν αξιόπιστα συμπεράσματα ως προς το κορεσμό της ρητίνης.

Τα δεδομένα της πολύ χαμηλής αντιοξειδωτικής δράσης όλων των κλασμάτων 'Αποβλήτου' (μέχρι και την ολοκλήρωση της έκλουσης του 1L αποβλήτου από τα 20 mL της XAD-761) εξασθενίζουν την υπόθεση που θα υποστήριζε ότι επειδή κατά τις διαδοχικές εκπλύσεις (100mL H<sub>2</sub>O) μετά από κάθε έκλουση 200mL αποβλήτου από την ρητίνη, απελευθερώνεται συνεχώς ένα σημαντικό μέρος της λειτουργικής επιφάνειας της ρητίνης και επίτευξης με αυτόν τον τρόπο της συνεχούς δέσμευσης νέων ποσοτήτων συστατικών του αποβλήτου, που θα αμφισβητούσε έτσι την αξιοπιστία της 5ης πορείας που ακολουθήσαμε για την εύρεση του ορίου κορεσμού της XAD-761.

Επιπρόσθετα τα δεδομένα του πειράματος επαληθεύουν τα συμπεράσματα που εξάγαμε στο τμήμα της συγκριτικής μελέτης των οκτώ ρητινών, με κύριο το ότι στην ρητίνη XAD-761 υπάρχει σημαντική απώλεια Tyr-OH στα 2α στάδια των Εκπλύσεων, αλλά όχι στα 1α στάδια των Εκλούσεων, γεγονός το οποίο μεταφράζεται σε μεγαλύτερες τιμές TPC και σε ισχυρότερη αναστολή DPPH στα κλάσματα Έκπλυσης' σε σχέση με τα κλάσματα 'Αποβλήτου'. Επίσης επαληθεύεται ότι οι σημαντικότερες απώλειες κατά το στάδιο της Έκπλυσης αντιστοιχούν σε μεταβολίτες/ομάδες μεταβολιτών που εμφανίζονται στις κηλίδες B,C και D των αντίστοιχων HPTLC των

#### Еік. 53, 55.

Τέλος, στα κλάσματα της αποδέσμευσης φαίνεται πως όλο το φορτίο που έχει προσροφηθεί στη ρητίνη κατά τη περάτωση της διαδικασίας, αποδεσμεύεται και συγκεντρώνεται στο κλάσμα κυρίως των πρώτων 100mL MeOH που διέρχονται από τη στήλη. Από την HPTLC επιβεβαιώνεται η σοβαρή απώλεια Tyr-OH στα κλάσματα Έκπλυσης', αλλά και η ερμηνεία που δώσαμε στην **4.6** για το δεδομένο ότι η XAD-761 όπως και XAD-7HP, παρουσιάζουν μικρότερες μάζες 'Αποδέσμευσης'. Βλέπουμε στα δύο τελευταία κλάσματα των 100mL της Αποδέσμευσης τα κύρια συστατικά ανήκουν σε πολικές (πιθανώς και μεγαλομοριακές) ενώσεις που δεν αναπτύσονται σε δ/τη ανάπτυξης DCM/MeOH 15%.

Τα παραπάνω αντιφατικά αποτελέσματα των πέντε πορειών που ακολουθήσαμε για να προσδιορίσουμε τον μέγιστο όγκο υλικού που μπορεί να εκλουστεί από έναν συγκεκριμένο όγκο ρητίνης XAD-761, ώστε να διατηρηθεί η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης (σημείο κορεσμού της ρητίνης) δημιούργησαν την υποψία είτε για πιθανή μερική αποικοδόμηση της ρητίνης κατά την διάρκεια της διαδικασίας,. Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε να γίνουν συνολικά έλεγχοι *in vitro* της αναστολής DPPH και ολικού φαινολικού φορτίου (TPC) των *procedural blanks* (τυφλά δείγματα) των ρητινών, αναλυτικός έλεγχος των *procedural blanks* όλων των ρητινών αλλά και ιδιαίτερα του *activation blank* (δείγμα από την διαδικασία ενεργοποίησης της ρητίνης) της XAD-761 με LC-HRMS.

#### 4.9. Πείραμα των procedural Blanks όλων των ρητινών

Για το πείραμα procedural Blank των ρητινών προετοιμάστηκε μία στήλη με 20mL ρητίνης για καθένα από τους ακόλουθους τύπους: Amberlite XAD – 4, 7HP, 18N, 1180, 1600, 16N, 16HPN και 761. Ως υλικό προς επεξεργασίας χρησιμοποιήθηκε νερό (50mL), ενώ επαναλήφθηκε η όλη διαδικασία δέσμευσης - αποδέσμευσης που εφαρμόστηκε στα παραπάνω πειράματα συλλέγοντας κλάσματα 'Αποβλήτου', 'Έκπλυσης', 'Αποδέσμευσης', δηλαδή διήλθαν από κάθε στήλη 100mL νερού, το οποίο συλλέχθηκε ως 'Απόβλητο', 100mL απεσταγμένου H<sub>2</sub>O, ως 'Έκπλυση' και 100mL MeOH, το οποίο συλλέχθηκε ως 'Αποδέσμευση' (procedural Blank). Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου περισυλλογής κλασμάτων αντιστοιχεί σε περίπου 60min για το στάδιο δέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποβλήτου' και 90min για το στάδιο της αποδέσμευσης και τη συλλογή του κλάσματος 'Αποδέσμευσης'. Στόχος του παρόντος πειράματος είναι η μελέτη των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης'. Τα αποτελέσματα του πειράματος παρατίθενται στον Πίν. 32:

Κλάσμα	ξ.β. μετά τη λυοφιλοποίηση/συμπ ύκνωση (g)
4ABlank	3.3
7ABlank	2.1
18ABlank	4.8
1180ABlank	13.9
1600ABlank	1.9
16NABlank	18.5
16HPNABlank	12.2
761ABlank	<u>19.1</u>

Πίν.	32:	Αποτελέσ	ματα	πειρά	ματος	procedural	Blank	ρητινών

**Αποτελέσματα:** από τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος στα procedural Blanks των ρητινών φαίνεται ότι όλα τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' παρουσιάζουν κάποια απόδοση, η οποία κυμαίνεται από 2 εως 20 mg, που σημαίνει ότι παρά του ότι το αρχικό υλικό (νερό) δεν έφερε προς προσρόφηση συστατικά κατά το στάδια αποδέσμευσης με MeOH λαμβάνει χώρα κάποια αποδέσμευση/ απομάκρυνση συστατικών ή λειτουργικών ομάδων του πολυμερούς της ρητίνης XAD–761, γεγονός το οποίο παρατηρείται και οπτικά καθώς η ξηρή μορφή των κλασμάτων αποδέσμευσης έχουν λευκό χρώμα για τις ρητίνες XAD – 4, 7HP, 18N, 1180, 1600, 16N, 16HPN και
κίτρινο χρώμα για τη ρητίνη XAD-761. Στη συνέχεια τα κλάσματα της 'Αποδέσμευσης' μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση και το ολικό φαινολικό φορτίο που φέρουν με τις μεθόδους DPPH και TPC.

# 4.9.1. Βιολογικές δοκιμές DPPH & TPC κλασμάτων «Αποδέσμευσης» procedural Blank ρητινών

Εφαρμόσαμε την ίδια διαδικασία ελέγχου DPPH και TPC για όλες τις υπό σύγκριση ρητίνες. Όλες οι συνθήκες ήταν ταυτόσημες με αυτές της κανονικής διαδικασίας. Στη συνέχεια ελέγξαμε τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' των τυφλών πειραμάτων στις δοκιμές DPPH και TPC. Τα αποτελέσματα των παραπάνω φαίνονται στον Πίν. 33:

Ρητίνη	Αποδέσμευση (mg)	DPPH 200µg/ml	TPC mg GA/g
4ABlank	3.3	13.22	5.26
7ABlank	2.1	1.91	4.58
18ABlank	13.9	6.19	1.93
1180ABlank	4.8	0.45	4.85
1600ABlank	1.9	3.66	6.45
16NABlank	18.5	-2.68	2.18
16HPNABlank	12.2	-0.99	2.24
761ABlank	19.1	95.09	161.11

Πίν. 33: Αποτελέσματα βιολογικών μελετών DPPH και TPC κλασμάτων Άποδέσμευσης' procedural Blank ρητινών.

<u>Αποτελέσματα</u>: Από τις αποκρίσεις των ελέγχων DPPH και TPC φαίνεται πώς τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' των procedural Blanks των ρητινών XAD-4, -7HP, -18N, -1180, -1600, -16N και -16HPN δεν παρουσιάζουν καμία αντιοξειδωτική δράση, όπως και μηδενικό ολικό φαινολικό φορτίο, όπως αναμενόταν. Αντιθέτως, το κλάσμα procedural Blank της ρητίνης XAD-761 παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικό φορτίο. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχει μερική αποικοδόμηση του πολυμερούς (bleeding). Το γεγονός ότι οι αποκρίσεις DPPH και TPC του κλάσματος procedural Blank 'Αποδέσμευση' της XAD-761, 95% & 161 mg GA/g, είναι όμοιες με τις αποκρίσεις του κλάσματος 'Αποδέσμευσης' του υδατικού αποβλήτου THR, 89% & 141 mg GA/g, δημιουργεί το ερώτημα για το αν τελικά οι αποκρίσεις του ενδιαφέροντος κλάσματος αντιστοιχούν

στα βιοδραστικά συστατικά που έχουν προσροφηθεί από το υδατικό απόβλητο ή αν τελικά οφείλονται σε άλλες ουσίες – ξένες προς τα συστατικά του αποβλήτου THR - και αν ισχύει η δεύτερη περίπτωση τότε ποιά είναι η αναλογία βιοδραστικών συστατικών που έχουν προσροφηθεί - αποδεσμευτεί από τη ρητίνη. Με σκοπό να απαντηθούν τα προαναφερόμενα ερωτηματικά αποφασίστηκε να γίνει ανάλυση LC-HRMS-TOF των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' και των procedural Blanks όλων των ρητινών. Επίσης ανάλυση δείγματος από την διαδικασία ενεργοποίησης της XAD-761.

# 4.10. LC-HRESI-MS ανάλυση των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' και των 'τυφλών' (*procedural blanks*) όλων των ρητινών

Λήφθηκαν δείγματα από τα κλάσματα αποδέσμευσης τόσο των 'procedural blank' όσο και των τελικών κλασμάτων 'Aποδέσμευσης' των ρητινών από τις οποίες διήλθε υλικό προς επεξεργασία, καθώς επίσης λήφθηκε δείγμα από το υπερκείμενο υγρό της αποθηκευμένης ρητίνης XAD – 761 (activation blank). Σκοπός αποτέλεσε η επεξεργασία των δειγμάτων με τη τεχνική LC-MS ώστε να ληφθεί ένα προφίλ των περιεχόμενων συστατικών σε αυτά τα κλάσματα, καθώς και για τη σύγκριση των κλασμάτων. Επίσης, η επεξεργασία αποσκοπούσε στο να φανεί αν υπάρχει πιθανή παρεμβολή του ίδιου του υλικού της ρητίνης στα τελικά αποτελέσματα, κυρίως για τη ρητίνη XAD - 761. Από το LC-MS, ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, 3,4-διυδροξυβενζοικό οξύ, κουμαρικό οξύ, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ολεοσίδης, 11-μεθυλεστέρας ολεοσίδη και η ολευρωπείνη. (**Εικ. 66-75**) Στη συνέχεια, τα δεδομένα από το LC-MS επεξεργάστηκαν στατιστικά (PCA) με σκοπό να γίνει πρώτη σύγκριση του περιεχομένου των κλασμάτων αποδέσμευσης των διαφορετικών ρητινών. Τα αποτελέσματα παρατίθε-νται στη συνέχεια.

# Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες στα κλάσματα «Αποδέσμευσης» με LC-HR(ESI-)-MS και σάρωση μη-στοχευμένης ανάλυσης

Στη συνέχεια παρατίθεται η διαδικασία ταυτοποίηση των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα, μετά από επεξεργασία με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν. Στο σημείο αυτό είναι αναγκαίο να σημειωθεί ότι και οι δέκα μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στα πλαίσια της σάρωσης της μη-στοχευμένης ανάλυσης, ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' (samples) και όλοι με πολύ υψηλά επίπεδα αξιοπιστίας (1 ή 2a). Η ταυτοποίηση μιάς ουσίας στο επίπεδο αξιοπιστίας 1, γίνεται μόνο αν υπάρχει πρότυπο δείγμα της συγκεκριμένης ουσίας στο εργαστήριο που γίνεται η ανάλυση, ώστε να μπορεί να αναπαραχθεί στις ίδιες συνθήκες το φάσμα μάζας της. Στο επίπεδο αξιοπιστίας 2a φτάνει μια ταυτοποίηση για μια ουσία, όταν δεν υπάρχει πρότυπο δείγμα της ουσίας, αλλά το φάσμα μάζας της συγκεκριμένης ουσίας υπάρχει στην βιβλιογραφία ή/και σε βάσεις δεδομένων δημόσιες ή ιδιωτικές και υπάρχει καλή συσχέτιση (με όρια αξιοπιστίας) σε παραμέτρους όπως t<sub>R</sub>, ισοτοπικό μοτίβο, MS/MS θραυσματοποίηση, προϊόντα προσθήκης (adducts).



Εικ. 66: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Τυροσόλη (C8H10O2, MW 138.16 g/mol, CAS No 501-94-0)



Εικ. 67: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Υδροζυτυροσόλη (C8H10O3, MW 154.16 g/mol, CAS No 10597-60-1)



Εικ. 68: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη 3,4 – διυδροζυβενζοικό οζύ (πρωτοκατεχικό οζύ, C7H6O4, MW 154.12 g/mol, CAS No 99-50-3)



Εικ. 69: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη π-Κουμαρικό οξύ (C9H8O3, MW 164.16 g/mol, CAS No 501-98-4)



#### Εικ. 70: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Βανιλλικό οξύ (C8H8O4, MW 168.15 g/mol, CAS No 121-34-6



**Εικ. 71:** Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Δαφνετίνη (7,8 Διϋδροξυ-κουμαρίνη, C9H6O4, MW 164.16 g/mol, CAS <u>No 468-35-1</u>



Εικ. 72: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Καφεϊκό οξύ (C9H8O4, MW 180.16 g/mol, CAS No 331-39-5)



Εικ. 73: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Ολεοσίδη (C16H22O11, MW 390.34 g/mol, CAS No 178600-68-5)



Εικ. 74: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη 11-μέθυλεστέρας του Ολεοσίδη (C17H24O11, MW 404.37 g/mol, CAS No

60539-23-3



Εικ. 75: Ταυτοποίηση του μεταβολίτη Ολευρωπεινη(C25H32O13, MW 540.52 g/mol, CAS No 32619-42-4)



Εικ. 76: Γραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων LC-MS σύγκρισης των δειγμάτων Αποδέσμευσης, με PCA.

<u>Αποτελέσματα</u>: Σε επίπεδο 1 ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες Τυροσόλη, Υδροξυτυροσόλη, π-Κουμαρικό οξύ, Βανιλλικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, ενώ στο επίπεδο 2a ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες Ολεοσίδης, 11-μεθυλεστέρας του Ολεοσίδη, Ολευρωπεϊνη, Δαφνετίνη και 3,4 διϋδροξυβενζοϊκό οξύ.

Στο διάγραμμα PCA φαίνεται ότι από την μέχρι τώρα στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων των φασμάτων LC-HRMS, οι ρητίνες κατηγοριοποιούνται σε 5 ομάδες, με βάση και τις ποιοτικές αλλά και τις ποσοτικές διαφοροποιήσεις των εκατοντάδων μεταβολιτών που ανιχνεύονται στα κλάσματα 'Αποδέσμευσης'. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι ρητίνες XAD-16N και XAD-18, στην δεύτερη ομάδα οι ρητίνες XAD-1600, XAD-1180 και XAD-16HPN, ενώ ξεχωριστές ομάδες αποτελούν η κάθε μια από τις XAD-7HP, XAD-761 και XAD-4. Επιβεβαιώνονται δηλαδή από την μέχρι τώρα στατιστική ανάλυση, τα αποτελέσματα που έχουμε από τις αναλύσεις των οργανικών φορτίων που προσροφήθηκαν στις ρητίνες (με HPTLC, την DPPHβιοαυτογραφική μέθοδο και τον έλεγχο TPC), οι διαφοροποιήσεις των XAD-761 και XAD-7HP. Για τις άλλες ομαδοποιήσεις που μας δείχνει η PCA, πρέπει να προχωρήσει η ανάλυση των LC-HRMS πειραματικών δεδομένων, να ανιχνευτούν και να ταυτοποιηθούν πολλοί περισσότεροι μεταβολίτες από τα κλάσματα «Αποδέσμευσης», να γίνει προσπάθεια ποσοτικοποίησης κάποιων από αυτούς (π.χ.των λιγνανίων που απ'όσο γνωρίζουμε δεν έχουν ανιχνευτεί από κανένα άλλο απόβλητο εκπίκρανσης) για να μπορέσουμε να τα συνδυάσουμε αξιόπιστα με τα αποτελέσματα της μελέτης που έγινε με την HPTLC και τους αντιοξειδωτικούς ελέγχους.

# 4.10.1. Ανίχνευση περιεχόμενων συστατικών στα επεξεργασμένα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' με LC-HR(ESI-)-MS (στοχευμένη ανάλυση)

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έλαβε χώρα μια διαδικασία εντοπισμού οκτώ μεταβολιτών,, οι οποίοι είχαν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από το ίδιο αρχικό υλικό (απόβλητο THR), σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής ομάδας (Μακρυγιαννάκης Μ., Μ.Δ.Ε., Τμ. Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, 2016), στα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' που προέκυψαν από την επεξεργασία με τις ρητίνες, που. Οι μεταβολίτες που ελέγχθησαν είναι οι εξής:

Μεταβολίτης 1 (9-O-Ακετυλο τυροσόλη,  $C_{10}H_{12}O_3$ , MW 180.08 g/mol)

Μεταβολίτης 2 (Κατεχόλη, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, MW 110.04 g/mol)

Μεταβολίτης 3 (4-Μεθυλο-1,2-διΰδροξυβενζόλιο,  $C_7H_8O_2$ , MW 124.05 g/mol)

Μεταβολίτης 4 (Φαινυλοπροπανοϊκό οξύ,  $C_9H_{10}O_2$ , MW 150.07 g/mol)

Μεταβολίτης 5(1-Ακετοξυπινορεζινόλη, C22H24O8, MW 416.15 g/mol)

**Μεταβολίτης 6** (6-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διοξοδικυκλο [3.3.0] οκταν-2-όνη,  $C_{13}H_{14}O_5$ , MW 250.08 g/mol)

Μεταβολίτης 7 (Πινορεζινόλη, C20H22O6, MW 358.14 g/mol)

Μεταβολίτης 8 (Κυκλοολιβίλη, C7H8O2, MW 376.15 g/mol)



Εικ. 77: Ανίχνευση του Μεταβολίτη 1 (9-Ο-ακετυλοτυροσόλη, C10H12O3, MW 180.08 g/mol)



Comment: m/z 109.0295 This peak does not exist in the provided vial (labelled as isolated metabolite 2)

Εικ. 78: Μεταβολίτης 2 (Κατεχόλη, C6H6O2, MW 110.04 g/mol)

#### Isolated Metabolite 3





#### Comment:

m/z 123.0045, t<sub>n</sub>= 5.01 min This does not exist in any samples neither its blanks (the experimental R between the isolated metabolite does not match to the one we have in the samples), this peak in the samples could be a fragment of other compounds...

Εικ. 79: Ανίχνευση του Μεταβολίτη 3 (4-μέθυλο-1,2-διΰδρόξυβενζόλιο, C7H8O2, MW 124.05 g/mol)



Comment: m/z 149.0608,  $t_{g}$ = 4.40 min This does not exist in any samples neither its blanks (the experimental tR of the isolated metabolite does not match to the one we have in the samples), it could be the fragment of other compounds...

Εικ. 80: Ανίχνευση Μεταβολίτη 4 (Φαινυλοπροπανοϊκό οξύ, C9H10O2, MW 150.07 g/mol)



Εικ. 81: Ανίχνευση του Μεταβολίτης 5 (1-Ακετοξυπινορεζινόλη, C22H24O8, MW 416.15 g/mol)







Εικ. 83: Ανίχνευση του Μεταβολίτη 7 (Πινορεζινόλη, C20H22O6, MW 358.14 g/mol)



#### Εικ. 84: Ανίγνευση του Μεταβολίτη 8 (Κυκλοολιβίλη, C7H8O2, MW 376.15 g/mol)

Αποτελέσματα: Ο μεταβολίτης 1 (9-Ο-Ακετυλοτυροσόλη) ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα του κλάσματος 'Αποδέσμευσης' της XAD-761, ανιχνεύτηκε όμως και στο τυφλό' δείγμα από την ίδια ρητίνη, χωρίς να ανιχνεύεται στο δείγμα της ενεργοποίησης (activation blank) της XAD-761. Η αξιοπιστία ταυτοποίησης παρέμεινε στο επίπεδο 4, αφού δεν μπόρεσε να επιτευγθεί αποδεκτά αξιόπιστη συσγέτιση των θραυσμάτων MS/MS με τα αντίστοιχα των βάσεων δεδομένων. Ο μεταβολίτης 2 δεν ανιχνεύτηκε καν στο δείγμα λόγω της μικρής αρχικής του (κατεχόλη) συγκέντρωσης και των αραιώσεων που προηγήθηκαν της ανάλυσης.. Για τον μεταβολίτη 3 (4-μέθυλο-1,2-διϋδροξυβενζόλιο), δεν έγινε κατορθωτό να διευκρινιστεί με ασφάλεια αν το διαγνωστικό θραύσμα m/z =123.0045amu από την ανάλυση του απομονωμένου μεταβολίτη, που ανιχνεύτηκε και στα δείγματα των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' όλων των ρητινών, είναι το μοριακό ιόν της ουσίας ([M-H]<sup>-</sup>) ή προϊόν από την θραυσματοποίηση κάποιας άλλης ουσίας στην οποία ανήκει ως τμήμα της δομής της (substructure). Επιπρόσθετα, τα πειραματικά t<sub>R</sub> του θραύσματος στην ανάλυση του απομονωμένου μεταβολίτη και σε αυτήν του κλάσματος 'Αποδέσμευσης' δεν είχαν καλή συμφωνία. Το γεγονός ότι υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση με άλλα 4 θραύσματα από την in silico θραυσματοποίηση του μεταβολίτη 3, δεν αλλάζει το παραπάνω συμπέρασμα. Πάντως το θραύσμα αυτό δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα «τυφλά» δείγματα. Για τον μεταβολίτη 4 (φαινυλοπροπανοϊκό οξύ) ισχύουν ακριβώς

τα ίδια με τον μεταβολίτη 3. Εδώ το διαγνωστικό ιόν είναι το m/z=149.0608amu που πάλι δεν μπορούμε να διευκρινίσουμε αν είναι το μοριακό ιόν του φαινυλοπροπανοϊκού οξέος ή αν προέργεται από την θραυσματοποίηση κάποιας άλλης ουσίας. Στην δεύτερου επιπέδου θραυσματοποίηση ταυτοποιήθηκε το ιόν m/z=59.0142amu που αντιστοιχεί στο [CH<sub>2</sub>COOH<sup>--</sup>] του μεταβολίτη 4, αλλά από μόνο του δεν θεωρείται αρκετό για να γίνει ταυτοποίηση του μεταβολίτη. Για τον μεταβολίτη 5 (1ακετοξυπινορεζινόλη) που ανιχνεύτηκε στα κλάσματα «Αποδέσμευσης» όλων των ρητινών (και καθόλου στα «τυφλά») η αξιοπιστία της ταυτοποίησης παρέμεινε στο επίπεδο 4, γιατί δεν επετεύχθη η περαιτέρω ταυτοποίηση του μεταβολίτη, μέσω ενός αξιόπιστου δεύτερου ή/και τρίτου επιπέδου θραυσματοποίησης (MS<sup>2</sup> ή/και MS<sup>3</sup>) στα 'Αποδέσμευσης'. Ο μεταβολίτης 6 (6-(3-μεθοξυ-4-υδροοξυ-3κλάσματα μεθοξυφαινυλο)-3,7-διοόξα-δικυκλο [3.3.0] οκταν-2- όνη) ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα και σε κανένα 'τυφλό', παρόλα αυτά η αξιοπιστία δεν ξεπέρασε το επίπεδο 4 γιατί δεν μπόρεσε να γίνει αξιόπιστη σύγκριση του MS/MS του δείγματος του μεταβολίτη με τα αντίστοιχα των δειγμάτων των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' λόγω της μικρής αφθονίας που είγαν αυτά στα κλάσματα 'Αποδέσμευσης'. Για τον μεταβολίτη 7 (Πινορεζινόλη), παρόλο που το μοριακό ιόν ήταν καθαρό στο δείγμα του απομονωμένου μεταβολίτη ([M-H]<sup>-</sup> m/z = 357.1344 amu,  $t_r = 6.30 min$ ) δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' (ούτε στα «τυφλά»). Ο μεταβολίτης 8 ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα και σε κανένα «τυφλό», παρόλα αυτά η αξιοπιστία δεν ξεπέρασε το επίπεδο 4 γιατί δεν μπόρεσε να γίνει αξιόπιστη σύγκριση του MS/MS του δείγματος του μεταβολίτη με τα αντίστοιχα των δειγμάτων των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' λόγω της μικρής αφθονίας που είχαν αυτά στα κλάσματα 'Αποδέσμευσης'.

# 4.10.2. LC-HRMS ανάλυση των «τυφλών» δειγμάτων (procedural blanks) των ρητινών

Οι ίδιες ακριβώς συνθήκες χρωματογραφικής έκλουσης και ιοντισμού (με ίδιες συνολικά όλες τις παραμέτρους φασματογράφου μάζας, όπως στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε για τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης') εφαρμόστηκαν και για την ανάλυση των 'τυφλών' δειγμάτων. Το διάγραμμα ροής για την ταυτοποίηση των ουσιών στα «τυφλά» ήταν αυτό της σάρωσης στοχευμένης ανάλυσης. Παραθέτουμε στην συνέχεια τα ολικά χρωματογραφήματα ιόντων των «τυφλών» δειγμάτων όλων των ρητινών (και του 'τυφλού' ενεργοποίησης, *activation blank* ειδικά της XAD-761), με βάση τις ουσίες ( το Μοριακό τους Βάρος και τους χρόνους έκλουσης) των οποίων διερευνήθηκε η παρουσία στα κανονικά δείγματα. Για την απαραίτητη σύγκριση παραθέτουμε και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα ιόντων των ταυτοποιημένων ουσιών.

#### <u>1. Τυροσόλη</u>

# Α. Τυφλά δειγματα





# 2. Υδροξυτυροσόλη

# Τυφλά δείγματα





### 3. 3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ

### Τυφλά δείγματα





# <u>4. π-Κουμαρικό οξύ</u>

# Τύφλα δείγματα





#### 5. Βανιλλικό οξύ

# Τυφλά δείγματα





#### <u>6. Δαφνετίνη</u>

### Τυφλά δείγματα





## <u>7. Καφεϊκό οξύ</u>







### 8. Ολεοσίδης

# Τυφλά δείγματα





### 9. 11-μεθυλεστέρας του Ολεσίδη

# Τυφλά δείγματα





# <u>10. Ολευρωπεϊνη</u>

# Τυφλά δείγματα





#### 11. Μεταβολίτης 1 (Ο-ακέτυλοτυροσόλη, C10H12O3)



# Τύφλα δείγματα



Δείγματα Αποδέσμευσης



207

#### 12. Μεταβολίτης 3 (4-μέθυλο-1,2-διϋδροξυβενζόλιο, C7H8O2)



# Τυφλά δείγματα





### 13. Μεταβολίτης 5 (1-ακετοξυ-Πινορεσινόλη)



# Τυφλά δείγματα



# Δείγματα Αποδέσμευσης



209



# Τυφλά δείγματα



# Δείγματα Αποδέσμευσης



210

# 15. Μεταβολίτης 8 (Κυκλοολιβίλη)



Τυφλά δείγματα



Intens.	sample 16HPN 10f RB3 01 32210 d: EC 374	5 1449+0 005 - All MS
x10 <sup>4</sup> :		
0.5	4.2 (10)	
Intens.	sample 16N 10f PB6 01 32213 d EIC 37	5 1449+0 005 - All MS
4000		
4000	4.2 mn	
2000 -		
. 1		
Intens.	sample 761 10f BB7 01 32214 d: EC 37	5 1449+0 005 -All MS
x104 -		
	4.2 (10)	
1-		
0		
Intens.	sample 1180 10f BC1 01 32216 d: EC 37	5 1449+0 005 - All MS
	- 42 min	
6000 -		
4000 -		
2000 -		
Intens.	sample XAD4 10f RB8 01 32215.d: EC 37	5.1449±0.005 -All MS
x10 <sup>4</sup>	42 min	
0.5 -		
0.0 -		
Intens	sample_XAD18_10f_RB2_01_32209.d: EIC 37	5.1449±0.005 -All MS
	4.2 min	
4000 -		
2000 -		
0 1		
Intens.	sample_XAD1600_10f_RB4_01_32211.d: EIC 37	5.1449±0.005 -All MS
6000 -	4.2 min	
4000 -		
2000 -		
0		
Intens.	sample_7_10f_RB5_01_32212.d: EIC 37	5.1449±0.005 -All MS
x104	4.3 min	
1.0 -		
0.5		
0.0		
0.0	0 2 4 6 8 10 12	Time (min)
-		

#### PCA

son of Procedural blanks of the Resins used to treat olive drupes based on their chemical profile obtained by LC-HRMS A quick qualitative comparison: All the procedural blank of the used resins a blank\_1180 are significantly different from each other Blank 16HPN with the exception to "blank resin 7" and a blank\_16N "blank resin XAD1600" as well as "blank a blank\_7 resin-761" and "blank resin 16N". a blank 701 There is significant difference between a blank\_activation\_76 PC2 (13.3% explained var.) procedural blank of resin 761 and its blank\_XAD1600 activated one. blank XAD18 a blank\_XAD4 PCA So K 7 501 PC1 (29.0% explained var.)

Εικ. 85: PCA για τα δείγματα procedurar Blnak των ρητινών

# **Cloud plot**

Comparison of Procedural blank of the Resin-761 and its activated procedural blank 246 masses were found to be statistically (p-value <0.001 and log2Fold changes >3) different between two batches.



The color of a feature depends on the fold change (log commandment intensity): reactive withing ner fold change (or nginer intensity) with have larger radii.
 The color of a feature depends on how high or low the feature's p-value is within all the graphed features. Thus, features that have low p-value will appear
dark while features with high p-value will be light.

**Αποτελέσματα:** Στο 'τυφλό' (procedural blanks) δείγμα της XAD-761, ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι εξής μεταβολίτες: α) π-κουμαρικό οξύ και ισομερή του β) ισομερή βανιλλικού οξέος γ) Δαφνετίνη ή ισομερή της δ) καφεϊκό οξύ ε) ο-ακέτυλοτυροσόλη. Στο 'τυφλό' ενεργοποίησης (activation blank) της ίδιας ρητίνης ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες: α) 3,4 διϋδροξυβενζοϊκό οξύ και β) βανιλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ισχυρές ενδείξεις ότι η ρητίνη είτε παρουσιάζει σοβαρό κατασκευαστικό πρόβλημα και άρα αποδομείται σταδιακά κατά την διάρκεια των εκλούσεων. Στον χάρτη PCA φαίνεται πάντως ότι κάθε procedural blank έχει σημαντικές διαφορές από όλα τα υπόλοιπα εκτός από το ζεύγος XAD-761 με την XAD-16N και το ζεύγος XAD-7HP με την XAD-1600.

#### 4.11. Συνολικά Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

- Έγινε επεξεργασία του υδατικού απόβλητου ξηράλατης Θρούμπας Θάσου με 8 διαφορετικούς κατασκευαστικά και φυσικοχημικά τύπους ρητινών Amberlite XAD, τις XAD-4, 7HP, 1180, 1600, 16N, 16HPN, 761 και 18, στα πλαίσια της προσπάθειας της ερευνητικής μας ομάδας για την εύρεση μιας αποτελεσματικής μεθόδου για την απαλλαγή του αποβλήτου από το NaCl και ταυτόχρονα την παραλαβή ενός συμπυκνώματος εμπλουτισμένου σε φαινόλες με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.
- Η επεξεργασία περιέλαβε τρία στάδια. Τα στάδια της Έκλουσης, της Έκπλυσης και της Αποδέσμευσης. Για κάθε διαφορετικό τύπο ρητινών πληρώθηκαν 6 στήλες για να υπάρχει αξιόπιστη επαναληψιμότητα και προέκυψαν συνολικά 48 κλάσματα για κάθε ένα από τα στάδια Έκλουσης', Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' των οποίων αξιολογήθηκε το χημικό φορτίο με HPTLC και τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (TPC), ενώ η αντιοξειδωτική τους δράση αξιολογήθηκε με τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ελύθερης ρίζας DPPH (in vitro και με βιοαυτογραφία).
- Εφαρμόσαμε δύο διαφορετικές μεθόδους για να υπολογίσουμε το Ολικό Οργανικό Φορτίο (Ο.Ο.Φ) του αποβλήτου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο όγκο του (50.0mL). Στην πρώτη, λυοφιλοποιήσαμε και στην συνέχεια εκπλύναμε με AcOEt/MeOH (20% v/v), ενώ στην δεύτερη εφαρμόσαμε στο αρχικό ογκομετρημένο απόβλητο υγρή-υγρή εκχύλιση διαδοχικά με AcOEt και n-BuOH. Τα αποτελέσματα είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ τους. Η λυοφιλοποίηση απέδωσε 430.6 mg από 50.0 mL αρχικού υλικού, ενώ η υγρή-υγρή εκχύλιση 73.6 mg από 50.0 mL αρχικού υλικού. Ενώ η απομάκρυνση του NaCl είναι σίγουρα πιο ποσοτική στην υγρή-υγρή εκχύλιση, εντούτις το Ο.Ο.Φ που προέκυψε από την φυγοκέντρηση/έκπλυση πιθανότατα περιλαμβάνει σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό οργανικά συστατικά μεγαλύτερου MW και πιο πολικά, τα οποία δεν παρέλαβε η εκχυλιστική μέθοδος, όπως είναι μικρά πεπτίδια, θραύσματα φαινολικών πολυμερών και ολιγοσακχαρίτες.
- Σε όλα τα κλάσματα 'Αποβλήτου', Έκπλυσης' και 'Αποδέσμευσης' που προέκυψαν μετρήθηκε η ξηρή τους μάζα και με βάση το ποσοστό ανάκτησης ως προς την μάζα του Ο.Ο.Φ οι ρητίνες κατηγοριοποιήθηκαν σε: υψηλού ποσοστού

ανάκτησης: XAD-18 (1.31%, 48.7%) > XAD-16N (1.28%, 47.7%), μεσαίου ποσοστού ανάκτησης: XAD-16HPN (1.17%, 43.8%) > XAD-1600(1.13%, 42.3%) > XAD-1180N (0.98%, 36.6%) > XAD-4 (0.97%, 36.0%) και χαμηλού ποσοστού ανάκτησης: XAD-7HP (0.54%) > XAD-761 (0.47%).

 Τα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' σε όλες τις ρητίνες είναι πλήρως απαλλαγμένα από NaCl, οι τελευταίες ποσότητες του οποίου απομακρύνονται κατά το 20 στάδιο των Εκπλύσεων, δεδομένο που ικανοποιεί τον έναν από τους δύο βασικούς στόχους της μεθόδου επεξεργασίας του αποβλήτου εκπίκρανσης με ρητίνες.

Επίσης, υπήρξαν απώλειες Ο.Φ. στα κλάσματα 'Αποβλήτου' και Έκπλυσης'. Στα πέρασαν πιθανότατα, κυρίως κλάσματα 'Αποβλήτου' σάκγαρα και ολιγοσακχαρίτες, μικρά πεπτίδια, φαινολικά πολυμερή, οργανικό φορτίο πάντως μικρής αναγωγικής ισχύος, όπως έδειξαν οι έλεγχοι αντιοξειδωτικής δράσης που διενεργήσαμε. Στα κλάσματα των Έκπλύσεων', πέρασε αντιοξειδωτικό φορτίο, εξαιτίας όμως των πολύ μικρών μαζών των κλασμάτων, η απώλεια μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Τα δεδομένα μας δείγνουν ότι για όλες τις ρητίνες, το κύριο αντιοξειδωτικό φορτίο του αποβλήτου είναι συγκεντρωμένο στα κλάσματα της 'Αποδέσμευσης', δεδομένο που ικανοποιεί τον δεύτερο βασικό στόχο της μεθόδου που εφαρμόσαμε. Η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης (και ολικού φαινολικού φορτίου) των ρητινών είναι : XAD-761> XAD-7HP> XAD-1600> XAD-16HPN> XAD-18> XAD-16N> XAD-4> XAD-1180.

- Στα κλάσματα 'Αποδέσμευσης' που προήλθαν από όλες τις ρητίνες, ανιχνεύτηκαν με HPTLC (με συνχρωματογράφηση με πρότυπες ουσίες) οι μεταβολίτες Τυροσόλη (Tyr), Υδροξυτυροσόλη (Tyr-OH) και Ολεϋρωπεϊνη (Ole). Μηδενικές απώλειες σε Tyr-OH (επομένως την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα) επέδειξαν οι ρητίνες XAD-7HP, XAD-18 και XAD-1600.
- Οι ρητίνη XAD-7HP προσρόφησε την δεύτερη μικρότερη μάζα Ο.Φ (η μικρότερη προσροφήθηκε από την XAD-761) γιατί σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες, οι δύο αυτές ρητίνες χαρακτηρίζονται από ένα μοναδικό συνδυασμό μεγαλύτερων διαμέτρων πόρων (και μικρότερης επιφανειοδραστικότητας) και υψηλότερης πολικότητας των πολυμερικών δομών τους. Παρόλα αυτά η XAD-7HP εμφάνισε την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή ολικού φαινολικού φορτίου (TPC) και την δεύτερη
μεγαλύτερη αναστολή DPPH, με πρώτη στις δύο κατηγορίες την XAD-761. Ταυτόχρονα η ρητίνη XAD-7HP επέδειξε μηδενική απώλεια σε Tyr-OH στο 20 στάδιο της Έκπλυσης. Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα συμπεράναμε πως η **'Tyr-OH' διαδραμτίζει έναν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ισχή του φαινολικού κλάσματος του αποβλήτου ξηράλατης Θρούμπας Θάσου.** Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από την θέση που έχουν στην κατάταξη της αντιοξειδωτικής δράσης (και του ολικού φαινολικού φορτίου) οι ρητίνες XAD– 1600 και XAD–18, που επίσης παρουσιάζουν μηδενική απώλεια σε Tyr-OH, που είναι αμέσως μετά από τις XAD-761 και XAD-7HP.

- Βάση των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των μεταβλητών 'Απόδοση Ανάκτησης', 'Αποκρίσεις DPPH' και 'Αποκρίσεις TPC' με την εξίσωσης επιθυμητότητας, φάνηκε πως τον βέλτιστο συνδοιασμό αυτών ως προς το τελική παραλαβή ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος των δίνουν οι ρητίνες Amberlite XAD 761 και XAD 7HP, με την XAD-761 να έχει δείξει τα καλύτερα συνδυαστικά αποτελέσματα. Βάση αυτού έγινε επιλογή της XAD-761 για περαιτέρω βελτιστοποίηση γιατί εμφάνισε τις πιο ενδιαφέρουσες ιδιότητες.
- Πέντε διαφορετικές μεθοδολογικά διαδικασίες στις οποίες την υποβάλλαμε για την εύρεση του ορίου κορεσμού της, απέβησαν αντιφατικές. Το πιο σημαντικό εύρημα στην πορεία αυτή, που δικαιολογεί την αποτυχία στην εύρεση του ορίου κορεσμού, ήταν το γεγονός ότι μετρήθηκαν για το 'τυφλό' δείγμα 'Αποδέσμευσης' της ΧΑD-761 αυξημένες τιμές ολικού φαινολικού φορτίου και αναστολής DPPH σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ρητίνες, οι οποίες επέδειξαν μηδενικές τιμές ολικού φαινολικού φορτίου και αναστολής DPPH για τα 'τυφλά' τους (procedural blanks) όπως αναμενόταν. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το υλικό της ρητίνης Amberlite XAD-761 είχε εξαρχής κατασκευαστικό πρόβλημα.
- Πραγματοποιήθηκε ανάλυση LC-HRESIMS-TOF τόσο των κλασμάτων 'τυφλών' 'Αποδέσμευσης' (procedural Blanks) όλων των ρητινών, όσο και του δείγματος από την ενεργοποίηση της ρητίνης XAD-761 (activation blank XAD-761) από την οποία ανιχνεύτηκε καφεϊκό οξύ και δαφνετίνη στο procedural

Blank, και καφεϊκό οξύ στο activation blank, δεδομένα που έρχονται σε συμφωνία με το προηγούμενο συμπέρασμα.

- Ωστόσο τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων διαδικασιών έδειξαν ότι με τη χρήση της ρητίνης XAD-761 είναι εφικτό να επιτύχουμε την ανάκτηση του 66% του φαινολικού φορτίου του αποβλήτου THR.
- Από την μέγρι τώρα επεξεργασία των δεδομένων LC-HRESIMS-TOF όλων των κλασμάτων 'Αποδέσμευσης' όλων των ρητινών στο πλαίσιο της μηστοχευμένης ανάλυσης (non-targeted Analysis), ταυτοποιήσαμε τους παρακάτω μεταβολίτες: Τυροσόλη (επίπεδο ταυτοποίησης 1), υδροξυτυροσόλη (επίπεδο ταυτοποίησης 1), 3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ (επίπεδο ταυτοποίησης 2a), π-Κουμαρικό οξύ (επίπεδο ταυτοποίησης 2a), Βανιλλικό οξύ (επίπεδο ταυτοποίησης 1), Δαφνετίνη (επίπεδο ταυτοποίησης 2a), Καφεϊκό οξύ (επίπεδο ταυτοποίησης 2a), Ολεοσίδης (επίπεδο ταυτοποίησης 2a), 11-μεθυλεστέρας Ολεοσίδη (επίπεδο ταυτοποίησης 2a) και Ολευρωπεϊνη (επίπεδο ταυτοποίησης 2a). Στο πλαίσιο της στοχευμένης ανάλυσης (Target ή suspect Analysis) και σε επίπεδο ταυτοποίησης 4, δηλαδή σε επίπεδο Μ.Τ, ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω μεταβολίτες:

1- ακετοξυ-Πινορεσινόλη, ακυτυλο-Τυροσόλη, 6-(4-υδροξυ-3μεθόξυφαινυλο)-3,7-διοξα-δικυκλο[3.3.0]οκταν-2-όνη και κυκλοολιβίλη. Δεν ανιχνεύτηκαν οι παρακάτω μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από το ίδιο υλικό σε προηγούμενη εργασία φυτοχημικής ανάλυσης της ερευνητικής μας ομάδας: Πινορεσινόλη, φαίνυλο-προπανοϊκό οξύ, Πυροκατεχόλη και 4-μεθυλο-1,2 διϋδροξυ-Βενζοϊκό οξύ.

## 4.12. Μελλοντικοί Στόχοι - Προοπτικές

- Συνέχιση της μελέτης βελτιστοποίησης των συνθηκών έκλουσης του αποβλήτου ξηράλατης εκπίκρανσης της Θρούμπας Θάσου από τη ρητίνη XAD-761, στην βάση της εκλεκτικότητας που παρουσιάζει για τον σημαντικό βιοδραστικό μεταβολίτη Tyr-OH. Διεξαγωγή πιο λεπτομερούς μελέτης του σταδίου της Έκπλυσης.
- Βελτιστοποίηση της διαδικασίας επεξεργασίας του αποβλήτου THR με τη ρητίνη XAD-7HP, η οποία έδειξε καλές ιδιότητες ως προς τη τελική λήψη ισχυρού αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος βάση στατιστική επεξεργασιας με τη εξίσωση επιθυμητότητητας.
- Ολοκλήρωση της ανάλυσης LC-HR-ESI-MS ως προς την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών του σταδίου της αποδέσμευσης όλων των ρητινών που χρησιμοποιήθηκαν.
- Συνέχιση και ολοκλήρωση της φυτοχημείας του αποβλήτου. Η απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του υλικού αυτού, πέρα από την πιθανή εύρεση νέων φυσικών προϊόντων θα μας επιτρέψει :
  - Τον έλεγχο της δραστικότητάς τους σε διάφορους βιολογικούς στόχους
     εκτός της αντιοξειδωτικής δράσης.
  - Την αξιόπιστη ποσοτική ανάλυση (ποσοτικοποίηση) όλων των απομονωμένων ουσιών στο αρχικό υλικό αλλά και στα δεσμευμένα φορτία από τις ρητίνες, συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματικότερη σύγκριση και αξιολόγησή τους.
- Αξιολόγηση άλλων μεθόδων απομάκρυνσης του NaCl από το απόβλητο (π.δ αντίστροφη ώσμωση) σε συνεργασία με το Ε.Μ. Πολυτεχνείο και σύγκρισή τους με την μέθοδο των ρητινών που εφαρμόζουμε στο εργαστήριό μας.
- Συνεργασία με εργαστήριο τροφίμων για την έλεγχο της δυνατότητας ενσωμάτωσης ενός επεξεργασμένου παραπροϊόντος εκπίκρανσης της Θρουμποελιάς, πλούσιου σε αντιοξειδωτικές και άλλες βιοδραστικές ουσίες, σε τρόφιμο.
- Πιο στενή και αποτελεσματική συνεργασία με την Ένωση Αγροτικών
   Συνεταιρισμών Καβάλας (ΕΑΣΚ), του μεγαλύτερου αγροτοσυνεταιρισμού της

χώρας σε μαζική παραγωγή ξηράλατης θρούμπας, προς την κατεύθυνση μιας συμφέρουσας αξιοποίησης του αποβλήτου ενός μοναδικού ελληνικού προϊόντος.

## Βιβλιογραφία

Accarone, E.M.M., 2003. Adsorption of Flavonoids on Resins : Hesperidin. J. Agric. Food Chem. 51, 6998–7004.

- Adachi, T., Isobe, E., 2004. Fundamental characteristics of synthetic adsorbents intended for industrial chromatographic separations. J. Chromatogr. A 1036, 33– 44. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.018
- Adlercreutz, H., 2007. Lignans and human health, Crit. Revi. Cli. Lab. Sci. https://doi.org/10.1080/10408360701612942
- Adriana Chiappetta, I.M., 2012. Botanical Description, in: Olive Germplasm. p. 24. https://doi.org/DOI: 10.5772/51836
- Aggelis, G.G., Gavala, H.N., Lyberatos, G., 2001. SE—Structures and Environment. J. Agric. Eng. Res. 80, 283–292. https://doi.org/10.1006/jaer.2001.0732
- Ahmad, A., Siddique, J.A., Laskar, M.A., Kumar, R., Mohd-Setapar, S.H., Khatoon, A., Shiekh, R.A., 2015. New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review. J. Environ. Sci. (China) 31, 104–123. https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.12.008
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valéro, J.R., 2011. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. Crit. Rev. Biotechnol. 31, 227–249. https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677
- Alagna, F., Geu-Flores, F., Kries, H., Panara, F., Baldoni, L., O'Connor, S.E., Osbourn, A., 2016. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropein biosynthesis in olive (Olea europaea) fruits. J. Biol. Chem. 291, 5542– 5554. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701276
- Aldhubaib, B.E., 2011. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. Pharm. Methods 2, 71–75. https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436
- Aldini, G., Piccoli, A., Beretta, G., Morazzoni, P., Riva, A., Marinello, C., Maffei Facino, R., 2006. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of

c.v. Coratina. Fitoterapia 77, 121–128. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.010

- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S., 2004. Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters. J. Agric. Food Chem. 52, 267–273. https://doi.org/10.1021/jf034944u
- Amiot, M.J., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. Phytochemistry 28, 67–69. https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)85009-5
- Amiot, M.J., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1986. Importance and Evolution of Phenolic Compounds in Olive during Growth and Maturation. J. Agric. Food Chem. 34, 823–826. https://doi.org/10.1021/jf00071a014
- Ammerer, D.I.R.K., Arle, R.E.C., Tanley, R.O.A.S., Aleh, Z.A.I.D.S.S., 2010. Pilot-Scale Resin Adsorption as a Means To Recover and Fractionate Apple Polyphenols. J. Agric. Food Chem. 58, 6787–6796. https://doi.org/10.1021/jf1000869
- Aruoma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corongiu, F.P., Assunta Dessí, M., Aeschbach, R., 1998. Effect of Hydroxytyrosol Found in Extra Virgin Olive Oil on Oxidative DNA Damage and on Low-Density Lipoprotein Oxidation. J. Agric. Food Chem. 46, 5181–5187. https://doi.org/10.1021/jf980649b
- Ayed, L., Asses, N., Chammem, N., Ben Othman, N., Hamdi, M., 2017. Advanced oxidation process and biological treatments for table olive processing wastewaters: constraints and a novel approach to integrated recycling process: a review. Biodegradation 28, 125–138. https://doi.org/10.1007/s10532-017-9782-0
- Ayraktar, O.G.U.Z.B., 2007. Adsorption of Olive Leaf (Olea europaea L.) Antioxidants on. J Agric Food Chem 55, 1227–1236. https://doi.org/10.1021/jf0628290
- Barbary, O.M., El-Sohaimy, S. a, El-Saadani, M. a, Zeitoun, a M. a, 2010. Antioxidant, Antimicrobial and Anti-HCV Activities of Lignan Extracted from Flaxseed. Res.

J. Agric. Biol. Sci. 6, 247–256.

- Bastoni, L., Bianco, A., Piccioni, F., Uccella, N., 2001. Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. Food Chem. 73, 145–151. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00250-8
- Bautista, L.F., Martínez, M., Aracil, J., 2003. Adsorption of α-amylase in a fixed bed: Operating efficiency and kinetic modeling. AIChE J. 49, 2631–2641. https://doi.org/10.1002/aic.690491016
- Bautista, L.F., Martínez, M., Aracil, J., 1999. Adsorption equilibrium of α-amylase in aqueous solutions. AIChE J. 45, 761–768. https://doi.org/10.1002/aic.690450411
- Bele, A., 2011. An overview on thin layer chromatography. Int. J. Pharm. Sci. Res. 2, 256–267.
- Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., Dominguez, J.R., Garcia, J., 2000. Aerobic biological treatment of black table olive washing wastewaters: Effect of an ozonation stage. Process Biochem. 35, 1183–1190. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00160-6
- Beltran, J., Gonzalez, T., Garcia, J., 2008. Kinetics of the biodegradation of green table olive wastewaters by aerobic and anaerobic treatments. J. Hazard. Mater. 154, 839–845. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.102
- Benitez, F.J., Acero, J.L., Gonzalez, T., Garcia, J., 2001. Ozonation and Biodegradation Processes in Batch Reactors Treating Black Table Olives Washing Wastewaters. Ind. Eng. Chem. Res. 40, 3144–3151. https://doi.org/10.1021/ie000735c
- Benitez, F.J., Acero, J.L., Leal, A.I., 2003. Purification of storage brines from the preservation of table olives. J. Hazard. Mater. 96, 155–169. https://doi.org/10.1016/S0304-3894(02)00183-8
- Bernini, R., Mincione, E., Barontini, M., Crisante, F., 2008. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol.
  J. Agric. Food Chem. 56, 8897–8904. https://doi.org/10.1021/jf801558z
- Bianchi, G., 2003. Lipids and phenols in table olives. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105, 229–242. https://doi.org/10.1002/ejlt.200390046

- Bianchi, G., Murelli, C., Vlahov, G., 1992. Surface Waxes From Olive Fruits. Phytochemistry 31, 3503–3506. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83716-c
- Bianchi, G., Pozzi, N., Vlahov, G., 1994. Pentacyclic triterpene acids in olives. Phytochemistry 37, 205–207. https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85026-7
- Bianchi, G., Vlahov, G., 1994. Composition of Lipid Classes in the Morphologically Different Parts of the Olive Fruit, cv. Corafina (Olea europaea Linn.). Fat Sci. 96, 72–77.
- Bianco, A., Uccella, N., 2000. Biophenolic components of olives. Food Res. Int. 33, 475–485. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00072-7
- Blaschek, H.P., 1992. Food Processing Industry More Environmentally Friendly. Trends Food Sci. Technol. 3, 107–110.
- Borzillo, a., Iannotta, N., Uccella, N., 2000. Oinotria table olives: Quality evaluation during ripening and processing by biomolecular components. Eur. Food Res. Technol. 212, 113–121. https://doi.org/10.1007/s002170000178
- Boskou, D., 2015. Olive and olive oil bioactive constituents. Urbana.
- Bouaziz, M., Lassoued, S., Bouallagui, Z., Smaoui, S., Gargoubi, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2008a. Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from tableolive brine process wastewater. Bioorganic Med. Chem. 16, 9238–9246. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.012
- Bouaziz, M., Lassoued, S., Bouallagui, Z., Smaoui, S., Gargoubi, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2008b. Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from tableolive brine process wastewater. Bioorganic Med. Chem. 16, 9238–9246. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.012
- Brenes-Balbuena, M., García-García, P., Garrido-Fernandez, A., 1992. Phenolic Compounds Related to the Black Color Formed during the Processing of Ripe Olives. J. Agric. Food Chem. 40, 1192–1196. https://doi.org/10.1021/jf00019a023
- Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A., 1994. Influence of salts and pH on thw firmness of olives in acid conditions. J. Food Qual. 17, 335–346. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1994.tb00155.x

- Brenes, M., García, P., Romero, C., Garrido, A., 2000a. Treatment of green table olive waste waters by an activated-sludge process. J. Chem. Technol. Biotechnol. 75, 459–463. https://doi.org/10.1002/1097-4660(200006)75:6<459::AID-JCTB234>3.0.CO;2-D
- Brenes, M., Hidalgo, F.J., García, A., Rios, J.J., García, P., Zamora, R., Garrido, A., 2000b. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 77, 715–720. https://doi.org/10.1007/s11746-000-0115-4
- Brenes, M., Montano, A., Garrido, A., 1990. Ultrafiltration of Green Table Olive Brines: Influence of some Operating Parameters and Effect on Polyphenol Composition. J. Food Sci. 55, 214–217. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06055.x
- Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A.H., Garrido, A., 1995a. Biochemical Changes in Phenolic Compounds during Spanish-Style Green Olive Processing. J. Agric. Food Chem. 43, 2702–2706. https://doi.org/10.1021/jf00058a028
- Brenes, M., Rejano, L., García, P., Sánchez, A.H., Garrido, A., 1995b. Biochemical Changes in Phenolic Compounds during Spanish-Style Green Olive Processing. J. Agric. Food Chem. 43, 2702–2706. https://doi.org/10.1021/jf00058a028
- Campestre, C., Marsilio, V., Lanza, B., Iezzi, C., Bianchi, G., 2002. Phenolic compounds and organic acids change in black oxidized table olives. Acta Hortic. 586, 575–578.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F., 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. Phytochemistry 31, 4125–4128. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80426-F
- Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., Lattanzio, V., 2012. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. J. Agric. Food Chem. 60, 1822–1829. https://doi.org/10.1021/jf204001p

- Cardoso, S.M., Mafra, I., Reis, A., Georget, D.M., Smith, A.C., Waldron, K.W., Coimbra, M.A., 2008. Effect of dry-salt processing on the textural properties and cell wall polysaccharides of cv. Thasos black olives. J. Sci. Food Agric. 88, 2079– 2086. https://doi.org/DOI: 10.1002/jsfa.3317
- Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G., Palacios, S.M., 2003. Antifungal effects of different organic extracts from Melia azedarach L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. J. Agric. Food Chem. 51, 2506–2511. https://doi.org/10.1021/jf026083f
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D., Fernández-Gutiérrez, A., 2005. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. J. Agric. Food Chem. 53, 8918–8925. https://doi.org/10.1021/jf0515680
- Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., Pezzi, V., 2013. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies. Mol. Nutr. Food Res. 57, 71–83. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200503
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., 2012. Food and Bioproducts Processing Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. Food Bioprod. Process. 90, 615–623. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.004
- Chang, X., Wang, D., Chen, B., Feng, Y., Wen, S., Zhan, P., 2012. Adsorption and Desorption Properties of Macroporous Resins for Anthocyanins from the Calyx Extract of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). J. Agric. Food Chem. 60, 2368–2376.
- Charoenprasert, S., Mitchell, A., 2012a. Factors influencing phenolic compounds in table olives (Olea europaea). J Agric Food Chem 60, 7081–7095. https://doi.org/10.1021/jf3017699
- Charoenprasert, S., Mitchell, A., 2012b. Factors influencing phenolic compounds in table olives (Olea europaea). J Agric Food Chem 60, 7081–7095. https://doi.org/10.1021/jf3017699

- Chatzisymeon, E., Stypas, E., Bousios, S., Xekoukoulotakis, N.P., Mantzavinos, D., 2008. Photocatalytic treatment of black table olive processing wastewater. J. Hazard. Mater. 154, 1090–1097. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.014
- Chen, J., 2015. Separation and purification of both tea seed polysaccharide and saponin from camellia cake extract using macroporous resin. J. Sep. Sci. 38, 543–702. https://doi.org/10.1002/jssc.201401123
- Chen, Y., Zhang, W., Zhao, T., Li, F., Zhang, M., Li, J., Zou, Y., Wang, W., Cobbina, S.J., Wu, X., Yang, L., 2016. Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. Food Chem. 194, 712–722. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.084
- Choma, I.M., Grzelak, E.M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. J. Chromatogr. A. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069
- Cicerale, S., Conlan, X. a, Sinclair, A.J., Keast, R.S.J., 2009. Chemistry and health of olive oil phenolics. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 49, 218–236. https://doi.org/10.1080/10408390701856223
- Ciftci, H., 2010a. Solid Phase Extraction Method for the Determination of Cobalt in Water Samples on Duolite XAD-761 Resin Using 4- (2-Pyridylazo) Resorcinol by FAAS. Curr. Anal. Chem. 700, 154–160.
- Ciftci, H., 2010b. Separation and solid phase extraction method for the determination of cadmium in environmental samples. Desalination 263, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.06.028
- Ciftci, H., Er, C., 2013. Solid-phase extraction and separation procedure for trace aluminum in water samples and its determination by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS). Environ. Monit. Assess. 185, 2745–2753. https://doi.org/10.1007/s10661-012-2745-3
- Ciftci, H., Er, C., Ozkan, M., 2016. Determination of aluminum from water samples and dialysis fluids after separation/preconcentration on Duolite XAD-761 polymeric resin. Desalin. Water Treat. 57, 6916–6924. https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1011704

- Ciftci, H., Tunc, T., Tasdemir, I.H., Ciftci, E., Iftci, H.A.C., Unc, T.U.T., Brahim, I., Asdemir, H.U.T., Iftci, E.S.E.N.C., 2011. Development of a new enrichment method for simultaneous determination of copper and zinc in water samples. Environ. Toxicol. Chem. 30, 616–621. https://doi.org/10.1002/etc.419
- Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Fidalgo, A., Ilharco, L.M., Pagliaro, M., 2016. Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 118, 503–511. https://doi.org/10.1002/ejlt.201500036
- Crook, E.H., McDonnell, R.P., McNulty, J.T., 1975. Removal and Recovery of Phenols from Industrial Waste Effluents with Amberlite XAD Polymeric Adsorbents. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 14, 113–118. https://doi.org/10.1021/i360054a012
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorrentino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., Masella, L., Tufano, M.A., Zappia, M., Galletti, P., 2005. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. Free Radic. Biol. Med. 38, 908–919. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.015
- Dar, A.A., Arumugam, N., 2013. Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis - A review. Bioorg. Chem. 50, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.06.009
- Datta, C., Dutta, A., Dutta, D., Chaudhuri, S., 2011. Adsorption of polyphenols from ginger rhizomes on an anion exchange resin Amberlite IR-400 – Study on effect of pH and temperature. Ital. Oral Surg. 1, 893–899. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.135
- De Castro, A., Brenes, M., 2001. Fermentation of washing waters of spanish-style green olive processing. Process Biochem. 36, 797–802. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00280-6
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., Sacchi, R., 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. Food Chem. 104, 858–867. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.005
- Deligiorgis, A., Xekoukoulotakis, N.P., Diamadopoulos, E., Mantzavinos, D., 2008.

Electrochemical oxidation of table olive processing wastewater over boron-doped diamond electrodes: Treatment optimization by factorial design. Water Res. 42, 1229–1237. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.014

- DellaGreca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., Temussi, F., 2001. Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67, 352–359. https://doi.org/10.1007/s001280132
- Delmulle, L., Bellahcène, A., Dhooge, W., Comhaire, F., Roelens, F., Huvaere, K., Heyerick, A., Castronovo, V., De Keukeleire, D., 2006. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus L.) in human prostate cancer cell lines. Phytomedicine 13, 732–734. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.01.001
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattabharya, N., Khanra, R., Dua, T.K., 2014. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. J. Pharm. Anal. 5, 75–84. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002
- Di Mauro, M.D., Giardina, R.C., Fava, G., Mirabella, E.F., Acquaviva, R., Renis, M., D'Antona, N., 2017. Polyphenolic profile and antioxidant activity of olive mill wastewater from two Sicilian olive cultivars: Cerasuola and Nocellara etnea. Eur. Food Res. Technol. 243, 1895–1903. https://doi.org/10.1007/s00217-017-2893-3
- Diez, C.M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., Gaut, B.S., 2015. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. New Phytol. 206, 436–447. https://doi.org/10.1111/nph.13181
- Domitrović, R., Jakovac, H., Marchesi, V.V., Šain, I., Romić, Ž., Rahelić, D., 2012. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachlorideinduced liver damage in mice. Pharmacol. Res. 65, 451–464. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.12.005
- During, A., Debouche, C., Raas, T., Larondelle, Y., 2012. Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells. J. Nutr. 142, 1798–1805. https://doi.org/10.3945/jn.112.162453.)
- E Silva, M.L.A., Esperandim, V.R., Ferreira, D.D.S., Magalhães, L.G., Lima, T.C.,

Cunha, W.R., Nanayakkara, D.N.P., Pereira, A.C., Bastos, J.K., 2014. Furofuran lignans display schistosomicidal and trypanocidal activities. Phytochemistry 107, 119–125. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.010

- Elizabeth F. Rangel, S.M. da C. and, Carvalho, B.M., 2017. World 's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher: Des. Control Appl. Mechatron. Syst. Eng. 135–152. https://doi.org/10.5772/67458
- Ellis, J., 2007. Adsorption characteristics of crocin in the extract of gardenia fruits ( Gardenia Jasminoides Ellis) on macroporous resins. J. Food Process Eng. 32, 35– 52. https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00201.x
- European Parliament and Council, 2008. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain directives. Off. J. Eur. Union 3–30. https://doi.org/2008/98/EC.; 32008L0098
- Fernández-bolaños, J.G., López, Ó., Fernández-bolaños, J., Rodríguez-, G., 2008. Hydroxytyrosol and Derivatives : Isolation , Synthesis , and Biological Properties. Curr. Org. Chem. 442–463.
- Fernández-Mar, M.I., Mateos, R., García-Parrilla, M.C., Puertas, B., Cantos-Villar, E., 2012. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin:
  A review. Food Chem. 130, 797–813. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.023
- Ferrer-Polonio, E., Carbonell-Alcaina, C., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Álvarez-Blanco, S., Bes-Piá, A., Pastor-Alcañiz, L., 2017a. Brine recovery from hypersaline wastewaters from table olive processing by combination of biological treatment and membrane technologies. J. Clean. Prod. 142, 1377–1386. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.169
- Ferrer-Polonio, E., Carbonell-Alcaina, C., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Lvarez-Blanco, S., Bes-Pi, A., Pastor-Alcaiz, L., 2017b. Brine recovery from hypersaline wastewaters from table olive processing by combination of biological treatment and membrane technologies. J. Clean. Prod. 142, 1377–1386. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.169

- Ferrer-Polonio, E., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Alonso-Molina, J.L., Pastor-Alcañiz, L., 2016. Biological treatment performance of hypersaline wastewaters with high phenols concentration from table olive packaging industry using sequencing batch reactors. J. Ind. Eng. Chem. 43, 44–52. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.07.046
- Ferrer-Polonio, E., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Alonso-Molina, J.L., Pastor-Alcañiz, L., 2015. Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry. Chem. Eng. J. 273, 595–602. https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.062
- Figueiredo, M.S., de Albuquerque Maia, L., Guarda, D.S., Lisboa, P.C., de Moura, E.G., 2017. Flaxseed secoisolariciresinol diglucoside (SDG) during lactation improves bone metabolism in offspring at adulthood. J. Funct. Foods 29, 161–171. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.021
- Fki, I., Sahnoun, Z., Sayadi, S., 2007. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. J. Agric. Food Chem. 55, 624–631. https://doi.org/10.1021/jf0623586
- Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J.A., Menéndez-Gutiérrez, M.P., Micol, V., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. Anal. Bioanal. Chem. 397, 643–654. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3604-0
- Funes, L., Laporta, O., Cerdán-Calero, M., Micol, V., 2010. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. Chem. Phys. Lipids 163, 190–199. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.11.004
- Furneri, P.M., Piperno, A., Sajia, A., Bisignano, G., 2004. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4892–4894. https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4892-4894.2004

Gambacorta, G., Faccia, M., Previtali, M.A., Pati, S., Notte, E.L., Baiano, A., 2010.

Effects of olive maturation and stoning on quality indices and antioxidant content of extra virgin oils (cv. coratina) during storage. J. Food Sci. 75. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01516.x

- Gao, C., Zhao, S., Yagiz, Y., Gu, L., 2018. Static, Kinetic, and Isotherm Adsorption Performances of Macroporous Adsorbent Resins for Recovery and Enrichment of Bioactive Procyanidins from Cranberry Pomace. J. Food Sci. 83, 1249–1257. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14142
- Garcia-Ivars, J., Iborra-Clar, M.I., Alcaina-Miranda, M.I., Mendoza-Roca, J.A., Pastor-Alcañiz, L., 2015. Treatment of table olive processing wastewaters using novel photomodified ultrafiltration membranes as first step for recovering phenolic compounds. J. Hazard. Mater. 290, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.062
- Gargouri, B., Gargouri, O.D., Khmakhem, I., Ammar, S., Abdelhèdi, R., Bouaziz, M., 2017. Chemical composition and direct electrochemical oxidation of table olive processing wastewater using high oxidation power anodes. Chemosphere 166, 363–371. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.080
- Gariboldi, P., Jommi, G., Verotta, L., 1986. Secoiridoids from Olea europaea. Phytochemistry 25, 865–869. https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)80018-8
- Geng, X., Ren, P., Pi, G., Shi, R., Yuan, Z., Wang, C., 2009. High selective purification of flavonoids from natural plants based on polymeric adsorbent with hydrogen-bonding interaction. J. Chromatogr. A 1216, 8331–8338. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.015
- Ghaedi, M., Mortazavi, K., Montazerozohori, M., Shokrollahi, A., Soylak, M., 2013.
  Flame atomic absorption spectrometric (FAAS) determination of copper, iron and zinc in food samples after solid-phase extraction on Schiff base-modified duolite XAD 761. Mater. Sci. Eng. C 33, 2338–2344. https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.062
- Ghaedi, M., Niknam, K., Niknam, E., Mortazavi, K., Taheri, K., Soylak, M., 2010. Development of an efficient procedure for determination of copper, zinc and iron after solid phase extraction on 3-(1-(1-H-indol-3-yl)-3-phenylallyl)-1H- indole

loaded on Duolite XAD 761. J. Chinese Chem. Soc. 57, 275–283. https://doi.org/10.1002/jccs.201000042

- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A.H., Saari, N., 2012. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (Olea europaea L.)-a review, International journal of molecular sciences. https://doi.org/10.3390/ijms13033291
- Gilani, A.H., Khan, A. ullah, Ghayur, M.N., 2006. Ca2+ antagonist and cholinergic activities explain the medicinal use of olive in gut disorders. Nutr. Res. 26, 277– 283. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.06.009
- Gökalp, F., 2017. An investigation of the olive phenols activity as a natural medicine. J. Food Drug Anal. 3–7. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.003
- González-Correa, J.A., Navas, M.D., Lopez-Villodres, J.A., Trujillo, M., Espartero, J.L., De La Cruz, J.P., 2008. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. Neurosci. Lett. 446, 143–146. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.022
- González-Hidalgo, I., Bañón, S., Ros, J.M., 2012. Evaluation of table olive by-product as a source of natural antioxidants. Int. J. Food Sci. Technol. 47, 674–681. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02892.x
- Grade, I., Exchange, I., 2008. Amberlite XAD761\_ER -- Technical Data Sheet 1–2.
- Guillermo Avila, J., De Liverant, J.G., Martínez, A., Martínez, G., Muñoz, J.L., Arciniegas, A., Romo De Vivar, A., 1999. Mode of action of Buddleja cordata verbascoside against Staphylococcus aureus. J. Ethnopharmacol. 66, 75–78. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00203-7
- Guinda, Á., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adánez, P., Castellano, J.M., 2010. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. J. Agric. Food Chem. 58, 9685– 9691. https://doi.org/10.1021/jf102039t
- Gülçin, I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. Arch. Toxicol.86, 345–391. https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2
- H. Passosa, M.G.F. and J.A.P.C., 2014. Ionic liquids solutions as extractive solvents of 232

value-added compounds from biomass. Green Chem. 1–29. https://doi.org/DOI: 10.1039/C4GC00236A

- Hang, Y.D., 2004. Management and Utilization of Food Processing Wastes. J. Food Sci. 69, 104–107. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13341.x
- Hegde, S., Lodge, J.S., Trabold, T.A., 2018. Characteristics of food processing wastes and their use in sustainable alcohol production. Renew. Sustain. Energy Rev. 81, 510–523. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.07.012
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., Adlercreutz, H., 2001. In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. J. Agric. Food Chem. 49, 3178–3186. https://doi.org/10.1021/jf010038a
- Hooshyar, N., Ottens, M., 2014. Food and Bioproducts Processing Resin selection for the separation of caffeine from green tea catechins. Food Bioprod. Process. 92, 192–198. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.02.002
- International Olive Council, 2012. International Trade Standard Applying To Olive Oils and Olive-Pomace Oils International Trade Standard Applying To Olive Oils and Olive-Pomace Oils 1–17.
- International Olive Oil Council, 2004. Trade Standard Aplying to Table Olives.
- Jampani, C., Naik, A., Raghavarao, K.S.M.S., 2014. Purification of anthocyanins from jamun (Syzygium cumini L.) employing adsorption. Sep. Purif. Technol. 125, 170–178. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.047
- Javier Benitez, F., Acero, J.L., Gonzalez, T., Garcia, J., 2001. Organic matter removal from wastewaters of the black olive industry by chemical and biological procedures. Process Biochem. 37, 257–265. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00209-6
- Jung, H.W., Mahesh, R., Lee, J.G., Lee, S.H., Kim, Y.S., Park, Y.K., 2010. Pinoresinol from the fruits of Forsythia koreana inhibits inflammatory responses in LPSactivated microglia. Neurosci. Lett. 480, 215–220. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.043

Kailis, S., Harris, D., 2007. PRODUCING TABLE OLIVES. Collingwood.

- Kammerer, D., Gajdos, J., 2005. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts
  (Vitis vinifera L . cv . Cabernet Mitos ) using a polymeric adsorber resin. Eur.
  Food Res. Technol. 220, 431–437. https://doi.org/10.1007/s00217-004-1078-z
- Kammerer, D.R., Saleh, Z.S., Carle, R., Stanley, R.A., 2007. Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice. Eur Food Res Technol 224, 605–613. https://doi.org/10.1007/s00217-006-0346-5
- Kammerer, J., Kammerer, D.R., Jensen, U., Carle, R., 2010. Interaction of apple polyphenols in a multi-compound system upon adsorption onto a food-grade resin.J. Food Eng. 96, 544–554. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.038
- Kammerer, J., Schweizer, C., Carle, R., Kammerer, D.R., 2011. Recovery and fractionation of major apple and grape polyphenols from model solutions and crude plant extracts using ion exchange and adsorbent resins. Int. J. Food Sci. Technol. 46, 1755–1767. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02681.x
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Avramaki, C., Angelakis, A.N., 2006. Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. Agric. Water Manag. 82, 354–370. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.08.004
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Crowther, J.C., 2008. Olive oil history, production and by-product management. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 7, 1–26. https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., Magiatis, P., 2012. Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative 1 H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils. J. Agric. Food Chem. 60, 11696–11703.
- Katsoni, A., Frontistis, Z., Xekoukoulotakis, N.P., Diamadopoulos, E., Mantzavinos, D., 2008. Wet air oxidation of table olive processing wastewater: Determination of key operating parameters by factorial design. Water Res. 42, 3591–3600. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.007

Kernan, M.R., Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Blanc, P., Murphy, J.T., Stoddart,

C.A., Nanakorn, W., Balick, M.J., Rozhon, E.J., 1997. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant Rhinacanthus nasutus. J. Nat. Prod. 60, 635–637. https://doi.org/10.1021/np960613i

- Kim, H.J., Ono, E., Morimoto, K., Yamagaki, T., Okazawa, A., Kobayashi, A., Satake, H., 2009. Metabolic engineering of lignan biosynthesis in forsythia cell culture. Plant Cell Physiol. 50, 2200–2209. https://doi.org/10.1093/pcp/pcp156
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J. Pharmacol. Sci. 96, 229–45. https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ04003X
- Kim, J., Yoon, M., Yang, H., Jo, J., Han, D., Jeon, Y., Cho, S., 2014. Enrichment and purification of marine polyphenol phlorotannins using macroporous adsorption resins. Food Chem. 162, 135–142. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.035
- Kiyama, R., 2016. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. Trends Food Sci. Technol. 54, 186–196. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.007
- Kong, Y., Yan, M., Luo, M., 2010. Preparative enrichment and separation of astragalosides from Radix Astragali extracts using macroporous resins. J. Sep. Sci. 33, 2278–2286. https://doi.org/10.1002/jssc.201000083
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., Leito, I., 2015. Tutorial review on validation of liquid chromatography – chromatography – mass spectrometry methods: Part I. Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017
- Kumar, P.R., Dinesh, S.R., Rini, R., 2016. LCMS- A review and a recent update. WORLD J. Pharm. Pharm. Sci. 5, 377–391. https://doi.org/10.20959/wjpps20165-6656
- Kyriacou, A., Lasaridi, K.E., Kotsou, M., Balis, C., Pilidis, G., 2005. Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater. Process Biochem. 40, 1401–1408. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.001

- Li, H., Liu, J., Li, D., Wang, H., 2012. Study on separation and purification of genistein in the soybean residue using macroporous resin adsorption. Ind. Eng. Chem. Res. 51, 44–49. https://doi.org/10.1021/ie200057e
- Li, H., Liu, Y., Jin, H., Liu, S., Fang, S., Wang, C., 2015. Separation of vitexin-4 O glucoside and vitexin-2 O -rhamnoside from hawthorn leaves extracts using macroporous resins. J. Chromatogr. B 1007, 23–29. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.043
- Li, J., Chase, H.A., 2010. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. Nat. Prod. Rep. 27, 1493–1510. https://doi.org/10.1039/c0np00015a
- Li, J., Liang, L., Cheng, J., Huang, Y., Zhu, M., Liang, S., 2012. Extraction of pigment from sugarcane juice alcohol wastewater and evaluation of its antioxidant and free radical scavenging activities Extraction of Pigment from Sugarcane Juice Alcohol Wastewater and Evaluation of Its Antioxidant and Free Radical Scaveng. Food Sci. Biotechnol. 21, 1489–2012. https://doi.org/10.1007/s10068-012-0197-8
- Li, X.N., Pu, J.X., Du, X., Yang, L.M., An, H.M., Lei, C., He, F., Luo, X., Zheng, Y.T., Lu, Y., Xiao, W.L., Sun, H.D., 2009. Lignans with anti-HIV activity from Schisandra propinqua var. sinensis. J. Nat. Prod. 72, 1133–1141. https://doi.org/10.1021/np900123z
- Liu, B., Dong, B., Yuan, X., Kuang, Q., Zhao, Q., Yang, M., Liu, J., Zhao, B., 2016. Enrichment and separation of chlorogenic acid from the extract of Eupatorium adenophorum Spreng by macroporous resin. J. Chromatogr. B 1008, 58–64.
- Liu, B., Ouyang, J., Yuan, X., Wang, L., Zhao, B., 2013. Adsorption properties and preparative separation of phenylethanoid glycosides from Cistanche deserticola by use of macroporous resins. J. Chromatogr. B 937, 84–90. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.018
- Liu, C., Deng, L., Zhang, P., Zhang, S., Xu, T., Wang, F., Tan, T., 2013a. Toward a cost-effective method for α-arbutin production by using immobilized hydroquinone as a glucosyl acceptor. Process Biochem. 48, 1447–1452.

https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.005

- Liu, C., Zhang, P., Liu, L., Xu, T., Tan, T., Wang, F., Deng, L., 2013b. Isolation of αarbutin from Xanthomonas CGMCC 1243 fermentation broth by macroporous resin adsorption chromatography. J. Chromatogr. B 925, 104–109. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.013
- Liu, F., Chen, S., Gao, Y., Xie, Y., 2017. CO2 adsorption behavior and kinetics on polyethylenimine modified porous phenolic resin. J. Porous Mater. 24, 1335– 1342. https://doi.org/10.1007/s10934-017-0375-4
- Liu, S.-H., Pan, I.-H., Chu, I.-M., 2007. Inhibitory effect of p-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis. Biol. Pharm. Bull. 30, 1135–1139. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1135
- Liu, S.X., 2014. Physicochemical wastewater treatment processes, in: 2 (Ed.), Food and Agricultural Wastewater Utilization and Treatment. pp. 45–102.
- Liu, X., Wang, J., Zhou, C., Gan, L., 2010. Preparative Separation and Enrichment of Syringopicroside from Folium syringae Leaves with Macroporous Resins. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–10. https://doi.org/10.1155/2010/572570
- Liu, Y., Bai, Q., Lou, S., Di, D., Li, J., Guo, M., 2012. Adsorption Characteristics of (
   )-Epigallocatechin Gallate and Caffeine in the Extract of Waste Tea on Macroporous Adsorption Resins Functionalized with Chloromethyl, Amino, and Phenylamino Groups. J. Agric. Food Chem. 60, 1555–1566.
- Liu, Y., Di, D., Bai, Q., Li, J., Chen, Z., Lou, S., Ye, H., 2011. Preparative Separation and Purification of Rebaudioside A from Steviol Glycosides Using Mixed-Mode Macroporous Adsorption Resins. J. Agric. Food Chem. 59, 9629–9636.
- López-Biedma, A., Sánchez-Quesada, C., Delgado-Rodríguez, M., Gaforio, J.J., 2016. The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: A review. J. Funct. Foods 26, 36–47. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.005
- Loumou, A., Giourga, C., 2003. Olive groves: "The life and identity of the Mediterranean." Agric. Human Values 20, 87–95. https://doi.org/10.1023/A:1022444005336

- Lu, C., Luo, X., Lu, L., Li, H., Chen, X., Ji, Y., 2012. Preliminary extration of tannins by 1-butyl-3-methylimidazole bromide and its subsequent removal from Galla chinensis extract using macroporous resins Chunxia. J. Sep. Sci. 1–24. https://doi.org/10.1002/jssc.201200679
- Lu, J., Huang, G., Wang, Z., Zhuang, S., Xu, L., Song, B., Xiong, Y., Guan, S., 2013.
  Tyrosol exhibits negative regulatory effects on LPS response and endotoxemia.
  Food Chem. Toxicol. 62, 172–178. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.031
- Luisa, M., Moure, A., Domínguez, H., Carlos, J., 2011. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption : A review. J. Food Eng. 105, 1–27. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010
- M.-I. Covas, K.N., "nen, H.E., Poulsen, J. Kaikkonen, H.-J.F. Zunft, H. Kiesewetter, A. Gaddi, R. de la Torre, J. Mursu, H.B., "umler, S. Nascetti, J.T. Salonen, M.F., ', J.V., and J. Marrugat, 2006. The Effect of Virgin and Refined Olive Oils on Heart Disease Risk Factors. Ann. Intern. Med. 144, 343.
- Macdonald-wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro : a review. J Sci Food Agric 2056, 2046–2056. https://doi.org/10.1002/jsfa
- MacRae, W.D., Towers, G.H.N., 1984. Biological activities of lignans. Phytochemistry 23, 1207–1220. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80428-8
- Manoukas, A.G., Mazomenos, B., Patrinou, M.A., 1973. Amino Acid Compositions of Three Varieties of Olive Fruit. J. Agric. Food Chem. 21, 215–217. https://doi.org/10.1021/jf60186a023
- Marahel, F., Ghaedi, M., Montazerozohori, M., Nejati Biyareh, M., Nasiri Kokhdan, S., Soylak, M., 2011. Solid-phase extraction and determination of trace amount of some metal ions on Duolite XAD 761 modified with a new Schiff base as chelating agent in some food samples. Food Chem. Toxicol. 49, 208–214. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.018
- Markín, D., Duek, L., Berdícevsky, I., 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses 46, 132–136. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00859.x

- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., 2001. Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. Food Chem. 74, 55–60. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00338-1
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., De Angelis, M., 2001. Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (Olea europaea L.) suitable for table olive purposes. Food Chem. 72, 485–490. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00268-5
- Marsilio, V., Lanza, B., Campestre, C., De Angelis, M., 2000. Oven-dried table olives: Textural properties as related to pectic composition. J. Sci. Food Agric. 80, 1271– 1276. https://doi.org/10.1002/1097-0010(200006)80:8<1271::AID-JSFA635>3.0.CO;2-O
- Matera, R., Gabbanini, S., Rosalinda, G., Nicola, D., Iori, R., Petrillo, G., Valgimigli, L., 2012. Identification and analysis of isothiocyanates and new acylated anthocyanins in the juice of Raphanus sativus cv. Sango sprouts. Food Chem. 133, 563–572. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.050
- Melliou, E., Zweigenbaum, J.A., Mitchell, A.E., 2015. Ultrahigh-pressure liquid chromatography triple-quadrupole tandem mass spectrometry quantitation of polyphenols and secoiridoids in california-style black ripe olives and dry saltcured olives. J. Agric. Food Chem. 63, 2400–2405. https://doi.org/10.1021/jf506367e
- Menendez J. A., Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C., Garcia-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., F.-G.A. and S.-C.A., 2009. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. Int. J. Mol. Med. 23, 521–527. https://doi.org/10.3892/ijmm
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S., 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. J. Clean. Prod. 65, 28–41. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051
- Mohagheghi, F., Bigdeli, M.R., Rasoulian, B., Hashemi, P., Pour, M.R., 2011. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral

ischemia. Phytomedicine 18, 170–175. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.06.007

- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A., 1993. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. J. Agric. Food Chem. 41, 2228– 2234. https://doi.org/10.1021/jf00035a076
- Moore, R.A., Karasek, F.W., 2006. Extraction of Organic Compounds from Aqueous Media by Amberlite XAD Resins Extraction of Organic Compounds from Aqueous Media by Amberlite XAD Resins 7319, 37–41. https://doi.org/10.1080/03067318408076972
- Morlock, G.E., Oellig, C., Bezuidenhout, L.W., Brett, M.J., Schwack, W., 2010. Miniaturized Planar Chromatography Using Office Peripherals 82, 2940–2946. https://doi.org/10.1021/ac902945t
- Moskovitz, J., Yim, M. Bin, Chock, P.B., 2002. Free radicals and disease. Arch. Biochem. Biophys. 397, 354–359. https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2692
- Motilva, V., Sánchez-Fidalgo, S., Barranco, M.D., Herrerías, J.M., Alarcón de la Lastra, C., 2008. Mechanisms of increased gastric protection after NSAIDadministration in rats consuming virgin olive oil diets. E Spen Eur E J Clin Nutr Metab 3, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.eclnm.2007.10.003
- Mousouri, E., Melliou, E., Magiatis, P., 2014. Isolation of megaritolactones and other bioactive metabolites from "Megaritiki" table olives and debittering water. J. Agric. Food Chem. 62, 660–667. https://doi.org/10.1021/jf404685h
- Muhammad I., Nazir A., Faqir Muhammad A., Muhammad Kamran K., Zarina M., M.N. and S.H., 2015. Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. Nutr. J. 14, 71. https://doi.org/10.1186/s12937-015-0059-3
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. Indian J. Pharmacol. 33, 2–16.

- Nijveldt, R.J., Nood, E. van, Hoorn, D.E. van, Boelens, P.G., Norren, K. van, Leeuwen, P.A. van, 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and. Am J Clin Nutr 74, 418–425.
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Konczak, I., Rehman, A.U., Robards, K., 2009. Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassays. Chem. Res. Toxicol. 22, 227–234. https://doi.org/10.1021/tx8004168
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Robards, K., 2008. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from Olea europaea L. Nat. Prod. Rep. 25, 1167–1179. https://doi.org/10.1039/B719736E
- Odiatou, E.M., Skaltsounis, A.L., Constantinou, A.I., 2013. Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol. Cancer Lett. 330, 113–121. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.035
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. Eur. J. Cancer 36, 1235–1247. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00103-9
- Panagou, E.Z., 2006. Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C. LWT - Food Sci. Technol. 39, 322– 329. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.02.017
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Katsaboxakis, K.Z., 2002. Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20 °C. Int. J. Food Sci. Technol. 37, 635–641. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00590.x
- Panel, E., Nda, A., 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood

HDL-cholesterol concentrations ( ID 1639 ) 9, 1–25. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033.

- Papadaki, E., Mantzouridou, F.T., 2016. Current status and future challenges of table olive processing wastewater valorization. Biochem. Eng. J. 112, 103–113. https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.008
- Paper, O., 2014. Purification of phloridzin from Lithocarpus polystrachyus Rehd leaves using polymeric adsorbents functionalized with glucosamine and β-cyclodextrin. Chem. Pap. 68, 1521–1531. https://doi.org/10.2478/s11696-014-0615-x
- Parinos, C.S., Stalikas, C.D., Giannopoulos, T.S., Pilidis, G.A., 2007. Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. J. Hazard. Mater. 145, 339–343. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.061
- Pasban-aliabadi, H., Esmaeili-mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Mehdizadeh, A., Yaghoobi, M.M., 2013. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (Olea europaea L .) leaf extract is performed by its main component oleuropein. Neurosci. Res. 16, 134–142.
- Patsios, S.I., Papaioannou, E.H., Karabelas, A.J., 2016. Long-term performance of a membrane bioreactor treating table olive processing wastewater. J. Chem. Technol. Biotechnol. 91, 2253–2262. https://doi.org/10.1002/jctb.4811
- Pavlovic, M.D., Buntic, A. V, 2015. Recovery of (-)- epigallocatechingallate (EGCG) from aqueous solution by selective adsorption onto spent coffee grounds. Eur. Food Res. Technol. 241, 399–412. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2472-4
- Perez-Larrán, P., Diaz-Reinoso, B., Moure, A., Alonso, J.L., Dominguez, H., 2017. Adsorption technologies to recover and concentrate food polyphenols. Curr. Opin. Food Sci. 1–19. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.005
- Pompeu, D.R., Moura, F.G., Silva, E.M., Rogez, H., Pompeu, D.R., Moura, F.G., Silva,
  E.M., Rogez, H., Moura, G., Silva, E.M., 2017. Equilibria , Kinetics , and
  Mechanisms for the Adsorption of Four Classes of Phenolic Compounds onto
  Synthetic Resins Equilibria , Kinetics , and Mechanisms for the Adsorption of

Four Classes of Phenolic Compounds onto Synthetic Resins. Sep. Sci. Technol. 6395, 700–709. https://doi.org/10.1080/01496390903562274

- Pratima, N.A., Gadikar, R., 2018. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. Arch. Org. Inorg. Chem. Sci. 1, 26–34. https://doi.org/1(1)- 2018. AOICS.MS.ID.000103.
- Preethi Soundarya, S., Sanjay, V., Haritha Menon, A., Dhivya, S., Selvamurugan, N., 2017. Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules. Elsevier B.V., Tamil Nadu, India. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.014
- Puel, C., Mardon, J., Agalias, A., Davicco, M.E., Lebecque, P., Mazur, A., Horcajada, M.N., Skaltsounis, A.E., Coxam, V., Gene, S., 2008. Major Phenolic Compounds in Olive Oil Modulate Bone Loss in an Ovariectomy / Inflammation Experimental Model 56, 9417–9422.
- Puel, C., Mardon, J., Kati-Coulibaly, S., Davicco, M.J., Lebecque, P., Obled, C., Rock,
  E., Horcajada, M.N., Agalias, A., Skaltsounis, L.A., Coxam, V., 2007. Black
  Lucques olives prevented bone loss caused by ovariectomy and talc
  granulomatosis in rats. Br. J. Nutr. 97, 1012–1020.
  https://doi.org/10.1017/S0007114507659030
- Puel, C., Quintin, A., Agalias, A., Mathey, J., Obled, C., Mazur, A., Davicco, M.J., Lebecque, P., Skaltsounis, A.L., Coxam, V., 2004. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. Br. J. Nutr. 92, 119–127. https://doi.org/10.1079/BJN20041181\rS0007114504001370 [pii]
- R. M. Wheaton, L.J.L., 2000. Dowex Ion Exchange Resins: Fundamentals of Ion Exchange, Dow Chemical U.S.A. https://doi.org/10.1016/S0026-0576(00)81191-5
- R, F.E., Garrido, A., López-miranda, J., Msallem, M., Parras, M., Rallo, L., Zanoli, R., 2013. Table olive processing technologies. Options Méditerranéennes 64, 67–74.

- Raiti, J., Hafidi, A., 2015. Mixed micelles-mediated dephenolisation of table olive processing's wastewaters. Water Sci. Technol. 72, 2132–2138. https://doi.org/10.2166/wst.2015.395
- Ram, M., Limited, I.L., Abdin, M.Z., Khan, M.A., Jha, P., 2014. HPTLC Fingerprint Analysis : A Quality Control for Authentication of Herbal Phytochemicals. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14025-9
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., Kohli, K., 2009.
  Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review.
  Inflamm. Allergy Drug Targets 8, 229–235. https://doi.org/10.2174/187152809788681029
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. Trends Biotechnol. 34, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008
- Rhizopoulou, S., 2007. Olea europaea L. A Botanical Contribution to Culture. Am. J. Agric. Environ. Sci. 2, 382–387.
- Ribeiro, M.H.L., Silveira, D., 2002. Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. Eur. Food Res. Technol. 215, 462–471. https://doi.org/10.1007/s00217-002-0592-0
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20, 933– 956. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9
- Robert J Nijveldt, Els van Nood, Danny EC vaRobert J Nijveldt, Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren, and P.A. van L., 2001.
  Review Article Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and. Am. J. Clin. Nutr. 74, 4, and P.A. van L., 2001. Review Article Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and. Am. J. Clin. Nutr. 74, 418–425.
- Rodríguez, I., Llompart, M.P., Cela, R., 2000. Solid-phase extraction of phenols. J. Chromatogr. A 885, 291–304. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00116-3

Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F.F., Cimato, A., 1999. Polyphenolic

content in five tuscany cultivars of Olea europaea L. J. Agric. Food Chem. 47, 964–967. https://doi.org/10.1021/jf980264t

- Romero Barranco, C., Brenes Balbuena, M., García García, P., Garrido Fernández, A., 2001. Management of spent brines or osmotic solutions. J. Food Eng. 49, 237– 246. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00204-1
- Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A., 2002. Hydroxytyrosol 4-B-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products.
  J. Agric. Food Chem. 50, 3835–3839. https://doi.org/10.1021/jf011485t
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., Garrido, A., 2004. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. J. Agric. Food Chem. 52, 479–484. https://doi.org/10.1021/jf0305251
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P.D., Lavee, S., Robards, K., 2002.
  Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth.
  J. Agric. Food Chem. 50, 6716–6724.
  https://doi.org/10.1021/jf025736p
- Ryan, D., Robards, K., 1998. Critical Review. Phenolic compounds in olives. Analyst 123, 31–44. https://doi.org/10.1039/a708920a
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S., 1999a. Changes in phenolic content of olive during maturation. Int. J. Food Sci. Technol. 34, 265–274. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1999.00261.x
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S., 1999b. Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. J. Chromatogr. A 832, 87–96. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00838-3
- Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S., 2005. An update on bioactive plant lignans. Nat. Prod. Rep. 22, 696. https://doi.org/10.1039/b514045p
- Sánchez-Quesada C.et al., 2013. Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of Olea europaea. J. Agric. Food Chem. 61, 12173–12182. https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/jf403154e |
- Sánchez, A., García, P., Rejano, L., Brenes, M., Garrido, A., 1995. The effects of 245

acidification and temperature during washing of Spanish-style green olives on the fermentation process. J. Sci. Food Agric. 68, 197–202. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680210

- Sánchez Gómez, A.H., García García, P., Rejano Navarro, L., 2006. Elaboration of table olives. Grasas y Aceites 57, 86–94. https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.24
- Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P., 2011. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. Int. Pharm. Sci. 1, 25–41. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.002
- Sandhu, A.K., Gu, L., 2013. Adsorption/Desorption Characteristics and Separation of Anthocyanins from Muscadine (Vitis rotundifolia) Juice Pomace by Use of Macroporous Adsorbent Resins. J. Agric. Food Chem. 61, 1441–1448.
- Savarese, M., De Marco, E., Falco, S., D'Antuoni, I., Sacchi, R., 2016. Biophenol extracts from olive oil mill wastewaters by membrane separation and adsorption resin. Int. J. Food Sci. Technol. 51, 2386–2395. https://doi.org/10.1111/ijfs.13219
- Schuldt, S., Schembecker, G., 2013. A Fully Automated Ad- and Desorption Method for Resin and Solvent Screening. Chem. Eng. Technol. 36, 1157–1164. https://doi.org/10.1002/ceat.201200725
- Scordino M., Mauro A., P.A. and M.E., 2004. Adsorption of Flavonoids on Resins : Cyanidin 3-Glucoside. J Agric Food Chem 52, 1965–1972. https://doi.org/10.1021/jf0352201 CCC: \$27.50
- Scordino, M., Mauro, A. Di, Passerini, A., Ã, E.M., 2007. Highly purified sugar concentrate from a residue of citrus pigments recovery process. LWT - Food Sci. Technol. 40, 713–721. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.007
- Sean X. Liu, 2014. Food and Agricultural Wastewater Utilisation and Treatment, 2Nd Ed., in: Sean X. Liu (Ed.), Food and Agricultural Wastewater Utilisation and Treatment, 2Nd Ed. Peoria, p. 23.
- Seidel, V., Verholle, M., Malard, Y., Tillequin, F., Fruchart, J.C., Duriez, P., Bailleul, F., Teissier, E., 2000. Phenylpropanoids from Ballota nigra L. inhibit in vitro LDL

peroxidation. Phyther. Res. 14, 93–98. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(200003)14:2<93::AID-PTR558>3.0.CO;2-X

- Serreli, G., Incani, A., Atzeri, A., Angioni, A., Campus, M., Cauli, E., Zurru, R., Deiana, M., 2017. Antioxidant Effect of Natural Table Olives Phenolic Extract Against Oxidative Stress and Membrane Damage in Enterocyte-Like Cells. J. Food Sci. 82, 380–385. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13613
- Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Jha, P., Heubi, J.E., 2014. Metabolism of secoisolariciresinol-diglycoside the dietary precursor to the intestinally derived lignan enterolactone in humans. Food Funct. 5, 491–501. https://doi.org/10.1039/c3fo60402k
- Shelke P.G., Tripathi A.S., Dewani A.P., Bakal R.L., M.D.S. and C.A.V., 2012. Liquid Chromatography in conjunction with Mass Spectrometry (LC-MS). IJPCS 1, 1532–1538.
- Shelkovnikova, L.A., Gavlina, O.T., Ivanov, V.A., 2010. A two-temperature concentration of alkali solutions on phenol-formaldehyde sorbents. Russ. J. Phys. Chem. A 84, 1967–1972. https://doi.org/10.1134/s0036024410110257
- Shelkovnikova, L.A., Gavlina, O.T., Ivanov, V.A., Gorshkov, V.I., 2009. The influence of temperature on the ion exchange properties of phenolformaldehyde sorbents.
  Russ. J. Phys. Chem. A 83, 2122–2126. https://doi.org/10.1134/S0036024409120218
- Sivakumar, G., Briccoli Bati, C., Uccella, N., 2005. HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. Chem. Nat. Compd. 41, 588–591. https://doi.org/10.1007/s10600-005-0214-8
- Sok, D.-E., Cui, H.S., Kim, M.R., 2009. Isolation and bioactivities of furfuran type lignan compounds from edible plants. Recent Pat. Food. Nutr. Agric. 1, 87–95. https://doi.org/10.2174/2212798410901010087
- Solutions, P., n.d. Reliability, Value, and Innovation.
- Soto, M.L., Conde, E., González-López, N., Conde, M.J., Moure, A., Sineiro, J., Falqué, E., Domínguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C., 2012. Recovery and

concentration of antioxidants from winery wastes. Molecules 17, 3008–3024. https://doi.org/10.3390/molecules17033008

- Spanier, A.M., Shahidi, F., Parliment, T.H., Mussinan, C., Ho, C.-T., Contis, E.T., Warner, K., Neff, W.E., 2001. Food Flavors and Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781847550859
- Stadtman, E.R., 2006. Protein oxidation and aging. Free Radic. Res. 40, 1250–1258. https://doi.org/10.1080/10715760600918142
- Stoclet, J.C., Schini-Kerth, V., 2011. Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. Ann. Pharm. Fr. 69, 78–90. https://doi.org/10.1016/j.pharma.2010.11.004
- Sun, P., Liu, Y., Yi, Y., Li, H., Fan, P., Xia, C., 2015. Preliminary enrichment and separation of chlorogenic acid from Helianthus tuberosus L . leaves extract by macroporous resins. Food chemisrty 168, 55–62. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.038
- Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R.R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Moccetti, T., Verbruggen, M., 2011. Olive (Olea europaea) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. Phytomedicine 18, 251–258. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.016
- Suzuki, S., Umezawa, T., 2007. Biosynthesis of lignans and norlignans. J. Wood Sci. 53, 273–284. https://doi.org/10.1007/s10086-007-0892-x
- T., M.J.K. and S., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J. Agric. Food Chem. 57, 1655–1666. https://doi.org/10.1021/jf803537k
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Zarrouk, M., Valverde, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2012. The Occurrence and Bioactivity of Polyphenols in Tunisian Olive Products and by-Products: A Review. J. Food Sci. 77. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02599.x
- Tang, W., Sun, B., Zhao, Y., 2014. Preparative separation and purification of rosmarinic acid from perilla seed meal via combined column chromatography. J. Chromatogr. B 947–948, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.007
- Tatoulis, T.I., Zapantiotis, S., Frontistis, Z., Akratos, C.S., Tekerlekopoulou, A.G., 248

Pavlou, S., Mantzavinos, D., Vayenas, D. V., 2016. A hybrid system comprising an aerobic biological process and electrochemical oxidation for the treatment of black table olive processing wastewaters. Int. Biodeterior. Biodegrad. 109, 104– 112. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.01.013

- Taylor, P., Deng, G., Xu, X., Zhang, Y., Li, D., Gan, R., Li, H., Deng, G., Xu, X., Zhang, Y., Li, D.A.N., 2013. Phenolic Compounds and Bioactivities of Pigmented Phenolic Compounds and Bioactivities of Pigmented Rice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53, 296–306. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.529624
- Terzuoli, E., Nannelli, G., Frosini, M., Giachetti, A., Ziche, M., Donnini, S., 2017. Inhibition of cell cycle progression by the hydroxytyrosol-cetuximab combination yields enhanced chemotherapeutic efficacy in colon cancer cells. Oncotarget 8, 83207–83224. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20544
- Theodosiou, T. Valsamidis, S., Hatziliadis, G., Nikolaidis, M., 2004. Application of Data Mining Techniques to Olea europaea var. media oblonga production from Thassos Island. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 25, 690–695.
- Tirzitis, G., Bartosz, G., 2010. Determination of antiradical and antioxidant activity : basic principles and new insights 57, 139–142.
- Trikas, E.D., Papi, R.M., Kyriakidis, D.A., Zachariadis, G.A., 2017. Evaluation of Ion Exchange and Sorbing Materials for Their Adsorption / Desorption Performane towards Anthocyanins, Total Phenolics, and Sugars from a Grape Pomace Extract. Separations 4, 1–11. https://doi.org/10.3390/separations4010009
- Tweddell, R.J., Kermasha, S., Combes, D., Marty, A., 1999. Immobilization of lipase from Rhizopus niveus: A way to enhance its synthetic activity in organic solvent.
  Biocatal. Biotransformation 16, 411–426. https://doi.org/10.3109/10242429909015219
- Umezawa, T., 2003. Diversity in lignan biosynthesis. Phytochem. Rev. 2, 371–390. https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000045487.02836.32
- Uylaşer, V., Yildiz, G., 2014. The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. Crit.

 Rev.
 Food
 Sci.
 Nutr.
 54,
 1092–101.

 https://doi.org/10.1080/10408398.2011.626874

- Van Dyk, J.S., Gama, R., Morrison, D., Swart, S., Pletschke, B.I., 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. Renew. Sustain. Energy Rev. 26, 521–531. https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.016
- Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2005. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (Olea europaea L.): Influences of cultivar and geographical origin. Food Chem. 89, 561–568. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.012
- Visen, P., Saraswat, B., Visen, A., Roller, M., Bily, A., Mermet, C., He, K., Bai, N., Lemaire, B., Lafay, S., Ibarra, A., 2009. Acute effects of Fraxinus excelsior L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers. J. Ethnopharmacol. 126, 226–232. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.039
- Vlahov, G., 1992. Flavonoids in Three Olive (Olea europaea) Fruit\rVarieties during Maturation. J Sci Food Agric 58, 157–159.
- Vossen, P., 2007. Olive oil: History, production, and characteristics of the world's classic oils. HortScience 42, 1093–1100.
- Wang, Q., Gao, Q., Gao, X., Nie, F., 2017. Principal component analysis. IJCAI Int. Jt. Conf. Artif. Intell. 2936–2942. https://doi.org/10.1039/c3ay41907j
- Wang, Q., Ying, T., Jahangir, M.M., Jiang, T., 2012. Study on removal of coloured impurity in soybean oligosaccharides extracted from sweet slurry by adsorption resins. J. Food Eng. 111, 386–393. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.005
- Watson, D.G., Atsriku, C., Oliveira, E.J., 2003. Review role of liquid chromatography

  mass spectrometry in the analysis of oxidation products and antioxidants in
  biological systems. Anal. Chim. Acta 492, 17–47. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00467-7
- Weisz, G.M., Carle, R., Kammerer, D.R., 2013. Sustainable sun fl ower processing II . Recovery of phenolic compounds as a by-product of sun fl ower protein

extraction. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 17, 169–179. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.009

- Weisz, G.M., Schneider, L., Schweiggert, U., Kammerer, D.R., Carle, R., 2010.
  Sustainable sun fl ower processing I . Development of a process for the adsorptive decolorization of sun fl ower [ Helianthus annuus L .] protein extracts
  ☆. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 11, 733–741.
  https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.05.005
- Wikul, A., Damsud, T., Kataoka, K., Phuwapraisirisan, P., 2012. (+)-Pinoresinol is a putative hypoglycemic agent in defatted sesame (Sesamum indicum) seeds though inhibiting α-glucosidase. Bioorganic Med. Chem. Lett. 22, 5215–5217. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.068
- Wołowicz, A., Hubicki, Z., 2010. Effect of matrix and structure types of ion exchangers on palladium(II) sorption from acidic medium. Chem. Eng. J. 160, 660–670. https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.04.009
- Xiong, Q., Zhang, Q., Zhang, D., Shi, Y., Jiang, C., Shi, X., 2014. Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (Arachis hypogaea) sprouts by macroporous adsorption resins. Food Chem. 145, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.140
- Xu, Y., Li, L.Z., Cong, Q., Wang, W., Qi, X.L., Peng, Y., Song, S.J., 2017. Bioactive lignans and flavones with in vitro antioxidant and neuroprotective properties from Rubus idaeus rhizome. J. Funct. Foods 32, 160–169. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.022
- Xu, Z., Zhang, Q., Fang, H.H.P., 2017. Applications of Porous Resin Sorbents in Industrial Wastewater Treatment and Resource Recovery 3389. https://doi.org/10.1080/10643380390249512
- Xynos, N., Abatis, D., Argyropoulou, A., Polychronopoulos, P., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L., 2015. Development of a Sustainable Procedure for the Recovery of Hydroxytyrosol from Table Olive Processing Wastewater Using Adsorption Resin Technology and Centrifugal Partition Chromatography. Planta Med. 81, 1621–1627. https://doi.org/10.1055/s-0035-1558111
- Yang, L., Tan, T., 2008. Enhancement of the isolation selectivity of isoflavonoid puerarin using oligo- β -cyclodextrin coupled polystyrene-based media. Biochem. Eng. Journa 40, 189–198. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.007
- Yang, Q., Zhao, M., Lin, L., 2016. Adsorption and desorption characteristics of adlay bran free phenolics on macroporous resins. Food Chem. 194, 900–907. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.070
- Yao, L., Zhang, N., Wang, C., Wang, C., 2015. Highly Selective Separation and Puri fi cation of Anthocyanins from Bilberry Based on a Macroporous Polymeric Adsorbent. J. Agric. Food Chem. https://doi.org/10.1021/jf506107m
- Zava, D.T., Duwe, G., 1933. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro Estrogenic and Antiproliferative Properties of Genistein and Other Flavonoids in Human Breast Cancer Cells In Vitro. Nutr. Cancer 27, 37–41. https://doi.org/10.1080/01635589709514498
- Zhang, J., Hayat, K., Zhang, X., Tong, J., Xia, S., Zhang, J., Hayat, K., Zhang, X., Tong, J., Xia, S., 2017. Separation and Purification of Flavonoid from Ginkgo Extract by Polyamide Resin Separation and Purification of Flavonoid from Ginkgo Extract by Polyamide Resin 6395. https://doi.org/10.1080/01496395.2010.487844
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Suzuki, C., Okamoto, H., Li, J., 1994. Lignans from bark of the Olea plants. I. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 1195–1201. https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229
- Zhao, R., Yan, Y., Li, M., Yan, H., 2008. Selective adsorption of tea polyphenols from aqueous solution of the mixture with caffeine on macroporous crosslinked poly ( N -vinyl-2-pyrrolidinone). React. Funct. Polym. 68, 768–774. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.11.016
- Zhaoyi X., Q.Z. and H.H.P.F., 2003. Application of porous resin sorbents in industrial wastewater treatmeant and resource recovery. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 33, 363–389. https://doi.org/10.1080/10643380390249512
- Zoidou, E., Melliou, E., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L.,

2010. Identification of throuba thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein. J. Agric. Food Chem. 58, 46–50. https://doi.org/10.1021/jf903405e

- Zouari, N., 1998. Decolorization of Olive Oil Mill Effluent by Physical and Chemical Treatment Prior to Anaerobic Digestion.
- ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ, 1994. https://doi.org/10.1007/978-3-8348-2331-1
- E.M.A., 2017. Assessment report on Olea europaea L ., folium 44.
- Κακριδής, Ι., 1987. Ελληνική μυθολογια,. Εκδοτική Αθηνών.
- Κατσοπρινάκη, Σ., 2004. Εφαρμογή της ιοντοεναλλαγής στην επεξεργασία νερού & υδατικών διαλυμάτων.
- Κυριτσάκης, Α., 2017. Ελαιόλαδο. Θεσσαλονίκη.
- Χατζηϊάννου Θ.Π., Ευσταθίου Κ.Η., Νικολέλη Δ.Π., 1988. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ. ΟΕΔΒ. Αθήνα.

Μακρυγιαννάκης, Μ., 2016. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης. Αθήνα