



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΟΦΙΑ ΜΗΤΑΚΟΥ



<<Αν αποσυνθέσεις την Ελλάδα στο τέλος θα δεις να σου απομένουν μια ελιά, ένα αμπέλι και ένα καράβι>> Οδ.Ελυτης

ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ *Olea europaea var. europaea* και ΑΓΡΙΕΛΙΑΣ *Olea europaea var. sylvestris* οικ.ΟΛΕΑCΕΑΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΛΕΥΡΩΠΕΙΝΗΣ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΙΣ ΙΔΙΕΣ ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΚΟΥΡΚΟΥΛΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας και την ευκαιρία που μου προσέφερε να εργαστώ στο εργαστήριό της , να εξοικειωθώ με νέες μεθόδους και τεχνικές και να αποκομίσω πολύτιμες και πολύπλευρες γνώσεις.

Τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής της διπλωματικής εργασίας για το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου και τον αναπληρωτή καθηγητή κ.Νεκτάριο Αληγιάννη οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την εργασία μου.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής για τις συμβουλές της στη συγγραφή της παρούσας εργασίας αλλά και για την υπομονή , την κατανόηση και την συμπαράστασή της.

Την επίκουρη καθηγήτρια Μαρία Χαλαμπαλάκη για το ενδιαφέρον και τις εποικοδομητικές συμβουλές για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Ε.ΔΙ.Π. κ. Παναγιώτη Σταθόπουλο για την απλόχερη μετάδοση γνώσεων, την ηθική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του στην πραγματοποίηση των αναλυτικών πειραμάτων.

Ευχαριστώ τη Δρ. Κωνσταντίνα Βουγογιαννοπούλου για τη συνεργασία μας καθόλη τη χρονική περίοδο των πειραμάτων και τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τη μεταδιδάκτορα Αργυροπούλου Αικατερίνη για τις συμβουλές της στην εκπόνηση της εργασίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ απευθύνεται σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το φιλικό κλίμα και το πνεύμα συνεργασίας που επικράτησε σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου σε αυτό.

Τέλος το πιο ευλικρινές μου ευχαριστώ στην οικογένειά μου , η οποία με στηρίζει ακατάπαυστα όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

TABLE OF CONTENTS

Πρόλογος-Σκοπός της Μελέτης	7
Περίληψη	8
1. Βοτανική Περιγραφή	9
1.1 Οικογένεια Oleaceae:.....	9
1.1.1 Γένος <i>Olea</i>	10
1.2 <i>Olea europaea</i>	11
1.2.1 Ταξινόμική γένους <i>Olea</i>	11
1.2.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά.....	12
1.3 Διαφοροποίηση ελιάς /αγριελιάς –ταυτοποίηση ποικιλιών	15
1.3.1 <i>Olea sylvestris</i>	15
1.3.2 <i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i> (καλλιεργούμενη ελιά).....	17
1.4 Εξάπλωση ελαιόδεντρου – Ιστορική αναδρομή.....	18
1.4.1 Η ελιά στον ελληνικό χώρο.....	19
1.4.2 Η ελιά και το λάδι στην αρχαιότητα	22
1.4.3 Θεραπευτικές Ιδιότητες Του Ελαιολάδου Κατά Την Αρχαιότητα	23
1.5 Συνθήκες ανάπτυξης.....	24
1.5.1 Επικονίαση της Ελιάς.....	25
1.6 Οικονομική σημασία.....	25
Κατηγορίες ελαιολάδου	27
1.6.1 Παραπροϊόντα από την Παραλαβή του Ελαιολάδου	28
1.6.2 Φύλλα Ελιάς.....	28
Μέθοδοι εκχύλισης	30
1.7 Δευτερογενείς μεταβολίτες	31
1.7.1 Ελιά και δευτερογενείς μεταβολίτες	32
1.8 Οξειδωτικό στρες	32
1.9 Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Σύσταση Φύλλων/Εκχυλίσματος	33
1.10 Χημικά Χαρακτηριστικά – Βιοενεργό Προφίλ Φύλλων.....	35
1.10.1 Πολυφαινόλες	36
1.10.2 Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών	37

1.10.3 Πολυφαινόλες στα φύλλα της ελιάς.....	37
1.10.4 Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών	43
1.11 Φαρμακολογικές δράσεις φύλλων ελιάς:	44
1.12 Ολευρωπεΐνη	51
1.12.1 Βιόσυνθεση Ολευρωπεΐνης	52
1.12.2 Σεκοϊριδοειδή.....	52
1.13 Άλλα συστατικά των φύλλων	54
1.14 Συμπερασματικά.....	54
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	56
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α.....	56
2.1 Όργανα, υλικά και μέθοδοι	56
2.1.1 Πρότυπες ενώσεις	56
2.1.2 Διαλύτες και χρωματογραφικά υλικά.....	56
2.1.3 Αναλυτικές χρωματογραφικές τεχνικές :.....	56
2.2 Δειγματοληψία και εκχύλιση φύλλων.....	58
2.2.1 Ανάπτυξη μεθόδου	58
2.2.2 Μέθοδος εκχύλισης	69
2.2.3 Προφίλ εκχυλισμάτων με χρήση ΗΡΤΛC	72
2.2.4 Χρωματογραφήματα ΗΡΤΛC	75
2.2.5 Χρωματογραφήματα αραιώσεων.....	79
2.2.6 Δείγματα OLL001-OLL077 : UPLC-DAD.....	81
2.2.7 Δείγματα OLL078-OLL117	91
2.3 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β.....	95
2.3.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων:.....	95
2.3.2 Σύγκριση ΗΡΛC/UPLC.....	95
2.4 Αποτελέσματα:	96
2.4.1 Ποικιλίες υπό όμοιες καλλιεργητικές συνθήκες	98
2.4.2 Περίοδος συλλογής 2014.....	99
2.4.3 Περίοδος συλλογής 10 ^{ος} /2016.....	102
2.4.4 Τα υψηλότερα 10 ποσοστά.....	107
2.4.5 Τα χαμηλότερα ποσοστά ολευρωπεΐνης.....	109
2.5 Περίοδος συλλογής και ποσοστό ολευρωπεΐνης.....	111

2.5.1 Αγριελιά.....	111
2.5.2 Ελιά.....	111
2.6 Σύγκριση ποσοστού ολευρωπεΐνης ανάλογα τη χώρα προέλευσης	112
2.7 Συμπεράσματα - προοπτικές	114
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	116
Βιβλιογραφία	124

Πρόλογος-Σκοπός της Μελέτης

Η σχέση του ανθρώπου με τη φύση υπήρξε πάντοτε στενή, διαδραστική και αμφότερα καθοριστική με τις αναμενόμενες διακυμάνσεις φυσικά. Έχοντας επανεκτιμήσει τα τελευταία χρόνια τη στάση της, η σημερινή κοινωνία στρέφεται όλο και πειρισσότερο στα φυσικά προϊόντα. Έχει έρθει ξανά στην επιφάνεια η ανάγκη για την εύρεση δραστικών ουσιών φυσικής προέλευσης για την βελτίωση αλλά και προάσπιση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου.

Ως αναμένεται, αναλόγως του τόπου, η έμφαση δίνεται κάθε φορά στην πιο προσβάσιμη και άφθονη πηγή. Αναφορικά με τη Μεσόγειο ποιά άλλη πηγή (δέντρο) είναι τόσο συνυφασμένη με αυτή πλην της ελιάς! Ήδη απο τα αρχαία χρόνια οι κάτοικοι της Μεσογείου έχουν χρησιμοποιήσει πληθώρα προϊόντων από αυτή και πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα μειωμένα ποσοστά καρδιαγγειακών παθήσεων συνδέονται άμεσα με την κατανάλωση ελαιόλαδου εν αντιθέσει με αυτή βουτύρου ή λαρδιού στις μη μεσογειακές χώρες.

Με δεδομένο αυτό αλλά και λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα παραπροϊόντα της ελαιοκομίας (στην παρούσα εργασία δίνεται έμφαση στα φύλλα) αποτελούν μείζον οικολογικό φορτίο, οδηγήθηκε στους πιθανούς τρόπους εκμετάλλευσής τους, πέραν της χρήσης τους ως ζωτροφής. Γνωρίζοντας μάλιστα ότι στη λαϊκή θεραπευτική εδώ και αιώνες χρησιμοποιούνται τα φύλλα κυρίως ως αφέψημα, μια εμπειριστατωμένη επιστημονικά άποψη επί του ζητήματος ήταν απαραίτητη.

Μετά από χρόνια μελετών, έχει πλέον αποδειχθεί η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (OLE) και η συμβολή του στην αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως φλεγμονές, υπέρταση διαβήτη κτλ. Συγκεκριμένα οι δράσεις του αποδίδονται στην ομάδα των φαινολικών συστατικών με κύριο εκπρόσωπο την ολεωρωπεΐνη.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία κρίθηκε σκόπιμο να γίνει μια συγκριτική μελέτη του ποσοστού της σε φύλλα διαφορετικών ποικιλιών. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε να έχουμε μια πρώτη εικόνα για το συσχετισμό ποικιλίας /ποσοστού και να καταλήξουμε σε κάποιες εμφανώς πιο «προνομιούχες» και τελικά να βρεθεί ένας τρόπος εκμετάλλευσης των φύλλων για την προάσπιση της υγείας και παράλληλα την προστασία του περιβάλλοντος.

Περίληψη

Αρχικά παρουσιάζεται η βοτανική περιγραφή του φυτού *Olea europaea* με αναφορά στην οικογένεια το γένος και τις ποικιλίες της. Περιγράφονται τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι συνθήκες ανάπτυξης. Εν συνεχεία παρατίθενται στοιχεία για την ιστορία και την παρουσία της από την αρχαιότητα έως σήμερα και τη σχέση της με την ελληνική, κυρίως, κοινωνία και παράδοση.

Γίνεται παρουσίαση των παραδοσιακών μακραιώνων χρήσεων των φύλλων καθώς και αναφορά στους διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης και των ενδείξεων που υπάρχουν σήμερα για την δράση τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Αναλύεται αδρά η χημική τους σύσταση ενώ πιο λεπτομερής αναφορά γίνεται για τις πολυφαινόλες και κυρίως την ολεωρωπεΐνη. Επεξηγούνται όροι όπως οξειδωτικό στρες, πολυφαινόλες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Επίσης παρουσιάζεται το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσής τους.

Στο πειραματικό μέρος πραγματοποιείται ανάλυση 102 δειγμάτων φύλλων ελιάς και αγριελιάς, διαφορετικών ποικιλιών και προέλευσης, ενώ ταυτόχρονα αναπτύσσεται για πρώτη φορά ταχύτατη μέθοδος ποσοτικοποίησης της ολεωρωπεΐνης με χρήση τεχνικής UPLC, διάρκειας 7 λεπτών.

Τέλος, καινοτομία της παρούσας διπλωματικής αποτελεί η μελέτη 22 δειγμάτων φύλλων προερχόμενα από τον ίδιο ελαιώνα, από ελαιόδεντρα καλλιεργούμενα υπό όμοιες πρακτικές και ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Επομένως καθίσταται δυνατή η άμεση συσχέτιση ποσοστού ολεωρωπεΐνης και ποικιλίας.

1. Βοτανική Περιγραφή

1.1 Οικογένεια Oleaceae:

Η οικογένεια Oleaceae ανήκει στην τάξη Lamiales και οφείλει το όνομά της στην ελιά, καθώς αποτελεί τον χαρακτηριστικότερο εκπρόσωπό της, από οικονομικής απόψεως. Περιλαμβάνει περισσότερα από 25 γένη. Στη συνέχεια παρατίθενται κάποια από αυτά :

Ενδεικτικά γένη της οικ. Oleaceae

<i>Abeliophyllum</i>	<i>Forestiera</i>	<i>Jasminum</i>	<i>Noronhia</i>	<i>Phillyrea</i>
<i>Chionanthus</i>	<i>Forsythia</i>	<i>Ligustrum</i>	<i>Notelaea</i>	<i>Picconia</i>
<i>Comoranthus</i>	<i>Fraxinus</i>	<i>Menodora</i>	<i>Nyctanthes</i>	<i>Priogymnanthus</i>
<i>Dimetra</i>	<i>Haenianthus</i>	<i>Myxopyrum</i>	<i>Olea</i>	<i>Schrebera</i>
<i>Fontanesia</i>	<i>Hesperelaea</i>	<i>Nestegis</i>	<i>Osmanthus</i>	<i>Syringa</i>

Αναμεσά τους υπάρχουν φυτά με σημαντική οικονομική αλλά και αισθητική αξία. Ενδεικτικά αναφέρονται για την καλλωπιστική τους αξία τα γένη: *Syringa*(πασχαλιές), *Jasminum* (γιασεμι), *Ligustrum*(λιγουστρα) ενώ από το γένος *Fraxinus* πολλά φυτά αποτελούν αντικείμενο εκμετάλλευσης για τον τομέα της ξυλείας, λόγω του σκληρού ξύλου τους.

Τα περισσότερα από τα φυτά που ανήκουν στην ανωτέρω οικογένεια είναι ξυλώδη και εντοπίζονται σε δασώδεις περιοχές. Ως επί το πλείστον είναι δέντρα ή θάμνοι αλλά μια μειονότητα αυτών έχει τη δυνατότητα αναρρίχησης όπως το γιασεμί. Η εξάπλωσή τους είναι σχεδόν καθολική με εξαίρεση την Αρκτική. Στις τροπικές και θερμές εύκρατες ζώνες είναι αειθαλή ενώ στη βόρεια εύκρατη ζώνη φυλλοβόλα.

Τα λουλούδια στα περισσότερα μέλη της οικογένειας έχουν 4 σέπαλα 4 πέταλα 2 στήμονες και 2 καρπόφύλλα συγχωνευμένα σε 1 ωοθήκη. Τα φύλλα κατά κύριο λόγο είναι αντίθετα μεταξύ τους ενώ ο καρπός ποικίλει από σαρκώδης πχ ελαιόκαρπος μέχρι ξυλώδης κάψουλα στο γένος *Schrebera*.

Πολλά φυτά της οικογένειας καλλιεργούνται για τα ευωδιαστά και ευπαρουσίαστα άνθη τους. Το πιο κοινό χρώμα άνθους είναι το λευκό αν και συναντώνται και άλλα όπως κίτρινο και λουλακί.

1.1.1 Γένος *Olea*

Το γένος *Olea* ανήκει στην προαναφερθείσα οικογένεια και αριθμεί πάνω από 30 είδη και υποείδη. Απαντάται σε θερμά εύκρατα και τροπικά κλίματα της νότιας Ευρώπης, στην Αφρική, στην νότια Ασία και στην Ωκεανία. Μορφολογικά συναντάμε κυρίως αειθαλή δέντρα ή θάμνους με φύλλα μικρού και μετρίου μεγέθους αντιδιαμετρικά τοποθετημένα. Ο καρπός είναι κατά κύριο λόγο δρύπη. Το είδος *Olea europaea* παρουσιάζει την μεγαλύτερη εξάπλωση, και το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον. Ειδικότερα η *O. europaea* var *europaea* αποτελεί το αρχαιότερο καλλιεργούμενο υποείδος στη λεκάνη της Μεσογείου

Τα σπουδαιότερα από τα είδη που περιλαμβάνονται είναι τα ακόλουθα :

1. *Olea europaea* L., υποείδος *euromediterranea*
2. *Olea europaea* L., υποείδος *cuspidata* Vall, Cif.
3. *Olea europaea* L., υποείδος *laperrini* Batt και Trab
4. *Olea chrysophylla* Lamk
5. *Olea hochstetteri*
6. *Olea somaliensis*
7. *Olea subtrinervata*
8. *Olea mussolinii*
9. *Olea kilimandsharica*
10. *Olea guineensis*
11. *Olea excelsa*

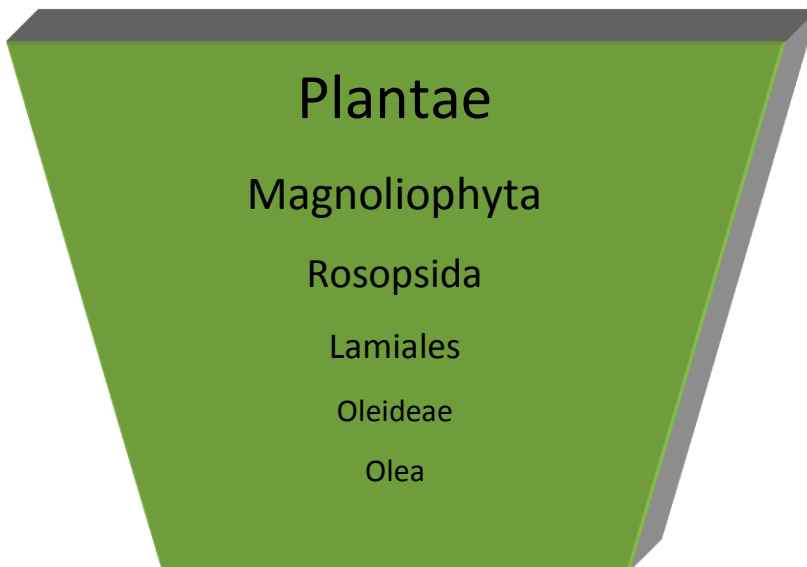
Το *Olea europaea euromediterranea* var. *sylvestris* Mill. (ή *Olea europaea* var *oleaster* Hoffm and Link) κοινώς αγριελιά απαντάται στη Β.Αφρική, Ισπανία, Ελλάδα, Πορτογαλία, Σικελία, Κριμαία, Καύκασο, Αρμενία και Συρία. Είναι θάμνος που φέρει αγκάθια και μικρούς συνήθως καρπούς. Το *Olea euromediterranea sativa*(ή var.*europaea*) είναι η καλλιεργούμενη ελιά η οποία περιλαμβάνει και ένα μεγάλο αριθμό βελτιωμένων ποικιλιών, οι οποίες πολλαπλασιάζονται αγενώς (βιβλ. Ειδική δενδροκομία Κων/νου Ποντίκη).

1.2 *Olea europaea*

Το ελαιόδεντρο αποτελεί το κατεξοχήν εμβληματικό δέντρο της Μεσογείου και είναι ένα από τα σημαντικότερα σε αξία καρποφόρα δέντρα. Στην λεκάνη της Μεσογείου συναντώνται τόσο ήμερες όσο και άγριες ποικιλίες του ελαιόδεντρου.

Είναι το κυρίως καλλιεργούμενο είδος από την οικογένεια Oleaceae, άρρηκτα συνδεδεμένο με την ευημερία και τον πολιτισμό των λαών πέριξ της λεκάνης της Μεσογείου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την πληθώρα πολιτιστικών έργων με άμεση αναφορά στο ελαιόδεντρο από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα (ποιήματα, πίνακες κτλ).

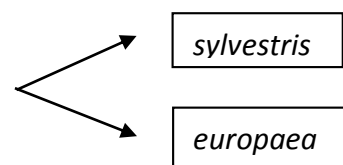
1.2.1 Ταξινομική γένους *Olea*



Ταξινόμηση γένους *Olea*

Στο είδος αυτό συγκαταλέγονται 6 υποείδη (Green, 2002):

1. *Cuspidata*
2. *Laperrinei*
3. *Maroccana*
4. *Cerasiformis*
5. *Guanchica*
6. *Europaea* το οποίο περιλαμβάνει δύο ποικιλίες



Το υποείδος *Olea europaea subs.europaea* (ήμερη και αγριελιά) φύτεται κατά κύριο λόγο στην λεκάνη της Μεσογείου και ανήκει στα φυτά με διπλοειδή σειρά ($2n=46$) χρωμοσωμάτων (Chiappetta & Muzzaluro, 2012).

1.2.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Είναι αειθαλής μακρόβιος θάμνος ή μικρό δέντρο ύψους 2-10 m (κάποιες φορές φτάνει και τα 20 μέτρα), με ανοιχτή κόμη, αργυρότεφρο φλοιό και σκουρότεφρο ξηροφλοιό.

Φύλλα:

Τα φύλλα είναι διατεταγμένα κατ'εναλλαγή, απλά δερματώδη, επιμήκη, λογχοειδή, στενά ελλειψοειδή (1-6*0,5-1,5 cm) λειόχειλα, σκουροπράσινα στην άνω και αργυρόχροα στην κάτω επιφάνεια, με μίσχο μήκους 3-7mm. Στην προσαξονική τους επιφάνεια καλύπτονται με παχιά εφυμενίδα, ενώ στην αποαξονική τους επιφάνεια φέρουν μεγάλο αριθμό τριχών και στομάτων. Οι οφθαλμοί της ελιάς διακρίνονται σε ξυλοφόρους, ανθοφόρους, και μικτούς.



Χαρακτηριστική εικόνα φύλλων ελιάς

Άνθη:

Τα άνθη είναι μικρά, κιτρινόλευκα έως λευκοπράσινα με 2 στήμονες, σε βοτρυώδεις ταξιανθίες και ανάλογα με την ποικιλία κυμαίνονται από 10-20 που βγαίνουν σε μασχαλιαίους βότρεις ή πλάγια των βλαστών της προηγούμενης βλαστικής περιόδου. Ανθίζει από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούνιο.

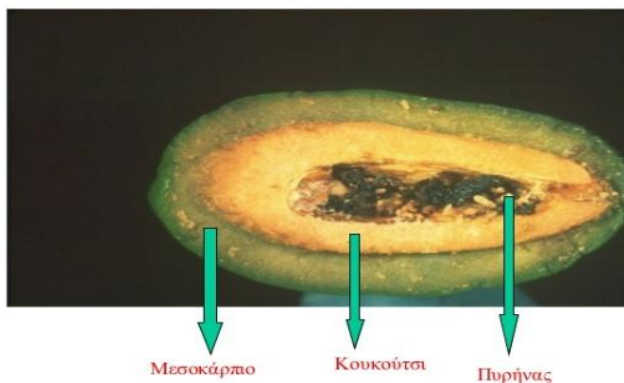


Άνθη ελιάς

Καρπός:

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη σφαιρική ή ελλειψοειδής, και αποτελείται από το περικάρπιο, το σαρκώδες (ελαιώδες) εδώδιμο ενδοκάρπιο και τον πυρήνα(λιθώδες σπέρμα). Το αρχικό του χρώμα είναι πράσινο ενώ κατά την πλήρη ωρίμανση εμφανίζει ώδες μαύρο χρωματισμό. Ωριμάζει από τα τέλη Οκτώβρη μέχρι τον Ιανουάριο και η συλλογή του γίνεται στο ίδιο διάστημα ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής. Ανάλογα με το βάρος του καρπού, οι διάφορες ποικιλίες της ελιάς χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τις μικρόκαρπες, τις μεσόκαρπες και τις μεγαλόκαρπες.

Ο ΚΑΡΠΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ



Καρπός της ελιάς σε κάθετη τομή



Διαφορετικές ποικιλίες ελιάς

Το ριζικό της σύστημα είναι επιπόλαιο, 20-70 εκατοστά, όπου σπάνια αγγίζει το ένα μέτρο και αναπτύσσεται κάθετα μέχρι τον τρίτο ή τέταρτο χρόνο ενώ αργότερα αντικαθίσταται από ένα άλλο θυσανώδες ριζικό σύστημα.

Ο κορμός της ελιάς είναι κυλινδρικός, λείος και τεφροπράσινος στα νεαρά δενδρύλια ενώ στα πιο ώριμα είναι ρυτιδομένος και φελοποιημένος σε χρώμα σκούρας τέφρας (Μεταπτυχιακή εργασία Εμμανουέλα Γαροφαλλάκη ΓΠΑ).



Κορμός υπεραιωνόβιας ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea subs.europaesa var.europaesa*) είναι ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στην Μεσόγειο με αξιοσημείωτη πολιτισμική και οικονομική σημασία. Ένα ασυνήθιστο γεγονός είναι ο πλούτος του γενετικού υλικού της καλλιεργήσιμης ελιάς το οποίο αποτελεί συνέπεια της μακροβιότητας της και της σύγχρονης έλλειψης διασταύρωσης με νέους γονοτύπους (Barranco et al.2005 Bartoline et al.2005 Baldoni and Belaj ,2009).

Παρά τον πλούτο του γενετικού υλικού της όμως, η ήμερη ελιά παρουσιάζει μικρότερη γενετική ποικιλία σε σχέση με την αγριελιά (Lumaret et al.2004 Breton et al.2006 Belaj et al.2010) υποδεικνύοντας ότι η τελευταία θα μπορούσε να

εμπλουτίσει τη γενετική βάση της καλλιεργούμενης ελιάς.

Μάλιστα, σημαντικά χαρακτηριστικά άμυνας, όπως αντοχή σε ασθένειες και προσαρμογή σε δυσμενείς συνθήκες συναντώνται συχνά στην αγριελιά αλλά σπάνια στην ήμερη (Colella et al.2008, Mkize et al.2008 Baldoni and Belaj 2009).

1.3 Διαφοροποίηση ελιάς /αγριελιάς –ταυτοποίηση ποικιλιών

Ως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχουν εκατοντάδες ποικιλίες και υποποικιλίες ελιάς. Μόνο για τη Μεσόγειο υπολογίζονται περί των 2000, οι οποίες φυσικά παρουσιάζουν διαφοροποίηση σε μορφολογικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά. Καθώς μάλιστα πολλές σύγχρονες καλλιέργειες ελιάς έχουν καρπό ο οποίος προσομοιάζει ως προς το μέγεθος αυτόν της αγριελιάς, συχνά καθίσταται δύσκολος ο διαχωρισμός τους (Bartolini et al 1998 2002 Ganino et al 2006).

Μέχρι πρόσφατα η ταυτοποίηση στηριζόταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο η αναγνώριση με βάση φαινοτυπικούς χαρακτήρες είναι προβληματική, ιδιαιτέρως στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης. Παραδοσιακά ο διαχωρισμός γινόταν εντοπίζοντας διαφορές κυρίως στο χρώμα και το σχήμα των φύλλων ή στη μορφολογία του ελαιοκάρπου. Το πλεονέκτημα είναι ότι αποτελούν άμεσα εντοπίσιμα χαρακτηριστικά, εύκολα προσδιορίσιμα, καθώς δεν απαιτούν κάποιο εξειδικευμένο μηχάνημα και εύκολα προσβάσιμα. Παρολαυτά μειονεκτούν, ως σημεία διαφοροποίησης, καθώς παρουσιάζουν μικρό πολυμορφισμό και εξαρτώνται από το περιβάλλον (Mohan et al 1997 Tanksley and Orton 1983).

Εκτός αυτού, κάποια μορφολογικά χαρακτηριστικά έχουν χρονικό περιορισμό πχ ελαιόκαρπος ή απαιτούν ένα πιο ώριμο στάδιο κάτι το οποίο μπορεί να καθυστερήσει ένα σωστό προσδιορισμό. Είναι φανερό ότι πλέον απαιτώνται πιο εξελιγμένες και ακριβείς μέθοδοι λόγω της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας που απαντάται στην ελιά.

1.3.1 *Olea sylvestris*

Η αγριελιά (*Olea europaea subsp.europaea var.sylvestris*) είναι θάμνος μακρόβιος. Παρά τις δυσκολίες προσδιορισμού της ακριβούς ηλικίας τους έχουν βρεθεί δέντρα τα οποία χρονολογούνται πάνω από 1000 ετών. Έχει πολυάριθμα κλαδιά, τα οποία φέρουν αγκάθια στην πρώιμη ηλικία, είναι συνήθως στρεβλά και

όταν ξεραθούν δημιουργούνται παραβλαστήματα από το υπόγειο τμήμα του βλαστού και το δένδρο συνεχίζει τη ζωή του. Τα φύλλα της είναι μικρά, αντίθετα, βραχύμισχα, ωσειδή,δερματώδη με λεία περιθώρια, σχήμα λογχοειδές ελλειπτικό, με σκουροπράσινο χρώμα από πάνω και αργυρόλευκο από κάτω. Το αργυρό χρώμα στο κάτω μέρος του φύλλου της ελιάς οφείλεται στο μεγάλο αριθμό πολυκύτταρων λεπιοειδών τριχών που υπάρχουν στην κάτω επιδερμίδα. Είναι πιο μικρά και στρογγυλοποιημένα σε σχέση με της ήμερης. Ο κορμός είναι συχνά κεκαμμένος ή στριφογυριστός και μπορεί να φτάσει μέχρι τα 15 μέτρα ιδιαίτερα σε «υπεραιωνόβια» δέντρα (Baltoni et al.2000). Ο φλοιός είναι γκι-σταχτύ, κατά κύριο λόγο λείος στα νεαρά δέντρα ο οποίος με το χρόνο αποκτά εξογκώματα και γίνεται πιο οζώδης(Belaj et al., 2011)(Breton et al., 2009).

Τα κλωνάρια της είναι πιο σκληρά συγκριτικά με την καλλιεργήσιμη ποικιλία.

Οι καρποί της είναι μικρές μαύρες δρύπες ,πιο σκληρές από τις αντίστοιχες της ήμερης, που παράγουν εξαιρετικής ποιότητας λάδι. Είναι το ονομαστό "αγριόλαδο", που χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική ως φάρμακο, σε δερματικές και άλλες παθήσεις. Η αγριελιά είναι ένα από τα τυπικά φυτά των μεσογειακών οικοσυστημάτων ενώ συναντάται και στις ακτές της νότιας Μαύρης θάλασσας. Στη χώρα μας μπορεί κανείς να συναντήσει άγριες ελιές διάσπαρτες σε πολλά μέρη κυρίως σε ακαλλιέργητες περιοχές , σε βραχώδεις πλαγιές, σχισμές ασβεστολιθικών πετρωμάτων, σε πετρώδεις λόφους και λαγκάδια μαζί με άλλουν θάμνους. Φύεται σε περιοχές με υψόμετρο 50/750 μέτρων από την επιφάνεια της θάλασσας. Άλλα ονόματα που χρησιμοποιούνται ανάλογα το μέρος είναι : Αγριλιός, Γριολιά, Κοσίνη, Κόστινος, Λευκάδα, Σκαντζογριλιός, Αρκολιά κτλ. Δεν είναι σπάνιο φαινόμενο η άγρια ελιά να χρησιμοποιείται ως υποκείμενο για να εμβολιαστούν πάνω σ' αυτή διάφορες ποικιλίες ήμερης, ελιάς. Έτσι οι ελαιώνες επεκτείνονται όλο και περισσότερο. Ενδιαφέρον έχει και η προσπάθεια επέκτασης των ελαιώνων με εμβολιασμό των παραβλαστημάτων της άγριας ελιάς σε περιοχές που καταστράφηκαν από πυρκαγιές.



Καρποί και φύλλα αγριελιάς

Για την αρχαία θεραπευτική το εκλεκτότερο εξ όλων των ελαιόλαδων ήταν αυτό που έδινε η αγριελιά, το οποίο ήταν πιο σπάνιο.

1.3.2 *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* (καλλιεργούμενη ελιά)

Οι βρώσιμες ελιές είναι προϊόν αυτού του δέντρου το οποίο φτάνει σε ύψος έως τα 20 μ. Το ξύλο είναι ιδιαίτερος ανθεκτικό στο πέρασμα των χρόνων ενώ όταν το άνω μέρος του δέντρου καταστραφεί από μηχανικά ή περιβαλλοντικά αίτια καινούριοι βλαστοί φύονται από το ριζικό σύστημα, το οποίο είναι σχετικά ρηχό και απλώνεται μέχρι τα 0,9-1,2 μ. (Κ.Α, 2000)



Καρπός και φύλλα ελιάς

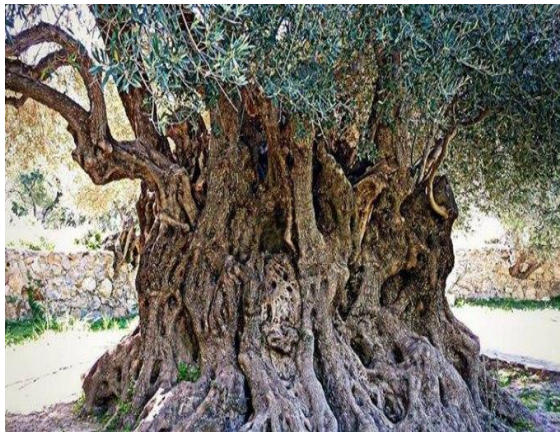
1.4 Εξάπλωση ελαιόδεντρου – Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία της ελιάς ανάγεται σε περιόδους προ της οργανωμένης ζωής του ανθρώπου στη γη. Έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες καθώς η προέλευση της ελιάς έχει χαθεί στους αιώνες, είναι όμως πάντα άρρηκτα συνδεδεμένη με την εξάπλωση και την ζωή των λαών γύρω από την Μεσόγειο .

Ο Α. De Candolle στη μελέτη του «Οι ρίζες των καλλιεργούμενων φυτών», καθώς και άλλοι ιστορικοί συγγραφείς, θεωρούν σαν πιο πιθανό τόπο προέλευσης της ελιάς, τις περιοχές της Συρίας και της Μικράς Ασίας, των οποίων οι βουνοπλαγιές είναι κατάφυτες με αγριελιές. Το στοιχείο όμως αυτό δε θεωρείται καθοριστικό, γιατί αγριελιές συναντώνται διάσπαρτες σ' όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, στα βόρεια παράλια της Αφρικής, στην Ισπανία, τη Νότια Ιταλία, στην Ελλάδα και κυρίως στην Τουρκία.

Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι η ελιά από τη Βόρεια Συρία διαδόθηκε στα ελληνικά νησιά και από εκεί στην ηπειρωτική Ελλάδα, από τους Φωκαείς, και το 600 π.Χ. στην Ιταλία, στη Σικελία και στη Σαρδηνία και μετά στις υπόλοιπες μεσογειακές χώρες.

Η συνεισφορά των ελλήνων για την καλλιέργεια της ελιάς στην περιοχή της Μασσαλίας, περίπου 2500 χρόνια πριν, είναι καλώς τεκμηριωμένη μέσα από πολλά αρχεία και καταγραφές και παρότι ελιές και αγριελιές υπήρχαν ήδη εκεί οι Έλληνες προφανώς εισήγαγαν νέες καλλιεργητικές μεθόδους (Breton et al., 2009) .



Κορμός υπεραιωνόβιας ελιάς-Ιεράπετρα Κρήτης

Στην Κρήτη μικρά δάση του φυτού – πρόγονου της καλλιεργήσιμης ελιάς που σώζονται στην περιοχή του Κόφωνα, στην οροσειρά των Αστερουσίων, μας δίνουν την εικόνα του τι συνέβαινε στα προϊστορικά χρόνια. Σύμφωνα με τον ερευνητή Ζαχ. Κυπριωτάκη, τα δάση της αγριελιάς έχουν μειωθεί λόγω υπερβόσκησης, αλλά μεμονωμένα δέντρα ή συστάδες μπορεί να δει κανείς σε πολύ απόκρημνες περιοχές, σε γκρεμούς και σε χάσματα βράχων. Αναμφισβήτητα η συστηματική καλλιέργεια της ελιάς συνέβαλε στην αλματώδη ανάπτυξη του μινωϊκού πολιτισμού.

Ανεξάρτητα από την προέλευση και τον τρόπο διάδοσης της ελιάς, είναι γεγονός ότι η καλλιέργειά της εξαπλώθηκε σε μεγάλη έκταση στην ευρωπαϊκή ήπειρο και αυτός ίσως είναι ο λόγος της γνωστής ονομασίας ελιά η Ευρωπαϊκή. Ειδικότερα για τη λεκάνη της Μεσογείου η ελιά αποτελεί τη βασικότερη καλλιέργεια από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα.

Οι απαρχές της ελαιοκαλλιέργειας τοποθετούνται συνήθως στο χρονικό ορίζοντα της λεγόμενης Πρώιμης Χαλκοκρατίας δηλαδή την 3η χιλιετία π.Χ.

Από τον 2ο έως τον 10ο αι. π.Χ. παρατηρείται μια εντυπωσιακή αύξηση της ελαιϊκής γύρης σύμφωνα με παλαιόβοτανικά δεδομένα, η οποία πιθανόν σηματοδοτεί τη σύγχρονη αύξηση της ελαιοκαλλιέργειας στον ελλαδικό χώρο.

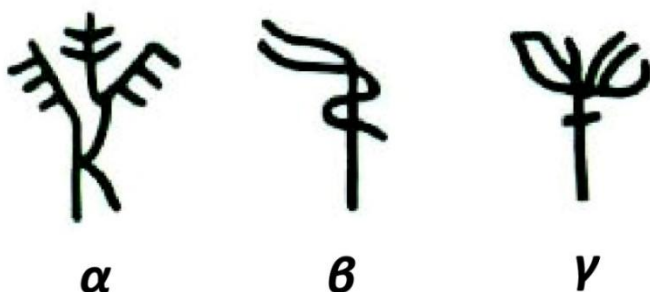
Κατά γενική παραδοχή η εξάπλωση έγινε από την Ανατολή στις χώρες της Μεσογείου (Ελλάδα Ιταλία Ισπανία Πορτογαλία και Γαλλία). Το 1560 οι ισπανοί κατακτητές μετέφεραν σπόρους ελιάς στο Περού. Από εκεί ή ανεξάρτητα το ελαιόδεντρο συναντάται στο Μεξικό, στη Χιλή και στην Αργεντινή. Οι φραγκισκανοί πατέρες διέδωσαν το ελαιόδεντρο και άλλους καρπούς από το Μεξικό στην Καλιφόρνια, όπου σήμερα υπάρχουν μεγάλες εκτάσεις με ελαιόδεντρα (Antonopoulos, Valet, Spiratos, & Siragakis, 2007).

1.4.1 Η ελιά στον ελλαδικό χώρο

Η Ελλάδα είναι μια χώρα κατάφυτη από ελαιώνες. Σε πόλεις και χωριά, σε βουνά αλλά και κάμπους μπορεί κανείς να συναντήσει πλήθος ελαιόδεντρων. Από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα δεν υπάρχει πιο ιερό δέντρο για τη χώρα μας, και ο λόγος είναι μάλλον προφανής.

Εκτός του ότι όλες οι συνθήκες ευνοούν την αναπτυξή του, οπότε θα έλεγε κανείς πως είναι ο φυσικός χώρος του, έχει προσφέρει στους Έλληνες πολλά παραπάνω από τον εξωραϊσμό του τοπίου.

Η παρουσία της ελιάς στον ελληνικό χώρο και η σπουδαιότητά της επισημαίνεται από τα αρχαία χρόνια σε πολλές καταγραφές. Το ιδεόγραμμα του ελαιόδενδρου (α,β) και του ελαιόκαρπου (γ) συναντάται στις πινακίδες της Γραμμικής Β



Ιδεογράμματα

Ο Όμηρος εξυμνούσε «το λιπαρόν έλαιον» με το οποίο εχρίοντο μετά το λουτρό οι ήρωές του. Ο Πλάτων επήνεσε το έλαιον, αποδίδοντάς του «πόνων αρωγήν». Οι αρχαίοι Έλληνες με στεφάνια αγρελιάς (κότινος) τιμούσαν τους Ολυμπιονίκες. Το ελαιόδενδρο ήταν σύμβολο της ειρήνης και ο καρπός τους αποτελούσε γι' αυτούς «μέγιστο αγαθόν προς πάσαν του βίου θεραπεία».

Το ελαιόδεντρο είναι σύμφωνα με τον Σοφοκλή «το δέντρο που θρέφει τα παιδιά»(η ελιά η παιδοτρόφα) και είναι ο πρωταγωνιστής στην ελληνική χλωρίδα και ιστορία ενώ το ελαιόλαδο είναι ο πρωταγωνιστής στην ελληνική διατροφή. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε ότι η Αθήνα πήρε το όνομά της απο τη θεά Αθηνά όταν αυτή επικράτησε του Ποσειδώνα, στην μεταξύ τους φιλονικία, προσφέροντας ως δώρο στους κατοίκους την ελιά.Σύμβολο ειρήνης και ευημερίας στο ταπεινό αυτό δέντρο οι Έλληνες οφείλουν εν πολλοίς την εξέλιξη του πολιτισμού τους αλλά και την επιβίωσή τους.

Απο τότε και μέχρι σήμερα η καλλιέργειά της είναι συνεχής, αδιάλληπτη και άρρηκτα συνδεδεμένη με την παράδοση και τον πολιτισμό των Ελλήνων. Υπήρχαν δυο τύποι ελιάς, όπως δείχνουν τα υπολείμματα μιας ήμερης ποικιλίας και μιας άγριας. Για το λόγο αυτό οι γραφείς των ανακτόρων χρησιμοποιούν δυο διαφορετικά ιδεογράμματα για την ελιά: Α και ΠΙ. Ο Chadwick πρότεινε να ερμηνευθούν τα

συλλαβογράμματα ως ακροφωνίες δυο επιθέτων, άγριος και τιθασός (ήμερος). Η αγριελιά εμφανίστηκε πρώτα στην ανατολική μεσόγειο, στην Ελλάδα όμως καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά. Ο J.Malena συμπλήρωσε την προηγούμενη έρευνα επικαλούμενος παλαιοβοτανικά δεδομένα, βάσει των οποίων οι Κρήτες της 2ης π.Χ. χιλιετίας εκμεταλλεύονταν συγχρόνως και την άγρια ποικιλία ελιάς και την ήμερη.

Ακόμη και στα μεταγενέστερα χρόνια το αγριέλαιον, που μερικές φορές αποκαλείται και ομφακέλαιον, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αρχαία ελληνική ιατρική και συνιστάται από τους ιατρούς εκείνης της εποχής ως κατάλληλο για ωμοτριβές (Διόσκουριδης). Η αγριελιά, η οποία στα κλασικά χρόνια ονομάζεται και κότινος, συνυπάρχει με την ήμερη ελιά στα μυκηναϊκά χρόνια και φαίνεται να χρησιμοποιείται ευρέως σε θεραπευτικές πρακτικές. Ακόμη, και τα ίδια τα φύλλα της βρασμένα σε ξίδι συνιστά ο Ιπποκράτης στην εμπύρετη μητρορραγία για πλύσεις γεννητικών οργάνων. Η συστηματική καλλιέργεια της ελιάς ξεκίνησε στους προϊστορικούς χρόνους :την εποχή του λίθου και του χαλκού και συνόδευε πληθώρα εκφάνσεων της καθημερινότητας των πολιτών.

Συνοψίζοντας τις χρήσεις της ελιάς στην αρχαιότητα:

1. Ο καρπός και το έλαιό της ήταν βρώσιμα.
2. Είχε συνδεθεί με της αθλητικές δραστηριότητες.
3. Για θρησκευτικές τελετές (σπονδές στους βωμούς).
4. Θεραπευτικές χρήσεις (60 φαρμακευτικές χρήσεις του λαδιού αναφέρονται στον ιπποκράτειο κώδικα της ιατρικής).
5. Παραγωγή αρωμάτων και καλλυντικών σκευασμάτων.
6. Για τον φωτισμό.
7. Την θέρμανση (τα κλαδιά και ο κορμός της ελιάς).
8. Στις τέχνες (απεικόνιση ελιάς σε αμφορείς και αγάλματα).
9. Στις καθημερινές τους συναλλαγές (νόμισμα με την Αθηνά φορώντας στεφάνι ελιάς).



Νόμισμα της αρχαιότητας

Ο Αριστοτέλης στο έργο του <<Αθηναίων Πολιτεία>> περιγράφει την αφθονία των ελαιόδεντρων στην Αθήνα. Ο Πλίνιος (συγγραφέας και γιατρός) αναφέρει το πρώτο ελαιοτριβείο και συνιστούσε την τοποθέτηση αρωματικών βοτάνων στο ελαιόλαδο. Η ελιά καλλιεργούταν σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας όπως στη Μήλο, στη Σάμο, την Εύβοια καθώς και αλλού. Η καλλιέργειά της είχε λάβει μεγάλες διαστάσεις κατά τον 5ο αιώνα (χρυσός αιώνας του Περικλή) όπου σύμφωνα με τον Ηρόδοτο η Αθήνα υπήρξε το κέντρο της ελαιοκαλλιέργειας.

1.4.2 Η ελιά και το λάδι στην αρχαιότητα

Οι αρχαίοι Έλληνες αγάπησαν την ελιά, θεοποίησαν την καταγωγή της και, όπως μας σώζει ο Αριστοτέλης, τιμωρούσαν με θάνατο όποιον την ξερίζωνε ή την κατέστρεφε. Ήταν σύμβολο ειρήνης και όποιος προσέφερε το κλαδί της γινόταν δεκτός με σεβασμό. Έτσι, το κρατούσαν στο χέρι τους οι απεσταλμένοι αγγελιαφόροι, για να ζητήσουν ανακωχή στα αντιμαχόμενα στρατεύματα και όποιος άλλος επιζητούσε συμφιλίωση και συνδιαλλαγή.

Το λάδι ήταν βασικό είδος διατροφής στην Αττική από τον 6ο π.Χ. αιώνα και μετά. Ο νομοθέτης Σόλωνας με μια σειρά μέτρων εξασφάλισε θεαματική αύξηση της παραγωγής. Ιδιαίτερα αυστηρή ήταν η ποινή σε όποιον τολμούσε να πειράξει ελιά και ιδιαίτερα τις «μορίες», τις ιερές ελιές που πίστευαν ότι προέρχονταν από την ελιά της θεάς Αθηνάς «Κι αν κανείς ξερίζωνε ή απέκοπτε κάποια μορία ελιά δικαζόταν από τον Άρειο Πάγο κι αν ήταν ένοχος τον καταδίκασαν σε θάνατο...» (Αριστοτέλης, Αθηναίων πολιτεία).

Στα κλασικά χρόνια ελαιώνες υπήρχαν κυρίως στην Κρήτη, στα νησιά του Ιονίου, στην Άμφισσα, στην Εύβοια, στη Λέσβο, στη Δήλο και τη Σάμο. Πολύ γνωστή είναι και η σχέση της ελιάς με αθλητικούς αγώνες και τελετές της αρχαίας Ελλάδας. Οι

αθλητές άλειφαν το σώμα τους με λάδι, το οποίο αφαιρούσαν όταν τελείωνε το αγώνισμα με τη βοήθεια μιας μεταλλικής «λεπίδας», την οποία ονόμαζαν στλεγγίδα.

Το μοναδικό βραβείο για τους νικητές των Ολυμπιακών αγώνων ήταν ένα στεφάνι φτιαγμένο από τον «κότινο», δηλαδή την άγρια ελιά. Σε ό,τι αφορά τώρα στις διάφορες άλλες τελετές, αξίζει να σημειώσουμε ότι στις θυσίες όλοι πήγαιναν στεφανωμένοι με κλαδιά ελιάς. Τα κλαδιά της ελιάς συχνά σχηματίζουν τα στέφανα του γάμου. Οι νεκροί θάβονται πάνω σε κλαδιά ελιάς. Κήρυκες και απεσταλμένοι σε καιρούς ειρήνης αλλά και πολέμου κρατούν στα χέρια τους ένα κλαδί ελιάς.

1.4.3 Θεραπευτικές Ιδιότητες Του Ελαιολάδου Κατά Την Αρχαιότητα

Από την αρχαιότητα η ελιά και το ελαιόλαδο απαντώνται σε κείμενα γνωστών συγγραφέων της εποχής, όπως είναι ο Όμηρος, ο Θεόφραστος, ο Αριστοτέλης, ο Πausανίας και πολλοί άλλοι.

Στον Ιπποκράτειο Κώδικα αναφέρονται περισσότερες από εξήντα φαρμακευτικές χρήσεις του ελαιόλαδου ενώ υπάρχουν και μεταγενέστερα συγγράμματα τα οποία αναφέρονται στις θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου. Το ελαιόλαδο κατέχει βασική θέση και στη σύγχρονη λαϊκή θεραπευτική καθώς θεωρείται χολαγωγό, βοηθητικό της κίνησης του εντέρου (άρα κατά της δυσκοιλιότητας), ανακουφίζει από δόγματα εντόμων, πόνους εγκαυμάτων και τη φλεγμονή από διαστρέμματα (Γ.Αντώνιος, n.d.).

Στην Κρήτη, την Πελοπόννησο και τη Μυτιλήνη, γνωστές ελαιοπαραγωγικές περιοχές της χώρας μας, έκαναν μαλάξεις με ελαιόλαδο στα διαστρέμματα. Ευρεία χρήση του ελαιολάδου υπήρξε και στον τομέα της μαιευτικής όπου άλειφαν την έγκυο με ελαιόλαδο για να έχει εύκολη γέννα. Άλειφαν επίσης το μωρό με ελαιόλαδο για τη θεραπεία των ερεθισμών στο ευαίσθητο δέρμα του.

Από πολύ παλαιά το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε τοπικά κατά των παθήσεων του δέρματος με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Γνωστός ήταν επίσης ο προστατευτικός ρόλος του ελαιόλαδου στο δέρμα από την ηλιακή ακτινοβολία και οι καταπραϋντικές ιδιότητές του.

Για τους ενήλικες, μερικές κουταλιές ωμό ελαιόλαδο το πρωί ήταν ευεργετικές για παθήσεις όπως, χολή, δυσκοιλιότητα, δυσπεψία και ηπατικές διαταραχές. Πριν από ένα και πλέον αιώνα, οι Ewald και Boas διαπίστωσαν ότι προσθήκη ελαιόλαδου στο γεύμα βοηθούσε στη μείωση της συγκέντρωσης των

γαστρικών υγρών. Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα από σειρά πειραμάτων των Farrel και Ivy. Ο Corpher διαπίστωσε μείωση της δυσπεψίας, με τη χορήγηση ελαιόλαδου μαζί με χυμό πορτοκαλιού.

1.5 Συνθήκες ανάπτυξης

Η ελιά χρειάζεται υψηλές θερμοκρασίες την άνοιξη και το καλοκαίρι και μία περίοδο, η διάρκεια της οποίας εξαρτάται από την ποικιλία, χαμηλών θερμοκρασιών (7-16°C) το χειμώνα, για να διαφοροποιήσει τους οφθαλμούς της. Παρόλα αυτά, οι πολύ υψηλές καλοκαιρινές θερμοκρασίες και οι ξηροί άνεμοι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της νέας βλάστησης και την καρπώδηση. Αντίστοιχα και οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα (-5°C και κάτω) μπορούν να καταστρέψουν την ελιά.

Η ελιά έχει μεγάλη ικανότητα να δημιουργεί νέα βλάστηση όταν καταστρέφεται το υπέργειο τμήμα της. Παράγει άνθη και καρπούς σε βλαστούς του προηγούμενου έτους και ανθίζει, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής και την ποικιλία, από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο. Η ελιά μπορεί να αναπτυχθεί και σε άγονα πετρώδη εδάφη πχ στη Μάνη, ωστόσο προτιμά τα γόνιμα εδάφη που διατηρούν την υγρασία τους χωρίς να κρατάνε υπερβολική ποσότητα νερού. Είναι φυτό ανθεκτικό στην αλατότητα του εδάφους (απόδειξη ότι φύεται σε παραθαλάσσια μέρη).

Η πλειονότητα των περιοχών όπου φύονται ελιές βρίσκεται σε γεωγραφικό πλάτος μεταξύ 30 και 40 μοιρών βόρεια και νότια του ισημερινού. Απαιτεί ήπιο και γλυκό κλίμα, χωρίς πολλές και απότομες αλλαγές των καιρικών συνθηκών. Χρειάζεται γενικά ασβεστώδη εδάφη και αναπτύσσεται καλύτερα σε γόνιμο έδαφος, αλλά παρουσιάζει μεγάλη αντοχή και σε άγονα, ξερά και πετρώδη εδάφη. Γενικά η ελιά είναι δέντρο που αντέχει στην ξηρασία. Η αντοχή στην ξηρασία κυμαίνεται από ποικιλία σε ποικιλία (Μεταπτυχιακή εργασία Εμμανουελα Γαροφαλλακη ΓΠΑ).



Ελαιώνας

1.5.1 Επικονίαση της Ελιάς

Το είδος *Olea europaea subs.europaea* συμπεριλαμβάνει τόσο την άγρια μορφή της (*var.sylvestris*) όσο και την καλλιεργήσιμη (*var.europaea*).

Η επικονίασή του γίνεται με γύρη είτε της ίδιας ποικιλίας (αυτοεπικονίαση) είτε άλλης ποικιλίας (σταυροεπικονίαση). Μάλιστα κάποιες ποικιλίες, καθώς δίνουν μικρή παραγωγή όταν αυτοεπικονιάζονται, καλλιεργούνται συχνά μαζί με άλλες ποικιλίες οι οποίες θεωρούνται επικονιαστές.

Η διασταρούμενη επικονίαση μπορεί να γίνει και ανάμεσα σε ήμερες ποικιλίες και αγριελιές δεδομένου ότι είναι ανεμόγαμα φυτά (Besnard et al 2000) γεγονός που ίσως να έχει οδηγήσει σε νέες ποικιλίες πέριξ της Μεσογείου (Chiaretta & Muzzalupo, 2012).

Σπάνια έχουν παρατηρηθεί καρποί χωρίς κουκούτσι οι οποίοι είναι προϊόν παρθενοκαρπίας και σπάνια φτάνουν στο στάδιο της ωρίμανσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σχινοκαρπία.

1.6 Οικονομική σημασία

Ήδη από την αρχαιότητα το ελαιόδεντρο αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα ευημερίας για του αρχαίους πολιτισμούς τόσο των Μινωιτών όσο και των Μυκηναίων. Δεν είναι τυχαία άλλωστα η οικονομική ευμάρεια όλων των περιοχών με ελαιώνες πχ Πελοπόννησος, νησια Ιονίου, Αττική κτλ.

Η καλλιέργεια της ελιάς αν και έχει αναπτυχθεί σε δύο στενές λωρίδες γης στην εύκρατη ζώνη (30°-45°) του βόρειου και νότιου ημισφαιρίου καταλαμβάνει μια σημαντική έκταση (100 εκατομμύρια στρέμματα), από την οποία τα 2/3 είναι αμιγείς ελαιώνες, ενώ το 1/3 αναφέρεται σε εκτάσεις συγκαλλιέργειας ελιάς με δημητριακά, άμπελο, ψυχανθή κλπ. Σήμερα σε όλη την υδρόγειο υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα από τα οποία το 95% περίπου καλλιεργούνται στη λεκάνη της Μεσογείου, η οποία διαθέτει άριστες εδαφοκλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς.

Πάνω από το 94% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου παράγεται από τις χώρες της Μεσογείου με 1^η ελαιοπαραγωγό χώρα την Ισπανία, ακολουθούμενη από την Ιταλία και την Ελλάδα.

Περίπου το 60% του καλλιεργούμενου εδάφους της Ελλάδας είναι ελαιώνες, ενώ εδώ απαντώνται οι περισσότερες ποικιλίες ελιάς. Παγκοσμίως είναι 1^η στην παραγωγή μαύρων ελιών. Πάνω από 132 εκ.ελαιόδεντρα φύονται στο έδαφός της από τα οποία εξάγονται περί τους 350.000 τόνους ελαιολάδου ετησίως.

Οι πιο σημαντικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές στην Ελλάδα είναι η Πελοπόννησος (65% επί του συνόλου) η Κρήτη και τα νησιά του Ιονίου και του Αιγαίου. Η κορωνέικη ποικιλία με καταγωγή την Κορώνη της Μεσσηνίας είναι εκείνη με τις περισσότερες βραβεύσεις ενώ το λάδι το οποίο παράγεται από αυτή θεωρείται ιδιαίτερος αρωματικό.

Οι ελιές και το ελαιόλαδο ανήκουν διαχρονικά στα κορυφαία εξαγωγίμα προϊόντα της πατρίδας μας και χαίρουν διεθνούς αναγνώρισης για την υψηλή ποιότητά τους.

Προϊόντα ελαιόδεντρου

Δεν θα ήταν υπερβολή να ισχυριστεί κανείς πως το δέντρο αυτό είναι ολόκληρο ένας θησαυρός καθώς ο άνθρωπος εκμεταλλεύεται :

- Το ξύλο ως καύσιμο υλικό
- Τον καρπό για βρώση αλλά και για την παραγωγή ελαιολάδου
- Το ίδιο το ελαιόλαδο πέραν της διατροφής χρησιμοποιείται σε καλλυντικά σκευάσματα, θεραπευτικές κρέμες και στην σαπωνοποιΐα
- Τα φύλλα για την απομόνωση πολύτιμων ουσιών

Μακράν το σημαντικότερο προϊόν είναι το ελαιόλαδο τόσο από οικονομική όσο και από διατροφική άποψη.

Κατηγορίες ελαιολάδου :

✓ **Παρθένα ελαιόλαδα :** Έλαια λαμβανόμενα από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες υπό συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου, και τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης· εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διαλύτες, με βοηθητικές ύλες παραλαβής που έχουν χημική ή βιόχημική δράση, ή με μεθόδους επανεστεροποίησης ή πρόσμειξης με έλαια άλλης φύσης.

Έχουμε τις εξής υποκατηγορίες :

- 1) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο δηλαδή παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,8 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.
- 2) Παρθένο ελαιόλαδο Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 2 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

✓ **Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα:** Έλαιό που αποτελείται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

✓ **Πυρηνέλαιο:** Έλαιο που αποτελείται από μείγμα εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν

υπερβαίνει το 1 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή (ΕΦΕΤ).

1.6.1 Παραπροϊόντα από την Παραλαβή του Ελαιολάδου

Περισσότερο από το 95% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου παράγεται στις χώρες που περιβάλλουν την περιοχή της Μεσογείου, φτάνει τα 1.7-3 εκατομμύρια τόνους ελαιολάδου το χρόνο και προέρχεται από 10-20 εκατομμύρια τόνους ελαιών. Η επεξεργασία του ελαιολάδου στην Ελλάδα γίνεται ως επί το πλείστον με τη διαδικασία εξαγωγής τριών φάσεων.

Η εν λόγω διαδικασία παράγει μεγάλες ποσότητες αποβλήτων, με υψηλό βιολογικό φορτίο, τα οποία χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα στερεά απόβλητα που αποτελούνται από ένα μίγμα στερεών συστατικών, όπως τον ελαιοπυρήνα και τα φύλλα των ελαιόδεντρων που συλλέχθηκαν κατά τη συγκομιδή του ελαιοκάρπου (Nunes, Pimentel, Costa, Alves, & Oliveira, 2016).

Στη δεύτερη κατηγορία συγκαταλέγονται τα αέρια αποβλητα (από τα μηχανήματα εσωτερικής καύσης και τα καυσαέρια καύσης του ελαιοπυρήνα) ωστόσο η επιβάρυνση της ατμόσφαιρας θεωρείται αμελητέα καθώς τα περισσότερα ελαιοτριβεία εγκαθίστανται εκτός αστικών περιοχών.

Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν τα υγρά απόβλητα τα οποία ονομάζονται κασίγαρος ή μούργα. Παράγονται κυρίως από φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και προέρχονται από το υγρό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και του νερού που προστίθενται στην πλύση του καρπού ή κατά τη μαλάξη, τη φυγοκέντρηση και το διαχωρισμό του ελαιολάδου, που λαμβάνει χώρα στον οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα και στον ελαιοδιαχωριστήρα. Η επεξεργασία τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου τους και των μεγάλων ποσοτήτων τους (Πέτρου Ι. Γεωργίου, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010).

1.6.2 Φύλλα Ελιάς

Με τον όρο «φύλλα ελιάς» αναφερόμαστε ουσιαστικά σε ένα μίγμα απο φύλλα και κλαδιά ως παραπροϊόντα από το κλάδεμα των ελαιόδεντρων, την συγκομιδή και καθαρισμό των ελιών και τέλος την εξαγωγή του ελαιολάδου. Υπολογίζεται ότι η παραγωγή των φύλλων ελιάς από το κλάδεμα αγγίζει τα 25 κιλά ανά δένδρο (El & Karakaya, 2009).

Βάσει άλλων υπολογισμών το 10% του βάρους των ελιών που προορίζονται για παραγωγή ελαιολάδου αντιστοιχεί στα φύλλα. Τα περισσότερα από τα φύλλα αυτά χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή ή απλά καίγονται μαζί με τα κλαδιά.

Οι Martins et al. (2009) απέδειξαν ότι η διατροφή των ζώων με αυτά βελτιώνει την ποιότητα του κρέατος καθώς μειώνει την οξείδωση των λιπιδίων. Για τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα μια διατροφή πλούσια σε φύλλα ελιάς συμβάλλει στην παραγωγή ποιοτικότερου γάλακτος σε σύγκριση με τη συμβατική διατροφή (Molina-Alcaide and Yanez-Ruiz, 2008).

Τα φύλλα της ελιάς θεωρούνται ως μια φθηνή πρώτη ύλη η οποία μπορεί κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί ως πηγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως οι φαινολικές ενώσεις. Ο μεγάλος αριθμός φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτά έχει προκαλέσει χρόνια τώρα το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών σε ολόκληρο τον κόσμο.

Μελέτες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους έχουν αναφέρει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών και πληθώρα ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία όπως αντιυπερτασική, διουρητική, καρδιοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντι-υπερλιπιδαιμική και υποστηρικτική στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας (Özcan & Matthäus, 2016).

Το φύλλα ελιάς χρησιμοποιούνται στην λαϊκή θεραπευτική για τις στομαχικές ενοχλήσεις και τα εντερικά νοσήματα ενώ το μάσημα αυτών θεωρείται ως αποτελεσματικό καθαρυστικό του στόματος. Τα αφεψήματα τόσο του αποξηραμένου καρπού όσο και των φύλλων λαμβάνονται από το στόμα για τη διάρροια και για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Ζεστά υδατικά εκχυλίσματα φρέσκων φύλλων λαμβάνονται για τη θεραπεία της υψηλής αρτηριακής πίεσης και την πρόκληση διούρησης, ενώ ζεστά υδατικά εκχυλίσματα αποξηραμένων φύλλων *per os* έχουν θετική επίδραση στο βρογχικό άσθμα. Είναι επίσης γνωστά για τις ευεργετικές επιδράσεις τους στο μεταβολισμό όταν χρησιμοποιούνται ως παραδοσιακά φυτικά φάρμακα. Αυτές οι ιδιότητες αποδίδονται στις φαινολικές ενώσεις των φύλλων της ελιάς.

Στη διάρκεια των τελευταίων ετών, η ζήτηση για το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς έχει αυξηθεί για χρήση σε τρόφιμα ως «ωφέλιμο πρόσθετο». Γενικά η βιομηχανία τροφίμων έχει επιδείξει μεγάλο ενδιαφέρον για τον εμπλουτισμό των

τροφίμων και την παραγωγή προϊόντων διατροφής με ενισχυμένες δράσεις προς όφελος της υγείας του καταναλωτή. Τα τελευταία χρόνια έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά πολλά προϊόντα (ως αφεψήματα, κάψουλες, εκχυλίσματα κτλ) τα οποία περιέχουν ξηρό εκχύλισμα φύλλων ελιάς με ιδιαίτερη αναφορά στο σεκοϊριδοειδές ολεωρωπεΐνη.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς παρουσιάζει ένα μεγάλο φάσμα *in vitro* και *in vivo* ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων της αντιοξειδωτικής δράσης, αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης επί των κυττάρων λευκαμίας με επαγωγή απόπτωσης (Abaza et al., 2007), κυτταροτοξικής δράσης έναντι καρκινικών κυττάρων μαστού στον άνθρωπο (Talhaoui et al., 2015), αντι-HIV δράση, αντιμυκητιακή γαστροπροστατευτική ενώ συμβάλλει στην εξασθένηση του διαβητικού νευροπαθητικού πόνου (Özcan & Matthäus, 2016).

Σχετικά πρόσφατα έχει προταθεί και η χρήση του ως συντηρητικό τροφίμων (Hayes et al., 2010).

Μέθοδοι εκχύλισης:

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη σύγκριση και πρόταση διαφόρων μεθόδων εκχύλισης φρέσκων ή αποξηραμένων φύλλων.

- (i) συμβατική εκχύλιση με διαβροχή (maceration) (Rahmanian, Jafari, & Wani, 2015),
- (ii) υποβοηθούμενη με υπερήχους (Ahmad-Qasem et al., 2013; Jarón et al., 2006; Rahmanian et al., 2015)
- (iii) υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Rahmanian et al., 2015; Sánchez-Ávila, et al, 2009; Taamalli et al., 2012),
- (iv) εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Le Floch et al., 1998).

Η συμβατική εκχύλιση έχει κάποια σοβαρά μειονεκτήματα όπως μεγάλους χρόνους εκχύλισης, ανεπαρκή παραλαβή συστατικών και λόγω της απαιτούμενης θέρμανσης /ανάμιξης υψηλό ενεργειακό κόστος (Rombaut et al., 2014).

Από τις μη συμβατικές τεχνικές η υποβοηθούμενη με υπερήχους φαίνεται η πιο πολλά υποσχόμενη για την παραλαβή κατά το δυνατόν πιο πλούσιων εκχυλισμάτων (Rombaut et al., 2014; Vilku et al. 2008). Είναι μια τεχνική οικονομική,

εύκολη με δυνατότητα εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα. (Ahmad-Qasem et al., 2013; Huang, Xue, Niu, Jia, & Wang, 2009).

Τα φύλλα της ελιάς είναι γνωστά για ποικίλα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά. Το εκχύλισμά τους έχει αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή (Aziz et al., 1998), αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική (Tutour and Guedon 1992 ,Benaverte-garcia et al.2000), αντιυπερτασική, υποχοληστεραιμική, αντι-υπεργλυκαιμική, αντι-θρομβωτική διουρητική και αντιογκογόνο δράση. Η χρήση τους από τον άνθρωπο για τις ευεργετικές τους ιδιότητες μετρά χρόνια (Soni et al. 2006). Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τη χρήση τους στους αρχαίους χρόνους καθώς προέρχονται από ένα φυτό ευρέως διαδεδομένο στη μεσόγειο και τον αραβικό κόσμο (οι Αιγύπτιοι πχ τα χρησιμοποιούσαν κατά τη διαδικασία της μουμιοποίησης ενώ οι Έλληνες ως αντιπυρετικό). Τα πράσινα φύλλα της ελιάς χρησιμοποιούνταν σα φάρμακο κατά της ελονοσίας (Pieroni et al. 1996, Ben Salem et al., 2015)

Το 1843 ο Daniel Hanbury στην Αγγλία αναφέρει ότι το πικρό συστατικό που παραλαμβάνεται κατά την παρασκευή τσαγιού από τα φύλλα ελιάς είναι υπεύθυνο για τη θεραπεία της ελονοσίας και του σχετιζόμενου πυρετού (Ben Salem et al., 2015)

Τις προαναφερθείσες ιδιότητες τις οφείλουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες και κυρίως όσους ανήκουν στην ομάδα των φαινολών.

1.7 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Με τον όρο δευτερογενείς μεταβολίτες αναφερόμαστε σε προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των οργανισμών. Είναι μικρού μοριακού βάρους, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλομορφία και δεν παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη ή αναπαραγωγή του φυτού, ωστόσο συμβάλλουν στην προστασία του και παρέχουν αναπαραγωγικά πλεονεκτήματα, προσελκύοντας έντομα-επικονιαστές. Μπορεί να ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες: τερπENOειδή, φαινολικά αλκαλοειδή κτλ. Ακόμα, ωστόσο, δεν υπάρχουν πλήρεις γνώσεις και ακριβής ορισμός για αυτούς, είναι όμως γενικά αποδεκτό ότι παράγονται προς όφελος του εκάστοτε οργανισμού και συνδέονται με τον πρωτογενή μεταβολισμό (Mann 1987).

Ο Verpoorte (2000) έδωσε τον παρακάτω ορισμό: *“Δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις με περιορισμένη κατανομή στις ταξινομικές ομάδες, οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για να ζήσει ένα κύτταρο (οργανισμός), αλλά παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου (οργανισμού) με το περιβάλλον του, συμβάλλοντας στην επιβίωση του οργανισμού μέσα στο οικοσύστημα που αναπτύσσεται.”*

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι συγκεκριμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες απαντώνται σε ένα μόνο φυτικό είδος ή παρόμοιες ομάδες φυτικών ειδών, ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες βρίσκονται σε όλο το φυτικό βασίλειο (Taiz and Zeiger, 2002; Verpoorte, 2000).

1.7.1 Ελιά και δευτερογενείς μεταβολίτες

Το ελαιόδεντρο είναι το κατεξοχήν δέντρο της μεσογείου, μιας περιοχής με μεγάλες περιόδους ηλιοφάνειας και υψηλά ποσοστά προσβολών από έντομα και παθογόνους μικροοργανισμούς. Για την αντιμετώπιση όλων αυτών των στρεσογόνων παραγόντων το ελαιόδεντρο συνθέτει μεγάλους όγκους πολυφαινολών, οι οποίες αποθηκεύονται κατά κύριο λόγο στα παχιά φύλλα του (Difonzo et al., 2017, Boss et al. 2016).

Οι πολυφαινόλες που απαντώνται στα φύλλα αλλά και άλλα μέρη της ελιάς και στις οποίες αποδίδεται υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ουσιαστικά ο τρόπος προστασίας του φυτού από παθογόνους οργανισμούς και η απάντησή του σε επιθέσεις εντόμων.

Το υψηλότερο ποσοστό εντοπίζεται στα φύλλα μεταξύ 1-14% ενώ στο λάδι κυμαίνεται από 0.005%-0.12% (Vogel et al., 2015).

1.8 Οξειδωτικό στρες

Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών ο οποίος σχετίζεται με φυσιολογικές μεταβολικές αερόβιες λειτουργίες του κυττάρου έχει συνδεθεί με διαφορετικού είδους οξειδωτικές βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό (Giri et al., 2012). Η κατανάλωση οξυγόνου κατά την ανάπτυξη των κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή αυτών των ριζών ενώ και ομοιάζοντα σε λιπίδια μόρια δύναται να παράγουν νέες ρίζες, υπεροξειδία και δευτερεύοντα προϊόντα οξείδωσης (Torel, Cillard, &

Cillard,1986). Αυτές οι ομάδες ελευθέρων ριζών είναι πιθανόν κυτταροτοξικές και πλεόνασμα αυτών οδηγεί τον οργανισμό στο λεγόμενο οξειδωτικό στρες. Ευτυχώς όμως υπάρχουν ουσίες όπως οι πολυφαινόλες, οι φλαβόνες και άλλες με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα χάρη στις ομάδες υδροξυλίου και στη δομική συχέτιση μεταξύ χαρακτηριστικών ομάδων του μορίου τους. Η γνωστή πλέον σε όλους μας μεσογειακή διατροφή, πλούσια σε φρούτα και λαχανικά συνδέεται στενά με μειωμένη εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου, εν μέρει οφειλόμενο στην υψηλή παρουσία βιοφαινολών. Αυτά τα συστατικά είναι άφθονα στα ελαιόδεντρα τόσο στον καρπό και το λάδι όσο και στα φύλλα

1.9 Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Σύσταση Φύλλων/Εκχυλίσματος

Η χημική σύνθεση των φύλλων ποικίλει ανάλογα με την προέλευση, την ποικιλία , τις συνθήκες αποθήκευσης, την ποσότητα κλαδιών στο δέντρο, τις κλιματικές συνθήκες, το επίπεδο υγρασίας και το βαθμό επιμόλυνσης με χόμα κ έλαια (Bilgin & Şahin, 2013). Επιπλέον οι δομικοί υδατάνθρακες και το περιεχόμενο άζωτο εξαρτώνται και αυτά απο τις κλιματικές αλλαγές την περίοδο συλλογής κτλ (El & Karakaya, 2009) .

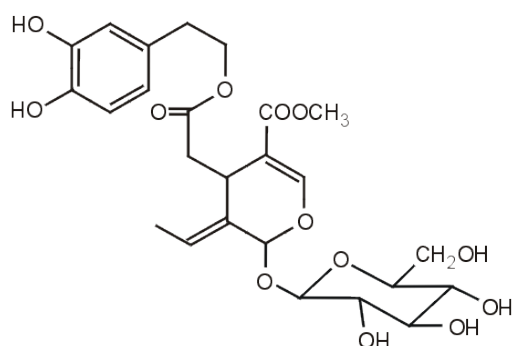
Η ποιοτική σύσταση του εκχυλίσματος των φύλλων είναι και αυτή εξαρτώμενη από πολλούς παράγοντες. Σύμφωνα με μια μελέτη η λυοφιλοποίηση, η ξήρανση με τη χρήση θερμού αέρα ή φούρνου ξήρανσης αλλοιώνει τη χημική σύσταση του εκχυλίσματος. Η ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 βαθμοί) ενδείκνυται καθώς τα ποσοστά ολευρωπείνης και βερμπασκοσίδη παραμένουν ανεπηρέαστα ενώ η έκθεσή τους σε θερμοκρασία 60 βαθμών οδηγεί σε μείωση (διαφορετικού ποσοστού) σχεδόν όλων των πολυφαινολών (Malik & Bradford, 2008).

Η χρήση επίσης ξηρού αέρα σε σκιερό μέρος είναι κατάλληλη και οικονομική χωρίς απώλεια θρεπτικών συστατικών. Αν και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με τα μέχρι τώρα δεδομένα καθίσταται σαφές ότι η ξήρανση σε υψηλές θερμοκρασίες είναι επιζήμια σε ό,τι αφορά στη θρεπτική αξία των φύλλων (Martin-Garcia & Molina-Alcaide, 2008).

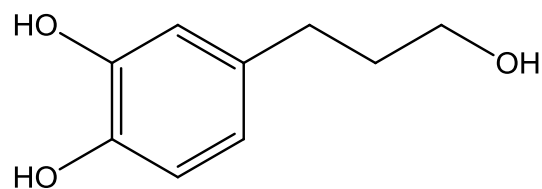
In vitro μελέτες υποστηρίζουν ότι ο τρόπος αποξήρανσης δεν έχει σημαντική επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών του εκχυλίσματος, σε αντίθεση με τη σύσταση αυτού. Πολλές ουσίες μέσα στον οργανισμό παρουσιάζουν διαφορετική απορρόφηση, επί παραδείγματι η ολευρωπεΐνη και ο βερμπασκοσίδης είναι αρκετά ανθεκτικά στο γαστρικό υγρό, εντούτοις η αντοχή τους μειώνεται αξιοσημείωτα κατά την διέλευσή τους από το λεπτό και το παχύ έντερο (Vogel et al., 2015).

Τέλος και ο διαλύτης εκχύλισης φαίνεται ότι επηρεάζει τη δράση του εκχυλίσματος, γεγονός αναμενόμενο εφόσον ανάλογα με την πολικότητα διαφορετικά συστατικά ή /και ποσοστά αυτών εντοπίζονται σε κάθε κλάσμα.

Ενδεικτικά παρατίθενται κάποια παραδείγματα στα οποία συσχετίζεται ο διαλύτης εκχύλισης με τη δραστηριότητα του εκχυλίσματος. Τα κύρια φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος, σε κάθε περίπτωση, είναι η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη.



ολευρωπεΐνη



υδροξυτυροσόλη

- ✓ Μείγμα μεθανόλης / νερού :

Αντιοξειδωτική (σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά καταλάσης)

Υπογλυκαιμική και υποχοληστεραιμική

Άλλες δράσεις: αντιθρομβωτική, προστατευτική του δέρματος (Saija and Uccella 2001) –αντιμικροβιακή, αναστέλει την ανάπτυξη πληθώρας βακτηρίων μυκήτων και ιών (Renis 1969; Hirschaman 1972) καρδιοπροστατευτική (Visioli et al. 1994)

- ✓ Οξικός αιθυλεστέρας : δραστικό έναντι στην *escherichia coli*
- ✓ Βουτανόλη: σημαντική δράση έναντι του εντερόκοκκου
- ✓ Μεθανόλη : *E.coli*
- ✓ Ακετόνη : αποτελεσματικό έναντι σε *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*

✓ Υδατικό : δράση σε Staphylococcus aureus και E. coli

(Ben Salem et al., 2015)

Ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες για τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και τις ευεργετικές τους ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό δεν υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός μελετών για το εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

Μάλιστα ο European Food Safety Authority (EFSA) έχει αποδώσει στο ελαιόλαδο τον εξής ισχυρισμό υγείας «οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες, όταν το ελαιόλαδο περιέχει το ελάχιστο 5 mg υδροξυτυροσόλης ή/και των παραγώγων αυτής όπως ολεωρωπεΐνη και τυροσόλη ανά 20 ml ελαιολάδου»

Κάτι αντίστοιχο δεν υπάρχει για το εκχύλισμα των φύλλων αν και έχει πιο πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο (μεγαλύτερη ποσότητα και ποικιλία) και αρκετές από τις πολυφαινόλες του φέρουν ένα μόριο γλυκόζης, μια δομική διαφορά η οποία μπορεί να επηρεάσει καθοριστικά τη δυνατότητά τους να επιφέρουν οφέλη στην υγεία. Σε μελέτες που έχουν γίνει το εκχύλισμα έχει εμφανίσει αξιόλογη δράση εναντίον διαφόρων καρκίνων (λευχαιμία, παγκρέατος, μαστού κτλ)(Boss, Bishop, Marlow, Barnett, & Ferguson, 2016).

1.10 Χημικά Χαρακτηριστικά – Βιοενεργό Προφίλ Φύλλων

Τα φύλλα περιέχουν σεκοϊριδοειδή (ολεωρωπεΐνη, λιγκοτροσίδης, διμεθυλιλευρωπεΐνη, ολεοσίδης), φλαβονοειδή (απιγενίνη, καιμπφερόλη, λουτεολίνη) και φαινολικά συστατικά (καφεϊκό οξύ, τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη). Ποιοτικές και ποσοτικές μελέτες με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσεως (HPLC) συζευγμένη με Photo Diode Array Detection (DAD) αποκάλυψαν έξι κυρίαρχα πολυφαινολικά συστατικά παρόντα στα εκχυλίσματα των φύλλων: ολεωρωπεΐνη (24.5%), βερμπασκοσίδη (1.1%), λουτεολιν-7-Ο-γλυκοσίδη (1.4%), απιγενίν-7-Ο-γλυκοσίδη, υδροξυτυροσόλη (1.5%) και τυροσόλη (0.7%). Λουτεολίνη, σεσαμόλη και ελλαγικό οξύ απομονώθηκαν επίσης από τα φύλλα.

Σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του φυτού, τα φύλλα περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό των ουσιών αυτών (Hayes et al., 2011; Niaounakis & Halvadakis, 2006; Rafiee et al., 2012a).

Το αιθέριο έλαιο των φύλλων έχει επίσης αντιοξειδωτική ικανότητα σχεδόν δύο φορές υψηλότερη από το εκχύλισμα πράσινου τσαγιού και πιο υψηλή από τη βιταμίνη C. Το έλαιο αυτό είναι ένα πολυσύνθετο μίγμα το οποίο περιέχει αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, αλκοόλες, αλκένια και αλκάνια (Rahmanian, Jafari, & Wani, 2015).

Η οργανική ύλη που είναι παρούσα στα φύλλα ποικίλει (76.4-92.7 g/100 g επί ξηρού), το περιεχόμενο σε ακατέργαστη πρωτεΐνη είναι χαμηλό (6.31-10.9 g/100 g επί ξηρού), η παρουσία αμινοξέων (89.9 g/100 g ολικού αζώτου) είναι σχετικά σημαντική και το άζωτο που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα είναι υψηλό (49.2 and 35.4 g/100 g ολικού αζώτου). Η ποσότητα ακατέργαστων λιπαρών επίσης διαφοροποιείται (2.28-9.57 g/100 g επί ξηρού) (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Η μαννιτόλη, μια φυσική πολυαλκοόλη με έξι άτομα άνθρακα και υπολογίσιμη γλυκύτητα της τάξεως 40-50% συγκρινόμενη με τη σακχαρόζη, εντοπίζεται επίσης στα φύλλα (Ghoreishi & Shahrestani, 2009). Η μαννιτόλη και η γλυκόζη είναι οι 2 πιο διαδεδομένοι ευδιάλυτοι υδατάνθρακες στα φύλλα, με ποσοστό που κυμαίνεται από 27.1-30.8% (Gucci, Lombardini, & Tattini, 1997,) με το ποσοστό της μαννιτόλης να εμφανίζει διακυμάνσεις από εποχή σε εποχή (Drossopoulos & Niavis, 1988).

Τα φύλλα, μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν ζωτροφή, μια οικολογική και οικονομική λύση που χρονολογείται αιώνες (Varmaghany, Rahimi, Torshizi, Lotfollahian, & Hassanzadeh, 2013).

1.10.1 Πολυφαινόλες

Τα φαινολικά συστατικά ή πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από τρία μεταβολικά μονοπάτια στα φυτά : της φωσφορικής πεντόζης, του σικιμικού και του φαινυλοπροπανοϊκού. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία δομών και ευρεία διάδοση συμβάλλοντας καθοριστικά στη μορφολογία και τη φυσιολογία των φυτών (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006), και θεωρούνται ιδιαίτερος υψηλού ενδιαφέροντος για την ανθρώπινη διατροφή λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Petti & Scully, 2009). Δομικά, παρά την ποικιλία τους, περιέχουν έναν κοινό δομικό σκελετό από άνθρακες : την C6-C3

φαινυλπροπανοϊκή ομάδα. Η βιοσύνθεση από αυτό το μονοπάτι έχει οδηγήσει σε ευρεία γκάμα φυτικών φαινολών : κινναμωμικού οξέος (cinnamic acids) (C6–C3), βενζοϊκού οξέος (benzoic acids) (C6–C1), φλαβονοειδή (flavonoids) (C6–C3–C6), προανθοκυανιδίνες (proanthocyanidins) [(C6–C3–C6)*n*], κουμαρίνες (coumarins) (C6–C3), στιλβένια (stilbenes) (C6–C2–C6), λιγνάνια (lignans) (C6–C3–C3–C6) και lignins [(C6–C3)*n*] (LamuelaRaventós et al., 2014, Talhaoui et al., 2015). Τα φαινολικά συστατικά είναι κατά κύριο λόγο υποκατεστημένα παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος και του υδροξυβενζοϊκού οξέος (Singh & Saldaña, 2011).

Οι φαινόλες περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα μόρια υδροξυλίου (πολικό μέρος) τα οποία ενώνονται απευθείας με τον αρωματικό δακτύλιο (άπολο μέρος) και απαντώνται στα φυτά συχνότερα με τη μορφή εστέρων ή γλυκοσιδών παρά σαν ελεύθερα μόρια (Rahmanian, Jafari, & Galanakis, 2014). Παρουσιάζουν διαφορετική διαλυτότητα στο νερό, υψηλό ρυθμό μεταβολισμού και ταχεία απομάκρυνση από τον οργανισμό (Parisi et al., 2014).

1.10.2 Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Οι αναγωγικές ιδιότητες των ομάδων υδροξυλίων και οι δομικές συσχετίσεις ανάμεσα στα διαφορετικά μέρη της χημικής δομής του είναι αυτές που προσδίδουν αντιοξειδωτική ικανότητα στις φαινόλες (Benavente-Garcia et al., 2000).

Ωστόσο, η αντιοξειδωτική ικανότητά τους εξαρτάται από μηχανισμούς που επηρεάζονται από δομικούς παράγοντες, όπως η παρουσία ή απουσία γλυκοσιδικών μερών στο μόριο των πολυφαινολών, η θέση γλυκοσιλίωσης, ο αριθμός και η θέση των ελεύθερων και εστεροποιημένων υδροξυλίων, κ.τ.λ. (Benavente-Garcia et al., 2000).

1.10.3 Πολυφαινόλες στα φύλλα της ελιάς

A) Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες που τις επηρεάζουν

Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες: προσχηματισμένες φαινόλες οι οποίες συντίθενται κατά την φυσιολογική ανάπτυξη των ιστών του φυτού και στις συνθετικά επαγόμενες σε απάντηση σε φυσικούς τραυματισμούς, προσβολές ή όταν το φυτό υφίσταται έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες όπως βαρέα μέταλλα, θερμοκρασία, υψηλή αλατότητα, UV ακτινοβολία κτλ. Η σύνθεση δηλαδή των φαινολών μπορεί να αφορά ιδιοσυστατικούς παράγοντες

αλλά συχνά προκαλείται από παράγοντες βιοτικούς ή αβιοτικούς οι οποίοι θέτουν το φυτό «σε συναγερμό» (Clériveret, et al., 1996; Lattanzio et al. 2006; Treutter, 2006). Αυτοί επηρεάζουν ποσοτικά και ποιοτικά τη φαινολική σύσταση των ελαιόφυλλων. (Bilgin & Şahin, 2013; Di Donna et al., 2010; Jarón-Luján et al 2006; Markakis et al., 2010; Paroti & Tsimidou, 2009a). Με τον όρο αβιοτικοί παράγοντες αναφερόμαστε σε μη έμβια χημικά και φυσικά μέρη του περιβάλλοντος τα οποία επηρεάζουν τα έμβια και τη λειτουργικότητα του οικοσυστήματος όπως το έδαφος, το νερό η υγρασία κοκ. Εν αντιθέσει βιοτικοί παράγοντες είναι έμβια όντα που επηρεάζουν άλλους οργανισμούς όπως μύκητες βακτήρια αλλά και ζώα ακόμα και ο ίδιος ο άνθρωπος (Talhaoui et al., 2015).

B) Χαρακτηριστικές πολυφαινόλες των φύλλων

Στην οικογένεια Oleaceae χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη ενώσεων που είναι γνωστά ως σεκοϊριδοειδή. Αυτές οι ενώσεις σχετίζονται με τα ιριδοειδή (π.χ. λογανίνη), τα οποία παράγονται μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού των μονοτερπενίων ως πρόδρομες ενώσεις διαφόρων ινδολικών αλκαλοειδών (Ryan et al., 2002). Τα ιριδοειδή χαρακτηρίζονται από ένα εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο που ενώνεται με ένα δακτύλιο κυκλοπεντανίου (Mann, 1987). Η σεκολογανίνη, η οποία προέρχεται από το άνοιγμα του κυκλοπεντανικού δακτυλίου της λογανίνης, αποτελεί τη μητρική ένωση των σεκοϊριδοειδών. Τα σεκοϊριδοειδή που χαρακτηρίζονται από εξωκυκλική 8,9-ολεφινική λειτουργικότητα είναι γνωστά ως ολεοσίδες(ολεοσίδια) και οι ενώσεις αυτές βρίσκονται στα φυτά της οικογένειας Oleaceae. Τα ολεοσίδια δεν είναι φαινολικά, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν ένα φαινολικό κομμάτι ως αποτέλεσμα εστεροποίησης μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος.

Τα φύλλα της ελιάς , θεωρούνται ως η κύρια θέση του μεταβολισμού των φυτών, τόσο σε επίπεδο πρωτογενών όσο και δευτερογενών προϊόντων (Heimler et al., 1992). Είναι αναμενόμενο επομένως να παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του φυτού και να έχουν ιδιαίτερη σημασία λόγω των δευτερογενών μεταβολιτών όπως τα σεκοϊριδοειδή ολεασίνη και ολευρωπεΐνη (Pereira et al 2007, Sato et al.2007, Ferreira

et al.2007). Οι γνωστές ευεργετικές τους δράσεις αποδίδονται στις περιεχόμενες πολυφαινόλες τους.

Θεωρούνται μία οικονομική και εύκολα προσβάσιμη πηγή φαινολικών συστατικών (Pince et al., 2012). Η μέγιστη θεωρητική απόδοση ολικών φαινολών με βάση τη μέθοδο FolineCiocalteu assay είναι 250.2 mg gallic acid equivalents (GAE) ανά 100 g ξήρου βάρους εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (Hayes et al., 2011). Η φαινολική σύσταση του εκχυλίσματος διαφέρει ανάλογα τη μέθοδο και την προέλευση του δείγματος. Η σχετική ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (άμεση συχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα) εμφανίζει την ακόλουθη πορεία : rutin > catechin > luteolin > olive leaf extract > hydroxytyrosol > diosmetin > caffeic acid > verbascoside > oleuropein > luteolin-7-glucoside > vanillic acid > diosmetin-7- glucoside > apigenin-7-glucoside > tyrosol > vanillin. Μάλιστα το εκχύλισμα έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από πολλά γνωστά αντιοξειδωτικά ίσως λόγω της συνέργειας ανάμεσα στα флаβονοειδή, την ομάδα των ολευροσιδών και τις υποκατεστημένες φαινόλες (Benavente-Garcia et al.2000).

Τα φύλλα περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων, ανάμεσα τους απλές φαινόλες (τα πιο κοινά και σημαντικά χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικά συστατικά), флаβονοειδή (φλαβόνες ,φλαβανόνες ,φλαβονόλες ,3-φλαβανόλες) και σεκοϊριδοειδή. Η υδροξυτυροσόλη έχει χαρακτηριστεί ως μία από τις κύριες απλές φαινόλες (Altiook, et al., 2008; Benavente-García,et al., 2000; Bouallagu et al. 2011; Fu et al., 2010; Goulas et al., 2009; Taamalli et al., 2012b). Η ομάδα των флаβονοειδών παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και ευρεία διάδοση στα φύλλα (Abaza et al., 2011; Heimler et al. 1992) και αποτελούνται από 2 αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι ενώνονται με 3 άτομα άνθρακα και οι οποίοι συμμετέχουν συνήθως σε οξυγονωμένο ετεροκυκλικό σύστημα (Škerget et al., 2005). Μπορεί να είναι παρόντα με τη μορφή του άγλυκου (quercetin, apigenin, luteolin, diosmetin) ή με την γλυκοζυλιωμένη μορφή (quercetin-7-O-rutinoside, luteolin- 7-O-rutinoside, luteolin-7-O-glucoside, luteolin-5-O-glucoside) (Briante et al. 2002a; Laguerre et al., 2009; Ryan et al., 2002). Ωστόσο τα σεκοϊριδοειδή, τα οποία είναι υποκατηγορία των ιριδοειδών (μονοτερπενικά παράγωγα με έναν δακτύλιο ιριδανίου) προέρχονται από διάσπαση του κυκλοπεντανικού δακτυλίου στη θέση 7,8 και περιέχουν μόρια φαινόλης,

περιορίζονται στην οικογένεια Oleaceae και είναι η κατεξοχήν ομάδα συστατικών της.

Ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς οδήγησε σε ταυτοποίηση 7 φαινολικών συστατικών: καφεϊκό οξύ, βερμπασκοσίδης, ολευρωπεΐνη, λουτεολιν-7-O-γλυκοσίδης, ρουτίνη απιγενιν-7-Oγλυκοσίδης και λουτεολιν-4'Ογλυκοσίδης.

Υψηλότερα ποσοστά φαινολικών συστατικών μετρήθηκαν στο υδατικό παρά στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, ίδιων αλλά και διαφορετικών ποικιλιών (Μακρης et al.2007).

Επιπροσθέτως τα κύρια συστατικά του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος ήταν τα φλαβονοειδή ενώ το κύριο συστατικό στο υδατικό εκχύλισμα ήταν η ολευρωπεΐνη αντιπροσωπεύοντας το 73% του συνόλου των ταυτοποιηθέντων συστατικών. Το καφεϊκό οξύ προσδιορίστηκε ως ολιγοσυστατικό. Τα στοιχεία για τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία όσο αφορά στο ποσοστό τους και τη διάδοσή τους είναι σπάνια (Liakopoulos et al 2007)

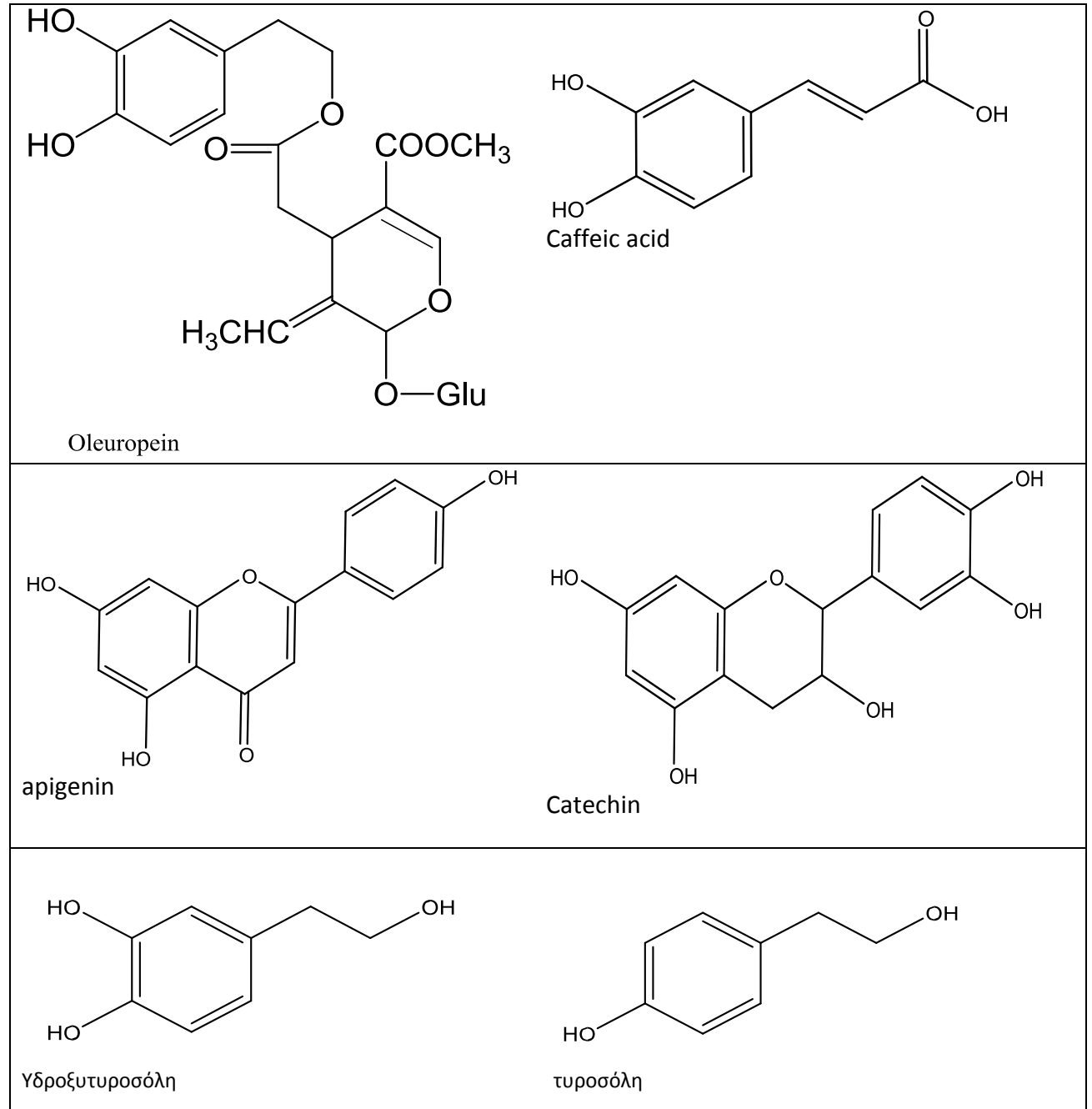
Η πιο άφθονη φαινολική ένωση ήταν η ολευρωπεΐνη και ακολούθησαν η υδροξυτυροσόλη, τα φλαβονο-7-γλυκοσίδια της λουτεολίνης και απιγενίνης και ο βερμπασκοσίδης. Επίσης, άλλες φαινολικές ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί είναι διάφορα σεκοϊριδοειδή (διμεθυλοελευρωπαΐνη, λιγουστροσίδιο, ελευροσίδιο, άγλυκο της ελευρωπαΐνης), γλυκοσίδια της λουτεολίνης (7-ρουτινοσίδιο της λουτεολίνης και 4-γλυκοσίδιο της λουτεολίνης), γλυκοσίδια της απιγενίνης (7-ρουτινοσίδιο της απιγενίνης) και απλές φαινόλες όπως το συριγκικό οξύ, το φερρουλικό οξύ και το γαλλικό οξύ (Briante et al., 2002; Le Tutour and Guedon, 1992).

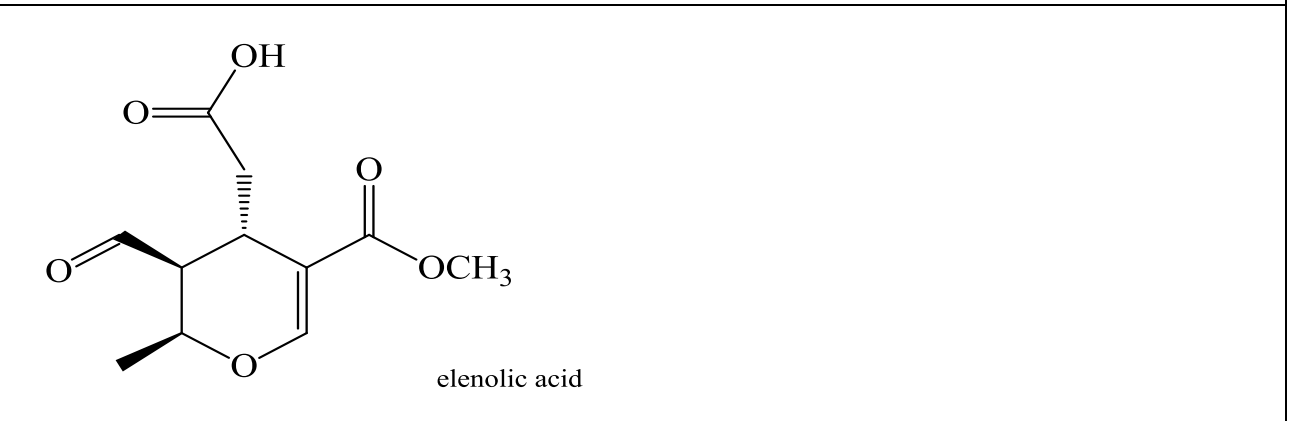
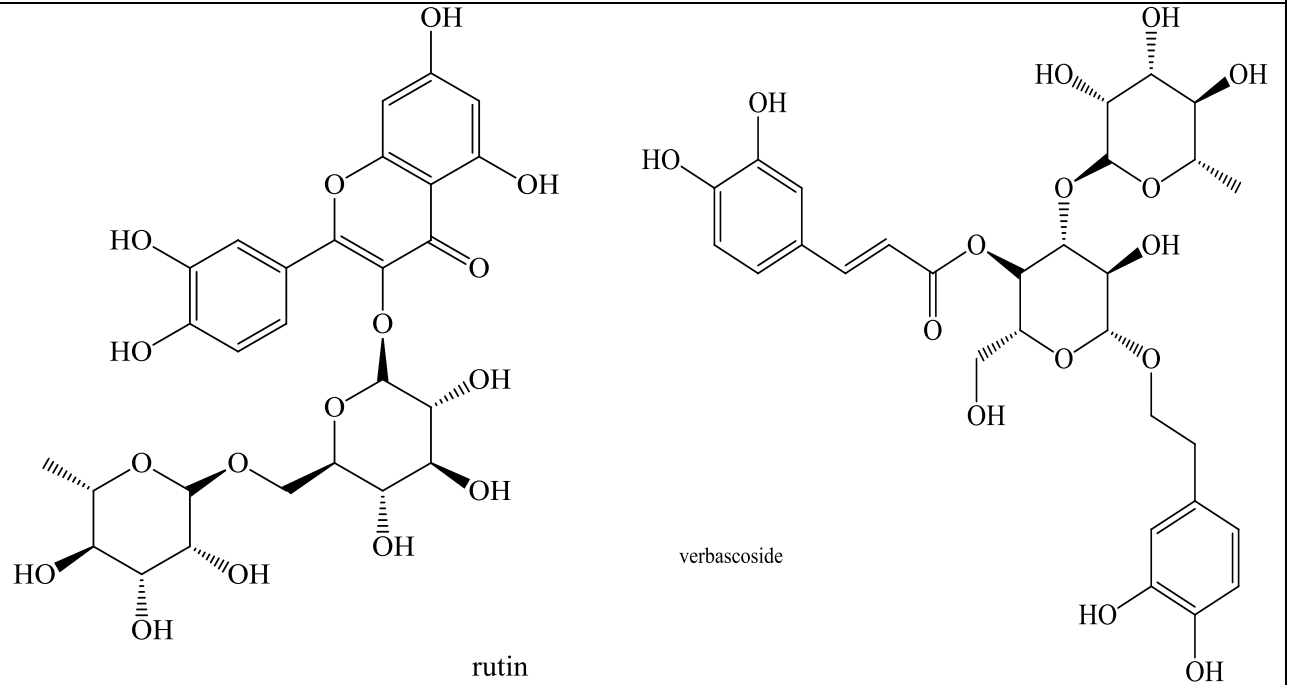
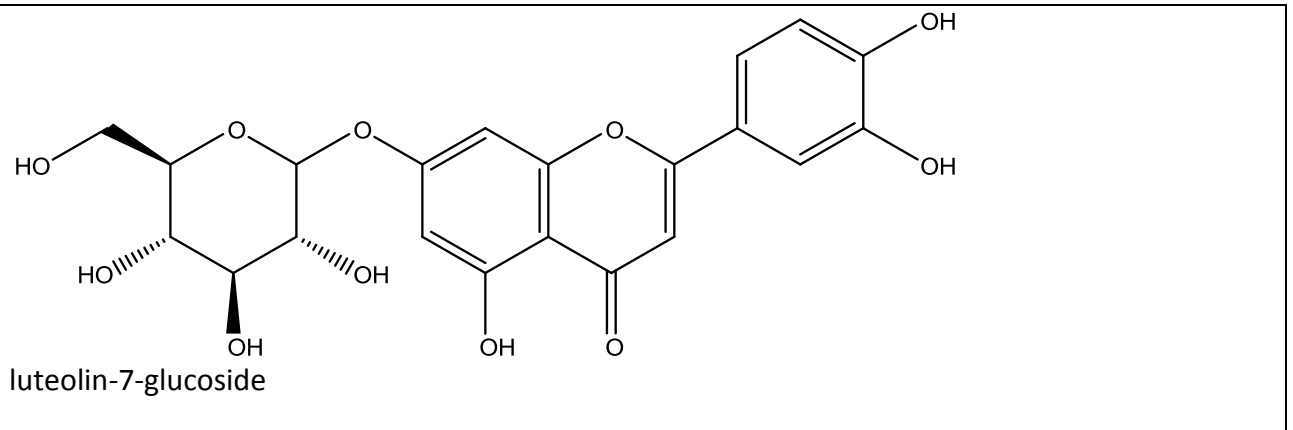
Σύμφωνα με τους Benavente-García et al. (2000) υπάρχουν 5 κυρίαρχες ομάδες φαινολικών συστατικών που συναντώνται στα φύλλα της ελιάς:

- ολευροσίδες (σεκοϊριδοειδη :oleuropein and verbascoside)
- φλαβόνες (luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside,diosmetin-7-glucoside luteolin and diosmetin)
- φλαβανόλες (rutin)
- φλαβαν -3-ολες (catechin)
- απλές φαινόλες (tyrosol hydroxytyrosol vanillin vanillic acid and caffeic acid)

Η ολευρωπεΐνη (6.53 mg/g) εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό ακολουθούμενη από το καφεϊκό οξύ (2.71 mg/g) και τον βερμπασκοσίδη(0.83 mg/mL) (Bouarroudj, Tamendjari, & Larbat, 2016).

Δομή κυρίαρχων φαινολικών συστατικών





Το πιο διαδεδομένο συστατικό στα φύλλα είναι η ολεωρωπεΐνη ακολουθούμενη από την υδροξυτυροσόλη, τις λουτεολίνη και απιγενίνη και τον βερμπασκοσίδη. Η υδροξυτυροσόλη είναι πρόδρομη ουσία της ολεωρωπεΐνης ενώ ο βερμπασκοσίδης είναι συζευγμένος γλυκοσίδης υδροξυτυροσόλης και καφεϊκού

οξέος. Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή στα φύλλα μετρήθηκε στα 2,058mg GAE(gallic acid equivalent) στα 100 γρ και 858mg CTE (catechin equivalent) στα 100 γρ τιμές παρόμοιες με τα αντίστοιχα ποσοστά στη φλούδα των κόκκινων σταφυλιών (Makris et al 2007). Το πικρό συστατικό - η ολευρωπεΐνη - είναι το κυρίαρχο σεκοϊριδοειδές και αντιοξειδωτικό με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Vogel et al., 2015). Ουσιαστικά είναι ένας εστέρας του ελενολικού οξέος με την διυδροξυφαινουλαιθανόλη (Benavente-Garcia et al 2000). Η υδροξυτυροσόλη είναι το κύριο προϊόν αποικοδομησής της. Η ολευρωπεΐνη είναι παρούσα σε μεγάλες ποσότητες κυρίως στα ανεπεξέργαστα φύλλα και στον ελαιόκαρπο ενώ η υδροξυτυροσόλη στον επεξεργασμένο ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο. Αυτή η μείωση στο ποσοστό της ολευρωπεΐνης και η συνοδή αύξηση της υδροξυτυροσόλης οφείλεται σε χημικές και ενζυματικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ωριμανση του καρπου ή εξαιτίας της επεξεργασίας στην οποία αυτός υπόκειται πχ κατά την παραγωγή του ελαιολάδου (Tan et al.2003).

1.10.4 Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών

Στη διατροφή με το όρο βιοδιαθεσιμότητα αναφερόμαστε στην ικανότητα του οργανισμού να απορροφήσει και να χρησιμοποιήσει συστατικά από τροφές αλλά και συμπληρώματα διατροφής. Πολλοί παράγοντες την επηρεάζουν όπως η δομή του συστατικού, ο βιολογικός του στόχος, ο χρόνος που χρειάζεται να απορροφηθεί και φυσικά και ιδιοσυγκρασιακοί παράγοντες.

Όσο αφορά στα φύλλα της ελιάς η μορφή κατανάλωσης και διατήρησής τους φαίνεται να επιδρά στη βιοδιαθεσιμότητα των ενεργών συστατικών τους. Μπορούν να καταναλωθούν σαν τσάι, σαν εκχύλισμα, σαν σκόνη και με άλλους τρόπους. Επί παραδείγματι, οι De Bock et. al. απέδειξαν ότι το ποσοστό πολυφαινολικών παραγώνων που μετρώνται στο πλάσμα διαφέρει αν έχει γίνει κατανάλωση ελαίου σε σχέση με τη χορήγησή τους σε μήτρα γλυκερόλης.

Συστατικά τα οποία εντοπίστηκαν στο εκχύλισμα φύλλων ελιάς αλλά όχι στο ελαιόλαδο περιλαμβάνουν αρκετά φλαβονοειδη και κυρίως λουτεολίνη και απιγενίνη οι οποίες έχουν επιδείξει σημαντική αντικαρκινική δράση. Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι η δομή των φαινολών, καθώς σε αντίθεση με τις περιεχόμενες στο λάδι και τον καρπό, οι υπάρχουσες στα φύλλα παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό σύζευξη με μόριο γλυκόζης. Η παρουσία του διαδραματίζει

σημαίνοντα ρόλο τόσο στη βιοδιαθεσιμότητα όσο και στη βιοενεργή ικανότητα των πολυφαινολών, επιδρώντας έτσι άμεσα στα προκαλούμενα στην υγεία οφέλη (Boss et al., 2016). Το μόριο αυτό της γλυκόζης αυξάνει σημαντικά το μοριακό βάρος των πολυφαινολών : ολευρωπεΐνη 540.51 g/mol, ενώ το άγλυκό της 394 g/mol. Πιθανόν βελτιώνει τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα ενώ διευκολύνει την πρόσβαση στα κύτταρα (Boss et al., 2016).

Σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα και τη σταθερότητα του εκχυλίσματος διαδραματίζει και η συνύπαρξη μέσα σε αυτό πληθώρας ουσιών. Ο συνδυασμός των πολυφαινολών συμβάλλει στη βιοσταθερότητά του, όταν ληφθεί *per os*, ενώ βελτιώνει και την ικανότητα της κάθε ουσίας να φτάσει τον κατάλληλο στόχο αμετάβλητη (Boss et al., 2016).

1.11 Φαρμακολογικές δράσεις φύλλων ελιάς:

Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται σε μια πολύ γνωστή, για τις ιδιότητες αυτή, ομάδα χημικών ουσιών, στις περιεχόμενες πολυφαινόλες (Bendini et al., 2007) (De La Puerta, et al. 2001). Το ενεργό οξυγόνο και άζωτο είναι θεμελιώδη για τη φυσιολογική λειτουργία των μηχανισμών παραγωγής ενέργειας, αποτοξίνωσης και ανοσοποίησης. Παράγονται συνεχώς από τον ανθρώπινο οργανισμό και ελέγχονται από ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Όταν όμως υπάρξει υπερπαραγωγή των ελευθέρων αυτών ριζών λόγω έκθεσης σε εξωτερικούς παράγοντες οξείδωσης ή αποτυχίας των μηχανισμών άμυνας μπορεί να υπάρξει καταστροφή σημαντικών βιομορίων (DNA λιπίδια πρωτεΐνες).

Η βλάβη αυτή σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, καρκίνου και άλλων χρόνιων ασθενειών (El & Karakaya, 2009). Η προστασία που προσφέρει μια δίαιτα πλούσια σε φρούτα και λαχανικά έναντι τέτοιων παθήσεων αποδίδεται κατά κύριο λόγο στα αντιοξειδωτικά που περιέχουν (Benavente-Garcia et al.2000, Briante et al., 2002).

Η ολευρωπεΐνη είναι ένα αντιοξειδωτικό (Hassen, Casabianca, & Hosni, 2015) με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Vogel et al., 2015). Η αποτροπή σχηματισμού

ελευθέρων ριζών από αυτή οφείλεται στην ικανότητά της να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων όπως ο Cu και ο Fe, τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών (Andrikorou et al 2002) όπως επίσης και στην ικανότητά της να αποτρέπει διάφορα ένζυμα εμπλεκόμενα στο μηχανισμό της φλεγμονής, όπως τις λιποξυγενάσες, χωρίς να επηρεάζει το μονοπάτι της κυκλοξυγενάσης (Visioli et al 2002). Τόσο η ολευρωπεΐνη όσο και η υδροξυτυροσόλη δεσμεύουν τα ανιόντα υπεροξειδίου και υδροξυλιωμένες ρίζες με την 1η να δείχνει μεγαλύτερη δράση (De la Puerta et al. 1999). Αμφότερες οι 2 αυτές ουσίες δεσμεύουν αποτελεσματικά το DPPH(1,1 diphenyl 2 picrylhydrazyl radical)(Gordon et al 2001)(Somona, Shode, Ramnanan, & Nadar, 2003).

Αντιφλεγμονώδης δράση

Η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη αναστέλλουν τη γένεση των B4 λευκοτριενίων τα οποία εμπλέκονται σε πολλά προφλεγμονώδη μονοπάτια καθώς και την παραγωγή εικοσανοειδών (Visioli et al 2008). Το ελενολικό οξύ μάλιστα έχει αντιφλεγμονώδη δράση παρόμοια με της ιβουμπροφαίνης (Pereira et al., 2007)(Bendini et al., 2007). Η λουτεολίνη είναι επίσης συστατικό-κλειδί για την αντιφλεγμονώδη δράση in vivo αλλά και την αντιαλλεργική δράση σε test-tubes μελέτες. Η απιγενίνη συστατικό και αυτή των φύλλων αναστέλλει το νιτρικό οξύ (διαμεσολαβητής της φλεγμονής) και την προσταγλαδίνη E2(de la puerta et al 1999).

Δράση στη ρευματοειδή αρθρίτιδα

Η ολευρωπεΐνη έχει βρεθεί ότι βοηθά στην πρόληψη και τη αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Όταν χορηγείται στα πρώιμα στάδια εμποδίζει την εξέλιξη των συμπτωμάτων ενώ οι προσβεβλημένοι ιστοί παρουσιάζουν βελτιωμένη όψη στο μικροσκόπιο. Ακόμα και αν χορηγηθεί μετά την πλήρη εκδήλωση της νόσου, σημαντική βελτίωση της φλεγμονής στις αρθρώσεις παρατηρείται σε σχέση με τα πειραματόζωα μάρτυρες (Gonzalez et al 1992). Παρόμοια οφέλη εμφάνισε και στην οστεοαρθρίτιδα. Σε πειραματικό επίπεδο

μειώνει το οίδημα των αρθρώσεων, βελτιώνει την όψη των ιστών και αποτρέπει την παραγωγή των κυτοκινών (Impellizeri et al 2011).

Ηπατοπροστατευτική δράση

Η χορήγηση ολευρωπεΐνης μειώνει σημαντικά τις τρανσαμινάσες του πλάσματος κυρίως τις alanine aminotransferase (ALT) και aspartate aminotransferase (AST) (Domitrovic´ et al., 2012; Kim et al., 2014).

Αναλγητική δράση

Σύμφωνα με μελέτες το εκχύλισμα φύλλων ελιάς αποκλείει διαύλους Ca ⁺² οι οποίοι σχετίζονται με τη αίσθηση του πόνου(Esmaeili-Mahani et al., 2010)

Δράση στο καρδιαγγειακό

Αντιαθηρωματική/υπολιπιδαιμική δράση

Έχει αποδειχθεί ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (OLE) έχει αντιαθηρωματική δράση η οποία συνδέεται τόσο με την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της όσο και με τη μείωση των λιπιδίων στον ορό του πλάσματος που αυτό επιφέρει (Aguilera et al., 2002; Cullinen, 2006; Wang et al., 2008, Mohagheghi et al. 2011).

Τα φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο αλλά και στα φύλλα της ελιάς έχουν συνδεθεί με μειωμένη εμφάνιση καρδιακών παθήσεων. Επιπλέον, η πλούσια σε αντιοξειδωτικά διατροφή θα μπορούσε να αποτρέψει τα δυσμενή αποτελέσματα του οξειδωτικού μεταβολισμού καθώς αυτά δεσμεύουν τις ελευθères ρίζες, αναστέλλοντας έτσι την οξείδωση και καθυστερώντας την αθηροσκλήρωση. Η διαδικασία αυτή ίσως περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος ενώ πιστεύεται ότι μειώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Özcan & Matthäus, 2016). Τα σεκοϊριδοειδή παράγωγα που υπάρχουν στα φύλλα είναι υπεύθυνα για τις αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος (Kimura et al 2012).

Τόσο το εκχύλισμα των φύλλων όσο και το ολεανολικό οξύ έχει επειδείξει in vitro υπογλυκαιμική, αντιοξειδωτική και αντυ-υπερλιπιδαιμική δράση (Somona et al.,

2003). Από πειράματα σε ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων πλούσιων σε ολεωρωπεΐνη και υδροξυτυροσόλη μειώνουν την οξειδωση των λιπιδίων (Jemai, Bouaziz, Fki, El Feki, & Sayadi, 2008).

Αντιθρομβωτική δράση

Με per os χορήγηση εμφανίστηκε σημαντική επιμήκυνση του μονοπατιού της πήξης και αντιαιμοπεταλιακή δράση καθώς εμποδίζουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και προκαλούν αναστολή της σύνθεσης των εικοσανοειδών (El & Karakaya, 2009)(Singh, Mok, Christensen, Turner, & Hawley, 2008).

Αντιυπερτασική

Σε μελέτη σε ασθενείς με υπέρταση 1^{ου} σταδίου που περιελάμβανε σύγκριση δράσης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς και καπτοπρίλης (αντιυπερτασικό φάρμακο) αποδείχτηκε ισοδύναμη μείωση τόσο της συστολικής όσο και της διαστολικής πίεσης. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, με πιο πιθανό τη συνεργιστική δράση της ολεωρωπεΐνης με άλλα συστατικά αφενός στην αναστολή του ACE και αφετέρου στον αποκλεισμό διαύλων ασβεστίου (Susalit et al., 2011).

Καρδιοπροστατευτικός ρόλος πολυφαινολών σε σύγχρονη λήψη δοξορουβικίνης

Αρχικά πρέπει να επισημανθεί ότι έχει αποδειχθεί πως η ολεωρωπεΐνη είναι ατοξική για διάφορα ζώα ενώ έχει αντιογκογόνο δράση (Hamdi et al 2008). Η δοξορουβικίνη είναι αντινεοπλασματικό φάρμακο (ανήκει στην τάξη των ανθρακυκλινών) δραστικό έναντι πολλών κακοηθών παθήσεων. Ωστόσο κλινικά η χρήση της είναι περιορισμένη καθώς έχει σοβαρές καρδιοτοξικές παρενέργειες, οι οποίες συχνά οδηγούν σε ΣΚΑ. Μετά από έρευνα αποδείχθηκε ότι η ολεωρωπεΐνη προστατεύει από τις επαγόμενες, λόγω της χρήσης της δοξορουβικίνης, καρδιοτοξικές παρενέργειες, καθώς αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων, ελαττώνει το οξειδωτικό στρες και μειώνει τα επίπεδα νιτρικού οξειδίου (nitric oxide species) στα κύτταρα του καρδιακού μυός. Για τους λόγους αυτούς η επαγόμενη από τη χρήση της δοξορουβικίνης καρδιοτοξικότητα μπορεί να αντιμετωπιστεί με ολεωρωπεΐνη (Andreadou et al 2008)

Υπογλυκαιμική δράση

Τα φύλλα ελιάς χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά εδώ και πολλά χρόνια ως αντιδιαβητικά στη βοτανοθεραπεία (Pereira et al 2006). Βελτιώνουν την λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος ενώ αυξάνουν και την ευαισθησία ανταπόκρισης στην ινσουλίνη (De Bock et al., 2013). Είναι ιδιαίτερα αναγνωρίσιμα στην Ευρώπη ως παραδοσιακό φάρμακο για τη διαβητική υπεργλυκαιμία, μια ακόμα δράση αποδιδόμενη κατά πρωτεύοντα ρόλο στην ολεωρωπεΐνη (Komaki et al 2008). Υπάρχουν 2 μηχανισμοί που εξηγούν τη δράση της αυτή :

Α) γλυκοζο επαγόμενη έκκριση ινσουλίνης και

β) Αύξηση της περιφερειακής πρόσληψης γλυκόζης

Μέρος της αντιδιαβητικής δράσης της ολεωρωπεΐνης οφείλεται και στην αντιοξειδωτική της ικανότητα. Αποτελέσματα ερευνών υποδεικνύουν ότι η ολεωρωπεΐνη αναστέλλει την υπεργλυκαιμία και το οξειδωτικό στρες λόγω διαβήτη και η χορήγηση της επικουρεί στην πρόληψη των διαβητικών επιπλοκών οι οποίες σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (al-azzawie et al 2006). Αναφέρεται επίσης ότι επιταχύνει την πρόσληψη της γλυκόζης από το κύτταρο (Gonzalez et al 1992). Επιπροσθέτως δρα αγωνιστικά στον TGR5, έναν υποδοχέα συζευγμένο με μια G πρωτεΐνη ο οποίος ενεργοποιείται από τα χολικά οξέα και μεσολαβεί σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Η αντιυπεργλυκαιμική δράση ενός TGR5 αγωνιστή απομωνοθέντα από τα φύλλα της ελιάς έχει αποδειχθεί πειραματικά (Pereira et al 2006). Ο TGR5 ταυτοποιήθηκε ως ο πρώτος υποδοχέας στην επιφάνεια του κυττάρου ο οποίος ενεργοποιείται από τα χολικά οξέα και μεσολαβεί σε ποικίλες ενδοκρινείς λειτουργίες αυτών. Τα χολικά οξέα είναι σημαντικά μόρια σηματοδότες (Sato et al 2007). Αυξάνουν την ενεργειακή δαπάνη, εν μέρει ενεργοποιώντας την λειτουργία των μιτοχονδρίων και έτσι αποτρέπουν την παχυσαρκία και την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη σε ποντίκια που λαμβάνουν διατροφή πλούσια σε λιπαρά (Sato et al 2007). Μειώνει επίσης το ρυθμό αύξησης του βάρους τους, εξαιτίας μιας τέτοιας διατροφής και έχουν πιθανή αντι υπεργλυκαιμική δράση η οποία μπορεί να συνεισφέρει στην δράση των φύλλων στον διαβήτη. Το ολεανολικό οξύ παρατηρήθηκε ότι μειώνει τη γλυκόζη του ορού και τα επίπεδα της ινσουλίνης σε ποντίκια και

ενίσχυσε την ανοχή στη γλυκόζη (Sato et al 2007). Επομένως, τόσο η ολευρωπεΐνη όσο και το ολεανολικό οξύ εμπλέκονται στην αντιδιαβητική δράση των φύλλων και δίνεται επιπλέον έμφαση στο ρόλο τους ως αγωνιστές του υποδοχέα TGR5 στη βελτίωση μεταβολικών διαταραχών.

Οστεοπόρωση

Η δράση εμφανίζεται τόσο σε επίπεδο διέγερσης των οστεοβλαστών, των κυττάρων δηλαδή που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των οστών, όσο και στην αναστολή λειτουργίας των οστεοκλαστών δηλαδή των κυττάρων που αφορούν στην αποδόμηση των οστών. Τόσο η ολευρωπεΐνη όσο και η υδροξυτυροσόλη παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και τη διατήρηση υγιών οστών και δύναται να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης (hagiwara et al 2011).

Ανοσοποιητικό

Η χρήση του σε περιπτώσεις παρατεταμένης λήψης αντιβιοτικών, η οποία ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης ευκαριακών λοιμώξεων, έχει κριθεί θετικά και μάλιστα είναι ιδιαίτερος δραστικό έναντι των Klebsiella και Pseudomonas, 2 βακτηριακά γένη με μεγάλη ανοχή. Επιπροσθέτως η χρήση των φύλλων ως «nutraceuticals» μειώνει τον κίνδυνο μικροβιακών λοιμώξεων κυρίως όσες αφορούν το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Η συνεργιστική δε και αθροιστική δράση όλων των συστατικών του εκχυλίσματος το καθιστούν ως την πλέον κατάλληλη επιλογή σε σχέση με τις ουσίες μεμονομένες (Pereira et al., 2007).

Χρήση στο Σύνδρομο Χρόνιας Κόπωσης

Σχετίζεται με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού επιτρέποντας έτσι την μόλυνση από ποικιλία μικροβίων, από τον ιό του έρπητα μέχρι παράσιτα και μύκητες. Ιδιαίτερα στις ΗΠΑ εκχύλισμα φύλλων ελιάς συνταγογραφείται για την αντιμετώπισή του (Michele et al 2002).

Αντιμικροβιακή δράση/Αντιική δράση

Αμφότερες η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι ποικίλων οργανισμών (bacillus subtilis, b.cereus, staphylococcus

aureus, salmonella typhi, vibrio cholera, v. parahemolyticus and micrococcus sp.) ,αντι-πρωτοζωική και αντιική δράση. Η ολευρωπεΐνη δρα μέσω του ελενολικού οξέος, το οποίο αποτελεί προϊόν υδρόλυσης της (sudjana et al 1999). Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει αντιμυκητιακές ιδιότητες ενώ είναι ιδιαίτερα δραστικό ενάντια στην κάντιτα (Zori et al., 2016).

Μυρμηκιές Εμφανίζονται κυρίως στα γόνατα, τα χέρια, τους αγκώνες και τα πόδια. Οφείλονται στον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων και καθώς το εκχύλισμα φύλλων είναι δραστικό έναντι ιών έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό έναντι και αυτού του ιού (Fredrickson et al 2000).

Αντικαρκινική δράση

Η δράση εναντίον διαφόρων μορφών καρκίνου αποδίδεται κυρίως στην ολευρωπεΐνη η οποία δρα με διάφορους μηχανισμούς.

- ✓ Προλαμβάνει τη φλεγμονή, η οποία αποτελεί μείζον παράγοντα ανάπτυξης όγκων (Corona et al. 2007).
- ✓ Σε κακοήθη κύτταρα, συγκεκριμένα σε καρκίνο του μαστού μειώνει την ικανότητα απάντησής τους στα οιστρογόνα, τις θηλυκές ορμόνες στις οποίες ποικίλοι τύποι καρκίνου του μαστού στηρίζονται για την επιβίωσή τους (Sirianni et al. 2010).
- ✓ Αναστέλει τη παραγωγή ενζύμων «πρωτεϊνών τήξεως» τις οποίες τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν για να προσβάλουν υγιείς ιστούς και να κάνουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα από την κύρια εστία (Scoditti et al. 2012).

Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη δραστικότητα έναντι πολλών μορφών καρκίνου πχ μαστού ,εγκεφάλου, ήπατος, προστάτη, κύστης, λευχαιμίας κτλ (Goulas et al. 2009; Kimura and Sumiyoshi 2009; Sirianni et al. 2010; Acquaviva et al. 2012).

Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν την αντιφλεγμονώδη με την αντικαρκινική δράση του εκχυλίσματος (Boss et al.,2016).

Συνοψίζοντας είναι εμφανές ότι η δραστηριότητα του εκχυλίσματος οφείλεται στα φαινορικά συστατικά με την ολευρωπεΐνη και την υδροξυτυροσόλη να διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο.

1.12 Ολευρωπεΐνη

Η ολευρωπεΐνη (oleuropein) άλλες ελληνικές αποδόσεις : ελευρωπαΐνη , ελαιοευρωπαΐνη είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης χαρακτηριστικός των ολεασών και αποτελεί το κύριο φαινολικό συστατικό της ελιάς από την οποία ονομάστηκε. Έχει μοριακό τύπο $C_{25}H_{32}O_{13}$ και μοριακό βάρος Mr 540.5

Η ολευρωπεΐνη ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα (Ranalli et al., 2006). Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιοκάρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Veer WLC, U.S. Patent 3,033,877).

Η ολευρωπεΐνη βρίσκεται στα φύλλα της ελιάς και στον ελαιοκάρπο. Η περιεκτικότητα σε ολευρωπεΐνη είναι μεγαλύτερη στα πράσινα νεαρά φύλλα σε σχέση με τα πιο «γερασμένα» γεγονός που ίσως οφείλεται σε βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν μέρος κατά τη γήρανση του φύλλου και έχουν σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση του μορίου (πιθανόν συμμετέχει το ένζυμο της β-γλυκοσιδάσης)(Ranalli et al., 2006). Επίσης μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζει στους ανώριμους ελαιοκάρπους και κυρίως στην ουσία αυτή οφείλεται η έντονα πικρή γεύση τους. Το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης, επιβεβαίωσαν τον χημικό τύπο της. Στην ίδια εργασία περιγράφουν μια μέθοδο απομόνωσης της από τις ελιές. Χρησιμοποίησαν την τεχνική της εκχύλισης κατ'αντιρροή (counter-current extraction) και απομόνωσαν 7,2 g σχεδόν καθαρής ουσίας από 500 g καρπών μιας ποικιλίας ελιάς (Manzanilla)

Είναι ένας φαινολικός σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης που αποτελείται από μία πολυφαινόλη την 4-(2-hydroxyethyl) benzene-1,2-diol, γνωστή ως hydroxytyrosol, ένα σεκοϊριδοειδές το ελενολικό οξύ και ένα μόριο γλυκόζης. Είναι το κυρίαρχο βιοενεργό συστατικό στα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea*). Το ποσοστό ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία, το κλίμα, την περίοδο και τον τρόπο συλλογής. Συναντάται κυρίως στην οικογένεια Oleaceae για την οποία θεωρείται και χημειοταξινομικός δείκτης για την κατάταξη γενών μέσα σ'άυτη (infra-generic classification)(Jensen, Franzyk, & Wallander, 2002).

Μέσα στην οικογένεια αυτή έχει βρεθεί και απομονωθεί από διάφορα άλλα είδη όπως : *Syringa pubescens* (Deng, Yuan, Yin, Wang, & Zhao, 2010), *Syringa reticulata* (Bi et al., 2011), *Syringa dilatata* (Oh et al., 2003), *Syringa oblata* var. *alba* (Nenadis, Vervoort, Boeren, & Tsimidou, 2007), *Ligustrum vulgare* (Tattini et al., 2004), *Ligustrum lucidum* (Guo et al., 2011), *Jasminum officinale* var. *grandiflorum* (Teerarak, Laosinwattana, & Charoenying, 2010), *Fraxinus excelsior* (Egan et al., 2004), *Fraxinus ornus* (Iossifova, Vogler, & Kostova, 1998) κ.α.

1.12.1 Βιόσυνθεση Ολεωρωπεΐνης

Στην οικογένεια Oleaceae η βιόσυνθεσή της λαμβάνει χώρα μέσω μιας διακλάδωσης της οδού του μεβαλονικού οξέος από τον δευτερογενή μεταβολισμό, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των ολεοσιδίων (Damtoft et al., 1992).

Είναι παράγωγο του λιγκστροσίδη ο οποίος προέρχεται από το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) με ενδιάμεση ένωση το 7-κετολογανικό οξύ. Μία πιθανή βιόσυνθετική οδός, η οποία περιλαμβάνει το δεοξυλογανικό οξύ, το 7-επιλογανικό οξύ, το 7-κετολογανικό οξύ, το 8-επικινγκισιδικό οξύ, τον ελαιοσιδικό 11-μεθυλεστέρα, το 7-β-1-D- γλυκοπυρανόσυλο 11-μεθυλελαιοσίδιο και το λιγουστροσίδιο, που τελικά οδηγεί στην ολεωρωπεΐνη προτάθηκε από τους Damtoft et al. (1993) για τα φυτά της οικογένειας Oleaceae (Damtoft, Franzyk, & Jensen, 1993).

1.12.2 Σεκοϊριδοειδή

Οι σεκοϊριδοειδείς ενώσεις συναντώνται επί το πλείστον γλυκοζυλιωμένες και παράγονται από το βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής τερπενίων (Obied et al. 2008). Βρίσκονται σε αφθονία στην οικογένεια Oleaceae, στην οποία ανήκει και η *Olea europaea* L. Όσον αφορά τη δομή τους, χαρακτηρίζεται από την παρουσία του

ελενολικού οξέος στην γλυκοζυλιωμένη ή στην απλή μορφή του και από μία φαινυλαίθυλο αλκοόλη (υδροξυτυροσόλη ή τυροσόλη). Οι γενίνες των σεκοϊριδοειδών προκύπτουν από τους αντίστοιχους γλυκοσίδες, που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο με ενζυμική υδρόλυση από το ενδογενές ένζυμο β-γλυκοσιδάση (Bendini et al., 2007). Κατά τη διάρκεια των περιόδων ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού, αρκετές βιοχημικές αλλαγές συμβαίνουν σε αυτόν. Όταν ο καρπός φθάσει σε ηλικία έξι μηνών, τα κύρια φαινολικά συστατικά είναι γλυκοζυλιωμένα σεκοϊριδοειδή (ολευρωπεΐνη και λιγκτροσιδής) αλλά τα μόρια αυτά δεν εντοπίζονται στο ελαιόλαδο, πιθανώς επειδή υδρολύονται από τη β- γλυκοσιδάση κατά τη διάρκεια της σύνθλιψης και της μάλαξης του καρπού, για την παραγωγή ελαιολάδου (Ryan et al. 2002).

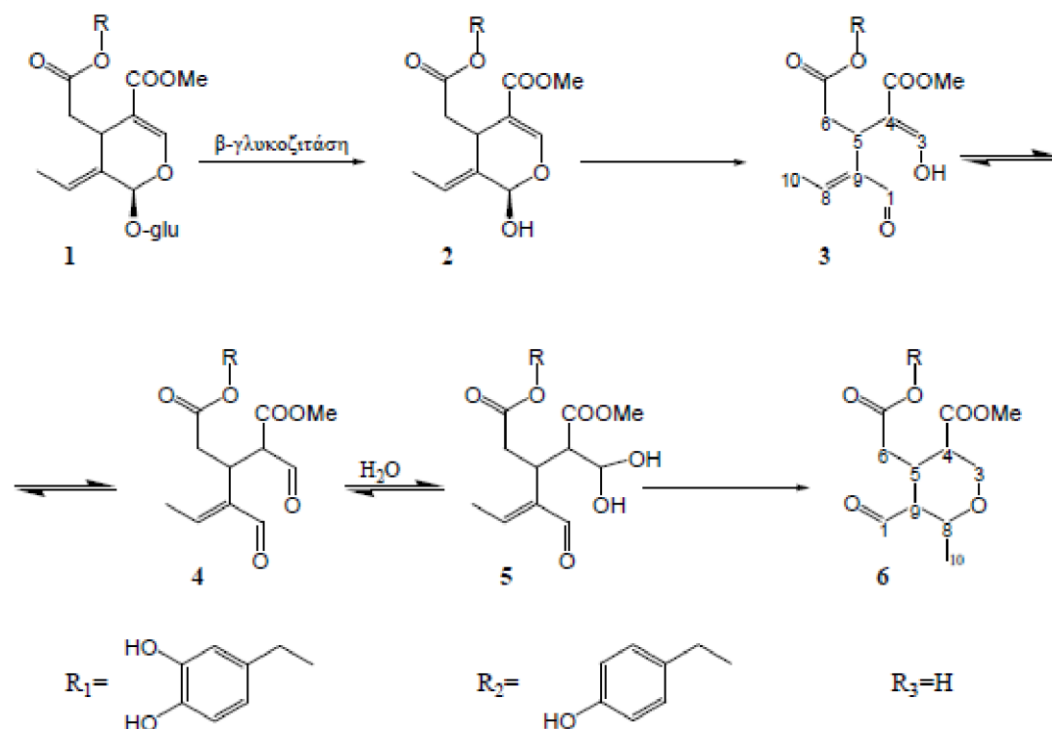


Figure 1 Ενζυματική υδρόλυση της ολευρωπεΐνης (R=R1), του λιγκτροσιδίου(R=R2) και του ελενολικού οξέος (R=R3) με το ένζυμο β-γλυκοσιδάση (2) άγλυκο της ολευρωπεΐνης ή του λιγκτροσιδίου(4) διαλδεϋδική μορφή της ολευρωπεΐνης και του λιγκτροσιδίου χωρίς την καρβοξυμέθυλο ομάδα (6) αλδεϋδική μορφή της ολευρωπεΐνης και του λιγκτροσιδίου

Κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου, υδρολυτικοί μηχανισμοί οδηγούν στην απελευθέρωση απλών φαινολών, δηλαδή υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης από σύνθετα σεκοϊριδοειδικά παράγωγα (Cinquanta et al. 1997).

1.13 Άλλα συστατικά των φύλλων

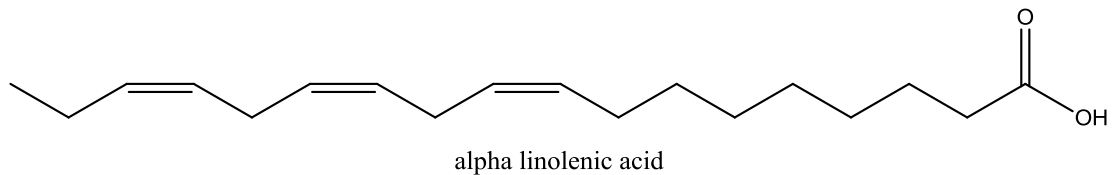
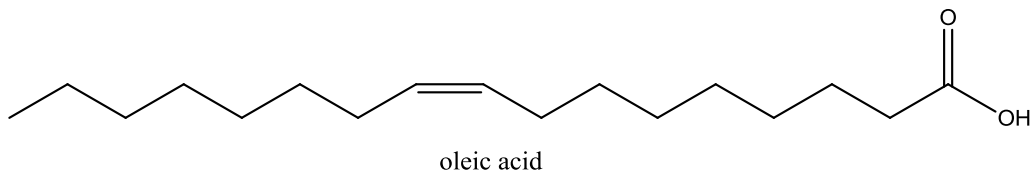
Έχοντας αναδείξει τη σημασία των πολυφαινολών και δη της ολευρωπεΐνης κρίνεται σκόπιμο στο σημείο αυτό να δοθούν επιγραμματικές πληροφορίες για την ύπαρξη και άλλων πολύτιμων στοιχείων στα φύλλα της ελιάς.

✓ Mineral elements Ανόργανα συστατικά

Τα στοιχεία που βρέθηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά ήταν τα Al, Ca, Fe, K, Mg, P, and S. Παρόλαυτα όμως ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις η ποσότητά τους δεν στοιχειοθετούσε τη χρήση τους ως πηγή αυτών (Cavalheiro et al., 2015).

✓ Λιπαρά οξέα

Είναι χρήσιμο να επισημανθεί η διαφορά στην παρουσία λιπαρών οξέων ανάμεσα στα φύλλα ελιάς και στο ελαιόλαδο. Χαρακτηριστικά το κύριο ακόρεστο λιπαρό οξύ στο ελαιόλαδο είναι το ελαϊκό οξύ ενώ στα φύλλα κυριαρχεί το λινολενικό. Το ποσοστό αυτού στο ελαιόλαδο είναι 0,5-2,0% ενώ στα φύλλα μπορεί να φτάσει μέχρι το 41,3%, εύρημα αξιοσημείωτο καθώς το άλφα λινολενικό οξύ (LNA, 18:3n-3) μέσω ενζυμικών διεργασιών του μεταβολισμού οδηγεί εν τέλει στην παραγωγή μακρών αλυσίδων πολυακόρεστων ω-3 λιπαρών οξέων (LC-PUFA) καθιστώντας έτσι τα φύλλα πιθανή πηγή n-3 PUFA. (Cavalheiro et al., 2015)



1.14 Συμπερασματικά

Οι διάφορες μελέτες και έρευνες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια και αφορούν στο εκχύλισμα φύλλων ελιάς ή /και μεμονωμένα συστατικά αυτού φαίνεται να δίνουν σημαντικά ερείσματα στην χρόνια παραδοσιακή χρήση τους για ποικίλες παθήσεις.

Με προεξάρχουσα ομάδα τις πολυφαινόλες και κυρίαρχη ουσία την ολεωρωπεΐνη φαίνεται ότι οι 2 κύριες δράσεις του που επιβεβαιώνονται από ποικίλα πειραματικά δεδομένα είναι η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης. Αυτές μάλιστα πολλές φορές είναι η αιτία εμφάνισης και άλλων δράσεων όπως αντικαρκινικής, αντιυπερλιπιδαιμικής κ.α.

Μένει να αποδειχθεί με κλινικές πλέον δοκιμές η δράση της ολεωρωπεΐνης ως μεμονωμένο ή μέσα στο εκχύλισμα και έτσι να εμπεριστατωθεί σαφώς και επιστημονικώς η αξία της ένταξής της ως συμπλήρωμα διατροφής ή ακόμα και σαν εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση, με ταυτόχρονο όφελος τη μείωση της οικολογικής επιβάρυνσης από την ελαιοκομία αλλά και τη μείωση του κόστους παραγωγής σκευασμάτων-συμπληρωμάτων διατροφής χρησιμοποιώντας μια φθηνή πρώτη ύλη.

Σύμφωνα με τον EMA (European Medicines Agency) (11ος/2011) μετά απο μελέτη των σχετικών ερευνών τα φύλλα (folium) της ελιάς *O. europaea L* θεωρούνται ήπιο διουρητικό και δύναται να χρησιμοποιηθούν ως αφέψημα σε περιπτώσεις μέτριας κατακράτησης υγρών αφού πρώτα άλλες παθήσεις έχουν αποκλειστεί απο εξειδικευμένο γιατρό. Ωστόσο τα φύλλα εκείνα που παρουσιάζουν θετική επίδραση στην υγεία οφείλουν να περιέχουν το λιγότερο 5% ολεωρωπεΐνης ($C_{25}H_{32}O_{13}$, Mr 540.5) (Ph. Eur. 2008:1878) επί ξηρού.

Βάσει της μονογραφίας η παρασκευή του αφεψήματος γίνεται ως εξής :

10 γρ. φρέσκων φύλλων ή μέχρι 5 γρ. αποξηραμένων (εννοείται τα φύλλα απο δέντρα που δεν έχουν υποστεί ψεκασμό και φύονται σε περιοχές με μικρή ατμοσφαιρική ρύπανση) τοποθετούνται σε 150 ml βραστού νερού και αφήνονται μέχρι όγκου 100 ml. Καταναλώνεται ζεστό πρωί και απογευμα. Χρήση σε άτομα κάτω των 18 δεν ενδείκνυται. Διάρκεια χρήσης : 2-4 εβδομάδες

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α

2.1 Όργανα, υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Πρότυπες ενώσεις

Για να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν: ολευρωπεΐνη της εταιρείας Sigma-Aldrich καθαρότητας >99% και τυροσόλη (4-υδροξυφαιναιθυλαλκοόλη) καθαρότητας >99.5% της εταιρείας Sigma-Aldrich.

2.1.2 Διαλύτες και χρωματογραφικά υλικά

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: μεθανόλη της εταιρείας Macron Fine Chemicals (HPLC grade), ακετονιτρίλιο της εταιρείας Macron Fine Chemicals (HPLC grade), νερό της εταιρείας Macron Fine Chemicals (HPLC grade), πυκνό οξικό οξύ (laboratory reagent grade) της εταιρείας Fischer Scientific και μεθανικό (φορμικό) οξύ της εταιρείας Chembiotin.

2.1.3 Αναλυτικές χρωματογραφικές τεχνικές :

Για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολευρωπεΐνης σε αυτά χρησιμοποιήθηκαν

- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε φύλλα αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck) . Ο έλεγχος των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λαμπτήρων υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκη κύματος 254 και 365 nm ενά ακολούθησε ψεκασμός με διάλυμα θειικής βανιλίνης και εν συνεχεία θέρμανση της πλάκας.

- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής ευκρίνειας (HPTLC)

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει :

- CAMAG Linomat 5 για την εφαρμογή των δειγμάτων

- CAMAG TLC scanner 3 για την πυκνομετρική αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων και την λήψη φασμάτων απορρόφησης
- CAMAG TLC visualizer για την αποτύπωση των χρωματογραφημάτων ως έγχρωμων εικόνων στα 254 366 και στο ορατό

➤ UPLC

Για την υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα AQUITY UPLC SYSTEM (WATERS), χρωματογραφική στήλη: Fortis, C18, (50 x 2.1mm, 1.7um),

➤ HPLC (Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης)

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Scientific που αποτελείται από: Αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία, αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000, ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) SpectraSystem UV800, στήλη Supelco RP18, Discovery HS-C18, 15 cm, 4.6 mm, 5 μm, προστήλη της ίδια εταιρείας και λογισμικό ChromQuest™ 4.2

Πίνακας συντομογραφιών

Olive leaves	OLL
Olive leaves extract	OLE
Ύδωρ	H ₂ O
Μεθανόλη	MeOH
Ακετονιτρίλιο	ACN
Οξικό οξύ	F.A
Φορμικό οξύ	A.A
Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη	area
Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης	HPLC
Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης	UPLC

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	TLC
Υψηλής απόδοσης χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	HPTLC
Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων	DAD
Τυπική απόκλιση	stdev
Σχετική τυπική απόκλιση	rsd
Ευρωπαϊκή φαρμακοποιία	Ε.Φ.

2.2 Δειγματοληψία και εκχύλιση φύλλων

Μέσα στα πλαίσια της μελέτης βιοδραστικών συστατικών από φυσικά προϊόντα έγκειται τόσο ο ποιοτικός όσο και ο ποσοτικός έλεγχος αυτών. Η βάση της οποιασδήποτε μελέτης είναι η συλλογή και ταυτοποίηση της πρώτης ύλης. Εν συνεχεία αναλόγως των στόχων εφαρμόζονται οι απαραίτητες τεχνικές και μέθοδοι.

Σκοπός της παρούσας πειραματικής διαδικασίας ήταν η ποσοτικοποίηση και ακολούθως η συγκριτική μελέτη του ποσοστού ολευρωπεΐνης σε δείγματα φύλλων ποικιλιών ελιάς και αγριελιάς με σύγχρονη ανάπτυξη μιας γρήγορης και αποτελεσματικής μεθόδου με τη χρήση UPLC-DAD. Πριν από οποιαδήποτε άλλη ενέργεια απαραίτητη είναι η βοτανική ταυτοποίηση των δειγμάτων η οποία και έγινε από βοτανολόγους συνεργαζόμενους με την ερευνητική μας ομάδα. Η διαφορά των δειγμάτων αφορούσε άλλοτε στην ποικιλία και άλλοτε στην περίοδο συλλογής τους.

2.2.1 Ανάπτυξη μεθόδου

Πρώτο και απαραίτητο στάδιο για την επίτευξη του στόχου ήταν η κατασκευή καμπύλης αναφοράς και η επιλογή συστήματος έκλουσης.

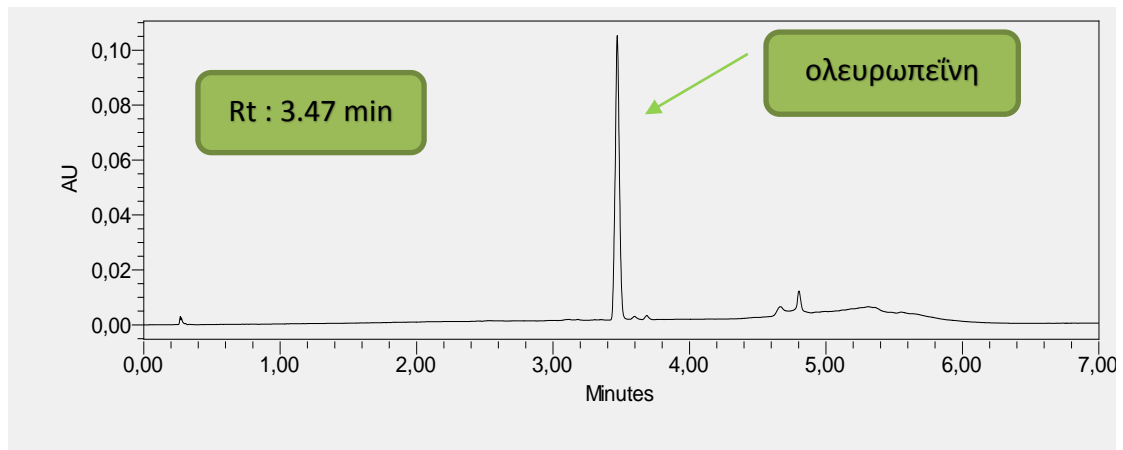
Καθώς για την πειραματική διαδικασία θα χρησιμοποιείτο UPLC και δεν υπήρχε κάποιο πρωτόκολλο μεθόδου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς έπρεπε να γίνουν οι απαραίτητες δοκιμές.

Ως εκ τούτου έχοντας επιλέξει ως διαλύτες της κινητής φάσης μεθανόλη με 0,1% φορμικό οξύ και νερό με 0.1% φορμικό οξύ, δοκιμάστηκαν διάφορα συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης τα οποία διέφεραν ως προς τον χρόνο αλλά και το ποσοστό των διαλυτών.

Επιλέχθηκε τελικά το κάτωθι σύστημα έκλουσης

T (min)	A% (H ₂ O-0,1% F.A.)	B%(ACN-0.1% F.A)	Ροή (ml/min)
0	95	5	0.6
1	90	10	0.6
2.5	80	20	0.6
4	70	30	0.6
5	50	50	0.6
6	95	5	0.6
7	95	5	0.6

Σύστημα έκλουσης



Χρωματογράφημα πρότυπης ολευρωπεΐνης 50μg/ml

Όπως φαίνεται και από το χρωματογράφημα η κορυφή της ολευρωπεΐνης είναι ευδιάκριτη και εμφανίζεται στη μέση χρονικά της μεθόδου στο 3,47 με τους διαλύτες να έχουν αναλογία 70-30 (νερό/ακετονιτρίλιο).

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Αρχικά παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκέντρωσης $C=10$ mg/ml και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να ληφθούν 7 διαλύματα με συγκεντρώσεις 10, 20, 30, 40, 50, 75 και 100 μg/ml. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μείγμα ακετονιτρίλιου νερού σε αναλογία 1:1

Για την κατασκευή της καμπύλης κάθε δείγμα μετρήθηκε εις τριπλούν ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι αποκλίσεις και τα αποτελέσματα να είναι κατά το δυνατόν στατιστικά ακριβή. Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν να γίνουν οι μετρήσεις είναι τα 240 nm 280nm και 360 nm. Οι μετρήσεις βάσει των οποίων σχεδιάστηκε η καμπύλη αναφοράς είναι οι ακόλουθες.

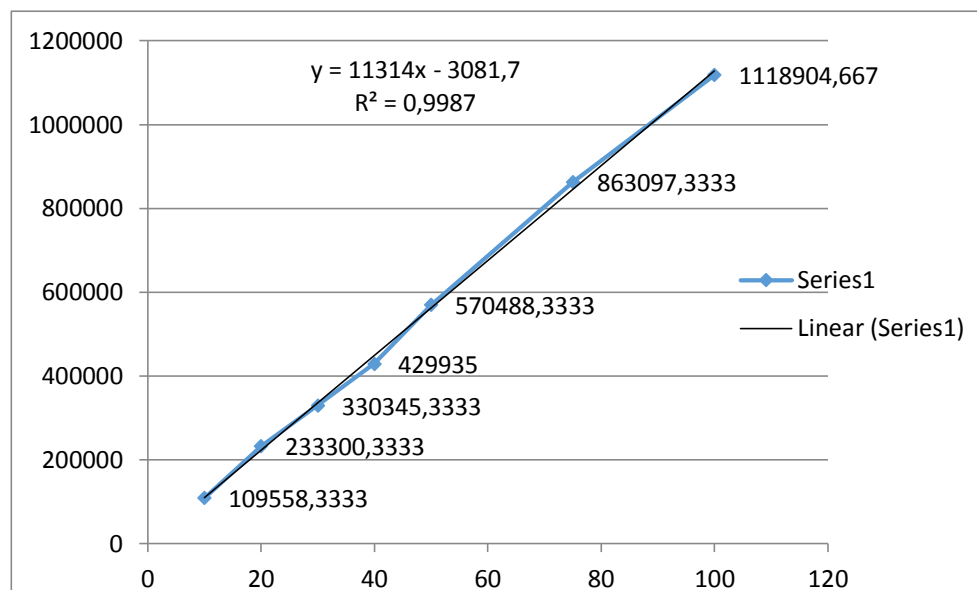
C(μg/ml)	10	20	30	40	50	75	100
Area 1	109638	233159	330752	431487	569763	863407	1107777
Area 2	109258	233197	330261	429212	570287	862534	1107482
Area 3	109779	233545	330023	429106	571415	863351	1141455
rsd	269.4816	212.7377	371.745	1345.116	844.2022	488.664	19529.72
Μέσος όρος	109558.3	233300.33	330345.33	429935	570488.3	863097.3	1118905
%απόκλιση	0.24	0.09	0.112	0.313	0.15	0.057	1.745

Πίνακας μετρήσεων στα 240 nm

C(μg/ml)	Μέσος όρος
10	109558,3
20	233300,33
30	330345,33
40	429935
50	1570488,3
75	863097,3
100	1118905

Πίνακας μέσων όρων area στα 240 nm

Με βάση τις μετρήσεις κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.



Καμπύλη αναφοράς στα 240 nm

C(µg/ml)	10	20	30	40	50	75	100
Area 1	23378	49569	70490	91833	121155	184386	235901
Area 2	23344	49755	70342	91616	121517	184027	235853
Area 3	23203	49689	70326	91385	121486	183666	243010
rsd	92,792	94,298	90,421	224,036	200,651	360,0	4118,31
Μέσος όρος	23308,33	49671	70386	91611,33	121386	184026,3	238254,7
%απόκλιση	0,398	0,190	0,128	0,244	0,165	0,196	1,728

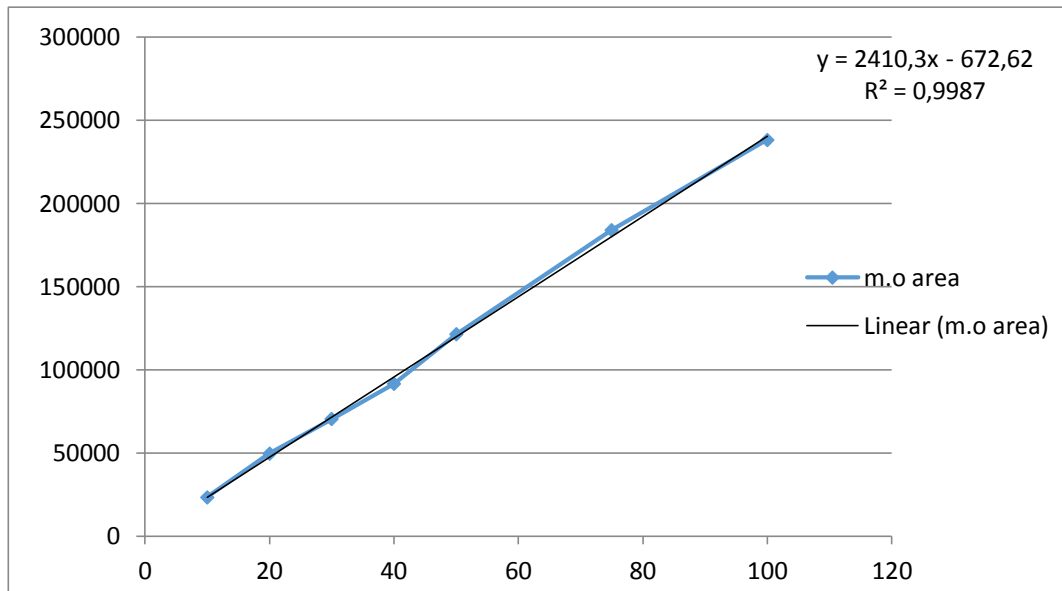
Πίνακας μετρήσεων στα 280 nm

C(μg/ml)	Μέσος όρος area
10	23308,33
20	49671
30	70386
40	91611,33
50	121386
75	184026,3
100	238254,7

Πίνακας μέσων όρων area στα 280 nm

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα η απόκλιση σε όλες τις μετρήσεις είναι στα αποδεκτά πλαίσια οπότε οι μετρήσεις θεωρούνται αξιόπιστες και επαναλήψιμες. Με βάση τις τιμές των μέσων όρων των area σχεδιάζεται και εδώ η ανάλογη καμπύλη αναφοράς.

Έτσι προκύπτει η εξής καμπύλη αναφοράς



Καμπύλη αναφοράς 280 nm

Το R^2 είναι ικανοποιητικό οπότε δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Το μήκος κύματος που επιλέχθηκε ήταν τα 280 nm καθώς εκεί η ουσία εμφανίζει το μέγιστο της απορρόφησης .

Αναφορικά με τα δείγματα παρατίθεται πίνακας στον οποίο αναγράφονται οι κωδικοί τους και λεπτομέρειες σχετικές με την ποικιλία. Ο κωδικός OLL προκύπτει ως ακρωνύμιο των λέξεων olive leaves ενώ ο κωδικός OLE από τις λέξεις olive extract.

SAMPLE CODE	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	SAMPLE CODE	ΠΟΙΚΙΛΙΑ
OLL001	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL055	ΑΜΦΙΣΣΗΣ 1
OLL002	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL056	ΑΜΦΙΣΣΗΣ 2
OLL003	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL058	ΗΜΕΡΗ
OLL004	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL059	ΗΜΕΡΗ
OLL005	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL060	ΗΜΕΡΗ
OLL006	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL061	ΗΜΕΡΗ
OLL007	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL064	ΗΜΕΡΗ
OLL008	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL065	ΗΜΕΡΗ
OLL009	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	OLL062	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL010	ΑΜΦΙΣΣΗΣ (ΜΠΟΛΙΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΑΓΡΙΕΛΙΑ)	OLL063	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL011	ΑΜΦΙΣΣΗΣ	OLL066	ΗΜΕΡΗ
OLL057	H131	OLL067	ΗΜΕΡΗ
OLL012	ΧΕΤΟΥΙ	OLL068	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL013	CHEMLALI	OLL069	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL014	BERLERI	OLL070	N/A
OLL015	MESKI	OLL071	N/A
OLL016	ZARAZZI	OLL072	N/A
OLL017	GORDAL	OLL073	ΑΓΡΙΕΛΙΑ

OLL018	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	OLL074	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL019	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	OLL075	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL020	ΜΑΝΖΑΝΙΛΛΑ	OLL076	ΗΜΕΡΗ
OLL021	GORDAL	OLL077	ΗΜΕΡΗ
OLL022	ΚΑΛΑΜΩΝ	OLL078	ΗΜΕΡΗ
OLL023	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL079	ΗΜΕΡΗ
OLL024	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL080	ΗΜΕΡΗ
OLL025	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL088	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ ΨΙΛΗ
OLL026	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL089	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ ΜΕΣΟΚΑΡΠΗ
OLL027	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL090	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ ΜΕΓΑΛΟΚΑΡΠΗ
OLL028	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL091	ΓΛΥΚΟΜΑΝΑΚΟ
OLL029	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL092	ΧΟΝΔΡΟΜΑΝΑΚΟ
OLL030	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL093	ΓΑΙΔΟΥΡΟΕΛΙΑ ΚΥΝΟΥΡΙΑΣ
OLL031	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL094	ΜΑΝΑΚΙ ΚΟΘΡΕΙΚΗ
OLL032	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL095	ΑΘΗΝΟΕΛΙΑ
OLL033	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL096	ΣΤΡΟΓΓΥΛΟΕΛΙΑ
OLL034	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL097	ΚΑΛΑΜΩΝ ΑΝΟΣΙΑΝΑ
OLL035	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL098	ΚΑΛΑΜΩΝ
OLL036	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL099	ΑΜΦΙΣΣΗΣ ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ
OLL037	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL100	GORDAL
OLL038	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL101	PICUAL

OLL039	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL102	GROSSA DI SPAGNA
OLL040	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL103	SANTA CATERINA
OLL041	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL104	BARNEA ISRAEL
OLL042	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL105	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL043	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL106	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL044	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL107	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL045	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL108	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL046	ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ	OLL109	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL047	MANZANILLA	OLL110	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL048	GORDAL	OLL111	ΛΙΑΝΟΛΙΑ
OLL049	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	OLL112	GORDAL
OLL050	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	OLL113	MANZANILLO
OLL051	ΚΑΛΑΜΩΝ	OLL114	ΚΑΛΑΜΩΝ
OLL052	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	OLL115	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ
OLL053	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	OLL116	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
OLL054	ΚΑΛΑΜΩΝ	OLL117	ΗΜΕΡΗ

Πίνακας κωδικών και ποικιλιών δειγμάτων

Ομαδοποίηση δειγμάτων

ΣΥΝΟΛΟ	ΕΛΙΑ	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΦΥΛΛΑ ΚΑΙ ΚΛΑΔΙΑ
102	55	19	28

Η πλειονότητα των δειγμάτων ήταν χλωρά φύλλα με αποτέλεσμα να απαιτηθεί πριν από οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία η ξήρανση αυτών. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκαν σε σκιερό και προστατευμένο από τον ήλιο χώρο, καλώς αεριζόμενο, μέχρι την πλήρη ξήρανσή τους. Επιλέχθηκε η αποξήρανση με το φυσικό αυτό τρόπο και όχι χρησιμοποιώντας κάποιο μηχανικό μέσο ξήρανσης διότι έχει αποδειχθεί πως είναι η πιο αποδοτική μέθοδος όσο αφορά στο ποσοστό ολευρωπεΐνης που υπολογίζεται στα φύλλα (Afaneh, Yateem, & Al-rimawi, 2015).

Ακολούθησε κονιοποίηση αυτών με τη χρήση blender και όπου απαιτήθηκε και τη χρήση ιγδίου ώστε να ληφθεί κόνις κατάλληλη για περαιτέρω αξιοποίηση.



Κονιοποίηση σε ιγδίο



Φύλλα και κόνις

Για την επεξεργασία των δειγμάτων ακολουθήθηκε η προτεινόμενη από την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία μέθοδος. Η εν λόγω μέθοδος αναφέρεται σε διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση ολευρωπείνης από φύλλα ελιάς με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC) αποδείχτηκε ωστόσο πως ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί και στην προκειμένη περίπτωση, κατά την οποία ως μέσο ανάλυσης είχε επιλεγεί για την ανάλυση υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής ανάλυσης (UPLC).

Όλες οι εκχυλίσσεις έγιναν με όμοιο τρόπο, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

2.2.2 Μέθοδος εκχύλισης

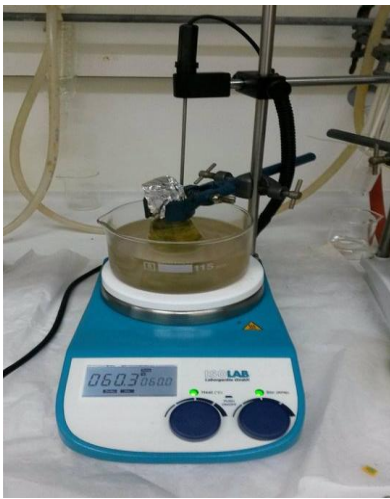
Στην πειραματική διαδικασία ακολουθήσαμε το προτεινόμενο από την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία πρωτόκολλο εκχύλισης φύλλων ελιάς για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης ολευρωπείνης με αριθμό καταχώρησης European pharmacopoeia 8.0 01/2009:1878.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή 1,000 γραμμάρια κόνεως φύλλων ελιάς αναμειγνύεται με 50 ml μεθανόλης (MeOH) καθαρότητας R σε κωνική φιάλη. Στο πείραμα κρίθηκε σκόπιμο η χρησιμοποιούμενη μεθανόλη να είναι μέγιστου βαθμού καθαρότητας οπότε αντί της R επιλέχθηκε η μεθανόλη (MeOH) analytical grade for HPLC.



Κωνική φιάλη με το δείγμα και τον διαλύτη

Επόμενο στάδιο είναι η ανάδευση του μείγματος με ταυτόχρονη θέρμανση στους 60 βαθμούς κελσίου για 30 λεπτά σε ελαιόλουτρο.



Ανάδευση σε ελαιόλουτρο

Μετά το πέρας αυτής το δείγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί διήθηση σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθήκη μεθανόλης μέχρι όγκου 100 ml



Διήθηση εκχυλίσματος



Αραίωση στα 100 ml

Από το μεθανολικό εκχύλισμα ποσότητα 2,5 ml φέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 25ml και αραιώνεται με νερό μέχρι αυτόν τον όγκο.



Αραίωση στα 25 ml



Αραιωμένα υδατικά εκχυλίσματα

Στο στάδιο αυτό το υδατικό εκχύλισμα που έχει παρασκευαστεί, με βάση της οδηγίες της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας, πρέπει να υποστεί περαιτέρω αραιώση ώστε να είναι κατάλληλο για ανάλυση με την τεχνική UPLC-DAD, διαδικασία που περιγράφεται στην συνέχεια.

2.2.3 Προφίλ εκχυλισμάτων με χρήση HPTLC

Καθότι το βασικό σημείο ενδιαφέροντος ήταν η συγκριτική μελέτη του ποσοστού της ολευρωπεΐνης κρίθηκε σκόπιμο πριν την τελική αραιώση με νερό βάσει της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας να γίνει ποιοτικός έλεγχος των μεθανολικών εκχυλισμάτων με HPTLC.

Εφόσον δεν ήταν γνωστό το ποσοστό ολευρωπεΐνης των φύλλων, αν και στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι μπορεί να φθάσει τα 60-90mg/g (Ghaleb Tayoub, Huda Sulaiman, Abdul Hadi Hassan, 2012) ενώ γενικά κυμαίνεται από 1-14% (Vogel et al., 2015) έπρεπε πρωτίστως να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση αλλά και το σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν κάποιες δοκιμαστικές TLC χρησιμοποιώντας τα εξής συστήματα ανάπτυξης:

- CH_2Cl_2 : MeOH 90:10
- CH_2Cl_2 : MeOH 85:15
- CH_2Cl_2 : MeOH 70:30

Επιλέχθηκε ως ιδανικότερο το σύστημα ανάπτυξης με αναλογία διαλυτών 85:15. Προκειμένου να υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση δείγματος, από το μεθανολικό δείγμα OLE48 λαμβάνονται 7, 14, 28 και 40 ml τα οποία τοποθετούνται σε σφαιρικές φιάλες. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή (rotavapor), μεταφορά των δειγμάτων σε προζυγισμένα φιαλίδια, εξάτμιση μέχρι ξηρού και εν συνεχεία ζύγιση του ξηρού εκχυλίσματος.

Πίνακας δοκιμαστικών δειγμάτων για HPTLC

Sample	ml	W ₁ (g)	W ₂ (g)	Μάζα ξηρού εκχυλίσματος (mg)
OLE048 A	7	10.3507	10.3685	17.8
OLE048 B	14	10.1832	10.2199	36.7
OLE048 Γ	28	10.3797	10.4525	72.8
OLE048 Δ	40	17.9565	18.0609	104.4

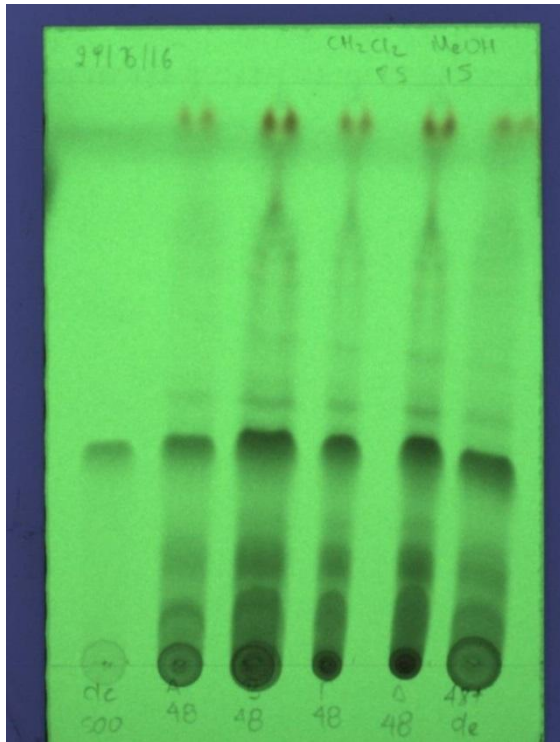
Σε όλες προστίθεται 0.5 ml μεθανόλης, ωστόσο καθώς μόνο το δείγμα OLE048 είναι διαλυτό στην ποσότητα αυτή επιπλέον ποσότητα 0.5 ml προστίθεται σε κάθε vial.

Παράλληλα παρασκευάζεται και διάλυμα πρότυπης ολευρωπεΐνης συγκέντρωσης 500μg/ml.

Σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC τοποθετούνται 3 σταγόνες από κάθε δείγμα και επιλέγεται τελικά το OLE048 A το οποίο υφίσταται εξάτμιση και ζύγιση εκ νέου.

Σε 15 mg ξηρού εκχυλίσματος προστίθεται 1,5 ml μεθανόλης ώστε να ληφθεί διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/ml.

Στο δείγμα αυτό γίνεται HPTLC αλλάζοντας την ποσότητα που εναποτίθεται κάθε φορά στην πλάκα (5, 8, 10, 15, 20 μl) και έχοντας πάντα ως σύστημα ανάπτυξης το CH₂Cl₂:MeOH 85:15 .



TLC δείγματος OLE048 στα 254nm

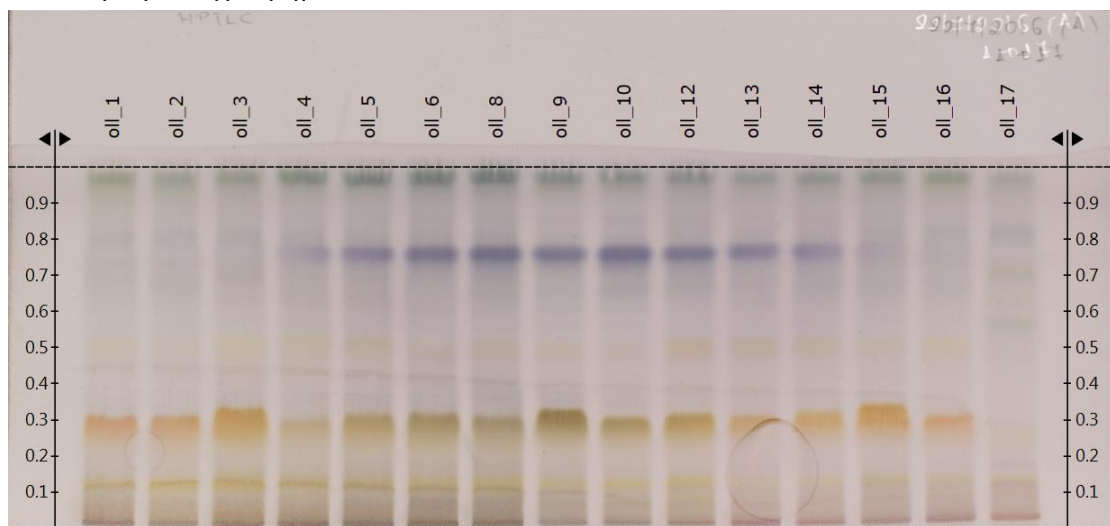


TLC δείγματος OLE048 μετά τον ψεκασμό με θειική βανιλίνη

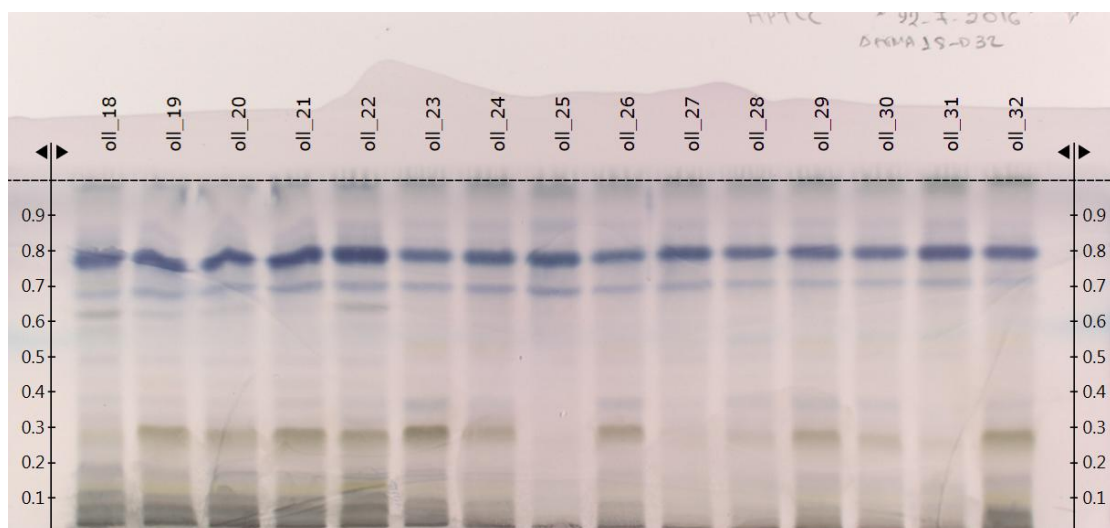
Από την εικόνα του χρωματογραφήματος επιλέγεται το δείγμα των 15 μl.

Από κάθε μεθανολικό δείγμα φέρεται ποσότητα 7 ml σε σωληνάκια τα οποία τοποθετούνται στο speedvac concentrator μέχρι πλήρους εξατμίσεως. Σε κάθε ένα από τα ξηρά εκχυλίσματα προστίθεται 1,8 ml μεθανόλης (τελική συγκέντρωση 10mg/ml). Όγκος ίσος με 1 ml μεταφέρεται σε καταλληλα φιαλίδια (vials) για την εφαρμογή ΗΡΤΛC. Στο τέλος της διαδικασίας ακολουθεί ψεκασμός των χρωματογραφημάτων με θειική βανιλίνη και θέρμανση αυτών.

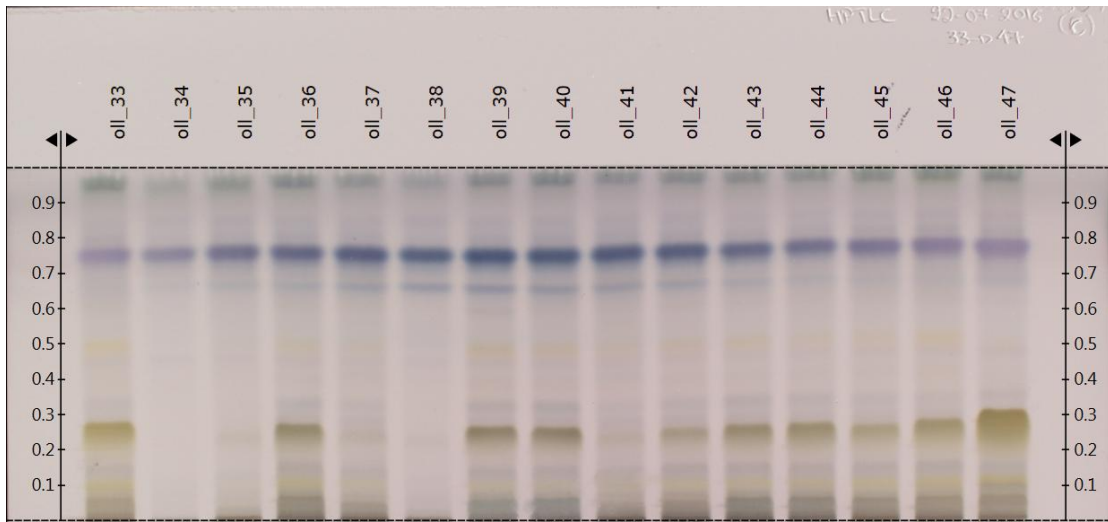
2.2.4 Χρωματογραφήματα ΗΡΤΛC



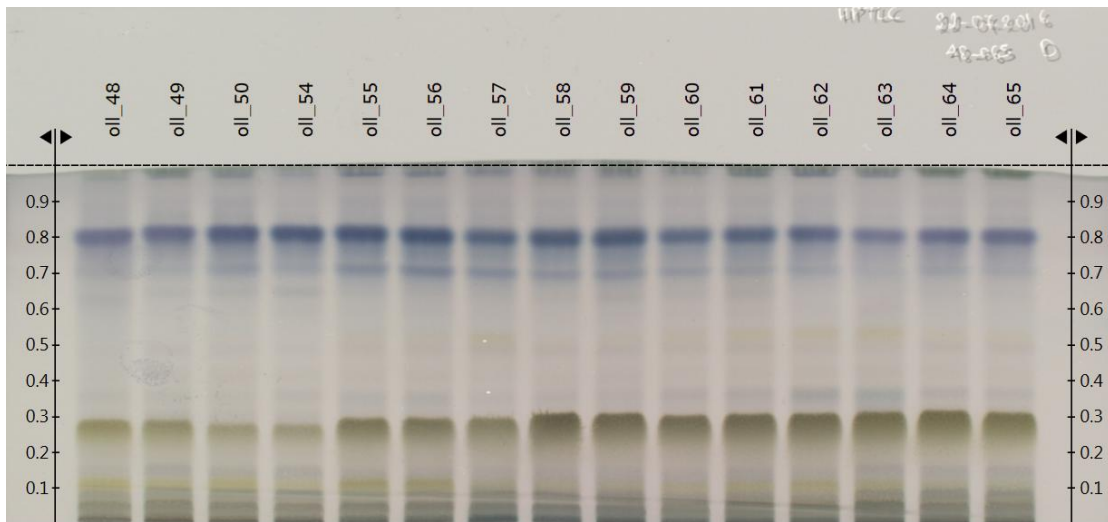
Χρωματογράφημα 1 στα δείγματα 1-17



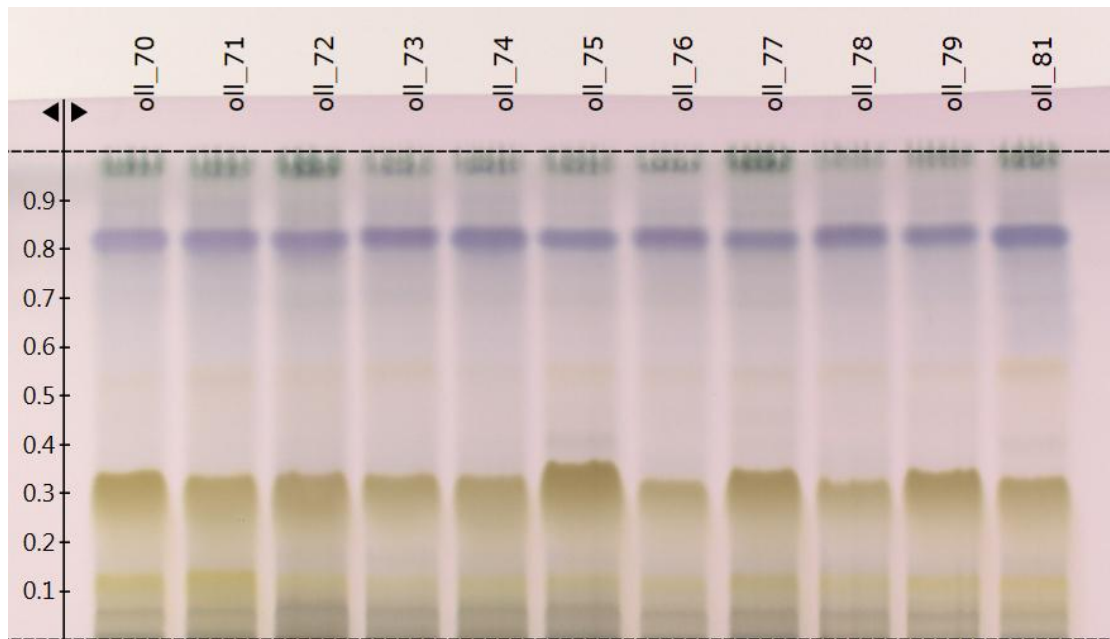
Χρωματογράφημα 2 στα δείγματα 18-32



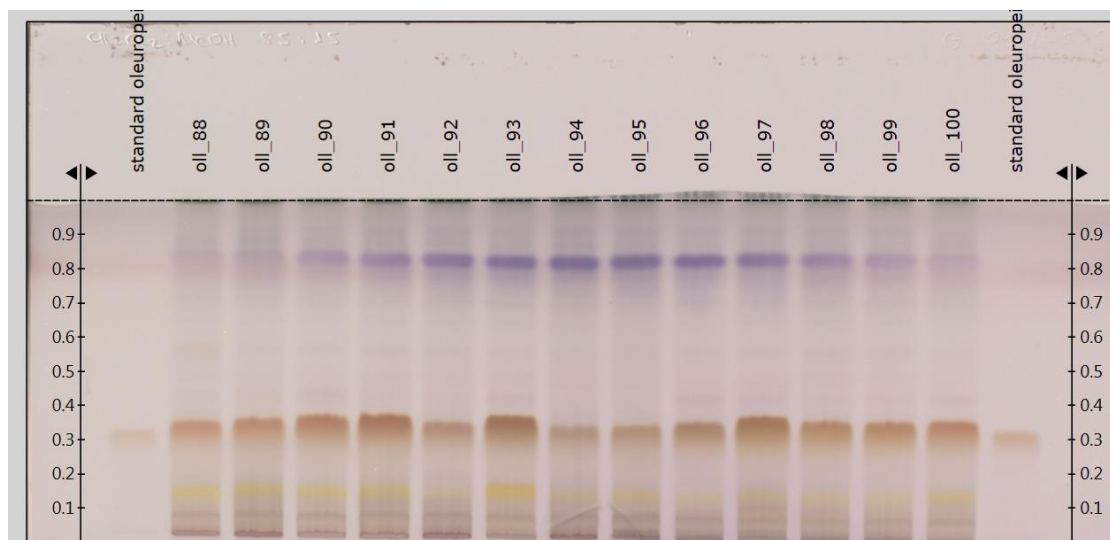
Χρωματογράφημα 3 στα δείγματα 33-47



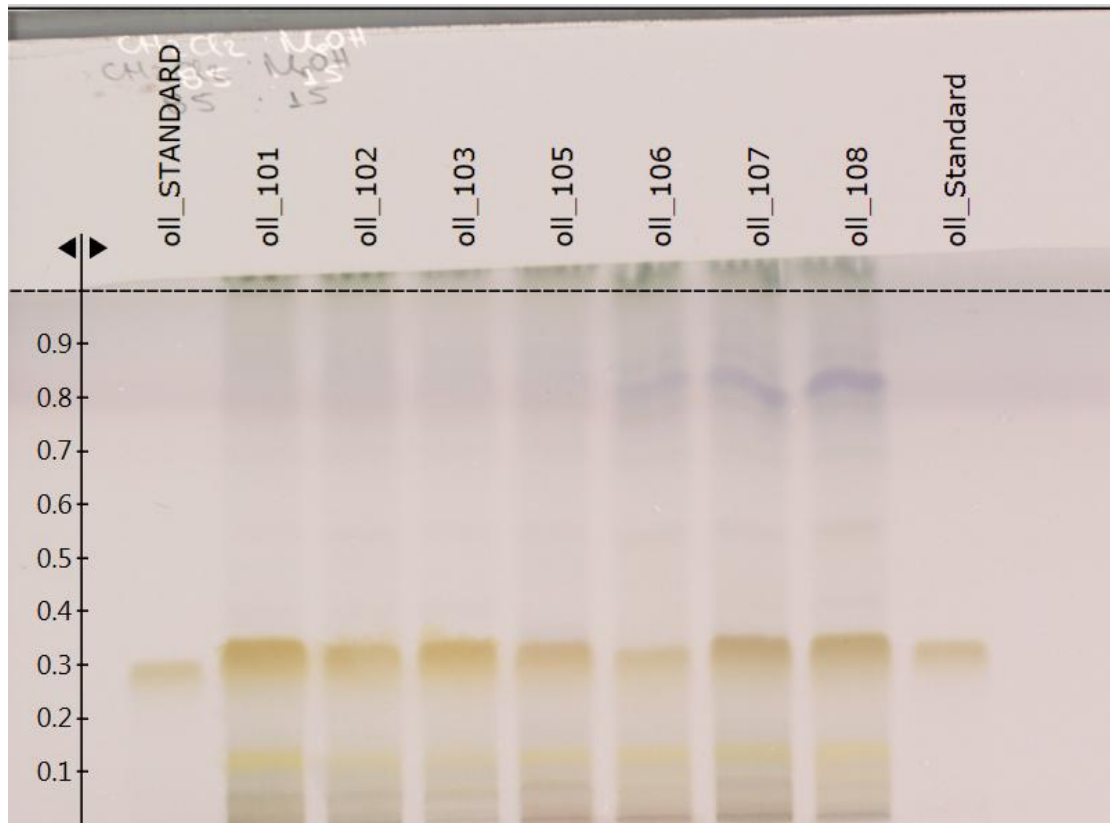
Χρωματογράφημα 4 στα δείγματα 48-65



Χρωματογράφημα 5 στα δείγματα 70-81



Χρωματογράφημα 6 στα δείγματα 88-100



Χρωματογράφημα 7 στα δείγματα 101-108

Σε όλα τα χρωματογραφήματα διακρίνουμε την χαρακτηριστική καφεκίτρινη κηλίδα της ολευρωπεΐνης. Είναι εμφανές ότι υπάρχει διαφορά ανάμεσα σε όλα τα δείγματα στο ποσοστό της ολευρωπεΐνης με κάποια να παρουσιάζονται πιο πλούσια σε σχέση με άλλα στα οποία η χαρακτηριστική κηλίδα της είναι δυσδιάκριτη.

Έχοντας πλέον μια ενδεικτική εικόνα των συγκεντρώσεων των φύλλων σε ολευρωπεΐνη επιλέγονται 2 δείγματα τα οποία υπόκεινται σε διαφορετικά επίπεδα αραιώσεων ώστε να βρεθεί η πλέον αρμόζουσα για την εφαρμογή UPLC.

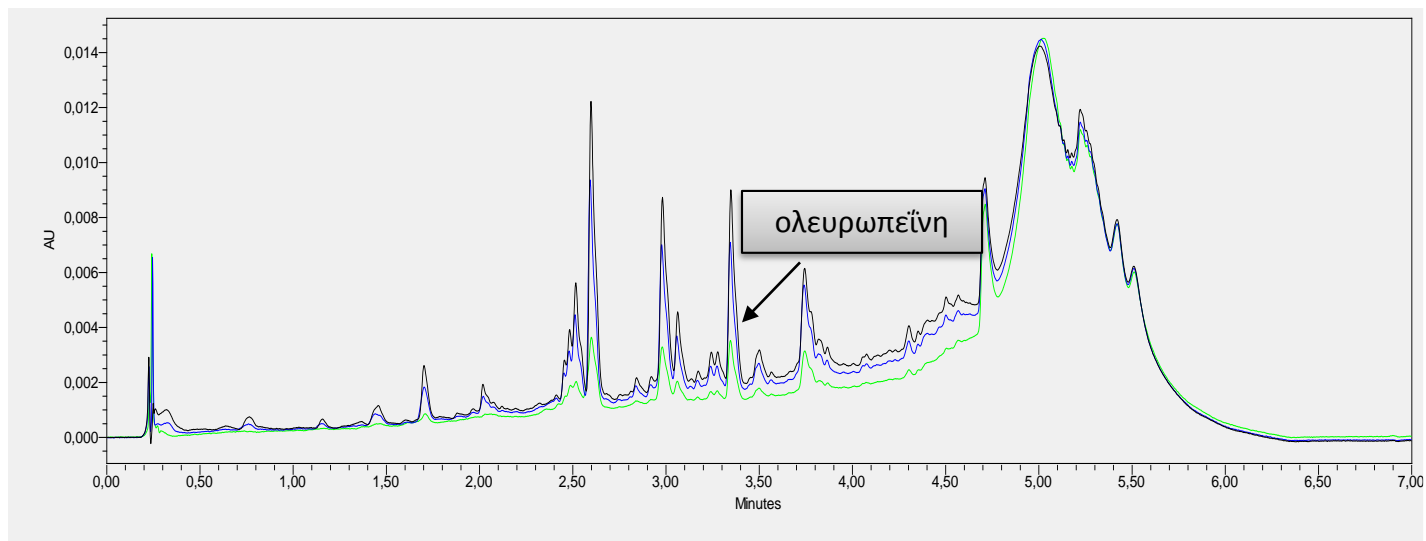
Αρχικά έγιναν δοκιμές σε αραιώσεις 1:100, 1:50, 1:20 (ένα μέρος υδατικού εκχυλίσματος προς 100/50/20 μέρη διαλύτη αντίστοιχα). Αποδείχτηκε όμως πως δεν έδιναν ικανοποιητικά χρωματογραφήματα λόγω μεγάλης αραιώσης, επομένως ακολούθησαν περαιτέρω αραιώσεις 1:5, 1:2,5, 1:2 για την παρασκευή λιγότερο αραιών διαλυμάτων.

Όλες οι αραιώσεις έγιναν σε μείγμα ακετονιτριλίου : νερού σε αναλογία 1 προς 1.

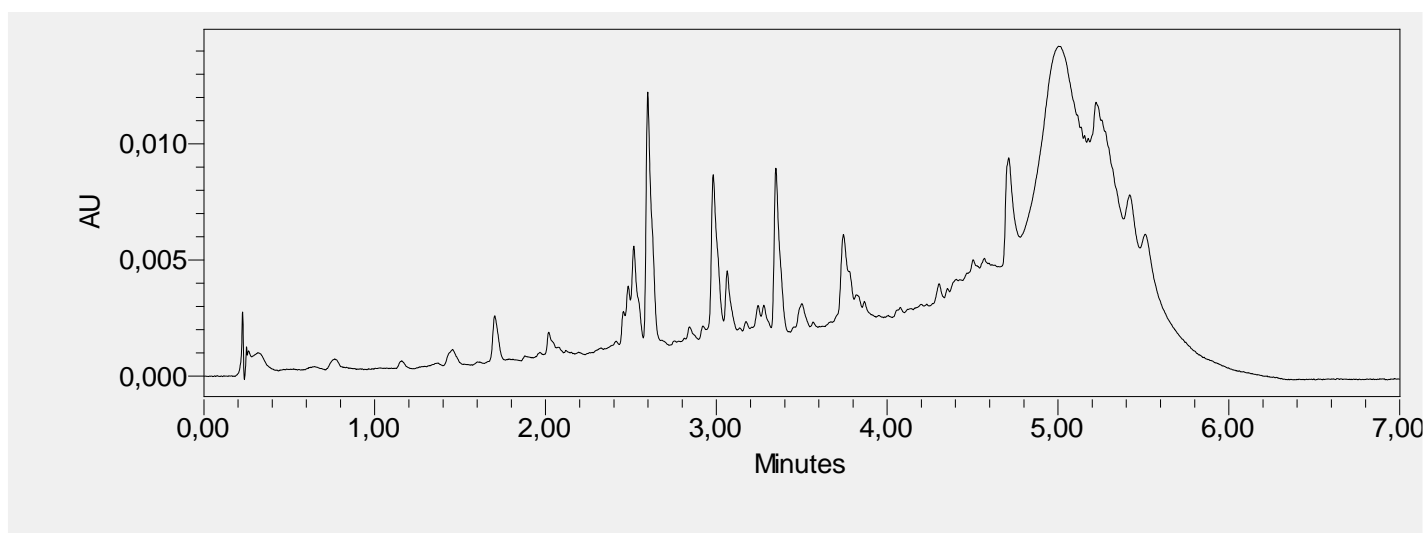
2.2.5 Χρωματογραφήματα αραιώσεων

Το πρώτο δείγμα που επιλέχθηκε ήταν το OLE042 το οποίο περιείχε φύλλα και κλαδιά μαζί.

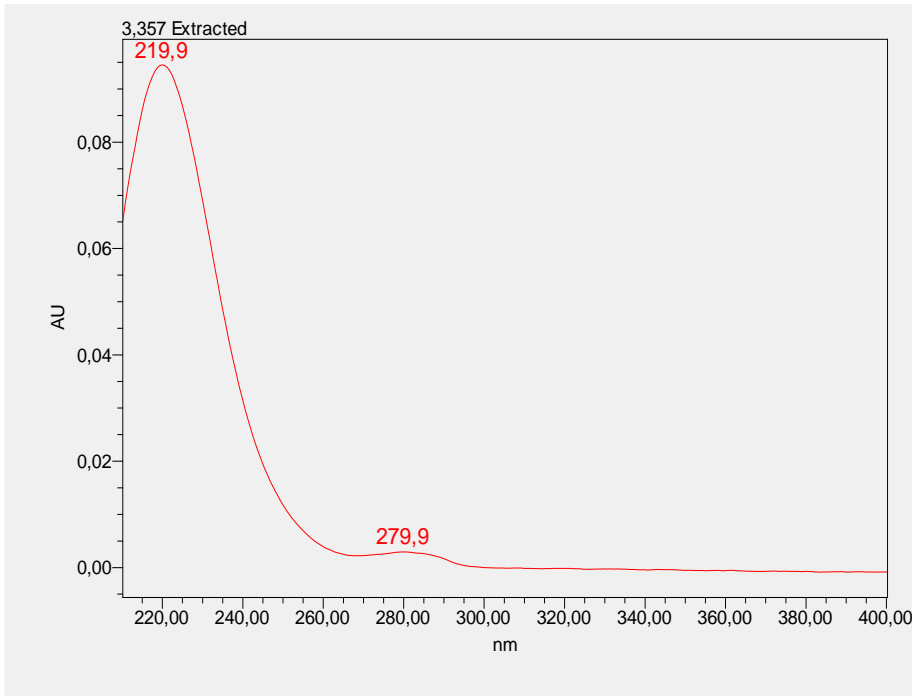
Έγιναν 3 διαδοχικές αραιώσεις σε αναλογία 1 :5 / 1:2,5 /1:2(1 μέρος υδατικού εκχυλίσματος προς 5/2,5/2 μέρη διαλύτη αντίστοιχα).



Χρωματογραφήματα διαδοχικών αραιώσεων στο δείγμα OLE 042



Χρωματογράφημα αραιώσης 1:2 στο δείγμα OL042



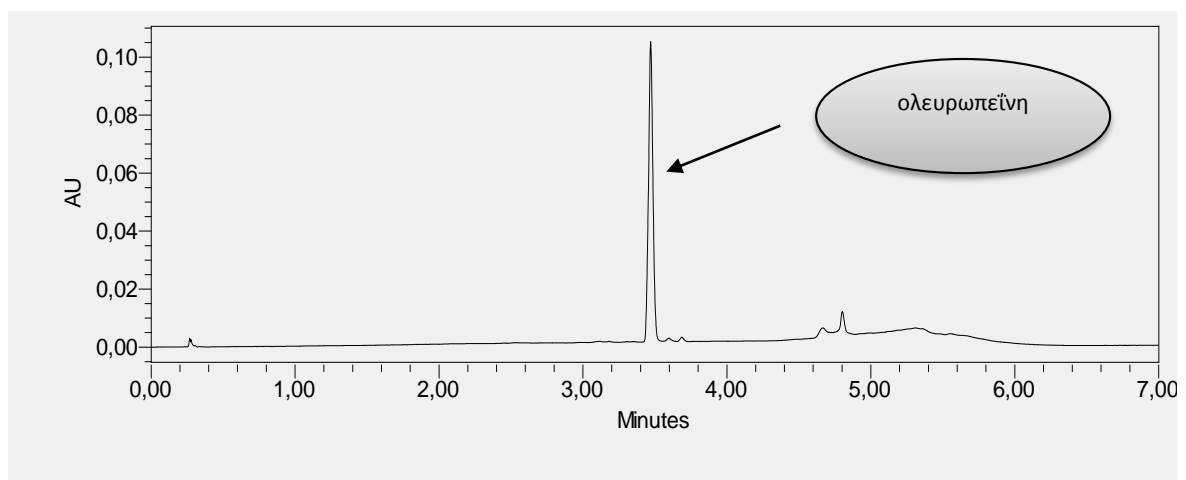
UV φάσμα ολευρωπεΐνης στο δείγμα OLE042

Η ολευρωπεΐνη εκλούεται σε χρόνο 3.35 λεπτά ενώ η αραιώση 1:2 φαίνεται ότι δίνει ένα ικανοποιητικό χρωματογράφημα.

Ωστόσο επειδή το δείγμα αυτό είχε την ιδιαιτερότητα να περιέχει φύλλα με κλαδιά αποφασίστηκε να επαληθευθεί το αποτέλεσμα πραγματοποιώντας παρόμοια αραιώση σε δείγμα μόνο φύλλων.

Επιλέχθηκε το δείγμα OLE12.

Το δείγμα OLE12 υφίσταται την αραιώση 1:2 και εν συνεχεία αναλύεται βάσει της αναπτυχθείσας μεθόδου



χρωματογράφημα αραιώσης 1:2 δείγματος OLE12

Ο χρόνος έκλουσης της ολευρωπεΐνης είναι και εδώ στα 3.35 λεπτά, ίδιος ακριβώς με την δοκιμή στο δείγμα OLE042

Όπως φαίνεται η αραίωση 1 : 2 έδωσε για ακόμη μία φορά ικανοποιητικό αποτέλεσμα οπότε εφαρμόστηκε και στα υπόλοιπα δείγματα. Η κορυφή της ολευρωπεΐνης διαχωρίζεται σαφώς και ικανοποιητικά από τα υπόλοιπα συστατικά ενώ είναι και η σημαντικότερη γεγονός το οποίο στηρίζει τα όσα μέχρι τώρα ήταν γνωστά , πως είναι η κυρίαρχη ουσία ενώ ταυτόχρονα είναι σαφής ένδειξη ότι η μέθοδος που αναπτύξαμε υπηρετεί άριστα τον σκοπό .

Επιπλέον συγκρίνοντας τα δύο αυτά χρωματογραφήματα παρατηρείται μια εμφανής ποιοτική διαφορά. Το χρωματογράφημα που αναφέρεται σε δείγμα φύλλων χωρίς την παρουσία κλαδιών είναι πιο «καθαρό» από άλλες ουσίες σε αντίθεση με εκείνο που αφορά μείγμα φύλλων και κλαδιών όπου αρκετές ακόμη κορυφές είναι παρούσες.

Τα εκχυλίσματα μέχρι την στιγμή της ανάλυσης τους φυλάσσονταν διαλυμένα μόνο σε μεθανόλη μέσα σε σκουρόχρωμα μπουκάλια σε θερμοκρασία 4 βαθμών κελσίου, προστατευμένα με parafilm.

Αμέσως πριν την τελική επεξεργασία τους με UPLC έγινε η οριστική αραίωση.

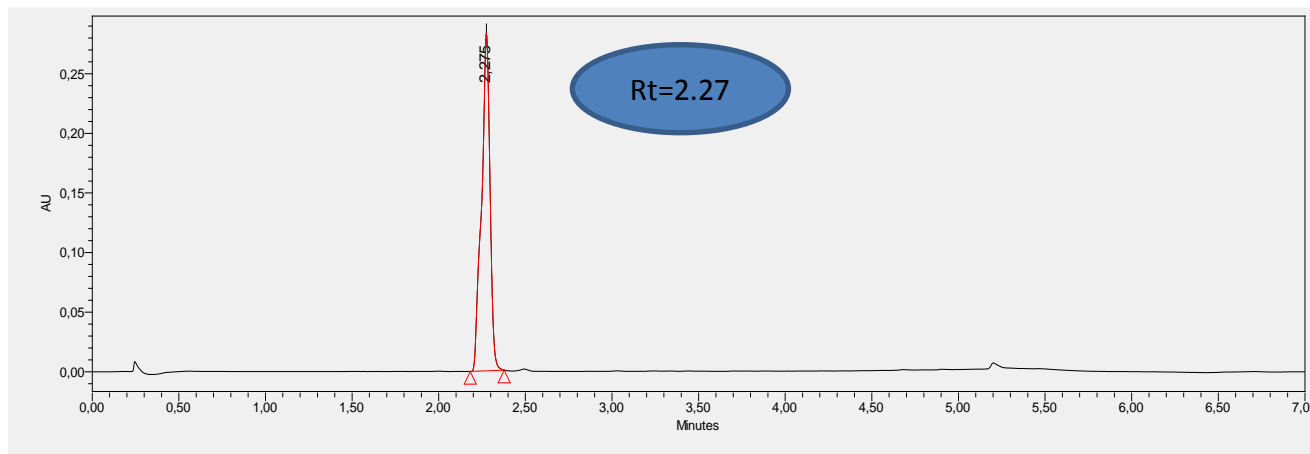
2.2.6 Δείγματα OLL001-OLL077 : UPLC-DAD

Μετά το τελικό στάδιο αραίωσης που προτείνει η ευρωπαϊκή φαρμακοποιία σε νερό, ακολούθησε και η απαραίτητη τελική αραίωση στην κατάλληλη συγκέντρωση για ανίχνευση της ολευρωπεΐνης με την τεχνική UPLC-DAD, δηλαδή 1 μέρος διαλύτη προς 2 μέρη εκχυλίσματος.

Από κάθε υδατικό εκχύλισμα λήφθηκε ποσότητα 667 μl και προστέθηκαν 333 μl διαλύτη (μείγμα ακετονιτριλίου/νερού 1:1) και προέκυψαν δείγματα όγκου 1ml. Ακολούθησε η επεξεργασία των δειγμάτων, με τη μέθοδο που παρουσιάστηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας την τεχνική UPLC-DAD.

Προκειμένου να ελεγχθεί μετά το πέρας της η ορθή πορεία της διαδικασίας κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη εξωτερικού προτύπου. Επιλέχθηκε το φερουλικό οξύ, μια ουσία η οποία εκλύεται σε διαφορετικό χρόνο από την προς μέτρηση ουσία (ολευρωπεΐνη) και συγκεκριμένα στα 2.27 λεπτά, ενώ η ολευρωπεΐνη στα 3,35.

Επομένως παρασκευάστηκαν διαλύματα φερουλικού οξέος τα οποία τοποθετήθηκαν ανάμεσα στα δείγματα ως εξωτερικό πρότυπο (Quality Control).



Χρωματογράφημα φερουλικού οξέος

Κάθε δείγμα από τα εκχυλίσματα ελέγχθηκε εις τριπλούν για μείωση του στατιστικού λάθους καθώς η μέθοδος αυτή εφαρμοζόταν για πρώτη φορά .

Υπολογίστηκε το area κάθε επανάληψης, ο μέσος όρος αυτών, η σχετική τυπική απόκλιση (rsd) και το stdev.s. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 280 nm, μήκος κύματος, στο οποίο η ολευρωπεΐνη παρουσιάζει το μέγιστο της απορρόφησής της. Ακολουθεί πίνακας όπου αναγράφονται οι κωδικοί των δειγμάτων , οι μετρήσεις του area για κάθε μία από τις 3 επαναλήψεις , ο μέσος όρων αυτών , το rsd και το stdev.

280 nm							
code	OLE 001	OLE 002	OLE 003	OLE 004	OLE005	OLE006	OLE007
area 1	59173	71572	127266	16357	49365	56493	21914
area 2	59259	71617	126990	16273	49218	56490	21925
area 3	59263	71681	127214	16386	49327	56482	21900
m.o	59231,67	71623,33	127156,7	16338,67	49303,33	56488,33	21913
stdev.s	50,84617	54,7753	146,6606	58,68844	76,30422	5,686241	12,52996
rsd	0,085843	0,076477	0,115339	0,3592	0,154765	0,010066	0,057181
code	OLE008	OLE009	OLE010	OLE012	OLE013	OLE014	OLE015
area 1	31197	112408	60907	74801	46811	59861	143687
area 2	31205	112363	60864	75000	46821	60012	143645
area 3	31215	112453	60863	74919	46794	59960	143549
m.o	31205,67	112408	60878	74906,67	46808,67	59944,33	143627
stdev.s	9,0185	45	25,11971	100,0716	13,6504	76,70941	70,73896
rsd	0,0289	0,040033	0,041262	0,133595	0,029162	0,127968	0,000493
code	OLE016	OLE017	OLE018	OLE019	OLE020	OLE021	OLE022
area 1	54066	3118	1628	17636	8361	16325	9887
area 2	53996	3017	1554	17620	8408	16298	9921
area 3	54068	3091	1513	17677	8421	16276	9797
m.o	54043,33	3075,333	1565	17644,33	8396,667	16299,67	9868,333

stdev.s	41,00406	52,29085	58,28379	29,39955	31,56475	24,54248	64,07288
rsd	0,075873	1,700331	3,724204	0,166623	0,37592	0,15057	0,649278
code	OLE023	OLE024	OLE025	OLE 026	OLE027	OLE028	OLE029
area 1	25205	6937	573	8228	676	1363	8295
area 2	25257	6962	614	8247	695	1365	8268
area 3	25324	7132	583	8257	678	1332	8257
m.o	25262	7010,333	590	8244	683	1353,333	8273,333
stdev.s	59,65735	106,1053	21,37756	14,73092	10,44031	18,50225	19,55335
rsd	0,236155	1,513556	3,623315	0,178687	1,528595	1,367161	0,236342
code	OLE030	OLE032	OLE033	OLE036	OLE037	OLE038	OLE039
area 1	2998	19156	3880	23541	1421	595	25533
area 2	2911	19190	38905	23544	1446	581	25485
area 3	2964	19194	38903	23477	1442	571	25473
m.o	2957,667	19180	27229,33	23520,67	1436,333	582,3333	25497
stdev.s	43,84442	20,88061	20221,12	37,84618	13,42882	12,05543	31,74902
rsd	1,482399	0,108867	74,26225	0,160906	0,934938	2,070194	0,124521
code	OLE040	OLE041	OLE042	OLE043	OLE044	OLE045	OLE046
area 1	22613	1313	6741	17132	21834	10194	25087
area 2	22552	1339	6683	17076	21864	10216	25014
area 3	22633	1312	6663	17006	21897	10180	25025
m.o	22599,33	1321,333	6695,667	17071,33	21865	10196,67	25042

stdev.s	42,194	15,30795	40,51337	63,1295	31,5119	18,14754	39,35734
rsd	0,186705	1,158523	0,605069	0,369798	0,14412	0,177975	0,157165
code	OLE047	OLE048	OLE049	OLE050	OLE054	OLE055	OLE056
area 1	95141	34014	25177	13557	12928	47388	55212
area 2	95244	34133	25114	13609	12820	47264	55209
area 3	95283	34168	25102	13653	12936	47151	55201
m.o	95222,67	34105	25131	13606,33	12894,67	47267,67	55207,33
stdev.s	73,36439	80,72794	40,28647	48,05552	64,78683	118,5425	5,686241
rsd	0,077045	0,236704	0,160306	0,353185	0,502431	0,25079	0,0103
code	OLE057	OLE058	OLE059	OLE060	OLE061	OLE062	OLE063
area 1	81152	117121	86973	75416	68540	70061	66552
area 2	81223	117194	87119	75510	68422	70174	66572
area 3	81036	117306	86968	75665	68553	70063	66514
m.o	81137	117207	87020	75530,33	68505	70099,33	66546
stdev.s	94,39809	93,18262	85,77296	125,7391	72,1734	64,67096	29,46184
rsd	0,116344	0,079503	0,098567	0,166475	0,105355	0,092256	0,044273
code	OLE064	OLE065	OLE070	OLE071	OLE072	OLE073	OLE074
area 1	83480	70889	111063	59686	59009	46862	56951
area 2	83541	70960	111195	59816	59026	50624	59125
area 3	83554	70845	111045	59796	59100	49432	58223
m.o	83525	70898	111101	59766	59045	48972,67	58099,67

stdev.s	39,50949	58,02586	81,90238	70	48,38388	1922,603	1092,235
rsd	0,047303	0,081844	0,073719	0,117123	0,081944	3,925869	1,879933
code	OLE075	OLE076	OLE077				
area 1	140659	39093	95230				
area 2	138702	41610	95319				
area 3	139424	41284	95256				
m.o	139595	40662,33	95268,33				
stdev.s	989,6429	1368,822	45,76389				
rsd	0,708939	3,366315	0,048037				

Πίνακας area δειγμάτων με την τεχνική UPLC

Μέσα στα δείγματα αυτά υπήρχαν φύλλα αλλά και φύλλα κονιοποιημένα μαζί με τα κλαδιά. Για την σωστή επεξεργασία έπρεπε να γίνει διαχωρισμός αυτών .

ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΚΛΑΔΙΑ

code	%Ποσοστό ολευρωπεΐνης(w/w)	ΧΩΡΑ
OLL034	0,03	ΕΛΛΑΔΑ
OLL035	0,04	ΕΛΛΑΔΑ
OLL031	0,04	ΕΛΛΑΔΑ
OLL038	0,08	ΕΛΛΑΔΑ
OLL025	0,08	ΕΛΛΑΔΑ
OLL027	0,08	ΕΛΛΑΔΑ
OLL041	0,12	ΕΛΛΑΔΑ
OLL028	0,13	ΕΛΛΑΔΑ
OLL037	0,13	ΕΛΛΑΔΑ
OLL030	0,23	ΕΛΛΑΔΑ
OLL042	0,46	ΕΛΛΑΔΑ
OLL024	0,48	ΕΛΛΑΔΑ
OLL026	0,55	ΕΛΛΑΔΑ
OLL029	0,56	ΕΛΛΑΔΑ
OLL045	0,68	ΕΛΛΑΔΑ
OLL043	1,10	ΕΛΛΑΔΑ
OLL032	1,23	ΕΛΛΑΔΑ
OLL044	1,40	ΕΛΛΑΔΑ
OLL040	1,45	ΕΛΛΑΔΑ

OLL046	1,60	ΕΛΛΑΔΑ
OLL023	1,61	ΕΛΛΑΔΑ
OLL039	1,63	ΕΛΛΑΔΑ
OLL033	1,74	ΕΛΛΑΔΑ
OLL036	1,74	ΕΛΛΑΔΑ
OLL055	2,98	ΕΛΛΑΔΑ
OLL056	3,48	ΕΛΛΑΔΑ
OLL063	4,18	ΕΛΛΑΔΑ
OLL062	4,40	ΕΛΛΑΔΑ
Μέσος όρος	1,15	

Πίνακας % ποσοστών ολευρωπεΐνης στα εκχυλίσματα φύλλων με κλαδιά

Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε ολευρωπεΐνη(g ολευρωπεΐνης σε 100 g κόνεως φύλλων) βρέθηκε να είναι 1,15%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 57% των δειγμάτων κυμαίνεται κάτω από τον μέσο όρο, ενώ ξεχωρίζουν τέσσερα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα και συγκεκριμένα τα OLL055, 056, 062, 063.

Τα OLL055 και OLL056 προέρχονται από ελαιόδεντρα της ποικιλίας Αμφίσσης και περιέχουν 2,98% και 3,48% ολευρωπεΐνης αντίστοιχα. Αντίθετα τα δείγματα OLL062, 063 προέρχονται από δέντρα αγριελιάς από την Φθιώτιδα και την Αρκαδία αντίστοιχα. Τα ποσοστά και στις δύο περιπτώσεις (ελιάς και αγριελιάς) είναι υψηλότερα από τον μέσο όρο που απαντάται σε δείγματα μείξης κλαδιών με φύλλα, στα οποία αναμένεται η ανάμειξη να προκαλέσει μείωση των ποσοστών. Ωστόσο είναι προφανές ότι τα δείγματα της αγριελιάς υπερέχουν σε περιεκτικότητα ολευρωπεΐνης σε σχέση με αυτά της ήμερης.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται 41 δείγματα τα οποία αποτελούνται αμιγώς από φύλλα και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική UPLC-DAD.

	ΦΥΛΛΑ	
SAMPLE CODE	μg ολευρωπεΐνης ανά ml διαλύματος	% ποσοστό ολευρωπεΐνης (w/w)
OLE 1	24,85	3,73
OLE 2	29,99	4,50
OLE 3	53,03	7,95
OLE 4	7,06	1,06
OLE 5	20,73	3,11
OLE 6	23,72	3,56
OLE 7	9,37	1,40
OLE 8	13,23	1,98
OLE 9	46,92	7,03
OLE 10	25,54	3,83
OLE 12	31,36	4,70
OLE 13	19,70	2,95
OLE 14	25,15	3,77
OLE 15	59,87	8,98
OLE 16	22,70	3,40
OLE 17	1,55	0,23
OLE 18	0,93	0,14
OLE 19	7,60	1,14
OLE 20	3,76	0,56
OLE 21	7,04	1,06
OLE 22	4,37	0,66
OLE 47	39,79	5,96

OLE 48	14,43	2,16
OLE 49	10,71	1,61
OLE 50	5,92	0,89
OLE 54	5,63	0,84
OLE 57	33,94	5,09
OLE 58	48,91	7,33
OLE 59	36,38	5,45
OLE 60	31,62	4,74
OLE 61	28,70	4,30
OLE 64	34,93	5,24
OLE 65	29,69	4,45
OLE 70	46,37	6,95
OLE 71	25,08	3,76
OLE 72	24,78	3,71
OLE 73	20,60	3,09
OLE 74	24,38	3,66
OLE 75	58,20	8,72
OLE 76	17,15	2,57
OLE 77	39,80	5,97
Μέσος όρος		3,71

Πίνακας % ποσοστών ολευρωπεΐνης στα φύλλα

Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας της ολευρωπεΐνης είναι 3,71% ενώ παρατηρείται εξαιρετική ποικιλία όσο αφορά στα ποσοστά. Δείγματα ιδιαίτερως πτωχά ήταν τα OLL018 (κονσερβολιά), 017 (gordal), 020 (manzanillo), 022 (καλαμών), 054 (καλαμών), 050 (κονσερβολιά) με ποσοστά κάτω του 1% ενώ υπήρχαν δείγματα σαφώς πιο πλούσια των οποίων το ποσοστό ξεπερνούσε το 7% και συγκεκριμένα το

OLL009, 058, 003,075, 015.Τα OLL009, 003 και 075 αφορούν δείγματα αγριελιάς από την Άμφισσα (έτος συλλογής το 2015), τη Φοινίκη Μεσσηνίας (έτος συλλογής το 2014) και την Καλαμάτα (έτος συλλογής 2016) αντίστοιχα.

2.2.7 Δείγματα OLL078-OLL117

Τα εν λόγω δείγματα επεξεργάστηκαν με την τεχνική HPLC εν αντιθέσει με τα υπόλοιπα που χρησιμοποιήθηκε, όπως περιγράφηκε παραπάνω, η τεχνική UPLC.

Έχοντας ήδη αναπτύξει μια μέθοδο επεξεργασίας για την ποσοτικοποίηση της ολευρωπεΐνης στο εργαστήριο τα προηγούμενα χρόνια επιλέχθηκε να χρησιμοποιήσουμε αυτή και για τα υπόλοιπα δείγματα.

Παρασκευάστηκαν τα εκχυλίσματα των δειγμάτων όπως προτείνει η ευρωπαϊκή φαρμακοποιία και στο τελικό υδατικό εκχύλισμα έγινε μια δοκιμαστική ανάλυση με την μέθοδο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο τα τελευταία χρόνια για την ανάλυση παρόμοιων εκχυλισμάτων.

Μετά από κατάλληλες δοκιμές η τελική ανάλυση αποφασίστηκε να γίνει απευθείας στα μεθανολικά εκχυλίσματα και όχι στα υδατικά ενώ για λόγους ευκρίνειας των χρωματογραφημάτων έγινε σε όλα ανάμειξη με νερό. Συγκεκριμένα 250 μl ύδατος και 750 μl μεθανολικού εκχυλίσματος αναμείχθηκαν ώστε να ληφθούν δείγματα τελικού όγκου 1 ml.

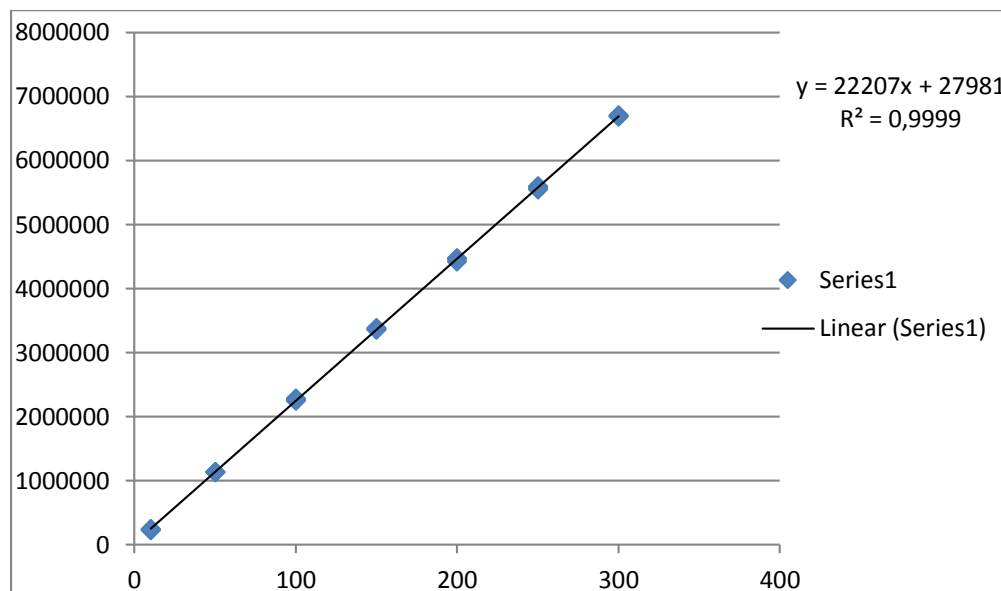
Το σύστημα διαλυτών βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν διάρκειας 50 λεπτών, με θέρμανση στους 30 βαθμούς.

T(min)	Ακετονιτρίλιο	H ₂ O - 0,2% οξικό οξύ(AA)
0	2	98
40	30	70
45	30	70
50	2	98

Σύστημα έκλουσης με την τεχνική HPLC

Ανάμεσα στα δείγματα είχε τοποθετηθεί πρότυπο διάλυμα τυροσόλης ώστε να ελεγχθεί η ακρίβεια της διαδικασίας και η διατήρηση ομοιομορφίας των συνθηκών.

Ο υπολογισμός του περιεχόμενου ποσοστού της ολευρωπεΐνης γίνεται με βάση καμπύλη αναφοράς, η οποία έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο στα πλαίσια προηγούμενων μελετών και είναι η ακόλουθη:



Καμπύλη αναφοράς HPLC

Ακολουθεί πίνακας με τα areas και το ποσοστό της ολευρωπεΐνης στα δείγματα που αναλύθηκαν με την τεχνική HPLC-DAD.

	ΦΥΛΛΑ HPLC	
SAMPLE CODE	AREA	% ποσοστό ολευρωπεΐνης(w/w)
OLE78	4747848	2,83
OLE79	14064946	8,43
OLE80	6201395	3,71
OLE88	6778802	4,05
OLE89	8235576	4,93
OLE90	11303904	6,77
OLE91	14369245	8,61
OLE92	5402382	3,23
OLE93	14113619	8,46
OLE94	3430991	2,04
OLE95	4251235	2,54
OLE96	7628191	4,56
OLE97	15612642	9,36
OLE98	10696505	6,41
OLE99	10484199	6,28
OLE100	10063724	6,03
OLE101	15598839	9,35
OLE102	10706143	6,41
OLE103	13628871	8,17
OLE104	14097337	8,45
OLE105	7497903	4,49

OLE106	3504383	2,09
OLE107	9618290	5,76
OLE108	11425887	6,84
OLE109	9477364	5,67
OLE110	232733	0,12
OLE111	615814	0,35
OLE112	2129022	1,26
OLE113	3732134	2,22
OLE114	2185046	1,30
OLE115	1148301	0,67
OLE116	6867593	4,11
OLE117	2719963	1,62
Μέσος όρος		4,76

Πίνακας % ποσοστών ολευρωπεΐνης στα φύλλα που αναλύθηκαν με HPLC

Ο μέσος όρος των δειγμάτων αυτών είναι 4,76% ενώ υπάρχουν δείγματα αρκετά φτωχά με περιεκτικότητα κάτω από 1% . Συγκεκριμένα τα OLL110, 111, 115 έχουν ποσοστά 0,12, 0,35 και 0,67%. Όλα τα δείγματα αυτά είναι συλλογής Δεκεμβρίου 2016, το 110 αφορά δείγμα αγριελιάς από την Κέρκυρα ενώ τα άλλα δύο είναι οι ποικιλίες λιανολιά και κονσερβολιά. Ξεχωρίζουν σαφώς 2 δείγματα ελιάς με ποσοστό άνω του 9% τα OLL101, OLL97 ποικιλιών ricual και καλαμών αντίστοιχα. Αμφότερα τα δείγματα προέρχονται από το ίδιο κτήμα στην Πελοπόννησο και η περίοδος συλλογής τους είναι ο Οκτώβριος του 2016.

2.3 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β

2.3.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων:

2.3.2 Σύγκριση HPLC/UPLC

Όπως είναι ήδη γνωστό η Ε.Φ. προτείνει την ανάλυση των φύλλων ελιάς και τον υπολογισμό της περιεχόμενης ολεωρωπεΐνης με τη μέθοδο της HPLC, η οποία αποτελεί τα τελευταία 30 χρόνια το πιο ευρύ και εύχρηστο εργαλείο ρουτίνας για τις ποσοτικές αναλύσεις δειγμάτων. Στην παρούσα εργασία αποφασίστηκε να εφαρμοστεί μια τροποποιημένη, της προτεινόμενης από την Ε.Φ. μεθόδου, ώστε να προσαρμοστεί στην οργανολογία UPLC-DAD η οποία θα μας έδινε τη δυνατότητα να επιτύχουμε σημαντικά μικρότερους χρόνους ανάλυσης.

Επιπλέον έγινε σύγκριση μεταξύ της τροποποιημένης μεθόδου UPLC με τη μέθοδο της HPLC, η οποία έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις ολεωρωπεΐνης στο εργαστήριό μας τα τελευταία 10 χρόνια.

Έτσι πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτική σύγχρονη ανάλυση με UPLC και HPLC με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ταυτόσημα και με τις 2 αναλυτικές τεχνικές, παρουσιάζοντας φυσικά την αναμενόμενη απόκλιση, η οποία ήταν όμως σε αποδεκτά πλαίσια.

CODE	% ποσοστό HPLC	% ποσοστό UPLC	%ΑΠΟΚΛΙΣΗ
OLL002	4,41	4,5	2,02
OLL003	7,34	7,95	7,69
OLL004	1,01	1,06	4,72
OLL006	3,43	3,56	3,70

Σύγκριση ποσοστών με τις 2 τεχνικές

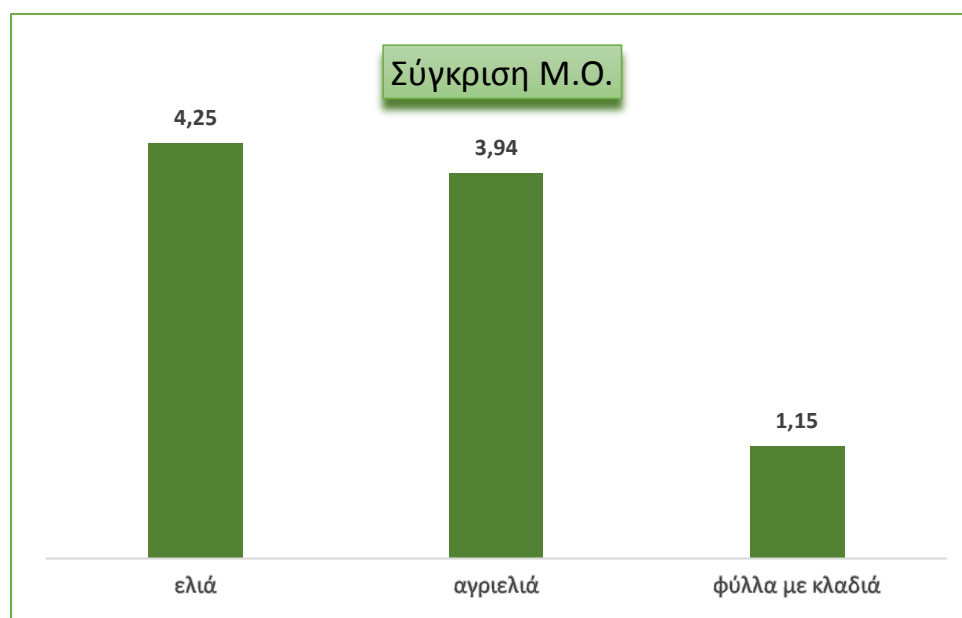
Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής ανάλυσης (UPLC) είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη και προσφέρει τα πλεονεκτήματα ταχύτερων αναλύσεων και χρησιμοποίησης σημαντικά μικρότερης ποσότητας δειγμάτων.

2.4 Αποτελέσματα:

Με το πέρας των αναλυτικών τεχνικών ακολούθησε η ομαδοποίηση των δεδομένων, καθώς υπήρχε μεγάλη διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα και ακολούθως η απαραίτητη επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Έχοντας λοιπόν ομαδοποιήσει τα δεδομένα προκύπτουν τα εξής διαγράμματα:

Διάγραμμα μέσων όρων ποσοστού ολευρωπεΐνης



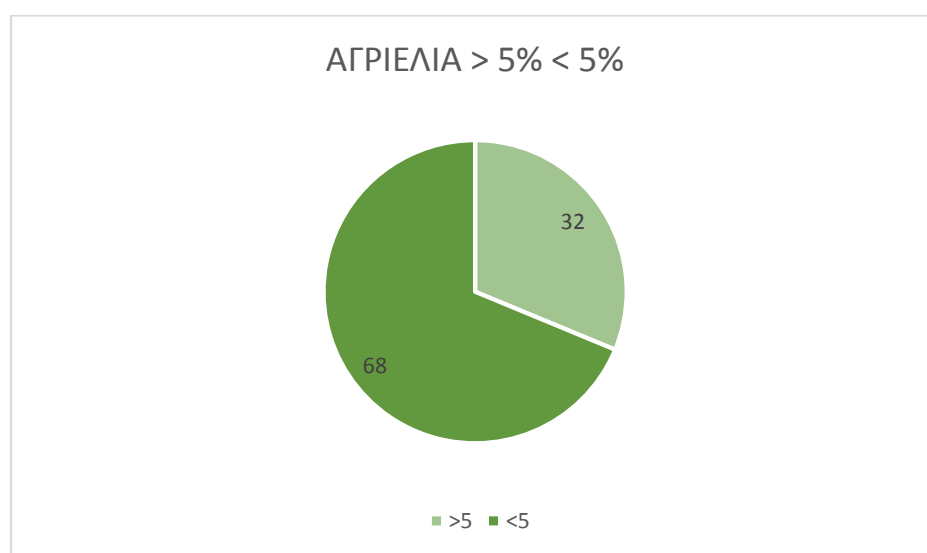
Στο διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται μια σύγκριση των μέσων όρων του ποσοστού της ολευρωπεΐνης στις τρεις ομάδες δειγμάτων δηλαδή: (1) φύλλα ελιάς, (2) φύλλα αγριελιάς και (3) μείξη φύλλων και κλαδιών ελιάς.

Όπως ήταν αναμενόμενο το μικρότερο ποσοστό ολευρωπεΐνης εμφανίζεται στα δείγματα που περιέχουν φύλλα και κλαδιά. Η διαφορά του από τα άλλα δύο είναι

μεγάλη και οφείλεται πιθανότητα στην ύπαρξη κλαδιών τα οποία μειώνουν δραματικά τον μέσο όρο καθώς περιέχουν ελάχιστη ποσότητα ολευρωπεΐνης.

Η διαφορά ωστόσο που παρατηρείται ανάμεσα στο ποσοστό της αγριελιάς με αυτό της ήμερης είναι ελάχιστη, με ελαφρά υψηλότερο στην καλλιεργήσιμη και δεν υποδηλώνει κάποια σαφή υπεροχή της μίας ή της άλλης ποικιλίας.

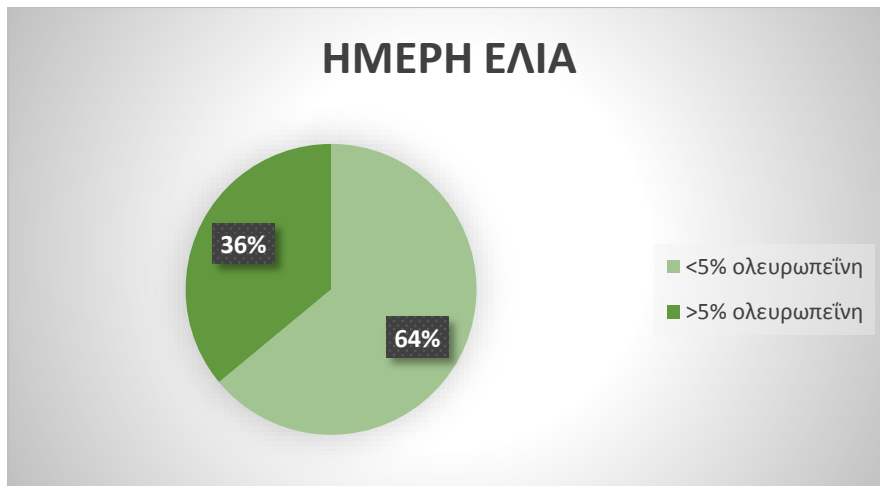
Γενικά υπάρχει η εντύπωση ότι η αγριελιά υπερέχει σε πολλά της ήμερης ελιάς. Ωστόσο δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες συγκρίνοντας επιμέρους χαρακτηριστικά, ενώ η πλειονότητα όσων έχουν πραγματοποιηθεί αφορά κατά βάση το ελαιόλαδο.



Ποσοστό φύλλων αγριελιάς άνω και κάτω του 5% που θέτει η Ε.Φ ως όριο για διουρητική δράση

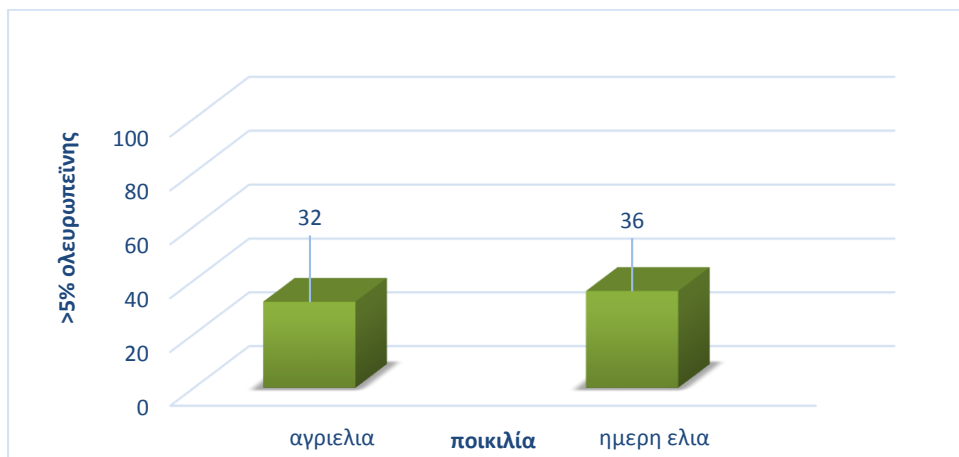
Στο διάγραμμα φαίνεται το ποσοστό των φύλλων που ξεπερνά το όριο του 5%. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία τα φύλλα της ελιάς, τα οποία περιέχουν το λιγότερο 5% ολευρωπεΐνης, έχουν διουρητική δράση και μπορούν να καταναλωθούν σαν αφέψημα.

Για την αγριελιά το 32% (ουσιαστικά δηλαδή το 1/3 των δειγμάτων) είναι πάνω από το όριο αυτό.



Ποσοστό φύλλων ελιάς άνω και κάτω του 5% που θέτει όριο η Ε.Φ για διουρητική δράση

Όπως φαίνεται και από το γράφημα το 36% των φύλλων ήμερης ελιάς περιέχει πάνω από 5% ολευρωπεΐνη.



Διάγραμμα σύγκρισης βάσει Ε.Φ.

Συγκρίνοντας τις 2 αυτές ποικιλίες παρατηρείται μια μικρή υπεροχή της ήμερης ελιάς όχι όμως καθοριστική ώστε να αποφανθούμε ότι είναι ανώτερη της αγριελιάς ως προς την περιεχόμενη ολευρωπεΐνη.

2.4.1 Ποικιλίες υπό όμοιες καλλιεργητικές συνθήκες

Ανάμεσα στα δείγματα που λάβαμε ξεχωριστή κατηγορία αποτελούν 2 διαφορετικές ομάδες φύλλων οι οποίες είχαν ίδια περίοδο συλλογής

(αναφερόμαστε στο έτος και για κάθε ομάδα) και προερχόντουσαν από τον ίδιο ελαιώνα, είχαν δηλαδή αναπτυχθεί υπό όμοιες συνθήκες.

2.4.2 Περίοδος συλλογής 2014

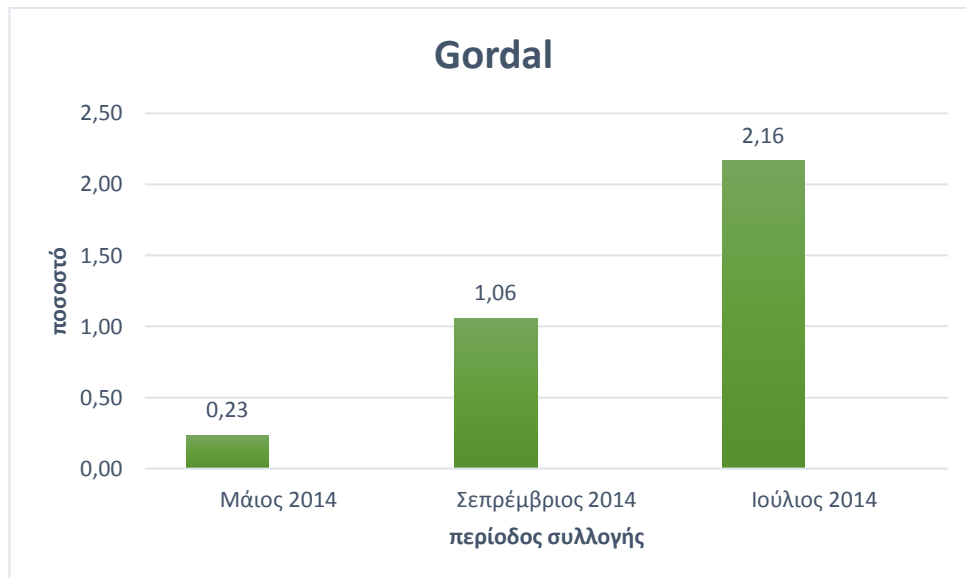
CODE	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑ	% ΠΟΣΟΣΤΟ ολευρωπείνης (w/w)	ΠΕΡΙΟΔΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ
OLL017	GORDAL	0,23	11/5/2014
OLL021	GORDAL	1,06	22/9/2014
OLL048	GORDAL	2,16	14/7/2014
OLL050	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	0,89	14/7/2014
OLL020	MANZANILLO	0,56	22/9/2014
OLL047	MANZANILLO	5,96	14/7/2014
OLL022	ΚΑΛΑΜΩΝ	0,66	22/9/2014
OLL054	ΚΑΛΑΜΩΝ	0,84	11/5/2014
OLL018	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	0,14	11/5/2014
OLL019	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	1,14	22/9/2014
OLL049	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	1,61	14/7/2014
	Μ.Ο	1,39	

Πίνακας ποικιλιών υπό όμοιες συνθήκες ανάπτυξης 2014

Τα δείγματα προέρχονται από το ίδιο κτήμα στο Βόλο. Ο μέσος όρος είναι αρκετά χαμηλός(1,39%) γεγονός που συνδέεται πιθανόν με την χρονική απόκλιση της συλλογής από την επεξεργασία των φύλλων. Επίσης διαπιστώνεται μια διακύμανση του ποσοστού ανάμεσα στην ίδια ποικιλία ανάλογα τον μήνα συλλογής των φύλλων.

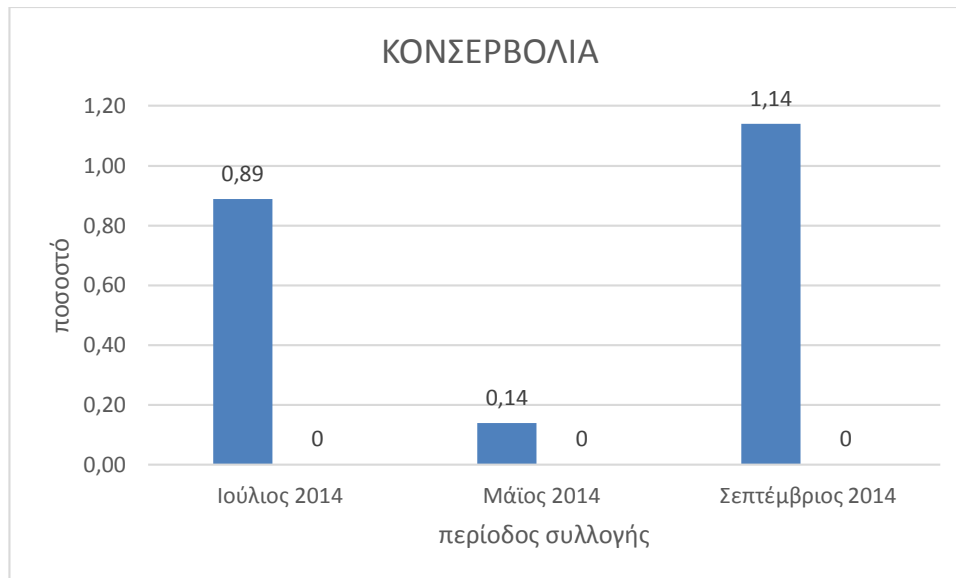
Συγκρίνοντας τους μήνες Ιούλιο, Μάϊο και Σεπτέμβριο στις ποικιλίες gordal (ισπανική ποικιλία) και κονσερβολιά, τους μήνες Σεπτέμβριο και Ιούλιο στην ποικιλία

manzanillo και Μάϊο και Σεπτέμβριο στην ποικιλία καλαμών λαμβάνουμε τα εξής ραβδογράμματα:



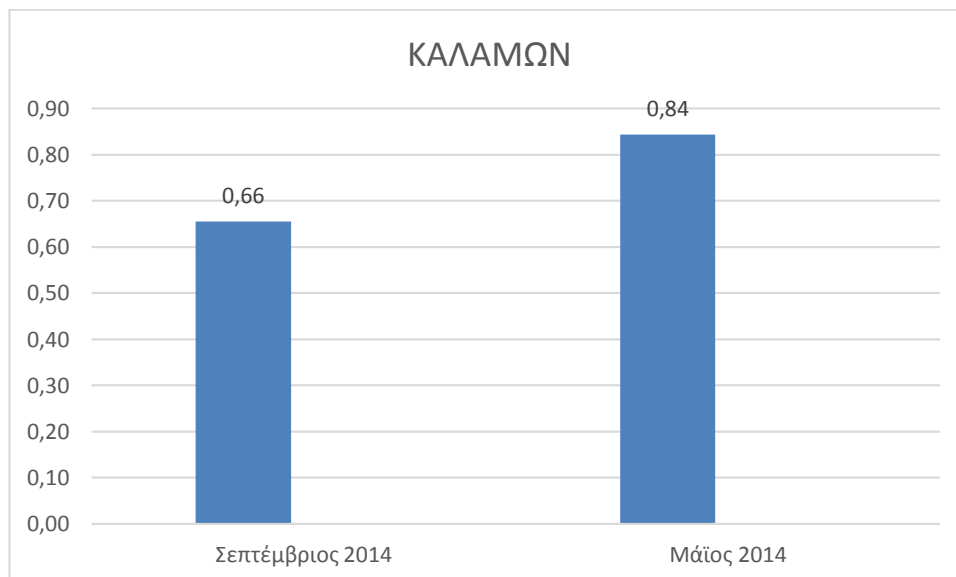
Μήνας συλλογής και ποσοστό ολευρωπείνης στην ποικιλία gordal

Όσο αφορά στην ποικιλία gordal φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα φύλλα που συλλέχθηκαν κατά τον μήνα Ιούλιο έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό ολευρωπείνης ενώ αυτά του Μαΐου εμφανίζουν εντυπωσιακά χαμηλά ποσοστά.



Μήνας συλλογής και ποσοστό ολευρωπεΐνης στην ποικιλία κονσερβολιά

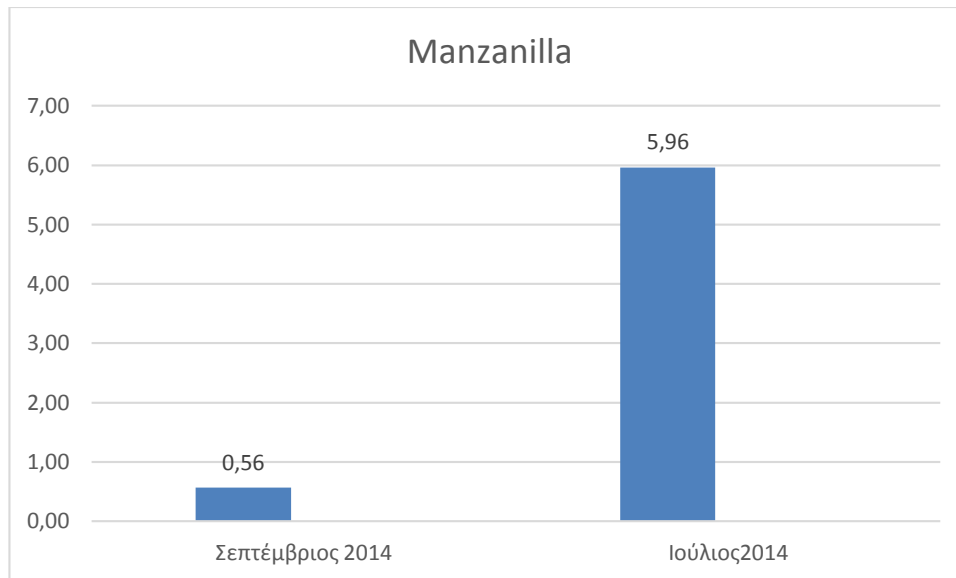
Για την ποικιλία κονσερβολιά το μεγαλύτερο ποσοστό παρουσιάζεται τον μήνα Σεπτέμβριο (1,14%) ενώ το χαμηλότερο τον Μάϊο (0,14%)



Μήνας συλλογής και ποσοστό ολευρωπεΐνης στην ποικιλία καλαμών

Εδώ τα ποσοστά ανάμεσα στην άνοιξη και το φθινόπωρο δεν εμφανίζουν μεγάλη διαφορά ,ωστόσο υπάρχει μια πτώση σε εκείνα που συνελλέχθησαν τον Σεπτέμβριο σε σχέση με του Μαΐου.

Τα φύλλα ποικιλίας καλαμών εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά τον Σεπτέμβριο



Μήνας συλλογής και ποσοστό ολευρωπεΐνης στην ποικιλία manzanilla

Στο ραβδόγραμμα αυτό παρατηρείται μια μεγάλη διαφορά ανάμεσα στους μήνες Ιούλιο και Σεπτέμβριο με αυτά του Ιουλίου να περιέχουν 5,96% ολευρωπεΐνης.

Μάλιστα τα φύλλα με περίοδο συλλογής Ιούλιο του 2014 ξεχωρίζουν σαφώς από όλα τα υπόλοιπα δείγματα του ίδιου έτους, παρουσιάζοντας εντυπωσιακά μεγάλο ποσοστό ειδικά αν αναλογιστεί κανείς ότι η επεξεργασία τους έγινε 2,5 χρόνια μετά ενώ το ποσοστό της περιεχόμενης ολευρωπεΐνης είναι 5,96% (πάνω δηλαδή από το αναφερόμενο 5% της Ε.Φ ως βάση για τον ισχυρισμό της διουρητικής δράσης του αφεψήματος των φύλλων) .

Ίσως το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει κάποιους ενδογενείς /ιδιοσυστατικούς παράγοντες της ποικιλίας αυτής που επηρεάζουν το ποσοστό σε σχέση με τον μήνα συλλογής σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες.

2.4.3 Περίοδος συλλογής 10^{ος}/2016

Η άλλη ομάδα δειγμάτων αφορά 22 (Oll088-Oll110) στον αριθμό τα οποία προέρχονταν, όπως και τα προηγούμενα, από το ίδιο κτήμα (στην Πελοπόννησο), είχαν καλλιέργηθεί δηλαδή υπό όμοιες συνθήκες ωστόσο όλα αφορούσαν σε διαφορετικές ποικιλίες.

Επομένως η περίπτωση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αναφερόμαστε ξεκάθαρα σε ομοιογένεια ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης (ηλιοφάνεια,θρεπτικά συστατικά εδάφους κτλ) και ίδια περίοδο συλλογής (Οκτώβριος 2016) για όλα, παράγοντες οι οποίες επηρεάζουν το ποσοστό ολευρωπεΐνης. Ως εκ τούτου η σύγκριση αφορά μόνο στις διαφορετικές ποικιλίες και οποιαδήποτε διαφορά στο ποσοστό της περιεχόμενης ολευρωπεΐνης σχετίζεται άμεσα με την ποικιλία.

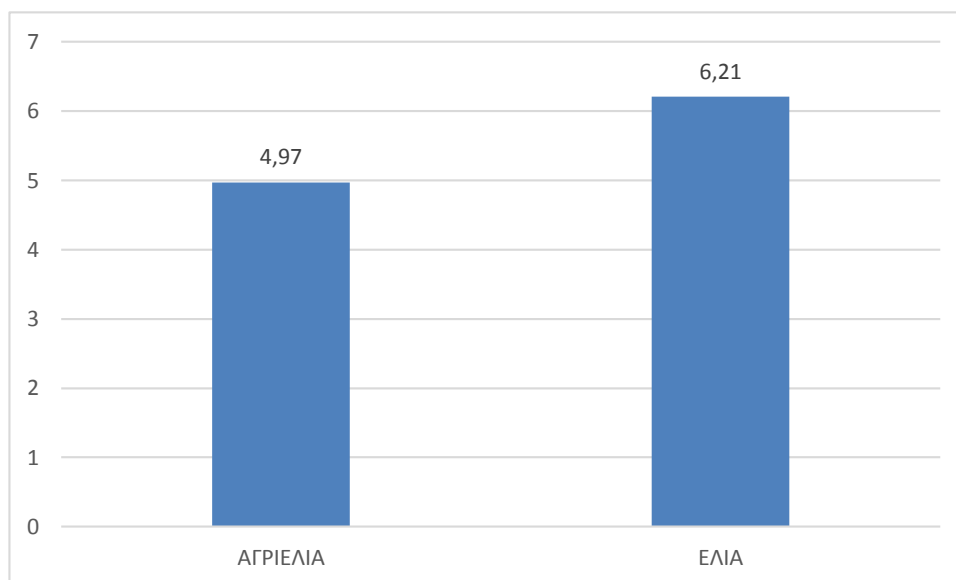
SAMPLE CODE	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑ	%ποσοστό ολευρωπεΐνης(w/w)	ΥΠΟΕΙΔΟΣ
OLL094	ΜΑΝΑΚΙ ΚΟΘΡΕΙΚΗ	2,04	ΗΜΕΡΗ
OLL106	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	2,09	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL095	ΑΘΗΝΟΕΛΙΑ	2,54	ΗΜΕΡΗ
OLL092	ΧΟΝΔΡΟΜΑΝΑΚΟ	3,23	ΗΜΕΡΗ
OLL088	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ ΨΙΛΗ	4,05	ΗΜΕΡΗ
OLL105	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	4,49	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL096	ΣΤΡΟΓΓΥΛΟΕΛΙΑ	4,56	ΗΜΕΡΗ
OLL089	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ ΜΕΣΟΚΑΡΠΗ	4,93	ΗΜΕΡΗ
OLL109	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	5,67	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL107	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	5,76	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL100	GORDAL	6,03	ΗΜΕΡΗ
OLL099	ΑΜΦΙΣΣΗΣ ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	6,28	ΗΜΕΡΗ
OLL098	ΚΑΛΑΜΩΝ	6,41	ΗΜΕΡΗ
OLL102	GROSSA DI SPAGNA	6,41	ΗΜΕΡΗ
OLL090	ΚΟΡΩΝ.ΜΕΓΑΛΟΚΑΡΠΗ	6,77	ΗΜΕΡΗ

OLL108	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	6,84	ΑΓΡΙΕΛΙΑ
OLL103	SANTA CATERINA	8,17	ΗΜΕΡΗ
OLL104	BARNEA	8,44	ΗΜΕΡΗ
OLL093	ΓΑΙΔΟΥΡΟΕΛΙΑ ΚΥΝΟΥΡΙΑΣ	8,46	ΗΜΕΡΗ
OLL091	ΓΛΥΚΟΜΑΝΑΚΟ	8,61	ΗΜΕΡΗ
OLL101	PICUAL	9,35	ΗΜΕΡΗ
OLL097	ΚΑΛΑΜΩΝ ΑΝΟΣΙΑΝΑ	9,36	ΗΜΕΡΗ
	Μέσος όρος	5,93	

Πίνακας ποικιλιών υπό όμοιες συνθήκες 2016

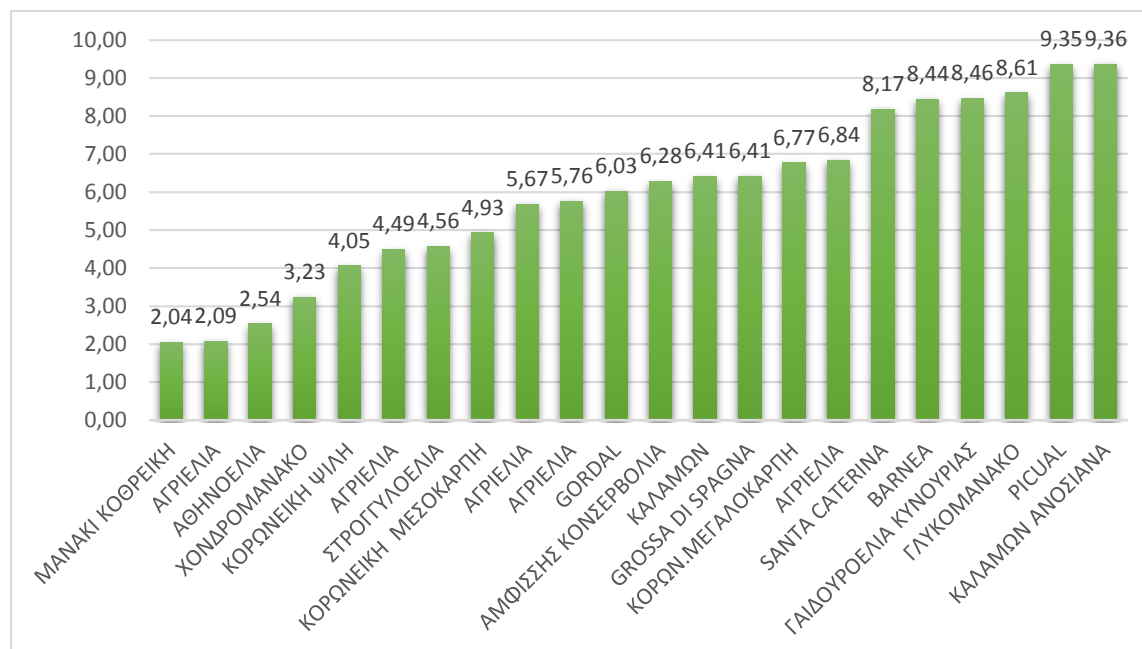
Ο μέσος όρος του ποσοστού είναι 5,93 (υψηλότερο από το οριζόμενο, από την Ε.Φ. όριο για θεραπευτική χρήση φύλλων του 5%).

Ανάμεσα στα δείγματα αυτά τα 5 είναι ποικιλίες αγριελιάς και τα υπόλοιπα 17 ποικιλίες καλλιεργήσιμης ελιάς.



Διάγραμμα σύγκρισης ποσοστών ελιάς/αγριελιάς υπό όμοιες συνθήκες ανάπτυξης

Στο διάγραμμα αυτό συγκρίνονται οι μέσοι όροι ποσοστού ολευρωπεΐνης ανάμεσα στα δείγματα ελιάς και αγριελιάς. Φαίνεται ότι υπάρχει μια υπεροχή της ήμερης ελιάς αποτέλεσμα που συνάδει και με τη γενική σύγκριση των δειγμάτων ελιάς/αγριελιάς αν και στην περίπτωση αυτή η διαφορά υπέρ της ήμερης ελιάς ως προς το ποσοστό της περιεχόμενης ολευρωπεΐνης είναι σημαντικά πιο μικρή.

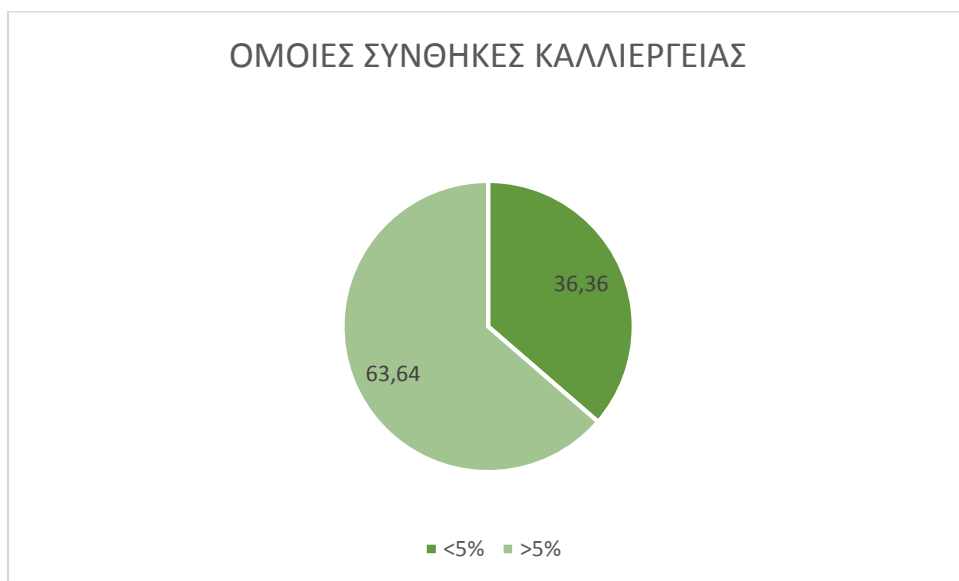


Διάγραμμα σύγκρισης ποσοστού ολευρωπεΐνης σε ποικιλίες υπό όμοιες συνθήκες καλλιέργειας

Στο ραβδόγραμμα αυτό παρατίθενται όλες οι εξετασθείσες ποικιλίες με το ποσοστό της περιεχόμενης ολευρωπεΐνης σε αύξουσα διάταξη. Όπως φαίνεται παρατηρούνται ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά στο γενικό σύνολο με τις ποικιλίες Καλαμών και Ρισιουάλ να εμφανίζουν πάνω από 9%. Σε μελέτη που είχε γίνει σε φύλλα ποικιλίας Ρισιουάλ (Ισπανία) το ποσοστό ολευρωπεΐνης κυμαινόταν από 4,7-7,2% σε χλωρά φύλλα όμως, με το μικρότερο ποσοστό να εμφανίζεται τον Απρίλιο και το υψηλότερο τον Νοέμβριο (Ortega-Garcia, Blanco, Peinado, & Peragon, 2008).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα πράσινα νεαρά φύλλα έχουν μεγαλύτερο ποσοστό ολευρωπεΐνης σε σχέση με τα πιο γερασμένα (συνήθως κιτρινοπράσινου

χρωματισμού), ενώ μπορούμε να διακρίνουμε 2 περιόδους στην ωρίμανση των φύλλων μία την άνοιξη και μία το φθινόπωρο (Ranalli et al., 2006).



Ποσοστό ολευρωπεΐνης σε φύλλα υπό όμοιες συνθήκες άνω και υπό του 5%

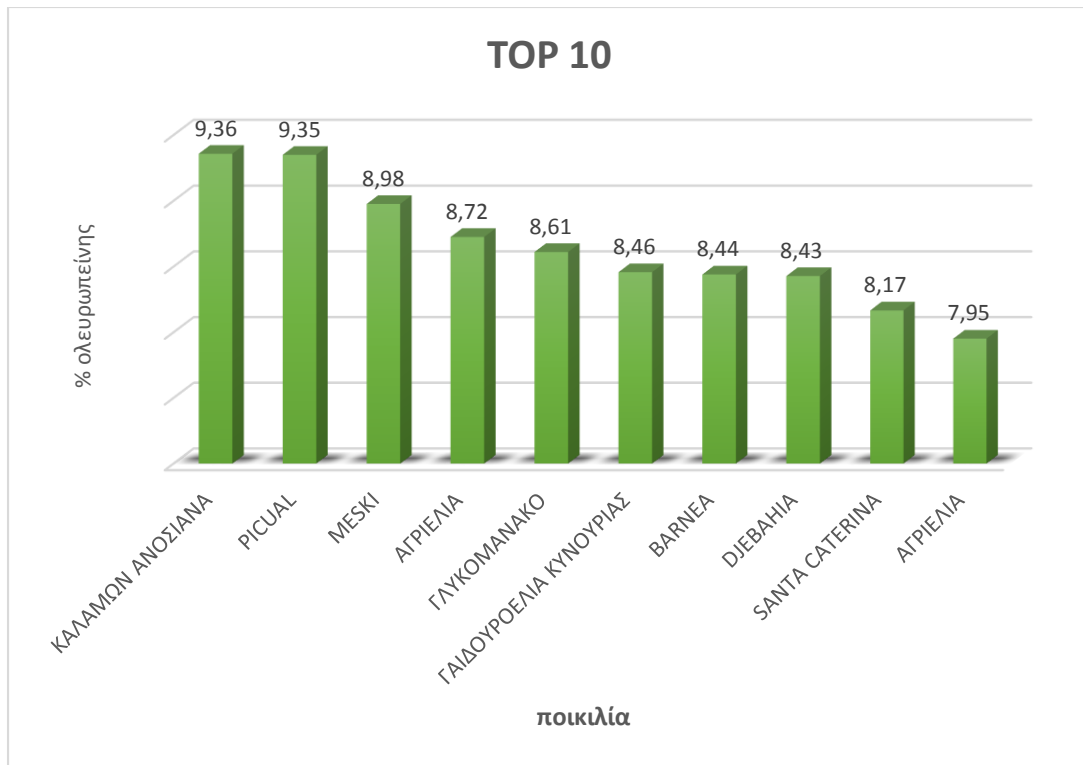
Το γράφημα αυτό αφορά στα ποσοστά που υπερβαίνουν το όριο του 5%. Συγκεκριμένα το 63,6% είναι πάνω απο αυτό γεγονός εντυπωσιακό, ειδικά αν συγκριθεί με τη συνολική εικόνα που μόλις το 32% (αγριελιά) και το 36% στην ήμερη το ξεπερνά.

Πιθανώς οι παράγοντες που επηρεάζουν θετικά το ποσοστό είναι το κατάλληλο κλίμα, η περίοδος συγκομιδής των φύλλων(τέλη Οκτωβρίου) αλλά και η άμεση επεξεργασία τους.

2.4.4 Τα υψηλότερα 10 ποσοστά

code	μέρος καλλιέργειας	ποικιλία	% ποσοστό ολευρωπεΐνης (w/w)	ΥΠΟΕΙΔΟΣ	Χώρα προέλευσης
OLL097	ΕΛΛΑΔΑ	ΚΑΛΑΜΩΝ ΑΝΟΣΙΑΝΑ	9,36	ΗΜΕΡΗ	ΕΛΛΑΔΑ
OLL101	ΕΛΛΑΔΑ	ΡΙCΥΑΛ	9,35	ΗΜΕΡΗ	ΙΣΠΑΝΙΑ
OLL015	ΤΥΝΗΣΙΑ	ΜΕSΚΙ	8,98	ΗΜΕΡΗ	ΤΥΝΗΣΙΑ
OLL075	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	8,72	ΗΜΕΡΗ	ΕΛΛΑΔΑ
OLL091	ΕΛΛΑΔΑ	ΓΛΥΚΟΜΑΝΑΚΟ	8,61	ΗΜΕΡΗ	ΕΛΛΑΔΑ
OLL093	ΕΛΛΑΔΑ	ΓΑΙΔΟΥΡΟΕΛΙΑ ΚΥΝΟΥΡΙΑΣ	8,46	ΗΜΕΡΗ	ΕΛΛΑΔΑ
OLE104	ΕΛΛΑΔΑ	ΒΑΡΝΕΑ	8,44	ΗΜΕΡΗ	ΕΛΛΑΔΑ
OLL079	ΑΛΓΕΡΙΑ	ΔΙΕΒΑΗΙΑ	8,43	ΗΜΕΡΗ	ΤΥΝΗΣΙΑ
OLL103	ΕΛΛΑΔΑ	SANTA CATERINA	8,17	ΗΜΕΡΗ	ΙΣΠΑΝΙΑ
OLL003	ΦΟΙΝΙΚΗ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	7,95	ΑΓΡΙΕΛΙΑ	ΕΛΛΑΔΑ

Τα δείγματα με τα υψηλότερα ποσοστά ολευρωπεΐνης



Διάγραμμα των 10 ποικιλιών με τα υψηλότερα ποσοστά ολευρωπείνης

Σύμφωνα με τα ανωτέρω δεδομένα στην πρώτη δεκάδα παρατηρείται ότι το 60% αφορά στα δείγματα που συλλέχθηκαν από το ίδιο κτήμα τον 10ο του 2016.

Στην 3η θέση εμφανίζεται η ποικιλία meski από την Τυνησία ενώ στην 8η η ποικιλία Djebahia από την Αλγερία.

Στην τέταρτη και την τελευταία θέση υπάρχουν και 2 δείγματα αγριελιάς με ποσοστά 8,72% και 7,95% αντίστοιχα. Μάλιστα το τελευταίο δείγμα με κωδικό OLL003 (από τη Φοινίκη Μεσσηνίας) έχει συλλεχθεί το Νοέμβριο του 2014! Η ανάλυση τους έλαβε χώρα 2 χρόνια μετά. Παρά το μεγάλο χρονικό διάστημα που πέρασε εντοπίζεται ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό. Πιθανόν λοιπόν το δένδρο αυτό να εμφανίζει ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά αν η επεξεργασία γίνει άμεσα μετά τη συγκομιδή.

Το 80% των δειγμάτων που εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά είναι συλλογής 2016 και η ανάλυση τους έγινε σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Φαίνεται επομένως ξεκάθαρα ότι η άμεση ανάλυση των φύλλων είναι απαραίτητη καθώς τότε η ολευρωπείνη εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά. Σε

αντίστοιχη μελέτη που αφορούσε φύλλα από την Τυνησία και τη Γαλλία τα ποσοστά είναι εντυπωσιακά καθώς κυμαίνονται από 8,72-17,95% επί ξηρού (Aouidi et al., 2012). Οι κοινές ποικιλίες και στις 2 μελέτες ήταν οι zarazzi,chemlali,chetoui,meski με πρόδηλη την επιρροή της άμεσης επεξεργασίας τους καθώς στην παρούσα ερευνητική εργασία (αρκετά δείγματα φύλλων αποθηκευμένα τουλάχιστον 1 χρόνο) τα ποσοστά κυμαίνονταν από 2,95-8,85%.

2.4.5 Τα χαμηλότερα ποσοστά ολευρωπεΐνης

SAMPLE CODE	ΠΕΡΙΟΧΗ/ΤΟΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	% ποσοστό ολευρωπεινης	Περίοδος συλλογής
OLL018	ΒΟΛΟΣ	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	0,14	5ος/2014
OLL017	ΒΟΛΟΣ	GORDAL	0,23	9ος/2014
OLL111	ΚΕΡΚΥΡΑ ΚΕΝΤΡΩΜΑ	ΛΙΑΝΟΛΙΑ	0,35	12ος/2016
OLL020	ΒΟΛΟΣ	ΜΑΝΖΑΝΙΛΛΑ	0,56	9ος/2014
OLL022	ΒΟΛΟΣ	ΚΑΛΑΜΩΝ	0,66	9ος/2014
OLL115	ΧΑΝΙΑ	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ ΜΙΚΡΟΣ	0,67	12ος/2016
OLL054	ΒΟΛΟΣ	ΚΑΛΑΜΩΝ	0,84	5ος/2014
OLL050	ΒΟΛΟΣ	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	0,89	7ος/2014
OLL021	ΒΟΛΟΣ	GORDAL	1,06	9ος/2014
OLL019	ΒΟΛΟΣ	ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ	1,14	9ος/2014

Πίνακας ποικιλιών με τα χαμηλότερα ποσοστά ολευρωπεΐνης

Το 80% των δειγμάτων αφορά σε χρονική περίοδο συλλογής το 2014 γεγονός που υποδηλώνει για ακόμα μία φορά την πιθανότητα άμεσης εξάρτησης ποσοστού και χρονικής εγγύτητας ανάμεσα στην επεξεργασία και την συγκομιδή των φύλλων.

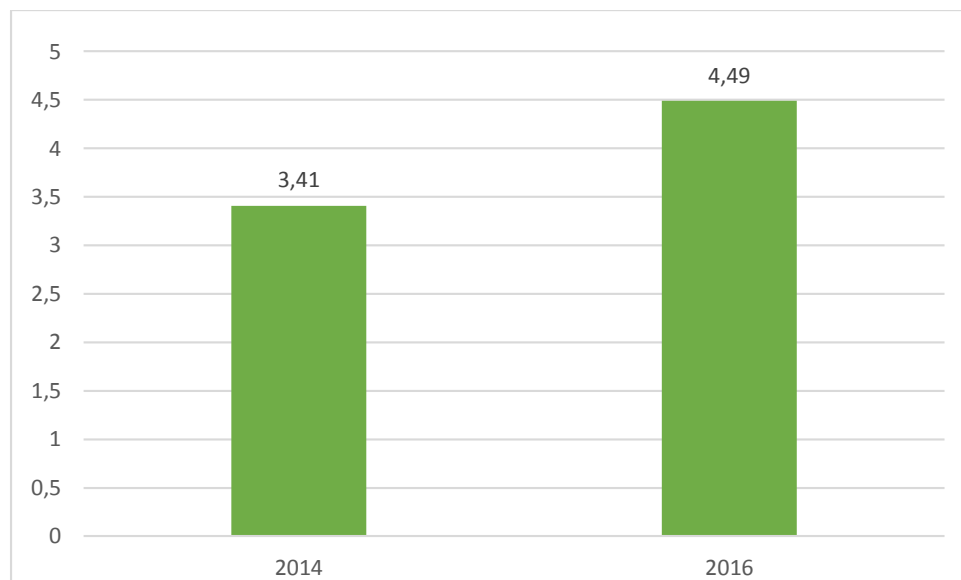
Επιπλέον προέρχονται από την ίδια περιοχή συλλογής ενώ τα 4 ανήκουν στην εμπορική ποικιλία ονσερβολιά ,τα 2 gordal, 2 καλαμών, 1 λιανολιά και 1 manzanillo. Ενώ μόλις 2 στα 10 δείγματα ξεπερνάν το 1%.

Μόνο 2 έχουν συλλεχθεί την άνοιξη και συγκεκριμένα τον μήνα Μάϊο, ενώ όλα τα υπόλοιπα είναι συλλογή μηνών Σεπτεμβρίου και Δεκεμβρίου.

Σε μελέτη που αφορούσε στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο φύλλων ελιάς και συνέκρινε διάφορες ελληνικές ποικιλίες ανάλογα με τον μήνα συλλογής των φύλλων είχε φανεί ότι το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο εντοπίζεται κατά τον μήνα Απριλίο ενώ φθίνει κατά την ωρίμανση των φύλλων με τα μικρότερα ποσοστά να εμφανίζονται τους μήνες Σεπτέμβριο και Δεκέμβριο. Αν και η έρευνα αυτή δεν αφορούσε την ολεωρωπεΐνη αυτή καθαυτή αλλά το σύνολο των φαινολών είναι ενδεικτική του τι συμβαίνει κατά την ωρίμανση των φύλλων. Γνωρίζοντας ότι η ολεωρωπεΐνη είναι το κύριο φαινολικό συστατικό μπορεί αν γίνει συχέτιση του ποσοστού των ολικών φαινολών με αυτή (Mitsopoulos, Papageorgioug, Komaitis, & Hagidimitriou, 2016).

2.5 Περίοδος συλλογής και ποσοστό ολευρωπεΐνης

2.5.1 Αγριελιά



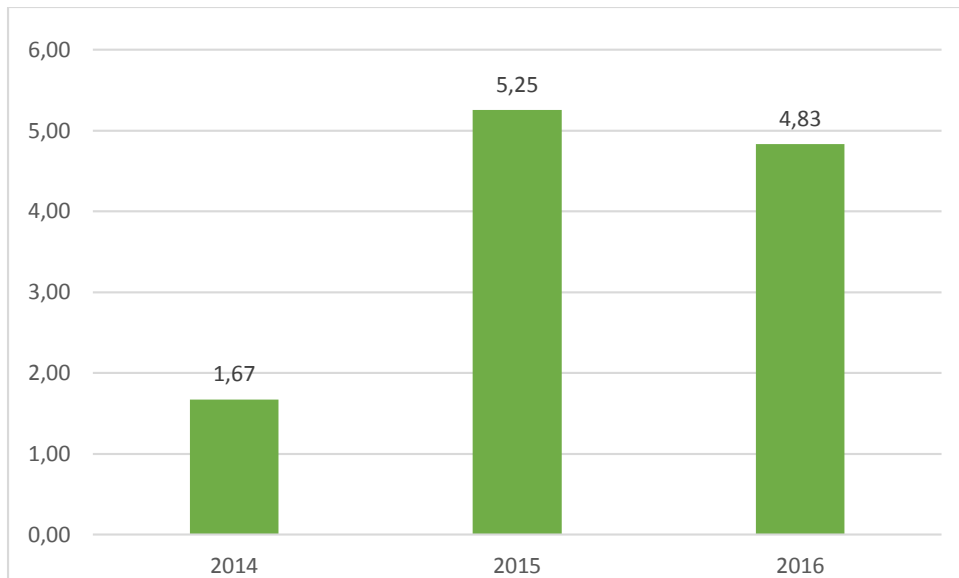
Σύγκριση ποσοστού ολευρωπεΐνης σε φύλλα συλλογής 2014/2016

Έχοντας 8 δείγματα αγριελιάς με περίοδο συλλογής το 2014 και 9 με περίοδο συλλογής το 2016 κρίθηκε σκόπιμο να γίνει μια σύγκριση του μέσου όρου του ποσοστού ολευρωπεΐνης.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα τα φύλλα που αφορούν στην περίοδο 2014 έχουν μέσο όρο 3,41% ενώ αυτά του 2016 4,49%. Μια διαφορά που δεν προκαλεί έκπληξη καθώς από τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα αλλά και από τις πληροφορίες της παρούσης ερευνητικής εργασίας έχει επισημανθεί η σημασία της άμεσης επεξεργασίας των φύλλων από την ημέρα συλλογής τους.

2.5.2 Ελιά

Η αντίστοιχη σύγκριση έγινε και στα δείγματα της ελιάς. Σε αυτά όμως μπορούμε να δούμε τη διακύμανση σε 3 διαδοχικά έτη καθώς υπήρχαν δείγματα του 2014, 2015 και 2016 όπου τα ποσοστά των μέσων όρων διαμορφώνονται ως εξής:



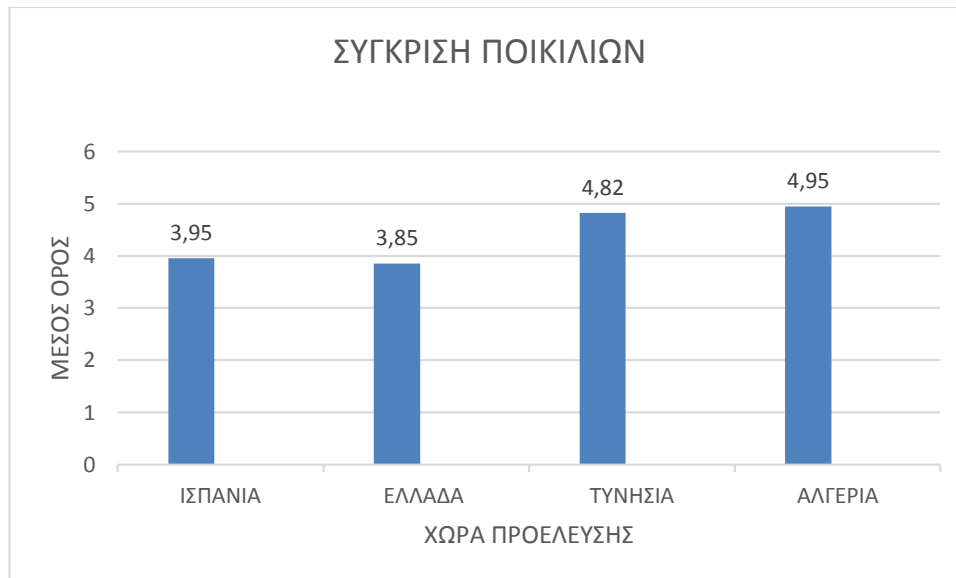
Σύγκριση ποσοστού ολευρωπεΐνης σε φύλλα συλλογής 2014/2015/2016

Εμφανές είναι και στην περίπτωση αυτή ότι το χαμηλότερο ποσοστό υπολογίζεται στα δείγματα συλλογής 2014. Γεγονός απόλυτα αναμενόμενο και λογικό. Ωστόσο η διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στα έτη 2015 και 2016 όχι μόνο δεν είναι τόσο μεγάλη αλλά η συλλογή του 2015 εμφανίζεται κατάτι πιο πλούσια σε σχέση με του 2016.

Είναι ένα γεγονός που προβληματίζει και ίσως υποδηλώνει ότι τα φύλλα του έτους 2015 προέρχονται από δένδρα ποικιλιών οι οποίες είναι πιο πλούσιες σε ολευρωπεΐνη σε σχέση με τις ποικιλίες των δένδρων που αφορούν συλλογή 2016 οπότε παρότι υπήρξε η παρέλευση μεγαλύτερο χρονικού διαστήματος η μείωση στα ποσοστά δεν ήταν ικανή να επηρεάσει την συνολική εικόνα.

2.6 Σύγκριση ποσοστού ολευρωπεΐνης ανάλογα τη χώρα προέλευσης

Έχοντας δείγματα από 4 διαφορετικές χώρες (Αλγερία, Ελλάδα, Ισπανία και Τυνησία) παρουσίαζε ενδιαφέρον μια σύγκριση των ποικιλιών και του ποσοστού της ολευρωπεΐνης σε αυτές. Ο διαχωρισμός έγινε με βάση την «καταγωγή» κάθε ποικιλίας ανεξαρτήτως της περιοχής καλλιέργειάς της.

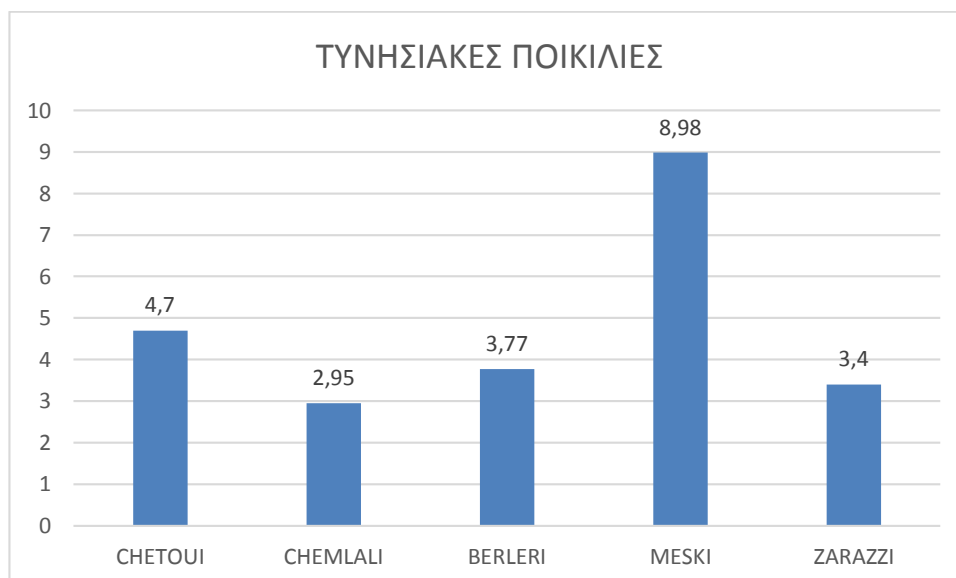


Σύγκριση ποσοστού ολευρωπεΐνης ανάλογα τη χώρα προέλευσης

Όπως φαίνεται η Αλγερία εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό της τάξεως του 4,95% με 2η την Τυνησία ενώ η Ελλάδα και η Ισπανία τα μικρότερα.

Αυτό που για άλλη μια φορά είναι εντυπωσιακό είναι πως τα δείγματα της Τυνησίας παρότι τα πιο παλιά εμφανίζουν ιδιαίτερως υψηλό ποσοστό με υψηλότερο αυτό της ποικιλίας meski (8.98%).

Από τις ισπανικές ποικιλίες η ricual φτάνει το 9.35% ενώ από τις ελληνικές στην πρώτη θέση είναι η καλαμών με 9.36%.



Σύγκριση τυνησιακών ποικιλιών ως προς το ποσοστό της περιεχόμενης ολευρωπεΐνης

Στο διάγραμμα αυτό γίνεται μια σύγκριση ανάμεσα σε 5 πολύ γνωστές ποικιλίες ελιάς από την Τυνησία . Ανάμεσά τους υπερτερεί η meski ακολουθεί η chetoui έπεται η berleri και τελευταίες οι chemlali και zarazzi.

Σύμφωνα με συγκριτική μελέτη που είχε γίνει και αφορούσε διάφορες τυνησιακές ποικιλίες πιο πλούσια σε ολευρωπεΐνη ήταν η chetoui ακολουθούμενη από τις chemlali και meski ,ακριβώς δηλαδή το αντίθετο από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας (Salah, Abdelmelek, & Abderraba, 2012).

2.7 Συμπεράσματα - προοπτικές

Μέχρι σήμερα αρκετές μελέτες που αφορούν στην ποσοτικοποίηση της ολευρωπεΐνης έχουν γίνει, ελάχιστες όμως περιέχουν το πλήθος δειγμάτων όπως η παρούσα και την διαφοροποίηση που εμφανίζουν αυτά. Επιπλέον οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κατά βάση HPLC και HRGC (high resolution gas chromatography) οι οποίες είναι αποτελεσματικές ωστόσο είναι χρονοβόρες και ασύμφωρες.

Καινοτομία της παρούσας μελέτης αποτελεί και η σύγκριση ποσοστού ολευρωπεΐνης σε φύλλα διαφορετικών ποικιλιών ελιάς και αγριελιάς, οι οποίες όμως προέρχονται από τον ίδιο ελαιώνα και δεν παρουσιάζουν καμία άλλη διαφοροποίηση. Η σύγκριση, επομένως, στην περίπτωση αυτή περιλαμβάνει μόνο 2 μεταβλητές : την ποικιλία και το ποσοστό. Με τον τρόπο αυτό εξάγεται ένα πιο σαφές και αξιόπιστο συμπέρασμα ποιες ποικιλίες υπερέχουν και ποιες εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά.

Επιπροσθέτως, στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια ταχύτατη και αποτελεσματική μεθόδος ανάλυσης κατά την οποία η ολευρωπεΐνη διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά στα 3,5 πρώτα λεπτά με χρήση τεχνικής UPLC (συνολική διάκριση μεθόδου 7 λεπτα). Σε αντίστοιχη μελέτη που αφορούσε το χημικό προφίλ διαφορετικών τμημάτων του ελαιόδεντρου είχε επίσης χρησιμοποιηθεί η τεχνική UHPLC όμως η διάκριση της μέτρησης ήταν πάνω από 10 λεπτά (Michel et al., 2015).

Βάσει διαφόρων πειραμάτων που έχουν γίνει κατά το παρελθόν φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη διακύμανση στο ποσοστό της ολευρωπεΐνης με 2 παράγοντες να παίζουν καταλυτικό ρόλο: την ποικιλία και την άμεση επεξεργασία των φύλλων.

Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι σε φύλλα ποικιλίας chemlali έχει υπολογιστεί ποσοστό 4,32% όταν αναλύθηκαν άμεσα (Jemai, Bouaziz, Fki, El Feki, & Sayadi, 2008) ενώ το ποσοστό που ανιχνεύθηκε από το εργαστήριό μας ήταν 2,95% καθώς τα φύλλα αυτά αναλύθηκαν με την παρέλευση 1 χρόνου από τη συλλογή τους.

Είναι εμφανές ότι η διενέργεια μια ερευνητικής προσπάθειας που θα αφορά τη σύγκριση ποσοστών σε φύλλα τα οποία προέρχονται από το ίδιο κτήμα (άρα ίδιες ποικιλίες και κλιματολογικές συνθήκες) με μόνη διαφορά το έτος και το μήνα συλλογής θα αποτελέσει ισχυρή ένδειξη του κατά πόσο επηρεάζεται το ποσοστό ανάλογα με την εγγύτητα της ανάλυσης/συλλογής αλλά και μέσα στο ίδιο έτος.

Ένα ακόμη σημείο πρωτοτυπίας της παρούσας εργασίας αφορά στην ανάλυση δειγμάτων αγριελιάς. Ελάχιστες εργασίες αφορούν την αγριελιά και πολύ λίγες έχουν επικεντρωθεί στο ποσοστό της ολευρωπεΐνης στα φύλλα αυτής. Έχοντας αναλύσει δείγματα αγριελιάς από διάφορες περιοχές της χώρας μας παρατηρείται μια διακύμανση του ποσοστού ανάλογα του μέρους και του έτους συλλογής. Σκόπιμο είναι ωστόσο να γίνει μια περαιτέρω ανάλυση επικεντρωμένη σε αυτά ώστε να ληφθεί μια πιο πλήρης και ακριβής εικόνα καθώς η Ελλάδα είναι μια χώρα με πολλές αγριελιές οι οποίες κατά κύριο λόγο είναι ανεκμετάλλευτες.

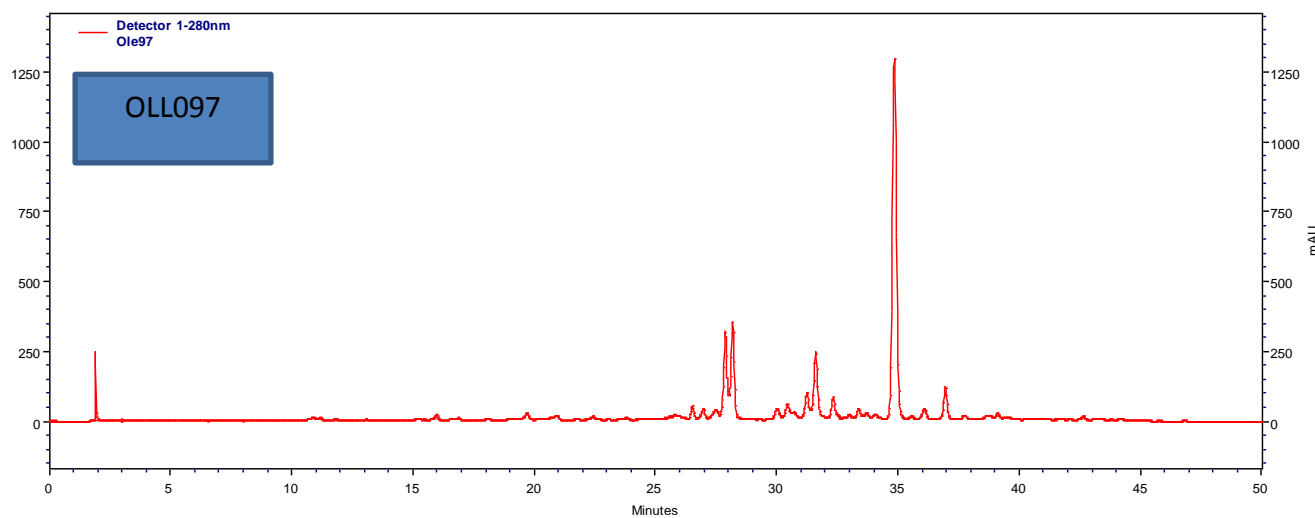
Από τα αποτελέσματα που λάβαμε είναι προφανές πως για την απομόνωση της ολευρωπεΐνης και την παραλαβή της ουσίας τα δείγματα πρέπει να αφορούν μόνο σε φύλλα. Η ύπαρξη και κλαδιών μέσα σε αυτά δεν πρόσφέρει τίποτα και μάλλον μειώνει δραματικά το ποσοστό της και δυσχεραίνει την απομόνωσή της.

Επιπλέον επειδή υπάχρουν σημαντικές διακυμάνσεις στο ποσοστό της, με κάποιες ποικιλίες να εμφανίζονται εμφανώς πιο πλούσιες, πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω αν κάτι τέτοιο εμφανίζει μια επαναληψιμότητα ή ήταν τυχαίο γεγονός. Επιπροσθέτως άλλοι παράγοντες όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, οι συνθήκες καλλιέργειας και η περίοδος συλλογής και κατεργασίας των φύλλων πρέπει να ερευνηθούν ενδελεχώς στο κατά πόσο επηρεάζουν την περιεχόμενη ολευρωπεΐνη.

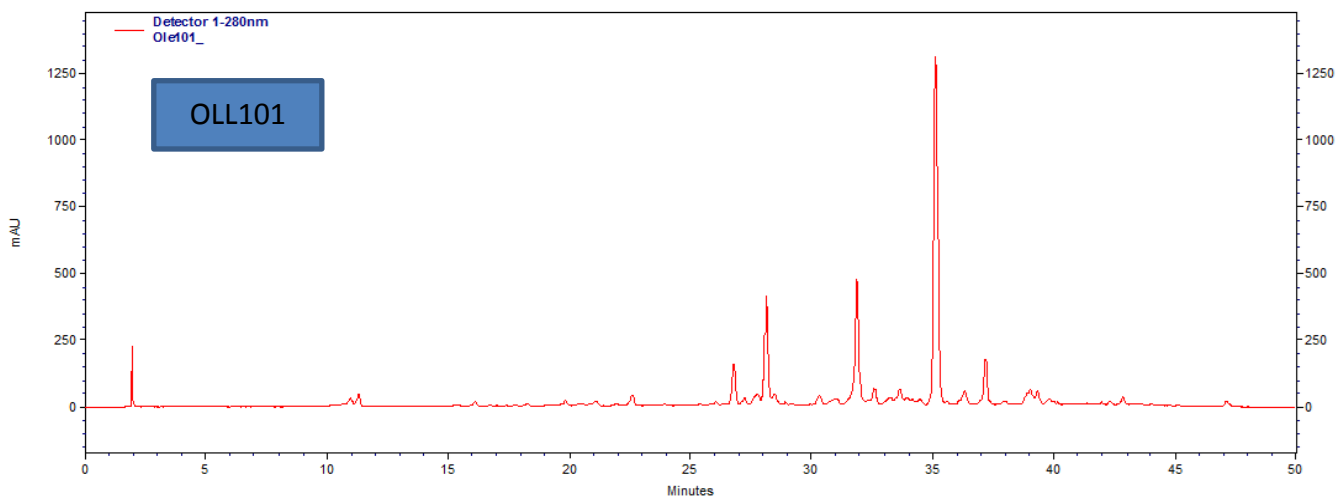
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρατίθενται τα πιο χαρακτηριστικά χρωματογράφημα:

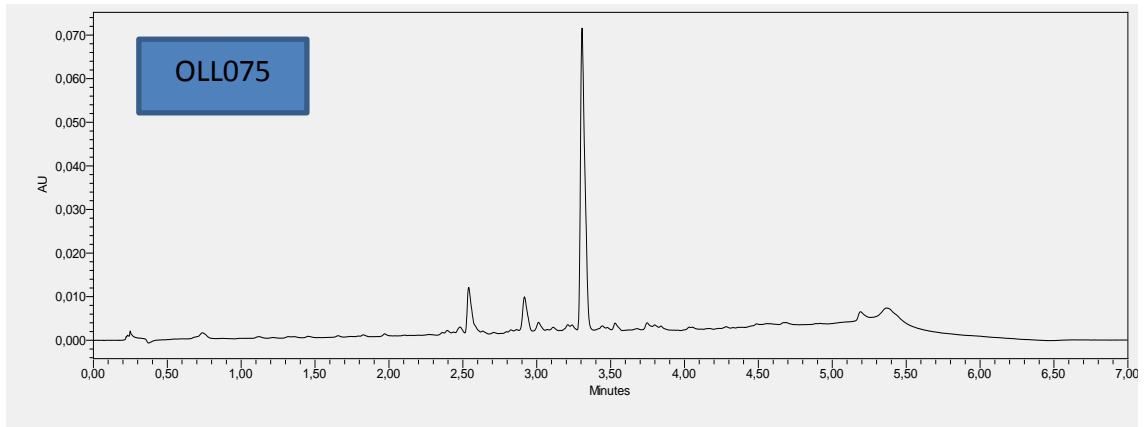
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΑ ΥΨΗΛΟΤΕΡΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΟΛΕΥΡΩΠΕΙΝΗΣ



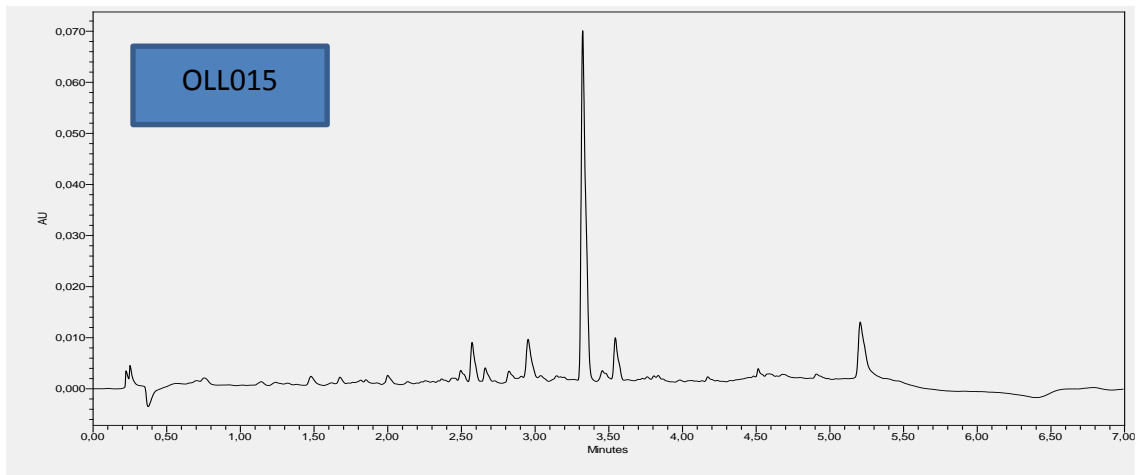
Εικόνα 1 χρωματογράφημα OLL097



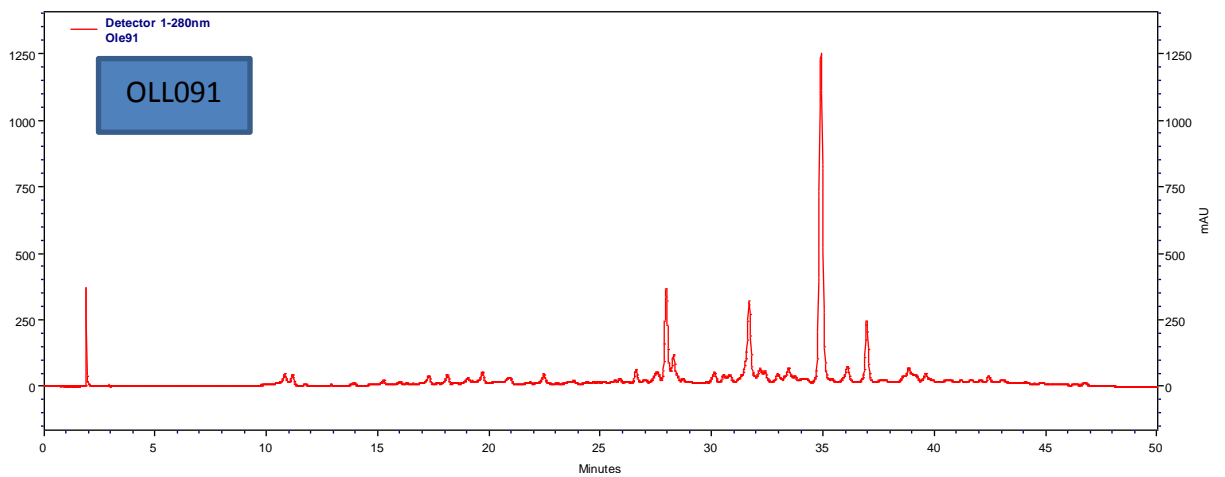
Εικόνα 2 χρωματογράφημα OLL101



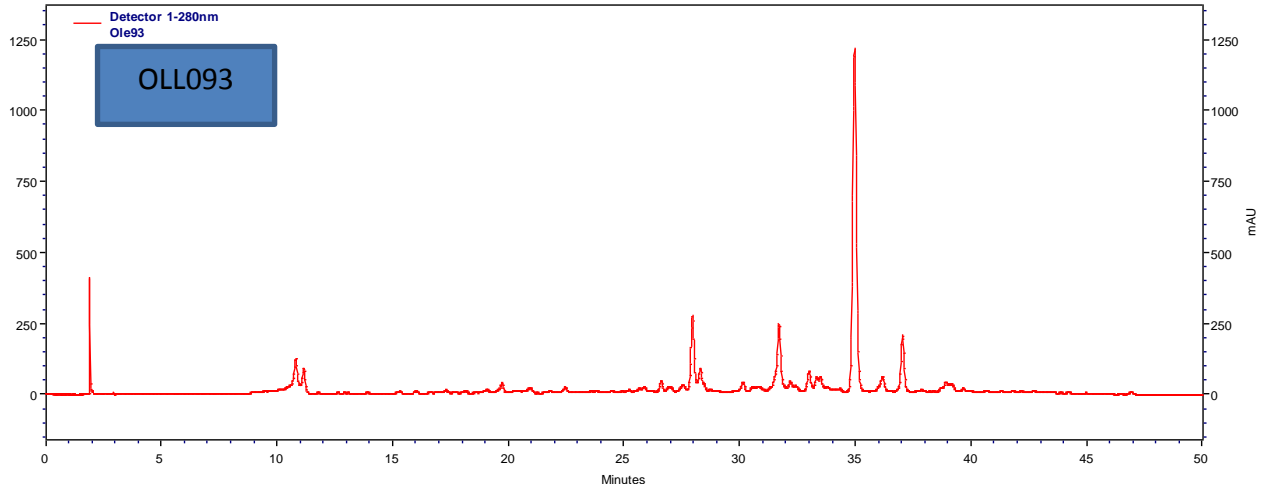
Εικόνα 3 χρωματογράφημα OLL075



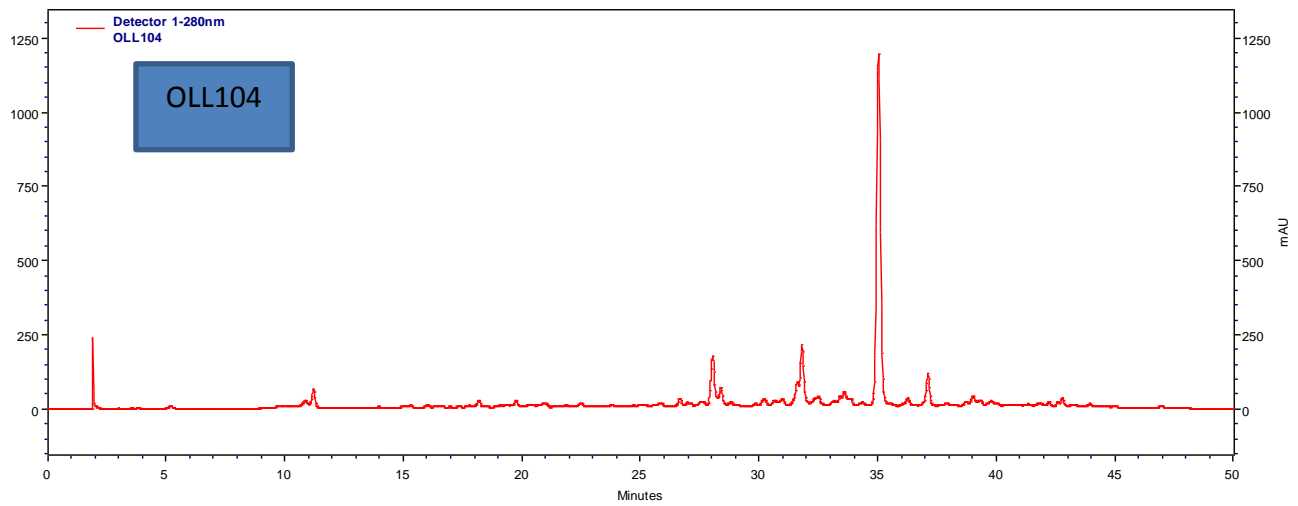
Εικόνα 4 χρωματογράφημα OLL015



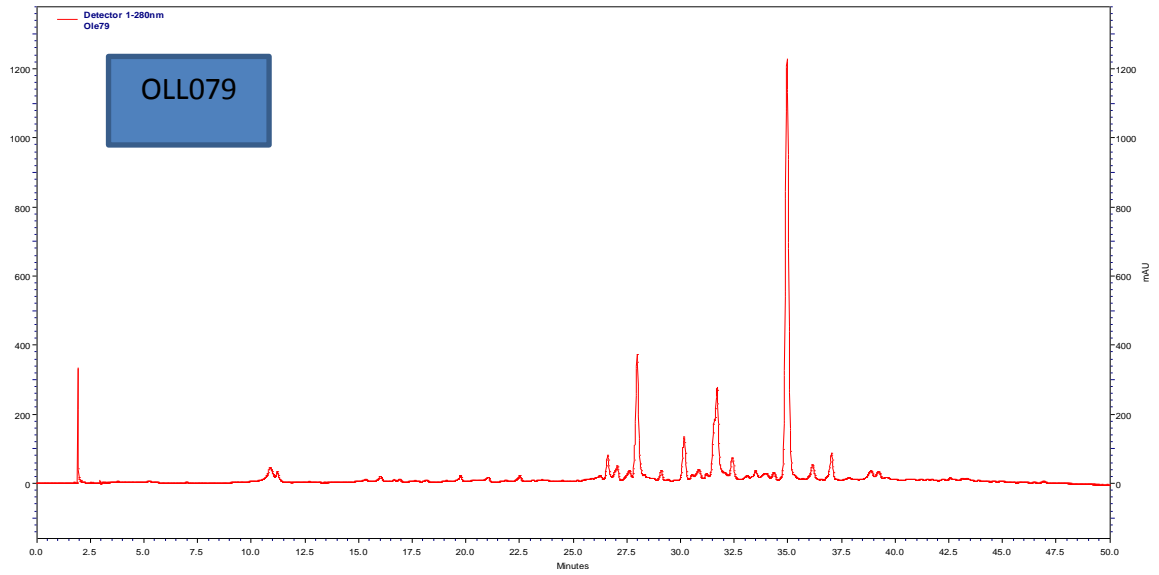
Εικόνα 5 χρωματογράφημα OLL091



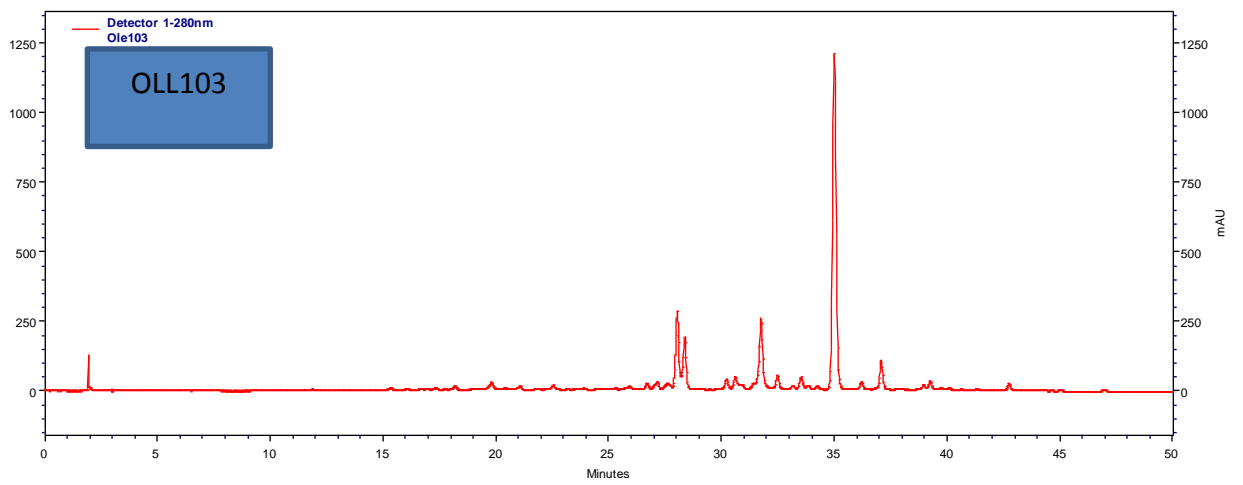
Εικόνα 6 χρωματογράφημα OLL093



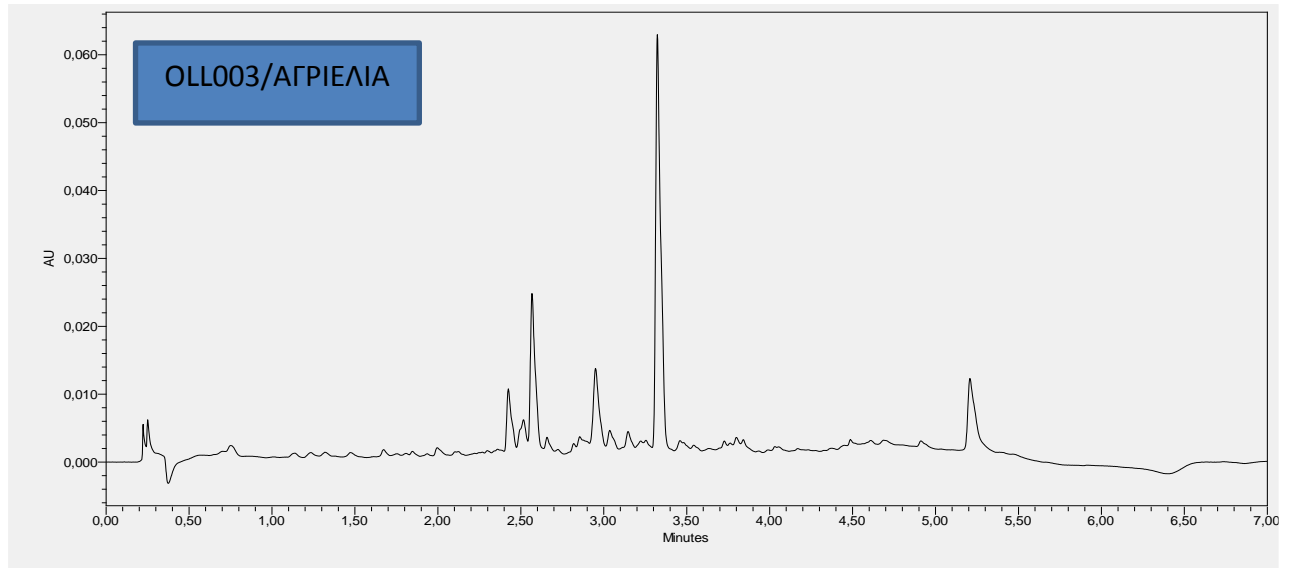
Εικόνα 7 χρωματογράφημα OLL104



Εικόνα 8 χρωματογράφημα OLL079

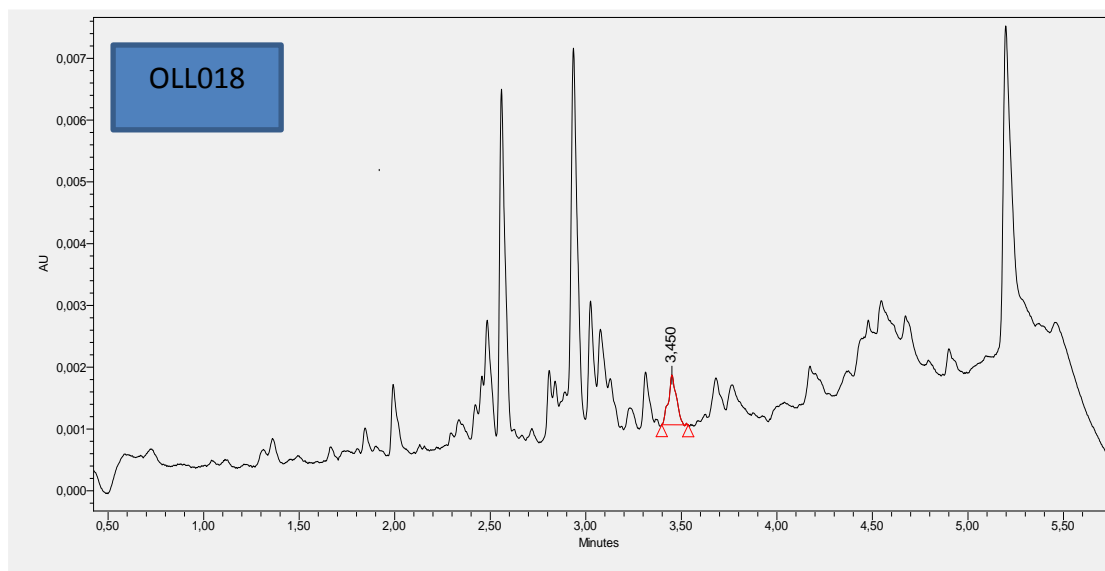


Εικόνα 9 χρωματογράφημα OLL103

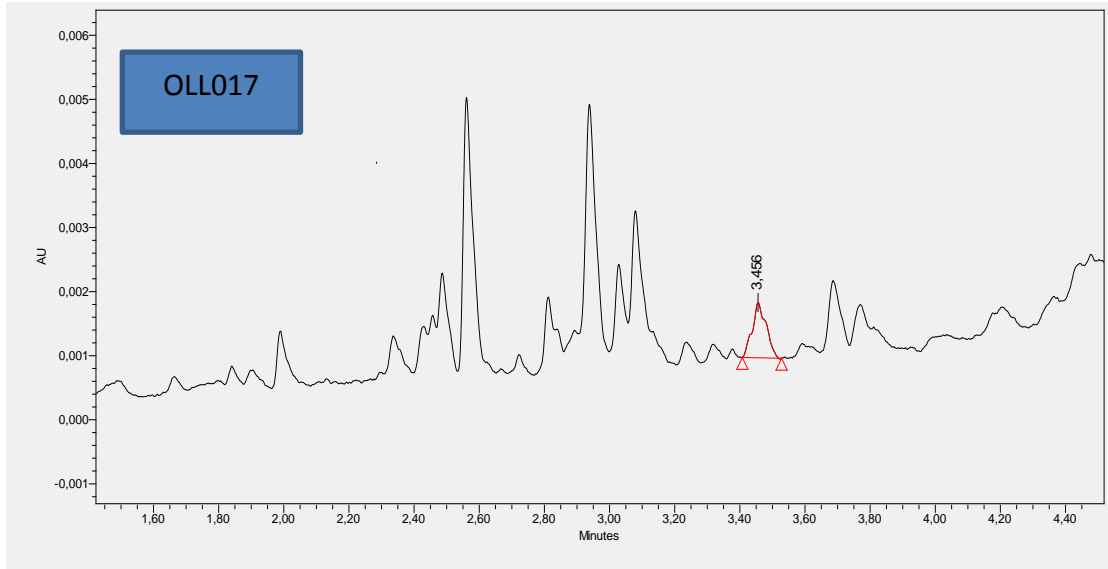


Εικόνα 10 χρωματογράφημα OLL003

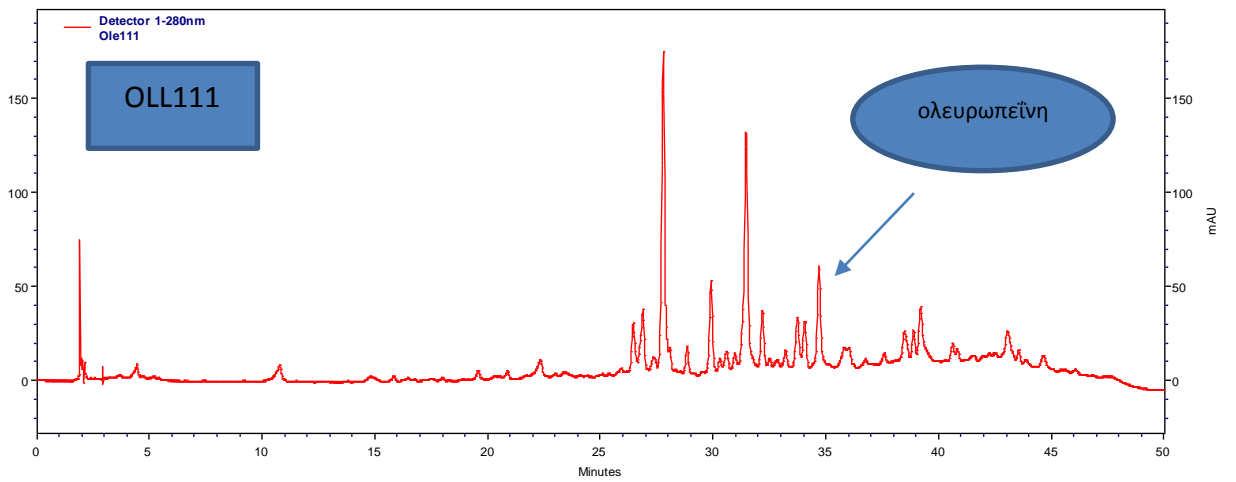
ΤΑ ΧΑΜΗΛΟΤΕΡΑ ΠΟΣΟΣΤΑ



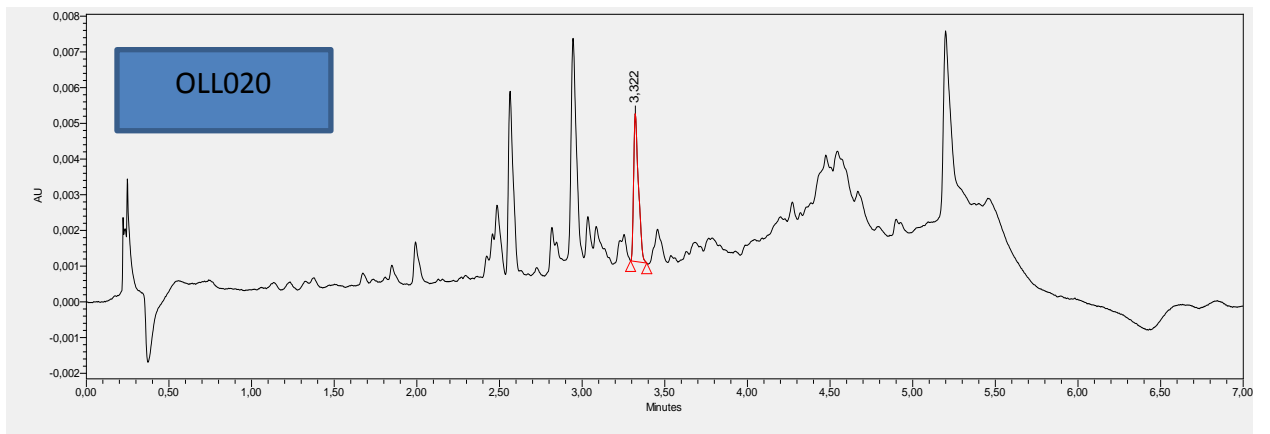
Εικόνα 11 χρωματογράφημα OLL018



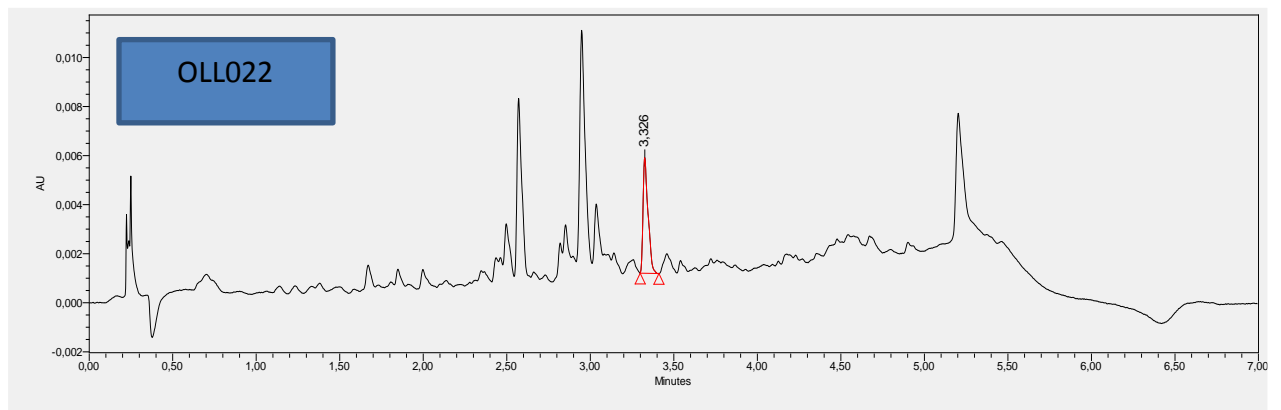
Εικόνα 12 χρωματογράφημα OLL017



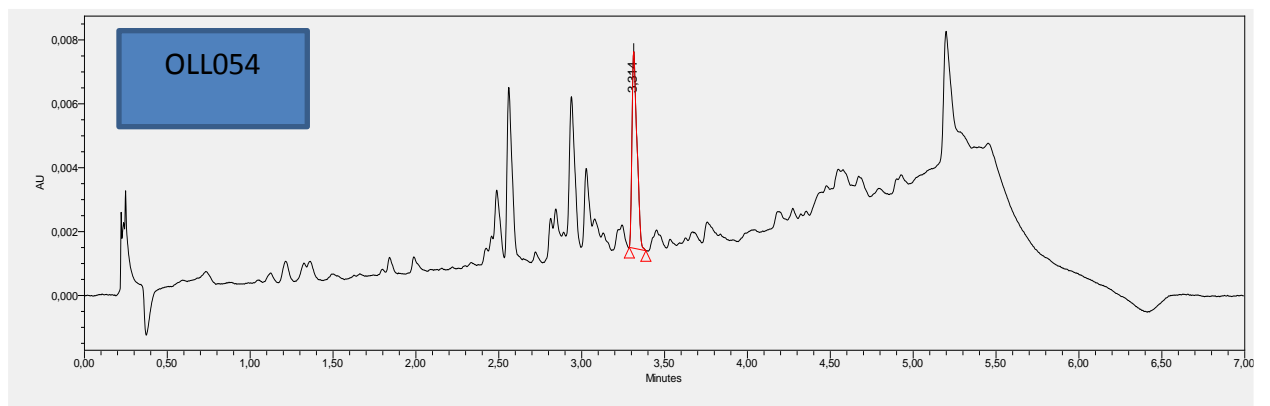
Εικόνα 13 χρωματογράφημα OLL11



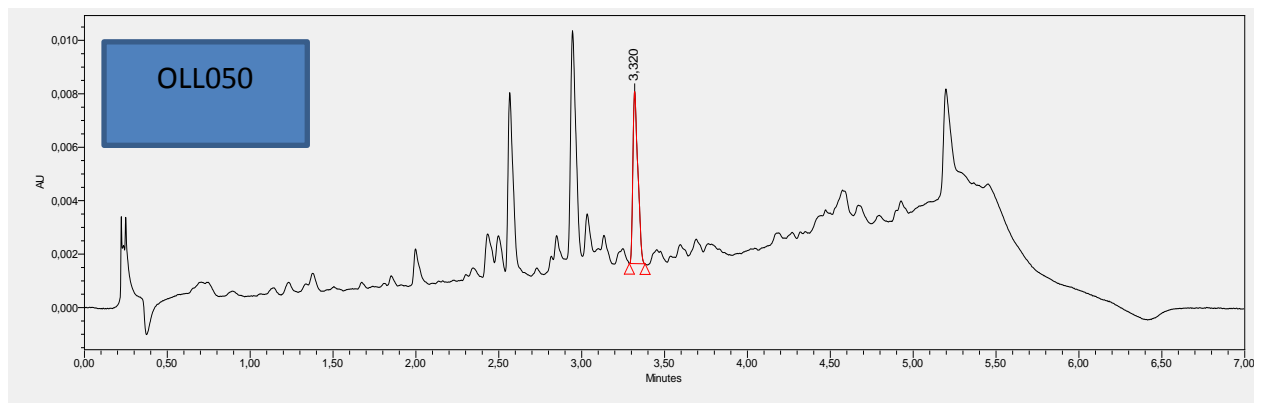
Εικόνα 14 χρωματογράφημα OLL020



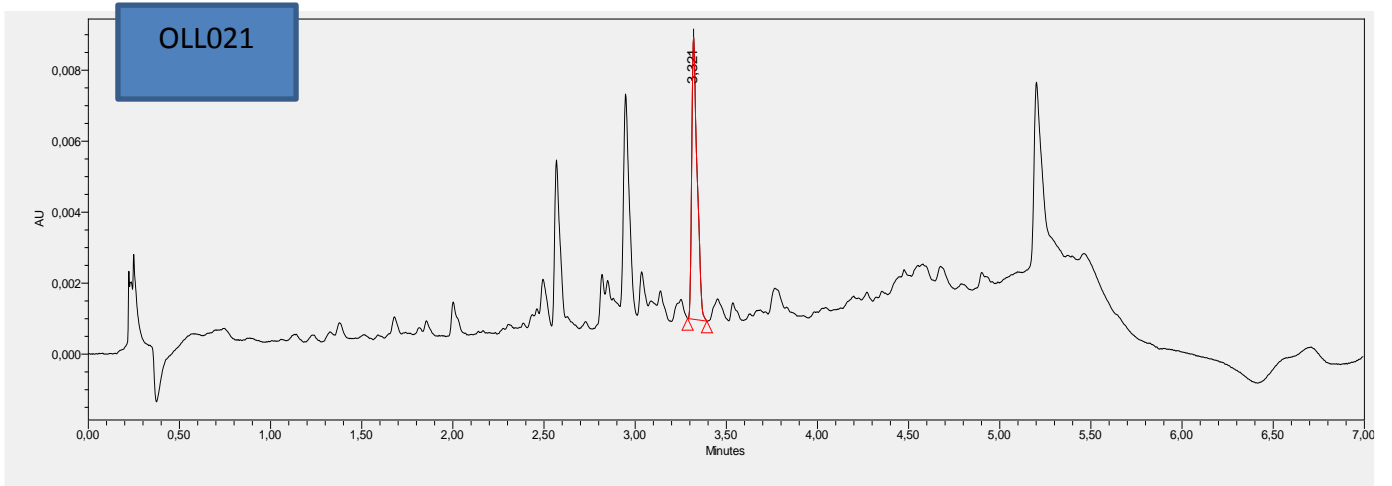
Εικόνα 15 χρωματογράφημα OLL022



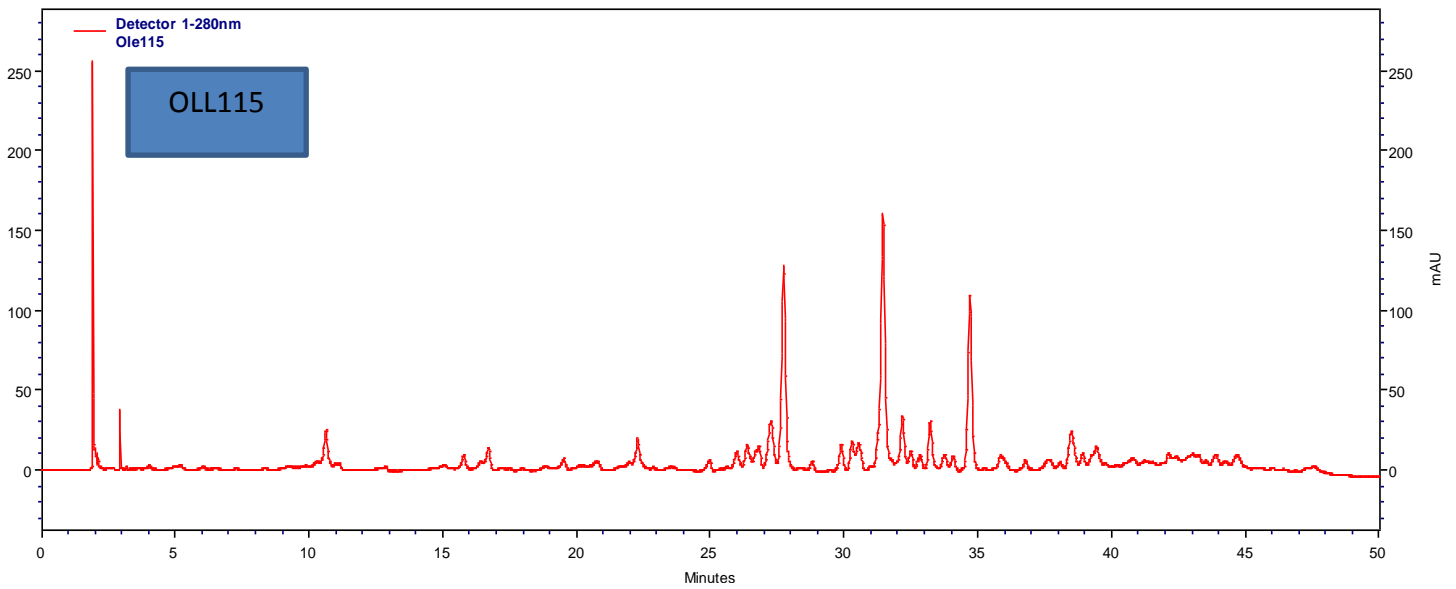
Εικόνα 16 χρωματογράφημα OLL054



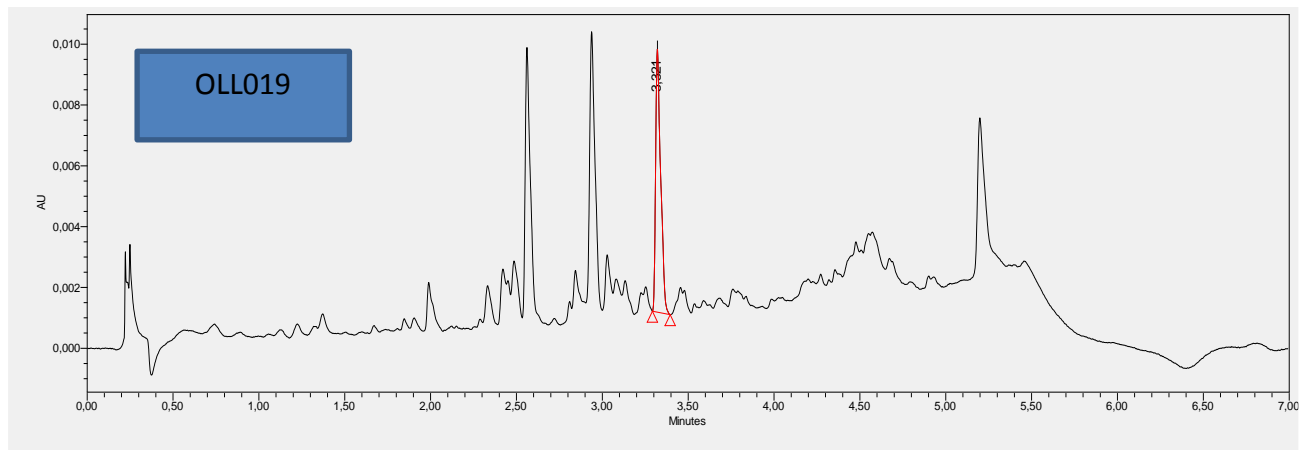
Εικόνα 17 χρωματογράφημα OLL050



Εικόνα 18 χρωματογράφημα OLL021



Εικόνα 19 χρωματογράφημα OLL115



Εικόνα 20 χρωματογράφημα OLL019

Βιβλιογραφία

<http://www.ema.europa.eu>

(“11526 - Αθήνα,” n.d.)11526 - Αθήνα. (n.d.).

Γ.Αντώνιος, Π. (n.d.). *Μελέτη πάνω στα χημικά συστατικά των φύλλων και των κλαδιών του φυτού Olea Europaea,*

Κ.Α, Π. (2000). *Ειδική Δενδροκομία, Ελαιοκομία.* Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Abaza, L., Talorete, T. P. N., Yamada, P., Kurita, Y., Zarrouk, M., & Isoda, H. (2007). Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(5), 1306–1312. <https://doi.org/10.1271/bbb.60716>

Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., & Siragakis, G. (2007). Olive oil and pomace olive oil processing. *Grasas Y Aceites*, 57(1), 56–67. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.22>

Belaj, A., León, L., Satovic, Z., & De la Rosa, R. (2011). Variability of wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agro-morphological traits and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.025>

Ben Salem, M., Affes, H., Ksouda, K., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., & Hammami, S. (2015). Pharmacological Activities of *Olea europaea* Leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 3128–3136. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12341>

Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., & 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(8), 1679–1719. <https://doi.org/10.3390/12081679>

- Bilgin, M., & Şahin, S. (2013). Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *44*(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.08.008>
- Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P. G., & Ferguson, L. R. (2016). Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/nu8080513>
- Bouarroudj, K., Tamendjari, A., & Larbat, R. (2016). Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*) oil. *Industrial Crops and Products*, *83*, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.081>
- Breton, C., Terral, J. F., Pinatel, C., Médail, F., Bonhomme, F., & Bervillé, A. (2009). The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus - Biologies*, *332*(12), 1059–1064. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2009.08.001>
- Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., & Nucci, R. (2002). *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(17), 4934–4940. <https://doi.org/10.1021/jf025540p>
- Cavalheiro, C. V., Picoloto, R. S., Cichoski, A. J., Wagner, R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., ... Barin, J. S. (2015). Olive leaves offer more than phenolic compounds - Fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil. *Industrial Crops and Products*, *71*, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.054>
- Chiappetta, A., & Muzzalupo, I. (2012). Botanical Description. *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*, 23–28. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/51836>
- Damtoft, S., Franzyk, H., & Jensen, S. R. (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in oleaceae. *Phytochemistry*, *34*(5), 1291–1299. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80018-V](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80018-V)
- de Bock, M., Derraik, J. G. B., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Morgan, P. E., Hodgkinson, S. C., ... Cutfield, W. S. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLoS ONE*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057622>
- De La Puerta, R., Domínguez, M. E. M., Ruíz-Gutiérrez, V., Flavill, J. A., & Hoult, J. R. S. (2001). Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sciences*, *69*(10), 1213–1222. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01218-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01218-8)
- Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V. M., Ranieri, M., Pasqualone, A., ... Caponio, F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *Journal of Functional Foods*, *31*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.039>

- El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, *67*(11), 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>
- Esmaeili-Mahani, S., Rezaeezadeh-Roukerd, M., Esmailpour, K., Abbasnejad, M., Rasouljan, B., Sheibani, V., ... Hajjalizadeh, Z. (2010). Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *132*(1), 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.013>
- Hassen, I., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation - A mini-review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 926–940. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.001>
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, *176*(2–3), 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.08.014>
- Mohagheghi, F., Bigdeli, M. R., Rasouljan, B., Hashemi, P., & Pour, M. R. (2011). The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine*, *18*(2–3), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.06.007>
- Nunes, M. A., Pimentel, F. B., Costa, A. S. G., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *35*, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.016>
- Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2016). A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, *243*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2726-9>
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... Pereira, J. A. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, *12*(5), 1153–1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science and Technology*, *42*(2), 150–172. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.009>
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 434–440. <https://doi.org/10.1021/jf051647b>
- Singh, I., Mok, M., Christensen, A. M., Turner, A. H., & Hawley, J. A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition*,

Metabolism and Cardiovascular Diseases, 18(2), 127–132.

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.09.001>

- Somova, L. I., Shode, F. O., Ramnanan, P., & Nadar, A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2–3), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00332-X)
- Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Mocchetti, T., & Verbruggen, M. (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.016>
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V. T., De Souza, D., & Morelo Dal Bosco, S. (2015). Polyphenols Benefits of Olive Leaf (*Olea Europaea* L) To Human Health. *Nutricion Hospitalaria*, 31(n03), 1427–1433. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400>
- Zori??, N., Kopjar, N., Kralji??, K., Or??oli??, N., Tomi??, S., & Kosalec, I. (2016). Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* - The in vitro viability study. *Acta Pharmaceutica*, 66(3), 411–421. <https://doi.org/10.1515/acph-2016-0033>
- Afaneh, I., Yateem, H., & Al-rimawi, F. (2015). Effect of Olive Leaves Drying on the Content of OLEuropein. *American Journal of Analytical Chemistry*, 6(February), 246–252. <https://doi.org/10.4236/ajac.2015.63023>
- Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Perraud Gaime, I., & Hamdi, M. (2012). Rapid quantitative determination of OLEuropein in olive leaves (*OLEa europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.024>
- Ghaleb Tayoub, Huda Sulaiman, Abdul Hadi Hassan, M. A. (2012). Determination of OLEuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(3), 428–433. Retrieved from <http://www.openaccessscience.com/index.php/journals/ijmap/181>
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of OLEuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2–3), 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.08.014>
- Michel, T., Khlif, I., Kanakis, P., Termentzi, A., Allouche, N., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L. (2015). UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different OLEa europaea organs of

- Koroneiki and Chetoui varieties. *Phytochemistry Letters*, 11, 424–439.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.12.020>
- Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M., & Hagidimitriou, M. (2016). Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Leaves and Drupes of Ten Olive Varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 155–161.
<https://doi.org/10.15835/nbha.44.1.10381>
- Ortega-Garcia, F., Blanco, S., Peinado, M. A., & Peragon, J. (2008). Polyphenol oxidase and its relationship with OLEuropein concentration in fruits and leaves of olive (*OLEa europaea*) cv. “Picual” trees during fruit ripening. *Tree Physiol*, 28(1), 45–54. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.1.45>
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Factors affecting the contents of iridoid OLEuropein in olive leaves (*OLEa europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 434–440.
<https://doi.org/10.1021/jf051647b>
- Salah, M. Ben, Abdelmelek, H., & Abderraba, M. (2012). Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal Chemistry*, 2(5), 107–111.
<https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000124>
- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V. T., De Souza, D., & Morelo Dal Bosco, S. (2015). Polyphenols Benefits of Olive Leaf (*OLEa Europaea* L) To Human Health. *Nutricion Hospitalaria*, 31(n03), 1427–1433.
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400>