



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**«ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΜΕΣΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΩΝ  
ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ  $^1\text{H-NMR}$ »**

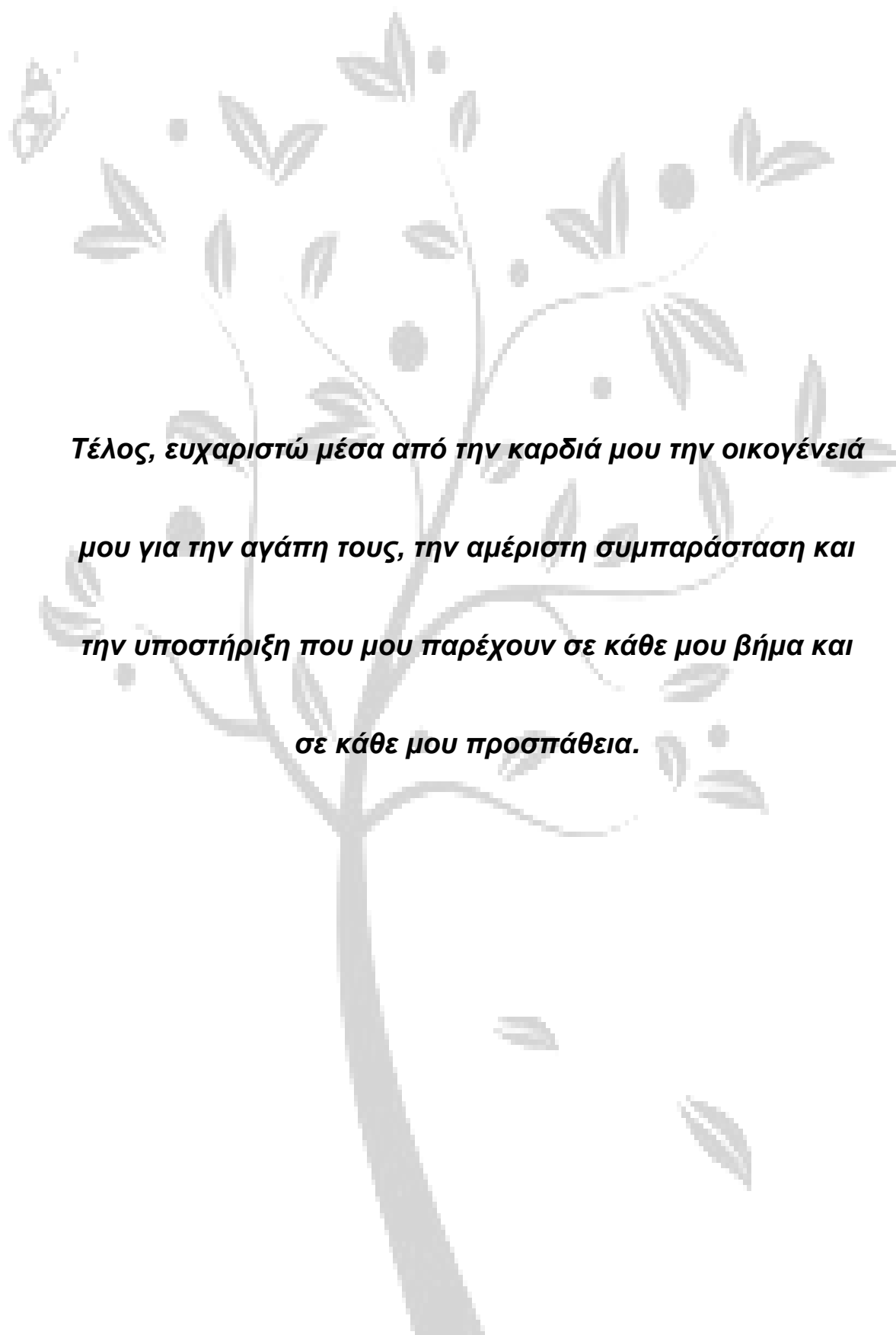
**Κάρκουλα Ευαγγελία  
Φαρμακοποιός**

**Αθήνα 2013**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Α.Λ. Σκαλτσούνη, κ. Β. Ρούσση και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ.Μ. Κουλάδη που δέχτηκαν να εκπονήσω το μεταπτυχιακό μου στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.
- Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, τον καθηγητή κ. Βασίλειο Ρούσση, τον επίκουρο καθηγητή κ. Νεκτάριο Αλγηιάννη και τον επίκουρο καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία.
- Ευχαριστώ τον υπεύθυνο για αυτή τη διπλωματική εργασία, επίκουρο καθηγητή, κ. Προκόπιο Μαγιάτη για την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή καθοδήγηση. Τον ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας.
- Ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για τις γνώσεις που μου προσέφεραν, καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.
- Ευχαριστώ τη διδάκτορα κ. Ελένη Μέλλιου για τη συμβολή της στην υλοποίηση αυτής της εργασίας.
- Ευχαριστώ τη μεταπτυχιακό κ. Αγγελική Σκάντζαρη για την ακούραστη καθοδήγησή της, τις συμβουλές της και όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε.
- Ευχαριστώ όλους τους ελαιοπαραγωγούς που με τίμησαν με την προμήθεια των δειγμάτων ελαιόλαδου.
- Ευχαριστώ το δήμο Μεσσήνης, το «Μανιατάκειον Ίδρυμα» στην Κορώνη, τον καθηγητή κ. Γ. Μπαλτόπουλο, την κ. Κ. Παπανικολάου (δήμος Παγγαίου), τους βουλευτές Ι. Πασχαλίδη και Γ. Κασαπίδη, τον AGROCERT και όλους όσους συνεισέφεραν στη δημιουργία της συλλογής ελαιόλαδων πάνω στην οποία στηρίχτηκε αυτή η μελέτη.
- Ευχαριστώ την ομάδα γευσιγνωσίας ελαιόλαδου του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας με επικεφαλής τον επίκουρο καθηγητή κ. Β. Δημόπουλο για την εποικοδομητική συνεργασία.
- Ευχαριστώ τους φίλους μου Τζένη, Νικητία, Μαρία, Κατερίνα και Γρηγόρη για τις υπέροχες στιγμές που περάσαμε όλοι μαζί στο εργαστήριο και τη στήριξή τους τα τελευταία χρόνια.
- Ευχαριστώ όλα τα παιδιά από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας για τη φιλία τους και την ηθική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια αυτού του μεταπτυχιακού.





***Τέλος, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου την οικογένειά μου για την αγάπη τους, την αμέριστη συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου παρέχουν σε κάθε μου βήμα και σε κάθε μου προσπάθεια.***



**Στο Λουτσιάνο**

**και**

**στην Τζένη**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού τεσσάρων σεκοϊριδοειδών και συγκεκριμένα της ελαιοκανθάλης, της ελαιασίνης, της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα, με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Οι ουσίες αυτές διαθέτουν πολύ σπουδαίες βιολογικές ιδιότητες και η περιεκτικότητά τους στο ελαιόλαδο μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυνητικά σαν δείκτης ποιότητας αυτού.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας αναφέρονται, αρχικά, τα βοτανικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Oleaceae καθώς και η διάκριση των ποικιλιών ελιάς στην Ελλάδα. Στη συνέχεια, γίνεται μια πιο λεπτομερής αναφορά στο ελαιόλαδο και στον τρόπο παραγωγής του στα διάφορα είδη των ελαιοτριβείων. Επίσης αναφέρονται οι παράγοντες που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των συστατικών του ελαιόλαδου καθώς και κάποιες νέες μέθοδοι που προτείνονται για τη βελτίωση της διαδικασίας παραγωγής. Τέλος παρουσιάζονται οι χημικές κατηγορίες και οι βιολογικές ιδιότητες των συστατικών του ελαιόλαδου και δίνονται ορισμένες πληροφορίες όσον αφορά το κομμάτι της γευσιγνωσίας.

Το δεύτερο μέρος χωρίζεται σε δύο πειραματικές ενότητες. Η πρώτη ενότητα αναφέρεται στην κατεργασία εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου με την τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης, στην απομόνωση δραστικών μεταβολιτών και στη φασματοσκοπική τους μελέτη. Η δεύτερη ενότητα περιλαμβάνει την ποσοτικοποίηση των σεκοϊριδοειδών σε ελαιόλαδο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καθώς και τις διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου. Επίσης γίνεται αναφορά στη συσχέτιση του περιεχομένου σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ορισμένων δειγμάτων.

Το τρίτο και τελευταίο μέρος της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει την εφαρμογή της μεθόδου άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού σεκοϊριδοειδών σε ελληνικά δείγματα ελαιόλαδου και την περαιτέρω στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Τέλος αναφέρονται πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα του ελαιόλαδου και τις μεταβολές που παρατηρούνται στην ποσοτική του σύσταση όσον αφορά την εποχή συγκομιδής του ελαιοκαρπού και τη θερμοκρασία παραγωγής του ελαιόλαδου.





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>2</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>8</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>10</b>
<b>Α' ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>14</b>
<b>1 ΕΛΙΑ</b> .....	<b>16</b>
1.1 ΕΛΙΑ – ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ .....	16
1.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ .....	16
1.3 ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	18
1.3.1 Ποικιλίες για ελαιοποίηση .....	19
1.3.2 Επιτραπέζιες ποικιλίες.....	20
1.3.3 Μεικτές ποικιλίες .....	21
<b>2 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ</b> .....	<b>23</b>
2.1 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΙΔΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	23
2.2 ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΘΕΣΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ, ΣΠΟΡΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΩΝ .....	24
2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....	25
2.4 ΕΙΔΗ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ .....	26
2.4.1 Παραδοσιακή επεξεργασία .....	26
2.4.2 Επεξεργασία τριών φάσεων .....	27
2.4.3 Επεξεργασία δύο φάσεων .....	30
2.4.4 Μέθοδος SINOLEA .....	32
2.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ .....	33
2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....	35
2.6.1 Εποχή συγκομιδής ελαιοκαρπού.....	36
2.6.2 Διαδικασία εξαγωγής ελαιόλαδου στο ελαιοτριβείο .....	38
2.7 ΝΕΕΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	40
<b>3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</b> .....	<b>42</b>
3.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	43
3.2 ΙΡΙΔΟΕΙΔΗ – ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ.....	45
3.2.1 Βιολογικές ιδιότητες σεκοΐριδοειδών και φαινολικών ενώσεων... ..	47
3.3 ΛΙΓΝΑΝΙΑ.....	51
3.3.1 Βιολογική δράση λιγνανίων .....	52
<b>4 ΓΕΥΣΙΓΝΩΣΙΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</b> .....	<b>54</b>
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	54
4.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΤΟΥΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	54
4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	55

4.3.1	Μοντέλο πρόβλεψης με βάση το δείκτη ολικών φαινολών του ελαιόλαδου .....	56
4.3.2	Μοντέλο πρόβλεψης με βάση το δείκτη $K_{225}$ του ελαιόλαδου .....	57
<b>Β' ΜΕΡΟΣ .....</b>		<b>60</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ 1 .....</b>		<b>62</b>
<b>5</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ .....</b>	<b>64</b>
6.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	64
6.2	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	64
6.2.1	Οργανολογία .....	64
6.2.2	Εκχύλιση ελαιόλαδου για παραλαβή φαινολικών συστατικών....	64
6.3	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗΛΗΣ ΜΕ ΓΕΛΗ ΠΥΡΙΤΙΟΥ (SILICA GEL) ΥΠΟ ΧΑΜΗΛΗ ΠΙΕΣΗ .....	65
6.3.1	Οργανολογία .....	65
6.3.2	Παραγωγή ολικού εκχυλίσματος προς χρωματογράφηση .....	66
6.3.3	Χρωματογραφική στήλη Νο 1 .....	67
6.3.4	Επεξεργασία κλασμάτων της χρωματογραφικής στήλης Νο 1 – Απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων .....	71
<b>7</b>	<b>ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΙΣΟΜΕΡΩΝ ΤΗΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ .....</b>	<b>75</b>
7.1	ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΓΕΛΗ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ .....	75
7.1.1	Γέλη πυριτίου .....	76
7.1.2	Κατεργασία εκχυλίσματος ελαιόλαδου με γέλη πυριτίου .....	77
7.2	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ....	79
<b>8</b>	<b>ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΕΙΣ .....</b>	<b>81</b>
8.1	ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ.....	81
8.1.1	Βιολογικές ιδιότητες ελαιοκανθάλης.....	83
8.2	ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ .....	86
8.2.1	Βιολογικές ιδιότητες ελαιασίνης .....	88
8.3	ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ .....	89
8.3.1	Βιολογικές ιδιότητες αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη .....	92
8.4	ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ .....	93
8.4.1	Βιολογικές ιδιότητες αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης .....	95
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ 2 .....</b>		<b>97</b>

<b>9</b>	<b>ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕΣΑ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ <sup>1</sup>H-NMR</b> .....	<b>97</b>
9.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	97
9.2	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	97
9.3	ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ .....	97
9.4	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ .....	98
9.5	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ.....	99
9.6	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ .....	100
9.7	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ .....	101
<b>10</b>	<b>ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΜΕΣΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ <sup>1</sup>H-NMR</b> .....	<b>103</b>
10.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	103
10.2	ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ (LINEARITY) .....	103
10.3	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (PRECISION).....	103
10.4	ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ACCURACY) .....	104
10.5	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (RECOVERY) .....	104
10.6	ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOD, LOQ).....	105
<b>11</b>	<b>ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ ΜΕ ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΟΡΩΝΕΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ</b> .....	<b>106</b>
	<b>ΜΕΡΟΣ Γ'</b> .....	<b>110</b>
<b>12</b>	<b>ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ, ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</b> .....	<b>112</b>
12.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	112
12.1.1	Οργανολογία .....	112
12.1.2	Κατεργασία δειγμάτων ελαιόλαδου–Παρασκευή εκχυλισμάτων.....	112
12.1.3	Αρχή μεθόδου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού .....	113
12.1.4	Εσωτερικό πρότυπο.....	113
12.2	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ.....	113
12.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	114
12.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΕΚΘΛΙΨΗΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	129
12.5	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	130
12.6	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑΣ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	131
12.7	ΣΥΝΟΨΗ-ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ.....	132
<b>13</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>134</b>
<b>14</b>	<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b> .....	<b>136</b>
<b>15</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>137</b>







# 1 ΕΛΙΑ

## 1.1 ΕΛΙΑ – ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ελιά ανήκει στη βοτανική οικογένεια *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα: *Olea* (Ελιά), *Syringa* (Πασχαλιά), *Forsythia* (Φορσύθια), *Ligustrum* (Λιγούστρο), *Jasminium* (Γιασεμί) και *Phillyrea* (Φυλλίκι, Λιόπρινος). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 40 διαφορετικά είδη, που είναι διασπαρμένα στις 5 ηπείρους. Το είδος που έχει οικονομικό ενδιαφέρον είναι το *Olea europaea*, που παρουσιάζει δύο παραλλαγές την *Olea europaea* L. var. *oleaster* Miller (κν. άγρια ελιά) και την *Olea europaea* var. *sativa* (κν. ήμερη ελιά).

<b>Βασίλειο:</b>	Plantae
<b>Διαίρεση:</b>	Magnoliophyta
<b>Κλάση:</b>	Magnoliopsida
<b>Υποκλάση:</b>	Asteridae (Sympetalae tetracyclae)
<b>Τάξη:</b>	Lamiales
<b>Οικογένεια:</b>	Oleaceae
<b>Υποοικογένεια:</b>	Oleoideae
<b>Γένος:</b>	Olea

Πίνακας 1: Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς.

## 1.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τα εξής είδη και ποικιλίες (Γεωργαλάς Γ.Κ.):

- Ελαία η άγρια (*Olea europaea* L. var. *sylvestris*) Hoffmanns and Link, κοινώς αγριελιά ή αγριλίδι
- Ελαία η ευρωπαϊκή (*Olea europaea*) ή κοινή, το συνηθέστερα καλλιεργούμενο είδος ανά τον κόσμο



- Ελαία η αιολόκαρπος (*Olea europaea cv. aeolocarpus*)
- Ελαία η ηδύκαρπος (*Olea europaea cv. nigra dulcis*)
- Ελαία η ισπανική (*Olea europaea cv. hispanica*)
- Ελαία η κρανιόμορφος (*Olea europaea cv. craniomorpha*), κοινώς Λιανολιά Κερκύρας
- Ελαία η κρεμοκλαδής (*Olea europaea cv. pendulata*), κοινώς κρεβατοελιά
- Ελαία η κωνική (*Olea europaea cv. conica*), κοινώς ελιά σαλωνίτικη
- Ελαία η λευκόκαρπος (*Olea europaea cv. leucocarpa*)
- Ελαία η μακρόκαρπος (*Olea europaea cv. macrocarpa*), κοινώς αετονυχολιά
- Ελαία η μικρόκαρπος (*Olea europaea cv. microcarpa*), κοινώς κορωνέικη
- Ελαία η μαστοειδής (*Olea europaea cv. mamillaris*), κοινώς αθηνολιά
- Ελαία η πρώιμος (*Olea europaea cv. precox*), κοινώς καλοκαιρίδα
- Ελαία η σαλέρνιος (*Olea europaea cv. salerniensis*), κοινώς γαϊδουρολιά
- Ελαία η στρεπτή (*Olea europaea cv. contorta*), κοινώς στριφτολιά
- Ελαία η στρογγυλοειδής (*Olea europaea cv. rotunda virida*)
- Ελαία η υποστρογγύλος (*Olea europaea cv. subrotunda*)
- Ελαία η σφαιρική (*Olea europaea cv. sphaerica*)
- Ελαία η υπόχλωρος (*Olea europaea cv. virida*)

Σε μερικές απ' αυτές τις ποικιλίες, με ορθολογική επιλογή, έχει επιτευχθεί μεγαλύτερη απόδοση σε ελαιόλαδο χάρη σε μια αξιόλογη σμίκρυνση του πυρήνα προς όφελος της σάρκας.

Η ταξινόμηση των ποικιλιών της ελιάς μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους.

Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο το **μέγεθος των καρπών** δημιουργήθηκαν οι τρεις ακόλουθες κατηγορίες:

- α) **μικρόκαρπες** (βάρος καρπού μικρότερο από 2,6g)
- β) **μεσόκαρπες** (βάρος καρπού κυμαινόμενο από 2,7g έως 4,2g)
- γ) **αδρόκαρπες** (βάρος καρπού μεγαλύτερο από 4,3g)

Από μια επόμενη ταξινόμηση, η οποία έγινε ανάλογα με τα **χαρακτηριστικά του πυρήνα και των φύλλων**, προέκυψαν οι εξής τρεις κατηγορίες:

- α) **μικροπύρηνες** (βάρος κουκουτσιού από 0,16 έως 0,35g)
- β) **μεσοπύρηνες** (βάρος κουκουτσιού από 0,35 έως 0,65g)
- γ) **μακροπύρηνες** (βάρος κουκουτσιού από 0,65 έως 1,30g) (Λύχνος Ν., 1948)

ΜΙΚΡΟΚΑΡΠΕΣ	ΜΕΣΟΚΑΡΠΕΣ	ΑΔΡΟΚΑΡΠΕΣ ή ΧΟΝΔΡΟΛΙΕΣ
Αγριελιά	Αγουρομανακολιά	Αμυγδαλολιά
Κορωνέικη	Αδραμυτινή	Βασιλικάδα
Κουτσουρελιά	Βαλανολιά	Γαϊδουρολιά
Λιανολιά Κερκύρας	Θρουμπολιά	Καρολιά
Μαστοειδής	Μεγαρίτικη	Καρυδολιά
Θιακή	Πικρολιά	Καλαμών
Μουρτολιά	Καλοκαιρίδα	Κοθρέικη
Μαυρελιά	Δαφνελιά	Κολυμπάδα
Τραγολιά		Κονσερβολιά
Λευκόκαρπος ή Ασπρολιά		Στρογγυλολιά
Μελολιά		
Χρυσολιά		

**Πίνακας 2:** Διάκριση ελληνικών ποικιλιών ελιάς

Ωστόσο, οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των παραπάνω ποικιλιών δεν είχαν γενετική βάση αλλά ήταν απόρροια της επιδράσεως περιβαλλοντικών παραγόντων. Έτσι εφόσον οι χαρακτήρες αυτοί δεν είναι σταθεροί, δεν μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστα κριτήρια. Με την εφαρμογή όμως της ηλεκτροφορητικής τεχνικής και τη μελέτη 16 ενζυμικών πολυμορφισμών κατέστη δυνατή η πλήρης διάκριση 27 καλλιεργούμενων ποικιλιών. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τον καθορισμό της γενετικής συνθέσεως ενός οργανισμού. (Ποντίκης Κ., 1992)

### 1.3 ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Η διάκριση των ποικιλιών γίνεται και ανάλογα με τον προορισμό χρήσης του καρπού. Με αυτή τη μέθοδο οι ποικιλίες χωρίζονται σε τρεις ομάδες οι οποίες είναι οι ποικιλίες για ελαιοποίηση, οι επιτραπέζιες και οι μεικτές ποικιλίες ή διπλής χρήσης.

### 1.3.1 Ποικιλίες για ελαιοποίηση

#### ❖ Κορωνέικη – *Olea europaea cv. microcarpa*

Η Κορωνέικη καλλιεργείται στην Πελοπόννησο (Μεσσηνία, Λακωνία, Αχαΐα), στην Κρήτη (Χανιά, Ρέθυμνο, Ηράκλειο), στα Ιόνια νησιά (Ζάκυνθος, Κεφαλονιά), στη Δυτική Στερεά, στη Σάμο, στην Ικαρία και αλλού. Είναι γνωστή επίσης ως Μικρόκαρπη, Ψιλολιά, Λιανολιά, Κρητικιά, Κορώνη, Βάτσικη, Ασπρολιά. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο κυμαίνεται γύρω στο 22% και το άρωμα και η γεύση του είναι εξαιρετικά. Πρόκειται για μια ποικιλία με φημισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

#### ❖ Αγουρομανάκι – *Olea europaea cv. ovalis*

Το αγουρομανάκι καλλιεργείται στην Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία, Σπέτσες και στην Ερμιονίδα. Είναι γνωστή και ως Αγουρομανάκι και Αγουρομάνακο. Επίσης είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στο ψύχος. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο φτάνει το 25%. Χαρακτηρίζεται από εξαιρετικό άρωμα και πολύ γλυκιά γεύση.

#### ❖ Αδραμυτινή – *Olea europaea cv. media subrotunda*

Η Αδραμυτινή καλλιεργείται κυρίως σε Μυτιλήνη, Χίο, Εύβοια και στην Άνδρο. Είναι γνωστή και ως Αϊβαλιώτικη, Κασδαγλίτισσα, Μυτιληνιά και Φραγκολιά. Προέρχεται από τη Μ. Ασία. Η περιεκτικότητα της Αδραμυτινής σε ελαιόλαδο φτάνει το 22-25% το οποίο είναι λεπτόρρευστο και έχει εξαιρετικό άρωμα.

#### ❖ Αθηνολιά – *Olea europaea cv. mamilaris*

Η Αθηνολιά καλλιεργείται σε Χανιά, Λακωνία, Ρέθυμνο και Μεσσηνία. Είναι γνωστή επίσης ως Τσουνάτη, Μαστοιδής, Μαστολιά, Ματσολιά, Μουρατολιά. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο μπορεί να φτάσει το 25% και είναι εξαιρετικής ποιότητας όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

#### ❖ Βαλανολιά – *Olea europaea cv. pyriformis*

Η Βαλανολιά καλλιεργείται στη Μυτιλήνη, Χίο και Σκύρο. Είναι γνωστή ως Κολοβή, Βαλάνα και Μυτιληνιά. Η περιεκτικότητα της Βαλανολιάς σε ελαιόλαδο φτάνει το 25-30% και είναι εξαιρετικής ποιότητας, με έντονο άρωμα και γεύση.

#### ❖ Κουτσουρελιά – *Olea europaea cv. microphylla*

Η Κουτσουρελιά καλλιεργείται στην Αιγιαλεία (Αχαΐα), στην Κορινθία και την Αιτωλοακαρνανία. Είναι γνωστή και με τα τοπικά ονόματα Λιανολιά ψιλή ή χοντρή, Πατρινή, Κουρτελιά κ.ά. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο κυμαίνεται περίπου 23- 24%, έχει ωραίο άρωμα και αρκετά καλή γεύση. Το όνομά της οφείλεται στο γεγονός ότι την εποχή ωρίμανσης χάνει αρκετά φύλλα.

#### ❖ Λιανολιά Κερκύρας – *Olea europaea cv. craneomorpha*

Η Λιανολιά Κερκύρας καλλιεργείται στα Ιόνια νησιά και στα παράλια της Ηπείρου. Είναι γνωστή ως Δαφνοφύλλη, Στριφτολιά, Νερολιά, Σουβλολιά, Πρεβεζάνα, Μερολιά, Κορφολιά, Κορφιάτικη. Η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιόλαδο κυμαίνεται περί το 20% και είναι άριστης ποιότητας εφόσον δεν καθυστερήσει η συγκομιδή του.

❖ **Μεγαρίτικη – *Olea europaea cv. argentata***

Η Μεγαρίτικη καλλιεργείται κυρίως στην Αττική και στη Βοιωτία, αλλά και σε Αργολίδα, Αιγιαλεία (Αχαΐα) και Κυνουρία. Ονομάζεται επίσης Λαδολιά, Περαχωρίτικη, Βοβωδική, Χοντρολιά. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο κυμαίνεται από 20-29% και είναι μέτριας ως καλής ποιότητας κατά περίπτωση.

❖ **Μυρτολιά – *Olea europaea cv. microcarpa subrotunda***

Η Μυρτολιά καλλιεργείται κυρίως στη Λακωνία και είναι γνωστή ως Μερτολιά ή Μουρτολιά. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο μπορεί να φτάσει το 25% και είναι καλής ποιότητας.

### 1.3.2 Επιτραπέζιες ποικιλίες

❖ **Αδρόκαρπη – *Olea europaea cv. mayor ή prunera***

Η Αδρόκαρπη καλλιεργείται σε όλη την Ελλάδα, αλλά το ενδιαφέρον της είναι περιορισμένο. Λέγεται και Κορομηλολιά, Δαμασκηνάτη, Ισπανική, Παλαμάρα. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 9,7:1 και η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο 27%. Χρησιμοποιείται για παραγωγή πράσινης και μαύρης επιτραπέζιας ελιάς, η οποία όμως έχει μέτρια ποιότητα.

❖ **Κονσερβολιά – *Olea europaea cv. rotunda***

Η Κονσερβολιά καλλιεργείται κυρίως στο Αγρίνιο, στην Άμφισσα, Άρτα, Εύβοια, Λαμία, Πάτρα, Πήλιο, αλλά και σε πολλές άλλες περιοχές της χώρας. Είναι επίσης γνωστή ως Αγρινίου, Άμφισσας, Βολιώτικη, Πατριλιά, Χοντρολιά, Στρογγυλολιά, Καρυδολιά κ.ά. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 10:1 και η περιεκτικότητα του σε ελαιόλαδο είναι 15%. Δίνει πράσινες και μαύρες επιτραπέζιες ελιές άριστης ποιότητας, ιδιαίτερα κατάλληλες για κονσερβοποίηση.

❖ **Βασιλακάδα – *Olea europaea cv. regalis***

Η Βασιλακάδα καλλιεργείται στην Κέρκυρα, στις Ροβιές Ευβοίας και στη Χαλκιδική. Είναι γνωστή επίσης ως Βασιλική, Ισπανική, Κολοκυθάτη, Ροβιάτικη κ.ά. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 7,6:1 και η περιεκτικότητα της σε ελαιόλαδο μόλις 16%. Αποτελεί κατάλληλη ποικιλία για την παραγωγή μαύρης και πράσινης επιτραπέζιας ελιάς.

❖ **Καλαμών – *Olea europaea cv. ceraticarpa***

Η ποικιλία Καλαμών καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία, Λακωνία καθώς και στην Αχαΐα. Ονομάζεται και Καλαματιανή, Αετονύχι και Χοντρολιά. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 8,3:1 και η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 17-19%. Είναι μια από τις καλύτερες επιτραπέζιες ποικιλίες.

❖ **Καρολιά – *Olea europaea cv. oblonga***

Η Καρολιά καλλιεργείται σε Μυτιλήνη, Κέρκυρα και Ζάκυνθο, με το ενδιαφέρον γι' αυτή να είναι περιορισμένο. Λέγεται επίσης Στραβολιά και Καρούλα. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 7,8:1 και η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιόλαδο 17% περίπου. Καλλιεργείται για παραγωγή επιτραπέζιας μαύρης και πράσινης ελιάς.

❖ **Καρυδολιά – *Olea europaea cv. maxima***

Η Καρυδολιά καλλιεργείται σε Κέρκυρα, Άμφισσα, Λαμία, Εύβοια, Χαλκιδική και Αττική. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Κωνική, Κολυμπάδα, Απολυτή και Καρυδοραχάτη. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 6,9:1 και η περιεκτικότητα της σε ελαιόλαδο φτάνει το 14%. Αποτελεί ποικιλία κατάλληλη για παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, πράσινης και μαύρης.

❖ **Κολυμπάδα – *Olea europaea cv. uberina***

Η Κολυμπάδα καλλιεργείται περιορισμένα στην Αττική, Φωκίδα, Κυκλάδες, Μεσσηνία, Εύβοια και αλλού. Είναι γνωστή και ως Καρυδολιά, Κολυμπάτη, Μηλολιά, Στρομπουλολιά κ.ά. και παρουσιάζει μικρή σημασία. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 4,3:1 και η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο 19%.

❖ **Στρογγυλολιά – *Olea europaea cv. rubrotunda***

Η Στρογγυλολιά καλλιεργείται κυρίως στη Χαλκιδική και αποκαλείται αλλιώς Γαλανή, Πρασινολιά, Στρογγυλοραχάτη και Μηλολιά. Έχει περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο 16% και η σχέση καρπού / πυρήνα είναι 6,8:1. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή επιτραπέζιας πράσινης ελιάς, η οποία εμφανίζει περιορισμένο ενδιαφέρον.

### 1.3.3 Μεικτές ποικιλίες

❖ **Θρούμπα – *Olea europaea cv. media oblonga***

Η Θρούμπα καλλιεργείται κυρίως στη Χίο, τη Σάμο, τις Κυκλάδες, καθώς και στην Κρήτη, την Αττική, τη Θάσο, τη Ρόδο και αλλού. Είναι γνωστή και ως Θρουμπολιά, Ασκούδα, Θασίτικη, Ξανθολιά, και Χοντρολιά. Έχει το μοναδικό χαρακτηριστικό να ξεπικρίζει αυτόματα ο καρπός πάνω στο δέντρο, όταν πλησιάζει το στάδιο της ωρίμανσης. Η περιεκτικότητα της σε ελαιόλαδο φτάνει μέχρι 28% και είναι άριστης ποιότητας με ιδιαίτερο άρωμα και γεύση. Χρησιμοποιείται επίσης και για την παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, της θρούμπας.

❖ **Μανάκι – *Olea europaea cv. minor rotunda***

Το Μανάκι καλλιεργείται σε Κορινθία, Αργολίδα, Άμφισσα, Δελφούς, Ιτέα, Αράχοβα, Λαμία, Κυνουρία, Ερμιόνη και Πόρο. Καλείται επίσης Κοθρέικη, Κορινθιακή, Γλυκομανάκι και Γλυκομανακολιά. Η απόδοσή της σε ελαιόλαδο φτάνει το 25% και χαρακτηρίζεται από εξαιρετικό άρωμα και ιδιαίτερα γλυκιά γεύση. Δίνει όμως και επιτραπέζια μαύρη ελιά, η οποία είναι επίσης γευστική και αρωματική.

❖ **Αμυγδαλολιά – *Olea europaea cv. amygdaliformis***

Η Αμυγδαλολιά καλλιεργείται στην Άμφισσα για την παραγωγή λαδιού, ενώ στην Αττική και αλλού για την παραγωγή επιτραπέζιας πράσινης ελιάς. Λέγεται αλλιώς Ισπανική, Κουρομύτα και Στραβομύτα. Η σχέση καρπού προς πυρήνα είναι 10,5:1 και η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο είναι 22%. Δεν είναι κατάλληλη για την παραγωγή επιτραπέζιας μαύρης ελιάς, αλλά και οι κονσέρβες πράσινης ελιάς είναι μέτριας ποιότητας.

❖ **Ματολιά**

Η Ματολιά καλλιεργείται στην Ηλεία. Είναι γνωστή και ως Ρουσολιά, Νυχάκι, Χοντρολιά, Νταμουρελιά. Η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 17-19%. Χρησιμοποιείται για ελαιοποίηση, αλλά και για παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, τοπικά, στην Ηλεία.

## **2 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

### **2.1 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΙΔΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

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

#### **Ονομασίες και ορισμοί των ελαιόλαδων :**

##### **1. Παρθένα ελαιόλαδα**

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

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

##### **α) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο**

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

##### **β) Παρθένο ελαιόλαδο**

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

##### **γ) LAMPANTE ελαιόλαδο**

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

## **2. Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο**

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

## **3. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα**

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

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων ελαιόλαδων.

	Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο	Παρθένο Ελαιόλαδο	LAMPANTE Ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο
Οξύτητα (wt / wt %)	≤0,8	≤2,0	>2,0	≤ 0,3	≤1,0

**Πίνακας 3:** Κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων ελαιόλαδων

## **2.2 ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΘΕΣΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ, ΣΠΟΡΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΩΝ**

1) Απαγορεύεται η θέση σε κυκλοφορία ή η διάθεση στην κατανάλωση, από οποιονδήποτε και με οποιονδήποτε τρόπο, ελαιόλαδων οποιασδήποτε ποιότητας, αναμειγμένων σε οποιαδήποτε αναλογία με άλλα έλαια, ως και η κατοχή τέτοιων αναμειγμένων ελαιόλαδων από τους εμπόρους. Εξαιρείται η περίπτωση του ελαίου από ελαιοπυρήνες, όπως αυτό ορίζεται στο άρθρο 72 παρ. 7 του Κώδικα Τροφίμων.

2) α) Τα βρώσιμα ελαιόλαδα που προορίζονται για τον καταναλωτή πρέπει να διατίθενται προς πώληση αποκλειστικά προσυσκευασμένα και να φέρουν τις



ενδείξεις που επιβάλλονται από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών.  
β) Η χύμα πώληση βρώσιμου ελαιόλαδου στον τελικό καταναλωτή επιτρέπεται αποκλειστικά για την κατηγορία του παρθένου ελαιόλαδου και μόνον από τους παραγωγούς, με την έκδοση των παραστατικών στοιχείων που προβλέπονται από τον Κ.Β.Σ. (Κώδικας Βιβλίων και Στοιχείων)

3) Απαγορεύεται η πώληση ελαιόλαδων και σπορέλαιων από βιομηχανίες, βιοτεχνίες και χονδρεμπόρους σε εμπόρους που δε διατηρούν κατάσταση που να λειτουργεί νόμιμα.

### **2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

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

#### **Πλύσιμο και ζύγισμα**

Όταν ο καρπός φτάνει στο ελαιοτριβείο, περιέχει φύλλα και ξένες ύλες όπως σκόνη, χώμα, πέτρες και άλλα στερεά υλικά, που πρέπει να απομακρυνθούν πριν την εξαγωγή του ελαιόλαδου. Αυτό γίνεται με αυτόματες μηχανές που αφαιρούν τα φύλλα με ρεύμα αέρα (αποφυλλωτήρια). Κατόπιν, οι καρποί περνούν σε ένα τύμπανο όπου κυκλοφορεί νερό, προκειμένου να πλυθούν και να απομακρυνθούν τα ξένα υλικά (σκόνη, χώμα, κλπ). Μετά το πλύσιμο, οι ελιές ζυγίζονται για να είναι γνωστή η ποσότητα του καθαρού καρπού του κάθε παραγωγού.

## **Άλεση**

Οι πλυμένοι καρποί αλέθονται σε ελαιόμυλους. Σκοπός είναι να σπάσουν τα κύτταρα του μεσοκαρπίου, ώστε να διευκολυνθεί η εξαγωγή του ελαίου από τα χυμοτόπια και να σχηματιστούν μεγαλύτερες σταγόνες, που μπορούν έπειτα να χωριστούν στις επόμενες φάσεις επεξεργασίας. Γενικά, οι καρποί συνθλίβονται σε μύλους από γρανίτη. Στις πιο σύγχρονες εγκαταστάσεις η άλεση γίνεται σε μεταλλικούς μύλους, σφυρόμυλους και σπαστήρες με αντίθετα περιστρεφόμενους οδοντωτούς δίσκους. Στους πέτρινους ελαιόμυλους, οι καρποί συνθλίβονται χωρίς υπερβολική μηχανική πίεση, με δραστικό περιορισμό των γαλακτωμάτων, αποφυγή υπερθέρμανσης της ελαιοζύμης και χωρίς τον κίνδυνο επιμόλυνσης από ίχνη μετάλλων. Γενικά, ο ελαιόμυλος αποτελείται από δύο ή τρεις κυλινδρικές ή κωνικές πέτρες από γρανίτη (κυρίως στην Ισπανία), που περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα με ταχύτητα 12–15 περιστροφές ανά λεπτό.

## **Μάλαξη**

Μετά την άλεση του ελαιοκαρπού ακολουθεί η μάλαξη, που γίνεται σε ειδικές ημικυλινδρικές ή ημισφαιρικές δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα με διπλά τοιχώματα, στα οποία κυκλοφορεί νερό, θερμοκρασίας 20 – 30 °C περίπου. Στόχος αυτού του σταδίου είναι η διάσπαση του γαλακτώματος ελαίου/ ύδατος και η συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων σε μεγαλύτερες σταγόνες λαδιού, ώστε να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός τους. Στην περίπτωση όπου η εξαγωγή του λαδιού γίνεται με υδραυλική πίεση, η διάρκεια μάλαξης περιορίζεται στα 20–30 λεπτά.

## **2.4 ΕΙΔΗ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ**

### **2.4.1 Παραδοσιακή επεξεργασία**

Η παλαιότερη μέθοδος επεξεργασίας ελαιόλαδου είναι μια ασυνεχής διαδικασία κατά την οποία παράγονται ελαιόλαδο, υγρά απόβλητα (κατσίγαρος) και στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας). Ο ελαιοκαρπός υπόκειται σε υδραυλική πίεση που σταδιακά φτάνει τα 300–500 kg/cm<sup>2</sup> ανάλογα με τα χαρακτηριστικά που καρπού, όπως η ωριμότητά του και το είδος του. Κατά τη διάρκεια της συμπίεσης του ελαιοκαρπού, το μίγμα ελαιόλαδο – νερό κυλάει και συλλέγεται στο κέντρο των μύλων. Έτσι με αυτόν τον τρόπο, τα στερεά υπολείμματα διαχωρίζονται από το μίγμα ελαιόλαδου – νερού. Το μίγμα αυτό επεξεργάζεται περαιτέρω με τη μέθοδο της καθίζησης και αργότερα με φυγοκέντρηση. Μια πιο σύγχρονη παραλλαγή της μεθόδου υδραυλικής πίεσης, επιτυγχάνεται με τη χρήση διαδοχικών πιεστηρίων με

διαφορετική πίεση. Η αποδοτικότητα των ελαιοτριβείων εξαρτάται άμεσα από τον αριθμό των πιεστηρίων που διαθέτει η κάθε μονάδα.

Όμως αυτή η διαδικασία συνδέεται επίσης και με την παραγωγή ελαιόλαδου υψηλής ποιότητας, εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας που απαιτείται για την εξαγωγή του, υπό την προϋπόθεση ότι διατηρείται ο χώρος πάντα όσο πιο καθαρός γίνεται. Εάν οι συνθήκες υγιεινής στις εγκαταστάσεις δεν είναι ικανοποιητικές και τα πιεστήρια δεν καθαρίζονται συχνά, παράγεται ελαιόλαδο λιγότερο καλής ποιότητας καθώς το προϊόν έρχεται σε επαφή με τα ήδη οξειδωμένα παλαιά σωματίδια. Η συμβατική μέθοδος εξαγωγής του ελαιόλαδου παραμένει η οικονομικότερη από πλευράς εξοπλισμού αλλά όχι και από πλευράς εργατικών χεριών και συντήρησης. Τέλος θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι η παραδοσιακή μέθοδος είναι μια ασυνεχής διαδικασία και συνεπώς δεν αποτελεί πλεονέκτημα για τη σύγχρονη βιομηχανία.

#### **2.4.2 Επεξεργασία τριών φάσεων**

Η φυγοκέντρηση αποτελεί μία διαδικασία διαχωρισμού του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη, που βασίζεται στη διαφορά ειδικού βάρους που παρουσιάζουν τα συστατικά της ελαιοζύμης. Παράγει χωριστά λάδι, νερό (απόνερα) και στερεό υπόλειμμα (πυρήνα). Η διαδικασία πραγματοποιείται σε συνεχείς εγκαταστάσεις φυγοκέντρησης. Οι διάφορες φάσεις που περιλαμβάνονται σε αυτήν τη διαδικασία αναφέρονται παρακάτω:

- **Άλεση του ελαιοκαρπού**

Για την άλεση του καρπού χρησιμοποιούνται μεταλλικοί σπαστήρες, που είναι κυρίως σφυρόμυλοι ή οδοντωτοί δίσκοι. Με τους μεταλλικούς σπαστήρες είναι δυνατό να ρυθμιστεί το μέγεθος της λειοτριβήσης του ελαιοκαρπού, με τη χρήση ειδικής σίτας που προσαρμόζεται στο σπαστήρα, ανάλογα με το σύστημα εξαγωγής που εφαρμόζεται. Τα πλεονεκτήματα των μεταλλικών σπαστήρων είναι η συνεχής λειτουργία, η μεγάλη απόδοση, το μικρότερο κόστος και μέγεθος, συγκριτικά με τους παραδοσιακούς πέτρινους μύλους. Σοβαρό μειονέκτημα είναι η γρήγορη φθορά των εξαρτημάτων θρύψεως, κάτι που συνεπάγεται αύξηση του κόστους.

- **Μάλαξη**

Οι μαλακτήρες είναι μηχανήματα τα οποία μαλάσσουν (ζυμώνουν, ομογενοποιούν) την ελαιοζύμη πριν εισαχθεί στο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα. Η μάλαξη είναι απαραίτητη, επειδή κατά την άλεση του ελαιοκαρπού σχηματίζεται

γαλάκτωμα μεταξύ ελαίου και ύδατος. Για αυτό είναι απαραίτητη η μίξη ώστε να συνενωθούν τα μικρής διαμέτρου σταγονίδια λαδιού προς μεγαλύτερες σταγόνες, εύκολα αποχωριζόμενες από τα υπόλοιπα συστατικά της ελαιοζύμης. Τα ελαιουργεία είναι εξοπλισμένα με δύο ή τρεις μαλακτήρες, ανάλογα με τη δυναμικότητά τους, που αποτελούνται από ημικυλινδρικές ανοξείδωτες δεξαμενές, με διπλά τοιχώματα όπου κυκλοφορεί ζεστό νερό. Μέσα στο μαλακτήρα, η ελαιοζύμη αναδεύεται με τη βοήθεια πτερυγίων που είναι προσαρμοσμένα σε κάθετο ή οριζόντιο άξονα περιστροφής, ανάλογα με τον τύπο του μαλακτήρα. Σε κανονικές συνθήκες, η ταχύτητα περιστροφής των πτερυγίων θα πρέπει να είναι 18 – 20 στροφές/ λεπτό. Η θέρμανση της ελαιοζύμης είναι απαραίτητη κατά τη μάλαξη, γιατί διευκολύνει την εξαγωγή του ελαιόλαδου. Η αποτελεσματικότερη θερμοκρασία είναι 20 – 30 °C. Η εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών, εξάγει μεγαλύτερη ποσότητα ελαιόλαδου, έχει όμως δυσμενή επίπτωση στην ποιότητα. Ο χρόνος μάλαξης δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 – 30 λεπτά. Αύξηση του χρόνου μάλαξης οδηγεί στη μείωση των φαινολικών ουσιών που περιέχονται στο ελαιόλαδο πιθανότατα λόγω ενζυματικής διάσπασης ή λόγω παρατεταμένης επαφής με τα φυτικά υγρά που οδηγεί σε διάχυση των φαινολών προς την υδατική φάση. (Inarejos-García A.M. et al., 2009)

- **Φυγοκέντρηση**

Σε αυτήν τη διαδικασία, η τεχνική διαχωρισμού του ελαιόλαδου βασίζεται στη διαφορά ειδικού βάρους που παρουσιάζουν τα συστατικά της ελαιοζύμης (ελαιόλαδο, νερό και στερεά συστατικά). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε οριζόντια φυγοκεντρικά μηχανήματα (decanter). Το σύστημα αποτελείται από ένα τύμπανο κυλινδρικού σχήματος, που περιστρέφεται γύρω από οριζόντιο άξονα. Συνδεδεμένος με τον οριζόντιο άξονα είναι ένας ατέρμονας κοχλίας που περιστρέφεται με την ίδια φορά αλλά με ελαφρώς λιγότερες στροφές. Η τροφοδοσία γίνεται από δεξιά, διαμέσου ειδικού σωλήνα που οδηγεί την ελαιοζύμη στο μέσο περίπου του τυμπάνου. Με την περιστροφή του τυμπάνου, η ελαιοζύμη βρίσκεται υπό την επίδραση της φυγοκέντρου δύναμews και τα συστατικά μέρη της διαχωρίζονται ανάλογα με το ειδικό βάρος. Έτσι, τα στερεά συστατικά εξωθούνται προς την περιφέρεια του τυμπάνου, ενώ τα φυτικά υγρά και το ελαιόλαδο σχηματίζουν δύο ομόκεντρους δακτυλίους. Ο δακτύλιος του λαδιού είναι κοντά στον άξονα περιστροφής, ενώ ο δακτύλιος των φυτικών υγρών είναι ενδιάμεσα μεταξύ λαδιού και ελαιοπυρήνα. Ο ατέρμονας κοχλίας συμπαρασύρει τον πυρήνα προς τα εμπρός, όπου είναι και η οπή εξόδου της από το τύμπανο, ενώ το λάδι και τα φυτικά υγρά εξέρχονται από το πίσω μέρος του τυμπάνου.

Για να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός, είναι απαραίτητο να προστεθεί νερό στην ελαιοζύμη μετά τη διαδικασία της μάλαξης. Η ποσότητα του νερού που προστίθεται εξαρτάται κυρίως από τα ρεολογικά χαρακτηριστικά της ελαιοζύμης. Η βέλτιστη αναλογία ελαιόπαστας/νερού ποικίλει από 1:0,7 έως 1:1,2 και καθορίζεται εμπειρικά με την παρατήρηση των χαρακτηριστικών του ελαιόλαδου και του νερού που βγαίνουν από το φυγοκεντρητή. Από το φυγοκεντρητή βγαίνουν δύο είδη υγρών προϊόντων: αρχικά ένα πράσινου χρώματος, που αποτελείται από το λάδι και μέρος των φυτικών υγρών και ένα άλλο (με μεγαλύτερο όγκο) με καφέ χρώμα, που αποτελείται κυρίως από φυτικά υγρά με ένα μέρος λαδιού. Δεδομένου ότι τα υγρά που βγαίνουν από το φυγοκεντρητή μπορεί να περιέχουν στερεά συστατικά (κομμάτια σάρκας ή πυρήνα), κοσκινίζονται σε παλινδρομικά κόσκινα. Αυτές οι μηχανές ανάλογα με το μέγεθός τους, έχουν ωριαία δυναμικότητα μεταξύ 0,5 έως 4,0 τόνων.

- **Διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά**

Ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά γίνεται με το φυγοκεντρικό διαχωριστήρα. Το σύστημα αποτελείται από ένα σταθερό κορμό και ένα κινητό τύμπανο που περιστρέφεται με μεγάλο αριθμό στροφών. Στο τύμπανο είναι προσαρμοσμένος μεγάλος αριθμός κωνικών δίσκων (πιάτα). Η υγρή φάση υποβάλλεται σε φυγοκέντρωση και ο διαχωρισμός του λαδιού από το νερό γίνεται με βάση τη διαφορά ειδικού βάρους.

Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για το βέλτιστο διαχωρισμό είναι: (i) η ομοιογένεια της υγρής φάσης, (ii) ο όγκος τροφοδότησης του διαχωριστήρα, (iii) η θερμοκρασία και (iv) η ποσότητα του προστιθέμενου νερού.

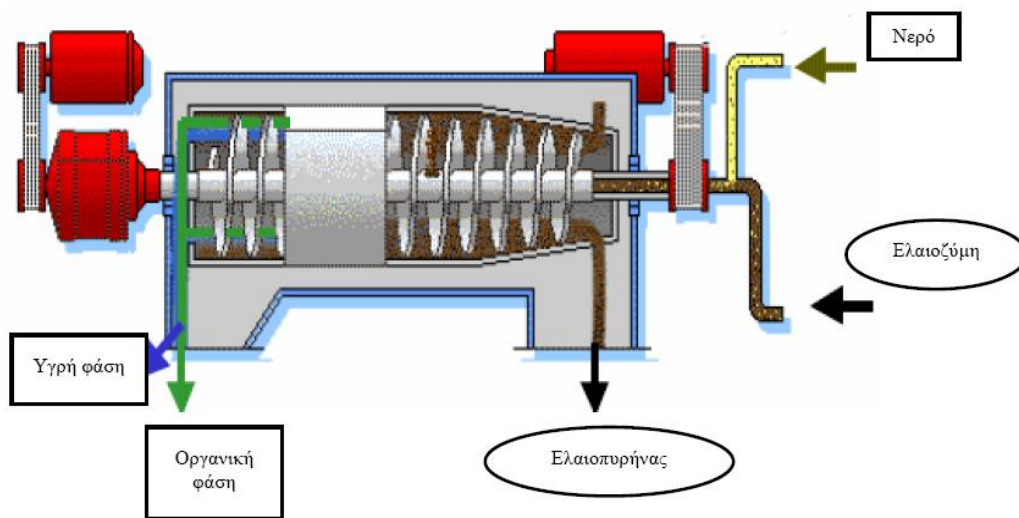
Η χρήση φυγοκεντρικών μηχανημάτων (decanters) παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα όπως:

- ❖ είναι συμπαγές μηχάνημα και καταλαμβάνει μικρότερη επιφάνεια στο ελαιοτριβείο
- ❖ εξασφαλίζει αυτοματισμό στην επεξεργασία του ελαιοκαρπού
- ❖ το λάδι που λαμβάνεται είναι καλύτερης ποιότητας συγκριτικά με τα υδραυλικά πιεστήρια και
- ❖ έχει μικρότερες απαιτήσεις σε εργατικό δυναμικό.

Τα κύρια μειονεκτήματα είναι:

- ❖ μεγαλύτερη αρχική επένδυση κεφαλαίων για αγορά και εγκατάσταση των μηχανημάτων
- ❖ απαίτηση σε εξειδικευμένο τεχνικό προσωπικό
- ❖ μεγαλύτερη κατανάλωση σε ηλεκτρική ενέργεια και κυρίως νερό και
- ❖ μεγαλύτερη ποσότητα υγρών αποβλήτων (απόνερα).

Το πρώτο ελαιοτριβείο με φυγοκεντρωτή παρουσιάστηκε στην Ελλάδα το 1965.



**Εικόνα 1:** Ο τριφασικός διαχωριστήρας

### 2.4.3 Επεξεργασία δύο φάσεων

Η μεγάλη ποσότητα υγρών αποβλήτων από την επεξεργασία τριών φάσεων, αποτέλεσε σοβαρό πρόβλημα για τις βιομηχανίες ελαιόλαδου στις αρχές της δεκαετίας του '90. Για το λόγο αυτό, το 1992 μερικές εταιρείες προώθησαν νέους τύπους φυγοκεντρικών μηχανημάτων, που μπορούν να διαχωρίσουν την ελαιούχο φάση από την ελαιόπαστα χωρίς την προσθήκη νερού. Έτσι, δεν παράγονται υγρά απόβλητα (απόνερα), τα οποία ενσωματώνονται στον ελαιοπυρήνα, ο οποίος για το λόγο αυτό περιέχει περισσότερη υγρασία.

Οι δύο πρώτες φάσεις της επεξεργασίας (άλεση του καρπού και μάλαξη της ελαιοζύμης) είναι παρόμοιες με εκείνες της επεξεργασίας τριών φάσεων. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στη φυγοκέντρωση της ελαιοζύμης και στον τελικό διαχωρισμό-καθαρισμό του ελαιόλαδου.

- **Άλεση του ελαιοκαρπού**

Πραγματοποιείται με παρόμοιο σύστημα με αυτό της επεξεργασίας τριών φάσεων.

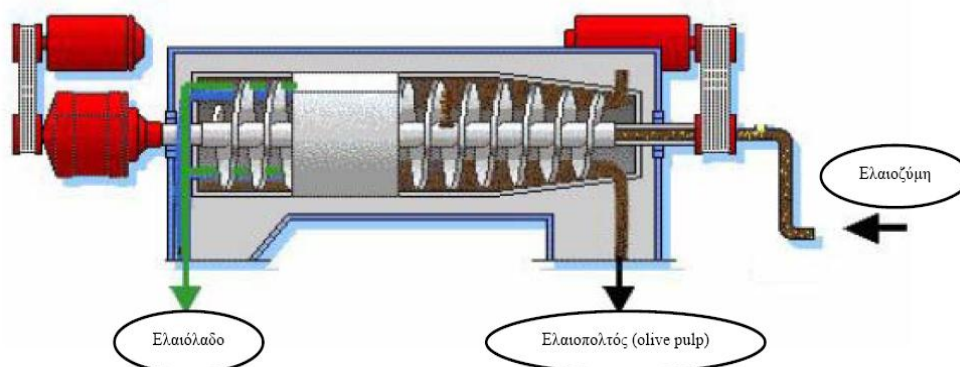
- **Μάλαξη**

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται είναι παρόμοιος με αυτόν της επεξεργασίας τριών φάσεων και λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο.

- **Φυγοκέντρηση**

Η ελαιούχος φάση διαχωρίζεται από τον ελαιοπυρήνα (στον οποίο είναι ενσωματωμένα τα απόνερα) με την επίδραση φυγοκέντρου δυνάμεως, η οποία αυξάνει τη διαφορά ειδικού βάρους μεταξύ του ελαιόλαδου και του υγρού ελαιοπυρήνα. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε φυγοκεντρικό διαχωριστήρα με οριζόντιο άξονα. Ο συντελεστής φυγοκέντρου δυνάμεως (G) είναι μεγαλύτερος στα διφασικά συστήματα (3000-3600) απ' ότι στα τριφασικά (2000-2600). Σε αυτήν την περίπτωση, δεν είναι απαραίτητο να προστεθεί νερό για να γίνει καλύτερος διαχωρισμός του ελαιόλαδου. Η ελαιούχος φάση που βγαίνει από το φυγοκεντητή (decanter) μπορεί να περιέχει μικρά στερεά σωματίδια, τα οποία απομακρύνονται με τη χρήση παλινδρομικών κόσκινων.

Σύμφωνα με τις κατασκευάστριες εταιρείες, ο φυγοκεντρικός διαχωριστήρας τριών φάσεων μπορεί να μετατραπεί εύκολα σε δύο φάσεων, με φράξιμο της οπής εξόδου των φυτικών υγρών και μείωση της ταχύτητας περιστροφής του u945 ατέρμονα κοχλία, ώστε να παραμείνει ο ελαιοπυρήνας για μεγαλύτερο χρόνο στο τύμπανο και να απορροφήσει περισσότερα υγρά.

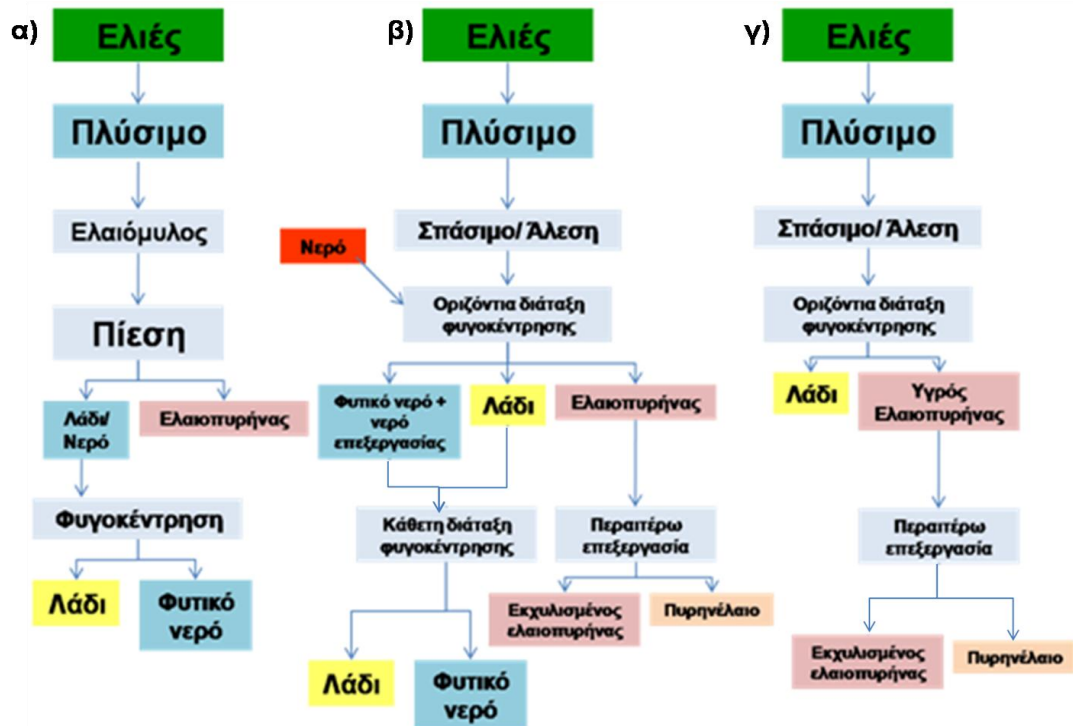


**Εικόνα 2:** Ο διφασικός διαχωριστήρας

- **Διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά**

Η ελαιούχος φάση υποβάλλεται σε διαχωρισμό με φυγοκεντρικό ελαιοδιαχωριστήρα. Μέσω της προσθήκης ορισμένης ποσότητας νερού, το ελαιόλαδο διαχωρίζεται και απομακρύνεται η υγρασία. Το νερό είναι το μόνο υγρό απόβλητο που παράγεται με αυτήν τη διαδικασία εξαγωγής ελαιόλαδου.

Στην εικόνα που ακολουθεί συνοψίζεται σχηματικά η διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου για κάθε ένα από τα τρία συστήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω.



**Εικόνα 3:** Διάγραμμα ροής των τριών διαφορετικών διαδικασιών παραγωγής ελαιόλαδου  
 α) Παραδοσιακή β) Τριών φάσεων γ) Δύο φάσεων

#### 2.4.4 Μέθοδος SINOLEA

Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε έναν πολύ απλό νόμο της φυσικής: στην φυσική αρχή της διαφορετικής επιφανειακής τάσης λόγω διαφορετικής μοριακής συνοχής μεταξύ ελαίου και φυτικών υγρών, (συνάφεια).

Επομένως, όταν βυθίζεται μια λεπίδα σε ένα μίγμα ελαίου και ύδατος, μόνο το ελαιόλαδο προσκολλάται στη λεπίδα, διαχωρίζοντας κατά συνέπεια το λάδι από τον πολτό της ελιάς με απολύτως φυσικό τρόπο. Η μηχανή που το πραγματοποιεί ονομάζεται SINOLEA.

Για να κατανοήσουμε την αρχή της λειτουργίας της SINOLEA μπορούμε να ανατρέξουμε σε αυτό το απλό πείραμα. Παίρνουμε δυο ποτήρια και γεμίζουμε το πρώτο με νερό και λάδι, ενώ το δεύτερο το κρατάμε άδειο. Βυθίζουμε τώρα μια



μεταλλική λάμα (κουτάλι ή μαχαίρι) στο πρώτο ποτήρι που περιέχει νερό και λάδι και την αφήνουμε να στάξει στο άδειο ποτήρι.

Εάν έχουμε την υπομονή να επαναλάβουμε αυτήν τη διαδικασία αρκετές φορές θα έχουμε μεταφέρει όλο το λάδι από το πρώτο στο δεύτερο ποτήρι, ενώ το νερό θα παραμείνει στο πρώτο ποτήρι.

Αυτό είναι το σύστημα της αποστάλαξης ή εκλεκτικής διήθησης που είναι η βασική αρχή της λειτουργίας της Sinolea, όπου αντί μιας λάμας υπάρχουν χιλιάδες λάμες από ανοξείδωτο χάλυβα, οι οποίες με συνεχή εναλλασσόμενη κίνηση δεισδύουν και εξέρχονται στην ελαιοζύμη, παραλαμβάνοντας το λάδι το οποίο στη συνέχεια στάζοντας καταλήγει στη δεξαμενή συλλογής.

Αυτή είναι πρώτη φάση διαχωρισμού με το σύστημα SINOLEA, όπου εξάγεται το 60% με 80% του ελαιόλαδου. Το υπόλοιπο που παραμένει στην ελαιοζύμη εξάγεται σε δεύτερη φάση με την κλασική φυγοκέντρωση.

Το πρώτο μηχάνημα τύπου SINOLEA το παρουσίασε η ιταλική ελαιουργική βιομηχανία RAPANELLI το 1972.

## **2.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ**

Η ποιότητα του ελαιόλαδου εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τον τύπο του ελαιοτριβείου όπου παράγεται. Είναι ευρέως αποδεκτό πως τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο ελαιόλαδο, το καθιστούν αρχικά εύγευστο και του προσδίδουν ένα πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων ευεργετικών για την υγεία των ανθρώπων. Έρευνες που έχουν γίνει κατά καιρούς σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα των φαινολικών ουσιών στο τελικό ελαιόλαδο απέδειξαν ότι ο τρόπος με τον οποίο εξάγεται το ελαιόλαδο από την ελιά αποτελεί κομβικό σημείο για την τελική ποιοτική του σύσταση. Πιο συγκεκριμένα, έχουν γίνει προσπάθειες αξιολόγησης των διαφορών μεταξύ ελαιόλαδων από ελαιοτριβεία δύο φάσεων, τριών φάσεων και παραδοσιακών ελαιουργείων. Κατόπιν ενδελεχούς μελέτης αποδείχτηκε ότι οι διαφορές στη σύσταση του φαινολικού κλάσματος ανάμεσα σε ελαιόλαδα προερχόμενα και από τους τρεις τύπους ελαιοτριβείων δεν είναι ποιοτικές αλλά ποσοτικές.

Οι διαφορές που παρατηρούνται αποδίδονται τόσο στο διαφορετικό τρόπο κατεργασίας του ελαιοκαρπού αλλά και στα διαφορετικά μηχανήματα που χρησιμοποιούνται. Έχει αποδειχθεί πως κατά τη διαδικασία της άλεσης, οι μεταλλικοί σπαστήρες στα φυγοκεντρικά συστήματα εξασφαλίζουν πολύ καλύτερη θραύση της σάρκας της ελιάς απέναντι στις μυλόπετρες των πιεστικών ελαιοτριβείων,

απελευθερώνοντας έτσι υψηλότερες ποσότητες πολυφαινολών στην ελαιοζύμη και ως εκ τούτου και στο τελικό ελαιόλαδο. (Di Giovacchino et al. 2002)

Το σοβαρότερο πρόβλημα που εντοπίζεται στα τριφασικά ελαιοτριβεία είναι η μεγάλη ποσότητα των υγρών αποβλήτων που δημιουργούνται από την επεξεργασία (περίπου 1,2-1,3 λίτρα/ κιλό επεξεργασμένου καρπού). Στην πραγματικότητα, η προσθήκη νερού στην ελαιοζύμη πριν τη φυγοκέντρωση, αυξάνει τον παραγόμενο όγκο των υγρών αποβλήτων. Τα υγρά αυτά, έχουν υψηλό ρυπαντικό φορτίο (χημική απαίτηση σε οξυγόνο, COD, 60-80 g O<sub>2</sub>/l) και υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολών. Για το λόγο αυτό, δεν είναι δυνατή η επεξεργασία τους με συμβατικά μέσα. Η μόνη πρακτικά εφαρμοσμένη λύση είναι η διοχέτευσή τους σε ανοιχτές λίμνες εξάτμισης, με κόστος όμως τα προβλήματα δυσσομίας που δημιουργούνται, κυρίως σε τουριστικές περιοχές. Επιπροσθέτως τα υγρά απόβλητα αυτά, περιέχουν μεγάλα ποσοστά φαινολικών ουσιών, οι οποίες λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα τους, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το νερό από ότι με το ελαιόλαδο. Εν τέλει η συγκέντρωσή τους στο τελικό προϊόν, είναι αισθητά μειωμένη σε σχέση με του ελαιόλαδου από διφασικό ελαιοτριβείο. (Di Giovacchino L. et al., 2002)

Ένα άλλο πολύ σημαντικό ζήτημα είναι το γεγονός ότι η παραγωγή ελαιόλαδου είναι υψηλότερη στη διφασική διαδικασία από ότι στην τριφασική. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι δεν προστίθεται νερό για την αραίωση της ελαιοζύμης και αποφεύγεται έτσι ο σχηματισμός γαλακτώματος ελαίου/ύδατος. Η διαδικασία των δύο φάσεων δεν παράγει υγρά απόβλητα, παρά μόνο μία μικρή ποσότητα, από το νερό που προστίθεται στο φυγοκεντρικό ελαιοδιαχωριστήρα κατά το διαχωρισμό του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά. Δε δημιουργεί προβλήματα διάθεσης των απόνερων (λίμνες εξάτμισης) και έχει μειωμένο κόστος. Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ποιότητα του ελαιόλαδου από το σύστημα των δύο φάσεων είναι καλύτερη απ' ότι από το σύστημα των τριών φάσεων, καθώς το ελαιόλαδο έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών και ορθο-διφαινολών, με αποτέλεσμα να είναι σταθερότερο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των τριών μεθόδων, το ελαιόλαδο που παράγεται με το φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων διαθέτει τα υψηλότερα ποσοστά τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης οι οποίες συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας και κατ' επέκταση στην ποιότητά του. (Servili M. et al., 2004)

Από την άποψη της ποιοτικής σύστασης των φαινολικών ουσιών του ελαιόλαδου, έχουν γίνει αρκετές έρευνες που αποδεικνύουν το περιεχόμενο τόσο του καρπού της ελιάς πριν την επεξεργασία όσο και των προϊόντων που προκύπτουν, δηλαδή της ελαιοζύμης, του ελαιοπυρήνα, των υγρών απόβλητων και φυσικά του ελαιόλαδου.

Έχει αποδειχθεί λοιπόν ότι, ανεξάρτητα από το είδος της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται στο ελαιοτριβείο, η ποιοτική φαινολική σύσταση των επιμέρους προϊόντων δεν αλλάζει, καθώς είναι εξαρτώμενη από την ενζυμική δραστηριότητα που συντελείται κατά την επεξεργασία. Ωστόσο, αυτό που φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά, είναι η ποσοτική κατανομή των πολυφαινολικών συστατικών μεταξύ των παραγόμενων προϊόντων. (Servili M. et al., 2004)

Συμπερασματικά, παρά το γεγονός ότι η περιεκτικότητα του ελαιοκαρπού σε πολυφαινολικά συστατικά είναι ιδιαίτερα μεγάλη, μόνο ένα μικρό ποσοστό καταφέρνει εν τέλει να καταλήξει στο ελαιόλαδο μετά την κατεργασία του στο ελαιοτριβείο και το υπόλοιπο καταλήγει στα απόβλητα. Με τις διαδικασίες της σύνθλιψης και της μάλαξης χάνεται πάνω από το 50 % των συστατικών αυτών και με την προσθήκη νερού το ποσοστό αυτό αυξάνεται αισθητά κυρίως λόγω της υδροφιλικότητας που εμφανίζουν. Η σειρά με την οποία κατατάσσονται οι τύποι των ελαιοτριβείων αναφορικά με το ποσοστό μεταφοράς των φαινολών από τον καρπό στο ελαιόλαδο είναι: διφασικό (1,5%) > πιεστικό – παραδοσιακό (1,2%) > τριφασικό (0,5%). Αξιολογώντας λοιπόν τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι από τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων παράγεται το πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες ελαιόλαδο και κατ' επέκταση το πιο ποιοτικό. (Jerman Klen T. et al. 2012)

Όσον αφορά τη μέθοδο SINOLEA είναι προφανές ότι παράγει ελαιόλαδο που διατηρεί υψηλό ποσοστό από τις πολυφαινόλες του και άλλα πολύτιμα συστατικά. Άρα μπορούμε να καταλήξουμε, στο ότι η ποιότητα του ελαιόλαδου που προκύπτει από αυτό το σύστημα επεξεργασίας είναι πολύ υψηλή. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου SINOLEA είναι ότι απαιτεί τρεις φορές περισσότερο χρόνο από άλλες μεθόδους, καθώς επίσης ότι είναι απαραίτητο και επόμενο στάδιο φυγοκέντρησης, για να ληφθεί και το υπόλοιπο λάδι. Ένα άλλο μειονέκτημα που παρατηρείται είναι πως οι μεγάλες επιφάνειες της μηχανής μπορεί να οδηγήσουν σε γρήγορη οξειδωση του λαδιού και πως υπάρχει δυσκολία στον καθαρισμό των 7000 λεπίδων της μηχανής. (Κορνάρος Μ., 2008)

## **2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Η ποσότητα των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες ποικιλοτρόπως. Καθώς τα πολυφαινολικά συστατικά παίζουν πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση της υψηλής ποιότητας του τελικού προϊόντος, θεωρείται δεδομένο ότι πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια για τη διατήρησή τους σε υψηλά επίπεδα. Ορισμένοι από τους παράγοντες που

επηρεάζουν την ποσότητα των φαινολών στο ελαιόλαδο είναι η εποχή συγκομιδής του ελαιοκαρπού, καθώς και η διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου από τον καρπό.

Σημαντικό ρόλο παίζει ο τύπος του ελαιοτριβείου, η θερμοκρασία εξαγωγής κλπ. Φυσικά δεν πρέπει να μη λαμβάνεται υπ' όψιν και η γενετική προδιάθεση που έχει η κάθε ποικιλία να παράγει ελαιόλαδο πλούσιο σε πολυφαινόλες, ωστόσο κατά κοινή αποδοχή, όλες οι ποικιλίες εάν επεξεργαστούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο δυνητικά μπορούν να δώσουν ένα ποιοτικό ελαιόλαδο.

### **2.6.1 Εποχή συγκομιδής ελαιοκαρπού**

Η ελιά (*Olea europaea L.*) καλλιεργείται ευρέως σε πολλές περιοχές του κόσμου όπου οι κλιματολογικές συνθήκες είναι εξίσου ευνοϊκές με εκείνες των χωρών που επικρατούν στη Μεσόγειο. Ο ελαιοκαρπός είναι μια δρύπη ωειδούς σχήματος που μπορεί να καταναλωθεί ως επιτραπέζιες ελιές ή από αυτόν να παραχθεί το παρθένο ελαιόλαδο και είναι μία από τις κύριες πηγές λιπών στη μεσογειακή διατροφή. Η ανάπτυξη της ελιάς από άνθος σε ώριμους καρπούς είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την τροποποίηση των διαμερισμάτων, την απώλεια της δομής του κυτταρικού τοιχώματος, τη σταδιακή χαλάρωση και τη συσσώρευση των υδατανθράκων. Ο καρπός της ελιάς αναπτύσσεται με ταχύ ρυθμό στα αρχικά του στάδια και ακολουθείται από μια περίοδο επιβράδυνσης της ανάπτυξής του, που ακολουθείται από μια άλλη περίοδο ανάπτυξης επιταχυνόμενου ρυθμού, που ισοδυναμεί με την αρχική. Η σκλήρυνση του πυρήνα συμβαίνει κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού, περίπου 10 εβδομάδες μετά την ανθοφορία, και συνεχίζεται έως ότου το υγρό ενδοσπέρμιο στερεοποιηθεί. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαιρεθεί σε τρία βασικά στάδια στην ελιά. Αυτά είναι, η καρπόδεση, η σκλήρυνση του πυρήνα και η ανάπτυξη του καρπού και τέλος η συσσώρευση του ελαιόλαδου, όταν λαμβάνει χώρα η ωρίμανση. Η καρπόδεση χαρακτηρίζεται από κυτταρική διαίρεση και αύξηση του μεγέθους των κυττάρων. Κατά το στάδιο της σκλήρυνσης του πυρήνα, το έμβρυο και ο πυρήνας ολοκληρώνουν τη διαδικασία της σκλήρυνσης με το ενδοκάρπιο να έχει σκληρύνει και αυτό. Μετά την παραγωγή της λιγνίνης, αρχίζει η σύνθεση των λιπαρών οξέων και η ραγδαία αύξηση του μεγέθους των κυττάρων.

Αυτά καθορίζουν το τελικό μέγεθος των καρπών της ελιάς στο στάδιο της ανάπτυξης του καρπού και της συσσώρευσης του ελαιόλαδου, η οποία, στο τελευταίο στάδιο, μειώνεται σταδιακά μέχρι το μέγιστο εύρος βάρους, και ύστερα αρχίζει η διαδικασία της ωρίμανσης. Η ωρίμανση της ελιάς είναι μια μακρά και αργή διαδικασία που διαρκεί αρκετούς μήνες και ποικίλλει ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος της περιοχής όπου φύεται το δέντρο, την ποικιλία του δέντρου, τη

διαθεσιμότητα του νερού, και τη θερμοκρασία. Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φυτού αλλά η φύση και η συγκέντρωσή τους ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ιστών του φυτού και επίσης συμβάλλουν στο χρώμα και τη γεύση του καρπού και του ελαιόλαδου, κυρίως δε, του προσδίδουν στυφές και πικρές ιδιότητες.

Η *Olea europaea* L. περιλαμβάνει μια σειρά ασυνήθιστων φαινολικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των ολεοσιδών οι οποίοι είναι φαινολικά σκεοϊριδοειδή, δεδομένου ότι εξάγονται ως μέρος των φαινολικών κλασμάτων των δειγμάτων.

Η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροσίδης, οι πιο σημαντικοί ολεοσίδες στον ελαιοκαρπό, είναι εστέρες ελενολικού οξέος (EA) με 2 - (3, 4-διυδροξυφαινυλο) αιθανόλη (3,4-DHPEA) και 2 - (4-υδροξυφαινυλο) αιθανόλη (p-HPEA), αντίστοιχα. Παρά το γεγονός ότι, ο βερμπασκοσίδης είναι το κύριο υδροξυκιναμικό παράγωγο του καρπού της ελιάς, μια σειρά από απλές φαινόλες είναι επίσης παρούσα. Σε αυτές περιλαμβάνονται η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη και γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως οι, κερκετινο-3-ρουτινοσίδης (ρουτίνη), λουτεολινο-7-γλυκοσίδης, απιγενινο-7-γλυκοσίδης και λουτεολίνη.

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την προέλευσή τους στο γενικό μεταβολισμό του φαινυλοπροπανίου, ο οποίος, στα τρία πρώτα του βήματα, αποτελείται από τη μετατροπή της L-φαινυλαλανίνης σε διάφορα υδροξυκιναμικά οξέα.

Η συσσώρευση των φαινολικών ενώσεων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τη φυσιολογική κατάσταση του καρπού και είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ της βιοσύνθεσης και του περαιτέρω καταβολισμού. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η συγκέντρωση πολυφαινολών στα παρθένα ελαιόλαδα μειώνεται με την αύξηση της άρδευσής τους, κάτι που εφαρμόστηκε σε διάφορες ποικιλίες ελιάς. Αυτό που παρατηρείται γενικά όμως είναι ότι, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού της ελιάς, δεν εμφανίζουν όλες οι φαινολικές ενώσεις την ίδια συμπεριφορά.

Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα χαρακτηριστικά ωρίμανσης της κάθε ποικιλίας ελιάς επηρεάζουν την ενζυματική δραστηριότητα της αμμωνιακής λύασης της φαινυλαλανίνης (PAL) και τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες στον ελαιοκαρπό, τα οποία συσχετίζονται σημαντικά. Και οι δύο ακολουθούν την ίδια τάση κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της ελιάς και υφίστανται μείωση όταν αρχίζει η διαδικασία ωρίμανσης. Το συνολικό περιεχόμενο σε φαινόλες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαφορά, που οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στην υψηλή μεταβλητότητα στην ωρίμανση που παρατηρείται μεταξύ των διάφορων ποικιλιών.

Το γενικό συμπέρασμα όμως που προκύπτει είναι ότι, όλες οι φαινολικές ουσίες αρχικά αυξάνονται εκθετικά στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού και στη συνέχεια όταν φτάσουν σε ένα μέγιστο επίπεδο, ακολουθούν μια φθίνουσα πορεία όπου παρατηρείται μείωση των επιπέδων τους όσο η ελιά συνεχίζει να αναπτύσσεται. Ως εκ τούτου φαινολικές ενώσεις όπως η ελευρωπαΐνη και η λουτεολίνη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως παράμετροι ωρίμανσης. (Morello J.R. et al., 2005)

### **2.6.2 Διαδικασία εξαγωγής ελαιόλαδου στο ελαιοτριβείο**

Οι φαινόλες που υπάρχουν στην πάστα ελιάς είναι διαλυτές στο νερό ή στο λάδι, ανάλογα με τους συντελεστές κατανομής τους και τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η εκχύλισή τους από το ελαιόλαδο.

Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, τα πιο κοινά συστήματα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την παραγωγή ελαιόλαδου είναι τα φυγοκεντρικά συστήματα τριών φάσεων και δύο φάσεων. Στη μέθοδο τριών φάσεων, η προσθήκη νερού στην πάστα, μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ των δύο υγρών φάσεων και μειώνει τη φαινολική συγκέντρωση στην ελαιώδη φάση, μέσω της αραίωσης στην υδατική φάση. Έτσι, η προσθήκη νερού στο ελαιόλαδο αφαιρεί υδατοδιαλυτές φαινόλες. (Gimeno E. et al., 2002, Inarejos-Garcia A. et al., 2009, Stefanoudaki E. et al., 2011, Papadimitriou V. et al., 2013). Παρατηρείται λοιπόν μικρότερη συγκέντρωση φαινολών, οι οποίες λειτουργούν σαν φυσικά αντιοξειδωτικά, κάτι που οδηγεί σε μειωμένη αντοχή του ελαιόλαδου στην αυτοοξειδωση. Στη μέθοδο δύο φάσεων δεν προστίθεται νερό για την αραίωση της ελαιοζύμης, οπότε δε μεταβάλλεται η αρχική συγκέντρωση πολυφαινολικών συστατικών. Το ελαιόλαδο που προκύπτει με αυτόν τον τρόπο παραγωγής, παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών, με αποτέλεσμα να είναι σταθερότερο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και να ανθίσταται στην αυτοοξειδωση. Κατά συνέπεια είναι πιο ποιοτικό.

Η προσθήκη νερού στα τριφασικά ελαιοτριβεία όμως προκαλεί και άλλες διαφοροποιήσεις ως προς το εκάστοτε παραγόμενο ελαιόλαδο. Πιο συγκεκριμένα προκαλεί το σχηματισμό μεγαλύτερων σταγονιδίων και με μεγαλύτερη διασπορά. Από τα διφασικά ελαιοτριβεία προκύπτει ελαιόλαδο με κολλοειδή σταγονίδια διασποράς που αρχικά έχουν μεγάλο μέγεθος, περίπου 7μm, αλλά μετά από τρεις μήνες ωρίμανσης μειώνονται σε 1 έως 2μm. Αντίθετα το σύστημα τριών φάσεων οδηγεί σε κολλοειδή σταγονίδια με μεγέθη μεταξύ 1 και 5μm.

Ως εκ τούτου, η ύπαρξη της αυξημένης περιεκτικότητας σε νερό σε σχέση με τα μειωμένα επίπεδα των πολυφαινολών, πρωτεϊνών και άλλων υδατοδιαλυτών

μικροσυστατικών σε δείγματα ελαιόλαδου που παράγονται με την τριφασική διαδικασία, φαίνεται να οδηγούν στο σχηματισμό μεγαλύτερων σταγονιδίων και με μεγαλύτερη διασπορά. Αντιθέτως, το ελαιόλαδο που παράγεται σε ένα διφασικό ελαιοτριβείο, μετά την ωρίμανση, καταλήγει στο να έχει μικρότερα σταγονίδια και με μικρότερη διασπορά. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύεται η άποψη ότι τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων φαίνεται να είναι πιο κατάλληλα για η παραγωγή σταθερών βρώσιμων ελαιόλαδων και πλούσιων σε υγριοπροστατευτικά μικροσυστατικά. (Papadimitriou V. et al., 2013)

Δύο άλλες πολύ σημαντικές παράμετροι που θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν είναι ο χρόνος μάλαξης του ελαιοκαρπού, καθώς και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η επεξεργασία του. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο χρόνος μάλαξης δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 – 30 λεπτά και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η όλη διαδικασία δε θα πρέπει να ξεπερνά τους 35 °C. Έχει αποδειχθεί ότι η παράταση της διάρκειας μάλαξης του ελαιοκαρπού έως 90 λεπτά και σε θερμοκρασία μέχρι 35 °C, παρέχει αυξημένη απόδοση σε ελαιόλαδο. (Di Giovacchino L. et al., 1991). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως η αύξηση της θερμοκρασίας μάλαξης (για παράδειγμα από τους 20 °C στους 40 °C), επηρεάζει περισσότερο την απόδοση σε ελαιόλαδο απ' ότι η διάρκειά της. Παρ' όλα αυτά, η απόδοση σε ποσότητα μπορεί να αυξάνεται αλλά όσον αφορά την ποιοτική σύστασή του παρατηρείται μείωση του ποσοστού ολικών φαινολών και ο-διφαινολών. Συνεπώς επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο η γεύση, όσο και η τελική οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου. (Inarejos–Garcia A., 2009)

Στα ελαιοτριβεία, η θερμοκρασία επεξεργασίας κατά τη διάρκεια μάλαξης συχνά διατηρείται από 35 °C έως 40 °C για οικονομικούς λόγους, δηλαδή για να παράγεται τελικά μεγαλύτερη ποσότητα ελαιόλαδου. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μάλαξης, χημικές και ενζυματικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, μπορεί να τροποποιήσουν αισθητά τη σύνθεση του ελαιόλαδου (απώλεια πτητικών ουσιών, αύξηση της οξύτητας, υποβάθμιση του χρώματος). Ο ρυθμός και η έκταση των αντιδράσεων αυτών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν.

Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μάλαξης του ελαιοπολτού αυξάνει την ενζυματική δραστηριότητα των οξειδοοξειδωτικών, που είναι φυσικά παρούσες στον ελαιοπολτό, όπως πολυφαινολοξειδάση (PPO), λιποξυγενάση (LOX) και υπεροξειδάση (POD). Σύμφωνα με τους Servili, Baldioli, Selvaggini, Mariotti και Montedoro (1999), η πολυφαινολοξειδάση είναι σχεδόν ολοκληρωτικά απενεργοποιημένη κατά τη

σύνθλιψη των ελαιόκαρπων και τα μόνα ενεργά ένζυμα κατά τη διάρκεια της μάλαξης είναι η λιποξυγενάση και η υπεροξειδάση. (Boseli E. et al., 2009)

Αυτό που μπορούμε να συμπεράνουμε τελικά, είναι ότι η αύξηση του χρόνου μάλαξης αλλά και η υπέρβαση των 35 °C κατά την παραγωγική διαδικασία, οδηγεί στη μείωση των πολυφαινολικών ουσιών που περιέχονται στο ελαιόλαδο. Έτσι υποβαθμίζεται κατά πολύ η ποιότητα του ελαιόλαδου. Συνεπώς είναι απαραίτητο να επιτευχθεί μια χρυσή τομή και ένας συμβιβασμός μεταξύ της αυξημένης απόδοσης σε ελαιόλαδο και της εξασφάλισης της ποιότητάς του.

## **2.7 ΝΕΕΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Η ανάγκη των ανθρώπων για βελτίωση της διαδικασίας παραγωγής ελαιόλαδου όσον αφορά το κόστος παραγωγής, την απόδοση σε ελαιόλαδο και το χρόνο που απαιτείται ώστε να φτάσει στα χέρια τους το τελικό προϊόν, οδήγησε στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων μεθόδων ώστε να διευκολύνεται η παραγωγή ελαιόλαδου.

Ο σημερινός τρόπος με τον οποίο παράγεται το ελαιόλαδο στα ελαιουργεία (φυγοκέντρηση, διφασικά ελαιοτριβεία κ.λπ) εκσυγχρονίζεται ολοένα και περισσότερο, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα στον παραγωγό να παίρνει στα χέρια του ένα ποιοτικό τελικό προϊόν που πληροί όλες τις απαιτούμενες προδιαγραφές.

Κατά την παραγωγή του ελαιόλαδου, όλα τα στάδια αποτελούν συνεχείς διαδικασίες, εκτός από το στάδιο της μάλαξης του ελαιοκαρπού. Η μάλαξη περιλαμβάνει δύο φάσεις: 1) την προθέρμανση της ελαιομάζας μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας και 2) την καθ' εαυτού μάλαξη όπου η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή.

Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα προηγουμένως, κατά τη μάλαξη, συνενώνονται τα σταγονίδια ελαίου προς μεγάλες σταγόνες και λόγω μηχανικών και ενζυματικών αντιδράσεων απελευθερώνονται στο ελαιόλαδο μικροσυστατικά όπως φαινόλες, τοκοφερόλες, χλωροφύλλες και καροτενοειδή που εμπλουτίζουν τη γεύση του ελαιόλαδου αλλά διαθέτουν και πολύ σημαντικές υγιοπροστατευτικές ιδιότητες. Έχει αποδειχτεί ότι η αύξηση της διάρκειας αλλά και η θερμοκρασίας της μάλαξης (Gimeno E. et al., 2002, Inarejos-Garcia A. et al., 2009, Stefanoudaki E. et al., 2011, Paradimitriou V. et al., 2013) επηρεάζουν δυσμενώς την ποιότητα του ελαιόλαδου αλλά και την περιεκτικότητά του σε ωφέλιμα συστατικά για την υγεία. Γι αυτό το λόγο γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της μεθόδου, ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος παραλαβής «ελαττωματικού προϊόντος» λόγω λανθασμένων χειρισμών.



Για να αντιμετωπιστούν τα όποια προβλήματα εμφανίζονταν κατά τη διαδικασία της μάλαξης, οι ερευνητές (Clodoneo M.L. et al. 2013) ανέπτυξαν μια μέθοδο που βασίζεται στη χρήση υπέρηχων για την εξαγωγή του ελαιόλαδου από τον ελαιοκαρπό. Από την έρευνα αυτή αποδείχτηκε ότι, εάν οι ελιές κατεργαστούν ολόκληρες, πριν την άλεση, μέσα σε υδατόλουτρο με υπέρηχους, το ελαιόλαδο που παράγεται, εξάγεται ευκολότερα από τον καρπό και είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένο σε μικροσυστατικά με ευεργετικές δράσεις στην υγεία. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε και στην ελαιοζύμη αντί των καρπών, αλλά εμφάνισε ορισμένα μειονεκτήματα και δεν προτείνεται.

Επίσης αποδείχτηκε ότι η εκχύλιση των πολυφαινολικών συστατικών ήταν πιο αποτελεσματική μέσω της χρήσης υπέρηχων από ότι με τα κλασσικά φυγοκεντρικά συστήματα. Φυσικά η όλη διαδικασία προϋποθέτει συνθήκες χωρίς οξυγόνο, ώστε να μη συντελούνται αντιδράσεις οξειδωσης και διάσπασης των μορίων.

Η διαφορά αυτής της μεθόδου με τις συμβατικές είναι ότι επεμβαίνει σε αυτούσιο τον καρπό και όχι στον αλεσμένο, γεγονός που συμβάλει εν τέλει, στην παραγωγή ποιοτικότερου ελαιόλαδου. Εφόσον ο καρπός παραμένει ολόκληρος, τα ένζυμα που περιέχει (οξειδάσες – υπεροξειδάσες) και τα υποστρώματα στα οποία δρουν, βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία, συνεπώς δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και δεν αντιδρούν. Επίσης, το νερό στο λουτρό υπέρηχων προστατεύει τις ελιές έναντι της δράσης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου που είναι υπεύθυνο για οξειδωτικές αντιδράσεις. Κατά τη διάρκεια της μάλαξης όμως, όπου ο καρπός είναι αλεσμένος είναι πολύ εύκολο να γίνουν αυτές οι αντιδράσεις και να σχηματιστούν πιθανώς προϊόντα που υποβαθμίζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου πράγμα που διορθώνεται μόνο εάν επικρατούν ανοξυγονικές συνθήκες.

Αυτή η καινούργια μέθοδος κατεργασίας του ελαιοκαρπού με υπέρηχους δίνει τη δυνατότητα μείωσης της διάρκειας της μάλαξης και ενίσχυσης της ποιότητας του προϊόντος ως προς τα μικροσυστατικά του. Επιπλέον μειώνεται και ο απαιτούμενος χρόνος για τη θέρμανση της ελαιοζύμης στο μαλακτήρα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε βιομηχανική κλίμακα λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει, όπως είναι το χαμηλό λειτουργικό κόστος και κόστος παραγωγής και οι μικρές απαιτήσεις χώρου, σε συνδυασμό φυσικά και με την υψηλή ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου.

### 3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Το ελαιόλαδο, είναι ένα μίγμα τρι-, δι-, και μονο-γλυκεριδίων και αποτελεί το προϊόν της εκχύλισης του ελαιοκαρπού. Θεωρείται δη, ως μια από τις καλύτερες πηγές λιπαρών οξέων και φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως είναι οι πολυφαινόλες, οι τοκοφερόλες κ.λπ. Οι θρεπτικές ιδιότητες, η εξαιρετική γεύση και το άρωμα του ελαιόλαδου είναι πολύ σημαντικά στοιχεία κυρίως λόγω της θετικής επίδρασής τους στην ανθρώπινη υγεία. Το ελαιόλαδο αποτελείται από μονοακόρεστα (ελαϊκό οξύ), πολυακόρεστα και κορεσμένα λιπαρά οξέα, κυρίως υπό τη μορφή εστέρων με γλυκερόλη (τριγλυκερίδια), τα οποία συνιστούν περισσότερο από το 98% της σύστασης του ελαιόλαδου. Τα δευτερεύοντα αλλά εξίσου σημαντικά συστατικά του ελαιόλαδου είναι τα εξής, φυτοστερόλες, (β-σιτοστερόλη), υδρογονάνθρακες (σκουαλένιο), πτητικές ενώσεις (κυρίως τα δευτερογενή προϊόντα που προκύπτουν λόγω οξειδωσης), τερπενόλες και τερπενικά οξέα (μασλινικό οξύ), πολυφαινολικά συστατικά, νερό, ελεύθερη γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, κ.λπ.

Ως αποτέλεσμα, το ελαιόλαδο, σαν τρόφιμο, αποτελεί μια σύνθετη μήτρα με πολλά συστατικά, η ανάλυση των οποίων δεν είναι ένα εύκολο έργο. Ο έγκυρος και ακριβής προσδιορισμός της σύνθεσης του ελαιόλαδου δεν είναι μόνο θέμα πιστοποίησης της υπεροχής του έναντι των άλλων βρώσιμων ελαίων, αλλά το πιο σημαντικό θεμέλιο για την αξιολόγηση της ποιότητας και της αυθεντικότητάς του. Ανάμεσα στα συστατικά του ελαιόλαδου, ίσως τον πιο σημαντικό ρόλο παίζουν οι πολυφαινόλες (το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο περιέχει περισσότερες από 20 φαινολικές ενώσεις εκτός από τα προϊόντα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη. Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου καθώς, παρά το γεγονός ότι αποτελούν μικροσυστατικά του ελαιόλαδου, συμμετέχουν στους μηχανισμούς που του προσδίδουν τις χαρακτηριστικές οργανοληπτικές ιδιότητές του και φυσικά επιδρούν ευεργετικά στην υγεία με διάφορους τρόπους που θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω.

<b>ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΚΛΑΣΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</b>
Τριγλυκερίδια
Διγλυκερίδια (1-3%)
Μονογλυκερίδια (<0,25%)
Ελεύθερα λιπαρά οξέα (σε περίπτωση μολυσμένων καρπών ελιάς)

<b>ΜΗ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΚΛΑΣΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</b>
Στερόλες (τερπενικές αλκοόλες, μεθυλοστερόλες)
Υδρογονάνθρακες (σκουαλένιο)
Τερπένια (τριτερπένια)
Τοκοφερόλες (α, β, γ)
Χλωροφύλλες
Καροτενοειδή (λουτεΐνη, β- καροτένιο, ξανθοφύλλη)
Φαινόλες

**Πίνακας 4:** Χημική σύσταση του ελαιολάδου.

Οι πιο βασικές κατηγορίες φαινολικών ουσιών που εμφανίζονται στο ελαιόλαδο και κυρίως στο παρθένο ελαιόλαδο και στις οποίες θα αναφερθούμε, είναι οι εξής:

1. **Απλές φαινόλες**, όπως η υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βανιλίνη, βανιλλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ κ.α.
2. **Σεκοϊριδοειδή**, όπως τα προϊόντα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη.
3. **Λιγνάνια**, όπως η 1-ακετοξυπινωρεσινόλη, η πινωρεσινόλη και η συρινγκαρεσινόλη.
4. **Φλαβονοειδή**, όπως η απιγενίνη και η λουτεολίνη.

(Harwood J. et al., 2000, Christophoridou S. et al., 2005, Bendini A. et al., 2007).

### 3.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ή πολυφαινολικές ενώσεις, είναι οι οργανικές ενώσεις στις οποίες μία (τουλάχιστον) υδροξυλομάδα συνδέεται άμεσα με ένα βενζολικό δακτύλιο. Η φαινόλη είναι η απλούστερη εκπρόσωπος των φαινολών και των αρενολών. Ο χημικός τύπος της είναι:  $C_6H_5OH$ , ενώ δομικά αποτελείται από το φαινύλιο ( $C_6H_5-$ , που παριστάνεται συντομογραφικά ως Ph- ή και ως Φ-) και ένα υδροξύλιο. Ανήκει στις αρωματικές ενώσεις και ειδικότερα στις φαινόλες. Συμπεριφέρεται ως ασθενές οξύ, με  $pK_a = 9,95$ .

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε:

- Απλές φαινολικές ενώσεις
- Σύνθετες φαινολικές ενώσεις (φαινολικοί γλυκοσίδες και σεκοϊριδοειδή)

➤ Φλαβονοειδή

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε όλα τα μέρη της ελιάς και παρατηρούνται και στο ελαιόλαδο. Εμφανίζουν μια ιδιαίτερη διακύμανση στα ποσοστά τους και αυτό σχετίζεται με διάφορους παράγοντες μερικοί από τους οποίους είναι:

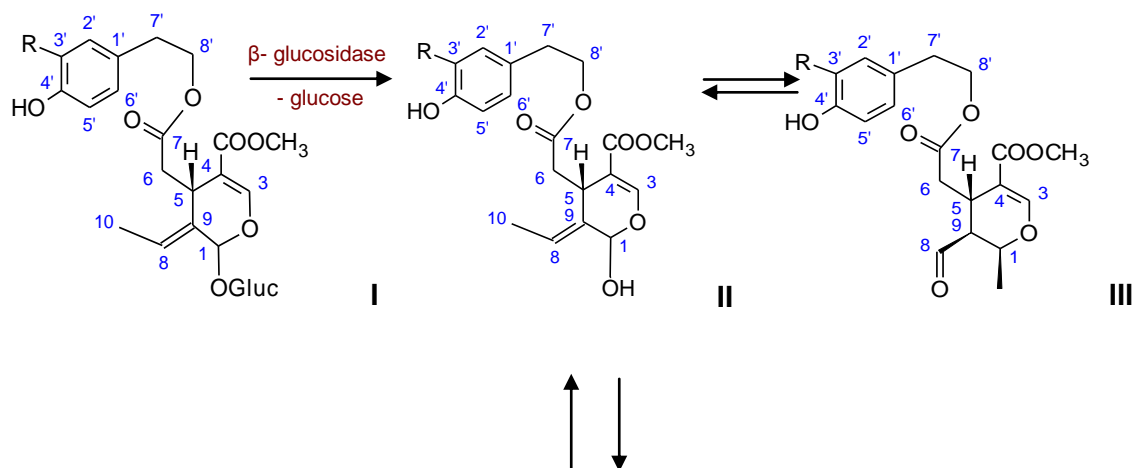
1. η ποικιλία της ελιάς
2. η θερμοκρασία που αναπτύσσεται το δέντρο
3. η υγρασία και τη διαθεσιμότητα νερού (ποτιστικές ή ξερικές ελιές)
4. το υψόμετρο
5. το στάδιο ωρίμανσης του καρπού
6. η διαδικασία και η χρονική στιγμή συγκομιδής του καρπού
7. ο τρόπος παραλαβής του ελαιόλαδου από τον καρπό
8. ο τρόπος αποθήκευσης του καρπού

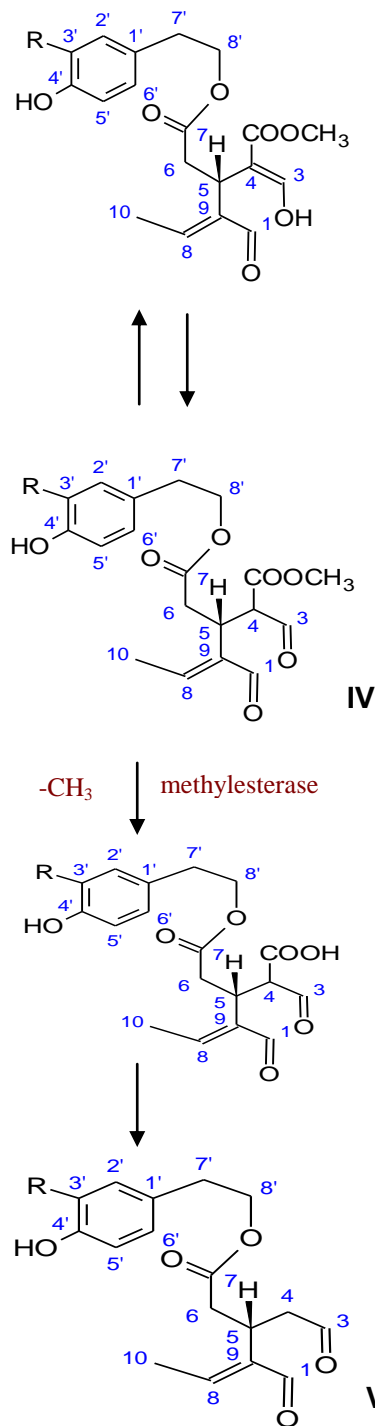
Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την προέλευσή τους στο γενικό μεταβολισμό του φαιυλοπροπανίου, ο οποίος, στα τρία πρώτα του βήματα, αποτελείται από τη μετατροπή της L-φαιουλαανίνης σε διάφορα υδροξυκιναμικά οξέα. Τα ένζυμα που καταλύουν τα επιμέρους βήματα αυτής της διαδικασίας είναι, αντιστοίχως, η αμμωνιακή λυάση της φαιουλαανίνης (PAL), η κιναμική-4-υδροξυλάση και η CoA λιγάση. Η αμμωνιακή λυάση της L-φαιουλαανίνης θεωρείται το βασικό ένζυμο σε φαινολικές βιοσυνθέσεις, δεδομένου ότι καταλύει την αναγωγική απαμίνωση της L-φαιουλαανίνης σε μορφή trans-κιναμικού οξέος, το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση των φυτικών φαιυλοπροπανοειδικών ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό λιγνίνης, φλαβονοειδών και υδροξυκιναμικών οξέων. Η δραστηριότητα της αμμωνιακής λυάσης της L-φαιουλαανίνης ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και τη διαφοροποίηση των ιστών και των κυττάρων, αλλά και κατόπιν επιδράσεως και άλλων παραγόντων, όπως ακτινοβολία, τραυματισμός, διατροφικές ανεπάρκειες του φυτού, ζιζανιοκτόνα φάρμακα και προσβολές από ιούς, μύκητες και έντομα, τα οποία αυξάνουν τη σύνθεση ή τη δραστηριότητα της αμμωνιακής λυάσης της L-φαιουλαανίνης σε διάφορα φυτά. (Morello J.R. et al., 2005)

### 3.2 ΙΡΙΔΟΕΙΔΗ – ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ

Τα ιριδοειδή είναι μονοτερπένια, που χαρακτηρίζονται από κυκλοπεντανο-(c)-πυρανικό σύστημα δακτυλίων. Σαν φυσικά προϊόντα απαντώνται σπάνια σαν άγλυκα, συνήθως σαν γλυκοσίδες στη θέση 1, με διπλό δεσμό στη θέση 3-4 και με υποκαταστάτη στη θέση 4 ένα καρβοξυμεθύλιο (CH<sub>3</sub>COO-). Εάν ανοίξει ο δακτύλιος του κυκλοπεντανίου σχηματίζονται τα σεκοΐριδοειδή, βιογενετικά συγγενείς ενώσεις με τα ιριδοειδή. (Βερυκοκίδου- Βισσαροπούλου Ε., 1997)

Στην οικογένεια Oleaceae, συναντώνται συνήθως απλά σεκοΐριδοειδή και σεκοΐριδοειδή τα οποία είναι συζευγμένα με φαινολική ομάδα. Έχουν βασικό σκελετό, τον ολεοσίδη, που χαρακτηρίζεται από ένα εξωκυκλικό 8,9-ολεφινικό τμήμα και είναι συνδυασμός του ελενολικού οξέος με ένα γλυκοσιδικό τμήμα. Όταν ο ολεοσίδης είναι συζευγμένος με μια φαινολική μονάδα, όπως η υδροξυτυροσόλη ή η τυροσόλη, προκύπτουν αντίστοιχα, η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροσίδης. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε ιδιαίτερα με τέσσερα σεκοΐριδοειδή του ελαιόλαδου, την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη, που αποτελούν τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα και τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα αντίστοιχα και την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης. Η συγκέντρωση της ελαιασίνης και της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο, αυξάνεται στο στάδιο της μάλαξης του καρπού, ενώ μειώνεται όσο αυξάνεται η διάρκεια μάλαξης καθώς και η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το στάδιο αυτό. (Servilli M. et al., 2002, Ranalli A. et al., 2001)





**Εικόνα 4:** Πιθανός βιοχημικός μηχανισμός σχηματισμού σεκοΐριδοειδών  
**I)** R= H : λιγκστροσίδη, R= OH : ελευρωπαΐνη, **II)** R= H : άγλυκο του λιγκστροσίδη, R= OH : άγλυκο της ελευρωπαΐνης, **III)** R= H : αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη, R= OH : αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης, **IV)** R= H : διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη, R= OH : διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης, **V)** R= H : ελαιοκανθάλη, R= OH : ελαιασίνη (Servili M. et al., 2004).

### 3.2.1 Βιολογικές ιδιότητες σεκοϊριδοειδών και φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ουσίες που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο εκτός από τις ευεργετικές ιδιότητες που του προσδίδουν, είναι υπεύθυνες και για τις οργανοληπτικές ιδιότητές του. Μερικά πολύ χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι:

- Η *ελαιασίνη* θεωρείται υπεύθυνη για την πικρή γεύση του ελαιόλαδου
- Η *ελαιοκανθάλη* προσδίδει μια αίσθηση «πικράδας και καψίματος» στο λαιμό (πικάντικη γεύση)

Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου εμφανίζουν ιδιαίτερη βιοδιαθεσιμότητα στον άνθρωπο, η οποία συντελεί στην ενίσχυση της άποψης ότι τα φαινολικά συστατικά ασκούν θετική επίδραση στην υγεία. Αν και οι ευεργετικές επιδράσεις του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου είναι γενικά γνωστές, πρόσφατα άρχισαν να ερευνώνται και οι βιολογικές ιδιότητες των μικροσυστατικών του που κατέχουν επίσης εξέχων ρόλο. Σε πειραματικές μελέτες (*in vivo* και *in vitro*), αποδεικνύεται ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου επιδρούν θετικά στη μεταβολή της σύνθεσης των λιπιδίων, των αιμοπεταλίων και στην κυτταρική λειτουργία. Επίσης επηρεάζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα και το σχηματισμό των οστών, καθώς επίσης προκαλούν μείωση της οξειδωτικής βλάβης και της φλεγμονής. Εξετάζοντας όλα τα παραπάνω λοιπόν, εξηγείται εν μέρει, το χαμηλό ποσοστό των ασθενειών που σχετίζονται με τη διατροφή, μεταξύ των πληθυσμών που κατοικούν στην περιοχή της Μεσογείου. Για παράδειγμα, το χαμηλό ποσοστό καρδιαγγειακών παθήσεων και η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου ανάμεσα στους μεσογειακούς λαούς και άλλους πληθυσμούς στον κόσμο. (Cicerale S. et al., 2010)

Παρά το γεγονός ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες, υπάρχουν ευρήματα που αποδεικνύουν τα ευεργετικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε σχέση με την υγεία των οστών, γεγονός που ίσως μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης οστεοπόρωσης σε πληθυσμούς που κατοικούν στην περιοχή της Μεσογείου. Γενικότερα πάντως, αν και το ελαιόλαδο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φάρμακο με τον αυστηρό ορισμό του φαρμάκου, οι βιολογικές ιδιότητες που μπορεί να έχει, επιδρούν ευεργετικά όσον αφορά τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών.

#### 3.2.1.1 Επίδραση στη συγκέντρωση λιποπρωτεϊνών του πλάσματος

Ως γνωστόν, τα αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης (TC) και λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL-C) λειτουργούν ως παράγοντες κινδύνου

για αθηροσκλήρωση, η οποία είναι η κύρια αιτία της καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, τα αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL-C) πιστεύεται ότι έχουν προστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. (Chrysohoou C. et al., 2006) Από έρευνες που έχουν γίνει κατά καιρούς σε υγιείς εθελοντές, έχει αποδειχθεί πως εμφανίζεται μείωση της αναλογίας ολικής χοληστερόλης / HDL-C σε συνδυασμό με την αύξηση της κατανάλωσης ελαιόλαδου πλούσιου σε πολυφαινόλες.

### **3.2.1.2 Επίδραση στην οξείδωση των λιπιδίων**

Η οξείδωση της LDL χοληστερόλης θεωρείται επίσης ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακής νόσου καθώς είναι γνωστό ότι προκαλεί βλάβες στα τοιχώματα των αγγείων και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πλάκας εντός του αρτηριακού τοιχώματος. (Coni E. et al., 2000, Patrick L. et al., 2001) *In vivo* μελέτες τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα έχουν δείξει ότι το επίπεδο στο οποίο οξειδώνεται η LDL χοληστερόλη, μειώνεται γραμμικά σε σχέση με την κατανάλωση ελαιόλαδου με αυξανόμενη συγκέντρωση σε φαινολικές ουσίες.

### **3.2.1.3 Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα**

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι φαινόλες είναι δυναμικά ισχυροί αναστολείς της οξείδωσης της LDL *in vitro*. Η *in vivo* οξείδωση της LDL είναι συνδεδεμένη με το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών, οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Οι πολυφαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου έχουν επίσης συνδεθεί και με τις διαδικασίες που συμβάλλουν στην παθογένεση των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Ειδικότερα η υδροξυτυροσώλη, μια από τις σημαντικότερες φαινολικές ουσίες του ελαιόλαδου, έχει αναφερθεί ότι μόνη της μειώνει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και αθηροσκλήρωσης. Επίσης, έχει τεκμηριωθεί ότι η υδροξυτυροσώλη αναστέλλει τη λιποξυγενάση του αραχιδονικού οξέος, ή εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Θεωρείται ότι η υδροξυτυροσώλη διεισδύει στις κυτταρικές μεμβράνες και, κατά συνέπεια, μπορεί να εμποδίσει την παραγωγή B4 λευκοτριενίων (LTB4) από ενδογενές αραχιδονικό οξύ, αποτελεσματικά. (Tuck K. et al., 2002) Επιπροσθέτως, οι πολυφαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου μπορούν να μειώσουν την πίεση του αίματος και να βελτιώσουν την ενδοθηλιακή λειτουργία σε νέες γυναίκες με ήπια υπέρταση (Moreno-Luna R. et al., 2012)



#### **3.2.1.4 Επίδραση στις οξειδωτικές αλλοιώσεις του DNA**

Οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA είναι ένας προάγγελος για καρκινογένεση στον άνθρωπο (Cooke M.S. et al., 2003), καθώς είναι ευρέως γνωστό ότι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου συνεχώς επιτίθενται στα ανθρώπινα κύτταρα κάτι που μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA και να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου (Salvini S. et al., 2006). Με βάση αυτήν την παρατήρηση πραγματοποιήθηκαν διάφορες έρευνες που αποδεικνύουν ότι η κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου πλούσιου σε πολυφαινολικά συστατικά μειώνει την οξειδωτική αλλοίωση του DNA έως και 30% σε σύγκριση με ένα ελαιόλαδο με χαμηλά ποσοστά φαινολικών ουσιών. (Salvini S. et al, 2006)

#### **3.2.1.5 Επίδραση στους δείκτες οξειδωτικού στρες**

Το οξειδωτικό στρες που παράγεται από τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) έχει συνδεθεί με μια σειρά ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, ορισμένες μορφές καρκίνου και κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και θεωρείται ως υποπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού. (Reinisch N. et al., 1998) Έρευνες έχουν αποδείξει πως οι απλές φαινόλες του ελαιόλαδου και συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη μειώνουν την παραγωγή ROS. (Goya L. et al., 2007) Η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί επίσης πως είναι πολύ αποτελεσματική στη μείωση του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με το παθητικό κάπνισμα. Η αμφίφιλη φύση αυτής της ουσίας, σε αντίθεση με τα λιπόφιλα χαρακτηριστικά της βιταμίνης E, μπορεί να παρέχει μια πρόσθετη προστασία απέναντι στις οξειδωτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα βιολογικά συστήματα στην επιφάνεια διεπαφής νερού – λιπιδίων στον οργανισμό. (Visioli F. et al., 2000) Έχει τέλος αναφερθεί αύξηση στη συνολική αντιοξειδωτική δράση του πλάσματος στον άνθρωπο μετά την κατανάλωση φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου.

#### **3.2.1.6 Επίδραση στην οξειδωτική κατάσταση υγιών ηλικιωμένων ανθρώπων**

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι ηλικιωμένοι έχουν αυξημένο οξειδωτικό στρες ενώ παράλληλα εμφανίζουν και μειωμένα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα. (Gano L.B. et al., 2011) Έρευνα που διεξήχθη σε υγιείς ηλικιωμένους ανθρώπους κατέδειξε ότι αυτοί που χρησιμοποίησαν ένα ελαιόλαδο πλούσιο σε πολυφαινόλες σαν αποκλειστική διατροφική πηγή λιπαρών σε μια καθημερινή δόση των 50 ml εμφάνισαν σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης και σημαντική αύξηση των επιπέδων HDL. Εν κατακλείδι, αποδείχτηκε ότι το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο βελτιώνει αισθητά την ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα των υγιών ηλικιωμένων ατόμων. (Oliveras-Lopez M.J. et al., 2013)

### 3.2.1.7 Επίδραση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια, έχει αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων και αθηροσκλήρωσης. Οι συνεχείς τραυματισμοί του αγγειακού επιθηλίου έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσίαση βλαβών οι οποίες προκαλούν την υπερέκφραση των κυττάρων και την υπερδραστηριότητα και συνάθροιση των αιμοπεταλίων (De La Cruz J.P. et al., 2000) Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τη μοριακή έκφραση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ανθρώπινων αιμοπεταλίων *in vitro*. (Togna G.I. et al., 2003) Συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει εντελώς τη συσσώρευση αιμοπεταλίων στο αίμα του ανθρώπου (*in vitro*) σε επίπεδο 100–400  $\mu\text{M}$ . (Petroni A. et al., 1995) Παρόμοιες ιδιότητες παρουσιάζουν και άλλες φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου όπως η λουτεολίνη και το άγλυκο της ελευρωπαΐνης. Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί πως η κατανάλωση ελαιόλαδου πλούσιου σε φαινολικές ουσίες μειώνει τη συγκέντρωση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) και του παράγοντα VII (FVII) που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρδιακών παθήσεων.

### 3.2.1.8 Αντιμικροβιακή δράση

*In vitro* έρευνα έχει αποδείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ιδιαίτερα η ελευρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη έχουν εμφανίσει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε πολλά στελέχη βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για εντερικές λοιμώξεις και λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. (Medina E. et al., 2006) Η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη έχουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε στελέχη της *Pseudomonas fluorescens* ATCC. (Tuck K. et al., 2002) Επίσης η ελαιοκανθάλη έχει αποδειχθεί ότι δεν υδρολύεται στο στομάχι και γι' αυτό το λόγο βοηθάει στην αναχαίτιση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Helicobacter pylori*. (Romero C. et al., 2007)

### 3.2.1.9 Δράση κατά του Alzheimer και του καρκίνου

Ο πολλαπλασιασμός και ο θάνατος των κυττάρων είναι υποκείμενοι παράγοντες για το σχηματισμό όγκων και την εξέλιξή τους. (Evan G.I. et al., 2001) Έρευνες μέχρι σήμερα έδειξαν ότι η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην ανθρώπινη προμυελοκυτταρική λευχαιμία HL60 κύτταρα και στον ανθρώπινο καρκίνο του παχέος εντέρου. (Hashim Y.Z. et al., 2008) Έρευνες έχουν δείξει μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή των κυττάρων του καρκίνου του παχέος εντέρου από τις φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου. Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί ότι ασκεί ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση ενάντια σε ανθρώπινα

κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. (Corona G. et al., 2009) Η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν την ιδιότητα να προκαλούν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7. (Han J. et al., 2009) Επίσης, η ελαιοκανθάλη, που ανήκει στα σεκοϊριδοειδή, έχει εμπλακεί στη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου του Alzheimer σε μεσογειακούς λαούς. (Αναλυτικότερα βλ. παράγραφο 8.1.1)

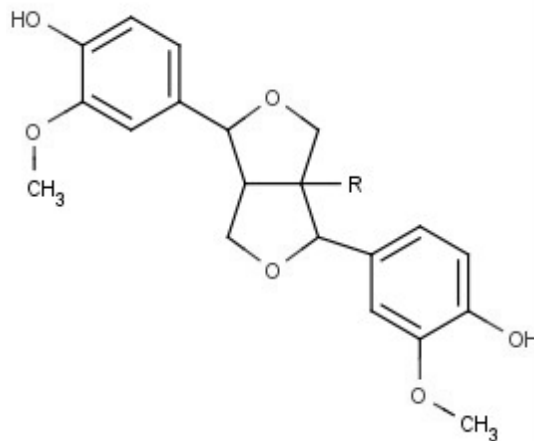
#### **3.2.1.10 Δράση στα οστά**

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των οστών και την πρόληψη της οστεοπενίας, λόγω της πολύ ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης τους (Cicerale S., et al., 2010)

### **3.3 ΛΙΓΝΑΝΙΑ**

Τα λιγνάνια είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που βρέθηκαν στα φυτά. Είναι μία από τις κύριες κατηγορίες φυτοοιστρογόνων, τα οποία είναι χημικές ουσίες που μοιάζουν στα οιστρογόνα, αλλά δρουν και ως αντιοξειδωτικές ουσίες. Τα λιγνάνια των φυτών είναι πολυφαινολικές ουσίες που προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη μέσω διμερισμού των υποκατεστημένων κινναμικών αλκοολών. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από οξειδωτικά ένζυμα και συχνά ελέγχεται από πρωτεΐνες. Τα λιγνάνια είναι παράγωγα του φαινυλοπροπανίου. Δύο δομικές μονάδες 1-φαινυλοπροπανίου συνδέονται (σύνδεση 8-8') και έτσι παράγονται τα λιγνάνια. Υπάρχουν επίσης oligομερή λιγνάνια που προκύπτουν με σύνδεση μέχρι 5 μονάδων φαινυλοπροπανίου καθώς και μόρια που προκύπτουν από τη σύνδεση λιγνανίου με φλαβονοειδές (λιγνανοειδή ή υβριδικά λιγνάνια) και έχουν μικτή βιογενετική προέλευση. Όταν αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διατροφής, μερικά λιγνάνια μεταβολίζονται προς εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από τα εντερικά βακτήρια. (Σκαλτσούνης Α.Λ., 2009)

Όσον αφορά στην ελιά και το ελαιόλαδο αξίζει να σημειωθεί ότι, στο φλοιό της ελιάς εμφανίζονται δύο λιγνάνια, η (+)-ακετοξυπινωρεσινόλη και η (+)-1-υδροξυπινωρεσινόλη, ενώ η (+)-πινωρεσινόλη βρίσκεται σε σημαντικό βαθμό στον πυρήνα της ελιάς. Στο ελαιόλαδο τα λιγνάνια εμφανίζονται μετά από το στάδιο της σύνθλιψης των καρπών της ελιάς, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός σχηματισμού αυτών των ουσιών. Στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο έχουν εντοπιστεί δυο λιγνάνια, η (+)-ακετοξυπινωρεσινόλη, και η (+)-πινωρεσινόλη. (Tripoli E. et al., 2005, Owen R.W. et al., 2000, Tsukamoto H. et al., 1984)



**Εικόνα 5:** R= H Πινορεσινόλη  
R= OCOCH<sub>3</sub> Ακετοξυπινορεσινόλη

### 3.3.1 Βιολογική δράση λιγνανίων

Τα λιγνάνια θεωρούνται σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες του φαινολικού κλάσματος του ελαιόλαδου. Επίσης, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι κυτταρικές και μεταβολικές μελέτες καθώς και μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι διαθέτουν αντικαρκινικές δράσεις, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στη δυνητική χρησιμοποίησή των λιγνανίων ως χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

Όταν αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διατροφής, μερικά λιγνάνια μεταβολίζονται προς εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από τα εντερικά βακτήρια. Η εντερολακτόνη έχει τη δυνατότητα να προστατεύει τον οργανισμό από την οξειδωση της LDL χοληστερόλης (Kang M.H. et al., 2000, Arts I. et al., 2005) και πρόσφατα, μια ανάλογη δραστηριότητα αποκαλύφθηκε και για τα λιγνάνια που προέρχονται από το ελαιόλαδο (Franconi F. et al., 2006). Ομοίως, μελέτες που διεξάγονται σε άλλη μια σημαντική πηγή λιγνανίων, το λιναρόσπορο (Meagher L.P. et al., 1999, Kang M.H. et al., 2000, Suja K.P. et al., 2005) έχουν δείξει ότι οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του δέρματος (Kang M.H. et al., 2000, Suja K.P. et al. 2005) του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και των ιστών του πνεύμονα. (Wang M.J. et al., 2002, Owen R.W. et al., 2000 a–c).

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα λιγνάνια μπορεί να αναστέλλουν την καρκινογένεση, συμπεριλαμβάνουν αντιοξειδωτικές και αντιοιστρογόνες δραστηριότητες. Επιπλέον, οι ομοιότητες στη δομή μεταξύ λιγνανίων και οιστραδιόλης καθώς και με το συνθετικό αντιοιστρογόνο ταμοξιφαίνη, υποδηλώνουν πιθανή δράση έναντι του καρκίνου του μαστού μέσω της αντιοιστρογονικής τους

δράσης που μεταφράζεται εν' τέλει σε αντικαρκινική δράση. Στην πραγματικότητα, τα λιγνάνια φέρεται να ευθύνονται για την αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων του πλακούντα αλλά και για την αναστολή του επαγόμενου από την οιστραδιόλη πολλαπλασιασμού των MCF-7 ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού. Επίσης σημαντική είναι και η ιδιότητα τους να αναστέλλουν την c-AMP φωσφοδιεστεράση των κυττάρων.

Τέλος, η (+)- ακετόξυπινореσινόλη εμφανίζει την ικανότητα να εμποδίζει την δραστηριότητα της HER2 ογκοπρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Επομένως, έχει πολύ καλό υπόβαθρο για να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού (Menendez J.A. et al., 2008).

## **4 ΓΕΥΣΙΓΝΩΣΙΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

### **4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η πρώτη αξιολόγηση ενός ελαιόλαδου γίνεται με τις αισθήσεις πολύ πριν λάβει χώρα οποιαδήποτε επεξεργασία ή χημική κατεργασία. Συνεπώς, εάν ένα ελαιόλαδο πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις γεύσης και οσμής για τον καταναλωτή, τότε και μόνο τότε κρίνεται κατάλληλο προς χρήση. Η ποιότητα του ελαιόλαδου καθορίζεται από τις οργανοληπτικές του ιδιότητες (Gomes da Silva M.D.R. et al., 2012). Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, ο πυλώνας της μεσογειακής διατροφής, χαρακτηρίζεται από τρία θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά: την αίσθηση του πικάντικου, του πικρού και του φρουτώδους.

### **4.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΤΟΥΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**

Σύμφωνα με τις επίσημες οδηγίες του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (IOC), η αίσθηση του πικάντικου γίνεται αντιληπτή σε όλη τη στοματική κοιλότητα και ιδίως στο πίσω μέρος της γλώσσας στην αρχή του λαιμού. Η αίσθηση του πικρού γίνεται αντιληπτή στην περιχαρακωμένες θηλές στη "V" περιοχή της γλώσσας, ενώ η αίσθηση του φρουτώδους στο πίσω μέρος της μύτης. (COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 4)

Η αντίληψη του πικάντικου και του πικρού στη στοματοφαρυγγική περιοχή της στοματικής κοιλότητας, οφείλεται σε συγκεκριμένες φαινολικές ουσίες του ελαιόλαδου που συνδέονται με καθένα από αυτά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι ουσίες αυτές ανήκουν κατά κύριο λόγο στη χημική κατηγορία των σεκοϊριδοειδών. Πιο συγκεκριμένα η ελαιοκανθάλη (p-HPEA-EDA) είναι μια ουσία που προκαλεί μια αίσθηση «καψίματος» στο πίσω μέρος της γλώσσας, μια ιδιότητα στην οποία οφείλει και το όνομά της. Στην πραγματικότητα, κατόπιν έρευνας αποδείχτηκε πως ενεργοποιεί τον αισθητικό υποδοχέα TRPA1 που βρίσκεται στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα, προκαλώντας αυτή την ερεθιστική δράση (Peyrot des Gachons C. et al., 2011). Μεταξύ των φαινολικών ουσιών που σχετίζονται με την πικρή γεύση ορισμένων εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων είναι και η ελαιασίνη (3,4-DHPEA-EDA) (Andrewes P. et al., 2003, Czerwińska M. et al, 2012–b, Gutiérrez-Rosales F. et al., 2003, Inarejos-García A.M. et al., 2010).

Οι παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες αλλά και την περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινολικές ουσίες συνδέονται κατά κύριο λόγο με την ποικιλία, καθώς επίσης και με τη γεωγραφική περιοχή, τις γεωπονικές πρακτικές και φυσικά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επίσης

εξαρτώνται από την ωρίμανση του καρπού, τις τεχνικές εξαγωγής του ελαιόλαδου και τέλος τις συνθήκες αποθήκευσής του, είτε στα σημεία διάθεσής – πώλησης, είτε στο σπίτι (Bendini A. et al., 2012).

Είναι γνωστό πως από ελαιόδεντρα που δεν αρδεύονται (ξερικές ελιές) παράγονται εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα με υψηλότερη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης, σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από αρδευόμενες ελιές. (Gomez-Rico A. et al., 2006). Επίσης, η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης είναι αισθητά μεγαλύτερη, εάν η συγκομιδή του ελαιοκαρπού γίνει ενώ οι ελιές είναι σε αρχικό στάδιο ωρίμανσης, όπου ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό είναι ακόμη πράσινες. (Morello J.R. et al., 2004. Gomez-Rico A. et al., 2006).

Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών του ελαιόλαδου μειώνεται κατά την έκθεσή του σε συνθήκες  $O_2$  και ηλιακού φωτός, συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η σωστή φύλαξη του ελαιόλαδου σε σκοτεινό και σκιερό μέρος, ώστε να διασφαλίζεται η ποιότητά του για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Παρά το γεγονός ότι οι φαινολικές ουσίες του ελαιόλαδου μειώνονται κατά πολύ κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος κυρίως λόγω της θέρμανσης, η ελαιοκανθάλη εμφανίζει αξιοσημείωτη σταθερότητα, ιδίως όταν η αρχική συγκέντρωσή της στο ελαιόλαδο είναι υψηλή (Gomez-Alonso S. et al, 2003, Allouche Y. et al., 2007). Αντίθετα, η ελαιασίνη δεν είναι τόσο σταθερή όσο η ελαιοκανθάλη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μαγειρέματος (Gomez-Alonso S. et al., 2003).

Τέλος έχει αναφερθεί ότι, όσο αυξάνεται ο χρόνος αποθήκευσης του παρθένου ελαιόλαδου, τόσο μειώνεται η περιεκτικότητά του σε σύνθετες μορφές φαινολικών συστατικών (3,4-DHEA-EDA, p-HPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA κλπ.) λόγω της ανάπτυξης οξειδωτικών και υδρολυτικών δράσεων. Αντίθετα, αυξάνεται η περιεκτικότητα σε απλές φαινολικές ενώσεις (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη) (Morello J.R. et al., 2004). Το γεγονός αυτό, επηρεάζει και την οργανοληπτική ποιότητα του παρθένου ελαιόλαδου, αφού η χαρακτηριστική πικρή γεύση του ελαττώνεται σημαντικά κατά την παλαίωση του προϊόντος (Sinesio F. et al., 2005).

#### **4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα προκειμένου να καταστεί εφικτή η αξιολόγηση των εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων, χωρίς την υποχρεωτική παρουσία εξειδικευμένων γευσιγνωστών. Κρίθηκε απαραίτητη συνεπώς η ανάπτυξη μεθόδων, όπου κατόπιν χημικής κατεργασίας του ελαιόλαδου, υπάρχει η δυνατότητα

εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικά με την αξιολόγηση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών.

Μια πρώτη προσέγγιση του θέματος έγινε προτείνοντας μοντέλα βασιζόμενα στην εκλεκτική απομόνωση των συστατικών που προσδίδουν την πικρή γεύση στο ελαιόλαδο και στη μετέπειτα φασματοφωτομετρική μέτρηση του δείκτη  $K_{225}$  αυτών. Επίσης άλλη μια εναλλακτική μέθοδος βασίστηκε στη μέτρηση του ολικού φαινολικού δείκτη των ελαιόλαδων.

Τα μοντέλα αυτά αξιολογήθηκαν και υπεβλήθησαν σε στατιστική επεξεργασία, ώστε να εξασφαλιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο, ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατόπιν χημικής ανάλυσης, συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα που προτείνουν οι επαγγελματίες γευσισγνώστες.

#### **4.3.1 Μοντέλο πρόβλεψης με βάση το δείκτη ολικών φαινολών του ελαιόλαδου**

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ορισμένες ποικιλίες ελαιόλαδου, είναι γενετικά καθορισμένο να μπορούν να παράγουν ελαιόλαδο πλούσιο σε πολυφαινόλες. Αν και είναι αποδεδειγμένο πως αυτές οι ουσίες συνεισφέρουν κυρίως στην αίσθηση του πικρού και του πικάντικου, δεν έχει καθοριστεί ακόμη με σαφήνεια ποια είναι η συμβολή της κάθε μιας ξεχωριστά. Υπάρχει βέβαια μια πολύ σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση συγκεκριμένων ουσιών, παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης που ανήκουν στα σεκοϊριδοειδή, όπως είναι η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη και στο πόσο πικρό ή πικάντικο είναι ένα ελαιόλαδο, αλλά χρησιμεύει μόνο στην περίπτωση που μελετώνται ελαιόλαδα που έχουν μεγάλα ποσοστά από αυτές τις ουσίες λόγω ποικιλίας (Andrewes P. et al. 2003). Ως επί το πλείστον οι ελληνικές ποικιλίες έχουν υψηλές συγκεντρώσεις από αυτές τις ουσίες, οπότε σε αυτή την περίπτωση η συσχέτιση επιτυγχάνεται χωρίς ιδιαίτερο πρόβλημα. Εάν επιχειρηθεί όμως η ίδια προσέγγιση σε ελαιόλαδα από ξένες ποικιλίες, για παράδειγμα από την ιταλική ποικιλία Coratina, παρατηρείται δυσαναλογία μεταξύ της ασθενώς πικρής γεύσης και του υψηλού ποσοστού ολικών φαινολών.

Συνεπώς η χρήση αυτού του μοντέλου πρόβλεψης οργανοληπτικών συστατικών του ελαιόλαδου κρίνεται αποτελεσματικό ανά περίπτωση και δεν μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε όλα τα ελαιόλαδα, ανεξαρτήτως της ποικιλίας από την οποία προέρχονται.



#### 4.3.2 Μοντέλο πρόβλεψης με βάση το δείκτη $K_{225}$ του ελαιόλαδου

Πρώτα, οι Gutierrez-Rosales F. et al., (1989), αντιστοίχισαν την πικρή γεύση του παρθένου ελαιολάδου σε συγκεκριμένες αταυτοποίητες χρωματογραφικές κορυφές που ανίχνευσαν στα 225 nm. Οι ερευνητές συσχέτισαν τις συγκεκριμένες κορυφές που ανίχνευσαν με την οργανοληπτική εκτίμηση μιας ομάδας γευσιγνωστών (panel) και πρότειναν μια μαθηματική σχέση, που αποτιμά ένα παρθένο ελαιόλαδο ως προς την πικρή γεύση του. Οι ερευνητές έχοντας μόνο 10 δείγματα στην κατοχή τους επισήμαναν την ανάγκη περαιτέρω μελέτης και βελτίωσης της μεθόδου τους. Πράγματι, στη συνέχεια της ερευνητικής εργασίας τους (Gutierrez-Rosales F. et al., 1992), παρουσίασαν μια γρήγορη και άμεση τεχνική εκτίμησης της πικρής γεύσης του παρθένου ελαιολάδου χρησιμοποιώντας μεγάλο αριθμό δειγμάτων παρθένου ελαιολάδου. Συγκεκριμένα, πρότειναν την απομόνωση του πολικού φαινολικού κλάσματος του παρθένου ελαιολάδου με SPE και απευθείας μέτρηση της απορρόφησης του εκχυλίσματος στα 225 nm, με λευκό δείγμα μεθανόλη/νερό (1:1 v/v). Το αποτέλεσμα που εκφράζεται ως  $K_{225}$ , είναι η απορρόφηση στα 225 nm, 1 g ελαιολάδου σε 100 mL διαλύτη εκχύλισης. Τα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα των παρθένων ελαιολάδων δίνουν 2 χαρακτηριστικά μέγιστα, στα 225 και 278 nm, με το πρώτο να διαφοροποιεί καλύτερα τα εκχυλίσματα άρα και τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ «πικρού» και «μη πικρού» παρθένου ελαιολάδου.

Οι ερευνητές συσχετίζοντας τα αποτελέσματα του  $K_{225}$  με αυτά ενός panel για 75 δείγματα παρθένου ελαιολάδου κατέληξαν σε μια μαθηματική εξίσωση με καλό συντελεστή συσχέτισης, σύμφωνα με την οποία μπορεί να προβλεφθεί η εκτίμηση του οργανοληπτικού panel για την πικρή γεύση ενός παρθένου ελαιολάδου. Η διαδικασία προσδιορισμού της πικράδας του παρθένου ελαιολάδου, όπως προτάθηκε από τους Gutierrez-Rosales F. et al. (1992), χωρίς να αποτελεί επίσημη μέθοδο, έχει τον χαρακτήρα μεθόδου αναφοράς, αφού χρησιμοποιείται από όλους τους ερευνητές που προσπαθούν να προσεγγίσουν την έννοια της πικράδας του παρθένου ελαιολάδου με αντικειμενικό τρόπο. Οι ερευνητές είτε ακολουθούν πιστά την διαδικασία, μετρώντας τον δείκτη  $K_{225}$ , είτε τον χρησιμοποιούν για να αναδείξουν την μέθοδό τους (καλή συσχέτιση με  $K_{225}$ ). Οι Mateos R. et al. (2004), αμφισβήτησαν μερικώς τον δείκτη  $K_{225}$ , επισημαίνοντας ότι στα 225 nm απορροφούν και φαινολικές ενώσεις (απλές φαινόλες, ελενολικό οξύ κλπ.) που όμως δεν είναι πικρές. Σύμφωνα με τους τελευταίους ο υπολογισμός του δείκτη  $K_{225}$  αποτελεί μια προσπάθεια ποσοτικής αξιολόγησης του φαινολικού εκχυλίσματος ως προς την πικρή γεύση, η οποία όμως είναι αυθαίρετη και δυσνόητη. Έτσι πρότειναν ένα μοντέλο συσχέτισης της περιεκτικότητας σε αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και της

πικρής γεύσης του ελαιόλαδου. Η ουσία αυτή συνδέεται βιοσυνθετικά με την ελαιασίνη, συνεπώς δεν αποτελεί έκπληξη το ότι διαθέτει πικρές ιδιότητες.

Τελικά, μέχρι σήμερα, περαιτέρω μελέτες που έλαβαν χώρα, αξιολογώντας όλα τα παραπάνω δεδομένα (Favati F. et. al., 2013) καταδεικνύουν απόλυτα, τη δυνατότητα εκτίμησης της έντασης της αντιληπτής πικράδας, με χρήση χημικών δεικτών. Έτσι η δυνατότητα χρήσης του δείκτη  $K_{225}$  θεωρείται δεδομένη. Οι Favati F. et. al. (2013) απέδειξαν ότι η ένταση της πικράδας ενός ελαιόλαδου μπορεί να προβλεφθεί ικανοποιητικά με βάση την εξίσωση:

$$\text{Ένταση πικράδας} = 14,055 * K_{225} - 0,5787$$







# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ 1

## 5 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί σημαντική πηγή πολλών βιοδραστικών συστατικών με αναρίθμητα οφέλη για την υγεία. Αν και είναι μίγμα πολλών διαφορετικών ουσιών, τον κυριότερο ρόλο στην προστασία και προάσπιση της ανθρώπινης υγείας φαίνεται να παίζουν τα φαινολικά συστατικά που περιέχει. Στις πιο σημαντικές φαινολικές ουσίες του ελαιόλαδου εντάσσονται η ελαιοκανθάλη, η ελαιασίνη, η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη οι οποίες είναι παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Για τις ουσίες αυτές υπάρχουν ήδη στη διεθνή βιβλιογραφία αρκετές μελέτες που τους αποδίδουν αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές, καρδιοπροστατευτικές και άλλες ιδιότητες.

Σύμφωνα με το νέο κανονισμό της ευρωπαϊκής ένωσης που εξέδωσε η ευρωπαϊκή επιτροπή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) σχετικά με το ελαιόλαδο, εάν ένα ελαιόλαδο δύναται να πιστοποιεί την περιεκτικότητά του σε υδροξυτυροσόλη και παράγωγά της με κάποιο τρόπο, έχει τη δυνατότητα να το αναγράφει στην ετικέτα του, προκειμένου αυτό να μπορεί να καταναλωθεί ως έλαιο με ένδειξη για την προστασία της υγείας.

Συγκεκριμένα η οδηγία της Ε.Ε αναφέρει τα εξής:

- ✓ **«Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου συνεισφέρουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από την οξειδωση»** [*Olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress*]
- ✓ **«Ο ισχυρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ελαιόλαδο το οποίο περιέχει τουλάχιστον 5 mg υδροξυτυροσόλης και τα παράγωγά της (π.χ. σύμπλεγμα ελευρωπαΐνης και τυροσόλης) για κάθε 20 γραμμάρια ελαιόλαδου. Προκειμένου να φέρει αυτόν τον ισχυρισμό, θα πρέπει να παρέχεται στον καταναλωτή η πληροφορία ότι το ωφέλιμο αποτέλεσμα αποκτάται από την ημερήσια πρόσληψη 20 γραμμάρων ελαιόλαδου».** [*The claim may be used only for olive oil which contains at least 5 mg of hydroxytyrosol and its derivatives (e.g. oleuropein complex and tyrosol) per 20 g of olive oil. In order to bear the claim information shall be given to the consumer that the beneficial effect is obtained with a daily intake of 20 g of olive oil.*]

Η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, η ποικιλία της ελιάς και το στάδιο ωρίμανσής της, οι συνθήκες που παράγεται το ελαιόλαδο στο ελαιοτριβείο (θερμοκρασία, προσθήκη η μη νερού) κ.λπ.

Κατά καιρούς έχουν δημοσιευτεί αρκετές ερευνητικές εργασίες όσον αφορά τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου και ιδιαίτερα της ελαιοκανθάλης, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριό μας όμως, αποδείχτηκε **η αστάθεια που εμφανίζουν οι ουσίες αυτές όταν έρχονται σε επαφή με διάφορους διαλύτες, όπως το νερό και η μεθανόλη**, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην HPLC. Για αυτό τον λόγο, κρίθηκε σκόπιμη και αναγκαία η ανάπτυξη μιας νέας πρωτότυπης μεθόδου, όπου δε θα χρησιμοποιούνταν διαλύτες που επηρέαζαν τις ουσίες με οποιοδήποτε τρόπο. Για όλους αυτούς τους λόγους, η μέθοδος που αναπτύχθηκε στηρίχθηκε στη Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ ), όπου χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες που δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα των ουσιών που μελετήθηκαν.

Αναπτύχθηκε λοιπόν μια νέα, αξιόπιστη και πλήρως επαναλήψιμη μέθοδος η οποία επιτρέπει τον ποιοτικό, αλλά πλέον και τον ποσοτικό προσδιορισμό, τεσσάρων σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο και συγκεκριμένα της ελαιοκανθάλης, της ελαιασίνης, της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης με Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ ).

## **6 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**

### **6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Αρχικά επιχειρήθηκε η απομόνωση βιοδραστικών ουσιών από δείγματα ελαιόλαδου. Οι ουσίες που παρελήφθησαν, μελετήθηκαν περαιτέρω με ποικίλες τεχνικές ώστε να ταυτοποιηθεί η δομή τους και να εξασφαλιστεί ότι έχουν τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα, ώστε να μπορούν χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπες ουσίες κατά την επικείμενη ποσοτικοποίηση.

### **6.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ**

#### **6.2.1 Οργανολογία**

Στην παρούσα ερευνητική εργασία για την παραλαβή των φαινολικών ουσιών από το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

- **Εκχύλιση με διάφορους διαλύτες**

- Κυκλοεξάνιο
- Ακετονιτρίλιο

- **Φυγοκέντρηση**

Ο διαχωρισμός των στιβάδων ακετονιτριλίου και κυκλοεξανίου, που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους, έγινε στις 4000 rpm/ 5 min με χρήση της συσκευής Heraus Multifuge 3S Centrifuge. Η λειτουργία της συσκευής βασίζεται στην ανάπτυξη φυγόκεντρου δύναμης η οποία οδηγεί στο διαχωρισμό.

#### **6.2.2 Εκχύλιση ελαιόλαδου για παραλαβή φαινολικών συστατικών**

Ένας από τους κύριους στόχους της έρευνας, ήταν η μελέτη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου. Καθώς το ελαιόλαδο αποτελεί ένα πολύπλοκο μίγμα πολλών ουσιών με κυρίαρχα συστατικά λιπαρής φύσεως, διαπιστώθηκε μια ιδιαίτερη δυσκολία στην απομόνωση και παρατήρηση των φαινολικών συστατικών του γιατί περιέχονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες μέσα στο ελαιόλαδο. Κρίθηκε απαραίτητο λοιπόν να προηγηθεί η απολίπανσή του, ώστε να απαλλαχτεί από τα λιπαρά συστατικά του. Με αυτόν τον τρόπο συνεπώς, διευκολύνεται η απόδοση του χημικού



προφίλ του εκάστοτε ελαιόλαδου και η ανίχνευση των ουσιών που περιέχει τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο.

Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή της μεθόδου υγρής-υγρής εκχύλισης που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του εκχυλίσματος του ελαιόλαδου:

- Σε μια κωνική φιάλη 100 ml τοποθετούνται 5g ελαιόλαδου
- Προσθήκη 20 ml κυκλοεξάνιου
- Ανάδευση για 1 min
- Προσθήκη 25 ml ακετονιτριλίου
- Ανάδευση για 1 min
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5 min
- Απομόνωση 25 ml από την υπερκείμενη στιβάδα του ακετονιτριλίου και ανάμιξη με 1.0 ml διαλύματος συριγγαλδεΐδης συγκέντρωσης (0.5 mg/mL) σε ακετονιτρίλιο
- Εξάτμιση υπό κενό (Buchi rotary evaporator)  
(Karkoula E. et al., 2012)

Η διαδικασία που περιγράφηκε είναι ενδεικτική για 5 g ελαιόλαδου. Στην περίπτωση που κρίνεται απαραίτητη η κατεργασία περισσότερης ποσότητας ελαιόλαδου, οι ποσότητες των διαλυτών προσαρμόζονται κατάλληλα κατά περίπτωση, με τήρηση των αναφερόμενων αναλογιών.

### **6.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗΛΗΣ ΜΕ ΓΕΛΗ ΠΥΡΙΤΙΟΥ (SILICA GEL) ΥΠΟ ΧΑΜΗΛΗ ΠΙΕΣΗ**

#### **6.3.1 Οργανολογία**

Στην παρούσα ερευνητική εργασία για τον ποιοτικό έλεγχο των μεταβολιτών που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

- ✓ **Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)** σε υάλινες πλάκες και σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck). Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν ως προς την απορρόφηση με έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία σε μήκη κύματος 254 και 365 nm και στη συνέχεια ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό φως.

Η ποσοτική παραλαβή των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τις παρακάτω περιγραφόμενες μεθόδους:

- ✓ **Υγρή χρωματογραφία στήλης (LC) υπό χαμηλή πίεση (300 mbar)**. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (Silica gel) διαμέτρου 0.04-0.06 mm (flash) και ως κινητή φάση επίσης οργανικοί διαλύτες κατάλληλης κατά περίπτωση πολικότητας.
- ✓ **Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC)** σε υάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων αυτών επιλέχθηκαν μίγματα οργανικών διαλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες μετά από έλεγχο σε απλές πλάκες TLC.
- ✓ **Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)**. Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου <sup>1</sup>H-NMR πραγματοποιήθηκε σε συσκευή NMR Bruker 600 και 400 MHz. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για λήψη φασμάτων ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl<sub>3</sub>. Τέλος, η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως: s = απλή, d = διπλή, t = τριπλή, q = τετραπλή, dd = διπλή διπλών και m = πολλαπλή.

### 6.3.2 Παραγωγή ολικού εκχυλίσματος προς χρωματογράφηση

Για τη διαδικασία της χρωματογραφίας στήλης με γέλη πυριτίου (silica gel) υπό χαμηλή πίεση, χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα που προέκυψε από 500 g ελαιόλαδο μετά την κατεργασία του με την τεχνική υγρής - υγρής εκχύλισης με σύστημα διαλυτών κυκλοεξάνιο : ακετονιτρίλιο σε αναλογία (4:5) όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Η εκχύλιση έλαβε χώρα σταδιακά, χρησιμοποιώντας 100 g ελαιόλαδο τη φορά. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 400 ml κυκλοεξάνιο και 500 ml ακετονιτρίλιο τα οποία ανακυκλώνονταν κατόπιν συμπύκνωσης και επαναχρησιμοποιούνταν.

Στο ολικό εκχύλισμα που προέκυψε, προχωρήσαμε σε μία επιπλέον εκχύλιση με 20 ml κυκλοεξάνιο και 25 ml ακετονιτρίλιο ώστε να επιτευχθεί η τελική απολίπανσή του. Ο λόγος που κρίθηκε απαραίτητη αυτή η ενέργεια ήταν ο εξής: επειδή οι δύο διαλύτες αναμιγνύονται ως ένα βαθμό, το τελικό ακετονιτριλιακό εκχύλισμα που προέκυψε από τα 500 g ελαιόλαδο περιείχε μια μικρή ποσότητα λιπαρών συστατικών που δυσχέραιναν την περαιτέρω κατεργασία του, συνεπώς η απολίπανση ήταν αναγκαία.

Το ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε, τα χαρακτηριστικά του οποίου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, επιλέχθηκε μεταξύ άλλων λόγω υψηλής βιολογικής αξίας αλλά και πλούσιου μεταβολικού προφίλ.

<b>ΠΟΙΚΙΛΙΑ:</b>	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
<b>ΠΕΡΙΟΧΗ:</b>	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
<b>ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ:</b>	ΜΠΑΛΤΟΠΟΥΛΟΣ Γ.
<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ:</b>	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011
<b>ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ:</b>	ΨΥΧΡΗ ΕΚΘΛΙΨΗ

**Πίνακας 5:** Χαρακτηριστικά ελαιόλαδου που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση βιοδραστικών μεταβολιτών

### 6.3.3 Χρωματογραφική στήλη No 1

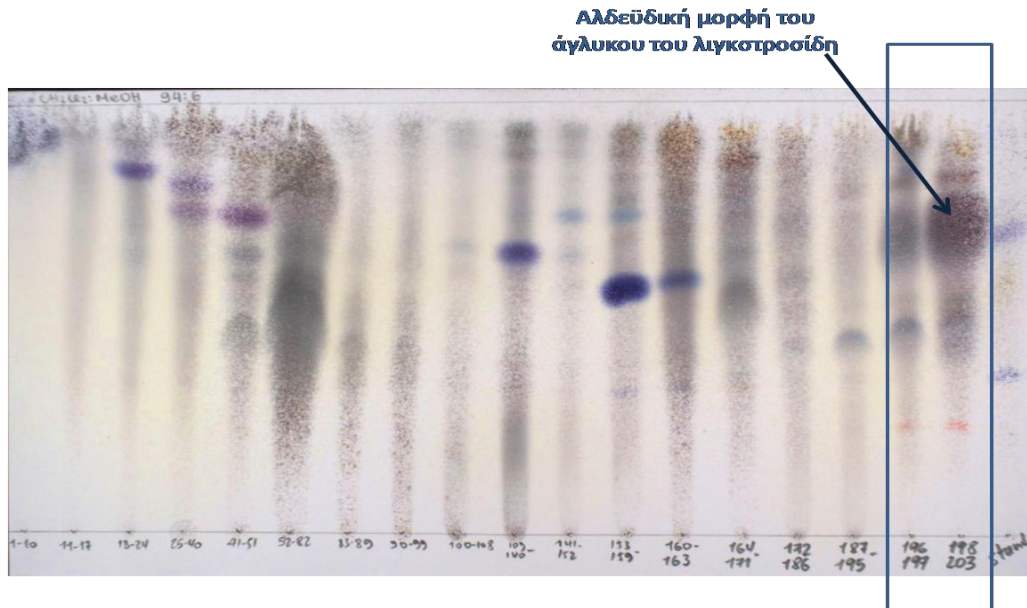
Από την κατεργασία των 500 g ελαιόλαδου προέκυψαν 880 mg εκχυλίσματος. Όλη η ποσότητα του εκχυλίσματος υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (με διάμετρο 2,5 cm) με γέλη πυριτίου (silica gel) υπό χαμηλή πίεση ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των ουσιών που περιέχονται μέσα στο ελαιόλαδο. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας (c-Hexane – EtOAc) ξεκινώντας από 100% c-Hexane και καταλήγοντας σε 100% EtOAc. Παρελήφθησαν κλάσματα των 20-50-100 ml κατά περίπτωση, τα οποία εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Ακολούθησαν συνενώσεις των κλασμάτων που εμφάνιζαν παρόμοιο χημικό προφίλ και εν τέλει προέκυψαν 46 τελικά κλάσματα τα οποία ελέγχθηκαν με συγκεντρωτικές TLC σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH) 94:6.

ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ cHex : EtOAc	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (mg)	
<b>1-10</b>	100 % cHex	62,5	
<b>11-17</b>	95 cHex: 5 EtOAc	1,2	

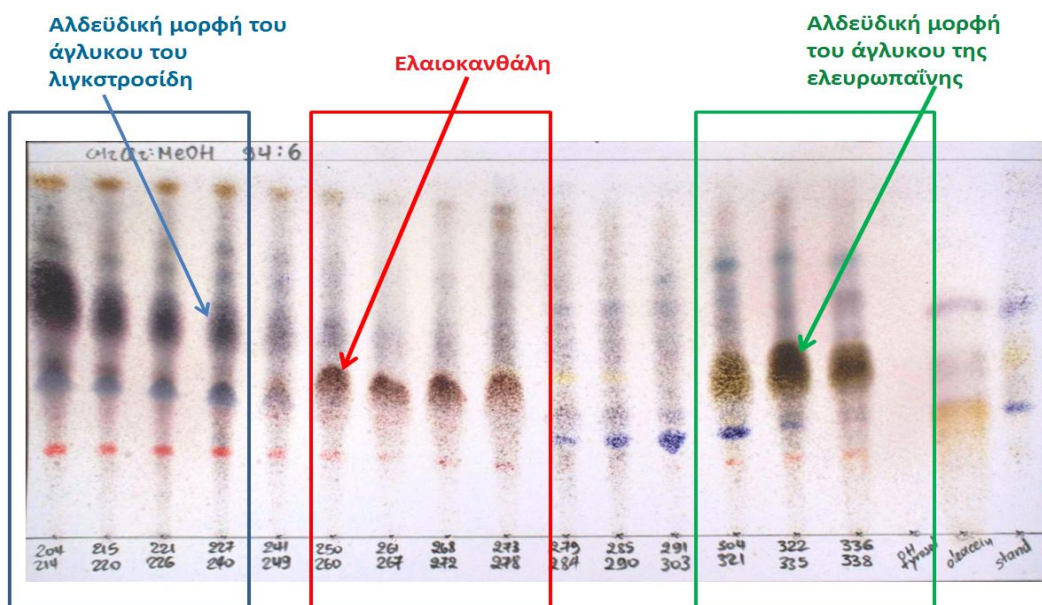
<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ cHex : EtOAc</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΑ (mg)</b>	
<b>18-24</b>	95 cHex: 5 EtOAc	3,8	
<b>25-40</b>	90 cHex: 10 EtOAc	9,5	
<b>41-51</b>	90 cHex: 10 EtOAc	22,0	
<b>52-82</b>	90 cHex: 10 EtOAc	45,9	
<b>83-89</b>	90 cHex: 10 EtOAc	4,0	
<b>90-99</b>	90 cHex: 10 EtOAc	4,1	
<b>100-108</b>	90 cHex: 10 EtOAc	2,3	
<b>109-140</b>	90 cHex: 10 EtOAc	6,6	
<b>141-152</b>	90 cHex: 10 EtOAc	1,5	
<b>153-155</b>	88 cHex: 12 EtOAc	6,4	
<b>156</b>	85 cHex: 15 EtOAc		
<b>157-159</b>	80 cHex: 20 EtOAc		
<b>160-163</b>	80 cHex: 20 EtOAc	14,3	
<b>164-171</b>	80 cHex: 20 EtOAc	8,1	
<b>172-186</b>	80 cHex: 20 EtOAc	3,4	
<b>187-195</b>	80 cHex: 20 EtOAc	2,4	
<b>196-197</b>	80 cHex: 20 EtOAc	6,3	<b>Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκοτροσίδη</b>
<b>198-203</b>	80 cHex: 20 EtOAc	34,7	
<b>204-214</b>	80 cHex: 20 EtOAc	16,3	
<b>215-220</b>	80 cHex: 20 EtOAc	4,3	
<b>221-226</b>	80 cHex: 20 EtOAc	4,4	
<b>227-240</b>	80 cHex: 20 EtOAc	7,4	
<b>241-249</b>	80 cHex: 20 EtOAc	6,8	
<b>250-260</b>	80 cHex: 20 EtOAc	12,9	<b>Ελαιοκανθάλη</b>
<b>261-267</b>	80 cHex: 20 EtOAc	9,1	
<b>268-272</b>	80 cHex: 20 EtOAc	6,3	
<b>273-278</b>	80 cHex: 20 EtOAc	17,5	
<b>279-284</b>	80 cHex: 20 EtOAc	4,0	
<b>285-290</b>	75 cHex: 25 EtOAc	4,6	
<b>291-303</b>	75 cHex: 25 EtOAc	6,7	

ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ cHex : EtOAc	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (mg)	
<b>304-321</b>	75 cHex: 25 EtOAc	18,5	<b>Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης</b>
<b>322-335</b>	75 cHex: 25 EtOAc	17,7	
<b>336-338</b>	75 cHex: 25 EtOAc	29,8	
<b>339-340</b>	75 cHex: 25 EtOAc	7,9	
<b>341-344</b>	50 cHex: 50 EtOAc	4,7	
<b>345-350</b>	50 cHex: 50 EtOAc	30,5	
<b>351-353</b>	50 cHex: 50 EtOAc	7,9	<b>Ελαιασίνη</b>
<b>354-356</b>	50 cHex: 50 EtOAc	6,6	
<b>357-359</b>	50 cHex: 50 EtOAc	5,0	
<b>360-362</b>	100 % EtOAc	7,8	
<b>363-365</b>	100 % EtOAc	16,6	
<b>366-368</b>	100 % EtOAc	7,2	
<b>369-374</b>	100 % EtOAc	8,6	
<b>375</b>	100% Acetone	3,3	
<b>376</b>	100% Acetone	13,4	
<b>377</b>	100% Acetone	10,3	

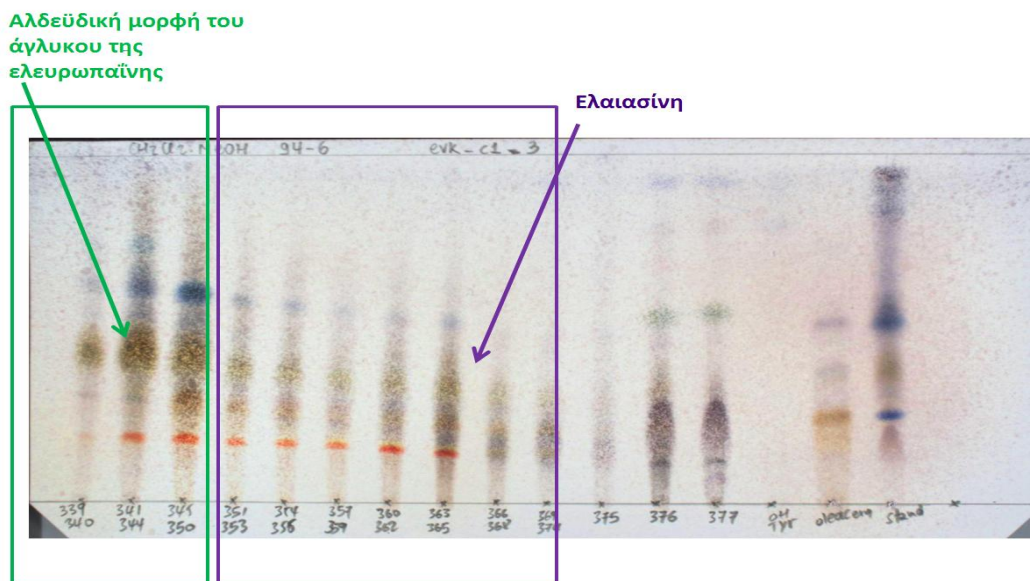
**Πίνακας 6:** Σχηματική λεπτομερής απεικόνιση της χρωματογραφικής στήλης Νο 1



**Εικόνα 6:** Συγκεντρωτική TLC χρωματογραφικής στήλης 1 , Κλάσματα 1–203 σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  –  $\text{MeOH}$ ) 94:6



**Εικόνα 7:** Συγκεντρωτική TLC χρωματογραφικής στήλης 1 , κλάσματα 204–338 σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  –  $\text{MeOH}$ ) 94:6



**Εικόνα 8:** Συγκεντρωτική TLC χρωματογραφικής στήλης 1 , Κλάσματα 339–377 σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  –  $\text{MeOH}$ ) 94:6

### 6.3.4 Επεξεργασία κλασμάτων της χρωματογραφικής στήλης No 1 – Απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων

Τα κλάσματα που προέκυψαν από τη στήλη 1 υπεβλήθησαν σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (preparative TLC) προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση ουσιών που περιέχονται μέσα στο ελαιόλαδο. Όπως φάνηκε πολύ χαρακτηριστικά από την προηγούμενη εξέταση των κλασμάτων με TLC, κάθε κλάσμα περιείχε κατά κύριο λόγο μια ουσία σε μεγαλύτερη ποσότητα και συνοδευόταν από άλλες σε μικρότερη αναλογία.

Αρχικά έγινε ένας πρώτος έλεγχος ορισμένων κλασμάτων με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού όπου διαπιστώθηκε η ύπαρξη συγκεκριμένων μορίων που βρίσκονταν στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Στη συνέχεια ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες preparative TLC ώστε να διαχωριστούν πλήρως οι ουσίες μεταξύ τους.

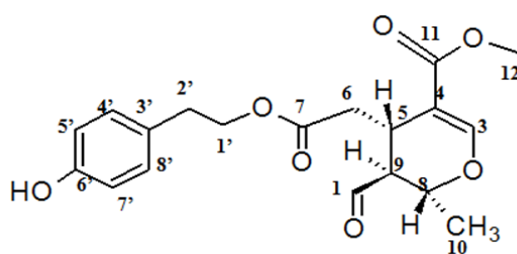
#### 6.3.4.1 Preparative TLC A και B – Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του Λιγκστροσίδη

Στα κλάσματα της στήλης 196–240 παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας ουσίας η οποία απορροφούσε στο υπεριώδες (254 nm) και μετά τον ψεκασμό της με διάλυμα

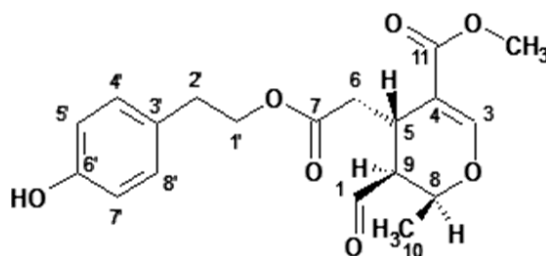
θειικής βανιλίνης χρωματιζόταν σκούρο μπλε. Κατόπιν ανάλυσης με φασματοσκοπία NMR διαπιστώθηκε πως πρόκειται για την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη. Η ουσία απαλλάχθηκε από προσμίξεις με preparative TLC σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH) 94:6.

Από προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριό μας είχε διαπιστωθεί πως, ουσίες με παρόμοια δομή και χαρακτηριστικά με την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη, επηρεάζονταν ή ακόμη και καταστρέφονταν, όταν έρχονταν σε επαφή με διαλύτες σαν τη μεθανόλη και το νερό. Κρίθηκε σκόπιμο λοιπόν να μελετηθεί η συμπεριφορά και της ουσίας αυτής και σε ένα άλλο σύστημα διαλυτών, ώστε να παρατηρηθούν τυχόν υπάρχουσες διαφορές μεταξύ των προϊόντων που προκύπτουν και στις δύο περιπτώσεις. Ως εκ τούτου, δοκιμάστηκε και το σύστημα κυκλοεξάνιο – οξικός αιθυλεστέρας (cHexane – EtOAc) 40:60 ώστε να μελετηθεί τυχόν αλληλεπίδραση.

Στη συνέχεια έγινε λήψη του φάσματος NMR των ουσιών που προέκυψαν και από τις δύο preparative TLC ξεχωριστά και διαπιστώθηκε πως είχε γίνει ισομερίωση της επικρατούσας μορφής (5S, 8R, 9S) σε ποσοστό 25% προς το ισομερές (5S, 8S, 9S) και στις δύο περιπτώσεις. Τα δύο ισομερή της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη εμφανίζονται ως μια ουσία στην TLC και δε διαχωρίζονταν περαιτέρω. (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. κεφ. 7)



(5S, 8R, 9S)



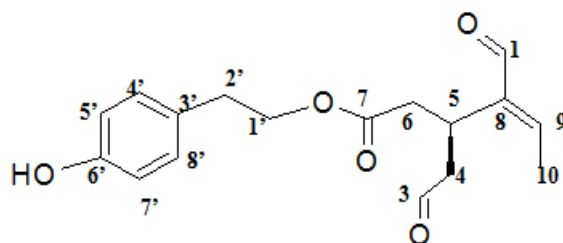
(5S, 8S, 9S)

**Εικόνα 9:** Ισομερή της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη



#### 6.3.4.2 Preparative TLC C – Ελαιοκανθάλη

Στα κλάσματα της στήλης 250 – 278 παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας ουσίας η οποία απορροφούσε στο υπεριώδες (254 nm) και μετά τον ψεκασμό της με διάλυμα θειικής βανιλίνης χρωματιζόταν κόκκινη. Κατόπιν ανάλυσης με φασματοσκοπία NMR, διαπιστώθηκε πως πρόκειται για τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα ή αλλιώς ελαιοκανθάλη. Η ουσία απαλλάχθηκε από προσμίξεις με preparative TLC κανονικής φάσης, σε σύστημα διαλυτών κυκλοεξάνιο – οξικός αιθυλεστέρας (cHexane – EtOAc) 40:60 + 50 στυ. φορμικό οξύ. Πραγματοποιήθηκε επίσης δοκιμή καθαρισμού σε αυτό το σύστημα διαλυτών χωρίς την προσθήκη φορμικού οξέος αλλά η διαχωριστική ικανότητα μειώθηκε αρκετά και έτσι το σύστημα αυτό απορρίφθηκε.

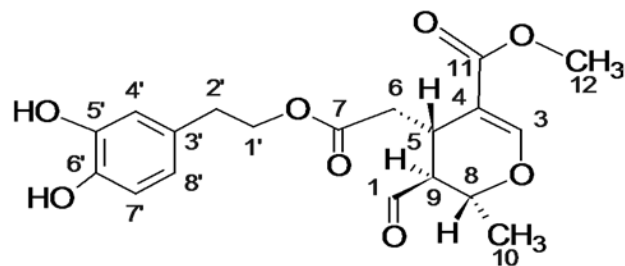


Εικόνα 10: Ελαιοκανθάλη

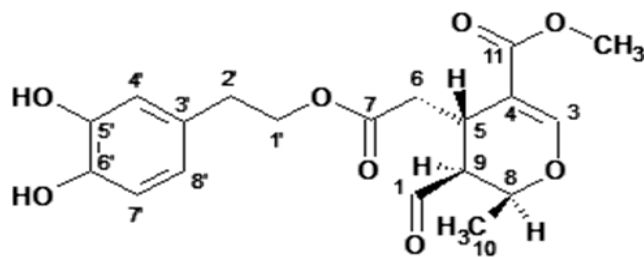
#### 6.3.4.3 Preparative TLC D και F – Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της Ελευρωπαΐνης

Στα κλάσματα της στήλης 304 – 350 παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας ουσίας η οποία απορροφούσε στο υπεριώδες (254 nm) και μετά τον ψεκασμό της με διάλυμα θειικής βανιλίνης χρωματιζόταν κίτρινη. Κατόπιν ανάλυσης με φασματοσκοπία NMR, διαπιστώθηκε πως πρόκειται για την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης. Η ουσία απαλλάχθηκε από προσμίξεις με preparative TLC κανονικής φάσης, σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας – κυκλοεξάνιο – διχλωρομεθάνιο (EtOAc – cHexane – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 60:20:20.

Κατά τη φασματοσκοπική ανάλυση της απομονωθείσας ουσίας παρατηρήθηκε επίσης ισομερίωση της επικρατούσας μορφής (5S, 8R, 9S) σε ποσοστό 25% προς το ισομερές (5S, 8S, 9S) όπως και στην αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη. Τα δύο ισομερή εμφανίζονται εξίσου ως μια ουσία στην TLC και δε διαχωρίζονταν περαιτέρω.



(5S, 8R, 9S)

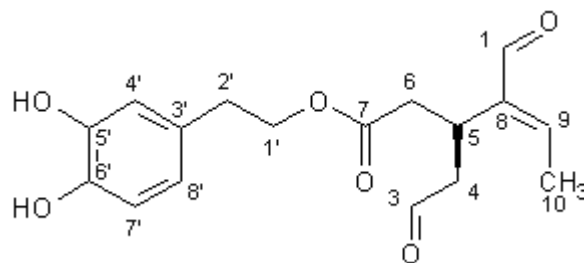


(5S, 8S, 9S)

**Εικόνα 11:** Ισομερή της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης

#### 6.3.4.4 Preparative TLC G και H – Ελαιασίνη

Στα κλάσματα της στήλης 351 – 374 παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας ουσίας η οποία απορροφούσε στο υπεριώδες (254 nm) και μετά τον ψεκασμό της με διάλυμα θειικής βανιλίνης χρωματιζόταν κόκκινη. Κατόπιν ανάλυσης με φασματοσκοπία NMR, διαπιστώθηκε πως πρόκειται για τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα ή αλλιώς ελαιασίνη. Η ουσία απαλλάχθηκε από προσμίξεις με preparative TLC αντίστροφης φάσης, σε σύστημα διαλυτών νερό – ακετονιτρίλιο (H<sub>2</sub>O – ACN) 50:50.



**Εικόνα 12:** Ελαιασίνη

## **7 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΙΣΟΜΕΡΩΝ ΤΗΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ**

Δύο από τις κυριότερες ουσίες του ελαιόλαδου που απομονώθηκαν από τη στήλη 1 ήταν η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσιδίου. Οι ουσίες αυτές είναι ανιχνεύσιμες και στο ολικό εκχύλισμα του ελαιόλαδου, μετά την απολίπανσή του με τη διαδικασία της υγρής – υγρής εκχύλισης. Καθώς πρόκειται για αλδεϋδικές μορφές, εμφανίζουν δύο ξεκάθαρες, πολύ χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα πρωτονίου NMR στα 9,52 ppm και 9,51 ppm αντίστοιχα.

Κατά την επεξεργασία του εκχυλίσματος του ελαιόλαδου με τη διαδικασία της στήλης, πραγματοποιήθηκε συνεχής έλεγχος των κλασμάτων που λαμβάνονταν, τόσο με TLC όσο και με φάσματα  $^1\text{H}$  – NMR. Διαπιστώθηκε ότι στα φάσματα και των δύο άγλυκων, δίπλα στις πραγματικές κορυφές των μορίων, εμφανίζονταν οι ίδιες κορυφές ελαφρά μετατοπισμένες. Εξήχθη λοιπόν το συμπέρασμα πως οι ουσίες έχουν ισομεριωθεί κατά ένα ποσοστό 25%, όπως αυτό φάνηκε από την αναλογία της ολοκλήρωσης των δύο κορυφών, της ουσίας και του ισομερούς της.

Έχοντας ως βάση το φάσμα του ολικού εκχυλίσματος πριν το υποβάλλουμε στη διαδικασία της στήλης και αντιπαραβάλλοντάς το με το φάσμα των απομονωθέντων ουσιών, διαπιστώθηκε πως τα ισομερή βρίσκονται και στο αρχικό εκχύλισμα του ελαιόλαδου, αλλά σε πολύ μικρότερη αναλογία, γεγονός που ενισχύει την άποψη πως τα ισομερή δημιουργούνται κατά την επαφή της ουσίας με τη γέλη πυριτίου της στήλης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα, αλλάζοντας τις συνθήκες κατεργασίας του εκχυλίσματος κάθε φορά, ώστε να διαπιστωθεί τι είναι αυτό που επιδρά στις ουσίες και προκαλεί την ισομερίωσή τους.

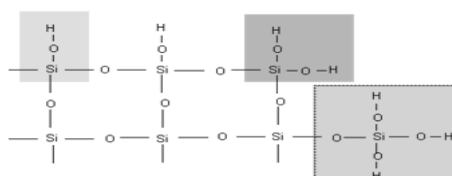
### **7.1 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΓΕΛΗ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ**

Στην παρούσα φάση έγινε μια προσπάθεια προσομοίωσης των συνθηκών που επικρατούν σε μια στήλη αλλά σε μικρότερη κλίμακα. Πραγματοποιήθηκε κατεργασία μικρής ποσότητας ακετονιτριλιακού εκχυλίσματος ελαιόλαδου με γέλη πυριτίου κανονικής και αντίστροφης φάσης σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών και παρατηρήθηκε τόσο η συμπεριφορά των ουσιών, όσο και η πιθανή αλληλεπίδρασή τους με τη γέλη.

## 7.1.1 Γέλη πυριτίου

### 7.1.1.1 Κανονική φάση

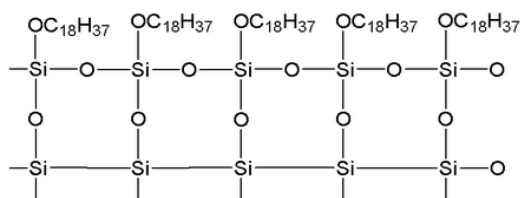
Η μήτρα των πρωτογενών σωματιδίων γέλης πυριτίου αποτελείται από έναν πυρήνα ατόμων πυριτίου τα οποία ενώνονται με άτομα οξυγόνου κατ εναλλαγή (πυριτίο – οξυγόνο – πυριτίο). Στην επιφάνεια κάθε πρωτογενούς σωματιδίου, παραμένουν κάποιες υπολειμματικές υδροξυλομάδες από το αρχικό πολυμερές πυριτικό οξύ, οι οποίες προσδίδουν στη γέλη πυριτίου τις πολικές ιδιότητές της. Η επιφάνεια πυριτίου είναι αρκετά περίπλοκη και περιέχει περισσότερα από ένα είδη υδροξυλίου, ισχυρά συνδεδεμένα ή «χημικά» προσροφημένα» μόρια νερού και ασθενώς συνδεδεμένα ή «φυσικώς προσροφημένα» μόρια νερού. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ομάδων υδροξυλίου. Η πρώτη περιλαμβάνει ένα υδροξύλιο προσαρτημένο σε ένα άτομο πυριτίου, το οποίο έχει τρεις δεσμούς με οξυγόνο με τους οποίους ενώνεται με τη μήτρα της γέλης. Στη δεύτερη υπάρχουν δύο ομάδες υδροξυλίου που συνδέονται με το ίδιο άτομο πυριτίου το οποίο, με τη σειρά του, συνδέεται με τη μήτρα με δύο δεσμούς με οξυγόνο. Στην τρίτη κατηγορία το κεντρικό άτομο πυριτίου φέρει τρία υδροξύλια και συνδέεται με τη μήτρα με έναν μόνο δεσμό με οξυγόνο.



**Εικόνα 13:** Γέλη πυριτίου κανονικής φάσης

### 7.1.1.2 Αντίστροφη φάση

Στην περίπτωση της γέλης πυριτίου αντίστροφης φάσης, πραγματοποιείται μια αντίδραση των σωματιδίων της γέλης κανονικής φάσης με κάποιους υδρογονάνθρακες μακριάς αλυσίδας. Η άπολη στιβάδα συνδέεται χημικά με το διοξείδιο του πυριτίου των σωματιδίων της επιφανείας της στατικής φάσης, καθιστώντας την έτσι λιγότερο πολική ή μη πολική. Συνήθως για αυτή την κατεργασία χρησιμοποιούνται αλυσίδες με 8 ή 18 άτομα άνθρακα (C8 ή C18).



**Εικόνα 14:** Γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης

### 7.1.2 Κατεργασία εκχυλίσματος ελαιόλαδου με γέλη πυριτίου

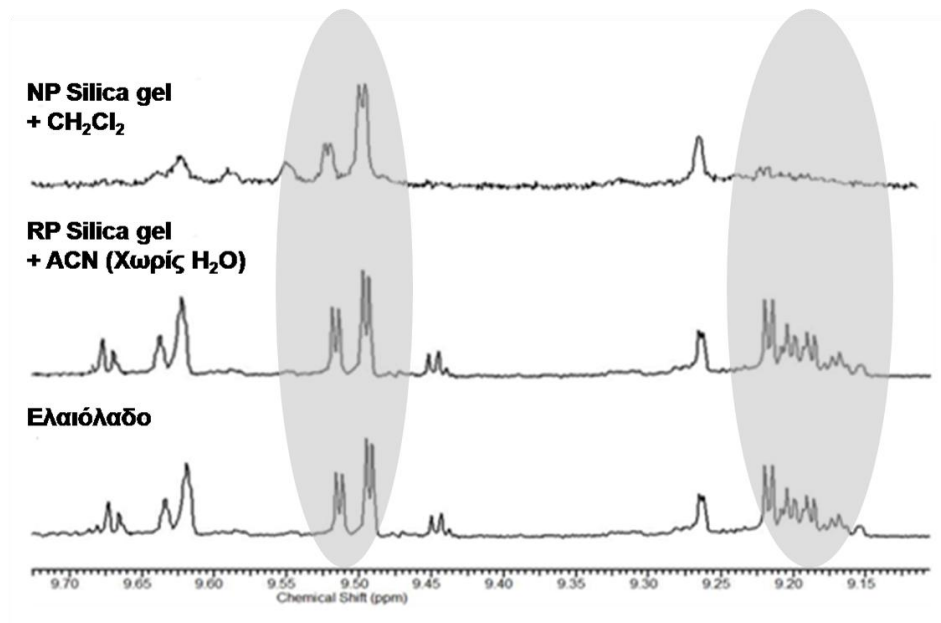
Οι ουσίες που περιέχονται στο ελαιόλαδο έχουν μια συγκεκριμένη ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τη γέλη πυριτίου, άλλες περισσότερο και άλλες λιγότερο. Επίσης, λόγω της πολυπλοκότητας του εκχυλίσματος, η συγγένεια της κάθε μιας ουσίας με τη στατική φάση είναι διαφορετική. Επιχειρήθηκε λοιπόν να προσδιοριστεί ο βαθμός με τον οποίο επηρεάζεται η κάθε ουσία από την εκάστοτε γέλη πυριτίου.

Επιλέχθηκε ένα ήδη μελετημένο εκχύλισμα ελαιόλαδου όπως προέκυψε μετά από κατεργασία με cHex-ACN, το οποίο ήταν αρκετά πλούσιο στις ουσίες ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη όπως αποδεικνύεται και από το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .

Το εκχύλισμα αυτό χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη. Στο πρώτο μέρος έγινε προσθήκη μικρής ποσότητας στερεής γέλης πυριτίου κανονικής φάσης και ακολούθησε διάλυση σε διχλωρομεθάνιο. Στο δεύτερο μέρος προστέθηκε γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και διαλύτης ακετονιτρίλιο. Τα διαλύματα αφέθηκαν για ένα βράδυ και τη επόμενη ημέρα ακολούθησε διήθηση, ώστε να απομακρυνθεί η γέλη και να μελετηθεί η συμπεριφορά των ουσιών στο εκχύλισμα.

Παρατηρήθηκε λοιπόν, πως οι ουσίες ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη επηρεάζονται κατά την παρατεταμένη επαφή τους με τη γέλη πυριτίου κανονικής φάσης σε πολύ μεγάλο βαθμό. Αντίθετα, κατά την επαφή των ουσιών αυτών με τη γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης δε φαίνεται να υπάρχει κάποια ιδιαίτερη αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, όπως απεικονίζεται στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  που ακολουθεί, η ποσότητα των δύο ουσιών μειώνεται αισθητά στην περίπτωση της NP γέλης και παρατηρείται απώλεια των ουσιών.

Όσον αφορά την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη και την ενδεχόμενη ισομερίωσή τους, δε φάνηκε να παρατηρείται καμία αξιοσημείωτη μεταβολή στις κορυφές του φάσματος ανάμεσα στο αρχικό εκχύλισμα και σε αυτό που ήρθε σε επαφή με τη γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης. Αντίθετα, σε αυτό που κατεργάστηκε με γέλη πυριτίου κανονικής φάσης, φάνηκε να αυξάνεται η αναλογία μεταξύ της ουσίας και του ισομερούς της.



**Εικόνα 15:** Επίδραση της γέλης πυριτίου κανονικής και αντίστροφης φάσης στις αλδεϊδικές ουσίες του ελαιόλαδου

Έτσι λοιπόν, εξήχθη το αρχικό συμπέρασμα πως, η γέλη πυριτίου κανονικής φάσης λόγω των πολικών ομάδων που διαθέτει, προκαλεί ανεπανόρθωτη ζημιά στις ουσίες του ελαιόλαδου που μελετώνται. Η παρατεταμένη επαφή των ουσιών με τη γέλη πυριτίου-NP οδηγεί σε αποικοδόμησή τους κατά μεγάλο ποσοστό, με αποτέλεσμα την αισθητή μείωση της ποσότητάς τους. Ως εκ τούτου ο ποσοτικός προσδιορισμός τους με χρήση αυτής της τεχνικής ανάλυσης καθίσταται αδύνατος. Παρ' όλα αυτά, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έχει γίνει χρήση της γέλης πυριτίου κανονικής φάσης για απομόνωση και διαχωρισμό των ουσιών αυτών λαμβάνοντας όμως υπ' όψιν, απαραίτητως, την απώλεια σημαντικής ποσότητας σε κάθε περίπτωση.

Αντιθέτως, η γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης φαίνεται να μην προκαλεί κάποια αλλοίωση στις ουσίες οπότε κρίνεται σαν καταλληλότερη τεχνική ανάλυσης στην παρούσα φάση.

## 7.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Στο ολικό εκχύλισμα ελαιόλαδου ποικιλίας Κορωνέικη από τη Μεσσηνία το οποίο ήταν αρκετά πλούσιο και στις τέσσερις κύριες ουσίες, ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη και αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη, έγινε δοκιμή διαχωρισμού των κύριων συστατικών του με preparative TLC. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε preparative TLC αντίστροφης φάσης, καθώς αποδείχτηκε σε προηγούμενο στάδιο πως οι ουσίες που μελετώνται είναι σταθερές κατά την επαφή τους με γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και διαλύτη Ακετονιτρίλιο.

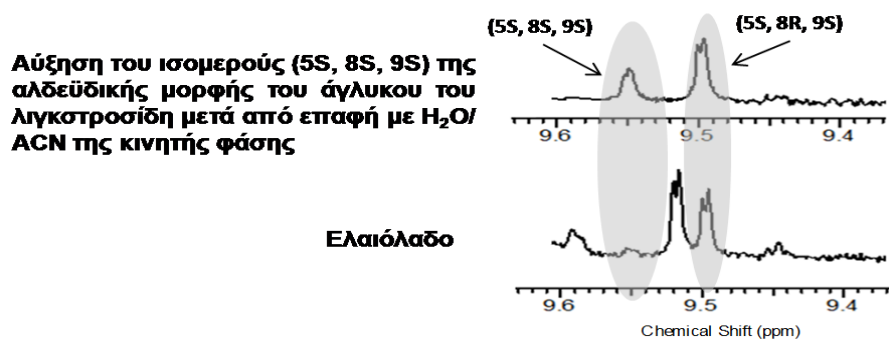
Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 25 mg εκχυλίσματος που προέκυψε από τη γνωστή διαδικασία εκχύλισης του ελαιόλαδου με κυκλοεξάνιο – ακετονιτρίλιο.

Η χρωματογραφία έγινε χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών ανάπτυξης Νερό : Ακετονιτρίλιο 45: 55.

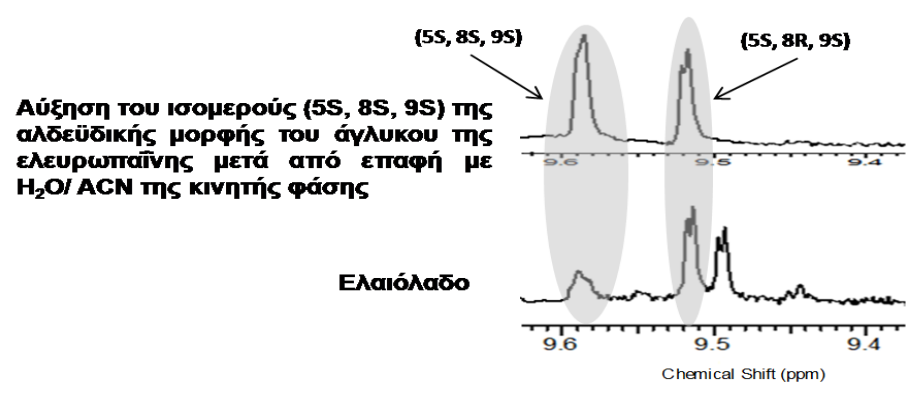
Ακολούθησε διαχωρισμός των ουσιών κατά μήκος της γυάλινης πλάκας και στη συνέχεια απομόνωση και ταυτοποίησή τους. Έγινε παρατήρηση της πλάκας στο υπεριώδες (254 nm), όπου φάνηκε να απορροφούν έντονα τέσσερις ξεκάθαρες ζώνες. Έγινε λοιπόν η υπόθεση πως οι ζώνες αυτές θα μπορούσαν να αντιστοιχούν στις τέσσερις ουσίες που μας ενδιαφέρουν( ελαιασίνη, ελαιοκανθάλη, αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη). Στη συνέχεια ακολούθησε ψεκασμός με διάλυμα θειικής βανιλίνης.

Όπως αποδείχτηκε λοιπόν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  οι ουσίες που απομονώθηκαν ήταν το σκουαλένιο, η ελαιασίνη σε καθαρή μορφή και η ελαιοκανθάλη σε μίγμα με ένα μικρό ποσοστό από τα δύο άγλυκα. Απομονώθηκαν επίσης, η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη σε μίγμα και με άλλες ουσίες, που όμως ήταν σε πολύ μικρότερη αναλογία. Όπως αποδείχτηκε όμως από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και οι δύο ουσίες είχαν ισομεριωθεί κατά 50%, ποσοστό μεγαλύτερο από το 25% της ισομερίωσης που παρατηρήθηκε κατά τη διαδικασία της στήλης.

Βασιζόμενοι σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, όπου μελετήθηκε η συμπεριφορά των ουσιών ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη όταν έρθουν σε επαφή με διάφορους διαλύτες (Σκάντζαρη Α., 2011), εξήχθη το συμπέρασμα πως και τα δύο άγλυκα είναι εξίσου ασταθή με την ελαιασίνη και την ελαιοκανθάλη όταν έρθουν σε επαφή με  $\text{H}_2\text{O}$ . Συνεπώς, η επαφή τους με το  $\text{H}_2\text{O}$  που χρησιμοποιήθηκε στην κινητή φάση της RP –preparative TLC προκάλεσε εν τέλει την ισομερίωσή τους.



**Εικόνα 16:** Ισομερίωση αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκοτροσίδη



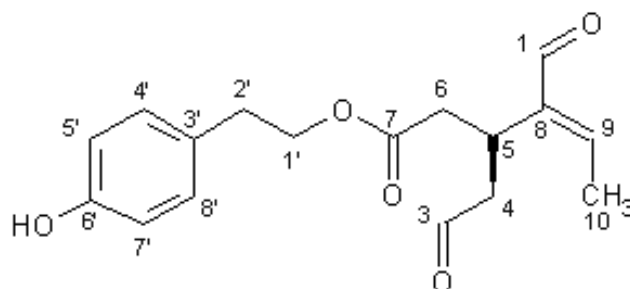
**Εικόνα 17:** Ισομερίωση αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης



## 8 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

### 8.1 ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ

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



**Εικόνα 18:** Χημικός τύπος ελαιοκανθάλης

**MT:** C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>

**[MS (ESI), m/z: 303 (M-H)]**

**[a]<sub>D25</sub> -0.78° (c = 0.9g/ 100ml CDCl<sub>3</sub>)**

Τα στοιχεία αυτά, ήταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Andrewes P. et al., 2003, Owen R. et al., 2000, Montedoro G. et al., 1993).

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR παρατηρούνται τα εξής:

- Μια ευρεία απλή κορυφή στα 9,64 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 3.
- Μια διπλή κορυφή στα 9,24 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 1 (J<sub>1-5</sub>= 2.0 Hz).
- Μια διπλή κορυφή στα 7,05 ppm που ολοκληρώνει για 2 H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 8' και 4'. Έχουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 5' και 7' (J<sub>4'-5'/ 7'-8'</sub>= 8.5 Hz).

- Μια διπλή κορυφή στα 6,77 ppm που ολοκληρώνει για 2 H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 5' και 7'. Έχουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 4' και 8' ( $J_{5'-4'/8'-7'} = 8.5 \text{ Hz}$ ).
- Στα 6,66 ppm εμφανίζεται μια τετραπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 9. Έχει σύζευξη με το H-10 ( $J = 7.1 \text{ Hz}$ ).
- Μια πολλαπλή κορυφή στα 4,22 ppm που ολοκληρώνει για 2 H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1'.
- Στα 3,62 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Έχει σύζευξη με τα H των θέσεων 6, 4 και 1.
- Στα 2,99 ppm και 2,74 ppm εμφανίζονται δυο διπλές- διπλές- διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια, και αντιστοιχούν στα H-4a ( $J_{4a-b} = 18.4 \text{ Hz}$ ,  $J_{4a-5} = 8.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{4a-3} = 1.0 \text{ Hz}$ ) και 4β ( $J_{4b-a} = 18.4 \text{ Hz}$ ,  $J_{4b-5} = 5.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{4b-3} = 2.4 \text{ Hz}$ ).
- Μια τριπλή κορυφή στα 2,83 ppm, η οποία ολοκληρώνει για 2 H ανήκει στα H της θέσης 2'. Εμφανίζει σύζευξη με τα H της θέσης 1' ( $J = 6.8 \text{ Hz}$ ).
- Στα 2,66 ppm έχουμε την πολλαπλή κορυφή του H- 6, η οποία ολοκληρώνει για 2.
- Τέλος, στα 2,08 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή του μεθυλίου της θέσης 10, και η οποία ολοκληρώνει για 3 H και έχει σύζευξη με το H- 9 ( $J = 7.1 \text{ Hz}$ ).

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta$ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta$ ppm, $J$ Hz)
1	200,25	9,24 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )
3	195,09	9,64 (1H, brs)
4a	46,2	2,99 (1H, ddd, $J = 18.4 \text{ Hz}$ , $8.5 \text{ Hz}$ , $1.0 \text{ Hz}$ )
4b		2,74 (1H, ddd, $J = 18.4 \text{ Hz}$ , $5.5 \text{ Hz}$ , $2.4 \text{ Hz}$ )
5	26,97	3,62 (1H, m)
6	36,82	2,66 (2H, m)
7	171,99	-
8	143,39	-
9	153,82	6,66 (1H, q, $J = 7.1 \text{ Hz}$ )
10	15,25	2,08 (3H, d, $J = 7.1 \text{ Hz}$ )
1'	64,72	4,22 (2H, m)

Άτομο	<sup>13</sup> C-NMR (δ ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (δ ppm, J Hz)
2'	34,24	2,83 (2H, t, J= 6.8 Hz)
3'	129,86	-
4', 8'	130,14	7,05 (2H, d, J =8.5 Hz)
5', 7'	115,37	6,77 (2H, d, J =8.5 Hz)
6'	154,0	-

**Πίνακας 7:** Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της ελαιοκανθάλης

### 8.1.1 Βιολογικές ιδιότητες ελαιοκανθάλης

Πρόκειται για τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα (Mateos R. et al., 2004), στην οποία οφείλεται η αίσθηση «πικράδας και καψίματος» στο λαιμό, κυρίως στη βάση της γλώσσας, κατά τη γευστική δοκιμή παρθένων ελαιόλαδων.

Οι φαρμακολογικές της δράσεις είναι οι ακόλουθες:

❖ Δράση κατά της νόσου Alzheimer

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα διαλυτά ολιγομερή του αμυλοειδούς-b1-42 πεπτιδίου, δρουν ως βασική νευροτοξίνη στη νόσο Alzheimer. Κατά συνέπεια, οι ενώσεις που δύνανται να τροποποιήσουν τη δημιουργία των ολιγομερών αυτών (τα οποία αναφέρονται ως ADDLs), μπορεί να έχουν θεραπευτική δράση έναντι της ασθένειας του Alzheimer. Η ελαιοκανθάλη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ικανότητά της να διαταράσσει τον ολιγομερισμό αυτό και να μειώνει την παθογένεια της νόσου, προστατεύοντας ταυτόχρονα τους νευρώνες από τις συναπτοπαθολογικές επιπτώσεις των ADDLs. (Pitt J. et. al., 2009) Η ελαιοκανθάλη επίσης, έχει την ιδιότητα να αναστέλλει το σχηματισμό tau-ινιδίων τροποποιώντας ομοιοπολικά το PHF-6 πεπτίδιο που είναι ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό τους. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε νευροϊνιδιακές εμπλοκές οι οποίες συνδέονται εγγενώς με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer. Οι δυο αλδεϋδες της ελαιοκανθάλης σχηματίζουν σύμπλοκο με την δομική μονάδα της λυσίνης μέσω της αντίδρασης σχηματισμού βάσης Schiff στο PHF6 πεπτίδιο, επηρεάζοντας σημαντικά την συσσωμάτωση των T (tau) πρωτεϊνών στα νευροϊνίδια. (Li W. et al., 2009). Έχει βρεθεί επίσης ότι η ελαιοκανθάλη αλληλεπιδρά με την tau-441 πρωτεΐνη,

προκαλώντας τη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της δευτεροταγούς δομής της, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διαμορφωθεί περαιτέρω. (Monti M.C et al., 2012) Με την εξέταση της δράσης της ελαιοκανθάλης σε καλλιεργημένα κύτταρα, αλλά επίσης και σε εγκεφάλους πειραματόζωων, ανακαλύφθηκε πως η ελαιοκανθάλη έχει τη δυνατότητα να ευοδώνει την απομάκρυνση του αμυλοειδούς-β (Αβ) από τον εγκέφαλο, μέσω αύξησης της έκφρασης και της δραστηριότητας των υποδοχέων της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr) και των LDL λιποπρωτεϊνών, που συνδέονται με τις πρωτεΐνες-1 (LRP1), οι οποίες είναι μεγάλες πρωτεΐνες μεταφοράς Αβ στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Βρέθηκε λοιπόν πως η ελαιοκανθάλη αυξάνει τη δραστηριότητα της P-gr και των LRP1 και κατ' επέκταση αυξάνεται και η απομάκρυνση του Αβ. Με αυτόν τον τρόπο συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα πως, η δυνητική μείωση του κινδύνου εμφάνισης Alzheimer, που σχετίζεται με την κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιόλαδου, θα μπορούσε να οφείλεται στην ενίσχυση της απομάκρυνσης του Αβ από τον εγκέφαλο. (Abuznait A.H., 2013)

#### ❖ Δράση κατά της οστεοαρθρίτιδας

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) είναι μια ασθένεια της οποίας η εξέλιξη χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) κάτι το οποίο συνδέεται με τη χάλαση των χόνδρων των οστών. Πρόσφατα, η ελαιοκανθάλη που απομονώθηκε από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο βρέθηκε να εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση παρόμοια με αυτή της ιβουπροφαΐνης, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική διαχείριση των κοινών φλεγμονωδών νόσων. Η ελαιοκανθάλη και τα παράγωγά της μειώνουν την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτες σύνθεση NO στα κύτταρα των χόνδρων, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η βιωσιμότητα των κυττάρων. Επίσης, η ελαιοκανθάλη παρεμβαίνει στη σύνθεση των προσταγλανδινών, μέσω της ανασταλτικής δράσης που ασκεί στα ένζυμα της κυκλοξυγενάσης. (Cicerale S. et al., 2012) Συνεπώς η ελαιοκανθάλη δυνητικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό όπλο για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών εκφυλιστικών παθήσεων, τόσο στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας όσο και στην οστεοαρθρίτιδα. (Iacono A. et al., 2010)

#### ❖ Αναστολή των ενζύμων της κυκλοξυγενάσης COX-1 και COX-2

Η ελαιοκανθάλη αναστέλλει τα ένζυμα της κυκλοξυγενάσης (cyclooxygenase enzymes) στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των προσταγλανδινών που αποτελούν παράγοντες φλεγμονής. (Iacono A. et al., 2010) Η ελαιοκανθάλη

έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τα ένζυμα της κυκλοξυγενάσης (COX) με έναν δόσοεξαρτώμενο τρόπο, μιμούμενη την αντιφλεγμονώδη δράση της ιβουπροφαίνης. (Beauchamp G.K. et al., 2005) Τα ένζυμα της κυκλοξυγενάσης 1 και 2 (COX 1 και COX 2) είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες και θρομβοξάνια, τα οποία παράγονται ως απόκριση σε φλεγμονώδη ή τοξικά ερεθίσματα. Η κυκλοξυγενάση 1 και 2 μπορεί να είναι επιβλαβής για τον οργανισμό. Ειδικότερα, η COX 2 εμπλέκεται στην παθογένεια των διαφόρων μορφών καρκίνου σε μελέτες τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (Harris R.E. et al., 2003, Boland G. et al., 2004, Subbaramaiah K. et al., 2002), και μπορεί να παίζει επίσης ρόλο στην αθηροσκλήρωση (Chenevard R. et al., 2003). Τα ευρήματα που παρουσίασαν οι Beauchamp G.K. et al., αποδεικνύουν ότι η ελαιοκανθάλη όχι μόνο μιμείται τον τρόπο δράσης της ιβουπροφαίνης, αλλά παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα σε σύγκριση με αυτήν, στην παρεμπόδιση της δράσης της COX 1 και COX 2 σε ισομοριακές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, η ελαιοκανθάλη σε συγκέντρωση (25 μM) ανέστειλε 41-57% της δραστηριότητας της COX σε σύγκριση με την ιβουπροφαίνη (25 μM) που ανέστειλε μόνο το 13-18%. Επιπλέον έχει διατυπωθεί η πρόταση ότι η χρόνια λήψη μικρών ποσοτήτων ελαιοκανθάλης μέσω της κατανάλωσης εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου είναι εν μέρει υπεύθυνη για το χαμηλό επιπολασμό νόσων που σχετίζονται με τη διατροφή στις μεσογειακές χώρες. Είναι γνωστό ότι χρόνιες χαμηλές δόσεις της ιβουπροφαίνης και άλλων αναστολέων της COX, όπως η ασπιρίνη, έχουν σημαντικά οφέλη στην υγεία ως προς την πρόληψη της ανάπτυξης καρκίνου (π.χ. παχέος εντέρου και του μαστού) (Garcia-Rodriguez L. A. & Huerta-Alvarez C., 2001, Harris R. E. et al., 2006) και καρδιαγγειακής νόσου (Hennekens C.H., 2002). Ως εκ τούτου, μακροχρόνια κατανάλωση ελαιόλαδου πλούσιου σε ελαιοκανθάλη μπορεί να συμβάλει στη μείωση της εμφάνισης αυτών των ασθενειών. (Cicerale S. et al., 2012)

#### ❖ Αντικαρκινική δράση

Η ελαιοκανθάλη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυτταρικών σειρών των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και του προστάτη και κατέδειξε αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα. Αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της c-Met κινάσης *in vitro* με IC<sub>50</sub> 4,8 μM, οπότε ενδέχεται να έχει θεραπευτική χρήση για την καταπολέμηση κακοηθειών. Επίσης αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την εισβολή των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF7, MDA-

MB231 και PC-3 του στήθους και του προστάτη, αντίστοιχα. (Elnagar A.Y. et al., 2011)

❖ Ρύθμιση της γήρανσης του δέρματος

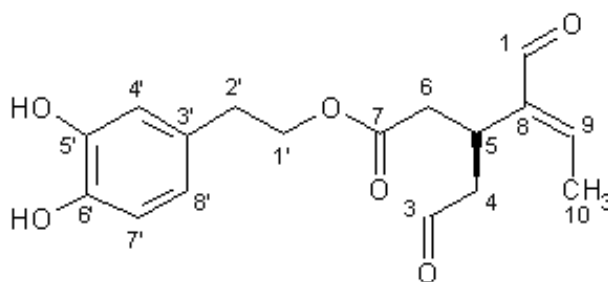
Η ελαιοκανθάλη παρεμποδίζει τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων σε περιπτώσεις στρες που οφείλεται σε περιβαλλοντικούς λόγους, με τη διέγερση της σύνθεσης δερματικών λιπιδίων, καθώς και με τη διέγερση των γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα κύτταρα ( Estanove C. et al., 2009).

❖ Αντιμικροβιακή δράση

Επίσης η ελαιοκανθάλη έχει αποδειχθεί ότι δεν υδρολύεται στο στομάχι και γι' αυτό το λόγο βοηθάει στην αναχαίτιση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση πεπτικού έλκους και ορισμένων τύπων καρκίνου. ( Romero C. et al., 2007)

## 8.2 ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ

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



**Εικόνα 19:** Χημικός τύπος ελαιασίνης

**MT: C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>**

**[MS (ESI), m/z: 319 (M-H)<sup>-</sup>]**

**[α]<sub>D20</sub> -0.70° (c = 0.05 g/ 100ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**

Τα στοιχεία αυτά, ήταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Owen R. et al., 2000, Montedoro et al., 1993).

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

- Μια ευρεία απλή κορυφή στα 9,65 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 3.
- Μια διπλή κορυφή στα 9,21 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ( $J_{1-5} = 1.8 \text{ Hz}$ ).
- Στα 6,79 ppm έχουμε μια διπλή κορυφή για το H- 7' ( $J_{7'-8} = 8.0 \text{ Hz}$ ).
- Μια διπλή κορυφή του H- 4' στα 6,72 ppm ( $J_{8'-4'} = 2.0 \text{ Hz}$ ).
- Στα 6,66 ppm η τετραπλή κορυφή του H- 9 ( $J_{9-10} = 7.1 \text{ Hz}$ ).
- Η διπλή- διπλή κορυφή του H- 8' εμφανίζεται στα 6,61 ppm ( $J_{8'-7} = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{4'-8'} = 2.0 \text{ Hz}$ ).
- Εμφανίζεται μια διπλή -τριπλή κορυφή στα 4,22 ppm που αντιστοιχεί στο H- 1'a ( $J_{1'a-b} = 10.8 \text{ Hz}$ ,  $J_{1'a-2'a/b} = 5.9 \text{ Hz}$ ), ενώ η πολλαπλή στα 4,15 ppm είναι η κορυφή του H- 1'b ( $J_{1'b-a} = 10.8 \text{ Hz}$ ,  $J_{1'b-2'a/b} = 6.0 \text{ Hz}$ ).
- Στα 3,64 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο 5 και δίνει μια πολλαπλή κορυφή.
- Η διπλή- διπλή- διπλή κορυφή στα 2,94 ppm είναι του H- 4a ( $J_{4a-b} = 18.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{4a-5} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{4a-3} = 1.2 \text{ Hz}$ ).
- Το H- 6b συντονίζεται στα 2,62 ppm ( $J_{6b-a} = 15.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{6b-5} = 6.4 \text{ Hz}$ ).
- Στα 2,77 ppm η κορυφή που ολοκληρώνει για 2, ανήκει στο H- 2'.
- Στα 2,73 ppm η διπλή- διπλή κορυφή του H- 6 ( $J_{6a-b} = 15.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{6a-5} = 8.9 \text{ Hz}$ ).
- Η διπλή- διπλή- διπλή κορυφή στα 2,79 ppm είναι του H- 4b ( $J_{4b-a} = 18.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{4b-5} = 6.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{4b-3} = 1.0 \text{ Hz}$ ).
- Τέλος, στα 2,06 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή του μεθυλίου της θέσης 10, και η οποία ολοκληρώνει για 3 H ( $J_{10-9} = 7.1 \text{ Hz}$ ).

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta$ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta$ ppm, $J$ Hz)
1	195,78	9,21 (1H, d, $J = 1.8 \text{ Hz}$ )
3	200,97	9.65 (1H, brs).
4a	46,24	2,94 (1H, ddd, $J = 18.5 \text{ Hz}$ , $8.3 \text{ Hz}$ , $1.2 \text{ Hz}$ )
4b		2,79 (1H, ddd, $J = 18.5 \text{ Hz}$ , $6.0 \text{ Hz}$ , $1.0 \text{ Hz}$ )
5	27,22	3.64 (1H, m)
6a	36,99	2,73 (1H, dd, $J = 15.7 \text{ Hz}$ , $8.9 \text{ Hz}$ )
6b		2,62 (1H, dd, $J = 15.7 \text{ Hz}$ , $6.4 \text{ Hz}$ )
7	172,02	-

Άτομο	<sup>13</sup> C-NMR (δ ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (δ ppm, J Hz)
8	143,19	-
9	155,17	6,66 (1H, q, J=7.1Hz)
10	15,29	2,08 (3H, d, J= 7.1 Hz)
1'a	65,25	4,22 (1H, dt, J= 10.8 Hz, 5.9 Hz)
1'b		4,15 (1H, dt, J= 10.8 Hz, 6.0 Hz)
2'	34,26	2,77 (2H, m)
3'	130,44	-
4'	121,21	6,72 (1H, d, J= 2Hz)
5'	115,33	-
6'	65,25	-
7'	143,60	6,79 (1H, d, J =8 Hz)
8'	116,22	6,61 ( 1H, dd, J=8 Hz, 2Hz)

**Πίνακας 8:** Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της ελαιασίνης

### 8.2.1 Βιολογικές ιδιότητες ελαιασίνης

Η ελαιασίνη είναι μια ουσία με φαρμακολογικές δράσεις παρόμοιες με αυτές της ελαιοκανθάλης, κυρίως σε ό, τι αφορά την τοπική χρήση της.

#### ❖ Αντιοξειδωτική δράση

Μια σημαντική δράση που εμφανίζει, σε αντίθεση με την ελαιοκανθάλη, είναι η προστασία των ανθρώπινων κυττάρων από το οξειδωτικό στρες σε μεγαλύτερο βαθμό ακόμα και από την υδροξυτυροσώλη (Pavia-Martins F. P. et al., 2009).

#### ❖ Αναστολέας μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE)

Η αναστολή του ACE επιφέρει αγγειοδιαστολή συνεπώς η ελαιασίνη θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της υπέρτασης και της καρδιακής ανεπάρκειας. (Hansen K. et al., 1996, Somova L.I. et al., 2003)

#### ❖ Αντιγηραντική δράση

Η ελαιασίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, και έτσι μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση της LDL, το οξειδωτικό στρες και τις οξειδωτικές βλάβες του DNA. Τα ενδοθηλιακά πρόγονα αιμοποιητικά κύτταρα (EPC) συνιστούν το βασικό



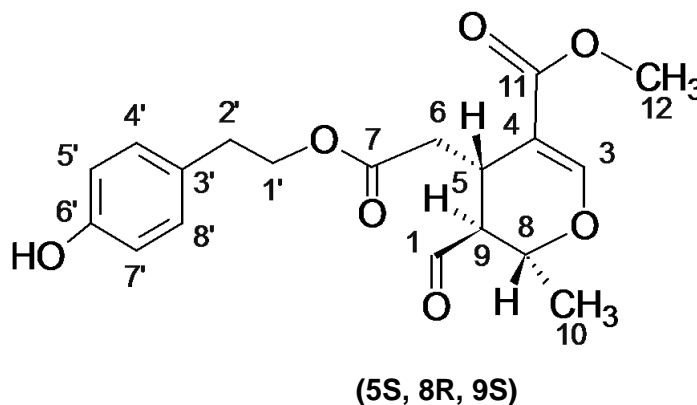
μηχανισμό με τον οποίο επιδιορθώνονται τα κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία. Επίσης, αυτά τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες. Η ελαιασίνη μειώνει τη γήρανση των κυττάρων που επάγεται από την αγγειοτενσίνη II και αναστέλλει το σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της νιτροτυροσίνης και τη μείωση των οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Επιπλέον, η ελαιασίνη αυξάνει το αγγειογενετικό δυναμικό των ενδοθηλιακών πρόγονων αιμοποιητικών κυττάρων *in vitro*. Συνεπώς η ελαιασίνη μπορεί να προστατεύσει τα EPC από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αγγειοτενσίνη II. (Parzonko A. et al., 2012)

#### ❖ Καρδιοπροστατευτική δράση

Η ελαιασίνη αναστέλλει την απελευθέρωση μυελοϋπεροξειδάσης από τα ουδετερόφιλα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει το ρόλο του ελαιόλαδου στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Παρ' όλα αυτά όμως το άμεσο αποτέλεσμα της ελαιασίνης στη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. (Czerwińska M. et al., 2012-a)

### 8.3 ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ

[Συνώνυμα : p-HPEA –EA, Ty- EA]



**Εικόνα 20:** Χημικός τύπος αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη

**MT:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>

**[MS (ESI), m/z: 361 (M-H)]**

Η ταυτοποίηση του παραπάνω μορίου έγινε με μεθόδους φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR). Τα στοιχεία αυτά, ήταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Montedoro G. et al., 1993, Christophoridou S. et al., 2009). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν CDCl<sub>3</sub>. Το φυσικό αυτό προϊόν που

απομονώθηκε, βρίσκεται σε μίγμα με ένα ποσοστό (25%) της άλλης διαστερεοϊσομερούς μορφής του, (5S, 8S, 9S).

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

- Μια διπλή κορυφή στα 9,51 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ( $J = 1.7 \text{ Hz}$ ).
- Στα 7,56 ppm η απλή κορυφή ανήκει στο H- 3.
- Η διπλή κορυφή στα 7,06 ppm αντιστοιχεί στα H- 4' και 8' ( $J = 8.5 \text{ Hz}$ ).
- Στα 6,78 ppm συντονίζονται τα H- 5' και 7' ως διπλή κορυφή ( $J = 8.5 \text{ Hz}$ ).
- Στα 4,41 ppm η πολλαπλή κορυφή αντιστοιχεί στο H- 8.
- Εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή στα 4,26 ppm που αντιστοιχεί στα H- 1' ( $J_{1'a-1'b} = 12.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{1'-2'} = 7.2 \text{ Hz}$ ).
- Το H- 12 της καρβοξυ-μεθυλομάδας συντονίζεται στα 3,71 ppm.
- Το H- 5 εμφανίζεται στα 3,38 ppm ως πολλαπλή κορυφή.
- Στα 2,83- 2,92 εμφανίζονται τα H- 6a, H- 2'. Πιο συγκεκριμένα, στα 2,89 ppm συντονίζεται το H- 6a και εμφανίζεται ως διπλή-διπλή κορυφή ( $J_{6a-b} = 16 \text{ Hz}$ ,  $J_{6a-5} = 3.7 \text{ Hz}$ ) και στα 2,85 ppm τα H- 2' ως πολλαπλή ( $J_{2'-1'} = 7.2 \text{ Hz}$ ).
- Στα 2,50 μέχρι τα 2,58 ppm συντονίζονται τα H- 9, H- 6b. Πιο συγκεκριμένα, στα 2,55 ppm εμφανίζεται το H- 9 ως διπλή τριπλή ( $J_{9-5} = 5.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{9-1} = 1.7 \text{ Hz}$ ), ενώ στα 2,52 ppm το H- 6b δίνει μια διπλή διπλή κορυφή ( $J_{6b-a} = 16 \text{ Hz}$ ,  $J_{6b-5} = 10 \text{ Hz}$ ).
- Στα 1,38 ppm έχουμε μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H- 10 ( $J_{10-8} = 6.5 \text{ Hz}$ ).

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta$ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta$ ppm, $J$ Hz)
1	199,6	9,51 (1H, d, $J=1.7\text{Hz}$ )
3	156,8	7,56 (1H, s)
4	106,5	-
5	28,0	3,38 (1H, m)
6a	38,7	2,89 (1H, dd, $J=16 \text{ Hz}$ , $3.7\text{Hz}$ )
6b		2,52 (1H, dd, $J=16\text{Hz}$ , $10\text{Hz}$ )
7	171,2	-

Άτομο	<sup>13</sup> C-NMR (δ ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (δ ppm, J Hz)
8	69,5	4,41 (1H, m)
9	50,8	2,55 (1H, dt, J=5.7 Hz, 1.7 Hz)
10	17,9	1,38 (3H, d, J=6.5 Hz)
11	167,1	-
12	51,5	3,71 (3H, s)
1'	65,3	4,26 (2H, ddd, J= 12.9 Hz, 7.2 Hz, 2.7 Hz)
2'	34,1	2,85 (2H, m , J= 7.2Hz)
3'	129,6	-
6'	156,7	-
4', 8'	130,0	7,06 (2H, d, J=8.5Hz)
5', 7'	115,4	6,78 (2H, d, J=8.5Hz)

**Πίνακας 9a:** Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη (5S, 8R, 9S).

Άτομο	<sup>1</sup> H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	9,55 (1H, d, J=1.7Hz)
3	7,62 (1H, s)
10	1,53 (3H, d, J=6.5 Hz)
12	3,73 (3H, s)

**Πίνακας 9b:** Χαρακτηριστικότερες χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη (5S, 8S, 9S).

### 8.3.1 Βιολογικές ιδιότητες αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκοτροσίδη

Είναι ένα ελαιώδες συστατικό, που έχει απομονωθεί παλαιότερα από την ελιά. Είναι γνωστή, όπως σχεδόν όλες οι φαινολικές ουσίες της *Olea europaea*, για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες.

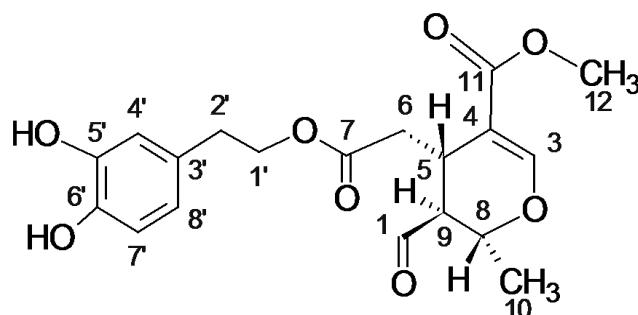
Επίσης το άγλυκο του λιγκοτροσίδη προκαλεί υψηλά επίπεδα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε υπερεκφραζόμενα καρκινικά κύτταρα μαστού HER2 και έδειξε μέτρια κυτταροτοξικότητα ενάντια σε μια ομάδα 39 ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*. (Menendez J.A. et al., 2008) Επίσης εμφανίζει την υψηλότερη αντι-μεταστατική δράση σε σχέση με την ελαιοκανθάλη και την τυροσόλη. (Busnena B.A et al., 2013)

Το άγλυκο του λιγκοτροσίδη ενώ εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα στερείται κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικά κύτταρα.

Τέλος, ασκεί ελάχιστη ανασταλτική δράση στη φωσφορυλίωση του c-MET, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει ότι η αντι-μεταστατική του δράση θα μπορούσε να είναι μέσω διαφορετικού μοριακού στόχου από το c-MET. (Busnena B.A et al., 2013)

## 8.4 ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ

[Συνώνυμα : 3,4-DHPEA –EA, HTy- EA]



(5S, 8R, 9S)

**Εικόνα 21:** Χημικός τύπος αλδευδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης

**MT:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>

**[MS (ESI), m/z: 377 (M-H)]**

Η ταυτοποίηση του παραπάνω μορίου έγινε με μεθόδους φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR). Τα στοιχεία αυτά, ήταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Pérez-Trujillo M. et al., 2010, Gariboldi P. et al., 1985, Christophoridou S. et al., 2009). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν CDCl<sub>3</sub>. Το φυσικό αυτό προϊόν που απομονώθηκε, βρίσκεται σε μίγμα με ένα ποσοστό (25%) της άλλης διαστερεοϊσομερούς μορφής του (5S, 8S, 9S).

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR παρατηρούνται τα εξής:

- Μια διπλή κορυφή στα 9,52 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεϋδης που εμφανίζεται στη θέση 1 (J = 1.7 Hz).
- Στα 7,58 ppm η απλή κορυφή ανήκει στο H- 3.
- Το H- 8' συντονίζεται στα 6,61 ppm και δίνει μια διπλή –διπλή κορυφή (J<sub>8'-7'</sub>= 8.2 Hz, J<sub>8'-4'</sub>= 2Hz).
- Στα 6,80 ppm υπάρχει μια διπλή κορυφή του H- 7' (J<sub>7'-8'</sub>= 8.2 Hz).
- Στα 6,76 ppm υπάρχει μια διπλή κορυφή του H- 4' (J<sub>4'-8'</sub>= 2 Hz).
- Η πολλαπλή κορυφή στα 4,46 ppm αντιστοιχεί στο H- 8 (J<sub>8-10</sub>= 6.5 Hz).
- Η πολλαπλή κορυφή στα 4,25 ppm αντιστοιχεί στα H- 1'.
- Τα πρωτόνια της καρβοξυ-μεθυλομάδας της θέσης 12 συντονίζονται στα 3,74 ppm.

- Το H- 5 εμφανίζεται στα 3,38 ppm ως πολλαπλή κορυφή.
- Στα 2,83- 2,92 εμφανίζονται τα H-6a, H-2'. Πιο συγκεκριμένα, στα 2,87 ppm συντονίζεται το H-6a και εμφανίζεται ως διπλή-διπλή κορυφή ( $J_{6a-6b} = 16\text{Hz}$ ,  $J_{6a-5} = 3.4\text{Hz}$ ), και στα 2,81 ppm τα H-2' ως πολλαπλή ( $J_{2'-1'} = 6.6\text{Hz}$ ).
- Στα 2,50 μέχρι τα 2,58 ppm συντονίζονται τα H-9, H-6b. Πιο συγκεκριμένα, στα 2,57 ppm εμφανίζεται το H- 9 ως διπλή τριπλή ( $J_{9-5} = 5.6\text{Hz}$ ,  $J_{9-1} = 1.7\text{Hz}$ ), ενώ στα 2,54 ppm το H-6b δίνει μια διπλή διπλή κορυφή ( $J_{6b-6a} = 16\text{Hz}$ ,  $J_{6b-5} = 10\text{Hz}$ ).
- Στα 1,39 ppm η διπλή κορυφή του H-10 ( $J_{10-8} = 6.5\text{ Hz}$ ).

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta$ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta$ ppm, $J$ Hz)
1	199,55	9,52 (1H, d, $J=1.7\text{ Hz}$ )
3	156,9	7,58 (1H, s)
4	129,88	-
5	26,79	3,38 (1H, m)
6a	36,89	2,87 (1H, dd, $J=16\text{ Hz}$ , $3.4\text{Hz}$ )
6b		2,54 (1H, dd, $J=16\text{Hz}$ , $10\text{Hz}$ )
7	171,45	-
8	70,53	4,46 (1H, m, $J= 6.5\text{ Hz}$ )
9	54,12	2,57 (1H, dt, $J= 5.6\text{ Hz}$ , $1.7\text{ Hz}$ )
10	19,06	1,39 (3H, d, $J=6.5\text{ Hz}$ )
11	167,14	-
12	51,28	3,74 (3H, s)
1'	64,96	4,25 (2H, m)
2'	33,95	2,81 (2H, m , $J= 6.6\text{Hz}$ )
3'	106,1	-
4'	114,95	6,76 (1H, d, $J= 2\text{Hz}$ )
5'	143,23	-
6'	142,52	-
7'	115,78	6,80 (1H, d, $J=8.2\text{Hz}$ )
8'	120,75	6,61 (1H, dd, $J=8.2\text{Hz}$ , $2\text{Hz}$ )

**Πίνακας 10a:** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (5S, 8R, 9S).

Άτομο	<sup>1</sup> H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	9,59 (1H, d, J=1.7 Hz)
3	7,65 (1H, s)
10	1,56 (3H, d, J=6.5 Hz)
12	3,77 (3H, s)

**Πίνακας 10b:** Χαρακτηριστικότερες χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (5S, 8S, 9S).

#### 8.4.1 Βιολογικές ιδιότητες αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης

Είναι ένα ελαιώδες συστατικό, το οποίο έχει ξανά απομονωθεί από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (Pérez-Trujillo M. et al., 2010), καθώς και από τα φύλλα της ελιάς (Gariboldi P. et al., 1985), ενώ έχει μελετηθεί πολλές φορές και ως προϊόν υδρόλυσης απομονωθείσας ελευρωπαΐνης (Briante R. et al., 2001).

Χημικά κατατάσσεται στις όρθο-δифαινόλες, που αποτελούν βιοδραστικό τμήμα στο μηχανισμό της προστασίας των καρπών της ελιάς από επιθέσεις εντόμων και παθογόνων βακτηρίων (Bianco A.D. et al., 1999). Ακόμα, είναι γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση, η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτή της ελευρωπαΐνης. Επίσης το άγλυκο της ελευρωπαΐνης είναι ένα φαρμακολογικά δραστικό μόριο, γνωστό για τη δυναμική χρησιμοποίησή του σαν αντιμικροβιακό σε κάποιες κοινές ασθένειες των ελαιόδεντρων. (Briante R. et al., 2001). Για παράδειγμα, εμποδίζει την ωοτοκία του εντόμου *Dacus oleae* που προσβάλλει την ελιά, σε αντίθεση με την ελευρωπαΐνη που την διεγείρει (Gariboldi P. et al., 1985).

Επιπροσθέτως υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να αποτρέπει τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό κυττάρων στον καρκίνο του μαστού (Pérez-Trujillo M. et al., 2010).

Η αμυλίνη (hIAPP) ανακαλύφθηκε το 1987 όταν απομονώθηκε από εναποθέσεις αμυλοειδούς, που πάρθηκαν μετά θάνατον, από πάγκρεας ασθενών με διαβήτη τύπου II. Είναι μια πεπτιδική ορμόνη αποτελούμενη από 37 αμινοξέα, που βρίσκεται μαζί με την ινσουλίνη στα εκκριτικά κοκκία των β-κυττάρων του παγκρέατος και εκκρίνεται σε απάντηση τροφικών ερεθισμάτων και άλλων εκκριταγωγών. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν αποδείξει ότι, οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης και της αμυλίνης στο πλάσμα αυξάνονται και ελαττώνονται παράλληλα, ακολουθώντας τα γεύματα. (Ludvik B. et al., 1997) Οι εναποθέσεις αμυλίνης στο πάγκρεας είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II και υπάρχουν πολλά

στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα ολιγομερή αμυλίνης εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση στα β-κύτταρα του παγκρέατος.

Το άγλυκο της ελευρωπαϊνης αποτρέπει την αύξηση της συγκέντρωσης αμυλίνης στον οργανισμό. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα συσσωματώματα αμυλίνης που μεγαλώνουν παρουσία του άγλυκου της ελευρωπαϊνης, δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την κυτταρική μεμβράνη και να την αποσταθεροποιήσουν. Ως εκ τούτου δεν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα στα β-κύτταρα. (Rigaccia S. et al., 2010)



## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ 2**

### **9 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕΣΑ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ <sup>1</sup>H-NMR**

#### **9.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

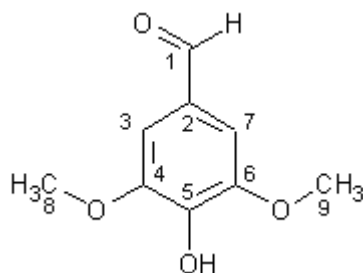
Οι καμπύλες αναφοράς πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη γνωστής ποσότητας πρότυπων ουσιών μέσα σε ελαιόλαδο, το οποίο δεν περιείχε καμία από τις ουσίες που μελετήθηκαν. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε αυτός ο τρόπος προσδιορισμού των ουσιών είναι ώστε να εξασφαλίζεται η προσομοίωση της συμπεριφοράς τους όταν βρίσκονται εκ φύσεως μέσα στο ελαιόλαδο και έτσι να επιτυγχάνεται καλύτερος ποσοτικός προσδιορισμός που ανταποκρίνεται σε πραγματικές συνθήκες. Επίσης είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι για τις ανάγκες των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε φρέσκο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, καθώς παρατηρήθηκε πως η χρήση παλιού ή οξειδωμένου ελαιόλαδου οδηγούσε σε λανθασμένα συμπεράσματα ή ακόμη και στη μετατροπή των ουσιών σε άλλες, δυσχεραίνοντας την παρατήρησή τους.

#### **9.2 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε ουσία ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες απομονωμένες εργαστηριακά, με χρωματογραφία στήλης και επαναλαμβανόμενες παρασκευαστικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας μέχρι να εξασφαλιστεί ο μέγιστος βαθμός καθαρότητας για την κάθε μία, όπως προσδιορίστηκε με NMR.

#### **9.3 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ**

Ως εσωτερική πρότυπη ουσία (IS) χρησιμοποιήθηκε η συριγγαλδεΐδη ή (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde), αφ' ενός γιατί δεν υπάρχει στο ελαιόλαδο και αφετέρου διότι το σήμα που δίνει το πρωτόνιο της αλδεΐδης της στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR βρίσκεται σε περιοχή που δεν επικαλύπτει κανένα σήμα των ουσιών που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα στα 9,81 ppm. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε είχε συγκέντρωση 0,5 mg/ml.



**Εικόνα 22:** Χημικός τύπος συριγγαλδεΐδης

Άτομο	<sup>1</sup> H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	9,81 (1H, s)
3,7	7,16 (2H, s)
8,9	3,98 (6H, s)

**Πίνακας 11:** Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της συριγγαλδεΐδης

#### 9.4 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ

Για την πραγματοποίηση της καμπύλης αναφοράς της ελαιοκανθάλης χρησιμοποιήθηκε εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ποικιλίας «Αδραμυτινή» από τη Λέσβο. Κατασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης της τάξεως των 0,5 mg/ ml σε ακετονιτρίλιο, το οποίο διατηρείτο στο ψυγείο. Από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση 10, 20, 40, 80, 160, και 320 mg/ kg μέσα στο ελαιόλαδο.

Η προσθήκη των ουσιών έγινε σε 5 g ελαιόλαδο και στη συνέχεια έλαβε χώρα η συνήθης διαδικασία της υγρής – υγρής εκχύλισης με κυκλοεξάνιο και ακετονιτρίλιο. Εφόσον το πρότυπο διάλυμα ελαιοκανθάλης ήταν σε ακετονιτρίλιο, ανάλογα με τον όγκο του προτύπου που προστέθηκε αρχικά στο ελαιόλαδο, προστέθηκε και η κατάλληλη ποσότητα ακετονιτριλίου για την εκχύλιση, ώστε ο τελικός συνολικός όγκος του να ισούται με 25 ml. Στη συνέχεια έγινε εκλεκτική απομόνωση 25 ml από τη στιβάδα του ακετονιτριλίου (πάνω φάση) και προστέθηκε 1 ml από διάλυμα συριγγαλδεΐδης σε ACN συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml. Τέλος ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και παραλαβή του εκχυλίσματος ελαιόλαδου που περιείχε τη γνωστή ποσότητα ελαιοκανθάλης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος <sup>1</sup>H-NMR στο ολικό εκχύλισμα. Για τη διάλυσή του απαιτούνται 750 μl δευτεριωμένου χλωροφορμίου

$\text{CDCl}_3$  από τα οποία ακολούθως, τα 550 μl μεταφέρονται σε σωληνάκι NMR και σε αυτά λαμβάνεται το φάσμα.

Η ελαιοκανθάλη εμφανίζει μια πολύ χαρακτηριστική διπλή κορυφή στα 9,23 ppm λόγω της αλδεΐδης που περιέχει το μόριό της. Επίσης η συριγγαλδεΐδη που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο δίνει μια απλή κορυφή στα 9,81 ppm η οποία δεν επικαλύπτει καμία από τις κορυφές των υπόλοιπων μορίων.

Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην αναλογία της ολοκλήρωσης της κορυφής του αλδεΐδικού πρωτονίου της ελαιοκανθάλης (9,23 ppm) ως προς την ολοκλήρωση του αλδεΐδικού πρωτονίου της συριγγαλδεΐδης (9,81 ppm). Κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιοκανθάλης σε mg ανά kg ελαιόλαδου, η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

<b>Αναλογία</b>	<b>Εξίσωση παλινδρόμησης</b>	<b>Συντελεστής συσχέτισης <math>r^2</math></b>
Ελαιοκανθάλη/ Εσωτερικό πρότυπο	$y=270,1x+4,2$	0,999

**Πίνακας 12:** Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιοκανθάλης σε ελαιόλαδο

## 9.5 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ

Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που παρασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της ελαιοκανθάλης έγινε και η καμπύλη αναφοράς της ελαιασίνης, χρησιμοποιώντας τις ίδιες ακριβώς συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος ελαιασίνης σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml, δηλαδή 10, 20, 40, 80, 160, και 320 mg/ kg μέσα σε ελαιόλαδο.

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε 1 ml από διάλυμα συριγγαλδεΐδης σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml.

Σε αυτή την περίπτωση η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην αναλογία της ολοκλήρωσης της κορυφής του αλδεΐδικού πρωτονίου της ελαιασίνης (9,19 ppm) ως προς την ολοκλήρωση του αλδεΐδικού πρωτονίου της συριγγαλδεΐδης (9,81 ppm). Κατασκευάστηκε λοιπόν η καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιασίνης σε mg ανά kg ελαιόλαδου, η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Αναλογία	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης $r^2$
Ελαιασίνη/ Εσωτερικό πρότυπο	$y=279,7x+6,5$	0,994

**Πίνακας 13:** Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιασίνης σε ελαιόλαδο

## 9.6 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ

Στην περίπτωση της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη στάθηκε αδύνατη η απομόνωση της καθαρής ουσίας απαλλαγμένης από το ισομερές που είχε δημιουργηθεί κατά τη διαδικασία της χρωματογραφίας. Συνεπώς κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς, λαμβάνοντας υπ' όψιν το άθροισμα των ολοκληρώσεων της κορυφής της ουσίας και της κορυφής του ισομερούς της, εκτός από το βαθμό καθαρότητάς της.

Όπως έχει τονιστεί ιδιαίτερα και προηγουμένως, η καμπύλη αναφοράς έγινε σε πραγματικές συνθήκες, δηλαδή μέσα σε ελαιόλαδο. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε φρέσκο ελαιόλαδο ποικιλίας «Μανάκι» από την Αργολίδα. Το εσωτερικό πρότυπο διάλυμα συριγγαλδεϋδης ήταν συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml και το αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης της ουσίας ήταν συγκέντρωσης 0,295 mg/ ml. Από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση 11, 22, 44, 89, 177 και 221 mg/ kg μέσα στο ελαιόλαδο. Η προσθήκη των ουσιών έγινε σε 5 g ελαιόλαδο και στη συνέχεια έλαβε χώρα η συνήθης διαδικασία της υγρής – υγρής εκχύλισης με κυκλοεξάνιο και ακετονιτρίλιο.

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε 1 ml από διάλυμα συριγγαλδεϋδης σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml.

Σε αυτή την περίπτωση η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην αναλογία του αθροίσματος των ολοκληρώσεων της κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη (9,48 ppm) και του ισομερούς της (9,54 ppm) ως προς την ολοκλήρωση του αλδεϋδικού πρωτονίου της συριγγαλδεϋδης (9,81 ppm). Παρατηρείται μια διαφοροποίηση στα ppm συγκριτικά με αυτά που παρατίθενται στους πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δύο ισομερών της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη, η οποία οφείλεται στο ότι οι ουσίες βρίσκονται πλέον σε περιβάλλον ελαιόλαδου και υφίστανται επίδραση matrix.

Κατασκευάστηκαν λοιπόν, η καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε mg ανά kg ελαιόλαδο, η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Αναλογία	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης $r^2$
Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη / Εσωτερικό πρότυπο	$y=324x-0,78$	0,9911

**Πίνακας 14:** Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε ελαιόλαδο

## 9.7 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ

Όπως και στην περίπτωση της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη, στάθηκε αδύνατη η απομόνωση της καθαρής αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης απαλλαγμένης από το ισομερές που είχε δημιουργηθεί κατά τη διαδικασία της χρωματογραφίας. Συνεπώς κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς, λαμβάνοντας υπ' όψιν το άθροισμα των ολοκληρώσεων της κορυφής της ουσίας και της κορυφής του ισομερούς της, εκτός από το βαθμό καθαρότητάς της.

Η καμπύλη αναφοράς έγινε σε πραγματικές συνθήκες, δηλαδή μέσα σε ελαιόλαδο. Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε φρέσκο ελαιόλαδο ποικιλίας «Μανάκι» από την Αργολίδα. Το εσωτερικό πρότυπο διάλυμα συριγγαλδεΐδης ήταν συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml και το αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης της ουσίας ήταν συγκέντρωσης 0,3 mg/ ml. Από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση 11, 22, 44, 89 και 178 mg/ kg μέσα στο ελαιόλαδο. Η προσθήκη των ουσιών έγινε σε 5 g ελαιόλαδο και στη συνέχεια έλαβε χώρα η συνήθης διαδικασία της υγρής – υγρής εκχύλισης με κυκλοεξάνιο και ακετονιτρίλιο.

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε 1 ml από διάλυμα συριγγαλδεΐδης σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0,5 mg/ ml.

Σε αυτή την περίπτωση η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην αναλογία του αθροίσματος των ολοκληρώσεων της κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (9,50 ppm) και του ισομερούς της (9,57 ppm) ως προς την ολοκλήρωση του αλδεϋδικού πρωτονίου της

συριγγαλδεΐδης (9,81 ppm). Παρατηρείται επίσης μια διαφοροποίηση στα ppm συγκριτικά με αυτά που παρατίθενται στους πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δύο ισομερών της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης, λόγω του ότι βρίσκονται σε περιβάλλον ελαιόλαδου.

Κατασκευάστηκαν λοιπόν, η καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης σε mg ανά kg ελαιόλαδου, η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

<b>Αναλογία</b>	<b>Εξίσωση παλινδρόμησης</b>	<b>Συντελεστής συσχέτισης <math>r^2</math></b>
Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης / Εσωτερικό πρότυπο	$y=336,5x-8,66$	0,9986

**Πίνακας 15:** Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης σε ελαιόλαδο

## 10 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΜΕΣΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ $^1\text{H-NMR}$

### 10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο ελαιόλαδο, ελέγχθηκε όσον αφορά τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, η οποία υπολογίζεται ως η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation % (RSD %)), την ακρίβεια, η οποία αξιολογείται ως το σχετικό ποσοστό σφάλματος (relative percentage error % (Er%)) και την ευαισθησία, η οποία αξιολογείται ως τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (limits of Detection and Quantitation LOD, LOQ).

### 10.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ (LINEARITY)

Για τον προσδιορισμό της γραμμικότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιόλαδου τα οποία στερούνταν εκ φύσεως τις ουσίες ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη. Σε δείγματα των 5g από αυτό το ελαιόλαδο, έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ελαιασίνης και ελαιοκανθάλης ξεχωριστά (εμβολιασμός), ώστε τελικά το ελαιόλαδο να περιέχει τις ουσίες αυτές σε συγκεντρώσεις 10, 20, 40, 80, 160 και 320 mg/ kg ανά δείγμα. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων αυτών με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και υπολογίστηκε η αναλογία της ολοκλήρωσης των κορυφών της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, ως προς την ολοκλήρωση της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Η αντίστοιχη συγκέντρωση των δειγμάτων ελαιόλαδου στα οποία είχαν προστεθεί οι πρότυπες ουσίες, υπολογίστηκε με ανάλυση μη σταθμισμένης γραμμικής παλινδρόμησης.

### 10.3 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (PRECISION)

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων κατά τη διάρκεια μιας μέρας (intraday precision), προσδιορίστηκε κατόπιν ανάλυσης πέντε δειγμάτων ελαιόλαδου τα οποία περιείχαν ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης, 80 και 160 mg/ kg.

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων ανάμεσα σε διαφορετικές ημέρες (interday precision), εκτιμήθηκε κατόπιν ανάλυσης δειγμάτων ελαιόλαδου σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης ήτοι 80 και 160 mg / kg, τα οποία παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν με τον ίδιο τρόπο σε πέντε διαφορετικές ημέρες.

Αναλογία	Intraday precision (RSD%)		Interday precision (RSD%)	
	80 mg/ kg	160 mg/ kg	80 mg/ kg	160 mg/ kg
Ελαιοκανθάλη/ Εσωτερικό πρότυπο	4.9	3.7	5.1	4.5
Ελαιασίνη/ Εσωτερικό πρότυπο	5.4	3.3	4.8	3.8

**Πίνακας 16:** Intraday και interday precision για την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη

#### 10.4 ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ACCURACY)

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελαιόλαδου σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης 10, 80 και 160 mg/ kg. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν το σχετικό ποσοστό σφάλματος (relative percentage error % (Er%)) το οποίο ορίζεται σαν [πειραματική τιμή συγκέντρωσης–πραγματική τιμή συγκέντρωσης]/ [πραγματική τιμή συγκέντρωσης] x 100

Αναλογία	Accuracy (Er%)		
	10 mg/ kg	80 mg/ kg	160 mg/ kg
Ελαιοκανθάλη/ Εσωτερικό πρότυπο	5.8	6.5	-0.9
Ελαιασίνη/ Εσωτερικό πρότυπο	15.6	-0.1	-0.1

**Πίνακας 17:** Προσδιορισμός ακρίβειας μεθόδου προσδιορισμού ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης

#### 10.5 ΑΝΑΚΤΗΣΗ (RECOVERY)

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελαιόλαδου σε συγκέντρωση 160 mg/ kg και για τους δύο αναλύτες. Συνολικά αναλύθηκαν 5 δείγματα για τον κάθε αναλύτη με την ήδη περιγεγραμμένη διαδικασία. Η ανάκτηση υπολογίστηκε ως, η αναλογία μεταξύ της απόκρισης και των δύο ουσιών στα εμβολιασμένα δείγματα ελαιόλαδου και της απόκρισης των πρότυπων, στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης. Εκφράστηκε δε, σαν τη μέση τυπική απόκλιση ( $\pm$  standard deviation). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η



ανάκτηση φτάνει το 85.2% ( $\pm 3.6$ ) και το 85.9% ( $\pm 3.0$ ) όσον αφορά τα 160 mg/ kg για την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανάκτηση είναι εντός αποδεκτών ορίων. Στην περίπτωση χαμηλότερων συγκεντρώσεων η ανάκτηση είναι αρκετά μικρότερη και γι' αυτό το λόγο η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε την κατασκευή καμπύλης αναφοράς μέσα στο ελαιόλαδο, ώστε να εξαλειφθεί αυτός ο παράγοντας σφάλματος.

## **10.6 ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOD, LOQ)**

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης εκφράζουν την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη.

Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του θορύβου. Τα LOD και LOQ προσδιορίστηκαν από 6 τυφλά δείγματα ελαιόλαδου ποικιλίας Αδραμυτινή μετρώντας την απόκριση του θορύβου για κάθε αναλύτη. Υπολογίστηκε μια αναλογία σήματος προς θόρυβο 3:1 (signal-to-noise (S/N)) για το LOD και 10:1 για το LOQ. Το LOD υπολογίστηκε 1 mg/ kg και το LOQ 10 mg/ kg και για τις δύο ουσίες (ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη).

## 11 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ ΜΕ ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΟΡΩΝΕΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

Το ελαιόλαδο έχει αποδειχθεί πως περιέχει πολλά συστατικά τα οποία το καθιστούν ιδιαίτερα ωφέλιμο για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο ο πρωταρχικός του ρόλος είναι αυτός του τροφίμου. Ο πρώτος και κύριος λόγος που κάποιος επιλέγει ένα ελαιόλαδο προς κατανάλωση είναι τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, τα οποία όμως συνδέονται άρρηκτα με τις ευεργετικές ιδιότητές του, άρα τελικά για όποιο λόγο από τους δύο κι αν επιλέγει κανείς ποιο ελαιόλαδο θα καταναλώσει, έχει μεγάλο όφελος.

Στα πλαίσια συνεργασίας με την ομάδα γευσιγνωσίας ελαιόλαδου του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας επιδιώχθηκε η συσχέτιση της συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με την ένταση της αίσθησης του πικάντικου και του πικρού σε ελαιόλαδα Κορωνέικης ποικιλίας. Ως εκ τούτου, προσδιορίστηκε η ακριβής ποσοτική σύσταση σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη σε δείγματα ελαιολάδου της ποικιλίας αυτής και αξιολογήθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων από το εξειδικευμένο πάνελ των γευσιγνωστών. Επιπλέον, συσχετίστηκε η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης αυτών των σεκοίριδοειδών ενώσεων με την ένταση του πικάντικου και την πικρού, προκειμένου να προταθεί ένα ευρετήριο για την περιγραφή και την ποσοτικοποίηση των θετικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου.

Μελετήθηκαν 21 δείγματα εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου τα οποία προέρχονταν από την περιοχή της Μεσσηνίας. Όλα τα δείγματα ανήκαν στην ποικιλία Κορωνέικη και είχαν συλλεχθεί την περίοδο Νοεμβρίου–Δεκεμβρίου 2011. Ο καρπός μεταφέρθηκε αμέσως μετά τη συγκομιδή στο ελαιοτριβείο και το ελαιόλαδο που παρήχθη τοποθετήθηκε σε κατάλληλες συνθήκες μακριά από φως και οξυγόνο.

Τα δείγματα εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου αξιολογήθηκαν από 10 μέλη της ομάδας γευσιγνωσίας ελαιόλαδου του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος (ΤΕΙ) Καλαμάτας, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EC Reg. 640/2008) και τους κανονισμούς του IOC (IOC/T.20/Doc. No 15/Rev. 3). Τα μέλη της επιτροπής έχουν περισσότερα από τέσσερα χρόνια εμπειρία στην αξιολόγηση του ελαιόλαδου. Η ένταση των θετικών χαρακτηριστικών, φρουτώδες, πικάντικο και πικρό, και τα ελαττώματα εκφράζονται ως διάμεσες τιμές. Η κατάταξη του ελαιολάδου ως έξτρα παρθένο απαιτεί η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων να είναι

ίση με 0 και η διάμεση τιμή για το φρουτώδες να είναι μεγαλύτερη του 0. (EC Reg. 640/2008)

Στα δείγματα που μελετήθηκαν, οι συγκεντρώσεις της ελαιοκανθάλης κυμαίνονταν από 34,6 έως 154,6 mg / L, με μέση τιμή  $94,5 \pm 31,8$  mg / L. Οι τιμές αυτές είναι σε συμφωνία και με τα δεδομένα άλλων μελετών (Stefanouadaki E. et al., 2011) και κατατάσσουν την ποικιλία Κορωνέικη μεταξύ εκείνων με την υψηλότερη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης. Το υψηλό ποσοστό ελαιοκανθάλης εξαρτάται ως ένα βαθμό από τις πρακτικές καλλιέργειας οι οποίες αυξάνουν τη συγκέντρωσή της, για παράδειγμα οι άνυδρες συνθήκες καλλιέργειας, η πρόωρη ημερομηνία συγκομιδής, η ταχεία έκθλιψη, αλλά και η μικρή περίοδος αποθήκευσης (2-3 μήνες) μέχρι τη δειγματοληψία και την αξιολόγηση από το panel.

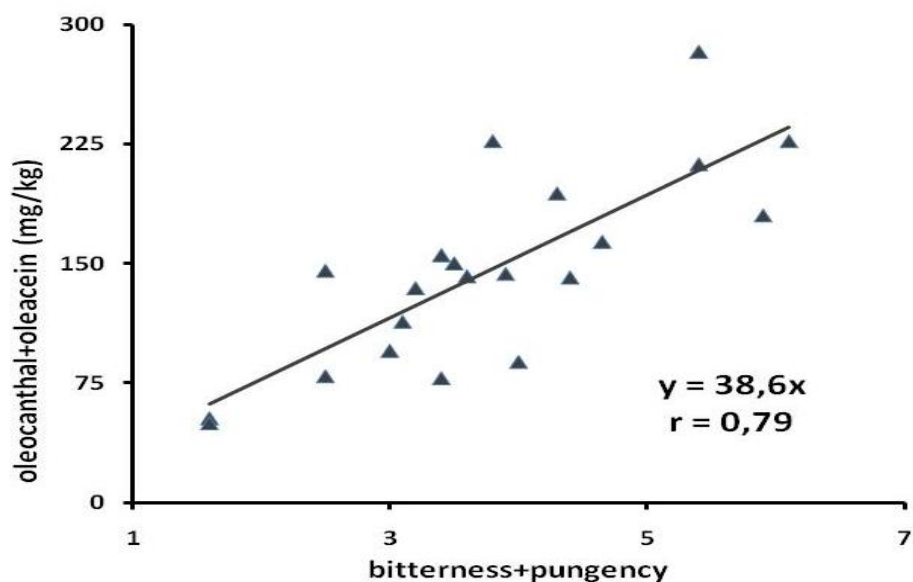
Οι συγκεντρώσεις της ελαιασίνης κυμαίνονταν από 11,5 έως 191,9 mg / L, με μέση τιμή  $63,3 \pm 36,1$  mg / L. Τα στοιχεία αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά που αναφέρθηκαν για την ποικιλία Κορωνέικη από άλλους ερευνητές, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις τα δέντρα αναπτύχθηκαν υπό αρδευόμενες συνθήκες. (Stefanouadaki E. et al., 2011)

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων έδειξε ότι τα συνολικά θετικά χαρακτηριστικά κυμαίνονταν από 0,40 έως 2,65 με μέση τιμή  $1,45 \pm 0,72$  για την πικράδα, από 1,50 έως 3,70 με μέση τιμή  $2,62 \pm 0,56$  για την αίσθηση του πικάντικου και από 0,40 έως 3,60 με μέση τιμή  $2,14 \pm 0,82$  για το φρουτώδες. Με βάση τα παραπάνω, το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο από τη συγκεκριμένη περιοχή μελέτης χαρακτηρίζεται ως ελαφρύ και ισορροπημένο.

Έχει αναφερθεί ότι η αίσθηση του πικάντικου και του πικρού συσχετίζεται με το ποσοστό της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης αντίστοιχα. Η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης συσχετίζεται τόσο με την αίσθηση του πικάντικου ( $r^2 = 0.57$ ,  $p \leq 0.05$ ) όσο και με την πικράδα ( $r^2 = 0.73$ ,  $p \leq 0.05$ ). Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση ελαιασίνης έδειξε παρόμοια συσχέτιση με την πικράδα ( $r^2=0.68$ ,  $p \leq 0.05$ ), αλλά σε μικρότερο βαθμό με την αίσθηση του πικάντικου ( $r^2=0.60$ ,  $p \leq 0.05$ ). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τόσο η ελαιοκανθάλη όσο και η ελαιασίνη συσχετίζονται με την αίσθηση του πικρού και του πικάντικου σε δείγματα εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.

Μια ισχυρή συσχέτιση ( $r^2=0,79$ ,  $p \leq 0,05$ ) παρατηρήθηκε μεταξύ του άθροισματος της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης με το αντίστοιχο ποσοστό του πικρού και πικάντικου (Εικόνα 23). Με βάση αυτό το σχήμα, προτείνεται ότι το άθροισμα της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας ενδεικτικός δείκτης για την οργανοληπτική αξιολόγηση του ελαιόλαδου

όταν αυτή δεν είναι εφικτή και, αντιστρόφως, το αντίστοιχο άθροισμα της έντασης του πικρού και του πικάντικου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της αντιοξειδωτικής δράσης, εάν η χημική ανάλυση δεν είναι εφικτή. Στην παρούσα φάση όμως, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη βαθμονόμηση αυτών των δεικτών.



**Εικόνα 23:** Συσχέτιση του αθροίσματος της έντασης του πικρού και του πικάντικου με το άθροισμα της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης





## ΜΕΡΟΣ Γ΄

**«Εφαρμογή της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης, αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε ελληνικά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα»**



## 12 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ, ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ ΤΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε και περιγράφηκε παραπάνω, εφαρμόστηκε σε 291 μονοποικιλιακά δείγματα ελαιόλαδου με σκοπό να υπολογιστούν τα επίπεδα συγκέντρωσης των τεσσάρων ουσιών στο ελαιόλαδο και να γίνει μια όσο το δυνατόν πληρέστερη χαρτογράφηση της ελληνικής παραγωγής. Στόχος επίσης ήταν να προσδιοριστεί η αναλογία των ουσιών αυτών στο εκάστοτε δείγμα ελαιόλαδου, ώστε να γίνει μια προσπάθεια συσχέτισης της ποικιλίας με το φαινολικό προφίλ όπως απεικονίζεται στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .

### 12.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### 12.1.1 Οργανολογία

- **Φυγοκέντρωση**

Ο διαχωρισμός των στιβάδων ακετονιτριλίου και κυκλοεξανίου, που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους, έγινε στις 4000 rpm/ 5 min με χρήση της συσκευής Heraus Multifuge 3S Centrifuge. Η λειτουργία της συσκευής βασίζεται στην ανάπτυξη φυγόκεντρου δύναμης η οποία οδηγεί στο διαχωρισμό.

- **Λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$**

Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$  έγινε σε συσκευή NMR Bruker 600 και 400 MHz. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο  $\text{CDCl}_3$ .

#### 12.1.2 Κατεργασία δειγμάτων ελαιόλαδου–Παρασκευή εκχυλισμάτων

Για τις ανάγκες της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 5g από όλα τα δείγματα ελαιόλαδου τα οποία υποβλήθηκαν στη διαδικασία υγρής – υγρής εκχύλισης με κυκλοεξάνιο και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 4:5 όπως περιγράφεται νωρίτερα (βλ. παράγραφο 6.2.2)



### 12.1.3 Αρχή μεθόδου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Στα διαλύματα των ολικών φαινολικών εκχυλισμάτων των ελαιόλαδων πραγματοποιήθηκαν πειράματα  $^1\text{H-NMR}$  ώστε να επιτευχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης και αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη.

### 12.1.4 Εσωτερικό πρότυπο

Ως εσωτερική πρότυπη ουσία (IS) χρησιμοποιήθηκε η συριγγαλδεϋδη ή (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde), αφ' ενός γιατί δεν υπάρχει στο ελαιόλαδο και αφετέρου διότι το σήμα που δίνει το πρωτόνιο της αλδεϋδης της στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , βρίσκεται σε περιοχή που δεν επικαλύπτει κανένα σήμα των ουσιών που μελετήθηκαν. Το διάλυμα συριγγαλδεϋδης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση 0,5 mg/ml και για τις ανάγκες της ποσοτικοποίησης, σε κάθε δείγμα ελαιόλαδου που αναλύθηκε, είχε γίνει προσθήκη 1 ml από αυτό το διάλυμα.

## 12.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

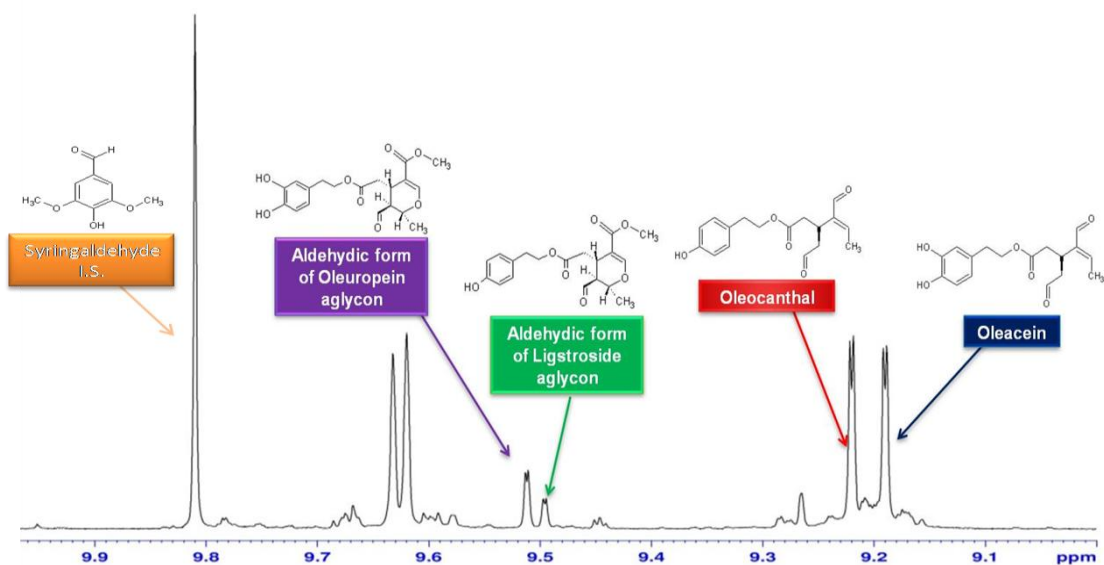
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν για την κάθε μια ουσία ξεχωριστά.

Στηριζόμενοι στην αναλογία της ολοκλήρωσης των κορυφών των ουσιών, σε σχέση με την κορυφή του εσωτερικού προτύπου, καθίσταται δυνατή η ποσοτική μέτρηση της κάθε μιας.

Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε κατεργασία των δειγμάτων ελαιόλαδου με υγρή-υγρή εκχύλιση με κυκλοεξάνιο και ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε εκλεκτική απομόνωση 25 ml από τη στιβάδα του ακετονιτρίλιου, όπου στη συνέχεια έγινε προσθήκη 1 ml διαλύματος συριγγαλδεϋδης συγκέντρωσης 0,5 mg/ml, συμπύκνωση και παραλαβή του τελικού εκχυλίσματος.

Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η ορθότητα των αποτελεσμάτων, μέσω της εξάλειψης ενός σοβαρού παράγοντα σφάλματος. Καθώς το εσωτερικό πρότυπο εμπεριέχεται ήδη στο εκχύλισμα, σε οποιαδήποτε κατεργασία συμβεί μετά, π.χ. αραίωση, απομάκρυνση μιας ποσότητας κ.λπ. η αναλογία εσωτερικού προτύπου και ουσίας διατηρείται σταθερή.

Εν συνεχεία, ακολούθησε λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ , ολοκλήρωση των κορυφών των τεσσάρων ουσιών και υπολογισμός της αναλογίας τους σε σχέση με την ολοκλήρωση της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.



**Εικόνα 24:** Τυπική εικόνα φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών και του εσωτερικού προτύπου (9–10 ppm)

Κατασκευάστηκαν τέλος πίνακες, όπου φαίνεται η αναλογία της ολοκλήρωσης για κάθε ουσία ξεχωριστά σε όλα τα δείγματα ελαιόλαδου καθώς και η ποσοτική σύσταση του εκάστοτε δείγματος ως προς τα τέσσερα σεκοϊριδοειδή που προαναφέρθηκαν.

Αναλυτικότερα, υπολογίστηκε η ολοκλήρωση της κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου της ελαιοκανθάλης (9.23 ppm), της ελαιασίνης (9.19 ppm), της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη (9.48 ppm) και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (9.50 ppm) ως προς την κορυφή του αλδεϋδικού πρωτονίου της συριγγαλδεϋδης (9.81 ppm) και δημιουργήθηκαν ειδικοί πίνακες ολοκληρώσεων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν μέσα σε ελαιόλαδο, για την κάθε ουσία ξεχωριστά, πραγματοποιήθηκε αναγωγή της ολοκλήρωσης των κορυφών, σε ποσότητα, που μετράται σε mg ουσίας ανά kg ελαιόλαδου (mg/ kg).

Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε πίνακες, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω στατιστική επεξεργασία τους.

### 12.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν 291 μονοποικιλιακά δείγματα ελαιόλαδου από όλη την Ελλάδα, με χρήση

φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$ . Σε κάθε δείγμα ελαιόλαδου ξεχωριστά, προσδιορίστηκαν οι τιμές ολοκληρώσεων ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης, αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκτροσιδίου και αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης σε σχέση με την ολοκλήρωση του εσωτερικού προτύπου. Με βάση τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν γι' αυτό το λόγο, προσδιορίστηκε η ακριβής ποσοτική σύσταση του ελαιόλαδου όσον αφορά σε αυτές τις τέσσερις ουσίες.

Τα δείγματα ελαιόλαδου προέρχονταν από διάφορες ελαιοκομικές περιοχές της Ελλάδας και κατά κύριο λόγο παράγονταν από παραγωγούς μικρής κλίμακας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ποικιλίες ελιάς και κατ' επέκταση ελαιόλαδου που παράγεται από αυτές, είναι πολλές και εμφανίζουν συγκεκριμένη διασπορά ανά την ελληνική επικράτεια.

Οι πιο γνωστές και χαρακτηριστικές ποικιλίες ελαιόλαδου που μελετήθηκαν είναι:

- Κορωνέικη
- Αδραμυτινή
- Αθηνολιά
- Αμφίσσης
- Θιακή
- Θρούμπα
- Κολοβή
- Λιανολιά
- Μανάκι
- Μεγαρίτικη
- Χαλκιδικής

Επίσης αναλύθηκαν και κάποια δείγματα ελαιόλαδου από αγριελιά.

Η πλειοψηφία των δειγμάτων που μελετήθηκαν ανήκε στην ποικιλία Κορωνέικη, καθώς είναι η πιο διαδεδομένη ελληνική ποικιλία για παραγωγή ελαιόλαδου.

Τα αποτελέσματα των ολοκληρώσεων που μετρήθηκαν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ , καταγράφηκαν σε ειδικούς πίνακες και στη συνέχεια έγινε αναγωγή της ολοκλήρωσης των κορυφών των ουσιών σε ποσοτήτα ουσίας ανά κιλό ελαιόλαδου με βάση τις καμπύλες αναφοράς.

Στους παρακάτω πίνακες απεικονίζεται η πλήρης, αναλυτική ποσοτική σύσταση των δειγμάτων ελαιόλαδου που αναλύθηκαν, σε ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη και αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης. Εξαιτίας του όγκου των δειγμάτων που μελετήθηκαν είναι προφανές, ότι η παράθεση όλων των αποτελεσμάτων είναι πρακτικά αδύνατη, έτσι λοιπόν εμφανίζονται μόνο τα 40 πλουσιότερα δείγματα. Οι πίνακες αποτελούν μέρος ενός ευρύτερου, ενιαίου πίνακα, που περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά και την ποσοτική σύσταση κάθε δείγματος ξεχωριστά, ωστόσο για λόγους ευκολίας κατά την ανάγνωση, ακολούθησε η διαίρεσή του σε τρία κομμάτια.

Για κάθε δείγμα που αναλύθηκε υπολογίστηκαν οι τιμές της ολοκλήρωσης για κάθε μια ουσία ως προς την ολοκλήρωση του εσωτερικού προτύπου. Κάθε δείγμα μετρήθηκε 2 φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος (M.O.) των δύο τιμών που προέκυψαν. Με βάση τις τιμές των M.O. υπολογίστηκε και η περιεκτικότητα σε mg/kg για όλες τις ουσίες.

Όπως αποδείχτηκε από τη μελέτη των αποτελεσμάτων της έρευνας, οι διαφορές που εντοπίζονται ανάμεσα στα ελαιόλαδα είναι ιδιαίτερα μεγάλες, όσον αφορά τη συγκέντρωση των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη, γεγονός που συμφωνεί και με άλλες πρόσφατες μελέτες (Cicerale S. et al., 2012).

Ειδικότερα, το εύρος των συγκεντρώσεων των τεσσάρων ουσιών ποικίλει, ξεκινώντας από μη ανιχνεύσιμες ποσότητες και φτάνοντας σε ανώτατο όριο για την ελαιοκανθάλη τα 712 mg/kg, για την ελαιασίνη τα 588 mg/kg, για την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης τα 258 mg/kg και για την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη τα 228 mg/kg.

Άμεσο συμπέρασμα όλων αυτών είναι η διαπίστωση πως, παρά το γεγονός ότι όλα τα ελαιόλαδα που αναλύθηκαν ανήκαν στην ευρύτερη κατηγορία «εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο», δεν εμφάνιζαν όλα το ίδιο προφίλ βιοδραστικών συστατικών. Ως εκ τούτου κρίθηκε απαραίτητη η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση νέους δείκτες που σχετίζονται άμεσα με τους ισχυρισμούς υγείας του ελαιόλαδου.

Μέσα από αυτή τη μελέτη λοιπόν, προτείνονται τρεις νέοι δείκτες (**D1**, **D2** και **D3**) για την κατηγοριοποίηση και αξιολόγηση των ελληνικών παρθένων ελαιόλαδων. Αναλυτικότερα, ο **δείκτης D1** είναι το άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε mg/kg, ο **δείκτης D2** είναι ο λόγος της ολοκλήρωσης της ελαιασίνης προς την ολοκλήρωση της ελαιοκανθάλης και ο **δείκτης D3** είναι το άθροισμα και των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών σε mg/kg και πιο συγκεκριμένα το άθροισμα της

ελαιοκανθάλης, της ελαιασίνης, της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη.

Είναι προφανές ότι, αφού οι δείκτες διαμορφώνονται από την περιεκτικότητα των ελαιόλαδων στις τέσσερις ουσίες, θα ακολουθούν μια ανάλογη πορεία με αυτές. Έτσι λοιπόν σύμφωνα με τις μετρήσεις ο δείκτης D1 κυμαίνεται από 0 – 1300 mg/ kg, ο δείκτης D2 από 0 – 1.99 και ο δείκτης D3 από 0 – 1534 mg/ kg.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, διαπιστώθηκε πως στη μεγάλη τους πλειονότητα, τα ελαιόλαδα περιείχαν και τις τέσσερις ουσίες. Παρ' όλα αυτά κάποια δείγματα εμφάνιζαν διαφοροποίηση, είτε εμφανίζοντας ορισμένες από τις ουσίες σε μικρότερο ποσοστό, είτε ακόμα και εξαιτίας της παντελούς έλλειψης κάποιων από τις τέσσερις. Οι ουσίες όμως που φαίνεται να διαμορφώνουν τη συνολική περιεκτικότητα των ελαιόλαδων σε σεκοϊριδοειδή είναι κατά κύριο λόγο η ελαιασίνη και η ελαιοκανθάλη.

Η κατάταξη των ελαιόλαδων και στους τρεις πίνακες που ακολουθούν, στηρίζεται στο δείκτη D3, που αποτελεί το άθροισμα και των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών και αναφέρεται αναλυτικότερα στον τρίτο πίνακα που ακολουθεί.

αα	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΝΟΜΟΣ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	Μ.Ο ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ	ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ mg/ kg	Μ.Ο ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ	ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ mg/ kg
1	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	2.62	711.86	2.08	588.28
2	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.24	339.07	1.84	521.71
3	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΑΝΤΙΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	1.31	357.49	1.45	410.95
4	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΚΡΗΤΗ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	1.94	528.19	1.37	389.69
5	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011	1.55	422.31	0.74	214.86
6	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.89	515.28	0.16	51.31
7	ΝΤΟΠΙΕΣ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	2.06	559.26	0.64	185.79
8	ΘΙΑΚΗ	ΙΘΑΚΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.48	403.35	1.12	319.99
9	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	2.32	631.91	0.35	103.56
10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	1.55	423.56	1.04	297.14
11	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	1.52	415.08	0.99	284.47
12	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	1.53	417.45	0.33	98.80
13	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	1.44	393.14	0.99	283.40
14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΑΝΤΙΠΑΡΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	1.27	348.04	0.98	279.49

αα	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΝΟΜΟΣ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	Μ.Ο ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ	ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ mg/ kg	Μ.Ο ΕΛΛΙΑΣΙΝΗΣ	ΕΛΛΙΑΣΙΝΗ mg/ kg
15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.77	196.53	1.09	291.67
16	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	1.25	341.72	0.65	189.12
17	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.04	284.62	0.94	268.77
18	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.83	212.10	0.97	259.44
19	ΑΓΟΥΡ. ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	1.00	274.03	0.64	184.86
20	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.39	378.64	0.13	42.58
21	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.84	215.01	0.81	217.18
22	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.05	286.45	0.56	161.73
23	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011	1.40	354.96	0.54	146.48
24	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.95	261.88	0.62	179.35
25	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	1.79	487.77	0.00	3.61
26	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.51	142.22	0.47	136.84
27	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	1.11	281.03	0.47	126.35
28	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	0.81	207.09	0.42	115.13
29	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.93	236.17	0.61	163.98
30	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΥΠΡΟΣ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013	0.98	267.68	0.56	162.24
31	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.91	249.83	0.52	151.33
32	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	0.78	198.65	0.74	197.72
33	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.78	199.67	0.55	148.30
34	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.77	197.17	0.48	129.19
35	ΛΙΑΝΟΛΙΑ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	1.24	340.20	0.29	87.17
36	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.72	184.11	0.46	125.75
37	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.72	183.92	0.61	164.12
38	ΑΓΟΥΡ. ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	ΚΑΒΑΛΑ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.49	135.79	0.19	58.69
39	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.80	221.58	0.44	128.25
40	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	1.02	257.99	0.39	104.78

**Πίνακας 18:** Ποσοτική σύσταση 40 ελληνικών ελαιόλαδων σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη (mg/ kg)

αα	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΝΟΜΟΣ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	Μ.Ο. ΑΓΛΥΚΟΥ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ	ΑΓΛΥΚΟ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ mg/ kg	Μ.Ο. ΑΓΛΥΚΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟ ΣΙΔΗ	ΑΓΛΥΚΟ ΛΙΓΚΣΤΡΟ ΣΙΔΗ mg/ kg
1	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.38	120.07	0.35	114.03
2	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.57	181.66	0.40	128.92
3	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΑΝΤΙΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.56	180.28	0.41	131.41
4	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΚΡΗΤΗ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.27	83.24	0.23	73.92
5	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011	0.50	172.20	0.41	142.30
6	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.44	139.27	0.71	228.06
7	ΝΤΟΠΙΕΣ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.27	80.78	0.29	93.60
8	ΘΙΑΚΗ	ΙΘΑΚΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.26	77.89	0.22	71.25
9	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.35	108.11	0.08	25.14
10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.23	68.23	0.23	74.32
11	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.22	64.50	0.20	64.34
12	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.79	257.85	0.13	40.79
13	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.18	52.68	0.18	58.87
14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΑΝΤΙΠΑΡΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.29	90.54	0.20	63.44
15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.45	155.94	0.19	67.22
16	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.25	76.51	0.26	83.27
17	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.26	78.93	0.16	52.26
18	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.39	131.97	0.22	78.51
19	ΑΓΟΥΡ. ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.38	117.63	0.27	86.93
20	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.38	119.71	0.31	100.41
21	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.35	120.24	0.20	68.68
22	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.30	93.23	0.22	69.24
23	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011	0.14	42.36	0.13	44.52
24	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.25	74.42	0.19	61.14
25	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.06	12.98	0.14	48.93
26	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.53	169.58	0.27	87.64
27	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.19	61.70	0.19	64.57
28	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	0.31	105.61	0.27	93.17

αα	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΝΟΜΟΣ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	Μ.Ο. ΑΓΛΥΚΟΥ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ	ΑΓΛΥΚΟ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ mg/ kg	Μ.Ο. ΑΓΛΥΚΟΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟ ΣΙΔΗ	ΑΓΛΥΚΟ ΛΙΓΚΣΤΡΟ ΣΙΔΗ mg/ kg
29	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.19	61.40	0.12	40.96
30	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΥΠΡΟΣ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013	0.12	32.97	0.09	27.15
31	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.15	42.12	0.14	43.22
32	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	0.17	51.40	0.10	33.42
33	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.23	76.19	0.15	52.73
34	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.29	97.18	0.14	50.31
35	ΛΙΑΝΟΛΙΑ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.06	11.66	0.10	33.01
36	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	0.26	86.71	0.21	74.20
37	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.23	76.14	0.12	42.90
38	ΑΓΟΥΡ. ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	ΚΑΒΑΛΑ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	0.76	246.74	0.07	21.90
39	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	0.19	53.93	0.18	58.77
40	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	0.16	50.41	0.13	46.30

**Πίνακας 19:** Ποσοτική σύσταση 40 ελληνικών ελαιόλαδων σε αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη (mg/ kg)



αα	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΝΟΜΟΣ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	D1 ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ+ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ mg/ kg	D2 ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ/ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ (INT.)	D3 ΑΘΡΟΙΣΜΑ 4 ΣΕΚΟΙΡΙΔΟΕΙΔΩΝ mg/ kg
1	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	1300.14	0.79	1534.24
2	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	860.78	1.49	1171.36
3	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΑΝΤΙΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	768.44	1.11	1080.13
4	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΚΡΗΤΗ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	917.88	0.71	1075.04
5	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011	637.16	0.48	951.66
6	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	566.59	0.08	933.92
7	ΝΤΟΠΙΕΣ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	745.04	0.31	919.43
8	ΘΙΑΚΗ	ΙΘΑΚΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	723.34	0.76	872.47
9	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	735.47	0.15	868.71
10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	720.69	0.67	863.25
11	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	699.54	0.65	828.38
12	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	516.25	0.22	814.89
13	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	676.55	0.69	788.10
14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΑΝΤΙΠΑΡΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	627.52	0.77	781.50
15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	488.20	1.42	711.35
16	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	530.83	0.52	690.61
17	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	553.39	0.90	684.58
18	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	471.54	1.17	682.01
19	ΑΓΟΥΡ. ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	458.89	0.64	663.45
20	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	421.22	0.09	641.34
21	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	432.19	0.96	621.11
22	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	448.19	0.53	610.66
23	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΑΡΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011	501.44	0.39	588.32
24	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	441.23	0.65	576.79
25	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	491.38	0.00	553.30
26	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	279.06	0.91	536.28
27	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	407.38	0.42	533.64
28	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	322.23	0.52	521.01

αα	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΝΟΜΟΣ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	D1 ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ+ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ mg/ kg	D2 ΕΛΑΙΑΣΙΝΗ/ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗ (INT.)	D3 ΑΘΡΟΙΣΜΑ 4 ΣΕΚΟΙΡΙΔΟΕΙΔΩΝ mg/ kg
29	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	400.15	0.66	502.51
30	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΥΠΡΟΣ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013	429.92	0.57	490.03
31	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	401.16	0.57	486.49
32	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	396.37	0.95	481.19
33	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	347.96	0.70	476.88
34	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	326.35	0.62	473.84
35	ΛΙΑΝΟΛΙΑ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	427.37	0.23	472.05
36	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΟΛΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ	309.86	0.65	470.77
37	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	348.04	0.85	467.07
38	ΑΓΟΥΡ. ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	ΚΑΒΑΛΑ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012	194.48	0.38	463.13
39	ΘΡΟΥΜΠΑ	ΘΑΣΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012	349.83	0.54	462.53
40	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011	362.77	0.38	459.48

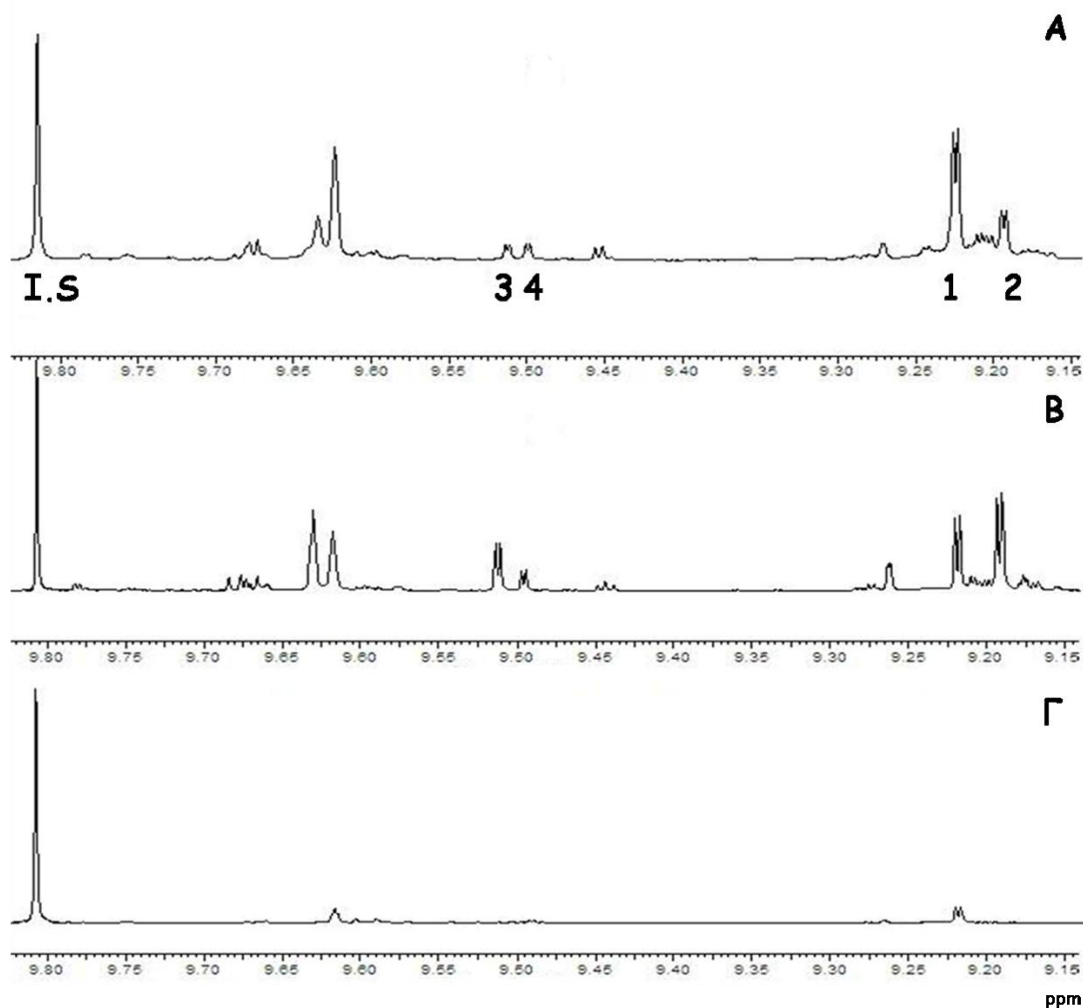
**Πίνακας 20:** Δείκτες D1, D2, D3 40 ελληνικών ελαιόλαδων

**D1=** ελαιοκανθάλη+ ελαιασίνη (mg/ kg)

**D2=** ελαιασίνη/ ελαιοκανθάλη (int.)

**D3=** ελαιοκανθάλη+ ελαιασίνη+ άγλυκο λιγκτροσίδη+ άγλυκο ελευρωπαΐνης (mg/ kg)

Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε μια πολύ χαρακτηριστική σύγκριση και συσχέτιση των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  ελαιόλαδων από διαφορετικές ποικιλίες, με διαφορετική αναλογία ως προς τις τέσσερις ουσίες. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρατηρούνται διαφορές ακόμη και ανάμεσα σε ελαιόλαδα που ανήκουν στην ίδια ποικιλία. Στην εικόνα φαίνεται η αναλογία των ουσιών ως προς το εσωτερικό πρότυπο (συριγγαλδεΐδη, απλή κορυφή στα 9.81 ppm) όπου οι ποσοτικές και ποιοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ελαιόλαδων είναι πασιφανείς.



**Εικόνα 24:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  με τις χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις σεκοϊριδοειδών στην περιοχή 9.1–9.8 ppm από διαφορετικά δείγματα ελαιόλαδου όπου

1 = Ελαιοκανθάλη

2 = Ελαιασίνη

3 = Αλδεΐδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης

4 = Αλδεΐδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη

I.S = Εσωτερικό πρότυπο

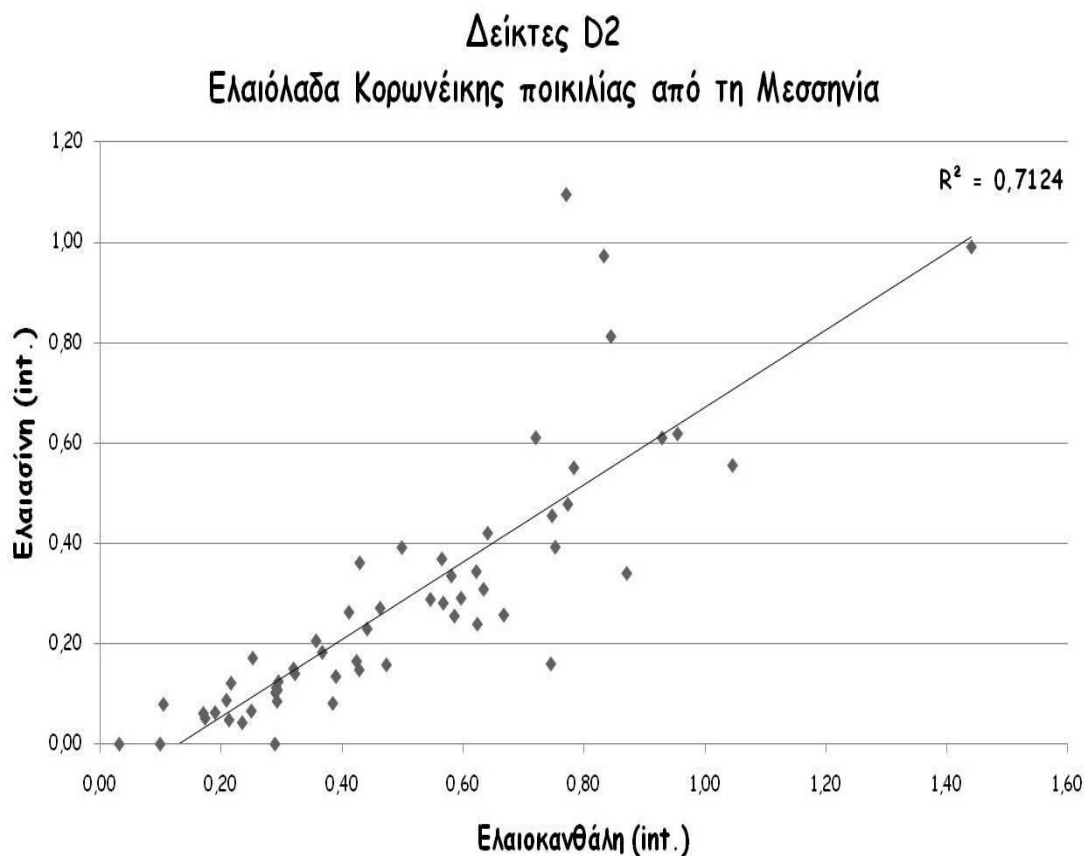
A = Κορωνέικη ποικιλία με τυπική αναλογία ελαιοκανθάλης / ελαιασίνης

B = Κορωνέικη ποικιλία με ασυνήθιστη αναλογία ελαιοκανθάλης / ελαιασίνης

Γ = Μεγαρίτικη ποικιλία

Η διάκριση των ελαιόλαδων με βάση την περιεκτικότητά τους σε σεκοϊριδοειδή, μπορεί να βασιστεί σε πολλά κριτήρια και με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται πολλές επιμέρους κατηγορίες.

Μια αρχική κατηγοριοποίηση βασίζεται στην αναλογία ελαιασίνης/ελαιοκανθάλης (δείκτης D2). Ο λόγος των ολοκληρώσεων των δύο ουσιών φαίνεται να εξαρτάται από την ποικιλία του ελαιόλαδου, πιθανότατα για γενετικούς λόγους και να είναι ανεξάρτητος από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες παράγεται ένα ελαιόλαδο. Στο συμπέρασμα αυτό οδήγησε και το γεγονός ότι, μελετώντας μια συγκεκριμένη ομάδα 56 δειγμάτων που ανήκαν όλα στην ποικιλία Κορωνέικη από την περιοχή της Μεσσηνίας, παρατηρήθηκε ότι, παρά τις διακυμάνσεις στον δείκτη D1, οφειλόμενες κατά κύριο λόγο στις διαφορετικές συνθήκες συγκομιδής και επεξεργασίας του καρπού, η συσχέτιση ανάμεσα στην ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη ήταν σχεδόν γραμμική ( $R^2=0.7124$ ).



**Εικόνα 25:** Διασπορά δεικτών D2 σε 56 δείγματα ελαιόλαδου Κορωνέικης ποικιλίας από την περιοχή της Μεσσηνίας

Στηριζόμενοι στις προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με την αναλογία ελαιασίνης/ελαιοκανθάλης στα δείγματα που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ταξινόμηση των ελαιόλαδων με βάση το δείκτη D2 συμπεριλαμβάνοντας και όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Από την ταξινόμηση προέκυψαν τέσσερις νέες κατηγορίες ελαιόλαδων.

#### Ελαιόλαδα με αναλογία ελαιασίνης/ ελαιοκανθάλης μεγαλύτερη από 1

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται μόνο 4 δείγματα ελαιόλαδου αποκλειστικά Κορωνέικης ποικιλίας που προέρχονται από την περιοχή της Μεσσηνίας, των Χανίων και της Αντιπάρου. Είναι προφανές ότι σε αυτά τα δείγματα, η περιεχόμενη ελαιασίνη είναι περισσότερη από την ελαιοκανθάλη. Παρ' όλα αυτά, το γεγονός αυτό αποτελεί εξαίρεση και επιβεβαιώνεται και από τη μικρή εκπροσώπηση από δείγματα.

#### Ελαιόλαδα με αναλογία ελαιασίνης/ ελαιοκανθάλης μεγαλύτερη από 0,5 και μικρότερη από 1

Κυριότερος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι επίσης η Κορωνέικη ποικιλία από την περιοχή της Μεσσηνίας, της Λακωνίας, της Ζακύνθου, της Κρήτης, της Ηλείας, της Πάρου και της Αντιπάρου. Επίσης απαντώνται και ελαιόλαδα από τις ποικιλίες Αθηνολιά, Χαλκιδικής, Θιακή, Αγριελιά, Κολοβή και Αμφίσσης.

#### Ελαιόλαδα με αναλογία ελαιασίνης/ ελαιοκανθάλης μεγαλύτερη από 0,25 και μικρότερη από 0,5

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα περισσότερα δείγματα ελαιόλαδων που μελετήθηκαν. Ως επί τω πλείστον ανήκουν στην Κορωνέικη ποικιλία και προέρχονται από τη Ζάκυνθο, τη Μεσσηνία, την Ηλεία, τη Λακωνία και την Κρήτη. Επίσης εδώ ανήκει και το ελαιόλαδο από τις ποικιλίες Θρούμπα Θάσου, Λιανολιά Κερκύρας, Αθηνολιά, Μεγαρίτικη, Χαλκιδικής, Κολοβή και Μανάκι.

#### Ελαιόλαδα με αναλογία ελαιασίνης/ ελαιοκανθάλης μικρότερη από 0,25

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κατά κύριο λόγο τα δείγματα από τις ποικιλίες Μεγαρίτικη Βοιωτίας και Σαλαμίνας καθώς και αρκετά δείγματα από την ποικιλία Μανάκι από Κορινθία και Αργολίδα και από την ποικιλία Αδραμυτινή της Λέσβου. Επίσης συμπεριλαμβάνονται και μικρός αριθμός ελαιόλαδων από όλες σχεδόν τις ποικιλίες που μελετήθηκαν όπως Θρούμπα, Χαλκιδικής, Λιανολιά, Κολοβή, Αθηνολιά, Αμφίσσης ακόμα και Κορωνέικη.

Στην τελευταία κατηγορία φυσιολογικά εμπίπτουν ελαιόλαδα από τις ποικιλίες Αδραμυτινή, Μεγαρίτικη και Μανάκι. Οι ποικιλίες αυτές χαρακτηρίζονται γενετικά από μειωμένα ποσοστά ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης. Πιθανότατα ο λόγος που συμπεριλαμβάνονται δείγματα και από τις άλλες ποικιλίες είναι ότι οι συνθήκες παραγωγής αυτών των δειγμάτων ελαιόλαδου δεν ήταν οι κατάλληλες για να παραχθεί ποιοτικό προϊόν με υψηλή περιεκτικότητα σε σεκοϊριδοειδή (π.χ. υψηλές θερμοκρασίες έκθλιψης και μάλαξης, υπέρωριμοι ελαιοκαρποί κ.λπ.).

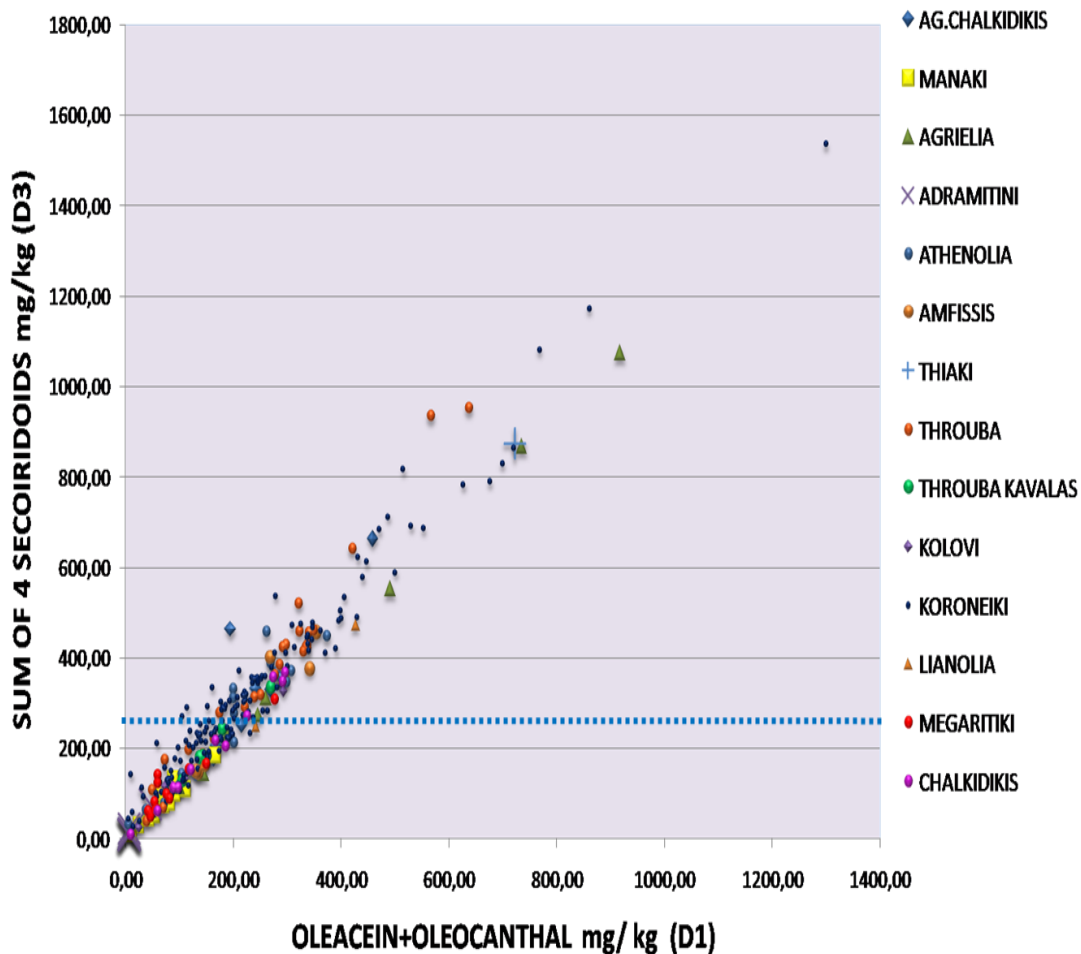
Κατόπιν προσεκτικής μελέτης των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  όλων των ελαιόλαδων, παρατηρήθηκαν αισθητές διαφορές στις αναλογίες των ουσιών, οι οποίες συσχετίζονται με την ποικιλία. Για την καλύτερη κατανόηση των διαγραμμάτων που ακολουθούν παρατίθενται εν συντομία οι πιο σημαντικές από αυτές:

- Οι ποικιλίες Θρούμπα και Αγριελιά χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά ελαιοκανθάλης αλλά αρκετά χαμηλά ποσοστά ελαιασίνης.
- Ποικιλίες όπως το Μανάκι, η Μεγαρίτικη, η Αδραμυτινή και η Χαλκιδικής δεν είναι ιδιαίτερα πλούσιες όσον αφορά και τις δύο ουσίες, ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη.
- Ποικιλίες όπως η Κορωνέικη, η Λιανολιά, η Κολοβή, η Αθηνολιά, η Αμφίσσης και η Θιακή χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές τόσο ελαιοκανθάλης όσο και ελαιασίνης.

Μια δεύτερη κατάταξη των δειγμάτων ελαιόλαδου που μελετήθηκαν, βασίζεται στους δείκτες D3 και D1 όπου ο D1 συμπεριλαμβάνεται κατά κάποιο τρόπο μέσα στον D3. Στηριζόμενοι στους πίνακες που αναφέρθηκαν προηγουμένως κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα όπου απεικονίζει τη σχέση των δύο δεικτών.

Το διάγραμμα αυτό απεικονίζει τη συσχέτιση του άθροισματος των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών (δείκτης D3) με το άθροισμα ελαιασίνη + ελαιοκανθάλη (δείκτης D1), για όλα τα ελαιόλαδα που αναλύθηκαν το χρονικό διάστημα 2009–2013. Είναι εμφανές από το διάγραμμα ότι η εξίσωση που προκύπτει είναι της μορφής  $y=ax+\beta$ . Η νοητή γραμμή τάσης που δημιουργείται, περνάει σχεδόν από την αρχή των αξόνων. Ως εκ τούτου εξάγεται το συμπέρασμα ότι το  $\beta$ , όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι το άθροισμα των δύο άγλυκων (ελευρωπαΐνης και λιγκοτροσιδή) είναι αρκετά μικρό.

## EXTRA VIRGIN OLIVE OILS 2009 - 2013

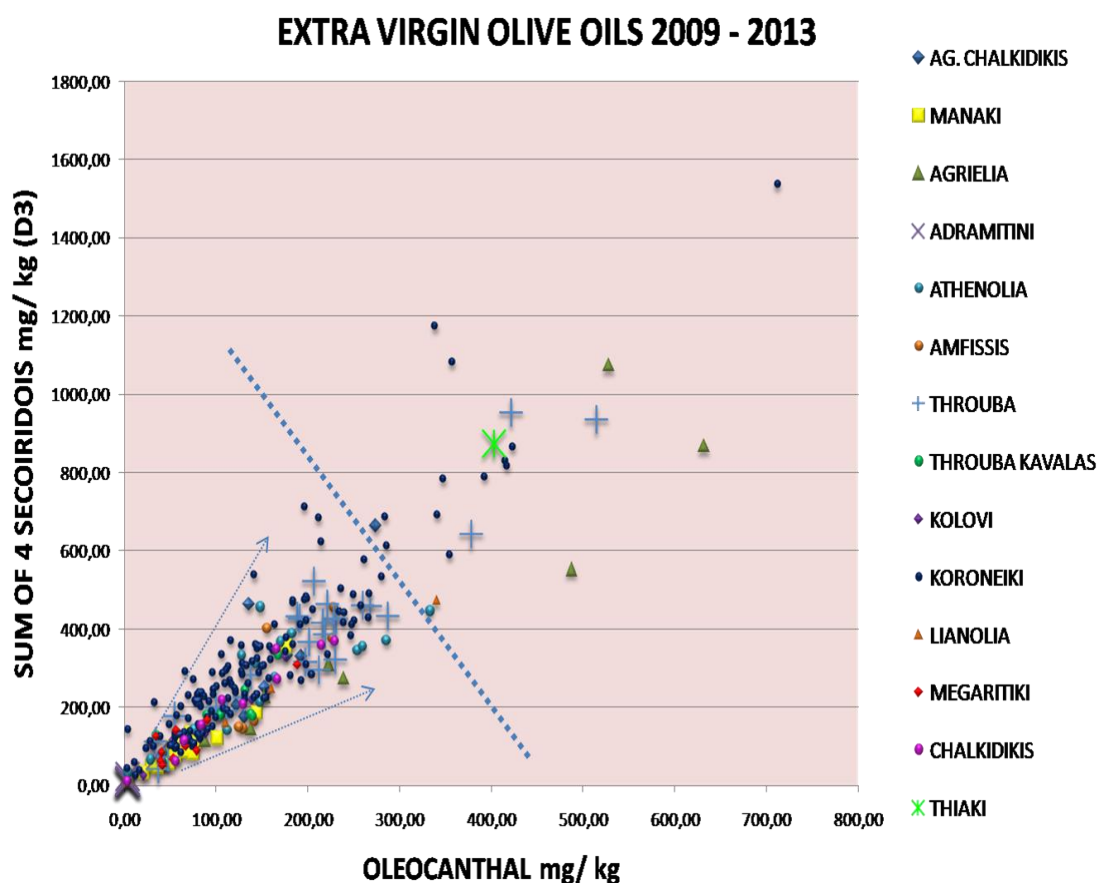


**Διάγραμμα 1:** Συσχέτιση του δείκτη D3 με το δείκτη D1 για όλα τα ελαιόλαδα που αναλύθηκαν το χρονικό διάστημα 2009–2013

Επίσης, είναι σαφές πως ο δείκτης D3 εξ' ορισμού αποτελείται από το δείκτη D1 και το άθροισμα των δύο άγλυκων. Το γεγονός λοιπόν πως σχεδόν κανένα από τα δείγματα ελαιόλαδου που μελετήθηκαν δεν ξεφεύγει από αυτή τη γραμμή τάσης του διαγράμματος, αποδεικνύει ότι σε όλα τα δείγματα, το ποσοστό των δύο άγλυκων είναι μικρό.

Στο παραπάνω διάγραμμα σημειώνεται με στικτή γραμμή το όριο των 250 mg/ kg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της όπως ορίζεται από τη νέα ευρωπαϊκή νομοθεσία. Είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικός ο μεγάλος αριθμός ελληνικών ελαιόλαδων που βρίσκονται πάνω από αυτό το όριο, γεγονός που υπερτονίζει την ελληνική παραγωγή και επιβεβαιώνει την υψηλή ποιότητα των ελληνικών ελαιόλαδων.

Κατασκευάστηκε στη συνέχεια ένα δεύτερο διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η συσχέτιση του δείκτη D3 με την ελαιοκανθάλη για όλα τα ελαιόλαδα που αναλύθηκαν το χρονικό διάστημα 2009–2013.



**Διάγραμμα 2:** Συσχέτιση του δείκτη D3 με την περιεχόμενη ελαιοκανθάλη για όλα τα ελαιόλαδα που αναλύθηκαν το χρονικό διάστημα 2009–2013

Είναι εμφανές ότι συγκριτικά με το προηγούμενο διάγραμμα, η διασπορά των τιμών σ' αυτό είναι μεγαλύτερη και δεν υπάρχει τόσο καλή γραμμικότητα. Όπως σημειώνεται με τη στικτή γραμμή, όσο προχωράμε στην περιοχή του διαγράμματος με τις μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης, τόσο αυξάνεται και η διασπορά των τιμών.

Αντίθετα, στην περιοχή από 0–200 mg/ kg όσον αφορά και τις δύο συνιστώσες, η γραμμικότητα βελτιώνεται αισθητά. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, σε αυτή την περιοχή συναντάμε κατά κύριο λόγο ποικιλίες όπως το Μανάκι, η Μεγαρίτικη, η Αδραμυτινή και η Χαλκιδικής οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε ελαιασίνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις τιμές των σημείων στους δύο άξονες οι οποίες αυξάνονται σχεδόν αναλογικά. Συνεπώς στηριζόμενοι και στο προηγούμενο συμπέρασμα ότι τα δύο άγλυκα δεν επηρεάζουν τόσο πολύ το δείκτη D3, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ελαιοκανθάλη είναι τελικά



αυτή που διαμορφώνει τους δείκτες D1 και D3 σε αυτές τις ποικιλίες. Σε αυτή την περιοχή του διαγράμματος συναντάμε επίσης και ελαιόλαδα από αρκετές ποικιλίες που φυσιολογικά δεν κατατάσσονται τόσο χαμηλά (π.χ. ελαιόλαδα Κορωνέικης ποικιλίας), αλλά βρίσκονται σ' αυτό το σημείο πιθανότατα λόγω λανθασμένων συνθηκών παραγωγής.

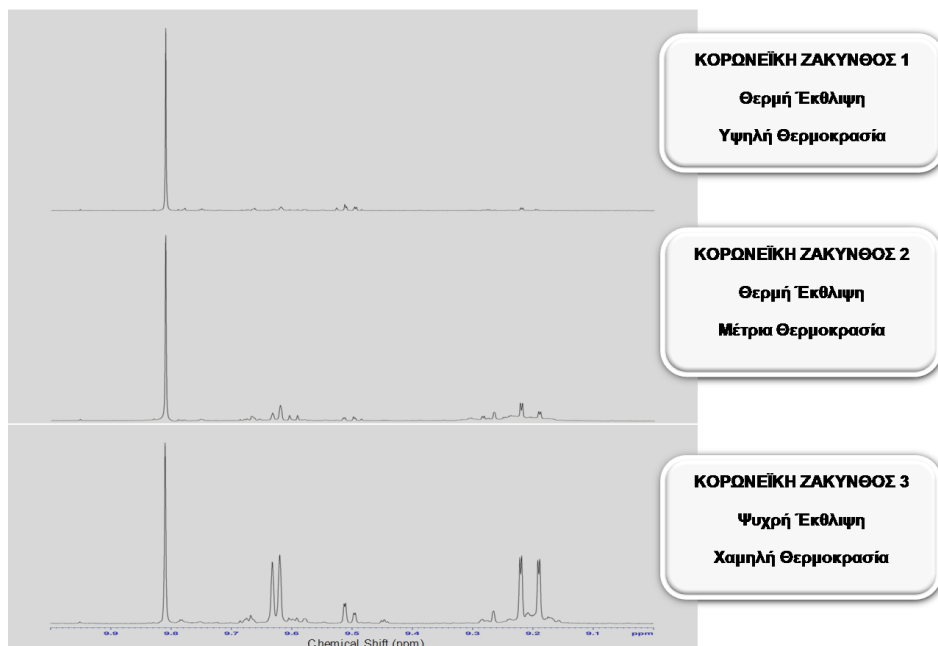
Προχωρώντας στις μεγαλύτερες τιμές του διαγράμματος βλέπουμε τη διασπορά να αυξάνεται. Τα ελαιόλαδα που βρίσκονται σε υψηλότερα πεδία χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερα ποσοστά ελαιοκανθάλης αλλά και ελαιασίνης. Γι' αυτό το λόγο χάνεται και η αναλογική σχέση μεταξύ των τιμών στους δύο άξονες καθώς πλέον η περιεχόμενη ελαιασίνη συμβάλλει κι αυτή στη διαμόρφωση των δεικτών.

Υπάρχουν ωστόσο και ορισμένα δείγματα που ξεφεύγουν από τα υπόλοιπα, περιέχοντας ελαιοκανθάλη πάνω από 500 mg/ kg και χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλούς δείκτες καταλαμβάνοντας μια ξεχωριστή θέση στο διάγραμμα. Σε αυτή την περιοχή ανήκουν ελαιόλαδα από τις ποικιλίες Κορωνέικη, Θρούμπα, Θιακή και Αγριελιά.

#### **12.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΕΚΘΛΙΨΗΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Ένα άλλο πολύ σημαντικό εύρημα που προέκυψε από την παρούσα μελέτη ήταν το γεγονός ότι, ορισμένα δείγματα ελαιόλαδου, παρά το ότι προέρχονταν από την ίδια ποικιλία και την ίδια περιοχή, εμφάνισαν πολύ διαφορετικό προφίλ στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ . Συγκεκριμένα αναφέρεται το παράδειγμα τριών δειγμάτων Κορωνέικης ποικιλίας από τη Ζάκυνθο. Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά και στην εικόνα που ακολουθεί, η θερμοκρασία εξαγωγής του ελαιόλαδου από τον καρπό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ποιοτική και ποσοτική σύσταση του τελικού προϊόντος καθώς, αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει μείωση στην ποσότητα των περιεχόμενων ουσιών.

Αν και έχει αποδειχθεί πως η Κορωνέικη είναι μια ποικιλία από την οποία δύναται να παραχθεί ελαιόλαδο πλούσιο σε φαινολικές ουσίες και συγκεκριμένα στα τέσσερα σεκοϊριδοειδή που μελετώνται, είναι σαφές ότι, εάν η έκθλιψη των καρπών γίνει σε μεγαλύτερη θερμοκρασία από την επιτρεπτή, η ποιότητα υποβαθμίζεται ανεπανόρθωτα. Εξ' αιτίας του θερμοευαίσθητου χαρακτήρα των ουσιών αυτών, είναι πρακτικά αδύνατο να υπάρξουν σε ένα ελαιόλαδο που έχει εξαχθεί σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία.



**Εικόνα 26:** Επίδραση της θερμοκρασίας έκθλιψης του ελαιοκαρπού στη σύσταση του ελαιόλαδου

## 12.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Ένα γεγονός που απασχολεί ιδιαίτερα όλους αυτούς που ασχολούνται με το ελαιόλαδο επαγγελματικά αλλά και τους συνειδητοποιημένους καταναλωτές που ενδιαφέρονται για την ποιότητα του ελαιόλαδου που φτάνει στο τραπέζι τους είναι η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην ποιότητα του ελαιόλαδου. Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, ασχοληθήκαμε εν μέρει και με τη σταθερότητα που εμφανίζουν δείγματα ελαιόλαδου όσο περνάει ο καιρός, προσομοιάζοντας τις συνθήκες υπό τις οποίες διατηρείται το ελαιόλαδο σε ένα τυπικό ελληνικό σπίτι. Αν και η μέτρηση όλων των δειγμάτων και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ήταν χρονικά αδύνατη, μέσα από κάποια ενδεικτικά αλλά στοχευμένα πειράματα σε συγκεκριμένα δείγματα, μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα που αποτελούν ένδειξη και για τα υπόλοιπα δείγματα με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά που αναλύθηκαν.

Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 12 μηνών, μετρήθηκαν κάποια δείγματα ελαιόλαδου για να προσδιοριστούν τα επίπεδα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης που περιείχαν. Τα δείγματα παρήχθησαν το Δεκέμβριο του 2010 και μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα μετά την παραγωγή τους και 12 μήνες αργότερα. Εν τω μεταξύ, τα δείγματα διατηρήθηκαν σε σκουρόχρωμες γυάλινες φιάλες σε ξηρό και

δροσερό μέρος. Για τα ελαιόλαδα με  $D1 > 200$  η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν κατά μέσο όρο της τάξεως του 10-15% με την ελαιασίνη να εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό μείωσης από ότι η ελαιοκανθάλη. Ωστόσο, στην περίπτωση των ελαιόλαδων με  $D1 < 100$  η μείωση έφτασε το 50% στους 12 μήνες.

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η υψηλή περιεκτικότητα ενός ελαιόλαδου σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη του προσδίδει αυξημένη οξειδωτική σταθερότητα και μεγαλύτερη αντοχή στο χρόνο. Με αυτόν τον τρόπο, πλεονεκτεί έναντι άλλων ελαιόλαδων που δεν έχουν τόσο υψηλή περιεκτικότητα σε αυτές τις ουσίες.

## **12.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑΣ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Μια ακόμη θεωρία που επιβεβαιώνεται μέσα από τη μελέτη αυτή είναι η επίδραση της ημερομηνίας συγκομιδής του καρπού στην ποσοτική σύσταση του παραγόμενου ελαιόλαδου. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν σε αυτό το κομμάτι και έχουν ήδη αναφερθεί εκτενώς, είναι γνωστό πως τα ελαιόλαδα που παράγονται από άγουρους καρπούς, π.χ. στα μέσα Οκτωβρίου περίπου είναι αρκετά πλουσιότερα σε πολυφαινολικά συστατικά έναντι αυτών που παράγονται για παράδειγμα, τέλη Δεκεμβρίου.

Σε μια προσπάθεια εξέλιξης αυτής της παραδοχής αναλύθηκαν δύο δείγματα ελαιόλαδου. Το ένα ανήκει στην ποικιλία Θρούμπα από την περιοχή της Θάσου και το άλλο στην ποικιλία Κορωνέικη από την περιοχή της Μεσσηνίας. Το ελαιόλαδο από τη Μεσσηνία παρήχθη σε δύο στάδια, ένα μέρος στα τέλη Νοεμβρίου 2011 και το υπόλοιπο στα μέσα Ιανουαρίου 2012. Παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη μείωση και στις τέσσερις ουσίες η οποία απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα. Το ελαιόλαδο από τη Θάσο παρήχθη σε τέσσερα στάδια αλλά πιο συμπυκμένα συγκριτικά με το προηγούμενο, ξεκινώντας από 17 Νοεμβρίου 2012 και τελειώνοντας στις 3 Δεκεμβρίου 2012 όπου επίσης παρατηρήθηκε μια φθίνουσα πορεία στις τέσσερις ουσίες.

Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες μη αναμενόμενες αυξομειώσεις που παρατηρούνται στο ελαιόλαδο της Θάσου, οφείλονται πιθανότατα σε κάποιους αστάθμητους παράγοντες, για παράδειγμα εάν κάποιο σημείο του χωραφιού είναι προσήλιο ή όχι, εάν αρδεύεται με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα σημεία κλπ. Παρ' όλα αυτά, σαν γενικό συμπέρασμα προκύπτει ότι τελικά η περιεκτικότητα των ουσιών στο ελαιόλαδο ακολουθεί μια φθίνουσα πορεία με την πάροδο του χρόνου.

mg/ kg	Κορωνέικη Μεσσηνίας		Θρούμπα Θάσου			
	Νοέμβριος 2011	Ιανουάριος 2012	17/11- 22/11	21/11- 28/11	23/11- 26/11	27/11- 3/12
Ελαιοκανθάλη	212	56	288	212	198	230
Ελαιασίνη	259	26	50	10	41	22
Άγλυκο Ελευρωπαΐνης	132	26	47	32	35	27
Άγλυκο Λιγκστροσίδη	79	24	48	39	41	41

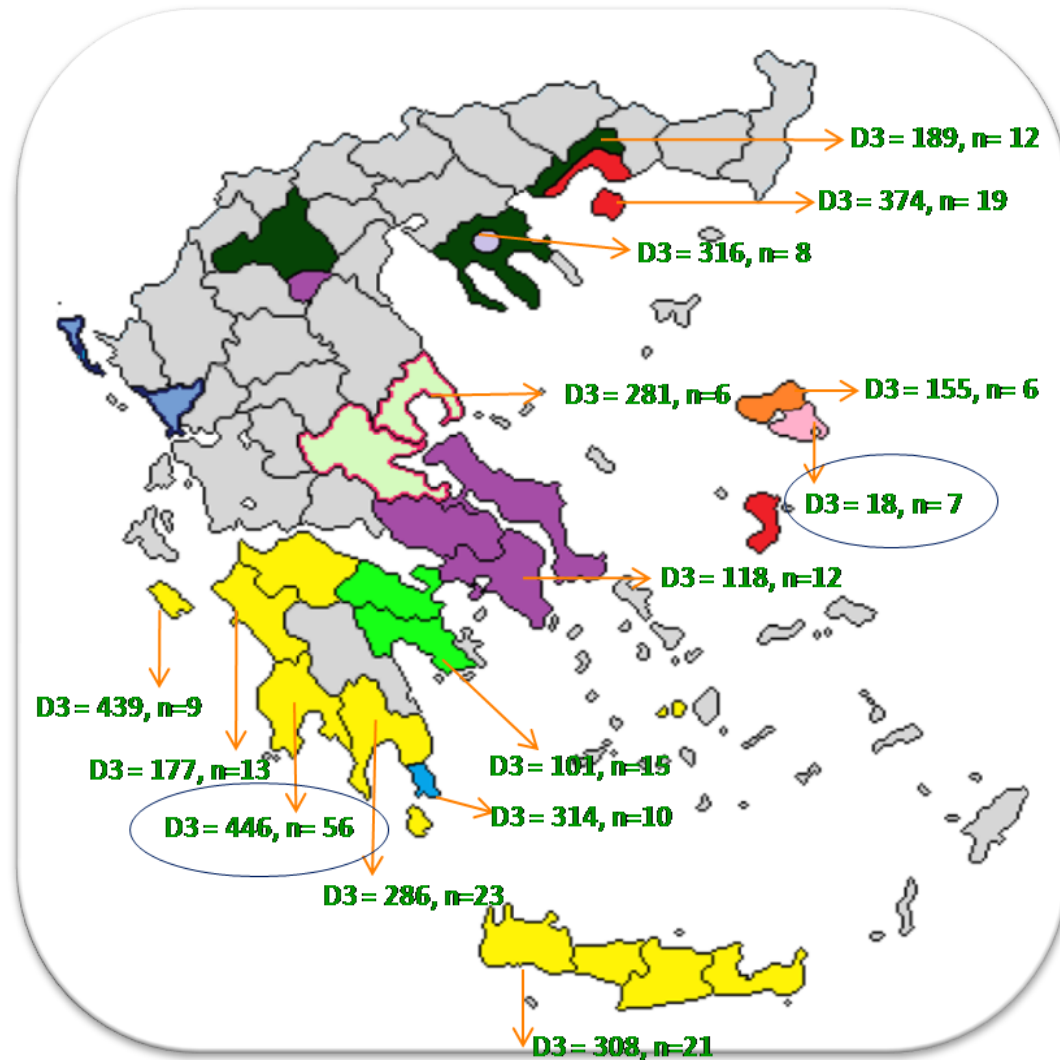
**Πίνακας 21:** Επίδραση της ημερομηνίας συγκομιδής του καρπού στην ποσοτική σύσταση του παραγόμενου ελαιόλαδου

## 12.7 ΣΥΝΟΨΗ-ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ

Συνοψίζοντας, μετά από την ενδελεχή μελέτη 291 δειγμάτων ελληνικού εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου κρίθηκε σκόπιμη η δημιουργία ενός χάρτη όπου απεικονίζονται διαγραμματικά όλα τα αποτελέσματα και πιο συγκεκριμένα, η ποικιλία ελαιόλαδου που συναντάται ανά περιοχή, ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν καθώς και ο μέσος όρος του δείκτη D3 ανά ποικιλία και περιοχή.

Είναι προφανές ότι ο δείκτης D3 εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη δυνατότητα που έχει η κάθε ποικιλία να παράγει ελαιόλαδο πλούσιο σε ελαιασίνη, ελαιοκανθάλη και στα δύο άγλυκα. Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά και στο χάρτη, η πλουσιότερη ποικιλία που μελετήθηκε ήταν η Κορωνέικη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσσηνίας. Συγκεκριμένα από αυτή την ποικιλία και περιοχή μελετήθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων (n=56) και μετρήθηκε ο μεγαλύτερος μ.ο. δεικτών D3. Στο αντίθετο άκρο βρίσκεται η ποικιλία Αδραμυτινή από τη Λέσβο όπου ο μ.ο. των δεικτών D3 είναι μόλις 18.

Σε αυτόν το χάρτη λοιπόν αποτυπώνονται σχηματικά οι πολύ μεγάλες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των διαφορετικών ελληνικών ελαιόλαδων και τον καθιστούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στα χέρια όλων αυτών που επιθυμούν να ασχοληθούν με το ελαιόλαδο.



**Εικόνα 27:** Χάρτης Ελλάδας όπου απεικονίζεται ο μ.ο. των δεικτών D3 ανά ποικιλία, ανά περιοχή και ανά αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν

## 13 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία είναι ότι:

- ✓ Υπάρχουν πολύ μεγάλες διαφορές στα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα όσον αφορά τα υγειοπροστατευτικά συστατικά τους
- ✓ Οι διαφορές αυτές δεν οφείλονται μόνο σε γενετικά κριτήρια, αλλά σε πολύ μεγάλο βαθμό στον τρόπο και τη διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου

Πιο συγκεκριμένα καταλήγουμε στα εξής:

- Τα ελαιόλαδα που προέρχονται από την ίδια ποικιλία εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  όσον αφορά τα σεκοϊριδοειδή που περιέχουν και συγκεκριμένα την ελαιοκανθάλη, την ελαιασίνη, την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη
- Εντοπίζεται μια συστηματική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών ελαιόλαδου η οποία αφορά κατά κύριο λόγο στο περιεχόμενο σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη και όχι τόσο στα δύο άγλυκα. Ορισμένες ποικιλίες χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, άλλες από χαμηλές τιμές και των δύο ουσιών και κάποιες από αυξημένα ποσοστά ελαιοκανθάλης αλλά χαμηλά ποσοστά ελαιασίνης
- Τα ελαιόλαδα που προέρχονται από ψυχρή έκθλιψη είναι κατά κύριο λόγο πλούσια σε ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη, ενώ αντίθετα τα ελαιόλαδα που προέρχονται από θερμή έκθλιψη είναι αρκετά φτωχότερα και σε ορισμένες περιπτώσεις στερούνται ολοκληρωτικά και τις δύο ουσίες
- Μεταξύ ελαιόλαδων της ίδιας ποικιλίας μπορεί να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές οι οποίες πιθανότατα οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες παραγωγής του ελαιόλαδου

Όσον αφορά στην πειραματική διαδικασία:

- ✓ Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος που επιτρέπει τον άμεσο ποσοτικό προσδιορισμό ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης, αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε ελαιόλαδο με χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$

- ✓ Με τη μέθοδο αυτή αποφεύγεται η χρήση συνήθων χρωματογραφικών μεθόδων που περιλαμβάνουν τη χρήση διαλυτών όπως η MeOH και το H<sub>2</sub>O οι οποίοι αντιδρούν με τις ουσίες αυτές προκαλώντας ανεπιθύμητη ζημιά
- ✓ Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι απλή, γρήγορη, οικονομική και οικολογική εφόσον δεν απαιτεί μεγάλη κατανάλωση διαλυτών
- ✓ Δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού **τριών νέων δεικτών αξιολόγησης του ελαιόλαδου D1, D2, D3** όπου

**D1= ελαιοκανθάλη+ ελαιασίνη (mg/ kg)**

**D2= ελαιασίνη/ ελαιοκανθάλη (int.)**

**D3= ελαιοκανθάλη + ελαιασίνη + άγλυκο ελευρωπαΐνης + άγλυκο λιγκτροσίδη (mg/ kg)**

και, κατ' επέκταση, δίνεται η ευκαιρία στους παραγωγούς να αναδείξουν το προϊόν τους, εξασφαλίζοντας παράλληλα την ποιότητα αλλά και την προστασία της ανθρώπινης υγείας

- ✓ Τέλος, η μέθοδος αυτή αποτελεί μια καινοτομία στον τομέα του ελαιόλαδου καθώς δίνεται η δυνατότητα πιστοποίησης και ελέγχου των χαρακτηριστικών και της ποιότητας του ελαιόλαδου με μια μέθοδο εύκολα εφαρμόσιμη και προσιτή



## Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative $^1\text{H}$ NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils

Evangelia Karkoula,<sup>†</sup> Angeliki Skantzari,<sup>†</sup> Eleni Melliou,<sup>†,‡</sup> and Prokopios Magiatis<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Laboratory of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, 157 71 Athens, Greece

<sup>‡</sup>Olive Center, University of California, Davis, One Shields Avenue, Davis, California 95616, United States

### Supporting Information

**ABSTRACT:** A new method for direct measurement of the oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative  $^1\text{H}$  NMR was developed. The method was applied to the study of 175 monovarietal commercial Greek and California olive oil samples. The main findings were as follows: (1) There was a significant variation concerning the concentrations of oleocanthal and oleacein among the studied samples. Their concentrations ranged from nondetectable to 355 mg/kg and their sum (index D1) from 0 to 501 mg/kg. (2) There are olive varieties that independent of geographic origin and harvest time produce oil that contains both compounds in low levels. (3) There is a positive correlation of a high level of oleocanthal and oleacein in olive oils with the early time of harvest. Although there is a need for more extensive study, a new index for the characterization of extra virgin olive oils, which is a combination of D1 = oleocanthal + oleacein level and D2 = oleocanthal/oleacein ratio, seems to be very useful.

**KEYWORDS:** extra virgin olive oil, oleocanthal, oleacein, quantitative NMR

Received: July 28, 2012

Revised: October 31, 2012

Accepted: November 2, 2012

*J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (47), pp 11696-11703

DOI: 10.1021/jf3032765

Publication Date (Web): November 2, 2012

Copyright © 2012 American Chemical Society



## A new method for the estimation of olive oil healthfulness

- A growing body of evidence suggests that the healthfulness of olive oils could be classified based on their content of oleocanthal, oleacein, and related secoiridoids. However, such compounds are difficult to measure because they react with the water or methanol used during the mobile phase of liquid chromatography.

- Recently, a new method allowing olive oil polyphenols to be extracted without the use of reacting solvent was developed, making it possible to measure oleocanthal and oleacein levels directly by quantitative  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) in  $\text{CDCl}_3$  at 600 MHz and 800 MHz.

- Measurements of 300 olive oil samples using this method revealed wide variations in the concentrations of these healthful compounds among extra virgin olive oils.

Evangelia Karkoula, Eleni Melliou,  
and Prokopios Magiatis

Several epidemiological studies have shown that the traditional Mediterranean diet is associated with a lower incidence of atherosclerosis, cardiovascular disease, neurodegenerative diseases, and certain kinds of cancer. These appreciable health-promoting properties have been partially correlated with the regular consumption of extra virgin olive oil as the principal source of fat. Olive oil is the most famous agricultural product in the Mediterranean, with a history as old as that region's civilization. Olive fruits and olive oil not only are delicious but also have been considered as medicines since ancient times.



## 15 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abuznait A.H., Qosa H., Busnena B.A., El Sayed K.A., Kaddoumi A., **2013**. "Olive-Oil-Derived Oleocanthal Enhances  $\beta$ -Amyloid Clearance as a Potential Neuroprotective Mechanism against Alzheimer's Disease: In Vitro and in Vivo Studies." ACS Chem. Neurosci., Article ASAP DOI: 10.1021/cn400024q
- Allouche Y., Jimenez A., Gaforio J. J., Uceda M. and Beltran G. **2007**. "How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition." J. Agric. Food Chem., 55:9646-9654
- Andrewes P., Busch J., De Joode T., Groenewegen A. and Het A. **2003**. "Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency." J. Agric. Food Chem., 51: 1415-20
- Arts I., Hollman P., **2005**. "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies1–4" Am J Clin Nutr;81 (suppl):317S–25S.
- Beauchamp G. K., Keast R. S. J., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C., Smith A. B. and Breslin P. A. S. , **2005**. "Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil." Nature 437: 45-46.
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gómez-Caravaca A. M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., and Lercker G., **2007**. "Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade". Molecules, 12, 1679-1719.
- Bendini A., Valli E., Barbieri S. and Toschi T.G., **2012**. Sensory Analysis of Virgin Olive Oil. p. 109-130. In: D. Boskou (ed.), Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Intech, Croatia
- Bianco A.D., Piperno A., Romeo G., and Uccella N. **1999**. "NMR experiments of oleuropein biomimetic hydrolysis." J. Agric. Food Chem., **47**, 3665-3668.
- Boland G., Butt I., Prasad R., Knox W. & Bundred N., **2004**. "COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ." British Journal of Cancer, 90, 423-429.
- Boselli E., Di Lecce G., Strabbioli R., Pieralisi G. and Frega N.G., **2009**. "Are virgin olive oils obtained below 27 °C better than those produced at higher temperatures?" LWT - Food Science and Technology, 42, 748–757
- Briante R., Cara F. L., Tonziello M. P., Febbraio F. and Nucci R., **2001**. "Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic beta-glycosidase." J Agric. Food Chem., 49(7): 3198-3203.
- Busnena B.A., Foudah A.I., Melancon T., El Sayed K.A., **2013**. "Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer." Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21, 2117–2127
- Chenevard R., Hurlimann D., Bechir M., Enseleit F., Spieker L., Hermann M., et al. **2003**. "Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease." Circulation, 10000051r.

- Christophoridou S. and Dais P., **2009**. "Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Analytica Chimica Acta*, 633, 283-292.
- Christophoridou S., Dais P., Tseng L.H. and Spraul M., **2005**. "Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling High-Performance Liquid Chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR)" *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4667-4679.
- Chrysohoou C., Pitsavos C., Skoumas J., Masoura C., Katinioti A., Panagiotakos D., Stefanadis C., **2006**. "The emerging anti-inflammatory role of HDL-cholesterol, illustrated in cardiovascular disease free population; the ATTICA study." *Int. J. Cardio.*, 122, 29–33.
- Cicerale S., Lucas L., Keast R., **2010**, "Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil". *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 458-479.
- Cicerale S., Breslin P.A., Beauchamp G.K. and Keast R.S. **2009**. "Sensory characterization of the irritant properties of oleocanthal, a natural anti-inflammatory agent in extra virgin olive oils." *Chem Senses*, 34: 333-339
- Cicerale S., Lucas L.J. and Keast R.S.J., **2012**. "Oleocanthal: a naturally occurring anti-inflammatory agent in virgin olive oil." p. 357-374. In: D. Boskou (ed.), *Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. Intech, Croatia
- Clodoveo M.L., Durante V., La Notte D., **2013**. "Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil ", *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1261–1270
- Coni E., Di Benedetto R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R., Carlini, E.A., **2000**. "Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits." *Lipids*, 35, 45–54.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., **2003**. "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." *Fed. Am. Soc. Exper. Biol. J.*, 17, 1195–1214.
- Corona G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M.A., Spencer, J.P.E., **2009**. "Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1." *Mol. Nutr. Food Res*, 53, 897–903.
- Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M., **2012-a**. "Oleacein from virgin olive oil may contribute to stabilization of atherosclerotic plaques by decrease myeloperoxidase release from neutrophils"
- Czerwińska M., Kiss A. and Naruszewicz, M., **2012-b**. "A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein." *Food Chemistry*, 131:940-947
- De La Cruz J.P., Villalobos M.A., Carmona J.A., Martin-Romero M., Smith-Agreda J.M., de la Cuesta F.S., **2000**. "Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol." *Thromb. Res.*, 100, 305–315.

- Di Giovacchino L., **1991**, "L'estrazione dell'olio con la centrifugazione diretta delle paste di olive. Nota I: Influenza della gramolazione" *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 68, 413–420.
- Di Giovacchino L., Sestili S., Di Vincenzo D., **2002**. "Influence of olive processing on virgin olive oil quality." *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 587–601
- Elnagar A.Y., Sylvester P.W., El Sayed K.A., **2011**. "(-)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers." *Planta Med.* 2011 Feb 15.
- Estanove C., Pruvost F., Allart J.C., and Saldmann F., **2009**. "Use of olive oil extract to control skin aging". WO 2009/122045 A2.
- European Community (EC). 2008. Commission Regulation No 640/2008 of 4 July 2008 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, L178:11-16.
- Evan G.I., Vousden K.H., **2001**, "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." *Nature*, 411,342–348.
- Favati F., Condelli N., Galgano F., Caruso M.C., **2013**. Extra virgin olive oil bitterness evaluation by sensory and chemical analyses, *Food Chemistry*, 139 949–954
- Franconi F., Coinu R., Carta S., Urgeghe P.P., Ieri F., Mulinacci N., Romani A., **2006**. "Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3121–3125.
- Gano L.B., Donato A.J., Pierce G.L., Pasha H.M., Magerko K.A., Roeca C., et al. **2011**. "Increased proinflammatory and oxidant gene expression in circulating mononuclear cells in older adults: Amelioration by habitual exercise." *Physiological Genomics*, 43, 895–902.
- Garcia-Rodriguez L.A. & Huerta-Alvarez C., **2001**. "Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs" *Epidemiology*, 12, 88-93.
- Gariboldi P., Jommi G. and Verotta L., **1986**. "Secoiridoids from *Olea europaea*." *Phytochemistry* 25(4): 865-869.
- Gimeno E., Fito M., Lamuela-Raventos R.M., Castellote A.I., Covas M., Farre M., de La Torre-Boronat M.C., and Lopez-Sabater M.C., **2002**. "Effect of ingestion of virgin olive oil on human lowdensity lipoprotein composition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, 114–120.
- Gomes da Silva M.D.R., Costa Freitas A.M., Cabrita M.J.B. and Garcia R. **2012**. "Olive oil composition: volatile compounds" p. 17-46 In: D. Boskou (ed.), *Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. Intech, Croatia
- Gomez-Alonso S., Fregapane G., Salvador M.D. and Gordon M. H. **2003**. "Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying." *J. Agric. Food Chem.*, 51:667-672

- Gomez-Rico A., Salvador M. D., La Greca M. and Fregapane G. **2006**. "Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. cv. cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management." *J. Agric. Food Chem.* 54:7130-7136
- Goya L., Mateos R., Bravo L., **2007**. "Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide." *Eur. J. Nutr.*, 46, 70–78.
- Gutiérrez-Rosales F., Ríos, J.J. and Gómez-Rey, MA.L. **2003**. "Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry." *J. Agric. Food Chem.* 51:6021-6025
- Han J., Talorete T.P.N., Yamada P., Isoda H., **2009**, "Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells." *Cytotechnology*, 59, 45–53.
- Hansen K., Adersen A., Brogger Christensen S., Rosendal Jensen S., Nyman U., Wagner Smiti U., **1996**, "Isolation of an Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*." *Phytomedicine* Vol. 2 (4), pp. 319-325,
- Harris R. E., Beebe-Donk J. & Alshafie G. A. **2006**. "Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors." *BMC Cancer*, 6, 27.
- Harris R. E., Chlebowski R. T., Jackson R. D., Frid D. J., Ascenseo J. L., Anderson G., et al. **2003**. "Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative." *Cancer Research*, 63, 6096-6101.
- Harwood J., Aparicio R., **2000**, "Handbook of olive oil: Analysis and Properties". An aspen publication
- Hashim Y.Z., Rowland I.R., McGlynn H., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro G., Kaisalo L., Wahala K., Gill C.I., **2008**. "Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro." *Int. J. Cancer*, 122, 495–500.
- Hennekens C. H., **2002**. "Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease" *American Journal of Managed Care*, 8, 691S-700S.
- Iacono A., Gómez R., Sperry J., Conde J., Bianco G., Meli R., Reino J.J.G., Smith A. B. and Gualillo O., **2010**. "Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line". *Arthritis & Rheumatism* 62(6): 1675-1682.
- Inarejos-García A.M., Gómez-Rico A., Salvador M.D., Fregapane G., **2009**. "Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition" *Eur. Food Res Technol.*, 228, 671–677
- Inarejos-García A.M., Santacatterina M., Salvador M.D., Fregapane G. and Gómez-Alonso S. **2010**. "PDO virgin olive oil quality – minor components and organoleptic evaluation" *Food Research International*. 43:2138-2146

- International Olive Council (IOC). **2010**. Sensory analysis of olive oil: method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T.20/Doc. No 15/Rev.3.
- IOC COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 4. **2011**. Sensory analysis of olive oil method for the organoleptic assessment of virgin olive oil.
- Jerman Klen T., Branka Mozeti Vodopivec B., **2012**. "The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge" *LWT - Food Science and Technology*, 49, 267–274
- Kang M. H., Naito M., Sakai K., Uchida K. and Osawa T.. **2000**. "Mode of action of sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage in vitro." *Life Sci.* 66: 161-171.
- Karkoula E., Skantzari A., Melliou E., Magiatis P., **2012**. "Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative <sup>1</sup>H-NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils." *J Agric Food Chem.*, Nov 28;60(47):11696-703.
- Li W., Sperry J. B., Crowe A., Trojanowski J. Q., Smith A. B. and Lee V. M. Y. **2009**. "Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau". *J Neurochem* **110** (4): 1339- 1351.
- Ludvik B., Kautzky-Willer A., Prager R., Thomaseth K., Pacini G., **1997**. "Amylin: history and overview." *Diabet Med*, 14 (Suppl 2):S9–S13.
- Mateos R., Cert A., Perez-Camino M C., Garcia J M., **2004**. "Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives" *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 71- 75.
- Meagher L.P., Beecher G.R., Flanagan V.P., Li B.W., **1999**. "Isolation and characterization of lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal." *J. Agric. Food Chem.* 47 3173-3180.
- Medina E., de Castro A., Romero C., Brenes M., **2006**. "Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity." *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4954–4961.
- Menendez J.A., Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C., Garcia-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A. Fernandez-Gutierrez A. and Segura-Carretero A. **2009**. "Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: Relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2." *International Journal of Oncology.*, 34, 43-51
- Menendez J.A., Vazquez-Martin R., Garcia-Villalba A., Carrasco-Pancorbo C., Oliveras-Ferraros A., Fernandez-Gutierrez A., and Segura-Carretero A., **2008**. "Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin olive oil (EVOO)". *BMC Cancer* 2008, 8 (377), 1-23.
- Montedoro G., Servilli M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., and Macchioni A., **1993**. "Simple and hydrolysable compounds in virgin olive oil. 3.

- Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives". *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2228-2234.
- Monti M.C., Margarucci L., Riccio R., Casapullo A., **2012**. "Modulation of tau protein fibrillization by oleocanthal *Journal of natural products*", 75, 1584-1588.
- Morello J. R., Romero M. P. and Motilva M. J. **2004**. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Ambequina, Farga and Morrut cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 52:6002-6009
- Morello J.R., Romero M., Ramo T., Motilva M.J., **2005**. "Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time". *Plant Science* 168, 65- 72.
- Moreno-Luna R., Munoz-Hernandez R., L. Miranda M., F. Costa A., Jimenez-Jimenez L., J. Vallejo- Vaz A., Muriana F., Villar J., Stiefel P., **2012**. "Olive Oil Polyphenols Decrease Blood Pressure and Improve Endothelial Function in Young Women with Mild Hypertension"
- Oliveras-Lopez M.J., et al., **2013**. "Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans." *Arch. Gerontol. Geriatr.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2013.04.002>
- Owen R.W, Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B. & Bartsch H. **2000c**. "Identification of lignans as major components in the phenolic fraction". *Clinical Chemistry* 46, 976–988.
- 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.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B. and Bartsch H. **2000b**. "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols." *Food Chem Toxicol* 38(8): 647-659.
- Papadimitriou V., Dulle M., Wachter W., Sotiroudis T. G., Glatter O., Xenakis A. **2013**. "Structure and Dynamics of Veiled Virgin Olive Oil: Influence of Production Conditions and Relation to its Antioxidant Capacity" *Food Biophysics*, 8, 112–121
- Parzonko A., Naruszewicz M., **2012**. "Oleacein protects endothelial progenitor cells against angiotensin II - induced oxidative stress" *Planta Med* 2012; 78 - PD88 DOI: 10.1055/s-0032-1320446
- Patrick L., Uzick M., **2001**. "Cardiovascular disease: C-reactive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature." *Altern. Med. Rev.*, 6, 248–271.
- Pavia-Martins F., Fernandes J., Rocha S., Nascimento H., Vitorino R., Amado F., Borges F., Belo L. and Santos-Silva A. **2009**. "Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage." *Molecular Nutrition and Food Research*, 53: 609-616

- Pérez-Trujillo M., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Cutiérrez A. and Parella T. **2010**. "Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycon". *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9129-9136.
- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G., Galli C., **1995**. "Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil." *Thromb. Res.*, 78, 151–160.
- Peyrot des Gachons C., Uchida K., Bryant B., Shima A., Sperry J.B., Dankulich-Nagrudny L., et al, **2011**. "Unusually pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal." *Journal of Neuroscience*, 31, 999-1009
- Pitt J., Roth W., Lacor P., Amos B. Smith III, Blankenship M., Velasco P., De Felice F., Breslin P. and Klein W.L. **2009**. "Alzheimer's-associated A $\beta$  oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal" *Toxicology and Applied Pharmacology* 240, 189–197
- Ranalli A., Contento S., Schiavone C., and Simone N., **2001**. "Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103, 228-238.
- Reinisch N., Kiechl S., Mayr C., Schratzberger P., Dunzendorfer S., Kahler C.M., Buratti T., Willeit J., Wiedermann C.J., **1998**. "Association of high plasma antioxidant capacity with new lesion formation in carotid atherosclerosis: a prospective study." *Eur. J. Clin. Invest.*, 28, 787–792.
- Rigaccia S., Guidottia V., Bucciantinia M., Parria M., Nediania C., Cerbaib E., Stefania M., Berti A., **2010**. "Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin", *Journal of Nutritional Biochemistry* 21 726–735
- Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M., De Castro A., **2007**. "In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*." *J. Agric. Food Chem.*, 55, 680–686.
- Salvini S., Sera F., Carus D., Giovannelli L., Visioli F., Saieva C., Masala G., Ceroti M., Giovacchini V., Pitozzi V., Galli C., Romani A., Mulinacci N., Bortolomeazzi R., Dolaro P., Palli D., **2006**. "Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women." *Br. J. Nutr.*, 95, 742–751.
- Servilli M. and Montedoro G., **2002**. "Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality". *Europaean Journal of Lipid Science & Technology*, 104, 602-613.
- Servilli M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. and Montedoro G. **1999**. "High-Performance Liquid Chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1-D and 2D-Nuclear Magnetic Resonance Characterization". *J American Oil Chemists' Society*, **76**, 873-882.

- Servilli M., Selvaggini R., Esposito S., Taticchi A., Montedoro G., and Morozzi G., **2004**. "Health and the sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of the production that affect their occurrence in the oil". *J. Chromatography A*, 1054, 113-127.
- Sinesio F., Moneta E., Esti M., **2005**. "The dynamic sensory evaluation of bitterness and pungency in virgin olive oil", *Food Quality and Preference*, 16, 557-564.
- Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P. and Nadar A., **2003**. "Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves", *Journal of Ethnopharmacology* 84 , 299- 305
- Stefanoudaki E., Koutsaftakis A., Harwood J.L., **2011**. "Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil ", *Food Chemistry*, 127, 1481–1486
- Subbaramaiah K., Norton L., Gerald W. & Dannenberg A.J., **2002**. "Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer." *Journal of Biological Chemistry*, 277, 18649 - 18657.
- Suja K.P, Jayalekshmy A., Arumughan C., **2005**. "Antioxidant Activity of Sesame Cake Extract." *Food Chem.* **91**: 213-219.
- Togna G.I.; Togna A.R.; Franconi M.; Marra C.; Guiso M., **2003**. "Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity." *J. Nutr.*, 133, 2532–2536.
- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S. and La Guardia M., **2005**. "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health" *Nutrition Research Reviews*, **18**, 98–112.
- Tsukamoto H., Hisada S. & Nishibe S., **1984**. "Lignans from bark of the *Olea* plants, 1". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **32**, 2730–2735.
- Tuck K.L. and Hayball P.J., **2002**. "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects", *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 636 – 644
- Visioli F., Galli C., Plasmati E., Viappiani S., Hernandez A., Colombo C., Sala A., **2000**. "Olive Phenol Hydroxytyrosol Prevents Passive Smoking–Induced Oxidative Stress" (*Circulation*.2000;102:2169-2171.) <http://circ.ahajournals.org/content/102/18/2169>
- Visioli, F., Poli A., and Galli C. **2002**. "Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil". *Medicinal Research Reviews*, **22** (1), 65-75.
- Wang M.J, Lin W.W, Chen H.L, Chang Y.H, Ou H.C, Kuo J.S, Hong J.S and Jeng K.C, **2002**. "Silymarin Protects Dopaminergic Neurons against Lipopolysaccharide-induced Neurotoxicity by Inhibiting Microglia Activation." *Eur J Neurosci.* **16**: 2103–2112.
- Βερυκοκίδου–Βιτσαροπούλου Ε.: «Σημειώσεις Φαρμακογνωσίας Ι». Αθήνα (1997)
- Γεωργαλάς Γ.Κ., στο λήμμα "Ελαιά", «Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια» Π. Δρανδάκη, Αθήνα



Κυριτσάκης Α.: «Βιολογικές και άλλες Ιδιότητες του Ελαιόλαδου στο Ελαιόλαδο». Agricultural Cooperative Editions, Θεσσαλονίκη **(1988)**

Κώδικας τροφίμων και ποτών (71) :71.1-71.5

Λύχνος Ν.: «Το Δένδρο της Ελαίας και η Καλλιέργειά του». Τύποις, Αθήναι **(1948)**

Μπαλατσούρας, Γ.: «Η επιτραπέζια ελιά». Αθήνα **(1992)**

Παπαναστασίου Δ.: «Σύγχρονη ελαιουργία. Η τεχνολογία των ελαίων.». Εκδοτικός οίκος Σπύρος Σπύρου και Υιός, Αθήνα. **(1966)**

Ποντίκης Κ.: «Ελαιοκομία». Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιάς **(1992)**

Σκαλτσούνης Α.Λ., Μητάκου Σ., Σκαλτσά Ε.: «Σημειώσεις Φαρμακογνωσίας II». Αθήνα **(2009)**

Σκάντζαρη Α.: Μ.Δ.Ε. «Απομόνωση των φαινολικών συστατικών και η ποσοτικοποίηση αυτών με φασματοσκοπία NMR σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα» **(2011)**