



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Σχολή Επιστημών Υγείας**

**Τμήμα Φαρμακευτικής**

**Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων**



***Διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την περιεκτικότητα του ελαιολάδου στις βιοδραστικές φαινόλες του ευρωπαϊκού ισχυρισμού υγείας και μέθοδοι απομόνωσής τους σε ημι-βιομηχανική κλίμακα.***

Διδακτορική Διατριβή

**Διαμαντάκος Παναγιώτης**

Χημικός Μηχανικός

Επιβλέπων: Μαγιάτης Προκόπιος

Αθήνα

2020



#### Τριμελής επιτροπή

- **Προκόπιος Μαγιάτης** - Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα (Επιβλέπων)
- **Ιωάννα Χήνου** – Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα
- **Αθανάσιος Γκιμήσης** – Καθηγητής, τμήμα Χημείας, Αθήνα

#### Επταμελής επιτροπή

- **Προκόπιος Μαγιάτης** - Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα (Επιβλέπων)
- **Ιωάννα Χήνου** – Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα
- **Αθανάσιος Γκιμήσης** – Καθηγητής, τμήμα Χημείας, Αθήνα
- **Ελένη Σκαλτσά** - Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα
- **Νεκτάριος Αλγιάννης** - Αναπληρωτής Καθηγητής, , Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα
- **Νικόλαος Θωμαΐδης** – Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Αθήνα
- **Νικόλαος Νενάδης** - Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Θεσσαλονίκη

## Περίληψη

Το δέντρο της ελιάς αποτελεί μια από τις αρχαιότερες καλλιέργειες στον ελλαδικό χώρο και την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Στις μέρες μας, η καλλιέργεια της ελιάς πραγματοποιείται σε 5 Ηπείρους, σε κλιματικές συνθήκες που προσομοιάζουν με αυτές της Μεσογείου. Το ελαιόλαδο, αποτελεί το προϊόν επεξεργασίας του ελαιόκαρπου αποκλειστικά με μηχανικά μέσα, και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βρώσιμα έλαια.

Η μεσογειακή διατροφή, της οποίας βασικό συστατικό είναι το ελαιόλαδο, δομήθηκε από τις διατροφικές συνήθειες των λαών που εγκαταστάθηκαν στην περιοχή της Μεσογείου από τα αρχαία χρόνια. Στην διάρκεια των αιώνων, το μοντέλο της μεσογειακής διατροφής, εξελίχθηκε. Ενσωμάτωσε τις ιδιαίτερες διατροφικές συνήθειες και άλλων λαών, που με τον έναν ή τον άλλο τρόπο αλληλεπίδρασαν με τους λαούς της Μεσογείου, διατηρώντας ωστόσο το ελαιόλαδο ως βασικό συστατικό διατροφής.

Από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα, διαπιστώθηκαν τα ιδιαίτερα υγειοπροστατευτικά οφέλη της Μεσογειακής διατροφής, και γρήγορα, κάποια από αυτά αποδόθηκαν στην παρουσία του ελαιολάδου ως βασικού συστατικού. Αν και η λιπιδική σύσταση του ελαιολάδου αρχικά θεωρήθηκε υπεύθυνη για πολλά από αυτά τα οφέλη, τα τελευταία χρόνια, σειρά μελετών αποδεικνύει έτι περαιτέρω ότι το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, είναι αυτό που συμβάλει καθοριστικά στις υγειοπροστατευτικές ιδιότητες του προϊόντος.

Οι σημαντικές ιδιότητες του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, έχουν τροφοδοτήσει έναν μεγάλο αριθμό μελετών σχετικά με τους παράγοντες που τις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, και φυσικά με τις μεθόδους εκχύλισης τους από το ελαιόλαδο .

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ασχοληθήκαμε με το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου σε ένα ιδιαίτερα ευρύ φάσμα, που περιλαμβάνει το δέντρο της ελιάς ως καλλιέργεια, την παραγωγή του ελαιολάδου, τα κριτήρια ποιότητας του, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του και τέλος την μορφοποίησή τους σε σκευάσματα.

Στην πρώτη ενότητα του παρόντος πονήματος, μελετήσαμε την επίδραση του βαθμού ωρίμανσης του καρπού, της ποικιλίας, της θερμοκρασίας και του χρόνου μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Με την βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR, είχαμε την δυνατότητα να μελετήσουμε πως επηρεάζεται κάθε φαινολικό συστατικό ξεχωριστά, και τελικά να οδηγηθούμε σε σημαντικά συμπεράσματα που αφορούν τον μηχανισμό βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών.

Λόγω της υψηλής διατροφικής και εμπορικής αξίας του ελαιολάδου μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της συγκέντρωσης κάποιων φαινολικών συστατικών, σε ορισμένους δείκτες ποιότητας του ελαιολάδου, όπως είναι οι δείκτες K, οι οποίοι αποτελούν και επίσημα εμπορικά κριτήρια ποιότητας για το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Από την μελέτη μας, προέκυψε ότι είναι πιθανόν, η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών συστατικών να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα κατά την φασματοσκοπική ανάλυση του ελαιολάδου με υπεριώδη ακτινοβολία και για τον λόγο αυτό, παρουσιάζουμε τροποποιημένες μεθόδους φασματοσκοπικής ανάλυσης του ελαιολάδου, για την αποφυγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων.

Στο τρίτο μέρος της εργασίας, παρουσιάζονται στατιστικά στοιχεία από την ανάλυση περισσότερων από 6614 δειγμάτων ελαιολάδου, που αναλύθηκαν στο εργαστήριο μας τα τελευταία χρόνια. Πρόκειται για την μεγαλύτερη παγκοσμίως βάση δεδομένων που αφορά το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου. Από την στατιστική ανάλυση, προέκυψαν σημαντικά στοιχεία για την χαρτογράφηση του ελαιολάδου στην Ελλάδα αλλά και το εξωτερικό.

Τέλος, στο τελευταίο μέρος της παρούσας διατριβής, παρουσιάζονται νέες, φιλικές προς το περιβάλλον μέθοδοι εκλεκτικής εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου σε μικρή και μεγάλη κλίμακα. Στην ενότητα αυτή, γίνεται μελέτη της συμπεριφοράς συστατικών του ελαιολάδου όπως η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη, κατά την αλληλεπίδρασή τους με το νερό, ενώ γίνεται και ολοκληρωμένη παρουσίαση των ενυδατωμένων μορφών τους. Η μελέτη αυτή, οδήγησε στην παρασκευή σκευασμάτων που περιέχουν τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου με πράσινες τεχνικές.

## Abstract

Olive cultivation is considered among the most ancient cultivars in Greece and in the Mediterranean region. Nowadays, olive cultivation is spread in 5 different continents where the climate has similarities with the Mediterranean climatic conditions. Olive oil obtained directly from olives and solely by mechanical means, and is considered among the most important edible oils.

Mediterranean diet, which includes olive oil as major ingredient, has been structured by the eating habits of peoples, who have settled in the Mediterranean region since ancient times. Over the centuries, the Mediterranean diet has evolved, and incorporated the special dietary habits of other peoples, who interacted with the peoples of the Mediterranean region, retaining olive oil though, as a key ingredient. From the middle of the last century, scientists have studied and identified the special health protective properties of the Mediterranean diet, and soon, some of these properties have been attributed to the presence of olive oil as a key ingredient. Although the lipid composition of olive oil was initially considered to be responsible for many of properties, in recent years, a number of studies have shown that the phenolic fraction of olive oil contributes significantly to the health-protective properties of olive oil.

The important health-protective properties of the phenolic fraction of olive oil, have triggered a large number of studies, with main subject the factors that affect their concentration in olive oil, the maximum concentrations of these substances in olive oil, and the extraction of the phenolic components from olive oil. During this thesis, we have dealt with the phenolic fraction of olive oil in a very wide range, which includes the olive tree as a crop, the production of olive oil, the quality criteria of olive oil, and the extraction of phenolic components from olive oil and its formulation in pharmaceutical formulas.

In the first section of this thesis, we studied the effect of the ripening degree of the olive fruit, the variety, the malaxation temperature and malaxation time on the phenolic concentration. Via NMR spectroscopy, we were able to study how each phenolic component is affected individually, and highlight some important conclusions about the formation mechanism of the phenolic components.

Due to the high nutritional and commercial value of olive oil, we studied the possible effect of the concentration of some phenolic components on certain quality criteria of olive oil, such as K Index, which are official commercial quality criteria for extra virgin olive oil. Our study showed that it is possible that the high concentration of phenolic components leads to erroneous conclusions during the spectroscopic analysis of olive oil and for this reason, we present modified methods for spectroscopic analysis of olive oils, to avoid errors.

In the third part of the thesis, a statistical analysis is presented which is related with the analysis of more than 6000 samples of olive oil, which were analyzed in our laboratory in recent years. This is the largest database concerning the phenolic fraction of olive oil. From the statistical analysis, important data emerge for the mapping of olive oil in Greece and abroad.

Finally, in the last part of this thesis, new, green extraction methods are presented in small and large scale. In this section, the behavior of olive oil phenolic ingredients such as oleocanthal and oleacein is studied, after interacting with water interaction with water, while a complete presentation of hydrated forms of oleocanthal and oleacein is made. This study led to the preparation of formulas containing the phenolic components of olive oil with green techniques.

## Πρόλογος.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή, εκπονήθηκε στο τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, το διάστημα 2016-2020. Στην πραγματικότητα, είναι αποτέλεσμα μιας επίπονης προσπάθειας που ξεκίνησε λίγα χρόνια νωρίτερα, όταν παρακολούθησα το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών στον ίδιο τομέα, και για πρώτη φορά μου δόθηκε η ευκαιρία να έρθω σε επαφή με το συγκεκριμένο αντικείμενο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής Ελένη Σκαλτσά, Νεκτάριο Αληγιάννη, Νικόλαο Θωμαΐδη και Νικόλαο Νενάδη που δέχτηκαν να κρίνουν και να αξιολογήσουν την διατριβή αυτή και ιδιαιτέρως τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Ιωάννα Χήνου και Αθανάσιο Γκιμήση, οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να συνεισφέρουν με κάθε τρόπο στην διεκπεραίωση του παρόντος πονήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Προκόπη Μαγιάτη, για όλη αυτή την διαδρομή. Η αποδοχή της συνεργασίας μας πριν από 7 χρόνια, η ανάθεση του θέματος και στην συνέχεια η διαρκής επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και η ψυχολογική στήριξη που μου παρείχε, αποτελούσαν και αποτελούν τα ισχυρότερα εφόδια που απέκτησα στην διάρκεια όλων αυτών των χρόνων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω, στην ΕΔΙΠ Δρ. Ελένη Μέλλιου, η οποία ήταν δίπλα μου από την πρώτη μέρα αυτής της προσπάθειας. Ο καταλυτικός της ρόλος στην εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου, στην επιστημονική αρτιότητα των αποτελεσμάτων και την αποφασιστικότητα της στις δύσκολες στιγμές, αποτέλεσε εγγύηση για την ομαλή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ τον Δρ. Κώστα Ιωαννίδη για την πολύτιμη βοήθεια του, στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις χιλιάδες αναλύσεις ελαιολάδου, που πραγματοποιήθηκαν όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις φαρμακοποιούς Τριάδα Γιαννάρα, Μαρία Σκάρκου, Μαρία Γκουσιάκη και Δήμητρα Ζάχου για την συνεργασία τους και την αλληλοβοήθεια.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους υπεύθυνους του Διαπεριφερειακού Προγράμματος "Aristoil" για την οικονομική στήριξη που μου παρείχαν, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμβάλω με όλες μου τις δυνάμεις στην επιτυχία του προγράμματος αυτού, καθώς και το "Παγκόσμιο κέντρο Ελιάς για την υγεία", για την βράβευση και την οικονομική υποστήριξη. Ακόμα τους αρμόδιους στην εταιρία Olivartia A.E. για την τεχνική υποστήριξη στην ανάπτυξη των μεθόδων απομόνωσης φαινολικών συστατικών.



Εοίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες που συναντηθήκαμε στο εργαστήριο κατά την διάρκεια όλων αυτών των χρόνων ιδιαιτέρως την ακούραστη “Λάκαινα” Αιμιλία Ρηγάκου, την πιο μακροχρόνια συνεργάτιδα μου Άννια Τσολάκου, την Κ. Παπακωνσταντίνου, τον Δρ. Χρ. Παπανικολάου την Η. Καλαμπόκη, και όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες που συνεργαστήκαμε το διάστημα αυτό. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Νίκη, την Αθηνά, τον Βαγγέλη και τον Γιώργο για την ουσιώδη βοήθεια που μου παρείχαν.

Τέλος, Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και κυρίως την οικογένειά μου για την στήριξή τους στην προσπάθεια αυτή.

Στον πατέρα μου, γιατί αυτός τα ξεκίνησε όλα

Στην μητέρα μου γιατί ήταν πάντα εκεί

Και στην Κίκη...

Πάντα στην Κίκη

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Πρόλογος</b> .....	<b>vi</b>
<b>Περιεχόμενα</b> .....	<b>ix</b>
<b>Κατάλογος Πινάκων</b> .....	<b>xii</b>
<b>Κατάλογος Διαγραμμάτων</b> .....	<b>xx</b>
<b>Κατάλογος Εικόνων</b> .....	<b>xxv</b>
<b>1 Εισαγωγή</b> .....	<b>1</b>
1.1 Το δέντρο της ελιάς – Γενικά γνωρίσματα.....	1
1.2 Η καλλιέργεια της Ελιάς.....	1
1.3 Ποικιλίες ελιάς.....	4
1.4 Χημική σύσταση Ελαιολάδου.....	5
Λιπαρά οξέα.....	5
Φαινολικά συστατικά.....	8
Βιοσύνθεση σεκοϊριδοειδών.....	9
Υδρογονάνθρακες.....	12
Στερόλες.....	12
Τοκοφερόλες.....	13
Χρωστικές.....	14
Τριτερπενικά οξέα.....	14
1.5 Μεσογειακή διατροφή και ελαιόλαδο.....	15
Η εξέλιξη της μεσογειακής διατροφής.....	15
Υγειοπροστατευτικά χαρακτηριστικά μεσογειακής διατροφής.....	16
1.6 Βιολογικές ιδιότητες φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.....	21
1.6.1 Ελαιοκανθάλη.....	21
1.6.2 Ελαιασίνη.....	26
1.6.3 Άγλυκο λιγκστροσίδη.....	27
1.6.4 Άγλυκο της ελευρωπαϊνης.....	28
1.7 Η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου από την αρχαιότητα στο σήμερα.....	29
1.8 Γενικοί στόχοι.....	34
<b>2. Επίδραση της εποχής συγκομιδής και των συνθηκών μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό υγείας του ελαιολάδου</b> .....	<b>36</b>
2.1 Εισαγωγή.....	36
2.1.1 Εποχή συγκομιδής.....	37
2.1.2 Θερμοκρασία μάλαξης.....	37
2.1.3 Χρόνος μάλαξης.....	39
2.1.4 Η φασματοσκοπία NMR στην ανάλυση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου.....	40

2.2 Σκοπός.....	42
2.3 Υλικά και μέθοδοι.....	44
2.3.1 Υλικά.....	44
2.3.2 Μέθοδοι.....	46
2.3.3 Σχεδιασμός πειραμάτων ελαιοποίησης.....	50
2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων.....	57
2.4.1 Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών.....	57
2.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην Κορωνέικη ποικιλία.....	65
2.4.3 Επίδραση του χρόνου μάλαξης στα φαινολικά συστατικά.....	84
2.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού.....	114
2.4.5 Ελαιοποίηση καρπού από διαφορετικές ποικιλίες.....	124
2.4.6 Πειράματα ελαιοποίησης σε μη φυσιολογικό pH.....	130
2.5 Συμπεράσματα - Η βιοσύνθεση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.....	132
<b>3. Επίδραση των φαινολικών συστατικών στους δείκτες Κ.....</b>	<b>136</b>
3.1 Εισαγωγή.....	136
3.1.1 Κατηγορίες ελαιολάδου στο διεθνές εμπόριο.....	136
3.1.2 Κριτήρια ποιότητας ελαιολάδου.....	138
3.1.3 Η Μοριακή φασματοσκοπία Απορρόφησης ως μέσο ανάλυσης της ποιότητας του ελαιολάδου.....	147
3.2 Σκοπός.....	156
3.3 Υλικά και Μέθοδοι.....	157
3.3.1 Υλικά.....	157
3.3.2 Μέθοδοι.....	158
3.3 Πειραματικό μέρος.....	161
3.3.1 Εισαγωγή.....	161
3.3.2 Εισαγωγικά πειράματα.....	164
3.3.3 Επίδραση της συγκέντρωσης της τυροσόλης στους δείκτες Κ του ελαιολάδου.....	168
3.3.4 Επίδραση ελαιοκανθάλης στους δείκτες Κ.....	186
3.3.5 Επίδραση της ελαιασίνης τους δείκτες Κ.....	195
3.3.5 Δείκτες Κ και οξειδωτική αλλοίωση του ελαιολάδου.....	203
3.3.6 Μέτρηση δεικτών Κ μετά από εκχύλιση του ελαιολάδου.....	207
3.4 Συμπεράσματα.....	209
<b>4. Στατιστικά στοιχεία.....</b>	<b>211</b>
4.1 Εισαγωγή.....	211
4.1.1 Οι ολικές φαινόλες στο ελαιόλαδο.....	211
4.1.2 Η συγκέντρωση των απλών φαινολών στο ελαιόλαδο.....	212
4.1.3 Η συγκέντρωση των βασικών σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο.....	213
4.2 Σκοπός.....	216
4.3 Υλικά και μέθοδοι.....	217

4.3.1 Υλικά.....	217
4.3.2 Μέθοδοι.....	218
4.4 Αποτελέσματα.....	225
4.4.1 Γενικά στατιστικά στοιχεία με βάση την γεωγραφική προέλευση.....	225
4.4.2 Στατιστικές κατανομές ελληνικών δειγμάτων.....	226
4.4.3 Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στα ελληνικά ελαιόλαδα.....	236
4.4.3 Διαφορές μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων, και της εποχής συγκομιδής.....	255
4.5 Στατιστικά δεδομένα ελαιοκομικής περιόδου 2019-2020.....	283
4.6 Συμπεράσματα.....	285
<b>5 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.....</b>	<b>288</b>
5.1 Εισαγωγή.....	288
5.1.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από απόβλητα ελαιοτριβείου.....	289
5.1.2 Εκχυλίσεις φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο.....	295
5.1.3 Πράσινες τεχνικές και εκχυλίσεις βιομηχανικής κλίμακας.....	298
5.2 Σκοπός.....	302
5.3 Υλικά και μέθοδοι.....	303
5.3.1 Υλικά.....	303
Χημικά.....	303
Δεξαμενές.....	303
5.3.2 Μέθοδοι.....	303
Ποσοτικός Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	303
Φάσματα δύο διαστάσεων.....	303
5.4 Υδατικές εκχυλίσεις.....	304
5.4.1 Ανάλυση υδατικού αποβλήτου ελαιοτριβείου.....	304
5.3.2 Πειράματα ανάμιξης ελαιολάδου-νερού.....	306
5.4.3 Υδατικά εκχυλίσματα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης.....	312
Διαλυτότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο νερό.....	341
5.4.4 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών σε ημι-βιομηχανική κλίμακα.....	342
5.5 Εκχύλιση με βιοσυμβατούς οργανικούς διαλύτες.....	349
Πειραματικός σχεδιασμός.....	349
5.4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με αιθανόλη, και ισοπροπανόλη.....	350
5.5.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με πολυαιθυλενογλυκόλη.....	352
5.5.3 Πολυαιθυλενογλυκολική ημιακετάλη της ελαιοκανθάλη.....	357
5.5.4 Απομόνωση φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο με PEG400.....	363
5.5.5 Μορφοποίηση εκχυλισμάτων.....	364
Υδατικά εκχυλίσματα.....	365
5.6 Συμπεράσματα.....	367
<b>6. Δημοσιεύσεις.....</b>	<b>369</b>
<b>7. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>372</b>

## Κατάλογος Πινάκων

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
Πίνακας 1.1: Η βοτανική ταξινόμηση της ελιάς.....	1
Πίνακας 1.2: Ελληνικές Ποικιλίες Ελιάς.....	4
Πίνακας 1.3: Σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα.....	19
<b>2. Επίδραση της εποχής συγκομιδής και των συνθηκών μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό υγείας του ελαιολάδου.....</b>	<b>35</b>
Πίνακας 2.1 : Στοιχεία των δειγμάτων που αναλύθηκαν από την Κορωνέικη ποικιλία.....	51
Πίνακας 2.2: Στοιχεία των δειγμάτων που αναλύθηκαν από την Κορωνέικη ποικιλία.....	52
Πίνακας 2.3: Στοιχεία των δειγμάτων που αναλύθηκαν από την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	53
Πίνακας 2.4: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.....	56
Πίνακας 2.5: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.....	57
Πίνακας 2.6: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.....	58
Πίνακας 2.7 : Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε μεσαία θερμοκρασία για την ποικιλία Αθηνολιάς.....	59
Πίνακας 2.8: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε μεσαία θερμοκρασία για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	60
Πίνακας 2.9: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.....	64
Πίνακας 2.10: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.....	65
Πίνακας 2.11: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.....	66
Πίνακας 2.12 : Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.....	67
Πίνακας 2.13: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.....	68
Πίνακας 2.14: Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ελαιοκανθάλη και Ελαιασίνη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην Κορωνέικη ποικιλία.....	71
Πίνακας 2.15: Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών Ελαιοκορωνάλη και Ελαιομισσιονάλη για την Κορωνέικη ποικιλία.....	74
Πίνακας 2.16: Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών Άγλυκο Λιγκστροσίδη και Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης για την Κορωνέικη ποικιλία.....	77
Πίνακας 2.17: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και του μοντέλου πολλαπλών Duncan's και του μοντέλου Duncan MRT με $p=0.05$ για την ελαιοκανθάλη.....	80
Πίνακας 2.18: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και του μοντέλου πολλαπλών Duncan's (ANOVA) και του μοντέλου Duncan MRT με $p=0.05$ για την ελαιασίνη.....	81



Πίνακας 2.41: Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.....	103
Πίνακας 2.42: Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς. ....	104
Πίνακας 2.43: Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιοκανθάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	105
Πίνακας 2.44: Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιασίνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	105
Πίνακας 2.45: Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	106
Πίνακας 2.46: Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιομισσιονάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	107
Πίνακας 2.47: Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.....	107
Πίνακας 2.48: Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου. ....	108
Πίνακας 2.49: Οι τιμές της απόδοσης του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας σε ελαιόλαδο που ελαιοποιήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης. ....	114
Πίνακας 2.50: Οι τιμές της απόδοσης του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας σε ελαιόλαδο που ελαιοποιήθηκε σε μεσαία θερμοκρασία σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης. ....	115
Πίνακας 2.51: Οι τιμές της απόδοσης του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας σε ελαιόλαδο που ελαιοποιήθηκε σε μεσαία θερμοκρασία σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.....	115
<b>3. Επίδραση των φαινολικών συστατικών στους δείκτες Κ.</b> .....	135
Πίνακας 3.1: Αναλογία λιπαρών σε διάφορα βρώσιμα έλαια. ....	153
Πίνακας 3.2: Στοιχεία οξύτητας και δεικτών Κ από δείγματα εργαστηρίου. ....	163
Πίνακας 3.3: Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης τυροσόλης σε ελαιόλαδο με χαμηλούς αρχικούς δείκτες Κ.....	168
Πίνακας 3.4: Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα τυροσόλης με χαμηλούς δείκτες Κ. ....	170
Πίνακας 3.5: Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης τυροσόλης σε ελαιόλαδο με υψηλούς δείκτες Κ.....	174
Πίνακας 3.6: Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα τυροσόλης με υψηλούς δείκτες Κ. ....	176
Πίνακας 3.7: Συσχέτιση διαλυμάτων τυροσόλης με αντίστοιχα δείγματα ελαιολάδου.....	150
Πίνακας 3.8 : Στοιχεία απορρόφησης διαλυμάτων τυροσόλης.....	183
Πίνακας 3.9 : Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης. ....	187
Πίνακας 3.10: Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα ελαιοκανθάλης. ....	189
Πίνακας 3.11: Στοιχεία απορρόφησης διαλυμάτων ελαιοκανθάλης. ....	191
Πίνακας 3.12: Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης. ....	195
Πίνακας 3.13: Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα ελαιασίνης. ....	196
Πίνακας 3.14: Στοιχεία απορρόφησης διαλυμάτων ελαιασίνης. ....	200
Πίνακας 3.15: Η εξέλιξη των δεικτών Κ, κατά την διάρκεια της θερμικής καταπόνησης. ....	204
<b>4. Στατιστικά στοιχεία.</b> .....	210
Πίνακας 4.1: Χώρα προέλευσης των δειγμάτων.....	218



Πίνακας 4.2: Ελαιοκομική περίοδος αναλυθέντων δειγμάτων. ....	219
Πίνακας 4.3: Μήνας συγκομιδής του ελαιόκαρπου. ....	220
Πίνακας 4.4: Οι διαφορετικές ποικιλίες των δειγμάτων. ....	222
Πίνακας 4.5: Τα δείγματα ελαιολάδου με βάση τον τύπο του ελαιοτριβείου. ....	223
Πίνακας 4.6: Τα δείγματα ελαιολάδου ανά χώρα. ....	224
Πίνακας 4.7: Η κατανομή των ελληνικών δειγμάτων βάση της ποικιλίας. ....	224
Πίνακας 4.8: Η κατανομή των ελληνικών δειγμάτων βάση της ποικιλίας. ....	226
Πίνακας 4.9: Κατανομή μήνα συγκομιδής για τα ελληνικά δείγματα. ....	228
Πίνακας 4.10: Κατανομή των εβδομάδων συγκομιδής για τα ελληνικά δείγματα. ....	229
Πίνακας 4.11: Γεωγραφική κατανομή σε επίπεδο περιφέρειας για τα ελληνικά δείγματα. ....	230
Πίνακας 4.12: Γεωγραφική κατανομή σε επίπεδο νομού για τα ελληνικά δείγματα. ....	231
Πίνακας 4.13: Γεωγραφική κατανομή σε επίπεδο δήμου. ....	233
Πίνακας 4.14: Κατανομή ελληνικών δειγμάτων ως προς τον τύπο ελαιοτριβείου. ....	235
Πίνακας 4.15: Συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα ελληνικά ελαιόλαδα. ....	236
Πίνακας 4.16: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης. ....	238
Πίνακας 4.17: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της ελαιασίνης. ....	238
Πίνακας 4.18: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαΐνης. ....	239
Πίνακας 4.19: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη. ....	239
Πίνακας 4.20: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της ελαιοκορωνάλης. ....	239
Πίνακας 4.21: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της ελαιομισσιονάλης. ....	240
Πίνακας 4.22: Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο των ολικών φαινολικών. ....	240
Πίνακας 4.23: Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιοκανθάλης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ). ....	241
Πίνακας 4.24: Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιασίνης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ). ....	241
Πίνακας 4.25: Σύγκριση του μέσου όρου του Άγλυκου της ελευρωπαΐνης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT. ....	242
Πίνακας 4.26: Σύγκριση του μέσου όρου του Άγλυκου του λιγκτροσίδη για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT. ....	242
Πίνακας 4.27: Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιοκορωνάλης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT. ....	243
Πίνακας 4.28: Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιομισσιονάλης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT. ....	243
Πίνακας 4.29: Σύγκριση του μέσου όρου των ολικών φαινολών για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT. ....	244
Πίνακας 4.30: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για κάθε τύπο ελαιοτριβείου με το μοντέλο MRT. ....	246
Πίνακας 4.31: Σύγκριση ποικιλιών ως προς τον τύπο ελαιοτριβείου. ....	248
Πίνακας 4.32: Ποικιλίες που περιλήφθηκαν στην ανάλυση GLM. ....	249

Πίνακας 4.33: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Αγριελιάς. ....	249
Πίνακας 4.34: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Αμφίσσης. ....	249
Πίνακας 4.35: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Αθηνολιάς. ....	250
Πίνακας 4.36: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Χαλκιδικής. ....	250
Πίνακας 4.37: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Καλαμών. ....	250
Πίνακας 4.38: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Κολοβή. ....	250
Πίνακας 4.39: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Κορωνέικη. ....	251
Πίνακας 4.40: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Κουτσουρελιάς. ....	251
Πίνακας 4.41: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Μανάκι. ....	251
Πίνακας 4.42: Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Μεγαρίτικη. ....	251
Πίνακας 4.43: Στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης του τύπου του ελαιοτριβείου στην συγκέντρωση των φαινολών για τις διαφορετικές ποικιλίες. ....	252
Πίνακας 4.44: Στατιστική σημαντικότητα της αλληλεπίδρασης του τύπου του ελαιοτριβείου και της ποικιλίας στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. ....	253
Πίνακας 4.45: Στατιστική σημαντικότητα της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων. ....	255
Πίνακας 4.46: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	256
Πίνακας 4.47: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	256
Πίνακας 4.48: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης + ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	257
Πίνακας 4.49: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	257
Πίνακας 4.50: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	257
Πίνακας 4.51: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ). ....	257
Πίνακας 4.52: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	258
Πίνακας 4.53: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	258
Πίνακας 4.54: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρόξυ τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	258
Πίνακας 4.55: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT. ....	258
Πίνακας 4.56: Στατιστική σημασία της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για όλους του μήνες (συνολικά για όλες τις ελαιοκομικές περιόδους). ....	259
Πίνακας 4.57: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου. ....	259
Πίνακας 4.58: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT. ....	260
Πίνακας 4.59: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης + ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT. ....	260

Πίνακας 4.60: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊκής (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	260
Πίνακας 4.61: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	260
Πίνακας 4.62: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	261
Πίνακας 4.63: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	261
Πίνακας 4.64: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	261
Πίνακας 4.65: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρόξυ-τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	261
Πίνακας 4.66 Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT .....	262
Πίνακας 4.67: Στατιστική σημασία της συγκέντρωσής των φαινολικών συστατικών μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων για κάθε χρόνο. ....	262
Πίνακας 4.68: Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	262
Πίνακας 4.69: Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	263
Πίνακας 4.70. Σύγκριση της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	263
Πίνακας 4.71: Σύγκριση της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊκής (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	263
Πίνακας 4.72: Σύγκριση της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	264
Πίνακας 4.73. Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	264
Πίνακας 4.74. Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	264
Πίνακας 4. 75. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ολικών παραγώγων τυροσόλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	265
Πίνακας 4.76. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ολικών παραγώγων υδρξυτυροσόλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	265
Πίνακας 4.77. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT .....	265
Πίνακας 4.78: Στατιστική σημασία της διαφοράς της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για όλες τις εβδομάδες. ....	268
Πίνακας 4.79: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	268
Πίνακας 4.80: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	269
Πίνακας 4.81: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	269

Πίνακας 4.82: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MR .....	270
Πίνακας 4.83: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου .....	270
Πίνακας 4.84: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	271
Πίνακας 4.85: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	271
Πίνακας 4.86: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	272
Πίνακας 4.87: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρόξυ τυροσόλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT.....	272
Πίνακας 4.88: Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT .....	273
Πίνακας 4.89: Στατιστική σημασία της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για την εβδομάδα συγκομιδής για κάθε χρόνο. ....	274
Πίνακας 4.90: Στατιστική σημασία της διαφοράς συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών μεταξύ των διαφορετικών περιοχών προέλευσης. ....	274
Πίνακας 4.91: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT.....	275
Πίνακας 4.92: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	275
Πίνακας 4.93: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	276
Πίνακας 4.94: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	276
Πίνακας 4.95: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	277
Πίνακας 4.96: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT.....	277
Πίνακας 4.97: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT.....	278
Πίνακας 4.98: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	278
Πίνακας 4.99: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρξυτυροσόλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	278
Πίνακας 4.100: Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT .....	279
Πίνακας: 4.101. Έλεγχος ανεξαρτησίας μεταξύ της ποικιλίας και της περιοχής προέλευσης ....	281
Πίνακας 4.102. Μέσοι όροι και μέγιστες τιμές για όλα τα φαινολικά συστατικά περιλαμβανομένων και των δειγμάτων για την περίοδο 2019-2020.....	282
<b>5 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου. ....</b>	<b>287</b>
Πίνακας 5.1: Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	305

Πίνακας 5.2: Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	306
Πίνακας 5.3: Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία 100 0C. ....	308
Πίνακας 5.4: Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία 100 0C. ....	309
Πίνακας 5.5: Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την ελαιασινοδιόλη και την ελαιασίνη σε διαλύτη D2O. ....	325
Πίνακας 5.6: Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων για την ελαιασινοδιόλη και την ελαιασίνη σε διαλύτη D2O. ....	325
Πίνακας 5.7: Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την ελαιοκανθαδιόλη και την ελαιοκανθάλη σε διαλύτη D2O.....	339
Πίνακας 5.8: Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την ελαιοκανθαδιόλη και την ελαιοκανθάλη σε διαλύτη D2O.....	339
Πίνακας 5.9: Οι μέγιστες συγκεντρώσεις σε διαλύτη D2O.....	340
Πίνακας 5.10: Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την πολυαιθυλενογλυκολική ελαιοκανθάλη σε δευτεριωμένο DMSO. ....	361
Πίνακας 5.11: Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων για την πολυαιθυλενογλυκολική ελαιοκανθάλη σε δευτεριωμένο DMSO. ....	361

## Κατάλογος Διαγραμμάτων.

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
Διάγραμμα 1.1: Η εξέλιξη της παραγωγής των μεσογειακών χωρών τα τελευταία 28 χρόνια (Πηγή IOC).....	2
<b>2. Επίδραση της εποχής συγκομιδής και των συνθηκών μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό υγείας του ελαιολάδου.....</b>	<b>35</b>
Διάγραμμα 2.1 : Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.....	57
Διάγραμμα 2.2: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.....	58
Διάγραμμα 2.3: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.....	59
Διάγραμμα 2.4: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την ποικιλία Αθηνολιά στους 28°C, για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.....	60
Διάγραμμα 2.5: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την ποικιλία Θρουμπολιά στους 28°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.....	61
Διάγραμμα 2.6: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Οκτώβριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.....	65
Διάγραμμα 2.7: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Νοέμβριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.....	66
Διάγραμμα 2.8: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Δεκέμβριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.....	67
Διάγραμμα 2.9: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Ιανουάριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.....	68
Διάγραμμα 2.10: Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Φεβρουάριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.....	69
Διάγραμμα 2.11: Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία.....	73
Διάγραμμα 2.12: Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία.....	76
Διάγραμμα 2.13: Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στα άγλυκα λιγκστροσίδη και ελευρωπαΐνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία.....	79
Διάγραμμα 2.14 : Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.....	84
Διάγραμμα 2.15: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	85
Διάγραμμα 2.16: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	85

Διάγραμμα 2.17 : Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Αθηνολιάς στους 28 °C.....	86
Διάγραμμα 2.18: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	86
Διάγραμμα 2.19: Ποσοστιαία μείωση των φαινολικών συστατικών για όλες τις θερμοκρασίες και όλους τους βαθμούς συγκομιδής.....	87
Διάγραμμα 2.20: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.....	89
Διάγραμμα 2.21: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.....	89
Διάγραμμα 2.22: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	90
Διάγραμμα 2.23: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	91
Διάγραμμα 2.24: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	91
Διάγραμμα 2.25: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	92
Διάγραμμα 2.26: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.....	93
Διάγραμμα 2.27: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22°C.....	94
Διάγραμμα 2.28: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	94
Διάγραμμα 2.29: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	94
Διάγραμμα 2.30: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	96
Διάγραμμα 2.31: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	96
Διάγραμμα 2.32: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο του Λιγκστροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.....	97
Διάγραμμα 2.33: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.....	98
Διάγραμμα 2.34 Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο του Λιγκστροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	98
Διάγραμμα 2.35: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.....	99
Διάγραμμα 2.36: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο του Λιγκστροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	100

Διάγραμμα 2.37: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.....	100
Διάγραμμα 2.38: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.....	101
Διάγραμμα 2.39: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.....	102
Διάγραμμα 2.40: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.....	102
Διάγραμμα 2.41: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.....	103
Διάγραμμα 2.42: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο Λιγκστροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.....	103
Διάγραμμα 2.43: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.....	104
Διάγραμμα 2.44: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	105
Διάγραμμα 2.45: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	106
Διάγραμμα 2.46: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	106
Διάγραμμα 2.47: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	107
Διάγραμμα 2.48: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο Λιγκστροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	108
Διάγραμμα 2.49: Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.....	108
Διάγραμμα 2.50: Συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης για την ποικιλία Αθηνολιά κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.....	109
Διάγραμμα 2.51: Ποσοστιαία μείωση ελαιοκορωνάλης για την Κορωνέικη ποικιλία μεταξύ των 15 και 90 min μάλαξης, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.....	111
Διάγραμμα 2.52: Ποσοστιαία μείωση ελαιομισσιονάλης για την Κορωνέικη ποικιλία μεταξύ των 15 και 90 min μάλαξης, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.....	112
Διάγραμμα 2.53: Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για ελαιοποίηση στους 22 °C.....	114
Διάγραμμα 2.54: Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για ελαιοποίηση στους 28 °C.....	115
Διάγραμμα 2.55 : Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για ελαιοποίηση στους 32 °C.....	116
Διάγραμμα 2.56: Ποσοστιαία αύξηση της ελαιοπεριεκτικότητας μεταξύ των ακραίων χρόνων μάλαξης 15 και 90 min.....	117



Διάγραμμα 2.57: Η απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ελαιοποίησης για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την κορωνέικη ποικιλία.....	118
Διάγραμμα 4.58: Ποσοστιαία Μείωση ολικών φαινολών για την Κορωνέικη ποικιλία κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού μεταξύ των 15 και 90 min μάλαξης.....	119
<b>3. Επίδραση των φαινολικών συστατικών στους δείκτες Κ.....</b>	<b>135</b>
Διάγραμμα 3.1: Οι δείκτες Κ232, Κ270 και Κ280 για τα δείγματα τυροσόλης με χαμηλούς δείκτες Κ.....	171
Διάγραμμα 3.2 : Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη τυροσόλης.....	171
Διάγραμμα 3.3: Οι δείκτες Κ232, Κ270 και Κ280 για τα δείγματα τυροσόλης σε ελαιόλαδο με υψηλούς αρχικούς δείκτες Κ.....	176
Διάγραμμα 3.4: Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη τυροσόλης.....	176
Διάγραμμα 3.5: Απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης και των θεωρητικών δεικτών Κ για τα διαλύματα τυροσόλης.....	183
Διάγραμμα 3.6: Οι δείκτες Κ232, και Κ270 για τα δείγματα ελαιοκανθάλης.....	189
Διάγραμμα 3.7: Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη ελαιοκανθάλης.....	190
Διάγραμμα 3.8: Απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης και των θεωρητικών δεικτών Κ για τα διαλύματα ελαιοκανθάλης.....	192
Διάγραμμα 3.9: Οι δείκτες Κ232, και Κ270 για τα δείγματα ελαιασίνης.....	197
Διάγραμμα 3.10: Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη ελαιασίνης.....	197
Διάγραμμα 3.11: Απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης και των θεωρητικών δεικτών Κ για τα διαλύματα ελαιασίνης.....	200
Διάγραμμα 3.12: Απεικόνιση της εξέλιξης των δεικτών Κ.....	201
<b>4. Στατιστικά στοιχεία.....</b>	<b>210</b>
Διάγραμμα 4.1: Κατανομή των δειγμάτων ανά χώρα.....	219
Διάγραμμα 4.2: Κατανομή των δειγμάτων ανά ελαιοκομική περίοδο.....	220
Διάγραμμα 4.3: Κατανομή των δειγμάτων ανά μήνα συγκομιδής.....	221
Διάγραμμα 4.4: Κατανομή των δειγμάτων ανά ποικιλία.....	222
Διάγραμμα 4.5: Κατανομή των δειγμάτων ανά τύπο ελαιοτριβείου.....	223
Διάγραμμα 4.6: Σύσταση των φαινολικών συστατικών ανά χώρα.....	224
Διάγραμμα 4.7: Κατανομή ελληνικών δειγμάτων ανά ποικιλία.....	226
Διάγραμμα 4.8: Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων ανά ελαιοκομική περίοδο.....	227
Διάγραμμα 4.9: Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων ανά μήνα συγκομιδής.....	228
Διάγραμμα 4.10: Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων ανά εβδομάδα συγκομιδής.....	229
Διάγραμμα 4.11: Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων ανά περιφέρεια.....	230
Διάγραμμα 4.12: Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων ανά τύπο ελαιοτριβείου.....	234
Διάγραμμα 4.13: Κατανομή της συγκέντρωσης του κάθε φαινολικού συστατικού.....	237

Διάγραμμα 4.14: Κατανομή της συγκέντρωσης του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών.....	237
Διάγραμμα 4.15: Κατανομή του μέσου όρου της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών ανά ποικιλία.....	247
Διάγραμμα 4.16: Κατανομή των φαινολικών συστατικών ανά ελαιοκομική περίοδο.....	256
Διάγραμμα 4.17: Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων ανά μήνα συγκομιδής για όλες τις χρονιές.....	266
Διάγραμμα 4.18: Κατανομή της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών ανά μήνα συγκομιδής.....	267
Διάγραμμα 4.19: Κατανομή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών (μέσος όρος) ανά εβδομάδα συγκομιδής.....	273
Διάγραμμα 4.20: Διαφορές στην συγκέντρωση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών (mg/g) μεταξύ των μελετώμενων περιοχών.....	279
Διάγραμμα 4.21: Διαφορές μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών για τις διάφορες περιοχές προέλευσης.....	281
<b>5 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.....</b>	<b>287</b>

## Κατάλογος Εικόνων.

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
Εικόνα 1.1: Η Γεροντοελιά της Νάξου.....	3
<b>2. Επίδραση της εποχής συγκομιδής και των συνθηκών μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό υγείας του ελαιολάδου.....</b>	<b>35</b>
Εικόνα 2.1: Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος του φαινολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου.....	46
Εικόνα 2.2: Ο σχεδιασμός πειραμάτων που αφορούν την ελαιοποίηση του καρπού.....	50
Εικόνα 2.3: Η αλδεϋδική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup> H-NMR Κορωνέικης ποικιλίας σε μεσαία θερμοκρασία για 3 διαφορετικούς χρόνους μάλαξης.....	121
Εικόνα 2.4: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Θρουμπολιά.....	125
Εικόνα 2.5: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την Ολύμπια ποικιλία.....	126
Εικόνα 2.6: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Κορωνέικη.....	127
Εικόνα 2.7: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Καλαμών.....	128
Εικόνα 2.8: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Καλαμών.....	129
Εικόνα 2.9: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.....	134
<b>3. Επίδραση των φαινολικών συστατικών στους δείκτες Κ.....</b>	<b>135</b>
Εικόνα 3.1: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών χρωμοφόρων ομάδων.....	148
Εικόνα 3.2: Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών φαινολικών δακτυλίων .....	151
Εικόνα 3.3: Φάσματα απορρόφησης διαφορετικού τύπου ελαίου.....	154
Εικόνα 3.4: Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση τυροσόλης στα 280 nm.....	169
Εικόνα 3.5: Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση τυροσόλης στα 232 nm.....	169
Εικόνα 3.6: Το φάσμα UV-vis για τα 4 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση τυροσόλης στα 232 και 280 nm.....	174
Εικόνα 3.7: Φάσμα της απορρόφησης χλωροφορμίου, THF και διοξάνης στο κυκλοεξάνιο.....	179
Εικόνα 3.8: Φάσμα απορρόφησης πυκνού διαλύματος τυροσόλης.....	181
Εικόνα 3.9: Φάσμα απορρόφησης των 4 διαλυμάτων τυροσόλης.....	182
Εικόνα 3.10: Φάσμα απορρόφησης του δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά την προσθήκη τυροσόλης, και της αντίστοιχης ποσότητας καθαρής τυροσόλης.....	184
Εικόνα 3.11: Οι χρωμοφόρες ομάδες της ελαιοκανθάλης.....	185

Εικόνα 3.12: Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιοκανθάλης στα 232 nm.....	188
Εικόνα 3.13: Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιοκανθάλης στα 270 nm.....	188
Εικόνα 3.14: Φάσμα απορρόφησης των 4 διαλυμάτων ελαιοκανθάλης.....	192
Εικόνα 3.15: Φάσμα απορρόφησης του δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά την προσθήκη τυροσόλη, και της αντίστοιχης ποσότητας καθαρής τυροσόλης.....	193
Εικόνα 3.16: Οι χρωμοφόρες ομάδες της ελαιασίνης.....	194
Εικόνα 3.17: Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιασίνης στα 270 nm.....	195
Εικόνα 3.18: Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιασίνης στα 232 nm.....	196
Εικόνα 3.19: Φάσμα απορρόφησης των 4 διαλυμάτων ελαιασίνης.....	199
Εικόνα 3.20: Φάσμα απορρόφησης του δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά την προσθήκη ελαιασίνης, και της αντίστοιχης ποσότητας καθαρής ελαιασίνης.....	201
Εικόνα 3.21: Τα φάσματα απορρόφησης του ελαιολάδου, πριν και μετά την προσθήκη τυροσόλης.....	207
<b>4. Στατιστικά στοιχεία.....</b>	<b>210</b>
<b>5 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.....</b>	<b>287</b>
Εικόνα 5.1: Η αλδεϋδική και αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ υδατικού εκχυλίσματος αποβλήτου ελαιοτριβείου.....	302
Εικόνα 5.2: Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	304
Εικόνα 5.3: Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	305
Εικόνα 5.4: Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία $100\text{ }^\circ\text{C}$ .....	306
Εικόνα 5.5: Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία $100\text{ }^\circ\text{C}$ .....	307
Εικόνα 5.6: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ολικού υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου.....	309
Εικόνα 5.7: Ελαιασινοδιόλη και Ελαιασίνη.....	312
Εικόνα 5.8: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ελαιασίνης σε $\text{D}_2\text{O}$ .....	313
Εικόνα 5.9: Συσχέτιση αρωματικών πρωτονίων στο φάσμα COSY.....	313
Εικόνα 5.10: Συσχέτιση ολεφινικού πρωτονίου με το μεθύλιο της θέσης 10 στο φάσμα COSY.....	314
Εικόνα 5.11: Συσχετίσεις των πρωτονίων H-1, H-9, H-4', H-7', H-8' με τους αντίστοιχους άνθρακες στο φάσμα HMQC.....	314
Εικόνα 5.12: Συσχετίσεις το αλδεϋδικού πρωτονίου της ελαιασινοδιόλης στο φάσμα COSY και του H-5 με τον C-5 στο HMQC.....	315
Εικόνα 5.13: Συσχετίσεις των H-1 και H-9 με τους γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα HMBC.....	315

Εικόνα 5.14: Συσχετίσεις του H-5 της ελαισινοδιόλης στο φάσμα COSY.....	316
Εικόνα 5.15: Συσχετίσεις των H-4a,H-4b, H-6a και H-6b με τους C-4 και C-6 το φάσμα ΗΜQC..	316
Εικόνα 5.16: Συσχετίσεις των H-4a, H-4b με τον C-3 και των H-6a και H-6b με τον C-7 στο φάσμα ΗΜBC.....	317
Εικόνα 5.17: Συσχετίσεις των H-1a, H-1b με τα H-2a και H-2b από το φάσμα COSY.....	318
Εικόνα 5.18: Τα χαρακτηριστικά σήματα των H-1a' , H-1b' , H-2a,b' στο φασμα 1H-NMR.....	318
Εικόνα 5.19: Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσης 1' με τον C-1' και της θέσης 2' με τον C-2' από το φάσμα ΗΜQC και οι συσχετίσεις των ίδιων πρωτονίων με γειτονικούς άνθρακες.....	319
Εικόνα 5.20: Οι συσχετίσεις των H-7' και H-8' με γειτονικούς άνθρακες.....	319
Εικόνα 5.21: Τα χαρακτηριστικά σήματα του H-3 και CH <sub>3</sub> -10 της ελαιαίνης στο φάσμα 1H-NMR.....	320
Εικόνα 5.22: Συσχέτιση του αλδεϋδικού και των μεθυλικών πρωτονίων της ελαιαίνης με τον C-1 και C-10 αντίστοιχα.....	321
Εικόνα 5.23: Το χαρακτηριστικό σήμα του H-5 της ελαιαίνης στο φάσμα 1H-NMR.....	321
Εικόνα 5.24: Οι συσχετίσεις του H-5 της ελαιαίνης στο φάσμα COSY.....	322
Εικόνα 5.25: Οι συσχετίσεις του C-5 με γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα ΗΜBC.....	322
Εικόνα 5.26: Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσης 4 με τους γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα ΗΜBC.....	323
Εικόνα 5.27: Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσης 6 με τους γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα ΗΜBC.....	323
Εικόνα 5.28: Τα σήματα του πρωτονίου H-7' στο φάσμα 1H-NMR.....	324
Εικόνα 5.29: Τα σήματα των φαινολικών πρωτονίων, τους αλδεϋδικού πρωτονίου και του μεθυλίου της ελαιοκανθαδιόλης στο φάσμα 1H-NMR.....	326
Εικόνα 5.30: Οι συσχετίσεις των φαινολικών πρωτονίων στο φάσμα COSY.....	327
Εικόνα 5.31: Η συσχέτιση των πρωτονίων του μεθυλίου με το ολεφινικό πρωτόνιο H-9 στο φάσμα COSY.....	327
Εικόνα 5.32: Οι συσχετίσεις των H-1, H-9, H-4', H-8', H-5', H-7' με τους αντίστοιχους άνθρακες στο φάσμα ΗΜQC.....	328
Εικόνα 5.33: Οι συσχετίσεις του H-1 στο φάσμα COSY και του H-5 με το C-5 φάσμα ΗΜQC.....	328
Εικόνα 5.34: Οι συσχετίσεις των H-1, και H-9 στο φάσμα ΗΜBC.....	329
Εικόνα 5.35: Οι συσχετίσεις του H-5 στο φάσμα COSY.....	329
Εικόνα 5.36: Οι συσχετίσεις των H-6a, H-6b, H-4a, H-4b και H-3 με τους αντίστοιχους άνθρακες στο φάσμα ΗΜQC.....	330
Εικόνα 5.38: Οι συσχετίσεις των H-6a και H-6b με τους γειτονικούς τους άνθρακες.....	331
Εικόνα 5.39: Οι συσχετίσεις των H-1' με τα H-2' στο φάσμα COSY.....	331
Εικόνα 5.40: Τα σήματα των H-1'a, H-1'b και H-2'a, H-2'b στο φάσμα 1H-NMR.....	332
Εικόνα 5.41: Οι συσχετίσεις των H-1' με τα H-2' με τους αντίστοιχους άνθρακες καθώς και με τους γειτονικούς τους.....	332

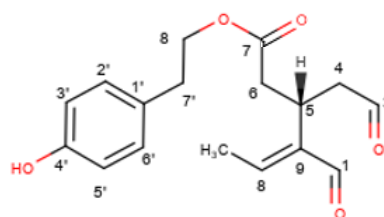
Εικόνα 5.42: Οι συσχετίσεις των H-4' και H8' καθώς και των H-5' και H-7' τους γειτονικούς τους άνθρακες.....	333
Εικόνα 5.43: Τα χαρακτηριστικά σήματα του μεθυλίου και του αλδεϋδικού πρωτονίου της θέσης 3 στο φάσμα 1H-NMR.....	334
Εικόνα 5.44: Οι συσχετίσεις του μεθυλίου και του αλδεϋδικού πρωτονίου της θέσης 3 με τους αντίστοιχους άνθρακες.....	335
Εικόνα 5.45 Οι συσχετίσεις του μεθυλίου και τον καρβονυλικό άνθρακα για την ελαιοκανθάλη και την ελαιοκανθαδιόλη.....	335
Εικόνα 5.46: Το χαρακτηριστικά σήμα του H-5 το φάσμα 1H-NMR.....	336
Εικόνα 5.47: Οι συσχετίσεις του H-5 στο φάσμα COSY.....	336
Εικόνα 5.48: Οι συσχετίσεις του C-5 στο φάσμα HMBC.....	337
Εικόνα 5.49: Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσεις 4, με τους γειτονικούς τους άνθρακες στο φάσμα HMBC.....	337
Εικόνα 5.50: Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσεις 5 και 6, με τους γειτονικούς τους άνθρακες στο φάσμα HMBC.....	338
Εικόνα 5.51: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά την ελαιοποίηση.....	343
Εικόνα 5.52: Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά την δεύτερη φυγοκέντρωση.....	344
Εικόνα 5.53: Το φάσμα 1H-NMR του υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου.....	346
Εικόνα 5.54: Ο καθαρισμός του υδατικού εκχυλίσματος σε ένα βήμα με silica C18.....	347
Εικόνα 5.55: Σύγκριση της αναμιξιμότητας του ελαιολάδου, με ισοπροπανόλη, αιθανόλη και αιθανόλη/νερό.....	349
Εικόνα 5.56: Το χαρακτηριστικό σήμα του PEG στο ελαιόλαδο και η σύγκριση του ποσοστού PEG που παραμένει μετά από βαρυτικό διαχωρισμό και φυγοκέντρωση.....	351
Εικόνα 5.57: Φάσμα πολυαιθυλενογλυκολικού εκχυλίσματος σε CDCl <sub>3</sub> .....	352
Εικόνα 5.58: Το φάσμα 1H-NMR της PEG-OLE.....	353
Εικόνα 5.59: Η αντίδραση της ελαιοκανθάλης με την πολυαιθυλενογλυκόλη.....	354
Εικόνα 5.60: Το φάσμα της πολυαιθυλενογλυκολικής ελαιοκανθάλης σε CDCl <sub>3</sub> .....	354
Εικόνα 5.61: Το φάσμα του εκχυλίσματος πολυαιθυλενογλυκολικής ελαιοκανθάλης σε D <sub>2</sub> O.....	355
Εικόνα 5.62: Η συσχέτιση των πρωτονίων του μεθυλίου με τον αντίστοιχο C από στο HSQC....	356
Εικόνα 5.63: Οι συσχετίσεις του πρωτονίου H-8 με γειτονικά πρωτόνια και τον C-8.....	356
Εικόνα 5.64: Οι συσχετίσεις του H-8 με τους γειτονικούς άνθρακες.....	357
Εικόνα 5.65: Οι συσχετίσεις του C-9 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC.....	357
Εικόνα 5.66: Οι συσχετίσεις του C-5 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC.....	358
Εικόνα 5.67: Οι συσχετίσεις των πρωτονίων των θέσεων 4 και 6 με τους αντίστοιχους άνθρακες και με το πρωτόνιο της θέσης 5.....	358
Εικόνα 5.68: Οι συσχετίσεις του C-7 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC.....	359

Εικόνα 5.69: Οι συσχετίσεις του H-3 με τον C-3 από το φάσμα ΗΜQC.....	359
Εικόνα 5.70: Οι συσχετίσεις του C-3 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα ΗΜBC.....	360
Εικόνα 5.71: Πλαστική δεξαμενή εκχύλισης.....	362
Εικόνα 5.72: Δισκία Ελαιοκανθαδιόλης .....	364
Εικόνα 5.72: Σκληρές Κάψουλες PEG-OLE.....	365

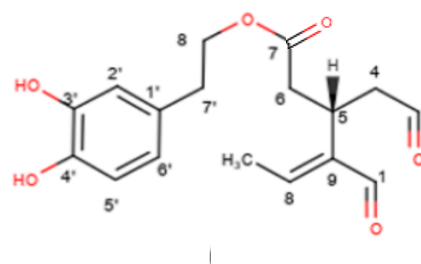
## Συντομεύσεις

Στην παρούσα εργασία οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται επεξηγούνται κατά την πρώτη τους αναφορά. Για επεξηγηματικούς λόγους αλλά και για την διευκόλυνση του αναγνώστη ωστόσο, κρίνεται αναγκαίο να παρουσιαστούν οι βασικοί χημικοί τύποι που χρησιμοποιούνται με τις αντίστοιχες ονομασίες που αναφέρονται .

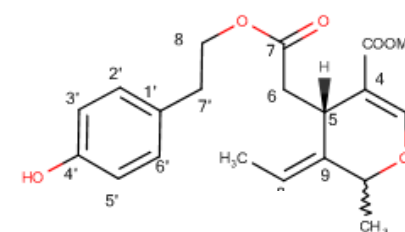
- Ελαιοκανθάλη



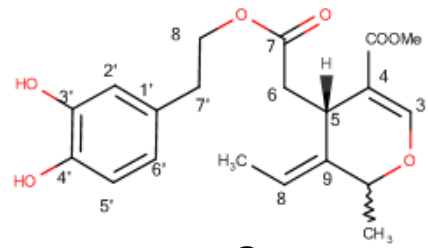
- Ελαιασίνη



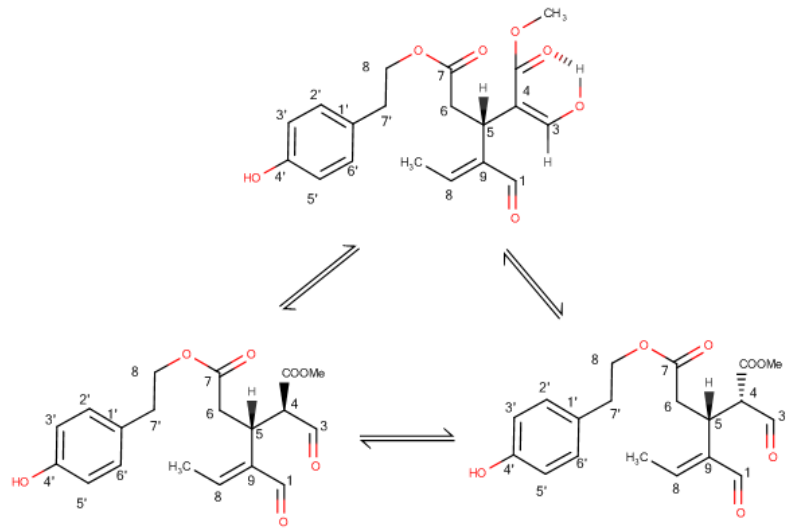
- Άγλυκο του λιγκαστροσίδη  
(ή μονοαλδεϋδική μορφή)



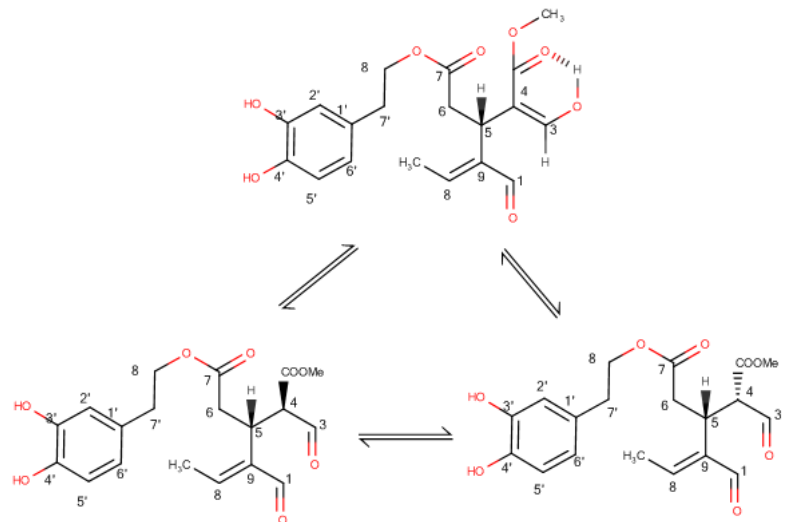
- Άγλυκο της ελευρωπαΐνης  
(ή μονοαλδεϋδική μορφή)



- Ελαιοκορωνάλη



- Ελαιομισσιονάλη





# 1 Εισαγωγή.

## 1.1 Το δέντρο της ελιάς – Γενικά γνωρίσματα.

Η ελιά είναι δέντρο αειθαλές που γενικά δε μεγαλώνει σε ύψος μεγαλύτερο από 10 μέτρα. Αναπτύσσεται αργά, φτάνοντας στην πλήρη παραγωγή όταν είναι 25-30 ετών, αλλά μπορεί να ζήσει για αρκετούς αιώνες. Από βοτανικής απόψεως, η ελιά ανήκει στο γένος της Ελαιίας (*Olea*) της οικογένειας *Oleaceae*.

**Πίνακας 1.1:** Η βοτανική ταξινόμηση της ελιάς.

<b>Βασίλειο</b>	<i>Plantae</i>
<b>Διαίρεση</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Κλάση</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Τάξη</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Οικογένεια</b>	<i>Oleaceae</i>
<b>Υποοικογένεια</b>	<i>Oleoideae</i>
<b>Γένος</b>	<i>Olea</i>

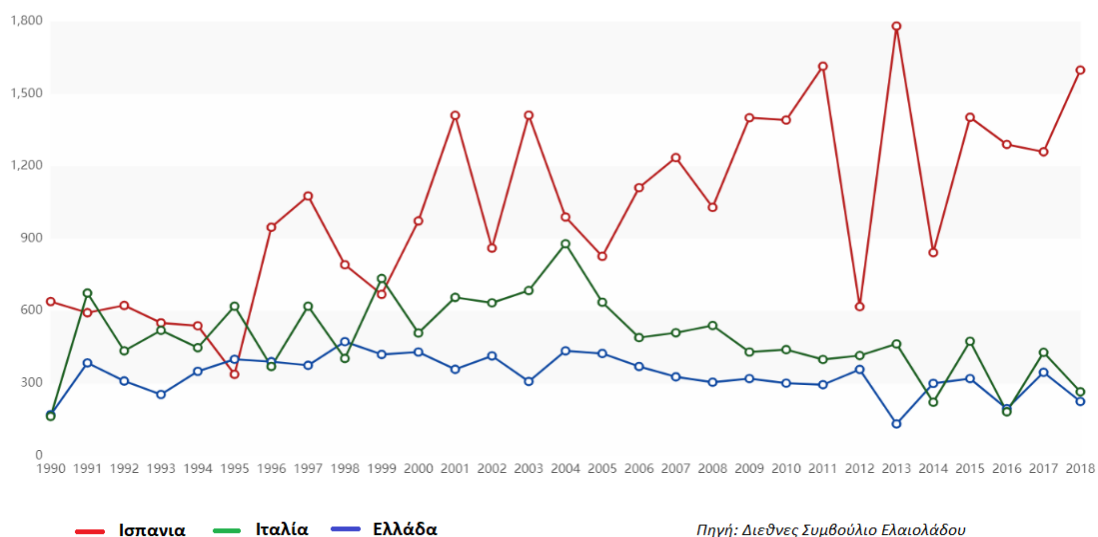
Η οικογένεια *Oleaceae* περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι η *Olea* (Ελιά), *Syringa* (Πασχαλιά), *Forsythia* (Φορσύθια), *Ligustrum* (Λιγούστρο), *Jasminium* (Γιασεμί) και η *Phillyrea* (Φυλλίκι, Λιόπρινος). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τρία υπογένη τα *Paniculatae*, *Tetrapilus* και *Olea*. Το υπογένος *Olea* με την σειρά του χωρίζεται σε δύο κατηγορίες το *Ligustroides* και *Olea*. Σύμφωνα με μια σύγχρονη εκδοχή της ταξινόμησης της ελιάς, το είδος *Olea europaea* περιλαμβάνει έξι υποείδη: *cuspidata*, *laperrinei*, *maroccana*, *cerasiformis*, *guanchica*, *europaea*. Η κατηγορία *Olea europaea subsp. europaea* υποδιαιρείται σε δύο ποικιλίες. Την άγρια ελιά, *Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris* και την καλλιεργήσιμη (ήμερη), *Olea europaea subsp. europaea var. europaea*. ( Kostelenos and Kiritsakis 2017).

## 1.2 Η καλλιέργεια της Ελιάς.

Το δέντρο της ελιάς, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες στον ελλαδικό χώρο, ίσως και την αρχαιότερη. Το κλιματικό περιβάλλον της Ελλάδας και της Μεσογείου γενικότερα, θεωρείται ιδανικό για την καλλιέργεια της ελιάς. Στην Ελλάδα εντοπίζεται σε όλες τις παραθαλάσσιες περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας και τα νησιά.

Συνολικά σύμφωνα με στοιχεία του FAOSTAT των Ηνωμένων Εθνών, το 2018 η καλλιέργεια της ελιάς στον ελλαδικό χώρο, ανήλθε σε πάνω από 9,6 εκ. στρ. αντιπροσωπεύοντας το 18% της

συνολικής καλλιεργήσιμης γης, ενώ η Ελλάδα για πολλά χρόνια ήταν η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Η καλλιέργεια της ελιάς εθεωρείτο σχεδόν αποκλειστικό προνόμιο των παραπάνω χωρών καθώς σύμφωνα με παλαιότερα στοιχεία, η Ευρώπη κατείχε περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου. Ωστόσο, είναι βέβαιο ότι τα επόμενα χρόνια, σημαντικές ποσότητες ελαιολάδου θα παράγονται και από άλλες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου όπως η Τουρκία και η Τυνησία, ενώ σημαντικές προσπάθειες σε χώρες όπως το Ισραήλ, το Ιράκ το Περού, οι ΗΠΑ και η Αυστραλία.



**Διάγραμμα 1.1:** Η εξέλιξη της παραγωγής στις Μεσογειακές χώρες τα τελευταία 28 χρόνια (Πηγή ΙΟΕ).

Για την προέλευση της ελιάς, έχουν διατυπωθεί διάφορες εκδοχές, ωστόσο σε μια από τις επικρατέστερες, η ελιά κατάγεται από την ευρύτερη γεωγραφική περιοχή που ορίζεται από τις ακτές της Ανατολικής Μεσογείου, την Μέση Ανατολή, το Ιράν και τους πρόποδες του Νότιου Καυκάσου. Σύμφωνα με αυτή την εκδοχή, η αρχή της ελαιοκαλλιέργειας χρονολογείται πριν περίπου 6.000 χρόνια στην ανατολική Μεσογειακή περιοχή και πιο συγκεκριμένα την αρχαία Περσία και τη Μεσοποταμία από όπου εξαπλώθηκε στη Συρία και την Παλαιστίνη ( Kiritsakis and Shahidi 2017). Σε μια άλλη εκδοχή, κατά την διάρκεια της τελευταίας περιόδου των παγετώνων, το δέντρο της ελιάς διασώθηκε σε δύο περιοχές – καταφύγια, την Συρία και την Βορειοδυτική Αφρική ( Kostelenos 2011).

Από την Ανατολική Μεσόγειο και την Μέση Ανατολή, η καλλιέργεια της ελιάς, επεκτάθηκε στην Κρήτη και τα νησιά του Αιγαίου και στον υπόλοιπο Ελλαδικό χώρο. Στην συνέχεια, μέσω του εμπορίου και του εμπορίου, η ελιά μεταφέρθηκε στην Νότιο Ιταλία και από εκεί στην υπόλοιπη λεκάνη της Μεσογείου και κυρίως στην Ιβηρική χερσόνησο και την Βόρεια Αφρική. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στην ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου, που εμφανίζεται σε αρκετά νησιά του

Αιγαίου. Στο νησί της Νάξου, υπάρχει η Γεροντοελιά, η οποία έχει χάσει τον κεντρικό της κορμό, και σήμερα αποτελείται από περιμετρικούς κορμούς συνολικής διαμέτρου στα 29 μέτρα. Η ηλικία της συγκεκριμένης ελιάς, εκτιμάται ότι υπερβαίνει τα 5000 έτη, και αποδεικνύει την καλλιέργεια της στον Ελλαδικό χώρο την συγκεκριμένη περίοδο. Το δέντρο αυτό αποτελεί πολύ σημαντικό στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η Ελλάδα είναι η κοιτίδα της συστηματικής καλλιέργειας της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου. Από το συγκεκριμένο δέντρο, και στα πλαίσια της παρούσας διατριβή είχαμε την δυνατότητα να επεξεργαστούμε τον καρπό και να μελετήσουμε τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του.



**Εικόνα 1.1:** Η Γεροντοελιά της Νάξου.

Στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, ως Βόρειο φυσικό όριο θεωρείται η χερσόνησος της Κριμαίας, ενώ Ανατολικά, ως φυσικό όριο θεωρείται το Ιράν. Στο Νότιο τμήμα της λεκάνης της Μεσογείου, η έρημος της Σαχάρας θεωρείται ως το όριο για την καλλιέργεια της ελιάς. Τέλος ως Δυτικό όριο θεωρούνται οι ακτές της Ιβηρικής χερσονήσου και της ΒΔ Αφρικής

Σε χώρες μακριά από την λεκάνη της Μεσογείου, η καλλιέργεια της ελιάς, πραγματοποιήθηκε πολύ αργότερα. Στην ήπειρο της Αμερικής πρωτοκαλλιεργήθηκε μετά την ανακάλυψή της, το 1492 όπου Ισπανοί και Πορτογάλοι ερευνητές έφτιαξαν τους πρώτους ελαιώνες στις περιοχές όπου το κλίμα προσομοίαζε με το Μεσογειακό, και κυρίως στην περιοχή της Καλιφόρνιας. Ωστόσο η καλλιέργεια της ελιάς στις περιοχές αυτές, αναπτύχθηκε έντονα μόλις στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Τέλος, στην ήπειρο της Αυστραλίας, η ελιά καλλιεργήθηκε μόλις το 1800 από Ιταλούς μετανάστες.

### 1.3 Ποικιλίες ελιάς.

Για τις ποικιλίες της ελιάς, υπάρχουν διαφορετικές εκδοχές για τον αριθμό των ποικιλιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. Κατά μια εκδοχή, ο αριθμός αυτών, ανέρχεται σε 45-50 διαφορετικές ποικιλίες (επιτραπέζιες και ελαιοποιήσιμες), ενώ κατά άλλες εκδοχές ο αριθμός αυτός, φτάνει ακόμα και τις 100 ποικιλίες.

**Πίνακας 1.2:** Ελληνικές Ποικιλίες Ελιάς.

<b>Μικρόκαρπες</b>	<b>Μεσόκαρπες</b>	<b>Μεγαλόκαρπες</b>
Αρίκομπη*	Αγουρομάνακο*	Αετονυχολιά
Ασπρολιά*	Αδραμυττινη*	Αμυγδαλολιά*
Θιακή*	Ασπρολιά Αλεξ/πολης	Αρβανιτολιά Σερρών
Θιακή Πλεξιδένια*	Ασπρολιά Λευκάδος*	Ασπρολιά Χαλκιδικής
Κορφολιά Κεφαλληνίας*	Βαλανολιά*	Βασιλικάδα*
Κορωνέικη*	Βρασταμίνη	Βρώσιμη Αττικής
Κουτσουρελιά*	Γαλατσάνικη*	Γαϊδουρολιά*
Λιανολιά Κερκύρας*	Γκούμες Σερρών	Δαφνολιά Χαλκιδικής*
Λιανομάνακο Τυρού*	Γκρατζουνιέρα	Καλαμών*
Μανιάτικη*	Γλυκομάνακο	Καρολιά Λέσβου*
Μαστοειδής η κοινή*	Δαφνολιά Αιγαίου	Καρυδολιά ΓΠΑ*
Μαστοειδής η μεγαλόκαρπη*	Θασίτικη	Καρυδολιά Χαλκιδικής
Μαστοειδής ΝΚ Γίγας*	Θρουμπολιά	Κολυμπάδα*
Ματολιά*	Καλοκαιρίδα*	Κονσερβολιά*
Μαυρολιά Λευκάδας*	Καλολιά Κορακολιά	Σαλώνιτσα
Μαυρολιά Μεσσηνίας*	Καρολιά Ρόδου	Στρογγυλολιά*
Μοθωνιά Αιγιαλείας*	Καρυδολιά Σπετσών*	Ψαρολιά Ιστιαίας
Μποτσικολιά*	Καρυδολιά Τροιζηνίας	
Μπρατσέρα Κορινθίας*	Κλωνάρες Κορσίου*	
Μπρουτσολιά*	Κοθρέικη*	
Ντόπια Ατσίχολου*	Κολυρέικη*	
Ντόπια Ζακύνθου*	Λαδολιά Λέσβου	
Ντόπια Κεφαλληνίας*	Λευκολιά Σερρών	
Πιτσουνολιά Ζακύνθου*	Μαρωνείας*	
Πλεξιδολιάς Λευκάδος*	Μαυρολιά Σερρών	
Ραχάτη*	Μεγάρων*	
Ρωμέικη Αμαλιάδας*	Μωραϊτική	
Σμερτολιά*	Ντόπια Βέροιας	
Τραγολιά*	Πετρολιά Σερρών	
	Πικρολιά*	
	Πιτσαδέικη	
	Τσακωνική	
	Χονδρολιά Ηγ/τσας*	

**Όλες οι ποικιλίες αναφέρονται στο βιβλίο (Κωστελένος 2011)  
Οι ποικιλίες που αναγράφονται με αστερίσκο (\*), αναφέρονται και στον ‘Εθνικό Κατάλογο Ποικιλιών Δενδρωδών Καλλιεργειών’.**

## 1.4 Χημική σύσταση Ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά κύριο λόγο από τριγλυκερίδια (τριάκυλο γλυκερόλες). Ωστόσο, σε σημαντικά μικρότερες ποσότητες θα βρούμε και άλλα συστατικά όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, φωσφατίδια, χρωστικές, στερόλες, πτητικά συστατικά, φαινόλες κ.α. Από χημικής απόψεως, το ελαιόλαδο χωρίζεται στο σαπωνοποιήσιμο κλάσμα το οποίο καταλαμβάνει περίπου το 98% της συνολικής σύστασης του ελαιολάδου και περιλαμβάνει τα λιπαρά οξέα και στο μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα που περιέχει όλα τα υπόλοιπα συστατικά. Στα επόμενα θα δούμε τις κύριες κατηγορίες ενώσεων που περιέχονται στο ελαιόλαδο, καθώς και κάποια στοιχεία από την βιοσύνθεσή τους στο δέντρο της ελιάς.

### Λιπαρά οξέα.

Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου αποτελείται από τα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα με μακριά ανθρακική αλυσίδα. Όπως θα δούμε και παρακάτω, λόγω του μηχανισμού βιοσύνθεσης, τα λιπαρά οξέα, αποτελούνται από άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα, και διακρίνονται σε κορεσμένα οξέα, τα οποία αποτελούν το 15-23% των λιπαρών οξέων και σε ακόρεστα, που αντιπροσωπεύουν το 75-85%, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη, διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα. Επίσης οι διπλοί δεσμοί, όπου αυτοί υπάρχουν, έχουν *cis* διαμόρφωση. Στο ελαιόλαδο εβρίσκονται κυρίως το παλμιτικό οξύ (C16:0), το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1), το λιγελαϊκό (C18:2), και το λινολενικό οξύ (C18:3). Σε μικρότερη περιεκτικότητα συναντάμε και άλλα οξέα όπως το μυριστικό οξύ (C14:0), το επταδεκανοϊκό, το εικοσανοϊκό οξύ και το *cis* βαξενικό οξύ. Το τελευταίο μάλιστα, σύμφωνα με πολύ πρόσφατη εργασία, εντοπίζεται στο ελαιόλαδο σε σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες από ότι αρχικά είχε υπολογιστεί, οι οποίες φτάνουν το 3% του συνόλου της σύστασης σε λιπαρά οξέα (Rotondo et al. 2020).

Η σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση του δείγματος, την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού. Τα λιπαρά οξέα βρίσκονται σε πολύ μικρό βαθμό στην ελεύθερη μορφή τους. Στο μεγαλύτερο βαθμό βρίσκονται εστεροποιημένα ανά τρία σε ένα μόριο γλυκερόλης σχηματίζοντας τα τριγλυκερίδια. Σε μικρό βαθμό επίσης συναντάμε τις διακυλογλυκερόλες και τις ακυλογλυκερόλες, δηλαδή μόρια γλυκερόλης συνδεδεμένα με 1 ή 2 μόρια λιπαρού οξέος

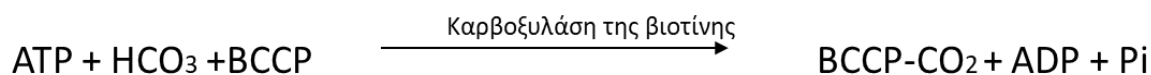
καθώς επίσης και ελεύθερη γλυκερόλη, ως αποτέλεσμα υδρόλυσης ή μερικής βιοσύνθεσης της τριακυλογλυκερόλης.

#### *Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στον καρπό της ελιάς.*

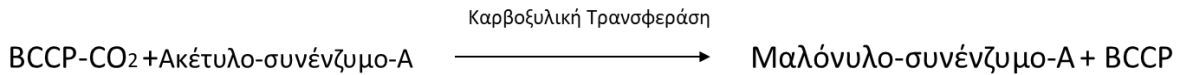
Κυρίαρχο ρόλο στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, παίζει το ακέτυλο συνένζυμο A. Για την βιοσύνθεση του έχουν βρεθεί τρία διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια. Το πρώτο, περιλαμβάνει τον σχηματισμό πυροσταφυλικού οξέος από υδατάνθρακες, μέσω γλυκόλυσης, και στην συνέχεια αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού στα πλαστίδια του καρπού της ελιάς από κατάλληλο ένζυμο. Ένα δεύτερο βιοσυνθετικό μονοπάτι, περιλαμβάνει τον σχηματισμό του πυροσταφυλικού οξέος μέσα στα πλαστίδια από την αποκαρβοξυλίωση μηλικού άλατος. Το τρίτο βιοσυνθετικό μονοπάτι περιλαμβάνει τον σχηματισμό του ακέτυλο συνένζυμου A από πυροσταφυλικό οξύ στα μιτοχόνδρια. Το πυροσταφυλικό υδρολύεται σε οξικό άλας, και μεταφέρεται στα πλαστίδια, όπου ενεργοποιείται με την βοήθεια της συνθάσης του ακέτυλο συνένζυμου A. Η σύνθεση των λιπιδίων του ελαιολάδου, είναι μια διεργασία που πραγματοποιείται στα πλαστίδια, και απαιτεί την συνδυαστική δράση δύο συνενζύμων, της καρβοξυλάσης του ακέτυλο συνένζυμου A και της συνθάσης των λιπαρών οξέων.

Η καρβοξυλάση του ακέτυλο συνένζυμου A, καταλύει τον σχηματισμό του μαλόνυλο συνένζυμου A, που αποτελεί και την πρώτη αντίδραση στην σύνθεση των λιπαρών οξέων και θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο, στην ρύθμιση της παραγωγής λιπαρών οξέων σε διάφορους ιστούς των φυτών. Η αντίδραση αυτή, περιλαμβάνει την συμμετοχή της βιοτίνης, και χαρακτηρίζεται από την υδρόλυση του ATP. Η αντίδραση αυτή επίσης, λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Το ένζυμο που συμμετέχει, είναι ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από τρεις τουλάχιστον πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η καρβοξυλάση της βιοτίνης, η καρβοξυλική τρανσφεράση και η πρωτεΐνη BCCP.

- Στο πρώτο στάδιο η βιοτίνη (BCCP) καρβοξυλιώνεται από το ένζυμο καρβοξυλάση.



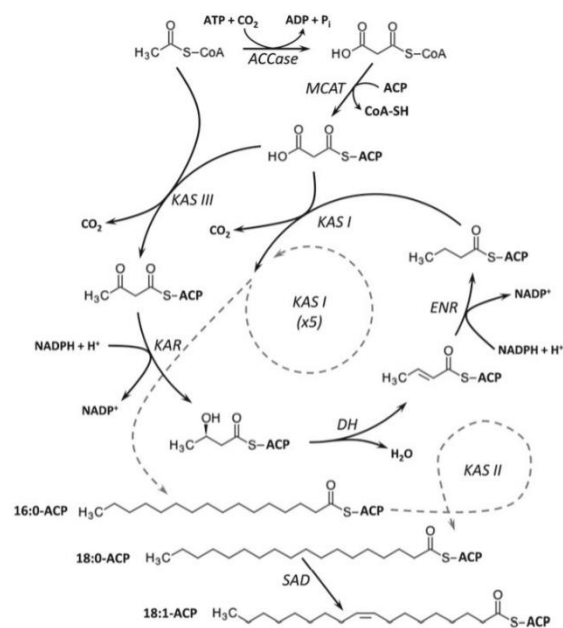
- Στο δεύτερο στάδιο το διοξείδιο του άνθρακα μεταφέρεται στο ακέτυλο συνένζυμο-A σχηματίζοντας το μαλόνυλο συνένζυμο A



Για την έναρξη της σύνθεσης των λιπαρών οξέων, απαραίτητη είναι η πρόσδεση της ακέτυλο-ομάδας (CH<sub>3</sub>CO-) του ακέτυλο-CoA και της μαλόνυλο-ομάδας (HOOC-CH<sub>2</sub>-CO-) του μαλόνυλο-CoA στην πεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου που ονομάζεται ακυλοφέρουσα πρωτεΐνη (ACP).

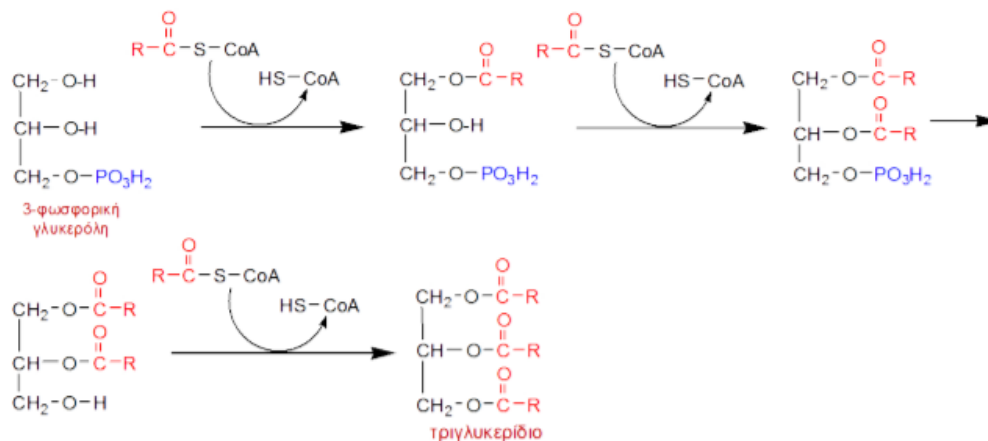
Έτσι το ακέτυλο-ACP (CH<sub>3</sub>-CO-ACP) και το μαλόνυλο-ACP (HOOC-CH<sub>2</sub>-CO-ACP) συμμετέχουν σε αντίδραση συμπύκνωσης, όπου με την απομάκρυνση ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα σχηματίζουν μια νέα πρωτεΐνη, την ακετακέτυλο-ACP. Στην συνέχεια πραγματοποιείται αναγωγή προς σχηματισμό του β-υδρόξυ-άκυλο-ACP το οποίο με την απομάκρυνση ενός μορίου νερού σχηματίζει το ένολο -ACP. Με εκ νέου αναγωγή, σχηματίζεται η βουτυρυλο-ACP με τέσσερα άτομα άνθρακα. Αυτή είναι και η κύρια δομική μονάδα του λιπαρού οξέος.

Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται επιμήκυνση της αλυσίδας του λιπαρού οξέος. Μια νέα ακέτυλο ομάδα συνδέεται στην πρωτεΐνη ACP η οποία με αντίδραση συμπύκνωσης αντιδρά με την μαλόνυλο ACP. Η σχηματιζόμενη β-ακέτυλο ACP συμμετέχει στις ίδιες αντιδράσεις αναγωγής-αφυδάτωσης-αναγωγής με τελικό αποτέλεσμα, την επιμήκυνση της αλυσίδας κάθε φορά κατά δύο άτομα άνθρακα. Στο τέλος της επιμήκυνσης, σχηματίζεται η παλμίτυλο-ACP που αποτελείται από 16 άτομα C. Στην πρωτεΐνη αυτή γίνεται μια επιπλέον επιμήκυνση με την βοήθεια διαφορετικών ενζύμων προς τον σχηματισμό της στεαρυλο ACP με 18 άτομα C.



Στο τελικό στάδιο γίνεται ο διαχωρισμός των λιπαρών οξέων. Ανάλογα με την παρουσία και την ενεργότητα κάποιων ενζύμων, έχουμε τον σχηματισμό διαφορετικών λιπαρών οξέων, που καθορίζουν την τελική αναλογία σε λιπαρά οξέα στο τελικό έλαιο. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) που είναι και το πιο αντιπροσωπευτικό λιπαρό οξύ του ελαιολάδου, σχηματίζεται με την απόσπαση δύο ατόμων υδρογόνου από την στεαρυλο-ACP, μια ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την 9-ακορεστάση της στεαρυλο ACP. Το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ, σχηματίζεται από το ελαϊκό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου ακορεστάση του ελαϊκού οξέος.

Τα λιπαρά οξέα, ωστόσο, βρίσκονται σε πολύ μικρό βαθμό υπό την ελεύθερη μορφή τους στο ελαιόλαδο. Μετά την βιοσύνθεσή τους συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων η οποία πραγματοποιείται μετά από αλληπάλληλες ακυλιώσεις ενός μορίου της 3 φωσφο-γλυκερόλης και σύνδεσης λιπαρών οξέων στο μόριο (Harwood and Salas 2013).



#### Φαινολικά συστατικά.

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες συστατικών του μη σαπωνοποιησίμου κλάσματος του ελαιολάδου. Οι βιολογικές τους ιδιότητες, όπως θα δούμε σε επόμενη παράγραφο, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και τα τελευταία χρόνια γίνεται σημαντική προσπάθεια ώστε να αποσαφηνιστούν όλοι οι μηχανισμοί δράσης των συστατικών αυτών.

Ως φαινόλες, χαρακτηρίζονται όλα τα συστατικά που περιέχουν τουλάχιστον ένα βενζολικό δακτύλιο και ένα ή περισσότερα υδροξύλια στο βενζολικό δακτύλιο. Μπορεί να είναι απλές φαινόλες (με ένα βενζολικό δακτύλιο), φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή ή σεκοϊριδοειδή. Ωστόσο πολύ συχνά, και λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των σεκοϊριδοειδών και των απλών φαινολών σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες των φαινολικών συστατικών, όταν αναφερόμαστε στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, αναφερόμαστε κυρίως στις απλές φαινόλες και στα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου. Παρακάτω παρουσιάζονται οι βασικές κατηγορίες φαινολικών συστατικών.

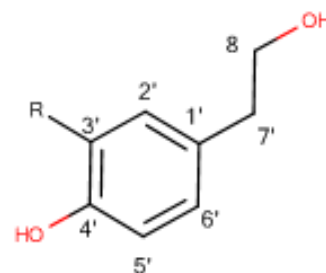
Τα φαινολοξέα, είναι αρωματικά συστατικά που εμπεριέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο, και μια καρβοξυλική ομάδα. Στο ελαιόλαδο συναντάμε υδροξυ-βενζοϊκά οξέα όπως το γαλλικό, το πρωτοκατεχικό οξύ και το 4 υδροξυβενζοϊκό οξύ, υδροξυκιναμωμικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ καθώς και όρθο- και πάρα- κουμαρικά οξέα.



Άλλη μια κατηγορία φαινολικών συστατικών αποτελούν οι λιγνάνες. Τα λιγνάνια και συγκεκριμένα η (+)-1-ακετόξυ-πινορεσινόλη και η (+)-πινορεσινόλη, μπορούν να φτάσουν σε συγκέντρωση μέχρι και τα 100 mg/kg ελαιολάδου.

Οι φαινολικές αλκοόλες, ή απλές φαινόλες, αποτελούν μια σημαντική κατηγορία φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου. Οι κυριότερες απλές φαινόλες του ελαιολάδου, είναι η τυροσόλη **(1)** και τη υδροξυτυροσόλη **(2)**.

Η παρουσία των συστατικών αυτών στον καρπό της ελιάς, είναι αποτέλεσμα είτε της υδρόλυσης των συστατικών του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης αντίστοιχα, είτε κομμάτι της βιοσύνθεσής τους. Τα σεκοϊριδοειδή, αποτελούν την σημαντικότερη κατηγορία φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος. Αποτελούνται από μια δομική μονάδα τυροσόλης ή υδροξυτυροσόλης, εστεροποιημένη με ένα παράγωγο ελενολικού οξέος. Τα σεκοϊριδοειδή προέρχονται από τους μεταβολίτες του καρπού της ελιάς την ελευρωπαΐνη και τον λιγκστροσίδη τα οποία, όπως θα δούμε και σε επόμενο κεφάλαιο, κατά την διαδικασία ελαιοποίησης του καρπού της ελιάς μετατρέπονται στις άγλυκες μορφές.

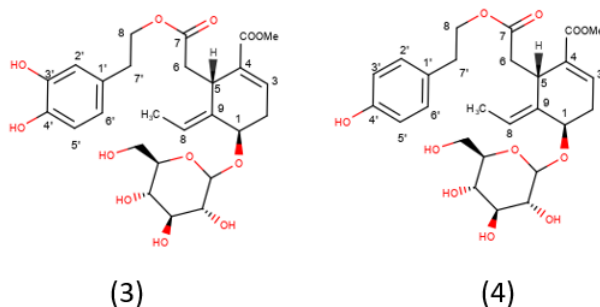


#### Βιοσύνθεση σεκοϊριδοειδών.

Η βιοσύνθεση των πρόδρομων μεταβολιτών των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου, γίνεται στον καρπό της ελιάς. Τα τερπένια και τα σεκοϊριδοειδή συντίθενται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος του δευτερογενούς μεταβολισμού, ενώ οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να προκύψουν μέσω δύο οδών. Η πρώτη, είναι η οδός του σικιμικού οξέος από την οποία προκύπτουν τα αρωματικά αμινοξέα, τα κινναμωμικά και τα βενζοϊκά οξέα καθώς επίσης και τα λιγνάνια. Από την δεύτερη οδό αυτή του οξικού οξέος, προκύπτουν πολυ-β-κετο-εστέρες οι οποίοι οδηγούν σε πολυκυκλικά παράγωγα όπως είναι οι χρωμόνες, οι κινόνες κλπ. Τα φλαβονοειδή προκύπτουν από τον συνδυασμό των δύο οδών.

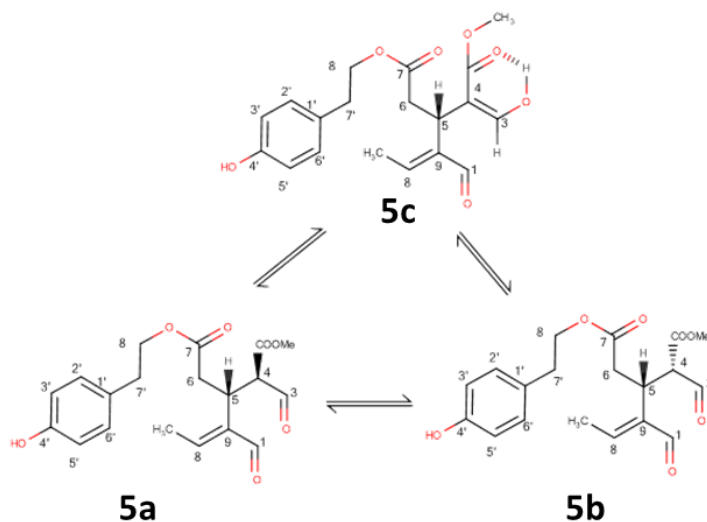
Τα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου, όπως ήδη αναφέρθηκε, προέρχονται από την ελευρωπαΐνη **(3)** και τον λιγκστροσίδη **(4)**. Στην οικογένεια Oleaceae, η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροσίδης βιοσυντίθενται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος από το οποίο προκύπτουν οι ολεοσίδες (Obied et al. 2008).

Στα πρώτα στάδια της βιοσύνθεσης από το μεβαλονικό οξύ προκύπτουν οι πρόδρομες ενώσεις της λογανίνης, και συγκεκριμένα η γερανιόλη, η 10-υδροξυγερανιόλη και η ιριδοδιάλη. Στην συνέχεια το δεόξυλογανικό οξύ, το 7-επιλογανικό οξύ, και το λογανικό οξύ οδηγούν στον σχηματισμό του λιγκτροσίδης. Ο λιγκτροσίδης αποτελεί και την πρόδρομη ένωση της ελευρωπαΐνης



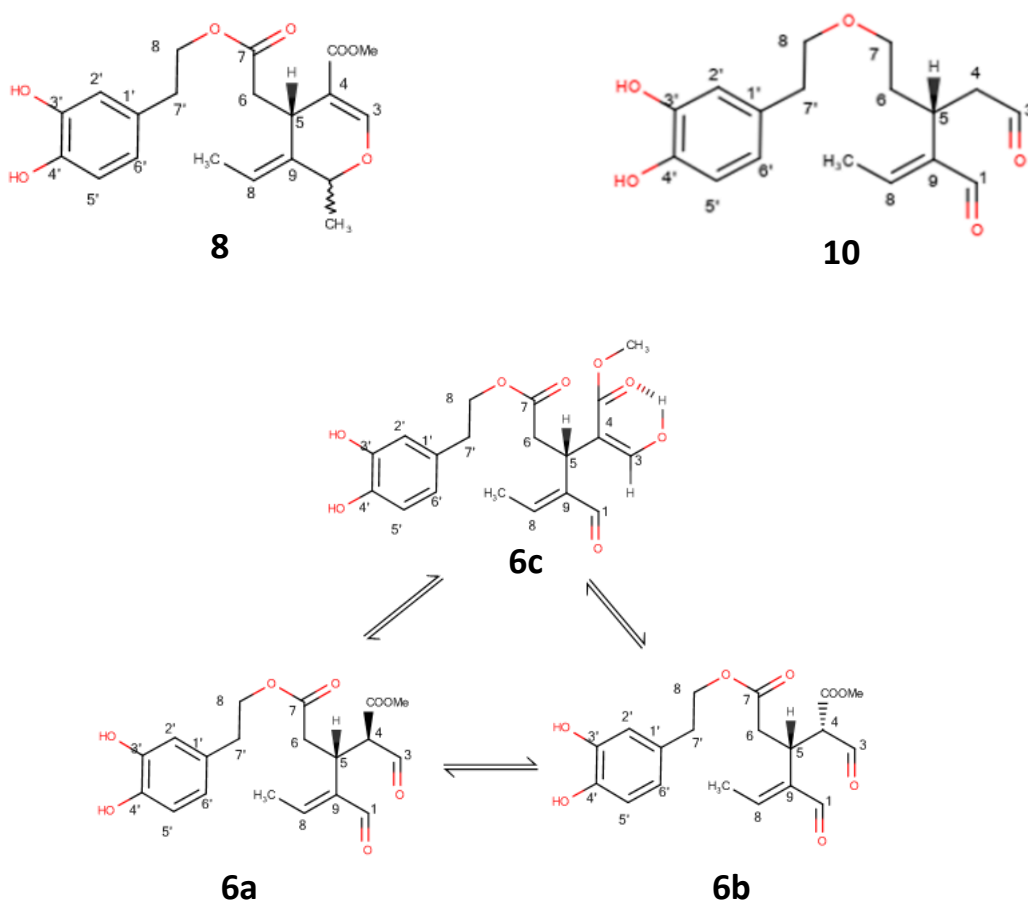
Η ελευρωπαΐνη και ο λιγκτροσίδης σχηματίζονται από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού της ελιάς, ενώ στα επόμενα στάδια της ωρίμανσης του καρπού, οι συγκεντρώσεις τους μειώνονται.

Το μόριο της γλυκόζης που περιέχουν η ελευρωπαΐνη και ο λιγκτροσίδης, καθιστά τις ενώσεις αυτές αδιάλυτες στο ελαιόλαδο. Κατά την ελαιοποίηση του καρπού, το ένζυμο β- γλυκοσιδάση απομακρύνει το μόριο της γλυκόζης και με την βοήθεια και άλλων ενζύμων έχουμε τον σχηματισμό των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου. Τα κυριότερα σεκοϊριδοειδή παράγωγα τυροσόλης στο ελαιόλαδο, είναι η ελαιοκανθάλη (**9**), η μονοαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδης (**7**), ενώ το 2012 από το εργαστήριο μας παρουσιάσαμε και δύο διαλδεϋδικές (λιγκτροδιάλες **5a,5b**) και μια ενολική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδης (ελαιοκωρονάλη **5c**), οι οποίες δεν μπορούν να διαχωριστούν και βρίσκονται σε διαρκή ισορροπία μεταξύ τους, και για λόγους ευκολίας, στην παρούσα διατριβή θα αναφέρονται συνολικά με το όνομα ελαιοκωρονάλη.



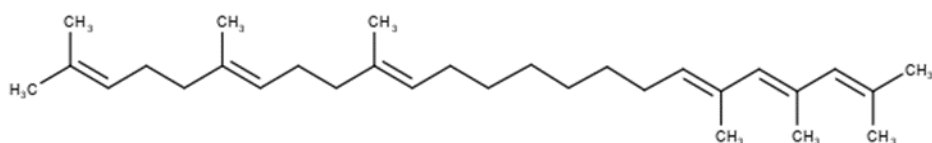


Τα κυριότερα παράγωγα υδροόξυ-τυροσόλης στο ελαιόλαδο, είναι η ελαιασίνη (**10**), η μονοαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (**8**) καθώς και, ομοίως με την περίπτωση των παραγώγων τυροσόλης, οι δύο διαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (ελευρωπαΐνοδιάλες **6a,6b**) και μια ενολική μορφή (Ελαιομισσιονάλη **6c**), που για λόγους ευκολίας θα αποκαλείται ως Ελαιομισσιονάλη.



## Υδρογονάνθρακες.

Στο ελαιόλαδο οι κύριοι υδρογονάνθρακες είναι το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Σε μικρότερη ποσότητα συναντάμε άλλα συστατικά που ανήκουν στις ομάδες των διτερπενίων και των τριτερπενίων, ισοπρενοειδών και η-παραφινών. Το σκουαλένιο αποτελεί το 90% των υδρογονανθράκων και στο ελαιόλαδο η συγκέντρωσή του κυμαίνεται μεταξύ 136-700 mg/100g.

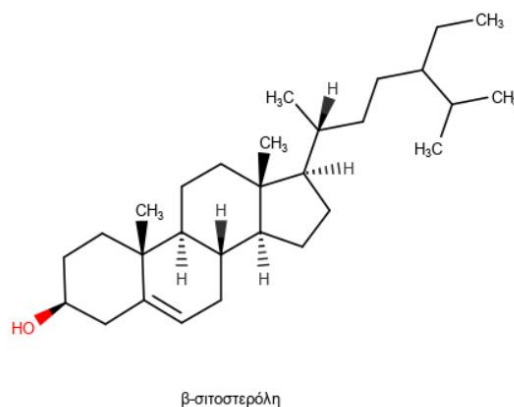


Το σκουαλένιο αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της βιοσύνθεσης των στερολών. Είναι ένας πολυακόρεστος υδρογονάνθρακας με τριάντα άτομα άνθρακα. Στα βρώσιμα έλαια έχει εντοπιστεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις (10.2–49.3 mg/100 g) με εξαίρεση το ελαιόλαδο, στο οποίο εντοπίζεται σε σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες (136-700 mg/100 g) (Kalogeropoulos 2009) γεγονός που το καθιστά έναν εν δυνάμει δείκτη νοθείας του ελαιολάδου. Το σκουαλένιο, όπως και οι υπόλοιποι υδρογονάνθρακες, μειώνουν την συγκέντρωσή τους με την ωρίμανση του καρπού.

## Στερόλες.

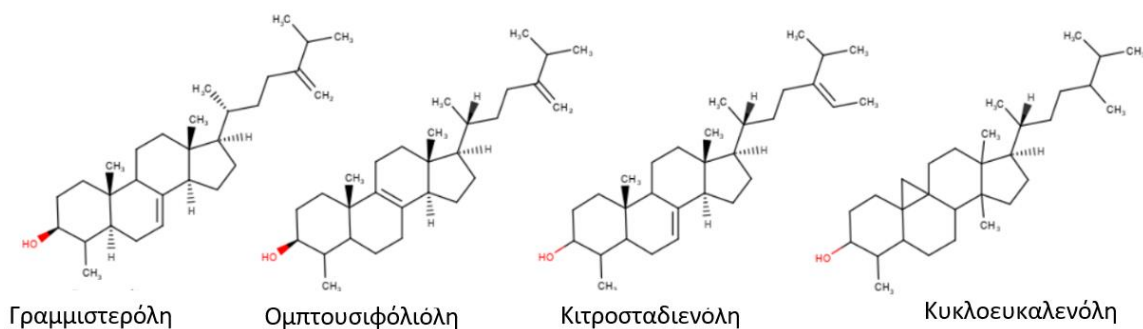
Στο ελαιόλαδο συναντάμε 4 κατηγορίες στερολών. Τι κοινές στερόλες, τις 4α-μεθυλοστερόλες, τις τριτερπενικές διαλκοόλες, και τις τριτερπενικές αλκοόλες. Οι περιεκτικότητά τους στο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 1000-2000 mg/kg (Boskou 2006)

Τα κύρια συστατικά του κλάσματος των τριτερπενικών διαλκοολών είναι, η β-αμυρίνη, η βουτυροσπερμόλη, η 24-μεθυλενοκυκλοαρτανόλη και η κυκλοαρτενόλη, ενώ οι σημαντικότερες τριτερπενικές αλκοόλες που απαντούν στο ελαιόλαδο είναι η α- και η β-αμυρίνη. Οι κοινές στερόλες συναντώνται είτε υπό την ελεύθερη είτε υπό την εστεροποιημένη μορφή. Η βασική δομική μονάδα είναι η β-σιτοστερόλη η οποία αντιπροσωπεύει το 75-90% των στερολών. Οι 4-μεθυλ-στερόλες αποτελούν



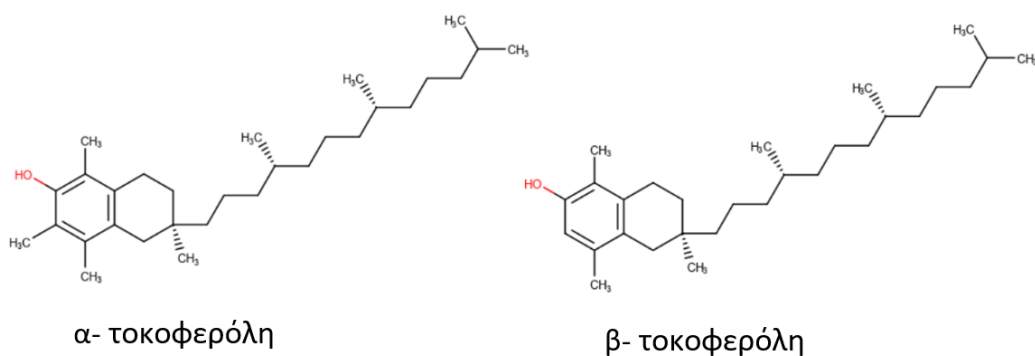
β-σιτοστερόλη

ενδιάμεσο προϊόν της βιοσύνθεσης των στερολών και τις συναντάμε είτε υπό την ελεύθερη, είτε υπό την εστεροποιημένη τους μορφή. Οι βασικότερες στερόλες της κατηγορίας αυτής, είναι η ομππουσιφολιόλη, η γραμμιστερόλη, η κυκλοευκαλενόλη και η κίτροσταδιενόλη. Στο ελαιόλαδο η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται μεταξύ 50 και 360 mg/kg (Boskou 2006).



### Τοκοφερόλες.

Οι τοκοφερόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις. Η συγκέντρωση των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο, είναι περίπου 10 φορές χαμηλότερη σε σχέση με το σπορέλαιο. Οι τοκοφερόλες αποτελούν το 2-3% του μη σαπωνοποιήσιμου κλάσματος του ελαιολάδου. Από τις τοκοφερόλες (α,β,γ,δ), γνωστές και ως βιταμίνη Ε, η α-τοκοφερόλη συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο ελαιόλαδο (88%) ενώ σε σημαντικά ποσοστά βρίσκουμε και την β-τοκοφερόλη (10%). Όλες οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά των ελαιολάδων, αφού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και προστασία των λιπιδίων από την οξείδωση.



## Χρωστικές.

Οι κύριες χρωστικές του ελαιολάδου είναι η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή. Η χλωροφύλλη προσδίδει το πράσινο χρώμα στο ελαιόλαδο ενώ τα καροτενοειδή το κίτρινο. Οι χλωροφύλλες, όπως θα δούμε και σε επόμενο κεφάλαιο, λειτουργούν ως φωτοευαισθητοποιητές. Παρουσία φωτός, επιταχύνουν την οξείδωση των λιπιδίων, ενώ απουσία φωτός δρουν ως αντιοξειδωτικά. Σε φρέσκα παρθένα ελαιόλαδα το συνολικό άθροισμα της χλωροφύλλης α και β κυμαίνεται από 1 μέχρι 10 ppm και της φαιοφυτίνης α και β από 0,2 μέχρι 24 ppm. Με την πρόοδο της ωρίμανσης του ελαιόκαρπου μειώνεται η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε β-καροτένιο, κυμαίνεται από 330 έως 3690 mg/kg ελαιολάδου.

## Τριτερπενικά οξέα.

Τα τριτερπενικά οξέα εβρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο λάδι. Το ολεανολικό και το μασλινικό οξύ είναι τα κύρια τριτερπενικά οξέα στο παρθένο ελαιόλαδο. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία απαντώνται στην επιδερμίδα της ελιάς, από το οποίο εκχυλίζονται σε μικρή ποσότητα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του καρπού στο ελαιοτριβείο.

## 1.5 Μεσογειακή Διατροφή και ελαιόλαδο.

Η εξέλιξη της Μεσογειακής Διατροφής.

Οι διαταραχές της διατροφής, όπως ο υποσιτισμός και η παχυσαρκία, αποτελούν μαζί με την κλιματική αλλαγή τους βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου (Swinburn et al. 2019). Η Μεσογειακή Διατροφή αποτελεί ένα μοντέλο διατροφής με μακρά ιστορία, που εφαρμόζεται για αιώνες, ακόμα και σε περιοχές που δεν διαθέτουν τους απαραίτητους πόρους, γεγονός που την καθιστά ιδανική για την υιοθέτηση της σε παγκόσμια κλίμακα.

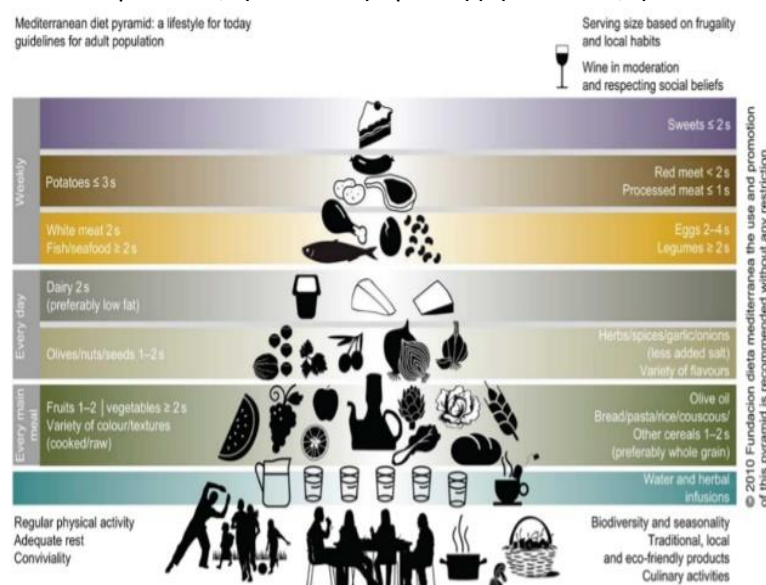
Η Μεσογειακή Διατροφή αποτελεί ένα μοντέλο διατροφής το οποίο δομήθηκε στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου πριν από χιλιάδες χρόνια και έκτοτε επηρεάστηκε από διαφορετικούς πολιτισμούς και ιδιαίτερες διατροφικές συνήθειες λαών, που με τον έναν ή τον άλλο τρόπο αλληλεπίδρασαν με τους πολιτισμούς της Μεσογείου. Στα κλασσικά χρόνια η μεσογειακή διατροφή ξεκίνησε να διαμορφώνεται και να περιγράφεται από κείμενα φιλοσόφων της εποχής όπως του Πλάτωνα (Skiadas and Lascaratos 2001) και του Ιπποκράτη (Minelli and Montinari 2019) οι οποίοι επισημαίνουν βασικά χαρακτηριστικά της μεσογειακής διατροφής αλλά και των υγειοπροστατευτικών της ιδιοτήτων. Το ίδιο μοντέλο διατροφής διατηρήθηκε και κατά την περίοδο άνθισης της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, με κύρια συστατικά της διατροφής το ελαιόλαδο, τον οίνο και το ψωμί. Στην διάρκεια του χρόνου διατήρησε αυτή την βάση διατροφής και σταδιακά ενσωμάτωσε νέα συστατικά ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των πολιτισμών στην περιοχή της Μεσογείου. Η αραβική διατροφή τους επόμενους αιώνες εισήγαγε την χρήση μπαχαρικών στην διατροφή ενώ ενίσχυσε την χρήση οσπρίων και δημητριακών που προϋπήρχαν στην Μεσογειακή Διατροφή (Hidalgo-Mora et al. 2020). Η μεσογειακή διατροφή συνέχισε να εμπλουτίζεται με την είσοδο στοιχείων διατροφής από τις αποικίες σε Αμερική, Αφρική και Ασία, φτάνοντας στην σημερινή της μορφή.

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα συστατικά που παρέμεινε βασικό στη Μεσογειακή διατροφή στο πέρασμα των αιώνων, και σε αυτό αποδίδονται πολλά από τα υγειοπροστατευτικά οφέλη της. Ο λόγος που το ελαιόλαδο αρχικά θεωρήθηκε αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής, είναι ότι θεωρήθηκε η ιδανική τροφή για την λήψη λιπιδίων.

## Υγαιοπροστατευτικά χαρακτηριστικά Μεσογειακής Διατροφής.

Αρχικά μέσω της παράδοσης και στην συνέχεια μέσω της έρευνας, η Μεσογειακή Διατροφή συσχετίστηκε με την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής. Τον προηγούμενο αιώνα, μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών ασχολήθηκε με τις υγαιοπροστατευτικές ιδιότητες της Μεσογειακής Διατροφής. Από τα πρώτα ερευνητικά ευρήματα, η υγαιοπροστατευτικότητα της μεσογειακής διατροφής συσχετίστηκε με την αντιοξειδωτική προστασία και την προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος αλλά και με ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος ασθενειών.

Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή, όπως αυτή έχει διαμορφωθεί την τελευταία δεκαετία, χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση λαχανικών, φρούτων, οσπρίων, ξηρών καρπών και δημητριακών. Η κατανάλωση κρέατος είναι περιορισμένη ενώ συνίσταται λελογισμένη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής είναι και η κατανάλωση μικρής ποσότητας αλκοόλ (κρασί) κυρίως σαν συνοδευτικό του γεύματος. Στο διαιτολόγιο αυτό, η συνολική πρόσληψη λιπιδίων, φτάνει σε αρκετά υψηλά επίπεδα (30-40%).



Το χαρακτηριστικό ωστόσο της Μεσογειακής Διατροφής, είναι ότι η πηγή λιπιδίων, περιέχει μεγάλη αναλογία ακόρεστων λιπαρών ως προς τα κορεσμένα. Μεγάλο ρόλο σε αυτό παίζει το ελαιόλαδο το οποίο είναι και η βασική πηγή πρόσληψης λιπιδίων στην μεσογειακή διατροφή (Antonia Trichopoulou et al. 2014).

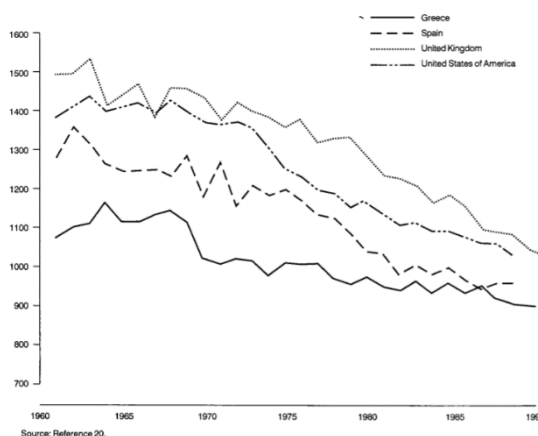
Η πρώτη μεγάλη επιδημιολογική μελέτη που έγινε σε σχέση με την Μεσογειακή Διατροφή είναι η γνωστή μελέτη των 7 χωρών που ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1950. Στην μελέτη αυτή για πρώτη φορά συσχετίστηκε το χαμηλό ποσοστό καρδιαγγειακών παθήσεων σε άτομα που ακολουθούσαν το μοντέλο της Μεσογειακής διατροφής σε σχέση με άλλα μοντέλα. Τα χαμηλά αυτά ποσοστά συσχετίστηκαν με το χαμηλό ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών, σε σχέση με τα μη κορεσμένα, τα οποία περιλαμβάνει η Μεσογειακή Διατροφή. Αυτό, όπως εξηγούν οι ερευνητές σχετίζεται με την μείωση της χοληστερόλης (την εποχή εκείνη δεν είχε γίνει διαχωρισμός των HDL και LDL) από την πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών (Keys et al. 1958). Στην μελέτη αυτή, οι κάτοικοι της Κρήτης αλλά και της Ιαπωνίας, εμφάνισαν χαμηλότερη θνησιμότητα



από όλες τις αιτίες, (στεφανιαίες νόσους, καρκίνο), καθώς στο διαιτολόγιο τους, είτε λόγω της κατανάλωσης ελαιολάδου, είτε λόγω της κατανάλωσης ψαριών, η πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των κορεσμένων. Ακόμα έγινε σύγκριση ανθρώπων που ζούσαν στην Ιαπωνία με ανθρώπους που είχαν καταγωγή από την Ιαπωνία, ωστόσο ζούσαν πλέον στην Αμερική και την Χαβάη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι άνθρωποι που ζούσαν στην Ιαπωνία, εμφάνιζαν σημαντικά λιγότερα καρδιαγγειακά προβλήματα σε σχέση με τους ανθρώπους που ζούσαν στην Αμερική και οι οποίοι είχαν αφομοιώσει το δυτικό μοντέλο διατροφής.

Την ίδια περίπου εποχή πραγματοποιήθηκε άλλη μια επιδημιολογική μελέτη, αυτή την φορά από τον Stout και τους συνεργάτες του το 1964, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι σε μια πολυπολιτισμική χώρα, τις ΗΠΑ, οι κάτοικοι μιας κοινότητας στην Πενσυλβάνια, της οποίας οι κάτοικοι ήταν πρώτης γενιάς Ιταλο-Αμερικανοί, τα ποσοστά των θανάτων από έμφραγμα του μυοκαρδίου, ήταν τα μισά από αυτά άλλων, γειτονικών συνοικιών. Το στατιστικό αυτό δεδομένο, αφορούσε ένα χρονικό διάστημα 10 ετών, και διατηρήθηκε αναλλοίωτο για τα επόμενα 30 χρόνια. Το φαινόμενο αυτό συσχετίστηκε με το ειδικό τους διαιτολόγιο που διατήρησαν οι Ιταλοί μετανάστες ερχόμενοι από την περιοχή της Μεσογείου, σε σχέση με τους υπόλοιπους κατοίκους των γειτονικών κοινοτήτων (Stout et al. 1964). Τα ίδια δεδομένα σχολίασαν και ο Wolf με τους συνεργάτες του, οι οποίοι εστίασαν τα συμπεράσματά τους τόσο στο χαμηλό στρες όσο και σε ένα μικρότερο βαθμό στο διαιτολόγιο των κατοίκων της συγκεκριμένης κοινότητας (Wolf 1966).

Οι παραπάνω μελέτες ήταν οι πρώτες οργανωμένες επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν με επίκεντρο το διαιτολόγιο διαφορετικών πληθυσμών και διήρκεσαν για πολλές δεκαετίες. Παράλληλα υπήρξαν και άλλες μελέτες βασιζόμενες στα στοιχεία του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (ΠΟΥ), οι οποίες έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα. Επίσης σε μελέτες με άλλα δεδομένα παρατηρήθηκε και πάλι το ίδιο φαινόμενο, λαοί της Μεσογείου όπως οι κάτοικοι της Ελλάδας και της Ισπανίας να εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά θανάτου από καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνο σε σχέση με λαούς της Βόρειας Ευρώπης ή της Αμερικής. Το ενδιαφέρον συμπέρασμα στις μελέτες αυτές, ήταν ότι οι λαοί της Μεσογείου εμφάνιζαν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής, την στιγμή που το σύστημα υγείας της χώρας τους ήταν κατώτερο από αυτό των βόρειων χωρών, καθώς επίσης εμφάνιζαν μεγαλύτερο ποσοστό καπνίστων σε σχέση με τις άλλες χώρες ( Trichopoulou and Lagiou 1997).



Οι παραπάνω μελέτες είναι μερικές από τις μεγαλύτερες επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν τον προηγούμενο αιώνα, και που σκοπό είχαν να υπερτονίσουν την σημασία του διατροφολογίου στην ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών οδήγησαν πολλούς ερευνητές να προχωρήσουν σε πιο επισταμένες κλινικές μελέτες, με σκοπό να τεκμηριώσουν πλήρως τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών γενικού πληθυσμού. Χαρακτηριστική είναι η μελέτη της Λυών, στην οποία οι ερευνητές εφάρμοσαν σε ένα μεγάλο αριθμό ατόμων οι οποίοι είχαν ήδη διαγνωσμένα καρδιαγγειακά προβλήματα, ένα ειδικό διατροφολόγιο που προσομοιάζει αυτό της μεσογειακής διατροφής συγκριτικά με μια συνηθισμένη διατροφή δυτικού τύπου. Η έρευνα εστίασε στην πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών, μέσω της χρήσης ελαιολάδου, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από 27 μήνες η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων στον πληθυσμό που ακολούθησε την μεσογειακή διατροφή, ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τον αντίστοιχο πληθυσμό που ακολούθησε μια συνηθισμένη διατροφή (de Lorgeril et al. 1994).

Οι παραπάνω μελέτες ανέδειξαν τις υγειοπροστατευτικές ιδιότητες της μεσογειακής διατροφής. Μέχρι και τα τέλη της δεκαετίας του 1990, οι επιστήμονες εστίαζαν στον ρόλο που παίζουν τα ακόρεστα λιπαρά στις καρδιαγγειακές παθήσεις, και στην μείωση της χοληστερόλης. Σε σημαντικό βαθμό οι ιδιότητες αυτές αποδόθηκαν στην χρήση ελαιολάδου ως πηγή πρόσληψης λιπαρών. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, με την πρόοδο που συντελέστηκε στις επιστήμες υγείας, οι επιστήμονες άρχισαν να εξειδικεύουν τις υγειοπροστατευτικές ιδιότητες μεμονωμένων συστατικών της μεσογειακής διατροφής πάνω σε συγκεκριμένες ασθένειες.

Στις αρχές της δεκαετίας του 2000, ξεκίνησε την Ισπανία η κλινική μελέτη PREDIMED, μια μελέτη που επικεντρώθηκε στην χρήση του ελαιολάδου μέσω της Μεσογειακής διατροφής, σε ανθρώπους με μεγάλο ρίσκο καρδιαγγειακών παθήσεων. Η επταετής αυτή μελέτη έδειξε ότι οι άνθρωποι που υιοθέτησαν το διατροφολόγιο αυτό συγκριτικά με τους ανθρώπους που ακολούθησαν ένα διατροφολόγιο χαμηλό σε λιπαρά, εμφάνισαν σημαντικά μικρότερο αριθμό καρδιαγγειακών επεισοδίων (Estruch et al. 2018). Από την ίδια μελέτη, προέκυψαν μια σειρά από άλλα ευρήματα, τα οποία έδειξαν ότι η χρήση ελαιολάδου στην διατροφή, επέφερε μείωση της γλυκόζης του αίματος, μείωση κάποιων αντιφλεγμονωδών δεικτών, που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση καθώς και σημαντική μείωση εμφάνισης κρουσμάτων καρκίνου του μαστού στις γυναίκες (Román et al. 2019).

Ο λόγος που οι περισσότεροι ερευνητές συσχετίζουν κάποια σημαντικά οφέλη της Μεσογειακής διατροφής με το ελαιόλαδο, είναι η σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα. Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από μεγάλη αναλογία μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών σε σχέση με τα κορεσμένα λιπαρά, αναλογία που σε άλλες πηγές πρόσληψης λιπιδίων είναι πολύ

χαμηλότερη, αν όχι αντίστροφη. Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά μεγάλη αναλογία από το ελαϊκό οξύ, που είναι μονοακόρεστο (~83%). Σε μικρότερα ποσοστά εβρίσκονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό οξύ (~5%), το α-λινολενικό οξύ (0,6%) και το γ-λινολενικό οξύ (0,4%). Αντίθετα σε μικρές αναλογίες βρίσκουμε την ομάδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων, όπως το παλμιτικό (6,5%) και το στεατικό οξύ (2,5%).

**Πίνακας 1.3:** Σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα ( Kiritsakis and Shahidi 2017).

<b>Λιπαρά οξέα</b>	<b>Αριθμός Ανθράκων</b>	<b>Επιτρεπτά όρια (%)</b>
<b>Μυριστικό οξύ</b>	C14:0	<0.03
<b>Παλμιτικό οξύ</b>	C16:0	7.5-20
<b>Παλμιτελαϊκό οξύ</b>	C16:1	0.3-3.5
<b>Επταδεκανοϊκό οξύ</b>	C17:0	<0.03
<b>Επταδεκανοϊκό οξύ</b>	C17:1	<0.03
<b>Στεατικό οξύ</b>	C18:0	0.5-5
<b>Ελαϊκό Οξύ</b>	C18:1	55-83
<b>Λινολεϊκό οξύ</b>	C18:2	2.5-21
<b>Λινελενικό οξύ</b>	C18:3	<1
<b>Αραχιδικό οξύ</b>	C20:0	<0.6
<b>Βεχενικό οξύ</b>	C22:0	<0.2
<b>Λιγνοκερικό οξύ</b>	C24:0	<0.2

Η σημασία των ακόρεστων λιπαρών έχει μελετηθεί εκτενώς από τους επιστήμονες σε σχέση με την προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος. Η πρόσληψη πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα, σε αντίθεση με τα κορεσμένα τα οποία την αυξάνουν (Kris-Etherton Penny M. 1999). Αποτέλεσμα των μελετών αποτελεί και ο ισχυρισμός υγείας από την ΕΕ (432/2012) που σχετίζεται με την πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών.

Το ελαϊκό οξύ, είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στο ελαιόλαδο και δρα προληπτικά στην ανάπτυξη αθηρωμάτων και των επακόλουθων θρόμβων μέσω της δημιουργίας μεγαλύτερης αναλογίας μονοακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά. Τα μονοακόρεστα λιπαρά σε πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί ότι αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, γνωστής και ως καλής χοληστερόλης (Román et al. 2019).

Σε επιδημιολογικές μελέτες έχει επισημανθεί ότι η επαρκής πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινελαϊκό οξύ, συσχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Σε στοχευμένες μάλιστα μελέτες διατροφικής παρέμβασης μάλιστα, έχει φανεί ότι η αντικατάσταση του 5% των θερμίδων που προέρχονται από κορεσμένα λιπαρά οξέα με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνει την LDL χοληστερόλη έως και 10%, οδηγώντας έτσι σε σημαντική μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακού νοσήματος (Marangoni et al. 2020).

Εκτός από την ακορεστότητα των λιπαρών οξέων, η σύσταση του ελαιολάδου διακρίνεται και από την απουσία trans λιπαρών. Η κατανάλωση τους μπορεί να επιφέρει πολύ σημαντικά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων. Σε περιπτώσεις που γίνεται κατανάλωση 1-3% της συνολικής ποσότητας λιπιδίων σε trans λιπαρά, αυξάνεται σημαντικά η πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακού νοσήματος κατά 23% (Mozaffarian et al. 2006).

Από τις ανωτέρω αναφορές, δημιουργείται βέβαια η πεποίθηση ότι η Μεσογειακή Διατροφή και το ελαιόλαδο έχουν συσχετισθεί με την πρόληψη από καρδιαγγειακά νοσήματα, κυρίως μέσω της μείωσης της LDL χοληστερόλης, και την αύξηση της HDL. Με τον όρο καρδιαγγειακά νοσήματα συνήθως αναφερόμαστε σε νόσους που σχετίζονται άμεσα με το κυκλοφορικό σύστημα αλλά αντιμετωπίζονται ξεχωριστά σαν κατηγορία και έχουν ως επίκεντρο την λειτουργία της καρδιάς. Τέτοια νοσήματα είναι η στένωση αορτής, θρόμβωση, ισχαιμικές καρδιοπάθειες κ.α. Η δυσλειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος επηρεάζει και επηρεάζεται από μια σειρά άλλων λειτουργιών του οργανισμού. Έτσι η κακή λειτουργία του συστήματος αυτού, συσχετίζεται πολλές φορές με τον σακχαρώδη διαβήτη, την υπέρταση, την αύξηση του βάρους σώματος, νόσους που συναποτελούν το λεγόμενο μεταβολικό σύνδρομο.

Με την σειρά τους, όλες αυτές οι παθήσεις σχετίζονται με μερικές από τις κυριότερες νόσους του ανθρώπινου οργανισμού, όπως είναι η ογκογένεση και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Σε επιδημιολογικές μελέτες που έχουμε ήδη αναφέρει, συχνά αναφέρεται ότι η υιοθέτηση ενός μοντέλου Μεσογειακής Διατροφής, αλλά και ειδικότερα η χρήση ελαιολάδου, οδηγεί σε στατιστικά μικρότερο αριθμό κρουσμάτων από τις νόσους που αναφέραμε πιο πάνω (Román et al. 2019; Hardman et al. 2016).

Στις περιπτώσεις των μελετών αυτών, που γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στο ελαιόλαδο ως συστατικό της Μεσογειακής Διατροφής, για πολλά χρόνια οι ερευνητές απέδιδαν τον υγειοπροστατευτικό χαρακτήρα του ελαιολάδου στην σύσταση σε λιπαρά οξέα. Οι ισχυρισμοί αυτοί σε ένα βαθμό έχουν επιβεβαιωθεί από *in vivo* πειράματα που δείχνουν τον ρόλο των ακόρεστων λιπιδίων στους μηχανισμούς γένεσης τέτοιων παθήσεων όπως για παράδειγμα στην γνωστική λειτουργία (Parrott and Greenwood 2007). Ωστόσο, στην βιβλιογραφία, θα βρούμε μεγάλο αριθμό μελετών που ασχολούνται με τις βιολογικές ιδιότητες του φαινολικού κλάσματος

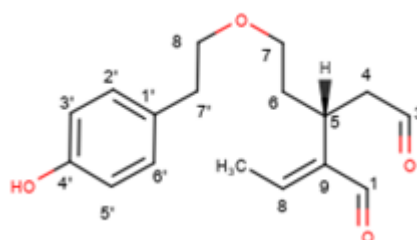
του ελαιολάδου. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, αρχικά θεωρήθηκαν, ως εν δυνάμει αντιοξειδωτικοί παράγοντες, που μαζί με το σύνολο των αντιοξειδωτικών παραγόντων που περιέχονται στα προϊόντα της Μεσογειακής Διατροφής, συνέβαλαν στον υγιοπροστατευτικό της χαρακτήρα. Γρήγορα όμως φάνηκε ότι τα φαινολικά συστατικά παρεμβαίνουν σε μια σειρά από μηχανισμούς και λειτουργίες του οργανισμού που σχετίζονται με σημαντικές παθήσεις.

Στις επόμενες παραγράφους θα δούμε μερικές από τις σημαντικότερες μελέτες που έχουν γίνει πάνω στις βιολογικές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου

## 1.6 Βιολογικές ιδιότητες φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

### 1.6.1 Ελαιοκανθάλη

Η ελαιοκανθάλη είναι ένα σεκοϊριδιειδές προερχόμενο από τον λιγκτροσίδη. Αποτελείται από ένα μόριο τυροσόλης, το οποίο είναι εστεροποιημένο με ένα μόριο δεκαρβομεθύξυ ελενολικού οξέος. Η ελαιοκανθάλη είναι το συστατικό του ελαιολάδου, που έχει μελετηθεί περισσότερο, ως προς τις βιολογικές του δράσεις. Από την βιβλιογραφία θα δούμε ότι έχει σημαντική δράση, σε μια σειρά από μηχανισμούς που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονές, ογκογέννεση και νευροεκφυλιστικές νόσους.



#### Αντικαρκινικές ιδιότητες:

Σημαντικά ευρήματα έχουν παρουσιαστεί από μελέτη με ορμονο-εξαρτώμενο καρκίνο του μαστού (Ayoub et al. 2017). Στην μελέτη αυτή η ελαιοκανθάλη έδειξε να ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού *in vitro*. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να εμποδίζεται η ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, ενώ όταν χορηγήθηκε και η ταμοξιφαίνη, ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της νόσου, φάνηκε να υπάρχει συνεργιστική δράση των δύο ουσιών. Όπως εξηγούν οι ερευνητές, η ελαιοκανθάλη δρα μέσω των υποδοχέων των οιστρογόνων μειώνοντας τα επίπεδα τους, ενώ σε *in vivo* πειράματα, είχε 97% ποσοστό επιτυχούς αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού σε ποντίκια. Σε παρόμοια εργασία αναφέρεται μάλιστα ότι η ελαιοκανθάλη παρεμποδίζει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων

του μαστού να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν μέσω ρύθμισης της έκφρασης καναλιού TRPC6, ενώ η δράση της φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στη βιολογία των μη καρκινικών κυττάρων (Diez-Bello et al. 2019).

Σε άλλη μελέτη, οι ερευνητές έδειξαν ότι η ελαιοκανθάλη αναστέλλει κατά το ήμισυ τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την διεισδυτικότητα των επιθηλιακών κυττάρων του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του προστάτη σε κυτταρικές σειρές, καθώς και τη φωσφορυλίωση της cMet κινάσης, η οποία ευθύνεται για μια σειρά από κακοήθειες (Elmagar, Sylvester, and El Sayed 2011; Akl et al. 2014).

Με την καρκινογένεση σχετίζονται άμεσα μια σειρά από πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με την ελαιοκανθάλη. Σύμφωνα με τον Cassiano και τους συνεργάτες του, η αλληλεπίδραση της ελαιοκανθάλης με πρωτεΐνες όπως οι HSP70 και HSP90, μπορεί αποτελέσει ένδειξη της αντικαρκινικής της δράσης (Cassiano et al. 2015). Άλλη μια πρωτεΐνη που σχετίζεται τόσο με την καρκινογένεση, όσο και με την νόσο Alzheimer, η mTOR, αναστέλλεται κατά 50% (IC50 708 nM) σε *in vitro* πειράματα (Khanfar et al. 2015).

Η αντικαρκινική δράση της ελαιοκανθάλης σε *in vitro* πειράματα παρουσιάστηκε και σε ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα πρόσφατης εργασίας έδειξαν ότι η ελαιοκανθάλη μείωσε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου και ταυτόχρονα προκάλεσε τον θάνατο πολλών καρκινικών κυττάρων σε συγκεντρώσεις 51-63 mM μέσα σε 24 ώρες (Pei et al. 2016).

Τον μηχανισμό δράσης της ελαιοκανθάλης κατά ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μελέτησαν και ο LeGendre και οι συνεργάτες του το 2015. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων, η ελαιοκανθάλη προκάλεσε τον θάνατο καρκινικών κυττάρων εκλεκτικά σε μόλις 30 λεπτά, μέσω τροποποίησης της διαπερατότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης. Τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να έχουν εύθραυστες λυσοσωμικές μεμβράνες, συγκριτικά με τα φυσιολογικά, με αποτέλεσμα η ελαιοκανθάλη να σκοτώνει εκλεκτικά μόνο τα καρκινικά κύτταρα (LeGendre, Breslin, and Foster 2015).

Σε *in vitro* μελέτη επισημάνθηκε η θετική επίδραση χορήγησης ελαιοκανθάλης σε καρκίνο του δέρματος χωρίς μελάνωμα. Τα εκχυλίσματα που περιείχαν ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη κατάφεραν να μειώσουν την βιωσιμότητα και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό αποικιών και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των άτυπων κερατινοκυττάρων (Polini et al. 2018). Ωστόσο η ελαιοκανθάλη έχει δείξει εκλεκτική αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα και σε ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος. Σε *in vitro* πειράματα, κυτταρικής βιωσιμότητας η ελαιοκανθάλη έδειξε αξιοσημείωτη και ειδική δράση στα

κύτταρα του μελανώματος έναντι των φυσιολογικών ινοβλαστών του δέρματος, με IC50 σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10  $\mu$ M) (Fogli et al. 2016). Τέλος σε πρόσφατη εργασία φανερώνουν την ίδια δράση τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα που αφορούν στο μελάνωμα. Η αντικαρκινική δράση οφείλεται σύμφωνα με τους ερευνητές στην αλληλεπίδραση που έχει η ελαιοκανθάλη με πρωτεΐνες που σχετίζονται με την βιολογία των καρκινικών κυττάρων (Gu et al 2017).

Έχει επίσης μελετηθεί η αντικαρκινική δράση και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως αυτές του καρκίνου του ήπατος και του παχέος εντέρου με εξίσου καλά αποτελέσματα (Cusimano et al. 2017).

### *Νόσος Alzheimer.*

Μια από τις πρώτες εργασίες σε σχέση με την νόσο Alzheimer και τα φαινορικά συστατικά του ελαιολάδου, επικεντρώθηκε στην ελαιοκανθάλη, ως μια ουσία ικανή να αλλάζει την κατάσταση συνδεσιμότητας των ολιγομερών του β-αμυλοειδούς-β1-42 πεπτιδίου (ADDL), το οποίο είναι μια νευροτοξίνη που προκαλεί τη νόσο του Alzheimer (AD). Η ελαιοκανθάλη αύξησε την ανοσοδραστικότητα των διαλυτών Αβ πλάκων, προκαλώντας αλλαγές στην δομή των ολιγομερών, και έδειξε ότι είναι ένα συστατικό, ικανό να προστατεύει τους νευρώνες από τις δράσεις της νευροτοξίνης αυτής (Pitt et al. 2009).

Σε παρόμοια εργασία ερευνητές μελέτησαν τη δυνατότητα της ελαιοκανθάλης να προάγει την απομάκρυνση από τον εγκέφαλο τοξικών πρωτεϊνών (Αβ πλάκες) που σχετίζονται με την νόσο Alzheimer. Η χορήγηση ελαιοκανθάλης τόσο σε εγκεφαλικά κύτταρα ποντικών όσο και σε ποντίκια οδήγησε σε αύξηση της δράσης της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (Ρ-gr) και του LDL λιποπρωτεϊνικού σχετιζόμενου με την πρωτεΐνη 1 υποδοχέα (LRP1). Οι πρωτεΐνες αυτές, ελέγχουν την μεταφορά ουσιών από και προς τον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα τον καθαρισμό του από τις Αβ πλάκες (Abuznait et al. 2013). Τον ίδιο μηχανισμό επιβεβαίωσαν αργότερα και άλλες μελέτες (Qosa et al. 2015).

Σε πρόσφατη εργασία έγινε μελέτη της επίδρασης της ελαιοκανθάλης στην ρύθμιση της τοξικότητας των ολιγομερών του β-αμυλοειδούς σε βασικά κύτταρα του νευρικού συστήματος (αστροκύτταρα) με *in vitro* πειράματα. Οι ερευνητές παρουσίασαν ότι η ελαιοκανθάλη εμποδίζει την απορρύθμιση των πρωτεϊνών SNAP-25 και PSD-95, που προάγονται από τα αβ-ολιγομερή στους νευρώνες, και μείωσε σε σημαντικό βαθμό την φλεγμονή που οφείλεται στα αβ-ολιγομερή με την απορρύθμιση των μεταφορέων γλουταμίνης (GLT1) και γλυκόζης (GLUT1) στα

αστροκύτταρα. Η δράση αυτή σχετίζεται άμεσα με την προστασία των νευρώνων και νευρικών κυττάρων από τα αβ-ολιγομερή και άρα την προστασία από την νόσο Alzheimer (Batarseh et al. 2017).

Η ίδια ομάδα ερευνητών, ένα χρόνο αργότερα, σε *in vivo* μελέτη, έδειξε ότι με τη χορήγηση ελαιολάδου, σαν φαρμακευτικό τρόφιμο (medicinal food), παράλληλα με την χορήγηση θεραπευτικής αγωγής με την δραστική ουσία donepezil, επετεύχθη μείωση του ΑΒ αμυλοειδούς και άλλων παθολογικών συμπτωμάτων της ασθένειας αυτής. Συμπερασματικά οι ερευνητές αναφέρουν ότι η μακροχρόνια κατανάλωση ελαιολάδου πλούσιου σε ελαιοκανθάλη, όχι μόνο ενισχύει την δράση της φαρμακευτικής αγωγής στην συσσώρευση του β αμυλοειδούς, αλλά παρέχει επίσης πρόσθετους μηχανισμούς στην αντιμετώπιση της νόσου (Batarseh and Kaddoumi 2018).

Σε *in vivo* και *in vitro* δοκιμές, ερευνητές βρήκαν ότι η ελαιοκανθάλη, όπως και το άγλυκο του λιγκτροσίδη, δρα κατά της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, μια πάθηση που αναγνωρίζεται πλέον, ως ένα από τα πρώτα στάδια της νόσου. Οι ερευνητές επίσης παρουσίασαν και την αντιγηραντική δράση της ελαιοκανθάλης σε κύτταρα του εγκεφάλου σε πειραματόζωα (Grewal et al. 2020).

Σε άλλη εργασία οι ερευνητές με *in vivo* πειράματα, διαπίστωσαν ότι η ελαιοκανθάλη έχει τη δυνατότητα να αλλάζει το σχηματισμό ινιδίων της Τ πρωτεΐνης του εγκεφάλου, η οποία είναι ένας παράγοντας-κλειδί στη δημιουργία νευροεκφυλιστικών νόσων. Με τον μηχανισμό αυτό η ελαιοκανθάλη, φαίνεται να προστατεύει τον οργανισμό από την εμφάνιση ή την επέκταση της νόσου (Monti et al. 2012). Τον ίδιο μηχανισμό μελέτησαν και άλλοι ερευνητές επισημαίνοντας ότι η ελαιοκανθάλη μπορεί να εμποδίσει την αλλοίωση της πρωτεΐνης αυτής διατηρώντας την φυσική της μορφή. Επιπλέον μελέτες έδειξαν πως η ελαιοκανθάλη, λόγω της δομής της, οδηγεί στην παρεμπόδιση αυτή, χωρίς να επηρεάσει σημαντικά την φυσιολογική λειτουργία της Τ πρωτεΐνης (Li et al. 2009).

Σε πολύ πρόσφατη μελέτη (Tzekaki et al. 2019), παρουσιάστηκαν από ομάδα Ελλήνων ερευνητών τα αποτελέσματα χορήγησης Ελληνικού ελαιολάδου, με κύριο συστατικό την ελαιοκανθάλη, σε 36 ασθενείς. Στην μελέτη αυτή, ύστερα και από αναλύσεις στο πλάσμα των ασθενών, αναφέρθηκε μείωση δύο κύριων αναστολέων του ινωδολυτικού συστήματος του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1) και της α2-αντιπλασμίνης που σχετίζονται με την νόσο. Ένας ακόμα σημαντικός δείκτης που μειώθηκε είναι αυτός της συγκέντρωσης της Τ – πρωτεΐνης, καθώς και ο δείκτης οξειδωτικού στρες (MDA). Τα αποτελέσματα αυτά, αποτυπώνουν την πιθανή συσχέτιση της αναστολής εξέλιξης της νόσου με την ένταξη στην διατροφή του ασθενούς ελαιόλαδο με υψηλό φαινολικό περιεχόμενο.



### Αντιφλεγμονώδης δράση.

Η πρώτη σημαντική μελέτη που έγινε για τις βιολογικές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, αφορούσε την αντιφλεγμονώδη δράση του ελαιολάδου η οποία αποδόθηκε στην ελαιοκανθάλη. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, η ελαιοκανθάλη εμφανίζει παρόμοια αντιφλεγμονώδη δράση με αυτή της ιβουπροφαίνης, ενός ισχυρού αντιφλεγμονώδους φαρμάκου, παρότι χημικά διαφέρουν πολύ. Ο μηχανισμός δράσης της ελαιοκανθάλης γίνεται μέσω δόσο-εξαρτώμενης αναστολής της δράσης των COX-1 και COX-2, χωρίς επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου της λιποξυγενάσης (Beauchamp et al. 2005).

Η γενική αντιφλεγμονώδης δράση της ελαιοκανθάλης έχει μελετηθεί σε διαφορετικού τύπου φλεγμονές στον ανθρώπινο οργανισμό. Χαρακτηριστική περίπτωση, είναι αυτή της οστεοαρθρίτιδας, μια πάθηση που προκαλείται από διαταραχές στην ομοίωση των χόνδρων, με την αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) το οποίο σχετίζεται με την αποδόμηση των χόνδρων. Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα που παρουσιάστηκαν από την Iacono και τους συνεργάτες της, η ελαιοκανθάλη και τα παράγωγα της μειώνουν τη σύνθεση του NO που προάγεται από τον λιποπολυσακχαρίτη στα χονδροκύτταρα χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Iacono et al. 2010). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί και από άλλους ερευνητές (Scotece et al. 2012).

Η αντιφλεγμονώδης δράση της ελαιοκανθάλης, έχει αποδειχθεί και διαδερμικά, όταν σε μελέτη, χορηγήθηκε διαδερμικά εκχύλισμα ελαιοκανθάλης για την αντιμετώπιση φλεγμονής που προήλθε από φωτοδυναμική θεραπεία, σε ασθενείς με ακτινική κεράτωση, μια ασθένεια του δέρματος που μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Η υποχώρηση της φλεγμονής στους ασθενείς ήταν σημαντική τόσο με όρους άμεσης απόκρισης (2 μέρες μετά την εφαρμογή), όσο και μακροπρόθεσμα (3 μήνες μετά την εφαρμογή) (Segura Palacios et al. 2019).

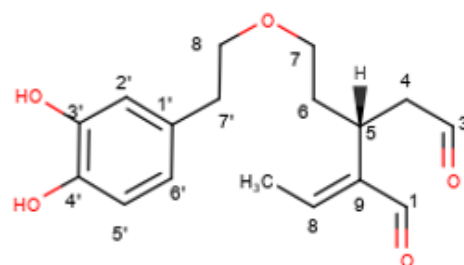
### Αντιθρομβωτική δράση.

Σε κλινική μελέτη υπό την μορφή διατροφικής παρέμβασης που έχει γίνει σε ανθρώπους φάνηκε ότι τα ελαιόλαδα πλούσια σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη βοηθούν στην μείωση των θρομβώσεων, καθώς προκαλούν μείωση της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Οι συμμετέχοντες (n = 9) κατανάλωναν 40 mL EVOO εβδομαδιαίως ενώ η συλλογή του αίματος έγινε πριν και 2 ώρες μετά τη λήψη ελαιολάδου. Η οξεία χορήγηση ελαιολάδου πλούσιου σε

ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη προκάλεσαν αξιόλογη μείωση στη μέγιστη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων (Agrawal et al. 2017).

### 1.6.2 Ελαιασίνη

Η ελαιασίνη είναι ένα σεκοϊριδοειδές, παράγωγο της ελευρωπαΐνης. Αποτελείται από ένα μόριο υδροξυτυροσόλης εστεροποιημένο με ένα παράγωγο αποκαρβοξυλιωμένου ελενολικού οξέος.



#### *Αντιοξειδωτική δράση.*

Η ελαιασίνη έχει μελετηθεί ευρέως ως προς την αντιοξειδωτική της δράση. Σε μελέτη που έγινε με *in vitro* πειράματα σε ερυθροκύτταρα, η ελαιασίνη έδειξε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. ;Εδειξε να προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από την οξείδωση και κατ' επέκταση την καταστροφή τους ακόμα και σε πολύ χαμηλές δόσεις (Paiva-Martins et al. 2009).

Η ελαιασίνη μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη μείωση της προόδου της αθηροσκλήρωσης, που αποτελεί την σημαντικότερη αιτία εγκεφαλικού ή εμφράγματος (Naruszewicz et al. Σε άλλη μελέτη οι ερευνητές παρουσίασαν τον μηχανισμό προστασίας της ελαιασίνης στην αθηροσκλήρωση, μέσω αύξησης της έκφρασης των υποδοχέων των πρωτεϊνών (CD163 και IL10), καθώς και την ενδοκυτταρική έκκριση πρωτεϊνών στα ανθρώπινα μακροφάγα κύτταρα, ενισχύοντας την αντιφλεγμονώδη δράση κατά της αθηροσκλήρωσης (Filipek et al. 2015).

Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τη ελαιασίνης, αναφέρεται και σε άλλη εργασία, όπου παρουσιάστηκε η ικανότητα της ελαιασίνης να προστατεύει τα κύτταρα από την γήρανση και τον θάνατο τους με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Parzonko et al. 2013). Εξηγώντας τον μηχανισμό, οι ερευνητές αναφέρουν ότι η χορήγηση ελαιασίνης σε κύτταρα οδήγησε σε μια σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού και της δραστηριότητας της τελομεράσης στα κύτταρα, καθώς και μείωση στο ποσοστό γερασμένων κυττάρων.

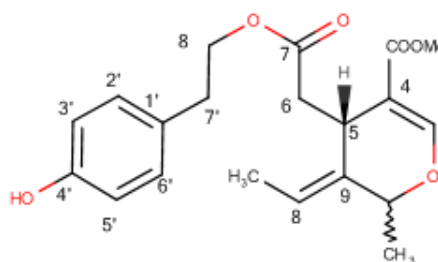
Η ελαιασίνη επίσης, έχει εμφανίσει πολύ ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Σύμφωνα με ερευνητές, η ελαιασίνη αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους αναστολείς της 5-λιποξυγενάσης, ενός ενζύμου που σχετίζεται με τα πρώτα στάδια εμφάνισης φλεγμονής, καθώς καταλύει τα αρχικά στάδια του μονοπατιού της βιοσύνθεσης των προ-φλεγμονωδών

λευκοτριενίων. Στον συγκεκριμένο μηχανισμό μάλιστα η ελαιασίνη φαίνεται να είναι σημαντικά πιο ισχυρή σε σχέση με άλλες φαινόλες του ελαιολάδου και του καρπού της ελιάς, όπως η ελαιοκανθάλη και η ελευρωπαΐνη (Vougianniopoulou et al. 2014).

Η ελαιασίνη παρουσίασε και δράση ενάντια στην αποσταθεροποίηση των πλακών της καρωτίδας σε *ex vivo* πειράματα, επηρεάζοντας την έκκριση ειδικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αθηρωμάτωση της καρωτίδας, φαινόμενο το οποίο είναι υπεύθυνο για την δημιουργία εγκεφαλικού επεισοδίου προκαλούμενο από ισχαιμία (Filipek et al. 2017).

### 1.6.3 Άγλυκο λιγκτροσίδη.

Η μονοαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη είναι ένα συστατικό του ελαιολάδου που προέρχεται από τον λιγκτροσίδη. Είναι και αυτό ένα μόριο που αποτελείται από την τυροσόλη εστεροποιημένη με ελενολικό οξύ.

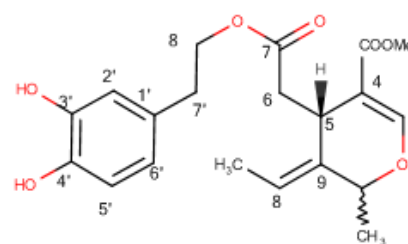


Το άγλυκο του λιγκτροσίδη έδειξε την καλύτερη αντι-μεταστατική δράση έναντι των υψηλά μεταστατικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού, σε μελέτη με *in vitro* πειράματα. Όπως και στην περίπτωση της ελαιοκανθάλης, έτσι και εδώ ο μηχανισμός δράσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη, σχετίζεται με την αναστολή της πρωτεΐνης c-MET (Busnena et al. 2013).

Σημαντικά είναι τα ευρήματα μελέτης για την επίδραση του άγλυκου του λιγκτροσίδη σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Σε *in vitro* πειράματα με ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το άγλυκο του λιγκτροσίδη επηρεάζει τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης HER2, που υπάρχει σε μεγάλα ποσοστά στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και ο οποίος προκαλεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Το άγλυκο του λιγκτροσίδη προκάλεσε μείωση του αριθμού των υποδοχέων κατά 68%, ακόμη και σε πολύ μικρές δόσεις και τελικά τα καρκινικά κύτταρα οδηγήθηκαν σε κυτταρικό θάνατο (Menendez et al. 2008).

#### 1.6.4 Άγλυκο της ελευρωπαϊνης.

Το άγλυκο της ελευρωπαϊνης είναι και αυτό ένα σεκοϊριδοειδές του ελαιολάδου. Αποτελείται από ένα φαινολικό δακτύλιο υδροξυτυροσόλης, εστεροποιημένο με ελενολικό οξύ .



Σε *in vivo* μελέτη που πραγματοποιήθηκε, η χορήγηση του άγλυκου της ελευρωπαϊνης μέσω της διατροφής έδειξε να βελτιώνει σημαντικά την απόδοση της αντίληψης σε πειραματόζωα (ποντίκια) νεαρής και μέσης ηλικίας, παθολογίας των Αβ πλακών που σχετίζεται άμεσα με την νόσο Alzheimer. Η δράση του άγλυκου της ελευρωπαϊνης στη σταθεροποίηση της εξέλιξης της νόσου επιτεύχθηκε ρυθμίζοντας την πρωτεΐνη mTOR (C. Grossi et al. 2013).

Σε άλλη μελέτη , φάνηκε ότι μπορεί να παρεμποδίσει ή να επιβραδύνει την πρόοδο του διαβήτη τύπου II. Σε *in vitro* πειράματα, το άγλυκο της ελευρωπαϊνης έδειξε να παρεμποδίζει τη συσσώρευση και την τοξικότητα της αμυλίνης στα κύτταρα του παγκρέατος, μια ουσίας που έχει άμεση σχέση με την παθογένεια της νόσου, καθώς όταν συσσωρεύεται στα κύτταρα του παγκρέατος δημιουργεί το αμυλοειδές, που έχει άμεση σχέση με την παθογένεια του διαβήτη τύπου II (Rigacci et al. 2010).

Τέλος, σε *in vitro* πειράματα που αναφέρθηκαν και για το άγλυκο του λιγκοτροσίδη, το άγλυκο της ελευρωπαϊνης φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού προκαλώντας μείωση του αριθμού των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης HER2, που υπάρχει σε μεγάλα ποσοστά στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους (Menendez et al. 2008).

## 1.7 Η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου από την αρχαιότητα στο σήμερα.

### *Η τεχνολογία παραλαβής του ελαιολάδου κατά την αρχαιότητα.*

Ιστορικά ευρήματα δείχνουν ότι η παραγωγή ελαιολάδου χρονολογείται από την 5<sup>η</sup> χιλιετία π.Χ. με σύνθλιψη της ελιάς από μεγάλες πέτρες. Η εκχύλιση του ελαιολάδου κατά την Μυκηναϊκή και την Μινωική περίοδο, γινόταν παραδοσιακά σε πέτρινους μύλους, και στον πολτό της ελιάς γινόταν προσθήκη ζεστού νερού, το οποίο βοηθούσε το έλαιο να απομακρύνεται από την σάρκα του καρπού (Melena 1983). Ο πολτός της ελιάς που προέκυπτε τοποθετείτο σε μεγάλη πέτρινη επιφάνεια με αυλακώσεις, ώστε να αποστραγγίζεται σιγά σιγά το ελαιόλαδο. Για την επιτάχυνση της εκχύλισης του ελαιολάδου, τοποθετούνταν μεγάλες πέτρες, οι οποίες ασκούσαν πίεση στον πολτό της ελιάς, ώστε να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα ελαιολάδου από τον πολτό. Στην συνέχεια το ελαιόλαδο διαχωριζόταν από τους υπόλοιπους χυμούς της ελιάς με την επίδραση της βαρύτητας, με τοποθέτηση του μίγματος σε αγγεία.

Την ίδια εποχή εμφανίζονται και τα πρώτα πιεστικά συστήματα με την τοποθέτηση του πολτού σε υφασμάτινα σακιά πάνω από δεξαμενές αποστράγγισης όπου στην συνέχεια γινόταν διαχωρισμός του ελαιολάδου από τους χυμούς της ελιάς με την επίδραση της βαρύτητας (Kapellakis et al 2008).



Κατά την Ρωμαϊκή περίοδο, η διαδικασία εκχύλισης του ελαιολάδου εξελίχθηκε, επιταχύνοντας τη διαδικασία σύνθλιψης του καρπού με ένα σύστημα θραυστήρα με την μορφή μύλων (trapezum). Την ίδια περίοδο αναβαθμίστηκε και το σύστημα διαχωρισμού του ελαιολάδου, με ένα είδος πιεστηρίου που επέτρεπε την ταχύτερη απομάκρυνση του ελαιολάδου και των χυμών

του καρπού της ελιάς από τον πολτό. Πρόδρομες μορφές των μηχανισμών αυτών έχουν βρεθεί στην αρχαία Ελλάδα (Di Giocchino 2000).



*Η εκχύλιση του ελαιολάδου σήμερα.*

Η τεχνολογία εκχύλισης του ελαιολάδου παρέμεινε η ίδια για πολλούς αιώνες, αφού μόλις τον προηγούμενο επετεύχθη σημαντική πρόοδος στον τομέα αυτόν με την εισαγωγή της τεχνολογίας συνάφειας και φυγοκέντρωσης.

Το ελαιόλαδο είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο προέρχεται από τον καρπό της ελιάς και παραλαμβάνεται αποκλειστικά με μηχανικά μέσα (Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 29/2012 της Επιτροπής, της 13ης Ιανουαρίου 2012, για τα πρότυπα εμπορίας του ελαιολάδου 2012). Η παραγωγή του ελαιολάδου περιλαμβάνει την συλλογή του καρπού, την απομάκρυνση φύλλων και ξένων υλών (χώμα πέτρες κ.α.), την σύνθλιψη του καρπού, την μάλαξη του πολτού των ελιών και τον διαχωρισμό του ελαιολάδου από τον πολτό αυτόν.

*Συλλογή του καρπού.*

Η συλλογή του καρπού γίνεται κατά την περίοδο ωρίμανσης σε χρόνο που επιλέγει ο παραγωγός. Η συλλογή του καρπού πραγματοποιείται με κατάλληλα μηχανικά μέσα, ώστε να αποφεύγεται ο τραυματισμός του καρπού ή του δέντρου. Μετά την συλλογή ο καρπός μεταφέρεται στα ελαιοτριβεία, όπου ακολουθεί η διαδικασία εκχύλισης του ελαιολάδου.

*Απομάκρυνση ξένων υλών από τον καρπό.*

Η απομάκρυνση των ξένων υλών γίνεται κυρίως για την προστασία των μηχανημάτων του ελαιοτριβείου από μηχανικές βλάβες αλλά και για την βελτιστοποίηση της ποιότητας του τελικού

προϊόντος. Η διαδικασία συνήθως πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο οι ελιές διέρχονται από μεταλλικό πλέγμα, που λειτουργεί σαν κόσκινο, συγκρατώντας μεγάλα αντικείμενα όπως μικρά κλαριά των δέντρα. Στο δεύτερο στάδιο ο καρπός διέρχεται μέσα από ειδικό μεταλλικό κλωβό όπου με ισχυρό ρεύμα αέρα απομακρύνονται ελαφριά αντικείμενα όπως τα φύλλα και τέλος στο τρίτο στάδιο πολλά ελαιοτριβεία επιλέγουν το πλύσιμο της ελιάς, όπου οι ελιές διέρχονται από δεξαμενές νερού με στόχο την απομάκρυνση χώματος ή άλλων ξένων υλών.

#### *Σύνθλιψη του ελαιόκαρπου*

Η σύνθλιψη του καρπού της ελιάς παραδοσιακά γινόταν με μυλόπετρες ωστόσο στα σύγχρονα ελαιοτριβεία χρησιμοποιούνται σπαστήρες με σφυριά ή λεπίδες. Στον σπαστήρα η ελιά συνθλίβεται ενώ υπάρχουν μεταλλικά πλέγματα (κόσκινα) τα οποία επιτρέπουν να περνά έλαιοπολτός συγκεκριμένου μόνο διαμετρήματος με σκοπό την ομοιομορφία του πολτού. Σύγχρονοι σπαστήρες έχουν την δυνατότητα να απομακρύνουν το κουκούτσι της ελιάς και να μην συνθλίβεται μαζί με την σάρκα του καρπού (Amirante et al. 2010).

#### *Μάλαξη της ελαιόπαστας.*

Η μάλαξη του καρπού γίνεται σε ημικυλινδρικές δεξαμενές που αποκαλούνται μαλακτήρες. Οι πρώτοι μαλακτήρες ήταν ανοικτοί στο το πάνω μέρος, ενώ η σύγχρονη τάση επιβάλλει να αποφεύγεται η επαφή του πολτού με την ατμόσφαιρα κατά την διάρκεια της μάλαξης. Για τον σκοπό αυτό οι σύγχρονοι μαλακτήρες είναι κλειστού κυλινδρικού τύπου. Για την διευκόλυνση της εκχύλισης του ελαιολάδου οι μαλακτήρες διαθέτουν διπλά τοιχώματα, τα οποία διατρέχονται με θερμό νερό ώστε η όλη διαδικασία να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες που συνήθως κυμαίνονται από 23°C ως 35 °C.

#### *Διαχωρισμός ελαιολάδου από τον πολτό.*

Η βασική μέθοδος παραγωγής του ελαιολάδου σήμερα είναι η φυγοκεντρική μέθοδος, ωστόσο συνολικά υπάρχουν τρεις μέθοδοι εκχύλισης του ελαιολάδου, που λειτουργούν με πίεση, με συνάφεια και με φυγοκέντρηση.

### Παραλαβή ελαιολάδου με πίεση.

Τα πιεστικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αρχαιότητα δεν διαφέρουν σημαντικά με τα σημερινά ως προς την αρχή λειτουργίας τους.

Η εκχύλιση του ελαιολάδου με πίεση συνίσταται στην άσκηση πίεσης πάνω στον πολτό της ελιάς, η οποία τοποθετείται πάνω σε ειδικούς δίσκους, συνήθως κυκλικούς, οι οποίοι εναλλάσσονται με άλλους μεταλλικούς κυλινδρικούς δίσκους. Το σύστημα των κυλίνδρων είναι ομόκεντρο ως προς έναν μεταλλικό κοχλία ο οποίος μεταφέρει κάθετη πίεση στους κυλίνδρους.

### Εκχύλιση ελαιολάδου με την τεχνική της συνάφειας.

Η εκχύλιση του ελαιολάδου με συνάφεια (συχνά αναφέρεται και εκχύλιση με διήθηση) βασίζεται στην μεγάλη συνάφεια που εμφανίζει το ελαιόλαδο με ορισμένα μέταλλα, σε σχέση με την υδατική φάση του πολτού της ελιάς.

Το 1911 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ένα σύστημα συνάφειας που ονομάστηκε σύστημα "Acarulco", ενώ στην συνέχεια εξελίχθηκε και μετονομάστηκε σε σύστημα "Acarulco-Quintanilla". Λόγω των πολλών μηχανολογικών προβλημάτων που παρουσίαζαν τα συστήματα αυτά τελικά το 1951, κατασκευάστηκε στην Ισπανία η τρίτη εκδοχή των ελαιοτριβείων που λειτουργούσαν με την μέθοδο της διήθησης που ονομάστηκε "Alfin". Η τελευταία τροποποίηση της μεθόδου αυτής εφαρμόστηκε στην Ιταλία και ονομάστηκε μέθοδος Sinolea (Ranalli et al. 1999). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται ελάσματα από ειδικό κράμα μετάλλου που παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτική συνάφεια με το ελαιόλαδο. Εξαιτίας της μεγάλης συνάφειας ελαιολάδου - μετάλλου, κατά την επαφή της ελαιομάζας με τα ελάσματα, συγκρατείται ποσότητα ελαιολάδου το οποίο συγκεντρώνεται σε ειδική λεκάνη. Τα φυτικά υγρά και μέρος του λαδιού που δεν συγκρατήθηκε από τα ελάσματα, παραμένουν στην ελαιομάζα.

### Εκχύλιση με φυγοκέντρωση.

Τα φυγοκεντρικά συστήματα είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος διαχωρισμού του ελαιολάδου από τον πολτό της ελιάς στην σύγχρονη εποχή. Τα πρώτα φυγοκεντρικά μηχανήματα εμφανίστηκαν την δεκαετία του 1960. Η φυγοκεντρική μέθοδος βασίζεται στην διαφορετική πυκνότητα των συστατικών του πολτού της ελιάς (ελαιόλαδο, υδατική φάση, στερεά συστατικά). Με την γρήγορη



περιστροφή ενός οριζόντιου διαχωριστήρα (decanter) που περιέχει ποσότητα του πολτού της ελιάς, εφαρμόζεται κεντρομόλος δύναμη, η οποία διαχωρίζει τις δύο ή τρεις φάσεις και παραλαμβάνεται το ελαιόλαδο σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας (Karellakis et al 2008).

Συνολικά υπάρχουν δύο τύποι φυγοκεντρικών συστημάτων, τα 2 φάσεων και εκείνα των 3, τα οποία διακρίνονται μεταξύ τους από το πλήθος των προϊόντων που προκύπτουν κατά και μετά την επεξεργασία του πολτού της ελιάς. Στα φυγοκεντρικά συστήματα 3 φάσεων, γίνεται προσθήκη νερού στον πολτό της ελιάς πριν αυτός εισέλθει στον διαχωριστήρα, και στο τέλος της φυγοκέντρωσης παραλαμβάνονται 3 φάσεις, το ελαιόλαδο, η υδατική φάση (χυμοί του καρπού και το νερό που προστέθηκε), και η στερεή φάση (σάρκα και ο πυρήνας της ελιάς). Στα συστήματα 2 φάσεων, που είναι η πιο σύγχρονη μέθοδος και στην προσπάθεια να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από τον πολτό, γίνεται μόνο μικρή (ή και καθόλου) προσθήκη νερού μέσα στον, όπου μετά την διαδικασία του διαχωρισμού, παραλαμβάνονται δύο φάσεις, το ελαιόλαδο και τα υγρά και στερεά υπολείμματα υπό την μορφή ενός πολτού αποβλήτων (Clodoveo et al. 2015).

Μετά την φυγοκέντρωση (οριζόντια) του ελαιολάδου σε πολλά ελαιοτριβεία χρησιμοποιείται και δεύτερη φυγοκέντρωση, αυτή την φορά σε κάθετους διαχωριστήρες υγρού-υγρού όπου απομακρύνονται υπολείμματα των υδατικών ή στερεών αποβλήτων .

## 1.8 Γενικοί στόχοι.

Το ερευνητικό έργο που παρουσιάζεται στην διατριβή αυτή, θέτει στο επίκεντρο το ελαιόλαδο και τα φαινολικά συστατικά που σχετίζονται με τον ευρωπαϊκό ισχυρισμό υγείας και εκτείνεται σε ένα μεγάλο εύρος που ξεκινά από την καλλιέργεια του δέντρου της ελιάς και καταλήγει σε φαρμακοτεχνικές μορφές που περιέχουν ως δραστικά συστατικά τα φαινολικά συστατικά.

Στην πρώτη πειραματική ενότητα (κεφ. 2) παρουσιάζεται η μελέτη της επίδρασης βασικών παραγόντων που επηρεάζουν την συγκέντρωση συγκεκριμένων φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά, γίνεται ταυτόχρονη διερεύνηση της επίδρασης της ποικιλίας του ελαιόκαρπου, του βαθμού ωρίμανσης, του χρόνου και της θερμοκρασίας μάλαξης με την μέθοδο qNMR. Με την μέθοδο αυτή δίνεται η δυνατότητα για πρώτη φορά να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός συστατικών όπως η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη. Η καινοτομία αυτή, μέσα και από πειράματα τροποποιημένης μάλαξης, είχε ως στόχο τόσο την μελέτη γύρω από την αξιοποίηση των φαινολικών συστατικών και την βελτιστοποίηση της ποιότητας του ελαιολάδου όσο και της αποκωδικοποίησης του βιοσυνθετικού μονοπατιού των εν λόγω συστατικών.

Στην δεύτερη ενότητα (κεφ. 3) γίνεται μελέτη γύρω από τα κριτήρια ποιότητας του ελαιολάδου. Με επίκεντρο τα υψηλού φαινολικού περιεχομένου ελαιόλαδα, παρουσιάζεται μελέτη σε σχέση με την επίδραση που έχει η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στην απορρόφηση του φάσματος UV, μια μέθοδο που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των δεικτών K που σχετίζονται με την οξειδωτική κατάσταση του ελαιολάδου. Μέσα από τα αποτελέσματα αυτά εγείρονται σοβαρά ερωτήματα ως προς την αξιοπιστία της μεθόδου αυτής, ενώ παρουσιάζεται και μια τροποποίηση της μεθόδου με πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Στο τρίτο μέρος της εργασίας (κεφ. 4), παρουσιάζονται στατιστικά στοιχεία από την ανάλυση περισσότερων από 6,614 δειγμάτων ελαιολάδου. Η στατιστική μελέτη έχει ως στόχο την επιβεβαίωση κάποιων από τα συμπεράσματα που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 2, αλλά και την εξαγωγή νέων χρήσιμων εργαλείων που σχετίζονται με τα φαινολικά ελαιόλαδα, με τελικό στόχο μια νέα κατηγοριοποίηση των ελαιολάδων σε σχέση με τον ισχυρισμό υγείας.

Τέλος, σκοπός του τελευταίου μέρους της διατριβής, ήταν η αξιοποίηση των υψηλών φαινολικά ελαιολάδων, για την ανάπτυξη νέων μεθόδων απομόνωσης των συστατικών αυτών με πράσινες πλέον τεχνικές, και τέλος την παρασκευή φαρμακοτεχνικών μορφών και σκευασμάτων με κύρια δραστική τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου.



## 2. Επίδραση της εποχής συγκομιδής και των συνθηκών μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό υγείας του ελαιολάδου.

### 2.1 Εισαγωγή.

Όσο το επιστημονικό και το εμπορικό ενδιαφέρον για το ελαιόλαδο αυξάνεται, δημιουργούνται και διάφορες τάσεις για τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να πραγματοποιείται η ελαιοποίηση του καρπού. Οι τάσεις αυτές, άλλες φορές συνεπικουρούνται από στοιχεία μελετών που γίνονται πάνω στο ελαιόλαδο, πολλές φορές όμως βασίζονται και σε πρακτικές που προέρχονται από την παράδοση. Δεν είναι δε λίγες οι φορές όπου είτε ομάδες παραγωγών, είτε επίσημοι φορείς επιδιώκουν την κατοχύρωση στοιχείων ή ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του προϊόντος που παράγεται, όπως η γεωγραφική προέλευση και οι συνθήκες στις οποίες αυτό παράγεται, είτε για στοιχεία της χημικής του σύστασης (ΠΟΠ-ΠΓΕ, ισχυρισμοί υγείας). Συνέπεια όλων των παραπάνω, είναι το ελαιόλαδο να έχει καταστεί το επίκεντρο εκτενών μελετών, με σκοπό να αποσαφηνιστούν όλες οι ιδιότητες του αλλά και να οριστούν οι ορθές πρακτικές παραγωγής του.

Οι πρώτες μελέτες πάνω στο ελαιόλαδο, όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, βασίστηκαν στο μη πολικό κλάσμα, δηλαδή στα λιπίδια και στο πλεονέκτημα που εμφανίζει το ελαιόλαδο σε σχέση με τα υπόλοιπα βρώσιμα έλαια λόγω της ιδιαίτερης σύστασής του. Σύντομα, μεγάλο μέρος των μελετών, περιέλαβε εκτός από το μη πολικό κλάσμα και δευτερεύοντα συστατικά του ελαιολάδου, και κυρίως το φαινολικό κλάσμα. Το φαινολικό κλάσμα, λόγω των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων, αρχικά θεωρήθηκε καθοριστικός παράγοντας για την προστασία των λιπιδίων από την οξείδωση και επομένως για την μεγαλύτερη χημική σταθερότητα του ελαιολάδου (Paradopoulos and Boskou 1991). Γρήγορα όμως επισημάνθηκαν αξιολογικά υγειοπροστατευτικά χαρακτηριστικά τα οποία αποδόθηκαν και αυτά στο φαινολικό κλάσμα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση υιοθετώντας την επιστημονική άποψη της EFSA, επέτρεψε πριν από μερικά χρόνια την χρήση ισχυρισμού υγείας που συνδέεται με την συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο (EU reg. 2012/432 2012).

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, να ανοίξει μια μεγάλη συζήτηση μεταξύ άλλων, για τους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την συγκέντρωση των συστατικών που αποτελούν το φαινολικό κλάσμα. Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία, παρατηρήθηκε ότι η συζήτηση αυτή, επικεντρώνεται σε κάποιους βασικούς παράγοντες όπως η γενετική προέλευση του καρπού της ελιάς, και οι συνθήκες ελαιοποίησης και πιο συγκεκριμένα η εποχή συγκομιδής, η θερμοκρασία και ο χρόνος μάλαξης.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εμφανίζουν αρκετές αποκλίσεις μεταξύ τους γεγονός που οφείλεται στην πολυπλοκότητα της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών και στους πολλούς παράγοντες που επιδρούν με διαφορετικό τρόπο πάνω σε αυτά.

### 2.1.1 Εποχή συγκομιδής.

Η περίοδος συγκομιδής του καρπού της ελιάς αποτελεί έναν από τους βασικότερους αγρονομικούς παράγοντες που έχουν μελετηθεί. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο μειώνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού (Lukić et al. 2017; Jimenez 2014), ενώ άλλοι ερευνητές παρουσιάζουν μια μη γραμμική συσχέτιση του βαθμού ωρίμανσης και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών (Jolayemi et al 2016; Ben Youssef et al. 2010; Baccouri et al. 2008). Όπως αναφέρουν πολλοί ερευνητές, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού μια σειρά από χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα, προκαλώντας πολλές αλλαγές τόσο στην μορφολογία όσο και στην χημική σύσταση του καρπού της ελιάς (Ryan et al. 2002). Η μείωση της συγκέντρωσης συστατικών όπως της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη στον καρπό, έχουν ως άμεση συνέπεια την μείωση και των φαινολικών συστατικών που μεταφέρονται στο ελαιόλαδο, καθώς αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των συστατικών αυτών. Έχει αναφερθεί μάλιστα, ότι ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες, και διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης, οι ενζυμικές αυτές αντιδράσεις διαφέρουν ως προς την απόδοσή τους και κατ' επέκταση, ως προς την επίδραση που έχουν στα συστατικά του καρπού της ελιάς (Hachicha Hbaieb et al. 2016).

### 2.1.2 Θερμοκρασία μάλαξης.

Κατά την διάρκεια της ελαιοποίησης του καρπού, θεωρείται απαραίτητη η μάλαξη του πολτού του καρπού της ελιάς, με σκοπό την αποτελεσματική εκχύλιση του ελαιολάδου. Η παρέμβαση αυτή, έχει στόχο να διευκολύνει τα μικροσταγονίδια του ελαιολάδου να συνενωθούν με γειτονικά μικροσταγονίδια, δημιουργώντας μεγαλύτερες σταγόνες ελαιολάδου και τελικά να εκχυλιστούν πιο αποτελεσματικά από τον πολτό. Βοηθάει στην διάσπαση των γαλακτωμάτων που δημιουργούνται μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης κατά την σύνθλιψη του καρπού (Di Giovanacchino et al 2002). Μια συνήθης πρακτική στα ελαιοτριβεία, είναι η θέρμανση του πολτού, μέσω θερμού νερού που διατρέχει τα διπλά τοιχώματα του μαλακτήρα. Παράλληλα όμως η θέρμανση αυτή, φαίνεται να επιδρά και στα φαινολικά συστατικά που μεταφέρονται από τον καρπό στο ελαιόλαδο.

Κάποιοι ερευνητές έχουν αναφέρει την αρνητική συσχέτιση της αυξημένης θερμοκρασίας μάλαξης και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο (Angerosa et al. 2001; Servili et al. 2004). Επισημαίνουν μάλιστα ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μάλαξης, επιδρά στην κατανομή των φαινολικών συστατικών, και κυρίως των όρθο διφαινολικών συστατικών, μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης που υπάρχει μέσα στον μαλακτήρα καθώς η αύξηση αυτή αυξάνει την διαλυτότητα τους στην υδατική φάση (Rodis et al 2002). Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στα απόβλητα του ελαιοτριβείου και μείωση της συγκέντρωσης τους στο ελαιόλαδο. Επιπροσθέτως, η αύξηση της θερμοκρασίας μάλαξης, ευνοεί την δράση διάφορων ενδογενών ενζύμων που περιέχονται στον καρπό της ελιάς και που απελευθερώνονται στον πολτό μετά την σύνθλιψη αυτού. Οι ερευνητές εστιάζουν στις πολυφαινολοξειδάσες και στις οξειδοαναγωγάσες που εμπεριέχονται στον καρπό και οι οποίες καταλύουν ενζυμικές αντιδράσεις στο περιβάλλον του πολτού της ελιάς μειώνοντας τελικά τα φαινολικά συστατικά (Ryan et al. 2002).

Αντίθετα αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί όμως από άλλους ερευνητές, οι οποίοι έχουν παρατηρήσει θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της θερμοκρασίας μάλαξης και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών (Taticchi et al. 2013; Aguilera 2015; Lukic et al. 2018). Εξηγούν μάλιστα ότι παράλληλα με την δράση των οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων, παρατηρείται αυξημένη δράση και άλλων σημαντικών ενζύμων, που επιδρούν θετικά στην αύξηση των φαινολικών συστατικών στον πολτό της ελιάς και κατ' επέκταση, στο ελαιόλαδο. Τέτοια ένζυμα μπορεί να είναι είτε εκείνα που καταλύουν αντιδράσεις σχηματισμού των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, όπως η β γλυκοσιδάση, είτε ένζυμα που διασπούν τα κυτταρικά τοιχώματα στην σάρκα του καρπού της ελιάς, επιτρέποντας την απελευθέρωση μεγαλύτερων ποσοτήτων της ελευρωπαΐνης και λιγκστροσίδη στο περιβάλλον του πολτού. Σε άλλες μελέτες φάνηκε ότι επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών είχε την μορφή κανονικής κατανομής (Parenti 2008; Clodoveo 2012). Στην μελέτη αυτή υπήρξε βέλτιστη θερμοκρασία μάλαξης οι 28°C, ενώ σε μικρότερες και μεγαλύτερες θερμοκρασίες η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ήταν χαμηλότερη.

Το σύνολο των φυσικοχημικών φαινομένων που αναφέρθηκαν παραπάνω, και που λαμβάνουν χώρα στον μαλακτήρα του ελαιοτριβείου, φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στο συνολικό φαινολικό φορτίο του ελαιολάδου. Όπως φαίνεται και από την βιβλιογραφία, σε πιο σύγχρονες μελέτες, αντικείμενο της έρευνας δεν αποτελεί μόνο το συνολικό φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, αλλά και συγκεκριμένα φαινολικά συστατικά (Hachicha Hbaieb et al. 2016; Angerosa et al. 2001; Servili et al. 2004; Rodis et al 2002). Η εξειδίκευση αυτή οφείλεται αφενός στο γεγονός ότι αυξάνεται και ο αριθμός των εργασιών που αφορούν τις βιολογικές δράσεις μεμονωμένων φαινολικών συστατικών, αφετέρου φαίνεται ότι η μελέτη των φαινολικών συστατικών

ξεχωριστά, αποτελεί το κλειδί για την πλήρη αποκρυπτογράφηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φαινολικών συστατικών.

Στις εξειδικευμένες αυτές μελέτες, υπάρχουν εργασίες όπου αναφέρεται η θετική συσχέτιση της θερμοκρασίας μάλαξης και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης ενώ τα άγλυκα της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη παρουσιάζουν μη γραμμική συσχέτιση (Lukić et al. 2018; 2017; Gómez-Rico et al. 2009). Σε άλλες μελέτες έχει αναφερθεί μια συσχέτιση κανονικής κατανομής με μέγιστο στους 28°C, μεταξύ της θερμοκρασίας μάλαξης και των συγκεντρώσεων όλων των συστατικών (Parenti 2008). Σε παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα παρατηρείται μη γραμμική συσχέτιση των συγκεντρώσεων της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης με την θερμοκρασία μάλαξης αν και η δειγματοληψία στην μελέτη αυτή έχει γίνει απευθείας από τον πολτό της ελιάς και σε διαφορετικούς χρόνους μάλαξης (Gómez-Rico et al. 2009).

### 2.1.3 Χρόνος μάλαξης.

Ένας άλλος κρίσιμος παράγοντας, είναι η διάρκεια της μάλαξης του πολτού της ελιάς. Υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία που υποστηρίζουν ότι η επίδραση του χρόνου μάλαξης στην συγκέντρωση του συνόλου των φαινολικών συστατικών είναι υπαρκτή αλλά ασθενής (Di Giovacchino et al 2002; Lukić et al. 2018; Aguilera 2015; Inarejos-García et al. 2009; Yorulmaz et al. 2017; Gómez-Rico et al. 2009). Αντίθετα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε άλλες εργασίες όπου φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρά αρνητική συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας της μάλαξης του πολτού και του συνόλου των φαινολικών συστατικών (Angerosa et al. 2001; Jimenez 2014). Σε αυτές τις εργασίες οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η μείωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο οφείλεται στην δράση των οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων τα οποία δρουν καθ' όλη την διάρκεια της μάλαξης. Η παρατεταμένη μάλαξη επομένως επιτρέπει στα ένζυμα αυτά να δρουν για περισσότερη ώρα. Μια δεύτερη αιτία που αναφέρεται είναι ότι η παρατεταμένη επαφή της λιπαρής και της υδατικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά μέρους των φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο.

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης, ότι τα φαινολικά συστατικά ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη αυξάνουν την συγκέντρωσή τους κατά την διάρκεια της μάλαξης, ενώ τα άγλυκα λιγκστροσίδη και ελευρωπαΐνης εμφανίζουν ασθενέστερη εξάρτηση από τον χρόνο μάλαξης (Lukić et al. 2018). Αντίθετα αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί ωστόσο, εμφανίζοντας την ελαιασίνη να έχει αρνητική συσχέτιση με τον χρόνο μάλαξης ενώ η ελαιοκανθάλη και σε αυτή την περίπτωση να αυξάνει την συγκέντρωσή της (Gómez-Rico et al. 2009).

Η ενζυμική δραστηριότητα που λαμβάνει χώρα στο περιβάλλον του πολτού της ελιάς κατά την μάλαξη, έχει σημαντική επίδραση στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Η πολυπλοκότητα των ενζυμικών αντιδράσεων εκτός των άλλων, οφείλεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα αποτελούν έναν ισχυρά θέρμο-εξαρτώμενο παράγοντα. Σε μελέτες που έγιναν σε ένζυμα που απομονώθηκαν από τον πολτό της ελιάς, η μέγιστη τιμή της δραστηριότητας της ΡΡΟ αναφέρεται σε υψηλές θερμοκρασίες (40°C – 50°C) εμφανίζοντας όμως παράλληλα, χαμηλή σταθερότητα στην θερμοκρασία αυτή (Hachicha Hbaieb et al. 2016; Taticchi et al. 2013).

Εκτός όμως από την ενζυμική δραστηριότητα, η διαλυτότητα των φαινολών στην υδατική φάση φαίνεται να επηρεάζεται πολύ από την θερμοκρασία και τον χρόνο μάλαξης (A. Ranalli et al. 2005; Gómez-Rico et al. 2009). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι κάθε φαινολικό συστατικό επηρεάζεται διαφορετικά από τον κάθε παράγοντα, προκύπτει ότι είναι πολύ δύσκολο να εξάγουμε κάποιες συγκεκριμένες τάσεις που να απεικονίζουν την επίδραση των συνθηκών ελαιοποίησης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο.

#### 2.1.4 Η φασματοσκοπία NMR στην ανάλυση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου.

Η συνεχής μελέτη της συμπεριφοράς των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών κατά την διάρκεια της μάλαξης, αποκαλύπτει σημαντικά κομμάτια του βιοσυνθετικού μονοπατιού σημαντικών συστατικών όπως της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Τα τελευταία χρόνια, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί σχηματισμού των παραγώγων της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη βασιζόμενοι σε δεδομένα που προέρχονται από πειράματα ελαιοποίησης καρπού (Ryan et al. 2002). Πρόσφατα, παρουσιάστηκαν από το εργαστήριό μας νέες μορφές του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη, γνωστές με την ονομασία ελαιομισσιονάλη και ελαιοκορωνάλη αντίστοιχα, βασιζόμενοι στην ανάλυση του φαινολικού προφίλ του ελαιολάδου με την μέθοδο Φασματοσκοπίας NMR (Diamantakos et al. 2015). Στην εργασία αυτή επισημάνθηκε το γεγονός ότι κατά την χρωματογραφική επεξεργασία του φαινολικού εκχυλίσματος, μεγάλο ποσοστό ορισμένων φαινολικών συστατικών όπως η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη κυκλοποιούνται, αποδίδοντας τις ήδη γνωστές κυκλικές μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη. Συγκεκριμένα η αλληλεπίδραση των συστατικών αυτών με οποιοδήποτε τύπο στατικής φάσης υδροχρωματογραφικής στήλης (είτε κανονικής είτε αντίστροφης φάσης) προκαλεί αλλαγή στην δομή των μορίων αυτών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η μελέτη των εκχυλισμάτων που η επεξεργασία τους περιλαμβάνει την χρήση τέτοιων υλικών, να οδηγούν σε παραπλανητικά αποτελέσματα (Melliou et al 2017).



Η μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο με φασματοσκοπία NMR, είναι μια σύγχρονη μέθοδος που χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά στην μελέτη του ελαιολάδου (Melliou et al 2017; Ruiz-Aracama, et al 2017; Karkoula et al. 2014; 2012). Η μέθοδος αυτή είναι δυνατόν να παρέχει μεγαλύτερο όγκο πληροφορίας σε μικρότερο χρόνο και με μικρότερο κόστος ανά δείγμα συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Όπως θα δούμε και στην συνέχεια μέσα σε λίγα μόνο χρόνια, κατέστη δυνατή, η φασματοσκοπική ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων ελαιολάδου στο εργαστήριό μας, ενώ σε πιο εξειδικευμένα πειράματα η χρήση επιλεκτικού παλμού δίνει την δυνατότητα ανάλυσης ελαιολάδου σε εξαιρετικά μικρούς χρόνους.

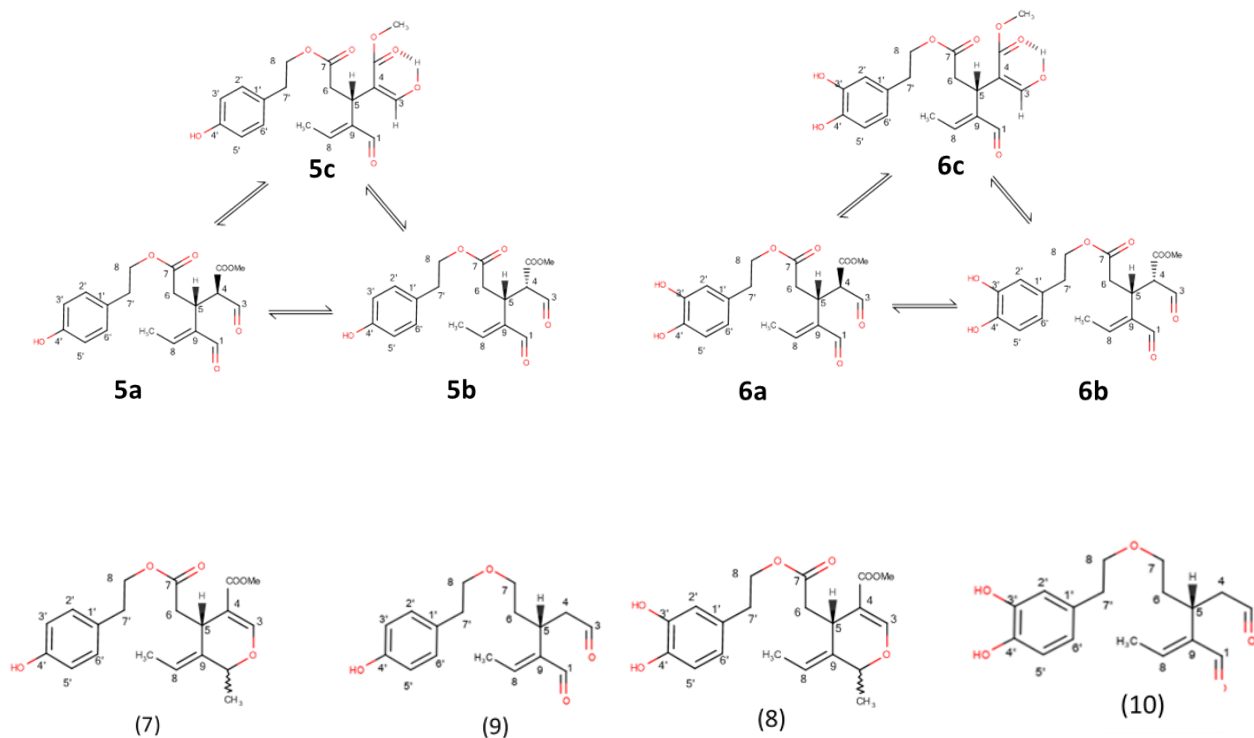
Βασιζόμενοι στις εργασίες που αναφέρθηκαν στην τελευταία παράγραφο, προχωρήσαμε σε μια εκτενή μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Με την μέθοδο αυτή, μπορέσαμε να εντοπίσουμε πως επηρεάζεται η κάθε φαινόλη ξεχωριστά, από τους βασικούς παράγοντες που αναπτύξαμε στην ενότητα αυτή.

## 2.2 Σκοπός.

Η παραγωγή ελαιόλαδου πλούσιο σε βιοφαινόλες αφορά ένα εξαιρετικά μεγάλο πεδίο μελέτης το οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Η συγκέντρωση των φαινολών στο ελαιόλαδο, σχετίζεται άμεσα τόσο με τα υγειοπροστατευτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, όσο και με τα γευσιγνωστικά του χαρακτηριστικά. Η πρόοδος που έχει γίνει στο ερευνητικό αυτό κομμάτι είναι αναμφίβολα μεγάλη, εντούτοις, πολλά κομμάτια του μηχανισμού σχηματισμού των βιοφαινολών παραμένουν άγνωστα.

Η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, έχει απασχολήσει ένα μεγάλο αριθμό μελετών στο παρελθόν. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ταυτόχρονη διερεύνηση 4 βασικών παραγόντων που επηρεάζουν την συγκέντρωση συγκεκριμένων φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, με την χρήση μεθόδου φασματοσκοπίας q-NMR.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η επίδραση που έχει η ποικιλία της ελιάς, η εποχή συγκομιδής, ο χρόνος και η θερμοκρασία μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, άγλυκο της ελευρωπαΐνης, άγλυκο του λιγκτροσίδη, ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη **(5,6,7,8,9,10)**.



Η πειραματική διαδικασία που έλαβε χώρα στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής, σε πρώτο στάδιο αφορούσε την παραγωγή ελαιολάδου από διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικές συνθήκες μάλαξης σε εργαστηριακή κλίμακα, μια προσπάθεια μίμησης της διαδικασίας που λαμβάνει χώρα σε ένα βιομηχανικό ελαιοτριβείο. Τα δείγματα ελαιολάδου που προέκυψαν αναλύθηκαν με την μέθοδο qNMR μια μέθοδο που για πρώτη φορά δίνει την δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού φαινολικών συστατικών όπως η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη. Η μελέτη έθεσε στο επίκεντρο τόσο το άθροισμα των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, όσο και των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών και τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζονται από τις διαφορετικές συνθήκες μάλαξης.

Σε δεύτερο επίπεδο, έγινε αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις συνολικά 107 αναλύσεις ελαιολάδου, ενώ πραγματοποιήθηκαν επιλεγμένα πειράματα “τροποποιημένης” μάλαξης με τελικό σκοπό την διαλεύκανση του μηχανισμού βιοσύνθεσης των φαινολών.

## 2.3 Υλικά και μέθοδοι.

### 2.3.1 Υλικά.

#### *Δείγματα ελαιόκαρπου.*

Στην παρούσα διατριβή έγινε συλλογή ελαιόκαρπου από πολλές διαφορετικές ποικιλίες και σε πολλά διαφορετικά στάδια ωρίμανσης με σκοπό να εξετασθεί το κατά πόσο επηρεάζεται το φαινολικό προφίλ του παραγόμενου ελαιολάδου από την ποικιλία του ελαιόδεντρου και τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού. Οι ποικιλίες που επιλέξαμε να μελετήσουμε ήταν η Κορωνέικη, η Αθηνολιά, η Θρούμπα Αιγαίου, η Λιανολιά Κερκύρας, η Ολύμπια ποικιλία και η Καλαμών (Σπάρτης). Συγκεκριμένα:

#### *Κορωνέικη (Λακωνίας).*

Για την πραγματοποίηση του πειράματος έγινε συγκομιδή καρπών ελιάς ποικιλίας “Κορωνέικη” από μη αρδευόμενο κτήμα στην περιοχή των Μολάων Λακωνίας. Συνολικά συλλέχθηκαν 5 δείγματα κατά το χρονικό διάστημα από αρχές Οκτώβριου 2017 έως και τον Φεβρουάριο του 2018, ένα για κάθε μήνα. Η συλλογή του καρπού γινόταν με το χέρι και η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν σε χάρτινη σακούλα εντός 24 ωρών. Κάθε δείγμα ζύγιζε 4,5 κιλά ενώ η συλλογή του καρπού γινόταν κάθε φορά από τα ίδια 3 γειτονικά δέντρα ενός κτήματος, με σκοπό να περιορίσουμε τον αστάθμητο παράγοντα της επίδρασης των διαφορετικών πεδοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν σε διαφορετικές περιοχές, αλλά ακόμα και σε διαφορετικά κτήματα της ίδιας περιοχής. Το συνολικό χρονικό περιθώριο μεταξύ της συγκομιδής και της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου δεν ξεπερνούσε τις 48 ώρες, ενώ η αποθήκευσή τους γινόταν σε συνθήκες ψύξης (4 °C).

#### *Αθηνολιά (Λακωνίας).*

Για την μελέτη της ποικιλίας “Αθηνολιά” συλλέχθηκαν 4 δείγματα κατά το χρονικό διάστημα από το Νοέμβριο 2017 έως και τον Φεβρουάριο του 2018. Η συλλογή των δειγμάτων ελαιόκαρπου έγινε πάλι από την περιοχή των Μολάων Λακωνίας και από το ίδιο κτήμα όπου συλλέχθηκαν και τα δείγματα της Κορωνέικης ποικιλίας. Και σε αυτήν την περίπτωση τα δείγματα προέρχονταν από τρία συγκεκριμένα δέντρα κάθε φορά, και η συλλογή τους γινόταν με το χέρι. Η μεταφορά και ανάλυση γινόταν εντός 48 ωρών και η αποθήκευσή τους γινόταν σε συνθήκες ψύξης (4 °C).

#### Θρουμπολιά Αιγαίου.

Η συλλογή των δειγμάτων “Θρουμπολιά Αιγαίου” πραγματοποιήθηκε από την ‘Γεροντοελιά’ του Δαμαρίωνα Νάξου και από την περιοχή Βίβλος της Νάξου. Συνολικά συλλέχθηκαν για την ελαιοποίηση και μελέτη 6 δείγματα κατά την περίοδο από τον Αύγουστο 2018 έως και τον Οκτώβριο του ίδιου έτους. Κάθε δείγμα ζύγιζε 0,7 κιλά. Μετά τη συγκομιδή η ελαιοποίηση στο εργαστήριο πραγματοποιούνταν στους 28°C μετά από 2 ημέρες, ενώ ο καρπός διατηρούνταν σε συνθήκες ψύξης (4 °C).

#### Κορωνέικη (Μεσσηνίας).

Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε από την περιοχή Πεταλίδι της Μεσσηνίας τον Σεπτέμβριο της ελαιοκομικής περιόδου 2018-2019. Συνολικά συλλέχθηκαν 800g καρπού και ελαιοποιήθηκαν εντός 24 ωρών από την συλλογή τους.

#### Καλαμών (Σπάρτης).

Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε από την περιοχή της Σπάρτης, τον Σεπτέμβριο της ελαιοκομικής περιόδου 2018-2019. Συνολικά συλλέχθηκαν 800g καρπού και ελαιοποιήθηκαν εντός 24 ωρών από την συλλογή τους.

#### Ολύμπια (Αρχαία Ολυμπία).

Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε από την περιοχή της Αρχαίας Ολυμπίας, τον Νοέμβριο της ελαιοκομικής περιόδου 2018-2019. Συνολικά συλλέχθηκαν 900g καρπού και ελαιοποιήθηκαν εντός 24 ωρών από την συλλογή τους.

#### Λιανολιά (Κέρκυρας).

Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε από το νησί της Κέρκυρας, τον Νοέμβριο της ελαιοκομικής περιόδου 2018-2019. Συνολικά συλλέχθηκαν 800g καρπού και ελαιοποιήθηκαν εντός 24 ωρών από την συλλογή τους.

### 2.3.2 Μέθοδοι.

#### *Εκχύλιση φαινολικού κλάσματος από δείγμα ελαιολάδου.*

Η εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος από τα δείγματα ελαιολάδου που προέκυψαν από την παραγωγή ελαιολάδου σε εργαστηριακή κλίμακα στο εργαστήριο Φαρμακογνωσία και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριο μας το 2012 (Karkoula et al. 2012).

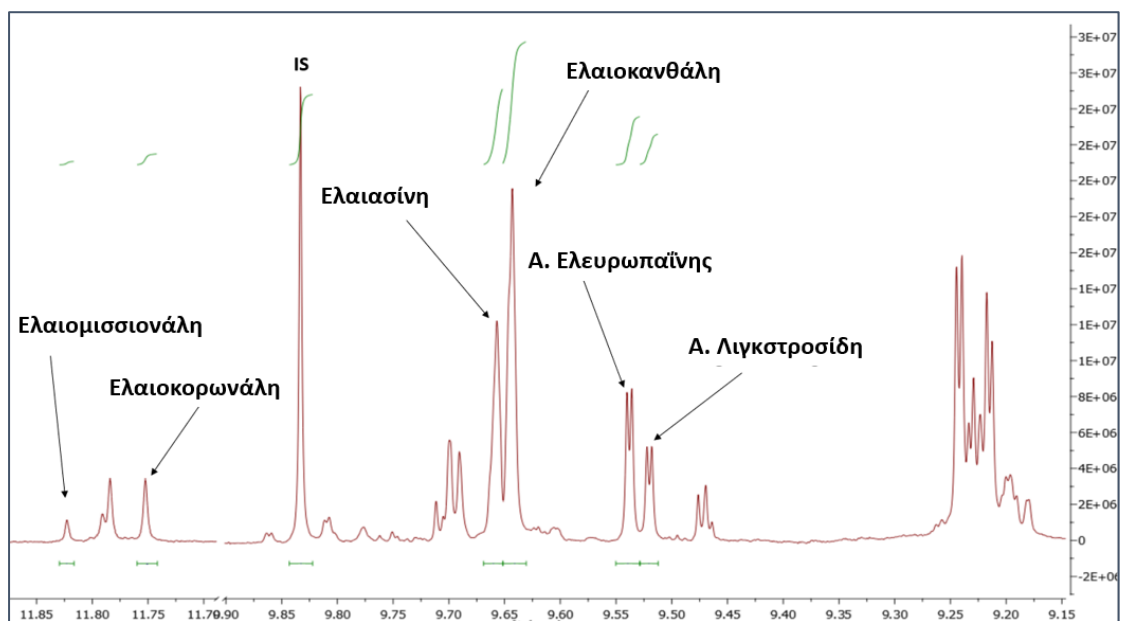
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, 5 g ελαιολάδου ζυγίζονταν σε falcon tube. προστίθεντο 20 mL κυκλοεξανίου (cHex) και το διάλυμα αναδεύονταν σε συσκευή ανάδευσης (VXMTAL multi-tube vortex mixer, OHAUS) για 1 min. Στην συνέχεια γινόταν προσθήκη 25 mL ακετονιτριλίου (ACN) και το μίγμα αναδεύονταν για 1min σε συσκευή ανάδευσης. Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείτο για 5min στις 4000 rpm σε συσκευή φυγοκέντρησης (FRONTIER™ 5000 SERIES MULTI OHAUS). Μετά την παραλαβή 25 mL της ακετονιτριλιακής φάσης γινόταν μεταφορά τους σε σφαιρική φιάλη 100 mL, στην οποία γινόταν προσθήκη 1 mL πρότυπου διαλύματος εσωτερικού πρότυπου συριγγαλδεύδης 1 mg/mL σε ACN. Το διάλυμα στην συνέχεια εξατμιζόταν μέχρι ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση στους 40 °C. Για την πλήρη εξατμιση του διαλύτη το εκχύλισμα τοποθετείτο σε αντλία κενού για επιπλέον 10 min. Τέλος το εκχύλισμα διαλυόταν σε 750 μL δευτεριωμένου χλωροφορμίου (CDCl<sub>3</sub>) και 550 μL μεταφέρονταν σε σωληνάκι NMR.

#### *Λήψη φάσματος Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR)*

Τα φάσματα πρωτονίου NMR ελήφθησαν σε 400 MHz (Bruker 400). Ελήφθησαν 32 scans σε 32 K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time 1.7 s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε exponential weighing factor 0.3 Hz . Η διόρθωση της φάσης του φάσματος καθώς και οι ολοκληρώσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MestRenova.

#### *Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων ελαιολάδου ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο ποσοτικού προσδιορισμού φαινολικών συστατικών που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριο μας το 2012 με κάποιες τροποποιήσεις.



**Εικόνα 2.1:** Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος του φαινολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών γινόταν με ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών των συστατικών στην αλδεϋδική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  και του αλδεϋδικού πρωτονίου της συριγγαλδεϋδης που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ελαιοκανθάλης γινόταν με ολοκλήρωση του αλδεϋδικού πρωτονίου στα 9.62 ppm και γινόταν χρήση της εξίσωσης παλινδρόμησης  $y=197.72*x+19.77$ . Για την ελαιασίνη ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με ολοκλήρωση του αλδεϋδικού πρωτονίου στα 9.64 ppm και γινόταν χρήση της εξίσωσης παλινδρόμησης  $y=205.09*x+19.16$ . Για την ελαιοκορωνάλη (ως άθροισμα των δύο διαλδεϋδικών και της μια ενολικής μορφής) ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με ολοκλήρωση της κορυφής που αντιστοιχεί στην ενολική ομάδα του μορίου της ελαιοκορωνάλης στα 11.74 ppm και χρησιμοποιείται η εξίσωση  $y=4*(232.7*x+4.3)$ . Για το άγλυκο του λιγκστροσίδη ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με ολοκλήρωση της διπλής κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου στα 9.48 ppm και χρησιμοποιούνται η εξίσωση παλινδρόμησης  $y=232.7*x+4.3$ . Για την ελαιομυσιονάλη (ως άθροισμα των δύο διαλδεϋδικών και της μιας ενολικής μορφή) γινόταν ολοκλήρωση της κορυφής στα 11.80 ppm που αντιστοιχεί στο ενολικό πρωτόνιο της ένωσης, και εφαρμοζόταν η εξίσωση  $y=4*(243.5*y+4.57)$ . Για το άγλυκο της ελευρωπαϊνης γινόταν ολοκλήρωση της διπλής κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου στα 9.50 ppm. και χρησιμοποιείται η εξίσωση παλινδρόμησης  $y=243.5*y+4.57$ . Τέλος για την τυροσόλη γινόταν η ολοκλήρωση του σήματος του αρωματικού πρωτονίου 7.10 ppm και χρησιμοποιείται η εξίσωση παλινδρόμησης  $y=80.16*x+10.32$ .

### *Εξισώσεις Παλινδρόμησης.*

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο στηρίζονται στην μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην εργασία των Karkoula et al 2012. Σύμφωνα με αυτή, έπρεπε να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς για το κάθε συστατικό με την προσθήκη αυτού σε καθαρή μορφή στο ελαιόλαδο με μηδενικό φαινολικό περιεχόμενο.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης προέκυψαν από την συσχέτιση της πραγματικής συγκέντρωσης του ελαιολάδου, όπως αυτή ορίζεται από την ποσότητα του συστατικού που προστέθηκε αρχικά, που διαπιστώνεται με την ολοκλήρωση της χαρακτηριστικής κορυφής του συστατικού σε σχέση με την ολοκλήρωση της χαρακτηριστικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, κρίθηκε αναγκαία η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς για κάθε συστατικό από την αρχή, με σκοπό την βελτιστοποίηση της μεθόδου για την αποφυγή επικαλύψεων των χαρακτηριστικών κορυφών των προς ποσοτικοποίηση συστατικών. Για τους σκοπούς αυτούς απομονώθηκαν όλα τα φαινολικά συστατικά από το ελαιόλαδο με την χρήση χρωματογραφικών μεθόδων. Συγκεκριμένα 2 L ελαιολάδου πλούσιου σε όλα τα φαινολικά συστατικά εκχυλίστηκαν με 2 L απεσταγμένου νερού, σύμφωνα με την διαδικασία που θα παρουσιαστεί αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο (κεφ.5). Μετά τον διαχωρισμό των φάσεων και την παραλαβή της υδατικής φάσης, η τελευταία εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Η ίδια διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε 3 φορές με σκοπό την πλήρη εκχύλιση του ελαιολάδου.

Μετά την συνένωση όλων των εκχυλισμάτων προέκυψε συνολικό εκχύλισμα 2 g. Το εκχύλισμα αυτό στην συνέχεια υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη silica gel κανονικής φάσης με σύστημα διαλυτών cyclohexane: ethyl acetate.

Από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό προέκυψε επαρκής ποσότητα των συστατικών ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, άγλυκο του λιγκστροσίδη, άγλυκο της ελευρωπαϊνης, ελαιομισιονάλη και τυροσόλη.

Αφού πραγματοποιήθηκε μέτρηση της καθαρότητας των συστατικών αυτών προχωρήσαμε σε κατασκευή καμπύλης αναφοράς για το κάθε συστατικό. Ανατρέχοντας την βάση δεδομένων του εργαστηρίου μας εντοπίστηκε ελαιόλαδο που είχε μηδενικό φαινολικό φορτίο, το οποίο και επιλέχθηκε για την κατασκευή των καμπυλών. Στο ελαιόλαδο αυτό, προστέθηκε κάθε φορά διαφορετική ποσότητα ενός φαινολικού συστατικού παρασκευάζοντας τελικά 5 δείγματα ελαιολάδου για το κάθε συστατικό με συγκέντρωση από 0 mg/kg έως 1000 mg/kg. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ελαιολάδων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε από τους Karkoula et al 2012.



Από την ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών των συστατικών και του εσωτερικού προτύπου προέκυψε για κάθε συστατικό μια καμπύλη αναφοράς και από την συσχέτιση της ολοκλήρωσης και της πραγματικής συγκέντρωσης προέκυψε η γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης για το κάθε ένα.

### 2.3.3 Σχεδιασμός πειραμάτων ελαιοποίησης.

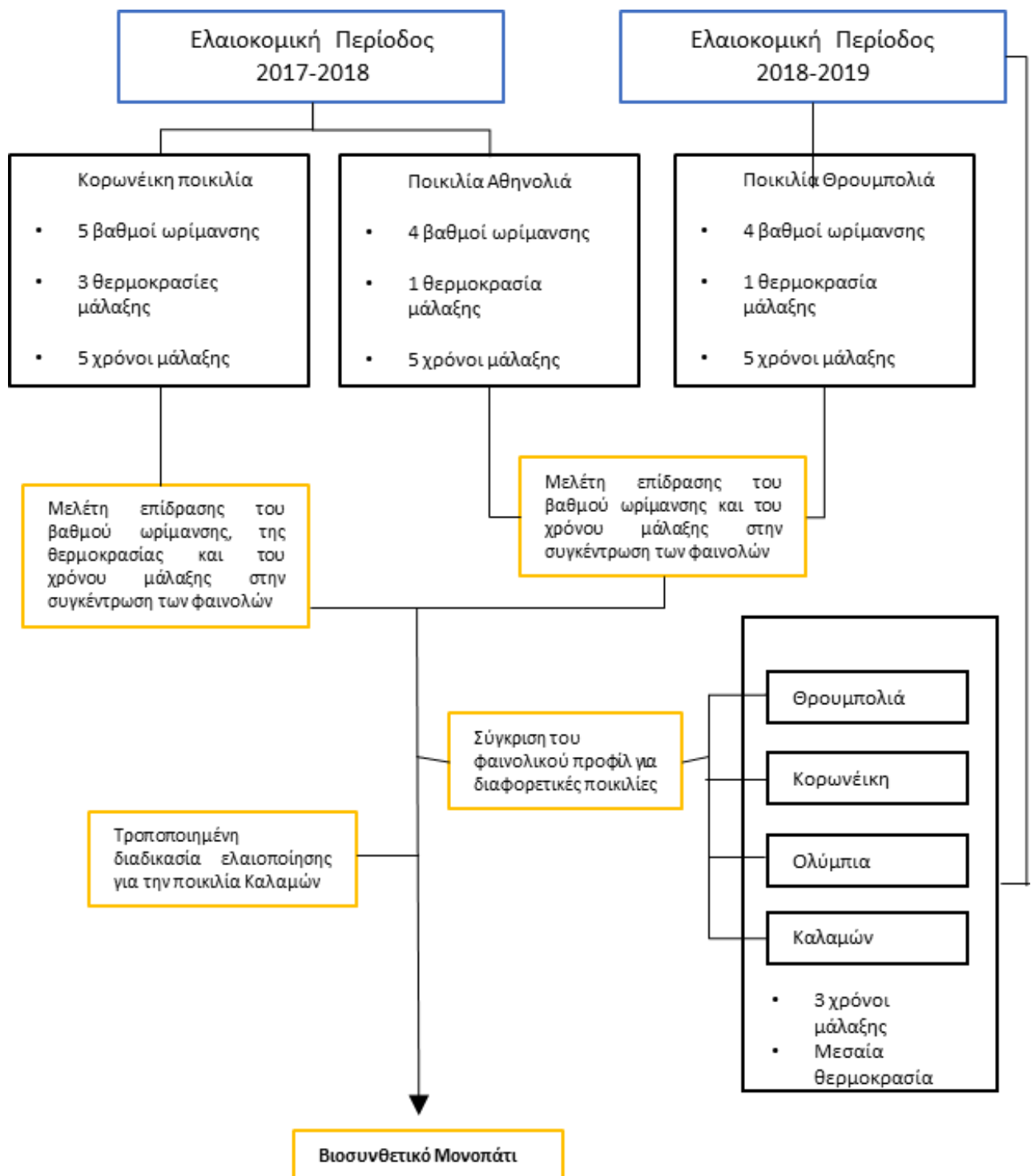
Στη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα ενότητα, αρχικά μελετήθηκε η επίδραση που έχουν κάποιοι βασικοί παράγοντες στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Έτσι επιλέχθηκε αρχικά να μελετηθεί η 'Κορωνέικη' ποικιλία, μια από τις πιο διαδεδομένες στην Ελλάδα, , ώστε να μελετηθούν όλοι οι παράγοντες ελαιοποίησης.

Στην συνέχεια έπρεπε να διερευνηθεί αν σε διαφορετικές ποικιλίες, η εξάρτηση των φαινολικών συστατικών από τις συνθήκες ελαιοποίησης ακολουθούσε την ίδια τάση. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν άλλες δύο ποικιλίες, η Αθηνολιά και η Θρουμπολιά Αιγαίου, ώστε να επαναληφθούν κάποια από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την Κορωνέικη ποικιλία. Συγκεκριμένα, στις δύο αυτές ποικιλίες εφαρμόστηκε μόνο η μεσαία θερμοκρασία μάλαξης, δεδομένου ότι η πληροφορία που αντλήθηκε από τα πειράματα της Κορωνέικης ποικιλίας θεωρήθηκε επαρκής.

Σε επόμενο στάδιο, επιλέχθηκαν κάποιες σταθερές συνθήκες ελαιοποίησης και πραγματοποιήθηκαν στοχευμένα πειράματα ελαιοποίησης από διαφορετικές ποικιλίες, ώστε να διαπιστωθεί αν το μοτίβο που παρατηρήθηκε στα αρχικά πειράματα επιβεβαιώνεται, και ποιες διαφορές μπορούν να παρατηρηθούν μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών. Για την καλύτερη επεξεργασία των αποτελεσμάτων η παρουσίαση τους θα γίνει συνολικά και για τις τρεις ποικιλίες και για κάθε παράγοντα ξεχωριστά.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν πειράματα τροποποιημένης μάλαξης ώστε να επιβεβαιωθούν κάποια βασικά συμπεράσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

Στην επόμενη σελίδα μπορούμε να δούμε συνοπτικά το πρόγραμμα των πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε ενώ στην συνέχεια θα παρουσιάσουμε αναλυτικά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν



**Εικόνα 2.2:** Ο σχεδιασμός πειραμάτων που αφορούν την ελαιοποίηση του καρπού.

*ι. Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης, της θερμοκρασίας και του χρόνου μάλαξης στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου και στην ελαιοπεριεκτικότητα.*

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση που έχει ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού της ελιάς στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου για τρεις ποικιλίες, την Κορωνέικη, την Αθηνολιά και την Θρουμπολιά Αιγαίου. Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας μάλαξης για την Κορωνέικη ποικιλία σε συνάρτηση με τον βαθμό ωρίμανσης και τον χρόνο μάλαξης, τόσο για το άθροισμα των φαινολικών συστατικών όσο και για μεμονωμένες φαινόλες. Τελευταία βασική παράμετρος που μελετήθηκε είναι ο χρόνος μάλαξης για τις τρεις ποικιλίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Κάθε πείραμα ελαιοποίησης πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές.

*Κορωνέικη ποικιλία.*

Για την Κορωνέικη ποικιλία, την πιο διαδεδομένη ποικιλία ελιάς στην Ελλάδα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε 5 διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης και 3 διαφορετικούς χρόνους μάλαξης. Η δειγματοληψία του ελαιοκάρπου πραγματοποιήθηκε την ελαιοκομική περίοδο 2017-2018 κατά τους μήνες από Οκτώβριο έως Φεβρουάριο. Συγκεκριμένα έγινε λήψη:

**Πίνακας 2.1 :** Στοιχεία των δειγμάτων που αναλύθηκαν από την Κορωνέικη ποικιλία

Δείγμα1	10 Οκτωβρίου 2017
Δείγμα2	10 Νοεμβρίου 2017
Δείγμα3	10 Δεκεμβρίου 2017
Δείγμα4	10 Ιανουαρίου 2018
Δείγμα 5	10 Φεβρουαρίου 2018

Όλα τα δείγματα είχαν ποσότητα καρπού άνω των 4,5 Kg και κάθε φορά πραγματοποιήθηκαν τρεις ελαιοποιήσεις:

- Ελαιοποίηση καρπού σε χαμηλή θερμοκρασία (22 °C). Η μάλαξη του καρπού διήρκεσε 90 min και ελήφθησαν ποσότητες του πολτού σε 5 χρονικά σημεία (15, 30, 45, 60, 90 min)
- Ελαιοποίηση καρπού σε μεσαία θερμοκρασία (28 °C). Η μάλαξη του καρπού διήρκεσε 90 min και ελήφθησαν ποσότητες του πολτού σε 5 χρονικά σημεία (15, 30, 45, 60, 90 min)

- Ελαιοποίηση καρπού σε υψηλή θερμοκρασία (32 °C). Η μάλαξη του καρπού διήρκησε 90 min και ελήφθησαν ποσότητες του πολτού σε 5 χρονικά σημεία (15, 30, 45, 60, 90 min).

Τα δείγματα ελαιολάδου που παρελήφθησαν, αναλύθηκαν εντός 48 ωρών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται παραπάνω και έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών καθώς και μέτρηση της ελαιοπεριεκτικότητας για κάθε χρονικό σημείο. Τα αποτελέσματα αναλύονται στα επόμενα.

#### Ποικιλία Αθηνολιά.

Η ποικιλία Αθηνολιά, είναι μια επίσης πολύ διαδεδομένη ποικιλία ελαιόδεντρου που χρησιμοποιείται τόσο για την παραγωγή ελαιολάδου, όσο και για την παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς. Η ποικιλία αυτή είναι πολύ διαδεδομένη σε δύο από τους κύριους ελαιοπαραγωγούς νομούς της χώρας την Μεσσηνία και την Λακωνία, αλλά η καλλιέργειά της συνηθίζεται και σε άλλες περιοχές.

Για την ποικιλία Αθηνολιά επιλέχθηκε να μελετηθούν τέσσερις διαφορετικοί βαθμοί ωρίμανσης κατά την ελαιοκομική περίοδο 2017-2018 και κατά το χρονικό διάστημα από 10 Νοεμβρίου έως και 10 Φεβρουαρίου.

**Πίνακας 2.2:** Στοιχεία των δειγμάτων που αναλύθηκαν από την ποικιλία Αθηνολιάς.

Δείγμα1	10 Νοεμβρίου 2017
Δείγμα2	10 Δεκεμβρίου 2017
Δείγμα3	10 Ιανουαρίου 2018
Δείγμα4	10 Φεβρουαρίου 2018

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν είχαν ποσότητα καρπού βάρους 1,5 Kg. Για τον συγκεκριμένο κύκλο πειραμάτων πραγματοποιήθηκε μια ελαιοποίηση σε μεσαία θερμοκρασία (28 °C), θεωρώντας την ως μια αντιπροσωπευτική θερμοκρασία και πιο συνήθη σε επίπεδο ελαιοτριβείων και πραγματικών συνθηκών ελαιοποίησης. Η διαδικασία της μάλαξης διήρκησε συνολικά 90min και έγινε δειγματοληψία πολτού σε 5 χρονικά σημεία (15, 30, 45, 60, 90 min)

▪

## Θρουμπολιά Αιγαίου.

Η ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου αποτελεί μια πολύ ιδιαίτερη ποικιλία ελιάς, η οποία αποφασίστηκε να μελετηθεί. Η ιδιαιτερότητα της είναι η ασυνήθιστα μεγάλη ηλικία του δέντρου που μελετήθηκε. Πρόκειται για έναν ελαιώνα που βρίσκεται στην περιοχή Δαμαρίωνα της Νάξου και υπολογίζεται ότι η ηλικία του δέντρου ξεπερνά τα 5000 έτη. Πρόκειται λοιπόν για ένα δείγμα καρπού που, όπως θα παρουσιαστεί και στην συνέχεια, κρύβει κάποια ασυνήθιστα χαρακτηριστικά.

Για την συγκεκριμένη λοιπόν ποικιλία, μελετήθηκε ο καρπός από ελαιόδεντρα που βρίσκονταν σε δύο διαφορετικούς ελαιώνες από την περιοχή της Νάξου την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019. Ο ένας ελαιώνας βρισκόταν στην περιοχή της Βίβλου ενώ ο δεύτερος, που είναι και ο αρχαιότερος, στην περιοχή Δαμαρίωνα Νάξου. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι αν και υπήρχαν μικρές διαφορές μεταξύ των δύο ελαιώνων, οι γενικές τάσεις στα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν οι ίδιες. Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε να ενοποιηθούν και να παρουσιαστεί μια γενική εικόνα για την Θρουμπολιά Αιγαίου.

**Πίνακας 2.3:** Στοιχεία των δειγμάτων που αναλύθηκαν από την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

	<b>Ελαιώνας</b>	<b>Ημερομηνία</b>
Δείγμα1	Δαμαρίωνα	30/08/2018
Δείγμα2	Βίβλου	10/09/2018
Δείγμα3	Δαμαρίωνα	18/09/2018
Δείγμα4	Βίβλου	05/10/2018
Δείγμα5	Δαμαρίωνα	11/10/2018
Δείγμα6	Δαμαρίωνα	30/10/2018

- Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν είχαν ποσότητα καρπού βάρους 1 Kg. Για τον συγκεκριμένο κύκλο πειραμάτων πραγματοποιήθηκε μια ελαιοποίηση σε μεσαία θερμοκρασία (28 °C), θεωρώντας την ως μια αντιπροσωπευτική θερμοκρασία και πιο συνήθη σε επίπεδο ελαιοτριβείων και πραγματικών συνθηκών ελαιοποίησης. Η διαδικασία της μάλαξης διήρκεσε συνολικά 60 min και έγινε δειγματοληψία πολτού σε 3 χρονικά σημεία (15, 30, 60 min).

## *ii. Ελαιοποίηση καρπού από διαφορετικές ποικιλίες.*

Στην παράγραφο αυτή παρουσιάζονται τα πειράματα στοχευμένης ελαιοποίησης καρπού από διάφορες ποικιλίες. Συγκεκριμένα επιχειρήθηκε ελαιοποίηση δειγμάτων καρπού από τις ποικιλίες Θρουμπολιά Αιγαίου, Χωραϊτική (Ολύμπια) ποικιλία, Κορωνέικη ποικιλία και Καλαμών Σπάρτης για την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να διαπιστωθεί η ταχύτητα και ο βαθμός με τον οποίο μεταβάλλονται οι μεμονωμένες φαινόλες κατά την διάρκεια της μάλαξης.

Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε για δεκάδες δείγματα κατά την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019. Όπως γρήγορα διαπιστώθηκε, τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής θα μπορούσαν να αποτελούν μια ισχυρή ένδειξη για τον κατάλληλο χρόνο συγκομιδής του καρπού από τον παραγωγό, αλλά και ρύθμισης βασικών συνθηκών ελαιοποίησης. Με την ελαιοποίηση του καρπού ήταν δυνατή και η καταγραφή της ποσότητας του ελαιολάδου που παραλαμβάνονταν κάθε φορά καθώς και η ανάλυση του φαινολικού προφίλ σε κάθε χρονική στιγμή, οπότε ο παραγωγός έπαιρνε όλα εκείνα τα στοιχεία που χρειαζόταν, για να επιλέξει τον κατάλληλο χρόνο συγκομιδής.

### *Ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.*

Σε προηγούμενη παράγραφο παρουσιάστηκε ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η ελαιοποίηση του δείγματος της Θρουμπολιάς Αιγαίου. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων σε αυτή την παράγραφο χρησιμοποιήθηκε το δείγμα που ελαιοποιήθηκε στις 10 Σεπτεμβρίου 2018.

### *Ποικιλία Χωραϊτική (Ολύμπια).*

Το δείγμα ελαιόκαρπου προέρχεται από την περιοχή της ορεινής Γορτυνίας, και την ποικιλία Χωραϊτική. Το δείγμα ελαιοποιήθηκε στις 25 Σεπτεμβρίου στους 28 °C. Συλλέξαμε τρία δείγματα ελαιοζύμης, στα 15, 30 και 60 min από τα οποία με φυγοκέντρηση παραλάβαμε το ελαιόλαδο.

### *Ποικιλία Κορωνέικη Μεσσηνίας.*

Το δείγμα Κορωνέικης ποικιλίας προέρχεται από την περιοχή της Καλαμάτας. Η ελαιοποίηση πραγματοποιήθηκε στις 22 Σεπτεμβρίου στους 28 °C. Συλλέξαμε τρία δείγματα ελαιοζύμης, στα 15, 30 και 60 min από τα οποία με φυγοκέντρηση παραλάβαμε το ελαιόλαδο.

### Ποικιλία Καλαμών.

Το δείγμα συλλέχθηκε από την Σπάρτη Λακωνίας και ελαιοποιήθηκε στις 30 Σεπτεμβρίου στους 28 °C. Πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος ελαιοζύμης, στα 15, 30 και 60 min.

### *ΙΙΙ Επίδραση του pH κατά την ελαιοποίηση και στοχευμένα πειράματα ελαιοποίησης.*

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν στοχευμένα πειράματα ελαιοποίησης με ρύθμιση του pH κατά την διάρκεια της μάλαξης. Συγκεκριμένα για την πειραματική διαδικασία επιλέχθηκε η ποικιλία Καλαμών.

### Ελαιοποίηση σε συνθήκες όξινου pH.

Πραγματοποιήθηκαν στοχευμένα πειράματα ελαιοποίησης καρπού με αλλαγή του φυσιολογικού pH της ελαιομάζας. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε ποικιλία καρπού Καλαμών από την περιοχή της Σπάρτης και επιχειρήθηκε ελαιοποίηση σε διαφορετικές συνθήκες όξινου pH

Η ελαιοποίηση του καρπού, όπως αναφέρεται και στα πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν πραγματοποιήθηκε με πολτοποίηση του καρπού και μάλαξη του υπό σταθερή θερμοκρασία για ορισμένο χρόνο. Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή, φαίνεται ότι μεγάλο μέρος των ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μετά την πολτοποίηση του καρπού, πραγματοποιούνται σε πολύ σύντομο χρόνο καθιστώντας μερικές φορές αδύνατη την παρακολούθησή τους. Η διαφοροποίηση του pH της ελαιοποίησης επελέγη ώστε να εντοπιστούν οι αλλαγές στο φαινολικό προφίλ και για τον σκοπό αυτό, ο ίδιος καρπός ελαιοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες.

#### → Ελαιοποίηση σε φυσικό pH.

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων σε φυσικό pH, πραγματοποιήθηκε ελαιοποίηση της ίδιας ποσότητας καρπού ελιάς από την ίδια παρτίδα, στην ίδια θερμοκρασία και τον ίδιο χρόνο μάλαξης. Μετά από 30 min μάλαξης παρελήφθη με φυγοκέντρηση το ελαιόλαδο το οποίο κι αναλύθηκε.

#### → Ελαιοποίηση σε όξινο pH .

Για την ελαιοποίηση σε όξινο pH ελαιοποιήθηκαν 100 g από την ίδια παρτίδα ελιάς. Πριν την ελαιοποίηση του καρπού προστέθηκαν 5 g κιτρικού οξέος (5% κατά βάρος καρπού) και την συνέχεια ο καρπός πολτοποιήθηκε. Στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε ανοξειδωτή συσκευή ανάδευσης όπου και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της μάλαξης για 30 min.



## 2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων

### 2.4.1 Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών.

#### i. Κορωνέικη ποικιλία.

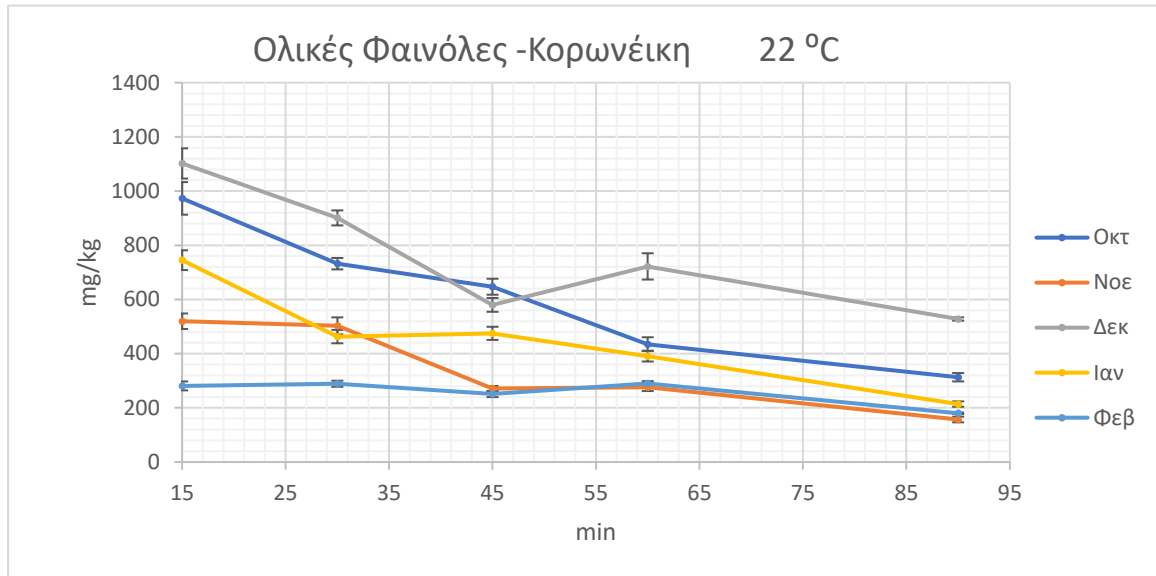
Όπως παρουσιάζεται στα επόμενα, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο επηρεάζεται ισχυρά τόσο από τον βαθμό ωρίμανσης όσο και από τον χρόνο μάλαξης. Όμως ενώ ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού της ελιάς είναι εύκολο να επιβεβαιωθεί από τον παραγωγό, ο ακριβής χρόνος μάλαξης πολλές φορές αποτελεί ένα δύσκολο σημείο, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που το ελαιόλαδο παράγεται σε μεγάλα ελαιοτριβεία. Για τον λόγο αυτό στα αποτελέσματα που συγκρίνουμε το άθροισμα των φαινολικών συστατικών ως προς τον βαθμό ωρίμανσης παρουσιάζονται οι τιμές καθ' όλη την διάρκεια της μάλαξης.

- Χαμηλή θερμοκρασία.

Στον επόμενο Πίνακα 2.4 και στο Διάγραμμα 2,1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των δειγμάτων ελαιολάδου Κορωνέικης ποικιλίας, που ελαιοποιήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (22 °C).

**Πίνακας 2.4:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άθροισμα Φαινολικών Συστατικών										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)
15	973	60	520	29	1101	56	745	37	280	16
30	732	21	502	31	901	28	476	25	281	11
45	647	29	271	10	581	26	487	24	244	11
60	432	26	276	14	722	49	398	20	281	9
90	313	15	157	10	528	6	256	10	180	3



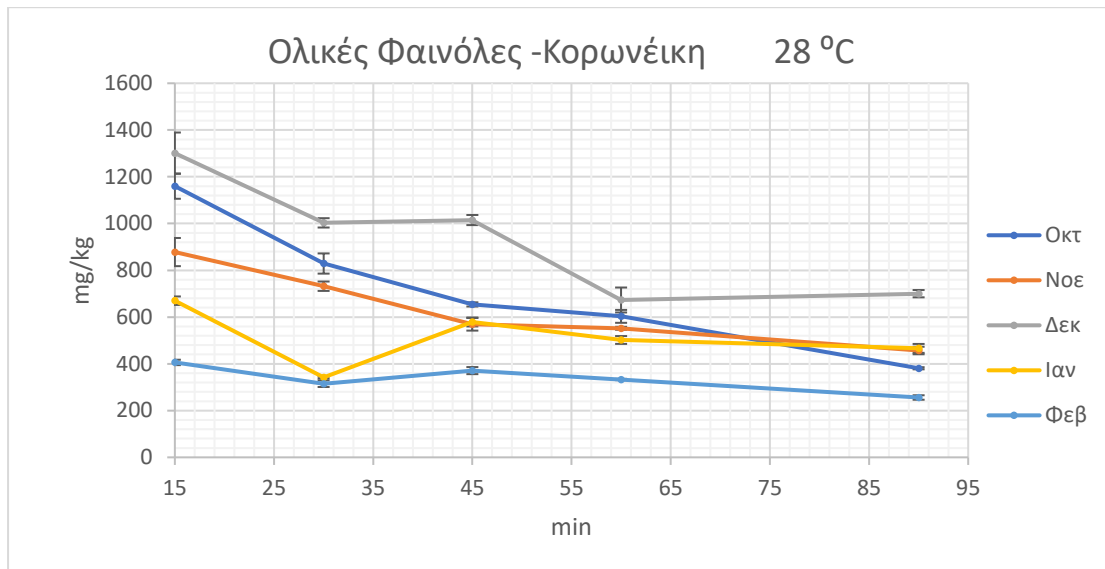
**Διάγραμμα 2.1 :** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

- Μεσαία θερμοκρασία.

Στον επόμενο Πίνακα 2.5 και στο Διάγραμμα 2,2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των δειγμάτων ελαιολάδου Κορωνέικης ποικιλίας, που ελαιοποιήθηκαν σε συνθήκες μεσαίας θερμοκρασίας (28 °C).

**Πίνακας 2.5:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άθροισμα Φαινολικών Συστατικών										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	1160	54	878	60	1301	88	670	18	406	12
30	829	43	732	20	1003	20	342	5	315	14
45	654	9	569	27	1015	22	579	19	371	15
60	603	28	552	6	673	53	502	17	333	3
90	381	5	457	16	700	16	466	19	256	10



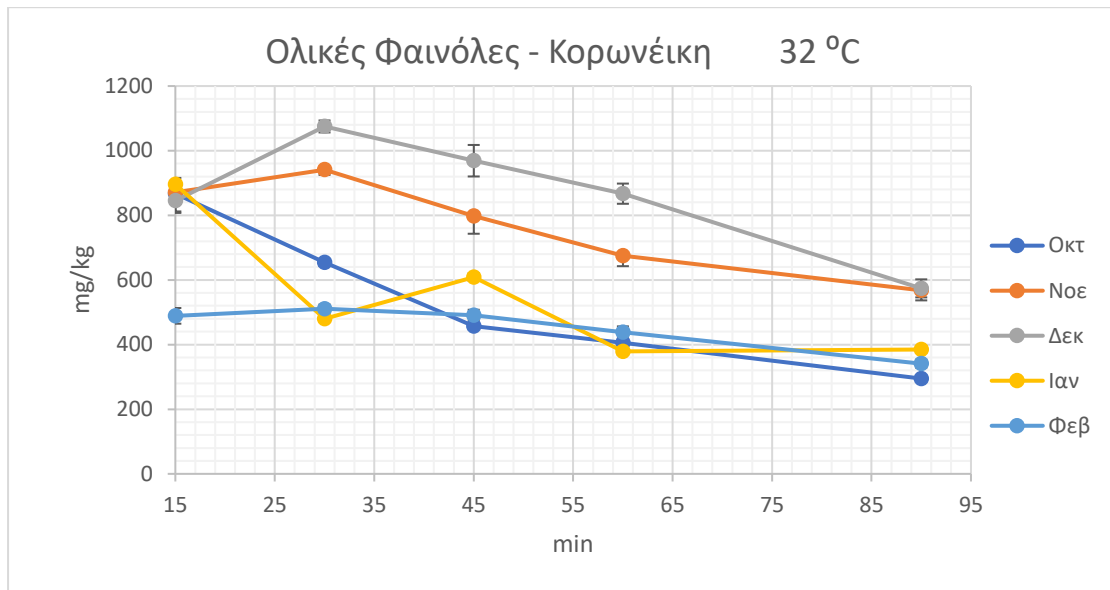
**Διάγραμμα 2.2:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

- Υψηλή θερμοκρασία.

Στον επόμενο Πίνακα 2,6 και στο Διάγραμμα 2,3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των δειγμάτων ελαιολάδου Κορωνέικης ποικιλίας, που ελαιοποιήθηκαν σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (32 °C).

**Πίνακας 2.6:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άθροισμα Φαινολικών Συστατικών										
Χρόνος μάλαξης (min)	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	867	25	871	59	845	38	896	20	489	24
30	654	11	941	16	1075	19	480	3	511	13
45	457	6	798	55	969	49	609	11	491	17
60	406	29	675	32	867	31	379	10	438	18
90	381	5	568	31	574	28	385	8	341	13



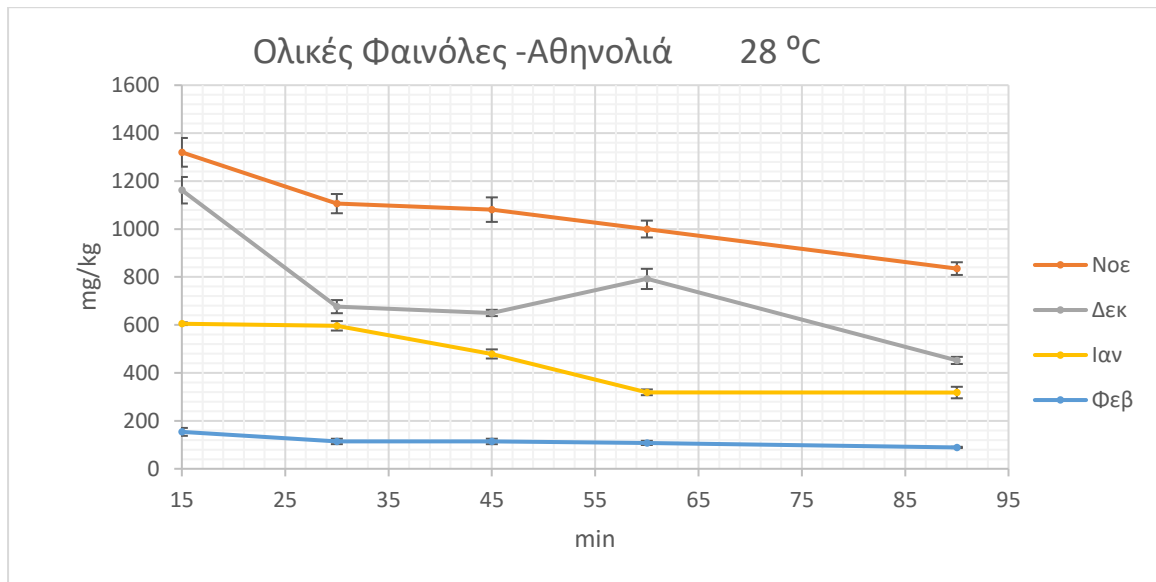
**Διάγραμμα 2.3:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

ii. *Ποικιλία Αθηνολιά.*

Στον επόμενο Πίνακα 2,7 και στο Διάγραμμα 2,4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των δειγμάτων ελαιολάδου ποικιλίας Αθηνολιάς, που ελαιοποιήθηκαν σε συνθήκες μεσαίας θερμοκρασίας (28 °C).

**Πίνακας 2.7 :** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε μεσαία θερμοκρασία για την ποικιλία Αθηνολιάς.

Άθροισμα Φαινολικών Συστατικών								
Χρόνος μάλαξης (min)	Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	1320	60	1162	55	605	6	154	4
30	1106	40	676	27	596	20	114	5
45	1081	51	650	13	479	19	114	6
60	1000	35	792	42	319	12	108	9
90	835	26	452	15	318	24	89	3



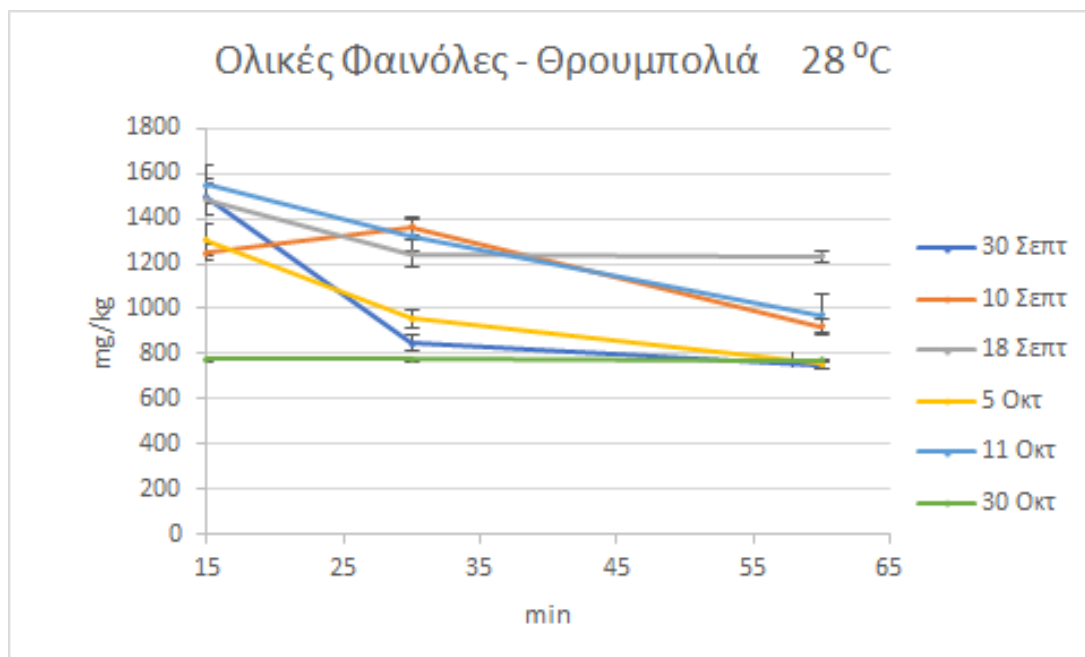
**Διάγραμμα 2.4:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την ποικιλία Αθηνολιά στους 28°C, για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

iii. *Θρουμπολιά Αιγαίου.*

Στον επόμενο Πίνακα 2,8 και στο Διάγραμμα 2,5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των δειγμάτων ελαιολάδου ποικιλίας Θρουμπολιά Αιγαίου, που ελαιοποιήθηκαν σε συνθήκες μεσαίας θερμοκρασίας (28°C).

**Πίνακας 2.8:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε μεσαία θερμοκρασία για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

Άθροισμα Φαινολικών Συστατικών						
Χρόνος Μάλαξης (min)	30/08		10/09		18/09	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	1493	82	1249	37	1485	74
30	848	33	1365	39	1245	61
60	750	17	923	30	1233	26
Χρόνος Μάλαξης (min)	5/10		11/10		30/10	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	1304	72	1550	88	776	26
30	955	38	1324	72	774	17
60	754	18	972	88	772	22



**Διάγραμμα 2.5:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την ποικιλία Θρουμπολιά στους 28°C για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

Όπως αναφέρθηκε και εισαγωγικά, είναι δύσκολο να συγκριθεί το άθροισμα των φαινολικών συστατικών στους διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης, καθώς αυτό θα πρέπει να γίνει και για όλους τους διαφορετικούς χρόνους μάλαξης, και για κάθε θερμοκρασία μάλαξης που εφαρμόζεται. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται και στα προηγούμενα, υπάρχει μια σαφής τάση πτώσης του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών σε κάθε θερμοκρασία όσο μεγαλώνει ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού της Κορωνέικης ποικιλίας.

Η μείωση αυτή ίσως δεν είναι τόσο εμφανής στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης του καρπού, τους μήνες δηλαδή Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο, καθώς φαίνεται ότι οι τιμές των φαινολικών συστατικών κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα για κάθε χρόνο μάλαξης και με μικρές διακυμάνσεις για την ίδια θερμοκρασία. Τους επόμενους δύο μήνες όμως, παρατηρήθηκε μια ραγδαία πτώση των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στο ελαιόλαδο. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η Κορωνέικη ποικιλία είναι μια ποικιλία που κατά κανόνα συλλέγεται από τους παραγωγούς κατά τους μήνες Νοέμβριο Δεκέμβριο Ιανουάριο, αναλόγως βέβαια και την πορεία ωρίμανσης του καρπού από χρονιά σε χρονιά.

Για την ελαιοκομική περίοδο 2017-2018, παρατηρήθηκε ότι το άθροισμα των φαινολικών συστατικών σημείωσε ραγδαία πτώση τον μήνα Ιανουάριο και ακόμα μεγαλύτερη την μήνα Φεβρουάριο. Η πτώση αυτή ήταν πολύ πιο έντονη στους μικρούς χρόνους μάλαξης οι οποίοι, αν

και για πολλούς παραγωγούς θεωρούνται πολύ δύσκολο να εφαρμοστούν, αποτελούν, όπως θα φανεί και παρακάτω, ένα δείκτη για το μέγεθος του φαινολικού φορτίου που δύναται να προσδώσει ο καρπός της ελιάς στο ελαιόλαδο.

Στην χαμηλή θερμοκρασία, η εν λόγω πτώση αυτή τον μήνα Ιανουάριο σε σχέση με εκείνη τον Δεκέμβριο, στους μικρούς χρόνους μάλαξης έφτασε το 47% (από 1101 mg/kg στα 745 mg/kg) ενώ η συνολική πτώση τον μήνα Φεβρουάριο σε σχέση με τον Δεκέμβριο, έφτασε το 75% (από 1101 mg/kg στα 280 mg/kg). Ομοίως όταν εφαρμόστηκαν μεγαλύτερες θερμοκρασίες κατά την μάλαξη, παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές φαινολικών συστατικών, καθώς η πτώση που παρατηρήθηκε από τον μήνα Δεκέμβριο στον μήνα Ιανουάριο είναι 49.8% (από 1301 mg/kg στα 670 mg/kg) ενώ για τον μήνα Φεβρουάριο ήταν 68% (από 1301 mg/kg στα 406 mg/kg) για την μεσαία θερμοκρασία. Τέλος στην υψηλή θερμοκρασία στους αρχικούς χρόνους μάλαξης σημαντική πτώση παρατηρείται μόνο μεταξύ των μηνών Ιανουαρίου και Φεβρουαρίου 45% (Από 896mg/kg στα 489 mg/kg). Οι μικρότερες τιμές που παρατηρήθηκαν στην πτώση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών στην υψηλή θερμοκρασία, οφείλονται στο γεγονός ότι οι μέγιστες τιμές τους εμφανίζονται σε μεγαλύτερους χρόνους μάλαξης. Έτσι για παράδειγμα μπορούμε να δούμε ότι η πτώση της τάξης του 50% που είδαμε σε άλλες θερμοκρασίες στους αρχικούς χρόνους μάλαξης στις υψηλές θερμοκρασίες η πτώση αυτή πραγματοποιείται στα 30 min μάλαξης και για το χρονικό διάστημα από τον Δεκέμβριο στον Ιανουάριο. Σε κάθε περίπτωση και ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας που εφαρμόστηκε η πτώση των φαινολικών συστατικών από τον μήνα Δεκέμβριο και μετά είναι ραγδαία.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για την ποικιλία Αθηνολιά. Παρατηρήθηκε δηλαδή ότι υπάρχει μια σταθερή πτώση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών όσο αυξανόταν ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού της Αθηνολιάς. Παρόλο που εφαρμόστηκε μόνο η μεσαία θερμοκρασία κατά την διάρκεια της μάλαξης εντούτοις ήταν σαφής η αρνητική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης πάνω στο φαινολικό φορτίο των δειγμάτων. Και σε αυτήν την περίπτωση η πτώση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών ήταν μετρήσιμη στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης της τάξης του 12% για το διάστημα από τον Νοέμβρη μέχρι τον Δεκέμβριο (από 1322 mg/kg έως 1162 mg/kg) ενώ τους επόμενους δύο μήνες η πτώση ήταν 54% και 88% σε σχέση με την αρχική μέτρηση.

Η Θρουμπολιά Αιγαίου όπως αναφέρθηκε και στην αρχή του κεφαλαίου αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση ελαιόδεντρου. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι το άθροισμα των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε διάστημα 2 μηνών δεν εμφάνισε μεγάλες διακυμάνσεις και διατηρήθηκαν σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η συγκεκριμένη ποικιλία ωριμάζει αρκετά γρήγορα με αποτέλεσμα ήδη από τα τέλη Οκτωβρίου να έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία

της ωρίμανσης. Έτσι αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι και εδώ στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης το συνολικό φαινολικό φορτίο παρέμεινε σταθερό ενώ υπήρξε σαφής πτώση των φαινολών στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης της τάξης του 50%.

Η πτώση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σαν άθροισμα, είναι πιθανότερο να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Δύο όμως είναι οι επικρατέστεροι και αφορούν τις ενζυμικές και φυσικοχημικές μεταβολές που επιτελούνται στον καρπό της ελιάς κατά την διάρκεια της ωρίμανσης. Διάφορα οξειδωτικά και υδρολυτικά ένζυμα όπως οι ΡΡΟ και οι ΡΟD αυξάνουν την δραστικότητα τους κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού με αποτέλεσμα την μείωση των φαινολικών συστατικών.

Με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσης επίσης, πραγματοποιούνται μετατροπές και στην χημική σύσταση του καρπού. Προς τα τελευταία στάδια της ωρίμανσης οι συγκεντρώσεις των πρόδρομων φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, όπως της ελευρωπαϊΐνης και του λιγκστροσίδη σταδιακά μειώνονται στο καρπό της ελιάς με αποτέλεσμα την εμφάνιση μικρότερων συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν ιδιαίτερη σημασία τόσο για την επιστημονική διερεύνηση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο όσο και τους παραγωγούς ελαιολάδου. Αποδεικνύεται ότι η καθυστέρηση μερικών εβδομάδων της συγκομιδής του καρπού, μπορεί να προκαλέσει απώλεια σημαντικού ποσοστού των φαινολικών συστατικών.



## 2.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην Κορωνέικη ποικιλία.

Η θερμοκρασία μάλαξης, όπως προκύπτει και από την βιβλιογραφία, αποτελεί μια σημαντική παράμετρο, που σχετίζεται με την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου. Στα ελαιοτριβεία, η θερμοκρασία εφαρμόζεται ώστε να διευκολυνθεί τόσο το σπάσιμο των κυττάρων της σάρκας της ελιάς, όσο και για να ευνοηθεί η συνένωση των μικροσταγονιδίων του ελαιολάδου και άρα, να παραλαμβάνεται μεγαλύτερη ποσότητα ελαιολάδου. Με τα χρόνια έγιναν προσπάθειες ώστε οι θερμοκρασίες στους μαλακτήρες να είναι χαμηλότερες, γεγονός που πυροδότησε μια σειρά μελετών για τα οφέλη ή μη, της υψηλής θερμοκρασίας μάλαξης.

Οι περισσότεροι ερευνητές συσχετίζουν την παράμετρο αυτή, με την επίδραση που έχει πάνω στα υδρολυτικά ένζυμα που περιέχονται στο καρπό της ελιάς, όσο και με την επίδραση που έχει στην κατανομή των φαινολών, και κυρίως των όρθο διφαινολών, στην λιπαρή και την υδατική φάση που δημιουργείται σε έναν μαλακτήρα ελαιοτριβείου.

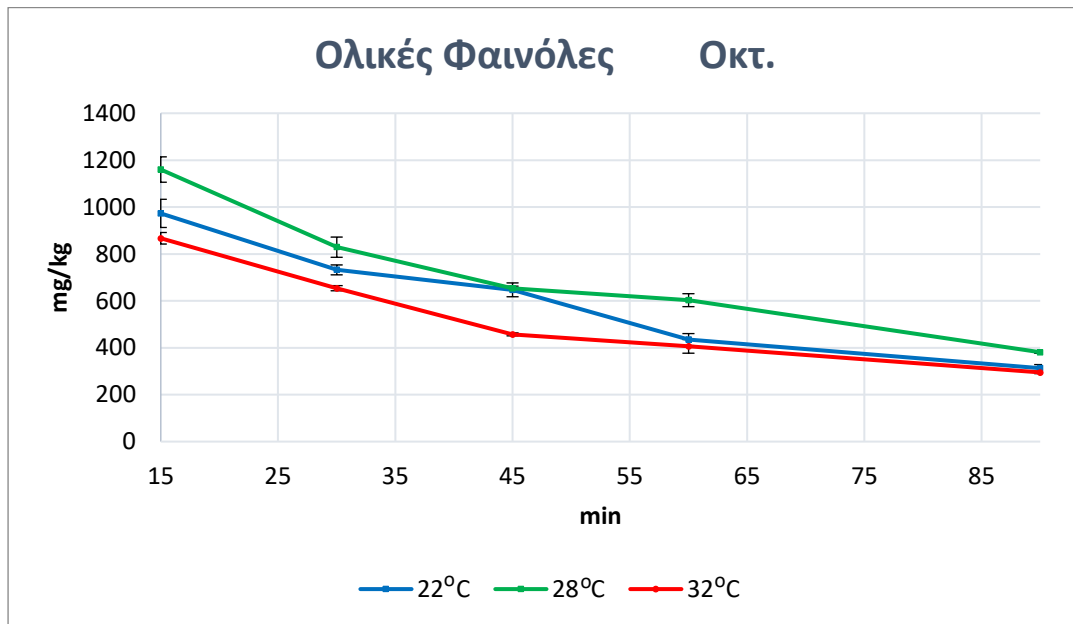
Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η επίδραση που έχει η θερμοκρασία μάλαξης πάνω στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών στα δείγματα “Κορωνέικης” ποικιλίας σε διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης, όπως αυτά προέκυψαν από την ελαιοποίηση καρπού σε εργαστηριακή κλίμακα για την ελαιοκομική περίοδο 2017-2018.

### *ί. Επίδραση στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών.*

- Για τα δείγματα ελαιολάδου τον Οκτώβριο 2017 προέκυψαν τα αποτελέσματα:

**Πίνακας 2.9:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.

Άθροισμα φαινολικών συστατικών						
Χρόνος μάλαξης (min)	23 °C		28 °C		32 °C	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	974	60	1160	54	867	25
30	732	21	829	43	654	11
45	646	29	654	9	457	6
60	432	26	603	28	406	29
90	296	15	381	5	295	5

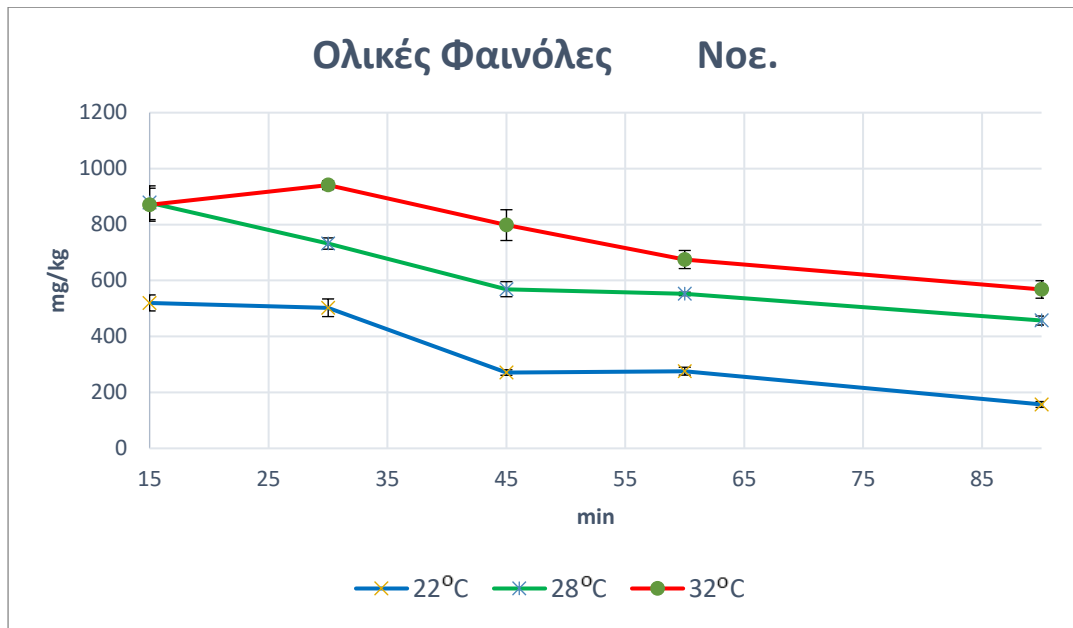


**Διάγραμμα 2.6:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Οκτώβριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.

- Για τα δείγματα ελαιολάδου τον Νοέμβριο του 2017 προέκυψαν τα αποτελέσματα:

**Πίνακας 2.10:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.

Άθροισμα φαινολικών συστατικών						
Χρόνος μάλαξης (min)	23 °C		28 °C		32 °C	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	520	29	878	60	871	59
30	502	31	732	20	941	16
45	271	10	569	27	798	55
60	276	14	552	6	675	32
90	157	10	457	16	568	31

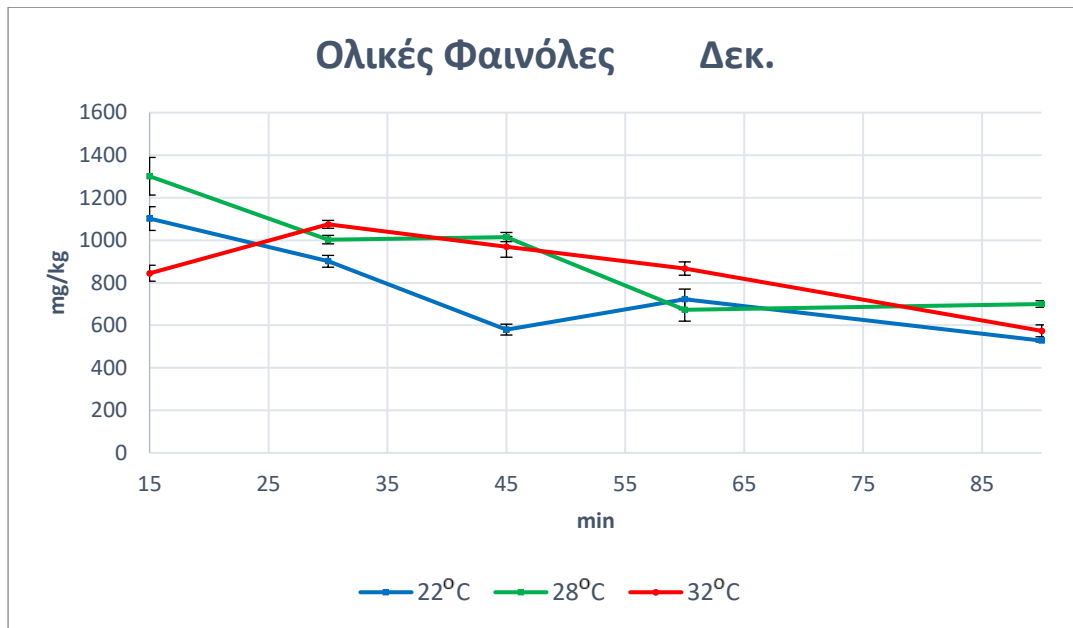


**Διάγραμμα 2.7:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Νοέμβριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.

- Για τα δείγματα ελαιολάδου τον Δεκέμβριο του 2017 προέκυψαν τα αποτελέσματα:

**Πίνακας 2.11:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών στα τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.

Άθροισμα φαινολικών συστατικών						
Χρόνος μάλαξης (min)	23 °C		28 °C		32 °C	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	1102	56	1301	88	845	38
30	901	28	1003	20	1075	19
45	580	26	1015	22	969	49
60	722	49	673	53	867	31
90	528	6	700	16	574	28

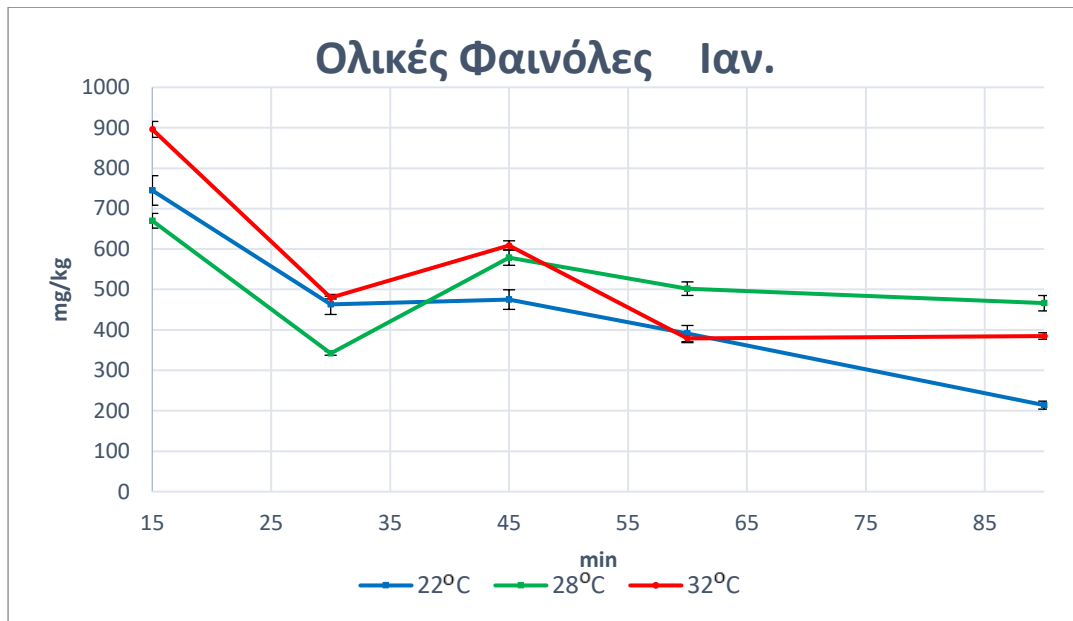


**Διάγραμμα 2.8:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Δεκέμβριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.

- Για τα δείγματα ελαιολάδου τον Ιανουάριο του 2018 προέκυψαν τα αποτελέσματα:

**Πίνακας 2.12 :** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών στα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άθροισμα φαινολικών συστατικών						
Χρόνος μάλαξης (min)	23 °C		28 °C		32 °C	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	745	37	670	18	896	20
30	463	25	342	5	480	3
45	475	24	579	19	609	11
60	391	20	502	17	379	10
90	214	10	466	19	385	8

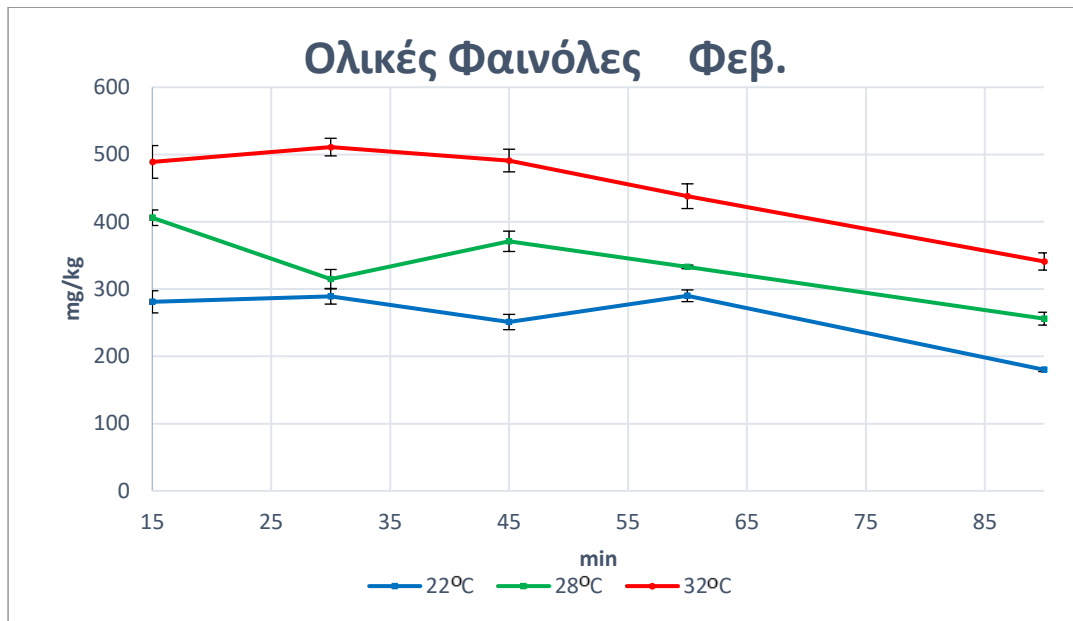


**Διάγραμμα 2.9:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Ιανουάριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.

- Για τα δείγματα ελαιολάδου τον Φεβρουάριο του 2018 προέκυψαν τα αποτελέσματα:

**Πίνακας 2.13:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για τα πειράματα ελαιοποίησης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για την ποικιλία Κορωνέικη.

Άθροισμα φαινολικών συστατικών						
Χρόνος μάλαξης (min)	23 °C		28 °C		32 °C	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	281	16	406	12	489	24
30	289	11	315	14	511	13
45	251	11	371	15	491	17
60	290	9	333	3	438	18
90	180	3	256	10	341	13



**Διάγραμμα 2.10:** Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών για την Κορωνέικη ποικιλία τον Φεβρουάριο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι μελετώντας το άθροισμα των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, ήταν σαφής η θετική επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου. Ανεξαρτήτως του βαθμού ωρίμανσης του ελαιόκαρπου, παρατηρήθηκε ότι έστω και μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας, οδήγησε σε συνολική αύξηση των φαινολικών συστατικών.

Σε όλες τις περιπτώσεις μελετήθηκε ο καρπός από τα ίδια δέντρα και ελαιοποιήθηκε την ίδια μέρα σε 5 διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης. Για να αποφευχθεί ο αστάθμητος παράγοντας του χρόνου της μάλαξης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του κάθε πειράματος καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας της μάλαξης και όχι σε μεμονωμένα χρονικά σημεία, και αντίστοιχα τα αποτελέσματα αξιολογούνται σαν συνολική τάση. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι το άθροισμα των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων που ελαιοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης (22°C) ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο άθροισμα στα πειράματα που εφαρμόστηκε μεσαία θερμοκρασία μάλαξης (28 °C) καθ' όλη την διάρκεια της μάλαξης με εξαίρεση τον Ιανουάριο, όπου και εκεί η μεσαία θερμοκρασία οδήγησε σε υψηλότερα φαινολικά αλλά από το 30 min και μετά.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν συγκρίνοντας την χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης με την υψηλή θερμοκρασία με μερικές αποκλίσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις η εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας μάλαξης είχε ως αποτέλεσμα είτε παρόμοιες συγκεντρώσεις με την μεσαία θερμοκρασία είτε ακόμα μεγαλύτερες. Μόνο σε πολύ αρχικά στάδια της ωρίμανσης

παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της θερμοκρασίας και του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών.

## *ii. Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην συγκέντρωση των κύριων φαινόλων.*

Η επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στο συνολικό φαινολικό φορτίο του ελαιολάδου ήταν σαφής για την Κορωνέικη ποικιλία. Με την πρόοδο που επιτυγχάνεται σταδιακά στην έρευνα του φαινολικού προφίλ του ελαιολάδου, αναπτύσσεται σιγά σιγά το ενδιαφέρον και για συγκεκριμένες φαινόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο. Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία, θα παρατηρήσουμε ότι τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες αφορούν στις βιολογικές δράσεις συγκεκριμένων φαινολικών συστατικών, όπως η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, αλλά και πιο σύνθετες όπως η ελαιοκανθάλη, η ελαιασίνη κ.α.. Η έρευνα αυτή ξεπερνά τα όρια των *in vitro* πειραμάτων και σιγά σιγά αναπτύσσονται και *in vivo* κλινικές μελέτες. Κατ' επέκταση δημιουργείται έντονο ενδιαφέρον για τον τρόπο με τον οποίο παράγονται αυτές οι ουσίες αλλά και για τους τρόπους με τους οποίους μπορούμε να τις παραλάβουμε από το ελαιόλαδο. Υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που αφορά στην συγκέντρωση των συγκεκριμένων φαινόλων στο ελαιόλαδο αλλά και τους παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται η βιοσύνθεσή τους.

Στην συγκεκριμένη διατριβή, η μελέτη των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού, μια μέθοδος που μας επιτρέπει να προσδιορίζουμε ποσοτικά, κάθε φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου. Έτσι προχωρήσαμε στην μελέτη των φαινολικών συστατικών Ελαιοκανθάλη, Ελαιασίνη, Ελαιομισσιονάλη, Ελαιοκορωνάλη καθώς και των μονοαλδεϋδικών μορφών του άγλυκου λιγκστροσίδη και ελευρωπαΐνης ως προς την επίδραση που έχουν σε αυτά οι διαφορετικές θερμοκρασίες μάλαξης. Οι φαινόλες αυτές αποτελούν τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, και όσο αφορά την ελαιοκορωνάλη και την ελαιομισσιονάλη, είναι η πρώτη φορά που γίνεται ο ποσοτικός τους προσδιορισμός τόσο στην Κορωνέικη ποικιλία, όσο και στο ελαιόλαδο γενικά.

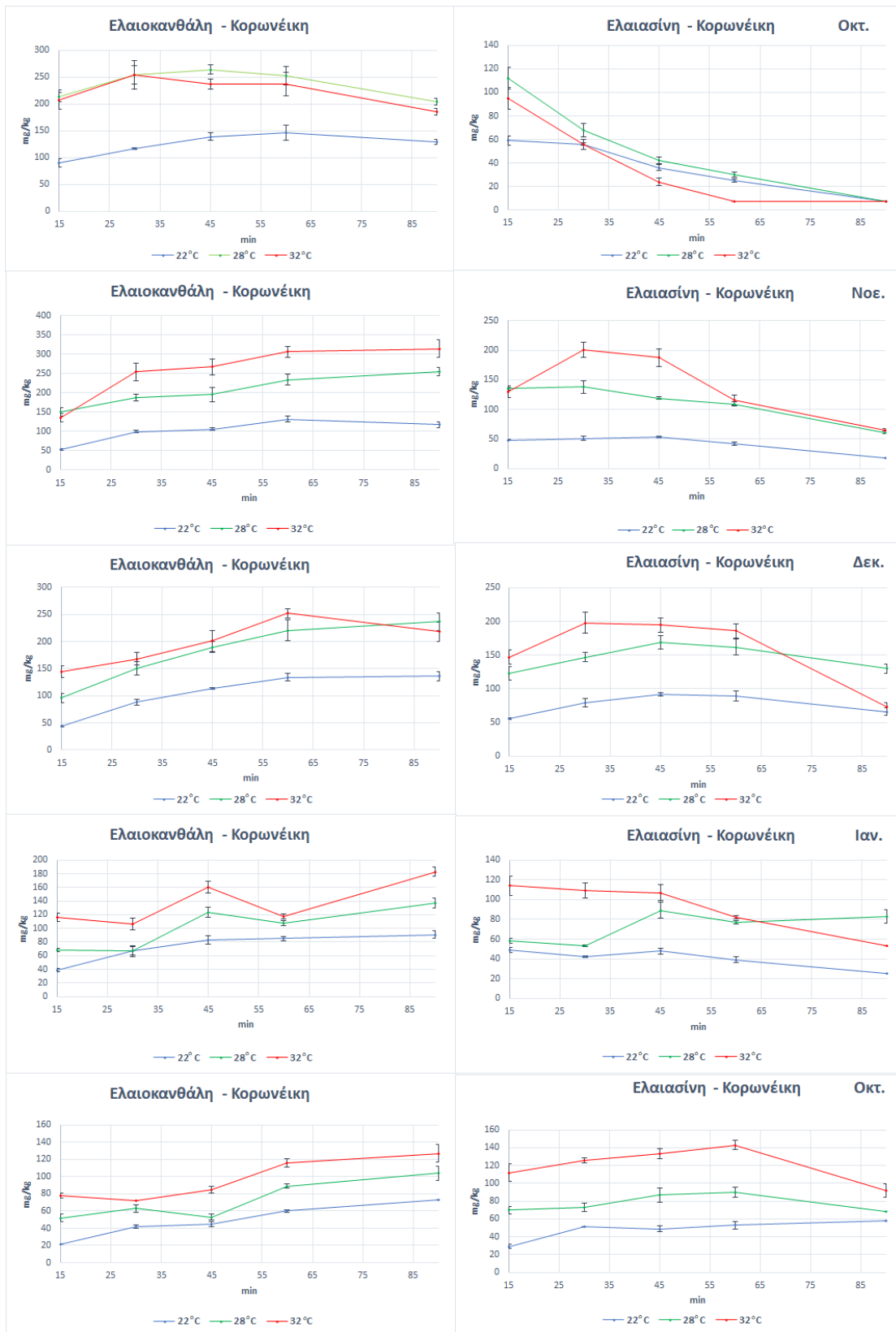
Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, ελαιοκορωνάλη ελαιομισσιονάλη, άγλυκο της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη στις διάφορες θερμοκρασίες μάλαξης για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

**Πίνακας 2.14:** Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ελαιοκανθάλη και Ελαιασίνη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην Κορωνέικη ποικιλία.

Κορωνέικη							
		T=22 °C		T=28 °C		T=32 °C	
Οκτώβριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	90	8	213	9	208	18
	30	117	2	254	26	254	18
	45	139	7	264	9	237	9
	60	147	14	252	17	237	21
	90	129	5	204	6	185	6
Νοέμβριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	53	3	150	11	136	11
	30	99	4	188	9	254	23
	45	106	2	195	18	267	20
	60	132	8	234	14	306	14
	90	117	8	254	10	314	22
Δεκέμβριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	44	2	96	9	144	11
	30	88	5	150	12	168	12
	45	114	2	190	10	201	20
	60	134	7	221	19	252	9
	90	136	8	237	16	218	18
Ιανουάριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	39	2	68	3	116	6
	30	67	6	67	8	106	9
	45	83	6	124	8	160	9
	60	85	3	108	4	117	4
	90	91	6	137	7	183	7
Φεβρουάριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD	Ελαιοκανθάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	min	mg/kg
	15	21	0	52	4	78	3
	30	42	2	63	5	72	0
	45	45	3	53	4	85	4
	60	60	1	89	3	116	5
	90	73	0	104	9	127	10



Κορωνέικη							
		T=22 °C		T=28 °C		T=32 °C	
Οκτώβριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	59	4	112	10	95	10
	30	56	4	68	6	56	1
	45	36	2	42	3	24	3
	60	25	2	30	2	7	0
	90	7	0	7	0	7	0
Νοέμβριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	48	1	135	3	130	11
	30	51	4	138	10	201	13
	45	53	2	119	2	188	15
	60	42	3	109	3	116	8
	90	18	0	61	2	65	2
Δεκέμβριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	56	1	123	11	147	11
	30	80	6	147	7	198	16
	45	92	3	169	11	195	11
	60	89	7	162	12	186	11
	90	66	6	130	7	73	7
Ιανουάριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	49	3	58	3	114	10
	30	42	1	53	1	109	8
	45	48	3	89	8	107	8
	60	39	3	77	2	82	2
	90	25	0	83	7	53	0
Φεβρουάριος	Χρόνος Μά- λαξης	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD	Ελαιασίνη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	min	mg/kg
	15	29	2	70	4	112	10
	30	51	0	73	4	126	3
	45	49	3	87	8	133	6
	60	53	4	90	5	143	5
	90	58	0	68	0	92	8

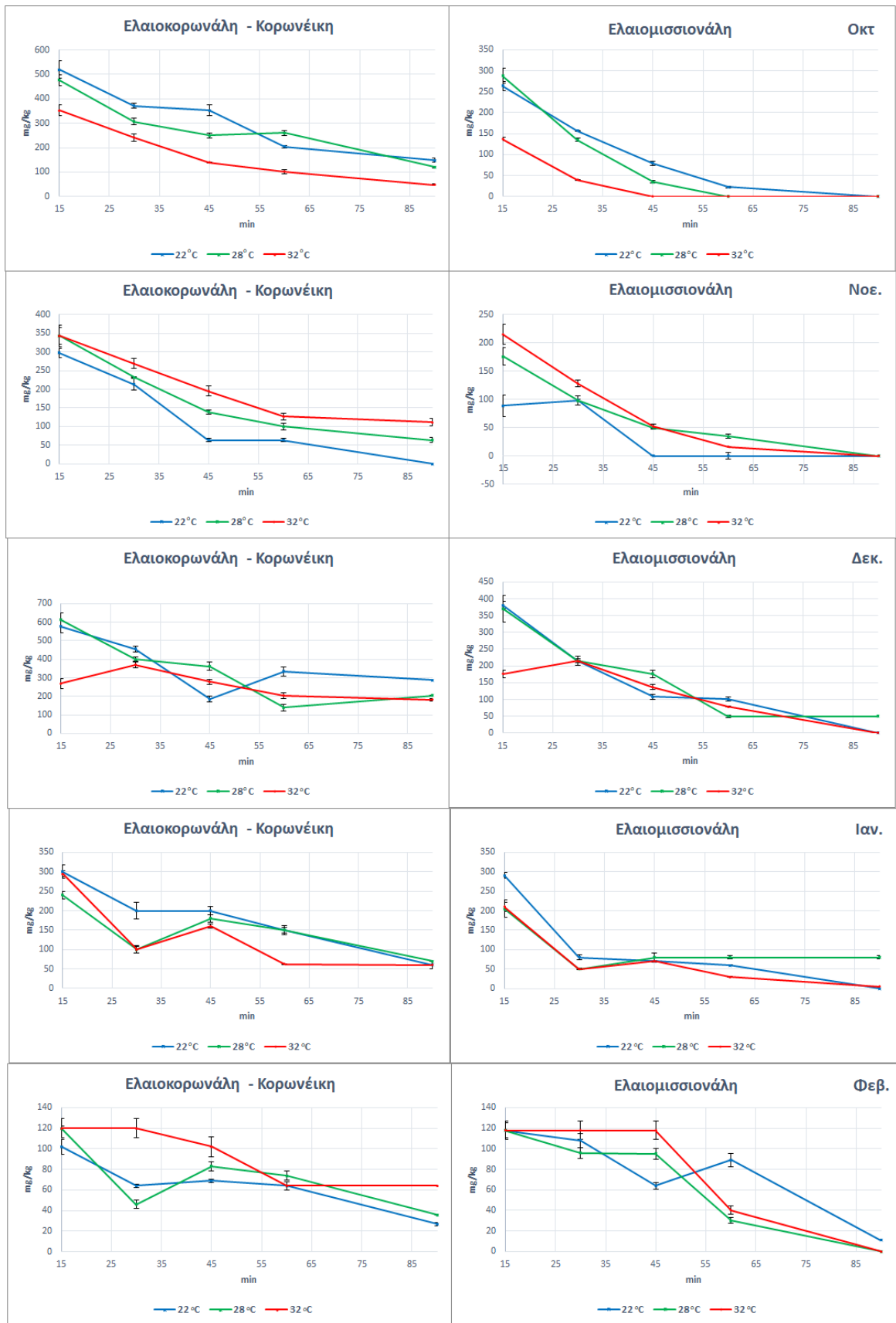


**Διάγραμμα 2.11:** Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία.

**Πίνακας 2.15:** Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών Ελαιοκορωνάλη και Ελαιομισσιονάλη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην Κορωνέικη ποικιλία.

cv. Koroneiki							
		T=22 °C		T=28 °C		T=32 °C	
<b>Οκτώβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	520	36	476	22	353	21
	30	371	11	306	13	241	15
	45	353	22	250	9	139	2
	60	204	4	260	10	102	8
	90	148	9	120	2	48	4
<b>Νοέμβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	297	13	343	29	343	23
	30	213	16	232	1	269	14
	45	64	5	139	6	195	14
	60	64	5	100	9	127	9
	90	0	0	64	6	111	10
<b>Δεκέμβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	576	35	613	38	269	26
	30	455	14	399	12	371	18
	45	185	16	362	22	278	15
	60	334	24	139	17	204	14
	90	288	3	204	1	181	5
<b>Ιανουάριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	300	17	240	9	295	8
	30	200	21	100	9	100	10
	45	200	11	180	9	160	5
	60	150	12	150	7	62	1
	90	60	9	70	0	60	0
<b>Φεβρουάριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD	Ελαιοκορωνάλη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	min	mg/kg
	15	102	7	120	2	120	9
	30	64	2	46	4	120	9
	45	69	2	83	4	102	10
	60	64	4	74	4	64	0
	90	27	1	36	0	64	0

cv. Koroneiki							
		T=22 °C		T=28 °C		T=32 °C	
<b>Οκτώβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	264	11	288	18	137	4
	30	157	1	135	4	40	1
	45	79	5	35	3	0	0
	60	23	2	0	0	0	0
	90	0	0	0	0	0	0
<b>Νοέμβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	89	19	176	15	215	18
	30	98	2	98	8	128	6
	45	0	8	50	1	52	5
	60	0	6	35	4	16	0
	90	0	0	0	0	0	0
<b>Δεκέμβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	381	11	371	40	176	11
	30	215	7	215	13	215	2
	45	108	7	176	11	137	8
	60	101	6	50	3	79	2
	90	0	0	50	0	0	0
<b>Ιανουάριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	290	7	205	23	210	11
	30	80	6	50	1	50	2
	45	70	2	80	10	70	1
	60	60	1	80	5	30	1
	90	0	0	80	5	5	0
<b>Φεβρουάριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD	Ελαιομυσιονάλη Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	min	mg/kg
	15	118	7	118	9	118	9
	30	108	7	96	5	118	9
	45	64	3	95	5	118	9
	60	89	6	30	3	40	4
	90	11	0	0	0	0	0

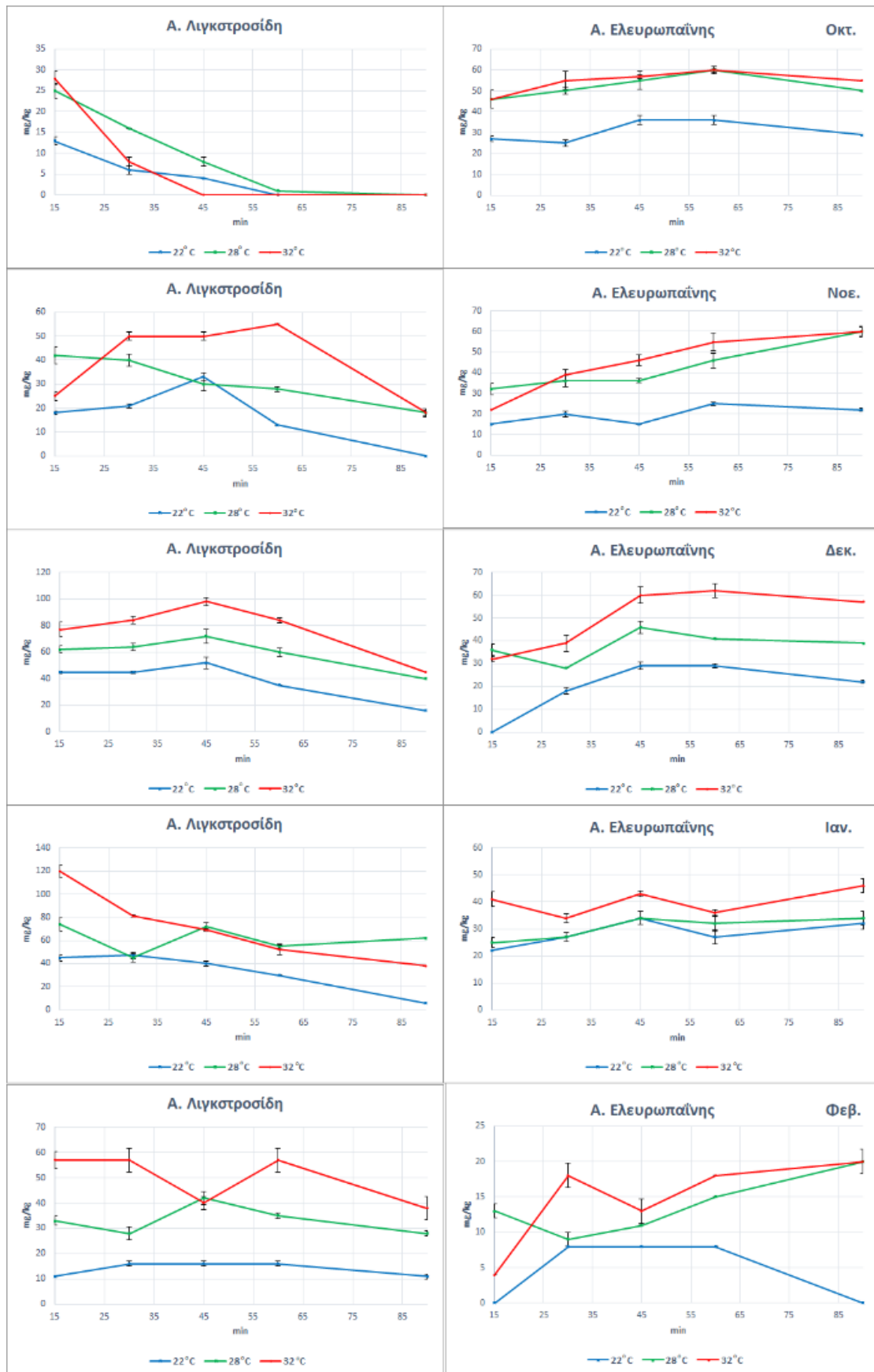


**Διάγραμμα 2.12:** Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία.

**Πίνακας 2.16:** Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών Άγλυκο Λιγκστροσίδη και Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην Κορωνέικη ποικιλία.

Κορωνέικη							
		T=22 °C		T=28 °C		T=32 °C	
Οκτώβριος	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	13	1	25	2	28	2
	30	6	1	16	0	8	1
	45	4	0	8	1	0	0
	60	0	0	1	0	0	0
	90	0	0	0	0	0	0
Νοέμβριος	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	18	1	42	3	25	2
	30	21	1	40	3	50	2
	45	33	2	30	3	50	2
	60	13	0	28	1	55	0
	90	<5	0	18	1	18	2
Δεκέμβριος	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	45	1	62	3	77	6
	30	45	1	64	3	84	3
	45	52	4	72	5	98	3
	60	35	0	60	3	84	2
	90	16	0	40	0	45	0
Ιανουάριος	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	45	3	74	6	120	6
	30	47	3	45	3	81	1
	45	40	2	72	3	69	1
	60	30	0	55	2	52	4
	90	6	0	62	0	38	0
Φεβρουάριος	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD	Άγλυκο Λιγκστροσίδη M.O.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	min	mg/kg
	15	11	0	33	2	57	3
	30	16	1	28	3	57	5
	45	16	1	42	3	40	3
	60	16	1	35	1	57	5
	90	11	1	28	1	38	5

cv. Koroneiki							
		T=22 °C		T=28 °C		T=32 °C	
<b>Οκτώβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	27	1	46	0	46	4
	30	25	2	50	2	55	4
	45	36	2	55	4	57	1
	60	36	2	60	2	60	1
	90	29	0	50	0	55	0
<b>Νοέμβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	15	0	32	3	22	0
	30	20	1	36	3	39	3
	45	15	0	36	1	46	3
	60	25	1	46	4	55	4
	90	22	1	60	3	60	2
<b>Δεκέμβριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	<5	0	36	3	32	1
	30	18	1	28	0	39	4
	45	29	2	46	3	60	4
	60	29	1	41	0	62	3
	90	22	1	39	0	57	0
<b>Ιανουάριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	15	22	0	25	2	41	3
	30	27	0	27	2	34	2
	45	34	2	34	0	43	1
	60	27	2	32	3	36	1
	90	32	2	34	3	46	3
<b>Φεβρουάριος</b>	Χρόνος Μάλαξης	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD	Άγλυκο Ελευρωπαϊνης Μ.Ο.	SD
	min	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	min	mg/kg
	15	<5	0	13	1	<5	0
	30	8	0	9	1	18	2
	45	8	0	11	0	13	2
	60	8	0	15	0	18	0
	90	<5	0	20	2	20	0



**Διάγραμμα 2.13:** Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στα άγλυκα λικτροσίδη και ελευρωπαϊνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία.



Όπως φάνηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η αύξηση της θερμοκρασίας ευνόησε το άθροισμα των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο. Η αύξηση αυτή πραγματοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σε μάλαξη μεσαίας θερμοκρασίας, ενώ πλην μερικών αποκλίσεων το ίδιο συνέβη και στις περιπτώσεις που εφαρμόστηκε η υψηλή θερμοκρασία.

Προχωρώντας στην ανάλυση συγκεκριμένων βιοφαινολών παρατηρήθηκε, ότι τόσο η ελαιοκανθάλη όσο και η ελαιασίνη ευνοήθηκαν σημαντικά από την αύξηση της θερμοκρασίας. Σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης που μελετήθηκαν για την Κορωνέικη ποικιλία, παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης των δειγμάτων που ελαιοποιήθηκαν σε μεσαία και υψηλή θερμοκρασία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τα δείγματα που ελαιοποιήθηκαν στην χαμηλή θερμοκρασία. Συγκεκριμένα για την ελαιοκανθάλη, συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις σε αρχικούς χρόνους μάλαξης (15 min), η αύξηση στην τιμή της συγκέντρωσης όταν εφαρμόστηκε μεσαία θερμοκρασία άγγιξε το 183% (δείγμα Νοεμβρίου) σε σχέση με εκείνη της χαμηλής θερμοκρασίας. Αντίστοιχα όταν εφαρμόστηκε υψηλή θερμοκρασία, η αύξηση σε σχέση με το ίδιο δείγμα που ελαιοποιήθηκε στην χαμηλή θερμοκρασία έφτασε 227% (δείγμα Δεκεμβρίου, από 44mg/kg στα 144 mg/kg ) η και 271% στο δείγμα Φεβρουαρίου.

Με στατιστικούς όρους, η ελαιοποίηση του καρπού σε μεσαία και υψηλή θερμοκρασία για τους αρχικούς χρόνους μάλαξης (15,30,45 min), οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της ελαιοκανθάλης.

**Πίνακας 2.17:** Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και του μοντέλου πολλαπλών Duncan's (ANOVA) καθώς και του μοντέλου Duncan MRT με  $p= 0.05$  για την ελαιοκανθάλη.

Μήνας Ελαιοποίησης	Θερμοκρασία Μάλαξης	Διάρκεια Μάλαξης		
		15 min	30 min	45 min
Οκτώβριος	32	208 <sup>a</sup>	254 <sup>a</sup>	237 <sup>b</sup>
	28	213 <sup>a</sup>	254 <sup>a</sup>	264 <sup>a</sup>
	22	90 <sup>b</sup>	117 <sup>b</sup>	139 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***
Νοέμβριος	32	136 <sup>a</sup>	254 <sup>a</sup>	267 <sup>a</sup>
	28	150 <sup>a</sup>	188 <sup>b</sup>	195 <sup>b</sup>
	22	53 <sup>b</sup>	99 <sup>c</sup>	106 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***
Δεκέμβριος	32	144 <sup>a</sup>	168 <sup>a</sup>	201 <sup>a</sup>
	28	96 <sup>b</sup>	150 <sup>a</sup>	190 <sup>a</sup>
	22	44 <sup>c</sup>	88 <sup>b</sup>	114 <sup>b</sup>
	ρ	***	***	***
Ιανουάριος	32	116 <sup>a</sup>	106 <sup>a</sup>	160 <sup>a</sup>
	28	68 <sup>b</sup>	67 <sup>b</sup>	124 <sup>b</sup>
	22	39 <sup>c</sup>	67 <sup>b</sup>	83 <sup>c</sup>
	ρ	***	**	***
Φεβρουάριος	32	78 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>
	28	52 <sup>b</sup>	63 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup>
	22	21 <sup>c</sup>	42 <sup>c</sup>	45 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***

Οι τιμές των μέσων όρων από το ίδιο γράμμα (a,b και c) στατιστικά δεν διαφέρουν σημαντικά. Αντίστοιχα για την ελαιασίνη η αύξηση αυτή ήταν σημαντική, αν και κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα. Έτσι η μεγαλύτερη αύξηση που παρατηρήθηκε σε αρχικούς χρόνους (15 min) όταν εφαρμόστηκε μεσαία θερμοκρασία στο δείγμα Νοεμβρίου ήταν 181%, ενώ στο δείγμα Φεβρουαρίου όταν εφαρμόστηκε υψηλή θερμοκρασία μάλαξης, η αύξηση σε σχέση με το αντίστοιχο πείραμα στην χαμηλή θερμοκρασία ήταν 286%.

Ομοίως και για την ελαιασίνη, η αύξηση της συγκέντρωσης είναι στατιστικά σημαντική όταν αυξάνεται η θερμοκρασία για τους αρχικούς χρόνους μάλαξης (15,30,45 min).

**Πίνακας 2.18:** Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και καθώς του μοντέλου πολλαπλών Duncan's (ANOVA) και του μοντέλου Duncan MRT με  $p=0.05$  για την ελαιασίνη.

Μήνας Ελαιοποίησης	Θερμοκρασία Μάλαξης	Διάρκεια Μάλαξης		
		15 min	30 min	15 min
Οκτώβριος	32	95 <sup>b</sup>	56 <sup>b</sup>	24 <sup>c</sup>
	28	112 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>
	22	59 <sup>c</sup>	56 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>
	ρ	**	*	**
Νοέμβριος	32	130 <sup>a</sup>	201 <sup>a</sup>	188 <sup>a</sup>
	28	135 <sup>a</sup>	138 <sup>b</sup>	119 <sup>b</sup>
	22	48 <sup>b</sup>	51 <sup>c</sup>	53 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***
Δεκέμβριος	32	147 <sup>a</sup>	198 <sup>a</sup>	195 <sup>a</sup>
	28	123 <sup>b</sup>	147 <sup>b</sup>	169 <sup>b</sup>
	22	56 <sup>c</sup>	80 <sup>c</sup>	92 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***
Ιανουάριος	32	114 <sup>a</sup>	109 <sup>a</sup>	107 <sup>a</sup>
	28	58 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup>	89 <sup>b</sup>
	22	49 <sup>b</sup>	42 <sup>c</sup>	48 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***
Φεβρουάριος	32	112 <sup>a</sup>	126 <sup>a</sup>	133 <sup>a</sup>
	28	70 <sup>b</sup>	73 <sup>b</sup>	87 <sup>b</sup>
	22	29 <sup>c</sup>	51 <sup>c</sup>	49 <sup>c</sup>
	ρ	***	***	***

. Οι τιμές των μέσων όρων από το ίδιο γράμμα (a,b και c) στατιστικά δεν διαφέρουν σημαντικά.

Περνώντας στα αποτελέσματα της ελαιοκορωνάλης και ελαιομισσιονάλης, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει επίδραση της θερμοκρασίας στην συγκέντρωση τους αλλά όχι με την ίδια ξεκάθαρη τάση όπως προηγουμένως. Συγκεκριμένα για την ελαιοκορωνάλη υπήρξαν 3 πειράματα ( Οκτώβριο, Δεκέμβριο και Φεβρουάριο) όπου η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μικρότερες συγκεντρώσεις ελαιοκορωνάλης. Αντίστοιχα η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης στα 3 από τα 5 πειράματα.

Τέλος, αναλύοντας τα αποτελέσματα του άγλυκου της ελευρωπαϊνης και του άγλυκου του λιγκτροσίδη θα παρατηρήθηκε ότι τα δύο αυτά συστατικά ακολούθησαν τις ίδιες γενικές τάσεις

με αυτές της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης, τόσο το άγλυκο του λιγκστροσίδη όσο και το άγλυκο της ελευρωπαϊνης, όταν εφαρμόστηκε μεσαία ή υψηλή θερμοκρασία είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα δείγματα που ελαιοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης. Θα πρέπει να επισημανθεί βέβαια ότι οι συγκεντρώσεις των δύο αυτών συστατικών σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης και σε όλες τις θερμοκρασίες, έχουν χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι υπάρχει ισχυρή εξάρτηση όλων των φαινολικών συστατικών από την θερμοκρασία μάλαξης. Η συσχέτιση αυτή μάλιστα φαίνεται να μην είναι ίδια για όλα τα συστατικά. Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη εμφάνισαν θετική συσχέτιση με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ ίδια εξάρτηση εμφάνισαν τα άγλυκα της ελευρωπαϊνης και λιγκστροσίδη, με την διαφορά ότι οι συγκεντρώσεις τους παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα. Χαρακτηριστική απόκλιση από αυτό το μοτίβο εμφανίζουν τα συστατικά ελαιοκορωνάλη και ελαιομισιονάλη τα οποία σε κάποιες περιπτώσεις επηρεάστηκαν θετικά από την αύξηση της θερμοκρασίας και σε άλλες αρνητικά.

Πολλοί ερευνητές, αναφέρουν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύει την δράση υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων που έχει ως συνέπεια την μείωση των φαινολικών συστατικών. Η ισχυρή εξάρτηση, και μάλιστα θετική, των φαινολικών συστατικών από την θερμοκρασία, όπως παρουσιάστηκε στις προηγούμενες παραγράφους, υποδεικνύει ότι πέρα από την δράση ενζύμων όπως οι PPO και POD, κατά την διάρκεια της μάλαξης δρουν και άλλα ένζυμα τα οποία σχετίζονται με την σύνθεση των συστατικών αυτών.

### 2.4.3 Επίδραση του χρόνου μάλαξης στα φαινολικά συστατικά.

Ένας ακόμα παράγοντας που μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ήταν ο χρόνος μάλαξης. Όπως έχει ήδη αρχίσει να φαίνεται, από τα διαγράμματα που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες παραγράφους, ο χρόνος μάλαξης φαίνεται να έχει μια αρκετά σημαντική επίδραση στα φαινολικά συστατικά.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαντικό ρόλο στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών παίζουν τα υδρολυτικά ένζυμα που υπάρχουν στον καρπό της ελιάς. Για τον λόγο αυτό σε πολλές εργασίες έχει μελετηθεί και η δραστηριότητα των ενζύμων του καρπού της ελιάς όπως και η σταθερότητα τους στον χρόνο, σε διαφορετικές θερμοκρασίες αλλά και διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης. Αντίστοιχα όπως έχει ήδη αρχίσει να φαίνεται από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, επίσης σημαντική είναι και η παρουσία και άλλων ενζύμων τα οποία ευνοούν την δημιουργία φαινολικών συστατικών, και τα οποία επίσης επηρεάζονται σημαντικά από όλους αυτούς τους παράγοντες.

Η κατανομή των φαινολικών συστατικών, και ειδικότερα των όρθοδιφαινολών, μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης του πολτού της ελιάς, είναι ακόμα μια αιτία για την μείωση των φαινολικών συστατικών και η οποία μάλιστα είναι προφανές, ότι εξαρτάται και από την θερμοκρασία και από τον χρόνο μάλαξης.

Σε προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε μια δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων όταν εξετάζεται μεμονωμένα ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Είναι προφανές, ότι η ενεργότητα των ενζύμων ή οι φυσικοχημικές συνθήκες που επικρατούν στον πολτό κατά την διάρκεια της μάλαξης, μεταβάλλονται ανάλογα με την θερμοκρασία που εφαρμόζεται στον μαλακτήρα, αλλά και ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού.

Αναπόφευκτα, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η χρονική διάρκεια της διαδικασίας της μάλαξης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η επίδραση που έχει η χρονική διάρκεια της μάλαξης αρχικά για την Κορωνέικη ποικιλία, όπου θα γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων τόσο για τους διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης, όσο και για τις διαφορετικές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται κατά την μάλαξη. Στην συνέχεια θα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα για τις διαφορετικές ποικιλίες που μελετήσαμε (Θρουμπολιά Αιγαίου, Αθηνολιά) συγκριτικά με τον εκάστοτε βαθμό ωρίμανσης του καρπού.

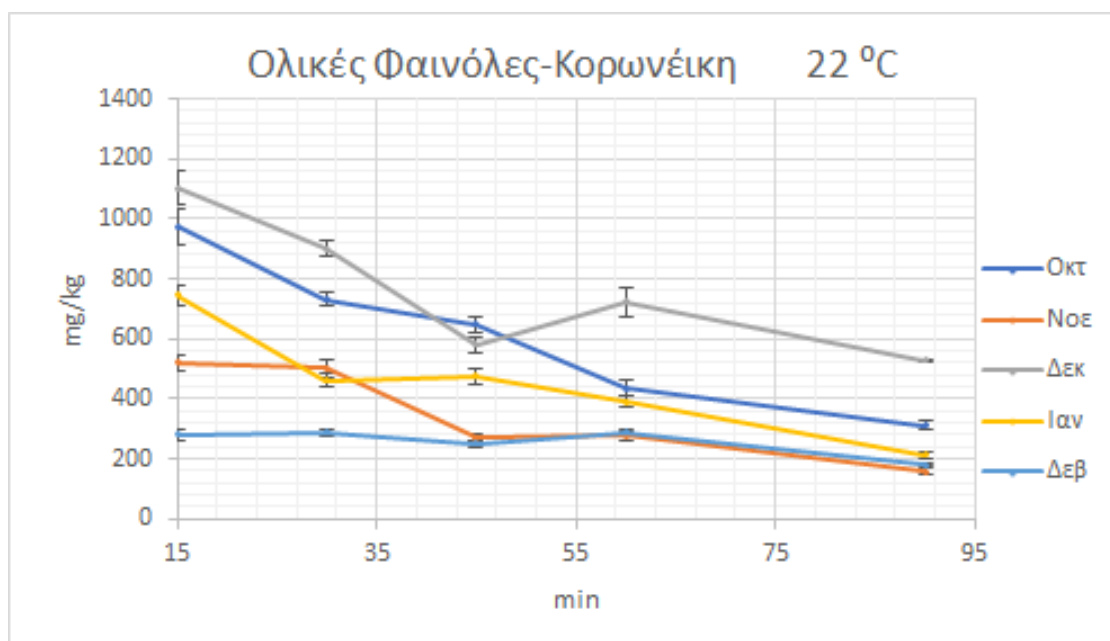
Επίσης, παρουσιάζεται η επίδραση που έχει ο χρόνος μάλαξης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών τόσο σαν σύνολο, όσο και μεμονωμένα για το κάθε συστατικό ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα που αφορούν το άθροισμα των φαινολικών συστατικών κατά την διάρκεια της μάλαξης έχουν ήδη παρουσιαστεί στην παράγραφο που έγινε η μελέτη της επίδρασης του βαθμού ωρίμανσης. Για την διευκόλυνση της συζήτησης των αποτελεσμάτων συνοπτικά θα παρουσιαστούν ξανά τα διαγράμματα που την αφορούν.

*i. Επίδραση χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες.*

**Κορωνέικη Ποικιλία.**

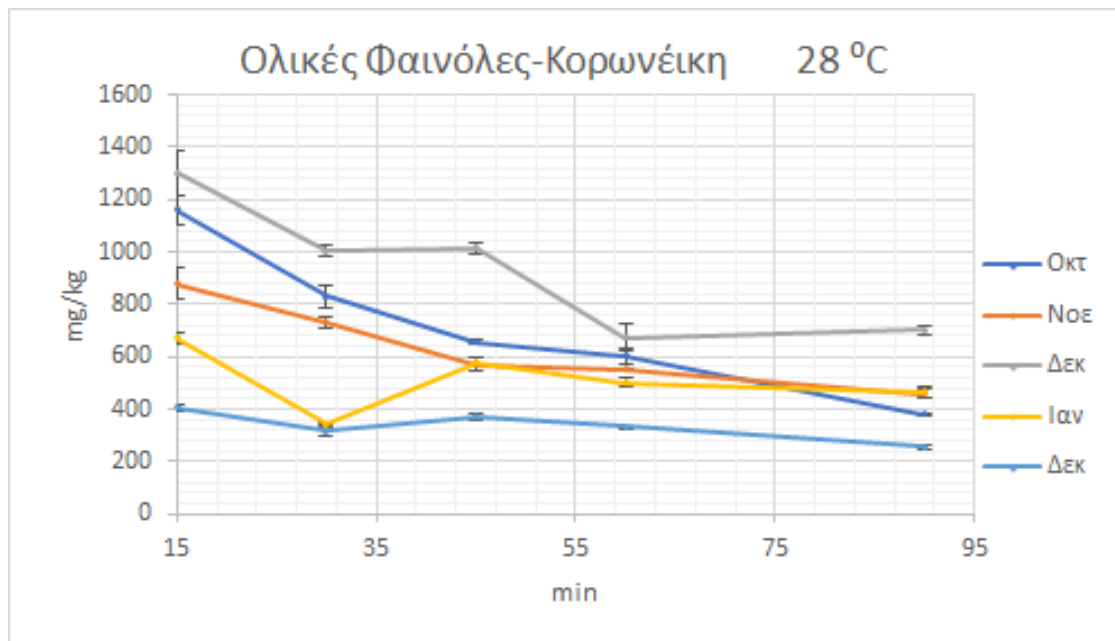
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την Κορωνέικη ποικιλία από την ελαιοκομική περίοδο 2017-2018 για τρεις θερμοκρασίες (Διαγράμματα 2.14-2.15-2.16):

- Χαμηλή θερμοκρασία (22 °C)



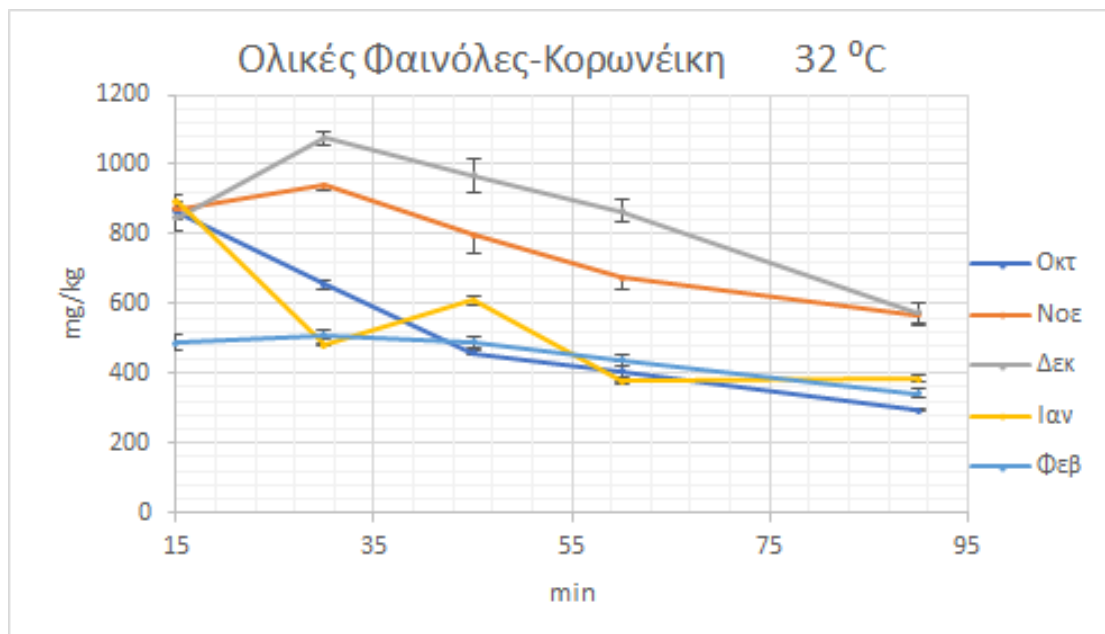
**Διάγραμμα 2.14 :** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.

- Μεσαία θερμοκρασία (28 °C).



**Διάγραμμα 2.15:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

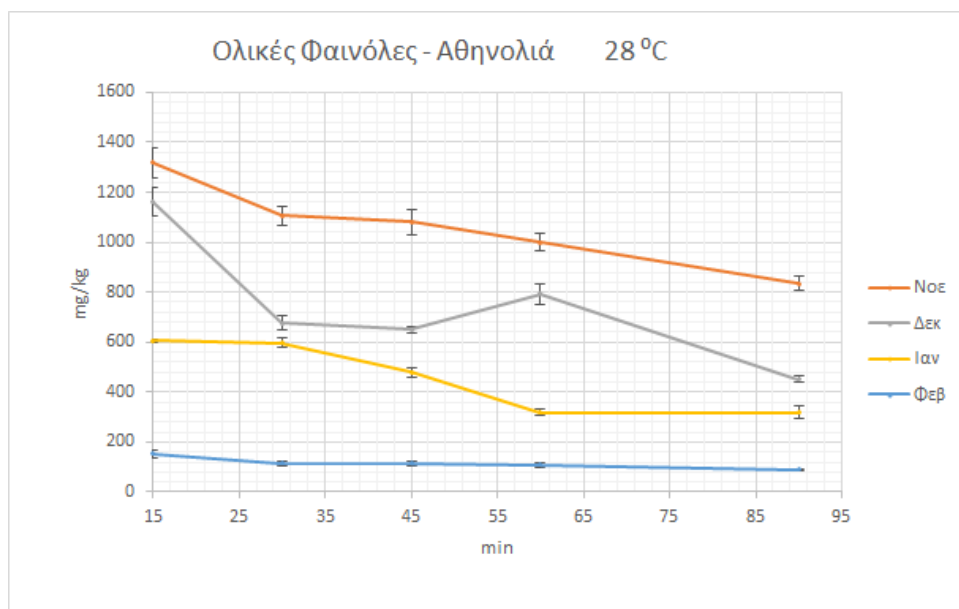
- Υψηλή θερμοκρασία (32 °C).



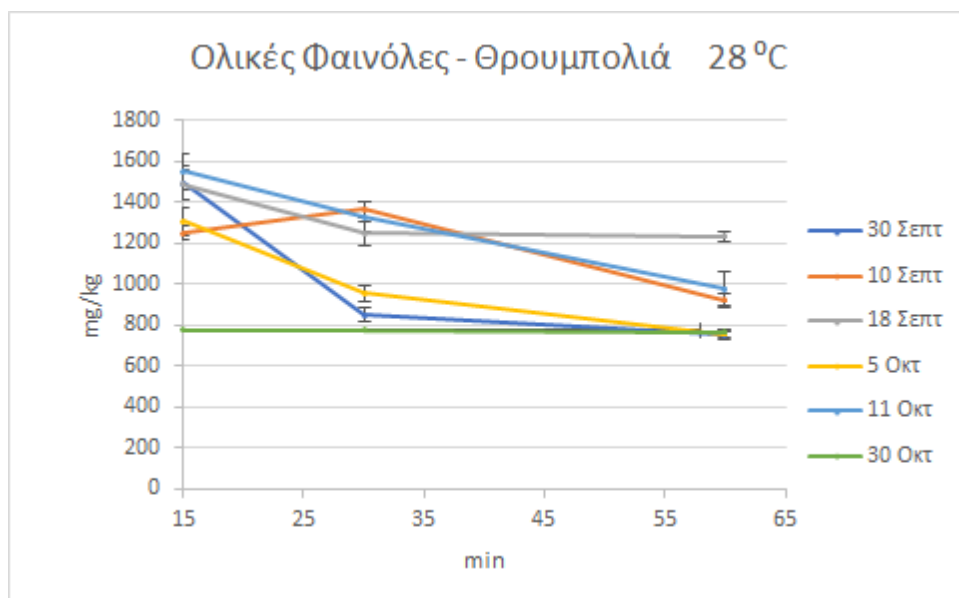
**Διάγραμμα 2.16:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

## Ποικιλία Αθηνολιάς ποικιλία Θρουμπολιάς Αιγαίου.

Για λόγους διευκόλυνσης της συζήτησης των αποτελεσμάτων, παρατίθενται ξανά τα δύο διαγράμματα που παρουσιάστηκαν και σε άλλο σημείο για την ποικιλία της Αθηνολιάς και της Θρουμπολιάς Αιγαίου (Διαγράμματα 2.17 - 2.18)..

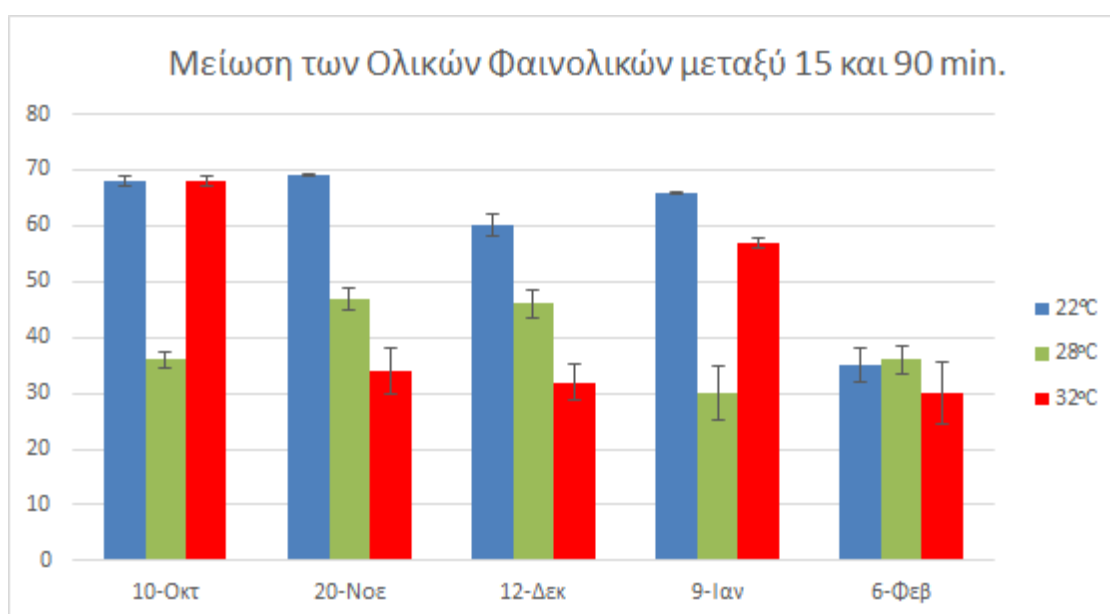


**Διάγραμμα 2.17 :** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Αθηνολιάς στους 28 °C.



**Διάγραμμα 2.18:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στις ολικές φαινόλες σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιάς Αιγαίου στους 28 °C.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σαφές ότι ο χρόνος μάλαξης είχε αρνητική συσχέτιση με την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο. Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, τόσο για την Κορωνέικη ποικιλία όσο και για την Αθηνολιά και την Θρουμπολιά Αιγαίου, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο μειώνεται κατά την διάρκεια της μάλαξης. Έτσι οι μέγιστες συγκεντρώσεις εμφανίστηκαν στους μικρότερους χρόνους μάλαξης που μελετήσαμε, τα 15 min, ενώ οι χαμηλότερες στο τέλος της μάλαξης στα 90 min. Η μείωση αυτή μάλιστα μεταξύ των ακραίων χρόνων μάλαξης ήταν εντονότερη στα πρώιμα στάδια ωρίμανσης και άγγιξε το 70% ενώ η μείωση ήταν μικρότερη όσο ο βαθμός ωρίμανσης αυξανόταν γεγονός που οφειλόταν και στο ήδη μειωμένο ποσοστό των φαινολών προς το τέλος της ωρίμανσης.



**Διάγραμμα 2.19:** Ποσοστιαία μείωση των φαινολικών συστατικών για όλες τις θερμοκρασίες και όλους τους βαθμούς συγκομιδής.

Μοναδική εξαίρεση στο παραπάνω μοτίβο αποτέλεσαν δύο περιπτώσεις όπου το άθροισμα των φαινολικών συστατικών αυξήθηκε για τα πρώτα 30 min της μάλαξης και μετά μειώθηκε, ακολουθώντας την γενική τάση που περιγράφηκε προηγουμένως. Τα δύο πειράματα αυτά αφορούν την Κορωνέικη ποικιλία, και έγιναν τον Νοέμβριο και τον Δεκέμβριο. Αξίζει τέλος να σημειωθεί, ότι και στις δύο περιπτώσεις, είχε εφαρμοστεί υψηλή θερμοκρασία μάλαξης.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την γενική πεποίθηση που αναφέρεται στην βιβλιογραφία, ότι δηλαδή οι οξειδωτικές και υδρολυτικές αντιδράσεις επιδρούν αρνητικά πάνω στο φαινολικό φορτίο. Η ύπαρξη βέβαια δύο περιπτώσεων που διαφοροποιήθηκαν από την γενική τάση καθώς και τα αποτελέσματα από την ανάλυση των μεμονωμένων φαινολών που θα παρουσιαστούν στα



επόμενα, αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την αποσαφήνιση της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

ii. *Επίδραση του χρόνου μάλαξης σε μεμονωμένα φαινολικά συστατικά.*

*Κορωνέικη Ποικιλία.*

Η επίδραση του χρόνου μάλαξης στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών ήταν σαφής. Όπως αποδείχτηκε στις περισσότερες περιπτώσεις η αύξηση του χρόνου μάλαξης οδήγησε σε μείωση των φαινολικών συστατικών, σαν σύνολο, με την μείωση αυτή να είναι συντριπτική σε ορισμένες περιπτώσεις.

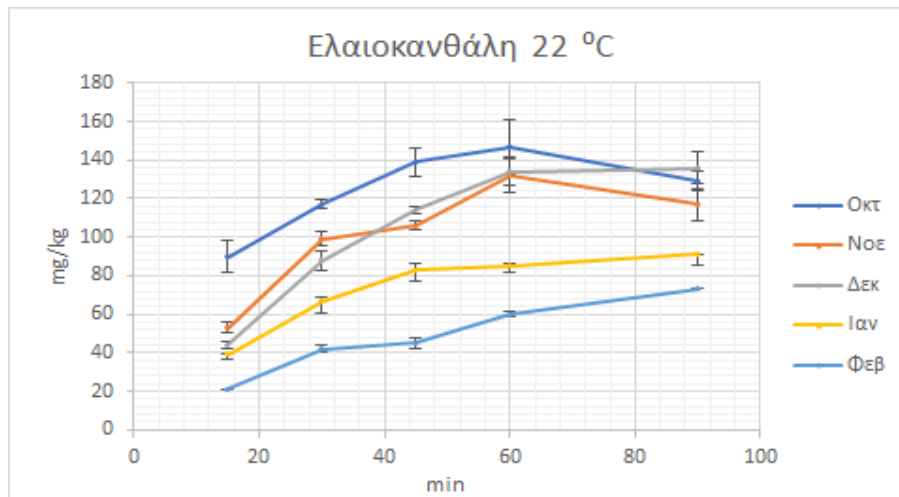
Σε αυτήν την παράγραφο θα παρουσιάζεται η επίδραση του χρόνου μάλαξης στις κύριες φαινόλες των δειγμάτων ελαιολάδου από Κορωνέικη ποικιλία. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για την ίδια κάθε φορά θερμοκρασία μάλαξης και για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

*Ελαιοκανθάλη και Ελαιασίνη.*

- Χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης (22 °C).

**Πίνακας 2.19:** Η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία στην Κορωνέικη ποικιλία.

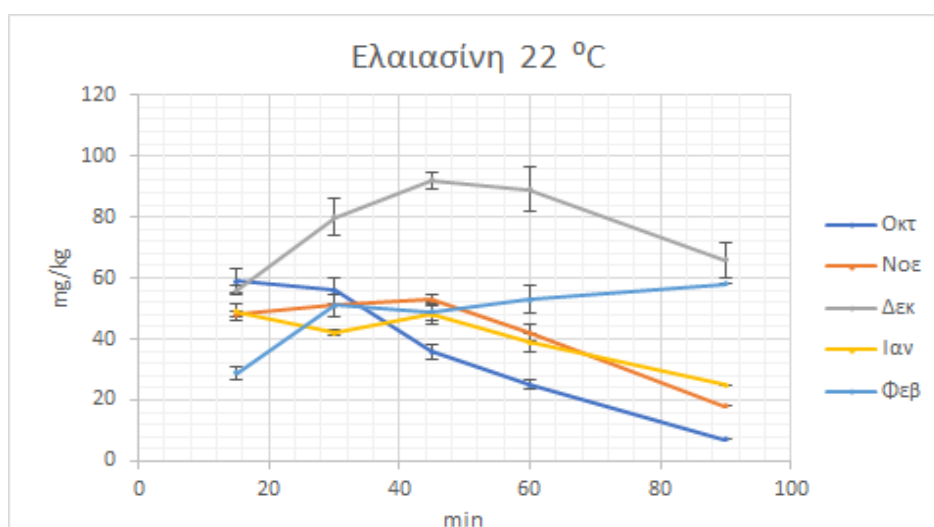
Άθροισμα Φαινολικών Συστατικών										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	90	8	53	3	44	2	39	2	21	0
30	117	2	99	4	88	5	67	6	42	2
45	139	7	106	2	114	2	83	6	45	3
60	147	14	132	8	134	7	85	3	60	1
90	129	5	117	8	136	8	91	6	73	0



**Διάγραμμα 2.20:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.

**Πίνακας 2.20:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιασίνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιασίνη										
Χρόνος μάλαξης (min)	Οκτ (mg/kg)		Νοε (mg/kg)		Δεκ (mg/kg)		Ιαν (mg/kg)		Φεβ (mg/kg)	
		SD		SD		SD		SD		SD
15	59	4	48	1	56	1	49	3	29	2
30	56	4	51	4	80	6	42	1	51	0
45	36	2	53	2	92	3	48	3	49	3
60	25	2	42	3	89	7	39	3	53	4
90	59	4	48	1	56	1	49	3	29	0

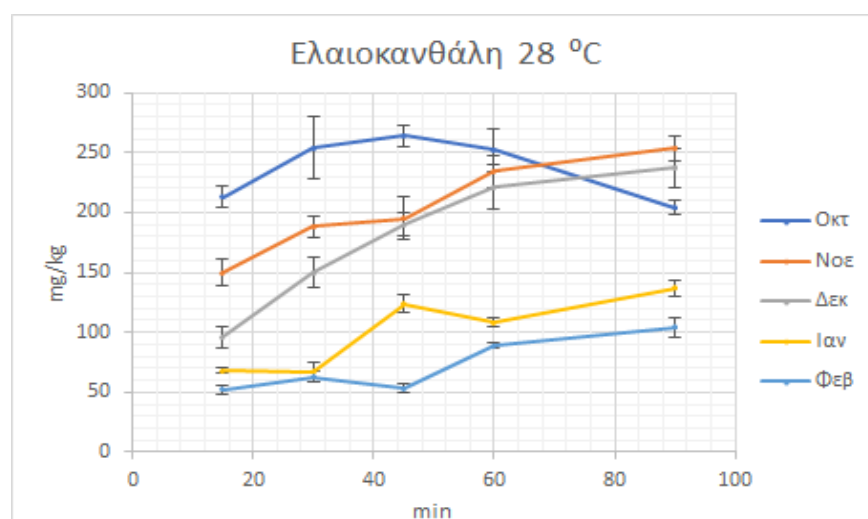


**Διάγραμμα 2.21:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.

- Μεσαία θερμοκρασία μάλαξης (28 °C).

**Πίνακας 2.21:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

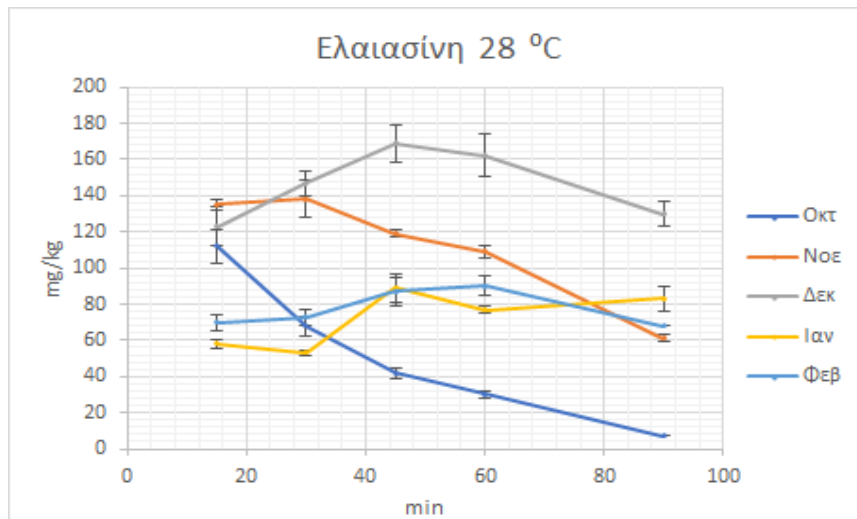
Ελαιοκανθάλη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	213	9	150	11	96	9	68	3	52	4
30	254	26	188	9	150	12	67	8	63	5
45	264	9	195	18	190	10	124	8	53	4
60	252	17	234	14	221	19	108	4	89	3
90	204	6	254	10	237	16	137	7	104	9



**Διάγραμμα 2.22:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

**Πίνακας 2.22:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιασίνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιασίνη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	112	10	135	3	123	11	58	3	70	4
30	68	6	138	10	147	7	53	1	73	4
45	42	3	119	2	169	11	89	8	87	8
60	30	2	109	3	162	12	77	2	90	5
90	7	0	61	2	130	7	83	7	68	0

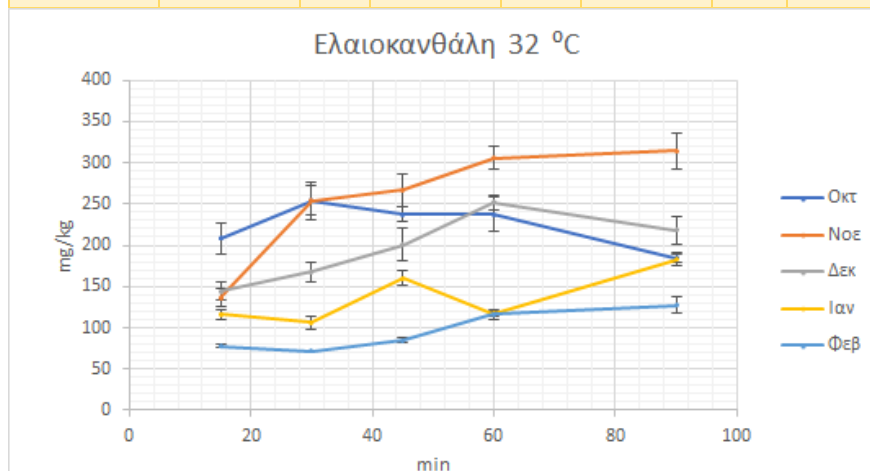


**Διάγραμμα 2.23:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

- Υψηλή θερμοκρασία μάλαξης (32°C).

**Πίνακας 2.23:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την Κορωνέικη ποικιλία σε υψηλή θερμοκρασία.

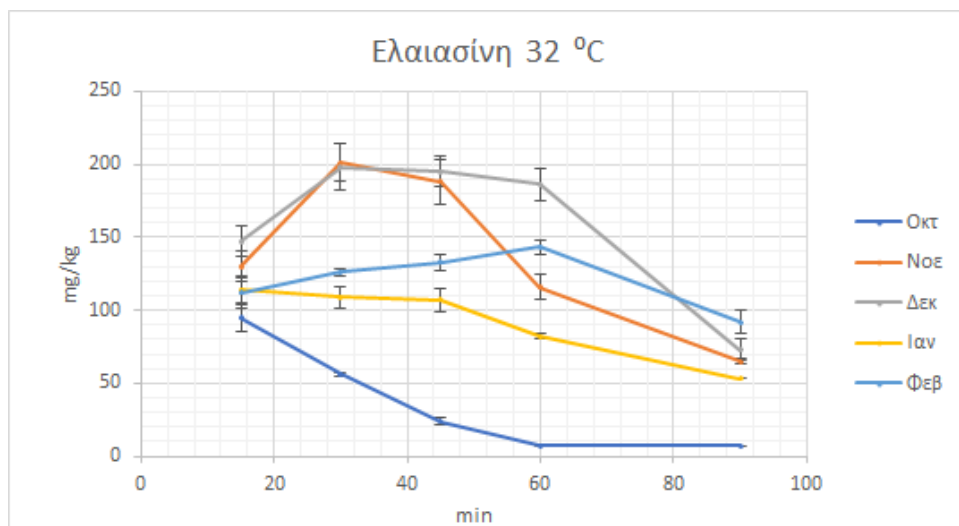
Ελαιοκανθάλη										
Χρόνος μάλαξης (min)	Οκτ (mg/kg)		Νοε (mg/kg)		Δεκ (mg/kg)		Ιαν (mg/kg)		Φεβ (mg/kg)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
15	208	18	136	11	144	11	116	6	78	3
30	254	18	254	23	168	12	106	9	72	0
45	237	9	267	20	201	20	160	9	85	4
60	237	21	306	14	252	9	117	4	116	5
90	185	6	314	22	218	18	183	7	127	10



**Διάγραμμα 2.24:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

**Πίνακας 2.24:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιασίνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιασίνη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	95	10	130	11	147	11	114	10	112	10
30	56	1	201	13	198	16	109	8	126	3
45	24	3	188	15	195	11	107	8	133	6
60	7	0	116	8	186	11	82	2	143	5
90	7	0	65	2	73	7	53	0	92	8



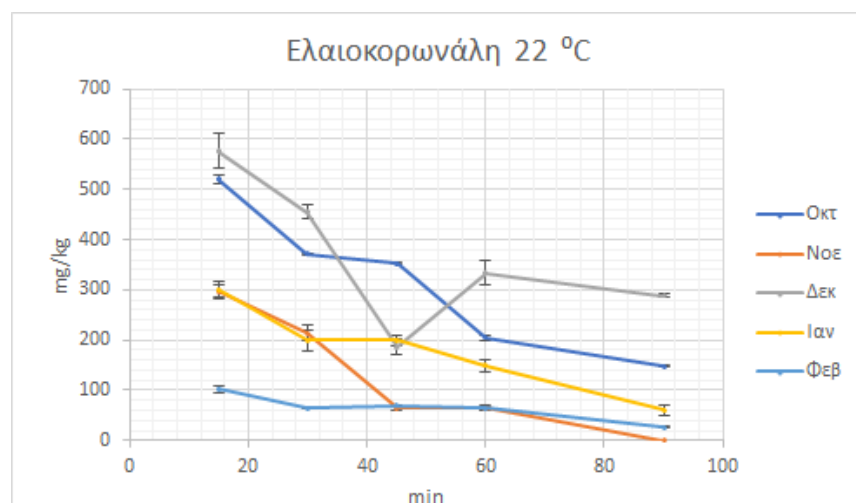
**Διάγραμμα 2.25:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

### Ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη.

- Χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης (22 °C).

**Πίνακας 2.25:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

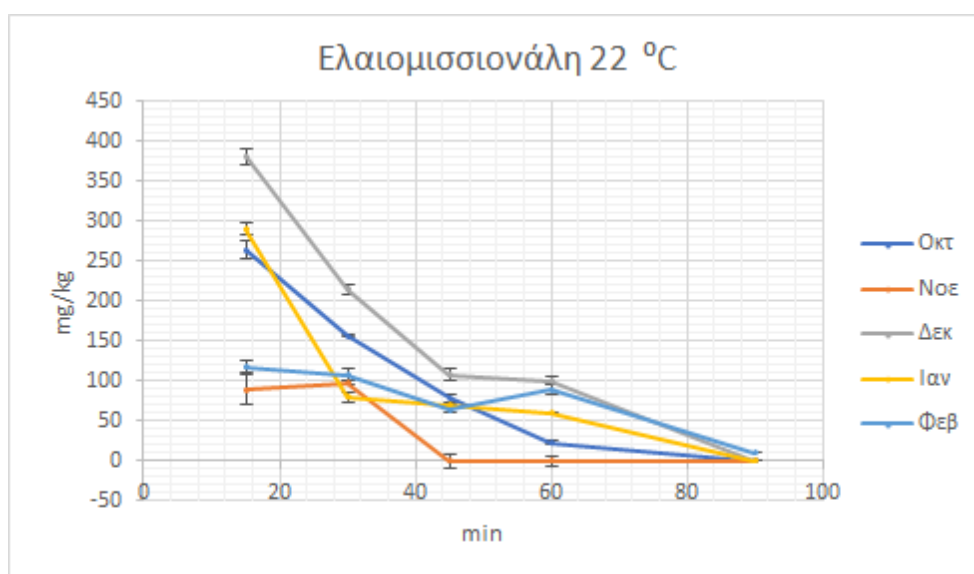
Ελαιοκορωνάλη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	520	36	297	13	576	35	300	17	102	7
30	371	11	213	16	455	14	200	21	64	2
45	353	22	64	5	185	16	200	11	69	2
60	204	4	64	5	334	24	150	12	64	4
90	148	9	<5	0	288	3	60	9	27	1



**Διάγραμμα 2.26:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.

**Πίνακας 2.26:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιομισσιονάλη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	264	11	89	19	381	11	290	7	118	7
30	157	1	98	2	215	7	80	6	108	7
45	79	5	<5	8	108	7	70	2	64	3
60	23	2	<5	6	101	6	60	1	89	6
90	<5	0	<5	0	<5	0	<5	0	11	0

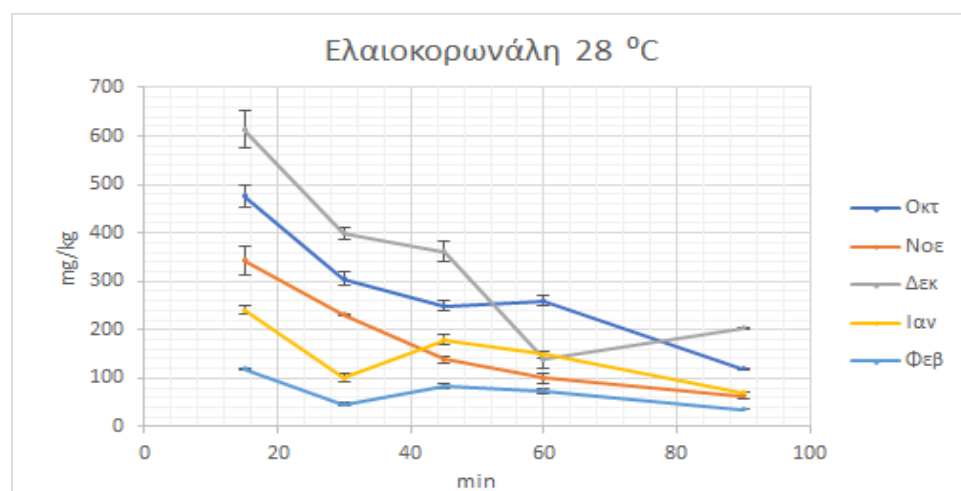


**Διάγραμμα 2.27:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22°C.

- Μεσαία θερμοκρασία μάλαξης (28 °C).

**Πίνακας 2.27:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

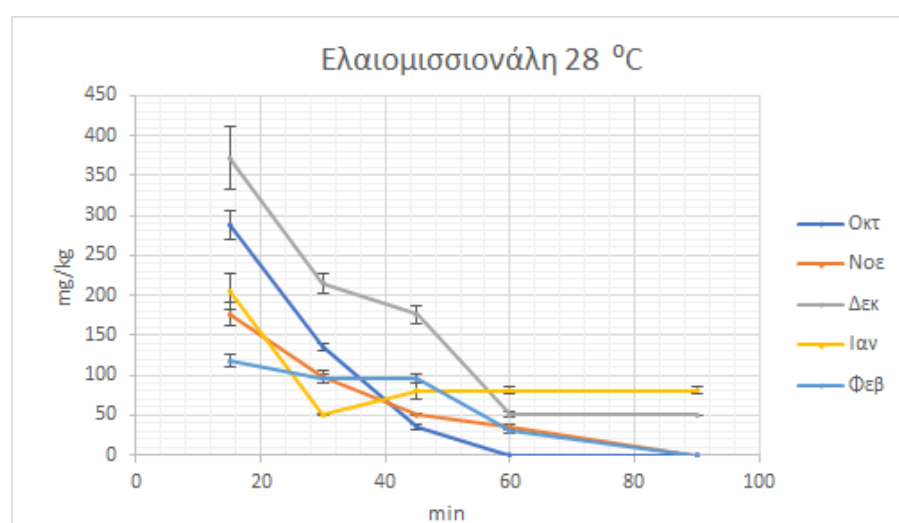
Ελαιοκορωνάλη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	476	22	343	29	613	38	240	9	120	2
30	306	13	232	1	399	12	100	9	46	4
45	250	9	139	6	362	22	180	9	83	4
60	260	10	100	9	139	17	150	7	74	4
90	120	2	64	6	204	1	70	0	36	0



**Διάγραμμα 2.28:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

**Πίνακας 2.28:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιομισσιονάλη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	288	18	176	15	371	40	205	23	118	9
30	135	4	98	8	215	13	50	1	96	5
45	35	3	50	1	176	11	80	10	95	5
60	<5	0	35	4	50	3	80	5	30	3
90	<5	0	<5	0	50	0	80	5	<5	0



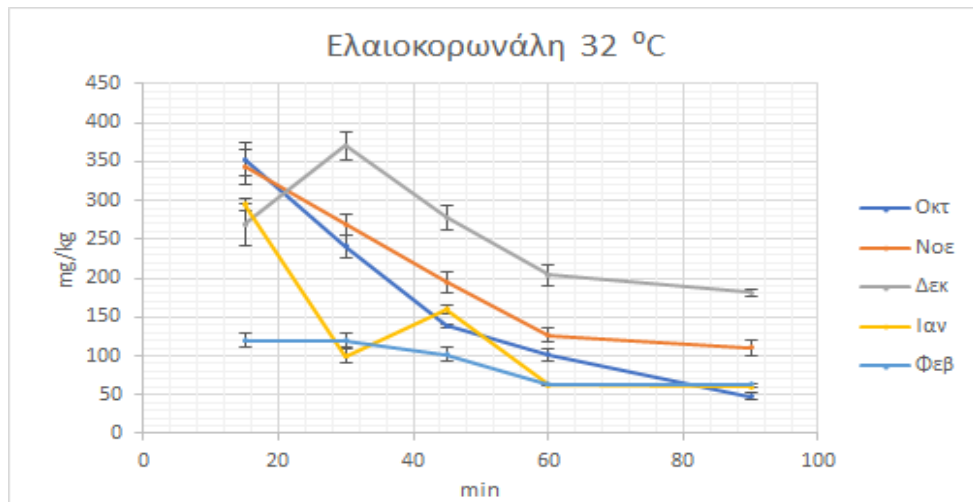
**Διάγραμμα 2.29:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

- Υψηλή θερμοκρασία μάλαξης (32 °C).

**Πίνακας 2.29:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιοκορωνάλη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	353	21	343	23	269	26	295	8	120	9
30	241	15	269	14	371	18	100	10	120	9
45	139	2	195	14	278	15	160	5	102	10
60	102	8	127	9	204	14	62	1	64	0
90	48	4	111	10	181	5	60	0	64	0

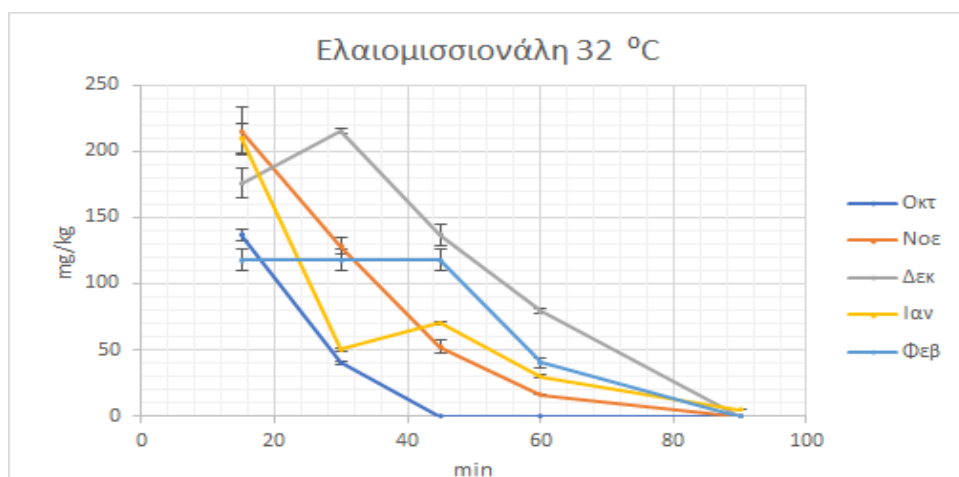




**Διάγραμμα 2.30:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

**Πίνακας 2.30:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιομυσιονάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Ελαιομυσιονάλη										
Χρόνος μάλαξης (min)	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	137	4	215	18	176	11	210	11	118	9
30	40	1	128	6	215	2	50	2	118	9
45	>5	0	52	5	137	8	70	1	118	9
60	>5	0	16	0	79	2	30	1	40	4
90	>5	0	>5	0	>5	0	5	0	>5	0



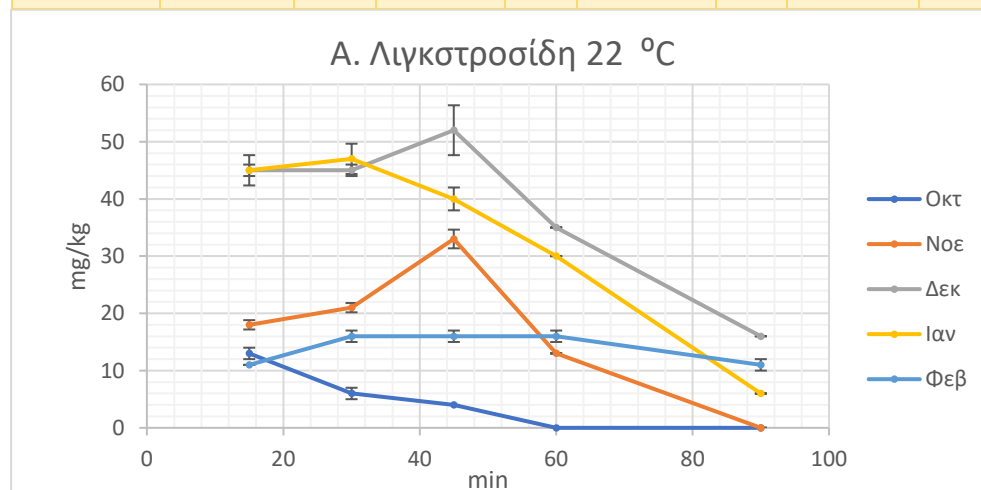
**Διάγραμμα 2.31:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομυσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

### Άγλυκο Λιγκτροσίδη και Άγλυκο Ελευρωπαΐνης.

- Χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης (22 °C).

**Πίνακας 2.31:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκου του Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

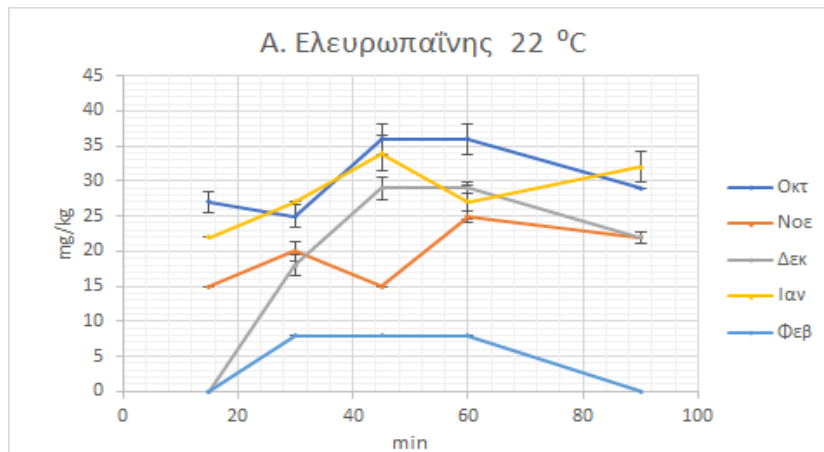
Άγλυκο Λιγκτροσίδη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	13	1	18	1	45	1	45	3	11	0
30	6	1	21	1	45	1	47	3	16	1
45	4	0	33	2	52	4	40	2	16	1
60	<5	0	13	0	35	0	30	0	16	1
90	<5	0	<5	0	16	0	6	0	11	1



**Διάγραμμα 2.32:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο του Λιγκτροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.

**Πίνακας 2.32:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Αγλυκου της ελευρωπαΐνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	27	1	15	0	<5	0	22	0	<5	0
30	25	2	20	1	18	1	27	0	8	0
45	36	2	15	0	29	2	34	2	8	0
60	36	2	25	1	29	1	27	2	8	0
90	29	0	22	1	22	1	32	2	<5	0

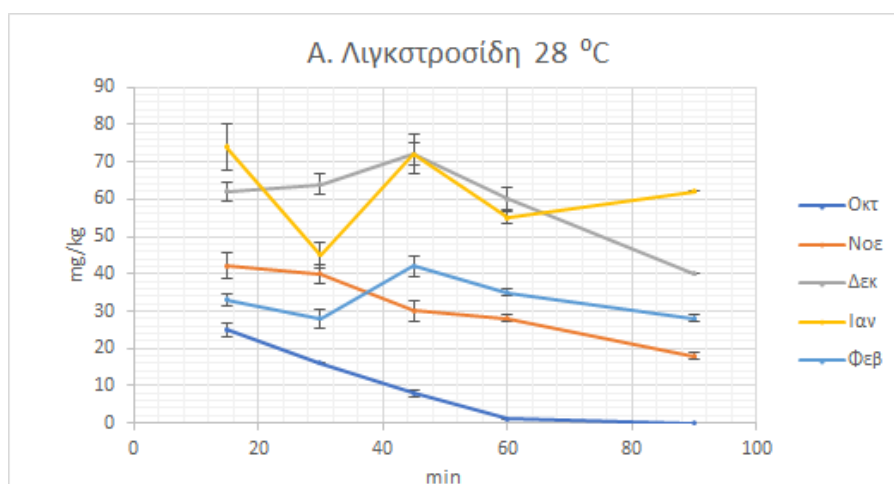


**Διάγραμμα 2.338:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 22 °C.

- Μεσαία θερμοκρασία μάλαξης (28 °C)

**Πίνακας 2.33 :** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο του Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

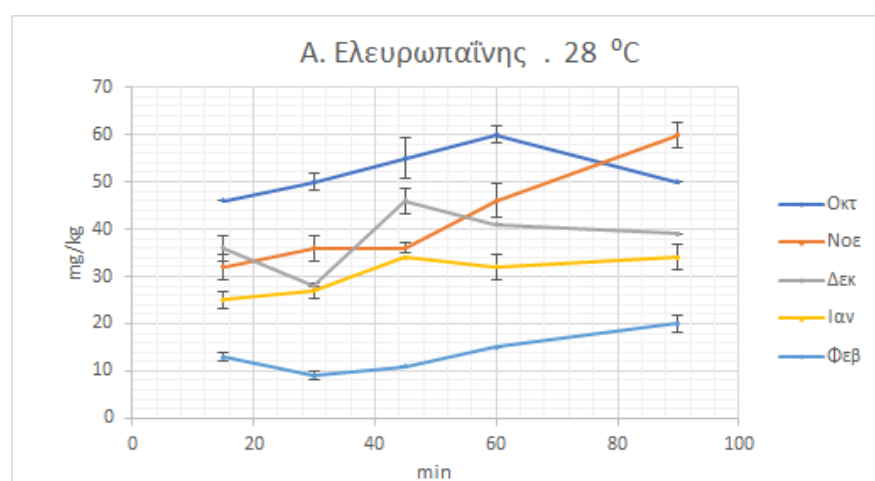
Άγλυκο Λιγκτροσίδη											
Χρόνος μάλαξης (min)	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ		
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	
15	25	2	42	3	62	3	74	6	33	2	
30	16	0	40	3	64	3	45	3	28	3	
45	8	1	30	3	72	5	72	3	42	3	
60	<5	0	28	1	60	3	55	2	35	1	
90	<5	0	18	1	40	0	62	0	28	1	



**Διάγραμμα 2.34:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο του Λιγκτροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

**Πίνακας 2.34:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκου της Ελευρωπαϊνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεσαία θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	46	0	32	3	36	3	25	2	13	1
30	50	2	36	3	28	0	27	2	9	1
45	55	4	36	1	46	3	34	0	11	0
60	60	2	46	4	41	0	32	3	15	0
90	50	0	60	3	39	0	34	3	20	2

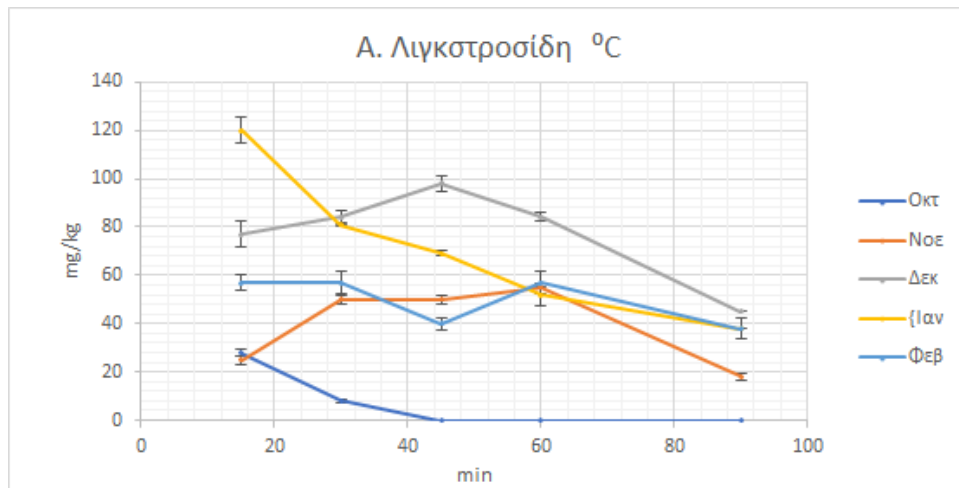


**Διάγραμμα 2.35:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 28 °C.

- Υψηλή θερμοκρασία μάλαξης (32 °C).

**Πίνακας 2.35:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκου του Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

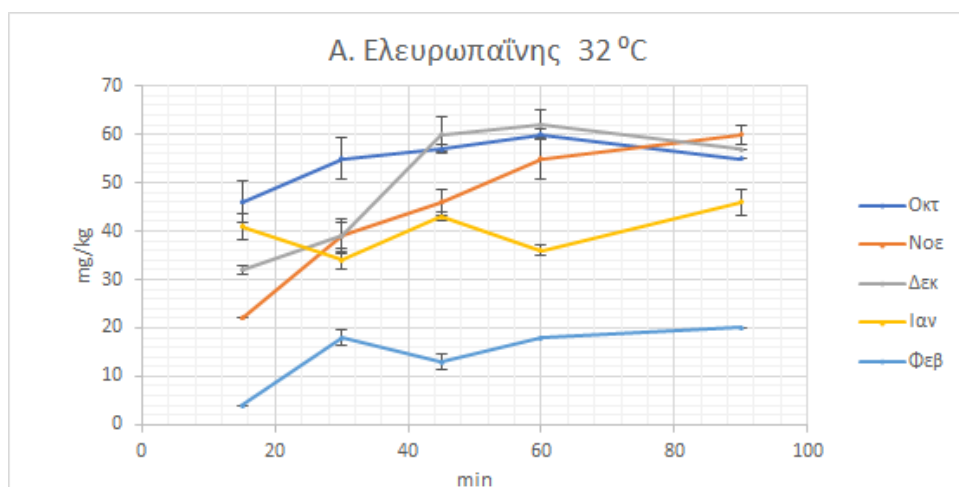
Άγλυκο Λιγκτροσίδη										
Χρόνος μάλαξης	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	28	2	25	2	77	6	120	6	57	3
30	8	1	50	2	84	3	81	1	57	5
45	<5	0	50	2	98	3	69	1	40	3
60	<5	0	55	0	84	2	52	4	57	5
90	<5	0	18	2	45	0	38	0	38	5



**Διάγραμμα 2.36:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο του Λιγκτροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

**Πίνακας 2.36:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για την Κορωνέικη ποικιλία.

Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης										
Χρόνος μάλαξης (min)	Οκτ		Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	46	4	22	0	32	4	<5	3	4	0
30	55	4	39	3	39	18	5	2	18	2
45	57	1	46	3	60	13	5	1	13	2
60	60	1	55	4	62	18	<5	1	18	0
90	55	0	60	2	57	20	<5	3	20	0



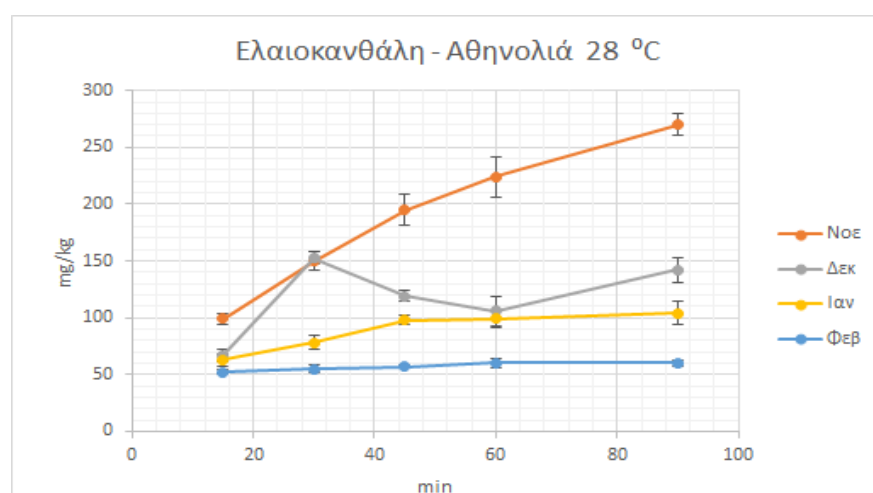
**Διάγραμμα 2.37:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την Κορωνέικη ποικιλία στους 32 °C.

## Ποικιλία Αθηνολιά.

### Ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη.

**Πίνακας 2.37:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.

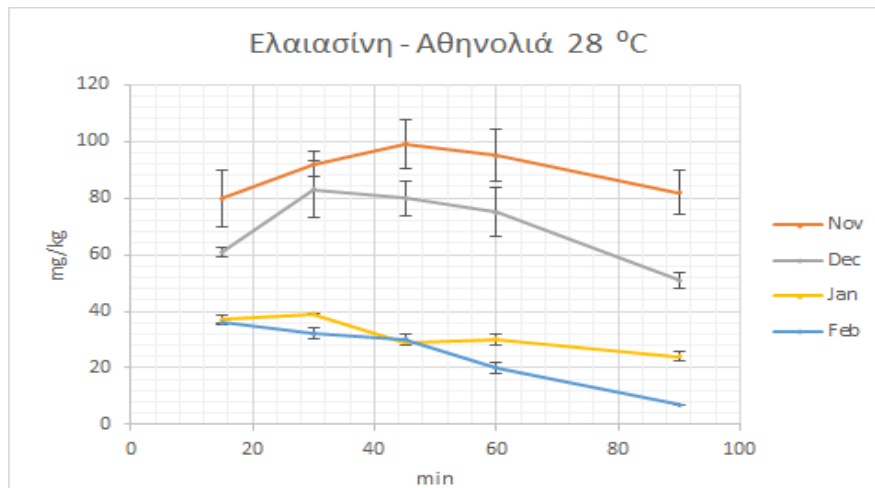
Ελαιοκανθάλη								
Χρόνος μάλαξης	Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)
15	99	4	67	5	63	5	52	2
30	150	9	152	6	78	6	55	3
45	195	13	119	5	98	5	57	2
60	224	17	106	13	99	7	60	4
90	270	10	142	11	104	11	60	3



**Διάγραμμα 2.38:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκανθάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.

**Πίνακας 2.38:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιασίνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.

Ελαιοκανθάλη								
Χρόνος μάλαξης	Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)
15	80	10	61	2	37	2	36	0
30	92	4	83	10	39	0	32	2
45	99	9	80	6	29	0	30	2
60	95	9	75	9	30	2	20	2
90	82	8	51	3	24	2	7	0

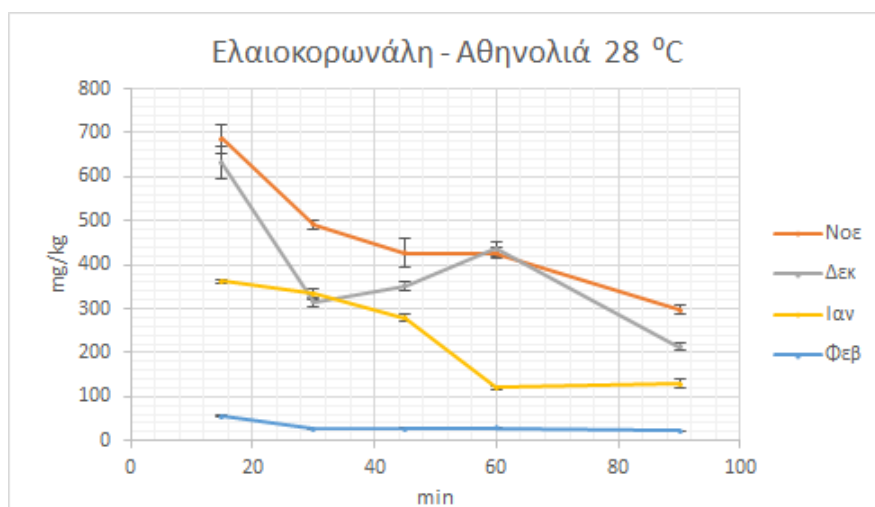


**Διάγραμμα 2.39:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.

#### Ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη.

**Πίνακας 2.39:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.

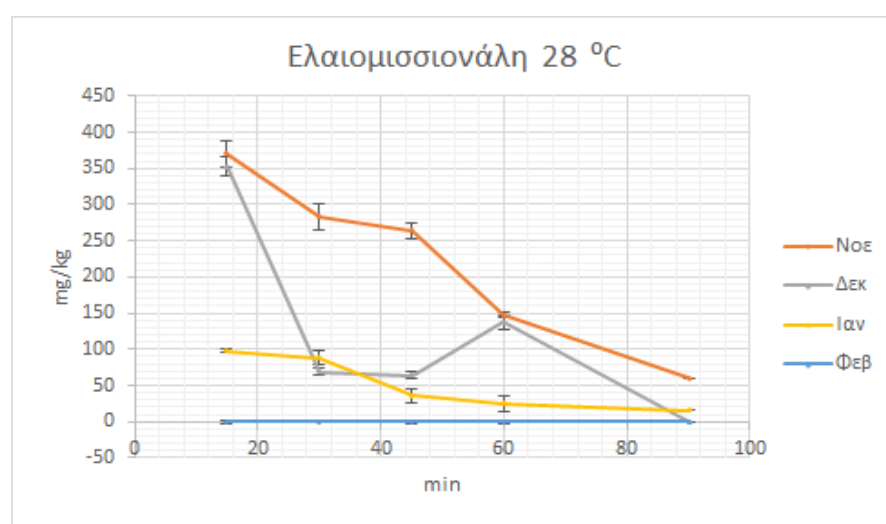
Ελαιοκορωνάλη								
Χρόνος μάλαξης (min)	Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	687	33	632	38	362	4	55	3
30	492	11	315	10	334	12	27	0
45	427	34	353	10	278	8	27	3
60	427	13	436	16	120	4	29	3
90	297	11	213	8	129	11	22	0



**Διάγραμμα 2.40:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.

**Πίνακας 2.40:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.

Ελαιομισσιονάλη								
Χρόνος μάλαξης	Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	371	18	352	13	98	3	<5	0
30	284	18	69	4	88	9	<5	0
45	264	10	64	4	36	10	<5	0
60	147	3	137	11	25	11	<5	0
90	60	0	<5	0	16	0	<5	0



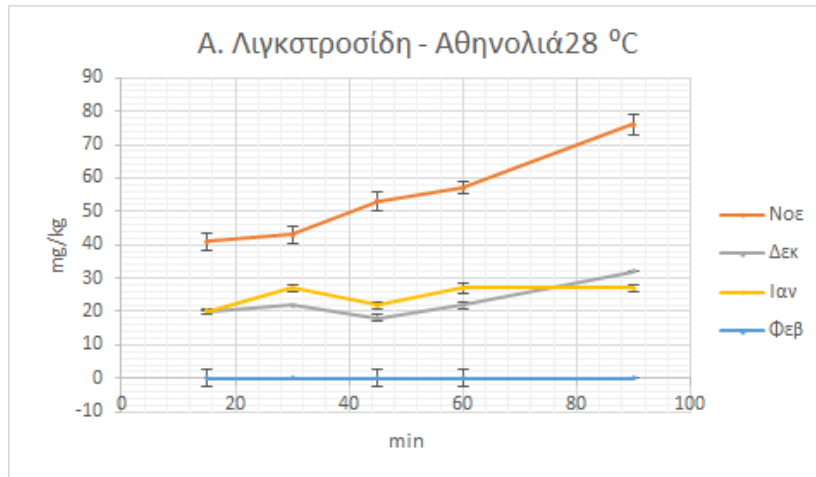
**Διάγραμμα 2.41:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.

#### Άγλυκο Λιγκτροσίδη και Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης.

**Πίνακας 2.41:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.

Άγλυκο του Λιγκτροσίδη								
Χρόνος μάλαξης	Νοε		Δεκ		Ιαν		Φεβ	
(min)	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	41	3	20	0	20	0	<5	0
30	43	3	22	1	27	1	<5	0
45	53	3	18	1	22	1	<5	0
60	57	2	22	2	27	2	<5	0
90	76	3	32	1	27	1	<5	0

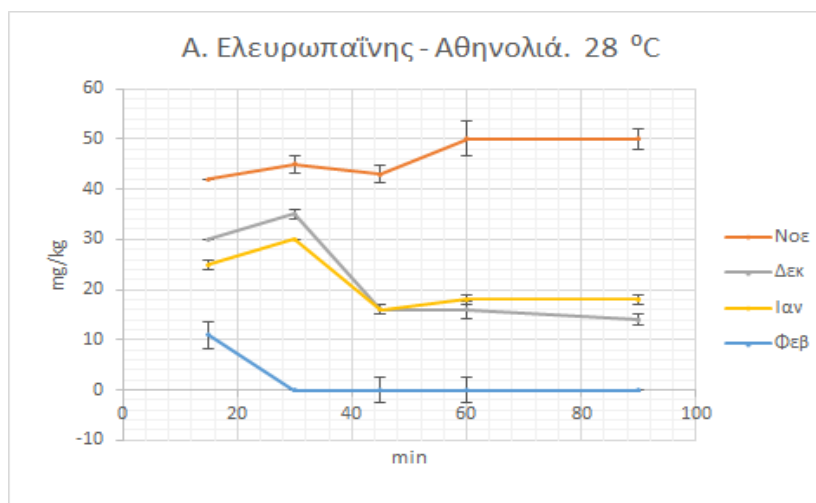




**Διάγραμμα 2.42:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο Λιγκτροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.

**Πίνακας 2.42:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο της Ελευρωπαϊνής για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία της Αθηνολιάς.

Άγλυκο της Ελευρωπαϊνής								
Χρόνος μάλαξης (min)	Noe		Dek		Ian		Feb	
	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD	(mg/kg)	SD
15	42	0	30	1	25	1	11	0
30	45	2	35	0	30	0	<5	0
45	43	2	16	1	16	1	<5	0
60	50	3	16	1	18	1	<5	0
90	50	2	14	0	18	1	<5	0

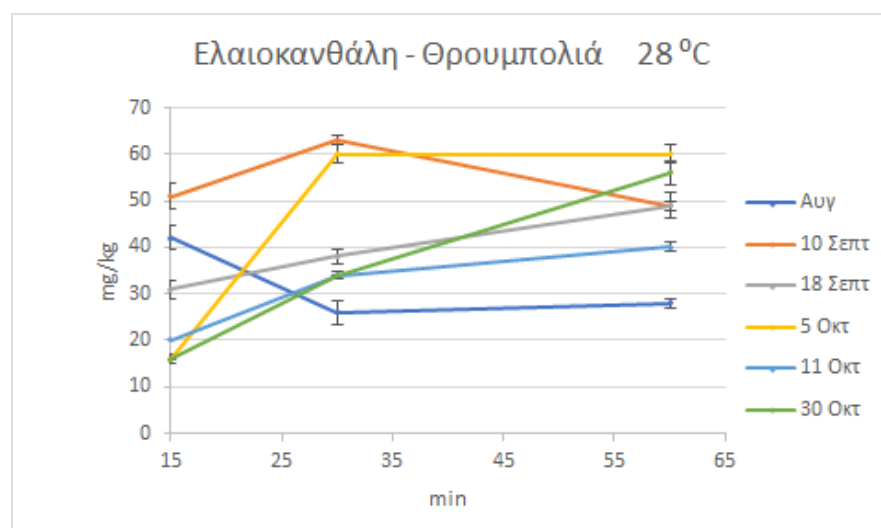


**Διάγραμμα 2.43:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαϊνής σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία της Αθηνολιάς στους 28 °C.

## Θρουμπολιά Αιγαίου.

**Πίνακας 2.43:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιοκανθάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

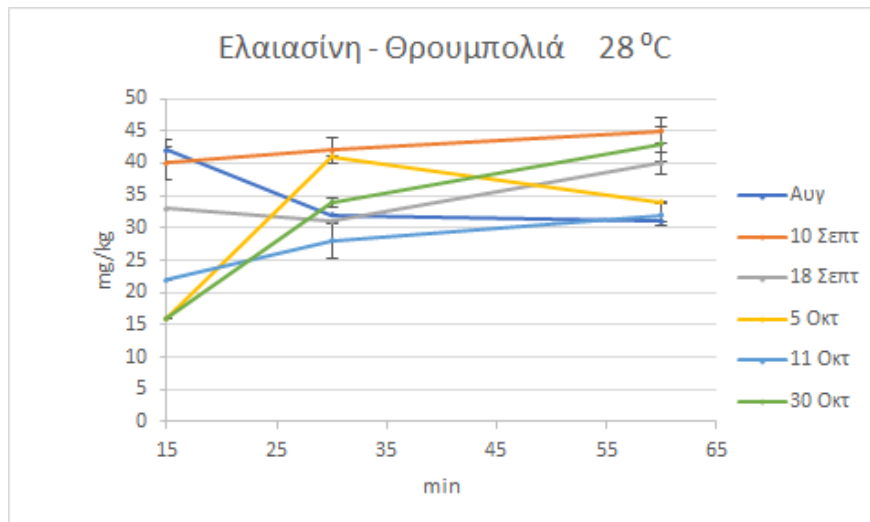
Ελαιοκανθάλη						
Χρόνος Μάλαξης (min)	30/08		10/09		18/09	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	42	3	51	3	31	2
30	26	3	63	1	38	2
60	28	1	49	1	49	3
Χρόνος Μάλαξης (min)	5/10		11/10		30/10	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	16	1	20	0	16	0
30	60	2	34	0	34	1
60	60	2	40	1	56	3



**Διάγραμμα 2.44:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιοκανθάλης σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.

**Πίνακας 2.44:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιαίνης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

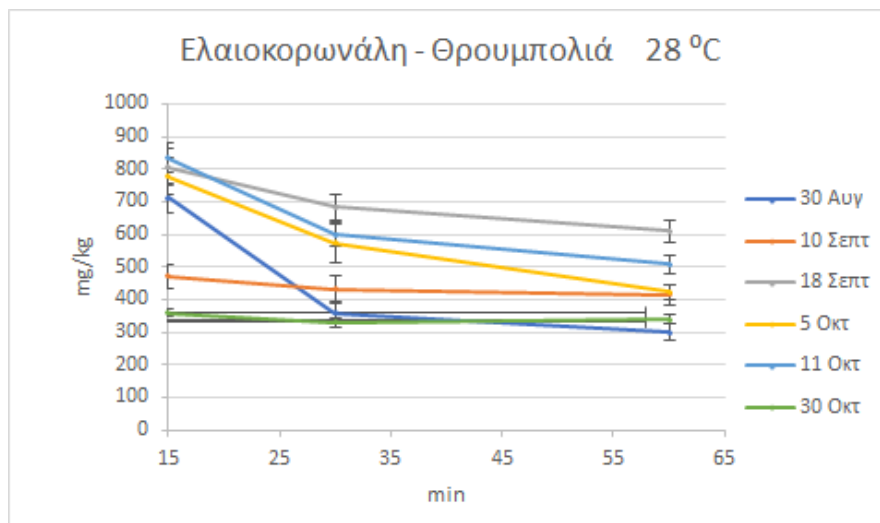
Ελαιαίνη						
Χρόνος Μάλαξης (min)	30/08		10/09		18/09	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	42	2	40	3	33	0
30	32	0	42	2	31	0
60	31	0	45	2	40	2
Χρόνος Μάλαξης (min)	5/10		11/10		30/10	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	16	0	22	0	16	0
30	41	0	28	3	34	2
60	34	0	32	2	43	4



**Διάγραμμα 2.45:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιασίνη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.

**Πίνακας 2.45:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιοκορωνάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

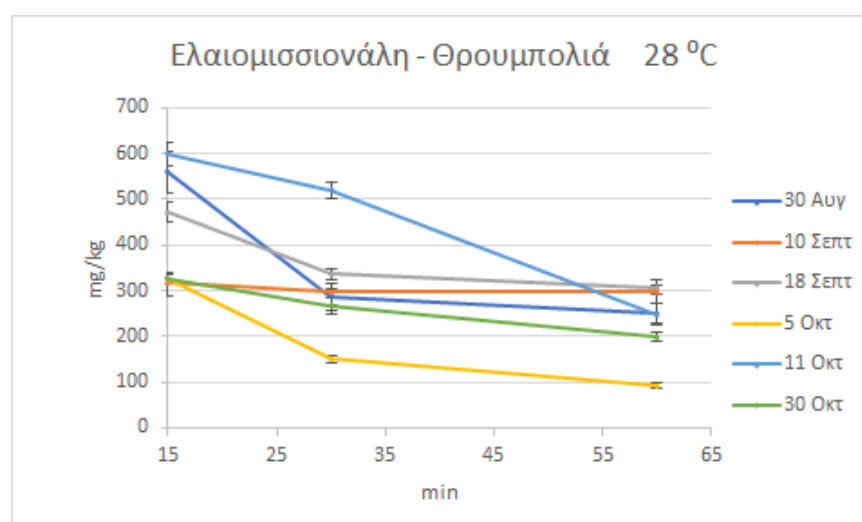
Ελαιοκορωνάλη						
Χρόνος Μάλαξης (min)	30/08		10/09		18/09	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	712	44	470	22	805	58
30	358	30	432	20	684	40
60	300	23	414	28	609	33
Χρόνος Μάλαξης (min)	5/10		11/10		30/10	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	777	58	833	45	358	10
30	572	58	600	36	330	14
60	423	22	507	26	339	12



**Διάγραμμα 2.46:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιοκορωνάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.

**Πίνακας 2.46:** Οι τιμές της συγκέντρωσης της Ελαιομισσιονάλης για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

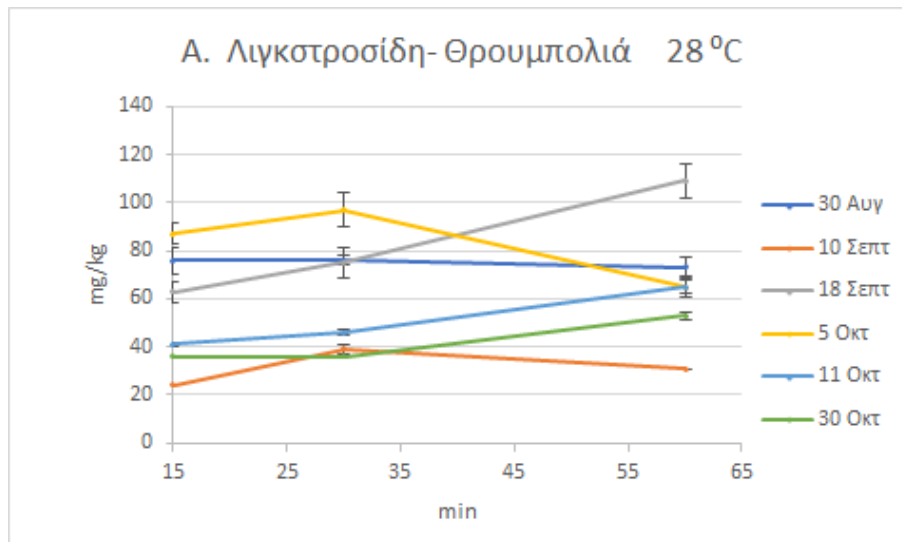
Ελαιομισσιονάλη						
Χρόνος Μάλαξης	30/08		10/09		18/09	
(min)	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	560	26	316	24	472	23
30	287	28	297	9	336	10
60	250	26	297	14	307	15
Χρόνος Μάλαξης	5/10		11/10		30/10	
(min)	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	326	11	599	24	326	11
30	151	9	521	18	268	18
60	92	6	248	24	199	11



**Διάγραμμα 2.47:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στην Ελαιομισσιονάλη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.

**Πίνακας 2.47:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο Λιγκτροσίδη για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

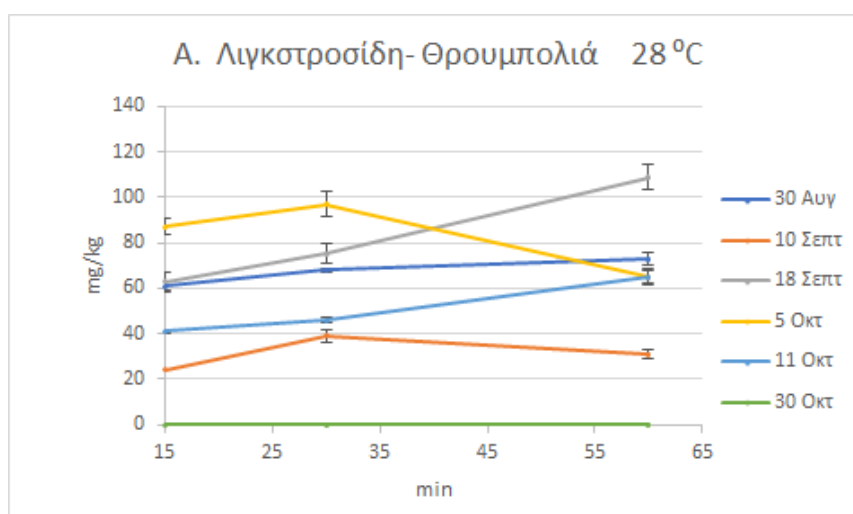
Άγλυκο Λιγκτροσίδη						
Χρόνος Μάλαξης	30/08		10/09		18/09	
(min)	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	76	6	24	0	63	4
30	76	2	39	2	75	6
60	73	4	31	0	109	7
Χρόνος Μάλαξης	5/10		11/10		30/10	
(min)	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	87	4	41	1	36	0
30	97	7	46	1	36	0
60	65	4	65	3	53	2



**Διάγραμμα 2.48:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο Λιγκτροσίδη σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.

**Πίνακας 2.48:** Οι τιμές της συγκέντρωσης του Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου.

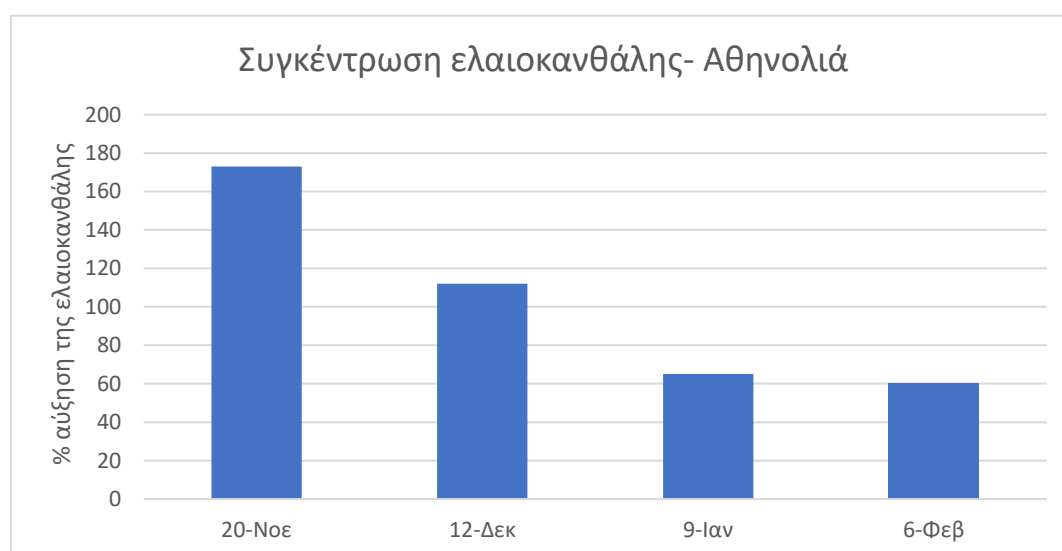
Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής						
Χρόνος Μάλαξης (min)	30/08		10/09		18/09	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	61	2	24	/0	63	4
30	68	1	39	3	75	4
60	73	3	31	2	109	6
Χρόνος Μάλαξης (min)	5/10		11/10		30/10	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
15	87	3	41	4	<5	0
30	97	6	46	4	<5	0
60	65	3	65	4	<5	0



**Διάγραμμα 2.49:** Επίδραση του χρόνου μάλαξης στο Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου στους 28 °C.

Από την ανάλυση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο, ήταν εμφανής η αρνητική συσχέτιση σε σχέση με τον χρόνο μάλαξης τόσο για την Κορωνέικη ποικιλία όσο και για τις υπόλοιπες που μελετήθηκαν. Στην ανάλυση των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις από αυτό το μοτίβο.

Ξεκινώντας από την ελαιοκανθάλη παρατηρήθηκε ότι για την Κορωνέικη ποικιλία όταν εφαρμόστηκε χαμηλή θερμοκρασία μάλαξης, η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης αυξήθηκε μέχρι τα 60 min μάλαξης, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση αυτή διήρκεσε μέχρι και τα 90 min. Αντίστοιχα όταν εφαρμόστηκε μεγαλύτερη θερμοκρασία μάλαξης, αφενός οι συγκεντρώσεις της ελαιοκανθάλης κυμάνθηκαν εξαρχής σε υψηλότερα επίπεδα, αφετέρου η αύξηση αυτή διήρκεσε τουλάχιστον μέχρι τα 45 min μάλαξης ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δε, η αύξηση αυτή διήρκεσε μέχρι τα 60 και τα 90 min μάλαξης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την ποικιλία της Αθηνολιάς με το επιπρόσθετο στοιχείο, ότι η αύξηση που επετεύχθη για την ελαιοκανθάλη από τα 15 min μέχρι τα 90 min της μάλαξης, μειώθηκε με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσης.



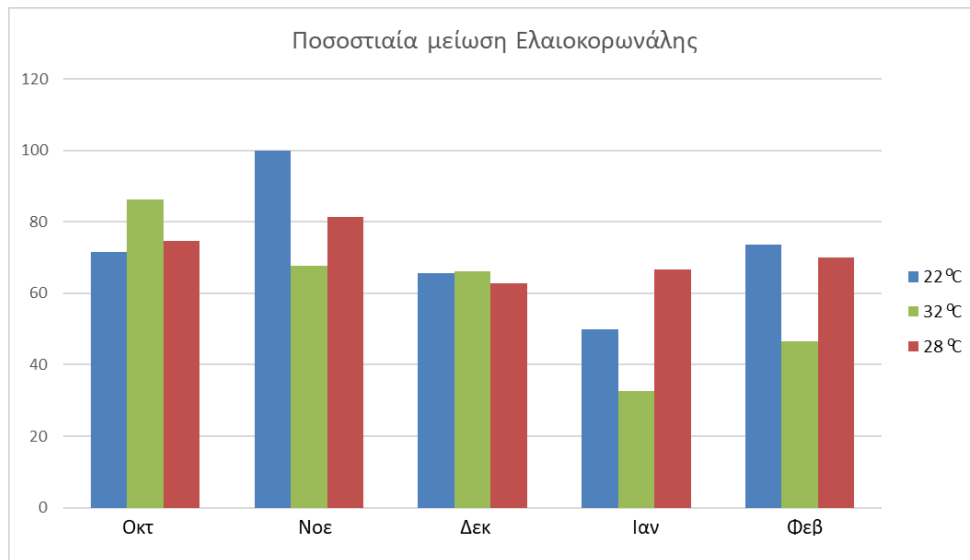
**Διάγραμμα 2.50:** Συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης για την ποικιλία Αθηνολιά κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.

Στην ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου παρατηρήθηκε μεν το ίδιο μοτίβο, όμως ήταν αξιοσημείωτα χαμηλή περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε αυτό το συστατικό συγκριτικά τουλάχιστον με την συγκέντρωση του αθροίσματος φαινολικών συστατικών. Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τις ποικιλίες Κορωνέικη και Αθηνολιά, μετά τα 30 min μάλαξης, η ελαιοκανθάλη ήταν το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό, σαν ποσοστό επί του συνόλου των φαινολών. Στην ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου, η ελαιοκανθάλη, δεν αποτέλεσε το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό σε κανένα σημείο της μάλαξης ακόμα και μετά από 90 min.

Αντίστοιχα στην ελαιασίνη, όταν εφαρμόστηκε χαμηλή θερμοκρασία η αύξηση της συγκέντρωσης της διήρκησε μέχρι το 45 min της μάλαξης ενώ σε πολύ λίγες περιπτώσεις η αύξηση έφτασε μέχρι το 60 min της μάλαξης. Όταν εφαρμόστηκε μεγαλύτερη θερμοκρασία, και εδώ τα επίπεδα της συγκέντρωσης της ελαιασίνης ήταν σαφέστατα μεγαλύτερα σε σχέση με την χαμηλή θερμοκρασία στους αρχικούς χρόνους μάλαξης. Επιπροσθέτως, και εδώ υπήρχαν πειράματα στα οποία η αύξηση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης διήρκησε μέχρι το 30 min της μάλαξης αλλά είδαμε και πολλές περιπτώσεις που από το 15 min της μάλαξης η συγκέντρωση μειωνόταν για το υπόλοιπο της μάλαξης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την ποικιλία της Αθηνολιάς ενώ για την Θρουμπολιά Αιγαίου, όπως και στην περίπτωση της ελαιοκανθάλης, παρατηρήθηκαν οι ίδιες τάσεις αλλά με αξιοσημείωτα χαμηλή συγκέντρωση σε σχέση με άλλες ποικιλίες.

Για τις μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και του άγλυκου της ελευρωπαΐνης παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα πειράματα και σε όλες τις ποικιλίες, οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών αυτών, παρέμειναν σε ανιχνεύσιμα, αλλά αρκετά χαμηλά επίπεδα με ένα εύρος τιμών από 0-100 mg/kg. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο για την γενικότερη διερεύνηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού των βιοφαινολών. Καθιστά όμως παράλληλα, την ενδελεχή ανάλυση των επιμέρους στατιστικών στοιχείων για τις ενώσεις αυτές μικρότερης σημασίας. Μπορεί όμως να επισημανθούν οι γενικότερες τάσεις, οι οποίες δείχνουν ότι το άγλυκο του λιγκστροσίδη στην Κορωνέικη ποικιλία και σε όλες τις θερμοκρασίες διατήρησε σταθερή την περιεκτικότητά του με σχετικά αυξητική τάση, ενώ το άγλυκο της ελευρωπαΐνης εμφάνισε μια μικρή πτωτική τάση κατά την διάρκεια της μάλαξης. Το ίδιο μοτίβο παρατηρήθηκε και για την ποικιλία της Αθηνολιάς ενώ για την Θρουμπολιά Αιγαίου, και τα δύο συστατικά δεν εμφάνισαν κάποια σταθερή τάση, πέραν της διατήρησης της συγκέντρωσής τους κατά την διάρκεια της μάλαξης.

Για την περίπτωση της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης παρατηρήθηκαν εκ διαμέτρου αντίθετα αποτελέσματα. Ξεκινώντας από την ελαιοκορωνάλη για την Κορωνέικη ποικιλία σε όλες τις θερμοκρασίες και σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης η συγκέντρωση της ελαιοκορωνάλης μειώθηκε κατά την διάρκεια της μάλαξης. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσαν δύο περιπτώσεις, στις 12 Δεκεμβρίου και 9 Ιανουαρίου, όπου συμπίπτουν με τα πειράματα όπου το άθροισμα των φαινολικών συστατικών αυξήθηκε κατά την διάρκεια της μάλαξης μέχρι το 30 min της μάλαξης, και στις οποίες εφαρμόστηκε υψηλή θερμοκρασία μάλαξης. Η μείωση της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης κυμάνθηκε από 33% όπου παρατηρήθηκε σε μεγάλη θερμοκρασία και σε μεγάλο βαθμό ωρίμανσης, έως και 100% που παρατηρήθηκε σε αρχικούς βαθμούς ωρίμανσης και σε χαμηλή θερμοκρασία.

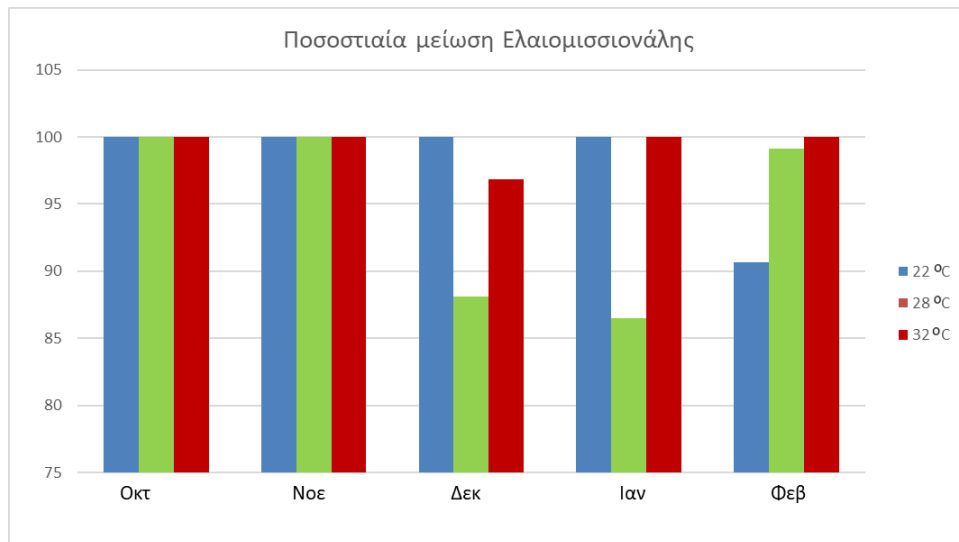


**Διάγραμμα 2.51:** Ποσοστιαία μείωση ελαιοκορωνάλης για την Κορωνέικη ποικιλία μεταξύ των 15 και 90 min μάλαξης, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.

Το ίδιο μοτίβο σε σχέση με την μείωση της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης παρατηρήθηκε και για την ποικιλία Αθηνολιά. Τέλος για την ποικιλία της Θρουμπολιάς Αιγαίου, και εδώ υπήρξε μια μικρή πτωτική τάση στις συγκεντρώσεις της, αλλά καταγράφηκε επίσης ότι η ποσοστιαία μείωση της ελαιοκορωνάλης ακόμα και στα 60 min που πραγματοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα πειράματα, ήταν μικρότερη από τις άλλες ποικιλίες. Υπήρχαν μάλιστα περιπτώσεις όπου η μείωση αυτή ήταν μόλις 5 ή και 6% μετά από 60 min μάλαξης.

Εξετάζοντας την ελαιομισσιονάλη, αρχικά στην Κορωνέικη ποικιλία σε όλες τις θερμοκρασίες και όλους τους βαθμούς ωρίμανσης, η υψηλότερη τιμή της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης ήταν στα 15 min μάλαξης. Καθ' όλη την διάρκεια της μάλαξης μέχρι τα 90 min, μειωνόταν και μάλιστα με ρυθμούς μεγαλύτερους από την ελαιοκορωνάλη. Στην περίπτωση της ελαιομισσιονάλης υπήρξε μόνο μια εξαίρεση στο παραπάνω μοτίβο, στις 09 Ιανουαρίου, όπου συμπίπτει με τις περιπτώσεις όπου εφαρμόστηκε υψηλή θερμοκρασία και είχαμε αύξηση τόσο των ολικών φαινολών και της ελαιοκορωνάλης μέχρι το 30 min της μάλαξης. Επίσης στην περίπτωση της ελαιομισσιονάλης παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης της κατά την διάρκεια των 90 min μάλαξης. Σε αρχικούς βαθμούς ωρίμανσης (Οκτώβριος και Νοέμβριος) και σε χαμηλή θερμοκρασία, η συγκέντρωση της ελαιομισσιονάλης από 264 mg/kg ή και 391 mg/kg, φτάνει τους επόμενους μήνες σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά από 90 min μάλαξης (100% μείωση). Σε ακόμη μεγαλύτερους βαθμούς ωρίμανσης η μείωση αυτή εξακολουθεί να είναι πολύ μεγάλη και σε μερικές περιπτώσεις να φτάνει και εκεί το 100%.





**Διάγραμμα 2.52:** Ποσοστιαία μείωση ελαιομισσιονάλης κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού για την Κορωνέικη ποικιλία μεταξύ των 15 και 90 min μάλαξης.

Οι ίδιες τάσεις παρατηρήθηκαν και στην ποικιλία Αθηνολιά, όπου σε κάποιες περιπτώσεις και εδώ φτάνει σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Για την ποικιλία Θρουμπολιά παρατηρήσαμε το ίδιο μοτίβο με την ελαιοκορωνάλη. Η ελαιομισσιονάλη μειώθηκε κατά την διάρκεια της μάλαξης αλλά με μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες ειδικά σε μεγαλύτερους βαθμούς ωρίμανσης.

#### 2.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού.

Η μελέτη που γίνεται για τους παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, είχε ως στόχο να διερευνηθούν οι μηχανισμοί βιοσύνθεσης τους σε όλα τα στάδια παραγωγής του ελαιολάδου. Για τον λόγο αυτό, πολλές φορές οι συνθήκες ελαιοποίησης σε εργαστηριακή κλίμακα, ξεφεύγουν αρκετά από τις συνήθεις πρακτικές στα ελαιοτριβεία, και οι παραγωγοί ελαιολάδου είτε είναι επιφυλακτικοί, είτε δυσκολεύονται πολύ να τις εφαρμόσουν σε πραγματικές συνθήκες ελαιοποίησης.

Παράλληλα, μια πολύ σημαντική παράμετρος που σχετίζεται με την παραγωγή του ελαιολάδου εκτός από τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά, είναι και η λεγόμενη απόδοση του ελαιολάδου, δηλαδή το ποσοστό του ελαιολάδου που παραλαμβάνεται κατά την διαδικασία της ελαιοποίησης. Όπως έχει αναφερθεί και εισαγωγικά, η διαδικασία της μάλαξης, μπορεί να χρησιμοποιείται παράλληλα και για την αποτελεσματική εκχύλιση του ελαιολάδου από τον πολτό της ελιάς.

Μελετώντας την βιβλιογραφία, παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν αρκετές μελέτες, που δείχνουν ότι η ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού της ελιάς. Αυτός είναι και ο λόγος που στις συνήθεις πρακτικές των ελαιοπαραγωγών συμπεριλαμβάνεται η συλλογή καρπού σε σχετικά μεγάλους βαθμούς ωρίμανσης, καθώς αυτό σχετίζεται άμεσα με την παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας ελαιολάδου και άρα με το εισόδημα του παραγωγού. Παράλληλα έχει αρχίσει να αναπτύσσεται μια τάση για παραγωγή ελαιολάδου από άγουρο καρπό. Η τάση αυτή σχετίζεται άμεσα βέβαια και με τα αποτελέσματα που έχουμε παρουσιάσει ως τώρα, καθώς φαίνεται ότι στον άγουρο καρπό υπάρχει μεγάλη ποικιλία υγειοπροστατευτικών συστατικών.

Στην βιβλιογραφία ακόμα, υπάρχουν και μελέτες που ασχολούνται και με την επίδραση των συνθηκών ελαιοποίησης στην ποσότητα του ελαιολάδου που παράγεται, όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία μάλαξης.

Στην παράγραφο αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα που έγιναν για την Κορωνέικη ποικιλία από την περιοχή των Μολάων σχετικά με την απόδοση του καρπού σε ελαιολάδο στις διαφορετικές συνθήκες ελαιοποίησης:

*ι. Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης του καρπού και του χρόνου μάλαξης στην απόδοση του ελαιόκαρπου.*

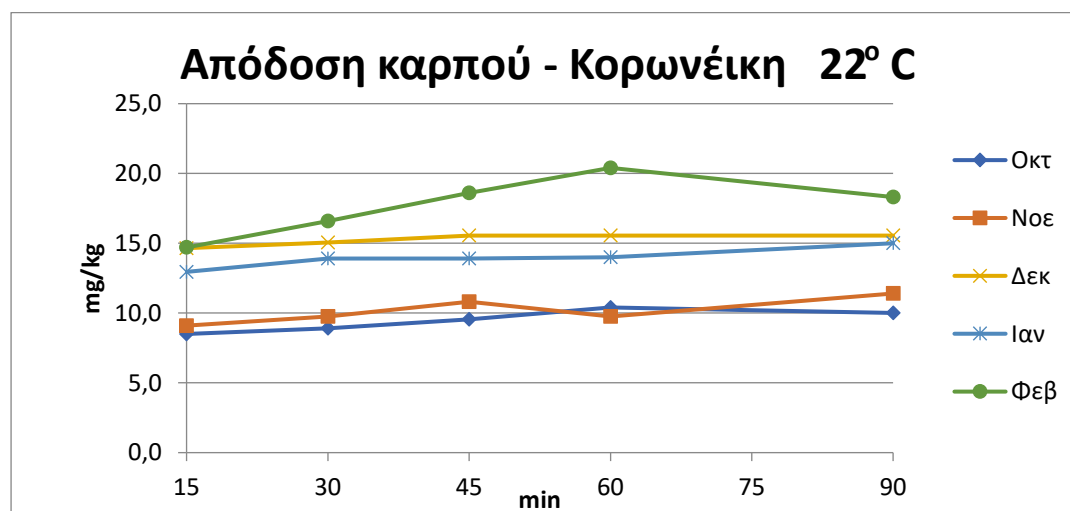
Όπως και κατά την σύγκριση των φαινολικών συστατικών, έτσι και για την απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο, είναι δύσκολο να συγκριθούν διαφορετικοί βαθμοί ωρίμανσης αν δεν καθοριστεί ο χρόνος και η θερμοκρασία μάλαξης στον οποίο έχει γίνει η ελαιοποίηση. Για τον λόγο αυτό έγινε σύγκριση της απόδοσης του καρπού σε ελαιόλαδο στους διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης, για κάθε θερμοκρασία χωριστά και για όλη την διάρκεια της μάλαξης.

→ Χαμηλή θερμοκρασία (22 °C).

Στο επόμενο παρουσιάζονται την απόδοση του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία

**Πίνακας 2.49:** Οι τιμές της απόδοσης του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας σε ελαιόλαδο που ελαιοποιήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

Απόδοση ελαιόκαρπου					
Χρόνος Μάλαξης (min)	10 Οκτ %	20 Νοε %	12 Δεκ %	09 Ιαν %	06 Φεβ %
15	8,5	9,1	14,7	13,0	14,7
30	8,9	9,8	15,1	13,9	16,6
45	9,6	10,8	15,6	13,9	18,6
60	10,4	9,8	15,6	14,0	20,4
90	10,0	11,4	15,6	15,0	18,3

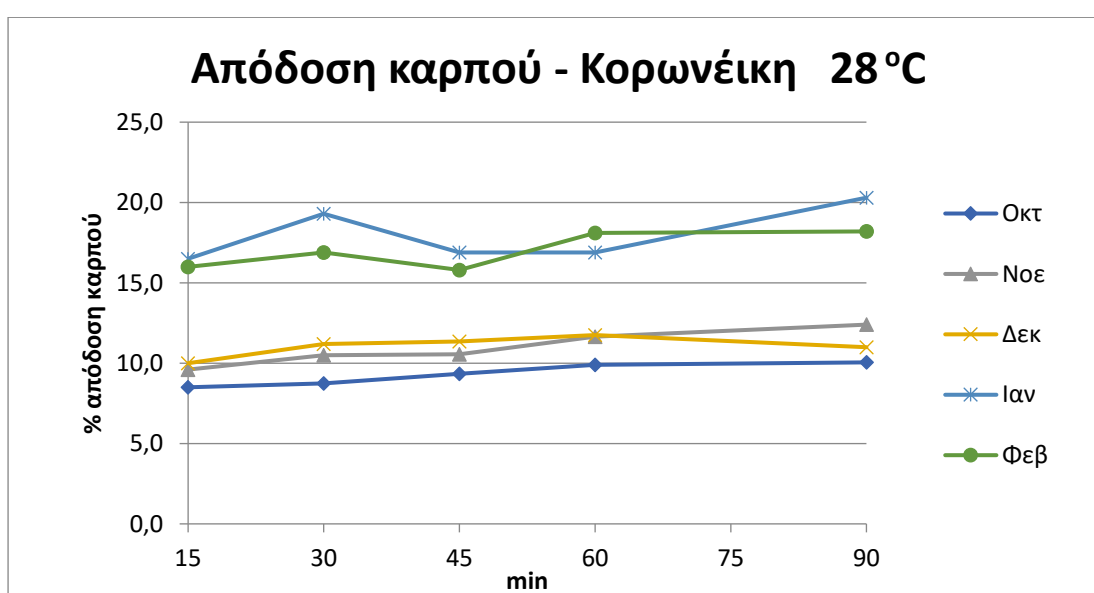


**Διάγραμμα 2.53:** Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για ελαιοποίηση στους 22 °C.

→ Μεσαία θερμοκρασία (28 °C).

**Πίνακας 2.50:** Οι τιμές της απόδοσης του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας σε ελαιόλαδο που ελαιοποιήθηκε σε μεσαία θερμοκρασία σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

Απόδοση ελαιόκαρπου					
Χρόνος Μάλαξης (min)	10 Οκτ %	20 Νοε %	12 Δεκ %	09 Ιαν %	06 Φεβ %
15	8,5	9,6	10,0	16,5	16,0
30	8,8	10,5	11,2	19,3	16,9
45	9,4	10,6	11,4	16,9	15,8
60	9,9	11,7	11,8	16,9	18,1
90	10,1	12,4	11,0	20,3	18,2

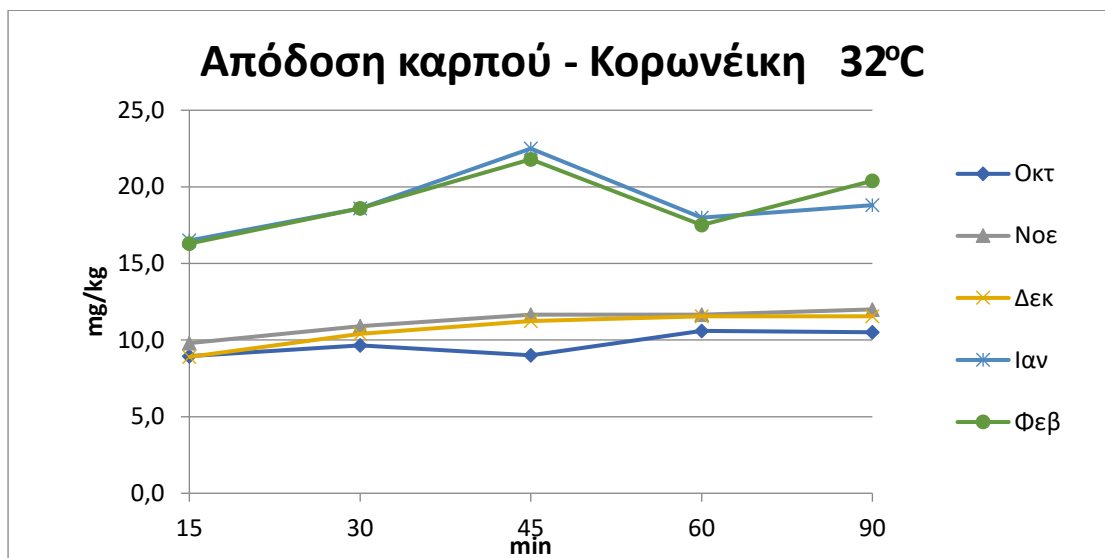


**Διάγραμμα 2.54:** Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για ελαιοποίηση στους 28 °C.

→ Υψηλή θερμοκρασία (32 °C).

**Πίνακας 2.51:** Οι τιμές της απόδοσης του καρπού Κορωνέικης ποικιλίας σε ελαιόλαδο που ελαιοποιήθηκε σε μεσαία θερμοκρασία σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.

Απόδοση ελαιόκαρπου					
Χρόνος Μάλαξης (min)	10 Οκτ %	20 Νοε %	12 Δεκ %	09 Ιαν %	06 Φεβ %
15	9,0	9,8	8,9	16,5	16,3
30	9,7	10,9	10,4	18,6	18,6
45	9,0	11,7	11,3	22,5	21,8
60	10,6	11,7	11,6	18,0	17,5
90	10,5	12,0	11,6	18,8	20,4



**Διάγραμμα 2.55:** Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για ελαιοποίηση στους 32 °C.

Από τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις θερμοκρασίες ελαιοποίησης, η απόδοση του ελαιόκαρπου σε ελαιόλαδο παρέμεινε σταθερή στους αρχικούς χρόνους ωρίμανσης. Στα τελευταία στάδια ωρίμανσης την περίοδο του Ιανουαρίου και του Φεβρουαρίου παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της απόδοσης του καρπού σε ελαιόλαδο. Η αύξηση αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς στα τελευταία στάδια ωρίμανσης του καρπού παρελήφθηκε έως και διπλάσια ποσότητα ελαιολάδου. Η αύξηση αυτή συνδέεται άμεσα με την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στον καρπό της ελιάς. Η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιόλαδο αυξάνεται με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσης.

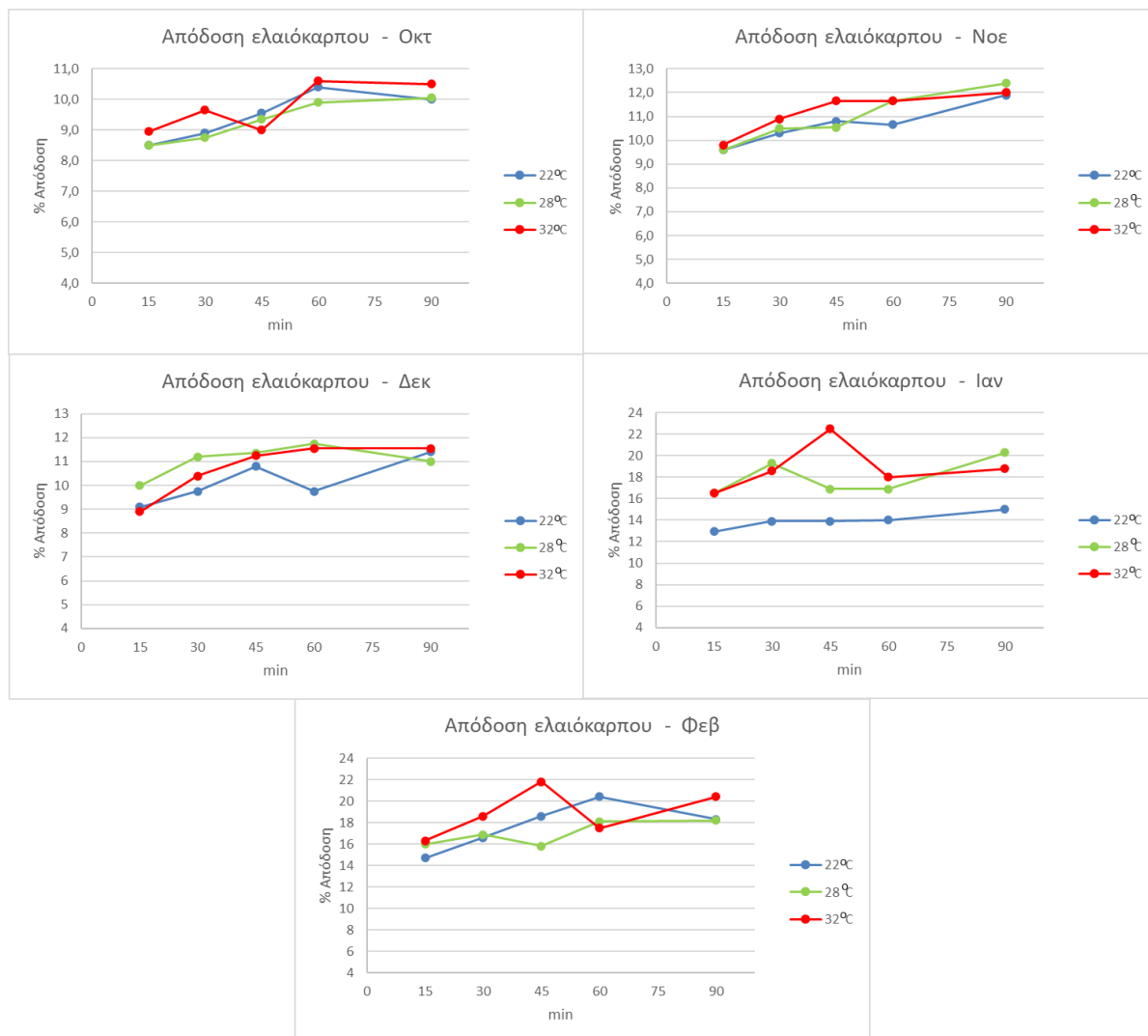
Η διαδικασία της μάλαξης έχει ως πρωταρχικό στόχο την συνένωση των μικροσταγονιδίων του ελαιολάδου που απελευθερώνονται στο περιβάλλον του πολτού της ελιάς, ώστε να το παραλάβουμε με φυγοκέντρηση. Όπως βλέπουμε και στα προηγούμενα διαγράμματα, πράγματι η αύξηση του χρόνου μάλαξης αυξάνει και την ποσότητα του ελαιολάδου που παραλαμβάνουμε από τον πολτό της ελιάς. Σε όλους τους βαθμούς ωρίμανσης και σε όλες τις θερμοκρασίες η ποσότητα του ελαιολάδου που παραλαμβάνεται από τον πολτό της ελιάς αυξάνεται κατά την διάρκεια της μάλαξης. Η αύξηση απόδοσης μεταξύ των 15 min και 90 min μάλαξης κυμαίνεται μεταξύ 5 και 30%. Η αύξηση αυτή στις περισσότερες περιπτώσεις και κυρίως σε μικρούς βαθμούς ωρίμανσης είναι γραμμική.



**Διάγραμμα 2.56:** Ποσοστιαία αύξηση της ελαιοπεριεκτικότητας μεταξύ των ακραίων χρόνων μάλαξης 15 και 90 min.

ii. Επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης στην απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο.

Στα επόμενα παρουσιάζεται η σύγκριση της απόδοσης του καρπού σε ελαιόλαδο για τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ελαιοποίησης και για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης.



**Διάγραμμα 2.57:** Η απόδοση του καρπού σε ελαιόλαδο για τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ελαιοποίησης για όλους τους βαθμούς ωρίμανσης για την κορωνέικη ποικιλία.

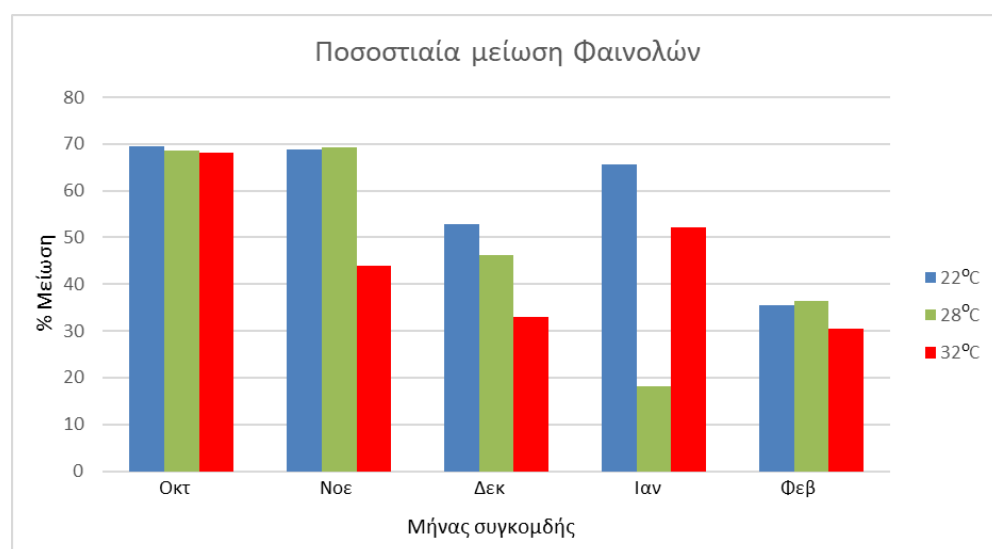
Από τα διαγράμματα αυτά παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει κάποια εμφανής συσχέτιση της απόδοσης του καρπού σε ελαιόλαδο με την θερμοκρασία ελαιοποίησης.

### Συζήτηση αποτελεσμάτων.

Στις προηγούμενες παραγράφους παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων ελαιοποίησης καρπού διαφορετικών ποικιλιών σε διαφορετικές συνθήκες ελαιοποίησης και βαθμού ωρίμανσης.

Συνοψίζοντας, ο βαθμός ωρίμανσης είχε ξεκάθαρα αρνητική επίδραση στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης ενισχύεται η δράση των υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων του καρπού της ελιάς. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η συγκέντρωση συστατικών όπως η ελευρωπαΐνη και ο λιγκτροσίδης, που αποτελούν πρόδρομες ουσίες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, να μειώνονται στον καρπό. Επιπλέον, τα ένζυμα αυτά δρουν και κατά την διάρκεια της μάλαξης, όπου και εκεί καταλύουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις που μειώνουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

Η δράση των οξειδωτικών ενζύμων κατά την διάρκεια της μάλαξης είναι αποδεδειγμένη από παλαιότερες έρευνες. Η ποσοτικοποίηση της δράσης της ΡΡΟ σε όλες τις μελέτες μέχρι σήμερα, γίνεται με την μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου από τον πολτό της ελιάς. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, θα πρέπει να παρατηρήσουμε ότι, αν η ποσοστιαία μείωση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών από την αρχή της μάλαξης (15min) μέχρι το τέλος της μάλαξης (90min), μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη για την δραστηριότητα του ενζύμου αυτού, τότε υπάρχει μια ανακολουθία στα αποτελέσματα. Αυτό γιατί όπως θα παρατηρήσουμε ότι σε αρχικούς βαθμούς ωρίμανσης, η μείωση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών σαν % ποσοστό μείωσης μεταξύ της τιμής στα 15 min και 90min μάλαξης, είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό σε μεγαλύτερους βαθμούς ωρίμανσης.



**Διάγραμμα 4.58:** Ποσοστιαία Μείωση ολικών φαινολών μεταξύ των 15 και 90 min μάλαξης για την Κορωνέικη ποικιλία κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.



Επομένως μπορούμε να πούμε ότι η μείωση των φαινολικών συστατικών σε μεγαλύτερους βαθμούς ωρίμανσης, δεν οφείλεται στην αυξημένη δράση υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων κατά την διάρκεια της μάλαξης, αλλά σε αλλαγές στην χημική σύσταση του καρπού κατά την διαδικασία της ωρίμανσης.

Η θερμοκρασία μάλαξης έχει στις περισσότερες περιπτώσεις θετική συσχέτιση με την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σαν άθροισμα αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις σε μεμονωμένες φαινόλες. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να θεωρηθεί ότι ευνοεί το σπάσιμο των κυττάρων, και την απελευθέρωση τόσο των πρόδρομων ενώσεων ελευρωπαΐνη και λιγκστροσίδη, όσο και των ενζύμων στο περιβάλλον του μαλακτήρα με αποτέλεσμα την παροχή μεγαλύτερου υποστρώματος για την παραγωγή των φαινολικών συστατικών. Η αύξηση της θερμοκρασίας ακόμη, έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την ενεργότητα του ενζύμου β γλυκοσιδάση, το οποίο ευθύνεται για την απομάκρυνση του σακχάρου από το μόριο της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγήσει την αύξηση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών αλλά δεν δικαιολογεί την αύξηση ή την μείωση των μεμονωμένων φαινολών. Προχωρώντας στα αποτελέσματα των μεμονωμένων φαινολών παρατηρούμε ότι υπάρχει σαφής θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αντίθετα αποτελέσματα, τουλάχιστον σε αρχικούς χρόνους μάλαξης είδαμε για τις φαινόλες ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη, όπου σε πολλές περιπτώσεις, η υψηλότερη συγκέντρωση, τουλάχιστον σε αρχικούς χρόνους μάλαξης, επιτεύχθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία.

Οι διαφορετικές αυτές τάσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών συστατικών του φαινολικού κλάσματος, φανερώνουν ότι παράλληλα με την δράση οξειδωτικών ενζύμων κατά την διάρκεια ης μάλαξης, και άλλοι θερμο-εξαρτώμενοι παράγοντες επιδρούν στα φαινολικά συστατικά και μάλιστα με διαφορετικό τρόπο.

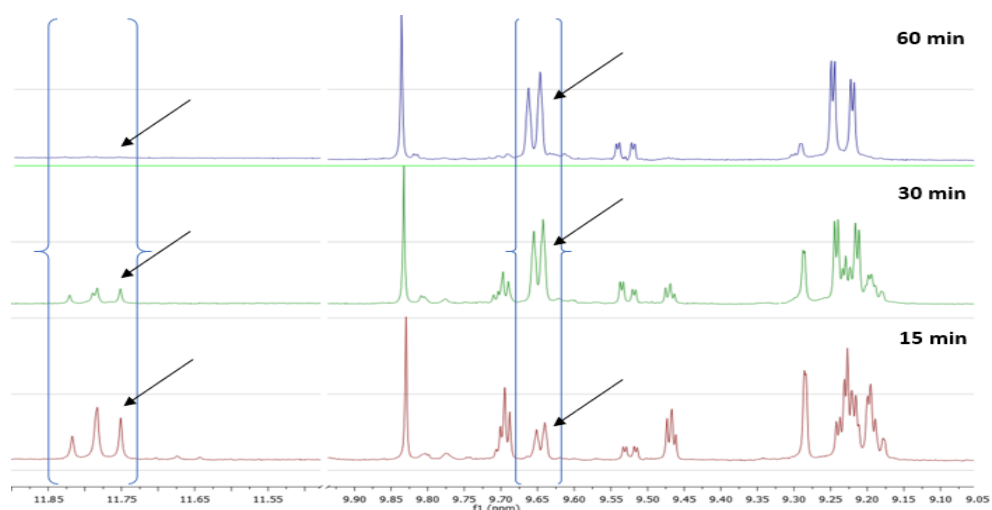
Πρόκειται πιθανότητα για άλλα ένζυμα που επιδρούν πάνω στα φαινολικά συστατικά προκαλώντας μια σειρά από μετασχηματισμούς που θα δούμε παρακάτω.

Περνώντας στον παράγοντα του χρόνου μάλαξης, παρατηρήθηκε ότι η επίδρασή του ήταν αρνητική στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών. Σε όλες τις περιπτώσεις, αύξηση του χρόνου μάλαξης οδήγησε σε μείωση των φαινολικών συστατικών, σαν άθροισμα. Για τις μεμονωμένες φαινόλες υπάρχουν συστατικά όπως η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη, τα οποία για μεγάλα χρονικά διαστήματα (άνω των 30min) αύξαναν την συγκέντρωσή τους. Αντίθετα συστατικά όπως η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη μείωναν σταθερά την συγκέντρωσή

τους. Τέλος συστατικά όπως το άγλυκο του λιγκτροσίδη και της ελευρωπαϊνης τα οποία είχαν σταθερά πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Η μείωση των φαινολικών συστατικών σαν άθροισμα, κατά την διάρκεια της μάλαξης αποδεικνύει την δράση των οξειδωτικών ενζύμων. Θα πρέπει να αναφερθεί όμως ότι όλες οι φαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν δεν υπάρχουν στον καρπό της ελιάς. Στον καρπό της ελιάς υπάρχουν μόνο η ελευρωπαϊνη, ο λιγκτροσίδης, η δεμεθυλελευρωπαϊνη και μικρότερες φαινολικές μονάδες όπως η ελεύθερη τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη. Τα φαινολικά συστατικά που μελετήθηκαν σε αυτήν την διατριβή, είναι αποτέλεσμα μετασχηματισμών που επιτελούνται πάνω σε αυτά τα αρχικά μόρια, ύστερα από την απομάκρυνση του σακχάρου από το ένζυμο β-γλυκοσιδάση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις διαφορετικές τάσεις που επικρατούν μεταξύ των φαινολικών συστατικών κατά την διάρκεια της μάλαξης, φανερώνει ότι τα διαφορετικά φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο ελαιόλαδο, αποτελούν προϊόντα του ίδιου βιοσυνθετικού μονοπατιού σε διαφορετικά στάδια. Όπως φαίνεται και στα φάσματα του  $^1\text{H-NMR}$ , κατά την διάρκεια της μάλαξης έχουμε αύξηση του ύψους της κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης στα 9.64 ppm και 9.62 ppm με αντίστοιχη μείωση των διπλών κορυφών που αντιστοιχούν στα ενολικά πρωτόνια της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης στα 11.76 ppm και 11.78 ppm.

Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές της σύνθεσης των φαινολικών ενώσεων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη μετατρέπονται προς όφελος της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης αντίστοιχα.



**Εικόνα 2.3:** Η αλδεϋδική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  Κορωνέικης ποικιλίας σε μεσαία θερμοκρασία για 3 διαφορετικούς χρόνους μάλαξης.

Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι κατά την βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, το ένζυμο β γλυκοσιδάση υδρολύει τον γλυκοσιδικό δεσμό στην ελευρωπαΐνη και τον λιγκτροσίδη δημιουργώντας τα αντίστοιχα άγλυκα. Από τα παραπάνω φάσματα φαίνεται ότι τα άγλυκα που προκύπτουν δεν είναι οι μονοαλδεϋδικές μορφές αλλά οι διαλδεϋδικές και οι ενολικές μορφές καθώς η συγκέντρωσή τους στο πρώτο χρονικό σημείο που μελετήθηκε είναι η μέγιστη που συναντάται κατά την διάρκεια της μάλαξης. Αντίθετα οι συγκεντρώσεις των μονοαλδεϋδικών μορφών του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη παραμένουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της μάλαξης.

#### 2.4.5 Ελαιοποίηση καρπού από διαφορετικές ποικιλίες.

Στο δεύτερο μέρος της ενότητας αυτής πραγματοποιήθηκε ελαιοποίηση διαφόρων δειγμάτων καρπού ελιάς, από διαφορετικές ποικιλίες στις ίδιες συνθήκες ώστε να εντοπιστεί η διαφορετική συμπεριφορά των φαινολικών συστατικών από ποικιλία σε ποικιλία.

Όπως ήδη έχει φανεί μέχρι τώρα, κατά την διάρκεια της μάλαξης υπάρχει δράση δύο ειδών ενζύμων. Των οξειδωτικών ενζύμων και εκείνων που επιτελούν μετασχηματισμούς στα φαινολικά συστατικά που καταλήγουν στο ελαιόλαδο (γλυκοσιδάση, απομεθυλάση). Η δράση των οξειδωτικών ενζύμων αποδεικνύεται από την μείωση των ολικών φαινολών κατά την διάρκεια της μάλαξης, μείωση που οφείλεται παράλληλα και στην διάλυση των φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση που υπάρχει στην ελαιοζύμη. Ξεκινώντας από την σύνθλιψη του καρπού της ελιάς, το πρώτο στάδιο μετασχηματισμών περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό της ελευρωπαΐνης και του λιγκοτροσίδη, τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά του καρπού της ελιάς, σε ελαιομισσιονάλη και ελαιοκορωνάλη. Το πρώτο στάδιο αυτό φαίνεται να γίνεται ακαριαία μετά την σύνθλιψη του καρπού και να έχει ολοκληρωθεί σε μεγάλο βαθμό σε λιγότερο από 15 min μάλαξης. Παράλληλα, αλλά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, άλλα ένζυμα επιτελούν τα επόμενα στάδια των μετασχηματισμών που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Στόχος των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν να διαπιστωθεί σε τι βαθμό πραγματοποιούνται οι ενζυμικές αντιδράσεις σε διαφορετικές ποικιλίες που έχουν ως αποτέλεσμα την μετατροπή των πρόδρομων άγλυκων μορφών.

### *Σχεδιασμός πειραμάτων ελαιοποίησης.*

Από την μελέτη της επίδρασης του χρόνου μάλαξης πάνω στο άθροισμα των φαινολικών συστατικών, παρατηρήθηκε ότι ένα ελαιόλαδο μπορεί να χάσει έως και το 70% των συνολικών φαινολικών συστατικών μέσα σε 90 λεπτά μάλαξης (Κορωνέικη 10 Οκτ, 22 °C , από 15min στα 90 min) ειδικά σε αρχικούς βαθμούς ωρίμανσης του καρπού. Ακόμα και σε περιπτώσεις που επιλέχθηκε σύντομος χρόνος μάλαξης, η πτώση μέσα σε 30 min μάλαξης η μείωση μπορεί να φτάσει το 49% (Κορωνέικη, 10 Οκτ, 32 °C, από 15min στα 45 min). Οι μεταβολές αυτές καθιστούν τον χρόνο μάλαξης έναν πολύ κρίσιμο παράγοντα για τον ελαιοπαραγωγό, καθώς η μείωση αυτή μπορεί να αφαιρέσει από το προϊόν του τον ισχυρισμό υγείας.

Πέραν όμως από το άθροισμα των φαινολικών συστατικών, είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά, προσδίδουν συγκεκριμένα γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά. Σε παλαιότερες μελέτες, έχει αναφερθεί ότι η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη ευθύνονται για την πικάντικη και πικρή γεύση του ελαιολάδου. Όπως φάνηκε και στην προηγούμενη ενότητα η αύξηση του χρόνου μάλαξης, στις περισσότερες ποικιλίες ευνοεί την δημιουργία των συστατικών αυτών ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση αυτή σταματάει μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, επακολουθούμενη από μείωση τους. Τέλος, όσο εξελίσσεται η έρευνα πάνω στις βιολογικές δράσεις των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών, είναι πολύ πιθανό να οδηγηθούμε σε αναζήτηση ελαιόλαδων με συγκεκριμένο φαινολικό προφίλ, τόσο για την καταναλωτική αγορά, όσο και για την βιομηχανία.

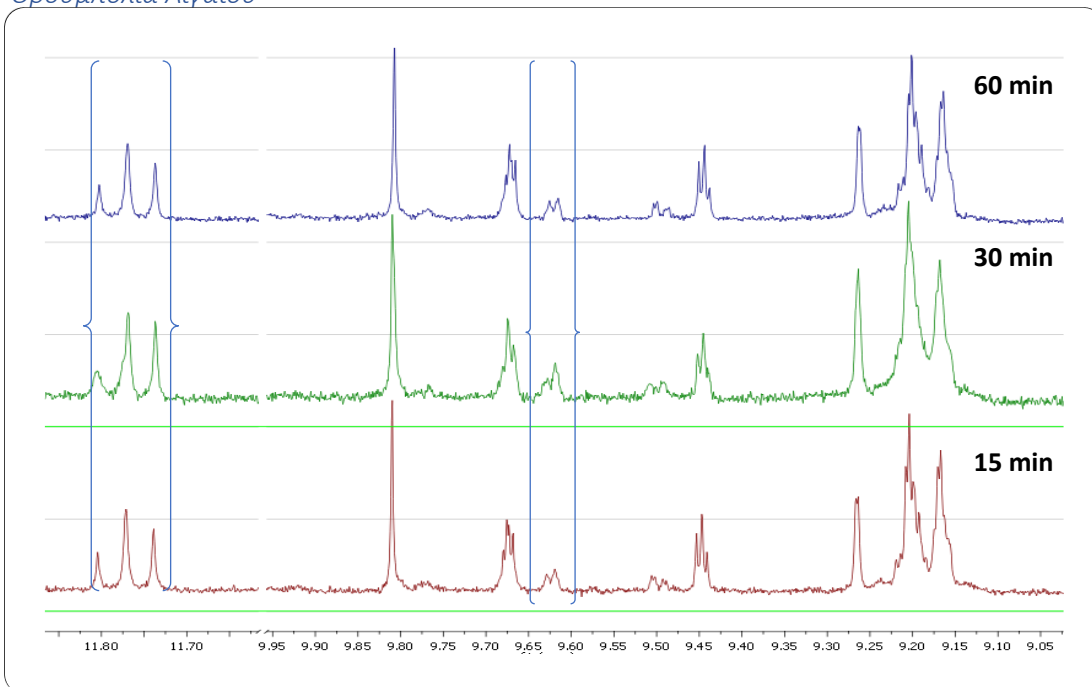
Όλα τα παραπάνω, συνηγορούν στο ότι η διαδικασία ελαιοποίησης του ελαιολάδου είναι μια διαδικασία που μπορεί να αυξήσει την υπεραξία του προϊόντος. Η διαδικασία θα πρέπει να βρίσκεται υπό τον πλήρη έλεγχο του χειριστή ενός ελαιοτριβείου. Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η διαφορετική συμπεριφορά βασικών ποικιλιών ελιάς ως προς τα μεμονωμένα φαινολικά συστατικά.

Συνολικά, μελετήθηκε το φαινολικό προφίλ κατά την διάρκεια της μάλαξης, για 4 ποικιλίες, την Θρουμπολιά Αιγαίου, την Ολύμπια ποικιλία, την Κορωνέικη και την ποικιλία Καλαμών. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε άγουρος πράσινος καρπός την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019 και τους μήνες Σεπτέμβριο ως Νοέμβρη. Ασφαλώς και τα διάφορα δείγματα δεν ήταν δυνατόν να έχουν τον ίδιο βαθμό ωρίμανσης, η συλλογή του καρπού όμως σε όλες τις περιπτώσεις έγινε σε αρχικούς βαθμούς ωρίμανσης για την κάθε ποικιλία.

Για την διευκόλυνση της ανάλυσης των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται κάποια από τα αποτελέσματα που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί παραπάνω. Συγκεκριμένα σαν πρώτη περίπτωση παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελαιοποίησης της Θρουμπολιάς Αιγαίου. Η ελαιοποίηση

πραγματοποιήθηκε στους 28 °C και παρατίθενται τα αποτελέσματα από τα δείγματα που συλλέχθηκαν στα 15, 30 και 60 min μάλαξης.

#### Θρουμπολιά Αιγαίου

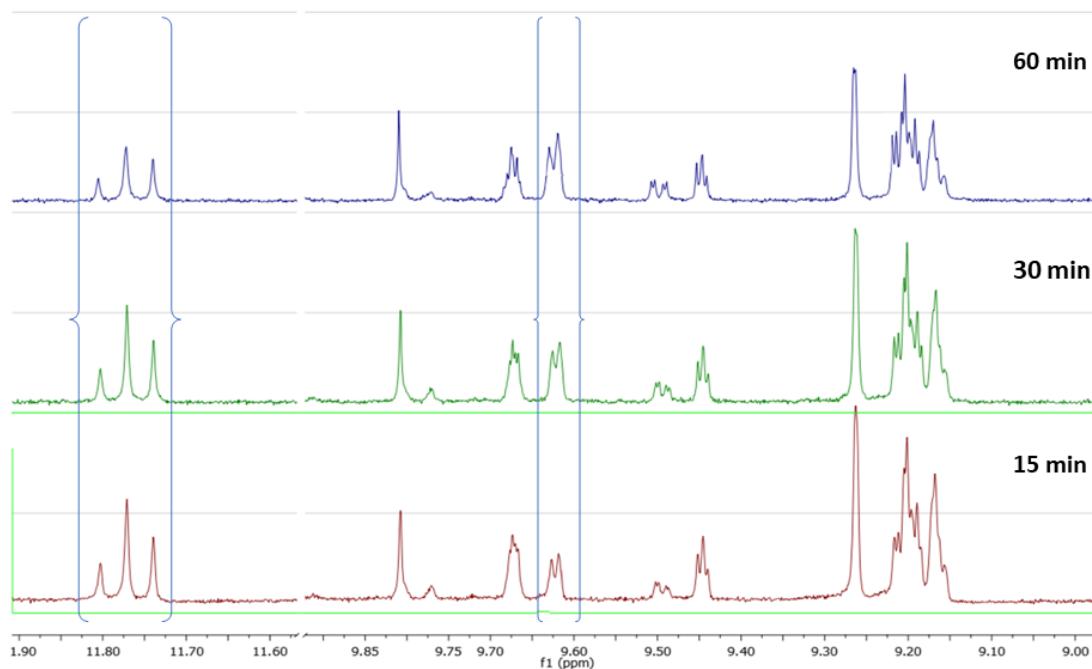


**Εικόνα 2.4:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Θρουμπολιά.

Η περίπτωση των δειγμάτων από την ποικιλία Θρουμπολιά Αιγαίου όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση καρπού. Στην ποικιλία αυτή το φαινολικό προφίλ του δείγματος ελαιολάδου δεν μεταβάλλεται ποιοτικά κατά την διάρκεια της μάλαξης. Από τα πρώτα 15 min της μάλαξης, η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη ήταν τα κυρίαρχα συστατικά, ενώ όσο η μάλαξη συνεχιζόταν παρατηρήθηκε μόνο η επίδραση οξειδωτικών ενζύμων που μειώνουν συνολικά το φαινολικό κλάσμα. Έτσι θα μπορούσαμε να πούμε ότι για το συγκεκριμένο δείγμα καρπού, η επιμήκυνση του χρόνου μάλαξης δεν προκάλεσε κάποια ποιοτική μεταβολή στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου.

### Ολύμπια Ποικιλία.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ελαιοποίησης για την Ολύμπια (Χωραίτικη) ποικιλία. Το δείγμα ελαιοποιήθηκε σε συνθήκες 28 °C και λήφθηκαν δείγματα στα 15,30 και 60 min.

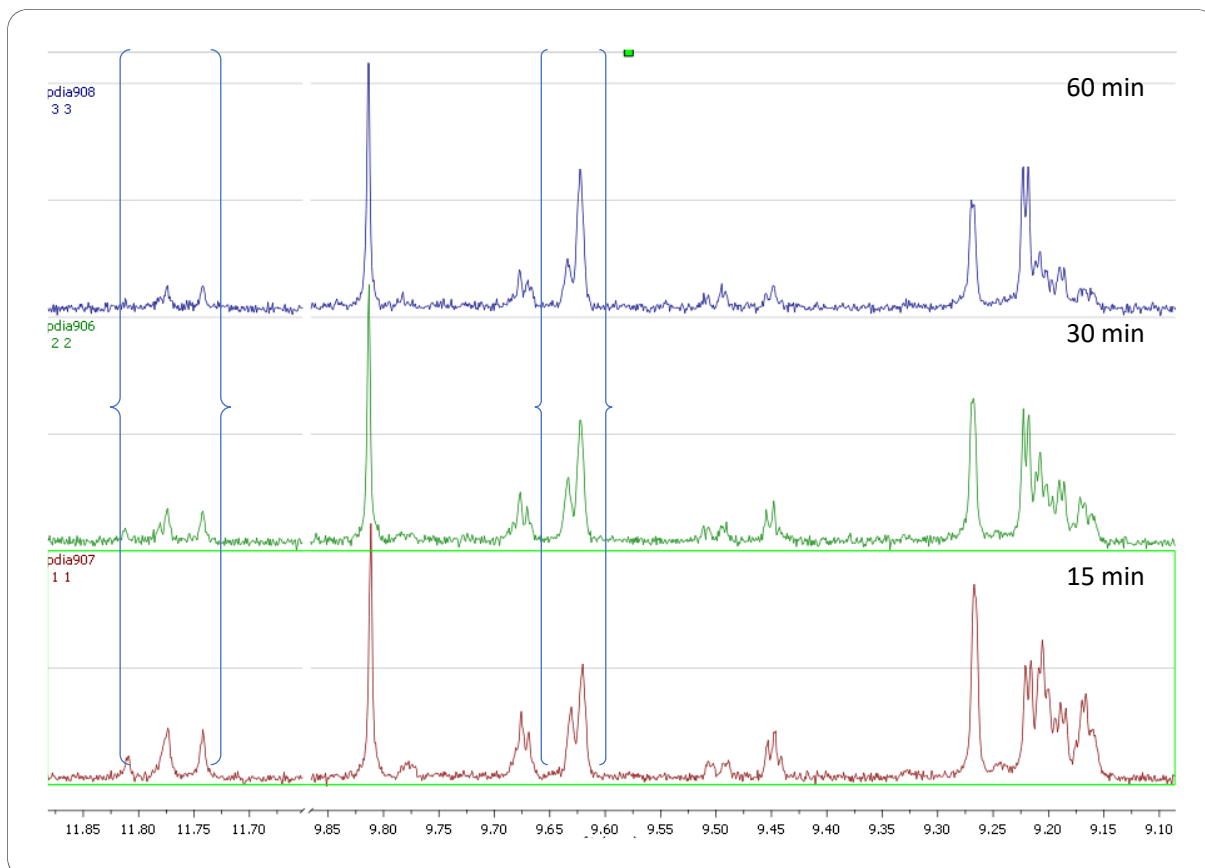


**Εικόνα 2.5:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την Ολύμπια ποικιλία.

Για την Ολύμπια ποικιλία παρατηρήθηκε ότι στους αρχικούς χρόνους μάλαξης τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά ήταν η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη. Όσο εξελισσόταν η διαδικασία της μάλαξης η συγκέντρωση της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης μειωνόταν με ταυτόχρονη αύξηση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Η μετατροπή αυτή δεν φάνηκε να συνεχίζεται μέχρι και το τέλος της μάλαξης στα 60 min. Φάνηκε λοιπόν ότι το μεγαλύτερο μέρος των ενζυμικών μετατροπών, πραγματοποιήθηκε μέχρι τα 30 min μάλαξης ενώ στην συνέχεια η ενζυμική δραστηριότητα σταμάτησε.

### Κορωνέικη ποικιλία

Το δείγμα Κορωνέικης ποικιλίας που ελαιοποιήθηκε προέρχονταν από την περιοχή της Μεσσηνίας. Ο καρπός ελαιοποιήθηκε σε συνθήκες 28 °C και πήραμε δείγματα στα 15,30 και 60 min.



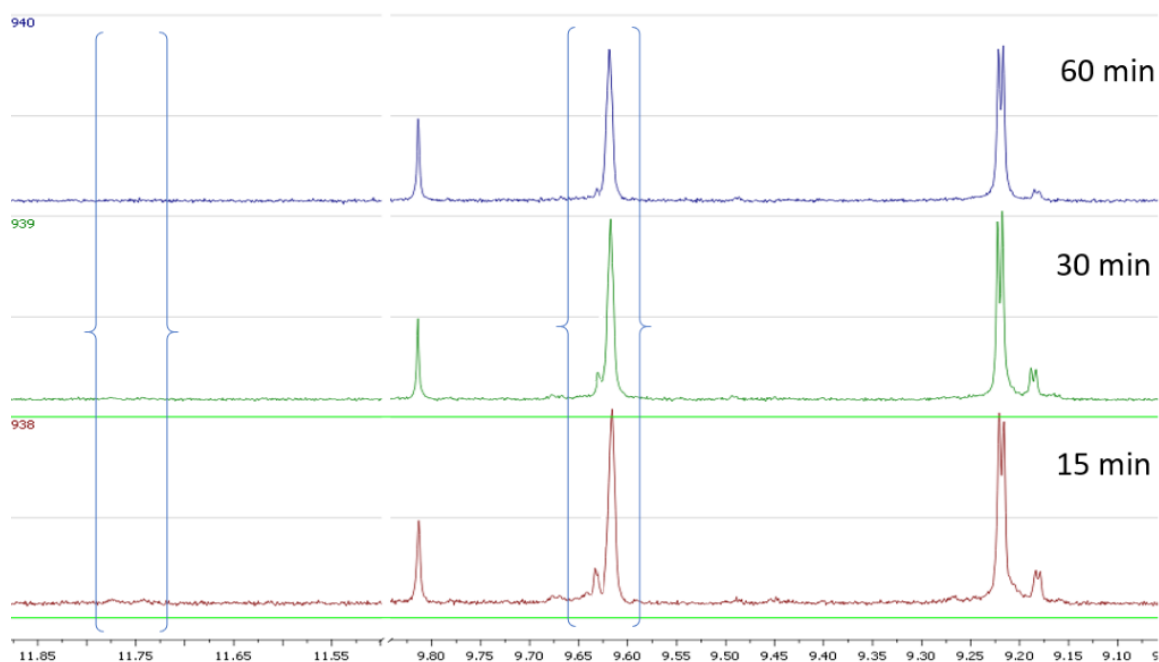
**Εικόνα 2.6:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Κορωνέικη.

Για την Κορωνέικη ποικιλία παρατηρήθηκε ότι από τα 15 min μάλαξης έχουν ήδη αρχίσει να σχηματίζονται σημαντικές ποσότητες ελαιοκανθάλης και ελαιαίνης. Μέχρι εκείνη την στιγμή όμως η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη εξακολουθούσαν να είναι τα κυρίαρχα συστατικά. Στα 30 min μάλαξης το κυρίαρχο συστατικό πλέον ήταν η ελαιοκανθάλη καθώς σημαντικές ποσότητες τόσο της ελαιοκορωνάλης όσο και της ελαιομισσιονάλης είχαν καταναλωθεί. Σε αυτό το χρονικό σημείο φαίνεται να σταθεροποιήθηκε το φαινολικό προφίλ και μέχρι την επόμενη μέτρηση που είναι στα 60 min, φάνηκε να επιδρούν μόνο τα οξειδωτικά ένζυμα.



### Ποικιλία Καλαμών.

Η ποικιλία καλαμών προορίζεται συνήθως για παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, ωστόσο, σε αρκετές περιοχές χρησιμοποιείται και για παραγωγή ελαιολάδου. Το δείγμα που ελαιοποιήθηκε προερχόταν από την περιοχή της Σπάρτης και η ελαιοποίηση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες 28 °C και πήραμε δείγματα στα 15,30 και 60 min.



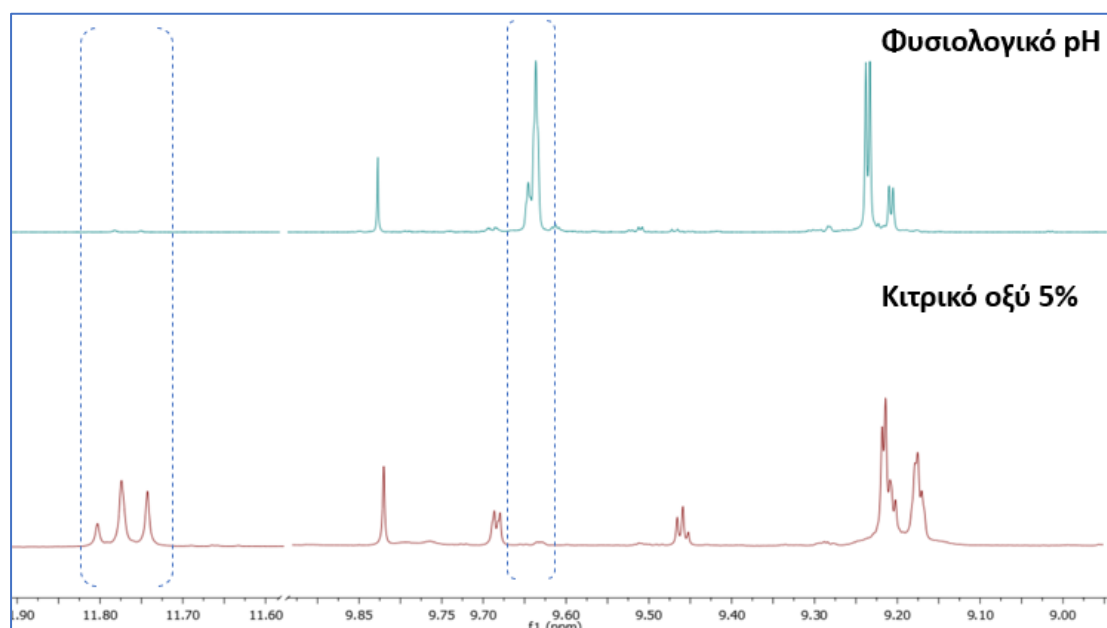
**Εικόνα 2.7:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά από 15,30 και 60 min μάλαξης για την ποικιλία Καλαμών.

Αντίθετα με τις άλλες περιπτώσεις, στην ποικιλία καλαμών παρατηρήθηκε ότι ήδη από τα 15 min μάλαξης, όλη η ποσότητα της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης είχε καταναλωθεί και τα μόνα φαινολικά συστατικά που εμφανίστηκαν στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου ήταν η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη. Στην συνέχεια της μάλαξης δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στο φαινολικό προφίλ, πέραν της αναμενόμενης μείωσης και των δύο φαινολικών συστατικών από τα οξειδωτικά ένζυμα, αλλά και από την διάχυσή τους στην υδατική φάση.

## 2.4.6 Πειράματα ελαιοποίησης σε μη φυσιολογικό pH.

Προχωρώντας στην ανάλυση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα ελαιοποίησης με αλλαγή του φυσιολογικού pH του καρπού εστίασαμε στις ποιοτικές αλλαγές που συντελούνται στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου.

Παρακάτω παρουσιάζεται η αλδεϋδική περιοχή του φάσματος δύο ελαιόλαδων, που ελαιοποιήθηκαν στον ίδιο βαθμό ωρίμανσης και τις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας (28 °C, 30 min) αλλά σε συνθήκες διαφορετικού pH. Πρόκειται για ελαιόλαδα που ελαιοποιήθηκαν από τον ίδιο καρπό ποικιλίας Καλαμών. Όπως φάνηκε και στην προηγούμενη παράγραφο η ποικιλία καλαμών, είναι μια ποικιλία στην οποία όλες οι ενζυμικές μετατροπές πραγματοποιούνται με μεγάλη ταχύτητα. Στο επάνω φάσμα είναι το ελαιόλαδο που προέκυψε από την φυσιολογική ελαιοποίηση του καρπού ενώ από κάτω, το ελαιόλαδο που προέκυψε από την ελαιοποίηση του καρπού παρουσία κιτρικού οξέος.



**Εικόνα 2.8:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου ποικιλίας Καλαμών σε φυσιολογικό και οξινο pH.

Στις ελιές που ελαιοποιήθηκαν στο φυσιολογικό τους pH, παρατηρήθηκε ότι τα κυρίαρχα συστατικά είναι η ελαιασίνη και η ελαιοκανθάλη. Οι συγκεντρώσεις της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισιονάλης ήταν μη ανιχνεύσιμες, ενώ αυτές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και του άγλυκου της ελευρωπαϊνης ήταν πολύ χαμηλές. Η εικόνα είναι πολύ κοντά σε αυτήν που θα

είχαμε εάν αυτές οι ελιές ελαιοποιούνταν σε ένα ελαιοτριβείο, χωρίς καμία προσθήκη νερού, ακόμα και στο στάδιο του διαχωρισμού της ελαιόπαστας από το ελαιόλαδο. Στην περίπτωση της ελαιοποίησης υπό όξινες συνθήκες, παρατηρήθηκαν αντίθετα αποτελέσματα. Στην περίπτωση αυτή τα κυρίαρχα συστατικά του φαινολικού κλάσματος ήταν η ελαιομισσιονάλη και η ελαιοκορωνάλη, ενώ η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη εβρίσκονται στο κλάσμα σε οριακά ανιχνεύσιμες ποσότητες. Τέλος οι κορυφές των μονοαλδεϋδικών μορφών του άγλυκου του λιγκτροσίδη και της ελευρωπαΐνης δεν εμφανίζονται.

Μετά την προσθήκη κιτρικού οξέος, το pH που δημιουργήθηκε, επέτρεψε μεν την δράση της β γλυκοσιδάσης, η οποία έχει μεγάλο εύρος δραστηριότητας, αντίθετα όμως απενεργοποιήθηκε η δράση άλλων ενζύμων, που δρουν επί της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης και τις μετατρέπουν σε επόμενο στάδια του βιοσυνθετικού αυτού μονοπατιού σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη. Συγκεκριμένα και σύμφωνα με μια πολύ πρόσφατη αναφορά στην βιβλιογραφία, στον καρπό της ελιάς υπάρχει παρουσία του ενζύμου μεθυλεστεράση (Volk et al. 2019). Με αυτόν το τρόπο εξηγείται η παρουσία φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, αποτέλεσμα της δράσης της β γλυκοσιδάσης, και παράλληλα διακοπή οποιασδήποτε άλλης ενζυμικής δραστηριότητας.

## 2.5 Συμπεράσματα - Σχηματισμός της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα σεκοϊριδοειδή ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, ελαιοκορωνάλη, ελαιομισσιονάλη καθώς και οι μονοαλδεϋδικές μορφές των άγλυκων του λιγκοτροσίδη και της ελευρωπαΐνης, δεν εντοπίζονται στον καρπό της ελιάς. Οι ενώσεις αυτές, είναι αποτέλεσμα ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν αμέσως μετά την πολτοποίηση του καρπού στον σπαστήρα του ελαιοτριβείου. Την χρονική αυτή στιγμή, η ελευρωπαΐνη και ο λιγκοτροσίδης, έρχονται σε επαφή με την β γλυκοσιδάση, η οποία μέσα στον καρπό βρίσκεται σε διαφορετικό ενδοκυτταρικό διαμέρισμα, και η οποία απομακρύνει το σάκχαρο από τα δύο αυτά μόρια.

Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, η χρήση της μεθόδου qNMR που χρησιμοποιήθηκε, έδωσε την δυνατότητα να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός όλων των φαινολικών συστατικών στα δείγματα που αναλύθηκαν αποφεύγοντας οποιονδήποτε μετασχηματισμό κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Επίσης δόθηκε η ευκαιρία να εντοπιστούν για πρώτη φορά ποιοτικές διαφορές στο φαινολικό προφίλ τόσο του ίδιου του ελαιολάδου κατά την διάρκεια της μάλαξης, όσο και ελαιολάδων που παράγονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες αλλά προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες ελιάς.

Μέσα από πειράματα ελαιοποίησης καρπού Κορωνέικης ποικιλίας και ποικιλίας Αθηνολιάς, σε διαφορετικές συνθήκες ωρίμανσης, χρόνου και θερμοκρασίας μάλαξης, προέκυψε ότι ανεξαρτήτως ποικιλίας, ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού έχει αρνητική επίδραση στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ιδιαίτερα σε μεγάλους βαθμούς ωρίμανσης όπου εντοπίζονται και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Σημαντική είναι η επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης, καθώς έστω και μικρή αύξηση της θερμοκρασίας μάλαξης οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών, σαν σύνολο, σε σχέση με πειράματα ελαιοποίησης που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία. Τέλος ο χρόνος μάλαξης είχε ξεκάθαρα αρνητική επίδραση στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο.

Από την ανάλυση της συγκέντρωσης των επιμέρους φαινολικών συστατικών προέκυψε ότι κατά την διάρκεια της μάλαξης η συγκέντρωση των συστατικών ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη μειώνεται ενώ η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης αυξάνεται κατά τρόπο μάλιστα θερμοεξαρτώμενο.

Μέσα από τα παραπάνω πειράματα ελαιοποίησης, αλλά και τα πειράματα τροποποιημένης μάλαξης για πρώτη φορά γίνεται σαφές ότι στους πολύ αρχικούς χρόνους μάλαξης, τα πρώτα φαινολικά συστατικά που εντοπίζονται στο ελαιολάδο μετά την σύνθλιψη του καρπού είναι η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη. Τα δύο αυτά συστατικά είναι οι πρώτες σταθερές μορφές

του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης που εντοπίζονται στο ελαιόλαδο ενώ η επιβεβαίωση του παραπάνω ευρήματος πραγματοποιήθηκε με τα πειράματα τροποποιημένης μάλαξης όπου η ρύθμιση του pH σε χαμηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα, οδήγησε σε αναστολή της δράσης των ενζύμων της μεθυλεστεράσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελαιολάδου μόνο με ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη.

Από την μελέτη σε διαφορετικές ποικιλίες αποδείχτηκε ότι σε ορισμένες ποικιλίες όπως η Θρουμπολιά Αιγαίου και η Ολύμπια ποικιλία, τα συστατικά αυτά αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά μέχρι το τέλος της διαδικασίας της μάλαξης ενώ σε άλλες ποικιλίες η συγκέντρωσή τους μειώνεται σημαντικά.

Χωρίς κάποια ενζυμική δραστηριότητα οι ενώσεις αυτές μετατρέπονται, συνήθως σε μικρό ποσοστό στις μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και του άγλυκου της ελευρωπαΐνης με απλή κυκλοποίηση όπως συμβαίνει κατά την διάρκεια της χρωματογραφικής τους επεξεργασίας και την αλληλεπίδραση με τη γέλη πυριτίο και το νερό. Στο στάδιο αυτό, από την στιγμή που γίνει η κυκλοποίηση, είναι αδύνατον να έχουμε κάποιο ενζυμικό μετασχηματισμό, πέραν από την οξείδωση από την PPO.

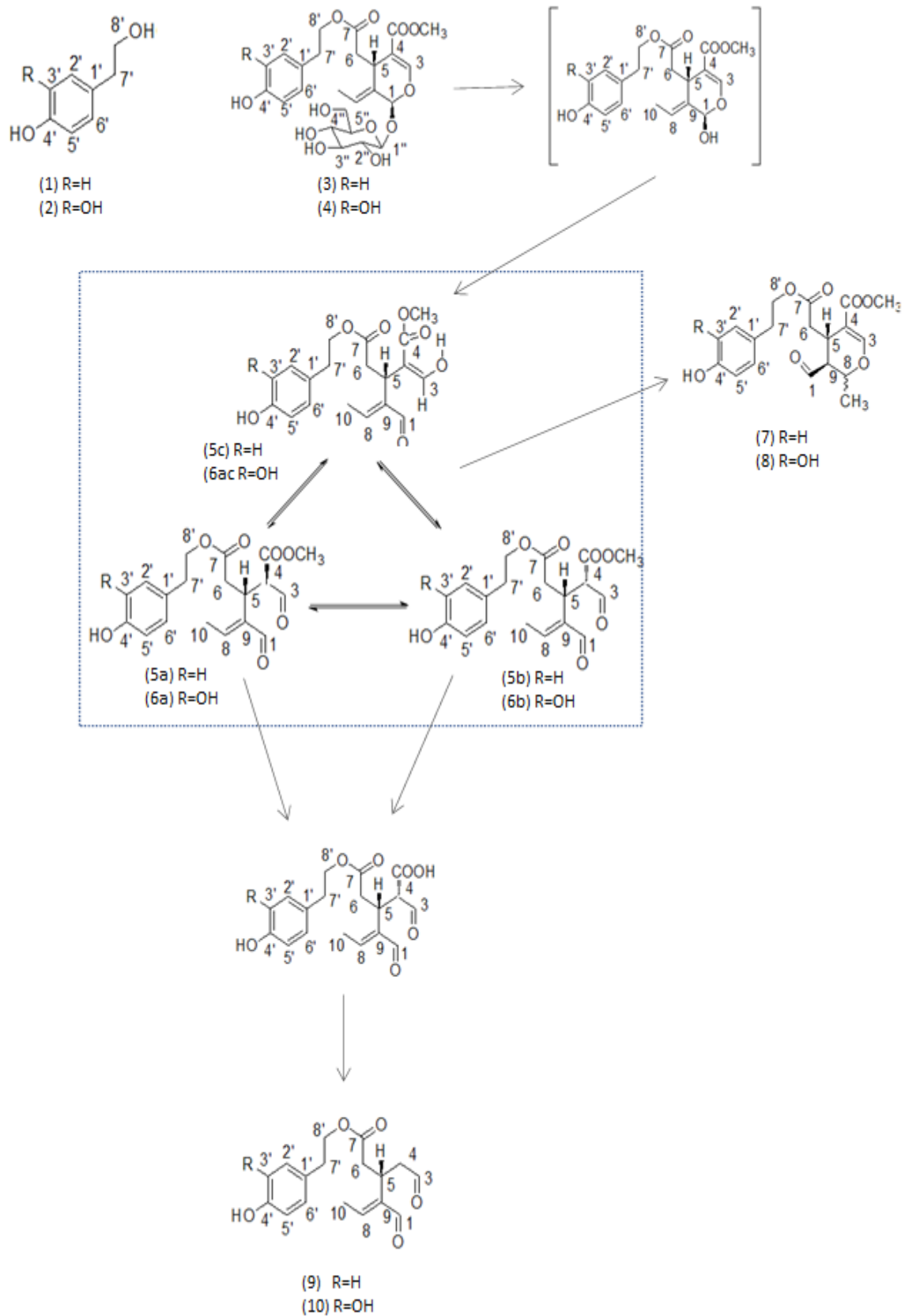
Όσο εξελίσσεται η διαδικασία της μάλαξης η συγκέντρωση της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης μειώνεται και σε πολλές περιπτώσεις μηδενίζεται και δεν εντοπίζονται στο ελαιόλαδο. Στην πραγματικότητα οι δύο αυτές ομάδες ουσιών καταναλώνονται με δύο τρόπους. Αφενός οξειδώνονται από την παρουσία οξειδωτικών ενζύμων (PPO) αφετέρου μετασχηματίζονται στην ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη αντίστοιχα.

Ο μετασχηματισμός αυτός γίνεται σε δύο στάδια. Όπως έχει αναφερθεί και στην αρχή της παρούσας εργασίας τόσο η ελαιοκορωνάλη όσο και η ελαιομισσιονάλη αποτελούν ομάδες ουσιών και συγκεκριμένα 2 διαλδεϋδικών μορφών και μιας ενολικής μορφής και οι οποίες μέσα στο ελαιόλαδο βρίσκονται σε διαρκή ισορροπία μεταξύ τους. Στο πρώτο στάδιο της μετατροπής των ενώσεων αυτών πραγματοποιείται απομεθυλίωση των διαλδεϋδικών μορφών του άγλυκου του λιγκστροσίδη ενώ σε δεύτερο στάδιο γίνεται θερμική αποκαρβοξυλίωση του προϊόντος που προκύπτει. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται κατά την διάρκεια της μάλαξης από μεθυλεστεράσες παράγοντας τελικά την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη.

Από την δεύτερη σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, για πρώτη φορά φάνηκε ότι σημαντικό ρόλο στην τελική διαμόρφωση του φαινολικού προφίλ του ελαιολάδου παίζει και η ποικιλία. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι που παρουσιάζεται στην ενότητα αυτή, σε κάθε περίπτωση, ακολουθεί τα ίδια στάδια, με διαφορετική όμως ταχύτητα και διαφορετική απόδοση. Επομένως υπάρχουν ποικιλίες που είτε λόγω του pH που δημιουργείται στην ελαιοζύμη είτε λόγω

μειωμένης δράσης ενζύμων είτε και παντελούς απουσίας τους, η βιοσυνθετική πορεία διακόπτεται από το πρώτο κιάλας στάδιο. Τέτοιες περιπτώσεις είναι η Θρουμπολιά Αιγαίου και σε ένα βαθμό και η Ολύμπια ποικιλία. Σε άλλες ποικιλίες το βιοσυνθετικό μονοπάτι εξελίσσεται καθ' όλη την διαρκεί της μάλαξης, όπως στην Κορωνέικη ποικιλία, όπου η μετατροπή της ελαιοκορωνάλης σε ελαιοκανθάλη διαρκεί τουλάχιστον 30 min και η ελαιοκορωνάλη και η ελαιομισσιονάλη φτάνουν εν τέλει σε οριακά ανιχνεύσιμα επίπεδα. Τέλος υπάρχουν και περιπτώσεις όπου τα στάδια που έχουμε περιγράψει, έχουν ολοκληρωθεί στο 100% σε χρόνο λιγότερο των 15 min όπως στην περίπτωση της ποικιλίας "Καλαμών".

Οι ενζυμικές αντιδράσεις, τα στάδια και τα διάφορα προϊόντα που προκύπτουν από τις διαδικασίες που περιγράφηκαν παραπάνω συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 2.8: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ελαιοκανθάλης και της ελαιαΐνης.

## 3. Επίδραση των φαινολικών συστατικών στους δείκτες Κ.

### 3.1 Εισαγωγή.

#### 3.1.1 Κατηγορίες ελαιολάδου στο διεθνές εμπόριο.

Από την αρχαιότητα ήδη, το ελαιόλαδο βρισκόταν στο επίκεντρο της εμπορικής δραστηριότητας των λαών της Μεσογείου. Η υψηλή διατροφική του αξία ήταν γνωστή από πολύ παλιά, και αυτό το κατέστησε πολύ σημαντικό κομμάτι της διατροφής των Μεσογειακών χωρών. Η εμπορική δραστηριότητα του ελαιολάδου συνεχίστηκε μέχρι τις μέρες μας, αποτελώντας πυρήνα της εξαγωγικής οικονομίας χωρών όπως η Ελλάδα, η Ιταλία, η Ισπανία άλλες και μεσογειακές χώρες. Η σημασία του προϊόντος αυτού οδήγησε και την επιστημονική κοινότητα από πολύ νωρίς να μελετήσει τις ιδιότητες του και να καθορίσει διεθνή κριτήρια ποιότητας.

Στο διεθνές εμπόριο τα ελαιόλαδα πρέπει να συμμορφώνονται με διαφορετικά πρότυπα και κανόνες, αναλόγως με την περιοχή που γίνεται η εμπορική συναλλαγή. Τρία από τα βασικότερα πρότυπα είναι αυτά που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση, το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου αλλά και την επιτροπή του *Codex Alimentarius*, η οποία αναγνωρίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Εμπορίου των Ηνωμένων Εθνών (Conte et al. 2019).

Εντός της ΕΕ, όλες οι νομοθεσίες που αφορούν το ελαιόλαδο, περιλαμβάνουν κανονισμούς, δηλαδή υποχρεωτικούς κανόνες. Η πρώτη φορά που το ελαιόλαδο αναφέρεται σε κανονισμό είναι το 1966, όταν η τότε ΕΟΚ, έθεσε τους πρώτους ορισμούς και κατηγορίες ελαίων. Ωστόσο στον κανονισμό αυτό γίνεται απλή περιγραφή και αναφορά των κατηγοριών του ελαιολάδου χωρίς να δίδονται περισσότερα αναλυτικά στοιχεία και μέθοδοι, που να διακρίνουν την μια κατηγορία από την άλλη (*Regulation No 136/66/EEC 1966*). Στην συνέχεια ο κανονισμός αυτός αντικαταστάθηκε 2 φορές από άλλους κανονισμούς, μέχρι την τελική του τροποποίηση το 1991 (*EC Regulation 2568 1991*). Ο κανονισμός αυτός έγινε σημείο αναφοράς για όλους τους κανονισμούς που ακολούθησαν στην συνέχεια για το ελαιόλαδο. Στον κανονισμό αυτόν για πρώτη φορά καθορίστηκαν οι παράμετροι με τις οποίες καθορίζεται η ποιότητα και η αυθεντικότητα του ελαιολάδου, τα αναλυτικά όρια που διακρίνουν τις διάφορες κατηγορίες ελαιολάδου, καθώς επίσης και τις αποκλειστικές μεθόδους προσδιορισμού των κριτηρίων αυτών.

Οι κανονισμοί αυτοί αποτελούν κανόνες που διέπουν το εμπόριο εντός της οικονομικής ζώνης της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Όταν η εμπορική συναλλαγή αφορά τρίτες χώρες, τότε τα πρότυπα τα



οποία εφαρμόζονται, είναι αυτά του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (IOC). Τα πρώτα πρότυπα που εκδόθηκαν από τον οργανισμό αυτό, ήταν το 1963, και εφαρμόζονται για τις εμπορικές συναλλαγές μεταξύ των χωρών που είναι μέλη του IOC. Η Ε.Ο.Κ. δεν αποτελούσε μέλος του IOC αλλά απλό παρατηρητή, ενώ με την μετατροπή της Ε.Ο.Κ. σε Ε.Ε. έγινε επίσημο μέλος του IOC και ξεκίνησε μια διαδικασία εναρμονισμού των κανονισμών και των προτύπων. Σε παγκόσμιο επίπεδο, το εμπόριο ελαιολάδου όταν δεν εμπίπτει σε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, εφαρμόζονται τα πρότυπα από την επιτροπή *Codex Alimentarius*. Τα πρότυπα αυτά εκδόθηκαν για πρώτη φορά το 1983 ενώ η τελευταία αναθεώρησή τους πραγματοποιήθηκε το 2017 (CODEX STAN 1981).

Τα επίσημα κριτήρια του ελαιολάδου περιλαμβάνουν κάποιους βασικούς δείκτες με τους οποίους μπορεί να διασφαλίζεται ότι το ελαιόλαδο έχει παραχθεί κάτω από βέλτιστες συνθήκες. Τα κριτήρια αυτά μπορούν να αποκαλύψουν κακές πρακτικές που έχουν εφαρμοστεί κατά την συλλογή του καρπού (προσβολή καρπού από έντομα, μύκητες, υπερώριμοι καρποί), κακές πρακτικές κατά την διαδικασία της ελαιοποίησης (παραμονή του καρπού σε σάκους πριν την ελαιοποίηση, χρήση νερού κατά την μάλαξη), ακόμα και μετά την ελαιοποίηση (κακή αποθήκευση του ελαιολάδου) ή ακόμα και την νόθευση του ελαιολάδου. Λόγω της εμπορικής αξίας του ελαιολάδου, συχνά είναι τα φαινόμενα κατά τα οποία στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο προστίθενται ποσότητες από άλλα, φθηνότερα έλαια όπως το ηλιέλαιο, πυρηνέλαιο, αραβοσιτέλαιο κ.α. (Al-Ismail et al. 2010).

Τα κριτήρια αυτά σε πρώτο στάδιο βασίζονται στα βασικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων που περιέχονται στο ελαιόλαδο, καθώς και στις βασικές χημικές αλλοιώσεις, που συμβαίνουν σε αυτά. Σε δεύτερο επίπεδο η αξιολόγηση του ελαιολάδου γίνεται με τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά αλλά και με τον έλεγχο δευτερευόντων συστατικών.

### 3.1.2 Κριτήρια ποιότητας ελαιολάδου.

#### *Οξύτητα ελαιολάδου.*

Η οξύτητα του ελαιολάδου, ή αλλιώς και ελεύθερη οξύτητα, σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης αποτελεί την πρώτη μέθοδο πιστοποίησης που πρέπει να πραγματοποιείται στο ελαιόλαδο (EC Regulation 2568 1991). Η ελεύθερη οξύτητα αφορά κυρίως τους ελέγχους που γίνονται για να διασφαλιστούν οι ορθές πρακτικές που έχουν εφαρμοστεί πριν την διαδικασία της ελαιοποίησης, καθώς δίνει πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του καρπού που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του ελαιολάδου (M. Grossi et al. 2019). Η ελεύθερη οξύτητα, αποτελεί βασικό κριτήριο ποιότητας του ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 1966, ενώ αναλυτική του περιγραφή ως προς την μέθοδο ανάλυσης, έγινε το 1991, οπότε και εφαρμόστηκε και ο πρώτος αναλυτικός κανονισμός από την Ευρωπαϊκή Ένωση σε σχέση με τις επιτρεπόμενες τιμές για την κάθε κατηγορία ελαιολάδου.

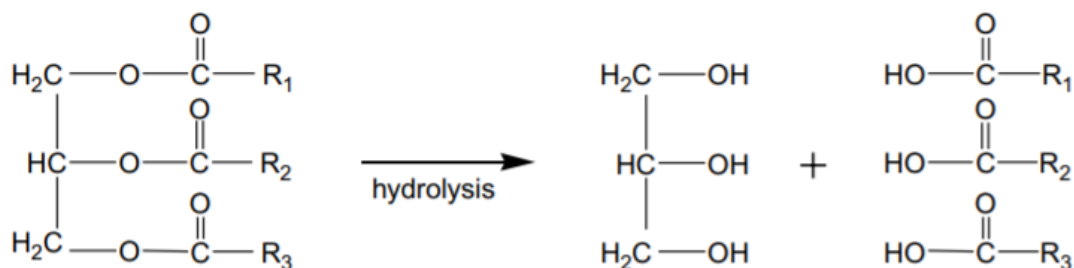
Η ελεύθερη οξύτητα ορίζεται ως το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων τα οποία έχουν αποσυνδεθεί από το σύστημα των τριγλυκεριδίων (TAG), που φυσιολογικά υπάρχουν στο ελαιόλαδο (Wiesman 2009), και η ποσοτικοποίηση της γίνεται ως ποσοστό επί του ελαϊκού οξέος. Στην επίσημη κατηγοριοποίηση των ελαιόλαδων, στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο η μέγιστη ελεύθερη οξύτητα ισοδυναμεί με 0.8 g ελαϊκού οξέος ανά 100 g ελαιολάδου, στο παρθένο ελαιόλαδο η μέγιστη ελεύθερη οξύτητα ισοδυναμεί με 2.0 g ελαϊκού οξέος ανά 100 g ελαιολάδου ενώ στην κατηγορία του Λαμπάντε, όπου πλέον το ελαιόλαδο θεωρείται ακατάλληλο για βρώση, η μέγιστη ελεύθερη οξύτητα ισοδυναμεί με τιμές μεγαλύτερες από 2.0 g ελαϊκού οξέος ανά 100 g ελαιολάδου.

Μετά την παραγωγή του το ελαιόλαδο, όπως και όλα τα βρώσιμα έλαια, έχουν την τάση να αποικοδομούνται, μέσω μιας σειράς υδρολυτικών αντιδράσεων. Στο ελαιόλαδο η πιο συχνή υποβάθμιση του προϊόντος, προκύπτει από την υδρόλυση των τριάκυλο γλυκερολών που φυσιολογικά υπάρχουν στο ελαιόλαδο. Αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών είναι η απελευθέρωση λιπαρών οξέων στο περιβάλλον του ελαίου.

Το ελαιόλαδο εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και αντίστοιχα μικρή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για άμεση κατανάλωση, ενώ προσφέρει και σημαντικά καρδιοπροστατευτικά οφέλη. Τα λιπαρά οξέα τα βρίσκουμε στο ελαιόλαδο υπό εστεροποιημένη μορφή, κυρίως με σύνδεση 3 μορίων λιπαρών οξέων με ένα μόριο γλυκερόλης. Στο ελαιόλαδο έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί συνολικά 20

είδη τριάκυλο γλυκερών, ωστόσο 5 είναι αυτές που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό (Leon- Camacho et al 2013.)

Η αντίδραση της υδρόλυσης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός, δύο, ακόμα και των τριών μορίων του λιπαρού οξέος από το σύστημα που αναφέρθηκε παραπάνω δημιουργώντας τα ελεύθερα λιπαρά οξέα.



Οι υδρολυτικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στο ελαιόλαδο δεν συνεπάγονται αλλοίωση των γευσιγνωστικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου, καθώς η οξύτητα δεν σχετίζεται με την γεύση ή την οσμή του προϊόντος. Η αυξημένη οξύτητα σχετίζεται με την υγειοπροστατευτική υποβάθμιση του ελαιολάδου, και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την διάρκεια ζωής του ελαιολάδου. Παρακάτω θα δούμε τους παράγοντες που επηρεάζουν την συχνότητα των αντιδράσεων αυτών.

Παράγοντες που επηρεάζουν την οξύτητα.

Την αντίδραση αυτή την συναντάμε πολύ συχνά πριν την ελαιοποίηση του καρπού της ελιάς. Βασική αιτία στην περίπτωση αυτή είναι η δράση του ενζύμου λιπάση, η οποία αποικοδομεί τα τριγλυκερίδια, υδρολύοντας τους εστερικούς δεσμούς και οδηγεί στο σχηματισμό γλυκερόλης και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι ενδογενή, είτε να παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες) που αναπτύσσονται στους καρπούς.

Οι μύκητες του γένους *Penicillium* έχουν αναγνωριστεί ως οι πιο ισχυροί παραγωγοί λιπασών (Peres et al 2017). Η ασθένεια “olive anthracnose” (γλοιοσπόριο) που προκαλείται από τους μύκητες του γένους *Colletotrichum* είναι μια ασθένεια που πλήττει την ελιά και προκαλεί σοβαρές

υδρολυτικές αλλαγές στους καρπούς (Cacciola et al. 2012). Όλες αυτές οι υδρολυτικές αλλαγές που επιτελούνται στον καρπό τελικά επιδρούν στην οξύτητα του ελαιολάδου. Σημαντική ακόμα, είναι και η επίδραση της προσβολής του ελαιόδεντρου από έντομα, όπως ο δάκος (*Bactrocera oleae*) καθώς η διάνοιξη σπών στο περίβλημα του καρπού, αυξάνει την επαφή των λιπιδίων του καρπού της ελιάς με την υγρασία της ατμόσφαιρας (Tamendjari et al. 2009).

Σημαντική επίσης επίδραση στην οξύτητα του καρπού φαίνεται να έχουν και άλλοι παράγοντες που έχουν να κάνουν με την καλλιέργεια, και την διαδικασία συλλογής και ελαιοποίησης του καρπού. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές η αυξημένη άρδευση της καλλιέργειας, αυξάνει τα επίπεδα της οξύτητας στο ελαιόλαδο καθώς, όπως εξηγούν οι ερευνητές, αυξάνεται η ευαισθησία του καρπού σε τραυματισμούς (Dag et al. 2012). Ο τραυματισμός της ελιάς, όπως έχουμε ήδη εξηγήσει, αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες αύξησης της οξύτητας στο ελαιόλαδο. Αυτός είναι και ο λόγος που κατά την συλλογή του καρπού, η χρήση μηχανικών μέσων οδηγεί στην πιθανότητα αύξησης της οξύτητας του ελαιολάδου (Famiani et al. 2020; Dag et al. 2012; Morales-Sillero et al. 2017). Όπως επισημαίνεται μάλιστα, ο τραυματισμός του καρπού από μηχανικά μέσα συλλογής από μόνος του, δεν είναι ο καθοριστικός παράγοντας αύξησης της οξύτητας του ελαιολάδου. Καθοριστικός είναι ο συνδυασμός της συλλογής του καρπού με μηχανικά μέσα, με την καθυστέρηση της ελαιοποίησης του καρπού. Τότε αυξάνεται δραματικά η οξύτητα.

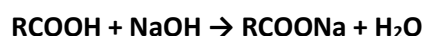
Η αποθήκευση του καρπού και η παραμονή του σε βιομηχανικούς χώρους αποθήκευσης αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της ελεύθερης οξύτητας του καρπού (Clodoveo et al. 2007; Dag et al. 2012). Η αύξηση της θερμοκρασίας και η παρουσία οξυγόνου αυξάνει εκθετικά την δράση ενζύμων, με αποτέλεσμα την αύξηση της ελεύθερης οξύτητας του ελαιολάδου όσο αυξάνεται και ο χρόνος παραμονής (Tayfun Agar et al. 1999; Kiritsakis et al. 1998).

Η ελεύθερη οξύτητα του ελαιολάδου επηρεάζεται και μετά την παραγωγή του ελαιολάδου, από τις συνθήκες αποθήκευσης. Το είδος της συσκευασίας και οι συνθήκες παραμονής σε αυτήν (θερμοκρασία, φως) μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην οξύτητα του ελαιολάδου, και να καθορίσουν την διάρκεια ζωής του τροφίμου (Pristouri et al 2010; Gutiérrez and Fernández 2002). Για τον λόγο, έχουν σχεδιαστεί συσκευασίες που προστατεύουν το έλαιο από αλλοιώσεις όπως η οξείδωση (Abbadí et al. 2014).

Η ελεύθερη οξύτητα είναι ένας από τους παράγοντες που μπορούν να υποβαθμίσουν σημαντικά το προϊόν. Για την επαναχρησιμοποίηση ενός ελαιολάδου με πολύ υψηλή οξύτητα είναι απαραίτητη η διαδικασία του εξευγενισμού, κατά την οποία έχουν αναπτυχθεί τεχνικές μείωσης της οξύτητας του ελαιολάδου τόσο με φυσικούς (φυσική απόσταξη, διήθηση με silica gel) όσο και με χημικούς τρόπους όπως η εξουδετέρωση (El-Salam et al. 2015).

### Υπολογισμός οξύτητας.

Η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης οξύτητας γίνεται με τιτλοδότηση σύμφωνα με την οποία, γίνεται υπολογισμός του όγκου διαλύματος γνωστής περιεκτικότητας (πρότυπο), που χρειάστηκε για να αντιδράσει πλήρως με το αρχικό διάλυμα άγνωστης περιεκτικότητας. Στην περίπτωση του ελαιολάδου, η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα προσδιορίζεται ποσοτικά με την πλήρη εξουδετέρωση μιας ποσότητας ελαιολάδου από ένα διάλυμα ισχυρής βάσης (π.χ. NaOH ή KOH) γνωστής συγκέντρωσης σύμφωνα με την αντίδραση:



### Υπεροξειδία.

Ο αριθμός των υπεροξειδίων είναι το δεύτερο σημαντικό κριτήριο ποιότητας του ελαιολάδου. Το ελαιόλαδο θεωρείται από τα πλέον σταθερά βρώσιμα έλαια λόγω της ψηλής περιεκτικότητας τους σε αντιοξειδωτικά όπως οι πολυφαινόλες και οι τοκοφερόλες. Εκτός από την ομάδα των αντιοξειδωτικών ενώσεων του ελαιολάδου, σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του στον χρόνο παίζει και ο μικρός βαθμός ακορεστότητας των λιπιδίων που περιέχει (Kamal-Eldin 2006). Ο αριθμός των υπεροξειδίων δηλώνει τον βαθμό οξείδωσης του ελαιολάδου και περιέχεται και αυτός στους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα υπεροξειδία είναι τα κυρίαρχα προϊόντα οξείδωσης του ελαιολάδου και των φυτικών ελαίων γενικότερα. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των ελαίων με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας (Wiesman 2009). Ακόμα και σε ένα συσκευασμένο ελαιόλαδο ο ελάχιστος ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχεται στην κορυφή ενός μπουκαλιού (headspace) περιέχει οξυγόνο το οποίο διαλύεται στο έλαιο με αποτέλεσμα να προκύπτουν αντιδράσεις οξείδωσης.

Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι από τις πιο σημαντικές αντιδράσεις στην χημεία των λιπιδίων. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που καταλύουν την οξείδωση των λιπιδίων. Στους σημαντικότερους αναφέρονται: η βιοδιαθεσιμότητα του οξυγόνου, η υψηλή θερμοκρασία, η παρουσία φωτός, μετάλλων και ενζύμων

Τα προϊόντα των οξειδωτικών αντιδράσεων επιδρούν σημαντικά στα γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, προσδίδοντας δυσάρεστη γεύση και οσμή, ενώ υποβαθμίζουν και την θρεπτική του αξία. Οι οξειδωτικές αυτές αντιδράσεις πραγματοποιούνται με τους εξής μηχανισμούς:

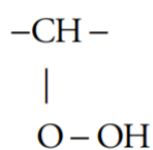
→ Ενζυμική οξείδωση

Η ενζυματική οξείδωση καταλύεται από την λιποξυγενάση η οποία ανήκει στις οξειδοαναγωγάσες. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν κυρίως με υπόστρωμα τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ σε μικρότερο ποσοστό δρουν και με υπόστρωμα τα τριγλυκερίδια.

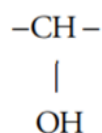
→ Μηχανισμός αυτό-οξείδωσης- μηχανισμός ελευθέρων ριζών.

Ο μηχανισμός των ελευθέρων ριζών της οξείδωσης των λιπιδίων περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Κατά το αρχικό στάδιο, αποσπάται το άτομο του υδρογόνου από το μόριο του ακόρεστου λιπαρού οξέος (RH) και σχηματίζεται μια ελεύθερη ρίζα λιπαρού οξέος (R·) (Porter et al 1995). Η ελεύθερη αυτή ρίζα του λιπαρού οξέος μπορεί να είναι είτε υπό την μορφή ελεύθερου λιπαρού οξέος είτε ακόμα στην εστεροποιημένη μορφή της τριακυλογλυκερόλης. Η οξείδωση των λιπαρών οξέων προσωρινά αναστέλλεται από την παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών όπως οι βιοφαινόλες. Στην περίπτωση που υπάρχουν αυτά τα φυσικά αντιοξειδωτικά, παίρνουν την θέση των λιπαρών οξέων και οξειδώνονται αυτά, αντί των λιπαρών οξέων. Μόλις καταναλωθούν η οξείδωση πραγματοποιείται στα λιπαρά οξέα.

Στο επόμενο στάδιο, οι ελεύθερες ρίζες των λιπαρών οξέων αντιδρούν με το οξυγόνο μέσω των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (υπερόξυ- ρίζες) και σχηματίζει ρίζα υπεροξειδίου (ROO·) η οποία με την σειρά της αποσπά το υδρογόνο από ένα άλλο λιπιδικό μόριο (RH) και αντιδρώντας μαζί του σχηματίζει υδροϋπεροξειδία (ROOH) (E. N. Frankel 2012). Τα υδροϋπεροξειδία αποτελούν τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης και δεν προσδίδουν κάποιο δυσάρεστο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό (Matthäus 2010).



Λόγω αστάθειας της παραπάνω ομάδας είναι πολύ εύκολο να παραχθούν προϊόντα δευτερογενούς οξείδωσης με απόσπαση ενός οξυγόνου και να απομείνει μια υδρόξυ δραστική ομάδα:



η οποία με τη σειρά της μαζί με μια γειτονική ομάδα μεθυλενίου -CH<sub>2</sub>- χάνει ένα μόριο νερού για να δώσει έναν διπλό δεσμό στην αλυσίδα, = CH-. Το οξυγόνο μπορεί να προστεθεί απευθείας στον διπλό δεσμό που έχει δημιουργηθεί, δίνοντας ένα υπεροξειδίο ή εποξειδίο:



Αποτέλεσμα της οξείδωσης αυτής είναι τελικώς η διάσπαση της αλυσίδας του λιπαρού οξέος και η απελευθέρωση τμημάτων της αλυσίδας με την μορφή κετονών και αλδευδών (-CHO και =CO) οι οποίες ευθύνονται για τα δυσάρεστα γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά ενός οξειδωμένου ελαιολάδου. Στην συνέχεια της πορείας της οξείδωσης των λιπιδίων του ελαιολάδου οι αλδεΐδες και οι κετόνες καταλήγουν σε καρβοξυλομάδες οι οποίες και προσδίδουν τα χαρακτηριστικά του ταγγίσματος (Patterson 2011).

Κατά τον τερματισμό του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών, οι ελεύθερες υπερόξυ ρίζες συσσωρεύονται και αντιδρούν μεταξύ τους τερματίζοντας την διαδικασία της οξείδωσης.

→ Μηχανισμός Φωτο-οξείδωσης.

Ο μηχανισμός φωτο-οξείδωσης λαμβάνει χώρα όταν το ελαιολάδο εκτίθεται σε φυσικές ή/και τεχνητές πηγές φωτός. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός μπορεί να επιταχύνει σημαντικά την διαδικασία της οξείδωσης, και είναι ο λόγος που η φύλαξη του ελαιολάδου γίνεται σε σκούρα μπουκάλια, ασκούς, και σκιερά μέρη.

[Παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές των υπεροξειδίων.](#)

Όπως και στην περίπτωση της ελεύθερης οξύτητας, έτσι και στην τιμή των υπεροξειδίων, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν την τιμή αυτή τόσο πριν, όσο και μετά την ελαιοποίηση του καρπού. Στην περίπτωση αυτή όμως φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρότερη εξάρτηση από παράγοντες που εμφανίζονται μετά την παραγωγή του ελαιολάδου.

Οι μέθοδοι συλλογής του καρπού, και τα μηχανικά μέσα που χρησιμοποιούνται, είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ταχύτητα οξείδωσης του ελαιολάδου υποβαθμίζοντας το τελικό προϊόν (Saglam et al. 2014). Φυσικά και η προσβολή του καρπού από μικροοργανισμούς είναι δυνατόν να προκαλέσει σημαντική αύξηση της τιμής των υπεροξειδίων καθώς ο τραυματισμός του καρπού επιφέρει τόσο υδρολυτικές όσο και οξειδωτικές αντιδράσεις στο εσωτερικό του καρπού.

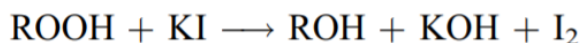
Ο αριθμός όμως των υπεροξειδίων είναι ένας παράγοντας που επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες αποθήκευσης του ελαιολάδου. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι οι μη ορθές συνθήκες

αποθήκευσης του ελαιολάδου, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής των υπεροξειδίων (Sanmartin et al. 2018). Συσκευασίες που επιτρέπουν την επαφή του ελαιολάδου με φυσικές ή τεχνητές πηγές φωτός, είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν κάποιους από τους μηχανισμούς που αναφέραμε παραπάνω.

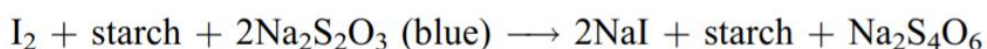
#### Υπολογισμός Υπεροξειδίων.

Η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού της τιμής των υπεροξειδίων βασίζεται στην ιωδομετρική τιτλοδότηση του ιωδίου που στοιχειομετρικά απελευθερώνεται μετά την προσθήκη περίσσειας ιωδιούχου καλίου (KI) από τα υδροϋπεροξειδία του ελαιολάδου.

Η τιμή των υπεροξειδίων του ελαιολάδου (PV), όπως αυτή υπολογίζεται από την επίσημη μέθοδο, καθορίζει τη συγκέντρωση των υδροϋπεροξειδίων, των πρωτογενών δηλαδή προϊόντων οξείδωσης, και ανήκει στην κατηγορία των ιωδιομετρικών αντιδράσεων. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στην ικανότητα των υπεροξειδίων να απελευθερώνουν ιώδιο από το ιωδιούχο κάλιο, το οποίο αποτελεί και το βασικό αντιδραστήριο της μεθόδου. Το ελαιόλαδο διαλύεται σε διάλυμα χλωροφορμίου/ οξικού οξέος και γίνεται προσθήκη ιωδιούχου καλίου. Τα υπεροξειδία του ελαιολάδου στο διάλυμα αυτό, απελευθερώνουν το ιώδιο από το ιωδιούχο κάλιο.



Ο υπολογισμός της ποσότητας των υπεροξειδίων (ROOH) γίνεται μετρώντας την ποσότητα του σχηματιζόμενου ιωδίου, η οποία γίνεται με τιτλοδότηση με θειοθειικό νάτριο και χρησιμοποιώντας δείκτη αμύλου:



Η ποσότητα υπεροξειδίων υπολογίζεται από την ποσότητα θειοθειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ ) που καταναλώνεται. Εκφράζεται ως τιμή υπεροξειδίου (PV) σε μονάδες χιλιοστοϊσοδύναμων (meq) υπεροξειδίου ανά 1 Kg λίπους που εξάγεται από το ελαιόλαδο (Kong and Singh 2011).



### Δείκτες K.

Τα διάφορα έλαια όπως και το ελαιόλαδο, απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος και σε όλο το εύρος από τα 230 nm ως τα 280 nm. Η ανάλυση του ελαιολάδου με την φασματοφωτομετρία UV-vis βασίζεται στις αρχές φασματοφωτομετρίας που συνοπτικά θα αναφερθούν σε επόμενη παράγραφο (Vieira and Regitano-D'arce 1998).

Η φασματοφωτομετρική εξέταση στο υπεριώδες και ιδιαίτερα οι τιμές των συντελεστών K232, K270, ΔK μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της οξειδωτικής κατάστασης του ελαιολάδου, για τον έλεγχο της ποιότητας του, και τέλος για τον έλεγχο της καθαρότητας-γνησιότητας του.

Η ανάλυση του ελαιολάδου γίνεται με διάλυση ελαιολάδου σε εξάνιο (1% w/v) και μέτρηση της απορρόφησης στα 232 nm, στα 270 nm και με τον υπολογισμό του ΔK. Συγκεκριμένα οι τρεις δείκτες είναι:

- Η απορρόφηση σε μήκος κύματος 232 nm που σχετίζεται με τα προϊόντα πρωτογενούς οξείδωσης του ελαιολάδου και έχει ως ανώτατο όριο την τιμή 2,5
- Η απορρόφηση σε μήκος κύματος 270 nm που σχετίζεται με χαρακτηριστικές ομάδες που δημιουργούνται κατά την βιομηχανική επεξεργασία του ελαιολάδου (εξευγενισμός)
- Η σταθερά ΔK αφορά την απορρόφηση που οφείλεται σε σωματίδια ξένα προς το ελαιόλαδο τα οποία είναι είτε παράγωγα του οξειδωτικού ταγγίσματος, είτε παράγωγα του εξευγενισμού και απορροφούν φως στη ζώνη 262-274 nm. Η τιμή της υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\Delta K = K_{270} - \frac{K_{266} + K_{274}}{2}$$

Οι δείκτες K μπορούμε να πούμε ότι δίνουν πολλές και διαφορετικές πληροφορίες για την ποιότητα του ελαιολάδου, καθώς όπως φαίνεται και από τους ορισμούς του κάθε δείκτη, προκύπτει ότι αφορούν σε μεγάλο μέρος των αλλοιώσεων του ελαιολάδου. Οι δείκτες K, αν και είναι μια πολύ απλή μέθοδος χρησιμοποιείται για να αντληθούν πληροφορίες για τα πρωτογενή και τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, καθώς και παρουσία είτε ξένων υλών είτε άλλων

ελαίων. Αυτός είναι και ο λόγος που από νωρίς χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την αξιολόγηση της ποιότητας του ελαιολάδου.

Κάθε δείκτης αφορά και κάποια διαφορετική αλλοίωση, οπότε οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτώνται συνολικά οι δείκτες K είναι πολλοί και διαφορετικοί. Σε επόμενες παραγράφους θα αναφερθούμε αναλυτικά στο πως λειτουργεί ο κάθε δείκτης, ωστόσο οι περισσότεροι ερευνητές εστιάζουν και εδώ στην ποιότητα του καρπού και στις συνθήκες αποθήκευσης του ελαιολάδου. Σε όλες τις περιπτώσεις το είδος της συσκευασίας (γυάλινο μπουκάλι, σκουρόχρωμο μπουκάλι, δοχείο αλουμινίου, PET) καθώς και η θερμοκρασία αποθήκευσης του ελαιολάδου, φαίνεται ότι μπορούν να επιβραδύνουν τις αλλοιώσεις του ελαιολάδου που συνεπάγονται και την αύξηση των τιμών απορρόφησης και στους δείκτες K (Sanmartin et al. 2018; Krichene et al. 2010).

### 3.1.3 Η Μοριακή φασματοσκοπία Απορρόφησης ως μέσο ανάλυσης της ποιότητας του ελαιολάδου.

Η φασματοσκοπία απορρόφησης βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως) με την ύλη (χημικές ενώσεις) και στις κβαντικές μεταβολές ενέργειας κατά την απορρόφηση ή εκπομπή της ακτινοβολίας. Περιλαμβάνει την απορρόφηση ακτινοβολίας, κατά την οποία μεταφέρεται ενέργεια από την ακτινοβολία στο δείγμα, και την εκπομπή ακτινοβολίας, κατά την οποία αποβάλλεται ενέργεια από το δείγμα που είναι σε διεγερμένη κατάσταση υπό μορφή φωτονίων, ώστε να επιστρέψει στη θεμελιώδη του κατάσταση ή σε χαμηλότερης στάθμης ενέργεια (Βαλαβανίδης 2008). Ανάλογα τον τρόπο με τον οποίο διεγείρεται η ύλη η μοριακή φασματοσκοπία διακρίνεται σε:

- φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-VIS).
- φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).
- φασματοσκοπία μικροκυμάτων.
- φασματοσκοπία ραδιοσυχνοτήτων (NMR).

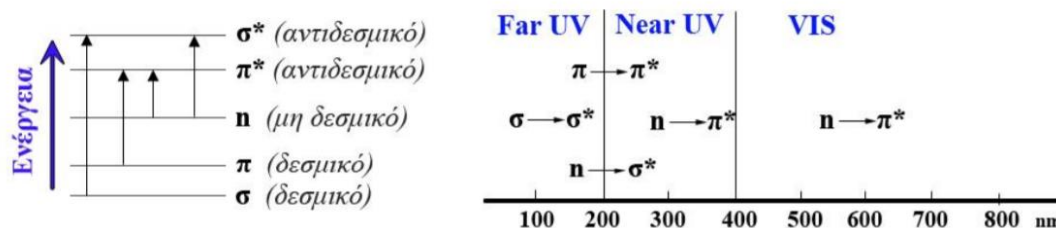
Οι φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στον έλεγχο ποιότητας των τροφίμων. Η εφαρμογή τους έχει ως σκοπό την πιστοποίηση προέλευσης, την νόθευση προϊόντων, τον έλεγχο υπολειμμάτων και τον έλεγχο ορθών πρακτικών κατά την παραγωγή των τροφίμων. Στις τεχνικές αυτές περιλαμβάνονται το σύνολο των τεχνικών με τις οποίες μετράται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που πηγάζει από την ύλη (άτομα, μόρια ή ιόντα) ή αλληλεπιδρά με αυτήν (Power et al. 2019).

Η μοριακή φασματοσκοπία απορρόφησης αναπτύχθηκε ευρύτατα λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που παρέχει στα πειράματα ελέγχου καθώς και της ευκολίας και ταχύτητας εξαγωγής των αποτελεσμάτων. Τα βρώσιμα έλαια, κατηγορία στην οποία περιλαμβάνεται και το ελαιόλαδο, αποτελούν μια κατηγορία τροφίμων στα οποία έχει εφαρμοστεί η φασματοσκοπία απορρόφησης.

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές διακρίνονται σε μοριακές και ατομικές τεχνικές. Όλες οι τεχνικές δεν είναι δυνατόν να δώσουν πληροφορίες για την δομή των μορίων που μελετώνται, δίνουν όμως πληροφορίες για τις βασικές δραστικές ομάδες που φέρουν τα μόρια που μελετάμε (Skoog, et al 2007).

### Μοριακή φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-vis).

Η Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-vis) αναφέρεται στην απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από τα συστατικά του δείγματος στην περιοχή UV (190-400 nm) και την ορατή περιοχή (400-780 nm). Τα φάσματα UV-vis δίνουν πληροφορίες για ορισμένες ομάδες του μορίου (χρωμοφόρες ομάδες) που απορροφούν ακτινοβολία. Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην θεωρία των μοριακών τροχιακών, η οποία μας επιτρέπει να αναπαραστήσουμε με σχετική ακρίβεια, τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις ανάμεσα στα μόρια των χημικών ενώσεων και να τις συνδέσουμε άμεσα με τις ενεργειακές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη λήψη φασμάτων UV-vis. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο γραμμικός συνδυασμός δύο ατομικών τροχιακών δημιουργεί δύο μοριακά τροχιακά διαφορετικής ενέργειας, όπου το μοριακό τροχιακό χαμηλής ενέργειας ονομάζεται δεσμικό (bonding orbital) και αυτό με την υψηλότερη ενέργεια αντιδεσμικό (antibonding orbital). Για την πλειοψηφία των οργανικών μορίων, τα ηλεκτρόνια κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: τα δεσμικά  $\sigma$ - και  $\pi$ -ηλεκτρόνια, και τα  $n$ -ηλεκτρόνια ή μη δεσμικά (non bonding) που δεν παίρνουν μέρος στον σχηματισμό χημικών δεσμών και συγκρατούνται ασθενέστερα ώστε να μπορούν να υποστούν μεταπτώσεις. Τα  $\sigma$  ηλεκτρόνια, που είναι πιο σταθερά και προσκολλημένα στους πυρήνες, απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια για να μεταβούν σε άλλα ενεργειακά επίπεδα, ενώ για τα  $\pi$ - και τα  $n$ -ηλεκτρόνια απαιτείται μικρότερη ενέργεια. Η ποσότητα της ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση των ηλεκτρονίων από τη δεσμική στην αντιδεσμική κατάσταση αντιστοιχεί στην εμφάνιση απορροφήσεων στην UV και VIS περιοχή του φάσματος (Βαλαβανίδης 2008).



Η φασματοσκοπία απορρόφησης Υπεριώδους-Ορατού (UV-vis) έχει βρει πολλές φορές εφαρμογή στον έλεγχο ποιότητας των τροφίμων (Power et al. 2019).

Οι οργανικές ενώσεις των τροφίμων, περιέχουν δραστικές ομάδες που διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Αυξόχρωμες ομάδες: Δραστικές ομάδες όπως  $-OH$ ,  $-OR$ ,  $-NHR$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$  και  $-Cl$  που περιέχουν μη δεσμικά ηλεκτρόνια σθένους και απορροφούν κοντά στα 200 nm, που αντιστοιχεί σε  $n \rightarrow \sigma^*$  μεταπτώσεις
- Χρωμοφόρες ομάδες: δραστικές ομάδες (πχ ακόρεστοι δεσμοί) που προκαλούν ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις και είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του μορίου στο εγγύς υπεριώδες ή ορατό ( $N=N$ ,  $C-N$ ,  $C=C$ ,  $N=O$ ,  $C=O$ )

Οι απλές χρωμοφόρες ομάδες όπως οι διπλοί και τριπλοί δεσμοί σε μια ανθρακική αλυσίδα, υπόκεινται σε ενεργειακές μεταπτώσεις που απορροφούν σε μικρά μήκη κύματος της UV περιοχής (>180 nm). Άλλες ομάδες (Αυξόχρωμες), όπως  $-OH$ ,  $-OR$  ( $R=$ αλκύλιο),  $-NH_2$ ,  $-SH$  και τα αλογόνα μπορούν να υποστούν μεταβάσεις σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, δηλαδή άνω των 190 nm που είναι και η περιοχή που αφορά και στην ανάλυση ποιότητας του ελαιολάδου.

Χρωμοφόρος ομάδα	Μετάβαση	$\lambda_{max}$ (nm)	Χρωμοφόρος ομάδα	Μετάβαση	$\lambda_{max}$ (nm)
$R-OH$	$n \longrightarrow \sigma^*$	180	$R-NO_2$	$n \longrightarrow \pi^*$	271
$R-O-R$	$n \longrightarrow \sigma^*$	180	$R-CHO$	$\pi \longrightarrow \pi^*$	190
$R-NH_2$	$n \longrightarrow \sigma^*$	190	$R-CHO$	$n \longrightarrow \pi$	290
$R-SH$	$n \longrightarrow \sigma^*$	210	$R_2C=O$	$\pi \longrightarrow \pi^*$	180
$R_2C=CR_2$	$\pi \longrightarrow \pi^*$	175	$R_2C=O$	$n \longrightarrow \pi^*$	280
$R-C \equiv C-R$	$\pi \longrightarrow \pi^*$	170	$RCOOH$	$n \longrightarrow \pi^*$	205
$R-C \equiv N$	$n \longrightarrow \pi^*$	160	$RCOOR'$	$n \longrightarrow \pi^*$	205
$R-N=N-R$	$n \longrightarrow \pi^*$	340	$RCONH_2$	$n \longrightarrow \pi^*$	210

Εικόνα 3.1: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών χρωμοφόρων ομάδων.

### *Φασματοσκοπία UV-vis στο Ελαιόλαδο.*

Τα τρόφιμα περιέχουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που περιέχουν χρωμοφόρες και αυξόχρωμες ομάδες. Τέτοιες χαρακτηριστικές ομάδες είναι τα αρωματικά αμινοξέα, οι βιταμίνες, τα λιπίδια, τα νουκλειικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι κουμαρίνες, και τα αλκαλοειδή. Το ελαιόλαδο περιέχει μεγάλο αριθμό ενώσεων που φέρουν αυτές τις χαρακτηριστικές ομάδες και για αυτό τον λόγο η φασματοσκοπία απορρόφησης, έχει μεγάλη εφαρμογή στην πιστοποίηση της ποιότητας του ελαιόλαδου.

Η φασματοσκοπία απορρόφησης μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για την ποιότητα του ελαιόλαδου. Η χρήση των φασμάτων απορρόφησης έχει βρει εφαρμογή στην διαπίστωση νοθείας, τον βαθμό οξειδωσης του ελαιόλαδου κ.α.. Η ανάλυση με την φασματοσκοπία UV-vis βασίζεται στην σύγκριση μεταξύ των χαρακτηριστικών χρωμοφόρων ομάδων ελαιόλαδων με εκείνες που έχουν υποστεί κάποια αλλοίωση ή με αυτές ξένων προσμίξεων.

Συμπληρωματικά, για την ανάλυση του ελαιόλαδου έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες τεχνικές μοριακής και ατομικής φασματοσκοπίας, όπως η φασματοσκοπία φθορισμού (Christensen et al. 2006; Sikorska et al 2012).

### *Χαρακτηριστικά σήματα στα φάσματα απορρόφησης.*

Μέσα από πολλές μελέτες που έχουν γίνει τα προηγούμενα χρόνια, οι ερευνητές έχουν καταφέρει να χαρτογραφήσουν τις περισσότερες περιοχές του φάσματος απορρόφησης UV-vis του ελαιόλαδου και να αποδώσουν συγκεκριμένες κορυφές σε κατηγορίες ενώσεων ακόμα και σε μεμονωμένες ενώσεις. Η χαρτογράφηση αυτή επετεύχθη χάρη στα χαρακτηριστικά σήματα που δίνουν οι χρωμοφόρες ομάδες των ενώσεων που περιέχονται στο ελαιόλαδο.

Χαρακτηριστικά είναι τα σήματα που δίνουν τα διένια, αλειφατικοί δηλαδή υδρογονάνθρακες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο διπλών δεσμών στο μόριό τους, και που εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή 220 nm 230 nm. Τα διένια απαντώνται στο ελαιόλαδο, στα λιπίδια τα οποία βρίσκονται στο πρώτο στάδιο της οξειδωσης (Vieira and Regitano-D'arce 1998).

Η οξείδωση του ελαιόλαδου γίνεται ακόμα και στο σκοτάδι λόγω της αλληλεπίδρασης του οξυγόνου της ατμόσφαιρας με το ελαιόλαδο και της σταδιακής διάλυσής του σε αυτό. Η οξείδωση αυτή οδηγεί στην καταστροφή τόσο των λιπαρών οξέων, όσο και άλλων συστατικών που

βρίσκονται σε μικρότερη περιεκτικότητα στο ελαιόλαδο όπως οι λιποδιαλυτές βιταμίνες E (τοκοφερόλες) A (β- καροτένιο). Οι χλωροφύλλες και οι φαιοφυτίνες δρουν προστατευτικά λειτουργώντας ως αντιοξειδωτικά όταν το ελαιόλαδο βρίσκεται σε σκιερό μέρος (Endo et al 1985). Αντίθετα όταν το ελαιόλαδο εκτεθεί σε φυσική ή τεχνητή πηγή φωτός, οι ενώσεις αυτές ενεργοποιούν την φωτο-οξείδωση (Rahmani and Csallany 1998). Αποτέλεσμα των οξειδωτικών αντιδράσεων που αναφέραμε και σε προηγούμενη παράγραφο, είναι η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με την δημιουργία των υδροϋπεροξειδίων (πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης). Τα προϊόντα αυτά εμφανίζουν απορρόφηση στα 232 nm και επίσης μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά και με την τιτλοδότηση που αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο. Στην εξέλιξη της διαδικασίας της οξείδωσης, τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης, λόγω και της χαμηλής σταθερότητας που εμφανίζουν σαν μόρια, αποσυντίθενται μαζί με την αλυσίδα των λιπαρών οξέων, δημιουργώντας μόρια που φέρουν ως δραστικές ομάδες αλδεΐδες, κετόνες και χαμηλού μοριακού βάρους οξέα (Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης). Τα προϊόντα αυτά εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση στο UV στα 270 nm. Η αυξημένη παρουσία οξυγόνου και η αυξημένη περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε χλωροφύλλες, αυξάνουν σημαντικά τους ρυθμούς των μηχανισμών οξείδωσης και φωτο-οξείδωσης παρουσία φωτός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης να μετατρέπονται γρήγορα στα δευτερογενή, και η συνολική οξείδωση καθώς και τα δυσάρεστα γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά να εμφανίζονται ταχύτερα.

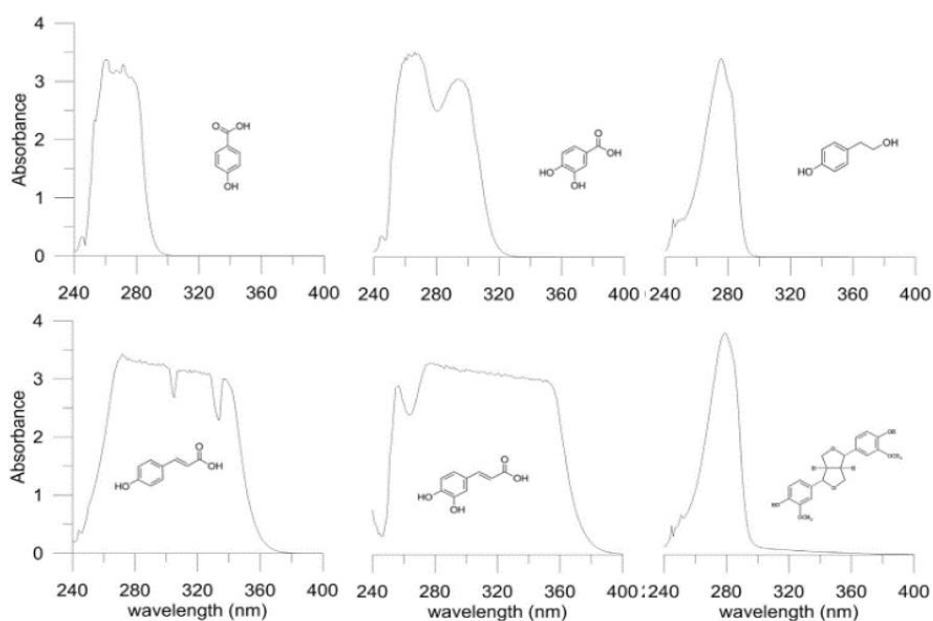
Η μέτρηση της τιμής των υπεροξειδίων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ουσιαστικά την μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων (πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης) και επομένως σχετίζεται με το K232. Ο πραγματικός βαθμός οξείδωσης του ελαιολάδου υπολογίζεται αν συμπληρωματικά υπολογίσουμε την περιεκτικότητα των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης δηλαδή την απορρόφηση στα 270nm (K270) (Guimet et al. 2005).

Προχωρώντας στην ανάλυση του φάσματος απορρόφησης του ελαιολάδου στην περιοχή UV-vis, μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για τις τοκοφερόλες. Η βιταμίνη E, που είναι ένας γενικότερος όρος με τον οποίο περιγράφεται η ομάδα των α-, β-, γ- δ- τοκοφερολών καθώς και των τοκοτριενιολών, έχει συσχετιστεί αφενός με την προστασία από νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, αφετέρου με την ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση (κυρίως η α-τοκοφερόλη) που προστατεύει από την οξείδωση των λιπιδίων του ελαιολάδου (Grilo et al. 2014; Gonçaves et al 2014). Η βασική ένωση της κατηγορίας αυτής στο ελαιόλαδο είναι η α-τοκοφερόλη και έχει άμεση συσχέτιση με την κορυφή στα 325 nm του φάσματος απορρόφησης.

Στην περιοχή 450-520 nm, βρίσκονται κορυφές που αποδίδονται στα καροτενοειδή που περιέχονται στο ελαιόλαδο (Sikorska et al. 2008). Τα καροτενοειδή αποτελούν χρωστικές ουσίες του ελαιολάδου και η παρουσία τους ενισχύει το κίτρινο χρώμα του. Τα κυρίαρχα καροτενοειδή

που απαντώνται στο ελαιόλαδο είναι το β- καροτένιο και η λουτεΐνη τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά τόσο για το ελαιόλαδο στον μηχανισμό της φωτο-οξειδωσης δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Křinsky 1989), όσο και για τον ανθρώπινο οργανισμό (Moγano et al 2010).

Στην κατηγορία των χρωστικών περιλαμβάνεται και η χλωροφύλλη. Στο ελαιόλαδο υπάρχουν σημαντικές ποσότητες της χλωροφύλλης Α και Β καθώς και της φαιοφυτίνης Α και Β με κυριότερη την φαιοφυτίνη Α. Η παρουσία τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται ισχυρά από γενετικούς παράγοντες, από τον βαθμό ωρίμανσης της ελιάς και τις συνθήκες ελαιοποίησης (Psomiadου and Tsimιδου 2001). Σε προηγούμενη παράγραφο αναφέραμε τον ρόλο της χλωροφύλλης στον μηχανισμό της φωτο-οξειδωσης. Παρόμοια αντιοξειδωτικά οφέλη έχουν αναφερθεί ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης φυσικών προϊόντων που περιέχει χλωροφύλλη (Moγano et al 2010). Η η χλωροφύλλη εμφανίζει δύο σήματα στο φάσμα απορρόφησης. Το ένα εντοπίζεται στην περιοχή 450-520 nm, το οποίο όμως αλληλεπικαλύπτεται με τα σήματα των καροτενοειδών, και το δεύτερο που αποτελεί και χαρακτηριστικό σήμα της χλωροφύλλης, εμφανίζεται στα 670 nm (Psomiadου and Tsimιδου 2001; Alves et al. 2019). Τελευταία κατηγορία ενώσεων που συναντάμε στο φάσμα απορρόφησης, είναι αυτή των πολυφαινόλων. Οι πολυφαινόλες πέραν των υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων που έχουμε αναφέρει και στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής, λειτουργούν και ως φυσικά αντιοξειδωτικά, κατά της οξειδωσης του ελαιολάδου. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου τα οποία είναι παράγωγα τυροσόλης και υδρόξυ τυροσόλης εμφανίζονται στα 285 nm (Sikorska et al. 2008; Fuentes et al. 2012). Στην περιοχή αυτή εντοπίζεται η απορρόφηση των διπλών δεσμών του φαινολικού δακτυλίου.



**Εικόνα 3.2:** Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών φαινολικών δακτυλίων .



Οι δύο κύριοι φαινολικοί δακτύλιοι που εμφανίζονται στο φαινολικό κλάσμα όπως είναι αναμενόμενο εμφανίζουν σήματα στην ίδια περιοχή, αλλά διαφορετικής μορφής (Paradiso et al. 2016).

Αξίζει να αναφέρουμε, ότι το φαινολικό κλάσμα αποτελείται από μια σειρά συστατικών τα οποία εμφανίζουν ομοιότητες και διαφορές μεταξύ τους. Τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον φαινολικό δακτύλιο που φέρουν (π-υδρόξυ βενζολίου ή 3,4-διυδρόξυ βενζολίου), καθώς και την δομή του εστεροποιημένου μη φαινολικού τμήματος, συνήθως κάποιο παράγωγο ελενολικού οξέος, το οποίο φέρει και άλλες χαρακτηριστικές χρωμοφόρες ομάδες, όπως οι αλδεΐδες και υδροξυλομάδες, με δυνατότητα απορρόφησης στο UV και σε άλλα μήκη κύματος. Το κομμάτι αυτό των φαινολικών συστατικών απορροφά στα 240 nm (Fuentes et al. 2012).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στα φάσματα αυτά δεν είναι εφικτός καθώς, όπως γίνεται σαφές και από τις προηγούμενες αναφορές, στην ίδια περιοχή απορροφούν μια σειρά από άλλες δραστικές ομάδες με αποτέλεσμα την δημιουργία αλληλοεπικαλύψεων (paradopoulos and Boskou 1991).

Η διαφορετική σύσταση του κάθε φαινολικού κλάσματος επομένως, θα οδηγήσει και σε διαφορετικό προφίλ απορρόφησης στην περιοχή 200nm - 450 nm.

*Η χρήση της φασματοσκοπίας UV για την διαπίστωση νοθείας και εξευγενισμού του ελαιολάδου.*

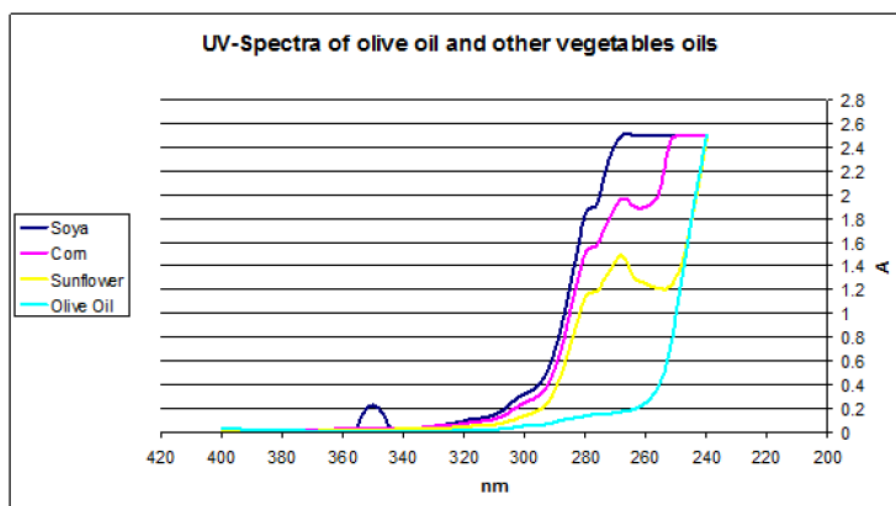
Η φασματοσκοπία UV έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την διαπίστωση νοθείας στο ελαιόλαδο. Η αυξημένη θρεπτική αξία του ελαιολάδου και τα ιδιαίτερα γευσιγνωστικά του χαρακτηριστικά, το κατατάσσουν στα ακριβότερα βρώσιμα έλαια. Συνέπεια αυτού, είναι να εμφανίζονται συχνά φαινόμενα νοθείας (Jabeuret al 2017). Η ανάμιξη του ελαιολάδου με άλλα βρώσιμα έλαια, χαμηλότερης οικονομικής και θρεπτικής αξίας, πέραν του εμπορικού και οικονομικού προβλήματος που δημιουργείται, έχει δημιουργήσει προβλήματα υγείας σε ανθρώπους που καταναλώνουν τα συγκεκριμένα προϊόντα ανάμιξης (Gelrí et al. 2002).

**Πίνακας 3.1:** Αναλογία λιπαρών σε διάφορα βρώσιμα έλαια.

		<b>Ελαιόλαδο</b>	<b>Αραβοσιτέλαιο</b>	<b>Σογιέλαιο</b>	<b>Ηλιέλαιο</b>
<b>Στεατικό οξύ</b>	C18:0	0.5 - 5	2 – 5	3 - 4.1	1 - 7
<b>Ελαϊκό Οξύ</b>	C18:1	55 - 83	19-49	2.4 - 23.3	14 - 40
<b>Λινολεϊκό οξύ</b>	C18:2	3.5 - 21	34-62	2.6 - 52.2	48 - 74
<b>Λινελενικό οξύ</b>	C18:3	0 - 1.5	0-1	3.5 - 5.6	0.09 - 0.12

Η ανίχνευση προσμίξεων ξένων ελαίων στηρίζεται είτε στην διαφορετική αναλογία ακόρεστων λιπαρών οξέων είτε στην ύπαρξη ή μη άλλων συστατικών που βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση στο ελαιόλαδο τα οποία όμως αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες του ελαιολάδου όπως η χλωροφύλλη. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει το ελαιόλαδο αποτελείται κυρίως από τριάκυλο-γλυκερόλες σχηματίζοντας αλυσίδες υδρογονάνθρακα με 12 – 24 άτομα άνθρακα. Η διαφορά μεταξύ των τριάκυλο γλυκερολών οφείλονται στα διαφορετικά μήκη των αλυσίδων των λιπαρών οξέων που περιέχουν καθώς και με το πλήθος των διπλών δεσμών που φέρουν. Ανάλογα με το πλήθος των διπλών δεσμών της αλυσίδας, τα λιπαρά οξέα, διακρίνονται σε κορεσμένα λιπαρά οξέα όπως το στεατικό (C 18:0), μονοακόρεστα όπως το ελαϊκό οξύ (18:1) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό οξύ (18:2). Το ελαιόλαδο περιέχει πολύ μικρό ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς το κυρίαρχο συστατικό του είναι το ελαϊκό οξύ, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα βρώσιμα έλαια τα οποία εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ.

Η αυξημένη απορρόφηση των διπλών δεσμών στα 270nm μπορεί να οφείλεται τόσο στα προϊόντα οξείδωσης όπως αναφέραμε και σε άλλη παράγραφο, αλλά μπορεί να οφείλεται και στην παρουσία διαφορετικών τύπου ελαίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα διαφορετικά φάσματα των διαφόρων ελαίων οφείλονται στην διαφορετική αναλογία των λιπαρών οξέων που βρίσκονται στο κάθε έλαιο (Tsimidou et al 1987). Τέλος στην ίδια περιοχή θα βρούμε και συζευγμένα τριεννοικά προϊόντα που δημιουργούνται κατά το ραφινάρισμα του ελαιολάδου. (Amereih et al 2014; Passaloglou-Emmanouilidou 1990).



**Εικόνα 3.3:** Φάσματα απορρόφησης διαφορετικού τύπου ελαίου.

Επίσης, μόνο το πυρηνέλαιο έδειξε να εμφανίζει την κορυφή του ελαιολάδου στα 660nm η οποία όπως προαναφέρθηκε σχετίζεται με την χλωροφύλλη. Συγκεκριμένα μοντέλα πρόβλεψης του είδους νοθείας έχουν προταθεί βασιζόμενα στην απορρόφηση στην περιοχή 270 – 280 nm (Amereih et al 2014).

Η διαπίστωση της νοθείας αλλά και ο τύπος της νοθείας μπορεί να προσδιοριστεί σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Η πρόσμιξη του ελαιολάδου με ραφινάρισμένο ελαιόλαδο προσδίδει αυξημένη απορρόφηση στα 268 nm (Ok 2017). Ορισμένα σπορέλαια περιέχουν ομάδες φλαβονοειδών όπως η απιγενίνη που εμφανίζουν απορρόφηση στα 320 nm. Τα έλαια ελαιοκράμβης και σόγιας, εμφανίζουν χαρακτηριστική απορρόφηση στα 298 nm, απορρόφηση που έχει αποδοθεί στην ύπαρξη σιναπικού οξέος.

### 3. 2 Σκοπός

Η ποιότητα του ελαιολάδου εξαρτάται από τις ορθές πρακτικές που εφαρμόζονται κατά την ελαιοκαλλιέργεια την συγκομιδή και την ελαιοποίηση του καρπού. Είναι επίσης άμεσα συνυφασμένη τόσο με την εμπορική όσο και με την διατροφική αξία του. Για την διασφάλιση της ποιότητας του ελαιολάδου, έχουν θεσπιστεί κριτήρια ποιότητας που σχετίζονται με την οξειδωτική και υδρολυτική κατάσταση των λιπαρών οξέων.

Με αφετηρία τους ισχυρισμούς υγείας και των συστατικών που σχετίζονται με αυτούς, δημιουργείται μια νέα κατηγορία ελαιολάδων, τα υψηλού φαινολικού περιεχομένου ελαιόλαδα, στην οποία κατηγορία πέραν των κριτηρίων ποιότητας της οξύτητας, υπεροξειδίων και δεικτών K, σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Μέσα από την ανάλυση της ποιότητας δειγμάτων ελαιολάδου παρατηρήθηκε ότι τα υψηλού φαινολικού περιεχομένου ελαιόλαδα παρουσιάζουν και υψηλές τιμές στους φασματοσκοπικούς δείκτες K232 και K270.

Στο κεφάλαιο αυτό, σκοπός ήταν να μελετηθεί για πρώτη φορά η επίδραση που έχουν οι χρωμοφόρες ομάδες τριών φαινολικών συστατικών στις τιμές των δεικτών K232 και K270 και να διερευνηθεί η πιθανότητα λήψης εσφαλμένων εκτιμήσεων για την υδρολυτική και οξειδωτική κατάσταση του ελαιολάδου κατά την φασματοσκοπική ανάλυσή τους. Επιπλέον, αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού των πραγματικών δεικτών K, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η επίδραση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών.

### 3.3 Υλικά και Μέθοδοι.

#### 3.3.1 Υλικά.

##### *Δείγματα ελαιολάδου.*

Όλα τα δείγματα ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από Έλληνες παραγωγούς, από την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019 και προμηθεύτηκαν από την συλλογή του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

##### *Εκχυλίσματα φαινολικών συστατικών και διαλύτες.*

Οι ποσότητες εκχυλισμάτων ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, ύστερα από χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η μέτρηση καθαρότητας έγινε με την χρήση εσωτερικού προτύπου συριγγαλδεΐδης και λήψη φάσματος H-NMR. Η ποσότητα τυροσόλης που χρησιμοποιήθηκε προμηθεύτηκε από την Sigma Aldrich.

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν έφεραν έγκριση UV-grade από τον παρασκευαστή τους και προμηθεύτηκαν από την Sigma Aldrich.

### 3.3.3 Μέθοδοι.

#### *Εκχύλιση φαινολικού κλάσματος από δείγμα ελαιολάδου.*

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που παρουσιάστηκε σε προηγούμενη παράγραφο (παρ. 2.3.2).

#### *Απομάκρυνση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.*

Για την απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών, και την παραλαβή ελαιολάδου ελεύθερου από φαινόλες πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με διαλύτες μεθανόλη/νερό στα πρότυπα του πρωτοκόλλου του διεθνούς συμβουλίου ελαιολάδου που αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου με κάποιες μετατροπές (IOOC 2009). Συγκεκριμένα:

- Σε falcon χωρητικότητας 50 mL ζυγίστηκαν 10 g ελαιολάδου. Στο δείγμα προστέθηκαν 25 mL διαλύματος μεθανόλη/νερό σε αναλογία 80:20 (v/v). Το δείγμα αναδεύτηκε για 1 min σε συσκευή ανάδευσης vortex. Στην συνέχεια το δείγμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπερήχων για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε συσκευή φυγοκέντρησης, όπου και φυγοκεντρήθηκε για 25 min στις 4000rpm.
- Μετά την φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε προσεκτικά το εκχύλισμα μεθανόλης νερού και παρελήφθη το ελαιόλαδο. Το δείγμα ελαιολάδου υποβλήθηκε ξανά σε διαδικασία φυγοκέντρησης για 25 min, ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα από διηθητικό χαρτί, για την πλήρη διάυγασή του.
- 5 g ελαιολάδου υποβλήθηκαν εκ νέου σε διαδικασία εκχύλισης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της E. Karkoula (2012), για να διαπιστωθεί ότι το ελαιόλαδο δεν περιείχε φαινολικά συστατικά.

### Μέτρηση δεικτών Κ.

Η μέτρηση των δεικτών Κ έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει θεσπιστεί από την ΕΕ (EU reg. 2015/1833). Σύμφωνα με αυτό η μέτρηση των δεικτών Κ έγινε με την βοήθεια πιστοποιημένου φασματοφωτόμετρου UV-Vis διπλής δέσμης και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια για όλα τα δείγματα.

- Προετοιμασία δείγματος: Ζυγίστηκαν 0,150 g ελαιολάδου σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με κυκλοεξάνιο. Το διάλυμα ανακινήθηκε για 1 min και ακολούθησε η πλήρωση της κυψελίδας χαλαζία πλάτους 10mm, αφού πρώτα η κυψελίδα έχει εκπλυθεί με κυκλοεξάνιο.
- Ρύθμιση παραμέτρων: Έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline) με καθαρό διαλύτη και στις δύο κυψελίδες
- Λήψη τιμών απορρόφησης: Ελήφθησαν για κάθε δείγμα οι τιμές απορρόφησης στα 232 nm, 266 nm, 268 nm, 270 nm, και 274 nm

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως εξής:

$$K_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{4 \cdot m}$$

Όπου:

- $K_{\lambda}$  συντελεστής απόσβεσης για κάθε επιλεγμένο μήκος κύματος (Δείκτης Κ)
- $A_{\lambda}$ : η απορρόφηση σε κάθε επιλεγμένο μήκος κύματος
- $m$ : Η ακριβής ποσότητα ελαιολάδου που ζυγίστηκε για την παρασκευή διαλύματος 1% με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων.

Για την ολοκληρωμένη ανάλυση των αποτελεσμάτων σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε συμπληρωματικά λήψη όλου του φάσματος στην περιοχή 200 – 800 nm.

Όλες οι μετρήσεις δεικτών Κ πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Μέθοδος μέτρησης οξύτητας ελαιολάδου.

Αντιδραστήρια:

- Αιθανόλη 95% ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ).
- Διαιθυλαιθέρας ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).
- Δείκτης φαινολοφθαλεΐνη 10 g/L διαλυμένο σε EtOH 95%.
- Πρότυπο διάλυμα KOH 0,1 N σε EtOH.

Διαδικασία:

Ζυγίστηκαν 20 g ελαιολάδου σε κωνική φιάλη, και προστέθηκαν 25 mL EtOH και 25 mL διαιθυλαιθέρα, αναδεύουμε, ρίχνουμε 4-5 σταγόνες από το δείκτη και ογκομετρούμε με το πρότυπο διάλυμα μέχρι να εμφανιστεί ροζ χρώμα στην επάνω φάση.

Υπολογισμός:

$$\text{Οξύτητα} = (V_{\text{KOH}} * C_{\text{KOH}} * 282) / (10 * m)$$

- ✓  $V$  = όγκος πρότυπου διαλύματος (mL)
- ✓  $C$  = συγκέντρωση (mol/L)
- ✓  $m$  = μάζα δείγματος (g)



### 3.3 Πειραματικό μέρος.

#### 3.3.1 Εισαγωγή.

Στο κεφάλαιο αυτό ασχοληθήκαμε με την μέτρηση των δεικτών K που προκύπτουν από την φασματοσκοπική ανάλυση του ελαιολάδου και την επίδραση που έχει η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σε αυτούς. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή του κεφαλαίου, η φασματοσκοπική ανάλυση στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού, δίνει πολλές χρήσιμες πληροφορίες για την ποιότητα του ελαιολάδου. Τα δύο βασικά κριτήρια που επαληθεύονται από αυτήν την μέθοδο είναι η διαπίστωση της νοθείας του ελαιολάδου με άλλα βρώσιμα έλαια, καθώς και ο βαθμός οξείδωσης του ελαιολάδου. Και στις δύο περιπτώσεις προκύπτει η θρεπτική υποβάθμιση του ελαιολάδου και για τον λόγο αυτό έχουν θεσπιστεί επίσημα κριτήρια από την Ευρωπαϊκή Ένωση με σκοπό τον διαχωρισμό τέτοιων προϊόντων από τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα.

Αφορμή για την μελέτη αυτή, στάθηκαν συγκεκριμένες μετρήσεις δειγμάτων ελαιολάδου που έγιναν την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019 στο εργαστήριο μας, και οι οποίες σχετίζονται με μη αναμενόμενα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Η ελαιοκομική περίοδος 2018 - 2019 χαρακτηρίστηκε από την αυξημένη προσβολή των ελαιόδεντρων από τον παθογόνο μύκητα *Colletotrichum gloeosporioides* που προκαλεί το γλοιοσπόριο καθώς και το έντομο *Bactrocera oleae* που προκαλεί την ασθένεια του Δάκου. Πολλά από τα δείγματα καρπού και ελαιολάδου που παρελήφθησαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, προέκυψαν από προσβεβλημένες καλλιέργειες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα φυσικοχημικά, αλλά και τα γευσιγνωστικά τους χαρακτηριστικά να είναι εμφανώς υποβαθμισμένα. Χαρακτηριστική ήταν η αυξημένη οξύτητα που εμφάνισαν τα δείγματα αυτά, αποτέλεσμα που ήταν αναμενόμενο βάσει των όσων αναφέρθηκαν και στην εισαγωγή του κεφαλαίου αυτού. Η κακή ποιότητα του καρπού οδήγησε τους παραγωγούς, είτε να μην ελαιοποιήσουν σημαντικές ποσότητες της παραγωγής τους, είτε να παραλάβουν ένα σαφώς υποβαθμισμένο προϊόν.

Τα δείγματα αυτά που καθ' ομολογία και των ίδιων των παραγωγών προέρχονταν από κακής ποιότητας καρπό, πέραν της αυξημένης οξύτητας, εμφάνιζαν και αυξημένους δείκτες K. Η προσβολή του καρπού από τις δύο αυτές ασθένειες φαίνεται ότι αύξησε στο μέγιστο τους μηχανισμούς υδρόλυσης και οξείδωσης του ελαιολάδου. Σε πολλές περιπτώσεις οι τιμές και για τα δύο αυτά επίσημα κριτήρια ήταν πάνω από τα όρια με τα οποία το προϊόν τους χαρακτηρίζεται ως έξτρα παρθένο. Πέραν όμως των κριτηρίων αυτών χαρακτηριστικό γνώρισμα των δειγμάτων

αυτών ήταν η ολική απουσία φαινολικών συστατικών καθώς και τα δυσάρεστα γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά.

Παράλληλα, αρκετοί ελαιοπαραγωγοί που επέλεξαν να ελαιοποιήσουν την παραγωγή τους σε αρχικά στάδια της ωρίμανσης του καρπού, κατάφεραν να ελαιοποιήσουν τον καρπό πριν αυτός προσβληθεί από παθογόνους μύκητες και έντομα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό και αρκετών ελαιολάδων με άριστα φυσικοχημικά και γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά, ακόμα και σε περιοχές που στην συνέχεια αντιμετώπισαν έντονο πρόβλημα δακοπροσβολής.

Ανάμεσα σε αυτά, προέκυψαν ελαιοάδα τα οποία εμφάνιζαν αρκετά καλές τιμές οξύτητας και δεικτών K, με μεγάλο εύρος στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών καθώς και δείγματα τα οποία ενώ εμφάνισαν πολύ καλή τιμή οξύτητας και υψηλό φαινολικό φορτίο, εμφάνισαν υψηλούς δείκτες K.

Όπως παρουσιάστηκε και στην εισαγωγή του κεφαλαίου, οι τιμές της οξύτητας και των δεικτών K, αφορούν την οξείδωση του ελαιολάδου (πρωτογενούς και δευτερογενούς), και υδρόλυσης των λιπιδίων του ελαιολάδου. Πρόκειται για δύο χημικά διαφορετικούς μηχανισμούς που επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, οι οποίους και αναφέρθηκαν παραπάνω. Διαπιστώθηκε, ότι πολλοί παράγοντες, όπως προσβολή του καρπού από κάποιο έντομο ή μύκητα, είναι κοινοί για τους δύο αυτούς μηχανισμούς.

Όσο αφορά την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, όπως παρουσιάζεται και σε επόμενο κεφάλαιο, έχουν ένα αρκετά μεγάλο εύρος που κυμαίνεται από 0 έως και 0,2% (w/w). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιοάδο, όπως αυτό προκύπτει από την παρούσα διατριβή αλλά συμπληρωματικά και με την υπόλοιπη βιβλιογραφία, οφείλεται σε πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με την ποικιλία της ελιάς, τις πεδοκλιματικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται το ελαιόδεντρο, την διαδικασία παραγωγής στο ελαιοτριβείο, την ποιότητα του καρπού καθώς και την αποθήκευση.

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τα φυσικά αντιοξειδωτικά του ελαιόδεντρου. Όπως εξηγήθηκε και εισαγωγικά προστατεύουν τόσο τα λιπίδια στον καρπό της ελιάς όσο και τα λιπίδια του ελαιολάδου μετά την παραγωγή του από την οξείδωση, παίρνοντας την θέση των λιπιδίων στον μηχανισμό της οξείδωσης. Η ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στο ελαιοάδο, μέχρι σήμερα δεν αποτελεί ένα αυτοτελές κριτήριο της ποιότητας του ελαιολάδου. Οι προσπάθειες που γίνονται σε αυτόν τομέα κινούνται στο πεδίο των υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων που προσφέρει η κατανάλωση του συμπληρωματικά με τις αντίστοιχες των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο ελαιοάδο υπό την μορφή ισχυρισμών υγείας.

Η ελεύθερη οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων και οι δείκτες K αποτελούν δείκτες της οξειδωτικής και υδρολυτικής κατάστασης του ελαιολάδου. Το κάθε κριτήριο αναφέρεται σε διαφορετικό μηχανισμό ή διαφορετικό στάδιο του ίδιου μηχανισμού υποβάθμισης του προϊόντος (πρωτογενής/δευτερογενής οξείδωση, υδρόλυση). Ως εκ τούτου, και όπως αναλύθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, επηρεάζεται και από διαφορετικούς παράγοντες. Η συγκέντρωση επίσης των φαινολικών συστατικών, όπως παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο είναι ένα πολύ-παραγοντικό πεδίο που δεν αναφέρεται αποκλειστικά σε μη ορθές πρακτικές καλλιέργειας και ελαιοποίησης.

Τα παραπάνω δεν επιτρέπουν να επιχειρηθεί μια γραμμική συσχέτιση όλων των παραγόντων ποιότητας καθώς η χαμηλή ελεύθερη οξύτητα δεν συνεπάγεται απαραίτητα και χαμηλό αριθμό υπεροξειδίων ή υψηλό φαινολικό φορτίο κοκ. Η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών συστατικών ωστόσο, αποτελεί ισχυρό δείκτη αντιοξειδωτικής προστασίας του ελαιολάδου και επομένως ο συνδυασμός υψηλού φαινολικού περιεχομένου ελαιολάδων και αυξημένων δεικτών K, όπως φαίνεται παρακάτω, ήταν ένα μη αναμενόμενο αποτέλεσμα, το οποίο μας οδήγησε σε εις βάθος διερεύνηση του θέματος.

### 3.3.2 Εισαγωγικά πειράματα.

Στην παράγραφο αυτή παρουσιάζονται ενδεικτικά, κάποια αποτελέσματα αναλύσεων που έγιναν στο εργαστήριο, σε σχέση με τα κριτήρια ποιότητας του ελαιολάδου καθώς και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Όλα τα δείγματα αφορούν την ελαιοκομική περίοδο 2018-2019. Τα δείγματα αυτά παραδόθηκαν στο εργαστήριο μας από τους ίδιους τους παραγωγούς με τους οποίους υπήρχε διαρκής επικοινωνία και συλλογή πληροφοριών που σχετίζονται με το δείγμα όπως η ακριβής ημερομηνία συλλογής, οι συνθήκες ελαιοποίησης ο βαθμός δακοπροσβολής κ.α.

**Πίνακας 3.2:** Στοιχεία οξύτητας και δεικτών K από δείγματα εργαστηρίου.

Δείγμα	Ολικές Φαινόλες (mg/kg)	Οξύτητα	K232	K270	Ποικιλία	Περιοχή Προέλευσης
s1	0	3.3	2.591	0.243	Θρουμπολιά	Νάξος
s2	147	1.7	2.914	0.313	Λιανολιά	Κέρκυρα
s3	171	1.7	2.799	0.283	Μανάκι	Χαλκίδα
s4	186	0.68	1.386	0.159	Κορωνέικη	Λακωνία
s5	1285	0.64	2.579	0.233	Ζακυνθου	Ζάκυνθος
s6	1337	0.48	2.033	0.235	Καλαμών	Λακωνία
s7	1200	0.4	2.27	0.238	Λιανολιά	Κέρκυρας
s8	396	0.35	1.587	0.126	Αθηνολιά	Λακωνία
s9	1086	0.32	1.856	0.207	Καλαμών	Κύπρος
s10	0	0.26	1.535	0.157	Μανάκι	Νότιας Εύβοια
s11	1028	0.21	2.039	0.175	Καλαμών	Κύπρος
s12	173	0.18	1.478	0.109	Κουτσουρελιά	Λακωνία
s13	200	0.1692	2.382	0.19	Μανάκι	Χαλκίδα
s14	485	0.1692	2.278	0.164	Κορωνέικη	Μεσσηνία
s15	0	0.14	1.691	0.218	Μανάκι	Νότια Εύβοια

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα, αν και αφορούν σε ένα μικρό μόνο δείγμα των αναλύσεων που έχουν γίνει στο εργαστήριο, παρατηρήθηκε ότι εμφανίστηκαν πολλές διαφορετικές κατηγορίες ελαιόλαδων.

Εστιάζοντας στα επιμέρους αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα s1-s3 ήταν δείγματα τα οποία εμφάνισαν οξύτητα που τα κατατάσσει σε χαμηλότερης κατηγορίας ελαιόλαδο, καθώς αυτή ξεπερνάει το όριο του 0,8. Για τα ίδια δείγματα οι δείκτες K ξεπέρασαν τα όρια του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ήταν αρκετά χαμηλή, χωρίς να φτάσει στα επίπεδα του ισχυρισμού υγείας (250 mg/kg).

Ανατρέχοντας στα επιπλέον στοιχεία που συλλέχθηκαν για το κάθε δείγμα παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα s1, s2 και s3 αποτελούσαν δείγματα που προήλθαν από καρπό προσβεβλημένο από τον μύκητα του γλοιοσπορίου και δάκο. Η επιπλέον αυτή πληροφορία εξηγεί σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, καθώς διαπιστώθηκε ότι τόσο οι υδρολυτικές όσο και οι οξειδωτικές αντιδράσεις στον καρπό, είχαν προχωρήσει αρκετά με αποτέλεσμα τις αυξημένες τιμές στα κριτήρια που μελετήθηκαν. Παράλληλα, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, ήταν αρκετά χαμηλή. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι το ελαιόλαδο αυτό είτε εξαρχής, είτε κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού, είτε κατά την ελαιοποίηση του καρπού, είχε μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία, γεγονός που το κατέστησε πιο ευάλωτο στις αντιδράσεις οξείδωσης και υδρόλυσης.

Από τα υπόλοιπα δείγματα παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μια ομάδα δειγμάτων, τα s4, s8, s10, 12 και s15 τα οποία εμφάνισαν οξύτητα εντός των ορίων του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Ταυτόχρονα τα δείγματα αυτά εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλές τιμές K232 και K270 κατατάσσοντάς το ελαιόλαδο αυτό στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα, καθώς μόνο ένα δείγμα εμφάνισε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 250 mg/kg (s8). Τα δείγματα αυτά, παρά την χαμηλή αντιοξειδωτική προστασία που διέθεταν, φαίνεται ότι μέχρι την στιγμή της ανάλυσής τους θωρακίστηκαν αρκετά ενάντια στις οξειδωτικές και υδρολυτικές αντιδράσεις. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην καλή ποιότητα καρπού που χρησιμοποιήθηκε.

Τα δείγματα s13 και s14 ήταν δύο δείγματα τα οποία εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλή οξύτητα, ωστόσο ο δείκτης K232 ήταν αυξημένος. Τα ελαιόλαδα αυτά εξακολουθούσαν να κατατάσσονται στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου αλλά φαίνεται ότι τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης είχαν ήδη αρχίσει να σχηματίζονται. Η αντιοξειδωτική προστασία που προέρχεται από τα φαινολικά συστατικά των δειγμάτων αυτών, ήταν σημαντική, και προστάτευσε την περαιτέρω οξείδωση των δειγμάτων αυτών.

Περνώντας στην τελευταία ομάδα δειγμάτων s5, s6, s7, s9 και s11 παρατηρήθηκε ότι όλα τα δείγματα είχαν χαμηλή οξύτητα, που τα κατατάσσει στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι όλα τα δείγματα εμφάνισαν αρκετά μεγάλες τιμές των δεικτών K232 και K270. Ειδικά τα δείγματα s5, s6 και s7 εμφάνισαν ιδιαίτερα ψηλές τιμές τόσο για τον δείκτη K232 όσο και για τον δείκτη K270. Σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί εισαγωγικά, οι αυξημένες τιμές απορρόφησης στα 232 nm και 270 nm οφείλονται στα αυξημένα προϊόντα πρωτογενούς και δευτερογενούς οξείδωσης είτε σε περιπτώσεις νόθευσης του προϊόντος με άλλα βρώσιμα έλαια. Απορρίπτοντας την τελευταία περίπτωση, καθώς τα δείγματα ήρθαν απευθείας από τους παραγωγούς στο εργαστήριο, τα δείγματα αυτά θα έπρεπε να θεωρηθούν

ως οξειδωτικά καταπονημένα ελαιόλαδα τα οποία βρίσκονταν στα όρια του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Ακόμα και τα δείγματα s9 και s11 αν και εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές των δεικτών αυτών, εμφάνισαν αυξημένες τιμές σε σχέση με αντίστοιχα δείγματα που μελετήθηκαν από την ίδια περιοχή.

Το παράδοξο σε όλα αυτά τα δείγματα ήταν ότι και τα 5 αυτά δείγματα, εμφάνισαν εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση των φαινολών υπερέβη τα 1000 mg/kg (0,1% w/w). Η αυξημένη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών προσδίδει στα δείγματα αυτά πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική προστασία. Το γεγονός αυτό δεν συνάδει με τις πληροφορίες που λήφθηκαν από την φασματοσκοπική ανάλυση του ελαιολάδου και τους δείκτες K. Θα αναμέναμε, ένα δείγμα ελαιολάδου με ιδιαίτερα ισχυρή αντιοξειδωτική προστασία να εμφανίζει την ελάχιστη οξειδωτική αλλοίωση τόσο στα πρωτογενή, όσο και στα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης.

Η συσχέτιση της συνολικής ποιότητας του ελαιολάδου, τόσο με τα επίσημα κριτήρια ποιότητας όσο και με την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών συνολικά, δεν είναι πάντα εφικτή καθώς το κάθε κριτήριο μπορεί να επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες. Για παράδειγμα ένα ελαιόλαδο μπορεί να έχει υποστεί σημαντικές οξειδωτικές αλλοιώσεις σε σημείο που να μην κατατάσσεται στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου χωρίς όμως να έχει υποστεί πολύ σημαντικές υδρολυτικές αλλοιώσεις. Επίσης, η συσχέτιση με την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών με τα άλλα κριτήρια καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη, καθώς όπως παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η ποικιλία της ελιάς αλλά και η διαδικασία της ελαιοποίησης μπορεί να επηρεάσουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι την οξύτητα ή τα προϊόντα οξείδωσης. Γεγονός όμως είναι, ότι θα αναμέναμε μια καλύτερη συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος με την οξειδωτική αλλοίωση που έχει ήδη υποστεί αυτό.

Η προηγούμενη παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών επηρεάζει αρνητικά τους δείκτες K, χωρίς να συσχετίζεται τελικά με την οξειδωτική κατάσταση του ελαιολάδου. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την βιβλιογραφική διερεύνηση των φασμάτων ελαιολάδου (1% σε οργανικό διαλύτη) που παρουσιάστηκε στην εισαγωγή του κεφαλαίου. Εκεί λοιπόν αναφέρθηκε ότι η μέτρηση των πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης απορροφούν στα 232 nm και 270 nm. Στις ίδιες περιοχές του φάσματος απορρόφησης βρίσκονται και οι απορροφήσεις των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου. Έτσι στα 280 nm εμφανίζονται οι απορροφήσεις του φαινολικού δακτυλίου ενώ στα 240 nm περίπου θα βρούμε τις απορροφήσεις του εστεροποιημένου με τους δακτυλίους τυροσόλης και υδροτυροσόλης τμήματος ελενολικού οξέος. Όπως αναφέρθηκε μάλιστα τα φαινολικά

συστατικά του ελαιολάδου δεν εμφανίζουν ακριβώς το ίδιο φάσμα λόγω διαφορών στην δομή τους.

Ανατρέχοντας επίσης στην βιβλιογραφία, παρατηρήθηκε απουσία ποσοτικών δεδομένων απορρόφησης για τα διάφορα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. Στις επόμενες παραγράφους παρουσιάζονται δεδομένα για την απορρόφηση των φαινολικών συστατικών σε διάφορες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο.

### 3.3.3 Επίδραση της συγκέντρωσης της τυροσόλης στους δείκτες K του ελαιολάδου.

#### i) Προσθήκη τυροσόλης σε ελαιόλαδο με χαμηλούς δείκτες K.

Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία, επιχειρήθηκε να εξακριβωθεί το κατά πόσο η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών επηρεάζει την μέτρηση των δεικτών K. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε ένα ελαιόλαδο ( $\Delta_0$ ) το οποίο είχε μηδενική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Ο έλεγχος του φαινολικού προφίλ του ελαιολάδου αυτού έγινε με την μέθοδο NMR που αναφέρεται σε προηγούμενη παράγραφο.

Σε 40 g ελαιολάδου ( $\Delta_0$ ) επιχειρήθηκε διάλυση 40 mg τυροσόλης. Εάν όλη η ποσότητα τυροσόλης διαλυόταν στα 40 g ελαιολάδου, το ελαιόλαδο που θα παραλαμβανετο θα είχε περιεκτικότητα 1000 g στο κιλό.

Μετά την προσθήκη της τυροσόλης στο ελαιόλαδο, το δείγμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 30 min, ενώ η ανάδευση συνεχίστηκε για 10 min σε ήπια θερμαινόμενο ελαιόλουτρο στους 40 °C. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η θερμική καταπόνηση του ελαιολάδου έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο πρόβλεψης των συνεπειών της οξειδωσης και της υδρόλυσης, καθώς αυξάνει την ταχύτητα των αντιδράσεων αυτών αλλά σε θερμοκρασίες και διάρκειες πολύ μεγαλύτερες από αυτές που εφαρμόστηκαν στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων.

Στην συνέχεια το δείγμα ελαιολάδου φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 4000 rpm. Αφού παραλήφθηκε το υπερκείμενο ελαιόλαδο, διηθήθηκε με την βοήθεια χάρτινου ηθμού. Το τελικό δείγμα ( $\Delta_5$ ) υποβλήθηκε σε ποσοτική ανάλυση φαινολικών συστατικών με την μέθοδο NMR, ώστε να διαπιστωθεί η ποσότητα τυροσόλης που ενσωματώθηκε στο δείγμα. Μετά την ανάλυση προέκυψε ότι το δείγμα ελαιολάδου είχε περιεκτικότητα 616 mg/kg ενώ η υπολειπόμενη ποσότητα τυροσόλης παραλήφθηκε μετά από την φυγοκέντρηση υπό την μορφή ιζήματος.

Όπως αναλύεται και σε επόμενο κεφάλαιο, είναι εξαιρετικά σπάνιο, αν όχι απίθανο, να εντοπιστεί ένα ελαιόλαδο με τόσο ψηλά επίπεδα τυροσόλης. Είναι σημαντικό να τονιστεί όμως, βασιζόμενοι στις βασικές αρχές της φασματοσκοπίας απορρόφησης, ότι η απορρόφηση που θεωρητικώς αναμένουμε στα 280 nm, οφείλεται στους δεσμούς του αρωματικού δακτυλίου της τυροσόλης. Αυτό σημαίνει ότι η απορρόφηση που παρατηρείται οφείλεται στη χρωμοφόρο ομάδα του φαινολικού δακτυλίου και όχι συνολικά στο μόριο. Έτσι για παράδειγμα, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι ισομοριακή ποσότητα τυροσόλης και οποιουδήποτε σεκοϊριδοειδούς που περιέχει τυροσόλη, θα δώσουν την ίδια απορρόφηση στα 280 nm. Επομένως η διαμόρφωση της κλίμακας των δειγμάτων σε αυτά τα επίπεδα καλύπτει πραγματικά δείγματα που απαντώνται στην φύση.



Συνεχίζοντας την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν πέντε δείγματα ελαιολάδου αυξανόμενης συγκέντρωσης, τα οποία προέκυψαν ύστερα από κατάλληλες αναμίξεις του αρχικού ελαιολάδου με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, και του ελαιολάδου που παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη τυροσόλης. Για να εξαληφθεί οποιαδήποτε αμφιβολία οξείδωσης του εμπλουτισμένου με τυροσόλη ελαιολάδου από την ήπια θερμική επεξεργασία, επαναλήφθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία και στο αρχικό ελαιόλαδο πριν γίνει η μέτρηση των δεικτών Κ.

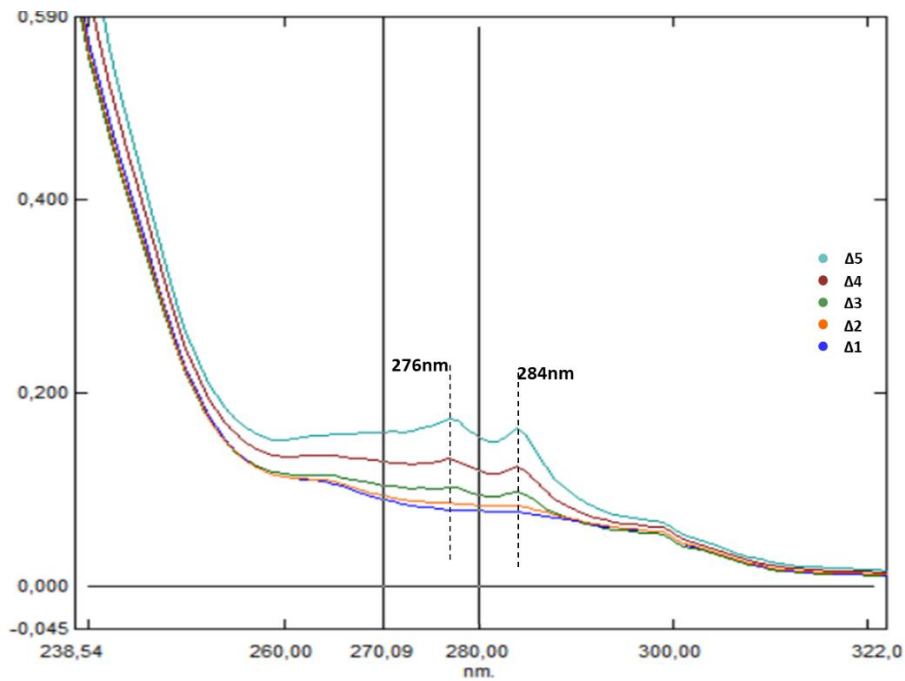
Ύστερα από κατάλληλες αναμίξεις που παρουσιάζονται και παρακάτω, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της τυροσόλης για κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3.3:

**Πίνακας 3.3:** Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης τυροσόλης σε ελαιόλαδο με χαμηλούς αρχικούς δείκτες Κ.

<b>Δείγματα</b>	<b>Πυκνό (<math>\Delta_0</math>) (g)</b>	<b>Αραιό <math>\Delta_5</math> (g)</b>	<b>Περιεκτικότητα τυροσόλης (mg/kg)</b>
<b><math>\Delta 1</math></b>	0	10	0
<b><math>\Delta 2</math></b>	0,769	9,230	64
<b><math>\Delta 3</math></b>	3,846	6,153	260
<b><math>\Delta 4</math></b>	6,153	3,846	353
<b><math>\Delta 5</math></b>	10	0	616

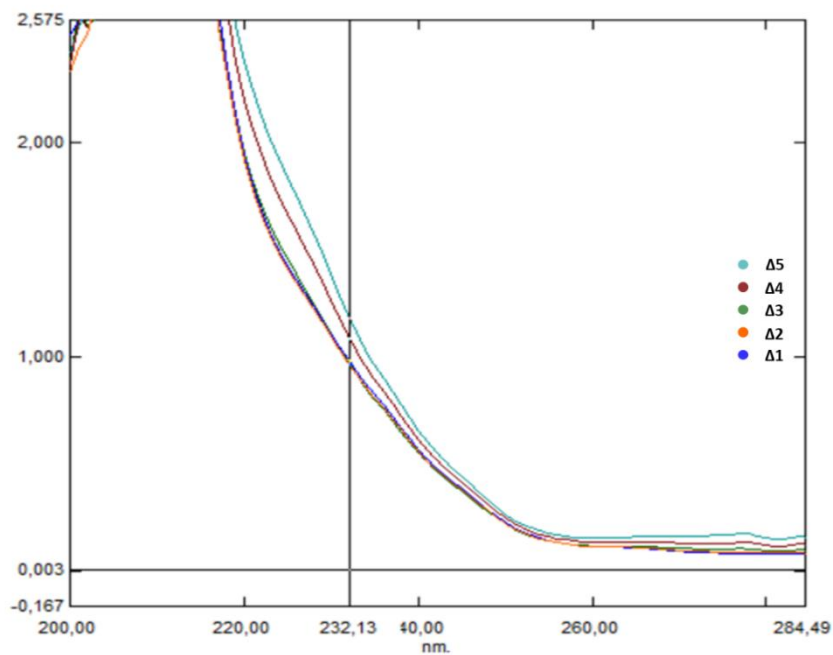
Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση όλων των δειγμάτων στα 232 nm, στα 270 nm και στα 280 nm. Για καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε λήψη όλου του φάσματος στην περιοχή UV-vis από τα 200 – 800 nm.

Στην εικόνα 3.4 παρουσιάζεται όλο το φάσμα της περιοχής UV-vis και για τα πέντε δείγματα που παρασκευάστηκαν.



**Εικόνα 3.4:** Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση τυροσόλης στα 280 nm.

Από το ολικό φάσμα παρατηρήθηκε ότι η απορρόφηση που οφείλεται στο δακτύλιο της τυροσόλης μεταβάλλει σημαντικά το φάσμα του ελαιολάδου. Παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης του ελαιολάδου στα 280 nm. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν δύο κορυφές στα 276 nm και στα 284 nm. Η αύξηση αυτή οδήγησε και σε αύξηση της απορρόφησης στα 270 nm που γίνεται και η μέτρηση για τον δείκτη K270.



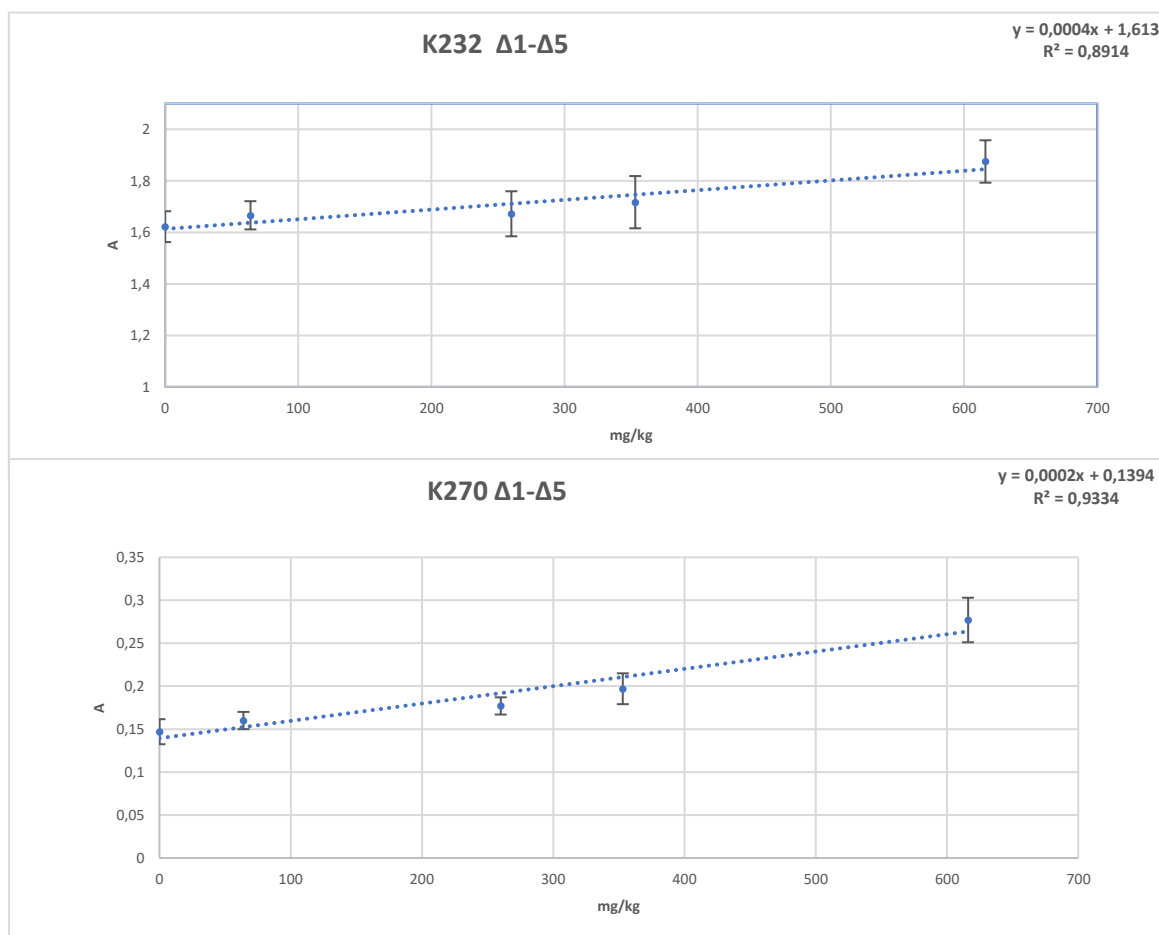
**Εικόνα 3.5:** Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση τυροσόλης στα 232 nm.

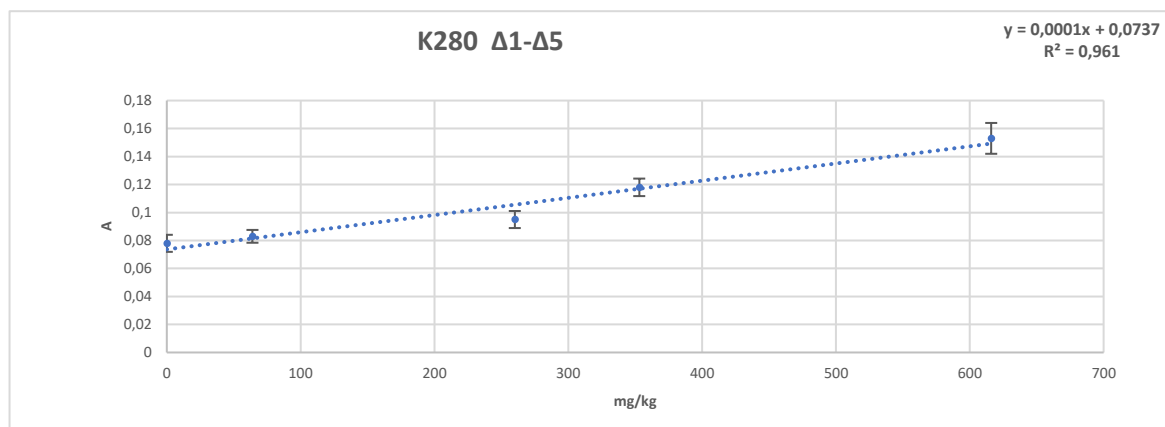
Αλλά και στην περιοχή που μετράται το K232 παρατηρήθηκαν μικρότερης κλίμακας αλλά σημαντικές αλλαγές. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μια αύξηση της απορρόφησης περίπου στα 220 nm. Η απορρόφηση αυτή επηρέασε και την μέτρηση στα 232 nm.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολών αυτών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών K232, K270 αλλά και K280. Παράλληλα καταγράφεται και η ποσοστιαία αύξηση του κάθε δείκτη με σκοπό να ποσοτικοποιηθεί το σφάλμα στην μέτρηση που γίνεται στον δείκτη K, ως κριτήριο ποιότητας του ελαιόλαδου και ως εκφραστή της συγκέντρωσης των προϊόντων οξείδωσης στο ελαιόλαδο.

**Πίνακας 3.4:** Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα τυροσόλης με χαμηλούς δείκτες K.

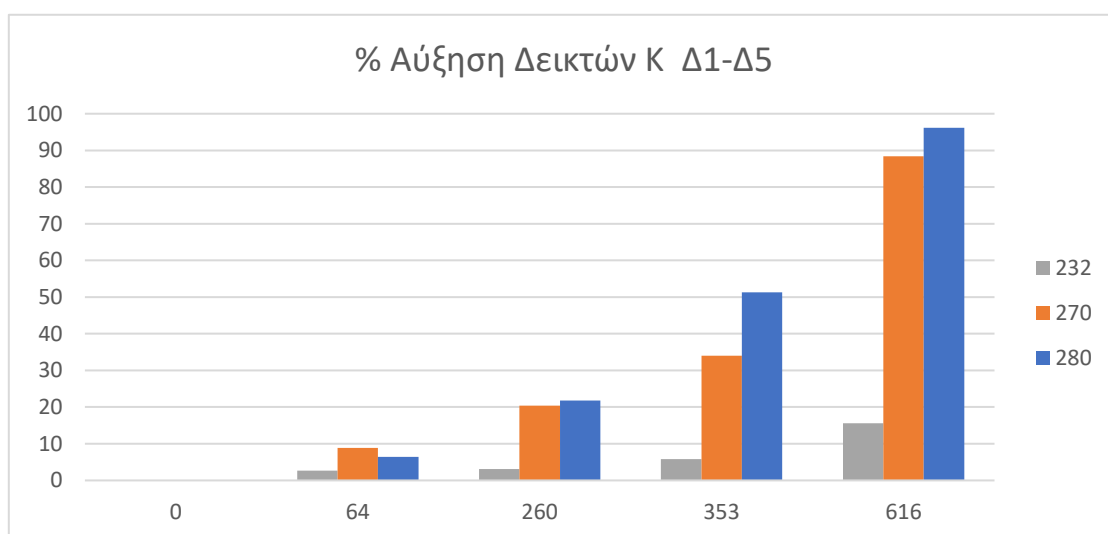
	232			270			280			
	mg/kg	K232	SD	% Αύξηση	K270	SD	% Αύξηση	K280	SD	% Αύξηση
Δ1:	0	1,622	0,060	0	0,147	0,0146	0	0,078	0,006	0
Δ2:	64	1,666	0,055	3	0,160	0,0101	9	0,083	0,005	6
Δ3:	260	1,672	0,087	3	0,177	0,0100	20	0,095	0,006	22
Δ4:	353	1,717	0,101	6	0,197	0,0180	34	0,118	0,006	51
Δ5:	616	1,875	0,082	16	0,277	0,0259	88	0,153	0,011	96





**Διάγραμμα 3.1:** Οι δείκτες K232, K270 και K280 για τα δείγματα τυροσόλης με χαμηλούς δείκτες Κ.

Όπως παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα, η ισχυρότερη επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης της τυροσόλης παρουσιάστηκε στα 280 nm. Η αύξηση αυτή, μετά την προσθήκη 616 mg τυροσόλης έφτασε το 96%. Ακόμα πιο σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα στα άλλα δύο μήκη κύματος, καθώς αυτά σχετίζονται και με τα κριτήρια ποιότητας του ελαιόλαδου. Για το K270 που επηρεάζεται σημαντικά από την απορρόφηση του φαινολικού δακτυλίου παρατηρήθηκε ότι σταθερά, επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από το K280 αλλά εξίσου σημαντικά. Έτσι μετά από την προσθήκη των 616 mg τυροσόλης στο δείγμα ελαιόλαδου η αύξηση του δείκτη K270 έφτασε το 88%. Η σημαντικότερη διαπίστωση έρχεται από το γεγονός, ότι το ελαιόλαδο αυτό, αν και αρχικά είχε πολύ χαμηλούς δείκτες Κ, μετά την προσθήκη τυροσόλης, εκπίπτει της κατηγορίας του εξαιρετικού παρθένου, και θεωρείται πλέον ένα παρθένο ελαιόλαδο. Η παραδοξότητα του αποτελέσματος αυτού, μεταφράζεται στο ότι σε ένα ελαιόλαδο με πολύ χαμηλό βαθμό οξείδωσης, η προσθήκη μια σημαντικής μεν, πιθανής όμως ποσότητας ενός αντιοξειδωτικού όπως είναι η τυροσόλη, οδηγεί σε ένα ελαιόλαδο που εσφαλμένα θεωρείται αρκετά οξειδωμένο για να καταναλωθεί ως εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο.



**Διάγραμμα 3.2 :** Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη τυροσόλης.

Αρκετά υποδεέστερες, αλλά άξιες αναφοράς, μεταβολές παρατηρήθηκαν και στον δείκτη K232. Ο δείκτης αυτός φαίνεται να επηρεάστηκε περισσότερο από την αύξηση της απορρόφησης που προκαλείται από διαφορετική χρωμοφόρο ομάδα η οποία απορροφά περίπου στα 220 nm. Η αύξηση της τιμής του K232 μετά την προσθήκη 616 mg τυροσόλης έφτασε το 16%. Η αύξηση αυτή φαίνεται μικρή σε σχέση με τις άλλες τιμές, όμως εξακολουθεί να οδηγεί σε παραπλανητικές ενδείξεις για την οξειδωτική κατάσταση του ελαιολάδου. Επιπροσθέτως, ένα ελαιόλαδο το οποίο έχει υποστεί μια μικρή οξειδωτική αλλοίωση αλλά εξακολουθεί να βρίσκεται στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, είναι πιθανό, το αυξημένο φαινολικό φορτίο που φέρει τελικά να το υποβαθμίσει.

ii) Προσθήκη τυροσόλης σε ελαιόλαδο με ψηλούς δείκτες K.

Το γεγονός ότι η αύξηση της απορρόφησης στα 280 nm μπορεί να επηρεάσει σε τέτοιο βαθμό την τιμή της απορρόφησης στα 270 nm εξαρχής αποδόθηκε στο γεγονός ότι στην περιοχή εκείνη του φάσματος απορρόφησης, δημιουργούνται πολλές αλληλεπικαλύψεις. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η μέτρηση προέρχεται ως αθροιστικό σήμα των απορροφήσεων από τις διάφορες χρωμοφόρες ομάδες οδηγεί σε συνολική αύξηση της απορρόφησης σε ένα σχετικά μεγάλο μέρος του φάσματος.

Γρήγορα όμως γεννήθηκε η απορία, κατά πόσο οι εξισώσεις που παρουσιάσαμε παραπάνω μπορούν να εφαρμοστούν σε κάθε ελαιόλαδο, λειτουργώντας σαν ένας συντελεστής διόρθωσης για τους δείκτες K. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό θα έπρεπε η ίδια πειραματική διαδικασία να επαναληφθεί και σε άλλα ελαιόλαδα τα οποία μάλιστα θα βρίσκονται σε διαφορετικό βαθμό οξείδωσης από το ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να διαπιστωθεί εάν η αθροιστική απορρόφηση που εμφανίζεται στο φάσμα απορρόφησης, και η οποία οφείλεται στο σύνολο των όμοιων χρωμοφόρων ομάδων που εντοπίζονται σε ένα δείγμα, επηρεάζονται από την αρχική συγκέντρωση των προϊόντων οξείδωσης.

Ύστερα από αναζήτηση στην βάση δεδομένων του εργαστήριου, εντοπίστηκε δείγμα ελαιολάδου Δ'ο το οποίο είχε μηδενική περιεκτικότητα σε οποιοδήποτε φαινολικό συστατικό και ο ένας από τους δύο δείκτες K, συγκεκριμένα ο δείκτης K232, ήταν σημαντικά αυξημένος.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία διάλυσης της τυροσόλης στο ελαιόλαδο. Μετά την προσθήκη της τυροσόλης στο ελαιόλαδο, το μίγμα αναδεύτηκε για 15 min και η ανάδευση συνεχίστηκε για 10 min σε ελαιόλουτρο στους 40 °C. Στην συνέχεια το δείγμα ελαιολάδου φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 4000 rpm. Ακολούθως παραλάβαμε το υπερκείμενο ελαιόλαδο Δ9 το οποίο και διηθήθηκε με την βοήθεια χάρτινου ηθμού. Μετά την ανάλυση φαινολικών συστατικών προέκυψε ότι το ελαιόλαδο είχε περιεκτικότητα σε τυροσόλη 665 mg/kg.

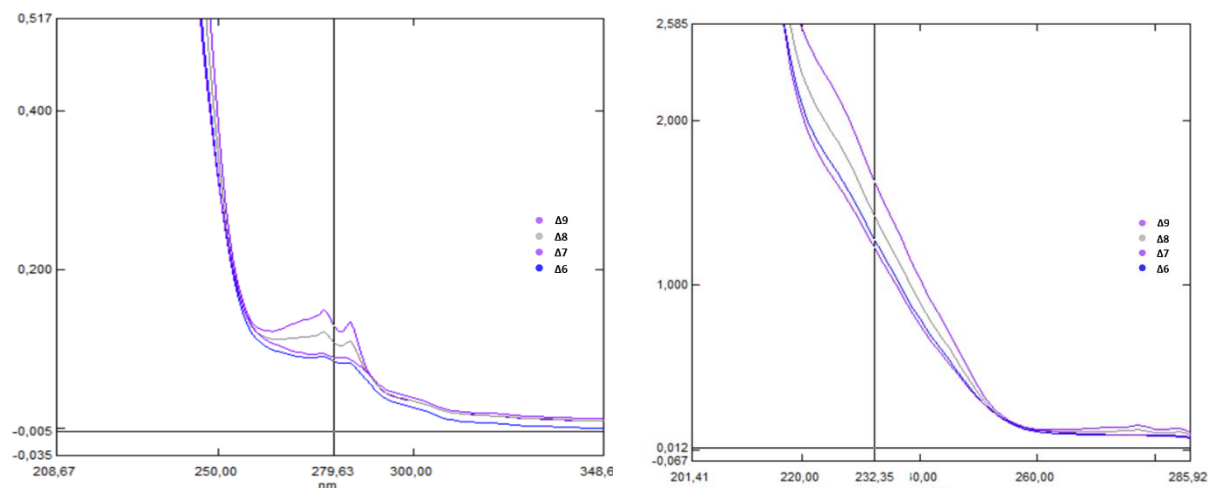
Με κατάλληλες αναμίξεις των δειγμάτων Δ'ο και Δ9 παρασκευάστηκαν συνολικά 4 ελαιόλαδα αυξανόμενης συγκέντρωσης τυροσόλης

**Πίνακας 3.5:** Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης τυροσόλης σε ελαιόλαδο με υψηλούς δείκτες Κ.

Δείγματα	Πυκνό ( $\Delta_0$ ) (g)	Αραιό $\Delta_5$ (g)	Περιεκτικότητα τυροσόλης (mg/kg)
$\Delta 6$	0	10	10
$\Delta 7$	5	5	341
$\Delta 8$	8	2	523
$\Delta 9$	10	0	665

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν τόσο με λήψη ολόκληρων των φασμάτων στην περιοχή UV-vis όσο και στα συγκεκριμένα nm που υπολογίζονται οι δείκτες Κ.

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα στην περιοχή UV-vis.

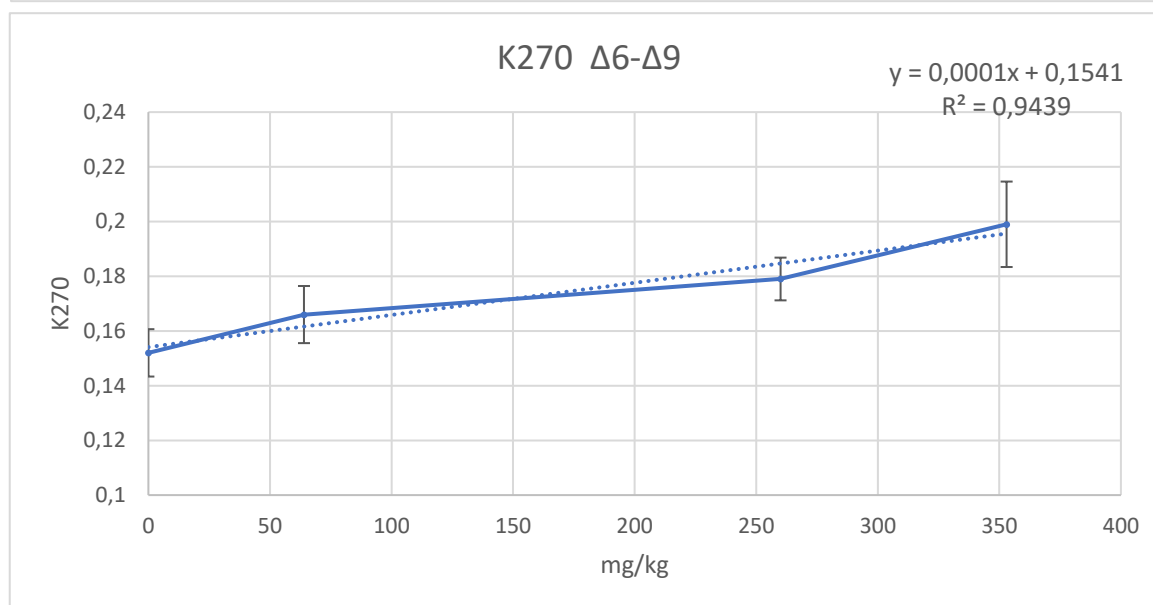
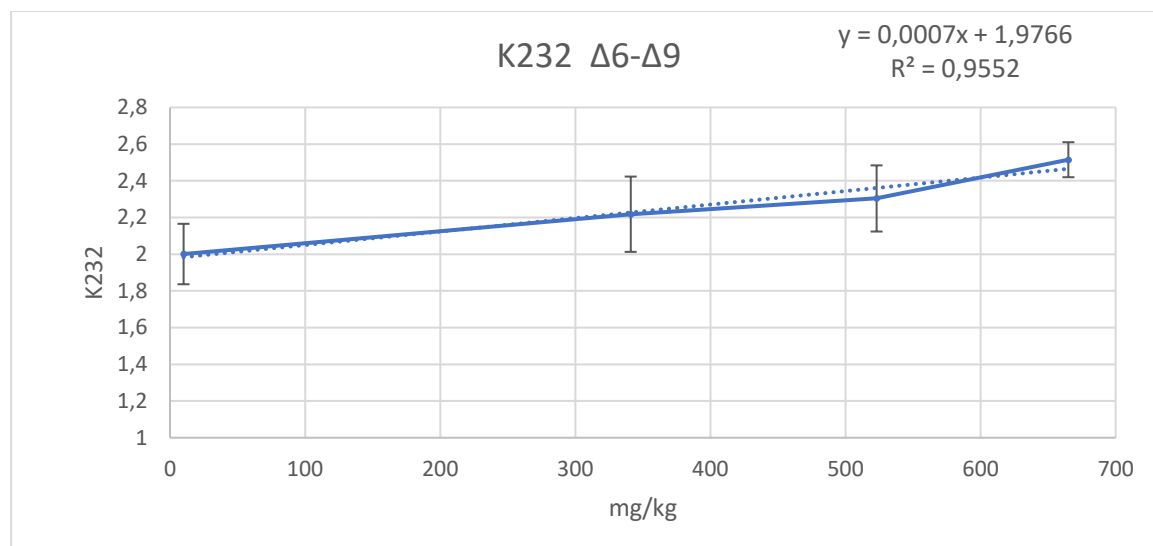


**Εικόνα 3.6:** Το φάσμα UV-vis για τα 4 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση τυροσόλης στα 232 και 280 nm.

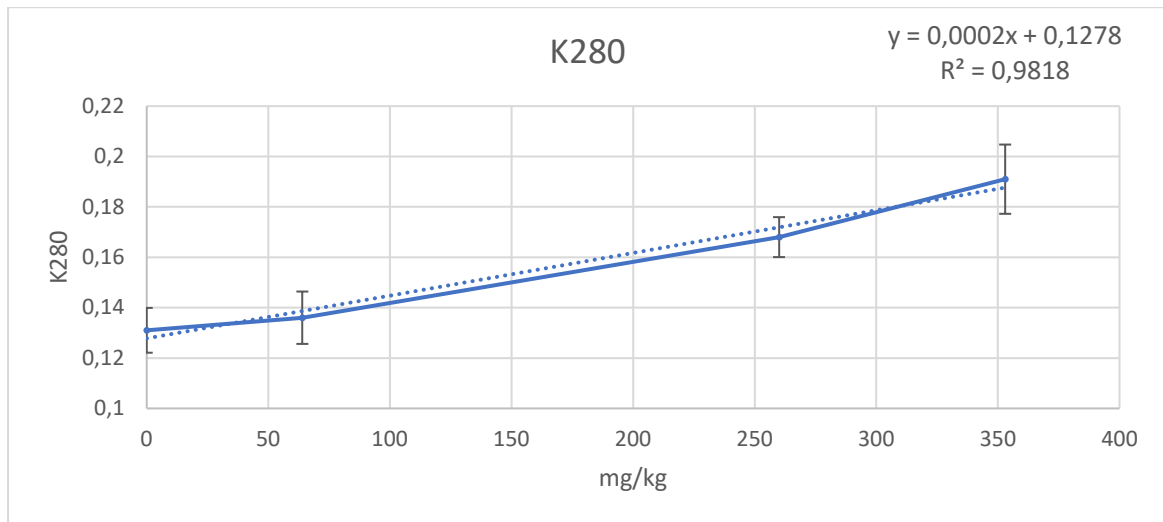
Και σε αυτή την περίπτωση η προσθήκη της τυροσόλης στο ελαιόλαδο αύξησε σημαντικά την απορρόφηση στα 280 nm με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης και στα 270nm. Παρόμοια αύξηση εντοπίστηκε και στα 232 nm η οποία όπως παρουσιάζεται και παρακάτω αλλοιώνει τους δείκτες Κ. Στον επόμενο Πίνακα 3,6 και στο Διάγραμμα 3.3 παρουσιάζονται αναλυτικά ποσοτικά στοιχεία των μεταβολών αυτών.

**Πίνακας 3.6:** Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα τυροσόλης με υψηλούς δείκτες Κ.

Συγκέντρωση	232			270			280			
mg/kg	K232	SD	% Αύξηση	K270	SD	% Αύξηση	K280	SD	% Αύξηση	
<b>Δ6:</b>	10	2,001	0,165	0	0,152	0,009	0	0,131	0,009	0
<b>Δ7:</b>	341	2,218	0,205	11	0,166	0,010	9	0,136	0,010	4
<b>Δ8:</b>	523	2,304	0,180	15	0,179	0,008	18	0,168	0,008	28
<b>Δ9:</b>	665	2,515	0,095	26	0,199	0,016	31	0,191	0,014	46



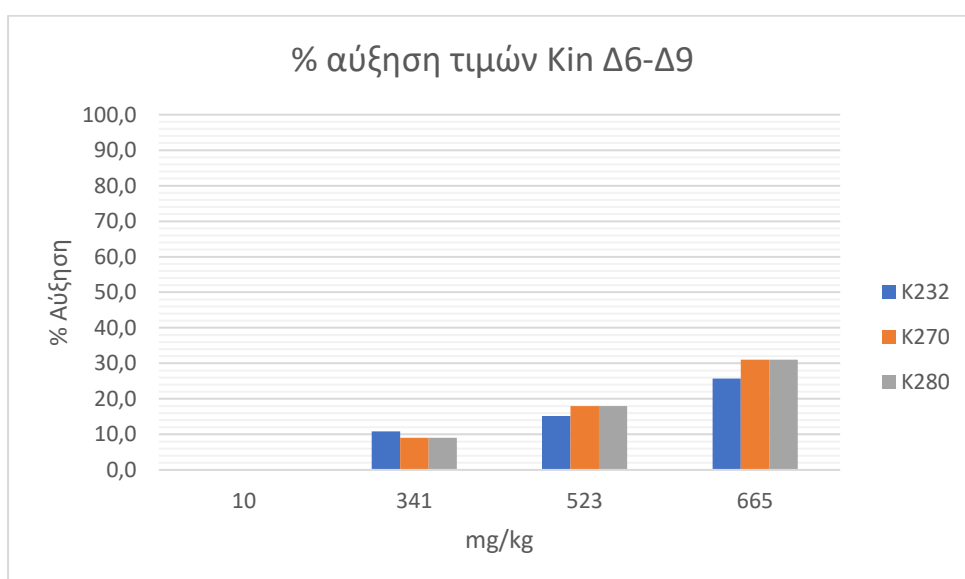




**Διάγραμμα 3.3:** Οι δείκτες K232, K270 και K280 για τα δείγματα τυροσόλης σε ελαιόλαδο με υψηλούς αρχικούς δείκτες Κ.

Από την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι και σε αυτήν την περίπτωση υπήρξε μια γραμμική αύξηση της απορρόφησης στα 280 nm με την αύξηση της συγκέντρωσης της τυροσόλης στο ελαιόλαδο. Όπως εξηγήθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, λόγω των αλληλοεπικαλύψεων που υπάρχουν σε εκείνη την περιοχή του φάσματος απορρόφησης, η αύξηση της συγκέντρωσης της τυροσόλης οδήγησε σε γραμμική αύξηση της τιμής της απορρόφησης στα 270 nm.

Αντίστοιχα και στα 232 nm η συσχέτιση της συγκέντρωσης της τυροσόλης και της αύξησης απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος, εμφάνισε πολύ καλή γραμμικότητα ( $R^2=0,95$ ).



**Διάγραμμα 3.4:** Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη τυροσόλης.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης που κατασκευάστηκαν και εδώ φανέρωσαν την μεγάλη αύξηση στους δείκτες K μετά την προσθήκη τυροσόλης. Συγκεκριμένα η τιμή του K232 φαίνεται να επηρεάστηκε σε σημαντικότερο βαθμό καθώς η μέγιστη αύξηση της τιμής του K232 που παρατηρήθηκε μετά την προσθήκη 665 mg τυροσόλης, ήταν 26%. Το K270 και το K280 φάνηκε να επηρεάζεται λιγότερο σε αυτή την περίπτωση καθώς η συνολική αύξηση ως ποσοστό ήταν σημαντικά μικρότερη. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια ότι και σε αυτήν την περίπτωση το ελαιόλαδο, αν και είχε σχετικά αυξημένο K, κατατάσσόταν στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, ενώ μετά την προσθήκη της τυροσόλης το ελαιόλαδο υποβαθμίστηκε τεχνητά σε κατώτερη κατηγορία καθώς το K232 ξεπέρασε το όριο του 2,500.

iii) Η απορρόφηση της τυροσόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Όπως φάνηκε στα προηγούμενα πειράματα, η προσθήκη τυροσόλης στο ελαιόλαδο, οδήγησε σε αύξηση της απορρόφησης σε δύο περιοχές του φάσματος υπεριώδους ορατού. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε προσθήκη τυροσόλης σε δύο δείγματα ελαιολάδου, τα οποία βρίσκονταν το καθένα σε διαφορετικό στάδιο της οξείδωσης. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, έγινε σαφές ότι η τελική τιμή που παρουσιάζεται ως δείκτης K, αφορά την αθροιστική απορρόφηση όμοιων ή μη, χρωμοφόρων ομάδων, οι οποίες απορροφούν στις ίδιες περιοχές, ανήκουν όμως σε τελείως διαφορετικά μόρια. Επομένως η απορρόφηση των προϊόντων οξείδωσης καθορίζει και το κατά πόσο θα αυξάνεται πλασματικά η τιμή του δείκτη K, από την παρουσία των φαινολικών συστατικών.

Στην προσπάθεια να ποσοτικοποιηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης της τυροσόλης στο φάσμα UV-vis, λήφθηκαν φάσματα απορρόφησης της καθαρής τυροσόλης χωρίς την παρουσία ελαιολάδου για να συγκριθούν κατά πόσο οι αυξήσεις που παρατηρούνται στα διαλύματα 1% ελαιολάδου σε κυκλοεξάνιο συμπίπτουν.

Στον σχεδιασμό του πειράματος, βασιστήκαμε στις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν στις προηγούμενες παραγράφους. Έπρεπε να παρασκευασθούν διαλύματα τυροσόλης σε κυκλοεξάνιο, τα οποία θα είχαν τις ίδιες ή πολύ κοντινές συγκεντρώσεις με τα αντίστοιχα ελαιόλαδα των προηγούμενων πειραμάτων. Έτσι αν για παράδειγμα στο πρώτο πείραμα η συγκέντρωση της τυροσόλης στο ελαιόλαδο ήταν 616 mg/kg, θα πρέπει να υπολογιστεί ότι για την μέτρηση των δεικτών K, έγινε ζύγιση 164 mg ελαιολάδου τα οποία αραιώθηκαν σε 25 mL κυκλοεξάνιου. Επομένως το διάλυμα που παρασκευάστηκε για την μέτρηση των δεικτών K είχε συγκέντρωση σε τυροσόλη 0,101/25 (mg/mL) ή 0,401 mg/100 mL. Έτσι για να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα, θα έπρεπε να παρασκευάσουμε διαλύματα τυροσόλης σε κυκλοεξάνιο ξεκινώντας με ένα διάλυμα κυκλοεξανίου το οποίο θα είχε συγκέντρωση 0,401 mg/100 mL.

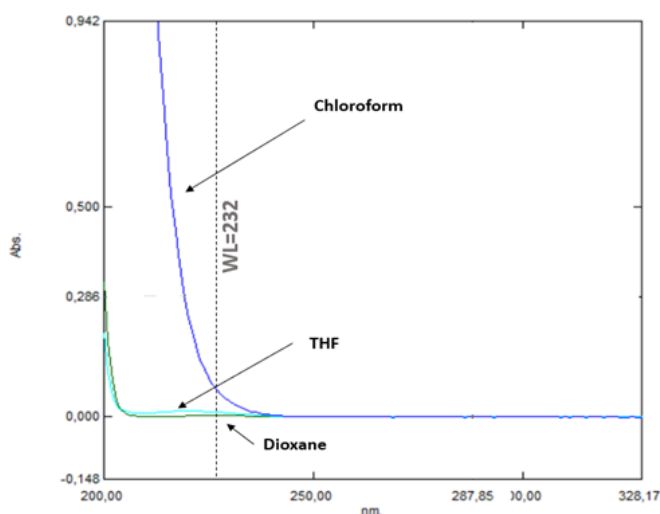
Το βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε στην προσπάθεια αυτή, ήταν η διάλυση της τυροσόλης στο κυκλοεξάνιο. Η τυροσόλη είναι μια φαινόλη που εμφανίζει μια σχετικά μεγάλη πολικότητα και για την διάλυση της, συνήθως χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως το νερό, η μεθανόλη, το χλωροφόρμιο το διχλωρομεθάνιο κ.α. Η κάθε χρωμοφόρος ομάδα όμως, γνωρίζουμε ότι απορροφά διαφορετικά σε κάθε διαλύτη. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει το πείραμα που θα πραγματοποιηθεί να γίνει σε κυκλοεξάνιο ή σε κάποιον άλλον παρεμφερή διαλύτη όπως το εξάνιο και το ίσο-οκτάνιο. Το κυκλοεξάνιο είναι ένας διαλύτης μικρής πολικότητας, και αυτός είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται για την διάλυση του ελαιολάδου. Τα λιπαρά οξέα από τα οποία αποτελείται κατά κύριο λόγο το ελαιόλαδο, διαλύονται σε άπολους διαλύτες

όπως το κυκλοεξάνιο, ενώ πιο πολικά συστατικά βρίσκονται σε πολύ μικρή περιεκτικότητα με αποτέλεσμα να μπορούν και αυτά να διαλυθούν στο κυκλοεξάνιο.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε έπρεπε να βρεθεί μια μέθοδος ώστε να είναι γνωστή η ακριβής συγκέντρωση των διαλυμάτων και να εξαλειφθεί κάθε πιθανότητα διάλυσης μικρότερης ποσότητας τυροσόλης από την επιθυμητή. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο της μικρής διαλυτότητας της τυροσόλης θα έπρεπε η τυροσόλη να γίνει πρώτα σε μια ελάχιστη ποσότητα ενός πολικότερου διαλύτη, και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό να αραιωθεί με κυκλοεξάνιο.

Η επιλογή του διαλύτη που θα χρησιμοποιούταν ήταν ένα πολύ κρίσιμο σημείο στην πορεία της ανάλυσης αυτής. Θα έπρεπε ο διαλύτης που θα επιλεγεί να πληροί 3 βασικά κριτήρια. Αρχικά θα έπρεπε να έχει κατάλληλη πολικότητα ώστε σε πολύ μικρή ποσότητα να μπορεί να διαλύσει την τυροσόλη. Σε δεύτερο επίπεδο ο διαλύτης αυτός θα έπρεπε να είναι πλήρως αναμίξιμος με το κυκλοεξάνιο ώστε το τελικό διάλυμα που θα παρασκευαζόταν να ήταν ομοιογενές. Το τελευταίο κριτήριο που θα έπρεπε να πληροί ο διαλύτης αυτός ήταν ότι θα έπρεπε να μην απορροφά στην περιοχή που κάνουμε τις μετρήσεις για τους δείκτες K ώστε να μην επηρεάζεται το αποτέλεσμα.

Τα δύο πρώτα κριτήρια που τέθηκαν ως απαραίτητες προϋποθέσεις καλύπτονταν από μια ομάδα διαλυτών οι οποίοι ήταν το χλωροφόρμιο, το τετραϋδροφουράνιο (THF) και η διοξάνη. Στην συνέχεια, αν και η ποσότητα του διαλύτη που θα έμπαινε στο κυκλοεξάνιο τελικά θα ήταν πολύ μικρή, θεωρήθηκε αναγκαίο να υπολογιστεί το cut-off των διαλυτών αυτών στο κυκλοεξάνιο. Έτσι υπολογίστηκε η ποσότητα του διαλύτη που θα έμπαινε στα διαλύματα μας και λήφθηκε φάσμα απορρόφησης σε όλη την περιοχή 200-800 nm. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα και των τριών διαλυτών σε κυκλοεξάνιο.



**Εικόνα 3.7:** Φάσμα της απορρόφησης χλωροφορμίου, THF και διοξάνης στο κυκλοεξάνιο.

Από τα φάσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω παρατηρήθηκε ότι το χλωροφόρμιο εμφάνισε σημαντική απορρόφηση στα 200 nm γεγονός που θα επηρεάσει την μέτρηση που γίνεται στα 232 nm. Αντίθετα το THF και η διοξάνη φαίνεται να εμφανίζουν ελάχιστη έως και μηδενική απορρόφηση στην περιοχή αυτή. Λόγω της καλύτερης διαλυτότητας της τυροσόλης στην διοξάνη και βασιζόμενοι και στα παραπάνω φάσματα, επιλέχθηκε για την πειραματική διαδικασία που θα ακολουθήσει, αλλά και για τα επόμενα πειράματα, να χρησιμοποιηθεί η διοξάνη ως “ενδιάμεσος” διαλύτη.

Μετά την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη παρασκευάστηκαν διαλύματα τυροσόλης σε διοξάνη. Με σκοπό τη παρασκευή διαλυμάτων παρόμοιων συγκεντρώσεων με εκείνα που περιείχαν ελαιόλαδο, υπολογίστηκε ότι πρέπει να διαλυθούν 4 mg τυροσόλης σε 2,5 mL διοξάνης. Τελικά ζυγίστηκαν 4,1 mg τυροσόλης τα οποία και διαλύθηκαν σε 2,5 mL διοξάνης. Από το διάλυμα αυτό 250 μL προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL που περιείχε μικρή ποσότητα κυκλοεξανίου. Για την μέγιστη ακρίβεια, η διάλυση της τυροσόλης σε διοξάνη αλλά και η λήψη των 250 μL έγινε με ζύγιση του διαλύματος βάσει της πυκνότητας της διοξάνης σε αναλυτικό ζυγό 4 δεκαδικών ψηφίων. Στην συνέχεια έγινε αραιώση μέχρι τη χαραγή με κυκλοεξάνιο (διάλυμα soln1). Έτσι το τελικό διάλυμα που παρασκευάσαμε περιείχε 0,41 mg τυροσόλης/ 100 mL κυκλοεξανίου.

Στη συνέχεια, με κατάλληλες αραιώσεις από το πυκνό διάλυμα soln1 (0.41mg/100 mL ) παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα περιεκτικότητας 70% (soln2), 40% (soln3) και 20% (soln4) τα οποία είναι στην ίδια τάξη μεγέθους με τα αντίστοιχα διαλύματα που προέκυψαν από την μέτρηση των δεικτών K στο ελαιόλαδο της προηγούμενης παραγράφου.

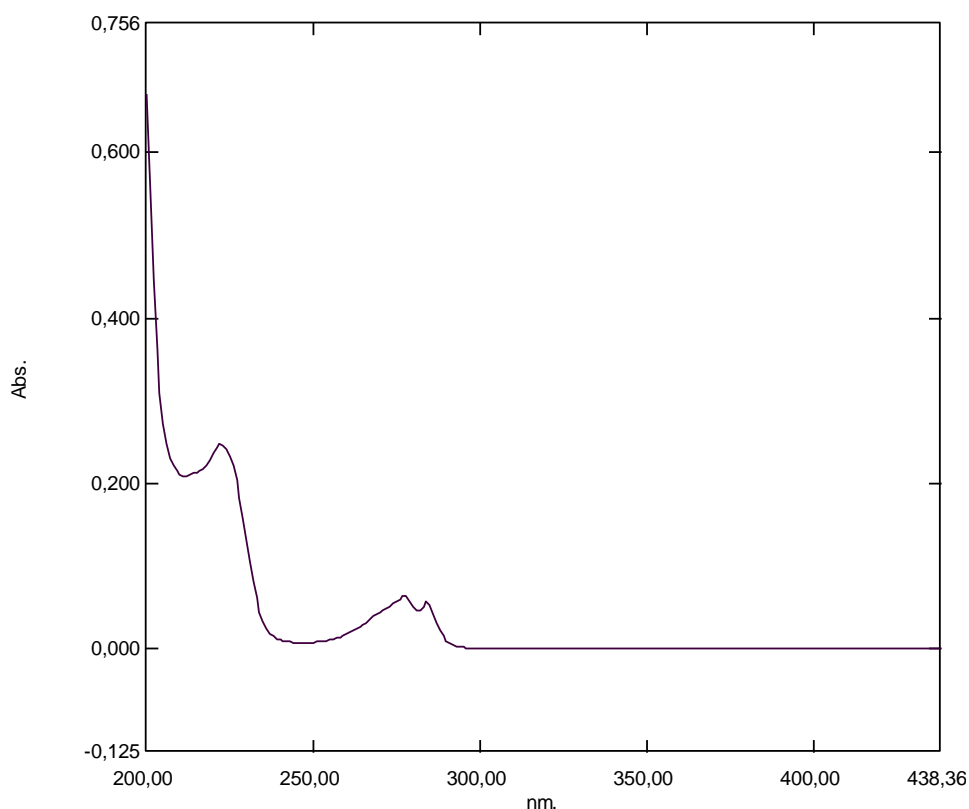
Με σκοπό να υπάρχει διαρκής σύγκριση με τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για την μέτρηση των δεικτών K της προηγούμενης παραγράφου, και για καθαρά επεξηγηματικούς λόγους, παρουσιάζονται παράλληλα με την ακριβή συγκέντρωση του κάθε διαλύματος, την περιεκτικότητα της τυροσόλης που θα αντιστοιχούσε, εάν τα διαλύματα αυτά είχαν προκύψει από την ζύγιση 164 mg ελαιολάδου και διάλυση τους σε 25 mL κυκλοεξανίου με σκοπό την μέτρηση των δεικτών K

**Πίνακας 3.7:** Συσχέτιση διαλυμάτων τυροσόλης με αντίστοιχα δείγματα ελαιολάδου.

	<i>C (mg/100 mL)</i>	<i>Θεωρητική περιεκτικότητα ελαιολάδου (mg/kg)</i>
<i>Soln1</i>	0,41	683
<i>Soln2</i>	0,28	478
<i>Soln3</i>	0,16	273
<i>Soln4</i>	0,08	136

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση των διαλυμάτων αυτών με λήψη φάσματος απορρόφησης σε όλη την περιοχή UV-vis από τα 200 – 800 nm. Για την λήψη των φασμάτων χρειάστηκε να γίνει διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline) στο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης. Με σκοπό να εξαιρεθεί κάθε πιθανότητα λήψης παραπλανητικών αποτελεσμάτων από την προσθήκη διοξάνης στα δείγματά μας, πραγματοποιήθηκε παρασκευή αντίστοιχων διαλυμάτων με παρουσία διοξάνης αλλά όχι τυροσόλης. Τα “τυφλά” διαλύματα παρασκευάστηκαν με την μέθοδο της αραιώσης όπως ακριβώς έγινε και με τα διαλύματα της τυροσόλης. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής ήταν η δημιουργία 4 τυφλών δειγμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς που προαναφέραμε.

Ξεκινώντας την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, παρακάτω παρατίθεται το φάσμα απορρόφησης του πιο πυκνού διαλύματος τυροσόλης,

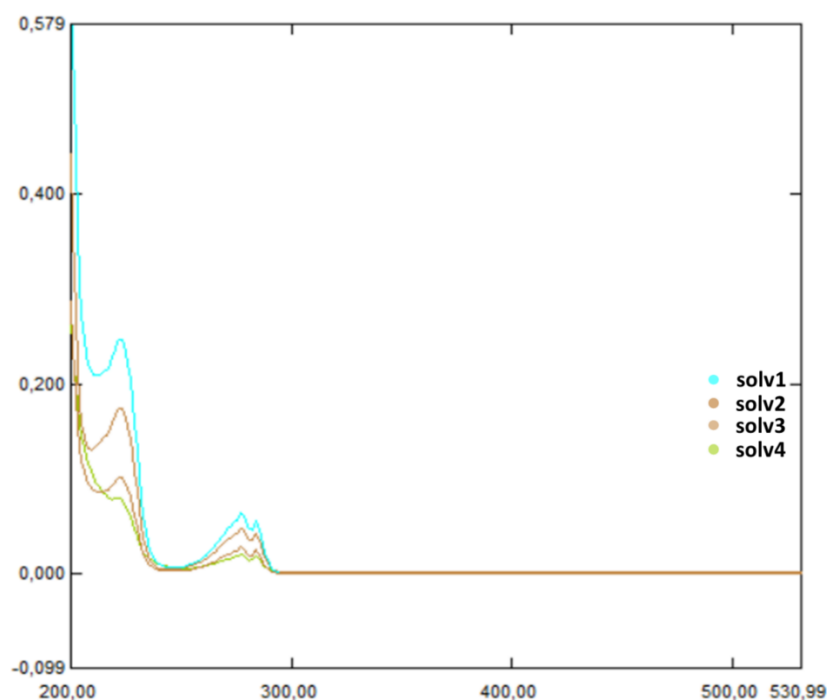


Εικόνα 3.8: Φάσμα απορρόφησης πυκνού διαλύματος τυροσόλης.

Σύμφωνα με το παραπάνω φάσμα, παρατηρήθηκε ότι η τυροσόλη απορροφά μόνο στην υπεριώδη περιοχή, καθώς στην ορατή περιοχή ( $\lambda=400-750$  nm) δεν εμφανίζεται κάποια κορυφή. Στην εγγύς υπεριώδη περιοχή του φάσματος ( $\lambda=200-400$  nm) αντιστοιχούν οι  $n \rightarrow \sigma^*$  και οι  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεις ηλεκτρονίων, ενώ στην άπω υπεριώδη περιοχή ( $\lambda < 200$  nm) αντιστοιχούν οι απορροφήσεις από τις  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  μεταπτώσεις. Το βενζόλιο που είναι η μια χρωμοφόρος ομάδα,

απορροφά σε  $\lambda_{\max}=254$  nm. Στην τυροσόλη βρίσκεται διυποκατεστημένο σε όρθο θέση οπότε εμφανίζει απορρόφηση σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, περίπου στα 280 nm. Οι απορροφήσεις στα 200 και 230 nm περίπου οφείλονται στους δεσμούς των -OH της τυροσόλης. Τα -OH είναι αυξόχρωμες ομάδες που περιέχουν μη δεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων (n), τα οποία συγκρατούνται ασθενέστερα από τον πυρήνα κι έτσι μπορούν να υποστούν μεταπτώσεις σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Οι αυξόχρωμες αυτές ομάδες απορροφούν κοντά στα 200 nm εξαιτίας των  $n \rightarrow \sigma^*$  μεταπτώσεων και προκαλούν βαθυχρωμική και υπερχρωμική μετατόπιση (αυξημένο μήκος κύματος και απορρόφηση αντίστοιχα). Επομένως, η ομάδα του -OH που συνδέεται με το μεθύλιο (-CH<sub>2</sub>-OH) εμφανίζει απορρόφηση στα 200 nm, εξαιτίας της  $n \rightarrow \sigma^*$  μετάπτωσης, ενώ η ομάδα του -OH που συνδέεται απευθείας με το βενζόλιο εμφανίζει απορρόφηση στα 220 nm. Στη δεύτερη περίπτωση η απορρόφηση εμφανίζεται σε μεγαλύτερο  $\lambda$  επειδή επηρεάζεται από το διπλανό συζυγιακό σύστημα του βενζολίου.

Παρακάτω θα δούμε και τα φάσματα και για τα 4 διαλύματα:

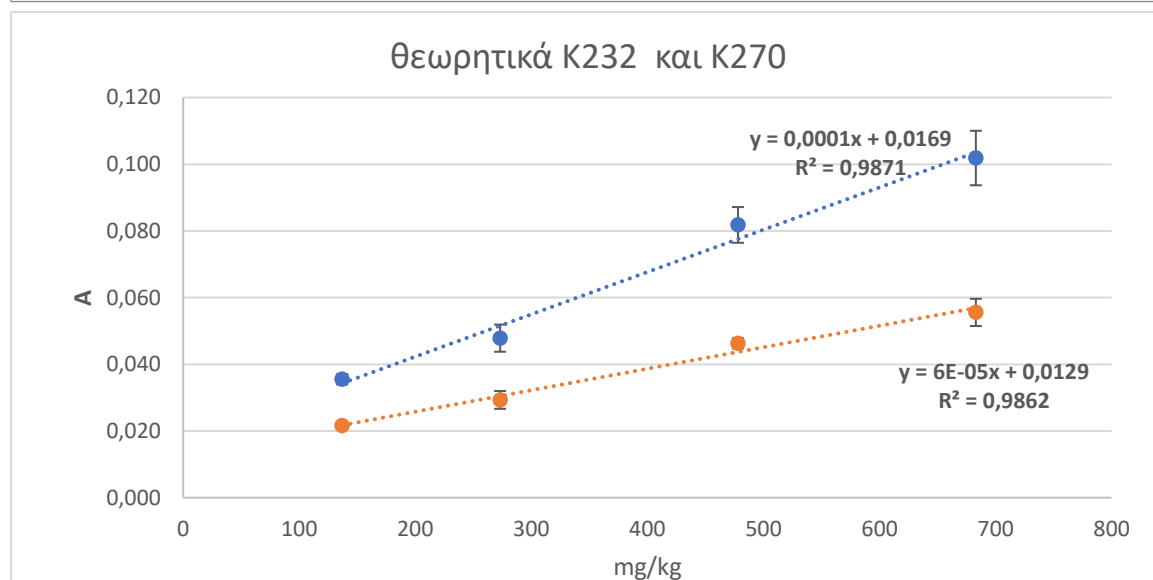
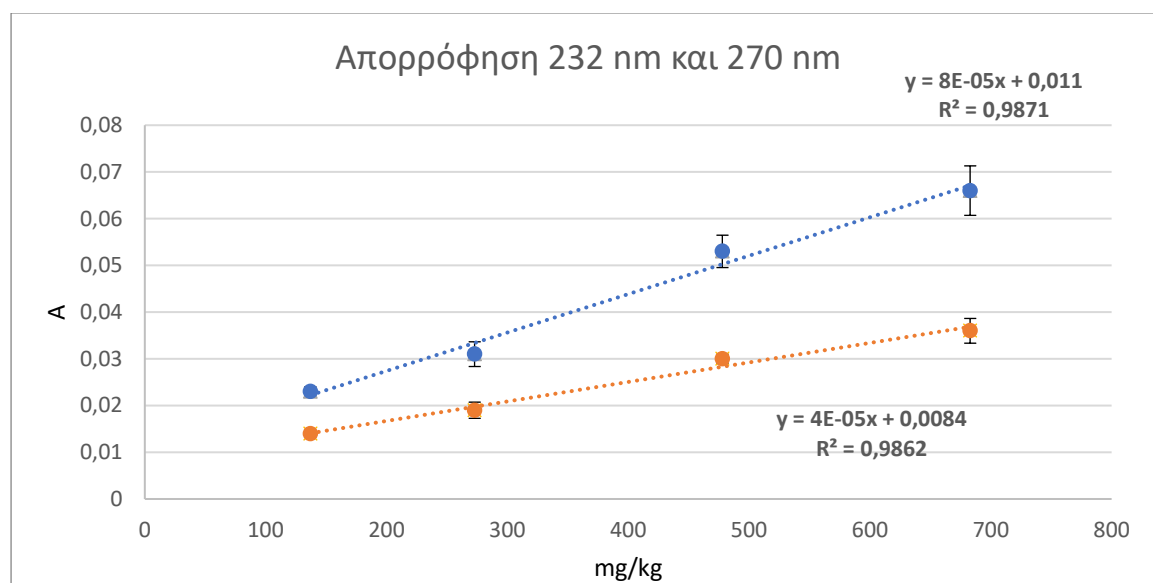


**Εικόνα 3.9:** Φάσμα απορρόφησης των 4 διαλυμάτων τυροσόλης.

Όπως ήταν αναμενόμενο τα διαλύματα εμφάνισαν διαφορετικές απορροφήσεις στις δύο περιοχές που απορροφούν οι χρωμοφόρες ομάδες. Όσο αυξάνετο η συγκέντρωση της τυροσόλης στο διάλυμα, άλλο τόσο αυξήθηκε η απορρόφηση στο φάσμα UV-vis. Παρακάτω παρουσιάζονται και ποσοτικά στοιχεία των μεταβολών αυτών αλλά και των αντίστοιχων τιμών K που θα προέκυπταν ένα είχαμε ζυγίσει 164 mg ελαιολάδου.

**Πίνακας 3.8 :** Στοιχεία απορρόφησης διαλυμάτων τυροσόλης.

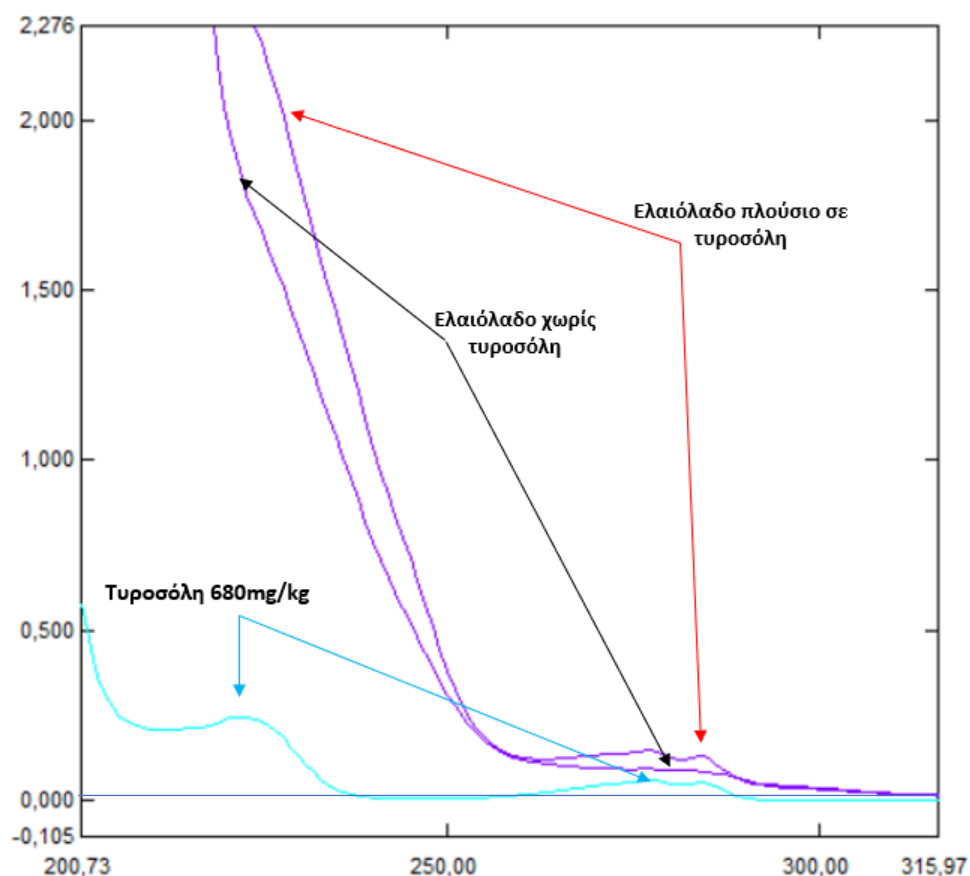
Διάλυμα	Συγκέντρωση Διαλύματος	Θεωρητική περιεκτικότητα ελαιολάδου	232		270		K232		K270	
			A	SD	A	SD	A	SD	A	SD
Solv1	0,41	683	0,066	0,0053	0,036	0,003	0,102	0,008	0,059	0,004
Solv2	0,28	478	0,053	0,0035	0,03	0,001	0,086	0,005	0,051	0,002
Solv3	0,16	273	0,031	0,0026	0,019	0,002	0,047	0,004	0,029	0,003
Solv4	0,08	137	0,023	0,0010	0,014	0,000	0,02	0,002	0,008	0,000



**Διάγραμμα 3.5:** Απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης και των θεωρητικών δεικτών K για τα διαλύματα τυροσόλης.



Από τις παραπάνω ποσοτικές μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι οι αλλαγές στο ελαιόλαδο είναι συμβατές με τις μεταβολές που παρατηρούμε στα διαλύματα τυροσόλης. Ειδικά στα 270 nm η αύξηση της απορρόφησης πλησιάζει αρκετά σαν τάξη μεγέθους τουλάχιστον τις μεταβολές του K270 στο ελαιόλαδο. Στα 232 nm οι διαφορές που βρίσκουμε στα διαλύματα είναι μικρότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν στο ελαιόλαδο.



**Εικόνα 3.10:** Φάσμα απορρόφησης του δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά την προσθήκη τυροσόλης, και της αντίστοιχης ποσότητας καθαρής τυροσόλης.

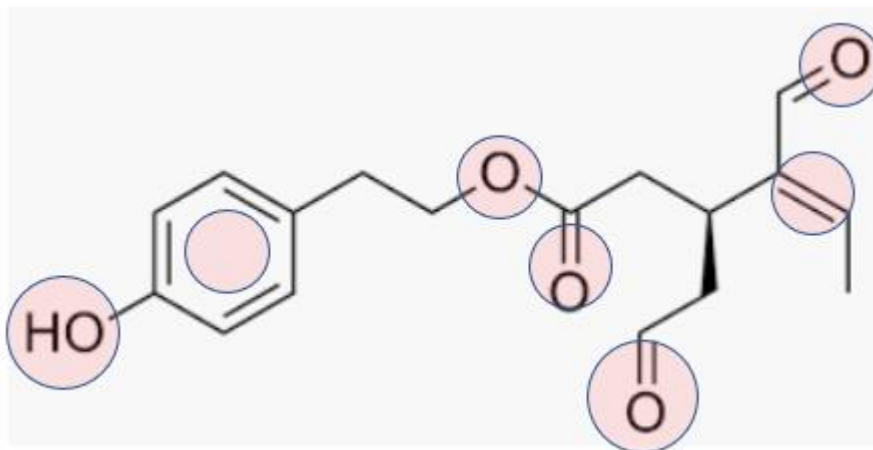
Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι στα 220 nm οι απορροφήσεις από τα προϊόντα οξείδωσης είναι πολύ μεγάλες με αποτέλεσμα οποιαδήποτε απορρόφηση προστεθεί στα σήματα που εμφανίζονται στην περιοχή, να δημιουργεί μεγάλη αύξηση στην καμπύλη του φάσματος και επομένως να αυξάνεται κατά πολύ η τιμή της απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

#### 4.3.4 Επίδραση ελαιοκανθάλης στους δείκτες Κ.

##### i) Προσθήκη ελαιοκανθάλης σε ελαιόλαδο.

Στην προηγούμενη παράγραφο παρουσιάστηκε η επίδραση που έχει η συγκέντρωση της τυροσόλης στην συνολική απορρόφηση διαλύματος ελαιολάδου (1% σε κυκλοεξάνιο) στα 232 nm και 270 nm. Η τυροσόλη χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για να διαπιστωθεί ποια είναι η επίδραση των χρωμοφόρων ομάδων στην συνολική απορρόφηση των συγκεκριμένων μηκών κύματος. Όπως ήδη αναφέρθηκε και όπως θα παρουσιαστεί και σε επόμενο κεφάλαιο, η συγκέντρωση της τυροσόλης στο ελαιόλαδο κινείται σε σαφώς χαμηλότερα επίπεδα από αυτά που παρουσιάστηκαν στις καμπύλες αναφοράς. Στο φαινόμενο της απορρόφησης ωστόσο, ρόλο δεν παίζουν τα μόρια σαν αυτούσιες δομές αλλά οι χρωμοφόρες ομάδες που αυτά φέρουν. Έτσι οι απορροφήσεις που παρατηρήθηκαν από την τυροσόλη αναμένουμε να εμφανίζονται και όταν στο ελαιόλαδο προστεθεί και κάποιο άλλο μόριο το οποίο θα έχει τις ίδιες χρωμοφόρες ομάδες.

Η ελαιοκανθάλη είναι ένα μόριο που αποτελείται από το μόριο της τυροσόλης συνδεδεμένο με εστερικό δεσμό με παράγωγο του ελενολικού οξέος. Κατά συνέπεια φέρει τις ίδιες χρωμοφόρες ομάδες του δακτυλίου της τυροσόλης, καθώς επίσης και τις υπόλοιπες χρωμοφόρες ομάδες που περιέχονται στο ελενολικό τμήμα του μορίου.



**Εικόνα 3.11:** Οι χρωμοφόρες ομάδες της ελαιοκανθάλης.

Αξίζει να αναφερθεί, ότι μελετώντας την βάση δεδομένων του εργαστηρίου μας που περιέχει χιλιάδες δείγματα ελαιολάδου, παρατηρήθηκε ότι η ελαιοκανθάλη, ειδικά στις ελληνικές ποικιλίες, σε πολλές περιπτώσεις αποτελούσε το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό. Το εύρος των συγκεντρώσεων της ελαιοκανθάλης ήταν συντριπτικά μεγαλύτερο από αυτό της τυροσόλης καθώς κυμαίνεται από 0 έως και 1,800 mg/kg. Το γεγονός αυτό καθιστά τις καμπύλες που

κατασκευάστηκαν παρακάτω ακόμα πιο κοντά στην πραγματικότητα και που σε πολλές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας.

Στην παράγραφο αυτή μελετήθηκε η επίδραση που έχει η προσθήκη της ελαιοκανθάλης στην απορρόφηση δείγματος ελαιολάδου, και πόσο μεταβάλλονται τελικά οι δείκτες K του δείγματος.

Η διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης στους δείκτες K του ελαιολάδου βασίστηκε στην ίδια μεθοδολογία με αυτή της τυροσόλης. Η ιδέα ήταν η μέτρηση της απορρόφησης ενός δείγματος ελαιολάδου, πριν και μετά την προσθήκη ελαιοκανθάλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπως και στην πειραματική διαδικασία με την τυροσόλη, έτσι και εδώ, αντιμετωπίσαμε το ίδιο πρόβλημα της διάλυσης της ελαιοκανθάλης στο δείγμα ελαιολάδου. Η διάλυση της ελαιοκανθάλης αρχικά επιχειρήθηκε με απλή ανάμιξη εκχυλίσματος ελαιοκανθάλης γνωστής καθαρότητας και ελαιολάδου. Βοηθητικά, υποβάλαμε το ελαιόλαδο σε θέρμανση έγινε χρήση και συσκευής υπερήχων για την καλύτερη διαλυτοποίηση του εκχυλίσματος στο ελαιόλαδο.

Το πρόβλημα της διαλυτοποίησης της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο αποδείχτηκε όμως μεγαλύτερο πρόβλημα από το αντίστοιχο της τυροσόλης για δύο λόγους. Ο πρώτος λόγος αφορά την τελική συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο, η οποία ύστερα από όλες τις διαδικασίες που επιχειρήθηκαν παρέμενε σε αρκετά χαμηλά επίπεδα, χαμηλότερα και από αυτά της τυροσόλης. Η συγκέντρωση που επετεύχθη με την παραπάνω διαδικασία δεν ξεπερνούσε τα 400 mg/kg, την στιγμή που στην φύση, απαντώνται και δείγματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης. Ο δεύτερος λόγος αφορά την καταπόνηση του δείγματος από την θερμική επεξεργασία αλλά κυρίως την χρήση υπερήχων. Στην προσπάθεια να ακολουθηθούν ήπιες τεχνικές και να εξαλειφθεί κάθε πιθανότητα λήψης παραπλανητικών αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ότι η καταπόνηση του ελαιολάδου θα πρέπει να αποφευχθεί. Επιπροσθέτως, μετά την χρήση υπερήχων παρατηρήθηκε μερική οξείδωση της ελαιοκανθάλης, και παραγωγή του ελαιοκανθαλικού οξέος. Το συγκεκριμένο προϊόν προκύπτει από την οξείδωση της αλδεϋδομάδας της ελαιοκανθάλης και μετατροπή της σε οξύ (Tsolakou et al. 2018). Το ελαιοκανθαλικό οξύ έχει παρόμοιες απορροφήσεις με την ελαιοκανθάλη λόγω της παρεμφερούς δομής του αλλά θα δυσκολεύσει αρκετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και στην παρασκευή των διαλυμάτων τυροσόλης σε κυκλοεξάνιο. Η ελαιοκανθάλη αρχικά διαλύθηκε σε μια πολύ μικρή ποσότητα διοξάνης και στην συνέχεια το διάλυμα αναμίχθηκε με το ελαιόλαδο και αναδεύτηκε για αρκετή ώρα μέχρι το δείγμα να θεωρηθεί ομογενές (Δείγμα Δ15). Τέλος το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 4000 rpm για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει κίνδυνος

διαχωρισμού των φάσεων του ελαιολάδου και της διοξάνης και άρα την δημιουργία ανομοιογενούς δείγματος.

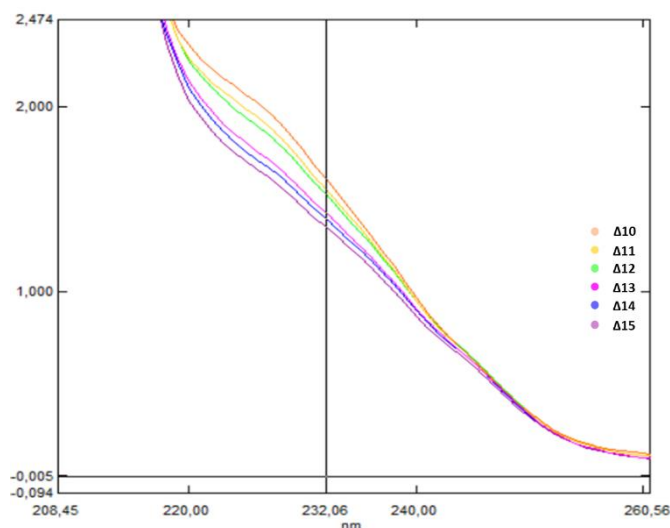
Έτσι διαλύθηκε μια ποσότητα ελαιοκανθάλης σε 1 mL διοξάνης το οποίο στην συνέχεια αναμίχθηκε με το ελαιολάδο. Το ελαιολάδο που επιλέξαμε ήταν ένα ελαιολάδο από την συλλογή που υπάρχει στο εργαστήριο φαρμακογνωσίας το οποίο είχε αυξημένους δείκτες K232. Στο τελικό δείγμα ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε ανάλυση των φαινολικών συστατικών με την μέθοδο που χρησιμοποιούμε καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής αυτής. Το πυκνό διάλυμα ελαιολάδου περιείχε 820 mg/kg ελαιοκανθάλη.

Με κατάλληλες αναμίξεις του αρχικού δείγματος ελαιολάδου μηδενικής περιεκτικότητας σε φαινόλες και του πυκνού δείγματος, παρασκευάστηκαν συνολικά 6 δείγματα ελαιολάδου (Δ10-Δ15) τα οποία είχαν αυξανόμενη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης. Σε όλα τα δείγματα έγινε ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός της ελαιοκανθάλης ο οποίος παρουσιάζεται παρακάτω.

**Πίνακας 3.9 :** Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης.

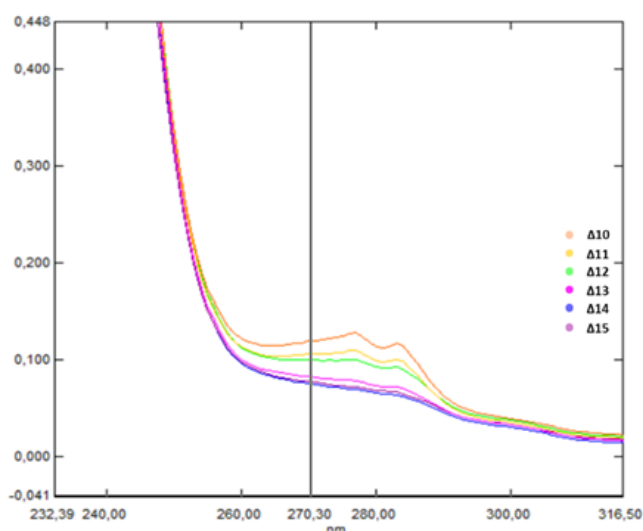
Δείγμα	Πυκνό δείγμα ελαιολάδου (g)	Αραιό δείγμα ελαιολάδου (g)	Περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη (mg/kg)
Δ10	0	10	0
Δ11	1	9	88
Δ12	3	6	261
Δ13	6	3	382
Δ14	8	2	566
Δ15	10	0	820

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση όλων των δειγμάτων με λήψη του πλήρους φάσματος στην περιοχή UV-vis καθώς και τον υπολογισμό των δεικτών K232 και K270. Παρακάτω παρουσιάζονται οι ποιοτικές διαφορές που προέκυψαν από την αύξηση της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης στο ίδιο δείγμα ελαιολάδου.



**Εικόνα 3.12:** Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιοκανθάλης στα 232 nm.

Όπως φαίνεται από το φάσμα απορρόφησης στην περιοχή γύρω από τα 232 nm , όπως και στην περίπτωση της τυροσόλης, υπάρχει διαφορά στα φάσματα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο. Η διαφορά αυτή παρατηρείται λόγω αύξησης της απορρόφησης σε κάποιο σημείο πριν τα 232 nm κοντά στα 220 nm. Η αύξηση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος είναι εμφανές ότι επηρεάζει και την τιμή της απορρόφησης στο μήκος κύματος που μετράται το K232. Αντίστοιχα στην δεύτερη περιοχή ενδιαφέροντος βλέπουμε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης προκαλεί αύξηση της απορρόφησης του δείγματος στην περιοχή κοντά στα 270 nm. Η αύξηση αυτή, όπως παρουσιάστηκε και στα πειράματα της τυροσόλης γίνεται κοντά στα 280 nm, με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης και στα 270 nm.

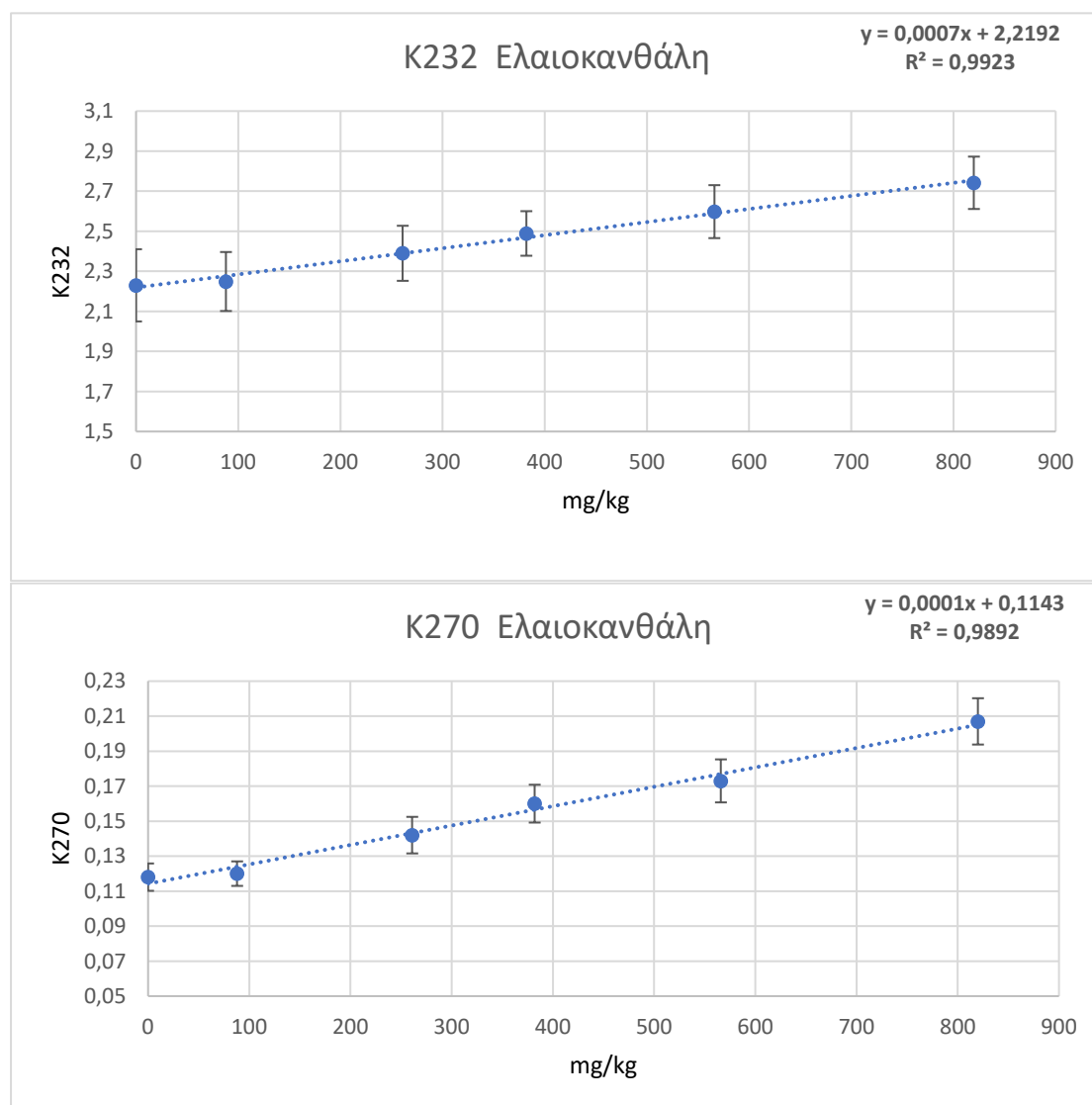


**Εικόνα 3.13:** Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιοκανθάλης στα 270 nm.

Παρακάτω παρουσιάζονται και τα ποσοτικά στοιχεία των μεταβολών που συντελούνται στο δείγμα και αφορούν τους δείκτες K232 και K270

**Πίνακας 3.10: Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα ελαιοκανθάλης.**

	Συγκέντρωση		232			270		
	mg/kg	K232	SD	% Αύξηση	K270	SD	% Αύξηση	
<b>Δ10</b>	0	2,23	0,180	0	0,118	0,008	0	
<b>Δ11</b>	88	2,249	0,147	1	0,12	0,007	2	
<b>Δ12</b>	261	2,390	0,137	7	0,142	0,010	20	
<b>Δ13</b>	382	2,489	0,111	12	0,16	0,011	36	
<b>Δ14</b>	566	2,598	0,132	17	0,173	0,012	47	
<b>Δ15</b>	820	2,742	0,131	23	0,207	0,013	75	



**Διάγραμμα 3.6:** Οι δείκτες K232, και K270 για τα δείγματα ελαιοκανθάλης.



**Διάγραμμα 3.7:** Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών K από την προσθήκη ελαιοκανθάλης.

Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει αρκετά καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της απορρόφησης στα 232nm και 270 nm και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης. Η προσθήκη της ελαιοκανθάλης στο δείγμα άλλαξε τελείως τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά, όπως τουλάχιστον αυτά ορίζονται από τον ορισμό που υπάρχει για τους δείκτες K.

Το αρχικό δείγμα ελαιολάδου είχε σχετικά υψηλό δείκτη K232 ο οποίος όμως ήταν ακόμα εντός των ορίων που έχει θεσπιστεί για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Βλέπουμε όμως ότι από το τέταρτο κιόλας δείγμα ελαιολάδου στο οποίο έχουν προστεθεί 382 mg/kg ελαιοκανθάλης το δείγμα κατέστη παρθένο ελαιόλαδο υποβαθμίζοντας μια κατηγορία στην αξιολόγηση του ως προς την οξειδωτική του κατάσταση. Όσο αυξανόταν μάλιστα η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης στο δείγμα η τιμή του K232 έφτασε μέχρι και το 2,742. Αλλά και στην μέτρηση του K270 παρατηρήθηκε ότι το ελαιόλαδο ξεκίνησε αρχικά με πολύ καλά επίπεδα και μετά την προσθήκη της μέγιστης ποσότητας ελαιοκανθάλης το K270 φτάνει την τιμή 0,207 η οποία , αν και εντός ορίων του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, υποβαθμίζει το ελαιόλαδο. Η αύξηση της τιμής του K270 έφτασε το 73% της αρχικής του τιμής παρουσιάζοντας το δείγμα ως ένα δείγμα οξειδωτικά καταπονημένο.

Είναι φανερό ότι η προσθήκη της ελαιοκανθάλης στο δείγμα επηρέασε σημαντικά την απορρόφηση του δείγματος στο φάσμα UV-vis. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να εμφανίζεται το δείγμα ελαιολάδου ψευδώς, οξειδωτικά καταπονημένο. Στην επόμενη παράγραφο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και στην τυροσόλη με λήψη φασμάτων απορρόφησης για την καθαρή ελαιοκανθάλη χωρίς την παρουσία ελαιολάδου.

ii) Απορρόφηση ελαιοκανθάλης στο κυκλοεξάνιο.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, κατέστη αναγκαίο να μελζτηθούν τα φάσματα της καθαρής ελαιοκανθάλης στο κυκλοεξάνιο και να διαπιστωθεί ποια είναι εκείνα τα σήματα που αθροιστικά με εκείνα των οξειδωμένων προϊόντων του ελαιολάδου, καθιστούν το δείγμα, ψευδώς, παρθένο ελαιόλαδο.

Για τους σκοπούς αυτούς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία διάλυσης της ελαιοκανθάλης σε κυκλοεξάνιο. Αφού υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης στα δείγματα που παρασκευάστηκαν για την μέτρηση των δεικτών K, επιχειρήθηκε να παρασκευαστούν ίδιας συγκέντρωσης διαλύματα καθαρής ελαιοκανθάλης σε κυκλοεξάνιο.

Για την διάλυση της ελαιοκανθάλης ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία της διάλυσης ελαιοκανθάλης γνωστής καθαρότητας, σε 250 μL διοξάνης. Συγκεκριμένα διαλύθηκε ποσότητα εκχυλίσματος που περιείχε 4,68 mg καθαρής ελαιοκανθάλης σε 2,5 mLmL διοξάνης. Αφού έγινε η πλήρης διάλυση του εκχυλίσματος, 250 μL του διαλύματος τα οποία προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στην συνέχεια συμπληρώθηκε με κυκλοεξάνιο μέχρι την χαραγή της φιάλης. Το τελικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 0,46 mg/100 mLmL κυκλοεξανίου και θα αντιστοιχούσε στο διάλυμα που θα παρασκευάζονταν για την μέτρηση των δεικτών K, ελαιολάδου με περιεκτικότητα 780 mg/kg

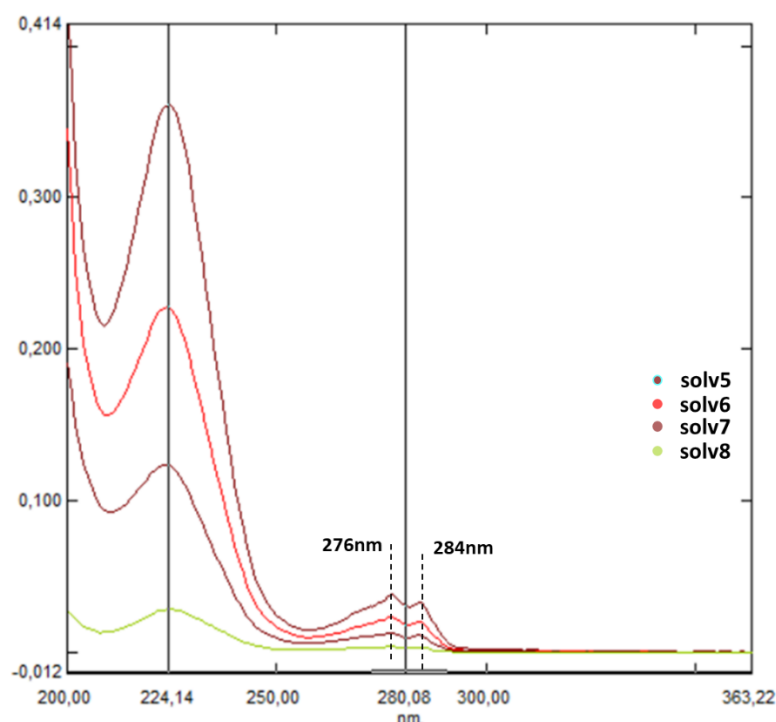
Με κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάστηκαν άλλα 3 διαλύματα με μειούμενη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης. Παράλληλα, όπως στην περίπτωση της τυροσόλης, παρασκευάστηκε τυφλό διάλυμα διοξάνης σε κυκλοεξάνιο (0,250 mL/100 mL) και κάνοντας τις ίδιες αραιώσεις παρασκευάσαμε τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διόρθωση της γραμμής βάσης των φασμάτων απορρόφησης.

**Πίνακας 3.11:** Στοιχεία απορρόφησης διαλυμάτων ελαιοκανθάλης.

Διάλυμα	Συγκέντρωση Διαλύματος mg/100mL	Θεωρητική περιεκτικότητα ελαιολάδου mg/kg	232 nm		270 nm		K232		K270	
			A	SD	A	SD	K	SD	K	SD
Solv5	0,46	780	0,266	0,017	0,028	0,002	1,4155	0,027	0,0469	0,003
Solv6	0,322	546	0,163	0,014	0,018	0,002	1,3492	0,021	0,0302	0,003
Solv7	0,184	312	0,087	0,007	0,012	0,001	1,0802	0,011	0,0201	0,002
Solv8	0,092	156	0,021	0,000	0,004	0,000	0,7822	0,000	0,0067	0,000

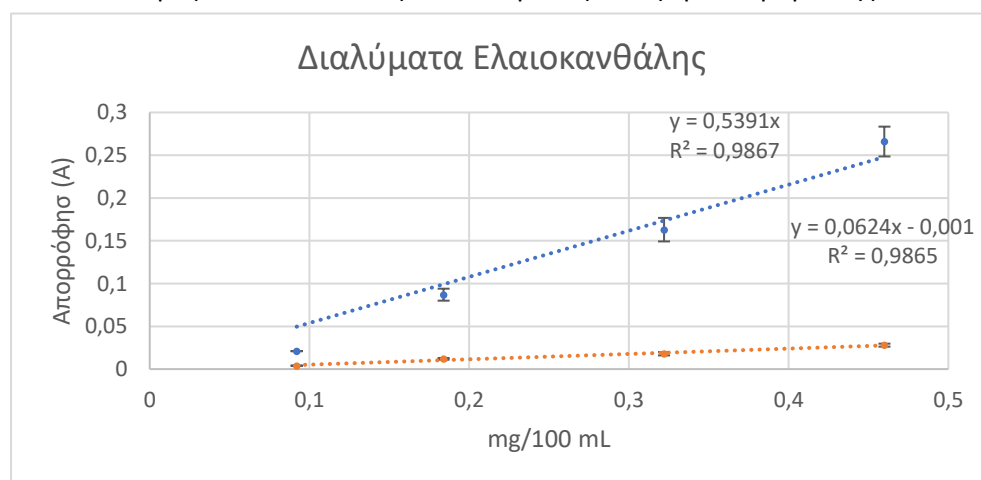


Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα της καθαρής ελαιοκανθάλης για όλες τις συγκεντρώσεις:



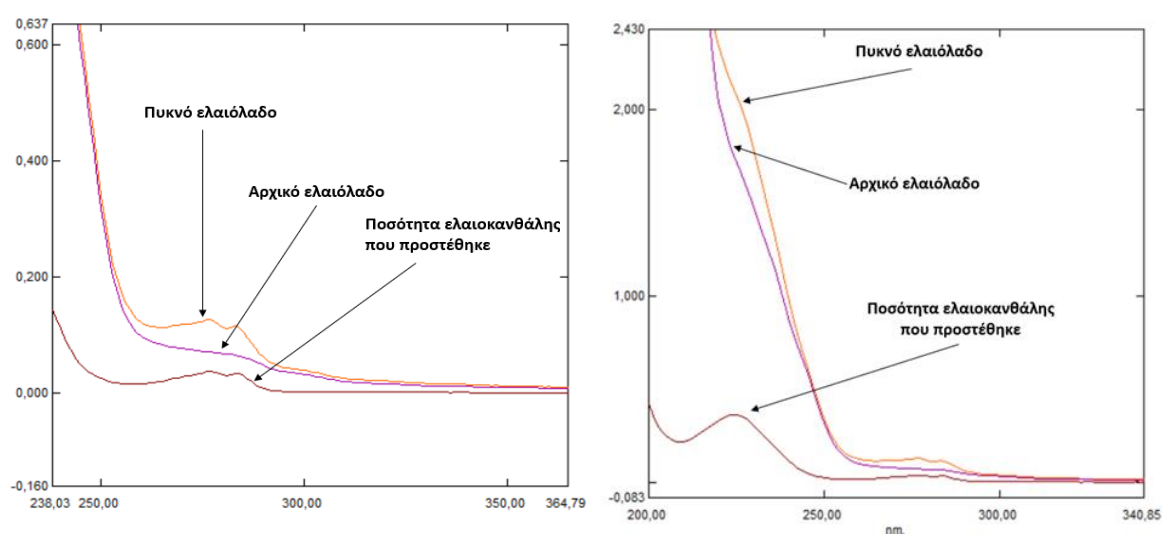
**Εικόνα 3.14:** Φάσμα απορρόφησης των 4 διαλυμάτων ελαιοκανθάλης.

Στο προηγούμενο φάσμα (Εικόνα 3.14) φαίνονται ξεκάθαρα τα σήματα που δίνει η ελαιοκανθάλη στο UV-vis για τις διάφορες συγκεντρώσεις. Η ελαιοκανθάλη παρουσιάζει παρόμοια σήματα στην περιοχή κοντά στα 280 nm με την τυροσόλη. Εκεί εμφανίζοντας δύο εμφανή σήματα στα 276 nm και 284 nm τα οποία αποδίδονται στον φαινολικό δακτύλιο της ελαιοκανθάλης. Τα σήματα αυτά προέρχονται από την ίδια χρωμοφόρο ομάδα που απορροφούσε στην τυροσόλη καθώς η ελαιοκανθάλη όπως έχει ήδη αναφερθεί, φέρει τον δακτύλιο του π-υδρόξυ βενζολίου. Παράλληλα παρατηρήθηκε χαρακτηριστική κορυφή στα 224 nm η οποία προφανώς αποδίδεται τόσο στα υδροξύλια όσο και στις αλδεϋδομάδες που φέρει το μόριο της ελαιοκανθάλης.



**Διάγραμμα 3.8:** Απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης και των θεωρητικών δεικτών K για τα διαλύματα ελαιοκανθάλης.

Παρατηρήθηκε και εδώ ότι οι εξισώσεις παλινδρόμησης που προέκυψαν από τις καμπύλες που κατασκευάσαμε ήταν μικρότερες από αυτές που εμφανίζονται στα φάσματα του ελαιολάδου. Αυτό οφείλεται στην προσθετικές απορροφήσεις των χρωμοφόρων ομάδων που απορροφούν σε παρεμφερή μήκη κύματος. Επίσης παρατηρήσαμε ότι ενώ οι απορροφήσεις στα 270 nm είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τις αντίστοιχες της τυροσόλης, οι απορροφήσεις στα 232 nm για την ελαιοκανθάλη ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της τυροσόλης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο, γιατί αν και η τυροσόλη έχει μικρότερο μοριακό βάρος από την ελαιοκανθάλη, ο συνολικός αριθμός χρωμοφόρων ομάδων που απορροφούν κοντά στα 220 nm είναι σημαντικά μεγαλύτερος σε ένα διάλυμα ελαιοκανθάλης, από το αντίστοιχο διάλυμα της τυροσόλης.



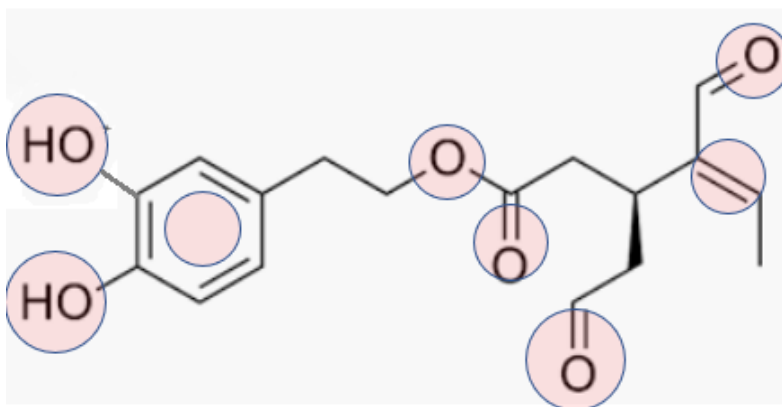
**Εικόνα 3.15:** Φάσμα απορρόφησης του δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά την προσθήκη τυροσόλης, και της αντίστοιχης ποσότητας καθαρής τυροσόλης.

Στα φάσματα της Εικόνας 3.15 έγινε σύγκριση του φάσματος απορρόφησης του πυκνού ελαιολάδου που παρασκευάστηκε με του αρχικού δείγματος ελαιολάδου και την ποσότητα ελαιοκανθάλης που προστέθηκε. Είναι φανερό ότι η προσθήκη φαινολικών συστατικών, όπως η ελαιοκανθάλη, μεταβάλλει σημαντικά το φάσμα απορρόφησης του ελαιολάδου και μάλιστα σε περιπτώσεις που αφορούν πλούσια σε φαινολικά συστατικά ελαιόλαδα, οδηγούν σε παραπλανητικά συμπεράσματα.

### 3.3.5 Επίδραση της ελαιασίνης τους δείκτες Κ.

#### i) Προσθήκη ελαιασίνης σε ελαιόλαδο.

Στην προσπάθεια να διαπιστωθεί κατά πόσο το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου επηρεάζει την απορρόφηση του διαλύματος που προορίζεται για μέτρηση των δεικτών Κ, έχουμε δει μέχρι στιγμής την επίδραση που έχει η τυροσόλη και η ελαιοκανθάλη. Στην παράγραφο αυτή, διερευνήθηκε η επίδραση που έχει μια άλλη κύρια φαινόλη του ελαιολάδου, η ελαιασίνη.



**Εικόνα 3.16:** Οι χρωμοφόρες ομάδες της ελαιασίνης.

Η ελαιασίνη έχει την ιδιαιτερότητα ότι δεν φέρει τον δακτύλιο τυροσόλης που έχει ήδη μελετηθεί αλλά τον δακτύλιο υδροξυτυροσόλης. Αποκτάει λοιπόν μια επιπλέον χρωμοφόρο ομάδα η οποία προσδίδει ένα νέο σήμα στο φάσμα απορρόφησης η οποία το επηρεάζει διαφορετικά

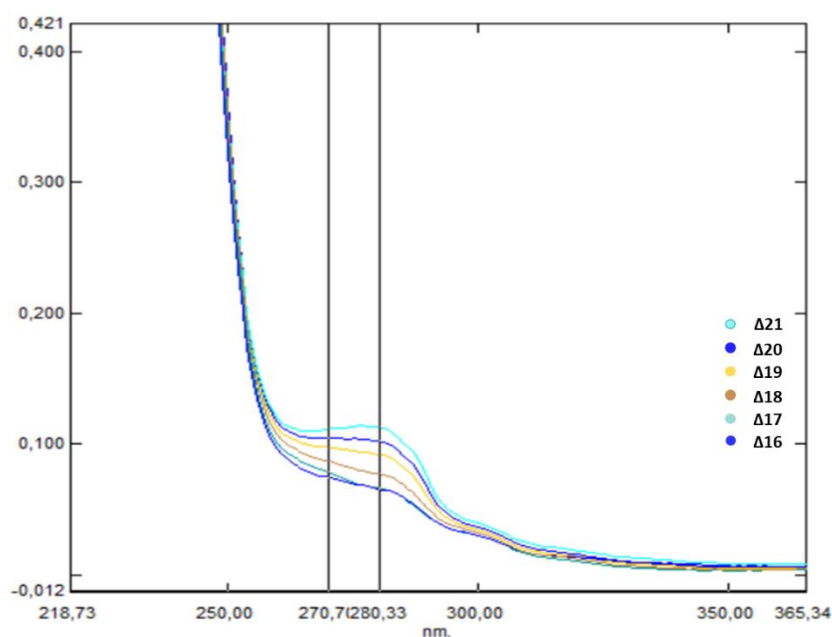
Για την μελέτη της επίδρασης της ελαιασίνης στους δείκτες Κ εργαστήκαμε και εδώ με την ίδια διαδικασία. Διαλύθηκε μια ποσότητα ελαιασίνης σε μια μικρή ποσότητα διοξάνης και στην συνέχεια το διάλυμα αυτό αναμίχθηκε με το ελαιόλαδο. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 45 mg ελαιασίνης σε 250 μL διοξάνης και στην συνέχεια αναμίχθηκαν με 100 g ελαιολάδου (Δ21). Αφού το ελαιόλαδο ομογενοποιήθηκε καλά πραγματοποιήθηκε ανάλυση φαινολικών συστατικών για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιασίνης στο πυκνό δείγμα. Μετά την ανάλυση προέκυψε ότι το πυκνό διάλυμα περιείχε 356 mg/kg.

Στην συνέχεια με κατάλληλες αναμίξεις του πυκνού ελαιολάδου και του αρχικού μηδενικού διαλύματος παρασκευάστηκαν συνολικά 5 δείγματα ελαιολάδου, τα οποία υποβλήθηκαν και αυτά σε ανάλυση φαινολικών συστατικών.

**Πίνακας 3.12:** Παρασκευή δειγμάτων διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης.

Δείγμα	Πυκνό δείγμα ελαιολάδου (g)	Αραιό δείγμα ελαιολάδου (g)	Περιεκτικότητα σε ελαιασίνη (mg/kg)
Δ16	0	10	0
Δ17	2	8	86
Δ18	4	6	125
Δ19	6	4	211
Δ20	8	2	272
Δ21	10	0	356

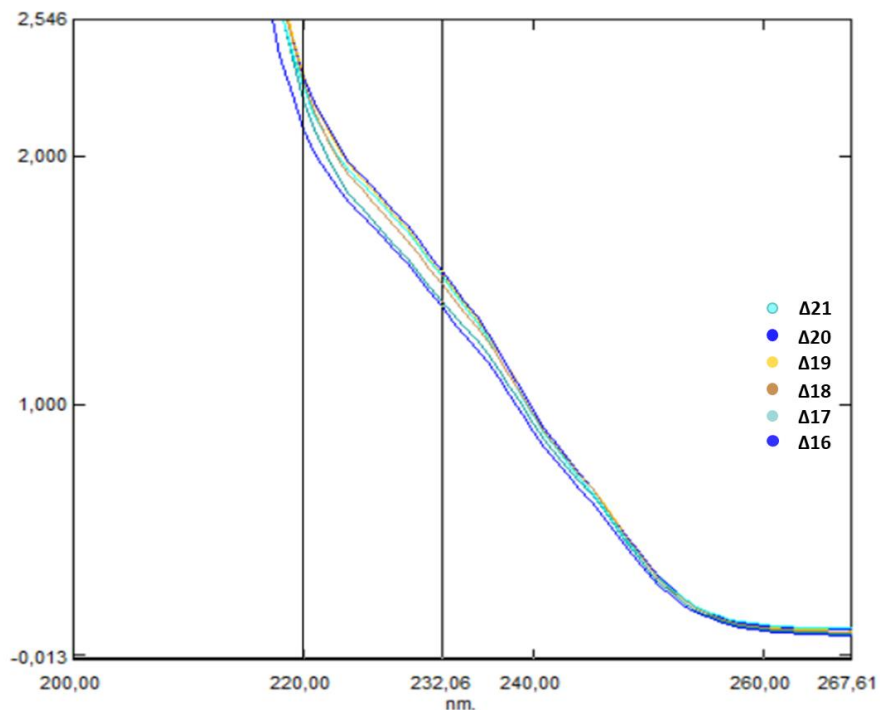
Επίσης πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση όλων των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν τόσο με την μέτρηση των δεικτών K232 και K 270 όσο και με την λήψη του πλήρους φάσματος απορρόφησης στην περιοχή UV-vis.



**Εικόνα 3.17:** Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιασίνης στα 270 nm.

Στο φάσμα απορρόφησης παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης στην περιοχή γύρω από τα 280 nm. Η μορφή του φάσματος εδώ φαίνεται ελαφρώς διαφορετική από την περίπτωση του φάσματος της ελαιοκανθάλης καθώς οι μέγιστες απορροφήσεις εμφανίζονται στα 280 nm ακριβώς και όχι υπό την μορφή 2 κορυφών στα 276 και 284 nm. Παράλληλα παρατηρήθηκε ότι αυτή η έντονη απορρόφηση επηρέασε σημαντικά και την τιμή της απορρόφησης στα 270 nm.

Εκτός από την περιοχή αυτή εστιάζοντας και στην περιοχή του φάσματος γύρω από τα 232 nm παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στο φάσμα απορρόφησης του ελαιολάδου κοντά στα 220 nm όπως ακριβώς και στα φάσματα της ελαιοκανθάλης, διαφοροποιήσεις που επηρεάζουν και τις τιμές της απορρόφησης στα 232nm.

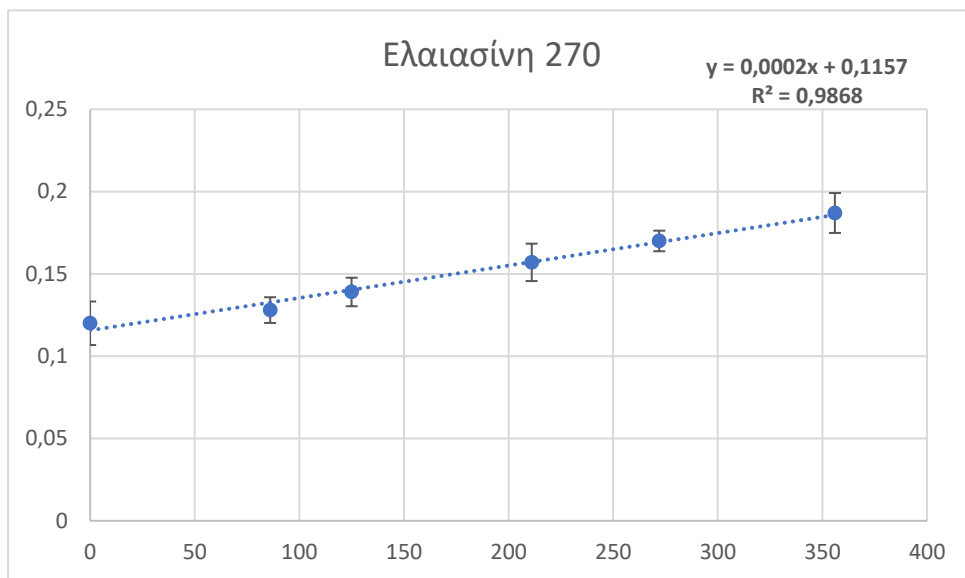
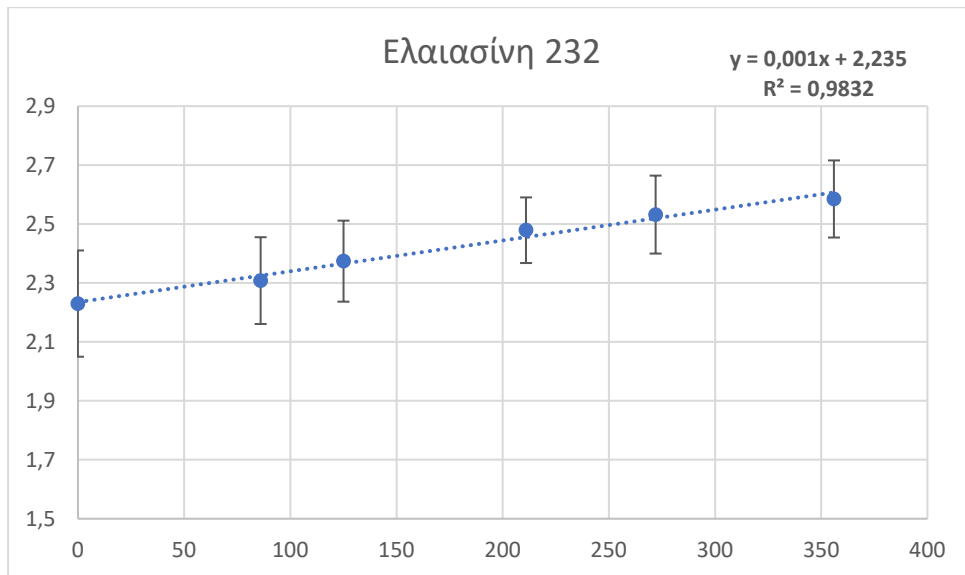


**Εικόνα 3.18:** Το φάσμα UV-vis για τα 5 δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ελαιασίνης στα 232 nm.

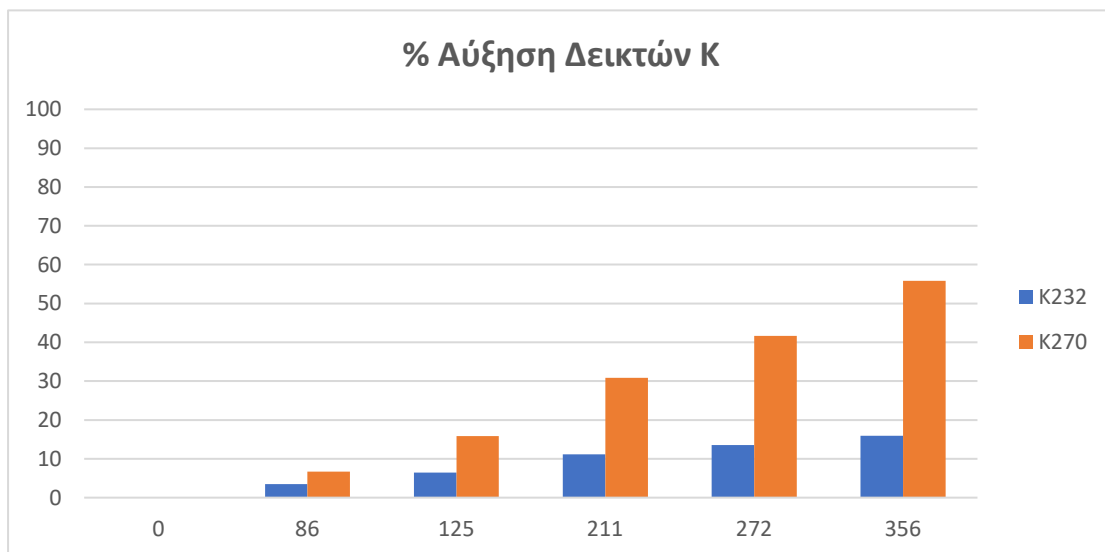
Στους επόμενους Πίνακες και Διαγράμματα παρουσιάζονται και τα ποσοτικά στοιχεία των μεταβολών αυτών με την μέτρηση των δεικτών K232 και K270, καθώς και τα ποσοστά αύξησης της απορρόφησης που οφείλονται στην αύξηση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης.

**Πίνακας 3.13:** Στοιχεία απορρόφησης για τα δείγματα ελαιασίνης.

	Συγκέντρωση		232 nm			270 nm		
	mg/kg	K232	SD	% Αύξηση	K270	SD	% Αύξηση	
Δ1	0	2,23	0,156	0	0,12	0,013	0	
Δ2	86	2,308	0,175	0	0,128	0,008	7	
Δ3	125	2,374	0,180	3	0,139	0,009	16	
Δ4	211	2,479	0,104	8	0,157	0,011	31	
Δ5	272	2,532	0,108	10	0,17	0,006	42	
Δ6	356	2,585	0,131	12	0,187	0,012	56	



**Διάγραμμα 3.9:** Οι δείκτες K232, και K270 για τα δείγματα ελαιασίνης.



**Διάγραμμα 3.10:** Ποσοστιαία αύξηση των δεικτών Κ από την προσθήκη ελαιασίνης.

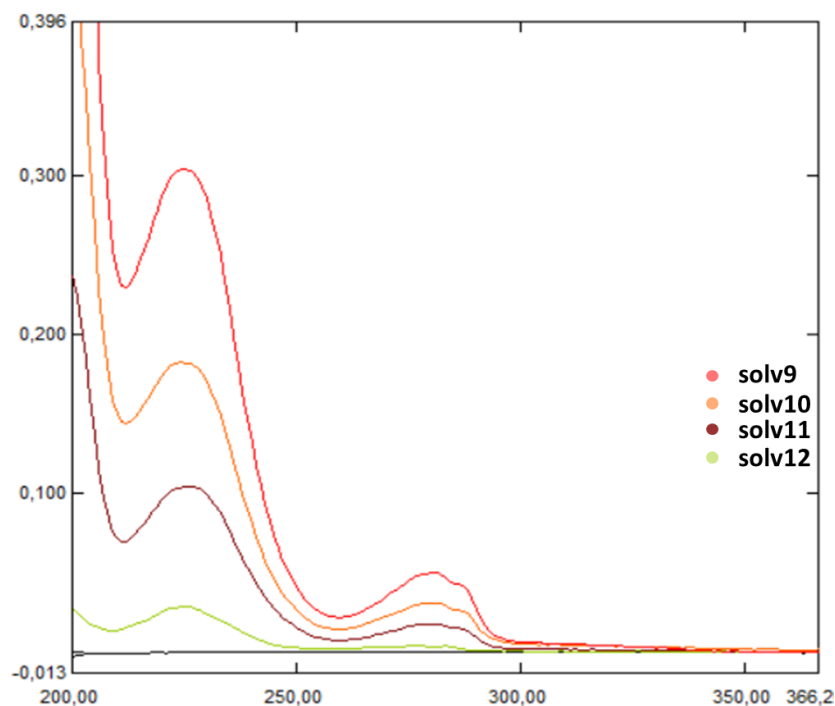
Από τα διαγράμματα ήταν φανερό, ότι και πάλι με την αύξηση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης υπήρξε σημαντική αύξηση των δεικτών K232 και K270. Η αύξηση αυτή στην συγκεκριμένη περίπτωση ελαιολάδου με ήδη υψηλούς δείκτες K, έφτασε το 56% για τον δείκτη K270 ενώ για τον δείκτη K232, θα δούμε ότι από την προσθήκη έστω και των 270 mg ελαιασίνης κιόλας, ποσότητα που βρίσκεται πολύ κοντά και στο όριο που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για να θεωρηθεί ένα ελαιόλαδο ως υγειοπροστατευτικό, παρατηρήθηκε ότι ξεπέρασε το όριο για να συγκαταλέγεται στα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα. Παρατηρήθηκε δηλαδή και πάλι το παράδοξο αποτέλεσμα όπου ο λόγος για τον οποίο το ελαιόλαδο θεωρείται υγειοπροστατευτικό, είναι και ο λόγος που το ελαιόλαδο παύει να χαρακτηρίζεται και ως εξαιρετικά παρθένο.

ii) Η απορρόφηση της Ελαιασίνης στο κυκλοεξάνιο .

Όπως και για τις άλλες δύο κύριες φαινόλες που μελετήθηκαν, μελετήθηκε και η απορρόφηση της ελαιασίνης στο κυκλοεξάνιο και διερευνήθηκε το κατά πόσο συσχετίζονται τα αποτελέσματα αυτά με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στο ελαιόλαδο.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε όπως στην τυροσόλη και την ελαιοκανθάλη, που περιλαμβάνει διάλυση γνωστής ποσότητας ελαιασίνης σε διοξάνη και αραιώση της σε διάλυμα κυκλοεξανίου. Έτσι ζυγίστηκαν 4,6 mg ελαιασίνης τα οποία διαλύθηκαν σε 2,5 mL διοξάνης. Μετά την πλήρη διάλυση της ελαιασίνης σε 250 mL του διαλύματος, αυτά προστέθηκαν σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL όπου και αραιώθηκαν με κυκλοεξάνιο μέχρι την χαραγή. Το τελικό διάλυμα (0,25mL διοξάνη/100 mL κυκλοεξανίου) είχε συγκέντρωση 0,46 mg/100 mL και θα αντιστοιχούσε σε ένα διάλυμα που θα είχε προκύψει από την ζύγιση 150 mg ελαιολάδου με περιεκτικότητα σε ελαιασίνη 780 mg/kg.

Στην συνέχεια και με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν άλλα 3 διαλύματα με μειούμενη συγκέντρωση σε ελαιασίνη και τέλος πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση των διαλυμάτων.



**Εικόνα 3.19:** Φάσμα απορρόφησης των 4 διαλυμάτων ελαιασίνης.

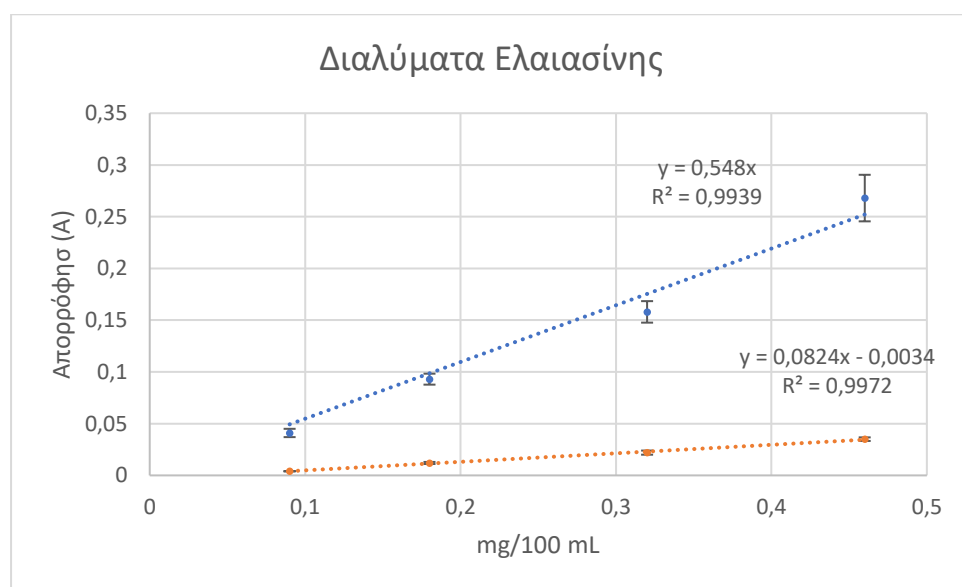
Από τα φάσματα που λάβαμε παρατηρήθηκαν οι διαφορετικές απορροφήσεις για τις διάφορες συγκεντρώσεις. Σημαντική παρατήρηση προκύπτει από τις απορροφήσεις στην περιοχή γύρω από τα 280 nm. Η μορφή του φάσματος σε αυτήν την περιοχή, ήταν διαφορετική από τις περιπτώσεις της ελαιοκανθάλης και της τυροσόλης. Η διαφορετική μορφή του φάσματος οφείλεται στον διαφορετικό φαινολικό δακτύλιο της υδροξυτυροσόλης και του επιπλέον υδροξυλίου. Οι απορροφήσεις γύρω από τα 220 nm ήταν πολύ κοντά στις απορροφήσεις της ελαιοκανθάλης. Οι απορροφήσεις που εμφανίζονται συμβάλουν αθροιστικά στις ήδη υπάρχουσες των οξειδωμένων προϊόντων του ελαιολάδου με αποτέλεσμα η αθροιστική απορρόφηση που εμφανίζεται στο ελαιόλαδο να είναι αυξημένη.

Στους επόμενους Πίνακες και Διαγράμματα παρουσιάζονται τα ποσοτικά στοιχεία και τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Για επεξηγηματικούς λόγους παρουσιάζουμε και τους δείκτες K, όπως αυτοί θα προέκυπταν εάν τα διαλύματα αυτά είχαν προέλθει από την ζύγιση 150mg ελαιολάδου.



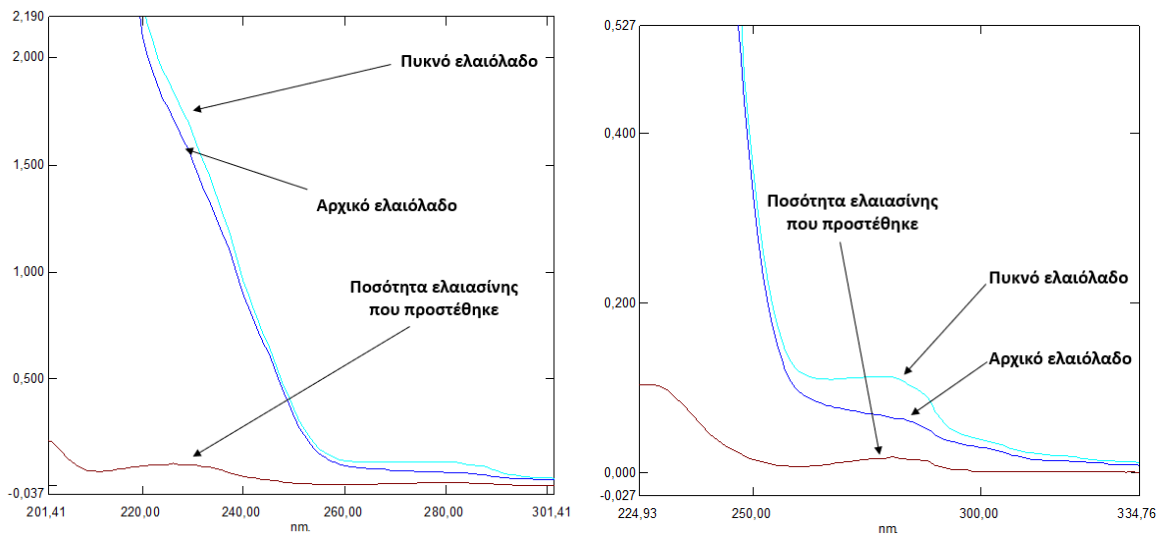
**Πίνακας 3.14:** Στοιχεία απορρόφησης διαλυμάτων ελαιασίνης.

Διάλυμα	Συγκέντρωση Διαλύματος mg/100mL	Θεωρητική περιεκτικότητα ελαιολάδου mg/kg	232		270		K232		K270	
			A	SD	A	SD	K	SD	K	SD
Solv9	0,46	0,017	780	0,268	0,023	0,035	0,002	0,447	0,058	0,46
Solv10	0,32	0,024	546	0,158	0,010	0,022	0,002	0,263	0,037	0,32
Solv11	0,18	0,015	312	0,093	0,005	0,012	0,001	0,155	0,02	0,18
Solv12	0,09	0,005	156	0,041	0,004	0,004	0,000	0,068	0,007	0,09



**Διάγραμμα 3.11:** Απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης και των θεωρητικών δεικτών K για τα διαλύματα ελαιασίνης.

Κατά προσέγγιση μπορούν να συγκριθούν τα φάσματα του αρχικού ελαιολάδου, το φάσμα του ελαιολάδου στο οποίο έχουν προστεθεί 356 mg/kg ελαιασίνης και του φάσματος της αντίστοιχης ελαιασίνης (Διάλυμα που αντιστοιχεί σε ελαιόλαδο με 312 mg/kg).



**Εικόνα 3.20:** Φάσμα απορρόφησης του δείγματος ελαιόλαδου πριν και μετά την προσθήκη ελαιασίνης, και της αντίστοιχης ποσότητας καθαρής ελαιασίνης.

### 3.3.5 Δείκτες K και οξειδωτική αλλοίωση του ελαιολάδου.

Στις προηγούμενες παραγράφους, παρουσιάστηκε αναλυτικά η επίδραση που έχουν 3 κύρια φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου στο φάσμα απορρόφησης διαλύματος ελαιολάδου (1%) στην περιοχή 200-800 nm. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών είδαμε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τελική απορρόφηση των δειγμάτων αυτών και έγινε σαφές, ότι πολύ εύκολα μπορούμε να οδηγηθούμε σε παραπλανητικά αποτελέσματα.

Επιστρέφοντας στον αρχικό ορισμό των δεικτών K, υπενθυμίζεται ότι πρακτικά δείχνουν το μέγεθος της οξειδωτικής αλλοίωσης που έχει υποστεί το ελαιόλαδο. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι συστατικά που βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση στο ελαιόλαδο, όπως η χλωροφύλλη και τα φαινολικά συστατικά δρουν προστατευτικά στο ελαιόλαδο, έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων του ελαιολάδου. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψε το παράδοξο αποτέλεσμα ότι, η προσθήκη συστατικών που σχετίζονται με πολύ σημαντικές υγειοπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς και με την προστασία του ελαιολάδου από την οξείδωση, είναι η ίδια αιτία για ένα ελαιόλαδο, ψευδώς οξειδωμένου και ακατάλληλο να χαρακτηριστεί ως εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έγινε αναφορά σε συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών που αφορούν τόσο στην πλειοψηφία των δειγμάτων ελαιολάδου που μπορεί να προμηθευτεί ο καταναλωτής δηλαδή ελαιόλαδα με χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, αλλά και σε μια αναδυόμενη κατηγορία ελαιολάδων, τα οποία περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών. Ο ορισμός του πλούσιου έναντι του φτωχού φαινολικού περιεχομένου είναι ένα θέμα το οποίο θα μας απασχολήσει σε επόμενο κεφάλαιο. Είναι όμως σαφές ότι η επίδραση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών της δείκτες K, είναι μικρότερη στα ελαιόλαδα με χαμηλό φαινολικό περιεχόμενο και μεγαλύτερη στα ελαιόλαδα με πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο. Στο κομμάτι αυτό θα ασχοληθήκαμε περισσότερο με τα προβλήματα που δημιουργούνται στον ίδιο τον ορισμό των δεικτών K .

Από την στιγμή που οι δείκτες K θεσπίστηκαν ως κριτήριο ποιότητας του ελαιολάδου, απέκτησαν και έναν ιδιαίτερο ρόλο στην εμπορική αξία του ελαιολάδου. Τόσο ο εμπορικός κόσμος όσο και το καταναλωτικό κοινό, αξιολογώντας την διατροφική αξία του προϊόντος εμπιστεύονται στο κριτήριο αυτό. Έτσι, μπορούσε να προβλέψει κανείς, της ένα ελαιόλαδο με πολύ χαμηλούς δείκτες K232 και K270, εάν συντηρούνταν υπό της κατάλληλες συνθήκες, θα είχε μεγαλύτερη “διάρκεια ζωής” ως εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο σε σχέση με ένα ελαιόλαδο το οποίο έχει χαρακτηριστεί μεν ως εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αλλά έχει υψηλούς δείκτες K.

Η διαδικασία της οξείδωσης που εξηγήθηκε εισαγωγικά, περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων οι οποίες εξαρτώνται, εκτός των άλλων, και από τον χρόνο, την θερμοκρασία αποθήκευσης, το φως, αλλά και το ποσοστό των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών συστατικών. Στην παράγραφο που θα ακολουθήσει, θα παρουσιάσουμε την διαφορετική οξειδωτική πορεία που ακολουθεί ένα ελαιόλαδο παρουσία και μη, των φαινολικών συστατικών.

*Επίδραση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου.*

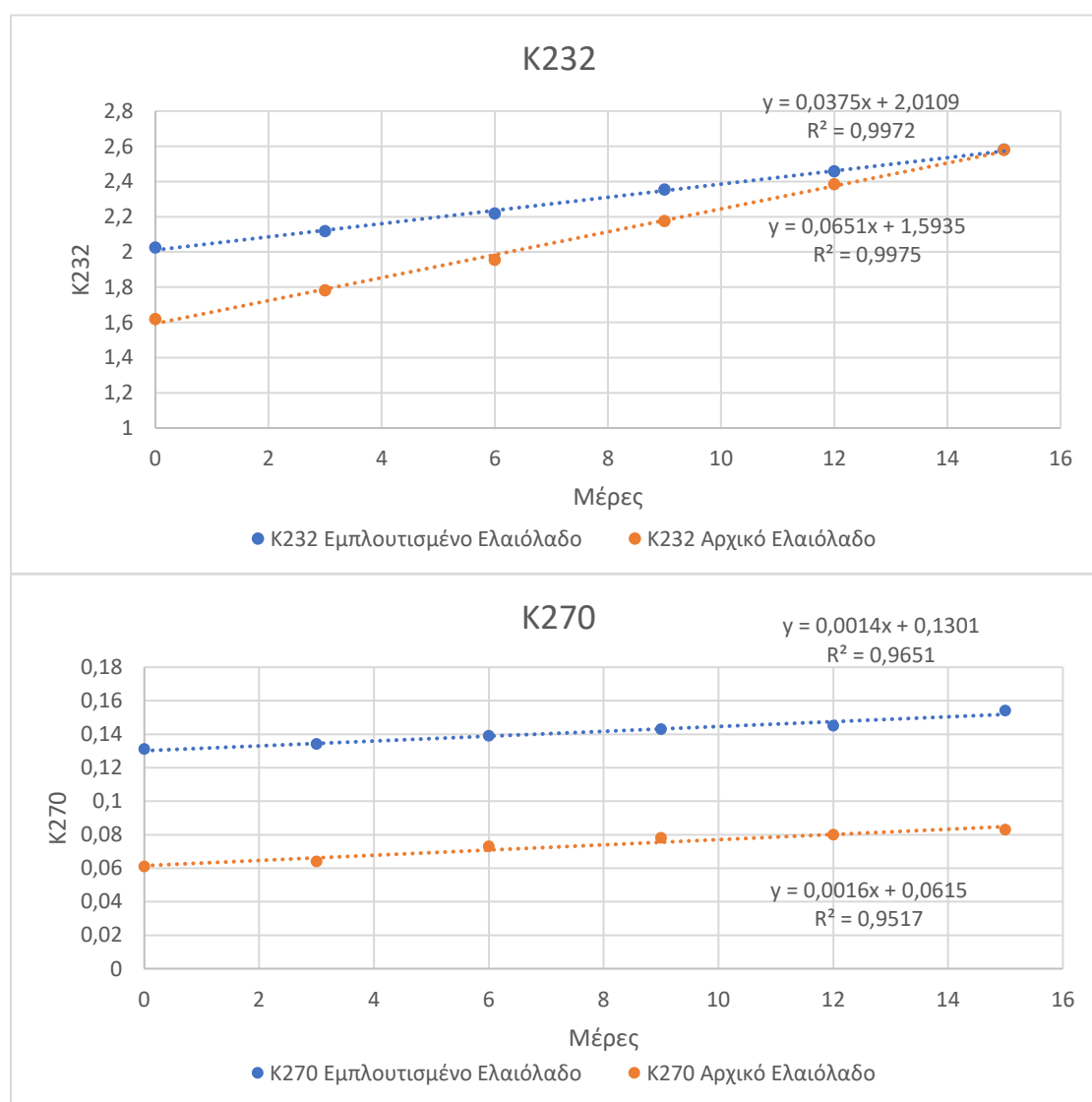
Η μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας του ελαιολάδου, και των συνθηκών αποθήκευσης έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν. Σε πολλές μελέτες μάλιστα, έχει χρησιμοποιηθεί η διαδικασία της θερμικής καταπόνησης του ελαιολάδου ως μοντέλο πρόβλεψης. Κατά την διαδικασία αυτή, η οξείδωση επισπεύδεται από την αποθήκευση του ελαιολάδου σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και αυξημένης παροχής οξυγόνου. Η θερμοκρασία και η παρουσία του οξυγόνου λειτουργούν καταλυτικά στην επίσπευση των οξειδωτικών αντιδράσεων, δημιουργώντας έτσι ένα είδος μοντέλου πρόβλεψης της οξειδωτικής πορείας του ελαιολάδου.

Στην παράγραφο αυτή γίνεται σύγκριση της οξειδωτικής σταθερότητας της ελαιολάδου το οποίο έχει μηδενικό φαινολικό φορτίο, και άρα πολύ χαμηλή οξειδωτική προστασία, και του ίδιου ελαιολάδου στο οποίο έχει γίνει προσθήκη φαινολικών συστατικών. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με απλή διάλυση εκχυλίσματος που περιείχε μίγμα φαινολικών συστατικών χωρίς την προσθήκη διαλύτη. Τα δύο ελαιόλαδα χωρίστηκαν σε διαφορετικά διάφανα φιαλίδια των 10 mL. Όλα τα φιαλίδια αποθηκεύτηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 50 °C για 15 μέρες. Κάθε 3 ημέρες παραλαμβάναμε ένα vial από κάθε ελαιόλαδο και γινόταν μέτρηση των δεικτών K232 και K270.

Στους αμέσως επόμενους Πίνακες και Διαγράμματα παρουσιάζονται τα συνολικά στοιχεία των δειγμάτων και τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

**Πίνακας 3.15:** Η εξέλιξη των δεικτών Κ, κατά την διάρκεια της θερμικής καταπόνησης.

Ημέρες	Εμπλουτισμένο Ελαιόλαδο		Αρχικό ελαιόλαδο	
	K232	K270	K232	K270
0	2,024	0,131	1,618	0,061
3	2,118	0,134	1,78	0,064
6	2,218	0,139	1,955	0,073
9	2,354	0,143	2,175	0,078
12	2,457	0,145	2,383	0,08
15	2,58	0,154	2,579	0,083



**Διάγραμμα 3.12:** Απεικόνιση της εξέλιξης των δεικτών Κ.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρήθηκε ότι τα δύο ελαιόλαδα ακολούθησαν την ίδια οξειδωτική πορεία στα 270 nm αλλά τελείως διαφορετική πορεία στα 232 nm. Συγκεκριμένα στο K232 το ελαιόλαδο που δεν περιείχε φαινολικά συστατικά, είχε τον διπλάσιο ρυθμό αύξησης της τιμής του K232 σε σχέση με όταν του προσθέσαμε φαινολικά συστατικά. Τελικά τα δύο ελαιόλαδα σε βάθος χρόνου (15 μέρες θερμικής καταπόνησης ) έφτασαν μαζί το όριο του  $K232=2.500$

Έτσι λοιπόν είδαμε μια χαρακτηριστική περίπτωση που έχουμε ένα ελαιόλαδο με εξαιρετικά χαμηλούς δείκτες K ( $K232=1,618$  και  $K270=0,073$ ). Ο εμπορικός κόσμος και το καταναλωτικό κοινό, λογικώς, θα θεωρήσει ότι το συγκεκριμένο προϊόν αποτελεί ένα ελαιόλαδο που αναμφισβήτητα ανήκει στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου και επιπροσθέτως έχει καλλιεργηθεί και ελαιοποιηθεί με τις βέλτιστες συνθήκες, γεγονός που του δίνει και μεγάλη διάρκεια ζωής.

Αντίστοιχα ο καταναλωτής και κυρίως όσοι ασχολούνται με το εμπόριο του ελαιολάδου, θα δούν ένα δεύτερο προϊόν το οποίο στην πραγματικότητα είναι ακριβώς το ίδιο ελαιόλαδο, το οποίο και αυτό ανήκει στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, ωστόσο, εμφανίζει σχετικά αυξημένους δείκτες K. Μη γνωρίζοντας ότι η διαφορά οφείλεται στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, είναι πιθανό να απορρίψει την περίπτωση του δεύτερου ελαιολάδου καθώς αυτό θα εμφάνιζε θεωρητικά μικρότερη διάρκεια ζωής.

### 3.3.6 Μέτρηση δεικτών K μετά από εκχύλιση του ελαιολάδου.

Στην τελευταία παράγραφο του κεφαλαίου αυτού έγινε προσπάθεια να συνοψιστούν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, αλλά και να βρεθεί μια διέξοδος στο πρόβλημα που έχει προκύψει με την μέτρηση των δεικτών K.

Όπως φάνηκε, τα φαινολικά συστατικά που μελετήθηκαν, και προφανώς και τα υπόλοιπα που απαντώνται στο ελαιόλαδο, απορροφούν διαφορετικά στο φάσμα απορρόφησης. Το ανωτέρω, σε συνδυασμό και με το γεγονός ότι η απορρόφηση που μετράται είναι αποτέλεσμα της αθροιστικής απορρόφησης όλων των όμοιων και μη, χρωμοφόρων ομάδων που απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρακτικά είναι πολύ δύσκολο να δημιουργήσουμε έναν συντελεστή διόρθωσης των δεικτών K, που να βασίζεται στην συγκέντρωση του κάθε φαινολικού συστατικού. Για να το κάνουμε αυτό θα έπρεπε σε πρώτο στάδιο να γνωρίζουμε την απορρόφηση που οφείλεται στα προϊόντα οξείδωσης αποκλειστικά, και σε δεύτερο επίπεδο να παρασκευαστούν νέες καμπύλες αναφοράς για κάθε διαφορετική τιμή αυτών.

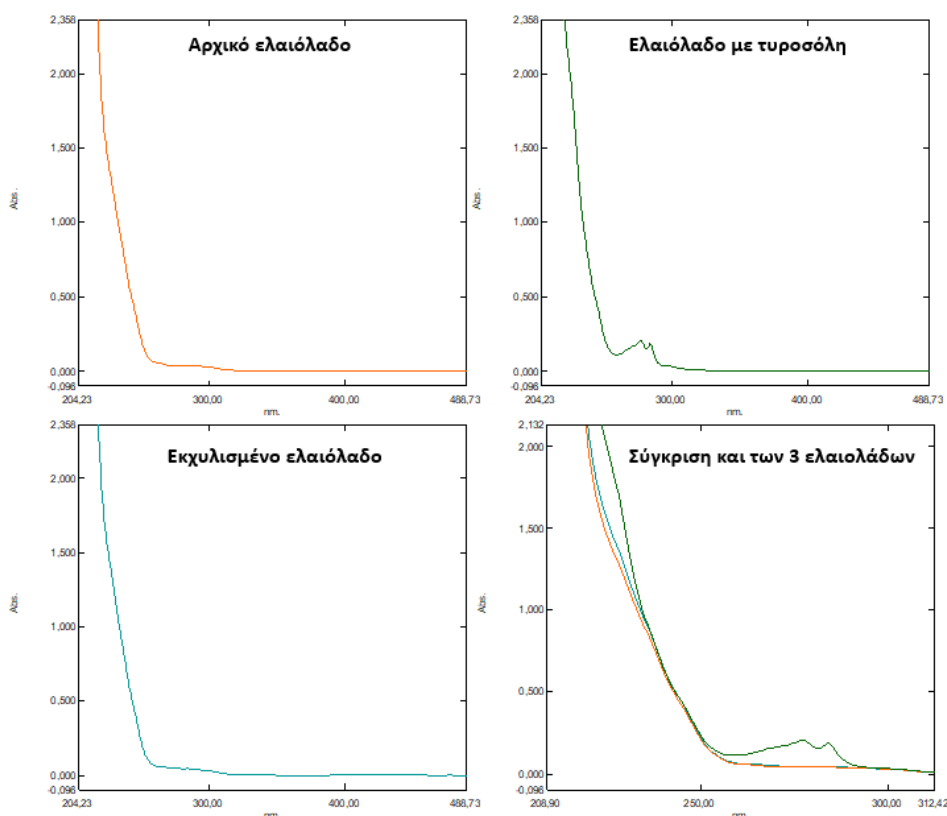
Επιχειρήθηκε λοιπόν να διερευνηθεί, κατά πόσο είναι εφικτή η μέτρηση των δεικτών K μετά την απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών. Ακολουθώντας ένα εναλλακτικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στην βιβλιογραφία, πήραμε ένα ελαιόλαδο το οποίο δεν περιείχε φαινολικά συστατικά και το υποβάλαμε σε φασματοσκοπική ανάλυση. Στην συνέχεια το ελαιόλαδο αυτό, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την πρώτη παράγραφο του κεφαλαίου αυτού, προστέθηκε τυροσόλη στο δείγμα χωρίς την χρήση διαλύτη, υπερήχων ή θερμοκρασίας.

Το ελαιόλαδο μετά από ανάδευση μισής ώρας, φυγοκεντρήθηκε για 25 min στις 4000 rpm ενώ μετά την παραλαβή του υπερκείμενου ελαιολάδου, πραγματοποιήθηκε διήθηση αυτού από χάρτινο ηθμό. Στο τελικό ελαιόλαδο έγινε φασματοσκοπική ανάλυση σε όλη την περιοχή UV-vis.

Τέλος το ελαιόλαδο εκχυλίστηκε με διάλυμα MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) με ανάδευση 1 min σε συσκευή ανάδευσης και 15 min σε συσκευή υπερήχων. Η χρήση υπερήχων θεωρήθηκε ότι δεν θα επηρεάσει τα λιπίδια του ελαιολάδου από την στιγμή που βρίσκονται σε συνεχή παρουσία με τον διαλύτη. Επίσης θεωρήθηκε ότι το διάλυμα MeOH/H<sub>2</sub>O θα εκχυλίσει μόνο πολικά συστατικά όπως την τυροσόλη, και δεν θα επηρεάσει την σύσταση των λιπιδίων. Μετά την εκχύλιση το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 25 min στις 4000 rpm. Από το εν λόγω δείγμα συλλέχθηκε η φάση του ελαιολάδου το οποίο διηθήθηκε δύο φορές σε χάρτινο ηθμό. Στο τέλος πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση όμοια με τις άλλες περιπτώσεις. Παρακάτω παρουσιάζονται και τα 3 φάσματα.

Το αρχικό ελαιόλαδο, όπως φάνηκε και από το φάσμα απορρόφησης, είναι ένα ελαιόλαδο με αρκετά χαμηλές τιμές απορρόφησης στις περιοχές ενδιαφέροντος. Αντίθετα, μετά τον εμπλουτισμό η απορρόφηση στα 232 και 270 nm είναι αρκετά αυξημένη. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα η μέτρηση των δεικτών K θα οδηγούσε στο συμπέρασμα ότι το ελαιόλαδο έχει υποστεί οξειδωτική υποβάθμιση.

Μετά την εκχύλιση του ελαιολάδου με μεθανόλη /νερό, παρατηρήθηκε ότι η απορρόφηση στις τιμές ενδιαφέροντος έχουν μειωθεί σημαντικά. Συγκεκριμένα στην σύγκριση των ολικών φασμάτων απορρόφησης βλέπουμε ότι το αρχικό και το εκχυλισμένο ελαιόλαδο έχουν πανομοιότυπη μορφή.



**Εικόνα 3.21:** Τα φάσματα απορρόφησης του ελαιολάδου, πριν και μετά την προσθήκη τυροσόλης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι από την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και τον εξαντλητικό διαχωρισμό των φάσεων μετά την διαδικασία εκχύλισης είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι δείκτες K, απαλλαγμένοι όμως από την απορρόφηση των φαινολικών συστατικών. Επιβεβαιώνεται επομένως ότι μόνο μετά από την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο πραγματικός βαθμός της οξείδωσης του ελαιολάδου.



### 3.4 Συμπεράσματα.

Τα βασικά κριτήρια με τα οποία αξιολογείται η ποιότητα του ελαιολάδου διεθνώς, είναι η ελεύθερη οξύτητα του ελαιολάδου, ο αριθμός των υπεροξειδίων και τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση του ελαιολάδου στο υπεριώδες, γνωστά και ως δείκτες Κ.

Κάθε κριτήριο ποιότητας μπορεί να φανερώσει την ύπαρξη κάποιας αλλοίωσης του ελαιολάδου, ακόμα και την ύπαρξη ξένου ελαίου. Οι πληροφορίες που μπορούμε να πάρουμε από το κάθε κριτήριο αφορούν σε κάποια διαφορετική αλλοίωση. Στις βασικότερες αλλοιώσεις περιλαμβάνονται η υδρόλυση των τριάκυλο γλυκερολών και η οξείδωση των λιπιδίων. Τα κριτήρια τα οποία μελετώνται αφορούν διαφορετικές αλλοιώσεις οι οποίες χημικά, ακολουθούν διαφορετικό μηχανισμό. Επομένως το αποτέλεσμα της κάθε ανάλυσης δεν είναι απαραίτητο να συμβαδίζει με το αποτέλεσμα των άλλων κριτηρίων.

Ωστόσο, η ύπαρξη δειγμάτων ελαιολάδου, στα οποία λήφθηκαν αντικρουόμενες πληροφορίες για τους ίδιους μηχανισμούς, οδήγησε στο να μελετηθεί η ακρίβεια της μέτρησης των δεικτών Κ, και η επίδραση που έχει το φαινολικό φορτίο του ελαιολάδου στην τελική τους τιμή.

Στην παρούσα ενότητα έγινε για πρώτη φορά ποσοτικοποίηση της απορρόφησης των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο σε διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση των δεικτών Κ. Κατά την προσθήκη ποσότητας απλών φαινολών όπως η τυροσόλη, υπήξε σημαντική αύξηση της απορρόφησης διαλύματος ελαιολάδου (1% σε κυκλοεξάνιο) στα 232 nm και 280 nm. Στα συγκεκριμένα μήκη κύματος, εκτός από τα πρωτογενή και δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, εμφανίζονται και οι απορροφήσεις των χρωμοφόρων ομάδων της τυροσόλης. Η πλασματική αύξηση των δεικτών Κ, ήταν σημαντική ακόμα και στις περιπτώσεις που προστέθηκε ποσότητα, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που ορίζει ο ισχυρισμός υγείας του ελαιολάδου (250 mg/Kg). Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα το ελαιόλαδο εξέπιπτε της κατηγορίας του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Έτσι λοιπόν εμφανίζεται το παράδοξο αποτέλεσμα η προσθήκη ενός αντιοξειδωτικού μέσου όπως είναι οι φαινόλες, να εμφανίζει το λάδι, πλασματικά, ως οξειδωμένο και τελικά να υποβαθμίζεται.

Στην συνέχεια με την επανάληψη των πειραμάτων σε διαφορετικά ελαιόλαδα, διαπιστώθηκε ότι η οξειδωτική κατάσταση του ελαιολάδου, καθορίζει και το βαθμό στον οποίο η συγκέντρωση της τυροσόλης επηρεάζει τις τελικές τιμές των δεικτών Κ.

Η τυροσόλη είναι η δομική μονάδα και άλλων ενώσεων όπως η ελαιοκανθάλη. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε και μελέτη επίδρασης και πιο σύνθετων φαινολών, όπως η ελαιοκανθάλη,

και διαπιστώθηκε ότι και σε αυτήν την περίπτωση, η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης επηρεάζει σημαντικά τους δείκτες Κ. Η επίδραση αυτή μάλιστα φαίνεται να διαφέρει ποσοτικά από αυτήν της τυροσόλης, καθώς η ελαιοκανθάλη φέρει επιπλέον χρωμοφόρες ομάδες από το εστεροποιημένο τμήμα της. Ακόμα μελετήθηκε και η επίδραση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης, μιας φαινόλης που φέρει διαφορετικό μεν φαινολικό δακτύλιο, ωστόσο επηρεάζει σημαντικά και αυτή τους δείκτες Κ.

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία, αποδεικνύει ότι η διεθνώς καθιερωμένη μέτρηση των δεικτών Κ, ως κριτήριο της οξειδωτικής και υδρολυτικής κατάστασης του ελαιολάδου, παρουσιάζει ισχυρή πιθανότητα να οδηγήσει σε εσφαλμένα και παραπλανητικά αποτελέσματα, υποβαθμίζοντας τελικά το προϊόν. Όπως θα παρουσιαστεί μάλιστα και στο επόμενο κεφάλαιο 4, οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στους δείκτες Κ, δεν αφορούν απλά μια μικρή κατηγορία ελαιόλαδων, αλλά ένα σημαντικό τμήμα των ελαιόλαδων που παράγονται αποδυναμώνοντας σημαντικά την αξιοπιστία του συγκεκριμένου κριτηρίου.

Για την αποφυγή παραπλανητικών αποτελεσμάτων, επιχειρήθηκε να ξεπεραστεί το πρόβλημα των πλασματικών δεικτών Κ, στα ελαιόλαδα υψηλού φαινολικού φορτίου, παρεμβάλλοντας πριν την φασματοσκοπική ανάλυση του ελαιολάδου, την εκχύλιση του ελαιολάδου με μίγμα μεθανόλης/νερού. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο μίγμα, είναι αρκετά επιλεκτικό ως προς τα συστατικά που εκχυλίζει, και επομένως η διαδικασία εκχύλισης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ως ενδιάμεσο στάδιο στην φασματοσκοπική ανάλυση του ελαιολάδου.

## 4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων αναλύσεων ελαιολάδου.

### 4.1 Εισαγωγή.

Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, το οποίο συχνά αναφέρεται και ως πολικό κλάσμα του ελαιολάδου, αποτελείται από τις μικρού μοριακού βάρους φαινόλες, τα флаβονοειδή, λιγνάνια και τα σεκοιριδοειδή. Οι απλές φαινόλες (τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη) και τα σεκοιριδοειδή, αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά του κλάσματος και οι ερευνητές από πολύ νωρίς μελέτησαν τις ιδιότητες τους.

#### 4.1.1 Οι ολικές φαινόλες στο ελαιόλαδο.

Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο που όπως προηγουμένως αναφέρθηκε έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές, οι περισσότεροι των οποίων συγκλίνουν στο ότι συνήθως, ο μέσος όρος των δειγμάτων ελαιολάδου κυμαίνεται σε ένα εύρος 10 – 300 mg/kg. Κατά άλλους ωστόσο τα φαινολικά συστατικά αυτά μπορούν γενικώς να ευρεθούν σε ένα εύρος από 50 έως 1000 mg/kg (Boskou 2006; Montedoro 1992). Οι ερευνητές αναφέρουν ότι υπάρχει μια δυσκολία να βρεθεί ένα ακριβές εύρος για τα φαινολικά συστατικά, καθώς είναι πολλοί οι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο. Για τον λόγο αυτό ο αριθμός των δειγμάτων του ελαιολάδου που επιλέγεται από τον εκάστοτε ερευνητή παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση ενός αξιόπιστου αποτελέσματος.

Σε μελέτη η οποία αφορούσε στην ανάλυση ελαιολάδων από 17 διαφορετικές ποικιλίες, και σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης του καρπού, το εύρος των φαινολικών συστατικών έχει ευρεθεί από 44 mg/kg ως 564 mg/kg (Aparicio and Luna 2002). Σε άλλη μελέτη, οι ίδιοι ερευνητές ανέλυσαν 79 ελαιόλαδα από δύο ποικιλίες και βρήκαν παρόμοιο εύρος τιμών με τον μέσο όρο της συγκέντρωσης και για τις δύο ποικιλίες να είναι κοντά στα 190 mg/kg (R. Aparicio et al. 1999). Σε μελέτη με μεγαλύτερο δείγμα (221 δείγματα ελαιολάδου) το εύρος των ολικών φαινολικών είναι από 23 – 641 mg/kg (Kalogeropoulos and Tsimidou 2014), ενώ έχουν παρατηρηθεί και εύρη που φτάνουν τα 1000 mg/kg (Fuentes et al. 2018).

Τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή πιο σύγχρονων μεθόδων ποσοτικοποίησης των φαινολικών συστατικών (NMR, LC MS-MS κ.α.) αλλά και με την επιλογή μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, τα εύρη που προαναφέραμε έχουν αναθεωρηθεί. Σε πρόσφατη εργασία το εύρος που παρατηρήθηκε έφτανε τα 1410 mg/kg (García-Rodríguez et al. 2017). Λίγα χρόνια νωρίτερα σε

εργασία που έχει παρουσιαστεί από το εργαστήριο μας, σε 340 δείγματα ελαιολάδου προέκυψε ότι η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών μπορεί να κινηθεί σε ακόμα μεγαλύτερα εύρη, καθώς υπήρχαν ελαιόλαδα με περιεκτικότητα τα 1530 mg/kg (Karkoula et al. 2014). Σε άλλη εργασία με 136 δείγματα, γίνεται αναφορά για εξίσου μεγάλο εύρος τιμών οι ολικές φαινόλες φτάνουν σε μέγιστη τιμή τα 1680 mg/kg (Peres, Martins, and Ferreira-Dias 2017). Τέλος, κάνοντας ιδιαίτερη αναφορά στην επίδραση που έχει η ποικιλία της ελιάς στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, σε πρόσφατη δημοσίευση μεγάλου δείγματος γίνεται λόγος για ελαιόλαδα με περιεκτικότητα σε φαινόλες μεγαλύτερη από 2000 mg/kg (Miho et al. 2018).

#### 4.1.2 Η συγκέντρωση των απλών φαινολών στο ελαιόλαδο.

Οι απλές φαινόλες όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και τα φαινολοξέα, χαρακτηρίζονται από μικρό μοριακό βάρος ( $<200 \text{ g mol}^{-1}$ ) και εντοπίστηκαν στο ελαιόλαδο την δεκαετία του 70 (Cerretani et al 2009). Από τις πρώτες εκείνες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, πέραν των βιολογικών ιδιοτήτων τους, έγινε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί και το εύρος της περιεκτικότητας τους στο ελαιόλαδο. Με βάση την βιβλιογραφία, είναι εύκολο να διαπιστώσει κανείς, ότι οι απλές φαινόλες εμφανίζονται στο ελαιόλαδο σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές το εύρος αυτό βρίσκεται μεταξύ 0 και 70 mg/kg (Cerretani 2009). Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι σε δείγμα 34 ελαιολάδων τόσο η τυροσόλη όσο και η υδροξυτυροσόλη έχουν βρεθεί σε ένα εύρος από 10-36 mg/kg (Saitta et al. 2009; Kalogeropoulos and Tsimidou 2014). Ακόμα και στις μελέτες που αναφέραμε πιο πάνω που εμφανίζουν μεγαλύτερο εύρος ολικών φαινολικών, η επιμέρους ανάλυση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης εμφανίζει την συγκέντρωση των συστατικών αυτών στα ίδια χαμηλά επίπεδα. Οι απλές φαινόλες βρίσκονται σε μικρή περιεκτικότητα στο φρέσκο ελαιόλαδο, καθώς αποτελούν προϊόν υδρόλυσης των σεκοϊριδοειδών και όχι τελικό προϊόν της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών στον καρπό και στο ελαιόλαδο. Η συγκέντρωσή τους, και κυρίως της τυροσόλης, αυξάνεται κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου, καθώς η υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών οδηγεί σε απελευθέρωση μορίων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης (Shendi et al. 2018; Boselli et al. 2009; Brenes et al. 2000).

#### 4.1.3 Η συγκέντρωση των βασικών σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, τα σεκοϊριδοειδή αποτελούν το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στον καρπό της ελιάς σχηματίζονται οι γλυκοσίδες ελευρωπαΐνης και λιγκοτροσίδη που αποτελούν τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά στον καρπό της ελιάς. Κατά την διάρκεια ελαιοποίησης του καρπού, τα μόρια αυτά, επιδέχονται μια σειρά μετασχηματισμών που, όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μια σειράς σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου.

Όπως επίσης έχουμε αναφέρει, κατά την διάρκεια της μάλαξης, πέραν των ενζύμων που συμμετέχουν στον σχηματισμό των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου, διάφορα άλλα υδρολυτικά και οξειδωτικά ένζυμα, δρουν επί των σεκοϊριδοειδών που βρίσκονται στο περιβάλλον του πολτού της ελιάς. Αποτέλεσμα της δράσης των ενζύμων αυτών, σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι η απελευθέρωση μεγάλης ποσότητας μορίων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Ωστόσο όπως θα δούμε και στο επόμενο κεφάλαιο, καθώς επίσης όπως είναι ήδη γνωστό από την βιβλιογραφία, οι απλές φαινόλες, λόγω της πολικότητάς τους, κατανέμονται σε μεγάλο ποσοστό στην υδατική φάση του πολτού της ελιάς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, μικρές μόνο ποσότητες των συστατικών αυτών, να ευρίσκονται στο τελικό προϊόν που είναι το ελαιόλαδο. Αυτός είναι ένας βασικός λόγος που τα κυρίαρχα συστατικά του ελαιολάδου είναι τα σεκοϊριδοειδή και όχι οι απλές φαινόλες.

#### *Ελαιοκανθάλη.*

Στην δεύτερη σημαντική κατηγορία ενώσεων του φαινολικού κλάσματος, ανήκουν τα σεκοϊριδοειδή, τα οποία αποτελούν και την κυρίαρχη ομάδα του κλάσματος αυτού. Στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών τα κυρίαρχα συστατικά φαίνεται να είναι τα συστατικά ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη καθώς επίσης και οι διάφορες μορφές του άγλυκου λιγκοτροσίδη και ελευρωπαΐνης. Οι βιολογικές ιδιότητες των συστατικών αυτών, όπως έχουμε παρουσιάσει και εισαγωγικά (παρ. 1.6), έχουν γίνει αντικείμενο δεκάδων μελετών. Η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο, αποτελεί τον πυρήνα του ισχυρισμού υγείας, καθώς όπως παρουσιάστηκε και παραπάνω, τα συστατικά τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη σαν ελεύθερα μόρια, αδυνατούν να καλύψουν το όριο των 250 mg/kg που θέτει ο EFSA για τον ισχυρισμό υγείας.

Η ελαιοκανθάλη (p-HPEA-EDA), είναι το συστατικό του ελαιολάδου που έχει προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις βιολογικές του ιδιότητες. Στις αρχικές μελέτες που διενεργήθηκαν πάνω στην σύσταση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, το εύρος της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης παρουσιάζεται αρκετά μικρό, 15-33 mg/kg (Servili and

Montedoro 2002). Το εύρος αυτό γρήγορα αναθεωρήθηκε προς τα πάνω φτάνοντας τιμές κοντά στα 150 mg/kg (Saitta et al. 2009; Kalogeropoulos and Tsimidou 2014). Σε πρόσφατη εργασία το εύρος της ελαιοκανθάλης βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένο φτάνοντας ως μέγιστη τιμή τα 317 mg/kg (El Riachy et al. 2019) ή ακόμη και τα 487 mg/kg (Peres et al 2017). Από τις περισσότερες μελέτες θα δούμε ότι οι ερευνητές παρουσιάζουν συγκεντρώσεις της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο σε ένα εύρος 23-444 (mg/kg) (Miladinović et al. 2019). Ωστόσο, σε άλλες εργασίες έχουν παρουσιαστεί ασυνήθιστα μεγάλες συγκεντρώσεις 744 mg (Karkoula et al. 2014) και 1660 mg (Miho et al. 2018). Στην τελευταία εργασία μάλιστα οι ερευνητές επισημαίνουν τον ρόλο της ποικιλίας της ελιάς στην συγκέντρωση αυτή, καθώς, όπως δείξαμε και εμείς σε προηγούμενο κεφάλαιο, υπήρχαν κάποιες ποικιλίες οι οποίες εμφανίζουν συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης κοντά στους μέσους όρους που έχουν δείξει και προηγούμενες έρευνες (274 mg/kg). Υπήρχαν όμως και ποικιλίες όπως η Καλαμών, Plementa Bjelica, Alfafara κ.α. οι οποίες είχαν πολύ μεγάλη συχνότητα εμφάνισης συγκέντρωσης πάνω από 750 mg/kg.

#### *Ελαιασίνη.*

Η ελαιασίνη (3,4-DHPEA-EDA) είναι το δεύτερο σημαντικότερο συστατικό του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου. Στις βιβλιογραφικές αναφορές είδαμε ότι σε παλαιότερες κυρίως μελέτες, η περιεκτικότητα της ελαιασίνης στα δείγματα ελαιολάδου που αναλύθηκαν, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της ελαιοκανθάλης και των υπολοίπων σεκοϊριδοειδών του φαινολικού κλάσματος, με τα επίπεδα να έχουν εξαρχής προσδιοριστεί πολύ ψηλά, στα 60 - 840 mg/kg (Servili and Montedoro 2002). Σε πιο πρόσφατες μελέτες θα δούμε ότι εμφανίζονται κάποιες αποκλίσεις από το μοτίβο αυτό με τους ερευνητές να παρουσιάζουν αντίστοιχα εύρη με αυτά της ελαιοκανθάλης.

Σε εντελώς πρόσφατες μελέτες η περιεκτικότητα της ελαιασίνης εμφανίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις σε ένα εύρος 27-575 mg/kg (Miladinović et al. 2019). Ωστόσο και πάλι θα βρούμε εργασίες οι οποίες εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ελαιασίνης στο ελαιόλαδο με την περιεκτικότητα να ανέρχεται στα 590 mg/kg (Karkoula et al. 2014), 650 mg/kg (Peres et al 2017) ή και 900 mg/kg (Miho et al. 2018). Στην τελευταία εργασία σε αντίθεση με παλαιότερα ευρήματα, οι ερευνητές αναφέρουν ότι η συγκέντρωση της ελαιασίνης γενικά, βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα από εκείνα της ελαιοκανθάλης.

Οι μονοαλδεϊδικές μορφές του άγλυκου του λιγκοτροσίδη είναι συστατικά που επίσης έχουν βρεθεί και ποσοτικοποιηθεί στο ελαιόλαδο. Η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης έχει βρεθεί από νωρίς σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις (85-310 mg/kg) (Servili and Montedoro 2002), ενώ το άγλυκο του λιγκοτροσίδη σε αρκετά πιο χαμηλές συγκεντρώσεις 15-33 (mg/kg). Σε νεότερες εργασίες που έχουμε αναφέρει και για τα υπόλοιπα συστατικά είδαμε ότι η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης εμφανίζει μέσο όρο συγκέντρωσης κοντά στα 130 mg/kg ενώ η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου του λιγκοτροσίδη εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερο εύρος από τα υπόλοιπα συστατικά (Peres et al 2017).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι σχεδόν σε όλες τις μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν ο όρος “άγλυκο” του λιγκοτροσίδη και ελευρωπαϊνης αναφέρεται σε όλες τις μορφές που προέρχονται από την απομάκρυνση ενός μορίου σακχάρου από τα μόρια λιγκοτροσίδη και ελευρωπαϊνης αντίστοιχα. Σε αυτή την κατηγορία ενώσεων επομένως ανήκουν τόσο οι μονοαλδεϊδικές όσο και οι διαλδεϊδικές και οι ενολικές μορφές. Όπως έχουμε ήδη συζητήσει σε προηγούμενες ενότητες, στην παρούσα διατριβή γίνεται διαχωρισμός των διαλδεϊδικών και ενολικών μορφών από τις μονοαλδεϊδικές μορφές καθώς οι μέθοδοι που χρησιμοποιούμε, μας εξασφαλίζουν ότι δεν συντελείται οποιοσδήποτε μετασχηματισμός κατά την διαδικασία εκχύλισης και ανάλυσης του φαινολικού κλάσματος.

Και οι δύο ομάδες συστατικών, δηλαδή τόσο η ελαιοκορωνάλη **(5)** και η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου του λιγκοτροσίδη **(7)**, όσο και η ελαιομισσιονάλη **(6)** και η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης **(8)**, έχουν το ίδιο μοριακό βάρος (ανάλογα με τον φαινολικό δακτύλιο που φέρουν). Ωστόσο η αδυναμία ασφαλούς διαχωρισμού των συστατικών αυτών, με τεχνικές HPLC (που έχουμε ήδη αναφέρει), οδήγησε τους ερευνητές να παρουσιάζουν συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις άγλυκες μορφές. Στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι πολύ πιθανό κατά την χρωματογραφική επεξεργασία των εκχυλισμάτων να επιτελούνταν μετατροπή των συστατικών που έχουμε ονομάσει ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη, στις αντίστοιχες μονοαλδεϊδικές μορφές. Σε πολύ πρόσφατη εργασία, και μετά την παρουσίαση των συστατικών ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη, γίνεται διάκριση των μονοαλδεϊδικών μορφών από τις υπόλοιπες μορφές, και γίνεται λόγος για αρκετά μεγάλα εύρη για όλες τις μορφές που φτάνουν ως και τα 1500 mg/kg (Miho et al. 2018).

## 4.2 Σκοπός.

Την ελαιοκομική περίοδο 2013 – 2014, στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής, ξεκίνησαν να πραγματοποιούνται συστηματικές αναλύσεις ελαιόλαδων, ως προς το φαινολικό τους περιεχόμενο. Τις επόμενες χρονιές, και στα πλαίσια του ερευνητικού διαπεριφερειακού προγράμματος <<Aristoil>>, ο αριθμός των δειγμάτων αυξήθηκε σημαντικά, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η μεγαλύτερη βάση δεδομένων που αφορά στο φαινολικό περιεχόμενο ελαιόλαδων.

Η ερευνητική διαδικασία της παρούσας ενότητας περιλαμβάνει τις αναλύσεις 3,500 δειγμάτων ελαιολάδου που πραγματοποιήσα από το 2014 έως το 2020 καθώς και την στατιστική αξιοποίηση των αποτελεσμάτων από τα συνολικά 6,614 δείγματα ελαιολάδου που ελέγχθηκαν με αποτέλεσμα να εξαχθούν κάποια χρήσιμα και ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά. Παράλληλα, με βάση τα αποτελέσματα των ελέγχων και σε συνδυασμό με τα εν λόγω στατιστικά αποτελέσματα, σκοπός μας ήταν να ορίσουμε για πρώτη φορά τα όρια του υψηλού φαινολικού ελαιολάδου. Η στατιστική ανάλυση αφορά σε καθοριστικούς παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, όπως η ποικιλία της ελιάς, ο τύπος του ελαιοτριβείου, η γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων καθώς και η εποχή συγκομιδής και ελαιοποίησης του καρπού.





Η πρότυπη συρριγαλδεΐδη, προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich

*Διάλυμα εσωτερικού προτύπου.*

Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε, ήταν διάλυμα συρριγαλδεΐδης σε Ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0.5 mg/mL

#### 4.3.2 Μέθοδοι.

*Εκχύλιση φαινολικού κλάσματος από δείγμα ελαιολάδου.*

Η εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος από τα δείγματα ελαιολάδου που παραλάβαμε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσία και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο (παρ 2.3.2)

*Λήψη φάσματος Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR).*

Τα φάσματα πρωτονίου NMR ελήφθησαν σε 400 MHz (Bruker 400). Ελήφθησαν 50 scans σε 32K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time 1.7s. τον μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε exponential weighing factor 0.3 Hz . Η διόρθωση της φάσης του φάσματος καθώς και οι ολοκληρώσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MestRenova.

*Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων ελαιολάδου ακολουθήσαμε τα αναφερόμενα στην παράγραφο 2.3.2

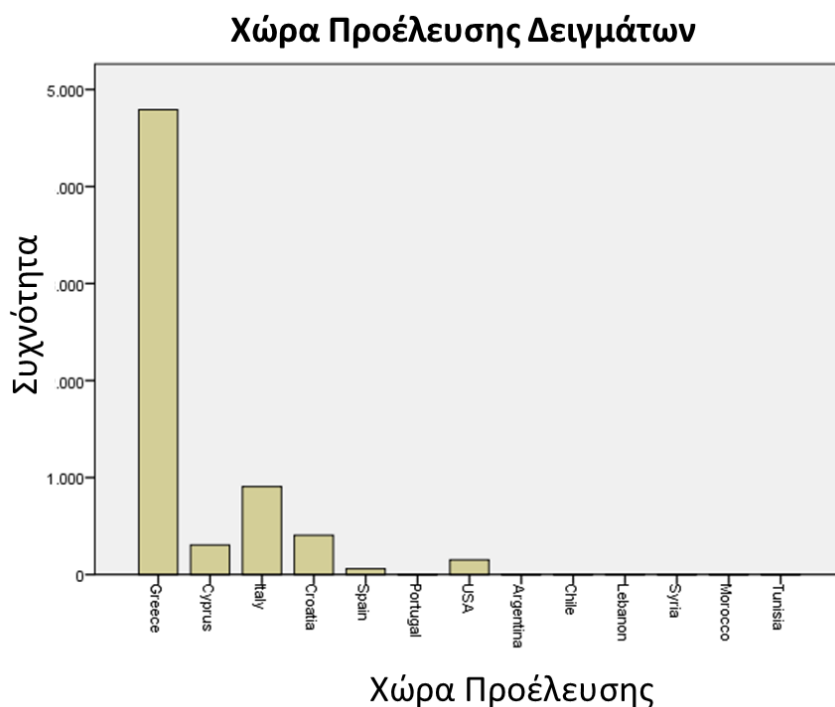
#### Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων – Δείγματα ελαιολάδου.

Συνολικά λοιπόν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν 6,614 δείγματα ελαιολάδου. Από αυτά, τα 4,778 είναι δείγματα που προέρχονται από ελληνικές καλλιέργειες. Ένας σημαντικός αριθμός δειγμάτων προέρχεται από την Ιταλία (n=906), την Κροατία (n=406) και την Κύπρο (n=305).

Ένας σαφώς μικρότερος αριθμός δειγμάτων, προέρχεται από χώρες εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Νότιος Αμερική, Αφρική, Μέση Ανατολή). Επίσης περίπου το 2.3% των δειγμάτων που μελετήθηκαν, προέρχονται από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, και περιλαμβάνουν δείγματα τα οποία παράγονται, συσκευάζονται και διατίθενται στην κατανάλωση, στην εκεί αγορά. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η κατανομή των δειγμάτων, ως προς την χώρα προέλευσης του δείγματος.

**Πίνακας 4.1:** Χώρα προέλευσης των δειγμάτων.

Χώρα προέλευσης	<i>n</i>	Ποσοστό(%)	Αθροιστικό ποσοστό (%)
<i>Ελλάδα</i>	4,778	72.2	72.2
<i>Κύπρος</i>	303	4.6	76.8
<i>Ιταλία</i>	906	13.7	90.5
<i>Κροατία</i>	406	6.1	96.7
<i>Ισπανία</i>	59	0.9	97.6
<i>Πορτογαλία</i>	1	0.0	97.6
<i>ΗΠΑ</i>	151	2.3	99.8
<i>Αργεντινή</i>	1	0.0	99.9
<i>Χιλή</i>	1	0.0	99.9
<i>Λίβανος</i>	3	0.0	99.9
<i>Συρία</i>	2	0.0	100.0
<i>Μαρόκο</i>	2	0.0	100.0
<i>Τυνησία</i>	1	0.0	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>6,614</b>	<b>100.0</b>	



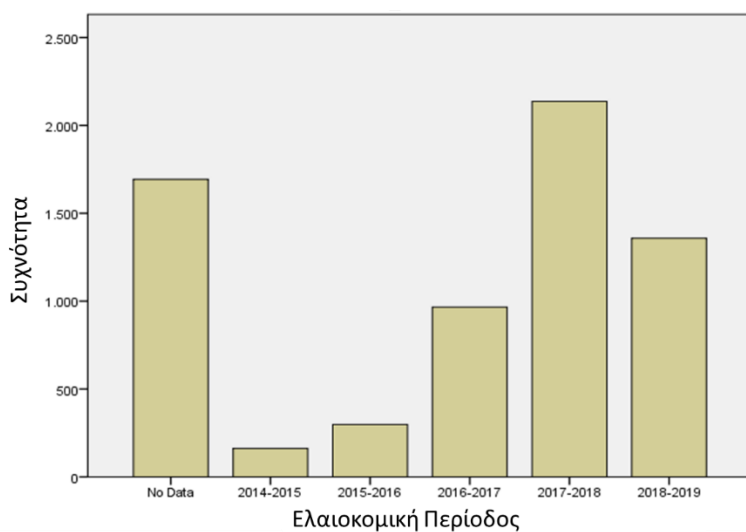
**Διάγραμμα 4.1:** Κατανομή των δειγμάτων κατά χώρα προέλευσης.

Ελαιοκομική περίοδος – Εποχή συγκομιδής .

Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από τις ελαιοκομικές περιόδους 2014-2015 έως και ελαιοκομική περίοδο 2018 -2019. Για 1693 δείγματα ελαιολάδου, δεν υπάρχουν στοιχεία ελαιοκομικής περιόδου, καθώς αποτελούσαν εμπορικά δείγματα χωρίς σαφή προσδιορισμό του έτους παραγωγής.

**Πίνακας 4.2:** Ελαιοκομική περίοδος αναλυθέντων δειγμάτων.

Έτος Συγκομιδής	n	Ποσοστό (%)	Αθροιστικό Ποσοστό (%)
<i>Χωρίς δεδομένα</i>	1,693	25.6	25.6
<i>2014-2015</i>	162	2.4	28.0
<i>2015-2016</i>	298	4.5	32.6
<i>2016-2017</i>	966	14.6	47.2
<i>2017-2018</i>	2,137	32.3	79.5
<i>2018-2019</i>	1,358	20.5	100.0
<i>Σύνολο</i>	<b>6,614</b>	<b>100.0</b>	

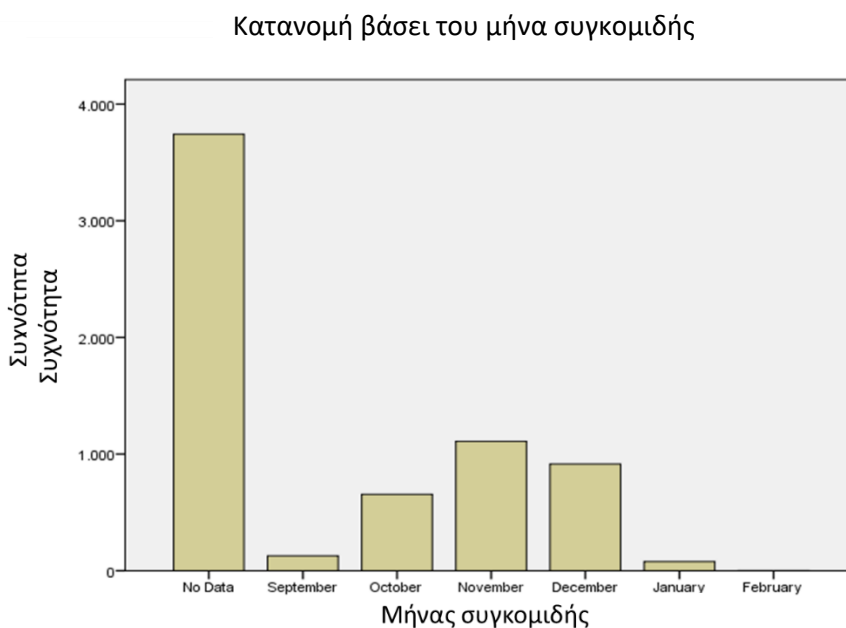


**Διάγραμμα 4.2:** Κατανομή των δειγμάτων κατά ελαιοκομική περίοδο.

Παρακάτω παρουσιάζεται η κατανομή της περιόδου συγκομιδής για τα δείγματα ελαιολάδου. Για 3.736 δείγματα δεν υπάρχουν δεδομένα για την περίοδο συγκομιδής καθώς η συλλογή του καρπού από το οποίο προέκυψε το τελικό προϊόν έγινε σε μια μακρά περίοδο μεγαλύτερης του ενός μήνα.

**Πίνακας 4.3:** Μήνας συγκομιδής του ελαιόκαρπου.

Μήνας Συγκομιδής	n	Ποσοστό(%)	Αθροιστικό Ποσοστό (%)
<i>Χωρίς δεδομένα</i>	3,736	56.5	56.5
<i>Σεπτέμβριος</i>	128	1.9	58.4
<i>Οκτώβριος</i>	652	9.9	68.3
<i>Νοέμβριος</i>	1,105	16.7	85.0
<i>Δεκέμβριος</i>	913	13.8	98.8
<i>Ιανουάριος</i>	79	1.2	100.0
<i>Φεβρουάριος</i>	1	0.0	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>6,614</b>	<b>100.0</b>	



**Διάγραμμα 4.3:** Κατανομή των δειγμάτων κατά μήνα συγκομιδής.

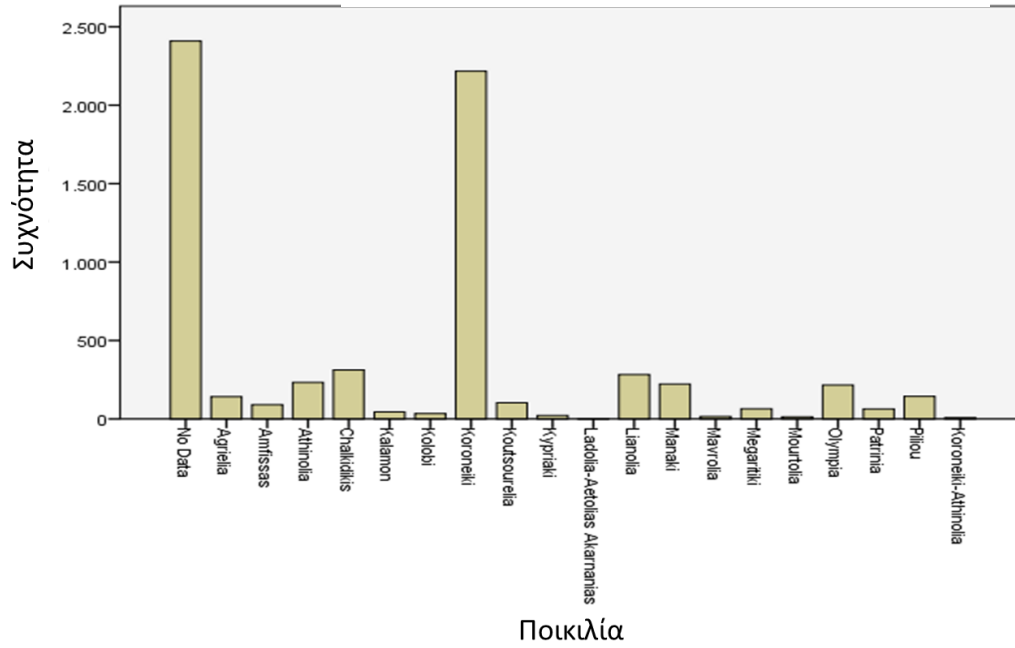
#### Ποικιλίες Ελιάς.

Από την καταγραφή των δειγμάτων ελαιολάδου που παραλάβαμε, προέκυψε ότι συνολικά μελετήθηκαν ελαιόλαδα από 19 διαφορετικές ποικιλίες. Στην κατανομή συχνοτήτων των ποικιλιών, η κυρίαρχη ποικιλία που μελετήσαμε, ήταν η Κορωνέικη, ( $n=2.217$ ), η οποία και αντιπροσωπεύει περίπου το 1/3 των δειγμάτων (33,8%). Τα υπόλοιπα δείγματα προέρχονται από ποικιλίες με σαφώς μικρότερο αριθμό δειγμάτων, όπως η ποικιλία Χαλκιδικής ( $n=312$ , 5.3%), η ποικιλία Λιανολιά Κερκύρας ( $n=283$ , 4.2%) η ποικιλία Αθηνολιά ( $n=233$ , 3.5%), η ποικιλία Μανάκι ( $n=222$ , 3.5%) και Ολύμπια ποικιλία ( $n=216$ , 3.3%). Ένα μεγάλο μέρος των δειγμάτων που αναλύθηκαν ( $n=2399$ ), που αντιστοιχεί στο 35,9 % των δειγμάτων που αναλύσαμε, είναι δείγματα στα οποία είτε δεν έχουμε δεδομένα ποικιλίας, είτε αποτελούν μίγματα διαφορετικών ποικιλιών, πρακτική που συνηθίζεται, ειδικά σε μονάδες που επεξεργάζονται μεγάλη ποσότητα καρπού (Συνεταιρισμοί, μεγάλες βιομηχανικές μονάδες κλπ).

Κατανομή βάσει του μήνα συγκομιδής

Κατανομή βάσει του μήνα συγκομιδής

Κατανομή βάσει Ποικιλίας



Διάγραμμα 4.4: Κατανομή των δειγμάτων κατά ποικιλία.

Πίνακας 4.4: Οι διαφορετικές ποικιλίες των δειγμάτων.

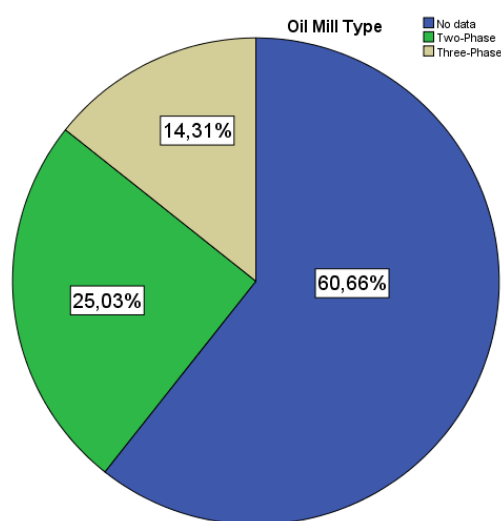
Ποικιλία	n	Ποσοστό	Αθροιστικό Ποσοστό
<i>Χωρίς δεδομένα</i>	2,399	36.3	36.3
<i>Αγριελιά</i>	142	2.1	38.4
<i>Αμφίσσης</i>	235	3.6	42.0
<i>Αθηνολιά</i>	233	3.5	45.5
<i>Χαλκιδικής</i>	312	4.7	50.2
<i>Καλαμών</i>	45	0.7	50.9
<i>Κολοβή</i>	34	0.5	51.4
<i>Κορωνέικη</i>	2,217	33.5	84.9
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	2.5	87.4
<i>Κυπριακή</i>	22	0.3	87.8
<i>Λιανολιά Κερκύρας</i>	283	4.3	92.1
<i>Μανάκι</i>	222	3.4	95.4
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	1.0	96.4
<i>Μουρτολιά</i>	13	0.2	96.6
<i>Ολύμπια</i>	216	3.3	99.9
<i>Κορωνέικη - Αθηνολιά</i>	8	0.1	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>6,614</b>	<b>100.0</b>	

## Τύπος ελαιοτριβείου.

Στα επόμενα, παρουσιάζεται η κατανομή των δειγμάτων ελαιολάδου που αναλύσαμε, σε σχέση με τον τύπο του ελαιοτριβείου που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του ελαιολάδου. Για τα περισσότερα δείγματα που αναλύθηκαν (n=4,010, 60.7%), δεν υπάρχουν δεδομένα για τον τύπο του ελαιοτριβείου που χρησιμοποιήθηκε. Από τα υπόλοιπα δείγματα, ένα σημαντικός αριθμός (n=1,655) αφορά ελαιολάδα των οποίων η παραγωγή πραγματοποιήθηκε σε ελαιοτριβείο 2 φάσεων, και αντιπροσωπεύει το 63.63% των δειγμάτων για τα οποία έχουμε δεδομένα. Τα υπόλοιπα (n=949), αφορούν δείγματα που ελαιοποιήθηκαν σε ελαιοτριβείο 3 φάσεων.

**Πίνακας 4.5:** Τα δείγματα ελαιολάδου με βάση τον τύπο του ελαιοτριβείου.

Τύπος Ελαιοτριβείου	n	Ποσοστό	Αθροιστικό Ποσοστό
<i>Χωρίς δεδομένα</i>	4,010	60.6	60.6
<i>2 Φάσεων</i>	1,655	25.0	85.7
<i>3 Φάσεων</i>	949	14.3	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>6,614</b>	<b>100.0</b>	



**Διάγραμμα 4.5:** Κατανομή των δειγμάτων κατά τύπο ελαιοτριβείου.



#### 4.4 Αποτελέσματα.

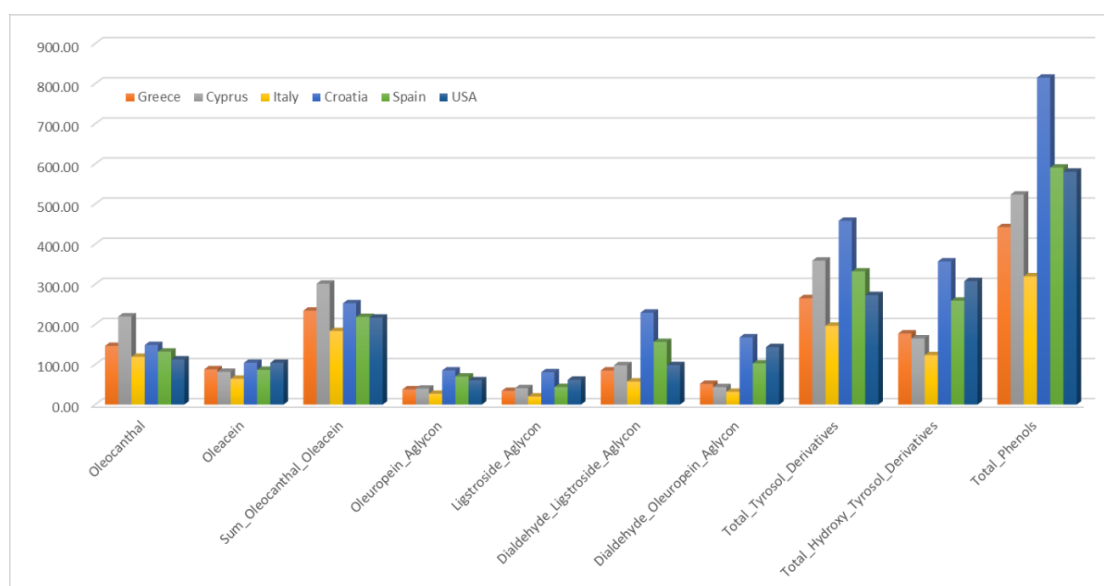
##### 4.4.1 Γενικά στατιστικά στοιχεία με βάση την γεωγραφική προέλευση.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανάλογα με την χώρα προέλευσης των ελαιολάδου, επιλέχθηκαν οι χώρες εκείνες, οι οποίες είχαν τουλάχιστον 30 δείγματα. Έτσι προέκυψε ένα σύνολο με αριθμό δειγμάτων n=4791

**Πίνακας 4.6:** Τα δείγματα ελαιολάδου κατά χώρα.

Χώρα Προέλευσης	n
<i>Ελλάδα</i>	4,791
<i>Κύπρος</i>	305
<i>Ιταλία</i>	906
<i>Κροατία</i>	406
<i>Ισπανία</i>	59
<i>ΗΠΑ</i>	151

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ξεκινάει με μια γενική εικόνα των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων, από τις χώρες που είχαν στατιστικά σημαντικό δείγμα. Παρακάτω παρουσιάζεται η κατανομή των μέσων όρων όλων των συστατικών για τις χώρες αυτές.



**Διάγραμμα 4.6:** Σύσταση των φαινολικών συστατικών κατά χώρα.

#### 4.4.2 Στατιστικές κατανομές ελληνικών δειγμάτων.

##### *Κατανομή των δειγμάτων με βάση την ποικιλία.*

Στην παράγραφο αυτή μελετήθηκαν τα στατιστικά δεδομένα για τα δείγματα που προέρχονται από την Ελλάδα. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα για τα οποία υπήρχαν και δεδομένα ποικιλίας καθώς επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες για τις οποίες υπήρχαν παραπάνω από 10 δείγματα. Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι ποικιλίες και ο αριθμός των δειγμάτων από την κάθε ποικιλία.

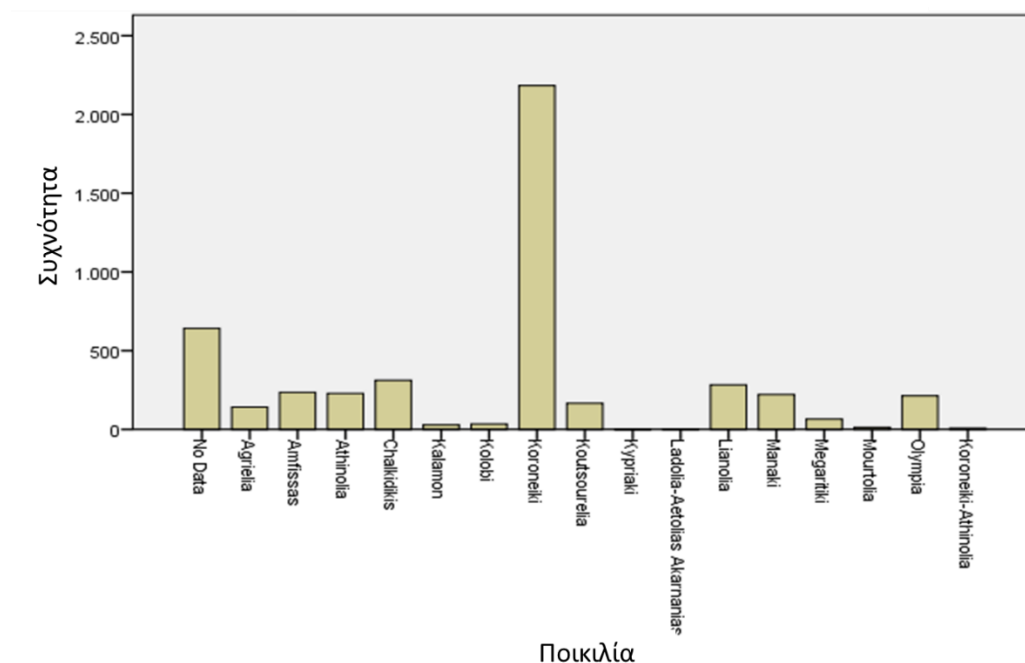
**Πίνακας 4.7:** Η κατανομή των ελληνικών δειγμάτων βάση της ποικιλίας.

<b>Ποικιλία</b>	<b>n</b>	<b>Ποσοστό(%)</b>	<b>Αθροιστικό Ποσοστό (%)</b>
<i>Χωρίς δεδομένα</i>	642	13.4	13.4
<i>Αγριελια</i>	142	3.0	16.4
<i>Αμφίσσης</i>	235	4.9	21.3
<i>Αθηνολιά</i>	228	4.8	26.1
<i>Χαλκιδικής</i>	312	6.5	32.6
<i>Καλαμών</i>	29	0.6	33.2
<i>Κολοβή</i>	34	0.7	33.9
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	45.7	79.6
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	3.5	83.1
<i>Λαδολιά Αιτωλοακαρνανίας</i>	2	0.0	83.2
<i>Λιανολιά</i>	283	5.9	89.1
<i>Μανάκι</i>	222	4.6	93.7
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	1.4	95.1
<i>Μουρτολιά</i>	13	0.3	95.4
<i>Ολύμπια</i>	213	4.5	99.8
<i>Κορωνέικη - Αθηνολιά</i>	8	0.2	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>100.0</b>	

Όπως φαίνεται και στον εν λόγω πίνακα ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων αφορούσε σε δείγματα που έχουν προέλθει από ελαιοποίηση καρπού Κορωνέικης ποικιλίας (n=2,183), και αντιστοιχούν σε περισσότερο από το ένα τρίτο του συνολικού αριθμού των δειγμάτων (45.6%). Τα υπόλοιπα δείγματα αφορούν σε λιγότερο δημοφιλείς ποικιλίες όπως η ποικιλία Χαλκιδικής (n=312, 6.5%), ποικιλία Αθηνολιάς (n=228, 4.8%), ποικιλία Λιανολιάς (n=283, 5.9%), Μανάκι (n=222, 4.6%), και Ολύμπια ποικιλία (n=213, 4.4%). Ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων (n=642) προήλθε από ελαιοποιήσεις καρπών χωρίς δεδομένα ποικιλίας. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε περιοχή όπως για παράδειγμα η ποικιλία Λιανολιά που εντοπίζεται στην περιφερειακή ενότητα των Ιονίων Νήσων, ή η ποικιλία Αμφίσσης. Η Κορωνέικη

ποικιλία αντίθετα, είναι μια ποικιλία η οποία αποτελεί την κυρίαρχη ποικιλία της μεγαλύτερης ελαιοπαραγωγική περιφέρειας της Ελλάδος, την Πελοπόννησο. Είναι μια ποικιλία που εντοπίζεται και σε πολλές άλλες περιοχές τις Ελλάδος, όπως πχ στην Κρήτη.

Κατανομή Ελληνικών δειγμάτων βάσει Ποικιλίας



**Διάγραμμα 4.7:** Κατανομή ελληνικών δειγμάτων κατά ποικιλία.

Κατανομή των δειγμάτων με βάση την ελαιοκομική περίοδο – μήνα και εβδομάδα συγκομιδής.

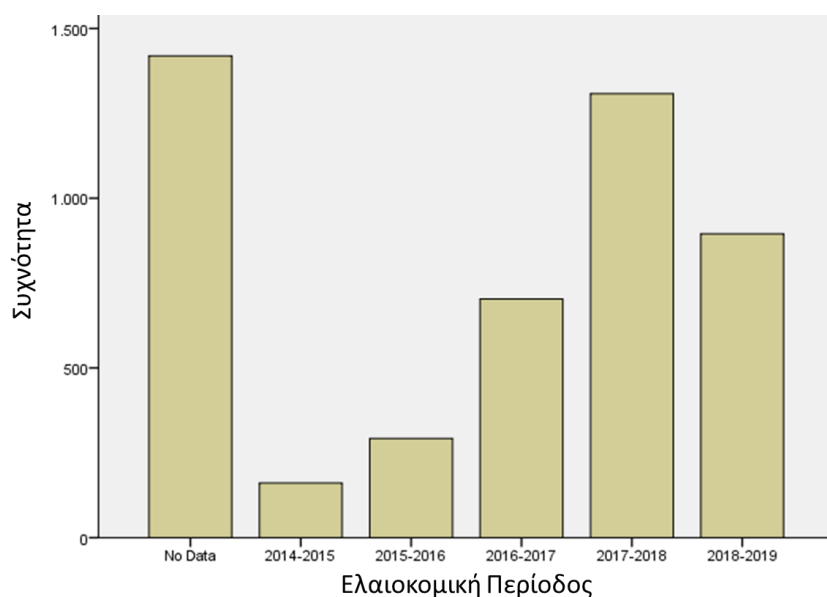
Ελαιοκομική Περίοδος.

Οι ελαιοκομικές περιόδους από τις οποίες αντλήθηκαν αποτελέσματα αναφέρονται στην περίοδο 2014-2019. Στον επόμενο πίνακα, παρουσιάζεται η κατανομή των ελληνικών δειγμάτων στις ελαιοκομικές περιόδους που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 4.8.** Η κατανομή των ελληνικών δειγμάτων βάσει της ποικιλίας.

Ελαιοκομική Περίοδος	n	Ποσοστό (%)	Αθροιστικό Ποσοστό (%)
Χωρίς Δεδομένα	1,419	29.7	29.7
2014-2015	161	3.4	33.1
2015-2016	292	6.1	39.2
2016-2017	703	14.7	53.9
2017-2018	1,308	27.4	81.3
2018-2019	895	18.7	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>100.0</b>	

Κατανομή Ελληνικών δειγμάτων κατά ελαιοκομική περίοδο



**Διάγραμμα 4.8:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά ελαιοκομική περίοδο.

Όπως φάνηκε και από το διάγραμμα η βάση δεδομένων που έχει δημιουργηθεί, αφορά κάθε χρόνο, όλο και μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Εξαιρέση αποτελεί η ελαιοκομική περίοδος 2018-2019, η οποία όμως χαρακτηρίστηκε από πολύ μεγάλη προσβολή της ελιάς από το δάκο, με αποτέλεσμα σημαντικό μέρος των καλλιεργητών να περιορίσουν σημαντικά την παραγωγή τους.

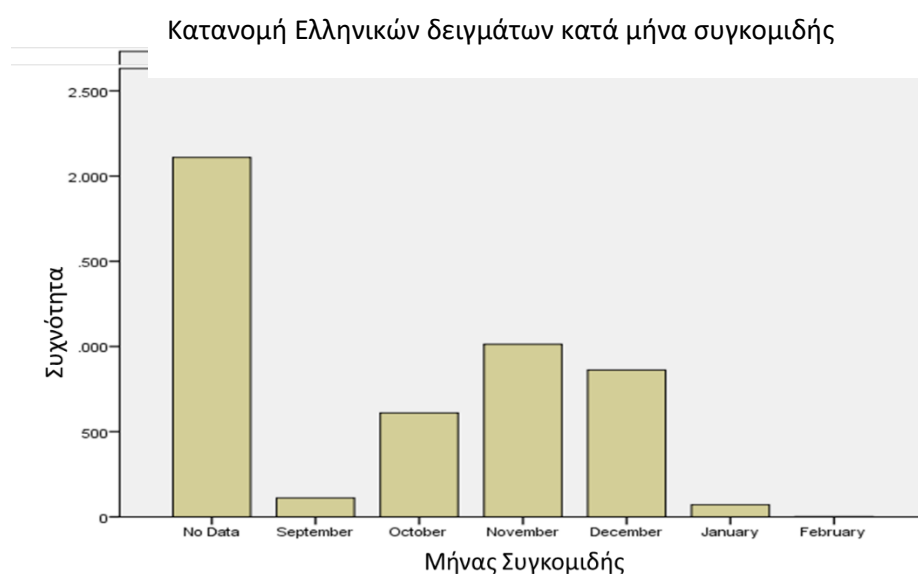
#### Μήνας συγκομιδής.

Προχωρώντας στην ανάλυση του μήνα συγκομιδής του ελαιόκαρπου όπως φαίνεται και στον επόμενο πίνακα, η εποχή συγκομιδής εκτείνεται σε ένα εύρος από τον μήνα Σεπτέμβριο μέχρι και τον μήνα Φεβρουάριο. Στον πίνακα, παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα δείγματα ελαιολάδου που παρελήφθησαν στο εργαστήριο ( $n=1,013$ ), ελαιοποιήθηκαν τον μήνα Νοέμβριο. Το ποσοστό αυτό, αφορά στο 21,2% των συνολικών δειγμάτων που μελετήθηκαν από τον ελλαδικό χώρο, εκ των οποίων το 38% αφορούσαν σε δείγματα για τα οποία υπήρχαν δεδομένα. Αναλύθηκαν επίσης δείγματα (2,109) για τα οποία δεν υπήρχαν ακριβή δεδομένα συγκομιδής καθώς η συγκομιδή τους διήρκεσε πάνω από ένα μήνα και αφορούν το 44,1% του συνόλου των δειγμάτων.

Στην συγκεκριμένη ανάλυση πρέπει βέβαια να ληφθεί υπόψη, το γεγονός ότι η κάθε ποικιλία ωριμάζει σε διαφορετικό χρονικό διάστημα και επομένως ο καρπός ελαιοποιείται σε παραπλήσιες πλην όμως διαφορετικές περιόδους.

**Πίνακας 4.9:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά μήνα συγκομιδής.

<i>Harvest Month</i>	<i>n</i>	<i>Ποσοστό (%)</i>	<i>Αθροιστικό Ποσοστό (%)</i>
<i>Χωρίς Δεδομένα</i>	2,109	44.1	44.1
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	2.3	46.5
<i>Οκτώβριος</i>	610	12.8	59.2
<i>Νοέμβριος</i>	1,013	21.2	80.4
<i>Δεκέμβριος</i>	862	18.0	98.5
<i>Ιανουάριος</i>	72	1.5	100.0
<i>Φεβρουάριος</i>	1	.0	100.0
<i>Σύνολο</i>	<i>4,778</i>	<i>100.0</i>	



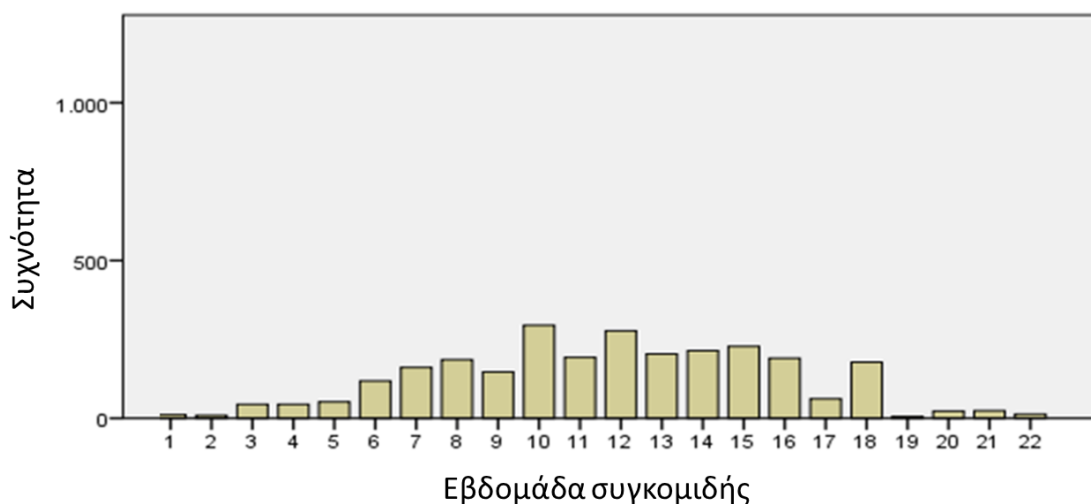
**Διάγραμμα 4.9:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά μήνα συγκομιδής.

Εβδομάδα συγκομιδής.

Στην συνέχεια, και με σκοπό να μελετηθεί σε βάθος η επίδραση της εποχής συγκομιδής, επιχειρήθηκε να χωριστεί η μηνιαία περίοδος του μήνα. Θεωρώντας ότι η ελαιοκομική περίοδος ξεκινάει τον μήνα Σεπτέμβριο (1<sup>η</sup> εβδομάδα 1-7 Σεπτεμβρίου κοκ) χωρίσαμε την συνολική ετήσια ελαιοκομική περίοδο σε 22 εβδομάδες. Ο καρπός επομένως από τον οποίο προήλθαν όλα τα εν λόγω δείγματα, συλλέχθηκε και ελαιοποιήθηκε σε ένα χρονικό εύρος από τον μήνα Σεπτέμβριο μέχρι τον Φεβρουάριο. Ένας μικρός αριθμός δειγμάτων που ελαιοποιήθηκε τον μήνα Αύγουστο, περιλήφθηκε στον μήνα Σεπτέμβριο. Τα αποτελέσματα της παρούσας παραγράφου, επηρεάζονται βέβαια τόσο από την ποικιλία όπως εξηγήθηκε προηγουμένως όσο και από τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν κατά την ελαιοκομική περίοδο. Είναι συχνό το φαινόμενο όπου οι γενικότερες κλιματολογικές συνθήκες να μετατοπίζουν την ελαιοκομική περίοδο μερικές εβδομάδες νωρίτερα ή αργότερα από το σύνηθες, κάτι που έχει να κάνει με παράγοντες όπως η ανθοφορία του φυτού της ελιάς, οι βροχές κ.α. Επίσης ιδιαίτερες κλιματικές συνθήκες την περίοδο

της συλλογής του καρπού, είναι πιθανό να μετατοπίσουν επίσης και την συλλογή και ελαιοποίηση του καρπού.

Ωστόσο, λόγω των πολλών ελαιοκομικών περιόδων, κατέστη τελικά εφικτό να υπάρξει μια αντιπροσωπευτική κατανομή για την εβδομάδα συγκομιδής.



**Διάγραμμα 4.10:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά εβδομάδα συγκομιδής.

**Πίνακας 4.10:** Κατανομή των εβδομάδων συγκομιδής για τα ελληνικά δείγματα.

Εβδομάδα Συγκομιδής	n	Ποσοστό (%)	Αθροιστικό Ποσοστό (%)
<b>Χωρίς Δεδομένα</b>	2,109	44.1	44.1
<i>1</i>	11	0.2	44.4
<i>2</i>	9	0.2	44.6
<i>3</i>	44	0.9	45.5
<i>4</i>	44	0.9	46.4
<i>5</i>	52	1.1	47.5
<i>6</i>	116	2.4	49.9
<i>7</i>	160	3.3	53.3
<i>8</i>	186	3.9	57.2
<i>9</i>	147	3.1	60.2
<i>10</i>	294	6.2	66.4
<i>11</i>	193	4.0	70.4
<i>12</i>	275	5.8	76.2
<i>13</i>	203	4.2	80.4
<i>14</i>	213	4.5	84.9
<i>15</i>	228	4.8	89.7
<i>16</i>	189	4.0	93.6

<i>17</i>	62	1.3	94.9
<i>18</i>	178	3.7	98.6
<i>19</i>	5	0.1	98.7
<i>20</i>	23	0.5	99.2
<i>21</i>	24	0.5	99.7
<i>22</i>	13	0.3	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>100.0</b>	

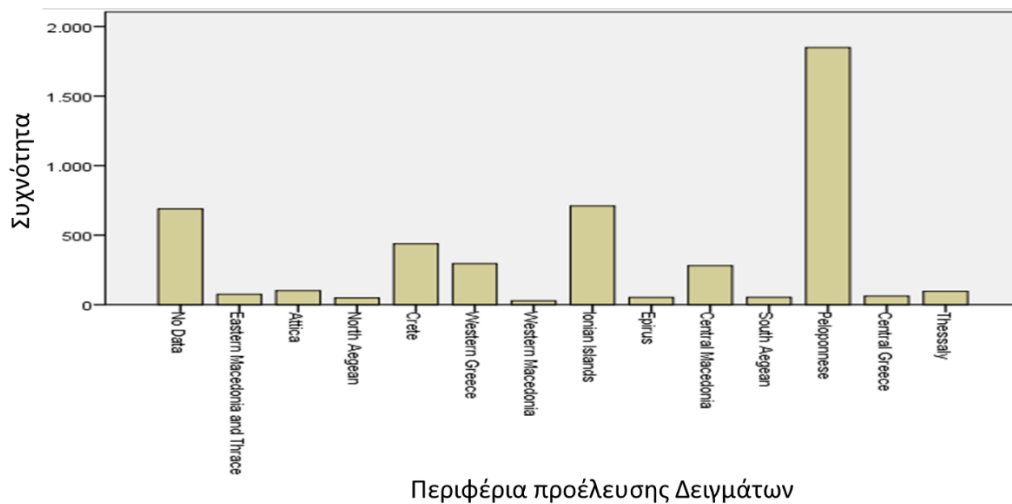
Γεωγραφική κατανομή των ελληνικών δειγμάτων.

Περιφέρειες.

Ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων που αναλύθηκαν (n=1,849) λόγω και του προγραμματισμού που εξ αρχής έγινε από το πρόγραμμα Aristoil, προήλθε από το γεωγραφικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου, αντιπροσωπεύοντας το 38,7% του συνόλου των δειγμάτων. Ένας επίσης σημαντικός αριθμός δειγμάτων προέρχεται από το γεωγραφικό διαμέρισμα των Ιονίων νήσων (n=710, 14.8%), αλλά και από την Κρήτη (n=438, 9.1%). Τέλος για 690 δείγματα, δεν υπήρχαν δεδομένα γεωγραφικής προέλευσης καθώς αυτά αποτελούσαν μίγματα ελαιολάδου που προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας..

**Πίνακας 4.11:** Γεωγραφική κατανομή σε επίπεδο περιφέρειας για τα ελληνικά δείγματα.

<i>Περιφέρεια</i>	<i>Συχνότητα</i>	<i>Ποσοστό</i>	<i>Αθροιστικό Ποσοστό</i>
<i>Χωρίς Δεδομένα</i>	689	14.4	14.4
<i>Ανατ. Μακεδονία και Θράκη</i>	75	1.6	16.0
<i>Αττική</i>	101	2.1	18.1
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49	1.0	19.1
<i>Κρήτη</i>	438	9.2	28.3
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	6.2	34.5
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28	0.6	35.1
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	14.9	49.9
<i>Ήπειρος</i>	52	1.1	51.0
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	5.9	56.9
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	1.1	58.0
<i>Πελοπόννησος</i>	1,849	38.7	96.7
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62	1.3	98.0
<i>Θεσσαλία</i>	96	2.0	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>100.0</b>	



**Διάγραμμα 4.11:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά περιφέρεια.

#### Νομοί.

Για 710 δείγματα ελαιολάδου που αναλύθηκαν δεν υπήρχαν δεδομένα για τον νομό από τον οποίο προήλθε το δείγμα. Τα περισσότερα από τα δείγματα που αναλύθηκαν και είχαν Νομό προέλευσης, προέρχονταν από τον νομό Μεσσηνίας (n=786) και τον νομό Λακωνίας (n=513), αντιπροσωπεύοντας αντίστοιχα το 16,6% και το 10,7% αντίστοιχα, των ελληνικών δειγμάτων. Σημαντικός αριθμός δειγμάτων, προήλθε από τους νομούς της Κέρκυρας (n=307, 6.4%), και της Ζάκυνθου (n=237, 4.9%), που ανήκουν στην περιφέρεια Ιονίων Νήσων, της Αργολίδας (n=256, 5.3%) και της Χαλκιδικής (n=264, 5.5%).

**Πίνακας 4.12:** Γεωγραφική κατανομή σε επίπεδο νομού για τα ελληνικά δείγματα.

Νομός	Συχνότητα	Ποσοστό (%)	Αθροιστικό Ποσοστό (%)
Χωρίς Δεδομένα	710	14.9	14.9
Αχαΐα	82	1.7	16.6
Αιτωλοακαρνανία	82	1.7	18.3
Αργολίδα	256	5.4	23.7
Αρκαδία	149	3.1	26.8
Αττική	101	2.1	28.9
Βοιωτία	23	0.5	29.4
Χαλκιδική	264	5.5	34.9
Χανιά	196	4.1	39.0
Χίος	6	0.1	39.1
Κυκλάδες	48	1.0	40.1
Δωδεκάνησα	5	0.1	40.2
Δράμα	2	0.0	40.3
Ευβοία	22	0.5	40.7
Εβρος	4	0.1	40.8
Φωκίδα	2	0.0	40.9
Ηλεία	130	2.7	43.6
Ηράκλειο	76	1.6	45.2
Καβάλα	53	1.1	46.3
Κεφαλονιά	107	2.2	48.5
Κέρκυρα	307	6.4	54.9
Κόρινθος	145	3.0	58.0
Κοζάνη	28	0.6	58.6



<i>Λακωνία</i>	513	10.7	69.3
<i>Λάρισα</i>	7	0.1	69.4
<i>Λασιθί</i>	136	2.8	72.3
<i>Λευκάδα</i>	59	1.2	73.5
<i>Λέσβος</i>	40	0.8	74.4
<i>Μαγνησία</i>	63	1.3	75.7
<i>Μεσσηνία</i>	786	16.5	92.1
<i>Φθιώτιδα</i>	15	0.3	92.4
<i>Πρέβεζα</i>	46	1.0	93.4
<i>Ρέθυμνο</i>	25	0.5	93.9
<i>Ροδόπη</i>	2	0.0	94.0
<i>Σάμος</i>	3	0.1	94.0
<i>Θεσπρωτία</i>	6	0.1	94.2
<i>Θεσσαλονίκη</i>	17	0.4	94.5
<i>Τρίκλα</i>	11	0.2	94.7
<i>Ξάνθη</i>	14	0.3	95.0
<i>Ζάκυνθος</i>	237	5.0	100.0
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>100.0</b>	

Δήμοι.

Για 691 δείγματα ελαιολάδου που αναλύθηκαν δεν υπήρχαν δεδομένα για τον δήμο από τον οποίο προήλθε το δείγμα. Τα περισσότερα δείγματα σε επίπεδο δήμου, προήλθαν από τον δήμο Κέρκυρας (n=305, 5.4%), και τον δήμο Ζακύνθου (n=237, 4.9%), τον δήμο Πύλου – Νέστορος (n=249, 5.4%), τον δήμο Σπάρτης (n=216, 4.4%) και Καλαμάτας (n=193, 3.9%). Σημαντικός τέλος αριθμός δειγμάτων προήλθε από τον δήμο Γορτυνίας και Μεσσήνης (n=153, 3.1%).

**Πίνακας 4.13:** Γεωγραφική κατανομή σε επίπεδο δήμου.

Δήμος	Συχνότητα	Ποσοστό	Αθροιστικό Ποσοστό	Δήμος	Συχνότητα	Ποσοστό	Αθροιστικό Ποσοστό
<i>Χωρίς Δεδομένα</i>	691	14.5	14.5	<i>Λαυρεωτική</i>	6	0.1	54.8
<i>Αβδήρα</i>	14	0.3	14.8	<i>Λευκάδα</i>	57	1.2	55.9
<i>Αιγιαλεία</i>	33	0.7	15.4	<i>Λέσβος</i>	40	0.8	56.8
<i>Αγ. Νικόλαος</i>	23	0.5	15.9	<i>Λιβαδειά</i>	3	0.1	56.8
<i>Αγιά</i>	1	0.0	15.9	<i>Λοκροί</i>	7	0.1	57.0
<i>Αγρίνιο</i>	24	0.5	16.5	<i>Λουτράκι Αγ. Θεόδωροι</i>	35	0.7	57.7
<i>Αχαρνές</i>	9	0.2	16.6	<i>Μάκρη</i>	2	0.0	57.8
<i>Αστερουσία</i>							
<i>Ακτιο Βονιτσα</i>	3	0.1	16.7	<i>Μαραθόνας</i>	2	0.0	57.8
<i>Αλεξανδρούπολη</i>	2	0.0	16.7	<i>Μεγαλόπολη</i>	1	0.0	57.8
<i>Αιμυρός</i>	15	0.3	17.1	<i>Μέγαρα</i>	7	0.1	58.0
<i>Αμάρι</i>	1	0.0	17.1	<i>Μεσολόγγι</i>	12	0.3	58.2
<i>Αμφίκλεια Ελάτεια</i>	1	0.0	17.1	<i>Μεσσήνη</i>	149	3.1	61.3
<i>Αμφιλοχία</i>	9	0.2	17.3	<i>Μικρή Βόλβη</i>	4	0.1	61.4
<i>Ανατολική Μάνη</i>	108	2.3	19.5	<i>Μινώα Πεδιάδα</i>	4	0.1	61.5
<i>Ανδραβίδα</i>	5	0.1	19.7	<i>Μώλος</i>	1	0.0	61.5
<i>Κυλλήνη</i>							
<i>Ανδρίτσена</i>	29	0.6	20.3	<i>Μονεμβασιά</i>	123	2.6	64.1
<i>Κρέστενα</i>							
<i>Αντίπαρος</i>	6	0.1	20.4	<i>Μολοπόταμος</i>	5	0.1	64.2
<i>Αποκορώνου</i>	2	0.0	20.4	<i>Ναύπλιο</i>	17	0.4	64.6
<i>Αρχαία Ολυμπία</i>	47	1.0	21.4	<i>Νάξος</i>	17	0.4	64.9
<i>Άργος Μυκίνες</i>	25	0.5	21.9	<i>Νέα Προποντίδα</i>	124	2.6	67.5
<i>Βιάνος</i>	36	0.8	22.7	<i>Νεμέα</i>	9	0.2	67.7
<i>Βόλβη</i>	12	0.3	22.9	<i>Νότιο Πήλιο</i>	62	1.3	69.0
<i>Χανιά</i>	44	0.9	23.9	<i>Οιγαλία</i>	29	0.6	69.6

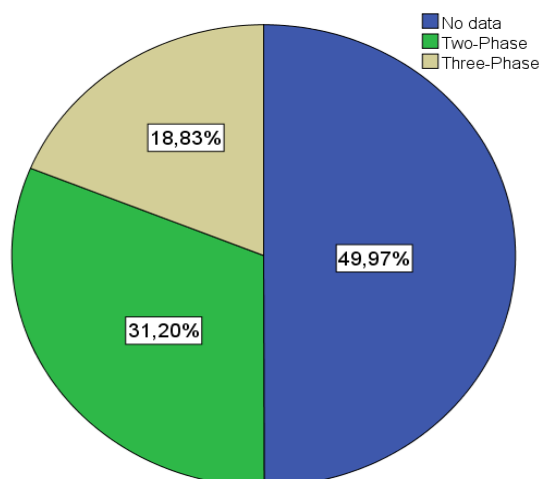
Χίος	6	0.1	24.0	Ωρωπός	1	0.0	69.6
Δελφοί	1	0.0	24.0	Παγγαιο	1	0.0	69.7
Δίστομο Αράχωβα	13	0.3	24.3	Πάργα	2	0.0	69.7
Δράμα	2	0.0	24.3	Πάρος	24	0.5	70.2
Δυτική Αχαΐα	29	0.6	24.9	Πάτρα	9	0.2	70.4
Δυτική Μάνη	44	0.9	25.8	Παζοί	4	0.1	70.5
Ελασσόνα	4	0.1	25.9	Πηγειού	1	0.0	70.5
Επίδαυρος	21	0.4	26.4	Πλατανιά	54	1.1	71.6
Ερέτρια	3	0.1	26.4	Πολύγυρος	112	2.3	74.0
Ερμιονίδα	193	4.0	30.5	Πρέβεζα	44	0.9	74.9
Ερύμανθος	1	0.0	30.5	Προσοτσάνη	2	0.0	74.9
Ευβοια	1	0.0	30.5	Πύλον Νέστορος	249	5.2	80.1
Ευρώτα	66	1.4	31.9	Πύργος	23	0.5	80.6
Φαιστός	38	0.8	32.7	Ρέθυμνο	20	0.4	81.0
Γορτυνία	147	3.1	35.8	Σαλαμίνα	9	0.2	81.2
Χαλκίδα	6	0.1	35.9	Σάμος	3	0.1	81.3
Ιεράπετρα	2	0.0	35.9	Σαρωνικός	23	0.5	81.8
Ηγουμενίτσα	6	0.1	36.1	Σικωνιές	45	0.9	82.7
Ηλίδα	22	0.5	36.5	Σητεία	111	2.3	85.0
Ηράκλειο	29	0.6	37.1	Σιθωνία	2	0.0	85.1
Ιστιαία Αιδηψός	1	0.0	37.1	Σπάρτη	216	4.5	89.6
Ιτέα	1	0.0	37.2	Σπάτα Αρτέμιδα	16	0.3	89.9
Ιθάκη	2	0.0	37.2	Σπέτσες	1	0.0	90.0
Καλαμάτα	188	3.9	41.1	Στυλίδα	1	0.0	90.0
Καλάβρυτα	10	0.2	41.4	Τέμπη	1	0.0	90.0
Κάλυμνος	59	1.2	42.6	Θάσος	49	1.0	91.0
Κάρμαθος	3	0.1	42.7	Θέρμο	17	0.4	91.4
Κάρυστος	3	0.1	42.7	Θήβα	6	0.1	91.5
Κασσάνδρα	26	0.5	43.3	Τριφυλλία	127	2.7	94.2
Κέα	1	0.0	43.3	Τρίκαλα	11	0.2	94.4
Κεφαλονιά	107	2.2	45.5	Τροιζίνα	3	0.1	94.5
Κέρκυρα	303	6.3	51.9	Βέλο Βόχα	1	0.0	94.5
Κίσσαμος	3	0.1	51.9	Βόλος	1	0.0	94.5
Κορινθίας	53	1.1	53.0	Βόρεια Κονουρία	1	0.0	94.5
Κοζάνη	28	0.6	53.6	Ξηρόμερο	14	0.3	94.8
Κρωπία	14	0.3	53.9	Ξυλόκαστρο	4	0.1	94.9
				Ευρωστινή			
Κύμη Αλιβέρι	8	0.2	54.1	Ζαχάρω	4	0.1	95.0
Κόθηρα	19	0.4	54.5	Ζάκυνθος	237	5.0	99.9
Λαμία	6	0.1	54.6	Ζήρος	3	0.1	100.0
Λάρισα	1	0.0	54.6	Σύνολο	4,778	100.0	

Κατανομή ελληνικών δειγμάτων, ως προς τον τύπο του ελαιοτριβείου.

Για τα μισά περίπου δείγματα (50%) δεν υπήρχαν δεδομένα για τον τύπο του ελαιοτριβείου που χρησιμοποιήθηκε. Από τα υπόλοιπα, ένα σημαντικό αριθμός (n=1,488) αφορούσαν σε ελαιόλαδα των οποίων η παραγωγή πραγματοποιήθηκε σε ελαιοτριβεία 2 φάσεων, και αποτελούν το 31,2% επί των συνολικών δειγμάτων, ενώ το 18,8% αφορούσε σε ελαιοτριβεία 3 φάσεων.

**Πίνακας 4.14:** Κατανομή ελληνικών δειγμάτων ως προς τον τύπο ελαιοτριβείου.

Τύπος Ελαιοτριβείου	Συχνότητα	Ποσοστό	Αθροιστικό Ποσοστό
<i>Χωρίς Δεδομένα</i>	2,389	50.0	50.0
<i>2 Φάσεων</i>	1,488	31.1	81.2
<i>3 Φάσεων</i>	901	18.9	100.0
<i>Σύνολο</i>	4,778	100.0	



**Διάγραμμα 4.12:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά τύπο ελαιοτριβείου.

Η χρήση ελαιοτριβείου 2 φάσεων, έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές ότι ευνοεί την αύξηση της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Η χρήση διφασικών ελαιοτριβείων αποτελεί μια εξελιγμένη μέθοδο ελαιοποίησης που αυξάνει την ποιότητα του ελαιολάδου συνολικά, και μειώνει το ποσοστό των αποβλήτων που αποτελεί μείζον πρόβλημα για τα ελαιοτριβεία και όχι μόνον. Όπως διαπιστώνεται και στο προηγούμενο διάγραμμα, η τεχνολογία αυτή έχει αφομοιωθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό από τους έλληνες παραγωγούς. Το ποσοστό των ελαιοτριβείων τριών φάσεων ωστόσο, παραμένει σε σημαντικό ποσοστό, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω ενημέρωσης και περισσότερων κινήτρων για την εξέλιξη των ελαιοτριβείων προς αυτή την κατεύθυνση.

#### 5.4.3 Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στα ελληνικά ελαιόλαδα.

##### Γενικά στοιχεία.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, ελαιοκορωνάλη, άγλυκο του λιγκστροσίδη (μονοαλδεϋδική μορφή), άγλυκο της ελευρωπαΐνης (μονοαλδεϋδική μορφή), ολικών παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης καθώς και του άθροισματος των φαινολικών συστατικών

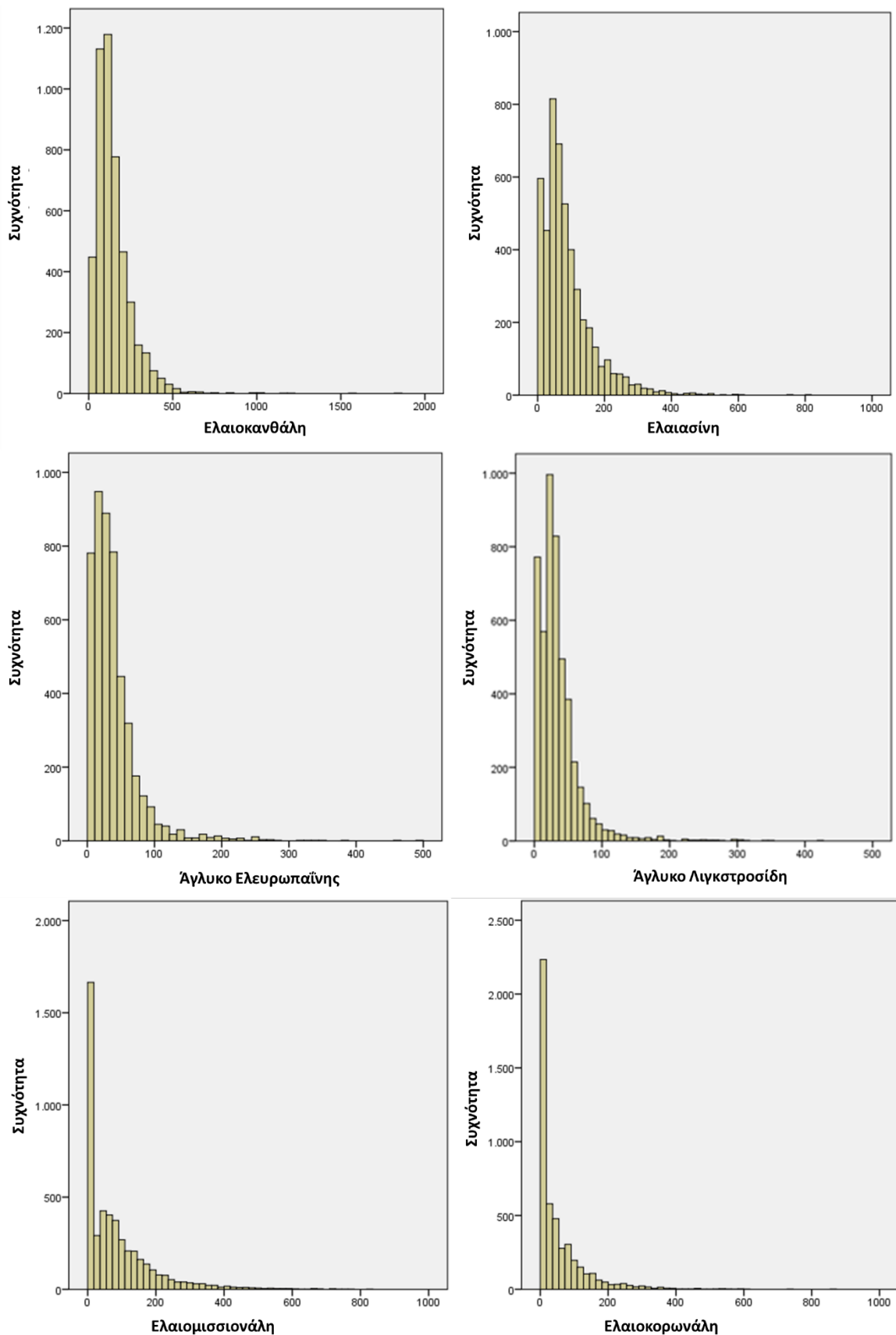
Τα ολικά παράγωγα της υδροξυτυροσόλης είναι ένας όρος που συχνά μελετάται στην βιβλιογραφία, και αποτελεί το άθροισμα της ελαιασίνης, της ελαιομισσιονάλης και του άγλυκου της ελευρωπαΐνης. Αντίστοιχα τα ολικά παράγωγα τυροσόλης, αποτελούν το άθροισμα των συστατικών ελαιοκανθάλη, ελαιοκορωνάλη και άγλυκο του λιγκστροσίδη. Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών (total phenols) αποτελεί το άθροισμα των ολικών παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις όλων των συστατικών που μελετήθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων που προήλθαν από την Ελλάδα.

**Πίνακας 4.15:** Συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα ελληνικά ελαιόλαδα.

<b>n=4,791 (mg/Kg)</b>	<b>Μέγιστη τιμή</b>	<b>Μέσος Όρος</b>	<b>SD</b>
<i>Ελαιοκανθάλη</i>	1,821	146.25	109.853
<i>Ελαιασίνη</i>	809	87.89	77.931
<i>Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνη</i>	2,045	234.13	175.925
<i>Άγλυκο Ελευρωπαΐνης</i>	494	37.89	37.956
<i>Άγλυκο Λιγκστροσίδη</i>	421	34.03	33.666
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	833	84.91	106.150
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	867	51.49	78.023
<i>Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης</i>	2,072	265.18	190.966
<i>Ολικά Παράγωγα Υδροξυτυροσόλης</i>	1,305	177.27	155.351
<i>Ολικές Φαινόλες</i>	2,442	442.45	332.564

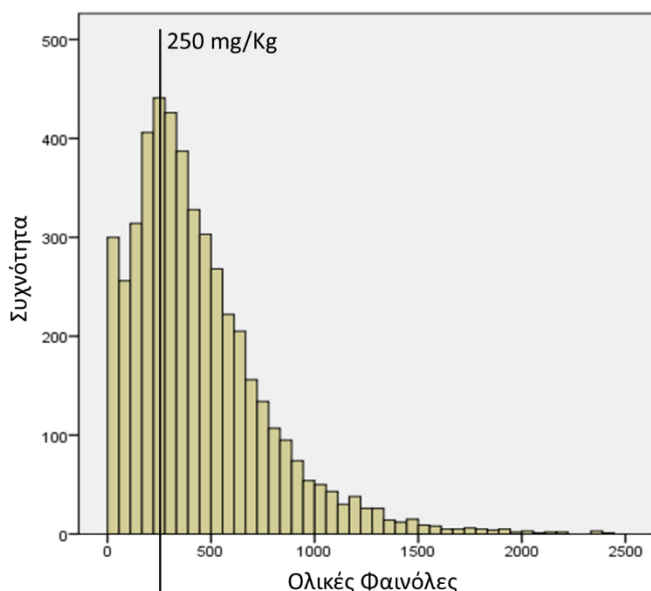
Στον τον ανωτέρω πίνακα διαπιστώθηκε ότι ο μέσος όρος των ολικών φαινολών είναι αρκετά μεγαλύτερος από το όριο για το ισχυρισμό υγείας του ελαιολάδου. Το εύρος των ολικών φαινολών, είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό που έχει παρατηρηθεί στην βιβλιογραφία μέχρι σήμερα καθώς φτάνει σε συγκεντρώσεις μέχρι 2,440 mg/kg. Η ελαιοκανθάλη, το συστατικό που έχει προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον μέχρι σήμερα στην βιβλιογραφία, φαίνεται να αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό στα ελληνικά ελαιόλαδα, και ως μέσος όρος και ως μέγιστη τιμή. Στα αμέσως πιο συχνά εμφανιζόμενα συστατικά είναι η ελαιασίνη, ως μέσος όρος, ενώ με μεγάλες συγκεντρώσεις, φαίνεται να μπορούν να εμφανιστούν τα συστατικά ελαιασίνη, ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη. Τις μικρότερες συγκεντρώσεις, τόσο ως μέσους όρους, όσο και ως μέγιστες τιμές, φάνηκε να εμφανίζουν οι μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης. Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζονται οι κατανομές συχνοτήτων για όλα τα

φαινολικά συστατικά αλλά και για τις ολικές φαινόλες. Η μορφή της κατανομής είναι παρόμοια για όλα τα συστατικά, με εναλλαγές μόνο στην μέγιστη τιμή συχνότητας,



**Διάγραμμα 4.13:** Κατανομή της συγκέντρωσης του κάθε φαινολικού συστατικού.

Από το διάγραμμα των ολικών φαινολικών συστατικών διαπιστώθηκε ότι στα τα ελληνικά ελαιόλαδα, υπάρχει πολύ ισχυρή πιθανότητα να υπάρχει πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών από εκείνη των 250 mg/kg. Εμφανώς μειωμένα, αλλά εξίσου σημαντικά, είναι και τα ποσοστά των δειγμάτων ελαιολάδου, τα οποία εμφάνισαν εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (πάνω από 1000 mg/kg).



**Διάγραμμα 4.14:** Κατανομή της συγκέντρωσης του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών.

Στην συνέχεια της ανάλυσης των στατιστικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σημαντικότητας των διαφορών που εντοπίζονται για διάφορες κατηγορίες όπως η ποικιλία, η εποχή συγκομιδής, ο τύπος του ελαιοτριβείου και η γεωγραφική προέλευση του δείγματος. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την κανονικότητα τους με τα μοντέλα Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov, (Shapiro and Wilk 1965; Cramer and Howitt 2004; Cramer 2003; Doane and Seward 2011; Razali and Wah 2011; Martin and Bridgmon 2012).

Τα σύνολα των δεδομένων τα οποία εμφάνισαν αποκλίσεις από την κανονικότητα, μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά, (Chambers et al. 1983), αν και γενικά η ανάλυση απόκλισης, είναι μια μέθοδος η οποία δεν επηρεάζεται σημαντικά από τις αποκλίσεις των δειγμάτων από την κανονικότητα, ακόμα και όταν οι πληθυσμοί των διαφορετικών διεργασιών ακολουθεί διαφορετική ποιοτικά κατανομή (Sokal and Rohlf 1995; Καλτσίκης 1989).

Το μοντέλο Duncan's Multiple Range Test (MRT) εφαρμόστηκε για τις πολλαπλές συγκρίσεις. Ο αριθμός των δειγμάτων που συμμετείχαν στην κάθε ανάλυση, δεν είναι ίδιος, καθώς σε κάθε ανάλυση επιβάλλονται συγκεκριμένοι περιορισμοί και αποκλεισμοί.

Για όλες τις αναλύσεις εφαρμόστηκε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$  με την χρήση λογισμικού SPSS v.20 software για Windows (IBM SPSS Statistics 2011, IBM Corp.).

Διαφορές στις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών.

Ενδιαφέροντα ήταν τα ευρήματα που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των ολικών, αλλά και των επιμέρους φαινολικών συστατικών συγκριτικά για όλες τις ποικιλίες που μελετήθηκαν. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για το κάθε φαινολικό συστατικό

**Πίνακας 4.16:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Καλαμών</i>	29	363.15	400.294	0	1,559
<i>Λιανολιά</i>	283	303.25	130.566	0	750
<i>Μουρτολιά</i>	13	193.69	150.984	76	641
<i>Ολύμπια</i>	213	190.88	114.249	0	1,188
<i>Αγριελιά</i>	142	181.69	119.914	0	974
<i>Χαλκιδικής</i>	312	179.70	105.839	0	658
<i>Αμφίσησης</i>	235	149.42	102.549	0	531
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>146.26</b>	<b>109.881</b>	<b>0</b>	<b>1,821</b>
<i>Αθηνολιά</i>	228	143.73	73.918	0	379
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	138.18	70.250	0	409
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	125.11	79.765	0	1,022
<i>Κολοβή</i>	34	119.65	51.452	28	237
<i>Μανάκι</i>	222	91.24	55.422	0	348
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	88.16	55.132	0	330

**Πίνακας 4.17:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης της ελαιασίνης.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Λιανολιά</i>	283	206.79	120.715	0	758
<i>Ολύμπια</i>	213	123.31	80.484	0	563
<i>Καλαμών</i>	29	104.25	109.011	0	404
<i>Χαλκιδική</i>	312	96.53	70.654	0	387
<i>Κολοβή</i>	34	94.93	72.353	0	269
<i>Αθηνολιά</i>	228	93.06	63.129	0	303
<i>Μουρτολιά</i>	13	89.45	53.079	0	208
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>87.90</b>	<b>77.923</b>	<b>0</b>	<b>809</b>
<i>Αγριελιά</i>	142	83.79	70.810	0	368
<i>Αμφίσησης</i>	235	81.95	68.723	0	373
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	77.52	64.019	0	809
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	69.70	51.253	0	300
<i>Μανάκι</i>	222	65.60	67.387	0	370
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	43.10	49.502	0	267

**Πίνακας 4.18:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊκής.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Ολόμπια</i>	213	102.46	84.288	0	494
<i>Αθηνολιά</i>	228	44.73	32.517	0	146
<i>Χαλκιδικής</i>	312	40.99	32.784	0	248
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>37.93</b>	<b>37.993</b>	<b>0</b>	<b>494</b>
<i>Αμφίσσης</i>	235	37.57	32.267	0	190
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	36.23	27.911	0	263
<i>Λιανολιά</i>	283	36.12	28.376	0	224
<i>Κολοβή</i>	34	31.02	21.101	0	95
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	30.24	29.583	0	187
<i>Καλαμών</i>	29	27.96	34.808	0	165
<i>Αγριελιά</i>	142	27.73	24.025	0	133
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	19.58	19.297	0	92
<i>Μανάκι</i>	222	17.16	15.891	0	112
<i>Μουρτολιά</i>	13	11.79	21.229	0	78

**Πίνακας 4.19:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκστροσίδη.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Ολόμπια</i>	213	90.56	79.336	0	421
<i>Αθηνολιά</i>	228	38.10	30.093	0	224
<i>Χαλκιδικής</i>	312	36.29	27.450	0	185
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>34.05</b>	<b>33.697</b>	<b>0</b>	<b>421</b>
<i>Λιανολιά</i>	283	32.16	20.942	0	197
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	31.95	23.464	0	204
<i>Αμφίσσης</i>	235	31.76	27.764	0	148
<i>Αγριελιά</i>	142	30.31	28.801	0	271
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	28.89	29.357	0	190
<i>Κολοβή</i>	34	24.22	16.156	0	60
<i>Καλαμών</i>	29	24.00	27.237	0	114
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	17.45	16.147	0	72
<i>Μανάκι</i>	222	17.32	17.274	0	80
<i>Μουρτολιά</i>	13	9.41	12.360	0	39

**Πίνακας 4.20:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης της ελατοκορωνάλης.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Ολόμπια</i>	213	239.86	196.560	0	833
<i>Αθηνολιά</i>	228	149.97	134.493	0	716
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>85.07</b>	<b>106.225</b>	<b>0</b>	<b>833</b>
<i>Χαλκιδικής</i>	312	83.28	84.504	0	460
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	83.01	91.533	0	721
<i>Λιανολιά</i>	283	82.78	96.467	0	570
<i>Αμφίσσης</i>	235	80.16	96.267	0	465
<i>Κολοβή</i>	34	63.29	93.118	0	330
<i>Αγριελιά</i>	142	53.90	84.967	0	665
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	52.85	67.235	0	316
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	49.32	78.554	0	328
<i>Καλαμών</i>	29	43.05	72.252	0	228
<i>Μουρτολιά</i>	13	32.70	108.594	0	393
<i>Μανάκι</i>	222	28.36	50.491	0	405



**Πίνακας 4.21:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης της ελαιομυσιονάλης.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Ολύμπια</i>	213	148.51	142.867	0	589
<i>Αθηνολιά</i>	228	90.76	101.442	0	543
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>51.58</b>	<b>78.089</b>	<b>0</b>	<b>867</b>
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	50.53	66.633	0	516
<i>Λιανολιά</i>	283	49.86	72.232	0	535
<i>Κολοβή</i>	34	49.03	85.914	0	382
<i>Μουρτολιά</i>	13	46.99	169.429	0	611
<i>Αμφίσσης</i>	235	44.51	65.223	0	309
<i>Χαλκιδικής</i>	312	40.98	55.645	0	384
<i>Αγριελιά</i>	142	33.99	82.272	0	867
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	28.44	55.973	0	219
<i>Καλαμών</i>	29	26.70	56.275	0	212
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	24.70	39.376	0	248
<i>Μανάκι</i>	222	19.84	60.472	0	735

**Πίνακας 4.22:** Κατάταξη των ποικιλιών, ως προς τον μέσο όρο της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών.

Ποικιλία	n	Μέσος Όρος	SD. Dev.	Ελάχιστο	Μέγιστο
<i>Ολύμπια</i>	213	895.58	559.274	0	2,343
<i>Λιανολιά</i>	283	710.97	342.185	0	2,442
<i>Καλαμών</i>	29	589.12	523.149	0	1,898
<i>Αθηνολιά</i>	228	560.35	361.752	0	1,712
<i>Χαλκιδικής</i>	312	477.76	298.189	0	1,468
<b>Σύνολο</b>	<b>4,778</b>	<b>442.78</b>	<b>332.792</b>	<b>0</b>	<b>2,442</b>
<i>Αμφίσσης</i>	235	425.36	312.446	0	1,438
<i>Αγριελιά</i>	142	411.40	307.541	0	2,382
<i>Κορωνέικη</i>	2,183	404.35	265.570	0	2,079
<i>Μουρτολιά</i>	13	384.04	328.859	153	1,287
<i>Κολοβή</i>	34	382.15	271.916	28	1,204
<i>Κουτσουρελιά</i>	166	344.57	221.867	0	1,059
<i>Μεγαρίτικη</i>	65	246.05	206.540	0	849
<i>Μανάκι</i>	222	239.51	203.785	0	1,396

Από τα αποτελέσματα στον προηγούμενο πίνακα σχηματίστηκε μια πρώτη εικόνα για τις ιδιαιτερότητες της κάθε ποικιλίας. Έτσι παρατηρήθηκε για τους μέσους όρους των ολικών φαινολικών συστατικών, ότι ποικιλίες όπως η Ολύμπια ποικιλία, η ποικιλία Λιανολιά και η Καλαμών ότι είναι ποικιλίες που έχουν συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σημαντικά μεγαλύτερη από τον γενικό μέσο όρο. Οι συγκεκριμένες ποικιλίες εμφάνισαν και πολύ μεγάλες μέγιστες τιμές.

Αντίθετα υπήρχαν άλλες πολύ γνωστές ποικιλίες όπως η Κορωνέικη ποικιλία και η Αγριελιά, όπου ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών ήταν κάτω από το μέσο όρο. Σημαντικό εύρημα ωστόσο, είναι ότι οι ποικιλίες αυτές εμφάνισαν μέγιστες τιμές πολύ υψηλές για κάποια από τα συστατικά. Το γεγονός αυτό φανερώνει, ότι το είδος της ποικιλίας, παίζει έναν πολύ

σημαντικό ρόλο στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, ωστόσο, και άλλοι παράγοντες όπως η γεωγραφική προέλευση, η μέθοδος ελαιοποίησης, η εποχή συγκομιδής, μπορούν να παίζουν καθοριστικό ρόλο.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το μοντέλο MRT. Με την μέθοδο αυτή, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών επιμερίζεται σε υποσύνολα, με σκοπό να εντοπιστεί ποιες ποικιλίες ξεχωρίζουν σε βαθμό μεγαλύτερο από τον μέσο όρο.

**Πίνακας 4.23:** Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιοκανθάλης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

<b>Ελαιοκανθάλη (mg/Kg)</b>								
<i>Ποικιλία</i>	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Καλαμών</i>	29	363.15						
<i>Λιανολιά</i>	283		303.25					
<i>Μουρτολιά</i>	13			193.69				
<i>Ολύμπια</i>	213			190.88				
<i>Αγριελιά</i>	142			181.69	181.69			
<i>Χαλκιδικής</i>	312			179.70	179.70			
<i>Αμφίσσης</i>	235				149.42	149.42		
<i>Αθηνολιά</i>	228					143.73		
<i>Κουτσοουρελιά</i>	166					138.18		
<i>Κορωνέικη</i>	2183					125.11	125.11	
<i>Κολοβή</i>	34					119.65	119.65	119.65
<i>Μανάκι</i>	222						91.24	91.24
<i>Μεγαρίτικη</i>	65							88.16

**Πίνακας 4.24:** Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιασίνης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

<b>Ελαιασίνη(mg/Kg)</b>							
<i>Ποικιλία</i>	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Λιανολιά</i>	283	206.79					
<i>Ολύμπια</i>	213		123.31				
<i>Καλαμών</i>	29		104.25	104.25			
<i>Χαλκιδικής</i>	312			96.53	96.53		
<i>Κολοβή</i>	34			94.93	94.93		
<i>Αθηνολιά</i>	228			93.06	93.06		
<i>Μουρτολιά</i>	13			89.45	89.45	89.45	
<i>Αγριελιά</i>	142			83.79	83.79	83.79	
<i>Αμφίσσης</i>	235			81.95	81.95	81.95	
<i>Κορωνέικη</i>	2183			77.52	77.52	77.52	
<i>Κουτσοουρελιά</i>	166				69.70	69.70	
<i>Μανάκι</i>	222					65.60	65.60
<i>Μεγαρίτικη</i>	65						43.10

**Πίνακας 4.25:** Σύγκριση του μέσου όρου του Άγλυκου της ελευρωπαΐνης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

Άγλυκο Ελευρωπαΐνης (mg/Kg)							
Ποικιλία	n	1	2	3	4	5	6
Ολύμπια	213	102.46					
Αθηνολιά	228		44.73				
Χαλκιδικής	312		40.99	40.99			
Αμφίσσης	235		37.57	37.57			
Κορωνέικη	2183		36.23	36.23			
Λιανολιά	283		36.12	36.12			
Κολοβή	34			31.02	31.02		
Κουτσοουρελιά	166			30.24	30.24		
Καλαμών	29			27.96	27.96	27.96	
Αγριελιά	142			27.73	27.73	27.73	
Μεγαρίτικη	65				19.58	19.58	19.58
Μανάκι	222					17.16	17.16
Μουρτολιά	13						11.79

**Πίνακας 4.26:** Σύγκριση του μέσου όρου του Άγλυκου του λιγκστροσίδη για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

Άγλυκο Λιγκστροσίδη (mg/Kg)						
Ποικιλία	n	1	2	3	4	5
Ολύμπια	213	90.56				
Αθηνολιά	228		38.10			
Χαλκιδικής	312		36.29			
Λιανολιά	283		32.16	32.16		
Κορωνέικη	2183		31.95	31.95		
αμφίσσης	235		31.76	31.76		
Αγριελιά	142		30.31	30.31		
Κουτσοουρελιά	166		28.89	28.89		
Κολοβή	34			24.22	24.22	
Καλαμών	29			24.00	24.00	
Μεγαρίτικη	65				17.45	17.45
Μανάκι	222				17.32	17.32
Μουρτολιά	13					9.41

**Πίνακας 4.27:** Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιοκορωνάλης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

<b>Ελαιοκορωνάλη (mg/Kg)</b>						
<i>Ποικιλία</i>	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>4</i>
<i>Ολύμπια</i>	213	239.86				
<i>Αθηνολιά</i>	228		149.97			
<i>Χαλκιδικής</i>	312			83.28		
<i>Κορωνέικη</i>	2183			83.01		
<i>Λιανολιά</i>	283			82.78		
<i>Αμφίσσης</i>	235			80.16	80.16	
<i>Κολοβή</i>	34			63.29	63.29	63.29
<i>Αγριελιά</i>	142			53.90	53.90	53.90
<i>Κουτσορευλιά</i>	166			52.85	52.85	52.85
<i>Μεγαρίτικη</i>	65			49.32	49.32	49.32
<i>Καλαμών</i>	29				43.05	43.05
<i>Μουρτολιά</i>	13					32.70
<i>Μανάκι</i>	222					28.36

**Πίνακας 4.28:** Σύγκριση του μέσου όρου της ελαιομισσιονάλης για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

<b>Ελαιομισσιονάλη (mg/Kg)</b>					
<i>Ποικιλία</i>	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Ολύμπια</i>	213	148.51			
<i>Αθηνολιά</i>	228		90.76		
<i>Κορωνέικη</i>	2183			50.53	
<i>Λιανολιά</i>	283			49.86	
<i>Κολοβή</i>	34			49.03	
<i>Μουρτολιά</i>	13			46.99	46.99
<i>Αμφίσσης</i>	235			44.51	44.51
<i>Χαλκιδικής</i>	312			40.98	40.98
<i>Αγριελιά</i>	142			33.99	33.99
<i>Μεγαρίτικη</i>	65			28.44	28.44
<i>Καλαμων</i>	29			26.70	26.70
<i>Κουτσορευλιά</i>	166			24.70	24.70
<i>Μανάκι</i>	222				19.84

**Πίνακας 4.29:** Σύγκριση του μέσου όρου των ολικών φαινόλων για τις διάφορες ποικιλίες με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι ποικιλίες που εμφανίζονται στην ίδια στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους).

Ολικές Φαινόλες (mg/Kg)								
Ποικιλία	n	1	2	3	4	5	6	7
Ολύμπια	213	895.58						
Λιανολιά	283		710.97					
Καλαμών	29			589.12				
Αθηνολιά	228			560.35	560.35			
Χαλκιδική	312				477.76	477.76		
Αμφίσσης	235					425.36	425.36	
Αγριελιά	142					411.40	411.40	
Κορωνέικη	2183					404.35	404.35	
Μουρτολιά	13					384.04	384.04	
Κολοβή	34					382.15	382.15	
Κουτσουρελιά	166						344.57	344.57
Μεγαρίτικη	65							246.05
Μανάκι	222							239.51

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα διαπιστώθηκε με βεβαιότητα, ότι η ποικιλία με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, είναι η Ολύμπια ποικιλία, ακολουθούμενη από την ποικιλία Λιανολιά. Υπάρχουν αντίστοιχα ποικιλίες όπως το Μανάκι, η Μεγαρίτικη και η Κουτσουρελιά, οι οποίες ξεχωρίζουν για τη χαμηλή τους περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Αξίζει να αναφερθεί βέβαια ότι ανάλυση αυτή αφορά τους μέσους όρους από τα δείγματα που αναλύθηκαν, καθώς όπως παρουσιάστηκε και στον πίνακα 5.23 στις συγκεκριμένες ποικιλίες υπήρχαν δείγματα στα οποία η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών αγγίζει τα επίπεδα της Ολύμπιας ποικιλίας και της Λιανολιάς.

Για τις επιμέρους τώρα φαινόλες παρατηρήθηκε ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης, εμφανίστηκαν στην ποικιλία Καλαμών ακολουθούμενη από την ποικιλία Λιανολιάς. Για τις ποικιλίες αυτές η υψηλή συγκέντρωση ελαιοκανθάλης, καθίσταται χαρακτηριστικό γνώρισμα. Η ποικιλία Λιανολιά, εμφανίζει στατιστικά την μεγαλύτερη συγκέντρωση για το συστατικό ελαιασίνη. Όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενη ενότητα, οι συγκεντρώσεις της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης σχετίζονται μεταξύ τους, καθώς και τα δύο αυτά συστατικά, ανήκουν στο ίδιο στάδιο της βιοσύνθεσης. Έτσι ενώ και η κατάταξη των ολικών φαινολικών για τις δύο αυτές ποικιλίες είναι πάρα πολύ υψηλή, παρατηρήθηκε ότι η αντίστοιχη κατάταξη για τα συστατικά ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη, καθώς και για τις μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης ήταν πολύ χαμηλότερη. Επομένως οι δύο ποικιλίες Λιανολιά

και Καλαμών, είναι δύο ποικιλίες στις οποίες ο μετασχηματισμός των φαινολικών συστατικών, λόγω ενζυμικής δραστηριότητας όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα (κεφ. 2), είναι πάρα πολύ γρήγορος.

Από όλες τις ποικιλίες στην Ολύμπια ποικιλία εμφανίστηκαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα συστατικά ελαιοκορωνάλη και ελαιομυσιονάλη καθώς και των μονοαλδεϋδικών μορφών του άγλυκου του λιγκστροσίδη από όλες τις ποικιλίες. Ψηλά στην κατάταξη για τα συστατικά αυτά ήταν και η ποικιλία της Αθηνολιάς. Για την περίπτωση της Ολύμπιας ποικιλίας, ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών, η συγκέντρωση των επιμέρους φαινολικών συστατικών, μπορεί να μας δίνει πληροφορίες για την ενεργότητα ενζύμων, και για την ταχύτητα με την οποία ακολουθείται το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαινολικών συστατικών.

*Επίδραση του τύπου του ελαιοτριβείου στα φαινολικά συστατικά.*

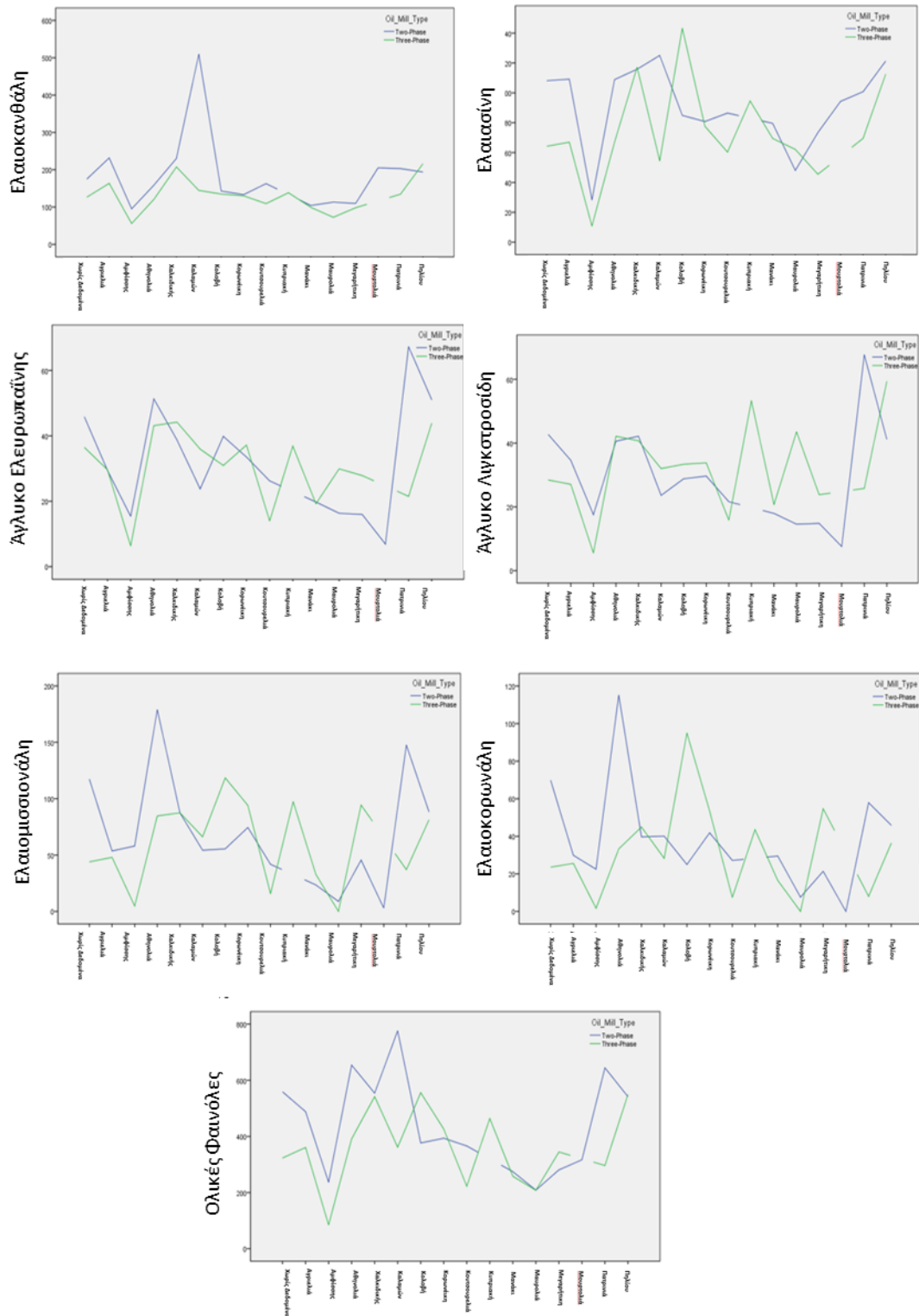
Εξετάζοντας την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών συγκριτικά με τον τύπο ελαιοτριβείου που χρησιμοποιήθηκε και ανεξάρτητα από την ποικιλία της ελιάς, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει σημαντική επίδραση του τύπου του ελαιοτριβείου επί της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών για τους δύο τύπους των ελαιοτριβείων. Στην ανάλυση συμπεριελήφθησαν όλα τα δείγματα που προέρχονταν από την Ελλάδα και για τα οποία υπήρχαν δεδομένα για τον τύπο του ελαιοτριβείου (n=2,034).

**Πίνακας 4.30:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για κάθε τύπο ελαιοτριβείου με το μοντέλο MRT ( $\alpha=0.05$ ). (\* Τα συστατικά που έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τύπων ελαιοτριβείου.

<i>Τύπος Ελαιοτριβείου</i>	<i>(mg/g)</i>	<i>Ελαιοκανθάλη*</i>	<i>Ελαιασίνη*</i>	<i>Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη*</i>	<i>Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής</i>	<i>Άγλυκο του Λιγιστροσίδη</i>
<i>2 Φάσεων n=1,359</i>	<b>Mean</b>	148.77	87.35	236.11	35.35	31.41
	<b>SD. Dev.</b>	106.634	71.992	164.878	28.054	25.536
<i>3 Φάσεων n=675</i>	<b>Mean</b>	133.79	78.62	212.41	33.09	30.90
	<b>SD. Dev.</b>	92.009	64.956	146.102	32.466	26.885
<i>Τύπος Ελαιοτριβείου</i>	<i>(mg/g)</i>	<i>Ελαιοκορωνάλη*</i>	<i>Ελαιομισσιονάλη*</i>	<i>Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης*</i>	<i>Ολικά παράγωγα υδροξυτυροσόλης*</i>	<i>Ολικές Φαινόλες*</i>
<i>Δύο Φάσεων n=1,359</i>	<b>Mean</b>	84.30	48.65	264.48	171.35	435.83
	<b>SD. Dev.</b>	100.917	73.773	177.118	142.217	303.166
<i>3 Φάσεων n=675</i>	<b>Mean</b>	74.57	41.12	239.25	152.83	392.08
	<b>SD. Dev.</b>	93.364	63.491	163.528	131.146	284.243

Σε ότι αφορά τα συστατικά, ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, ελαιοκορωνάλη, ελαιομισσιονάλη, αλλά και για το άθροισμα των φαινολικών συστατικών, υπήρξε σημαντική επίδραση του τύπου του ελαιοτριβείου που χρησιμοποιήθηκε. Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις, οι μέσες συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών ήταν σημαντικά πιο μεγάλες στα ελαιοτριβεία 2 φάσεων συγκριτικά με τα ελαιοτριβεία 3 φάσεων. Από τον τύπο του ελαιοτριβείου, δεν επηρεάστηκε στατιστικά η συγκέντρωση των μονοαλδεϊδικών μορφών του άγλυκου του λιγιστροσίδη και της ελευρωπαϊκής. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αλλού ήδη φανεί και όπως διαπιστώθηκε και στον προηγούμενο πίνακα 4.30 οι μέσες συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών ήταν αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά.

Για να εξακριβωθεί, εάν η κάθε ποικιλία καρπού επηρεάζεται διαφορετικά από τον τύπο του ελαιοτριβείου που χρησιμοποιείται, κατασκευάστηκαν διαγράμματα αντιστοίχισης της κάθε φαινόλης προς την κάθε ποικιλία.



**Διάγραμμα 4.15:** Κατανομή του μέσου όρου της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών κατά ποικιλία.



Από τα διαγράμματα αυτά φαίνεται ότι κάποιες ποικιλίες επηρεάζονται περισσότερο από κάποιες άλλες από τον τύπο του ελαιοτριβείου. Για να διαπιστωθεί ποιες ποικιλίες επηρεάζονται περισσότερο, προχωρήσαμε σε στατιστική σύγκριση των μέσων όρων για την κάθε ποικιλία (t-test). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι για όλα τα φαινοτικά συστατικά σε σύγκριση με τον τύπο του ελαιοτριβείου για κάθε ποικιλία και για όλα τα δείγματα στα οποία υπήρχαν επαρκή δεδομένα. Η συγκεκριμένη ανάλυση περιέλαβε έναν αρκετά σημαντικό αριθμό δειγμάτων (n=1,973) για τα οποία υπήρχαν πλήρη δεδομένα. Στους επόμενους πίνακες παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη ανάλυση.

**Πίνακας 4.31:** Σύγκριση ποικιλιών ως προς τον τύπο ελαιοτριβείου (οι ποικιλίες με σκίαση εξαιρούνται από την ανάλυση).

<i>Ποικιλία</i>	<i>Τύπος Ελαιοτριβείου</i>		<i>Σύνολο</i>
	<i>2 Φάσεων</i>	<i>3 Φάσεων</i>	
<i>Χωρίς Δεδομένα</i>	39	21	60
<i>Αγριελιά</i>	48	20	68
<i>Αμφίσσης</i>	112	15	127
<i>Αθηνολιά</i>	152	16	168
<i>Χαλκιδικής</i>	41	91	132
<i>Καλαμών</i>	10	6	16
<i>Κολοβή</i>	3	10	13
<i>Κορωνέικη</i>	836	339	1175
<i>Κουτσουρελιά</i>	42	43	85
<i>Κυπριακή</i>	0	1	1
<i>Λαδολιά Αιτ/νίας</i>	0	0	0
<i>Λιανολιά</i>	0	0	0
<i>Μανάκι</i>	47	97	144
<i>Μεγαρίτικη</i>	11	15	26
<i>Μουρτολιά</i>	11	0	11
<i>Ολύμπια</i>	0	0	0
<i>Θρούμπα</i>	0	0	0
<i>Τσουνάτη</i>	0	0	0
<i>Ζακύνθου</i>	0	0	0
<i>Κορωνέικη- Αθηνολιά</i>	0	0	0

**Πίνακας 4.32:** Ποικιλίες που περιλήφθηκαν στην ανάλυση GLM.

<i>Ποικιλία</i>	<b>Τύπος Ελαιοτριβείου</b>		<b>Σύνολο</b>
	<i>2 Φάσεων</i>	<i>3 Φάσεων</i>	
<i>Αγριελιά</i>	48	20	68
<i>Αμφίσης</i>	112	15	127
<i>Αθηνολιά</i>	152	16	168
<i>Χαλκιδική</i>	41	91	132
<i>Καλαμών</i>	10	6	16
<i>Κολοβή</i>	3	10	13
<i>Κορωνέικη</i>	836	339	1175
<i>Κουτσουρελιά</i>	42	43	85
<i>Μανάκι</i>	47	97	144
<i>Μεγαρίτικη</i>	11	15	26

**Πίνακας 4.33:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Αγριελιάς.

<i>Τύπος Ελαιοτριβείου</i>		<i>Ελαιοκανθάλη</i>	<i>Ελαιασίνη</i>	<i>Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη</i>	<i>Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης</i>	<i>Άγλυκο Λιγκστροσίδη</i>	<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	<i>Ολικά Παράγωγα τυροσόλης</i>	<i>Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης</i>	<i>Ολικές Φαινόλες</i>
<i>2 Φάσεων</i>	<b>M.O.</b>	231.66	109.16	340.82	29.39	34.58	53.63	29.88	319.86	168.43	488.29
	<b>n</b>	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
	<b>SD. Dev.</b>	152.094	72.262	208.848	21.114	27.179	75.944	43.559	193.703	114.457	289.971
<i>3 Φάσεων</i>	<b>M.O.</b>	163.57	66.98	230.55	29.59	27.05	47.96	25.57	238.57	122.14	360.72
	<b>n</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	<b>SD. Dev.</b>	110.147	59.223	154.226	22.722	12.991	57.492	39.666	153.419	108.701	247.522

**Πίνακας 4.34:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Αμφίσης.

<i>Τύπος Ελαιοτριβείου</i>		<i>Ελαιοκανθάλη</i>	<i>Ελαιασίνη</i>	<i>Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη</i>	<i>Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης</i>	<i>Άγλυκο Λιγκστροσίδη</i>	<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	<i>Ολικά Παράγωγα τυροσόλης</i>	<i>Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης</i>	<i>Ολικές Φαινόλες</i>
<i>2 Φάσεων</i>	<b>M.O.</b>	95.15	28.26	123.41	15.37	17.52	58.00	22.48	170.67	66.11	236.78
	<b>n</b>	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
	<b>SD. Dev.</b>	43.487	27.470	55.834	13.996	15.407	83.406	38.952	97.233	66.795	153.524
<i>3 Φάσεων</i>	<b>M.O.</b>	55.86	10.78	66.64	6.31	5.53	4.81	1.66	66.20	18.75	84.95
	<b>n</b>	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	<b>SD. Dev.</b>	53.223	16.927	57.690	12.706	11.124	17.327	5.995	64.207	24.143	81.108

**Πίνακας 4.35:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Αθηνολιάς.

Τύπος Ελαιотριβείου	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισο νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες	
2 Φάσεων	M.O.	158.98	108.88	267.86	51.30	40.57	178.99	115.21	378.54	275.40	653.94
	n	152	152	152	152	152	152	152	152	152	152
	SD. Dev.	75.862	63.698	130.871	33.416	31.313	139.342	111.998	203.217	188.212	376.974
3 Φάσεων	M.O.	121.00	66.89	187.89	43.11	42.11	84.67	33.29	247.78	143.29	391.08
	n	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	SD. Dev.	47.002	39.866	80.774	35.286	34.416	87.584	46.349	139.629	90.031	217.984

**Πίνακας 4.36:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Χαλκιδικής.

Τύπος Ελαιотριβείου	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισο νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες	
2 Φάσεων	M.O.	230.20	115.84	346.04	38.73	42.14	87.36	39.68	359.70	194.26	553.95
	n	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
	SD. Dev.	121.271	66.595	181.086	26.418	34.897	91.481	73.800	186.290	125.624	303.494
3 Φάσεων	M.O.	207.35	117.24	324.59	44.18	40.71	87.47	44.94	335.54	206.35	541.89
	n	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91
	SD. Dev.	112.002	83.440	185.384	33.945	28.718	80.943	60.594	176.681	155.493	321.400

**Πίνακας 4.37:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Καλαμών.

Τύπος Ελαιотριβείου	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισο νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες	
2 Φάσεων	M.O.	509.63	125.06	634.70	23.77	23.60	54.27	40.09	587.51	188.92	776.43
	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	SD. Dev.	478.714	115.033	572.892	26.684	18.589	84.333	79.286	454.766	175.777	563.157
3 Φάσεων	M.O.	144.60	54.45	199.05	35.94	32.01	66.14	28.26	242.75	118.64	361.39
	n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	SD. Dev.	74.358	41.102	103.880	23.310	25.608	80.378	35.700	106.795	79.546	181.104

**Πίνακας 4.38:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Κολοβή.

Τύπος Ελαιотριβείου	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισο νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες	
2 Φάσεων	M.O.	142.80	84.90	227.70	39.83	28.80	55.49	24.96	227.09	149.70	376.79
	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	SD. Dev.	31.666	12.828	42.448	18.062	3.492	28.595	22.458	32.889	39.823	63.469
3 Φάσεων	M.O.	134.78	143.30	278.08	30.93	33.35	118.43	95.00	286.57	269.22	555.79
	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	SD. Dev.	44.915	67.846	110.073	15.149	19.571	137.084	135.415	152.657	186.835	332.299

**Πίνακας 4.39:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Κορωνέικη

Τύπος Ελαιοτριβείου		Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισσι νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες
2 Φάσεων	M.O.	133.32	80.78	214.10	33.50	29.65	74.44	41.86	237.41	156.14	393.55
	n	836	836	836	836	836	836	836	836	836	836
	SD. Dev.	85.378	71.972	146.372	25.269	22.001	87.642	59.714	151.025	126.164	264.599
3 Φάσεων	M.O.	130.12	77.64	207.76	37.17	33.79	94.05	53.48	257.96	168.29	426.25
	n	339	339	339	339	339	339	339	339	339	339
	SD. Dev.	91.369	58.683	138.098	32.715	25.886	104.189	70.444	166.720	130.536	285.201

**Πίνακας 4.40:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Κουτσουρελιάς.

Τύπος Ελαιοτριβείου		Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισσι νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες
2 Φάσεων	M.O.	162.73	86.47	249.20	26.22	21.60	41.78	27.16	226.11	139.86	365.97
	n	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	SD. Dev.	82.040	82.306	147.643	29.071	26.474	58.563	58.983	131.778	133.384	240.234
3 Φάσεων	M.O.	109.24	60.32	169.56	13.96	15.81	15.70	7.44	140.75	81.72	222.47
	n	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	SD. Dev.	45.197	29.483	66.126	12.934	12.363	40.155	20.069	65.430	44.376	103.849

**Πίνακας 4.41:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Μανάκι.

Τύπος Ελαιοτριβείου		Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισσι νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλη	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες
2 Φάσεων	M.O.	104.30	79.56	183.85	19.76	17.94	23.47	29.47	145.71	128.79	274.50
	n	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47
	SD. Dev.	52.514	57.800	104.268	13.922	14.705	43.750	109.639	77.995	152.444	196.531
3 Φάσεων	M.O.	99.31	69.45	168.76	19.23	20.70	32.94	16.48	152.94	105.16	258.10
	n	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
	SD. Dev.	59.279	66.806	120.526	13.344	17.318	52.674	30.769	102.452	94.243	190.493

**Πίνακας 4.42:** Αποτελέσματα ανάλυσης t-test για την ποικιλία Μεγαρίτικη.

Τύπος Ελαιοτριβείου		Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη+ Ελαιασίνη	Άγλυκο της Ευρωπαϊκής	Άγλυκο Λιγκστρόσιδη	Ελαιοκορο νάλη	Ελαιομισσι νάλη	Ολικά Παράγωγα τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα υδροξυτυρ οσόλης	Ολικές Φαινόλες
2 Φάσεων	Mean	109.75	73.41	183.16	15.93	14.82	45.57	21.36	170.13	110.71	280.84
	n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	SD. Dev.	77.831	76.143	151.403	15.655	17.650	65.118	35.341	98.152	86.188	176.766
3 Φάσεων	Mean	98.27	45.48	143.74	27.84	23.82	94.37	54.71	216.46	128.02	344.48
	n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	SD. Dev.	63.374	43.602	100.059	25.515	20.192	108.748	77.797	141.524	117.720	251.694

Από την παραπάνω ανάλυση θα διαπιστώθηκε, ότι ποικιλίες όπως η Αγριελιά, η Αμφίσσης, η Αθηνολιά, η Κορωνέικη, η Κουτσουρελιά, είναι ποικιλίες που οι καρποί τους κατά την ελαιοτριβήση επηρεάζονται σημαντικά από τον τύπο του ελαιοτριβείου. Στις ποικιλίες αυτές η χρήση ελαιοτριβείου 2 φάσεων ενισχύει σημαντικά το φαινολικό περιεχόμενο του παραγόμενου ελαίου. Αντιθέτως, ποικιλίες όπως η Χαλκιδικής, η Καλαμών, η Κολοβή, το Μανάκι, και η Μεγαρήτικη φαίνεται να μην επηρεάζονται από τον τύπο του ελαιοτριβείου. Ο λόγος για τον οποίο κάποιες ποικιλίες επηρεάζονται περισσότερο από κάποιες άλλες δεν μπορεί να είναι σαφής στα πλαίσια τα παρούσας εργασίας. Θα μπορούσε ωστόσο να υποτεθεί βásiμα, ότι το μέγεθος του καρπού, σε συνδυασμό με το ποσοστό που καταλαμβάνει το νερό στον καρπό της ελιάς παίζει ρόλο στην σύσταση του πολτού της ελιάς, επομένως μεγαλόκαρπες ποικιλίες, όπως είναι οι περισσότερες ποικιλίες που βρέθηκαν να μην επηρεάζονται σημαντικά από τον τύπο του ελαιοτριβείου, αντισταθμίζουν την προσθήκη νερού που πραγματοποιείται στα ελαιοτριβεία 3 φάσεων, με το παραπάνω νερό που διαθέτουν από τον καρπό. Για την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής ωστόσο, θα πρέπει να γίνει σε βάθος μελέτη του ποσοστού του νερού που έχουν οι παραπάνω ποικιλίες.

Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζεται η στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης του τύπου του ελαιοτριβείου στην περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών για τις διαφορετικές ποικιλίες.

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζεται το επίπεδο σημαντικότητας της επίδρασης του τύπου του ελαιοτριβείου στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών.

**Πίνακας 4.43.** Στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης του τύπου του ελαιοτριβείου στην συγκέντρωση των φαινολών για τις διαφορετικές ποικιλίες.

	Αγριελιά	Αμφίσσης	Αθηνολιά	Χαλκιδικής	Καλαμών	Κολοβή	Κορωνέικη	Κουτσουρελιά	Μανάκι	Μεγαρήτικη
<i>Ελαιοκανθάλη</i>	ns	**	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
<i>Ελαιασίνη</i>	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Ελαιοκανθαλή + Ελαιασίνη</i>	*	**	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
<i>Άγλοκο της Ελευρωπαΐνης</i>	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
<i>Άγλοκο Ανγκιστροσίδη</i>	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	ns	*	**	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
<i>Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης</i>	ns	**	*	ns	ns	ns	*	**	ns	ns
<i>Ολικά Παράγωγα Υδροξυτυροσόλης</i>	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
<i>Ολικές Φαινόλες</i>	ns	**	**	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns

\*\*\* = $p<0.001$ , \*\*= $p<0.01$ , \*= $p<0.05$ , ns=not significant

Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της ποικιλίας του ελαιόκαρπου και του τύπου του ελαιοτριβείου, κατασκευάστηκε ένα απλό γραμμικό μοντέλο (GLM - hypothesis type

III) το οποίο είναι κατάλληλο για τον τύπο των δεδομένων που διαθέταμε (Searle 1987; Milliken and Johnson 1993). Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε, είναι το παρακάτω:

$$y_{ijk} = \mu + v_j + m_i + v_j * m_i + e_{ijk}$$

$y_{ijk}$  = Συγκέντρωση του kth δείγματος της jth ποικιλίας και του ith τύπου ελαιотριβείου,

$\mu$  = σταθερός μέσος όρος πληθυσμού όλων των δειγμάτων κατά μέσον όρο σε όλα τα δεδομένα

$v_j$  = τυχαία επίδραση της ποικιλίας jth = 1 ... 11.

$m_i$  = σταθερή τιμή της επίδρασης του ith = 1... 2 τύπου ελαιотριβείου.

$v_j * m_i$  = τυχαία τιμή της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ith τύπου ελαιотριβείου και της jth ποικιλίας

$e_{ijk}$  = τυχαίο υπολειπόμενο σφάλμα του kth δείγματος της jth ποικιλίας και του ith τύπου ελαιотριβείου.

**Πίνακας 4.44:** Στατιστική σημαντικότητα της αλληλεπίδρασης του τύπου του ελαιотριβείου και της ποικιλίας στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών.

	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνη	Άγλοκο της Ελευρωπαίνης	Άγλοκο Αιγκιστροσίδη	Ελαιοκορωνάλη	Ελαιομισσιονάλη	Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης	Ολικά Παράγωγα Υδροξυτυροσόλης	Ολικές Φαινόλες
Τύπος Ελαιотριβείου* Ποικιλία	***	ns	***	ns	*	***	***	**	***	***

\*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ , ns = not significant

#### 4.4.3 Διαφορές μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων, και της εποχής συγκομιδής.

Στην τελευταία παράγραφο του κεφαλαίου αυτού ασχοληθήκαμε με στοχευμένους ελέγχους αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών παραγόντων, με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων, αλλά και την εποχής συγκομιδής (μήνας και εβδομάδα) εφαρμόστηκαν έλεγχοι ANOVA καθώς επίσης και τρία γενικά γραμμικά μοντέλα. Η ανάλυση βασίστηκε στις μεμονωμένες τιμές, και εφαρμόστηκε με την χρήση μοντέλου GLM (hypothesis type III). Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραμμικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάποιους από τους ελέγχους. Το πρώτο γραμμικό μοντέλο κατασκευάστηκε για να εξεταστεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων και του μήνα συγκομιδής (συνολικά).

$$y_{ijk} = \mu + y_j + m_i(y_j) + e_{ijk} \quad (GLM 1)$$

$y_{ijk}$  = Συγκέντρωση φαινολικού συστατικού στο  $k^{\text{th}}$  δείγμα του  $j^{\text{th}}$  έτους και του  $i^{\text{th}}$  μήνα ως εξαρτημένη μεταβλητή

$\mu$  = σταθερός μέσος όρος πληθυσμού όλων των δειγμάτων κατά μέσον όρο σε όλα τα δεδομένα

$y_j$  = τυχαία επίδραση της ελαιοκομικής περιόδου  $j^{\text{th}} = 1 \dots 5$

$m_i(y_j)$  = τυχαία επίδραση του μήνα συγκομιδής  $i^{\text{th}} = 1 \dots 5$  που ανήκει στην ελαιοκομική περίοδο  $j^{\text{th}} = 1 \dots 5$

$e_{ijk}$  = τυχαίο υπολειπόμενο σφάλμα του δείγματος  $k^{\text{th}}$  την ελαιοκομική περίοδο  $j^{\text{th}}$  τον μήνα  $i^{\text{th}}$ .

Το δεύτερο μοντέλο κατασκευάστηκε με σκοπό να εξεταστεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών μεταξύ του μήνα συγκομιδής και για κάθε έτους συγκομιδής.

$$y_{ik} = \mu + m_i + e_k \quad (GLM2)$$

$y_{ik}$  = Συγκέντρωση φαινολικού συστατικού στο  $k^{\text{th}}$  τον μήνα  $i^{\text{th}}$ , ως εξαρτημένη μεταβλητή

$\mu$  = σταθερός μέσος όρος πληθυσμού όλων των δειγμάτων κατά μέσον όρο σε όλα τα δεδομένα

$m_i$  = τυχαία επίδραση του μήνα  $i^{\text{th}} = 1 \dots 5$

$e_{ik}$  = τυχαίο υπολειπόμενο σφάλμα του δείγματος  $k^{\text{th}}$  τον μήνα  $i^{\text{th}}$

Το τρίτο γραμμικό μοντέλο, κατασκευάστηκε με σκοπό να εξεταστεί, αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών μεταξύ της εβδομάδας συγκομιδής και για κάθε έτος συγκομιδής.

$$y_{ki} = \mu + w_k + e_{ki} \quad (GLM 3)$$

$y_{ki}$  = Συγκέντρωση φαινολικού συστατικού του  $I^{ov}$  δείγματος την εβδομάδα  $k^{th}$  ως εξαρτημένη μεταβλητή

$\mu$  = σταθερός μέσος όρος πληθυσμού όλων των δειγμάτων κατά μέσον όρο σε όλα τα δεδομένα

$w_k$  = τυχαία επίδραση της εβδομάδας  $k^{th} = 1 \dots 22$

$e_{ik}$  = τυχαίο υπολειπόμενο σφάλμα του δείγματος  $I^{th}$  της εβδομάδας  $k^{th}$ .

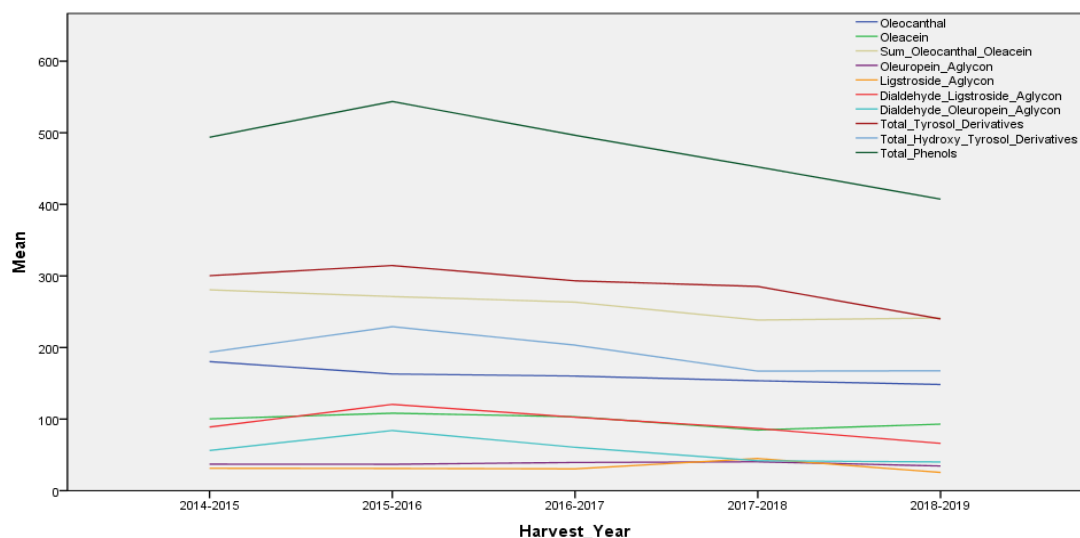
#### Διαφορές μεταξύ του έτους συγκομιδής (GLM1).

Η στατιστική σημαντικότητα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων, παρουσιάζεται στον επόμενο πίνακα. Αν και δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο για την ελαιασίνη όσο και για το άθροισμα ελαιοκανθάλης της ελαιασίνης εν τούτοις πραγματοποιήθηκαν νέες πολλαπλές δοκιμές. Σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Duncan's Multiple Range Test (MRT) και παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες. Η ελαιοκομική περίοδος 2016-2017 ήταν η καλύτερη για την ελαιασίνη καθώς και για το άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης. Η επόμενη ελαιοκομική περίοδος, ήταν η καλύτερη για τις μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου του λιγκτροσίδη και της ελευρωπαΐνης. Κατά την ελαιοκομική περίοδο 2015-2016 παρατηρήθηκαν οι ψηλότερες συγκεντρώσεις της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης.

**Πίνακας 4.45:** Στατιστική σημαντικότητα της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων.

<i>Ελαιοκανθάλη</i>	***
<i>Ελαιασίνη</i>	ns*
<i>Ελαιοκανθάλη+Ελαιασίνη</i>	**
<i>Άγλυκο της Ελευρωπαΐνης</i>	ns*
<i>Άγλυκο Λιγκτροσίδη</i>	***
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	*
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	*
<i>Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης</i>	**
<i>Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης</i>	ns*
	ns*
*** = $p < 0.001$ , ** = $p < 0.01$ , * = $p < 0.05$ , ns = not significant	
ns* : Ακόμα και στις περιπτώσεις που δεν εμφανίστηκε στατιστική σημαντικότητα προχωρήσαμε σε MRT	





**Διάγραμμα 4.16:** Κατανομή των φαινολικών συστατικών ανά ελαιοκομική περίοδο.

**Πίνακας 4.46.** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2
2014-2015	161	180.23	
2015-2016	292		163.00
2016-2017	703		160.11
2017-2018	1,308		153.56
2018-2019	895		148.32

**Πίνακας 4.47:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2	3
2015-2016	292	108.18		
2016-2017	703	103.31	103.31	
2014-2015	161	100.32	100.32	
2018-2019	895		92.92	92.92
2017-2018	1,308			84.77

**Πίνακας 4.48:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης + ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2
2014-2015	161	280.55	
2015-2016	292	271.19	
2016-2017	703	263.42	263.42
2018-2019	895		241.24
2017-2018	1,308		238.33

**Πίνακας 4.49.** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1
2017-2018	1,308	40.35
2016-2017	703	39.42
2014-2015	161	36.98
2015-2016	292	36.89
2018-2019	895	34.49

**Πίνακας 4.50:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκστροσίδη (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2	3
2017-2018	1,308	44.93		
2014-2015	161		31.25	
2015-2016	292		30.99	
2016-2017	703		30.46	
2018-2019	895			25.45

**Πίνακας 4.51:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2	3
2015-2016	292	120.56		
2016-2017	703		102.58	
2014-2015	161		88.86	
2017-2018	1,308		86.83	
2018-2019	895			66.09

**Πίνακας 4.52:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2	3
2015-2016	292	84.03		
2016-2017	703		60.60	
2014-2015	161		56.15	
2017-2018	1,308			41.87
2018-2019	895			40.05

**Πίνακας 4.53:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2
2015-2016	292	314.55	
2014-2015	161	300.34	
2016-2017	703	293.15	
2017-2018	1,308	285.32	
2018-2019	895		239.86

**Πίνακας 4.54:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρόξυ τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο-στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2	3
2015-2016	292	229.10		
2016-2017	703		203.33	
2014-2015	161		193.44	
2018-2019	895			167.47
2017-2018	1,308			166.99

**Πίνακας 4.55:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Ελαιοκομική Περίοδος	n	1	2	3
2015-2016	292	543.65		
2016-2017	703	496.48	496.48	
2014-2015	161	493.78	493.78	
2017-2018	1,308		452.31	452.31
2018-2019	895			407.33

*Διαφορές μεταξύ του μήνα συγκομιδής για όλες τις ελαιοκομικές περιόδους συνολικά. (ANOVA)*

Η στατιστική σημασία της επίδρασης του μήνα συγκομιδής στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών παρουσιάζεται στον επόμενο πίνακα 4.56. Αν και δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική επίδραση για τις μονοαλδεϊδικές μορφές των άγλυκων της ελευρωπαϊκής και λιγκστροσίδη, εφαρμόστηκε και σε αυτές η ανάλυση post hoc. Σε όλα τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τις πολλαπλές συγκρίσεις, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Duncan's Multiple Range Test (MRT), και παρουσιάζονται αναλυτικά στους επόμενους μετά τον πρώτο παρακάτω πίνακες.

Τα καλύτερα αποτελέσματα για την ελαιοκανθάλη, το άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, καθώς και για τα ολικά παράγωγα τυροσόλης και τέλος για τις ολικές φαινόλες παρουσιάστηκαν κατά τον μήνα Σεπτέμβριο. Για την ελαιασίνη, την ελαιομισσιονάλη και τα ολικά παράγωγα υδροξυτυροσόλης, παρουσιάστηκαν τον μήνα Οκτώβριο. Τον μήνα Νοέμβρη, οι συγκεντρώσεις των μονοαλδεϊδικών μορφών του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαϊκής καθώς και της ελαιοκορωνάλης, παρουσιάζουν τα μέγιστα αποτελέσματα.

**Πίνακας 4.56:** Στατιστική σημασία της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για όλους του μήνες (συνολικά για όλες τις ελαιοκομικές περιόδους).

<i>Ελαιοκανθάλη</i>	***
<i>Ελαιασίνη</i>	***
<i>Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνη</i>	***
<i>Άγλυκο της Ελευρωπαϊκής</i>	***
<i>Άγλυκο Λιγκστροσίδη</i>	ns
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	***
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	***
<i>Ολικά Παράγωγα τυροσόλης</i>	***
<i>Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης</i>	***
<i>Ολικές Φαινόλες</i>	***
*** = $p < 0.001$ , **= $p < 0.01$ , *= $p < 0.05$ , ns=not significant	

**Πίνακας 4.57:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά)

<i>Μήνας Συγκομιδής</i>	<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	251.06			
<i>Οκτώβριος</i>	613		191.34		
<i>Νοέμβριος</i>	1017			159.35	
<i>Δεκέμβριος</i>	864				131.84
<i>Ιανουάριος</i>	72				111.95

**Πίνακας 4.58:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

<i>Μήνας Συγκομιδής</i>	<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<i>Οκτώβριος</i>	613	117.95		
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	116.12		
<i>Νοέμβριος</i>	1017		98.22	
<i>Δεκέμβριος</i>	864			80.20
<i>Ιανουάριος</i>	72			68.97

**Πίνακας 4.59:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης + ελαιασίνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ).

<i>Μήνας Συγκομιδής</i>	<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	367.18			
<i>Οκτώβριος</i>	613		309.29		
<i>Νοέμβριος</i>	1017			257.57	
<i>Δεκέμβριος</i>	864				212.04
<i>Ιανουάριος</i>	72				180.92

**Πίνακας 4.60:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

<i>Μήνας Συγκομιδής</i>	<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<i>Νοέμβριος</i>	1017	40.76	
<i>Οκτώβριος</i>	613	39.40	
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	37.82	37.82
<i>Δεκέμβριος</i>	864	33.26	33.26
<i>Ιανουάριος</i>	72		30.85

**Πίνακας 4.61:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκστροσίδη (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

<i>Μήνας Συγκομιδής</i>	<b>n</b>	<b>1</b>
<i>Νοέμβριος</i>	1017	35.68
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	34.20
<i>Ιανουάριος</i>	72	33.41
<i>Δεκέμβριος</i>	864	32.95
<i>Οκτώβριος</i>	613	32.40

**Πίνακας 4.62:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Μήνας Συγκομιδής	n	1	2
<i>Νοέμβριος</i>	1017	98.85	
<i>Οκτώβριος</i>	613	97.24	
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	80.94	
<i>Δεκέμβριος</i>	864	77.58	
<i>Ιανουάριος</i>	72		54.33

**Πίνακας 4.63:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Μήνας Συγκομιδής	n	1	2
<i>Οκτώβριος</i>	613	58.51	
<i>Νοέμβριος</i>	1017	55.98	
<i>Δεκέμβριος</i>	864	45.19	45.19
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	41.61	41.61
<i>Ιανουάριος</i>	72		28.41

**Πίνακας 4.64.** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Μήνας Συγκομιδής	n	1	2	3	4
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	366.20			
<i>Οκτώβριος</i>	613		320.97		
<i>Νοέμβριος</i>	1017		293.88		
<i>Δεκέμβριος</i>	864			242.38	
<i>Ιανουάριος</i>	72				199.70

**Πίνακας 4.65.** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρόξυ-τυροσόλης (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδοι στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Μήνας Συγκομιδής	n	1	2
<i>Οκτώβριος</i>	613	215.86	
<i>Σεπτέμβριος</i>	111	195.55	
<i>Νοέμβριος</i>	1017	194.96	
<i>Δεκέμβριος</i>	864		158.64
<i>Ιανουάριος</i>	72		128.22

**Πίνακας 4.66** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/kg) μεταξύ των διαφορετικών μηνών με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι ελαιοκομικές περιόδους στο ίδιο υποσύνολο- στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Μήνας Συγκομιδής	n	1	2	3
Σεπτέμβριος	111	561.75		
Οκτώβριος	613	536.84		
Νοέμβριος	1017	488.84		
Δεκέμβριος	864		401.02	
Ιανουάριος	72			327.92

Διαφορές μεταξύ του μήνα συγκομιδής για κάθε χρονιά (GLM 2)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση για την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σε σχέση με τους μήνες συγκομιδής κείθε χρόνου παρουσιάζονται στους επόμενους πίνακες.

**Πίνακας 4.67:** Στατιστική σημασία της συγκέντρωσής των φαινολικών συστατικών μεταξύ των διαφορετικών ελαιοκομικών περιόδων για κάθε χρόνο.

ANOVA	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019
Ελαιοκανθάλη	***	**	***	***	***
Ελαιασίνη	**	ns	***	***	ns
Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνη	***	*	***	***	***
Άγλυκο Ελευρωπαΐνης	ns	ns	**	***	ns
Άγλυκο Αιγκυστροσίδη	ns	ns	***	***	**
Ελαιοκορωνάλη	ns	ns	***	***	*
Ελαιομισσιονάλη	ns	ns	***	***	*
Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης	*	ns	***	***	***
Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης	*	ns	***	***	ns
Ολικές Φαινόλες	*	ns	***	***	***

\*\*\* = $p<0.001$ , \*\*= $p<0.01$ , \*= $p<0.05$ , ns=not significant

**Πίνακας 4.68:** Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019								
Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n							
		1	2			1	2			1	2	3		1	2					
Οκτ	26	261		Οκτ	32	224		Σεπ	15	218		Σεπ	21	392		Σεπ	73	222		
Νοε	78		178	Νοε	145	167	167	Οκτ	129	211		Οκτ	136		201		Οκτ	290	168	168
Δεκ	59		151	Δεκ	108	145	145	Νοε	235	174		Νοε	311		171		Δεκ	133		135
				Σεπ	2		72	Δεκ	93		116	Δεκ	471			129	Νοε	248		121
				Ιαν	5		71	Ιαν	19		106	Ιαν	42			122	Ιαν	6		97

**Πίνακας 4.69:** Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018				2018-2019					
Μήνας Συγκομιδής	n	Subset	Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	I					
		1 2			1			1 2 3		n	1 2 3 4		n	1				
<b>Οκτ</b>	26	142	Οκτ	32	131	<b>Οκτ</b>	129	155		Σεπ	21	150		Σεπ	73	108		
<b>Νοε</b>	78		Νοε	145	109	Σεπ	15	114	114	<b>Οκτ</b>	136		108		<b>Οκτ</b>	290	103	
<b>Δεκ</b>	59		Δεκ	108	103	<b>Νοε</b>	235		109	<b>Νοε</b>	311		98	98	<b>Δεκ</b>	133	94	
			Σεπ	2	80	<b>Δεκ</b>	93		72	72	Ιαν	42		75	75	<b>Νοε</b>	248	82
			Ιαν	5	54	Ιαν	19			59	<b>Δεκ</b>	471			72	Ιαν	6	72

**Πίνακας 4.70:** Σύγκριση της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019					
Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδή	n				
		1 2			1 2			1 2			1 2 3			1 2			
<b>Οκτ</b>	26	403	<b>Οκτ</b>	32	355	<b>Οκτ</b>	129	366		Σεπ	21	542		Σεπ	73	330	
<b>Νοε</b>	78		Νοε	145	276	276	Σεπ	15	332	<b>Οκτ</b>	136		309	<b>Οκτ</b>	290	271	271
<b>Δεκ</b>	59		Δεκ	108	249	249	<b>Νοε</b>	235	283	<b>Νοε</b>	311		269	<b>Δεκ</b>	133	229	229
			Σεπ	2	152	152	<b>Δεκ</b>	93		188	<b>Δεκ</b>	471		200	<b>Νοε</b>	248	203
			Ιαν	5		125	Ιαν	19		165	Ιαν	42		197	Ιαν	6	168

**Πίνακας 4.71:** Σύγκριση της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019					
Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n				
		1			1			1 2 3			1 2			1			
<b>Δεκ</b>	59	38	Οκτ	32	42	Σεπ	15	62		<b>Νοε</b>	311	56		Ιαν	6	39	
<b>Οκτ</b>	26	37	<b>Δεκ</b>	108	39	<b>Οκτ</b>	129		44	<b>Οκτ</b>	136	44	44	<b>Οκτ</b>	290	35	
<b>Νοε</b>	78	36	Σεπ	2	39	<b>Νοε</b>	235		39	39	Σεπ	21	40	40	Σεπ	73	32
			Νοε	145	34	<b>Δεκ</b>	93		36	36	<b>Δεκ</b>	471		32	<b>Δεκ</b>	133	29
			Jan	5	30	Ιαν	19			26	Ιαν	42		32	<b>Νοε</b>	248	29



**Πίνακας 4.72:** Σύγκριση της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκτροσίδη (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019					
Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n				
		1			1			1 2 3			1 2			1			
<b>Οκτ</b>	26	34	Οκτ	32	40	Σεπ	15	50		<b>Νοε</b>	311	55		Σεπ	73	30	
<b>Νοε</b>	78	32	Δεκ	108	30	<b>Οκτ</b>	129		35		Ιαν	42	44	44	<b>Οκτ</b>	290	27
<b>Δεκ</b>	59	29	Νοε	145	30	<b>Νοε</b>	235		31		<b>Οκτ</b>	136	39	39	Ιαν	6	21
			Σεπ	2	21	<b>Δεκ</b>	93		25 25		<b>Δεκ</b>	471	39	39	<b>Νοε</b>	248	21
			Ιαν	5	20	Ιαν	19		17		Σεπ	21		37	<b>Δεκ</b>	133	20

**Πίνακας 4.73:** Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019				
Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n			
		1			1			1 2 3			1 2 3			1		
<b>Δεκ</b>	59	99	<b>Δεκ</b>	108	126	Σεπ	15	184		<b>Νοε</b>	311	133		<b>Οκτ</b>	290	73
<b>Οκτ</b>	26	84	Σεπ	2	124	<b>Οκτ</b>	129	143	143	Σεπ	21	109	109	<b>Δεκ</b>	133	58
<b>Νοε</b>	78	81	Νοε	145	122	<b>Νοε</b>	235		97 97	<b>Οκτ</b>	136	105	105	Σεπ	73	50
			Οκτ	32	109	<b>Δεκ</b>	93		96 96	<b>Δεκ</b>	471		66 66	<b>Νοε</b>	248	50
			Ιαν	5	52	Ιαν	19		47	Ιαν	42		59	Ιαν	6	50

**Πίνακας 4.74:** Σύγκριση της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019				
Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n		Μήνας Συγκομιδής	n			
		1			1			1 2 3			1 2			1		
<b>Οκτ</b>	26	76	Σεπ	2	156	Σεπ	15	103		<b>Νοε</b>	311	66		Ιαν	6	48
<b>Δεκ</b>	59	57	<b>Δεκ</b>	108	93	<b>Οκτ</b>	129	95	95	Σεπ	21	56	56	<b>Οκτ</b>	290	43
<b>Νοβ</b>	78	48	<b>Νοε</b>	145	83	<b>Δεκ</b>	93	61	61 61	<b>Οκτ</b>	136	53	53	<b>Δεκ</b>	133	38
			<b>Οκτ</b>	32	63	<b>Νοε</b>	235		55 55	<b>Δεκ</b>	471		32	<b>Νοε</b>	248	31
			Ιαν	5	34	Ιαν	19		26	Ιαν	42		26	Σεπ	73	22

**Πίνακας 4.75.** Σύγκριση της συγκέντρωσης των ολικών παραγώγων τυροσόλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019		
Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n	
		1 2			1			1 2 3			1 2 3			1 2
Οκτ	26	380	Οκτ	32	373	Σεπ	15	452	Σεπ	21	538	Σεπ	73	303
Νοε	78	290	Νοε	145	319	Οκτ	129	389	Νοε	311	358	Οκτ	290	268 268
Δεκ	59	279	Δεκ	108	302	Νοε	235	302	Οκτ	136	345	Δεκ	133	214 214
			Σεπ	2	218	Δεκ	93	237 237	Δεκ	471	233	Νοε	248	192
			Ιαν	5	144	Ιαν	19	170	Ιαν	42	225	Ιαν	6	168

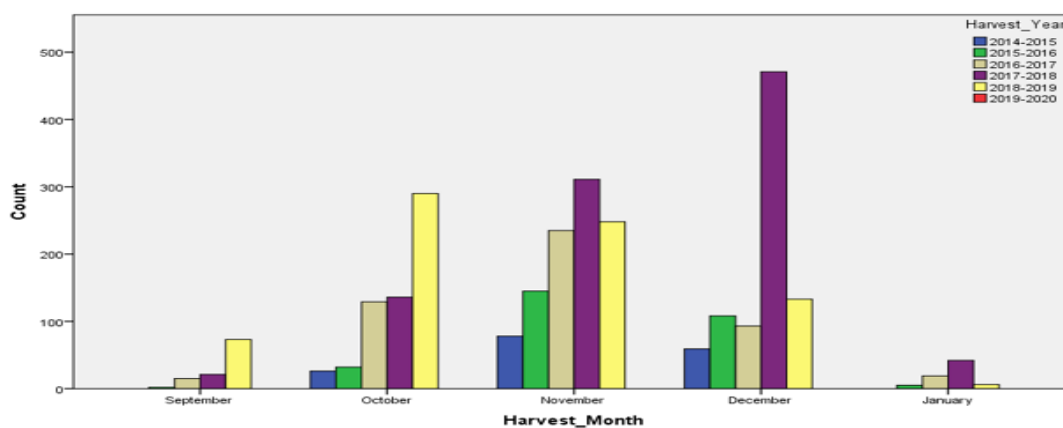
**Πίνακας 4.76.** Σύγκριση της συγκέντρωσης των ολικών παραγώγων υδροξυτυροσόλης (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019		
Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n	
		1 2			1			1 2 3			1 2			1
Οκτ	26	255	Σεπ	2	274	Οκτ	129	293	Σεπ	21	245	Οκτ	290	181
Νοβ	78	183	Οκτ	32	236	Σεπ	15	280	Νοε	311	220	Σεπ	73	162
Δεκ	59	181	Δεκ	108	236	Νοε	235	203	Οκτ	136	205	Δεκ	133	161
			Νοε	145	226	Δεκ	93	169 169	Δεκ	471	135	Ιαν	6	159
			Ιαν	5	118	Ιαν	19	111	Ιαν	42	133	Νοε	248	142

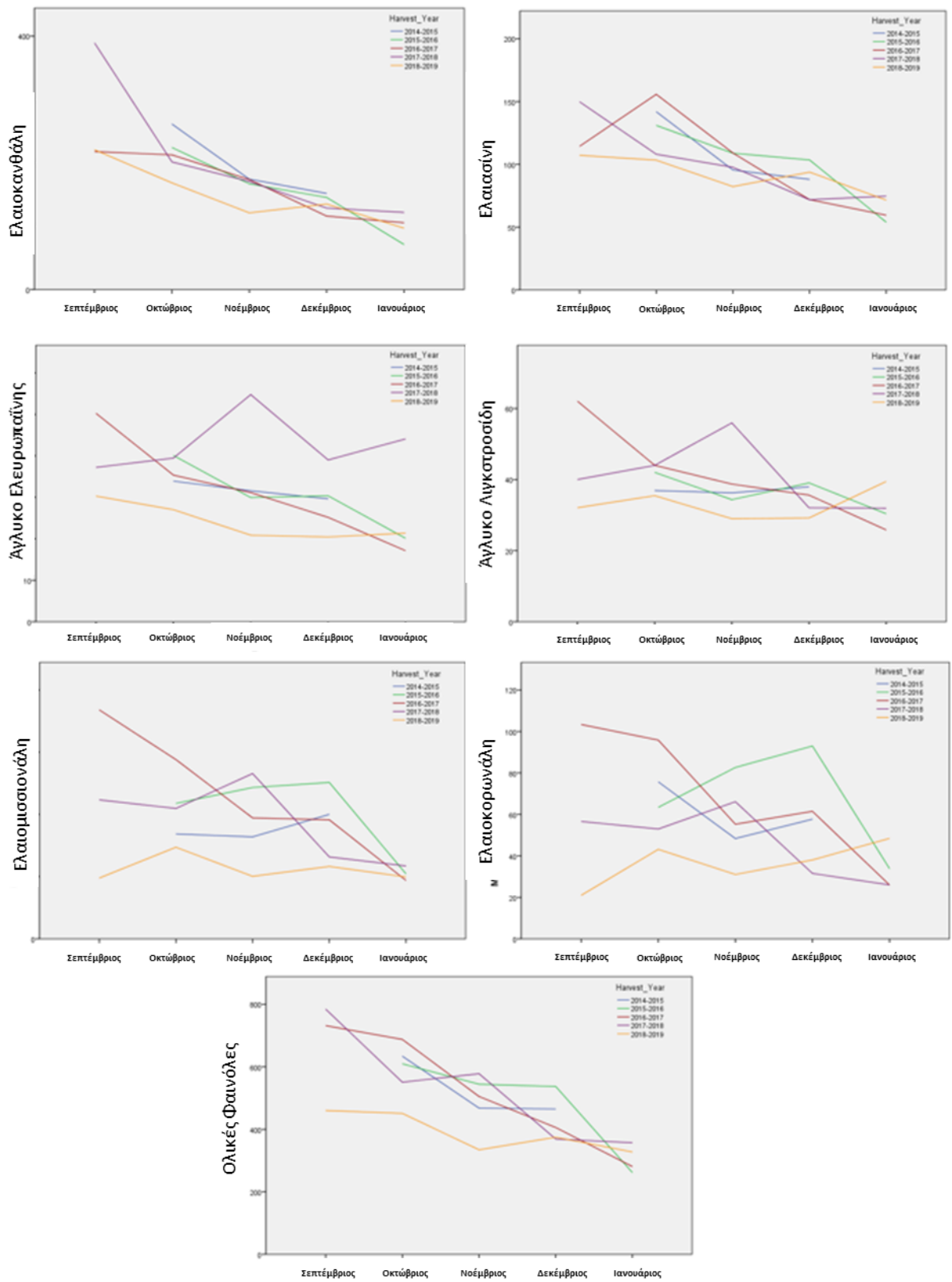
**Πίνακας 4.77.** Σύγκριση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών (mg/g) για όλους τους μήνες σε κάθε χρονιά με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ )(Οι μήνες στο ίδιο υποσύνολο - στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

2014-2015			2015-2016			2016-2017			2017-2018			2018-2019		
Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n		Μήνας Συγκομιδή	n	
		1 2			1			1 2 3			1 2 3			1
Οκτ	26	634	Οκτ	32	610	Σεπ	15	732	Σεπ	21	783	Σεπ	73	465
Νοε	78	473	Νοε	145	544	Οκτ	129	683	Νοε	311	578	Οκτ	290	449
Δεκ	59	460	Δεκ	108	537	Νοε	235	505	Οκτ	136	550	Δεκ	133	375
			Σεπ	2	492	Δεκ	93	406 406	Δεκ	471	369	Νοε	248	335
			Ιαν	5	262	Ιαν	19	281	Ιαν	42	357	Ιαν	6	327

Οι συγκεντρώσεις των μελετώμενων φαινολικών συστατικών στους διάφορους μήνες συγκομιδής και για κάθε ελαιοκομική περίοδο φαίνονται στα επόμενα διαγράμματα. Γενικά παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των περισσότερων φαινολικών συστατικών, είναι μεγαλύτερες στους πρώτους μήνες της ελαιοκομικής περιόδου. Η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης, της ελαιασίνης, του αθροίσματος της ελαιασίνης και της ελαιοκανθάλης, τα ολικά παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, και τέλος των ολικών φαινολών, είναι υψηλότερη στον άγουρο καρπό. Για τις μονοαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και του άγλυκου της ελευρωπαΐνης καθώς και της ελαιοκορωνάλης, ακολουθείται το ίδιο μοτίβο, με μερικές αποκλίσεις για κάποιες ελαιοκομικές περιόδους.



**Διάγραμμα 4.17:** Κατανομή των ελληνικών δειγμάτων κατά μήνα συγκομιδής για όλες τις χρονιές.



**Διάγραμμα 4.18:** Κατανομή της συγκέντρωσης των φαιολικών συστατικών κατά μήνα συγκομιδής

Διαφορές μεταξύ της εβδομάδες συγκομιδής για όλες τις ελαιοκομικές περιόδους συνολικά (ANOVA).

Στα επόμενα παρουσιάζεται η στατιστική σημασία της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για κάθε εβδομάδα συγκομιδής. Παρόλο που δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις τιμές της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκαστροσίδη τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση hoc με την χρήση του μοντέλου Duncan's Multiple Range Test (MRT) και παρουσιάζονται στους επόμενους πίνακες.

**Πίνακας 4.78:** Στατιστική σημασία της διαφοράς της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για όλες τις εβδομάδες.

<i>Ελαιοκανθάλη</i>	***
<i>Ελαιασίνη</i>	***
<i>Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνη</i>	***
<i>Άγλυκο Ελευρωπαΐνης</i>	***
<i>Άγλυκο Λιγκαστροσίδη</i>	ns
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	***
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	***
<i>Ολικά Παράγωγα Τυροσόλης</i>	***
<i>Ολικά Παράγωγα Υδροξυτυροσόςης</i>	***
<i>Ολικές Φαινόλες</i>	***

\*\*\* = $p < 0.001$ , \*\* = $p < 0.01$ , \* = $p < 0.05$ , ns = not significant

**Πίνακας 4.79:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha = 0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

Εβδομάδα Συγκομιδής	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	11	564.41							
<i>4</i>	44		238.50						
<i>5</i>	52		227.09	227.09					
<i>7</i>	161		202.20	202.20	202.20				
<i>2</i>	9		199.19	199.19	199.19				
<i>3</i>	44		196.38	196.38	196.38	196.38			
<i>6</i>	118		184.78	184.78	184.78	184.78			
<i>8</i>	186		182.32	182.32	182.32	182.32	182.32		
<i>10</i>	295			175.79	175.79	175.79	175.79		
<i>9</i>	147			171.99	171.99	171.99	171.99	171.99	
<i>13</i>	204				158.25	158.25	158.25	158.25	158.25
<i>14</i>	214				154.75	154.75	154.75	154.75	154.75
<i>12</i>	277				154.56	154.56	154.56	154.56	154.56
<i>11</i>	193				143.85	143.85	143.85	143.85	143.85
<i>15</i>	228				143.33	143.33	143.33	143.33	143.33
<i>16</i>	190					134.26	134.26	134.26	134.26
<i>21</i>	24						119.11	119.11	119.11
<i>22</i>	12							110.81	110.81
<i>20</i>	23								105.17
<i>17</i>	62								105.08
<i>19</i>	5								96.23
<i>18</i>	178								95.88

**Πίνακας 4.80:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

<i>Εβδομάδα Συγκομιδής</i>	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<i>1</i>	11	136.74				
<i>7</i>	161	135.78				
<i>5</i>	52	133.46	133.46			
<i>4</i>	44	126.14	126.14	126.14		
<i>6</i>	118	110.24	110.24	110.24	110.24	
<i>10</i>	295	107.93	107.93	107.93	107.93	
<i>3</i>	44	106.71	106.71	106.71	106.71	
<i>8</i>	186	105.02	105.02	105.02	105.02	
<i>9</i>	147	104.42	104.42	104.42	104.42	
<i>13</i>	204	102.10	102.10	102.10	102.10	
<i>12</i>	277	97.28	97.28	97.28	97.28	97.28
<i>14</i>	214	97.06	97.06	97.06	97.06	97.06
<i>15</i>	228	91.23	91.23	91.23	91.23	91.23
<i>2</i>	9		85.09	85.09	85.09	85.09
<i>11</i>	193		84.26	84.26	84.26	84.26
<i>16</i>	190			81.62	81.62	81.62
<i>21</i>	24				73.84	73.84
<i>22</i>	12				70.61	70.61
<i>20</i>	23				68.40	68.40
<i>17</i>	62				66.09	66.09
<i>19</i>	5				65.88	65.88
<i>18</i>	178					48.08

**Πίνακας 4.81:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

<i>Εβδομάδα Συγκομιδής</i>	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
<i>1</i>	11	701.16								
<i>4</i>	44		364.65							
<i>5</i>	52		360.55							
<i>7</i>	161		337.98	337.98						
<i>3</i>	44		303.08	303.08	303.08					
<i>6</i>	118		295.02	295.02	295.02	295.02				
<i>8</i>	186		287.34	287.34	287.34	287.34	287.34			
<i>2</i>	9		284.28	284.28	284.28	284.28	284.28			
<i>10</i>	295		283.72	283.72	283.72	283.72	283.72			
<i>9</i>	147		276.41	276.41	276.41	276.41	276.41	276.41		
<i>13</i>	204		260.36	260.36	260.36	260.36	260.36	260.36	260.36	
<i>12</i>	277			251.84	251.84	251.84	251.84	251.84	251.84	
<i>14</i>	214			251.80	251.80	251.80	251.80	251.80	251.80	
<i>15</i>	228			234.56	234.56	234.56	234.56	234.56	234.56	234.56
<i>11</i>	193				228.11	228.11	228.11	228.11	228.11	228.11
<i>16</i>	190				215.87	215.87	215.87	215.87	215.87	215.87
<i>21</i>	24					192.96	192.96	192.96	192.96	192.96
<i>22</i>	12						181.42	181.42	181.42	181.42
<i>20</i>	23							173.57	173.57	173.57
<i>17</i>	62							171.17	171.17	171.17
<i>19</i>	5								162.10	162.10
<i>18</i>	178									143.96

**Πίνακας 4.82:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

<b>Εβδομάδα Συγκομιδής</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>1</i></b>	<b><i>2</i></b>
2	9	67.37	
7	161		45.74
10	295		43.45
13	204		41.58
19	5		41.53
12	277		41.34
9	147		41.32
6	118		38.55
15	228		37.15
14	214		36.45
8	186		36.12
1	11		35.84
3	44		35.82
5	52		34.72
4	44		34.22
17	62		33.78
22	12		33.60
11	193		33.48
16	190		33.05
20	23		29.49
21	24		28.68
18	178		24.33

**Πίνακας 4.83:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκστροσίδη (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

<b>Εβδομάδα Συγκομιδής</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>1</i></b>	<b><i>2</i></b>	<b><i>3</i></b>
19	5	60.09		
2	9	48.29	48.29	
10	295		38.41	38.41
22	12		36.88	36.88
12	277		36.42	36.42
13	204		36.36	36.36
17	62		36.05	36.05
1	11		35.88	35.88
7	161		35.74	35.74
15	228		35.39	35.39
9	147		34.40	34.40
3	44		34.09	34.09
16	190		33.15	33.15
14	214		32.56	32.56
6	118		32.33	32.33
21	24		31.54	31.54
4	44		31.45	31.45
5	52		31.40	31.40
8	186		29.89	29.89
18	178		29.19	29.19
11	193		28.90	28.90
20	23			26.31

**Πίνακας 4.84:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

Εβδομάδα Συγκομιδής	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
2	9	117.11		
7	161	116.26		
12	277	109.23	109.23	
10	295	108.23	108.23	
6	118	96.73	96.73	
4	44	96.38	96.38	
8	186	96.21	96.21	
14	214	92.38	92.38	92.38
13	204	90.63	90.63	90.63
15	228	90.25	90.25	90.25
9	147	89.36	89.36	89.36
16	190	82.52	82.52	82.52
11	193	80.23	80.23	80.23
3	44	69.40	69.40	69.40
21	24	63.95	63.95	63.95
17	62	62.53	62.53	62.53
5	52	61.14	61.14	61.14
19	5	56.42	56.42	56.42
22	12	55.81	55.81	55.81
20	23		46.89	46.89
18	178		42.01	42.01
1	11			24.90

**Πίνακας 4.85:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομισσιονάλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

Εβδομάδα Συγκομιδής	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
7	161	84.90		
2	9	73.66	73.66	
12	277	62.39	62.39	62.39
10	295	59.53	59.53	59.53
13	204	56.01	56.01	56.01
15	228	55.38	55.38	55.38
6	118	51.85	51.85	51.85
14	214	51.60	51.60	51.60
9	147	50.26	50.26	50.26
8	186	50.09	50.09	50.09
16	190	47.68	47.68	47.68
4	44	47.59	47.59	47.59
11	193	44.82	44.82	44.82
19	5	36.77	36.77	36.77
17	62		34.17	34.17
3	44		33.65	33.65
22	12		32.90	32.90
20	23		31.35	31.35
5	52		30.89	30.89
21	24		27.14	27.14
18	178		24.09	24.09
1	11			14.36



**Πίνακας 4.86:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

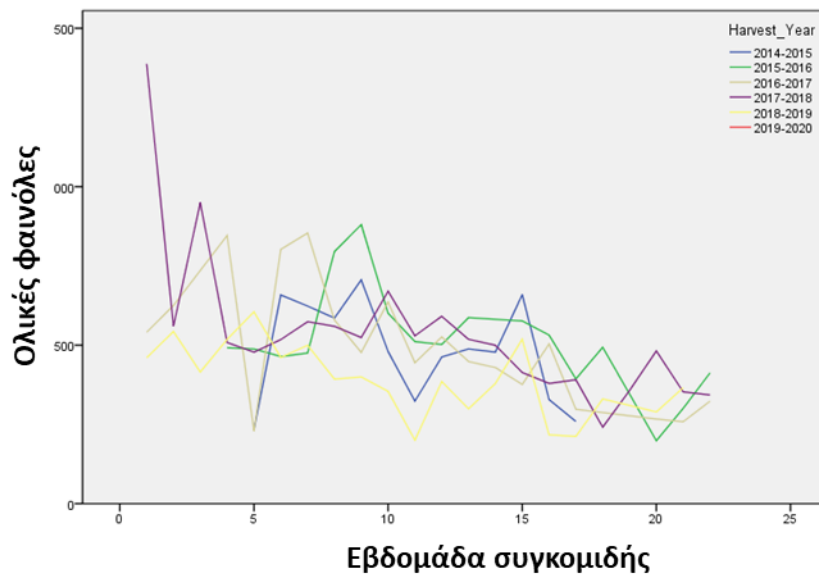
Εβδομάδα Συγκομιδής	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>1</i>	11	625.19					
<i>4</i>	44		366.34				
<i>2</i>	9		364.59				
<i>7</i>	161		354.20				
<i>10</i>	295		322.43	322.43			
<i>5</i>	52		319.64	319.64	319.64		
<i>6</i>	118		313.84	313.84	313.84		
<i>8</i>	186		308.42	308.42	308.42		
<i>12</i>	277		300.21	300.21	300.21		
<i>3</i>	44		299.87	299.87	299.87		
<i>9</i>	147		295.75	295.75	295.75		
<i>13</i>	204		285.24	285.24	285.24	285.24	
<i>14</i>	214		279.69	279.69	279.69	279.69	279.69
<i>15</i>	228		268.97	268.97	268.97	268.97	268.97
<i>11</i>	193		252.98	252.98	252.98	252.98	252.98
<i>16</i>	190		249.93	249.93	249.93	249.93	249.93
<i>21</i>	24			214.60	214.60	214.60	214.60
<i>19</i>	5			212.74	212.74	212.74	212.74
<i>17</i>	62				203.66	203.66	203.66
<i>22</i>	12				203.50	203.50	203.50
<i>20</i>	23					178.36	178.36
<i>18</i>	178						167.08

**Πίνακας 4.87:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδρόξυ τυροσόλης (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

Εβδομάδα Συγκομιδής	<i>n</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>7</i>	161	266.43		
<i>2</i>	9	226.13	226.13	
<i>10</i>	295	210.91	210.91	
<i>4</i>	44	207.95	207.95	
<i>12</i>	277	201.01	201.01	
<i>6</i>	118	200.65	200.65	
<i>13</i>	204	199.69	199.69	
<i>5</i>	52	199.06	199.06	
<i>9</i>	147	196.00	196.00	
<i>8</i>	186	191.24	191.24	191.24
<i>1</i>	11	186.94	186.94	186.94
<i>14</i>	214	185.11	185.11	185.11
<i>15</i>	228	183.76	183.76	183.76
<i>3</i>	44	176.18	176.18	176.18
<i>11</i>	193		162.56	162.56
<i>16</i>	190		162.35	162.35
<i>19</i>	5		144.18	144.18
<i>22</i>	12		137.11	137.11
<i>17</i>	62		134.03	134.03
<i>21</i>	24		129.66	129.66
<i>20</i>	23		129.25	129.25
<i>18</i>	178			96.50

**Πίνακας 4.88:** Σύγκριση του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινόλων (mg/kg) για όλες τις εβδομάδες με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (Οι εβδομάδες συγκομιδής στο ίδιο υποσύνολο δεν διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

Εβδομάδα Συγκομιδής	n	1	2	3	4	5	6
1	11	812.14					
7	161		620.63				
2	9		590.72	590.72			
4	44		574.28	574.28			
10	295		533.34	533.34	533.34		
5	52		518.70	518.70	518.70		
6	118		514.49	514.49	514.49	514.49	
12	277		501.22	501.22	501.22	501.22	
8	186		499.66	499.66	499.66	499.66	
9	147		491.75	491.75	491.75	491.75	
13	204		484.94	484.94	484.94	484.94	
3	44		476.05	476.05	476.05	476.05	
14	214		464.80	464.80	464.80	464.80	
15	228		452.73	452.73	452.73	452.73	452.73
11	193		415.53	415.53	415.53	415.53	415.53
16	190			412.28	412.28	412.28	412.28
19	5				356.92	356.92	356.92
21	24				344.27	344.27	344.27
22	12				340.61	340.61	340.61
17	62				337.70	337.70	337.70
20	23					307.60	307.60
18	178						263.58



**Διάγραμμα 4.19:** Κατανομή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών (μέσος όρος) ανά εβδομάδα συγκομιδής.

Παρατηρώντας το προηγούμενο διάγραμμα, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει και εδώ μια γενική τάση που δείχνει ότι όσο πιο νωρίς αρχίζει η ελαιοκομική περίοδος τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκουμε για το άθροισμα των φαινολικών συστατικών. Το αποτέλεσμα αυτό ισχύει για κάθε ελαιοκομική περίοδο που εξετάσαμε ξεχωριστά. Οι διακυμάνσεις που εμφανίζονται στο προηγούμενο διάγραμμα είναι πιθανό σε μεγάλο βαθμό να οφείλονται, στο γεγονός ότι σε κάθε σημείο της ελαιοκομικής περιόδου, συμμετέχουν δείγματα από διαφορετικές ποικιλίες λόγω του διαφορετικού βαθμού ωρίμανσης της κάθε ποικιλίας.

#### Διαφορές μεταξύ των εβδομάδων συγκομιδής για κάθε χρόνο (GLM 3)

Στα επόμενα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την σημαντικότητα της εβδομάδας συγκομιδής στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών για κάθε χρονιά

**Πίνακας 4.89:** Στατιστική σημασία της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για την εβδομάδα συγκομιδής για κάθε χρόνο.

ANOVA	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019
<i>Ελαιοκανθάλη</i>	***	**	***	***	***
<i>Ελαιασίνης</i>	*	ns	***	***	***
<i>Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνης</i>	***	ns	***	***	***
<i>Άγλυκο Ελευρωπαΐνης</i>	ns	ns	***	***	ns
<i>Άγλυκο Λιγιστροσίδη</i>	ns	ns	***	***	**
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	ns	ns	***	***	*
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	*	ns	***	***	ns
<i>Ολικά Παράγωγα τυροσόλης</i>	ns	ns	***	***	***
<i>Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης</i>	ns	ns	***	***	**
<i>Ολικές Φαινόλες</i>	ns	ns	***	***	***

\*\*\* = $p<0.001$ , \*\*= $p<0.01$ , \*= $p<0.05$ , ns=not significant

#### Διαφορές μεταξύ των περιοχών προέλευσης (ANOVA)

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την σημαντικότητα περιοχής προέλευσης του καρπού (περιφέρεια) στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών για κάθε χρονιά

**Πίνακας 4.90:** Στατιστική σημασία της διαφοράς συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών μεταξύ των διαφορετικών περιοχών προέλευσης.

<i>Ελαιοκανθάλη</i>	***	<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	***
<i>Ελαιασίνη</i>	***	<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	***
<i>Ελαιοκανθάλη + ελαιασίνη</i>	***	<i>Ολικά Παράγωγα τυροσόλης</i>	***
<i>Άγλυκα Ελευρωπαΐνης</i>	***	<i>Ολικά Παράγωγα Υδροξυτυροσόλης</i>	***
<i>Άγλυκο Λιγιστροσίδη</i>	***	<i>Ολικές Φαινόλες</i>	***

\*\*\* = $p<0.001$ , \*\*= $p<0.01$ , \*= $p<0.05$ , ns=not significant

**Πίνακας 4.91:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	206.10			
<i>Ήπειρος</i>	52	199.75			
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	188.91			
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53		156.28		
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75		151.72		
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295		142.52		
<i>Πελοπόννησος</i>	186 1		135.98	135.98	
<i>Κρήτη</i>	438		133.08	133.08	
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28		127.75	127.75	
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49			106.68	106.68
<i>Θεσσαλία</i>	96			103.35	103.35
<i>Αττική</i>	101			100.22	100.22
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62				86.15

**Πίνακας 4.92:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιασίνης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	134.53				
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281		103.60			
<i>Ήπειρος</i>	52		97.36	97.36		
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28		96.80	96.80		
<i>Κρήτη</i>	438		90.08	90.08		
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53		88.72	88.72		
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295		83.33	83.33		
<i>Πελοπόννησος</i>	1861		81.73	81.73		
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49		77.16	77.16		
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75			72.15	72.15	
<i>Αττική</i>	101				51.29	51.29
<i>Θεσσαλία</i>	96					35.48
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62					28.99

**Πίνακας 4.93:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5	6
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	340.63					
<i>Ήπειρος</i>	52	297.12	297.12				
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	292.51	292.51				
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53		245.00	245.00			
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295			225.85	225.85		
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28			224.55	224.55		
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75			223.86	223.86		
<i>Κρήτη</i>	438			223.16	223.16		
<i>Πελοπόννησος</i>	1861			217.71	217.71		
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49				183.84	183.84	
<i>Αττική</i>	101					151.51	151.51
<i>Θεσσαλία</i>	96					138.84	138.84
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62						115.15

**Πίνακας 4.94:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5	6
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75	50.66					
<i>Κρήτη</i>	438	50.48					
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	46.46	46.46				
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	41.84	41.84	41.84			
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	39.34	39.34	39.34	39.34		
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28		37.84	37.84	37.84		
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710		37.32	37.32	37.32		
<i>Πελοπόννησος</i>	186		35.65	35.65	35.65		
	1						
<i>Ήπειρος</i>	52			29.76	29.76	29.76	
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49				28.47	28.47	
<i>Αττική</i>	101				26.54	26.54	
<i>Θεσσαλία</i>	96					18.00	18.00
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62						11.58

**Πίνακας 4.95:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης του άγλυκου του λιγκστροσίδη (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75	46.00							
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	43.28	43.28						
<i>Κρήτη</i>	438	38.98	38.98	38.98					
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	37.76	37.76	37.76	37.76				
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710		33.99	33.99	33.99	33.99			
<i>Πελοπόννησος</i>	1861		33.55	33.55	33.55	33.55			
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53			31.77	31.77	31.77	31.77		
<i>Ήπειρος</i>	52				26.99	26.99	26.99	26.99	
<i>Αττική</i>	101					25.41	25.41	25.41	
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49					23.09	23.09	23.09	23.09
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28						22.16	22.16	22.16
<i>Θεσσαλία</i>	96							18.04	18.04
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62								13.22

**Πίνακας 4.96:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιοκορωνάλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	146.11				
<i>Κρήτη</i>	438	135.03				
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	118.71	118.71			
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75		96.92	96.92		
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28			82.83	82.83	
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281			81.93	81.93	
<i>Πελοπόννησος</i>	1861			78.22	78.22	
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710			77.08	77.08	
<i>Αττική</i>	101			63.81	63.81	
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49				48.73	48.73
<i>Θεσσαλία</i>	96				48.18	48.18
<i>Ήπειρος</i>	52				47.02	47.02
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62					15.56

**Πίνακας 4.97:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης της ελαιομυσιονάλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5
<i>Κρήτη</i>	438	86.15				
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	70.22	70.22			
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	66.74	66.74			
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28		56.91	56.91		
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75		48.70	48.70	48.70	
<i>Πελοπόννησος</i>	1861		45.74	45.74	45.74	
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710		44.93	44.93	44.93	
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281			39.77	39.77	
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49			36.74	36.74	
<i>Αττική</i>	101			31.63	31.63	31.63
<i>Θεσσαλία</i>	96				27.88	27.88
<i>Ήπειρος</i>	52				25.58	25.58
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62					9.08

**Πίνακας 4.98:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων τυροσόλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

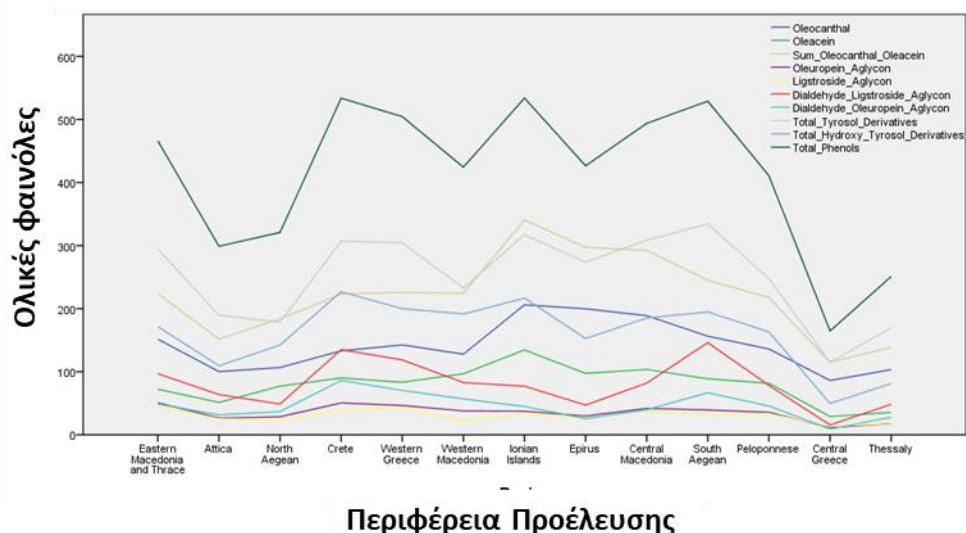
Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5	6	7
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	334.16						
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	317.17						
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	308.60	308.60					
<i>Κρήτη</i>	438	307.09	307.09					
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	304.51	304.51					
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75	294.63	294.63					
<i>Ήπειρος</i>	52	273.76	273.76	273.76				
<i>Πελοπόννησος</i>	1861		247.75	247.75	247.75			
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28			232.75	232.75	232.75		
<i>Αττική</i>	101				189.45	189.45	189.45	
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49					178.50	178.50	
<i>Θεσσαλία</i>	96						169.57	169.57
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62							114.93

**Πίνακας 4.99:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης των παραγώγων υδροξυτυροσόλης (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5	6	7
<i>Κρήτη</i>	438	226.71						
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	216.78	216.78					
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	200.01	200.01	200.01				
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	194.80	194.80	194.80	194.80			
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28	191.55	191.55	191.55	191.55			
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	185.20	185.20	185.20	185.20			
<i>Ανατολική Μακεδονία - Θράκη</i>	75		171.50	171.50	171.50			
<i>Πελοπόννησος</i>	1861			163.11	163.11			
<i>Ήπειρος</i>	52			152.70	152.70	152.70		
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49				142.37	142.37		
<i>Αττική</i>	101					109.46	109.46	
<i>Θεσσαλία</i>	96						81.36	81.36
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62							49.65

**Πίνακας 4.100:** Σύγκριση του του μέσου όρου της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών  $\zeta$  (mg/kg) με την χρήση μοντέλου MRT ( $\alpha=0.05$ ) (οι συγκεντρώσεις των περιοχών σε ίδιο υποσύνολο – στήλη δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά).

Περιφέρεια	n	1	2	3	4	5
<i>Ιόνιοι Νήσοι</i>	710	533.95				
<i>Κρήτη</i>	438	533.81				
<i>Νότιο Αιγαίο</i>	53	528.96				
<i>Δυτική Ελλάδα</i>	295	504.52	504.52			
<i>Κεντρική Μακεδονία</i>	281	493.80	493.80			
<i>Ανατολική Μακεδονία -Θράκη</i>	75	466.13	466.13			
<i>Ήπειρος</i>	52	426.47	426.47	426.47		
<i>Δυτική Μακεδονία</i>	28	424.29	424.29	424.29		
<i>Πελοπόννησος</i>	1861		410.87	410.87		
<i>Βόρειο Αιγαίο</i>	49			320.88	320.88	
<i>Αττική</i>	101				298.91	
<i>Θεσσαλία</i>	96				250.93	250.93
<i>Κεντρική Ελλάδα</i>	62					164.58



**Διάγραμμα 4.20:** Διαφορές στην συγκέντρωση του αθροίσματος των φαινολικών συστατικών (mg/g) μεταξύ των μελετώμενων περιοχών.

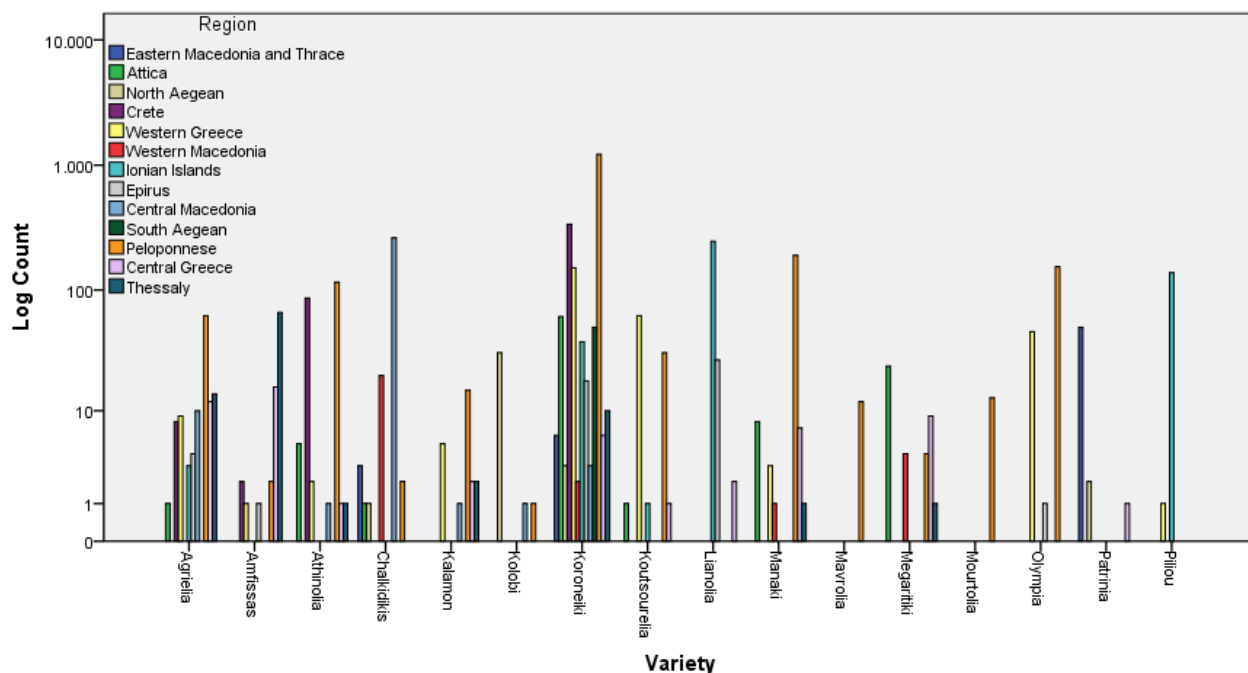
Όπως φάνηκε στα ανωτέρω αποτελέσματα, υπάρχουν περιοχές τις Ελλάδας, στις οποίες υπάρχουν σημαντικά μεγαλύτερες πιθανότητες να βρεθεί ελαιόλαδο με μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Έτσι υπάρχουν περιοχές όπως η Κρήτη, τα Ιόνια Νησιά, και τα Νησιά του Νοτίου Αιγαίου όπου η πιθανότητα να βρεθούν υψηλής περιεκτικότητας φαινολικά συστατικά είναι μεγαλύτερη. Αντίστοιχα, χαμηλότερά αλλά σημαντικά υψηλά ποσοστά εμφανίζουν περιοχές, όπως η Πελοπόννησος, η Ήπειρος, η Ανατολική Μακεδονία και η Θράκη. Τέλος υπάρχουν και περιοχές της Ελλάδας όπως η Αττική καθώς και περιοχές της κεντρικής Ελλάδας, στις οποίες στατιστικά εμφανίζουν χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών.



Για το συστατικό ελαιοκανθάλη, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, εμφανίζονται σε ελαιόλαδα προερχόμενα από τα Ιόνια Νησιά. Από την ίδια περιοχή προέρχονται και τα δείγματα με τον μεγαλύτερο μέσο όρο ελαιασίνης ακολουθούμενα από την κεντρική Μακεδονία και την Ήπειρο. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ελαιοκορωνάλης και της ελαιομισσιονάλης, εμφανίζονται στις περιοχές του Νοτίου Αιγαίου, της Κρήτης, και της δυτικής Ελλάδας. Για τις μονοαλδεϋδικές μορφές του Άγλυκου του Λιγκοτροσίδη και της ελευρωπαϊνης, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται στην Ανατολική Μακεδονία και την Θράκη.

### Σύγκριση των φαινολικών συστατικών για την κάθε ποικιλία σε κάθε περιοχή.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανεξαρτησίας  $\chi^2$  με σκοπό να διαπιστωθεί, αν υπάρχει σημαντική εξάρτηση μεταξύ της ποικιλίας και της περιοχής προέλευσης του δείγματος.



**Διάγραμμα 4.21:** Διαφορές μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών για τις διάφορες περιοχές προέλευσης.

Τα αποτελέσματα των ελέγχων ανεξαρτησίας ( $\chi^2$  test) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Η συσχέτιση μεταξύ της ποικιλίας και της περιοχής προέλευσης φάνηκε να είναι ισχυρή ( $V=0.603$ ) και στατιστικά σημαντική ( $p<0.001$ ).

**Πίνακας: 4.101.** Έλεγχος ανεξαρτησίας μεταξύ της ποικιλίας και της περιοχής προέλευσης

Pearson Chi-Square	***
Likelihood Ratio	***
Cramer's V	0,603
N of Valid Cases	3,718

\*\*\*  $p<0.001$ , \*\*  $p<0.01$ , \*  $p<0.05$ , ns=not significant

#### 4.5 Στατιστικά δεδομένα ελαιοκομικής περιόδου 2019-2020.

Η βάση δεδομένων που έχει δημιουργηθεί στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων του Φαρμακευτικού τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών, αποτελεί την μεγαλύτερη βάση δεδομένων που αφορά το φαινολικό προφίλ των ελληνικών ελαιολάδων. Για την συλλογή των δεδομένων απαιτήθηκε η ανάλυση κάθε χρόνο, περισσότερων από 1000 δειγμάτων κατά μέσο όρο ενώ στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των ελληνικών δειγμάτων που συλλέχθηκαν από την ελαιοκομική περίοδο 2014-2015 έως και την ελαιοκομική 2018-2019.

Η διαδικασία συλλογής και ανάλυσης του φαινολικού προφίλ των ελληνικών ελαιολάδων, είναι μια διαδικασία που συνεχίζεται μέχρι και σήμερα (ελαιοκομικές περιόδους 2019-2020 και 2020-2021) με την προσθήκη ακόμη περισσότερων δεδομένων. Κατά τον χρόνο συγγραφής της παρούσας διατριβής, ολοκληρώθηκε και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ελαιοκομικής περιόδου 2019-2020, από την οποία, και για λόγους αντιπροσωπευτικότερης ανάλυσης των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στα επόμενα κάποια επικαιροποιημένα δεδομένα. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές και οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών των ελληνικών ελαιολάδων για το διάστημα 2014-2020, δηλαδή μετά την προσθήκη δεδομένων και από την ελαιοκομική περίοδο 2019-2020.

**Πίνακας 4.102.** Μέσοι όροι και μέγιστες τιμές για όλα τα φαινολικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων για την περίοδο 2019-2020.

<i>n=5,744 (mg/Kg)</i>	<i>Μέγιστο</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Std. Deviation</i>
<i>Ελαιοκανθάλη</i>	1,821	157.67	1.621	122.854
<i>Ελαιασίνη</i>	809	92.76	1.052	79.730
<i>Ελαιοκανθάλη + Ελαιασίνη</i>	2,045	250.43	2.477	187.694
<i>Αγλυκο_ελευρωπαΐνης</i>	545	40.60	0.556	42.117
<i>Αγλυκο Λιγκστροσίδη</i>	530	35.70	0.469	35.536
<i>Ελαιοκορωνάλη</i>	1,559	93.60	1.519	115.127
<i>Ελαιομισσιονάλη</i>	867	56.55	1.078	81.705
<i>Ολικά Παράγωγα τυροσόλης</i>	2,200	286.98	2.759	209.069
<i>Ολικά Παράγωγα υδροξυτυροσόλης</i>	1,519	189.91	2.174	164.776
<i>Ολικές Φαινόλες</i>	2,637	476.89	4.700	356.244

Στον ανωτέρω πίνακα συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις συνολικά 5,744 δειγμάτων ελαιολάδου. Από τις αναλύσεις προέκυψε ότι η μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών συστατικών που βρέθηκε σε ελληνικό ελαιόλαδο, ανέρχεται στα 2619 mg/kg. Εξετάζοντας μεμονωμένα φαινολικά συστατικά, το συστατικό που βρέθηκε με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα, ήταν η ελαιοκανθάλη με 1821 mg/kg και η ελαιοκορωνάλη με 1559 mg/kg. Η

μέγιστη περιεκτικότητα για το συστατικό ελαιασίνη ήταν τα 809 mg/kg ενώ αρκετά πιο χαμηλά ήταν οι περιεκτικότητες των μονοαλδεϋδικών μορφών του άγλυκου λιγκτροσίδη και ελευρωπαΐνης.

Περνώντας στο κομμάτι των μέσων όρων και λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων, οι τιμές αυτές δίνουν μια καλή εικόνα για το που κυμαίνονται οι συγκεντρώσεις των ελληνικών ελαιολάδων. Έτσι η μέση τιμή των ολικών φαινολικών συστατικών συγκεντρωτικά για όλα τα δείγματα ελαιολάδου ήταν τα 476 mg/kg.

Η μελέτη των υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, οδήγησε το 2012 στον ισχυρισμό υγείας που μπορεί να φέρει ένα ελαιόλαδο. Έκτοτε, έχει ανοίξει μια συζήτηση για την χρήση όρων όπως το φαινολικό και το υψηλά φαινολικό ελαιόλαδο, χωρίς ωστόσο αυτοί να είναι σαφώς προσδιορισμένοι όροι. Με τα παραπάνω δεδομένα είναι εφικτό πλέον να επαναπροσδιοριστούν οι όροι του φαινολικού και του υψηλά φαινολικού ελαιολάδου.

Έτσι, προτείνεται ότι τα ελαιόλαδα που περιέχουν ποσοστό φαινολικών συστατικών μεγαλύτερο από το όριο που έχει τεθεί από την ΕΕ (250 mg/kg) να μπορούν να χαρακτηρίζονται ως "*phenolic olive oils*". Τα ελαιόλαδα που εμπεριέχουν συγκέντρωση φαινολικών συστατικών μεγαλύτερη από τον μέσο όρο που παρουσιάστηκε παραπάνω (476 mg/kg) μπορούν να χαρακτηρίζονται ως "*high phenolic olive oil*". Τέλος, υπάρχει και μια κατηγορία ελαιολάδων, η οποία αντιστοιχεί στο 5% των δειγμάτων που αναλύθηκαν, και αντιπροσωπεύει εκείνα τα ελαιόλαδα με την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, δηλαδή ελαιόλαδα με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 1160 mg/kg (επικαροποιημένα στοιχεία 2019-2020). Τα ελαιόλαδα που ανήκουν στην κατηγορία αυτή να μπορούν να αναφέρονται ως "*exceptionally high phenolic olive oil*".

#### 4.6 Συμπεράσματα.

Η ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων ελαιολάδου, είναι ένα τεράστιο έργο το οποίο απασχολεί το εργαστήριο φαρμακογνωσίας τα τελευταία 6 χρόνια. Η συλλογή δεδομένων και η στατιστική τους ανάλυση, είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο με το οποίο μπορούν να επιβεβαιωθούν ορισμένοι από τους ισχυρισμούς που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία αλλά και να ανοίξουν τον δρόμο για νέα ευρήματα.

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε αρχικά, ότι μεταξύ των μεγαλύτερων ελαιοπαραγωγικών περιφερειών, η κύρια καλλιεργούμενη ποικιλία ήταν η ποικιλία κορωνέικη. Από αυτήν προσκομίστηκαν στο εργαστήριο μας και μελετήθηκαν τα περισσότερα δείγματα ελαιολάδου. Περίπου τα δύο τρίτα της ελληνικής παραγωγής που μελετήθηκε, έγινε σε ελαιοτριβεία 2 φάσεων, έναντι της τεχνολογίας των ελαιοτριβείων 3 φάσεων.

Από τις 5 ελαιοκομικές περιόδους που μελετήθηκαν, προέκυψε ότι η κύρια περίοδος ελαιοσυκομιδής, ήταν ο μήνας Νοέμβριος, ενώ η δεύτερη βδομάδα του μήνα αυτού, ήταν στατιστικά η εβδομάδα με την μεγαλύτερη συκομιδή.

Προχωρώντας στην σύσταση του φαινολικού κλάσματος των ελληνικών ελαιόλαδων, παρατηρήθηκε ότι αυτά επιτυγχάνουν συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών έως και 2,637 mg/kg με τον μέσο όρο να είναι στα 476 mg/kg, δηλαδή πολύ ψηλότερα από το όριο που έχει θέσει η ΕΕ για την χρήση του ισχυρισμού υγείας. Η ελαιοκανθάλη, βασικό συστατικό του φαινολικού κλάσματος, είναι το συστατικό που έχει εμφανίσει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα (1,821 mg/kg) ενώ αποτελεί και το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό (ως μέσο όρο) στα ελληνικά ελαιόλαδα καθώς η μέση συγκέντρωση του στα ελληνικά ελαιόλαδα, ήταν 146 mg/kg. Η ελαιασίνη, το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό συστατικό του ελαιολάδου, εμφανίζεται σε ένα εύρος 0-809 mg/kg με μέσο όρο για τα ελληνικά δείγματα 87 mg/kg. Επίσης προέκυψε ότι για τις άγλυκες μορφές της ελευρωπαϊνης και του λιγκτροσίδη, οι μονοαλδεϊδικές μορφές, εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό στα ελληνικά ελαιόλαδα σε σχέση με τις διαλδεϊδικές και ενολικές τόσο ως μέσο όρο, όσο και ως μέγιστες τιμές. Συγκεκριμένα η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη εμφανίζεται σε ένα εύρος 0-421 mg/kg με μέσο όρο τα 34 mg. Η μονοαλδεϊδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης εμφανίζεται σε ένα εύρος 0-494 mg/kg με μέσο όρο τα 37 mg/kg. Αντίθετα η ελαιοκορωνάλη έχει το διπλάσιο σχεδόν εύρος 0-833 mg/kg και μέσο όρο 85 mg/kg ενώ η ελαιομισσιονάλη έχει εύρος 0-867 mg/kg και μέσο όρο τα 51 mg/kg. Γενικά, στα ελληνικά ελαιόλαδα, τα ολικά παράγωγα τυροσόλης είναι περισσότερα από τα ολικά παράγωγα υδροξυτυροσόλης με μέσο όρο τα 265 mg/kg και τα 177 mg/kg αντίστοιχα γεγονός που οφείλεται πιθανότητα στον μεγαλύτερο υδρόφιλο χαρακτήρα των φαινολικών παραγώγων υδροξυτυροσόλης.

Προχωρώντας στην διάκριση των ποικιλιών ως προς το φαινολικό τους περιεχόμενο, οι ποικιλίες Ολύμπια, Λιανολιά και Καλαμών, ήταν οι ποικιλίες με την υψηλότερη συγκέντρωση (ως μέσο όρο) φαινολικών συστατικών. Οι ποικιλίες Καλαμών και Λιανολιά ήταν οι εκείνες με την υψηλότερη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης, η οποία ήταν και η ποικιλία με την ψηλότερη συγκέντρωση ελαιασίνης. Η Ολύμπια ποικιλία ήταν η ποικιλία με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στις άγλυκες μορφές (μονοαλδεϋδικές αλλά και διαλδεϋδικές-ενολικές). Όπως εξηγήθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο (κεφ. 1), υπάρχουν ποικιλίες οι οποίες ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών, εμφανίζουν διαφορετικό προφίλ φαινολικών συστατικών, λόγω της διαφορετικής ταχύτητας με την οποία εκτελούνται οι βιοχημικές αντιδράσεις του βιοσυνθετικού μονοπατιού. Από πιο εξειδικευμένες δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με γραμμικά μοντέλα, παρατηρήθηκε ότι κάποιες ποικιλίες, επηρεάζονται περισσότερο από τον τύπο του ελαιοτριβείου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή. Έτσι, η Αγριελιά, η Αμφίσσης, η Αθηνολιά, η Κορωνέικη, η Κουτσουρελιά, είναι ποικιλίες καρπού που επηρεάζονται σημαντικά από τον τύπο του ελαιοτριβείου. Στις ποικιλίες αυτές η χρήση ελαιοτριβείου 2 φάσεων ενισχύει σημαντικά το φαινολικό περιεχόμενο του παραγόμενου ελαίου. Αντιθέτως, ποικιλίες όπως η Χαλκιδικής, η Καλαμών, η Κολοβή, το Μανάκι, και η Μεγαρίτικη ποικιλία φάνηκε να μην επηρεάζονται από τον τύπο του ελαιοτριβείου.

Συγκρίνοντας τις ελαιοκομικές περιόδους, διαπιστώνουμε ότι υπάρχουν διαφορές από χρονιά σε χρονιά. Έτσι, η καλύτερη ελαιοκομική περίοδος για τα ελληνικά ελαιόλαδα, ήταν η περίοδος 2015-2016 με μέσο όρο ολικών φαινολικών συστατικών στα 543 mg/kg, ενώ η χειρότερη ήταν η περίοδος 2018-2019 με μέσο όρο στα 398 mg/kg, γεγονός βέβαια, που μπορεί σε μεγάλο βαθμό να αποδοθεί, στην ασυνήθιστα υψηλή δακοπροσβολή που παρουσιάστηκε τη χρονιά αυτή στις ελληνικές καλλιέργειες.

Από την σύγκριση μεταξύ των μηνών συγκομιδής παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών επιτυγχάνεται στους πρώιμους βαθμούς ωρίμανσης. Έτσι, τον μήνα Σεπτέμβριο, επιτυγχάνονται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών, τόσο σαν σύνολο, όσο και για το κάθε φαινολικό συστατικό ξεχωριστά. Στην συνέχεια των ελαιοκομικών περιόδων όλα τα φαινολικά συστατικά βαθμιαία μειώνονται, με την μειωτική τάση να γίνεται πολύ έντονη τους τελευταίους μήνες της ωρίμανσης του καρπού. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν τόσο από την ανάλυση που κάναμε για τους μήνες ελαιοκομιδής ως μέσο όρο των 5 ελαιοκομικών περιόδων αθροιστικά, όσο και για την κάθε ελαιοκομική περίοδο ξεχωριστά. Μοναδική απόκλιση, ήταν οι ελαιοκομικές περίοδοι 2015-2016 και 2016-2017 που είδαμε ότι οι συγκεντρώσεις της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, βρέθηκαν στην μέγιστη τιμή τους τον Οκτώβριο. Την ίδια τάση εμφάνισαν και οι ολικές φαινόλες για την περίοδο 2015-2016.

Η ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων ελαιολάδου επιτρέπει την εξαγωγή κάποιων γενικότερων αλλά βάσιμων συμπερασμάτων πάνω στο φαινολικό προφίλ των ελληνικών ελαιολάδων καθώς και τον επαναπροσδιορισμό κάποιων όρων γύρω από το φαινολικό ελαιόλαδο. Από δε την ενσωμάτωση και των δεδομένων της ελαιοκομικής περιόδου 2019-2020, προέκυψε ότι ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο στα ελληνικά ελαιόλαδα, είναι τα 476 mg/kg. Κατόπιν αυτών προτείνεται όπως τα ελαιόλαδα με συγκέντρωση φαινολικών συστατικών μεγαλύτερη από το όριο που έχει τεθεί από την ΕΕ (250 mg/kg) να μπορούν να χαρακτηρίζονται ως *“phenolic olive oils”*. Τα ελαιόλαδα που περιέχουν συγκέντρωση φαινολικών συστατικών μεγαλύτερη από τον μέσο όρο που παρουσιάστηκε παραπάνω (476 mg/kg) μπορούν να χαρακτηρίζονται ως *“high phenolic olive oil”*. Τέλος, υπάρχουν και ελαιόλαδα με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 1160 mg/kg (επικαροποιημένα στοιχεία 2019-2020). Τα ελαιόλαδα που ανήκουν στην κατηγορία αυτή μπορούν να αναφέρονται ως *“exceptionally high phenolic olive oil”*.

## 5 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

### 5.1 Εισαγωγή.

Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, όπως έχει ήδη αναλυθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, έχει γίνει αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές. Σε μεγάλο βαθμό, η μελέτη πάνω στο πεδίο αυτό, αποσκοπεί στην διερεύνηση των βιολογικών ιδιοτήτων των συστατικών που περιέχονται σε αυτό. Λόγω της πληθώρας τέτοιων ιδιοτήτων στις οποίες αναφερθήκαμε και εισαγωγικά, στην βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ότι ένα μεγάλο μέρος των μελετών, αφορά και το κομμάτι της απομόνωσης των φαινολικών συστατικών για ερευνητικούς σκοπούς. Στην περίπτωση αυτή υπάρχουν πολλές μελέτες που κατά το πλείστον εστιάζουν σε ζητήματα διαχωρισμού των φαινολικών συστατικών, τόσο από ξένες όσο και από παρεμφερείς ενώσεις. Ωστόσο στο θέμα της απομόνωσης των φαινολικών συστατικών υπάρχουν και αρκετές μελέτες όπου ερευνάται η δυνατότητα βιομηχανικής και εμπορικής αξιοποίησης των αποτελεσμάτων.

Στην περίπτωση των μελετών αυτών ερευνώνται μέθοδοι εκχυλίσεων των φαινολικών συστατικών σε βιομηχανική κλίμακα. Οι μελέτες επικεντρώνονται στην παραγωγή εκχυλισμάτων με φιλικές προς το περιβάλλον και προς τον άνθρωπο μεθόδους (πράσινες εκχυλίσεις, αξιοποίηση αποβλήτων κ.α.) όσο και για την εύρεση της κατάλληλης πηγής για τα εκχυλίσματα αυτά.

Στην βιβλιογραφία γενικώς, οι περισσότερες μελέτες απομόνωσης φαινολικών συστατικών που περιέχονται στο ελαιόλαδο, μέχρι στιγμής έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων στις απλές φαινολικές αλκοόλες τυροσόλη και υδρόξυ τυροσόλη, ενώ σημαντική πρόοδος έχει γίνει και με το συστατικό ελευρωπαΐνη, η οποία αν και δεν ανήκει στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, αποτελεί έναν πολύ σημαντικό μεταβολίτη που εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς του δέντρου της ελιάς. Για τους μεταβολίτες αυτούς, θα δούμε ότι ήδη στο εμπόριο κυκλοφορούν μια σειρά από προϊόντα που περιλαμβάνουν τέτοιου είδους εκχυλίσματα αντικατοπτρίζοντας την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στον τομέα αυτό. Ωστόσο, ελάχιστα είναι τα σκευάσματα που περιέχουν σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη για τα οποία έχει γίνει ιδιαίτερη μνεία στην βιβλιογραφία, αναφορικά με τις υγιοπροστατευτικές τους ιδιότητες και κυρίως υπό την μορφή μικρής ποσότητας ελαιολάδου με μεγάλη περιεκτικότητα στα συστατικά αυτά.



### 5.1.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από απόβλητα ελαιοτριβείου.

#### *Συστήματα φυγοκέντρησης και δημιουργία αποβλήτων.*

Σε προηγούμενα κεφάλαια, μελετήθηκαν οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Έτσι, παρουσιάστηκε ότι υπάρχουν παράγοντες που αφορούν το δέντρο της ελιάς και έχουν να κάνουν τόσο με την ποικιλία αλλά και με τις πεδοκλιματικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται, όσο και παράγοντες που αφορούν την διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου, όπως ο βαθμός ωρίμανσης της ελιάς καθώς και η θερμοκρασία και ο χρόνος μάλαξης.

Μέσα από την πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν κάποιες από τις ιδιότητες των φαινολικών συστατικών που έχουν να κάνουν με την βιοσύνθεσή τους αλλά και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Παράλληλα μέσα από την στατιστική ανάλυση δεδομένων που προέρχονται από τις αναλύσεις χιλιάδων δειγμάτων ελαιολάδου, μπορέσαμε να διακρίνουμε και επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, όπως η χρήση ελαιοτριβείου 2 ή 3 φάσεων. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι η χρήση ελαιοτριβείου 2 φάσεων, ευνοεί την αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών.

Η φυγοκέντρηση εφαρμόζεται συνήθως για τον αρχικό διαχωρισμό του κλάσματος ελαιολάδου από το στερεό φυτικό υλικό και τους χυμούς της ελιάς. Αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό δύο διαφορετικών συστημάτων: οριζόντια φυγοκέντρηση (τριφασικός ή διφασικός διαχωριστήρας) και κάθετη φυγοκέντρηση. Η οριζόντια φυγοκέντρηση χρησιμοποιώντας τριφασικό διαχωριστήρα απαιτεί την προσθήκη ζεστού νερού για την αραίωση του πολτού, ώστε να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός που περιεγράφηκε παραπάνω, ενώ ο διαχωριστής δύο φάσεων αποτελείται από μονάδες φυγοκέντρησης "χωρίς νερό", χωρίς να απαιτείται προσθήκη ζεστού νερού. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στον διαχωριστήρα δύο φάσεων για να διευκολυνθεί η διαδικασία διαχωρισμού στον πολτού της ελιάς απαιτείται ελάχιστη τιμή υγρασίας (50%). Όταν δεν επιτυγχάνεται αυτή η τιμή, γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητα νερού πριν την είσοδο του πολτού στον διαχωριστήρα (E. Frankel et al. 2013).

Στην πρώτη φάση της διαδικασίας, επιτυγχάνεται σε σημαντικό βαθμό ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από τον υπόλοιπο πολτό. Ωστόσο το προϊόν που παραλαμβάνεται από τον οριζόντιο διαχωριστήρα περιέχει σε ένα μικρό βαθμό υπολείμματα στερεού πολτού και χυμών του καρπού. Αυτό συμβαίνει γιατί ο οριζόντιος διαχωριστήρας, λόγω της σχετικά μικρής φυγοκεντρικής

επιτάχυνσης (3000-4000 rpm) μπορεί να διαχωρίσει συγκεκριμένων διαστάσεων και βάρους σωματίδια από το ελαιόλαδο. Διασπαρμένα στερεά σωματίδια διαμέτρου μικρότερης από 10 μm καθώς και σταγονίδια νερού παρόμοιων διαστάσεων σπανίως μπορούν να διαχωριστούν σε οριζόντιους διαχωριστήρες. Για τον λόγο αυτό συνήθως εφαρμόζεται και δεύτερη φυγοκέντρηση υγρού-υγρού, σε κάθετους διαχωριστήρες (ή αλλιώς διαχωριστήρες δίσκων). Στους διαχωριστήρες αυτούς υπάρχουν κωνικές πλάκες οι οποίες περιστρέφονται με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα περιστροφής (5000-7000 rpm) με αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό. Και σε αυτόν τον διαχωριστήρα, για την λειτουργία του γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητας νερού (Peri 2014).

Από την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων που παρουσιάστηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, προέκυψε στατιστικά, ότι τα ελαιοτριβεία 2 φάσεων, παράγουν ελαιόλαδα με μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα μάλιστα το άθροισμα των παραγώγων υδροξυτυροσόλης, φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από το αντίστοιχο άθροισμα παραγώγων τυροσόλης. Την ίδια διαπίστωση, έχουν αναφέρει και άλλοι ερευνητές, μέσω της πειραματικής οδού. Σε μελέτες αναφέρεται ότι ο ίδιος καρπός, απέδωσε ελαιόλαδο που περιείχε μικρότερο άθροισμα ολικών φαινολικών με την χρήση διαχωριστήρα 3 φάσεων σε σχέση με τον διαχωριστήρα 2 φάσεων (Stefanouadaki et al 2011; Giovacchino et al. 2001; Ranalli and Angerosa 1996). Οι ερευνητές συμφωνούν ότι η χρήση διαχωριστήρα 3 φάσεων, αποδίδει μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών λόγω της προσθήκης νερού στον πολτό της ελιάς. Όπως εξηγούν, λόγω της παρουσίας νερού στον πολτό της ελιάς, ευνοείται η μεταφορά φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση, και κυρίως των όρθο-διφαινολών, όπως η ελαιασίνη και οι άγλυκες μορφές της ελευρωπαΐνης. Αλλά και σε μελέτες που έχουν γίνει αναφορικά με τους κάθετους διαχωριστήρες, παρατηρήθηκε ότι αν και η μείωση των φαινολικών συστατικών είναι μικρότερη σε σχέση με το στάδιο του οριζόντιου διαχωριστήρα, εξακολουθεί να υπάρχει μείωση των φαινολικών συστατικών. Σε ανάλυση που έχει γίνει από το απόβλητο κάθετου διαχωριστήρα, οι ερευνητές αναφέρουν ότι σε αυτό βρέθηκαν ποσότητες κυρίως των όρθο—διφαινολών του ελαιολάδου ενώ οι φαινόλες όπως η τυροσόλη και η ελαιοκανθάλη βρέθηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις ενώ επισημαίνουν, ότι σημαντικό ρόλο παίζει και η θερμοκρασία του νερού που συνήθως χρησιμοποιείται στους κάθετους διαχωριστήρες (40 °C) (García et al. 2001).

Η απώλεια των φαινολικών συστατικών στα υδατικά απόβλητα, οφείλεται στην προσθήκη νερού και επομένως στην μεταφορά φαινολικών συστατικών, κυρίως δε των υδρόφιλων συστατικών. Ωστόσο η διαλυτότητα των φαινολικών συστατικών και ο μηχανισμός διάλυσης τους, πέραν των απλών φαινολών, δεν έχει γίνει αντικείμενο μελέτης σε κάποιες από αυτές τις εργασίες.

### *Απόβλητα ελαιοτριβείου.*

Η διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείου, έχει καταστεί αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Οι λόγοι για τους οποίους η διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείου αποτελούν μείζων περιβαλλοντικό πρόβλημα, είναι ο όγκος τους και η χημική τους σύσταση. Αναφορικά με τον όγκο των αποβλήτων υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο παράγονται πάνω από 30,000 m<sup>3</sup> από τα οποία, μικρό μόνο μέρος κατευθύνεται σε μονάδες επεξεργασίας, ενώ τα περισσότερα καταλήγουν στο περιβάλλον χωρίς καμία επεξεργασία (Gebreyohannes et al 2016). Σημαντική μείωση της ποσότητας των αποβλήτων ελαιοτριβείου, επήλθε με την εφαρμογή διαχωρισμού με φυγόκεντρο δύο φάσεων. Τα ελαιοτριβεία 3 φάσεων παράγουν 2 ειδών απόβλητα. Το στερεό απόβλητο που αποτελείται από κομμάτια του πυρήνα και της σάρκας της ελιάς, καθώς και το υδατικό απόβλητο, που αποτελείται από τους χυμούς της ελιάς, καθώς και το νερό που προστέθηκε στο μαλακτήρα και στην φυγόκεντρο για να διευκολυνθεί η εκχύλιση του ελαιολάδου. Με την χρήση ελαιοτριβείων 2 φάσεων, η ποσότητα των αποβλήτων, μειώθηκε σημαντικά καθώς από τους διαχωριστήρες αυτούς, προκύπτει ένα είδος αποβλήτου, που έχει την μορφή λάσπης, στην οποία συνυπάρχουν τα στερεά απόβλητα και οι χυμοί της ελιάς, καθώς δεν γίνεται προσθήκη νερού στον μαλακτήρα (Markou 2010).

Το δεύτερο σημαντικό πρόβλημα με την διαχείριση των υδατικών αποβλήτων είναι η χημική τους σύσταση. Η διάθεση των αποβλήτων ελαιοτριβείου στο περιβάλλον προκαλεί προβλήματα στο έδαφος και στα υπόγεια ύδατα, καθώς τα απόβλητα φέρουν υψηλό βιοχημικώς και χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD και BOD) ενώ έχει και ελαφρώς όξινο χαρακτήρα. Τα απόβλητα ελαιοτριβείου χαρακτηρίζονται από μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινόλες και παρεμφερείς οργανικές καθώς και μακρομοριακές ενώσεις όπως λιπίδια, των οποίων η αποικοδόμηση είναι πολύπλοκη με αποτέλεσμα, το απόβλητο ελαιοτριβείου να καθίσταται βλαβερό για το περιβάλλον καθώς μπορεί να προκληθεί υψηλή φυτοτοξικότητα (Paredes et al. 1999; Khoufi et al 2008; Gómez-Caravaca et al. 2017). Για πολλά χρόνια το πρόβλημα αυτό, αντιμετωπίστηκε με την χρήση τεχνικών που αφορούσαν την μείωση του COD και του BOD μέσω επεξεργασίας του αποβλήτου ελαιοτριβείου. Η επεξεργασία του αποβλήτου γίνεται είτε με χημικές μεθόδους (Mantzavinos and Kalogerakis 2005), είτε με μεθόδους κλασμάτωσης του αποβλήτου και περιορισμού του όγκου του αποβλήτου όπως η χρήση τεχνολογίας μεμβρανών.

*Τα απόβλητα ελαιοτριβείου ως πηγή φαινολικών συστατικών.*

Την τελευταία δεκαετία ωστόσο το ενδιαφέρον των ερευνητών φαίνεται να στρέφεται στην αξιοποίηση των υδατικών αποβλήτων του ελαιοτριβείου, και την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από αυτό, με τον αριθμό των μελετών να υπερτερεί σημαντικά από τις αντίστοιχες μελέτες επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων (Gebreyohanneset al 2016).

Τα απόβλητα ελαιοτριβείου έχουν χαρακτηριστεί ως ιδανική πηγή φαινολικών συστατικών. Κατά την διάρκεια της επεξεργασίας του καρπού της ελιάς στα ελαιοτριβεία, όπως έχει εξηγηθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, στο περιβάλλον του μαλακτήρα απελευθερώνονται τα σεκοϊριδοειδή του καρπού της ελιάς, και με την βοήθεια ενζύμων, πραγματοποιούνται διάφορες ενζυμικές μετατροπές. Τα συστατικά του καρπού της ελιάς, σεκοϊριδοειδή και μη, διανέμονται μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης του πολτού της ελιάς, ανάλογα με την σχετική τους διαλυτότητα στο πολύπλοκο περιβάλλον του πολτού της ελιάς. Αναφορικά με τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου, υπολογίζεται, ότι μόλις το 1-2% της συνολικής τους συγκέντρωσης που περιέχονται στον πολτό της ελιάς, κατανέμονται στην λιπαρή φάση το οποίο στην συνέχεια χαρακτηρίζεται ως αντιοξειδωτικό φορτίο του ελαιολάδου, ενώ τα υπόλοιπα καταλήγουν στα στερεά και υδατικά απόβλητα (Rodis et al 2002).

Λαμβάνοντας υπόψιν την πληθώρα βιολογικών δράσεων των φαινολικών συστατικών του καρπού της ελιάς και του ελαιολάδου, αλλά και το γεγονός ότι η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών στο ελαιολάδο, είναι σημαντικά πιο μικρή σε σχέση με αυτήν των αποβλήτων, τα απόβλητα ελαιοτριβείου άρχισαν να μελετώνται ως προς την σύστασή τους και ως προς την δυνατότητα αξιοποίησής τους.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, στα φαινολικά συστατικά περιλαμβάνονται μια σειρά από ενώσεις που φέρουν φαινολικό δακτύλιο, όπως οι απλές φαινολικές αλκοόλες, τα φαινολοξέα, φλαβονοειδή, λιγνάνια και τα σεκοϊριδοειδή. Από αυτά τα συστατικά που εντοπίζονται στο ελαιόλαδο, σημαντικές ποσότητες εντοπίζονται και στα απόβλητα ελαιολιβερίου, τόσο τα στερεά όσο και στα υδατικά.

Από την κατηγορία των φλαβονοειδών στα απόβλητα ελαιολιβερίου έχουν εντοπιστεί ενώσεις όπως λουτεολίνη, ο γλυκοσίδη της λουτεολίνης, η ρουτίνη, η κερκετίνη η απιγενίνη κ.α. (Leouifoudi et al. 2014; Dermeche et al. 2013; Níounakis and Halvadakis 2006). Από τα λιγνάνια που απαντώνται και στο ελαιόλαδο, έχουν βρεθεί στα απόβλητα ελαιολιβερίου η πινορεσινόλη και η ακετόξυπινορεσινόλη. Από την κατηγορία των φαινολοξέων στα απόβλητα ελαιολιβερίου έχουν ανιχνευθεί ποσότητες καφεϊκού οξέος, βανιλικού, γαλλικού, συριγγικού, σιναπικού και ρ-κουμαρικού οξέος (Leouifoudi et al. 2014; Dermeche et al. 2013; Níounakis and Halvadakis 2006).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών ωστόσο φαίνεται να εστιάζεται στις απλές φαινολικές αλκοόλες και στα σεκοϊριδοειδή που συναντώνται στο ελαιόλαδο. Από τις κατηγορίες αυτές, στα απόβλητα ελαιολιβερίου, σε αντίθεση με το ελαιόλαδο, εβρίσκονται κυρίως οι όρθο διφαινόλες, τα παράγωγα δηλαδή υδροξυτυροσόλης. Αυτό πρακτικά συμβαίνει διότι στον καρπό της ελιάς, η ελευρωπαΐνη, που είναι και η πρόδρομη ουσία από την οποία μέσω διαφόρων ενζυμικών μετατροπών προκύπτουν όλα τα παράγωγα υδροξυτυροσόλης που υπάρχουν και στο ελαιόλαδο, είναι σε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον λιγκστροσίδη, ο οποίος είναι η πρόδρομη ένωση για όλα τα παράγωγα τυροσόλης. Επίσης, λόγω της επιπλέον υδρόξυ ομάδας στον φαινολικό δακτύλιο της υδροξυτυροσόλης, όλα τα παράγωγα που φέρουν αυτόν το δακτύλιο, είναι σημαντικά πιο υδρόφιλα, σε σχέση με τα παράγωγα τυροσόλης.

Στα απόβλητα ελαιολιβερίου έχουν εντοπιστεί σημαντικές ποσότητες του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης, ποσότητες δηλαδή που δεν αλληλεπιδράσαν με την β-γλυκοσιδάση και λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα τους λόγω του σακχάρου, παρέμειναν στην υδατική φάση. Από τα συστατικά του καρπού που δεν ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο, λόγω του μορίου γλυκόζης που φέρουν, στα απόβλητα ελαιολιβερίου συναντάμε ακόμα την δεμεθυλελευρωπαΐνη καθώς και τον βερμπασκοσίδη. Η περιεκτικότητα των αποβλήτων ελαιολιβερίου σε σεκοϊριδοειδή έχει μελετηθεί εκτενώς στην βιβλιογραφία. Στα συστατικά που υπάρχουν και στο ελαιόλαδο, που είναι και τα συστατικά-στόχος αυτών των μελετών, έχουν εντοπιστεί συστατικά όπως η τυροσόλη, η υδροξυ-τυροσόλη, η ελαιασίνη, οι μονοαλδεϊδικές μορφές του άγλυκου του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης (Dermeche et al. 2013; Leouifoudi et al. 2014; Obied et al. 2007). Ωστόσο αξίζει

να σημειωθεί, ότι σε ελάχιστες εργασίες γίνεται αναφορά και για την ανίχνευση της ελαιοκανθάλης, και κυρίως στο στερεό απόβλητο του ελαιοτριβείου (Cicerale et al. 2011).

Η παρουσία φαινολικών συστατικών στα απόβλητα ελαιοτριβείου εξαρτάται από την ποικιλία και τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού, της συνθήκης αποθήκευσης του αποβλήτου και την μέθοδο επεξεργασίας. Σημαντική παράμετρος ωστόσο, αποτελεί το φυσικοχημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα φαινολικά συστατικά μέσα στα απόβλητα (Obied et al. 2005). Η χαμηλή τιμή του pH καθώς και η παρουσία διαφόρων οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων, έχει ως αποτέλεσμα στην τελική σύσταση του αποβλήτου, να κυριαρχούν απλές φαινόλες, όπως η υδροξυτυροσώλη που αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης σεκοϊριδοειδών.

Για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τα υδατικά απόβλητα ελαιοτριβείου έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές όπως η τεχνολογία μεμβρανών, χρωματογραφικές μέθοδοι, μέθοδοι προσρόφησης κ.α. Η ανάκτηση φαινολικών συστατικών, συνήθως περιλαμβάνει κάποιο στάδιο συμπύκνωσης του υγρού αποβλήτου (θερμική συμπύκνωση, υπερδιήθηση, λυοφιλοποίηση) και στην συνέχεια διαδοχικά στάδια εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες (π.χ., μεθανόλη, αιθανόλη ή υδροαλκοολικά διαλύματα). Άλλες πρακτικές που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών περιλαμβάνουν υπερκρίσιμα ρευστά (Goula and Gerasopoulos 2017; Gómez-Caravaca et al. 2017).

### 5.1.2 Εκχυλίσεις φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο.

*Μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο για αναλυτικούς σκοπούς.*

Στο ελαιόλαδο, το φαινολικό κλάσμα πολλές φορές αποκαλείται και πολικό κλάσμα του ελαιολάδου. Με την σύσταση του ελαιολάδου να χαρακτηρίζεται από την συντριπτική παρουσία των τριάκυλο γλυκερολών, άπολων δηλαδή συστατικών, το ελαιόλαδο θεωρείται ένα άπολο σύστημα. Μικρότερης πολικότητας ενώσεις όπως φαινόλες, φαινολικά οξέα και κάποια φωσφολιπίδια εβρίσκονται σε σημαντικά μικρότερη αναλογία μέσα στο ελαιόλαδο.

Η διαφορά στην πολικότητα μεταξύ του φαινολικού κλάσματος και του λιπόφιλου κλάσματος είναι και η αρχή της μεθόδου στην υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE). Η υγρή-υγρή εκχύλιση, είναι μια μέθοδος διαχωρισμού που βασίζεται στην μεταφορά συστατικών από ένα διάλυμα σε ένα άλλο, μη αναμίξιμο διάλυμα, λόγω της διαφοράς πολικότητας των διαλυμάτων (Berk 2013).

Η υγρή-υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια παραδοσιακή μέθοδο για την απομόνωση των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο (Hrnčirik and Fritsche 2004). Για την εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος αξιοποιείται η διαφορά πολικότητας των λιπαρών συστατικών του ελαιολάδου με τα φαινολικά συστατικά. Έτσι η διαδικασία της εκχύλισης αποτελείται από ένα άπολο μέρος που είναι είτε το ελαιόλαδο αυτούσιο, είτε το ελαιόλαδο διαλυμένο σε κάποιον διαλύτη μικρής πολικότητας, με ένα δεύτερο, μη αναμίξιμο μέρος μεγαλύτερης πολικότητας.

Έτσι συχνά χρησιμοποιείται ως πολικός διαλύτης η καθαρή μεθανόλη (Owen et al. 2000; Aturki et al. 2008), μίγμα μεθανόλης νερού (80:20 v/v) ή (60:40 v/v). Τα διαλύματα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν σε συνδυασμό με αυτούσιο ελαιόλαδο, ελαιόλαδο/εξάνιο (1:1 w/v), ελαιόλαδο/ χλωροφόρμιο (10:1 w/v), ελαιόλαδο/πετρελαϊκός αιθέρας (1:1 w/v), ελαιόλαδο/[εξάνιο/πετρελαϊκός αιθέρας/χλωροφόρμιο (9/1/5 v/v)] (Montedoro et al 1992). Για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών έχουν βεβαίως προταθεί εναλλακτικά συστήματα ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία λιπιδίων στο τελικό εκχύλισμα, όπως η χρήση ακετονιτριλίου (Karkoula et al. 2012).

Σε πολλά πρωτόκολλα εκχύλισης αναφέρεται αρχική εκχύλιση του ελαιολάδου με κάποιον διαλύτη, όπως η καθαρή μεθανόλη, και στην συνέχεια η απολίπανση του εκχυλίσματος με σύστημα πολικού και άπολου διαλύτη. Σε τέτοιες περιπτώσεις αναφέρεται η χρήση του εξανίου ως άπολος διαλύτης και ακετονιτριλίου ή DMF ως πολικού διαλύτη (Brenes et al. 2000).

Στην εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου για αναλυτικούς σκοπούς μεγάλη σημασία έχει το ποσοστό της ανάκτησης των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο και πολλές φορές η καθαρότητα του εκχυλίσματος. Η δημιουργία γαλακτωμάτων, η ατελής ανάκτηση των φαινολικών συστατικών είναι προβλήματα που συχνά αναφέρονται στην υγρή-υγρή εκχύλιση (Angerosa et al. 1995).

Η εκχύλιση του ελαιολάδου απευθείας με μίγμα μεθανόλης/νερού (80:20) έχει υιοθετηθεί και από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου ως επίσημη μέθοδος για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (IOOC 2009).

Η κλασική μέθοδος της υγρής εκχύλισης έχει επιδεχτεί στο παρελθόν αρκετές τροποποιήσεις στα πρωτόκολλα εκχύλισης φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Οι μετατροπές αυτές στοχεύουν στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο αλλά και στην χρήση μικρότερης ποσότητας οργανικών διαλυτών. Τέτοιες τεχνικές είναι η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση και η εκχύλιση με υπερήχους (Pizarro et al. 2013).

Η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση βασίζεται στην μέθοδο της υγρής-υγρής εκχύλισης, με την διαφορά ότι γίνεται χρήση πολύ μικρότερης ποσότητας διαλυτών και δρόγης. Η αποτελεσματικότερη εκχύλιση επιτυγχάνεται με την προσθήκη πολλών σταδίων εκχύλισης και τελικής συνένωση τους. Στο ελαιόλαδο έχει χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος για απομόνωση των φαινολικών συστατικών για αναλυτικούς σκοπούς εμφανίζοντας πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα (Becerra-Herrera et al. 2014). Αντίστοιχα η χρήση υπερήχων κατά την εκχύλιση του ελαιολάδου έχει ενσωματωθεί σε πολλά πρωτόκολλα που αφορούν την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο (Jerman Klen and Mozetič Vodopivec 2012; Pizarro et al. 2013). Τέλος σε άλλη εργασία οι ερευνητές παρουσίασαν ακόμα μία μέθοδο υγρής- υγρής εκχύλισης των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο με HPCCC και χρήση εξανίου και μεθανόλης. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από την περιορισμένη χρήση διαλυτών (Adhami et al. 2015).

Η δεύτερη σημαντικότερη μέθοδος απομόνωσης του φαινολικού κλάσματος είναι η εκχύλιση στερεής φάσης. Η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση αναλυτών από αέρια, ρευστά ή και υγρά συστήματα, μέσω προσρόφησης των συστατικών από το αρχικό διάλυμα στην επιφάνεια ενός προσροφητικού στερεού. Οι αναλύτες μετά από τον διαχωρισμό τους ανακτώνται από το στερεό με την βοήθεια κάποιου διαλύτη, συνήθως οργανικού (Poole 2000). Η ανάπτυξη της μεθόδου αυτής ξεκίνησε πριν από περίπου 40 χρόνια και η εφαρμογή της αφορά τόσο διεργασίες εργαστηριακής κλίμακας, όσο και βιομηχανικής (Hennion 1999). Το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι προ-πακεταρισμένες στήλες πυριτίου κανονικής και αντίστροφης φάσης.



Στο ελαιόλαδο η απομόνωση των φαινολικών συστατικών με την χρήση SPE, επιτυγχάνεται με διάλυση του ελαιολάδου σε μικρή ποσότητα κάποιου μη πολικού διαλύτη όπως το εξάνιο, και έκλυση του διαλύματος από την προ-πακεταρισμένη στήλη C-8 (Pirisi et al. 2000) ή C-18 (Servili and Montedoro 2002). Στην συνέχεια, η στήλη εκλύεται με κάποιον πολικότερο διαλύτη. Ως πολικός διαλύτης έχει γίνει χρήση διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη/ακετονιτρίλιο (Pirisi et al. 2000), καθαρή μεθανόλη, μεθανόλη/νερό (Bendini et al. 2003).

Εκτός από τις στήλες αντίστροφης φάσης, έχουν αναπτυχθεί και οι νέες γενιάς στήλες Diol-Bonded που περιέχουν silica η οποία μπορεί να λειτουργήσει με συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις στήλες τόσο κανονικής όσο και αντίστροφης φάσης (Ríos et al 2005).

### 5.1.3 Πράσινες τεχνικές και εκχυλίσεις σε βιομηχανική κλίμακα.

Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, τόσο μέσα από βιβλιογραφικά δεδομένα όσο και από τα στατιστικά στοιχεία που παραθέσαμε, μπορεί να κυμανθεί από μηδενική έως και 2 και σε μερικές σπάνιες περιπτώσεις 3 γραμμάρια ανά κιλό ελαιολάδου. Η χαμηλή περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, ώθησε τους περισσότερους ερευνητές, να αναζητήσουν διαφορετικές πηγές για την απομόνωση τους, όπως τα απόβλητα ελαιοτριβείου. Όπως αναφέρθηκε όμως και προηγουμένως, στα απόβλητα ελαιοτριβείου, από τα φαινολικά συστατικά που συναντάμε στο ελαιόλαδο, μόνο οι απλές φαινολικές αλκοόλες όπως η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη εντοπίζονται σε αξιοποιήσιμα ποσοστά.

Παρά τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, το ενδιαφέρον για τα υπόλοιπα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου, παραμένει έντονο με αποτέλεσμα την διερεύνηση πιθανών μεθόδων απομόνωσης τους από το ελαιόλαδο. Η απομόνωση φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο για αναλυτικούς σκοπούς, πραγματοποιείται σε εργαστηριακή κλίμακα με μεθόδους που γίνεται χρήση υγρής-υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας στερεής φάσης. Οι μέθοδοι αυτοί τις περισσότερες φορές απαιτούν την χρήση οργανικών διαλυτών ενώ η εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα καθίσταται είτε απαγορευτική λόγω της τοξικότητας των διαλυτών, είτε οικονομικά ασύμφορη.

Μια από τις πιο σύγχρονες μεθόδους απομόνωσης φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο, είναι η μέθοδος που βασίζεται στην εκχύλιση με ευτηκτικά υγρά. Τα ευτηκτικά υγρά είναι μίγματα διαλυτών, μίγμα χημικών ενώσεων ή στοιχείων που εμφανίζουν μια ενιαία χημική σύσταση, και τα οποία στερεοποιούνται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από οποιαδήποτε άλλη σύσταση (Smith et al. 2019; Atkins and de Paula 2009). Τα ευτηκτικά υγρά αποτελούνται γενικά από 2 ή και 3 ασφαλή και χαμηλού κόστους συστατικά τα οποία είναι ικανά να συσχετίζονται μεταξύ τους, μέσω αλληλεπιδράσεων υδρογόνου, για να σχηματίσουν ένα ευτηκτικό μίγμα. Τα βαθέα ευτηκτικά υγρά (DES) χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη καταπόνηση του σημείου πήξης και είναι υγρές σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 150 ° C (Zhang et al. 2012).

Η εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου έχει πραγματοποιηθεί σε πρόσφατες εργασίες, με την βοήθεια πολλών διαφορετικών DES. Από τις εργασίες αυτές προέκυψε η ισχυρή εκχυλιστική ικανότητα των ευτηκτικών υγρών σε σύγκριση με την χρήση οργανικών διαλυτών στην υγρή-υγρή χρωματογραφία, ωστόσο και εδώ η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών από το διάλυμα του DES επιτυγχάνεται με χρήση τεχνικών εκχύλισης στερεής φάσης (ρητίνες) καθώς η εξάτμιση των DES είναι πρακτικά αδύνατη (García et al. 2001; Paradiso et al. 2016).

Σε πρόσφατη επίσης εργασία, έχει παρουσιαστεί μία μέθοδος για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου με φυγοκεντρική εκχύλιση (CPE) όπου το ελαιόλαδο, διαλυμένο σε εξάνιο χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, ενώ ως στατική φάση χρησιμοποιείται μίγμα αιθανόλης νερού (Angelis et al. 2017).

Μια από τις λίγες μεθόδους για την απομόνωση συστατικών όπως η ελαιοκανθάλη από το ελαιόλαδο, έχει παρουσιαστεί από τον Wen και τους συνεργάτες του τα δικαιώματα της οποία είναι διεθνώς προστατευμένα. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, οι εφευρέτες υποστηρίζουν ότι η προσθήκη ενός τροποποιημένου άμυλου στο ελαιόλαδο, δεσμεύει στην επιφάνεια του συστατικά όπως η ελαιοκανθάλη. Με την προσθήκη νερού το άμυλο αυτό παραλαμβάνεται από το ελαιόλαδο ενώ η παραλαβή των συστατικών από το διάλυμα γίνεται με συμπύκνωση του διαλύματος και εκχύλιση με διμεθυλαιθέρα και προπάνιο (Wen et al. 2015). Την δημιουργία συμπλόκου της ελαιοκανθάλης με σκοπό την απομόνωση και κυρίως τον καθαρισμό εκχυλίσματος ελαιοκανθάλης έχουν κατοχυρώσει και ο Estanove με τους συνεργάτες του, οι οποίοι για την απομόνωση δημιουργούν ένα σύμπλοκο της ελαιοκανθάλης με κάποιο τεταρτοταγές θειώδες άλας, ή θειώδες αμμώνιο. τα συστατικά που δεν αντιδρούν γίνεται με υγρή υγρή εκχύλιση. Η αποπροστασία της ελαιοκανθάλης γίνεται με την ρύθμιση pH και την προσθήκη κάποιου όξινου ή βασικού παράγοντα (Estanove et al 2009).

Μια άλλη εναλλακτική μέθοδος που έχει δημοσιευτεί πρόσφατα περιλαμβάνει την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο με την βοήθεια νανοσωματιδίων. Η μέθοδος αυτή συγκαταλέγεται στην κατηγορία της SPE και περιλαμβάνει την προσρόφηση των φαινολικών συστατικών πάνω στην επιφάνεια νανοσωματιδίων. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με την ελάχιστη χρήση υλικού προσρόφησης αλλά και οργανικών διαλυτών. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ των φαινολικών συστατικών και των νανοσωματιδίων παραμένουν συστήματα φιλικά προς το περιβάλλον καθώς και προς τον ανθρώπινο οργανισμό (Fratoddi et al. 2018). Η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών βέβαια και εδώ περιλαμβάνει την χρήση οργανικών διαλυτών.

### *Υδατική εκχύλιση ελαιολάδου.*

Στην τελευταία κατηγορία εκχυλίσεων θα αναφέρουμε μια από τις πιο πρόσφατες μεθόδους εκχύλισης του ελαιολάδου με την οποία ασχοληθήκαμε και εμείς στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Σύμφωνα με την εργασία των Siddique και των συνεργατών του, η εκχύλιση των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου, μπορεί να γίνει με απευθείας εκχύλιση του ελαιολάδου με νερό (Siddique et al. 2019). Οι ερευνητές ανέμιξαν ποσότητα ελαιολάδου (100 mL) με απιονισμένο νερό (150 mL) και μετά τον διαχωρισμό των φάσεων παρέλαβαν το υδατικό εκχύλισμα το οποίο περιείχε ελαιοκανθάλη καθώς και άλλα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου. Η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, έγινε με λυοφιλοποίηση του υδατικού εκχυλίσματος, ενώ εναλλακτικά έγινε χρήση ρητίνης XAD7 και ανάκτηση με οργανικό διαλύτη ακετόνη. Η συγκεκριμένη μέθοδος ανήκει στις πλέον πράσινες τεχνικές εκχύλισης και χαρακτηρίζεται από την εκλεκτική εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου ενώ σημειώνεται ότι επιτυγχάνεται η μέγιστη καθαρότητα του εκχυλίσματος με την απουσία συστατικών από την λιπαρή φάση.

Στην παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται η μεταφορά των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου, από την λιπαρή στην υδατική φάση. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η ελαιοκανθάλη μεταφέρεται από την λιπαρή στην υδατική φάση υπό την μορφή νανογαλακτώματος. Όπως εξηγούν η ελαιοκανθάλη, όταν έρχεται σε επαφή με υδατική φάση, τα μόρια του νερού αναμειγνύονται με τα μόρια της ελαιοκανθάλης δημιουργώντας ένα στρώμα γύρω από την ελαιοκανθάλη και σχηματίζοντας τελικά ένα γαλάκτωμα. Η κατανομή όγκου/βάρους του γαλακτώματος μετρήθηκε με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίου και βρέθηκε 2.87 nm τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία του νανογαλακτώματος.

Η δημιουργία νανογαλακτώματος, αποτελεί μια εξήγηση, για τον τρόπο με τον οποίο τα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου μπορούν να περάσουν από την λιπαρή, στην υδατική φάση. Η κατανομή των συστατικών αυτών, έχει απασχολήσει και άλλους ερευνητές στο παρελθόν, οι οποίοι εξηγούν ότι ο συντελεστής κατανομής των συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων, επηρεάζεται από την πολικότητα των συστατικών αλλά και τους σχετικούς όγκους των δύο φάσεων (Rodis et al 2002). Ωστόσο, πέραν της εργασίας του Siddique και των συνεργατών του, στην βιβλιογραφία συναντάμε στοιχεία διαλυτότητας των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, μόνο για τις πολικές απλές φαινόλες. Η διαλυτότητα των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου στην υδατική φάση αναφέρεται είτε ως αποτέλεσμα (παρουσία σεκοϊριδοειδών σε τελικό εκχύλισμα αποβλήτων ελαιοτριβείου) είτε σε μοντέλα πρόβλεψης του συντελεστή κατανομής μεταξύ υδατικής και λιπαρής φάσης (Rodis et al 2002).

Η δημιουργία νανογαλακτώματος, αποτελεί έναν μηχανισμό ανάμιξης της ελαιοκανθάλης με το νερό και μπορεί να εξηγήσει το γεγονός ότι τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης. Ένας άλλος μηχανισμός θα ήταν αυτός της διάλυσης των σεκοϊριδοειδών στο νερό χωρίς αντίδραση μεταξύ του νερού και των συστατικών, όπως συμβαίνει για τις απλές φαινυλικές αλκοόλες. Ωστόσο σε εργασία που αφορούσε την απομόνωση μεταβολιτών από το είδος *Phillyrea angustifolia* L. παρουσιάζονται οι δομές των μεταβολιτών ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη ύστερα από την αντίδραση ενός μορίου νερού με την μια από τις δύο αλδεΐδες των συστατικών αυτών (Scognamiglio et al. 2014). Στην συγκεκριμένη εργασία, οι ενυδατωμένες αυτές μορφές προήλθαν από την εκχύλιση του φυτού με μίγμα μεθανόλης/νερού ενώ η φασματοσκοπική τους απόδοση έγινε με φασματοσκοπία NMR σε μίγμα μεθανόλης/νερού. Η παρουσία της μεθανόλης στο διάλυμα εκχύλισης, περιπλέκει τον μηχανισμό διάλυσης των συστατικών αυτών, ωστόσο η αναφορά και μόνο σε ενυδατωμένες μορφές της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, αυτομάτως προτείνει έναν διαφορετικό μηχανισμό διάλυσης.

## 5.2 Σκοπός.

Ο ισχυρισμός υγείας που θεσπίστηκε από την ΕΕ, σε σχέση με τις υγειοπροστατευτικές ιδιότητες του ελαιολάδου, οδήγησε σε περεταίρω μελέτες των βιολογικών δράσεων συστατικών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό αυτό. Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, είτε ως σύνολο είτε ως μεμονωμένα φαινολικά συστατικά αξιολογούνται συνεχώς για τις δράσεις τους με αποτέλεσμα να αυξάνεται και το ενδιαφέρον για εξεύρεση μεθόδων απομόνωσης των συστατικών αυτών όχι πια για αναλυτικούς μόνο σκοπούς μόνο, αλλά και για μια πιθανή εμπορική αξιοποίησή τους.

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάστηκε ο μηχανισμός διάλυσης των συστατικών ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο νερό μέσω της ενυδάτωσης τους, ως μια μέθοδο απομόνωσης και παρασκευής εκχυλισμάτων βασισμένα στις ενυδατωμένες μορφές της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Μέσα από την διαλεύκανση του μηχανισμού αυτού εξετάστηκε και η χρήση διαφορετικών διαλυτών, φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, για την απομόνωση φαινολικών συστατικών και την παρασκευή εκχυλισμάτων κατάλληλα για ενσωμάτωση σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές.

## 5.3 Υλικά και μέθοδοι.

### 5.3.1 Υλικά

Χημικά Υλικά.

- Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich.
- Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG200 και PEG400) έφερε ένδειξη για φαρμακευτική χρήση.
- Όλοι οι δευτεριωμένοι διαλύτες προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich.
- Η silica gel αντίστροφης φάσης R-18 προμηθεύτηκε από την εταιρία MACHEREY-NAGEL.

Δεξαμενές.

Όλες οι δεξαμενές αποθήκευσης και ανάδευσης που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν ανοξειδωτες κατασκευές ή πλαστικές (πολυπροπυλένιο) κατάλληλες για επεξεργασία τροφίμων.

### 5.3.2 Μέθοδοι.

Ποσοτικός Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.

Όλοι οι ποσοτικοί προσδιορισμοί των φαινολικών συστατικών σε ελαιόλαδο πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε και περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 2.

Φάσματα δύο διαστάσεων

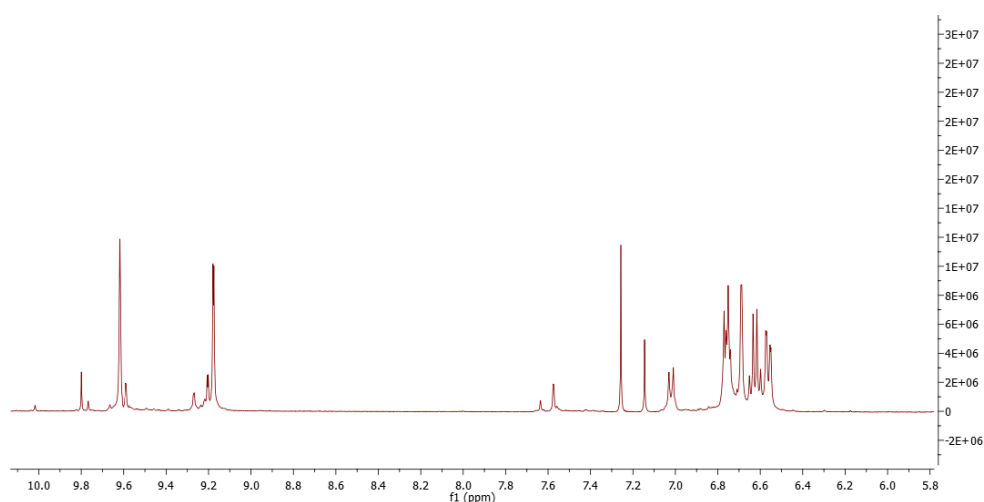
Όλα τα φάσματα δύο διαστάσεων ελήφθησαν σε 400 MHz (Bruker 400).

## 5.4 Υδατικές εκχυλίσσεις.

### 5.4.1 Ανάλυση υδατικού αποβλήτου ελαιοτριβείου.

Στα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν την ακαδημαϊκή περίοδο 2015-2016, αρχικός στόχος, ήταν να διερευνηθεί η επίδραση που έχει στο φαινολικό περιεχόμενο, η επαφή του νερού με το ελαιόλαδο. Για την συγκεκριμένη μελέτη, αφορμές στάθηκαν οι δημοσιευμένες αναφορές, για την αρνητική επίδραση που έχει η χρήση ελαιοτριβείων τριών φάσεων σε σχέση με εκείνα των 2 φάσεων που, όπως έχει εξηγηθεί και εισαγωγικά, η κύρια διαφορά τους είναι η προσθήκη νερού στους μαλακτήρες κατά την διάρκεια της ελαιοποίησης του καρπού. Σε ένα από τα πρώτα πειράματα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ποσότητας υδατικού αποβλήτου που προήλθε από τον κάθετο διαχωριστήρα του ελαιοτριβείου 3 φάσεων του Αγροτικού Συνεταιρισμού Παλαιοπαναγιάς Λακωνίας.

Το υδατικό αυτό απόβλητο, ήταν αρκετά πιο καθαρό από το αντίστοιχο υδατικό απόβλητο που προέκυψε από τον οριζόντιο διαχωριστήρα, και προέκυψε μετά από σύντομη επαφή θερμού νερού 35 °C με το ελαιόλαδο. Η ποσότητα αποβλήτου που συλλέχθηκε αποθηκεύτηκε σε συνθήκες -18 °C μέχρι την ανάλυση του. Στην συνέχεια, και σε μεταγενέστερο χρόνο αφού το δείγμα αποψύχθηκε, συλλέχθηκαν 10 mL και αφού προστέθηκε 1 mL από διάλυμα εσωτερικού προτύπου συριγγαλδεΐδης, εξατμίστηκε υπό κενό σε θερμοκρασία 40 °C σε συσκευή απόσταξης. Το ξηρό εκχύλισμα, διαλύθηκε σε 600  $\mu$ L δευτεριωμένου χλωροφορμίου, και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ , το οποίο και παρουσιάζουμε στην επόμενη εικόνα 5.1.



**Εικόνα 5.1:** Η αλδεϋδική και αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  υδατικού εκχυλίσματος αποβλήτου ελαιοτριβείου.

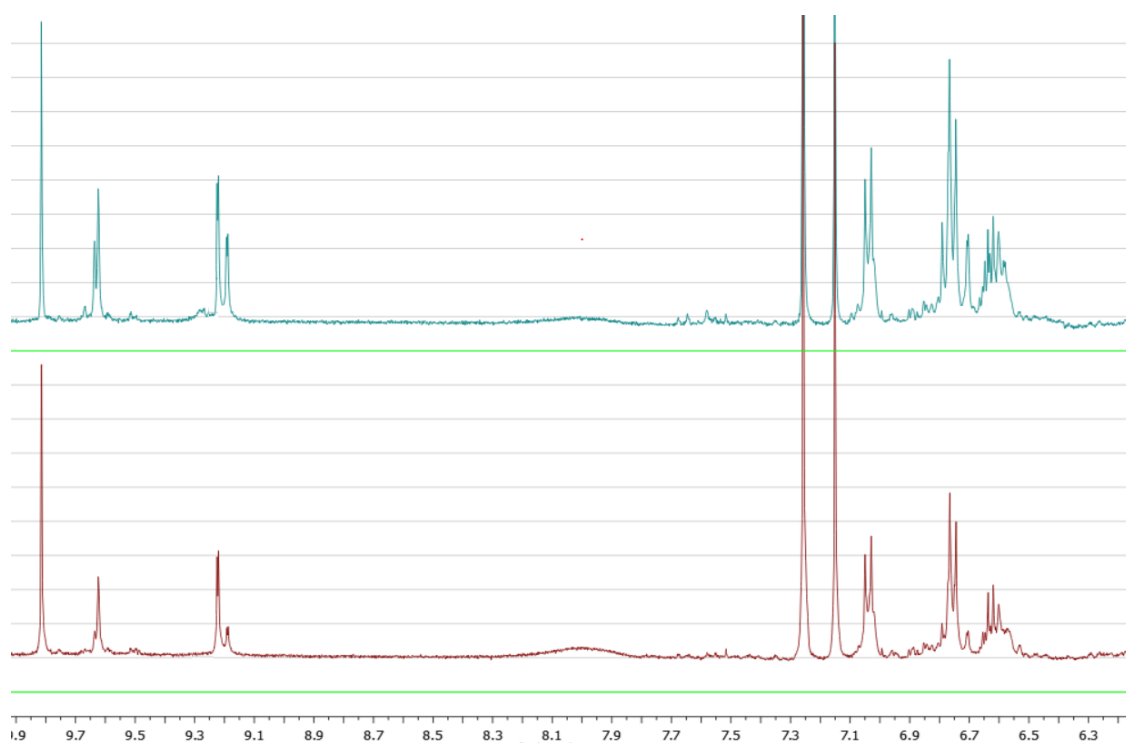


Από την αλδεϋδική και την αρωματική περιοχή του φάσματος πρωτονίου, διαπιστώθηκε παρουσία σημαντικής ποσότητας ελαιασίνης. Η ποσότητα της ελαιασίνης στο εκχύλισμα, προκάλεσε πολλά ερωτήματα για τον μηχανισμό διάλυσης της ελαιασίνης στο νερό. Ακόμα περισσότερα ερωτήματα ωστόσο, προκάλεσε η παρουσία μικρότερης, αλλά εξίσου σημαντικής ποσότητας ελαιοκανθάλης για τους ίδιους λόγους. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε νέα σειρά πειραμάτων, για την διερεύνηση του μηχανισμού διάλυσης της ελαιοκανθάλης στο νερό, όπου ελαιόλαδο γνωστής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά αναμίχθηκε με απιονισμένο νερό σε διαφορετικές θερμοκρασίες και αναλογίες.

### 5.3.2 Πειράματα ανάμιξης ελαιολάδου-νερού.

*Θερμοκρασία περιβάλλοντος – Αναλογία ελαιολάδου/νερού 1:1.*

Σε μια κωνική φιάλη προστέθηκαν 10 mL απιονισμένου νερού και 10 mL ελαιολάδου και αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 4000 rpm και παραλήφθηκε η φάση του ελαιολάδου. Το ελαιόλαδο μετά τον διαχωρισμό, υποβλήθηκε σε ανάλυση φαινολικών συστατικών ώστε να γίνει σύγκριση του αρχικού και του τελικού δείγματος ελαιολάδου.



**Εικόνα 5.2:** Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Πίνακας 5.1:** Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

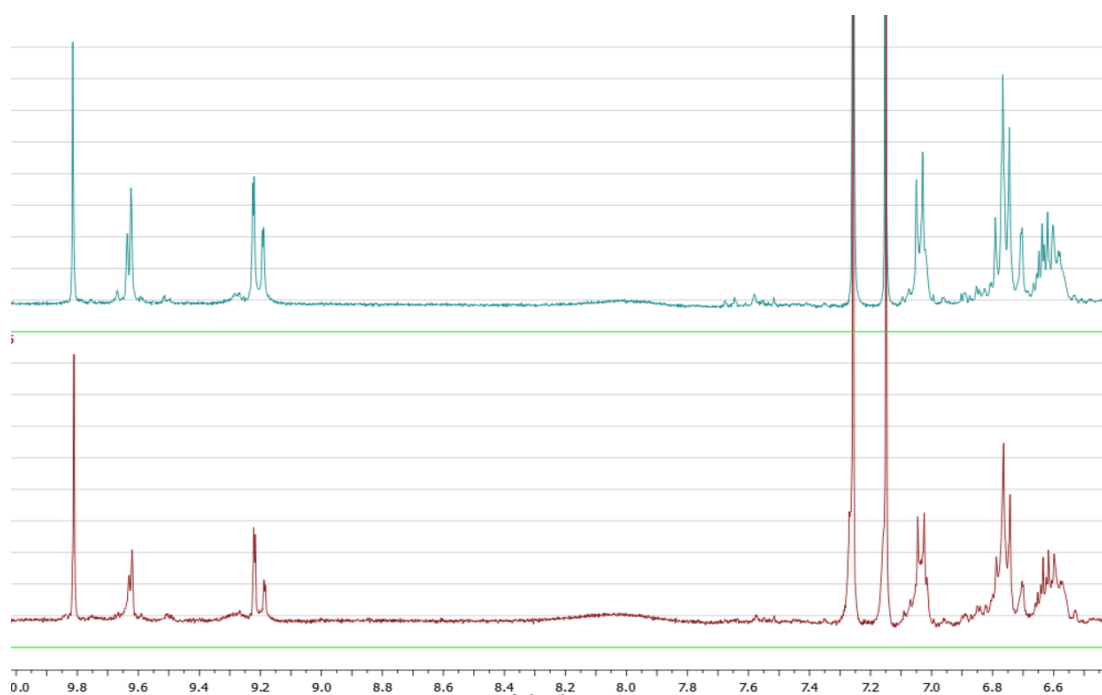
	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη
Αρχική συγκέντρωση	285	202
Τελική συγκέντρωση	209	107
Ποσοστιαία μείωση	26%	47%

Από τα παραπάνω φάσματα παρατηρήθηκε ότι οι κορυφές που αντιστοιχούν στα αλδεϋδικά πρωτόνια της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης μειώθηκαν σημαντικά μετά την παρατεταμένη επαφή με το νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα και ύστερα από την

παρατεταμένη επαφή των δύο φάσεων, υπήρχε πτώση της συγκέντρωσης της ελαιασίνης κατά 26% ενώ η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης μειώθηκε κατά 47%.

#### *Θερμοκρασία περιβάλλοντος – Αναλογία ελαιολάδου/νερού 1:10*

Στην συνέχεια, και για να εξακριβωθεί η επίδραση που έχει η ποσότητα του νερού που έρχεται σε επαφή με το ελαιόλαδο, πραγματοποιήθηκε νέα δοκιμή, αυτή την φορά δεκαπλασιάζοντας την ποσότητα του νερού που έρχεται σε επαφή με το ελαιόλαδο για 1 h. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, αλλά αυτή την φορά προστέθηκαν 10 mL του ίδιου αρχικού ελαιολάδου και 100 mL απιονισμένου νερού και αναδεύτηκαν με μαγνητική ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



**Εικόνα 5.3:** Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

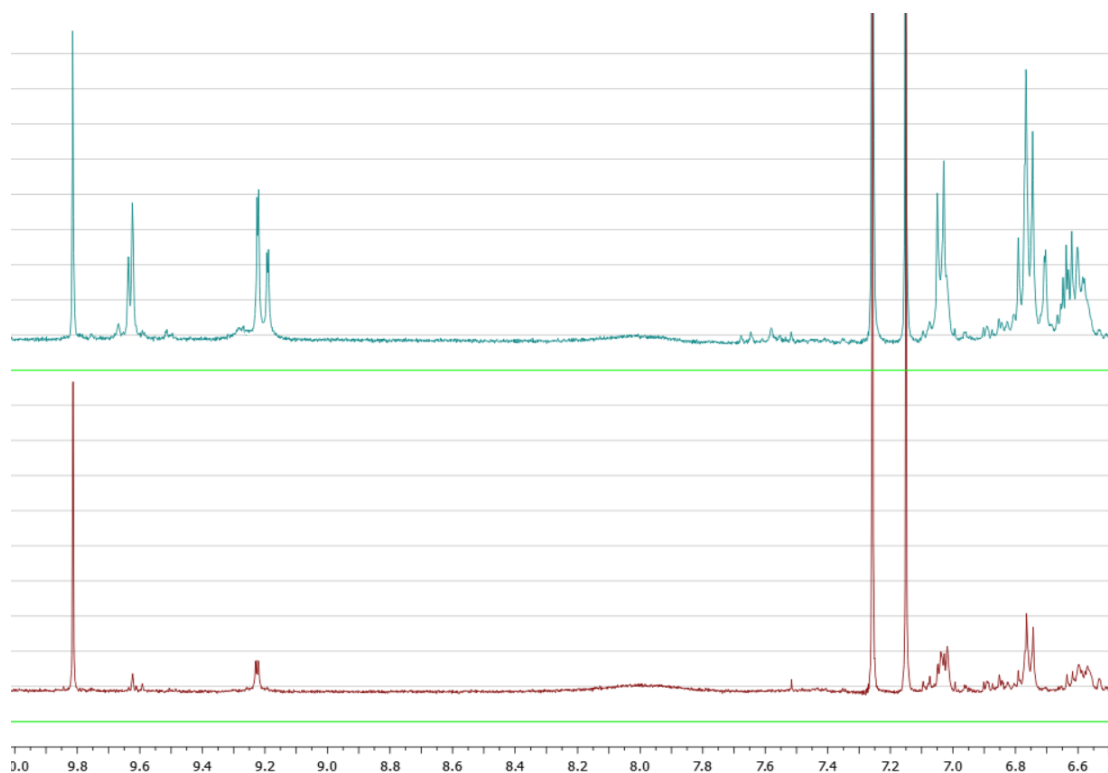
**Πίνακας 5.2:** Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη
Αρχική συγκέντρωση	285	202
Τελική συγκέντρωση	158	85
Ποσοστιαία μείωση	44%	58%

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας νερού, η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης μειώθηκε ακόμα περισσότερο. Συγκεκριμένα με την προσθήκη 10πλάσιου όγκου νερού η απώλεια της ελαιοκανθάλης διπλασιάστηκε (44%) ενώ η συγκέντρωση της ελαιασίνης μειώθηκε κατά 58%.

*Θερμοκρασία 100 °C – Αναλογία ελαιολάδου/νερού 1:1*

Για να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην απώλεια των φαινολικών συστατικών, επαναλήφθηκαν τα προηγούμενα πειράματα, αυτή την φορά σε θερμοκρασία 100 °C. Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 5 mL ελαιολάδου και 5 mL απεσταγμένου νερού, και αναδεύτηκαν σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα για 1h



**Εικόνα 5.4:** Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία 100 °C.

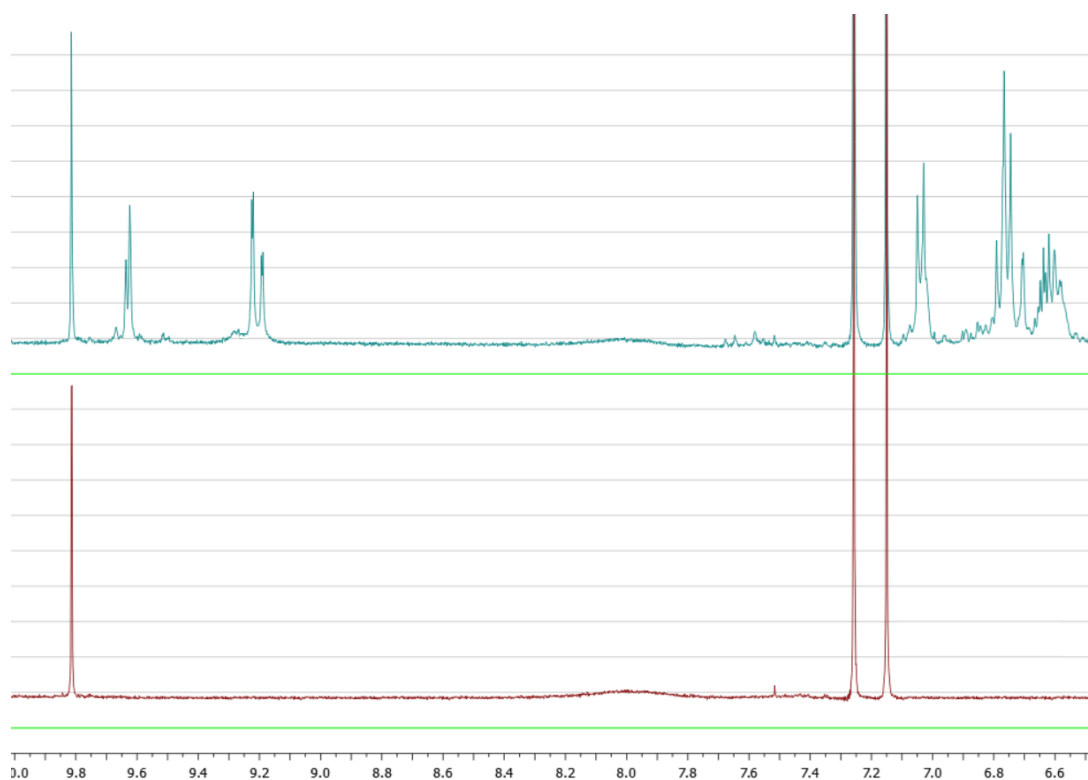
**Πίνακας 5.3:** Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:1 σε θερμοκρασία 100 °C.

	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη
Αρχική συγκέντρωση	285	202
Τελική συγκέντρωση	99	0
Ποσοστιαία μείωση	65%	100%

Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 100 °C παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο μειώθηκε σημαντικά (64%) ενώ η συγκέντρωση της ελαιασίνης μηδενίστηκε.

*Θερμοκρασία 100 °C – Αναλογία ελαιολάδου/νερού 1:10*

Ομοίως με της προηγούμενη σειρά πειραμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και για να διερευνηθεί η επίδραση που έχει η ποσότητα του νερού που έρχεται σε επαφή με το ελαιόλαδο, δεκαπλασιάστηκε η ποσότητα του νερού που έρχεται σε επαφή με το ελαιόλαδο για 1 h και σε θερμοκρασία 100 °C .



**Εικόνα 5.5:** Φαινολικό εκχύλισμα αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία 100 °C.

**Πίνακας 5.4:** Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του αρχικού ελαιολάδου και ελαιολάδου μετά από επαφή με νερό σε αναλογία 1:10 σε θερμοκρασία 100 °C.

	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη
Αρχική συγκέντρωση	285	202
Τελική συγκέντρωση	0	0
Ποσοστιαία μείωση	100%	100%

Όπως ήταν αναμενόμενο, με την προσθήκη δεκαπλάσιας ποσότητας νερού και για ανάδευση σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, μετά από ανάδευση μιας ώρας η συγκέντρωση τόσο της ελαιοκανθάλης, όσο και της ελαιασίνης, μηδενίστηκε.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι, όπως και στην περίπτωση της φυγοκέντρωσης του ελαιολάδου στον κάθετο διαχωριστήρα, η επαφή του ελαιολάδου με το νερό, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο. Η μείωση αυτή, επηρεάζεται από την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται αλλά και την θερμοκρασία ανάμιξης.

Μολονότι από την ανάλυση των αποβλήτων ελαιοτριβείου από τον κάθετο διαχωριστή, παρατηρήθηκε ότι το ξηρό εκχύλισμα αποτελεί κυρίως από ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη, από την παραπάνω ανάλυση διαπιστώθηκε μόνο η απώλεια των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο.

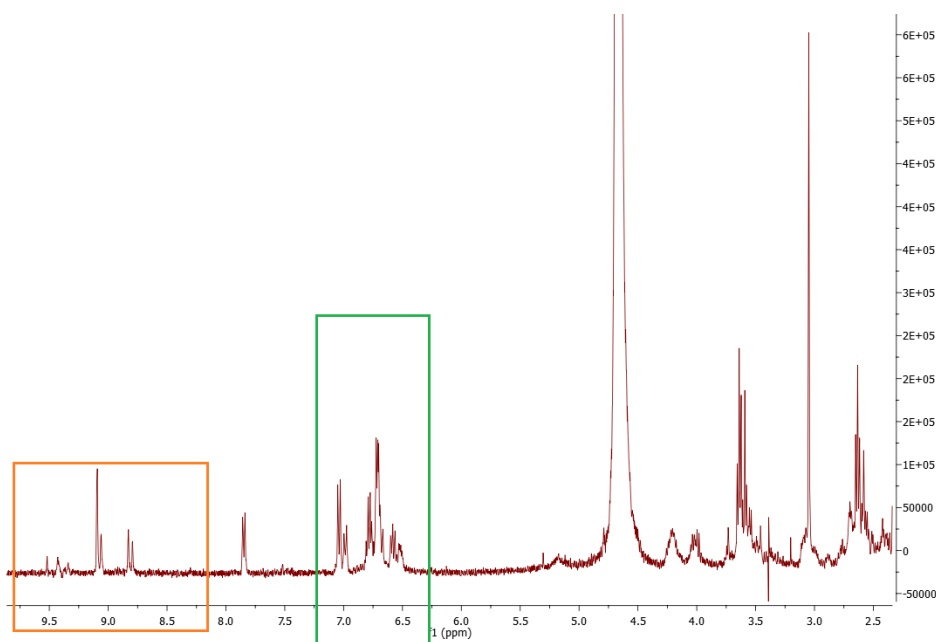
Πέραν όμως της μεταφοράς των σεκοϊριδοειδών από την λιπαρή και την υδατική φάση και του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό, έχει νομίζουμε ιδιαίτερη σημασία να διαπιστωθεί εάν κατά την μεταφορά αυτή επιτελούνται υδρολυτικές ή άλλες αντιδράσεις οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την μερική αποδόμηση των σεκοϊριδοειδών. Η υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών πραγματοποιείται με διάνοιξη του εστερικού δεσμού, απελευθερώνοντας ένα μόριο τυροσόλης ή υδροξυτυροσόλης και ένα παράγωγο του ελενολικού οξέος.

Για τον λόγο αυτόν διερευνήθηκε η πλήρης σύσταση της υδατικής φάσης χωρίς να μεσολαβήσει το στάδιο της εξάτμισης και της διάλυσης του ξηρού εκχυλίσματος σε διαλύτες διαφορετικών πολικιοτήτων.

### Εκχύλιση ελαιολάδου με δευτεριωμένο νερό.

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων, επαναλήφθηκαν κάποια πειράματα εκχύλισης αλλά αυτή την φορά, αντί για απεσταγμένο νερό, έγινε χρήση δευτεριωμένου νερού, ώστε να διερευνηθεί η πλήρης σύσταση του εκχυλίσματος.

Η εκχύλιση του ελαιολάδου, όπως είναι αναμενόμενο, έγινε σε μικρή κλίμακα. Συγκεκριμένα 1 mL ελαιολάδου, τοποθετήθηκε σε μικρό φιαλίδιο και προστέθηκε 1 mL δευτεριωμένου νερού. Το μίγμα αναμίχθηκε για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μετά την ανάμιξη, το μίγμα τοποθετήθηκε σε tube φυγοκέντρησης και το φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 4000 rpm. Η υδατική φάση συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε απ' ευθείας σε σωληνάκι NMR για την λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ .



**Εικόνα 5.6:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  ολικού υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου.

Το φάσμα πρωτονίου ήταν ένα αρκετά πολύπλοκο φάσμα στο οποίο ωστόσο, ήταν δυνατόν να διακριθούν αρκετές κορυφές στην αρωματική και στην αλδεϋδική περιοχή του. Δεδομένου της σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης των συστατικών που εμφανίζονται στο παραπάνω φάσμα, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα συστατικά του ελαιολάδου παραμένουν αδιάλυτα στο νερό, θεωρήθηκε ότι οι κορυφές αυτές θα έπρεπε να αντιστοιχούν, στα σεκοϊριδοειδή ή σε κάποια υποπροϊόντα των σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο.

#### 5.4.3 Υδατικά εκχυλίσματα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης.

Για τα συστατικά ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη, από την βιβλιογραφία διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μόνο μια αναφορά, στην οποία αναφέρεται ότι αυτά διαλύονται στο νερό, δημιουργώντας την ενυδατωμένη μορφή, στην οποία γίνεται και απόδοση της δομής με NMR. Στην εργασία ωστόσο αυτή, οι ερευνητές αναφέρουν ότι η διάλυση έχει γίνει με την προσθήκης ενός ποσοστού μεθανόλης, γεγονός που περιπλέκει την απόδοση της δομής και δεν εξασφαλίζει την αποφυγή δημιουργίας νέων προϊόντων όπως οι ημιακετάλες.

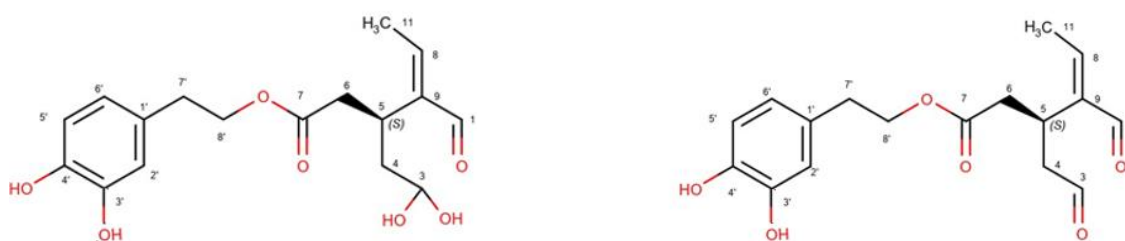
Σε επόμενο στάδιο επιχειρήθηκε η διάλυση των συστατικών ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη απευθείας σε δευτεριωμένο νερό. Για την σειρά πειραμάτων αυτήν χρησιμοποιήθηκαν δύο εκχυλίσματα που προέκυψαν από απομόνωση των συστατικών ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη με χρωματογραφικές μεθόδους.

Για την διάλυση των συστατικών ποσότητα 10 mg από το κάθε συστατικό αναμίχθηκε με 600 μL D<sub>2</sub>O και παρέμειναν σε επαφή για 3h. Στην συνέχεια παραλήφθηκε το υδατικό εκχύλισμα και πραγματοποιήθηκε απευθείας λήψη φασμάτων πρωτονίου και δύο διαστάσεων.



### Απόδοση δομής ελαιασίνης και ελαιασινοδιόλης σε D<sub>2</sub>O.

Από το φάσμα πρωτονίου που προήλθε από την διάλυση της ελαιασίνης σε D<sub>2</sub>O, παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν δύο ειδών σήματα. Πρόκειται για τα σήματα της διαλδεϊδικής μορφής της ελαιασίνης και της ενυδατωμένης μορφής της ελαιασίνης. Από την ανάλυση του φάσματος προέκυψε ότι στο εκχύλισμα, κυρίαρχο συστατικό, ήταν η ενυδατωμένη μορφή της ελαιασίνης (58%), ενώ η διαλδεϊδική της μορφή στο νερό, εμφανίστηκε σε ποσοστό 42%. Ορισμένα από τα σήματα της ενυδατωμένης μορφής, αλληλεπικαλύπτονταν με αυτά της διαλδεϊδικής, ωστόσο, και παρά την μικρή συγκέντρωση της διαλδεϊδικής μορφής στο νερό, με την χρήση των φασμάτων δύο διαστάσεων κατέστη δυνατό, να εξακριβωθούν τα σήματα και από τις μορφές. Παρακάτω θα παρουσιαστούν τα χαρακτηριστικά σήματα των πρωτονίων των δύο συστατικών.

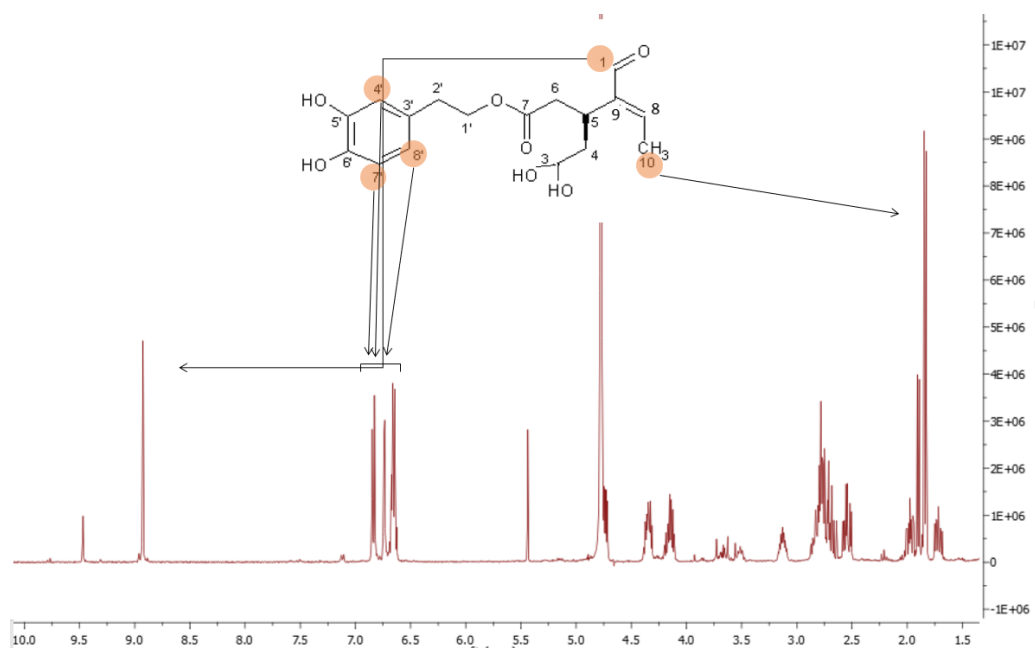


**Εικόνα 5.7:** Ελαιασινοδιόλη και Ελαιασίνη.

### Ελαιασινοδιόλη.

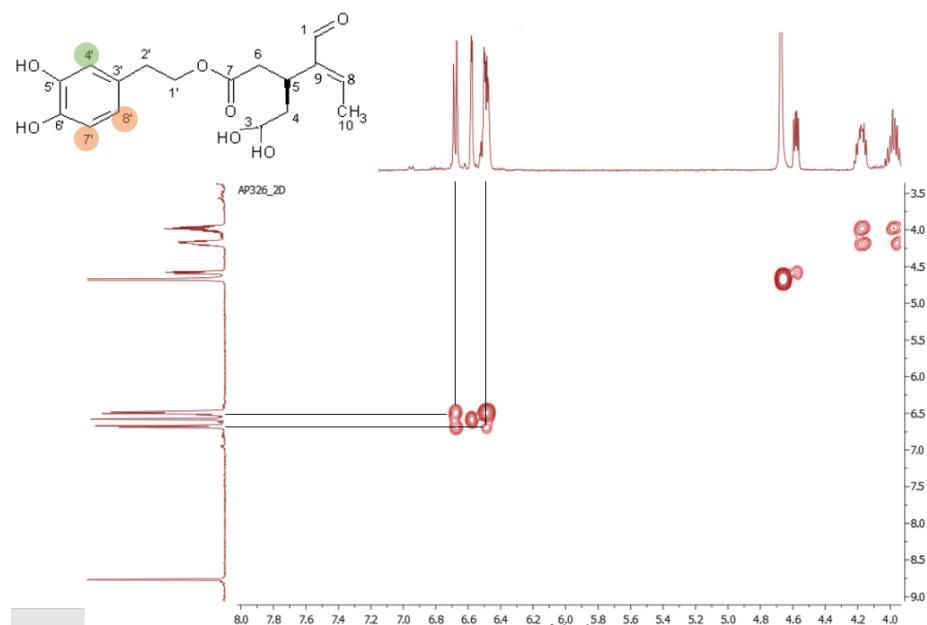
Στο φάσμα πρωτονίου εύκολα αποδόθηκαν μερικά σήματα σε συγκεκριμένα πρωτόνια. Στην αλδεϊδική περιοχή του φάσματος το αλδεϊδικό πρωτόνιο της θέσης 1 (H-1), το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με μικρή σχάση 1.68 Hz, και εμφανίζει χημική μετατόπιση 8.93 ppm. Επίσης στα υψηλά πεδία του φάσματος πρωτονίου, εμφανίζεται το χαρακτηριστικό σήμα ενός μεθυλίου το οποίο ολοκληρώνει για 2.3 σε σχέση με το αλδεϊδικό πρωτόνιο, και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-10 με χημική μετατόπιση 1.84 ppm. Παρατηρήθηκε ότι η ολοκλήρωση δεν αντιστοιχεί ακριβώς σε αναλογία 1:3, ωστόσο, όπως παρουσιάζεται και στην συνέχεια, στην ίδια χημική μετατόπιση εμφανίζεται και το αντίστοιχο σήμα της αλδεΐδης της διαλδεϊδικής μορφής την ελαιασίνης. Το σήμα του μεθυλίου εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σχάση 7.2 Hz λόγω συσχέτισής του με γειτονικό πρωτόνιο. Το αλδεϊδικό σήμα, εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με μικρή σχάση 1.7 Hz, λόγω της μακρινής του συσχέτισής με κάποιο πρωτόνιο.

Ακόμα εντοπίστηκαν και τα χαρακτηριστικά σήματα ενός όρθο-υποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου, στην αρωματική περιοχή του φάσματος.



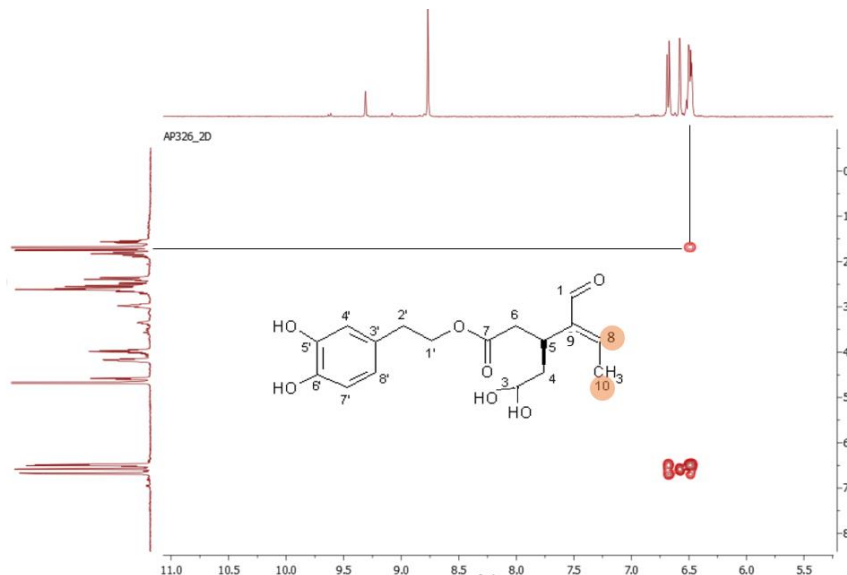
Εικόνα 5.8: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  ελαϊσίνης σε  $\text{D}_2\text{O}$ .

Το αρωματικό σύστημα που αναφέρθηκε μπορεί να αναλυθεί περισσότερο από το φάσμα COSY. Τα πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου εμφάνισαν όρθο και πάρα συσχετίσεις ανάλογα με την θέση τους στον φαινολικό δακτύλιο. Το  $\text{H-7}'$  με χημική μετατόπιση 6.84 ppm ( διπλή κορυφή με σχάση 8.2 Hz λόγω της όρθο- συσχέτισης του με το  $\text{H-8}'$ ), το  $\text{H-8}'$  στα 6.64 ppm (εμφανίζεται ως dd κορυφή με σχάση 8.2 Hz και 2 Hz λόγω της συσχέτισης του με τα  $\text{H-7}'$  και  $\text{H-4}'$  ) και  $\text{H-4}'$  στα 6.73 ppm (διπλή κορυφή με σχάση 2 Hz λόγω της μέτα- συσχέτισης του με το  $\text{H-7}'$ ).



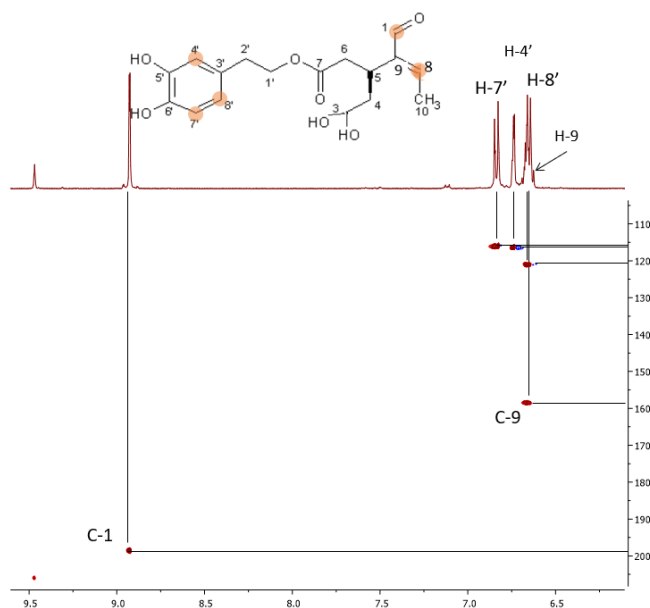
Εικόνα 5.9: Συσχέτιση αρωματικών πρωτονίων στο φάσμα COSY.

Τα πρωτόνια της θέσης 10, που ανήκουν στην ομάδα του μεθυλίου, εμφάνισαν στο φάσμα COSY μια συσχέτιση με ένα πρωτόνιο που βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό. Το πρωτόνιο αυτό είναι το πρωτόνιο H-8 στα 6.50, το οποίο επικαλύπτεται με το αρωματικό πρωτόνιο H-8'. Η παρουσία του πρωτονίου αυτού δίπλα στην ομάδα του μεθυλίου, επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα HMBC, και ΗΜQC.



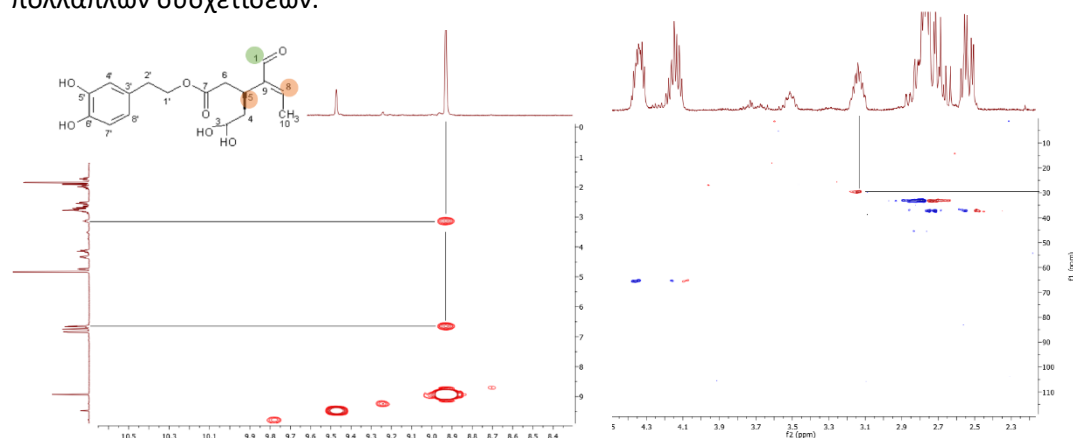
**Εικόνα 5.10:** Συσχέτιση ολεφινικού πρωτονίου με το μεθύλιο της θέσης 10 στο φάσμα COSY.

Από τα φάσματα δύο διαστάσεων ΗΜQC και ΗΜBC αντλήθηκαν πληροφορίες για τους άνθρακες με τους οποίους σχετίζονται τα πρωτόνια που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Έτσι από το φάσμα ΗΜQC παρατηρήθηκε ότι ο άνθρακας που συμμετέχει στην αλδεϋδική ομάδα της ελαισινοδιόλης C-1, εμφανίζει χημική μετατόπιση 198.60 ppm, ενώ οι αρωματικοί άνθρακες C-7', C-4' και C-8', εμφανίζουν χημική μετατόπιση 116.26, 116.63 και 120.92 ppm αντίστοιχα.



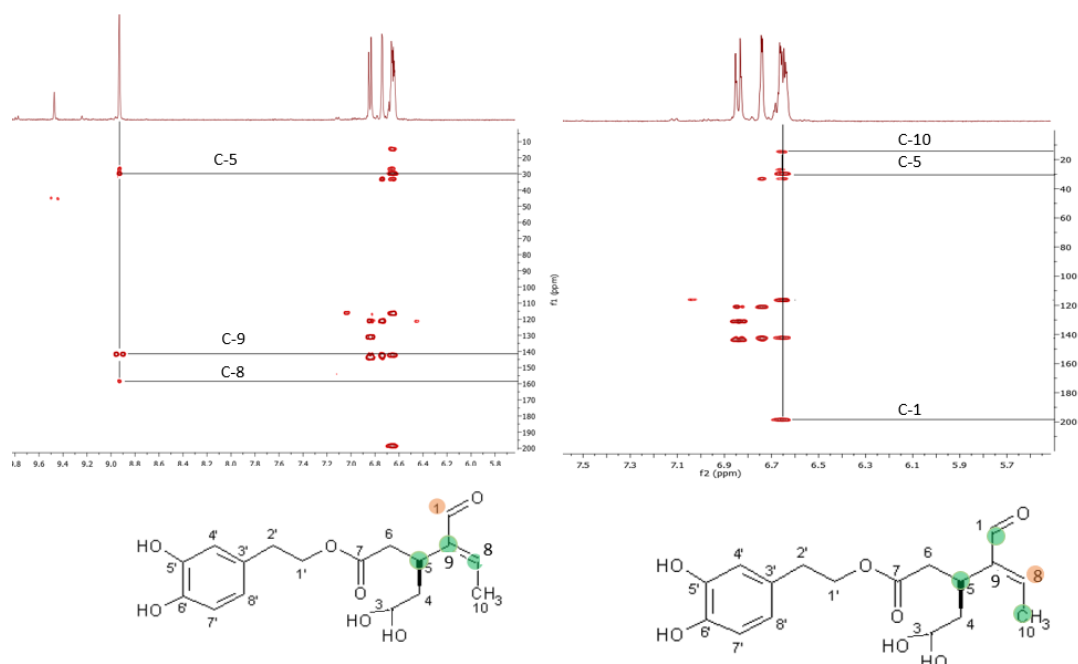
**Εικόνα 5.11:** Συσχετίσεις των πρωτονίων H-1, H-8, H-4', H-7', H-8' με τους αντίστοιχους άνθρακες στο φάσμα ΗΜQC.

Από το φάσμα COSY παρατηρήθηκε ότι το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1 εμφανίζει δύο μακρινές συσχετίσεις με το πρωτόνιο H-5 και με το ολεφινικό πρωτόνιο της θέσης 9 (H-9). Το πρωτόνιο H-5, εμφανίζεται στο φάσμα πρωτονίου, ως μια πολλαπλή κορυφή στα 3.13 ppm, λόγω των πολλαπλών συσχετίσεων.



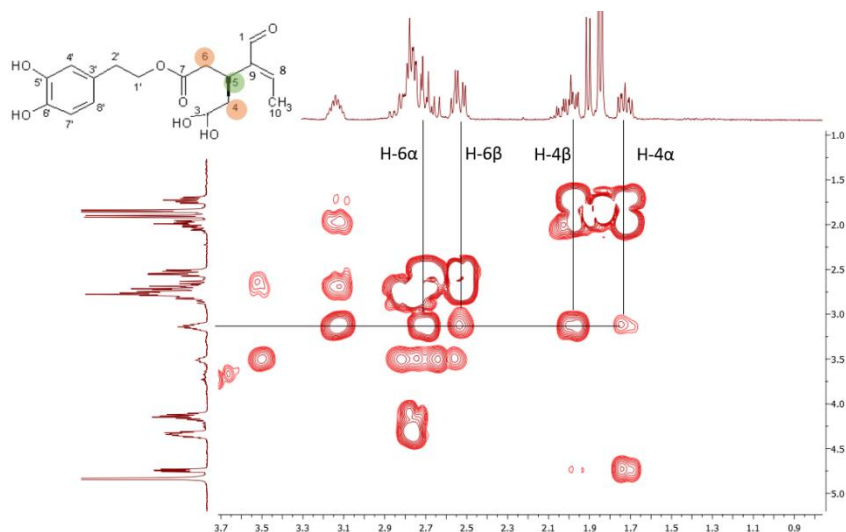
**Εικόνα 5.12:** Συσχετίσεις το αλδεϋδικού πρωτονίου της ελαιαινοδιόλης στο φάσμα COSY και του H-5 με τον C-5 στο HMQC.

Το σύστημα με την αλδεϋδη τον διπλό δεσμό, το μεθύλιο και το πρωτόνιο H-5, μπορούμε να το εξακριβώσουμε, αν δούμε τις συσχετίσεις που εμφανίζουν το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1 και το ολεφινικό πρωτόνιο H-8. Έτσι το H-8, είναι ένα πρωτόνιο που βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό (η χημική μετατόπιση του C-8 είναι 158.00 ppm), και εμφανίζει συσχέτιση τόσο με τους C-1 και C-10, όσο και με τον C-5 (χημική μετατόπιση 29.70ppm). Από το ίδιο φάσμα, παρατηρήθηκε ότι το αλδεϋδικό πρωτόνιο, εμφανίζει συσχέτιση με τους C-5 και C-8 όσο και με τον άνθρακα C-9, ο οποίος βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό (χημική μετατόπιση 141.00 ppm) και δεν συσχετίζεται άμεσα με κάποιο πρωτόνιο.



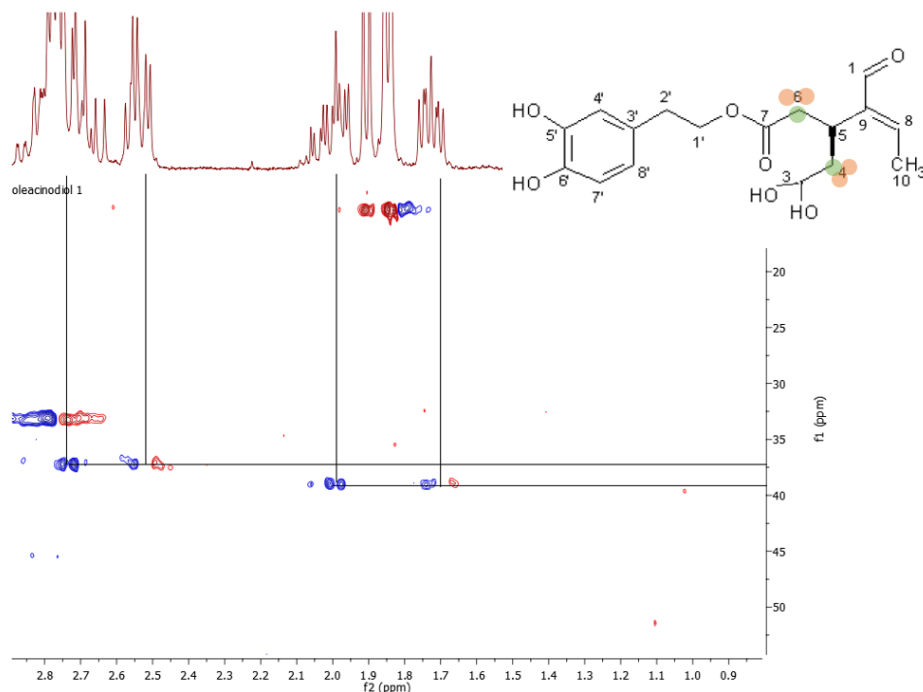
**Εικόνα 5.13:** Συσχετίσεις των H-1 και H-8 με τους γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα HMBC.

Το H-5, εμφανίζεται στο φάσμα πρωτονίου, ως μια πολλαπλή κορυφή, λόγω των πολλών συσχετίσεων που έχει με γειτονικά πρωτόνια. Από το φάσμα COSY θα δούμε ότι εκτός από την μακρινή συσχέτιση με το αλδεϊδικό πρωτόνιο, το H-5 εμφανίζει πολλαπλές συσχετίσεις με τα πρωτόνια των θέσεων 4 και 6.



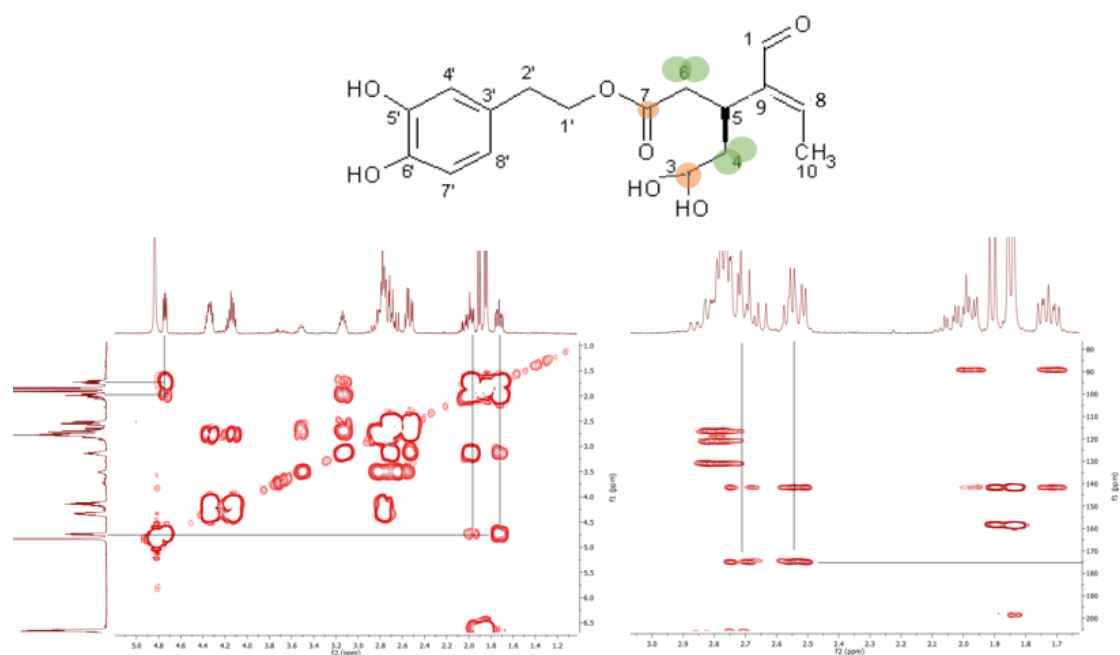
**Εικόνα 5.14:** Συσχετίσεις του H-5 της ελαιασινοδιόλης στο φάσμα COSY.

Για να διαχωριστούν τα H-4 από τα H-6 πρέπει να εστιάσουμε στις δικές τους συσχετίσεις στα φάσματα COSY και HMBC. Με το φάσμα HMQC μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι τα σήματα στα 1.72 και 1.98 ppm αντιστοιχούν σε πρωτόνια που βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα (C-4 με χημική μετατόπιση 39.02 ppm) και τα σήματα στα 2.52 και 2.69 ppm αντιστοιχούν σε πρωτόνια που βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα (C-6 με χημική μετατόπιση 37.20 ppm).



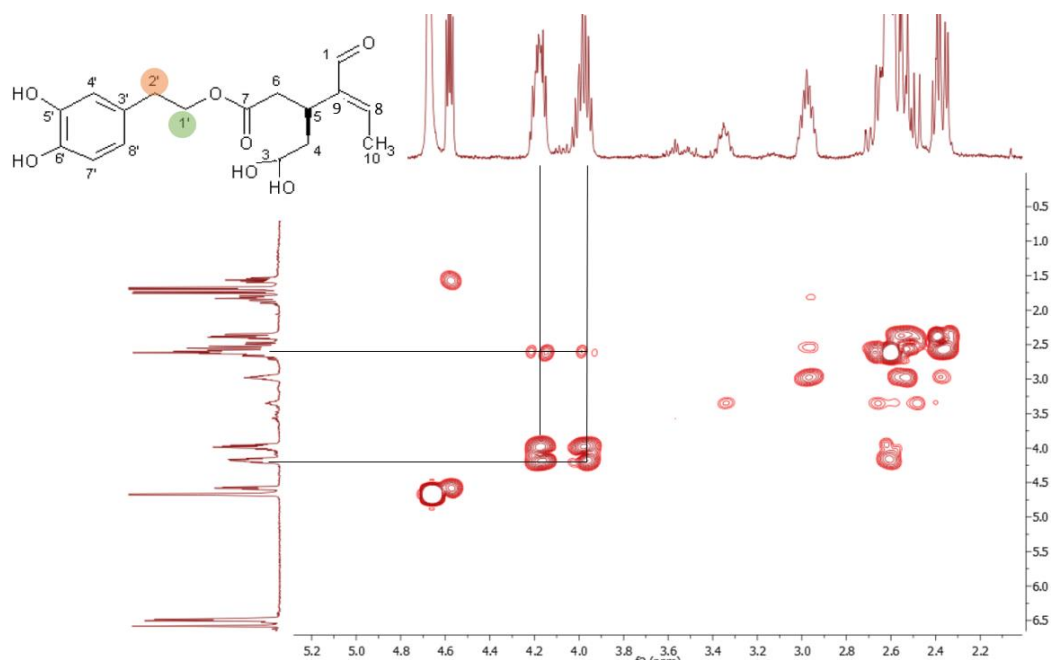
**Εικόνα 5.15:** Συσχετίσεις των H-4a, H-4b, H-6a και H-6b με τους C-4 και C-6 στο φάσμα HMQC.

Ο διαχωρισμός των σημάτων των θέσεων 4 και 6, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του φάσματος COSY και HMBC. Από το φάσμα COSY παρατηρήσαμε ότι τα σήματα στα 1.72 και 1.98 ppm (H-4α και H-4β) εμφανίζουν συσχέτιση με ένα αρκετά αποθωρακισμένο πρωτόνιο στα 4.74 ppm το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζεται ως dd κορυφή με σκάση 7.7 Hz και 4.2 Hz λόγω της συσχέτισής του με τα δύο πρωτόνια του ίδιου άνθρακα (C-4). Αντίθετα τα σήματα στα 2.52 και 2.69 ppm δεν εμφανίζουν κάποια συσχέτιση στο φάσμα COSY (πέραν αυτής με το C-5) αλλά όπως μπορούμε να δούμε από το φάσμα HMBC, εμφανίζει συσχέτιση με τον άνθρακα της καρβονυλομάδας της θέσης 7 (C-7 με χημική μετατόπιση 175.06 ppm).



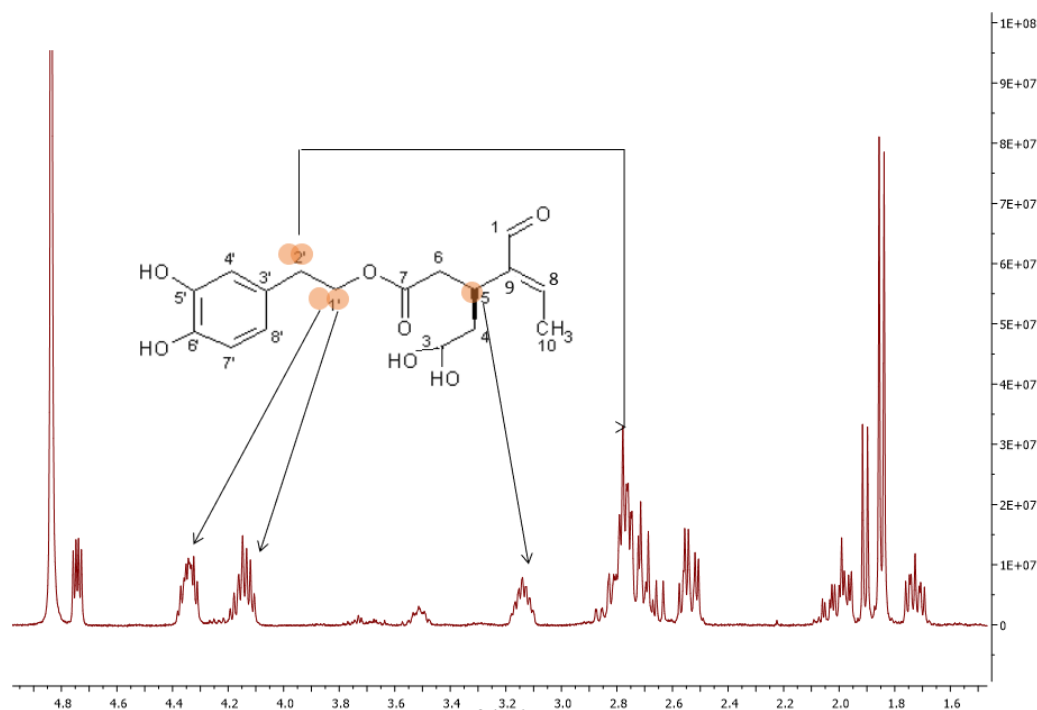
**Εικόνα 5.16:** Συσχετίσεις των H-4α, H-4β με τον C-3 και των H-6α και H-6β με τον C-7 στο φάσμα HMBC.

Για το σύστημα των πρωτονίων H-1' και H-2' από το φάσμα COSY παρατηρήσαμε ότι τα πρωτόνια της θέσης H-1' εμφανίζονται σαν ξεχωριστά πρωτόνια, εμφανώς αποθωρακισμένα. Τα πρωτόνια αυτά εμφανίζονται το μεν H-1'α στα 4.33 ppm (Επικαλυπτόμενο) το δε H-1'β στα 4.13 ppm και εμφανίζουν συσχέτιση τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα πρωτόνια H-2' τα οποία εμφανίζονται με την ίδια χημική μετατόπιση στα 2.77 ppm.



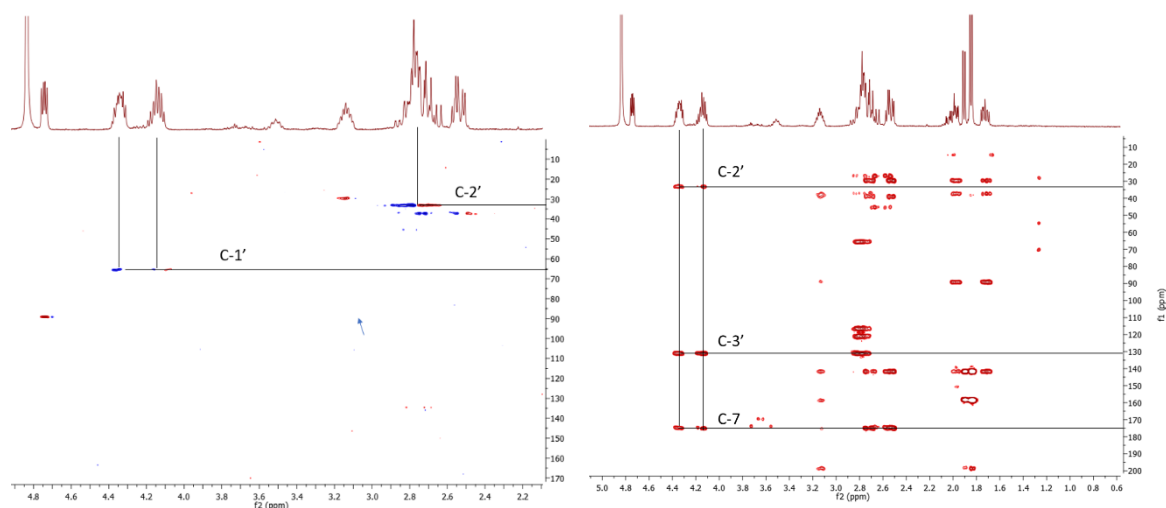
**Εικόνα 5.17:** Συσχετίσεις των H-1a, H-1b με τα H-2a και H-2b από το φάσμα COSY.

Το πρωτόνιο H-1'α εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή, ενώ το H-1'β ως κορυφή dt με σχάσεις 11.1 και 5.6 Hz. Τα πρωτόνια H-2' εμφανίζονται ως μια τριπλή κορυφή με σχάση 5.6 Hz.



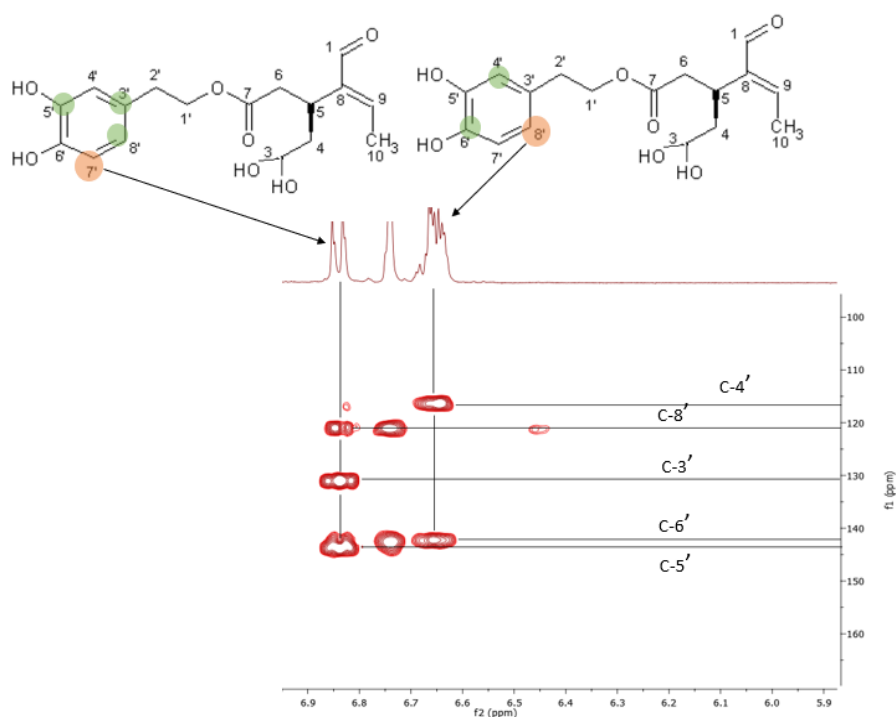
**Εικόνα 5.18:** Τα χαρακτηριστικά σήματα των H-1a', H-1b', H-2a,b' στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .

Από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι οι δύο εξωκυκλικοί άνθρακες των θέσεων 1' και 2' εμφανίζουν χημική μετατόπιση 65.73 ppm και 33.37 ppm. Από το φάσμα HMBC μπορούμε να επιβεβαιώσουμε τις θέσεις και τις συσχετίσεις των παραπάνω πρωτονίων, καθώς επίσης, και την παρουσία του φαινολικού άνθρακα C-3' με χημική μετατόπιση 131.18 ppm.



**Εικόνα 5.19:** Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσης 1' με τον C-1' και της θέσης 2' με τον C-2' από το φάσμα HMQC και οι συσχετίσεις των ίδιων πρωτονίων με γειτονικούς άνθρακες.

Στο κομμάτι του φαινολικού δακτυλίου έχουμε ήδη παρουσιαστεί οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των αντίστοιχων C του φαινολικού δακτυλίου. Στο φάσμα HMBC εμφανίζονται οι συσχετίσεις των πρωτονίων με γειτονικούς άνθρακες οι οποίοι συνδέονται με υδροξυλομάδες. Έτσι το H-7' που εμφανίζεται στα 6.83 ppm συσχετίζεται με τον άνθρακα C-3' στα 131.18 ppm που παρουσιάσαμε παραπάνω, καθώς επίσης και με τον άνθρακα C-8' που έχει ήδη εντοπιστεί προηγουμένως στα 120.92 ppm αλλά και τον άνθρακα C-5' ο οποίος δεν συσχετίζεται με κάποιο πρωτόνιο και εμφανίζει χημική μετατόπιση 143.84 ppm. Αντίστοιχα, το πρωτόνιο H-8' εμφανίζει συσχέτιση με τον C-4' στα 116.26 ppm και το δεύτερο άνθρακα που συσχετίζεται με υδροξυλομάδα, τον C-6' που εμφανίζει χημική μετατόπιση 142.31 ppm.



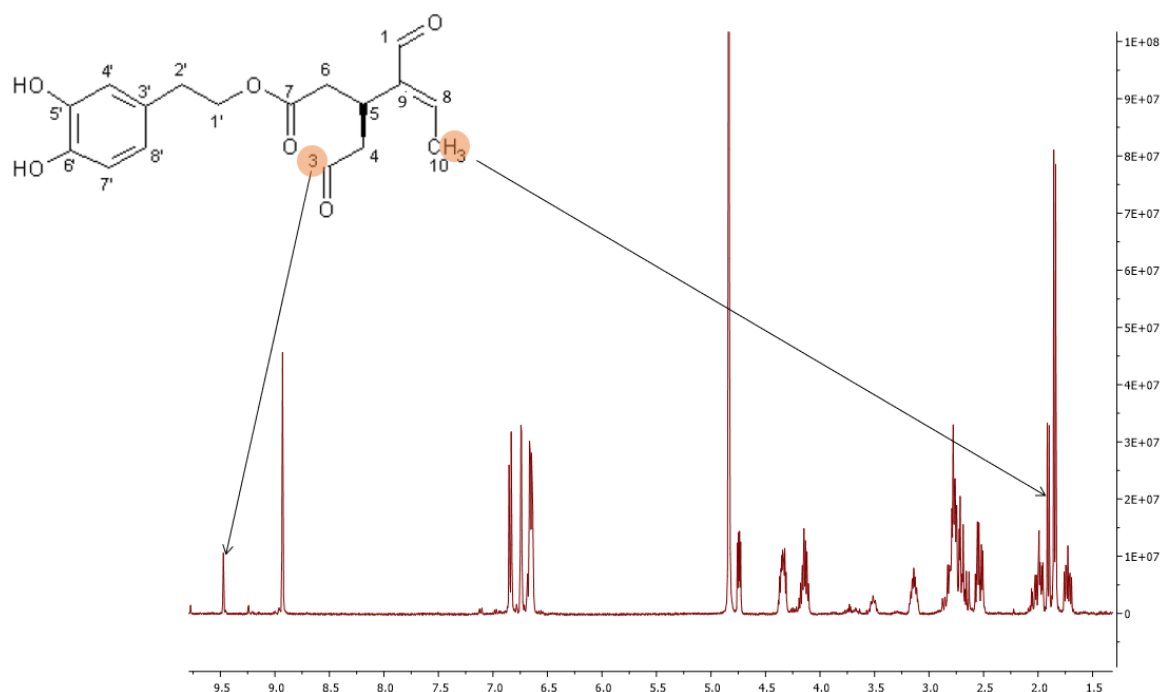
**Εικόνα 5.20:** Οι συσχετίσεις των H-7' και H-8' με γειτονικούς άνθρακες.



## Ελαιασίνη.

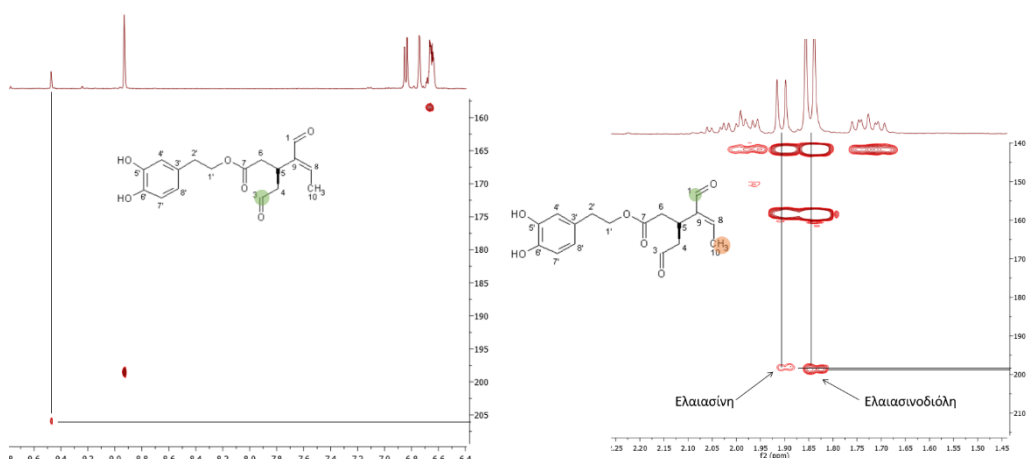
Στην απόδοση της δομής της ελαιασινοδιόλης που παρουσιάστηκε παραπάνω, το πρόβλημα που προέκυψε, ήταν η χαμηλή συγκέντρωση της ενυδατωμένης μορφής της ελαιασίνης στο νερό σε συνδυασμό με τα σήματα της διαλδευδικής της μορφής τα οποία σε πολλές περιπτώσεις συνέπιπταν με εκείνα της ενυδατωμένης. Η απόδοση δομής της διαλδευδικής μορφής στο νερό, ήταν ακόμα πιο δύσκολη, καθώς η συγκέντρωσή της ήταν σημαντικά πιο χαμηλή και σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις κατέστη δυνατό να εντοπιστούν σήματα από τα φάσματα δύο διαστάσεων. Σε κάθε περίπτωση στην ενότητα αυτή, επιβεβαιώθηκαν τα σήματα που αντιστοιχούν στην διαλδευδική μορφή και αποδείχτηκε, ότι σε ένα ποσοστό, η ελαιασίνη δεν ενυδατώνεται, αλλά παραμένει στην αρχική της μορφή.

Το πρώτο σήμα το οποίο οδήγησε στην υπόθεση για ύπαρξη ελαιασίνης σε διαλδευδική μορφή στο νερό, ήταν το σήμα του αλδευδικού πρωτονίου της θέσης 3. Πρόκειται για την αλδεΐδη η οποία μπορεί, σε ένα ποσοστό να αντιδρά με το νερό, και να οδηγεί στην ενυδατωμένη μορφή. Το σήμα αυτό, εμφανίζεται ως μια τριπλή κορυφή με σχάση 1.2 Hz στα 9.47 ppm. Εντοπίστηκε ακόμα και το χαρακτηριστικό σήμα μεθυλίου, που εμφανίζεται ως διπλή κορυφή λόγω της συσχέτισής του με γειτονικό πρωτόνιο με σχάση 7.2 Hz, στα 1.90 ppm.



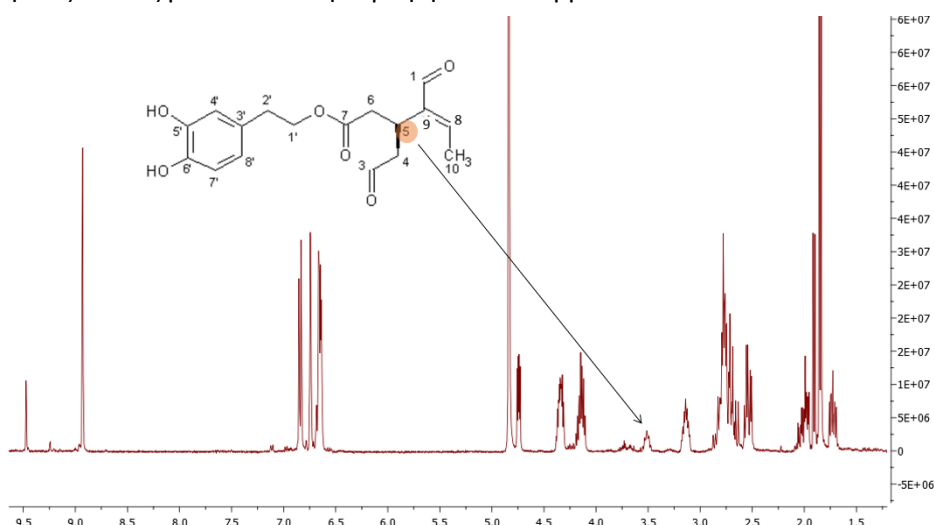
**Εικόνα 5.24:** Τα χαρακτηριστικά σήματα του H-3 και CH<sub>3</sub>-10 της ελαιασίνης στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR.

Από το φάσμα HMQC, παρατηρήθηκε ότι ο άνθρακας που συμμετέχει στην αλδεϋδομάδα C3, εμφανίζει χημική μετατόπιση 205.95 ppm ενώ ο άνθρακας του μεθυλίου στα 14.45 ppm. Η παρουσία της πρώτης αλδεϋδης δεν κατέστη δυνατό να επαληθευθεί από το φάσμα πρωτονίου. Ωστόσο, επειδή τα δύο αυτά συστατικά, εμφανίζουν πολλές ομοιότητες, αναζητήθηκε η ύπαρξη και της δεύτερης καρβονυλομάδας. Στο φάσμα HMBC, παρατηρώντας τις συσχετίσεις των πρωτονίων της μεθυλομάδας, παρατηρήθηκε ότι αυτή, συσχετίζεται με καρβονυλικό άνθρακα στα 198.52, ο οποίος μάλιστα εμφανίζει παρόμοια χημική μετατόπιση με τον αντίστοιχο άνθρακα της ελαιαινοδιόλης. Αυτό εξηγεί γιατί δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστεί ο άνθρακας αυτός στο φάσμα HMQC και να επαληθευθεί η παρουσία της αλδεϋδης της θέσης 1 στην ελαιασίνη. Ο άνθρακας αυτός είναι ο C-1 της ελαιασίνης και ανήκει στην αλδεϋδική ομάδα της θέσης αυτής ενώ το αντίστοιχο πρωτόνιο H-1 εμφανίζει χημική μετατόπιση, ίδια με την χημική μετατόπιση του αντίστοιχου πρωτονίου της ελαιαινοδιόλης, 8.93 ppm.



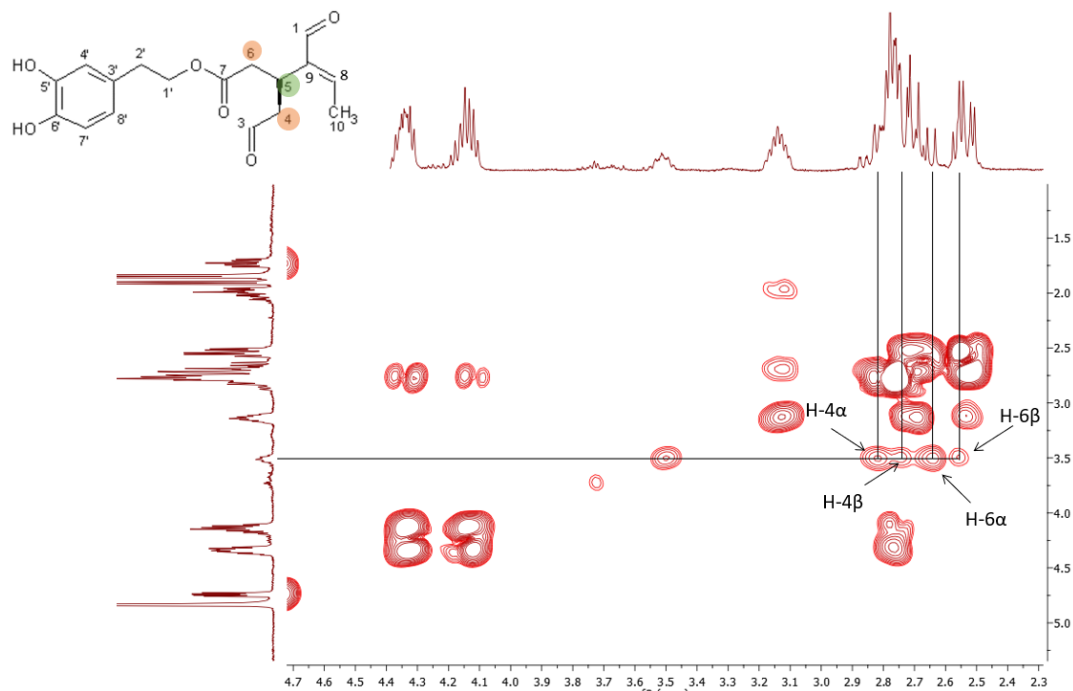
**Εικόνα 5.22:** Σύσχεση του αλδεϋδικού και των μεθυλικών πρωτονίων της ελαιασίνης με τον C-1 και C-10 αντίστοιχα.

Από το φάσμα πρωτονίου ακόμα, εντοπίστηκε και το χαρακτηριστικό πρωτόνιο της θέσης 5. Το H-5 εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή στα 3.51 ppm.



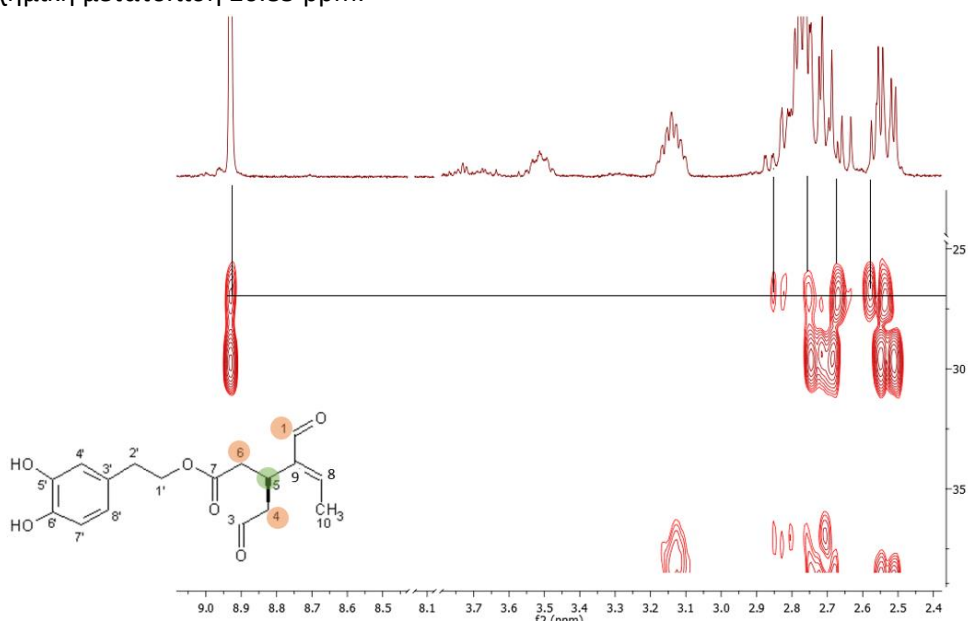
**Εικόνα 5.23:** Το χαρακτηριστικό σήμα του H-5 της ελαιασίνης στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .

Το πρωτόνιο της θέσης 5 θα δούμε ότι εμφανίζει 4 συσχετίσεις στο φάσμα COSY. Αποτελούν δε τις συσχετίσεις με τα 2 πρωτόνια της θέσης 4 σε χημική μετατόπιση 2.84 ppm και 2.74 ppm και τα δύο πρωτόνια της θέσης 6 σε χημική μετατόπιση 2.66 και 2.54 ppm.



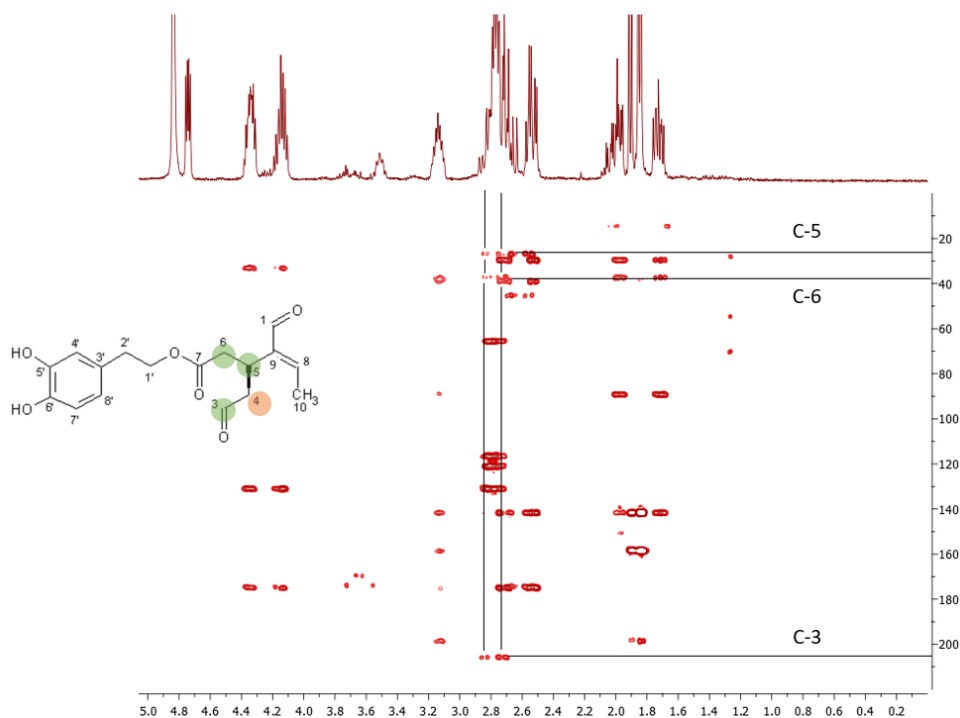
**Εικόνα 5.24:** Οι συσχετίσεις του H-5 της ελαιασίνης στο φάσμα COSY.

Για να διαχωριστούν τα πρωτόνια 4 εκείνα της θέσης 6, έπρεπε να διερευνηθούν οι συσχετίσεις των πρωτονίων αυτών, με γειτονικούς άνθρακες. Έτσι από το φάσμα HMBC, παρατηρήθηκε ότι τόσο τα σήματα στα 2.84 ppm και 2.74 ppm, όσο και τα σήματα στα 2.66 και 2.54 ppm συσχετίζονται με τον άνθρακα στα 26.85 ppm. Ο συγκεκριμένος άνθρακας, εμφανίζει μια ακόμα συσχέτιση, αυτή με το αλδεϊδικό πρωτόνιο της θέσης 1. Επομένως άνθρακας αυτός είναι ο C-5 με χημική μετατόπιση 26.85 ppm.



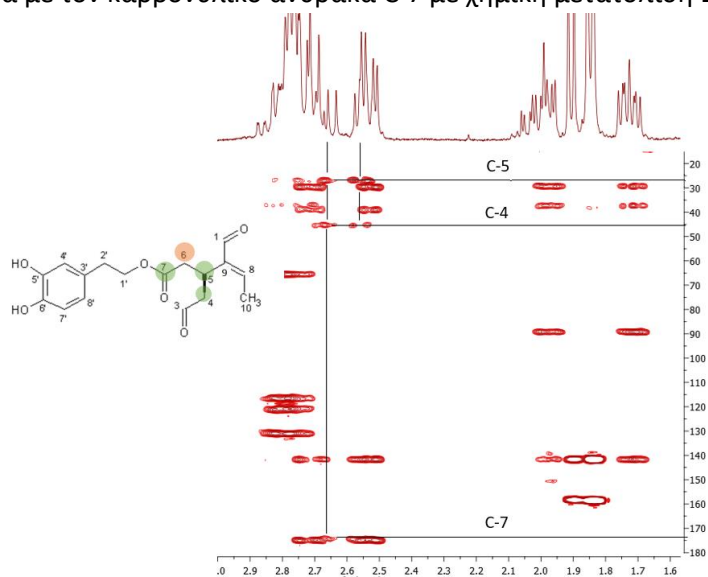
**Εικόνα 5.25:** Οι συσχετίσεις του C-5 με γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC

Τα σήματα στα 2.84 ppm και 2.74 ppm εκτός από την συσχέτιση με τον C-5 εμφανίζουν μια συσχέτιση με έναν άνθρακα στα 37.22 ppm αλλά και έναν άνθρακα στα 205.95 ppm, ο οποίος όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως από το φάσμα ΗΜQC, είναι ο καρβονυλικός άνθρακας της θέσης 3. Από αυτές τις συσχετίσεις εξακριβώθηκε ότι τα σήματα στα 2.84 ppm και 2.74 ppm, ανήκουν στα πρωτόνια Η-4α και Η-4β ενώ τα σήματα στα 2.66 και 2.54 ppm στα Η-6α και Η-6β.



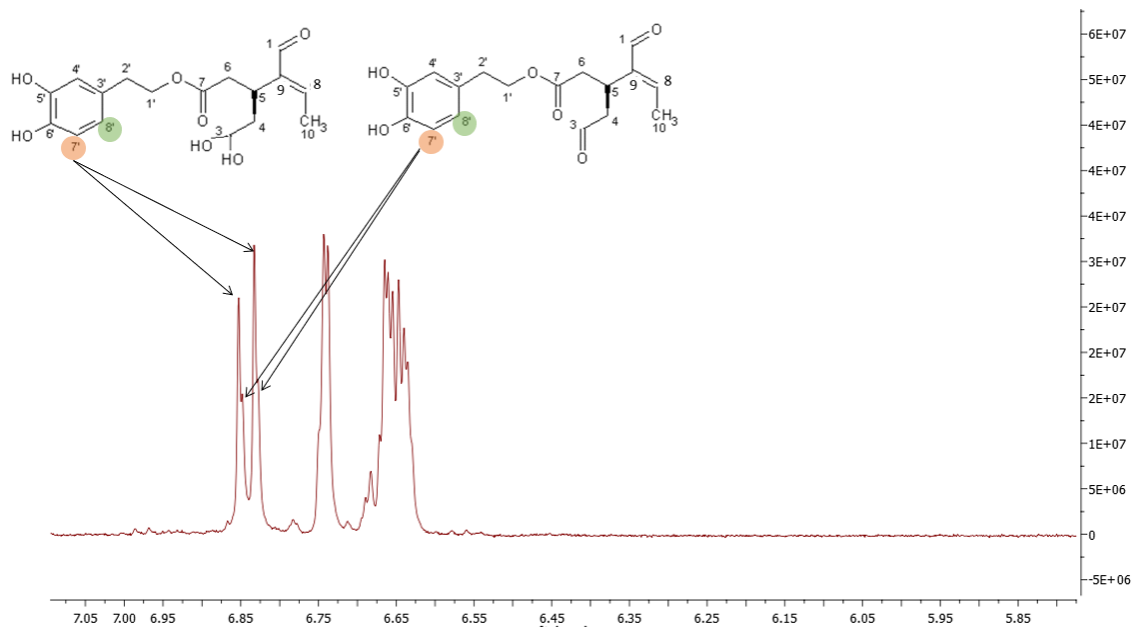
**Εικόνα 5.26:** Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσης 4 με τους γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα ΗΜBC.

Αντίστοιχα τα σήματα στα 2.66 και 2.54 ppm, εκτός από τον άνθρακα C-5, συσχετίζονται και με έναν άνθρακα στα 45.39 ppm ενώ από τα ίδιο φάσμα, μπορούμε να διακρίνουμε και την συσχέτιση του Η-6α με τον καρβονυλικό άνθρακα C-7 με χημική μετατόπιση 174.25.



**Εικόνα 5.27:** Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσης 6 με τους γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα ΗΜBC.

Τέλος τα υπόλοιπα σήματα που αποτελούν την μονάδα της υδροξυτυροσόλης, εμφανίζονται στις ίδιες χημικές μετατοπίσεις με αυτές του μορίου της ελαιασινοδιόλης. Η παρουσία του φαινολικού δακτυλίου, προκύπτει τόσο μέσα από τις ολοκληρώσεις των κορυφών, όσο και από τις πολύ μικρές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις.



**Εικόνα 5.28:** Τα σήματα του πρωτονίου H-7' στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$

Συνοπτικά στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται όλα τα δεδομένα για την ελαιαινοδιόλη και την ελαιασίνη σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

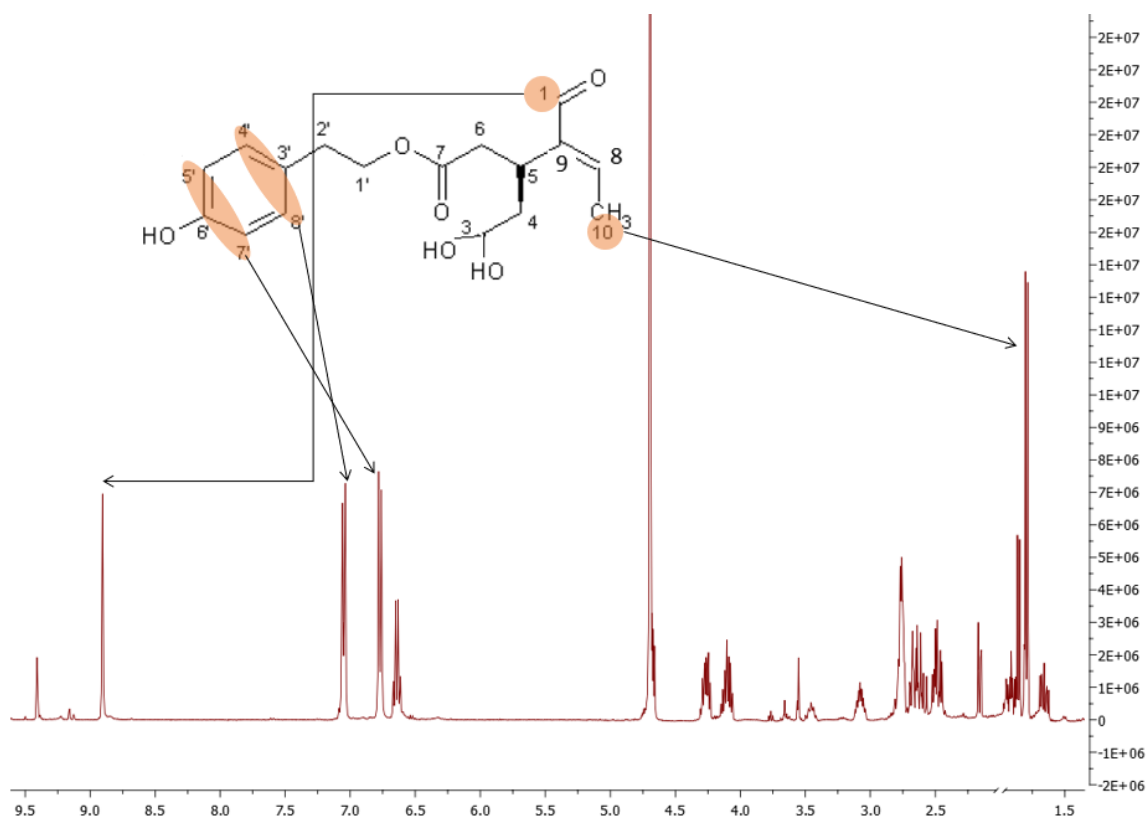
**Πίνακας 5.5:** Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την ελαιαινοδιόλη και την ελαιασίνη σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

	<b>Ελαιαινοδιόλη</b>	<b>Ελαιασίνη</b>
<b>H-1</b>	8.93, d, j=1.68 Hz	8.93, br s
<b>H-3</b>	4.74, dd, J = 7.7, 4.2 Hz	9.47, t, J = 1.2 Hz
<b>H-4a</b>	1.72, ddd, J = 13.9, 7.7, 5.2 Hz	2.84, ddd, J = 17.9, 8.0, 1.3 Hz
<b>H-4b</b>	1.98, ddd, J = 13.9, 9.9, 4.2 Hz	2.74, overlapped
<b>H-5</b>	3.13, ddt, J = 10.9, 9.9, 5.2 Hz	3.51, m
<b>H-6a</b>	2.52, dd, J = 14.6, 5.2 Hz	2.54, dd, J = 14.8, 5.8 Hz
<b>H-6b</b>	2.69, dd, J = 14.6, 10.9 Hz	2.66, dd, J = 14.8, 10.0 Hz
<b>H-8</b>	6.64, q, J = 7.2 Hz	6.64, q, J = 7.2 Hz
<b>H-10</b>	1.84, d, J = 7.2 Hz	1.90, d, J = 7.2 Hz
<b>H-1'α</b>	4.33, m, overlapped	4.35, m, overlapped
<b>H-1'β</b>	4.13, dt, J = 11.1, 5.6 Hz	4.16, dt, J = 11.1, 5.6 Hz
<b>H-2'</b>	2.77, t, J = 5.6 Hz	2.75, t, J = 5.6 Hz
<b>H-4'</b>	6.73, d, J = 2.0 Hz	6.74, d, J = 2.0 Hz
<b>H-5'</b>	-	-
<b>H-6'</b>	-	-
<b>H-7'</b>	6.84, d, J = 8.2 Hz	6.83, d, J = 8.1 Hz
<b>H-8'</b>	6.64, d, J = 8.2, 2.0 Hz	6.64, d, J = 8.2, 2.0 Hz

**Πίνακας 5.6:** Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων για την ελαιαινοδιόλη και την ελαιασίνη σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

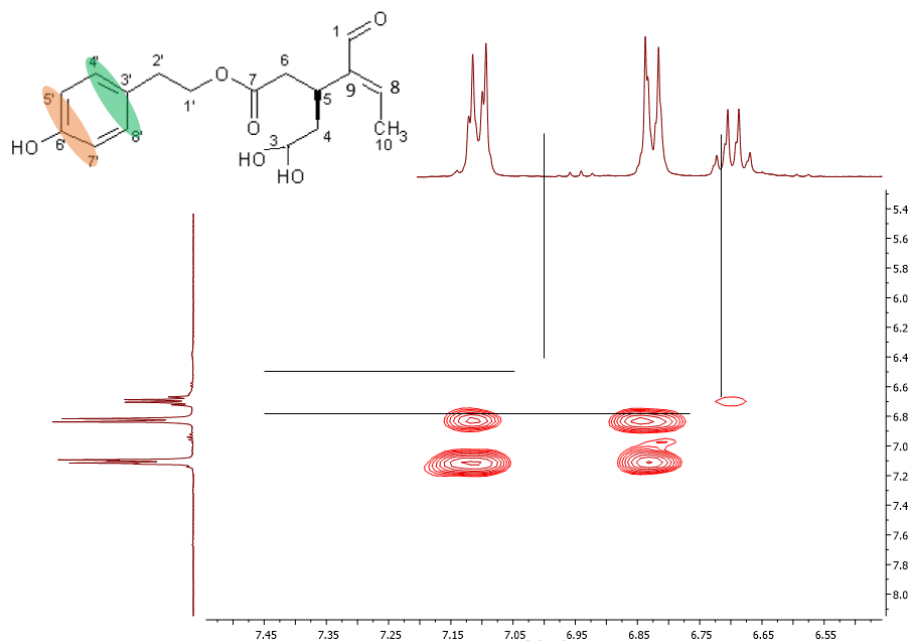
	<b>Ελαιαινοδιόλη</b>	<b>Ελαιασίνη</b>
<b>C-1</b>	198.6	198.52
<b>C-3</b>	89.19	205.95
<b>C-4</b>	39.02	45.39
<b>C-5</b>	29.71	28.56
<b>C-6</b>	37.20	37.22
<b>C-7</b>	175.06	174.25
<b>C-8</b>	158.03	158.03
<b>C-9</b>	141.53	141.01
<b>C-10</b>	14.51	14.52
<b>C-1'</b>	65.73	65.73
<b>C-2'</b>	33.37	33.37
<b>C-4'</b>	116.63	116.63
<b>C-3'</b>	131.18	131.18
<b>C-5'</b>	143.84	143.84
<b>C-6'</b>	142.31	142.31
<b>C-7'</b>	116.26	116.26
<b>C-8'</b>	120.92	120.92

Από το φάσμα πρωτονίου εύκολα αποδόθηκαν τα χαρακτηριστικά σήματα του αλδεϋδικού πρωτονίου H-1 στα 8.96 ppm στην αλδεϋδική περιοχή του φάσματος πρωτονίου. Το σήμα αυτό εμφανίζεται ως μια διευρυμένη κορυφή. Επίσης το χαρακτηριστικό σήμα μεθυλίου στα υψηλά πεδία, που εμφανίζεται ως διπλή κορυφή λόγω της συσχέτισής του με γειτονικό πρωτόνιο, με χημική μετατόπιση 1.86 ppm και σχάση 7.2Hz. Και στην περίπτωση αυτή, η ολοκλήρωση του σήματος του μεθυλίου ως προς το αλδεϋδικό σήμα, δεν ολοκληρώνει για 3 καθώς, όπως θα δούμε στην συνέχεια, στην ίδια χημική μετατόπιση υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις. Ακόμα τα χαρακτηριστικά σήματα ενός πάρα υποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου στην αρωματική περιοχή του φάσματος, όπου βρίσκονται τα πρωτόνια H-4'/H-8' και H-5'/H-7' στα 7.13 ppm και 6.84 ppm αντίστοιχα.



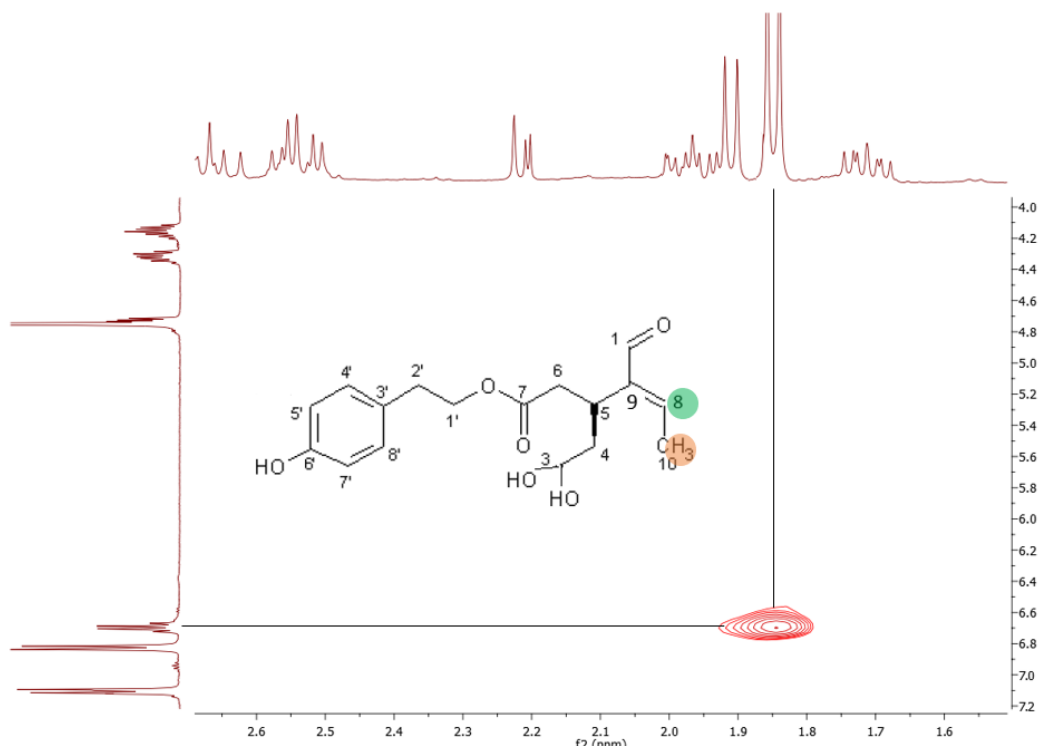
**Εικόνα 5.29:** Τα σήματα των φαινολικών πρωτονίων, τους αλδεϋδικού πρωτονίου και του μεθυλίου της ελαιοκανθαδιόλης στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR.

Το σύστημα του αρωματικού δακτυλίου παρουσιάζεται και στο φάσμα COSY όπου φαίνονται και οι συσχετίσεις των χημικώς ισοδύναμων H-4'/H-8' και H-5' και H-7'.



**Εικόνα 5.30:** Οι συσχετίσεις των φαινολικών πρωτονίων στο φάσμα COSY

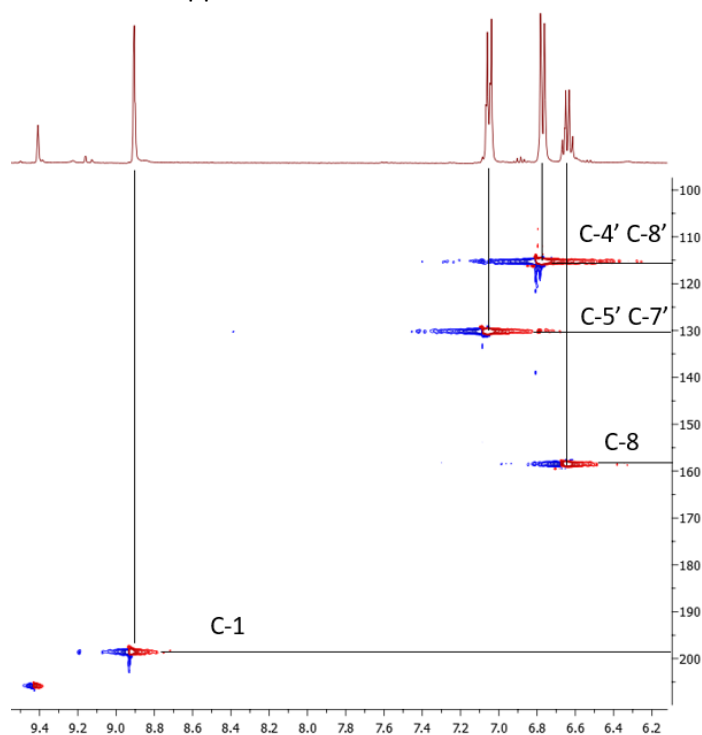
Τα πρωτόνια που ανήκουν στο μεθύλιο της θέσης 10 εμφανίζουν συσχέτιση με το σήμα του πρωτονίου στα 6.71 ppm. Το σήμα αυτό εμφανίζεται ως τετραπλή κορυφή λόγω της αλληλεπίδρασής του με το μεθύλιο, και βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό. Το πρωτόνιο αυτό είναι το H-8 και βρίσκεται στα 6.71 ppm.



**Εικόνα 5.31:** Η συσχέτιση των πρωτονίων του μεθυλίου με το ολεφινικό πρωτόνιο H-8 στο φάσμα COSY.

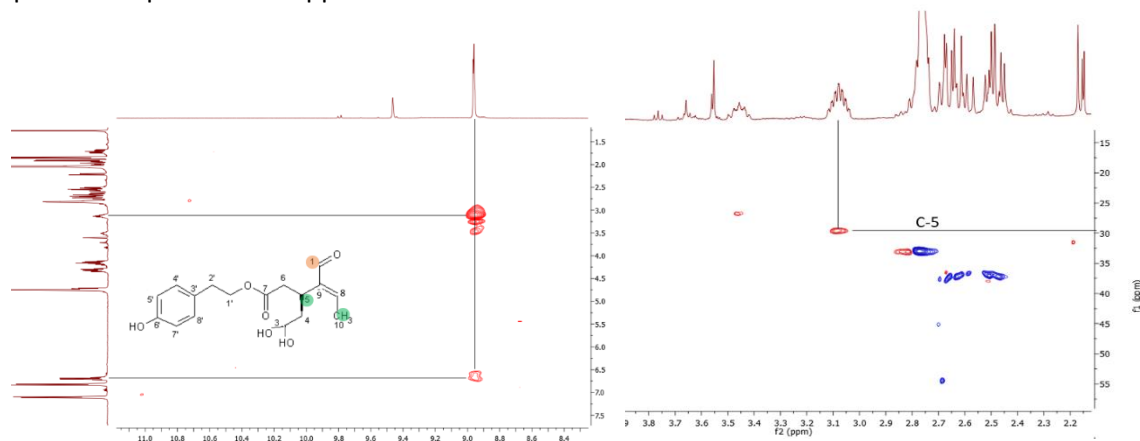


Από τα φάσματα HMBC και HMQC αντλήθηκαν πληροφορίες και για τους άνθρακες που σχετίζονται με τα πρωτόνια που έχουμε ήδη αναφέρει. Έτσι από το φάσμα HMQC παρατηρήθηκε ότι το αλδεϋδικό πρωτόνιο της θέσης 1 σε χημική μετατόπιση 8.96 ppm, εμφανίζει συσχέτιση με τον καρβονυλικό άνθρακα C-1 στα 199.2ppm. Από το ίδιο φάσμα, οι αρωματικοί άνθρακες C-4' και C-8' (χημικώς ισοδύναμοι) και οι C-5' και C-7' (χημικώς ισοδύναμοι), εμφανίζουν χημική μετατόπιση 115.70 και 130.70 ppm



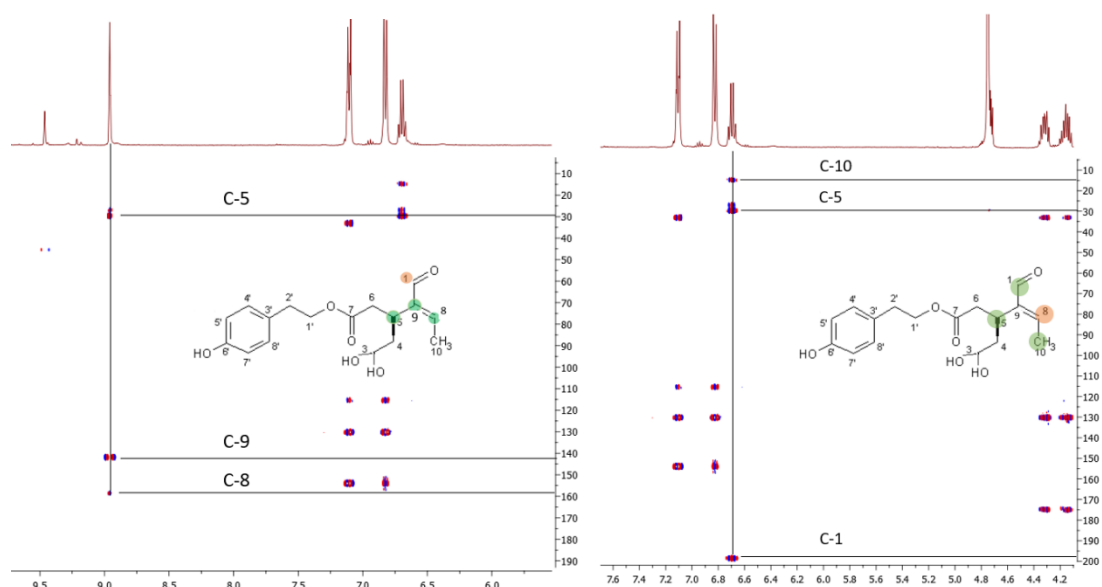
**Εικόνα 5.32:** Οι συσχετίσεις των H-1, H-8, H-4', H-8', H-5', H-7' με τους αντίστοιχους άνθρακες στο φάσμα HMQC.

Το αλδεϋδικό πρωτόνιο της θέσης 1, εμφανίζει και δύο μακρινές συσχετίσεις στο φάσμα COSY με το πρωτόνιο H-5 στα 3.13 και με το ολεφινικό πρωτόνιο της θέσης 9 (H-9). Το H-5, εμφανίζεται στο φάσμα πρωτονίου, ως μια πολλαπλή κορυφή, λόγω των πολλών συσχετίσεων που έχει με γειτονικά πρωτόνια 3.13ppm.



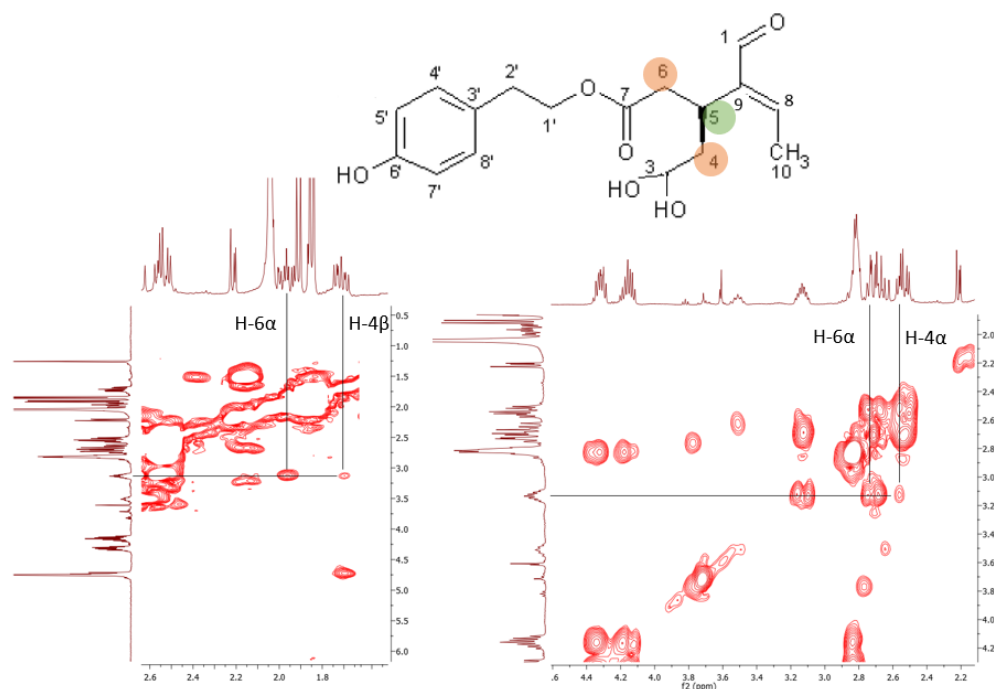
**Εικόνα 5.33:** Οι συσχετίσεις του H-1 στο φάσμα COSY και του H-5 με τον C-5 στο φάσμα HMQC

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω σήματα, εντοπίστηκαν οι συσχετίσεις που εμφανίζουν τα παραπάνω πρωτόνια με γειτονικούς άνθρακες στο φάσμα HMBC. Εκεί παρατηρήθηκε ότι το πρωτόνιο H-8 εμφανίζει συσχέτιση με τον άνθρακα με τόσο με τον C-1 όσο και με τον C-5 (χημική μετατόπιση 29.70 ppm) και τον άνθρακα του μεθυλίου C-10 (χημική μετατόπιση 14.70 ppm). Από το ίδιο φάσμα, θα δούμε ότι το αλδεϊδικό πρωτόνιο, εμφανίζει συσχέτιση με τον C-5 και τον C-8 όσο και με τον άνθρακα C-9, ο οποίος βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό (χημική μετατόπιση 142.40 ppm) και δεν συσχετίζεται άμεσα με κάποιο πρωτόνιο.



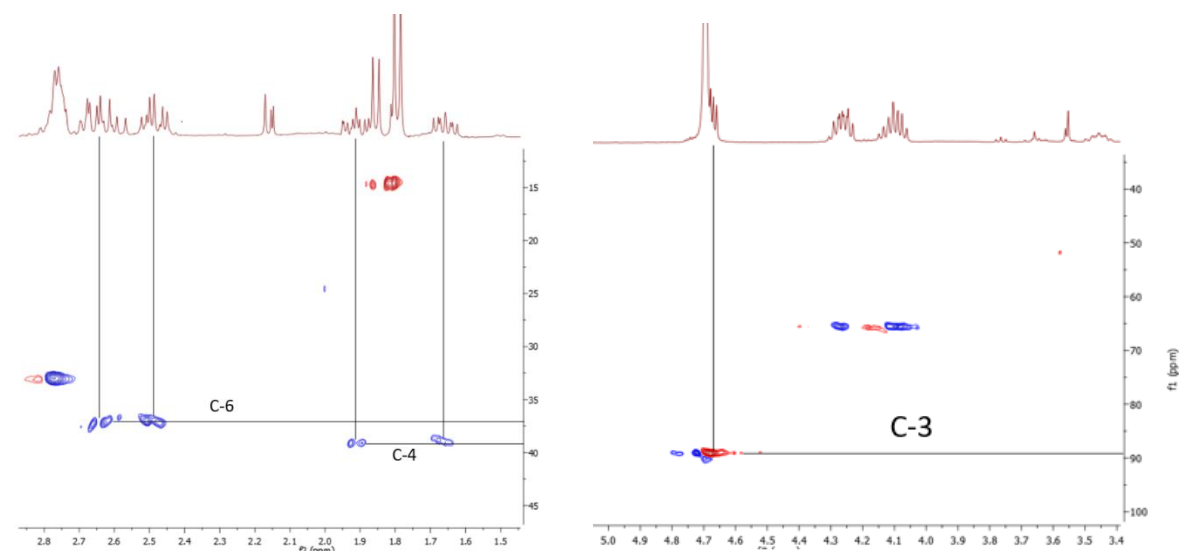
**Εικόνα 5.34:** Οι συσχετίσεις των H-1, και H-8 στο φάσμα HMBC.

Από το φάσμα COSY φάνηκε ότι εκτός από την μακρινή συσχέτιση με το αλδεϊδικό πρωτόνιο, το H-5 εμφανίζει πολλαπλές συσχετίσεις με τα πρωτόνια των θέσεων 4 και 6.



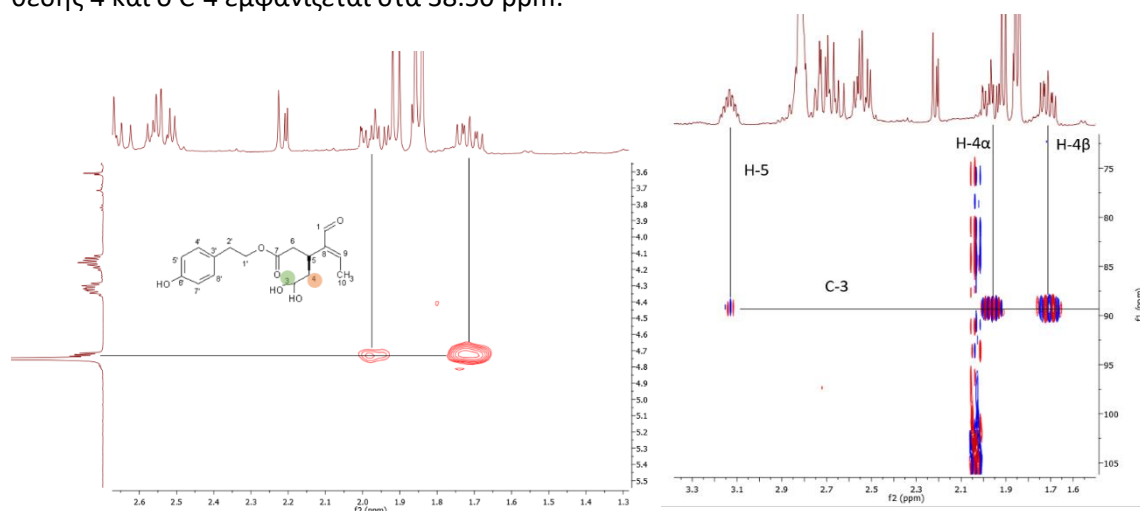
**Εικόνα 5.35:** Οι συσχετίσεις του H-5 στο φάσμα COSY.

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω σήματα αλλά και να διαχωριστούν τα H-4 από τα H-6 εντοπίστηκαν οι δικές τους συσχετίσεις στο φάσμα COSY αλλά και HMQC και HMBC. Αρχικά από το φάσμα HMQC παρατηρήθηκε ότι τα σήματα στα 1.72 και 1.99 ppm αντιστοιχούν σε πρωτόνια που σχετίζονται με τον ίδιο άνθρακα, στα 38.50 ppm, ενώ τα σήματα στα 2.54 και 2.72 ppm αντιστοιχούν σε πρωτόνια που σχετίζονται με τον ίδιο άνθρακα, στα 37.05 ppm.



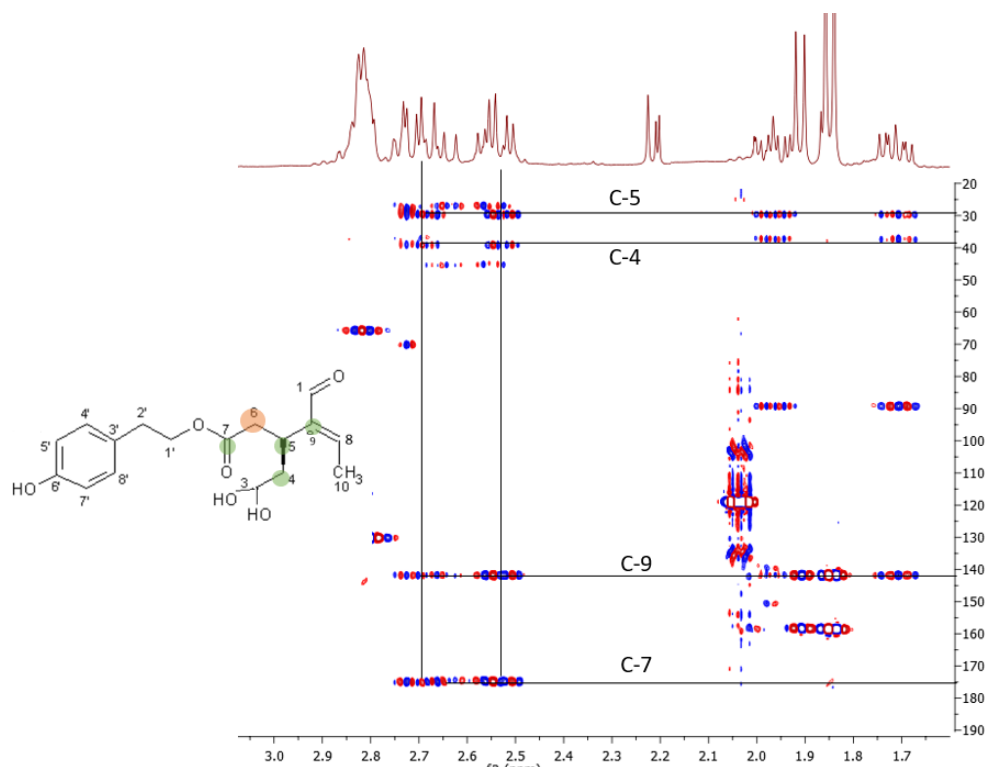
**Εικόνα 5.36:** Οι συσχετίσεις των H-6a, H-6b, H-4a, H-4b και H-3 με τους αντίστοιχους άνθρακες στο φάσμα HMQC.

Όπως στην περίπτωση της ελαιασινοδιόλης, έτσι και εδώ, τα σήματα στα 1.72 και 1.99 ppm, εμφανίζουν συσχέτιση στο φάσμα COSY με ένα πρωτόνιο σε χημική μετατόπιση 4.73 ppm. Το πρωτόνιο αυτό, εμφανίζεται στο φάσμα πρωτονίου ως dd κορυφή και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3. Από το φάσμα HMQC παραπάνω, ο C-3 εμφανίζει χημική μετατόπιση 89.4 ppm. Από το φάσμα HMBC, ο άνθρακας C-3, συσχετίζεται εκτός από το H-5, με τα πρωτόνια των θέσεων 1.72 και 1.99 ppm. Επομένως τα σήματα στα 1.72 και 1.99 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 4 και ο C-4 εμφανίζεται στα 38.50 ppm.



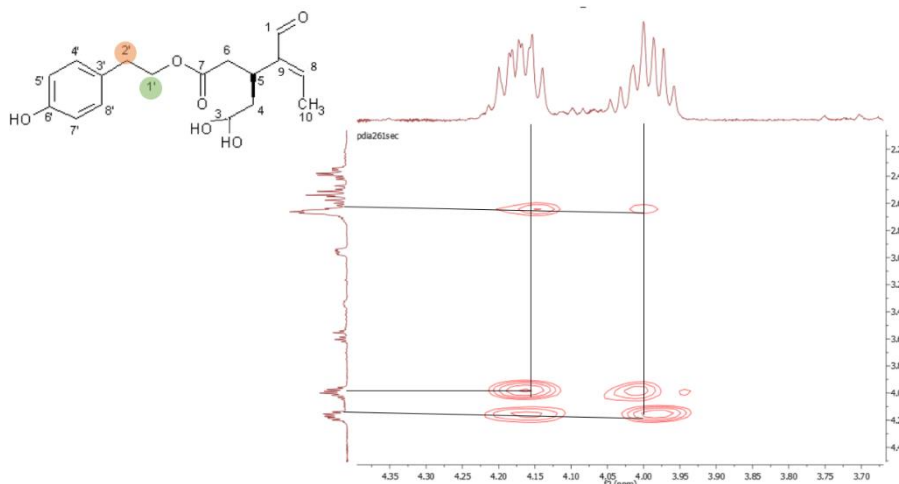
**Εικόνα 5.37:** Οι συσχετίσεις των H-3 με τα γειτονικά του πρωτόνια στο φάσμα COSY τους γειτονικούς του άνθρακες στο φάσμα HMBC.

Από το φάσμα HMBC (εικόνα 5.37) παρατηρήθηκε ότι τα σήματα στα 2.52 και 2.74 ppm εμφανίζουν συσχετίσεις με τον C-5 που είδαμε προηγουμένως, τον C-4, τον C-9, αλλά και έναν άλλον καρβονυλικό άνθρακα, τον C-7, με χημική μετατόπιση 175.70 ppm. Επομένως τα σήματα στα 2.54 και 2.72 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 6, και ο C-6 εμφανίζει χημική μετατόπιση 37.05 ppm.



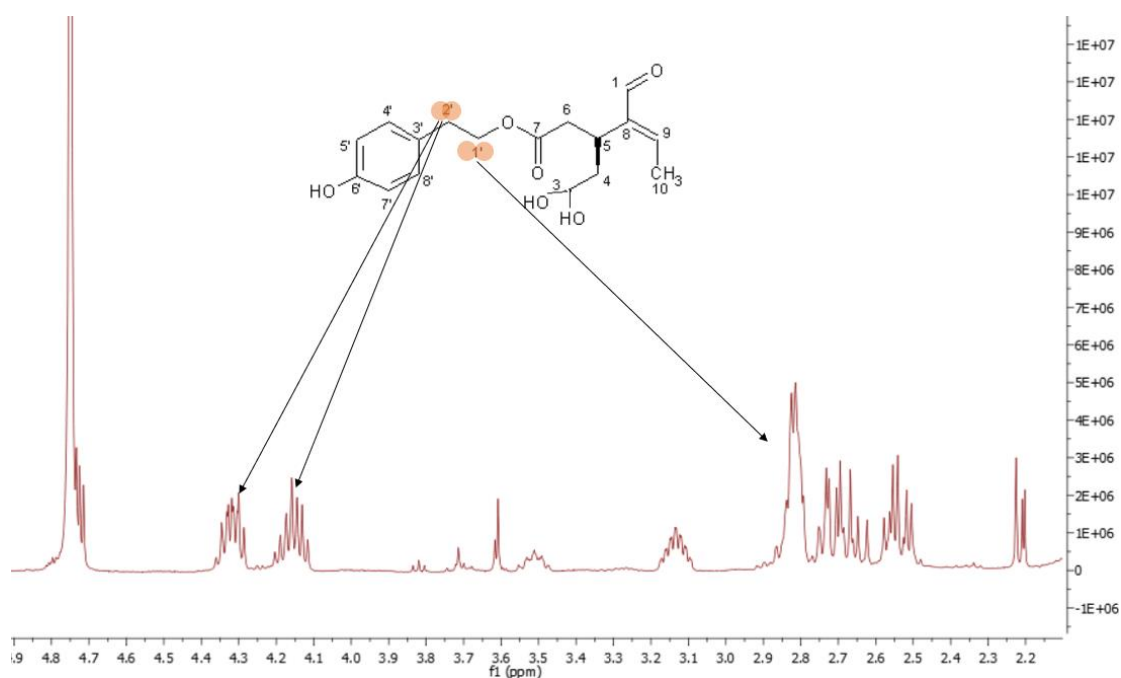
**Εικόνα 5.38:** Οι συσχετίσεις των H-6α και H-6β με τους γειτονικούς τους άνθρακες.

Τέλος για το σύστημα των πρωτονίων H-1' και H-2' από το φάσμα COSY παρατηρήθηκε ότι τα πρωτόνια της θέσης H-1' εμφανίζονται σαν ξεχωριστά πρωτόνια, εμφανώς αποθωρακισμένα. Τα πρωτόνια αυτά εμφανίζονται το μεν H-1'α στα 4.16 ppm το δε H-1'β στα 4.34 ppm και εμφανίζουν συσχέτιση τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα πρωτόνια H-2' τα οποία εμφανίζονται με την ίδια χημική μετατόπιση στα 2.84 ppm.



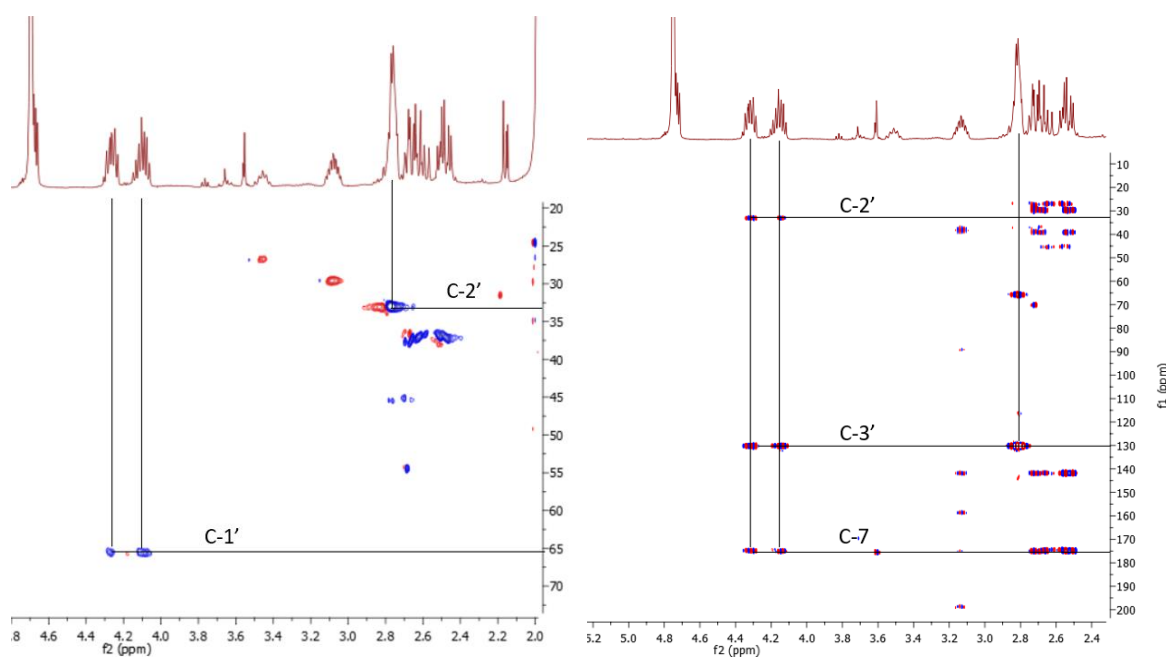
**Εικόνα 5.39:** Οι συσχετίσεις των H-1' με τα H-2' στο φάσμα COSY.

επίσης το πρωτόνιο H-1'α εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή, ενώ το H-1'β ως κορυφή dt με σκάσεις 11.1 και 5.6 Hz. Τα πρωτόνια H-2' εμφανίζονται ως μια τριπλή κορυφή με σκάση 5.4 Hz.



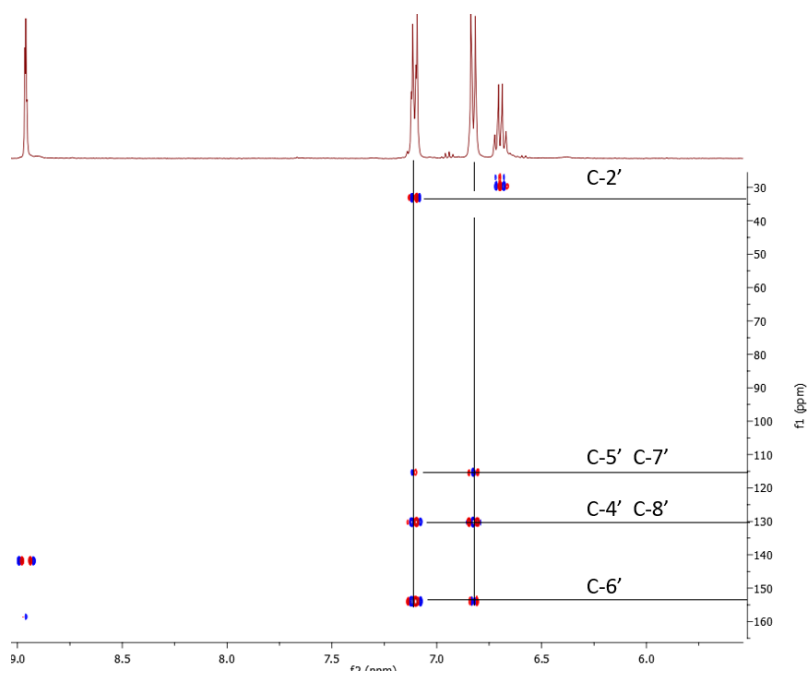
**Εικόνα 5.40:** Τα χαρακτηριστικά σήματα των H-1'α, H-1'β και H-2α', H-2'β στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .

Από το φάσμα HMQC παρατηρήθηκε ότι ο άνθρακας C-1' εμφανίζει χημική μετατόπιση 65.80 ppm, ενώ ο C-2' 33.3 ppm. Από το φάσμα HMBC επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις και οι συσχετίσεις των παραπάνω πρωτονίων, καθώς επίσης, και η παρουσία του φαινολικού άνθρακα C-3' με χημική μετατόπιση 130.60 ppm ο οποίος δεν συσχετίζεται άμεσα με κάποιο πρωτόνιο.



**Εικόνα 5.41:** Οι συσχετίσεις των H-1' με τα H-2' με τους αντίστοιχους άνθρακες καθώς και με τους γειτονικούς τους.

Στο κομμάτι του φαινολικού δακτυλίου έχουν ήδη παρουσιαστεί οι περισσότερες χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των αντίστοιχων C του φαινολικού δακτυλίου. Από το φάσμα HMBC παρατηρήθηκε ότι τα χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια H-4' και H8' στα 7.13 ppm, συσχετίζονται με τους χημικώς ισοδύναμους C-4'/C-8' (χημική μετατόπιση 130.70 ppm), με τους επίσης χημικώς ισοδύναμους άνθρακες με τον C-5'/ C-7' στα 115.7 ppm, με τον εξωκυκλικό άνθρακα C-2' καθώς και με τον τελευταίο άνθρακα των φαινολικού δακτυλίου, τον C-6' με χημική μετατόπιση 33.30 ppm. Αντίστοιχα τα χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια H-5' και H-7' στα 6.84 ppm, συσχετίζονται μόνο με άνθρακες του φαινολικού δακτυλίου.

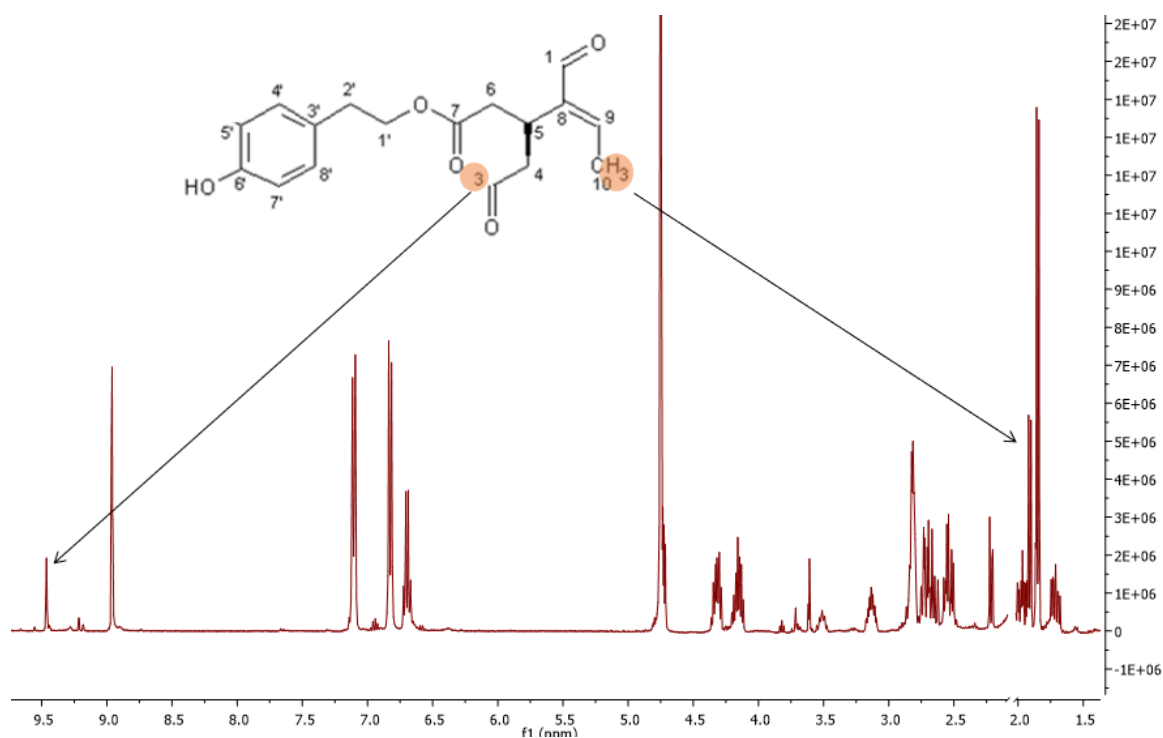


**Εικόνα 5.42:** Οι συσχετίσεις των H-4' και H8' καθώς και των H-5' και H-7' τους γειτονικούς τους άνθρακες.

## Ελαιοκανθάλη.

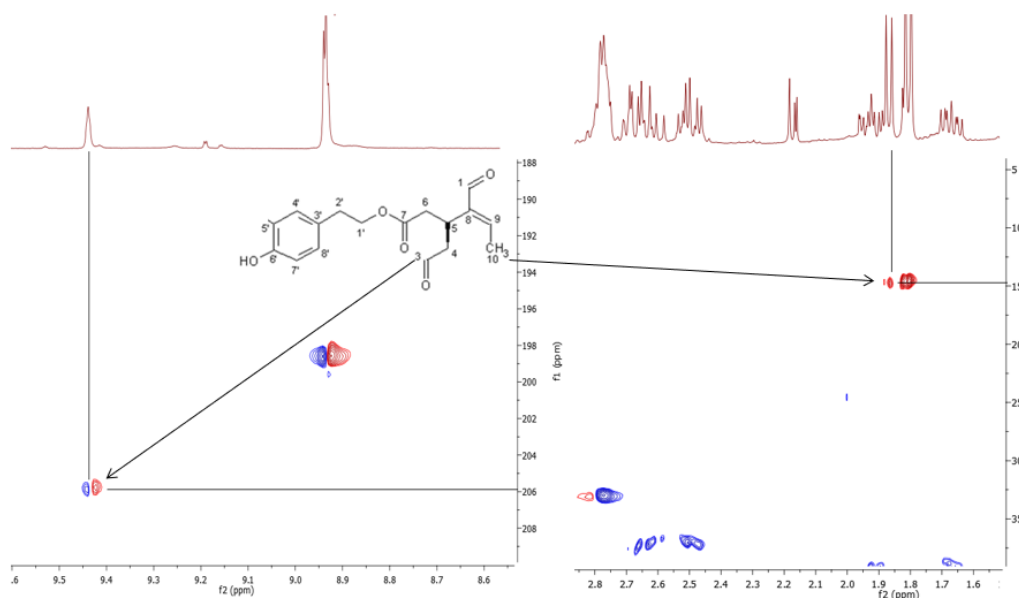
Η διάλυση της ελαιοκανθάλης στο νερό, φάνηκε να είναι πιο δύσκολη από αυτήν της ελαιασίνης. Το αποτέλεσμα της διάλυσης του συστατικού αυτού, είχε ως αποτέλεσμα μικρότερη ποσότητα της ενυδατωμένης μορφής στο νερό σε σχέση με την ελαιασίνη. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι και στην περίπτωση αυτή, ένα ποσοστό της ελαιοκανθάλης εμφανίζεται στο νερό, υπό την διαλδεϊδική μορφή. Ωστόσο, φάνηκε ότι η αναλογία στην περίπτωση αυτή, είναι ελαφρώς διαφορετική καθώς το ποσοστό της διαλδεϊδικής μορφής είναι 42% ως προς την ενυδατωμένη.

Και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρήθηκε το σήμα ενός αλδεϊδικού πρωτονίου, στα 9.48 ppm, το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3. Πρόκειται για την αλδεΐδη η οποία μπορεί, σε ένα ποσοστό να αντιδρά με το νερό, και να οδηγεί στην ενυδατωμένη μορφή. Το σήμα αυτό, εμφανίζεται ως μια τριπλή κορυφή με σχάση 1.2 Hz. Ακόμα εντοπίστηκε το σήμα ενός χαρακτηριστικού μεθυλίου στα 1.93 ppm το οποίο αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 10, και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή, με σχάση 7.2 Hz.



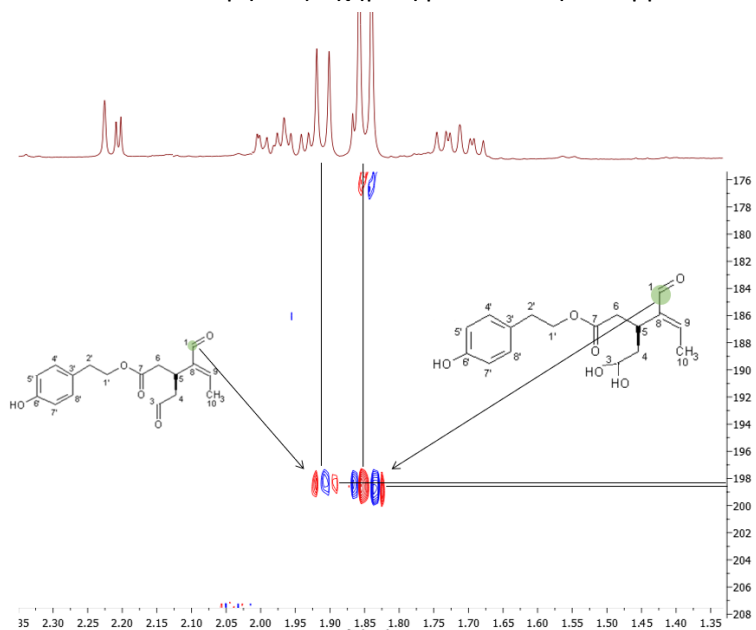
**Εικόνα 5.43:** Τα χαρακτηριστικά σήματα του μεθυλίου και του αλδεϊδικού πρωτονίου της θέσης 3 στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR.

Από το φάσμα HMQC εντοπίστηκαν οι άνθρακες της αλδεΐδομάδας C-3 (χημική μετατόπιση 205.82 ppm) καθώς και του μεθυλίου της ελαιοκανθάλης C-10 (χημική μετατόπιση 14.74 ppm).



**Εικόνα 5.44:** Οι συσχετίσεις του μεθυλίου και του αλδεΐδικού πρωτονίου της θέσης 3 με τους αντίστοιχους άνθρακες.

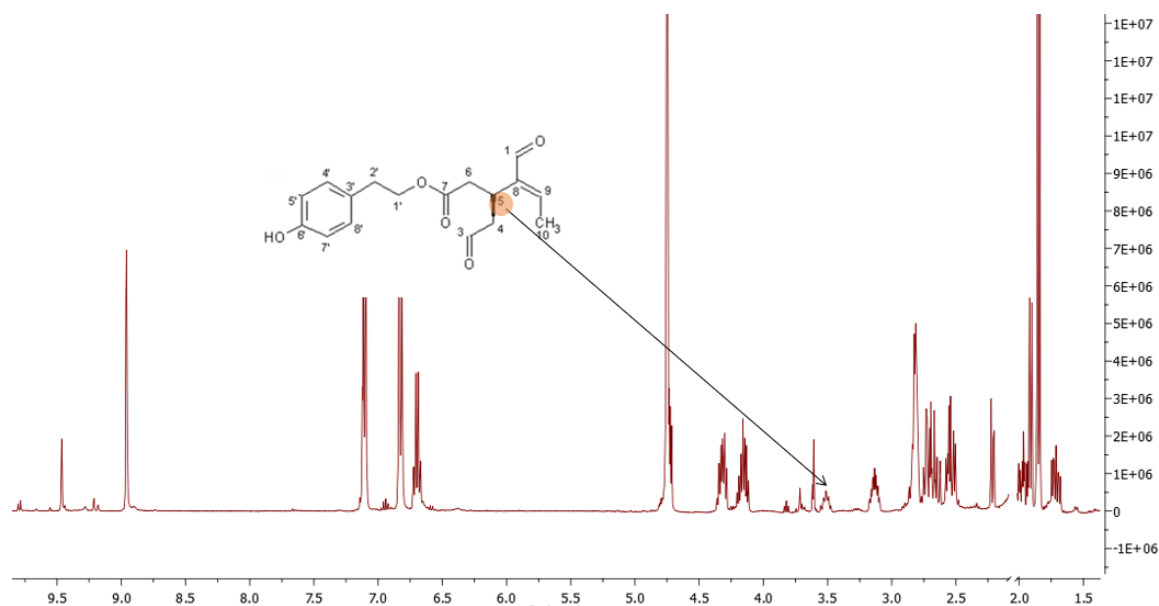
Στο φάσμα HMBC, παρατηρήθηκε ότι τα πρωτόνια της μεθυλομάδας της θέσης 10 συσχετίζονται με έναν καρβονυλικό άνθρακα ο οποίος έχει πολύ μικρή διαφορά στην χημική μετατόπιση από τον αντίστοιχο καρβονυλικό άνθρακα της ελαιοκανθαδιόλης. Ο άνθρακας αυτός είναι ο καρβονυλικός άνθρακας C-1 με χημική μετατόπιση 198.51 ppm. Η πολύ μικρή διαφορά στην χημική μετατόπιση των C-1 της ελαιοκανθάλης και της ελαιοκανθαδιόλης, φανερώνει ότι στο φάσμα πρωτονίου, και στο φάσμα HMQC, υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των σημάτων του αλδεΐδικού πρωτονίου H-1 που εμφανίζει χημική μετατόπιση 8.96 ppm.



**Εικόνα 5.45:** Οι συσχετίσεις του μεθυλίου και τον καρβονυλικό άνθρακα για την ελαιοκανθάλη και την ελαιοκανθαδιόλη

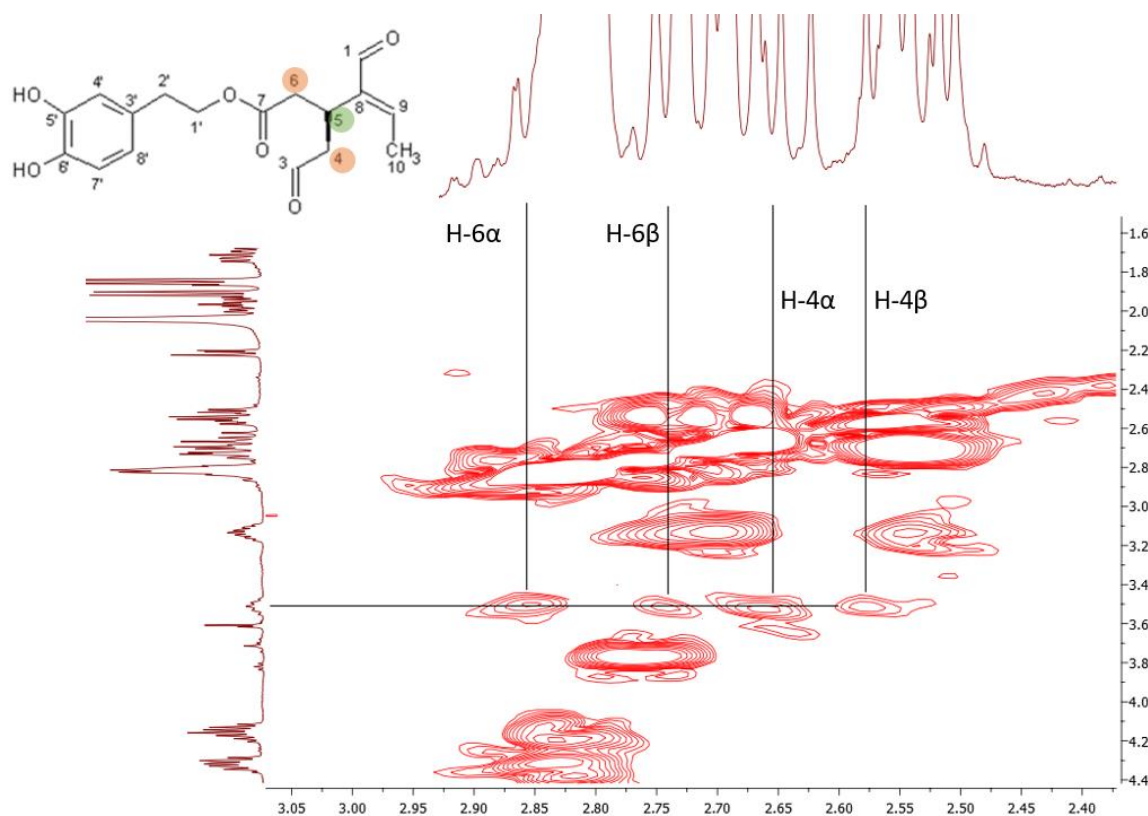


Επίσης από το φάσμα πρωτονίου, εντοπίστηκε και το χαρακτηριστικό πρωτόνιο της θέσης 5. Το H-5 εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή στα 3.52 ppm.



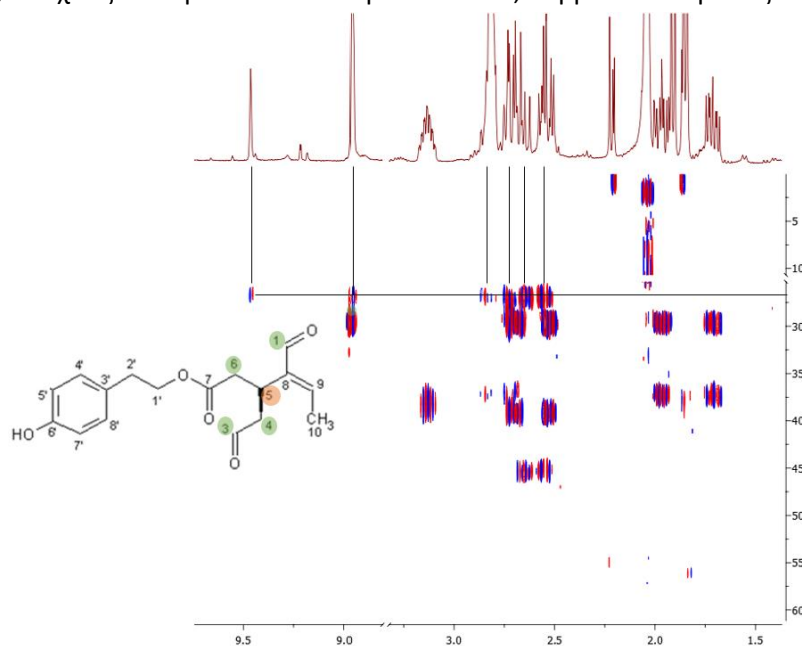
**Εικόνα 5.46:** Το χαρακτηριστικά σήμα του H-5 το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .

Το πρωτόνιο της θέσης 5 εμφανίζει 4 συσχετίσεις στο φάσμα COSY. Αποτελούν δε τις συσχετίσεις με τα 2 πρωτόνια της θέσης 4 σε χημική μετατόπιση 2.80 και 2.88 ppm και με τα δύο πρωτόνια της θέσης 6 σε χημική μετατόπιση 2.58 ppm και 2.68.



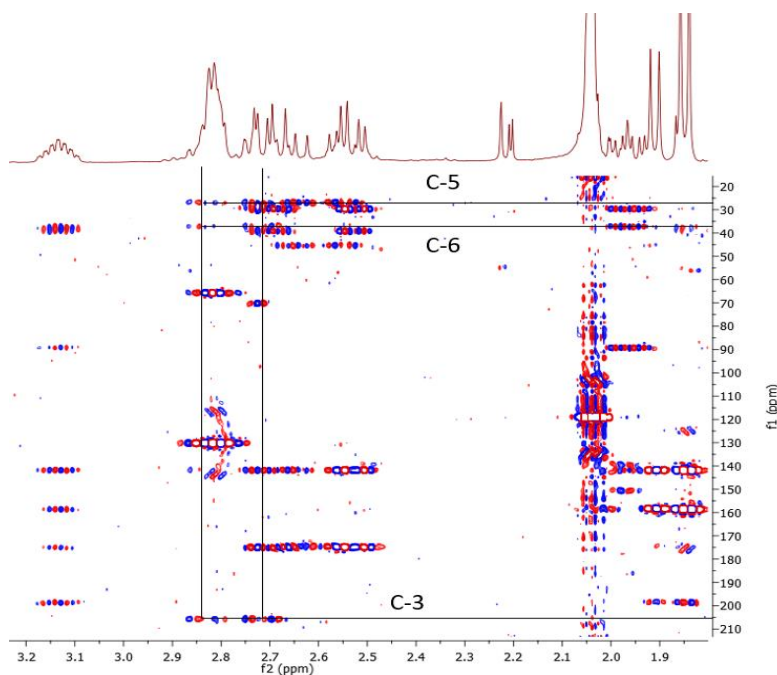
**Εικόνα 5.47:** Οι συσχετίσεις του H-5 στο φάσμα COSY.

Από το φάσμα HMBC, φάνηκε ότι τόσο τα 4 αυτά σήματα, όσο και τα σήματα των αλδεϋδικών πρωτονίων, συσχετίζονται με τον ίδιο άνθρακα στα 26,52 ppm. Ο άνθρακας αυτός είναι ο C-5.



**Εικόνα 5.50:** Οι συσχετίσεις του C-5 στο φάσμα HMBC.

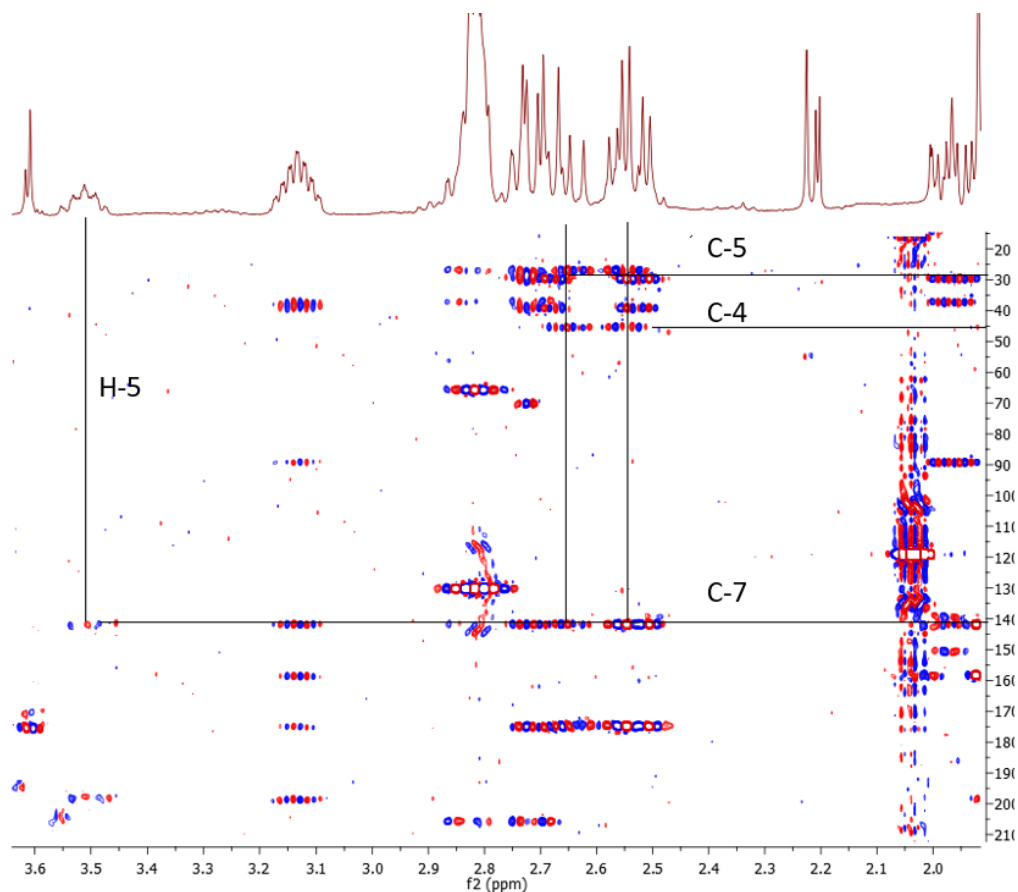
Τα σήματα στα 2.80 και 2.88 ppm εκτός από την συσχέτιση με τον C-5 εμφανίζουν μια συσχέτιση με έναν άνθρακα στα 37.67 ppm αλλά και έναν καρβονυλικό άνθρακα στα 205.82 ppm, ο οποίος όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως από το φάσμα HMQC, είναι ο καρβονυλικός άνθρακας της θέσης 3. Οι συσχετίσεις αυτές λόγω κάποιων αλληλοεπικαλύψεων, ήταν πιο ξεκάθαρες για το σήμα στα 2.88 ppm. Από αυτές εξακριβώθηκε ότι τα σήματα στα 2.80 ppm και 2.88 ppm, ανήκουν στα πρωτόνια H-4α και H-4β ενώ τα σήματα στα 2.58 ppm και 2.68 στα H-6α και H-6β



**Εικόνα 5.49:**

Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσεις 4, με τους γειτονικούς τους άνθρακες στο φάσμα HMBC.

Αντίστοιχα τα σήματα στα 2.58 ppm και 2.68 συσχετίζονται, εκτός από τον άνθρακα C-5, και με έναν άνθρακα στα 45.52 ppm. Ο συγκεκριμένος άνθρακας, είναι ο C-4, ενώ αντίστοιχα με την περίπτωση της ελαιασίνης, το σήμα του C-7 αλληλεπικαλύπτεται με το αντίστοιχο σήμα της ελαιοκανθαδιόλης. Η ύπαρξή του επιβεβαιώθηκε από την συσχέτισή του με τον άνθρακα C-5 στο φάσμα HMBC αποδεικνύοντας ότι εμφανίζει την ίδια χημική μετατόπιση με αυτή της ελαιοκανθαδιόλης στα 175.70 ppm.



**Εικόνα 5.50:** Οι συσχετίσεις των πρωτονίων της θέσεις 5 και 6, με τους γειτονικούς τους άνθρακες στο φάσμα HMBC.

Τέλος τα σήματα του φαινολικού δακτυλίου, συμπίπτουν με αυτά της ελαιοκανθαδιόλης με πολύ μικρές διαφορές στην χημική μετατόπισή. Και για τον λόγο αυτό στα επόμενα παρουσιάζονται μόνο οι τιμές της χημικής μετατόπισης πρωτονίων και ανθράκων.

Στους επόμενους πίνακες παρουσιάζονται συνοπτικά όλα τα δεδομένα για την ελαιοκανθαδιόλη και την ελαιοκανθάλη σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

**Πίνακας 5.7:** Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την ελαιοκανθαδιόλη και την ελαιοκανθάλη σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

	<b>Ελαιοκανθαδιόλη</b>	<b>Ελαιοκανθάλη</b>
<b>H-1</b>	8.96, d, J = 1.6 Hz	8.96, d, J = 1.6 Hz
<b>H-3</b>	4.73, dd, J = 7.7, 4.2 Hz	9.48, t, J = 1.2 Hz
<b>H-4a</b>	1.72, ddd, J = 13.5, 7.7, 5.2 Hz	2.88, ddd, J = 14.5, 8.6, 1.3 Hz
<b>H-4b</b>	1.99, ddd, J = 13.5, 9.9, 4.2 Hz	2.80, overlapped
<b>H-5</b>	3.13, ddt, J = 10.9, 9.9, 5.3 Hz	3.52, m
<b>H-6a</b>	2.54, dd, J = 14.7, 5.9 Hz	2.58, dd, J = 14.8, 5.8 Hz
<b>H-6b</b>	2.72, dd, J = 14.6, 10.9 Hz	2.68, dd, J = 14.8, 9.8 Hz
<b>H-8</b>	6.71, q, J = 7.1 Hz	6.71, q, J = 7.1 Hz
<b>H-10</b>	1.86, d, J = 7.2 Hz	1.93, d, J = 7.2 Hz
<b>H-1'α</b>	4.16, dt, J = 11.1, 5.4 Hz	7.13, d, J = 8.4 Hz
<b>H-1'β</b>	4.34, m, overlapped	
<b>H-2'</b>	2.84, t, J = 5.4 Hz	6.85, d, J = 8.4 Hz
<b>H-4'</b>	7.13, d, J = 8.4 Hz	6.85, d, J = 8.4 Hz
<b>H-5'</b>	6.84, d, J = 8.4 Hz	7.14, d, J = 8.4 Hz
<b>H-6'</b>	-	2.83, t, J = 5.4 Hz
<b>H-7'</b>	6.84, d, J = 8.4 Hz	4.36, m, overlapped 4.19, dt, J = 11.1, 5.4 Hz
<b>H-8'</b>	7.13, d, J = 8.4 Hz	

**Πίνακας 5.8:** Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την ελαιοκανθαδιόλη και την ελαιοκανθάλη σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

	<b>Ελαιοκανθαδιόλη</b>	<b>Ελαιοκανθάλη</b>
<b>C-1</b>	199.2	198.51
<b>C-3</b>	89.4	205.82
<b>C-4</b>	38.5	45.52
<b>C-5</b>	29.7	26.52
<b>C-6</b>	37.5	37.67
<b>C-7</b>	175.7	175.70
<b>C-8</b>	159.2	158.03
<b>C-9</b>	142.4	141.01
<b>C-10</b>	14.7*	14.74
<b>C-1'</b>	65.8	65.8
<b>C-2'</b>	33.3	33.3
<b>C-4'</b>	115.7	115.7
<b>C-3'</b>	130.60	130.60
<b>C-5'</b>	130.7	130.7
<b>C-6'</b>	33.30	33.30
<b>C-7'</b>	130.7	130.7
<b>C-8'</b>	115.7	115.7

## Διαλυτότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο νερό.

Όπως παρατηρήθηκε από την αρχή της πειραματικής διαδικασίας, η διάλυση της ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο νερό, είτε υπό την διαλδευδική, είτε υπό την ενυδατωμένη μορφή, είναι εφικτή, ωστόσο γίνεται σε μικρές συγκεντρώσεις. Η μέγιστη συγκέντρωση των συστατικών αυτών στο νερό, είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος για τον σχεδιασμό εκχυλίσεων του ελαιολάδου με νερό.

Στην παράγραφο αυτή υπολογίζεται η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση της ελαιασίνης και της ελαιοκανθάλης στο νερό. Για τον υπολογισμό αυτόν σε ξεχωριστά φιαλίδια προστέθηκαν 20 mg ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε ξηρή μορφή, και προστέθηκαν 1 mL δευτεριωμένου νερού. Τα μίγματα αναδεύτηκαν σε συσκευή ανάδευσης για 1 h και στην συνέχεια αφέθηκαν σε επαφή για 12 h. Ακολούθως παραλήφθηκαν 1 mL της υδατικής φάσης από το κάθε φιαλίδιο και προστέθηκε σε αυτά ποσότητα DMSO που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

Από την ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών της ελαιασίνης, της ελαιασινοδιόλης, της ελαιοκανθάλης και της ελαιοκανθαδιόλης, προέκυψε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών στην υδατική φάση είναι οι παρακάτω.

**Πίνακας 5.9:** Οι μέγιστες συγκεντρώσεις σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

	Μέγιστη συγκέντρωση (mg/mL)
Ελαιοκανθάλη	1.15
Ελαιοκανθαδιόλη	1.60
Ελαιασίνη	2.25
Ελαιασινοδιόλη	4.06

#### 5.4.4 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών σε ημι-βιομηχανική κλίμακα.

Από τα ανωτέρω πειράματα, προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα σεκοϊριδοειδή του ελαιολάδου ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη, όταν έρχονται σε επαφή με διαλύτη νερό, σε ένα σημαντικό ποσοστό αντιδρούν με αυτό, μέσω ενός μηχανισμού ενυδάτωσης της αλδεϋδης της θέσης 3. Σε ένα μικρότερο ποσοστό οι ενώσεις αυτές παραμένουν υπό την λιπόφιλη διαλδεϋδική τους μορφή σε μια ισορροπία που παραμένει σταθερή μέσα στο υδατικό διάλυμα.

Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί μια καθόλα φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο απομόνωσης των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο. Η διαπίστωση αυτή μας οδήγησε στο να προχωρήσουμε σε πειράματα απομόνωσης φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο, σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Για τον σχεδιασμό των πειραμάτων αυτών, έπρεπε να ληφθούν υπόψιν αποτελέσματα και από άλλα κεφάλαια της παρούσας διατριβής. Η χαμηλή διαλυτότητα των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου σε υδατικά διαλύματα, απαιτεί μεγάλες ποσότητες νερού και συγχρόνως ελαιόλαδο με μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά.

Σε δεύτερο στάδιο, όπως παρουσιάστηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, υπάρχει η δυνατότητα με την κατάλληλη επιλογή ποικιλίας καρπού και συνθηκών ελαιοποίησης, να προκύψει ελαιόλαδο με συγκεκριμένο φαινολικό προφίλ. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε να ελαιοποιηθεί καρπός με συγκεκριμένες προδιαγραφές, ώστε να παραχθεί ελαιόλαδο το οποίο στην συνέχεια, αποτέλεσε το υλικό για την εκχύλιση του φαινολικού συστατικού ελαιοκανθάλη με την μέθοδο που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Για την παραγωγή ελαιολάδου πλούσιο στο φαινολικό συστατικό ελαιοκανθάλη, επιλέχθηκε η ποικιλία Αμφίσσης, από την περιοχή των Ροβιών Ευβοίας. Πρόκειται για μια ποικιλία που εμφανίζει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με την ποικιλία Καλαμών. Το ελαιόλαδο που προκύπτει από την ελαιοποίηση του συγκεκριμένου καρπού εμφανίζει σημαντικές ποσότητες φαινολικών συστατικών, ενώ οι ενζυμικοί μετασχηματισμοί που αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, πραγματοποιούνται σε μικρό χρονικό διάστημα.

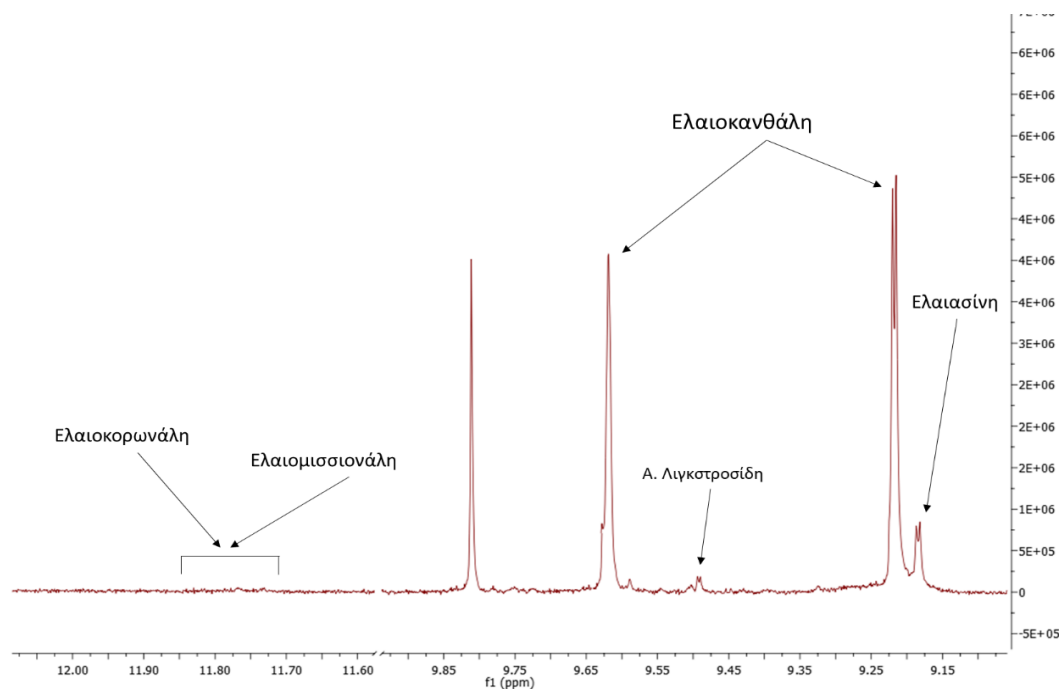
Συλλέχθηκε με μηχανικά μέσα ποσότητα καρπού 1.500 Kg τον μήνα Νοέμβριο. Ο καρπός αποθηκεύτηκε σε πλαστικά ανοικτά τελάρα και μεταφέρθηκε στις εγκαταστάσεις ελαιοτριβείου στα Σπάτα Αττικής μέσα σε 24 ώρες.

Από την μελέτη που παρουσιάστηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της μάλαξης ευνοεί την παραγωγή των φαινολικών συστατικών σαν σύνολο. Φάνηκε επίσης ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αποτελεσματικότερη ενζυμική μετατροπή, των πρόδρομων συστατικών ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη, σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη αντίστοιχα. Τέλος, κατά την διάρκεια της μάλαξης δρουν, εκτός των άλλων, και διάφορα οξειδωτικά και υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των σεκοϊριδοειδών κατά την διάρκεια της μάλαξης, δραστηριότητα που γίνεται εμφανής ιδιαίτερα στην κατηγορία των όρθο-διφαινολών σε μεσαίους και μεγάλους χρόνους μάλαξης.

Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκε η ελαιοποίηση του καρπού της συγκεκριμένης ποικιλίας, σε θερμοκρασία 29 °C για 50 min. Μετά την διαδικασία της μάλαξης, η ελαιοζύμη φυγοκεντρήθηκε σε οριζόντιο διαχωριστήρα 2 φάσεων για την απομάκρυνση του πολτού της ελιάς και στην συνέχεια σε κάθετο διαχωριστήρα, για τον καθαρισμό του ελαιολάδου.

Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψε ποσότητα ελαιολάδου 250 Kg η οποία και αποθηκεύτηκε σε κλειστή ανοξειδωτή δεξαμενή, μέχρι την εκχύλιση, ενώ μικρή ποσότητα του ελαιολάδου, υποβλήθηκε εργαστηριακά σε ανάλυση φαινολικών συστατικών με την μέθοδο NMR.

Από την ανάλυση των φαινολικών συστατικών, προέκυψε ότι το ελαιόλαδο, περιείχε σημαντικές ποσότητες ελαιοκανθάλης, ενώ όλα τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά, βρίσκονταν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα το ελαιόλαδο που παρασκευάστηκε περιείχε 615 mg/kg ελαιοκανθάλη, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις εντοπίζουμε την ελαιασίνη (70 mg/kg) και την μονοαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του Λιγκοτροσίδη (10 mg/kg).



**Εικόνα 5.51:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά την ελαιοποίηση.

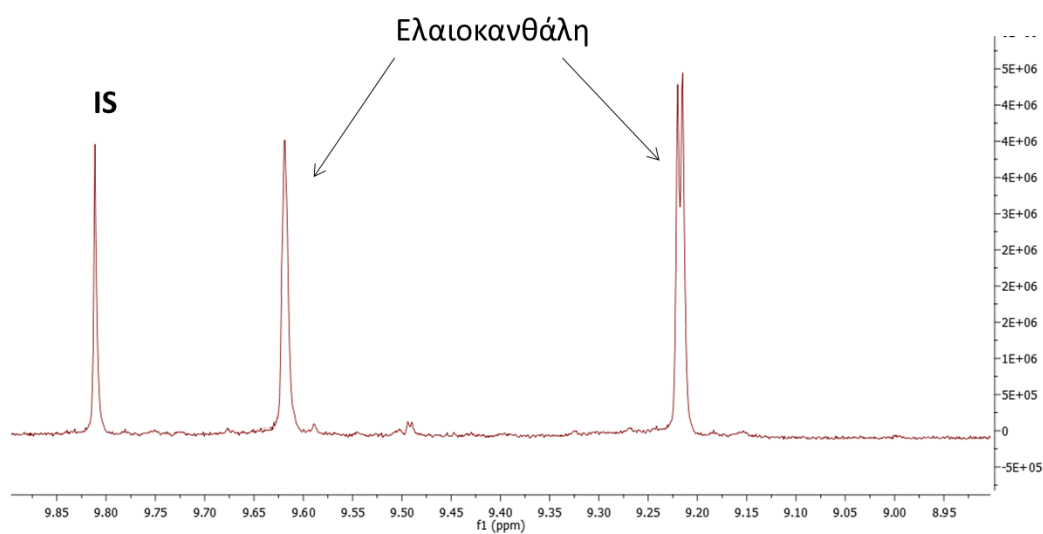
Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το ελαιόλαδο που παρασκευάστηκε, αποτελεί μια πολύ καλή πηγή για απομόνωση ελαιοκανθάλης. Για την βελτιστοποίηση του εκχύλισματος που θα παραλαμβάνονταν ωστόσο, θεωρήθηκε απαραίτητο, να προετοιμαστεί το αρχικό ελαιόλαδο κατάλληλα, ώστε στο τελικό εκχύλισμα να περιλαμβάνεται μόνο το συστατικό ελαιοκανθάλη. Με βάση τα δεδομένα που συζητήθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου, κατά την φυγοκέντρηση του ελαιολάδου από τον κάθετο διαχωριστή, ένα ποσοστό των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου διαλύεται στην υδατική φάση, που αποτελεί το απόβλητο του διαχωριστή. Πιο συγκεκριμένα, στο εκχύλισμα του αποβλήτου αυτό, ευνοείται η διάλυση των όρθο-διφαινολών όπως η ελαιασίνη σε βαθμό συγκριτικά μεγαλύτερο από την ελαιοκανθάλη.

Έτσι αποφασίστηκε το ελαιόλαδο που ήταν αποθηκευμένο σε δεξαμενή, να υποβληθεί εκ νέου σε διαδικασία φυγοκέντρησης από τον δεύτερο μόνο διαχωριστή, με σκοπό την απομάκρυνση της ελαιασίνης και πιθανώς άλλων συστατικών που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο ελαιόλαδο.



Μετά την φυγοκέντρωση το ελαιόλαδο αποθηκεύτηκε εκ νέου σε ανοξειδωτη δεξαμενή ενώ λήφθηκε και πάλι δείγμα προς ανάλυση. Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών, προέκυψε ότι το ελαιόλαδο είχε απωλέσει όλη την ποσότητα ελαιασίνης ενώ το άγλυκο του λιγκτροσίδη μπορούσε να εντοπιστεί σε ίχνη.

Η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης μειώθηκε στο ελαιόλαδο 580 (mg/kg) ωστόσο, τα οφέλη που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία ήταν αρκετά πιο σημαντικά από την απώλεια μικρού μόνο ποσοστού ελαιοκανθάλης.



**Εικόνα 5.52:** Το φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου μετά την δεύτερη φυγοκέντρωση.

### Υδατική εκχύλιση 250 L ελαιολάδου

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός της εκχύλισης του ελαιολάδου. Για την εκχύλιση του, χρειάστηκε να προμηθευτούμε ποσότητα απεσταγμένου νερού όγκου 750 L ο οποίος προοριζόταν για την εκχύλιση του ελαιολάδου. Η εκχύλιση του ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε σε αναλογία ελαιολάδου : απεσταγμένου νερού 1:1. Η διαδικασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε 3 φορές.

Η εκχύλιση του ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε σε ανοξείδωτη δεξαμενή ανάδευσης χωρητικότητας 600 L. Η δεξαμενή διέθετε κάθετο αξονικό αναδευτήρα ταχύτητας 30 rpm.

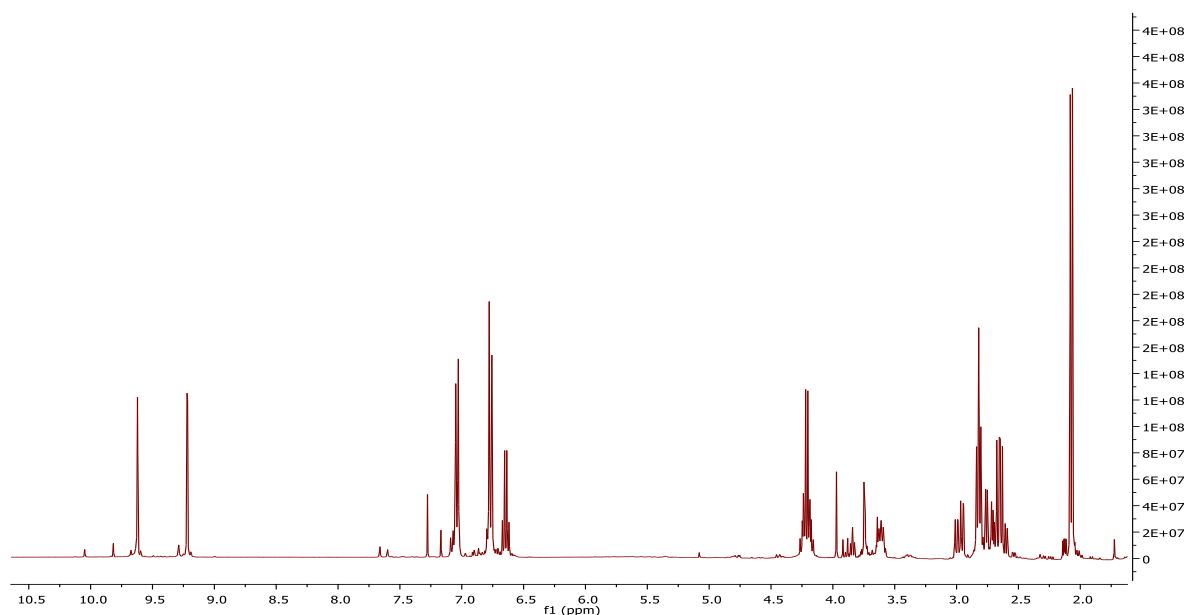
Στην δεξαμενή τοποθετήθηκαν 250 Kg ελαιολάδου και 250 L αποσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδευτήκε συνολικά για 12 h. Μετά το τέλος της ανάδευσης το μίγμα παρέμεινε στην δεξαμενή για διάστημα 3 h μέχρις ότου επιτευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός των φάσεων. Από την έξοδο στον πυθμένα της δεξαμενής, παραλάβαμε το υδατικό εκχύλισμα το οποίο αποθηκεύτηκε σε βαρέλια τροφής. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές μέχρι την πλήρη εκχύλιση του ελαιολάδου. Το συνολικό εκχύλισμα (750 L) μεταφέρθηκε στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις οινοποιείου στην περιοχή του Μαρκόπουλου Αττικής εντός 36 ωρών από την έναρξη της εκχυλιστικής διαδικασίας.

Στις εγκαταστάσεις του οινοποιείου, πραγματοποιήθηκε η συμπύκνωση του εκχυλίσματος υπό κενό. Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε με συσκευή συμπύκνωσης CADALPE C38-01, η οποία χρησιμοποιείται για την παρασκευή μελάσας. Η συγκεκριμένη συσκευή έχει την δυνατότητα να συμπυκνώνει υδατικά διαλύματα σε χαμηλή θερμοκρασία (27 °C) λειτουργώντας με αντλία κενού.



Η διαδικασία συμπύκνωσης διήρκεσε 7 h, όπου τα 750 L του αρχικού εκχυλίσματος συμπυκνώθηκαν σε 50 L τελικού εκχυλίσματος το οποίο συντηρήθηκε σε καταψύκτη (-18 °C) παραλαμβάνοντας προηγουμένως μικρή ποσότητα για επεξεργασία.

Συγκεκριμένα 10 mL του εκχυλίσματος εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό κενό, και το εκχύλισμα διαλύθηκε σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.



**Εικόνα 5.53:** Το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου.

Όπως φαίνεται και στο φάσμα της εικόνας 5.53, το εκχύλισμα περιείχε ελαιοκανθάλη σε πολύ μεγάλη καθαρότητα. Στην συνέχεια προχωρήσαμε σε μέτρηση της καθαρότητας του εκχυλίσματος.

Αφού εξατμίστηκε μια μικρή ποσότητα του εκχυλίσματος παραλήφθηκε ποσότητα 3 mg. Θεωρώντας την ποσότητα αυτή ως εκχύλισμα που περιέχει ελαιοκανθάλη καθαρότητας 100% προστέθηκε διάλυμα ακετονιτριλίου που περιείχε ισομοριακή ποσότητα συριγγαλδεΐδης. Το διάλυμα αυτό, αφού εξατμίστηκε υπό κενό, διαλύθηκε σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και έγινε λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ .

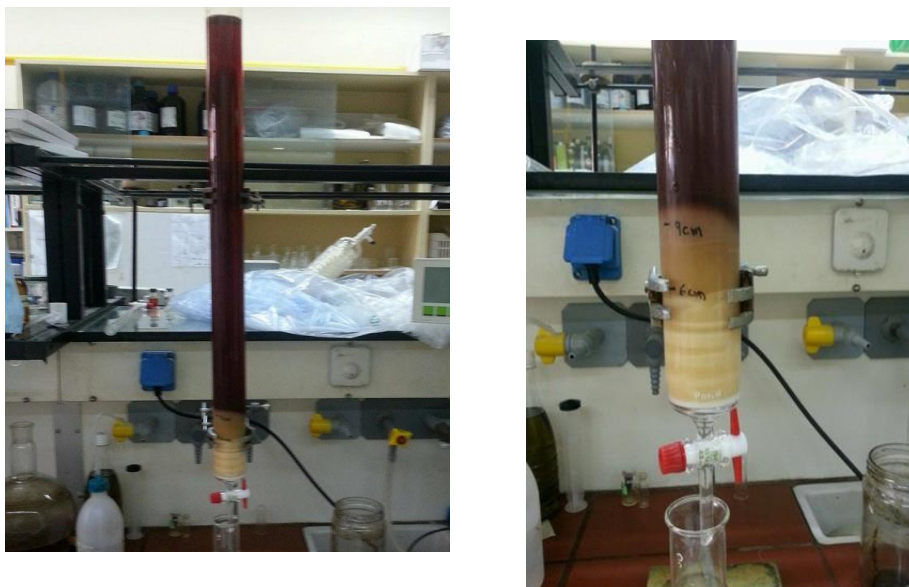
Από την αναλογία των κορυφών του αλδεϋδικού πρωτονίου της συριγγαλδεΐδης και του αλδεϋδικού πρωτονίου της ελαιοκανθάλης προέκυψε, ότι η απόκλιση από την αρχική υπόθεση ότι το εκχύλισμα αποτελείται από 100% ελαιοκανθάλη ήταν 0,35. Επομένως η κατά βάρος καθαρότητα του εκχυλίσματος της ελαιοκανθάλης ανέρχεται σε 65%.

Η καθαρότητα αυτή του εκχυλίσματος, αν και αναμενόμενη στα πλαίσια μιας ημι-βιομηχανικής κλίμακας εκχύλιση, δεν αντιστοιχούσε ποιοτικά στην εικόνα από το φάσμα πρωτονίου, όπου παρατηρήθηκε ότι οι κορυφές που αντιστοιχούν στο συστατικό ελαιοκανθάλη, είναι σημαντικά μεγαλύτερες από μικρές προσμίξεις που υπάρχουν στο εκχύλισμα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε διαδικασία καθαρισμού του εκχυλίσματος από πιθανές ανόργανες προσμίξεις.

### Καθαρισμός εκχυλίσματος

Ο καθαρισμός του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφίας στήλης. Από την ποιοτική ανάλυση του φάσματος πρωτονίου που προηγουμένως παρουσιάσαμε, διαπιστώθηκε ότι στο εκχύλισμα περιέχονταν προσμίξεις που αφορούν σε μικρού μοριακού βάρους ενώσεις που προερχόμενες από μικρού ποσοστού υδρολύσεις που πραγματοποιούνται στο βασικό μόριο, δηλαδή την ελαιοκανθάλη (μικροποσότητες ελεύθερης τυροσόλης, παράγωγα ελενολικού οξέος). Πέρα από τις οργανικές προσμίξεις υπήρχε και η πιθανότητα παρουσία ξένων προσμίξεων, όπως άλατα νερού που περιέχονται σε μικροποσότητες είτε διαλυμένες στο ελαιόλαδο είτε στο απεσταγμένο νερό και που μετά την συμπύκνωση 750 L νερού αυξήθηκε η συγκέντρωσή τους στο τελικό εκχύλισμα.

Εκμεταλλευόμενοι την διαφορά πολικότητας των προσμίξεων υδρόλυσης στο τελικό εκχύλισμα, αλλά και της ιδιότητας των οργανικών διαλυτών να μην διαλύουν ανόργανα συστατικά όπως τα άλατα, έγινε χρήση στήλης χρωματογραφίας διαμέτρου 4.5 cm η οποία πληρώθηκε με 15 g silica RP αντίστροφης φάσης.



**Εικόνα 5.54:** Ο καθαρισμός του υδατικού εκχυλίσματος σε ένα βήμα με χρήση silica C-18

Στην συνέχεια, φορτώθηκε η στήλη απευθείας με 1 L από το υδατικό εκχύλισμα. Η στήλη στην συνέχεια εκπλύθηκε με άλλα 3 L απεσταγμένου νερού και στην συνέχεια με 500 mL καθαρής αιθανόλης. Το κλάσμα της αιθανόλης συλλέχθηκε και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναλάβουμε την διαδικασία του προσδιορισμού καθαρότητας. Το νέο εκχύλισμα είχε καθαρότητα 90%

## 5.5 Εκχύλιση με βιοσυμβατούς οργανικούς διαλύτες.

Πειραματικός σχεδιασμός.

Αν και η υδατική εκχύλιση του ελαιολάδου σαν επιμέρους τεχνικά βήματα, είναι μια μέθοδος κατοχυρωμένη από διεθνή πατέντα (WO2018017967A1) μέσω της παραγωγής νανογαλακτωμάτων, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μια νέας μεθόδου απομόνωσης βασισμένη στον μηχανισμό της αντίδρασης των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου με τον διαλύτη. Ο μηχανισμός ενυδάτωσης συστατικών όπως η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη περιλαμβάνει την αντίδραση της αλδεϋδης της θέσης 3 με ένα μόριο νερού, με αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής των συστατικών, και την διάλυσή τους στο νερό. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται και με άλλους διαλύτες οι οποίοι φέρουν ως δραστική ομάδα ένα υδροξύλιο, όπως η μεθανόλη, η οποία αντιδρά με την συγκεκριμένη αλδεϋδη δημιουργώντας ημιακετάλες της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.

Συνεχίζοντας την προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων επιλεκτικής απομόνωσης των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο που θα προορίζονται για χρήση βιομηχανικής κλίμακας επιχειρήθηκαν δοκιμές με διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία φαρμάκων και τροφών λόγω της βιοσυμβατότητας τους με τον ανθρώπινο οργανισμό. Τέτοιοι διαλύτες είναι η αιθανόλη, η ισοπροπανόλη, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG).

Το βασικό πλεονέκτημα του απεσταγμένου νερού ως διαλύτη, είναι το γεγονός ότι είναι μη αναμίξιμο με το ελαιόλαδο με αποτέλεσμα, κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων για ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, να δίνεται ο απαραίτητος χρόνος ώστε να πραγματοποιείται η αντίδραση μεταξύ του νερού και των φαινολικών συστατικών. Η μη αναμιξιμότητα του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο, αποτέλεσε το πρώτο και βασικότερο χαρακτηριστικό που θα πρέπει να έχει ο διαλύτης.

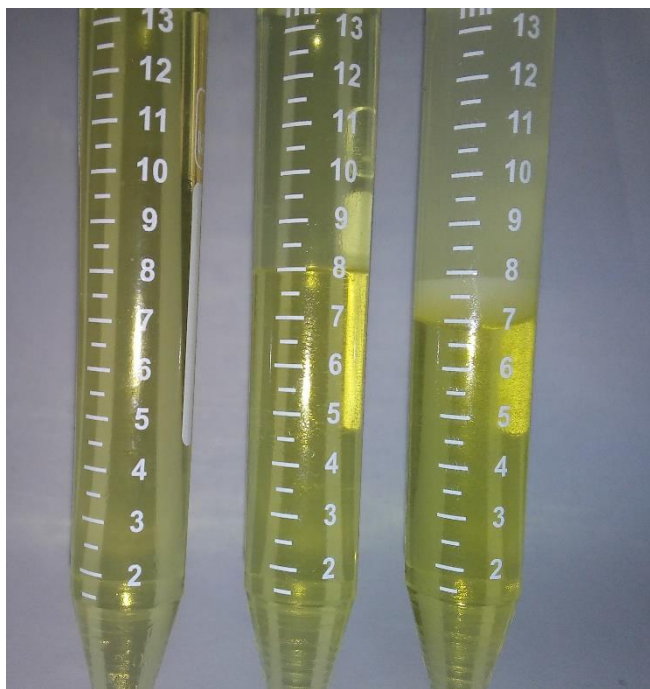
Σε δεύτερο επίπεδο, ο διαλύτης που επιλέχθηκε, θα έπρεπε να έχει την κατάλληλη δραστική ομάδα ώστε να αντιδρά επιλεκτικά με τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου μέσω του ίδιου μηχανισμού.

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ισοπροπανόλη, αιθανόλη και πολυαιθυλενογλυκόλη.

#### 5.4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με αιθανόλη, και ισοπροπανόλη.

Για τον έλεγχο της αναμιξιμότητας των διαλυτων που χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά πραγματοποιήθηκαν μικρής κλίμακας εκχυλίσεις, με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι δυνατός ο διαχωρισμός της λιπαρής φάσης και του εκάστοτε διαλύτη. Με δεδομένο ότι η φυγοκέντρηση σε βιομηχανική κλίμακα, είναι τεχνικά δύσκολη, και ανεβάζει το κόστος της όλης διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε έλεγχος αναμιξιμότητας αποκλειστικά με βαρυτικό διαχωρισμό.

Συγκεκριμένα, σε 3 πλαστικά tubes τον 15 mL, προστέθηκαν 7 mL ελαιολάδου στο καθένα και στην συνέχεια προστέθηκαν 7 mL διαδοχικά στο κάθε tube ισοπροπανόλη, αιθανόλη, μίγμα αιθανόλης/νερού 80:20. Τα τρία δείγματα αναδεύτηκαν για 5 min σε συσκευή ανάδευσης και στην συνέχεια αφέθηκαν σε ηρεμία για να διαχωριστούν για 2 h.



**Εικόνα 5.55:** Σύγκριση της αναμιξιμότητας του ελαιολάδου, με ισοπροπανόλη, αιθανόλη και αιθανόλη/νερό.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.55, στο πρώτο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε ισοπροπανόλη, δεν ήταν εφικτός ο διαχωρισμός της ισοπροπανόλης και του ελαιολάδου. Στο δεύτερο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη, ο διαχωρισμός επετεύχθη, ωστόσο, φαίνεται ότι η οργανική φάση έχει αυξηθεί κατά 1 mL γεγονός που δηλώνει ότι ένα ποσοστό του ελαιολάδου περνάει στην οργανική φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το τελικό εκχύλισμα να περιέχει λιπίδια, και να απαιτείται περαιτέρω χρωματογραφικός διαχωρισμός. Στο τρίτο δείγμα βλέπουμε ότι ο

διαχωρισμός των φάσεων είναι σημαντικά καλύτερος, ωστόσο η δημιουργία γαλακτώματος και εδώ, υποδηλώνει την ανάγκη φυγοκέντρησης του δείγματος.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία, και είναι γνωστό ότι μπορούν να είναι πολύ αποτελεσματικοί στην εκχύλιση πολικότερων συστατικών.

Η χρήση διαλυτών όπως η αιθανόλη σε καθαρή μορφή, ή και σε μίγμα με νερό, είναι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση φαινολικών συστατικών. Το αυξημένο κόστος του διαλύτη αυτού ωστόσο, αυξάνει το συνολικό κόστος εκχύλισης, ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς, ότι στην δοκιμαστική εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε χρειάστηκε να προστεθεί ποσότητα διαλύτη όση ακριβώς και του ελαιολάδου. Επίσης η δημιουργία γαλακτωμάτων, επιβάλλει την χρήση φυγοκεντρικών μεθόδων, γεγονός που αυξάνει ακόμα περισσότερο το κόστος της διαδικασίας.

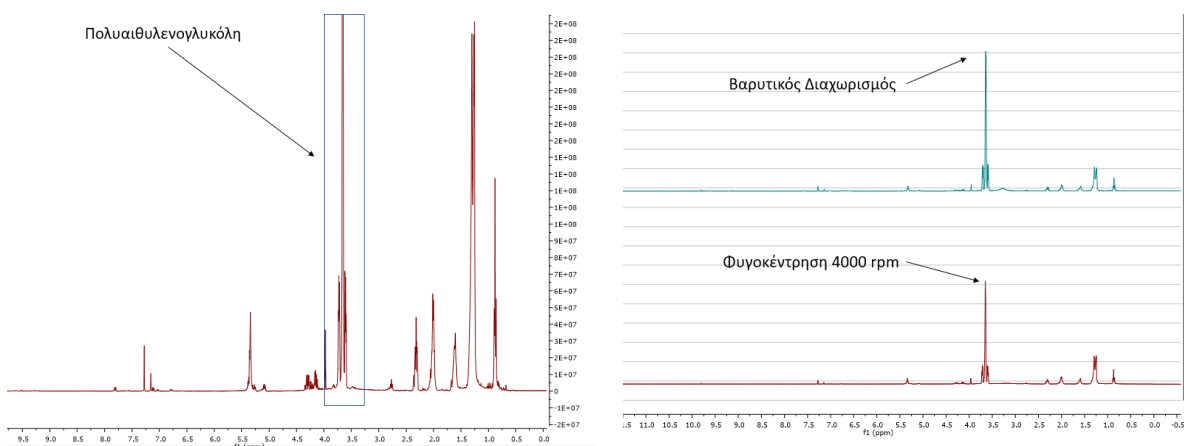
### 5.5.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με πολυαιθυλενογλυκόλη.

Στην τελευταία δοκιμή πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) μοριακού βάρους 200 και 400. Η πολυαιθυλενογλυκόλη, είναι ένα βιοσυμβατό υδρόφιλο πολυμερές που χρησιμοποιείται ευρέως στην φαρμακοβιομηχανία ως γαλακτοματοποιητής ή σταθεροποιητής.

#### Αναμιξιμότητα ελαιολάδου PEG

Σε αρχικές δοκιμές πραγματοποιήθηκε ανάμιξη ελαιολάδου με PEG200 και PEG400 σε διάφορες αναλογίες. Συγκεκριμένα πραγματοποιήσαμε δοκιμές με αναλογία ελαιολάδου/ PEG400 (και PEG200) 100:2. Το μίγμα αφού αναδεύτηκε για 2 min αφέθηκε να διαχωριστεί. Μετά από χρόνο 60 min είχε επιτευχθεί βαρυτικός διαχωρισμός σε ποσοστό άνω του 50%. Το μίγμα αφέθηκε για περισσότερη ώρα και συνολικά μετά από διάστημα 3 ημερών παραλάβαμε το 75% της αρχικής ποσότητας PEG200. Η ίδια δοκιμή πραγματοποιήθηκε και με PEG400 με ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα.

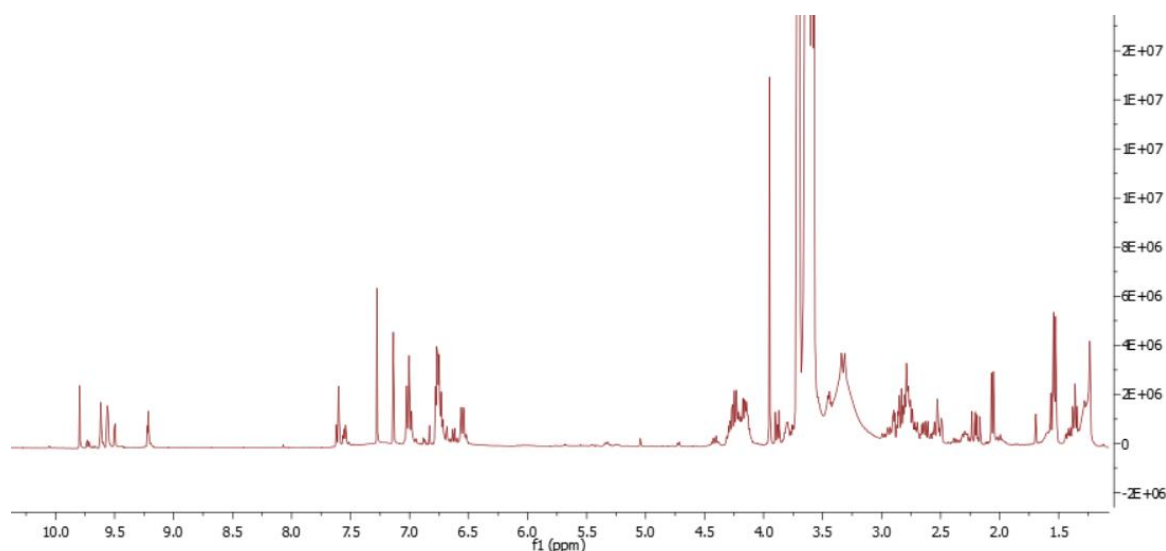
Μετά την εκχύλιση διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις και προχωρήσαμε σε φασματοσκοπική ανάλυση του ελαιολάδου με NMR. Όπως φαίνεται και στο φάσμα της εικόνας 5.56, μια ποσότητα της πολυεθυλενογλυκόλης παραμένει μέσα στο ελαιόλαδο και δεν μπορεί να διαχωριστεί πλήρως βαρυτικά. Για τον λόγο αυτό επιχειρήθηκε σε μικρή κλίμακα, η φυγοκέντρηση του δείγματος ώστε να διαπιστωθεί αν μπορεί να γίνει πλήρης διαχωρισμός των δύο φάσεων. Μετά τον διαχωρισμό φάνηκε και πάλι από το φάσμα H1-NMR, ότι ποσότητα του PEG παραμένει διαλυμένη μέσα στο ελαιόλαδο, αν και σαφώς μειωμένη. Η συνολική ανάκτηση ωστόσο του εκχυλίσματος είναι αρκετά ικανοποιητική.





**Εικόνα 5.56:** Το χαρακτηριστικό σήμα του PEG στο ελαιόλαδο και η σύγκριση του ποσοστού PEG που παραμένει σε αυτό μετά από βαρυτικό διαχωρισμό και φυγοκέντρηση.

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση του εκχυλίσματος. Από την ανάλυση της φάσης του ελαιολάδου, φάνηκε ότι μετά την εκχύλιση με PEG η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών μειώθηκε στο ελαιόλαδο. Πράγματι, μετά την ζύγιση 50mg του εκχυλίσματος που παραλήφθηκε, και διάλυσης τους σε  $\text{CDCl}_3$ , λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  το οποίο και παρουσιάζεται στην εικόνα 5.57.



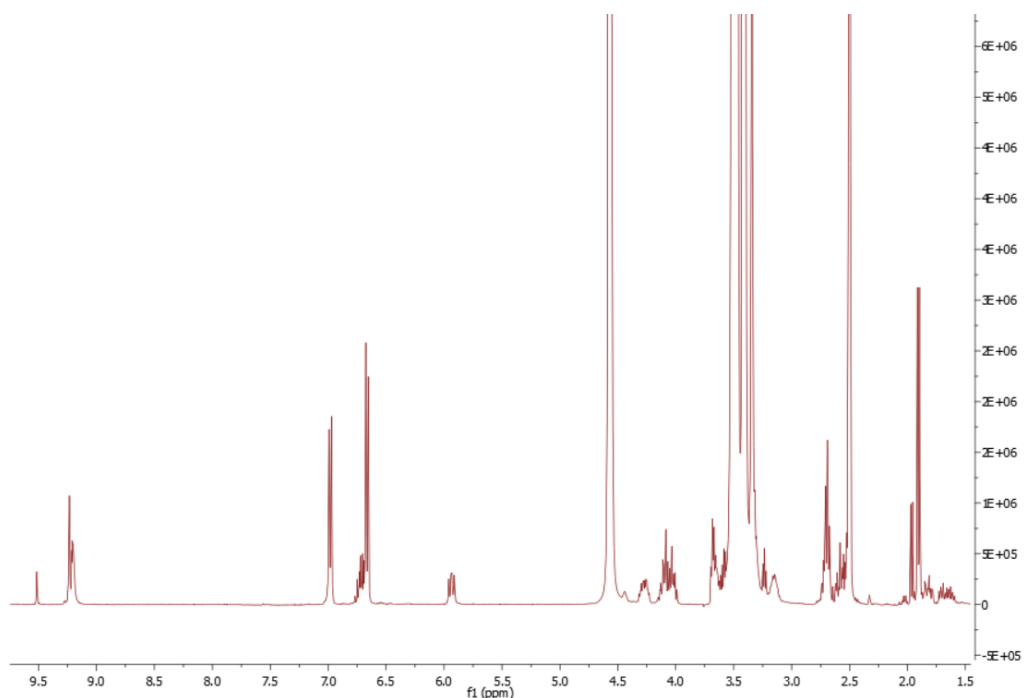
**Εικόνα 5.57:** Φάσμα πολυαιθυλενογλυκολικού εκχυλίσματος σε  $\text{CDCl}_3$

Όπως παρουσιάζεται και από το φάσμα σε  $\text{CDCl}_3$ , το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου εκχυλίζεται από την πολυεθυλενογλυκόλη και παραλαμβάνεται αυτούσιο στο εκχύλισμά μας.

### Αντίδραση Φαινολικών συστατικών – Πολυαιθυλενογλυκόλης.

Για να διαπιστωθεί σε ποια μορφή βρίσκονται τα φαινολικά συστατικά μέσα στο εκχύλισμα, έπρεπε να γίνει λήψη φάσματος σε δευτεριωμένο διαλύτη DMSO. Με τον τρόπο αυτό θα ήταν δυνατό να διαπιστωθεί εάν η πολυαιθυλενογλυκόλη, μπορεί να αντιδράσει με τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε σε πρώτη φάση εκτός του περιβάλλοντος του ελαιολάδου. Συγκεκριμένα σε ένα φιαλίδιο προστέθηκε ποσότητα 10mg ελαιοκανθάλης και στην συνέχεια προστέθηκαν 30 mg PEG200.

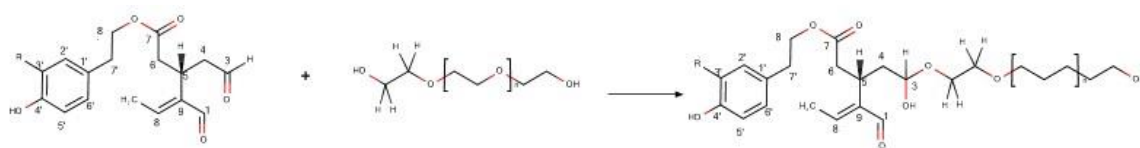
Το μίγμα αυτό παρέμεινε για αρκετή ώρα σε φιαλίδιο υπό ανακίνηση, καθώς η ομογενοποίησή πραγματοποιήθηκε μετά από 15 min. Μετά το διάστημα αυτό, προέκυψε ένα ομοιογενές μίγμα των δύο συστατικών. Για την διερεύνηση του μηχανισμού της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε λήψη μια σειράς φασμάτων σε διαφορετικούς διαλύτες με σκοπό να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός αντίδρασης. Αρχικά ποσότητα 5mg του προϊόντος της εν λόγω αντίδρασης προστέθηκαν 600μL δευτεριωμένου DMSO και λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ .



**Εικόνα 5.58:** Το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της PEG-OLE

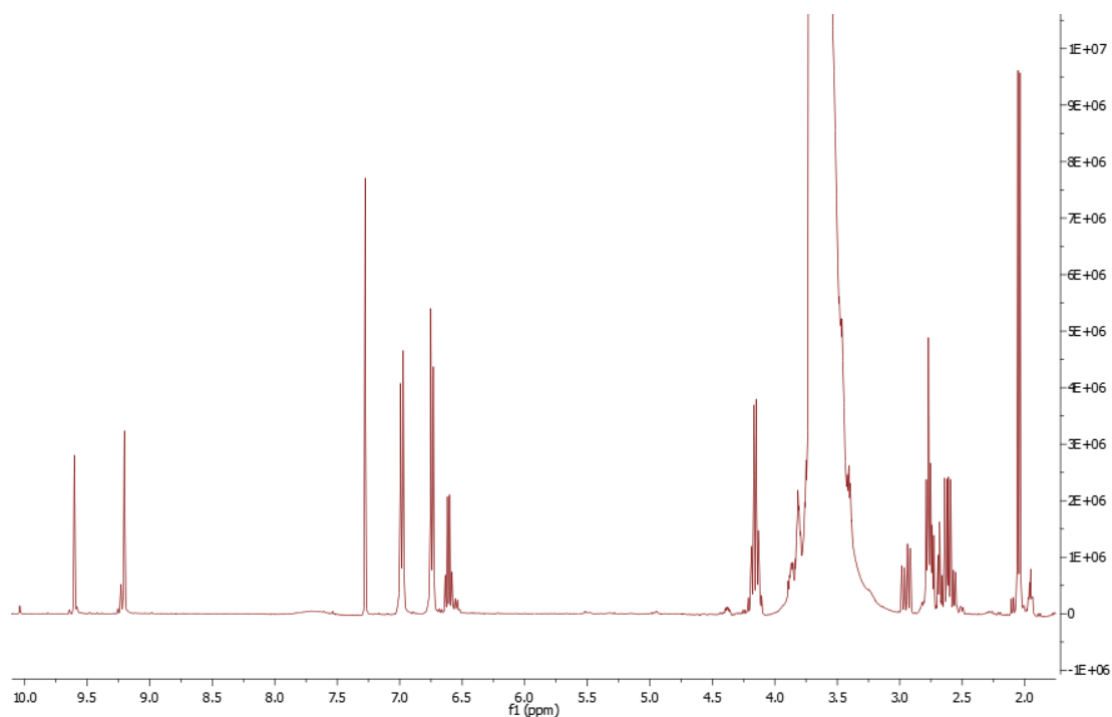
Στο φάσμα πρωτονίου, εκτός από τα χαρακτηριστικά σήματα αιθυλενίου στα 3.4 ppm που προέρχονται από το PEG, παρατηρήθηκε ότι στην αλδεϋδική περιοχή του φάσματος, εντοπίστηκε το ένα αλδεϋδικό πρωτόνιο στα 9.23 ppm ενώ η δεύτερη αλδεϋδη εντοπίστηκε στο φάσμα σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση. Αυτό συμβαίνει διότι η πολυαιθυλενογλυκόλη, έχει γενικό χημικό τύπο  $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ , και κατά την επαφή της με τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου,

αντιδρά με την αλδεΐδη της θέσης 3, δημιουργώντας πολυαιθυλενογλυκολικές ημιακετάλες της ελαιοκανθάλης, ενώ όπως και στο νερό, ένα ποσοστό παραμένει στην διαλδεϊδική κατάσταση.



**Εικόνα 5.59:** Η αντίδραση της ελαιοκανθάλης με την πολυαιθυλενογλυκόλη

Στην συνέχεια επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία, μόνο που αυτή την φορά η λήψη φάσματος πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

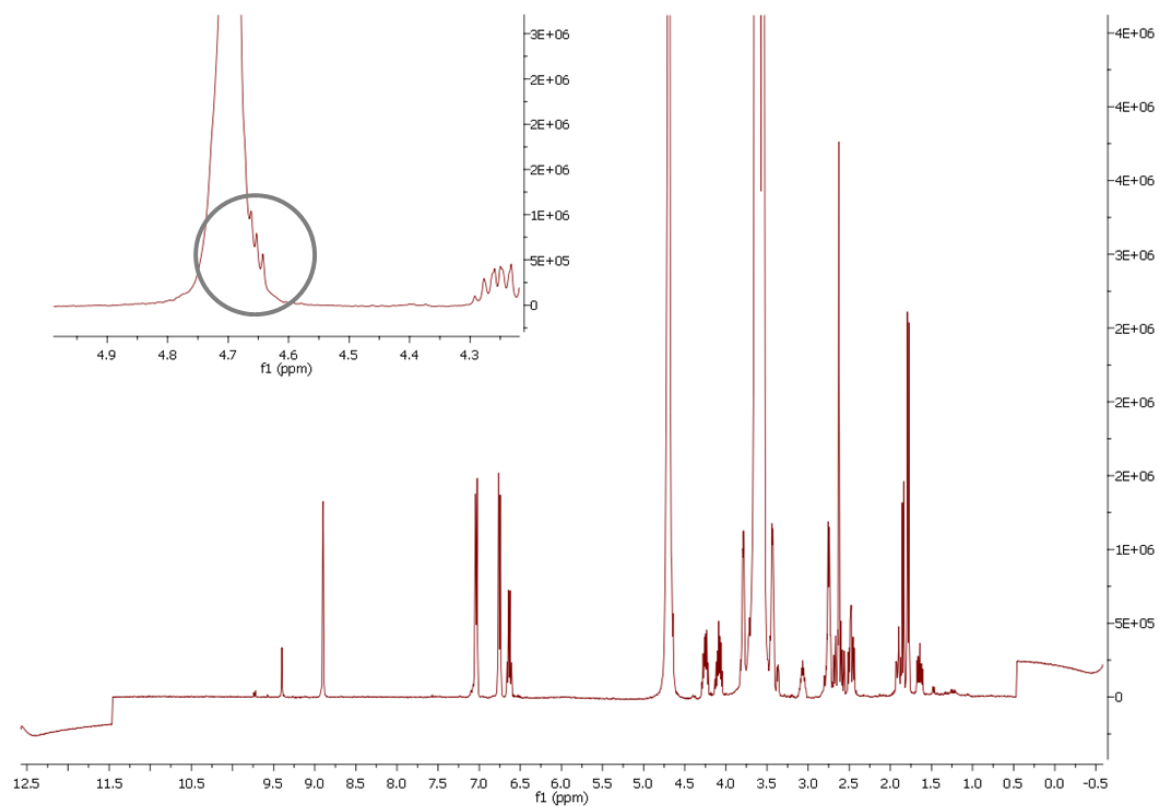


**Εικόνα 5.60:** Το φάσμα του εκχυλίσματος πολυαιθυλενογλυκολικής ελαιοκανθάλης σε CDCl<sub>3</sub>.

Από το φάσμα αυτό, διαπιστώθηκε ότι στο περιβάλλον του χλωροφορμίου η πολυαιθυλενογλυκόλη, αποσυνδέεται από το μόριο της ελαιοκανθάλης επαναφέροντας την αλδεΐδη της θέσης 3 στην αρχική της μορφή.

Αυτό δημιούργησε το ερώτημα, αν το συγκεκριμένο φαινόμενο πραγματοποιείται και σε υδατικό περιβάλλον. Για τον σκοπό αυτό, μικρή πάλι ποσότητα (5mg) της πολυαιθυλενογλυκολιομένης ελαιοκανθάλης, διαλύθηκε σε 600μL D<sub>2</sub>O και λήφθηκε φάσμα <sup>1</sup>H-NMR.

Όπως φαίνεται και στο φάσμα (εικόνα 5.61), και στο υδατικό περιβάλλον, η ελαιοκανθάλη, επανέρχεται στην αρχική της μορφή καθώς εμφανίζεται και η τετραπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3.

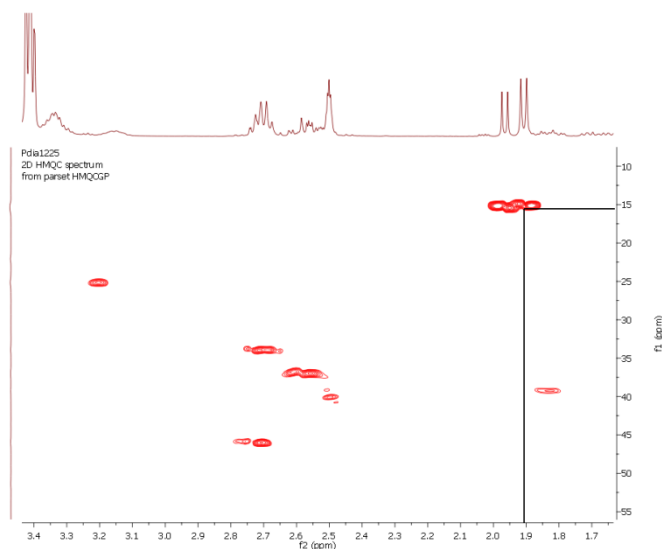


**Εικόνα 5.61:** Το φάσμα του εκχυλίσματος πολυαιθυλενογλυκολικής ελαιοκανθάλης σε D<sub>2</sub>O.

### 5.5.3 Πολυαιθυλενογλυκολική ημιακετάλη της ελαιοκανθάλης

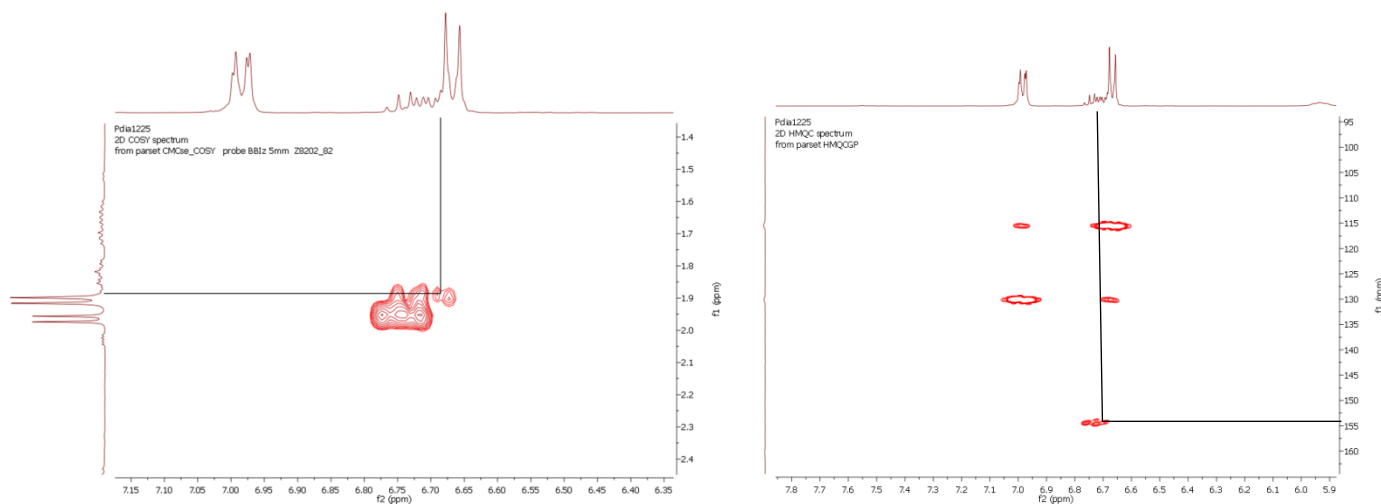
Για να επιβεβαιωθεί η δομή της πολυαιθυλενογλυκολικής ελαιοκανθάλης (PEG-OLE), πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και δύο διαστάσεων σε διαλύτη DMSO.

Το μεθύλιο της PEG-OLE εμφανίζεται στα 1.91 ppm ως διπλή κορυφή με  $J = 6.95$  Hz. Από το φάσμα QC παρατηρήσαμε ότι ο άνθρακας του μεθυλίου εμφανίζει χημική μετατόπιση 15.01 ppm.



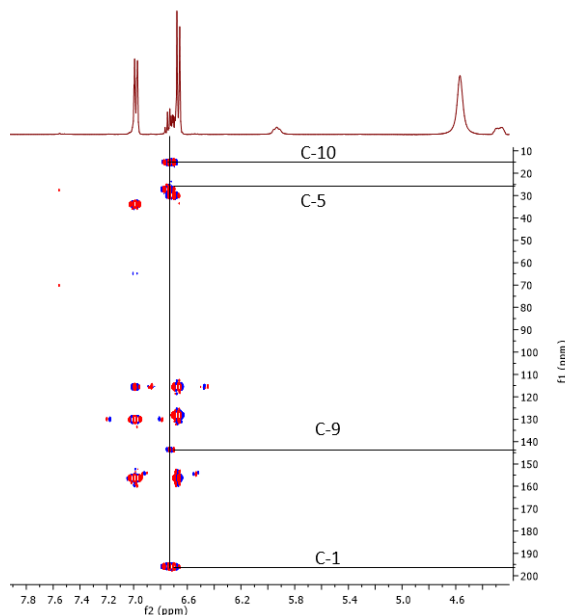
**Εικόνα 5.62:** Η συσχέτιση των πρωτονίων του μεθυλίου με τον αντίστοιχο C από το φάσμα HSQC

Στο το φάσμα HMBC ο άνθρακας του μεθυλίου συσχετίζεται με ένα πρωτόνιο στα 6.72 ppm. Το πρωτόνιο αυτό είναι το ολεφινικό πρωτόνιο της θέσης 8, το οποίο στο φάσμα πρωτονίου αλληλεπικαλύπτεται με το αντίστοιχο πρωτόνιο της διαλδεϋδικής μορφής της ελαιοκανθάλης. Από το φάσμα COSY φαίνεται και η συσχέτιση των πρωτονίων του μεθυλίου με το συγκεκριμένο πρωτόνιο ενώ από το φάσμα HMQC παρατηρήθηκε ότι ο άνθρακας της θέσης 8 εμφανίζεται στα 154.60 ppm.



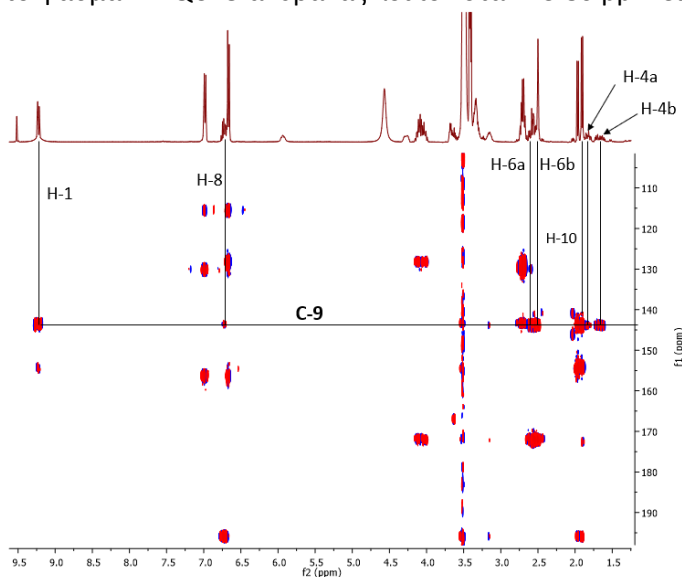
**Εικόνα 5.63:** Οι συσχετίσεις του πρωτονίου H-8 με γειτονικά πρωτόνια και τον C-8.

Το πρωτόνιο της θέσης 8 συσχετίζεται εκτός από τον άνθρακα του μεθυλίου (15.07 ppm) με έναν άνθρακα της 29.87 (C-5), έναν άνθρακα στα 143.74 ppm και έναν καρβονυλικό 196.28 ppm. Ο καρβονυλικός άνθρακας στα 196.28 ppm συσχετίζεται με το αλδεϋδικό πρωτόνιο στα 9.21 ppm που αντιστοιχεί στο H-1. Επομένως ο άνθρακας στα 196.28 ppm αντιστοιχεί στον C-1.



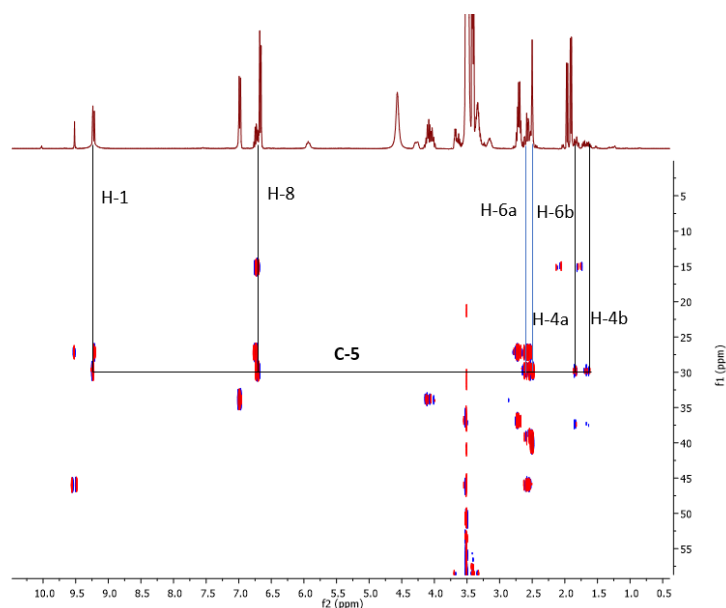
**Εικόνα 5.64:** Οι συσχετίσεις του H-8 με τους γειτονικούς άνθρακες.

Ο δεύτερος άνθρακας (143.86 ppm) που συσχετίζεται με το H-8, συσχετίζεται και με το αλδεϋδικό πρωτόνιο αλλά και με το μεθύλιο καθώς και με άλλα σήματα πρωτονίων στα 1.63 ppm 1.83 ppm και 3.16 ppm. Ο άνθρακας αυτός βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό και δεν εμφανίζει συσχέτιση με κανένα πρωτόνιο στο φάσμα ΗΜQC. Ο άνθρακας λοιπόν στα 143.86 ppm είναι ο C-9.



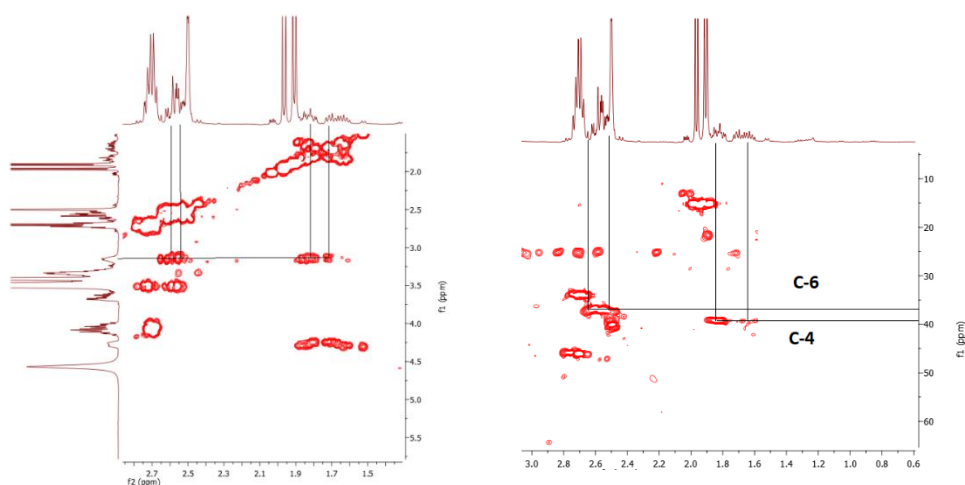
**Εικόνα 5.65:** Οι συσχετίσεις του C-9 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα ΗΜBC.

Ο τρίτος άνθρακας με τον οποίον συσχετίζεται το H-8 είναι ο άνθρακας στα 29.87 ppm. Ο άνθρακας αυτός από το φάσμα HMQC συσχετίζεται με το πρωτόνιο στα 3.16 ppm που εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή. Το πρωτόνιο αυτό είναι το πρωτόνιο της θέσης 5 (H-5: 3.16 ppm C-5: 29.87 ppm). Στο φάσμα HMBC παρατηρήσαμε ότι εμφανίζει συσχέτιση με μία αλδεΐδη στα 9.24 (Με την συσχέτιση αυτή επιβεβαιώνεται και η χημική μετατόπιση του H-1 και ο διαχωρισμός του από γειτονικά σήματα), H-8 καθώς και τα πρωτόνια στα 1.63, 1.83 ppm, 2.56 ppm και 2.61 ppm..



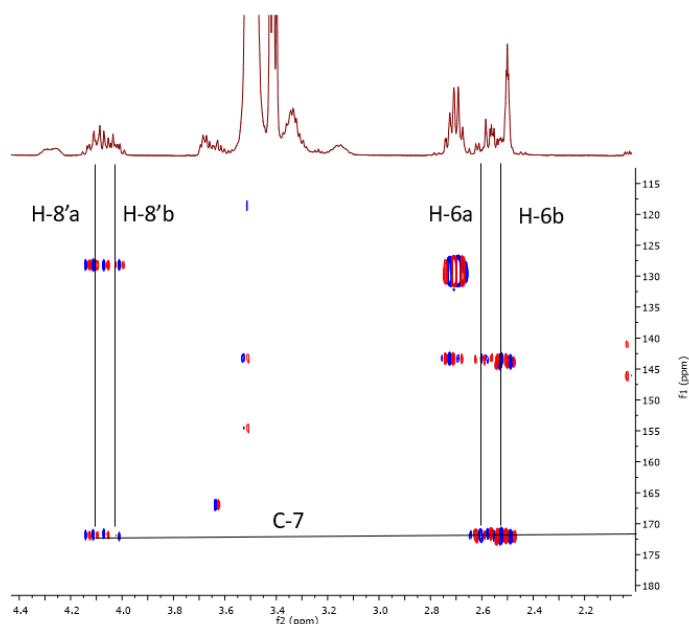
**Εικόνα 5.66:** Οι συσχετίσεις του C-5 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC.

Από το φάσμα HMQC παρατηρήθηκε ότι τα σήματα στα 1.63 και 1.83 ppm ανήκουν στον ίδιο άνθρακα στα 39.28 ppm και τα σήματα στα 2.56 ppm και 2.61 ppm ανήκουν επίσης στον ίδιο άνθρακα στα 37.03 ppm. Πρόκειται για τα σήματα της θέσης 4 και 6 αντίστοιχα. Τις συσχετίσεις του πρωτονίου H-5 με τα πρωτόνια της θέσης 4 και 6 που εντοπίζονται και στο φάσμα COSY.



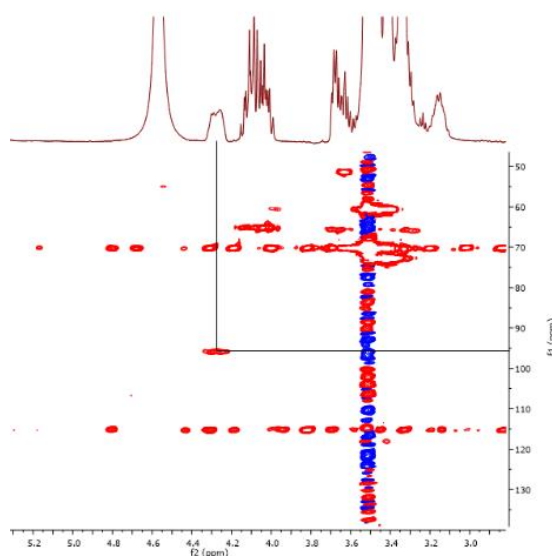
**Εικόνα 5.67:** Οι συσχετίσεις των πρωτονίων των θέσεων 4 και 6 με τους αντίστοιχους άνθρακες και με το πρωτόνιο της θέσης 5.

Όπως και στην περίπτωση της ελαιοκανθαδιόλης, έτσι και εδώ τα σήματα των H-4a και H-4b διαχωρίστηκαν από τα σήματα H-6a και H-6b βάσει των συσχετίσεων με τον καρβονυλικό άνθρακα C-7 και τον άνθρακα C-3. Συγκεκριμένα από το φάσμα HMBC παρατηρήθηκε ότι τα πρωτόνια στα 2.56 και 2.61 ppm (H-6a και H-6b) εμφανίζουν συσχέτιση με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 171.81 ppm (C-7) ο οποίος εμφανίζει μόνο μία συσχέτιση ακόμα στα 4.12 ppm και 4.14 ppm τα οποία, όπως και στην περίπτωση της ελαιοκανθαδιόλης, αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8'α και H-8'β του εστεροποιημένου τμήματος της τυροσόλης.



**Εικόνα 5.68:** Οι συσχετίσεις του C-7 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC.

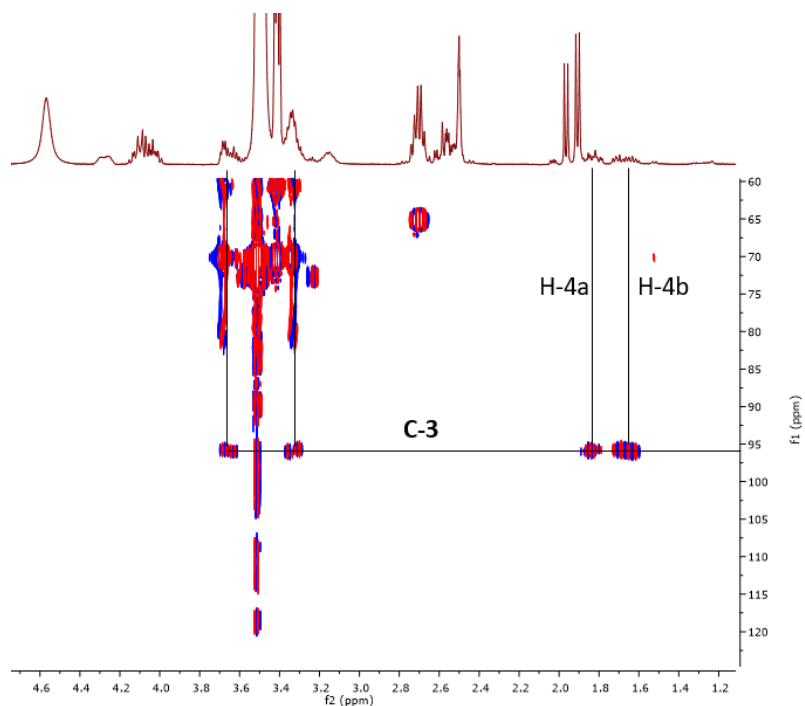
Αντίθετα τα σήματα στα 1.63 και 1.83 ppm εμφανίζουν συσχέτιση με έναν άνθρακα στα 96.03 ppm. Από το φάσμα HMQC φάνηκε ότι ο άνθρακας αυτός συσχετίζεται με το πρωτόνιο στα 4.27 ppm το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3 το οποίο πριν την αντίδραση αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο της αλδεϋδομάδας.



**Εικόνα 5.69:** Οι συσχετίσεις του H-3 με τον C-3 από το φάσμα HMQC.



Τέλος ο C-3 εμφανίζει συσχετίσεις, εκτός από τα πρωτόνια της θέσης 4, και με τα πρωτόνια στα 3.33 και 3.63 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της πρώτης αιθελενομάδας του μορίου της πολυαιθυλενογλυκόλης. Τα παραπάνω σήματα αποδεικνύουν την σύνδεση του μορίου της πολυαιθυλενογλυκόλης στην θέση 3 στην ελαιοκανθάλης που οδηγεί τελικά στην εκχύλιση του συστατικού από το ελαιόλαδο.



**Εικόνα 5.70:** Οι συσχετίσεις του C-3 με τα γειτονικά πρωτόνια στο φάσμα HMBC.

**Πίνακας 5.10:** Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για την πολυαιθυλενογλυκολική ημιακετάλη της ελαιοκανθάλης σε δευτεριωμένο DMSO.

<b>H</b>	<b>PEG-OLE- (DMSO)</b>
H-1	9.24, d, J = 1.6 Hz
H-3	4.28, dd, J = 7.7, 4.2 Hz
H-4a	1.63, ddd, J = 13.5, 7.7, 5.2 Hz
H-4b	1.83 ddd, J = 13.5, 9.9, 4.2 Hz
H-5	3.16, ddt, J = 10.9, 9.9, 5.3 Hz
H-6a	2.56, dd, J = 14.7, 5.9 Hz
H-6b	2.61, dd, J = 14.6, 10.9 Hz
H-8	6.72, q, J = 7.1 Hz
H-10	1.91, d, J = 7.0 Hz
H-1'α	4.03, dt, J = 11.1, 5.4 Hz
H-1'β	4.12, m, overlapped
H-2'	2.84, t, J = 5.4 Hz
H-4'	7.13, d, J = 8.4 Hz
H-5'	6.84, d, J = 8.4 Hz
H-6'	-
H-7'	6.84, d, J = 8.4 Hz
H-8'	7.13, d, J = 8.4 Hz

**Πίνακας 5.11:** Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων για την πολυαιθυλενογλυκολική ημιακετάλη της ελαιοκανθάλης σε δευτεριωμένο DMSO.

<b>C</b>	<b>PEG-OLE- (DMSO)</b>
C-1	196.28
C-3	95.86
C-4	39.26
C-5	27.14
C-6	37.5
C-7	171.81
C-8	154.6
C-9	143.86
C-10	15.01
C-1'	65.8
C-2'	33.3
C-4'	115.7
C-3'	130.60
C-5'	130.7
C-6'	33.30
C-7'	130.7
C-8'	115.7

#### 5.5.4 Απομόνωση φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο με PEG400

Συνοψίζοντας, είδαμε ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, έχουν την δυνατότητα να αντιδρούν με την πολυαιθυλενογλυκόλη, σχηματίζοντας πολυαιθυλενογλυκολικές ημιακετάλες των συστατικών. Οι νέες αυτές μορφές, όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον, όπως είναι και τα βιολογικά υγρά, διασπώνται, επαναφέροντας τα φαινολικά συστατικά στην αρχική τους μορφή. Στην παράγραφο αυτή επιχειρήθηκε απομόνωσης φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο με την χρήση PEG400.

Και σε αυτήν την περίπτωση επιχειρήθηκε η διαδικασία εκχύλισης να εφαρμοστεί σε ημιβιομηχανική κλίμακα. Για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκαν 100 L ελαιολάδου το οποίο εκχυλίστηκε με 2 L PEG400. Σε κωνικού σχήματος πλαστική δεξαμενή κατάλληλη για χρήση ελαιολάδου (πολυπροπυλένιο) προστέθηκαν το ελαιόλαδο. Το PEG και το μίγμα αναμίχθηκε για 5 min με μηχανικό αναδευτήρα. Μετά την ανάμιξη το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία για διάστημα 3 ημερών. Στο τέλος παραλείφθηκαν 1,5 L της πολυαιθυλενογλυκολικής φάσης.

Ύστερα από την ζύγιση 100 mg της πολυαιθυλενογλυκολικής φάσης, προσθήκης εσωτερικού προτύπου συριγγαλδεΐδης και της λήψης φάσματος σε  $\text{CDCl}_3$ , προέκυψε ότι το εκχύλισμα περιείχε 8 mg φαινολικών συστατικών.



**Εικόνα 5.71:** Πλαστική δεξαμενή εκχύλισης.

### 5.5.5 Μορφοποίηση εκχυλισμάτων.

Τα υδατικά και πολυαιθυλενογλυκοδικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν αποτελούν ιδανικές πρώτες ύλες για την παρασκευή βιοσυμβατών σκευασμάτων. Οι μέθοδοι εκχυλίσεων που αναπτύχθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, επιτρέπουν την παραγωγή εκχυλισμάτων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για περαιτέρω μορφοποίηση σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές. Τα εκχυλίσματα αυτά σε πρώτη φάση μπορούν να περιλαμβάνουν το συνολικό φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, και όχι μεμονωμένα συστατικά, καθώς αυτό θα απαιτούσε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς οι οποίοι απαιτούν την χρήση διαλυτών οι οποίοι είναι είτε τοξικοί για τον άνθρωπο είτε αυξάνουν κατά πολύ το κόστος παραγωγής. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, με την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών ελαιοποίησης του ελαιολάδου που αποτελεί την πρώτη ύλη ωστόσο παραγωγή, και την επιλογή της κατάλληλης ποικιλίας, είναι δυνατόν να παραχθούν ελαιόλαδα, των οποίων το φαινολικό κλάσμα, και άρα και το εκχύλισμα, διαθέτει συγκεκριμένη σύσταση που μπορεί να περιέχει μόνο ένα επιθυμητό συστατικό.

Στην περίπτωση των υδατικών εκχυλισμάτων, το εκχύλισμα παράγεται από μια διαδικασία ενός μόνο βήματος, ωστόσο, για να μπορεί να αξιοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα, απαραίτητη είναι η συμπύκνωση του εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 3g/L. Αντίθετα στην περίπτωση των πολυαιθυλενογλυκοδικών εκχυλισμάτων η μέθοδος αφορά την παρασκευή του εκχυλίσματος σε ένα βήμα, χωρίς την χρήση περαιτέρω επεξεργασίας. Και τα δύο εκχυλίσματα μπορούν να μορφοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους σε τελικά σκευάσματα. Παρακάτω θα δούμε κάποιες φόρμουλες που παρασκευάσαμε από τα εκχυλίσματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής.

## Υδατικά εκχυλίσματα.

Το υδατικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αποτέλεσε ιδανική πρώτη ύλη για περαιτέρω επεξεργασία με σκοπό την τελική μορφοποίηση σε φόρμουλες που εμπεριέχουν ως κύριο δραστικό συστατικό την ελαιοκανθάλη. Κατά την εκχύλιση του ελαιολάδου με απεσταγμένο νερό, το υδατικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι την τελική συγκέντρωσή 3g/L. Το υλικό αυτό μορφοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικές φόρμουλες:

- Ξηρό εκχύλισμα

Με απλή συμπύκνωση του υδατικού εκχυλίσματος, παραλήφθηκε το ξηρό εκχύλισμα το οποίο όπως παρουσιάστηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, περιείχε ελαιοκανθάλη σε πολύ υψηλή καθαρότητα.

- Ενέσιμο διάλυμα συγκέντρωσης 2 g/L.

Το υδατικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Στην συνέχεια ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος 0,5 διαλύθηκε σε injection solution για ενέσιμο διάλυμα μέχρι τελικής συγκέντρωσης 2 g/L. Η συγκεκριμένη φόρμουλα διατηρήθηκε σε συνθήκες ψύξης (8 °C).

- Δισκία Λακτόζης.

Η παραγωγή των δισκίων ελαιοκανθάλης πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της εταιρίας ΛΑΜΔΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ Α.Ε. Η παραγωγή των δισκίων πραγματοποιήθηκε με τεχνολογία fluidized bed και ως εκδοχο χρησιμοποιήθηκε η λακτόζη. Παρασκευάστηκαν δισκία των 10 και των 20 mg βάρους 400 mg.



**Εικόνα 5.72:** Δισκία Ελαιοκανθαδιόλης

Η διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου μέσω του μηχανισμού ενυδάτωσης καθώς και όλες οι μορφοποιήσεις που προκύπτουν από αυτήν την διαδικασία αυτή, ππροστατεύονται από ευρωπαϊκό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ύστερα από σχετική αξιολόγηση PCT (WO2020165614A3, GR2020165614A3).

#### *Πολυαιθυλενογλυκοδικά εκχυλίσματα*

Το πολυαιθυλενογλυκοδικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές φόρμουλες.

- Διάλυμα

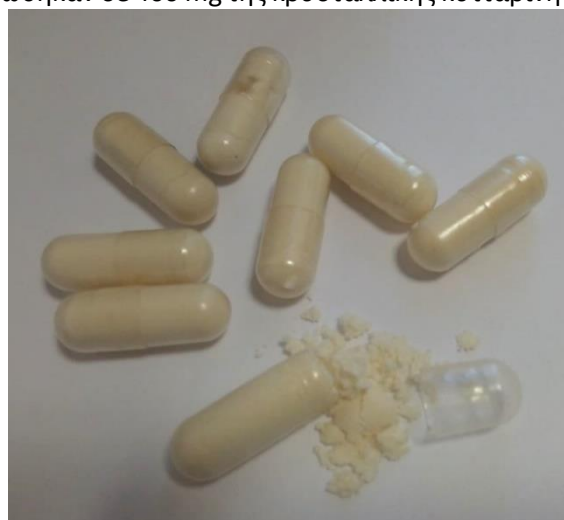
Τα πολυαιθυλενογλυκοδικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν έχουν την ιδιότητα, όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον (νερό, βιολογικά υγρά κα) να επαναφέρουν τα φαινοδικά συστατικά στην αρχική τους μορφή, αυτή χωρίς το μόριο της πολυαιθυλενογλυκόλης. Έτσι τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν συγκέντρωση 50g /Kg.

Η διαφορά με τα υδατικά εκχυλίσματα, είναι ότι στην περίπτωση αυτή, είναι δυνατόν να επιτευχθεί πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση. Έτσι το συγκεκριμένο εκχύλισμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε απευθείας ως πολυαιθυλενογλυκοδικό διάλυμα, είτε ως διάλυμα που αραιώνεται σε νερό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως πόσιμο διάλυμα ή ενέσιμο διάλυμα.

- Σκληρές κάψουλες.

Το πολυαιθυλενογλυκοδικό διάλυμα ενσωματώθηκε σε μικροκρυσταλλική κυτταρίνη παρασκευάζοντας μίγμα που στην συνέχεια προστέθηκε σε σκληρές κάψουλες μεγέθους 1. Συγκεκριμένα 200 mg του εκχυλίσματος ενσωματώθηκαν σε 400 mg της κρυσταλλικής κυτταρίνης και 600 mg του τελικού μίγματος προστέθηκαν σε σκληρές κάψουλες.

Για την παραπάνω διαδικασία αντίδρασης των φαινοδικών συστατικών ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη με την πολυαιθυλενογλυκόλη, εκχύλισης και μορφοποίησης τους, έχει χορηγηθεί δίπλωμα ευρωπαϊκής ευρεσιτεχνίας ύστερα από σχετική αξιολόγηση PCT (WO2020165614A3, GR2020165614A3).



**Εικόνα 5.73:** Σκληρές Κάψουλες PEG-OLE

## 5.6 Συμπεράσματα.

Όσο αυξάνονται οι μελέτες γύρω από τις βιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, τόσο στρέφεται και το ενδιαφέρον γύρω από μια πιθανή αξιοποίησή τους από την βιομηχανία. Βασικές παράμετροι στην προσπάθεια ανάπτυξης νέων μεθόδων για την αξιοποίηση αυτή, αποτελούν η εξεύρεση της κατάλληλης πρώτης ύλης και η ανάπτυξη πράσινων τεχνικών για την απομόνωσή τους.

Η απώλεια των φαινολικών συστατικών κατά το στάδιο της φυγοκέντρωσης του ελαιολάδου από τους κάθετους διαχωριστήρες του ελαιοτριβείου, αποτέλεσε την αφετηρία της μελέτης που ακολουθήθηκε πάνω στα υδατικά εκχυλίσματα του ελαιολάδου.

Η επαφή του νερού με το ελαιόλαδο, έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση των φαινολικών συστατικών στην φάση της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου για την παραγωγή του ελαιολάδου. Η μείωση αυτή μάλιστα αυξάνεται όσο αυξάνεται η αναλογία της υδατικής φάσης, και όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Ύστερα από λήψη φασμάτων της υδατικής φάσης, διαπιστώθηκε ότι η μείωση αυτή δεν οφείλεται στην αποδόμηση των συστατικών, αλλά στην σταδιακή μεταφορά των συστατικών στην υδατική φάση.

Ύστερα από εκχύλιση του ελαιολάδου απευθείας με δευτεριωμένο νερό, αλλά και διάλυσης των συστατικών ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη σε D<sub>2</sub>O προέκυψε, ότι η μεταφορά των φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση, πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού ενυδάτωσης της αλδεϋδομάδας που βρίσκεται και στα δύο μόρια στην θέση 3. Οι ενυδατωμένες μορφές μάλιστα, βρίσκονται σε ισορροπία με την διαλδεϋδική μορφή η οποία παραμένει και αυτή στην υδατική φάση σε πολύ μικρό ποσοστό. Η συγκέντρωση των συστατικών που επιτυγχάνεται είναι 1.7 g/L για την ελαιοκανθαδιόλη και 5.6 g/L για την ελαισινοδιόλη. Μετά την εξάτμιση του εκχυλίσματος, τα συστατικά επανέρχονται στην αρχική τους μορφή. Ο παραπάνω μηχανισμός, αποτέλεσε και μια νέα μέθοδο απομόνωσης φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο, ο οποίος εφαρμόστηκε σε ημι-βιομηχανική κλίμακα, οδηγώντας για πρώτη φορά σε ανάκτηση ξηρού εκχυλίσματος βάρους 140 g. Η μέθοδος εκχύλισης των φαινολικών συστατικών η οποία οδήγησε σε νέα φαρμακοτεχνικά προϊόντα, που προστατεύονται από δίπλωμα ευρεσιτεχνίας.

Σε επόμενο στάδιο, με σκοπό να αποφευχθούν οι μεγάλοι όγκοι του νερού που δημιουργούνται από την παραπάνω διαδικασία, αλλά και για την αποτελεσματικότερη εκχύλιση και μορφοποίηση των φαινολικών συστατικών, αναπτύχθηκε μια νέα πρωτότυπη μέθοδος απομόνωσης, αυτή την φορά με την χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG200 και PEG400).

Η πολυαιθυλενογλυκόλη, έχει την δυνατότητα να αντιδρά επιλεκτικά με τα φαινολικά συστατικά, με τον ίδιο μηχανισμό, όπως και στην περίπτωση με το νερό στην αλδεϋδη της θέσης 3,


σχηματίζοντας νέα μόρια, της πολυαιθυλενογλυκολικές μορφές της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Τα νέα αυτά μόρια, έχουν την ιδιότητα, όταν βρίσκονται σε υδατικό περιβάλλον, να απελευθερώνουν τα μόρια του PEG και τα σεκοϊριδοειδή να επανέρχονται στην αρχική τους μορφή. Με την μέθοδο αυτή, επιτυγχάνεται η απομόνωση των φαινολικών συστατικών με την χρήση πολύ λιγότερου διαλύτη, ενώ η βιοσυμβατότητα της πολυαιθυλενογλυκόλης επιτρέπει την δυνατότητα απευθείας μορφοποίησης του εκχυλίσματος σε σκληρές κάψουλες.

Όπως και στην περίπτωση των υδατικών εκχυλίσεων, η μέθοδος απομόνωσης εφαρμόστηκε και σε ημι-βιομηχανική κλίμακα με απομόνωση των φαινολικών συστατικών από 250 L ελαιολάδου. Για την μέθοδο αυτή, έχει χορηγηθεί δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και στην παρούσα φάση βρίσκεται στο στάδιο της περαιτέρω ανάπτυξης με τελικό στόχο την παρασκευή σε πρώτη φάση συμπληρώματος διατροφής και στην συνέχεια καθαρά φαρμακευτικού προϊόντος.



Article

## Influence of Harvest Time and Malaxation Conditions on the Concentration of Individual Phenols in Extra Virgin Olive Oil Related to Its Healthy Properties

Panagiotis Diamantakos, Triada Giannara, Maria Skarkou, Eleni Melliou and Prokopios Magiatis \* 

Laboratory of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, Athens 15771, Greece; totisdiam@hotmail.com (P.D.); tr.giannara@outlook.com.gr (T.G.); maria\_skarkou@outlook.com.gr (M.S.); emelliou@pharm.uoa.gr (E.M.)

\* Correspondence: magiatis@pharm.uoa.gr

Academic Editor: Roberto Fabiani

Received: 28 April 2020; Accepted: 21 May 2020; Published: 24 May 2020



**Abstract:** The phenolic fraction of the extra virgin olive oil (EVOO) has been studied over the past two decades because of its important health protective properties. Numerous studies have been performed in order to clarify the most crucial factors that affect the concentration of the EVOO's phenolic fraction and many contradictory results have been reported. Having as target to maximize the phenolic content of EVOO and its healthy properties we investigated the impact of harvest time, malaxation temperature, and malaxation duration on the concentration of individual phenols in extra virgin olive oil. Olive oil was prepared in a lab-scale olive mill from different varieties in Greece. The extraction process for cultivar (cv) Koroneiki samples was performed at five different harvest periods from the same trees with three different malaxation temperatures and five different malaxation duration times (N = 75). Similar types of experiments were also performed for other varieties: cv Athenolia (N = 20), cv Olympia (N = 3), cv Kalamata (N = 3), and cv Throubolia Aegean (N=3) in order to compare the changes in the phenolic profile during malaxation. The quantitative analysis of the olive oil samples with NMR showed that the total phenolic content has a negative correlation with the ripening degree and the malaxation time. The NMR data we collected helped us to quantitate not only the total phenolic content but also the concentration of the major phenolic compounds such as oleocanthal, oleacein, oleokoronal, and oleomissional. We noticed different trends for the concentration of these phenols during malaxation process and for different malaxation temperatures. The different trends of the concentration of the individual phenols during malaxation and the completely different behavior of each variety revealed possible biosynthetic formation steps for oleocanthal and oleacein and may explain the discrepancies reported from previous studies.

**Keywords:** quantitative nuclear magnetic resonance; olive oil; malaxation; harvest; phenols; oleocanthal

## Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil

Panagiotis Diamantakos<sup>1</sup>, Angeliki Velkou<sup>2</sup>, K. Brian Killday<sup>3</sup>, Thanasis Gimisis<sup>2</sup>, Eleni Melliou<sup>1,4</sup> and Prokopios Magiatis<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis-Zografou, Athens, Greece

<sup>2</sup> Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Zografou, Athens, Greece

<sup>3</sup> Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA

<sup>4</sup> Department of Physiology and Biophysics, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 7274052. E-mail: magiatis@pharm.uoa.gr

### Abstract

Extra virgin olive oil contains significant quantities of polar phenolic ingredients. The large majority is made up of esters of tyrosol or hydroxytyrosol with secoiridoid derivatives from oleuropein or ligstroside. In the current study we describe a number of new or incompletely characterized forms of ligstroside and oleuropein aglycons. Two of them which are stable enolic forms are described for the first time as real olive oil ingredients although their presence in olive oil had been postulated. To minimize the confusion with the complicated names of the aglycon isomers we propose the names oleokoronal and oleomissional for the two ingredients. After screening 2000 samples of olive oil from most major varieties we were able to identify samples of olive oil in which oleokoronal and oleomissional were the major phenolic ingredients and could be used as starting material for their isolation. Interestingly, during normal or reversed phase chromatography both compounds were transformed to the known forms of monoaldehydic closed ring aglycons, which offers an explanation as to why those compounds had not been identified so far. Their real presence in olive oil was confirmed by direct NMR observation without the use of any solvent.

### Key words

Phenolics, secoiridoids, ligstroside aglycon, oleuropein aglycon, olive oil, NMR.

Priorities GR20190100077A-2019-02-13  
Application GR2020000015W-2020-02-11  
Publication WO2020165614A2-2020-08-20

Published as **GR20190100077A; WO2020165614A2; WO2020165614A3**

EN FR

## METHOD FOR OBTAINING OLEOCANTHAL TYPE SECOIRIDOIDS AND FOR PRODUCING RESPECTIVE PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

### Abstract

The present invention relates to the method for obtaining in pure form or as a mixture of the bioactive diol forms of the main secoiridoid phenols present in olive oil and certain isomeric forms or derivatives thereof. Specifically, it relates to the production process of S-(E)-oleocanthadiol, S-(E)-oleaceinediol, 5S-(E)-oleomissionadiol, 5S-(E)-oleokoronadiol, oleuropeinediol and ligstrodiol and their corresponding polyethylene glycol hemiacetals through extraction of specifically selected olive oil with polyethylene glycol and then treated with water. It also relates to the pharmaceutical preparations containing the above substances in various combinations and the therapeutic properties of these preparations for the treatment of cancer, degenerative diseases of the central nervous system, diabetes, hyperlipidemia, inflammatory diseases and the prevention of creation of atherosclerotic plaques and thrombi.

## 7. Βιβλιογραφία

- Abbadi, J., Ibrahim Affaneh, Z. Ayyad, F. Al Rimawi, W. Sultan, and Khalid Kanaan. 2014. "Evaluation of the Effect of Packaging Materials and Storage Temperatures on Quality Degradation of Extra Virgin Olive Oil from Olives Grown in Palestine - Semantic Scholar." *Science and Education* 2 (5): 62–174. <https://doi.org/10.12691/ajfst-2-5-5>.
- Abuznait, Alaa H., Hisham Qosa, Belnaser A. Busnena, Khalid A. El Sayed, and A. Kaddoumi. 2013. "Olive-Oil-Derived Oleocanthal Enhances  $\beta$ -Amyloid Clearance as a Potential Neuroprotective Mechanism against Alzheimer's Disease: In Vitro and in Vivo Studies." *ACS Chemical Neuroscience* 4 (6): 973–82. <https://doi.org/10.1021/cn400024q>.
- Adhami, Hamid-Reza, M. Zehl, C.Dangl, D. Dorfmeister, M. Stadler, E. Urban, P. Hewitson, S. Ignatova, and L. Krenn. 2015. "Preparative Isolation of Oleocanthal, Tyrosol, and Hydroxytyrosol from Olive Oil by HPLC." *Food Chemistry* 170 (March): 154–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.079>.
- Agrawal, Karan, E.Melliou, X. Li, T. L. Pedersen, S. C. Wang, P. Magiatis, J. W. Newman, and R. R. Holt. 2017. "Oleocanthal-Rich Extra Virgin Olive Oil Demonstrates Acute Anti-Platelet Effects in Healthy Men in a Randomized Trial." *Journal of Functional Foods* 36 (September): 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.046>.
- Aguilera, M.P. 2015. "Modulation of Bitterness and Pungency in Virgin Olive Oil from Unripe 'Picual' Fruits - Aguilera - 2015 - European Journal of Lipid Science and Technology - Wiley Online Library." *European Journal of Lipid Science and Technology*, 10.1002/ejlt.201400432, 117 (9): 1463–72.
- Akl, Mohamed R., N. M. Ayoub, M. M. Mohyeldin, B. A. Busnena, A. I. Foudah, Yong-Yu Liu, and Khalid A. Ei Sayed. 2014. "Olive Phenolics as C-Met Inhibitors: (-)-Oleocanthal Attenuates Cell Proliferation, Invasiveness, and Tumor Growth in Breast Cancer Models." *PLoS One* 9 (5): e97622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097622>.
- Al-Ismail, Khalid M., Ali K. Alsaed, R. Ahmad, and M. Al-Dabbas. 2010. "Detection of Olive Oil Adulteration with Some Plant Oils by GLC Analysis of Sterols Using Polar Column." *Food Chemistry* 121 (4): 1255–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.016>.
- Alves, Francieli C. G. B. S., A. Coqueiro, P. H. Marçó, and P. Valderrama. 2019. "Evaluation of Olive Oils from the Mediterranean Region by UV–Vis Spectroscopy and Independent Component Analysis." *Food Chemistry*, 8th Brazilian Workshop of Chemometrics: Application of Chemometrics techniques in food chemistry, 273 (February): 124–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.126>.

- Amereih, S, Z. Barghouthi, and O. Marowan. 2014. "Detection and Quantification of Adulteration in Olive Oil Using a UV- Spectrophotometric Method." *Palestine Technical University*. [https://www.researchgate.net/publication/260532786\\_Detection\\_and\\_Quantification\\_of\\_Adulteration\\_in\\_Olive\\_Oil\\_using\\_a\\_UV-Spectrophotometric\\_Method](https://www.researchgate.net/publication/260532786_Detection_and_Quantification_of_Adulteration_in_Olive_Oil_using_a_UV-Spectrophotometric_Method).
- Amirante, P., Maria Lisa Clodoveo, A. Tamborrino, A. Leone, and A. G. Paice. 2010. "Chapter 8 - Influence of the Crushing System: Phenol Content in Virgin Olive Oil Produced from Whole and De-Stoned Pastes." In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, edited by Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson, 69–76. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00008-5>.
- Angelis, A., Mahmoud Hamzaoui, N. Aligiannis, T. Nikou, D. Michailidis, P. Gerolimos, A. Termentzi, et al. 2017. "An Integrated Process for the Recovery of High Added-Value Compounds from Olive Oil Using Solid Support Free Liquid-Liquid Extraction and Chromatography Techniques." *Journal of Chromatography A* 1491 (March): 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>.
- Angerosa, F., N. d’Alessandro, P. Konstantinou, and L. Di Giacinto. 1995. "GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (7): 1802–7. <https://doi.org/10.1021/jf00055a010>.
- Angerosa, F., R. Mostallino, C. Basti, and R. Vito. 2001. "Influence of Malaxation Temperature and Time on the Quality of Virgin Olive Oils." *Food Chemistry* 72 (1): 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00194-1).
- Aparicio, R., L. Roda, M. A. Albi, and F. Gutiérrez. 1999. "Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10): 4150–55. <https://doi.org/10.1021/jf9812230>.
- Aparicio, Ramón, and Guadalupe Luna. 2002. "Characterisation of Monovarietal Virgin Olive Oils." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (9–10): 614–27. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L).
- Atkins, P., and Julio de Paula. 2009. *Physical Chemistry, 9th Edition*. 9th edition. New York: W. H. Freeman.
- Aturki, Z., S. Fanali, G. D’Orazio, A. Rocco, and C. Rosati. 2008. "Analysis of Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil by Using Reversed-Phase Capillary Electrochromatography." *Electrophoresis* 29 (8): 1643–50. <https://doi.org/10.1002/elps.200700547>.
- Ayoub, Nehad M., A. B.Siddique, H.. Ebrahim, M.M. Mohyeldin, and Khalid. A. El Sayed. 2017. "The Olive Oil Phenolic (-)-Oleocanthal Modulates Estrogen Receptor Expression in Luminal Breast Cancer in Vitro and in Vivo and Synergizes with Tamoxifen Treatment." *European*

*Journal of Pharmacology* 810 (September): 100–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.019>.

- Baccouri, O., M. Guerfel, B. Baccouri, L. Cerretani, A. Bendini, G. Lercker, M. Zarrouk, and D. Daoud Ben Miled. 2008. "Chemical Composition and Oxidative Stability of Tunisian Monovarietal Virgin Olive Oils with Regard to Fruit Ripening." *Food Chemistry* 109 (4): 743–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.034>.
- Batarseh, Yazan S., and A. Kaddoumi. 2018. "Oleocanthal-Rich Extra-Virgin Olive Oil Enhances Donepezil Effect by Reducing Amyloid- $\beta$  Load and Related Toxicity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 55 (May): 113–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.006>.
- Batarseh, Yazan S., Loqman A. Mohamed, S. B. Al Rihani, Youssef M. Mousa, Abu Bakar Siddique, Khalid A. El Sayed, and Amal Kaddoumi. 2017. "Oleocanthal Ameliorates Amyloid- $\beta$  Oligomers' Toxicity on Astrocytes and Neuronal Cells: In Vitro Studies." *Neuroscience* 352 (June): 204–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.059>.
- Beauchamp, G. K., Russell S. J. Keast, D. Morel, J. Lin, Jana Pika, Q. Han, Chi-Ho Lee, A. B. Smith, and P. A. S. Breslin. 2005. "Phytochemistry: Ibuprofen-like Activity in Extra-Virgin Olive Oil." *Nature* 437 (7055): 45–46. <https://doi.org/10.1038/437045a>.
- Becerra-Herrera, Mercedes, M. Sánchez-Astudillo, R. Beltrán, and A. Sayago. 2014. "Determination of Phenolic Compounds in Olive Oil: New Method Based on Liquid–Liquid Micro Extraction and Ultra High Performance Liquid Chromatography–Triple–Quadrupole Mass Spectrometry." *LWT - Food Science and Technology* 57 (1): 49–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.016>.
- Ben Youssef, Nabil, W. Zarrouk, A. Carrasco-Pancorbo, Youssef Ouni, A. Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez, Douja Daoud, and Mokhtar Zarrouk. 2010. "Effect of Olive Ripeness on Chemical Properties and Phenolic Composition of Chétoui Virgin Olive Oil." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (2): 199–204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3784>.
- Bendini, A., M. Bonoli, L. Cerretani, B. Biguzzi, G. Lercker, and T. G. Toschi. 2003. "Liquid-Liquid and Solid-Phase Extractions of Phenols from Virgin Olive Oil and Their Separation by Chromatographic and Electrophoretic Methods." *Journal of Chromatography. A* 985 (1–2): 425–33. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)01460-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)01460-7).
- Berk, Zeki. 2013. "Chapter 11 - Extraction." In *Food Process Engineering and Technology (Second Edition)*, edited by Zeki Berk, 287–309. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00011-3>.

- Boselli, E., G. di Lecce, R. Strabbioli, G. Peralisi, and N. G. Frega. 2009. "Are Virgin Olive Oils Obtained below 27°C Better than Those Produced at Higher Temperatures?" *LWT - Food Science and Technology* 42 (3): 748–57.
- Boskou, D.. 2006. "Sources of Natural Phenolic Antioxidants." *Trends in Food Science & Technology*, INTRADFOODS, 17 (9): 505–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.004>.
- Brenes, M., A. García, P. García, and A. Garrido. 2000. "Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5178–83. <https://doi.org/10.1021/jf000686e>.
- Busnena, Belnaser A., Ahmed I. Foudah, T. Melancon, and Khalid A. El Sayed. 2013. "Olive Secoiridoids and Semisynthetic Bioisostere Analogues for the Control of Metastatic Breast Cancer." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (7): 2117–27. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.050>.
- Cacciola, S. O., R. Faedda, F. Sinatra, G. E. Agosteo, L. Schena, S. Frisullo, and G. Magnano di San Lio. 2012. "OLIVE ANTHRACNOSE." *Journal of Plant Pathology* 94 (1): 29–44. <https://doi.org/10.4454/JPPFA2011001>.
- Cassiano, Chiara, A. Casapullo, A. Tosco, M. C. Monti, and R. Riccio. 2015. "In Cell Interactome of Oleocanthal, an Extra Virgin Olive Oil Bioactive Component." *Natural Product Communications* 10 (6): 1013–16.
- Cerretani, L., T. G. Toschi, and A. Bendini. 2009. "Phenolic Fraction of Virgin Olive Oil : An Overview on Identified Compounds and Analytical Methods for Their Determination." 2009./paper/Phenolic-Fraction-of-Virgin-Olive-Oil-%3A-An-Overview-Cerretani-Toschi/eca7d081446d0429327c513948a0247a8a831ffa.
- Chambers, J. M., William S. Cleveland, Paul A. Tukey, and B. Kleiner. 1983. *Graphical Methods for Data Analysis*. 1st edition. Belmont, Calif. : Boston: Duxbury Press.
- Christensen, J., L. Nørgaard, R. Bro, and Søren Balling Engelsen. 2006. "Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems." *Chemical Reviews* 106 (6): 1979–94. <https://doi.org/10.1021/cr050019q>.
- Cicerale, S., X. A. Conlan, N. W. Barnett, and R. S. J. Keast. 2011. "The Concentration of Oleocanthal in Olive Oil Waste." *Natural Product Research* 25 (5): 542–48. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.511214>.
- Clodoveo, Maria Lisa. 2012. "Malaxation: Influence on Virgin Olive Oil Quality. Past, Present and Future – An Overview." *Trends in Food Science & Technology* 25 (1): 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.004>.

- Clodoveo, Maria Lisa, S. Camposeo, R. Amirante, G. Dugo, N. Cicero, and D. Boskou. 2015. "7 - Research and Innovative Approaches to Obtain Virgin Olive Oils with a Higher Level of Bioactive Constituents." In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, edited by Dimitrios Boskou, 179–215. AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50013-6>.
- Clodoveo, Maria Lisa, D. Delcuratolo, T.Gomes, and G. Colelli. 2007. "Effect of Different Temperatures and Storage Atmospheres on Coratina Olive Oil Quality." *Food Chemistry* 102 (3): 571–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.035>.
- CODEX STAN. 1981. "Codex Committee on Fats and Oils (CCFO)." Text. Food Safety - European Commission. 33 1981. [https://ec.europa.eu/food/safety/international\\_affairs/standard\\_setting\\_bodies/codex/ccfo\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/standard_setting_bodies/codex/ccfo_en).
- Conte, Lanfranco, A. Bendini, E. Valli, P. Lucci, S. Moret, A. Maquet, F. Lacoste, et al. 2019. "Olive Oil Quality and Authenticity: A Review of Current EU Legislation, Standards, Relevant Methods of Analyses, Their Drawbacks and Recommendations for the Future." *Trends in Food Science & Technology*, February. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.025>.
- Cramer, Duncan. 2003. *Fundamental Statistics for Social Research : Step-by-Step Calculations and Computer Techniques Using SPSS for Windows*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203360613>.
- Cramer, Duncan, and Dennis Howitt. 2004. *The SAGE Dictionary of Statistics*. 1 Oliver's Yard, 55 City Road, London England EC1Y 1SP United Kingdom: SAGE Publications, Ltd. <https://doi.org/10.4135/9780857020123>.
- Cusimano, Antonella, D. Balasus, A. Azzolina, G. Augello, Maria R. Emma, C.Di Sano, R. Gramignoli, et al. 2017. "Oleocanthal Exerts Antitumor Effects on Human Liver and Colon Cancer Cells through ROS Generation." *International Journal of Oncology* 51 (2): 533–44. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4049>.
- Dag, Arnon, S. Boim, Y. Sobotin, and I. Zipori. 2012. "Effect of Mechanically Harvested Olive Storage Temperature and Duration on Oil Quality." *HortTechnology* 22 (4): 528–33. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.22.4.528>.
- Dermeche, S., M. Nadour, C. Larroche, F. Moulti-Mati, and P. Michaud. 2013. "Olive Mill Wastes: Biochemical Characterizations and Valorization Strategies." *Process Biochemistry* 48 (10): 1532–52. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>.
- Di Giovacchino, Luciano. 2000. "Technological Aspects." In *Handbook of Olive Oil - Analysis and Properties* | Ramón Aparicio-Ruiz | Springer, 17–59. Aspen Publications. <https://www.springer.com/gp/book/9781461477761>.
- Di Giovacchino, Luciano, S. Sestili, and D. Di Vincenzo. 2002. "Influence of Olive Processing on Virgin Olive Oil Quality - Di Giovacchino - 2002 - European Journal of Lipid Science and



- Technology - Wiley Online Library." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (9–10): 587–601. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M).
- Diamantakos, Panagiotis, A. Velkou, B. Killday, T. Gimisis, E. Melliou, and P. Magiatis. 2015. "Oleokoronal and Oleomissional: New Major Phenolic Ingredients of Extra Virgin Olive Oil." *Olivae* 122: 22–32.
- Diez-Bello, R., I. Jardin, J. J. Lopez, M. El Haouari, J. Ortega-Vidal, J. Altarejos, G. M. Salido, S. Salido, and J. A. Rosado. 2019. "(-)-Oleocanthal Inhibits Proliferation and Migration by Modulating Ca<sup>2+</sup> Entry through TRPC6 in Breast Cancer Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866 (3): 474–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.010>.
- Doane, David P., and Lori E. Seward. 2011. "Measuring Skewness: A Forgotten Statistic?" *Journal of Statistics Education* 19 (2): null. <https://doi.org/10.1080/10691898.2011.11889611>.
- EC Regulation 2568. 1991. "The Characteristics of Olive Oil and Olive Residue Oil and Relevant Methods of Analysis." *Official Journal* 248 (6–7). <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/1991/2568/2015-10-16>.
- El Riachy, Milad, A. Hamade, R. Ayoub, F. Dandachi, and L. Chalak. 2019. "Oil Content, Fatty Acid and Phenolic Profiles of Some Olive Varieties Growing in Lebanon." *Frontiers in Nutrition* 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00094>.
- Elnagar, Ahmed Y., P. W. Sylvester, and Khalid A. El Sayed. 2011. "(-)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers." *Planta Medica* 77 (10): 1013–19. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270724>.
- El-Salam, Ahmed Samy M. Abd, M. Doheim, M.Z. Sitohy, and M. F. Ramadan. 2015. "Deacidification of High-Acid Olive Oil." In . <https://doi.org/10.4172/2157-7110.s5-001>.
- Endo, Yasushi, R. Usuki, and T. Kaneda. 1985. "Antioxidant Effects of Chlorophyll and Pheophytin on the Autoxidation of Oils in the Dark. I. Comparison of the Inhibitory Effects." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62 (9): 1375–78. <https://doi.org/10.1007/BF02545962>.
- Estanove, Cyril, F. PRUVOST, and F. SALDMANN. 2009. Procédé d'enrichissement d'un extrait contenant de l'oleocanthal. European Union EP2125692A1, filed January 21, 2008, and issued December 2, 2009. <https://patents.google.com/patent/EP2125692A1/en?q=oleocanthal>.
- Estruch, Ramón, E. Ros, Jordi Salas-Salvadó, M.-I. Covas, D. Corella, F. Arós, E. e Gómez-Gracia, et al. 2018. "Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts." *New England Journal of Medicine*, June. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>.

- EU reg. 2012/432. 2012. *Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 432/2012 της Επιτροπής, της 16ης Μαΐου 2012, σχετικά με τη θέσπιση καταλόγου επιτρεπόμενων ισχυρισμών υγείας που διατυπώνονται για τα τρόφιμα, εξαιρουμένων όσων αφορούν τη μείωση του κινδύνου εκδήλωσης ασθένειας και την ανάπτυξη και υγεία των παιδιών Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ. OJ L. Vol. 136. <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/432/oj/ell>.*
- Famiani, Franco, D. Farinelli, S. Urbani, R. Al Hariri, A. Paoletti, A. Rosati, S. Esposto, R. Selvaggini, A. Taticchi, and M. Servili. 2020. "Harvesting System and Fruit Storage Affect Basic Quality Parameters and Phenolic and Volatile Compounds of Oils from Intensive and Super-Intensive Olive Orchards." *Scientia Horticulturae* 263 (March): 109045. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109045>.
- Filipek, Agnieszka, M.E. Czerwińska, A. K. Kiss, J. A. Polański, and M.Naruszewicz. 2017. "Oleacein May Inhibit Destabilization of Carotid Plaques from Hypertensive Patients. Impact on High Mobility Group Protein-1." *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 32 (August): 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.06.004>.
- Filipek, Agnieszka, M. E. Czerwińska, Anna K. Kiss, M. Wrzosek, and M. Naruszewicz. 2015. "Oleacein Enhances Anti-Inflammatory Activity of Human Macrophages by Increasing CD163 Receptor Expression." *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 22 (14): 1255–61. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.10.005>.
- Fogli, Stefano, C. Arena, S. Carpi, B. Polini, S. Bertini, M. Digiacomo, F. Gado, et al. 2016. "Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells." *Nutrition and Cancer* 68 (5): 873–77. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1180407>.
- Frankel, Edwin, A. Bakhouché, J. Lozano-Sánchez, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez. 2013. "Literature Review on Production Process to Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (22): 5179–88. <https://doi.org/10.1021/jf400806z>.
- Frankel, Edwin N. 2012. "Chapter 1 - Free Radical Oxidation." In *Lipid Oxidation (Second Edition)*, edited by Edwin N. Frankel, 15–24. Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857097927.15>.
- Fratoddi, Ilaria, M. Rapa, G. Testa, I. Venditti, F. A.Scaramuzzo, and G. Vinci. 2018. "Response Surface Methodology for the Optimization of Phenolic Compounds Extraction from Extra Virgin Olive Oil with Functionalized Gold Nanoparticles." *Microchemical Journal* 138 (May): 430–37. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.01.043>.

- Fuentes, Edwar, M. E. Báez, M. Bravo, C. Cid, and F. Labra. 2012. "Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV–Visible Spectrometry and Multivariate Calibration." *Food Analytical Methods* 5 (6): 1311–19. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9379-5>.
- Fuentes, Edwar, F. Paucar, F. Tapia, J. Ortiz, P. Jimenez, and N. Romero. 2018. "Effect of the Composition of Extra Virgin Olive Oils on the Differentiation and Antioxidant Capacities of Twelve Monovarietals." *Food Chemistry* 243 (March): 285–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.130>.
- García, Aranzazu, M. Brenes, F. Martínez, J. Alba, P. García, and A. Garrido. 2001. "High-Performance Liquid Chromatography Evaluation of Phenols in Virgin Olive Oil during Extraction at Laboratory and Industrial Scale." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78 (6): 625–29. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0316-x>.
- García-Rodríguez, Rosa, . Belaj, C. Romero-Segura, C. Sanz, and A. G. Pérez. 2017. "Exploration of Genetic Resources to Improve the Functional Quality of Virgin Olive Oil." *Journal of Functional Foods* 38 (November): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.043>.
- Gebreyohannes, Abaynesh Yihdego, R. Mazzei, and L. Giorno. 2016. "Trends and Current Practices of Olive Mill Wastewater Treatment: Application of Integrated Membrane Process and Its Future Perspective." *Separation and Purification Technology* 162 (April): 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.02.001>.
- Gelpí, Emilio, M. Posada de la Paz, B. Terracini, I. Abaitua, A. Gómez de la Cámara, E. M Kilbourne, Carlos Lahoz, et al. 2002. "The Spanish Toxic Oil Syndrome 20 Years after Its Onset: A Multidisciplinary Review of Scientific Knowledge." *Environmental Health Perspectives* 110 (5): 457–64.
- Giovacchino, Luciano Di, N. Costantini, A. Serraiocco, G. Surricchio, and C.. Basti. 2001. "Natural Antioxidants and Volatile Compounds of Virgin Olive Oils Obtained by Two or Three-Phases Centrifugal Decanters." *European Journal of Lipid Science and Technology* 103 (5): 279–85. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200105\)103:5<279::AID-EJLT279>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200105)103:5<279::AID-EJLT279>3.0.CO;2-I).
- Gómez-Caravaca, Ana María, A. Segura-Carretero, A. Martínez-Férez, and J.r M. Ochando-Pulido. 2017. "Chapter 14 - Recovery of Phenolic Compounds From Olive Oil Mill Wastewaters by Physicochemical Methodologies." In *Food Bioconversion*, edited by Alexandru Mihai Grumezescu and Alina Maria Holban, 467–89. Handbook of Food Bioengineering. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811413-1.00014-0>.
- Gómez-Rico, Aurora, A. M. Inarejos-García, M. D. Salvador, and G.Fregapane. 2009. "Effect of Malaxation Conditions on Phenol and Volatile Profiles in Olive Paste and the Corresponding Virgin Olive Oils (Olea Europaea L. Cv. Cornicabra)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (9): 3587–95. <https://doi.org/10.1021/jf803505w>.

- Gonçalves, Rhayanna P., P. H. Março, and P. Valderrama. 2014. "Thermal Edible Oil Evaluation by UV–Vis Spectroscopy and Chemometrics." *Food Chemistry* 163 (November): 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.109>.
- Goula, Athanasia M., and D. Gerasopoulos. 2017. "Integrated Olive Mill Waste (OMW) Processing toward Complete by-Product Recovery of Functional Components." In *Olives and Olive Oil as Functional Foods*, 177–204. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119135340.ch9>.
- Grewal, Rekha, M.Reutzler, B. Dilberger, H. Hein, J. Zotzel, S. Marx, J. Tretzel, A. Sarafeddin, C.Fuchs, and Gunter P. Eckert. 2020. "Purified Oleocanthal and Ligstroside Protect against Mitochondrial Dysfunction in Models of Early Alzheimer’s Disease and Brain Ageing." *Experimental Neurology* 328 (June): 113248. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113248>.
- Grilo, Evellyn Câmara, P.. Nunes Costa, C. Santos Sânzio Gurgel, A. F. de Lima Beserra, F. Niéce de Souza Almeida, and R. Dimenstein. 2014. "Alpha-Tocopherol and Gamma-Tocopherol Concentration in Vegetable Oils." *Food Science and Technology* 34 (2): 379–85. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000031>.
- Grossi, Cristina, S. Rigacci, S. Ambrosini, T. Ed Dami, I. Luccarini, C. Traini, P. Failli, A. Berti, F. Casamenti, and M. Stefani. 2013. "The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A $\beta$  Plaque Pathology." *PloS One* 8 (8): e71702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071702>.
- Grossi, Marco, R. Palagano, A. Bendini, B. Riccò, M. Servili, D. L. García-González, and T. Gallina Toschi. 2019. "Design and In-House Validation of a Portable System for the Determination of Free Acidity in Virgin Olive Oil." *Food Control* 104 (October): 208–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.019>.
- Gu, Yanli, J.Wang, and L. Peng. 2017. "(-)-Oleocanthal Exerts Anti-Melanoma Activities and Inhibits STAT3 Signaling Pathway." *Oncology Reports* 37 (1): 483–91. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5270>.
- Guimet, Francesca, J. Ferré, R. Boqué, M. Vidal, and J. Garcia. 2005. "Excitation-Emission Fluorescence Spectroscopy Combined with Three-Way Methods of Analysis as a Complementary Technique for Olive Oil Characterization." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (24): 9319–28. <https://doi.org/10.1021/jf051237n>.
- Gutiérrez, F., and J. L. Fernández. 2002. "Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of Storage Time beyond Which the Oil Is No Longer of ‘Extra’ Quality." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (3): 571–77. <https://doi.org/10.1021/jf0102158>.

- Hachicha Hbaieb, Rim, F. Kotti, N. Cortes-Francisco, J. Caixach, M. Gargouri, and S. Vichi. 2016. "Ripening and Storage Conditions of Chétoui and Arbequina Olives: Part II. Effect on Olive Endogenous Enzymes and Virgin Olive Oil Secoiridoid Profile Determined by High Resolution Mass Spectrometry." *Food Chemistry* 210 (November): 631–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.026>.
- Hardman, Roy J., G. Kennedy, Helen Macpherson, A. B. Scholey, and A. Pipingas. 2016. "Adherence to a Mediterranean-Style Diet and Effects on Cognition in Adults: A Qualitative Evaluation and Systematic Review of Longitudinal and Prospective Trials." *Frontiers in Nutrition* 3: 22. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00022>.
- Harwood, J. L., and Joaquín J. Salas. 2013. "Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components |." In *Handbook of Olive Oil*. SpringerLink. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-7777-8\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-7777-8_4).
- Hennion, M. C. 1999. "Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography." *Journal of Chromatography. A* 856 (1–2): 3–54. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00832-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00832-8).
- Hidalgo-Mora, Juan José, A. García-Vigara, M. Luz Sánchez-Sánchez, M.-Á. García-Pérez, J. Tarín, and A. Cano. 2020. "The Mediterranean Diet: A Historical Perspective on Food for Health." *Maturitas* 132 (February): 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2019.12.002>.
- Hrncirik, Karel, and S. Fritsche. 2004. "Comparability and Reliability of Different Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil." *European Journal of Lipid Science and Technology* 106 (8): 540–49. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200400942>.
- Iacono, Anna, R. Gómez, J. Sperry, J. Conde, G. Bianco, R. Meli, J. J. Gómez-Reino, A. B. Smith, and O. Gualillo. 2010. "Effect of Oleocanthal and Its Derivatives on Inflammatory Response Induced by Lipopolysaccharide in a Murine Chondrocyte Cell Line." *Arthritis and Rheumatism* 62 (6): 1675–82. <https://doi.org/10.1002/art.27437>.
- Inarejos-García, Antonio, A. Gómez-Rico, M. D. Salvador, and G. Fregapane. 2009. "Influence of Malaxation Conditions on Virgin Olive Oil Yield, Overall Quality and Composition | SpringerLink." *European Food Research and Technology* 228 (4): 671–99. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0977-9>.
- Jabeur, Hazem, A. Zribi, and M. Bouaziz. 2017. "Detection of Extra Virgin Olive Oil Adulteration." In *Olives and Olive Oil as Functional Foods*, 537–53. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119135340.ch29>.
- Jerman Klen, T., and B. M. Vodopivec. 2012. "Optimisation of Olive Oil Phenol Extraction Conditions Using a High-Power Probe Ultrasonication." *Food Chemistry* 134 (4): 2481–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.096>.

- Jimenez, Brigida. 2014. "Influence of the Malaxation Time and Olive Ripening Stage on Oil Quality and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oils - Jiménez - 2014 - International Journal of Food Science & Technology - Wiley Online Library." *Food Science and Technology* 49 (11): 2521–27.
- Jolayemi, Olusola Samuel, F. Tokatli, and B. Ozen. 2016. "Effects of Malaxation Temperature and Harvest Time on the Chemical Characteristics of Olive Oils." *Food Chemistry* 211 (November): 776–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.134>.
- Kalogeropoulos, Nick, and M. Z. Tsimidou. 2014. "Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils." *Antioxidants* 3 (2): 387–413. <https://doi.org/10.3390/antiox3020387>.
- Kamal-Eldin, Afaf. 2006. "Effect of Fatty Acids and Tocopherols on the Oxidative Stability of Vegetable Oils." *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (12): 1051–61. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600090>.
- Kapellakis, Iosif Emmanouil, K. P. Tsagarakis, and J. C. Crowther. 2008. "Olive Oil History, Production and by-Product Management." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7 (1): 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9>.
- Karkoula, Evangelia, A. Skantzari, E. Melliou, and P. Magiatis. 2012. "Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative (1)H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (47): 11696–703. <https://doi.org/10.1021/jf3032765>.
- Karkoula, Evangelia, 2014. "Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using QNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (3): 600–607. <https://doi.org/10.1021/jf404421p>.
- Keys, A., N. Kimura, A. Kuskawa, B. Bronte-Stewart, N. Larsen, and M. H. Keys. 1958. "Lessons from Serum Cholesterol Studies in Japan, Hawaii and Los Angeles." *Annals of Internal Medicine* 48 (1): 83–94. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-48-1-83>.
- Khanfar, Mohammad A., S. K. Bardaweel, M. R. Akl, and K.A. El Sayed. 2015. "Olive Oil-Derived Oleocanthal as Potent Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin: Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies." *Phytotherapy Research: PTR* 29 (11): 1776–82. <https://doi.org/10.1002/ptr.5434>.
- Khoufi, Sonia, F. Aloui, and S. Sayadi. 2008. "Extraction of Antioxidants from Olive Mill Wastewater and Electro-Coagulation of Exhausted Fraction to Reduce Its Toxicity on Anaerobic Digestion." *Journal of Hazardous Materials* 151 (2–3): 531–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.017>.

- Kiritsakis, A., G. D. Nanos, Z. Polymenopoulos, T. Thomai, and E. M. Sfakiotakis. 1998. "Effect of Fruit Storage Conditions on Olive Oil Quality." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (6): 721–24. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0212-7>.
- Kiritsakis, Apostolos, and F. Shahidi. 2017. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons.
- Kong, F., and R. P. Singh. 2011. "12 - Advances in Instrumental Methods to Determine Food Quality Deterioration." In *Food and Beverage Stability and Shelf Life*, edited by David Kilcast and Persis Subramaniam, 381–404. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857092540.2.381>.
- Kostelenos, Giorgos, and A. Kiritsakis. 2017. "Olive Tree History and Evolution." In *Olives and Olive Oil as Functional Foods*, 1–12. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119135340.ch1>.
- Kostelenos, Γ. 2011. *Στοιχεία Ελαιοκωμίας - Ιστορία, Περιγραφή Και Γεωγραφική Κατανομή Των Ποικιλιών Της Ελιάς Στην Ελλάδα*. Α. Πόρος Τροιζηνίας: Κωστελένος.
- Krichene, D., A. Allalout, V. Mancebo-Campos, M. D. Salvador, M. Zarrouk, and G. Fregapane. 2010. "Stability of Virgin Olive Oil and Behaviour of Its Natural Antioxidants under Medium Temperature Accelerated Storage Conditions." *Food Chemistry* 121 (1): 171–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.026>.
- Krinsky, N. I. 1989. "Antioxidant Functions of Carotenoids." *Free Radical Biology & Medicine* 7 (6): 617–35. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90143-3).
- Kris-Etherton Penny M. 1999. "Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease." *Circulation* 100 (11): 1253–58. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.11.1253>.
- LeGendre, Onica, P. As Breslin, and D. A. Foster. 2015. "(-)-Oleocanthal Rapidly and Selectively Induces Cancer Cell Death via Lysosomal Membrane Permeabilization." *Molecular & Cellular Oncology* 2 (4): e1006077. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1006077>.
- Leon- Camacho, Manuel, R. Aparicio, and Morales. n.d. "Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Traceability Issues | Semantic Scholar." In . Accessed February 28, 2020. <https://www.semanticscholar.org/paper/Chromatographic-Methodologies%3A-Compounds-for-Olive-Le%3%B3n-Camacho-Morales/575f1d954e3fd817534f2ae44198b1fd05076269>.
- Leouifoudi, Inass, A. Ziad, A. Amechrouq, M. A. Oukerrou, H. Ait Mouse, and M. Mbarki. 2014. "Identification and Characterisation of Phenolic Compounds Extracted from Moroccan Olive Mill Wastewater." *Food Science and Technology* 34 (2): 249–57. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0051>.

- Li, Wenkai, Jeffrey B. Sperry, A. Crowe, J. Q. Trojanowski, A. B. Smith Iii, and V. M.-Y. Lee. 2009. "Inhibition of Tau Fibrillization by Oleocanthal via Reaction with the Amino Groups of Tau." *Journal of Neurochemistry* 110 (4): 1339–51. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06224.x>.
- Lorgeril, M de, S Renaud, P Salen, I Monjaud, N Mamelle, J. L Martin, J Guidollet, P Touboul, and J Delaye. 1994. "Mediterranean Alpha-Linolenic Acid-Rich Diet in Secondary Prevention of Coronary Heart Disease." *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8911, 343 (8911): 1454–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92580-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92580-1).
- Lukić, Igor, M. Krapac, I. Horvat, S. Godena, U. Kosić, and K. Brkić Bubola. 2018. "Three-Factor Approach for Balancing the Concentrations of Phenols and Volatiles in Virgin Olive Oil from a Late-Ripening Olive Cultivar." *LWT* 87 (January): 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.082>.
- Lukić, Igor, M. Žanetić, M. Jukić Špika, M. Lukić, O. Koprivnjak, and K. Brkić Bubola. 2017. "Complex Interactive Effects of Ripening Degree, Malaxation Duration and Temperature on Oblica Cv. Virgin Olive Oil Phenols, Volatiles and Sensory Quality." *Food Chemistry* 232 (October): 610–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.047>.
- Mantzavinos, Dionissios, and N. Kalogerakis. 2005. "Treatment of Olive Mill Effluents Part I. Organic Matter Degradation by Chemical and Biological Processes--an Overview." *Environment International* 31 (2): 289–95. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.005>.
- Marangoni, Franca, C. Agostoni, C. Borghi, A. L. Catapano, H. Cena, A. Ghiselli, C. La Vecchia, et al. 2020. "Dietary Linoleic Acid and Human Health: Focus on Cardiovascular and Cardiometabolic Effects." *Atherosclerosis* 292 (January): 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.018>.
- Markou, Giorgos. 2010. "Balanced Waste Management of 2-and 3-Phase Olive Oil Mills in Relation to the Seed Oil Extraction Plant." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, April. [https://www.academia.edu/24893410/Balanced\\_Waste\\_Management\\_of\\_2-and\\_3-Phase\\_Olive\\_Oil\\_Mills\\_in\\_Relation\\_to\\_the\\_Seed\\_Oil\\_Extraction\\_Plant](https://www.academia.edu/24893410/Balanced_Waste_Management_of_2-and_3-Phase_Olive_Oil_Mills_in_Relation_to_the_Seed_Oil_Extraction_Plant).
- Martin, W.E., and K.D. Bridgmon. 2012. *Quantitative and Statistical Research Methods: From Hypothesis to Results*. 1 edition. Jossey-Bass.
- Matthäus, B. 2010. "Oxidation of Edible Oils." *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications. Volume 2: Management in Different Industry Sectors*, 183–238.
- Melena, José L. 1983. "Olive Oil and Other Sorts of Oil in the Mycenaean Tablets." *Minos*, 89-124.
- Melliou, Eleni, P. Diamantakos, and P. Magiatis. 2017. "New Analytical Trends for the Measurement of Phenolic Substances of Olive Oil and Olives with Significant Biological and Functional Importance Related to Health Claims - Olives and Olive Oil as Functional Foods



- Wiley Online Library." In *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing, First Edition*.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119135340.ch31>.
- Menendez, Javier A., A. Vazquez-Martin, R. Garcia-Villalba, A. Carrasco-Pancorbo, C. Oliveras-Ferraros, A. Fernandez-Gutierrez, and A. Segura-Carretero. 2008. "TabAnti-HER2 (ErbB-2) Oncogene Effects of Phenolic Compounds Directly Isolated from Commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO)." *BMC Cancer* 8 (December): 377. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-377>.
- Miho, H., C. M. Díez, A. Mena-Bravo, V. Sánchez de Medina, J. Moral, E. Melliou, P. Magiatis, L. Rallo, D. Barranco, and F. Priego-Capote. 2018. "Cultivar Influence on Variability in Olive Oil Phenolic Profiles Determined through an Extensive Germplasm Survey." *Food Chemistry* 266 (November): 192–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.002>.
- Miladinović, Dragana, J. Vollmann, L. Molinero-Ruiz, and M. Torres. 2019. *Advances in Oil Crops Research – Classical and New Approaches to Achieve Sustainable Productivity*. Frontiers Media SA.
- Milliken, G. A., and D. E. Johnson. 1993. *Analysis of Messy Data: Designed Experiments*. CRC Press.
- Minelli, Pierluca, and M. R. Montinari. 2019. "The Mediterranean Diet And Cardioprotection: Historical Overview And Current Research." *Journal of Multidisciplinary Healthcare* 12 (September): 805–15. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S219875>.
- Montedoro, Gian Francesco. 1992. "Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC | J." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (9): 1571–76.
- Monti, Maria Chiara, L. Margarucci, R. Riccio, and A. Casapullo. 2012. "Modulation of Tau Protein Fibrillization by Oleocanthal." *Journal of Natural Products* 75 (9): 1584–88. <https://doi.org/10.1021/np300384h>.
- Morales-Sillero, Ana, A.G. Pérez, L. Casanova, and J. M. García. 2017. "Cold Storage of 'Manzanilla de Sevilla' and 'Manzanilla Cacereña' Mill Olives from Super-High Density Orchards." *Food Chemistry* 237 (December): 1216–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.073>.
- Moyano, María José, F. J. Heredia, and A. J. Meléndez-Martínez. 2010. "The Color of Olive Oils: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. May 1, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00109.x>.
- Mozaffarian, Dariush, M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer, and W. C. Willett. 2006. "Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease." *The New England Journal of Medicine* 354 (15): 1601–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMra054035>.

- Naruszewicz, Marek, M. E. Czerwińska, and A.K. Kiss. 2015. "Oleacein. Translation from Mediterranean Diet to Potential Antiatherosclerotic Drug." *Current Pharmaceutical Design* 21 (9): 1205–12. <https://doi.org/10.2174/1381612820666141007141137>.
- Niaounakis, m, and N Halvadakis. 2006. *Olive Processing Waste Management, Volume 5 - 2nd Edition*. 2nd ed. Waste Managment Series. Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/olive-processing-waste-management/niaounakis/978-0-08-044851-0>.
- Obied, Hassan K., M. S. Allen, D. R. Bedgood, P. D. Prenzler, K. Robards, and R. Stockmann. 2005. "Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (4): 823–37. <https://doi.org/10.1021/jf048569x>.
- Obied, Hassan K., Danny R. Bedgood, P. D. Prenzler, and K. Robards. 2007. "Chemical Screening of Olive Biophenol Extracts by Hyphenated Liquid Chromatography." *Analytica Chimica Acta* 603 (2): 176–89. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.044>.
- Obied, Hassan K., P. D. Prenzler, D. Ryan, M. Servili, A. Taticchi, S. Esposto, and K. Robards. 2008. "Biosynthesis and Biotransformations of Phenol-Conjugated Oleosidic Secoiridoids from *Olea Europaea* L." *Natural Product Reports* 25 (6): 1167–79. <https://doi.org/10.1039/b719736e>.
- Owen, R. W., W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch. 2000. "Phenolic Compounds and Squalene in Olive Oils: The Concentration and Antioxidant Potential of Total Phenols, Simple Phenols, Secoiridoids, Lignans and Squalene." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 38 (8): 647–59. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00061-2).
- Paiva-Martins, Fátima, J. Fernandes, S. Rocha, H. Nascimento, R. Vitorino, F. Amado, F. Borges, Luís Belo, and A. Santos-Silva. 2009. "Effects of Olive Oil Polyphenols on Erythrocyte Oxidative Damage." *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (5): 609–16. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800276>.
- Papadopoulos, George, and D. Boskou. 1991. "Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil." *Journal of the American Oil Chemists Society* 68 (9): 669–71. <https://doi.org/10.1007/BF02662292>.
- Paradiso, Vito Michele, A. Clemente, C. Summo, A. Pasqualone, and F. Caponio. 2016. "Towards Green Analysis of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Extraction by a Natural Deep Eutectic Solvent and Direct Spectrophotometric Detection." *Food Chemistry* 212 (December): 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.082>.
- Paredes, C., J. Cegarra, A. Roig, M. A. Sánchez-Monedero, and M. P. Bernal. 1999. "Characterization of Olive Mill Wastewater (Alpechin) and Its Sludge for Agricultural

- Purposes.” *Bioresource Technology* 67 (2): 111–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00106-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00106-0).
- Parenti, Alessandro. 2008. “The Effect of Malaxation Temperature on the Virgin Olive Oil Phenolic Profile under Laboratory-scale Conditions - Parenti - 2008 - European Journal of Lipid Science and Technology - Wiley Online Library.” *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (8): 735–41. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700307>.
- Parrott, Matthew D., and C. E. Greenwood. 2007. “Dietary Influences on Cognitive Function with Aging: From High-Fat Diets to Healthful Eating.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1114 (October): 389–97. <https://doi.org/10.1196/annals.1396.028>.
- Parzonko, Andrzej, M. E. Czerwińska, A. K. Kiss, and M. Naruszewicz. 2013. “Oleuropein and Oleacein May Restore Biological Functions of Endothelial Progenitor Cells Impaired by Angiotensin II via Activation of Nrf2/Heme Oxygenase-1 Pathway.” *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 20 (12): 1088–94. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.05.002>.
- Passaloglou-Emmanouilidou, Smaragda. 1990. “A Comparative Study of UV Spectrophotometric Methods for Detection of Olive Oil Adulteration by Refined Oils.” *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 191 (2): 132–34. <https://doi.org/10.1007/BF01202639>.
- Patterson, H. B. W. 2011. “Chapter 12 - Quality and Control.” In *Hydrogenation of Fats and Oils (Second Edition)*, edited by Gary R. List and Jerry W. King, 329–50. AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-93-6.50018-X>.
- Pei, Tiemin, Qinghui Meng, J. Han, H. Sun, L. Li, R. Song, B. Sun, S. Pan, D. Liang, and L. Liu. 2016. “(-)-Oleocanthal Inhibits Growth and Metastasis by Blocking Activation of STAT3 in Human Hepatocellular Carcinoma.” *Oncotarget* 7 (28): 43475–91. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9782>.
- Peres, Fátima, Luisa L. Martins, and Suzana Ferreira-Dias. 2017. “Influence of Enzymes and Technology on Virgin Olive Oil Composition.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (14): 3104–26. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1092107>.
- Peri, Claudio. 2014. “The Extra-Virgin Olive Oil Chain.” In *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*, 3–10. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118460412.ch1>.
- Pirisi, F. M., P. Cabras, C. F. Cao, M. Migliorini, and M. Muggelli. 2000. “Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (4): 1191–96. <https://doi.org/10.1021/jf991137f>.

- Pitt, Jason, W. Roth, P. Lacor, A. B. Smith, M. Blankenship, P. Velasco, F. De Felice, P. Breslin, and W. L. Klein. 2009. "Alzheimer's-Associated A $\beta$  Oligomers Show Altered Structure, Immunoreactivity and Synaptotoxicity with Low Doses of Oleocanthal." *Toxicology and Applied Pharmacology*, Toxicants and Neurodegenerative Diseases, 240 (2): 189–97. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.018>.
- Pizarro, M. Luz, M. Becerra, A. Sayago, M. Beltrán, and R. Beltrán. 2013. "Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil." *Food Analytical Methods* 6 (1): 123–32. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9420-8>.
- Polini, Beatrice, M. Digiacomio, S. Carpi, S. Bertini, F. Gado, G. Saccomanni, M. Macchia, P. Nieri, C. Manera, and S. Fogli. 2018. "Oleocanthal and Oleacein Contribute to the in Vitro Therapeutic Potential of Extra Virgin Oil-Derived Extracts in Non-Melanoma Skin Cancer." *Toxicology in Vitro* 52 (October): 243–50. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.06.021>.
- Poole, C. F. 2000. "EXTRACTION | Solid-Phase Extraction." In *Encyclopedia of Separation Science*, edited by Ian D. Wilson, 1405–16. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/02141-4>.
- Porter, Ned A., S.E. Caldwell, and K.n A. Mills. 1995. "Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids." *Lipids* 30 (4): 277–90. <https://doi.org/10.1007/BF02536034>.
- Power, A. C., J. Chapman, S. Chandra, and D. Cozzolino. 2019. "6 - Ultraviolet-Visible Spectroscopy for Food Quality Analysis." In *Evaluation Technologies for Food Quality*, edited by Jian Zhong and Xichang Wang, 91–104. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00006-8>.
- Pristouri, G., A. Badeka, and M. G. Kontominas. 2010. "Effect of Packaging Material Headspace, Oxygen and Light Transmission, Temperature and Storage Time on Quality Characteristics of Extra Virgin Olive Oil." *Food Control* 21 (4): 412–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.019>.
- Psomiadou, Eleni, and M. Tsimidou. 2001. "Pigments in Greek Virgin Olive Oils: Occurrence and Levels." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (7): 640–47. <https://doi.org/10.1002/jsfa.859>.
- Qosa, Hisham, Y.S. Batarseh, M. M. Mohyeldin, K. A. El Sayed, J. N. Keller, and A. Kaddoumi. 2015. "Oleocanthal Enhances Amyloid- $\beta$  Clearance from the Brains of TgSwDI Mice and in Vitro across a Human Blood-Brain Barrier Model." *ACS Chemical Neuroscience* 6 (11): 1849–59. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00190>.

- Rahmani, M., and A. S. Csallany. 1998. "Role of Minor Constituents in the Photooxidation of Virgin Olive Oil." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (7): 837–43. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0234-1>.
- Ranalli, A., M. L. Ferrante, G. De Mattia, and N. Costantini. 1999. "Analytical Evaluation of Virgin Olive Oil of First and Second Extraction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2): 417–24. <https://doi.org/10.1021/jf9800256>.
- Ranalli, A., A. Malfatti, L. Lucera, S. Contento, and E. Sotiriou. 2005. "Effects of Processing Techniques on the Natural Colourings and the Other Functional Constituents in Virgin Olive Oil." *Food Research International*, Third International Congress on Pigments in Food, 38 (8): 873–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.011>.
- Ranalli, Alfonso, and F. Angerosa. 1996. "Integral Centrifuges for Olive Oil Extraction. The Qualitative Characteristics of Products." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (4): 417–22. <https://doi.org/10.1007/BF02523912>.
- Razali, Nornadiah Mohd, and Y. B. Wah. 2011. "Power Comparisons of Shapiro-Wilk , Kolmogorov-Smirnov , Lilliefors and Anderson-Darling Tests." 2011. <https://www.semanticscholar.org/paper/Power-comparisons-of-Shapiro-Wilk-%2C-%2C-Lilliefors-Razali-Wah/dcdc0a0be7d65257c4e6a9117f69e246fb227423>.
- Regulation No 136/66/EEC of the Council of 22 September 1966 on the Establishment of a Common Organisation of the Market in Oils and Fats.* 1966. DD I. Vol. TOC. <http://data.europa.eu/eli/reg/1966/136/oj/eng>.
- Rigacci, Stefania, V. Guidotti, M. Bucciantini, M. Parri, C. Nediani, E. Cerbai, M. Stefani, and A. Berti. 2010. "Oleuropein Aglycon Prevents Cytotoxic Amyloid Aggregation of Human Amylin." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (8): 726–35. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.010>.
- Ríos, J. J., M. J. Gil, and F. Gutiérrez-Rosales. 2005. "Solid-Phase Extraction Gas Chromatography-Ion Trap-Mass Spectrometry Qualitative Method for Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil and Structural Confirmation of Oleuropein and Ligstroside Aglycons and Their Oxidation Products." *Journal of Chromatography. A* 1093 (1–2): 167–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.033>.
- Rodis, Panayotis S., V. T. Karathanos, and A. Mantzavinou. 2002. "Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (3): 596–601. <https://doi.org/10.1021/jf010864j>.
- Román, G. C., R. E. Jackson, J. Reis, A. N. Román, J. B. Toledo, and E. Toledo. 2019. "Extra-Virgin Olive Oil for Potential Prevention of Alzheimer Disease." *Revue Neurologique* 175 (10): 705–23. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.07.017>.

- Rotondo, Archimede, G. Loredana La Torre, G. Dugo, N. Cicero, A. Santini, and A. Salvo. 2020. "Oleic Acid Is Not the Only Relevant Mono-Unsaturated Fatty Ester in Olive Oil." *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (4). <https://doi.org/10.3390/foods9040384>.
- Ruiz-Aracama, Ainhoa, E. Goicoechea, and M. D. Guillén. 2017. "Direct Study of Minor Extra-Virgin Olive Oil Components without Any Sample Modification. 1H NMR Multisuppression Experiment: A Powerful Tool." *Food Chemistry* 228 (August): 301–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.009>.
- Ryan, Danielle, M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, and S. Lavee. 2002. "Biotransformations of Phenolic Compounds in *Olea Europaea* L." *Scientia Horticulturae* 92 (2): 147–76. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00287-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00287-4).
- Saglam, C., Y. T. Tuna, U. Gecgel, and E. S. Atar. 2014. "Effects of Olive Harvesting Methods on Oil Quality." *APCBEE Procedia, ICAAA 2013 & CAAS 2013*, 8 (January): 334–42. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.050>.
- Saitta, Marcello, F. Salvo, G. Di Bella, G. Dugo, and G. Loredana La Torre. 2009. "Minor Compounds in the Phenolic Fraction of Virgin Olive Oils." *Food Chemistry*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300927789>.
- Sanmartin, Chiara, F. Venturi, C. Sgherri, A. Nari, M. Macaluso, G. Flamini, M. F. Quartacci, I. Taglieri, G. Andrich, and A. Zinnai. 2018. "The Effects of Packaging and Storage Temperature on the Shelf-Life of Extra Virgin Olive Oil." *Heliyon* 4 (11): e00888. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00888>.
- Scognamiglio, Monica, B. D'Abrosca, V. Fiumano, M. Golino, A. Esposito, and A. Fiorentino. 2014. "Seasonal Phytochemical Changes in *Phillyrea Angustifolia* L.: Metabolomic Analysis and Phytotoxicity Assessment." *Phytochemistry Letters* 8 (May): 163–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.08.012>.
- Scotece, Morena, R. Gómez, J. Conde, V. Lopez, J. J. Gómez-Reino, F. Lago, A. B. Smith, and O. Gualillo. 2012. "Further Evidence for the Anti-Inflammatory Activity of Oleocanthal: Inhibition of MIP-1 $\alpha$  and IL-6 in J774 Macrophages and in ATDC5 Chondrocytes." *Life Sciences, Contribution of Intraneuronal Amyloid  $\beta$  Accumulation to Alzheimer's Disease*, 91 (23): 1229–35. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.09.012>.
- Searle, Shayle R. 1987. *Linear Models for Unbalanced Data*. Wiley.
- Segura Palacios, J. Manuel, N.B. Sánchez, F. Rivas Ruiz, M. Aguilar Bernier, B. Ramírez López, M. E. Fernández Sánchez, and M. de Troya Martín. 2019. "Topical Treatment with Oleocanthal Extract in Reducing Inflammatory Reactions after Photodynamic Therapy: A Prospective Quasi-Experimental Pilot Study." *Complementary Therapies in Medicine* 42 (February): 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.12.003>.

- Servili, Maurizio, and G. Montedoro. 2002. "Contribution of Phenolic Compounds to Virgin Olive Oil Quality." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (9–10): 602–13. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X).
- Servili, Maurizio, R. Selvaggini, S. Esposito, A. Taticchi, G. Montedoro, and G. Morozzi. 2004. "Health and Sensory Properties of Virgin Olive Oil Hydrophilic Phenols: Agronomic and Technological Aspects of Production That Affect Their Occurrence in the Oil." *Journal of Chromatography A, Food Science*, 1054 (1): 113–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070>.
- Shapiro, S. S., and M. B. Wilk. 1965. "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)." *Biometrika* 52 (3–4): 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.
- Shendi, Esmaeil Ghanbari, D. Sivri Ozay, M. Taha Ozkaya, and N. Feyza Ustunel. 2018. "Changes Occurring in Chemical Composition and Oxidative Stability of Virgin Olive Oil during Storage." *OCL* 25 (6): A602. <https://doi.org/10.1051/ocl/2018052>.
- Siddique, Abu Bakar, H. Ebrahim, M. Mohyeldin, M. Qusa, Y. Batarseh, A. Fayyad, A. Tajmim, S. Nazzal, A. Kaddoumi, and Khalid El Sayed. 2019. "Novel Liquid-Liquid Extraction and Self-Emulsion Methods for Simplified Isolation of Extra-Virgin Olive Oil Phenolics with Emphasis on (-)-Oleocanthal and Its Oral Anti-Breast Cancer Activity." *PLOS ONE* 14 (4): e0214798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214798>.
- Sikorska, Ewa, I. Khmelinskii, and M. Sikorski. 2012. "Analysis of Olive Oils by Fluorescence Spectroscopy: Methods and Applications." *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, February. <https://doi.org/10.5772/30676>.
- Sikorska, Ewa, I. V. Khmelinskii, M. Sikorski, F. Caponio, M. T. Bilancia, A. Pasqualone, and T. Gomes. 2008. "Fluorescence Spectroscopy in Monitoring of Extra Virgin Olive Oil during Storage." *International Journal of Food Science & Technology* 43 (1): 52–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01384.x>.
- Skiadas, P. K., and J. G. Lascaratos. 2001. "Dietetics in Ancient Greek Philosophy: Plato's Concepts of Healthy Diet." *European Journal of Clinical Nutrition* 55 (7): 532–37. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601179>.
- Skoog, Holler, and Nieman. 2007. "Μοριακή Φασματοσκοπία." In *Αρχες Της Εοργανης Ανάλυσης*, 5th ed., 354–84. Εκδ. Κωσταράκη.
- Smith, William Fortune, H. Javad, P. I-M. Francisc, and ProQuest (Firm). 2019. *Foundations of Materials Science and Engineering*. Sixth edition. New York, NY : McGraw-Hill Education. <https://trove.nla.gov.au/work/10975149>.
- Sokal, Robert R, and F. J. Rohlf. 1995. "Biometry : The Principles and Practice of Statistics in Biological Research." New York : W.H. Freeman. <https://trove.nla.gov.au/work/10262434>.

- Stefanoudaki, E., A. Koutsaftakis, and J. L. Harwood. 2011. "Influence of Malaxation Conditions on Characteristic Qualities of Olive Oil." *Food Chemistry* 127 (4): 1481–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.120>.
- Stout, Clarke, J. Morrow, E. N. Brandt, and S. Wolf. 1964. "Unusually Low Incidence of Death From Myocardial Infarction: Study of an Italian American Community in Pennsylvania." *JAMA* 188 (10): 845–49. <https://doi.org/10.1001/jama.1964.03060360005001>.
- Swinburn, Boyd A., V. I. Kraak, S. Allender, V. J. Atkins, P. I. Baker, J. R. Bogard, H. Brinsden, et al. 2019. "The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission Report." *Lancet (London, England)* 393 (10173): 791–846. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32822-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32822-8).
- Tamendjari, Abderezak, F. Angerosa, S. Mettouchi, and M. M. Bellal. 2009. "The Effect of Fly Attack ( *Bactrocera Oleae* ) on the Quality and Phenolic Content of Chemlal Olive Oil." In . <https://doi.org/10.3989/gya.032209>.
- Taticchi, Agnese, S. Esposto, G. Veneziani, S. Urbani, R. Selvaggini, and M. Servili. 2013. "The Influence of the Malaxation Temperature on the Activity of Polyphenoloxidase and Peroxidase and on the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil." *Food Chemistry* 136 (2): 975–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.071>.
- Tayfun Agar, I, Betty Hess-Pierce, M. M Sourour, and A. A Kader. 1999. "Identification of Optimum Preprocessing Storage Conditions to Maintain Quality of Black Ripe 'Manzanillo' Olives." *Postharvest Biology and Technology* 15 (1): 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00059-3).
- Trichopoulou, A., and P. Lagiou. 1997. "Healthy Traditional Mediterranean Diet: An Expression of Culture, History, and Lifestyle." *Nutrition Reviews* 55 (11 Pt 1): 383–89. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1997.tb01578.x>.
- Trichopoulou, Antonia, M. A. Martínez-González, T. Y. Tong, Nita G. Forouhi, S. Khandelwal, D. Prabhakaran, D. Mozaffarian, and M. de Lorgeril. 2014. "Definitions and Potential Health Benefits of the Mediterranean Diet: Views from Experts around the World." *BMC Medicine* 12 (July): 112. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-112>.
- Tsimidou, Maria, R. Macrae, and I. Wilson. 1987. "Authentication of Virgin Olive Oils Using Principal Component Analysis of Triglyceride and Fatty Acid Profiles: Part 2—Detection of Adulteration with Other Vegetable Oils." *Food Chemistry* 25 (4): 251–58. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90011-2).
- Tzekaki, E. E., M. Tsolaki, A. A. Pantazaki, G. Geromichalos, E. Lazarou, M. Kozori, and Z. Sinakos. 2019. "Administration of the Extra Virgin Olive Oil (EVOO) in Mild Cognitive Impairment



- (MCI) Patients as a Therapy for Preventing the Progress to AD." *Hellenic Journal of Nuclear Medicine* 22 Suppl 2 (December): 181.
- Vieira, Thais M. F. S., and M. A. B. Regitano-D'Arce. 1998. "STABILITY OF OILS HEATED BY MICROWAVE: UV - SPECTROPHOTOMETRIC EVALUATION." *Food Science and Technology* 18 (4): 433–37. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000400015>.
- Volk, Jascha, A. Sarafeddin, T. Unver, S. Marx, J. Tretzel, J. Zotzel, and H. Warzecha. 2019. "Two Novel Methylsterases from *Olea Europaea* Contribute to the Catabolism of Oleoside-Type Secoiridoid Esters." *Planta* 250 (6): 2083–97. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03286-0>.
- Vougogiannopoulou, Konstantina, C. Lemus, M. Halabalaki, C. Pergola, O. Werz, A. B. Smith, S. Michel, L. Skaltsounis, and B. Deguin. 2014. "One-Step Semisynthesis of Oleacein and the Determination as a 5-Lipoxygenase Inhibitor." *Journal of Natural Products* 77 (3): 441–45. <https://doi.org/10.1021/np401010x>.
- Wen J, Jiang, Zhu A, Yi H, Li L, and Yong X. 2015. Method for extracting oleocanthal from olive oil with high yield and content. China CN103483196B, filed September 30, 2013, and issued February 11, 2015. <https://patents.google.com/patent/CN103483196B/en?q=oleocanthal>.
- Wiesman, Zeev. 2009. "Chapter 11 - Olive-Oil Quality Biotechnologies." In *Desert Olive Oil Cultivation*, edited by Zeev Wiesman, 257–302. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374257-5.00011-7>.
- Wolf, S. 1966. "Mortality from Myocardial Infarction in Roseto." *JAMA* 195 (2): 186.
- Yorulmaz, Asli, A. Yıldırım, M. Duran, Ö. Kula, and M. Kıvrak. 2017. "Impact of Malaxation on Quality and Compositional Characteristics of Edremit Yaglık Olive Oil." *Journal of Food Processing and Preservation* 41 (6): e13291. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13291>.
- Zhang, Qinghua, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme. 2012. "Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications." *Chemical Society Reviews* 41 (21): 7108–46. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>.
- Βαλαβανίδης, Αθανάσιος. 2008. *ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ*. 2nd ed. Σύγχρονα Θέματα.
- Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 29/2012 της Επιτροπής, της 13ης Ιανουαρίου 2012, για τα πρότυπα εμπορίας του ελαιολάδου. 2012. *OJ L*. Vol. 012. [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2012/29/oj/ell](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2012/29/oj/ell).
- Καλτσίκης. 1989. *Γεωργικός Πειραματισμός - Παραγοντικά Πειράματα*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμφολή.