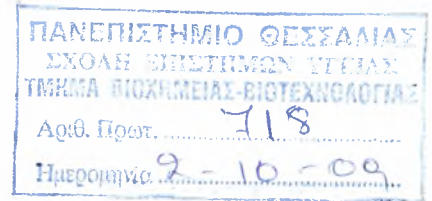


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ  
ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΚΑΙ ΧΥΜΟ ΜΗΛΟΥ ΜΕ ΣΚΟΠΟ  
ΤΗΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**



**ΞΥΠΝΗΤΟΥ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2009**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7653/1  
Ημερ. Εισ.: 10-11-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2009  
ΕΥΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087155

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Κουρέτας Δημήτριος – Καθηγητής Φυσιολογίας ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Λεάνδρος Σκαλτσούνης – Καθηγητής του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών
- Αληγιάννης Νεκτάριος – Λέκτορας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του τομέα Φαρμακογνωσίας του τμήματος Φαρμακευτικής στο Πανεπιστήμιο Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτρη.

Αισθάνομαι υποχρεωμένη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κ. Κουρέτα Δημήτρη που μου έδειξε εμπιστοσύνη προσφέροντάς μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Νεκτάριο Αληγιάννη που η επιστημονική κριτική του, οι πολύτιμες συμβουλές του, η υπομονή του, η ενθάρρυνση καθώς και η καθοδήγησή του συνέβαλαν στη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας που με βοήθησαν, με στήριξαν και συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
ΣΚΟΠΟΣ.....	6
A) ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ.....	7
Ελιά – Ιστορικά στοιχεία.....	7
• Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς .....	7
Ταξινόμηση της ελιάς .....	7
Παραγωγή και κατανάλωση επιτραπέζιου ελαιόκαρπου.....	8
Η προσφορά της ελιάς στον ανθρώπινο οργανισμό.....	8
Μέθοδοι επεξεργασίας επιτραπέζιου ελαιόκαρπου .....	10
Φαινολικές ενώσεις.....	11
Βιολογικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων του ελαιόκαρπου .....	12
Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών.....	12
Βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις της υδροξυτυροσόλης.....	13
Άλλες χημικές κατηγορίες των συστατικών της ελιάς και η δράση τους.....	15
B) ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ .....	17
Είδη ελαιοτριβείων – Διαφορές .....	18
Διφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία .....	19
Τα παραγόμενα απόβλητα επιβαρύνουν το περιβάλλον .....	20
Αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων .....	22
Γ) ΜΗΛΟ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΜΗΛΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΟΥ .....	23
Εισαγωγικά .....	23
Παραγωγή μήλου .....	24
Τα οφέλη της υγιεινής διατροφής.....	24
Οι ευεργετικές ουσίες των φρούτων και των λαχανικών .....	25
Ερευνητικές αποδείξεις για την προσφορά της κατανάλωσης μήλου στον ανθρώπινο οργανισμό.....	27
Φυτοχημικές ουσίες των μήλων.....	29

Διαφορές μεταξύ των ποικιλιών των μήλων .....	34
Απόβλητα μήλου .....	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	37
Α) ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ .....	37
Απομόνωση υδροξυτυροσόλης από νερό ξηπικρίσματος ελαιόκαρπου .....	37
Φασματοσκοπία NMR: .....	43
Β) ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ .....	45
Απομόνωση βιοδραστικών φυσικών προϊόντων από απόβλητα ελαιοτριβείου διφασικού συστήματος .....	46
Φασματοσκοπία NMR .....	47
Γ) Αξιοποίηση αποβλήτων που προέρχονται από τη διαδικασία παραγωγής χυμών μήλου. .....	50
Συμπεράσματα .....	58
Βιβλιογραφία:.....	60

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό από την αρχαιότητα και έχει επιβεβαιωθεί από σύγχρονες επιδημιολογικές μελέτες ότι οι διατροφικές συνήθειες μπορούν να επηρεάσουν την υγεία και τη φυσική κατάσταση του οργανισμού. Πολυάριθμες έρευνες παγκοσμίως δείχνουν ότι τα φυσικά συστατικά των τροφών, ιδιαίτερα φυτικής προέλευσης, επηρεάζουν πολλά ενζυμικά συστήματα και βιολογικές διεργασίες. Οι φυτικές τροφές είναι πολύ πλούσιες σε αντιοξειδωτικές ουσίες και η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών από διάφορες πληθυσμιακές ομάδες έχει συνδεθεί με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου.

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί γύρω από τον **ελαιόκαρπο** και το **μήλο**, με σκοπό να βρεθούν τα πλεονεκτήματα τους στον ανθρώπινο οργανισμό από την κατανάλωσή τους.

- Όσον αφορά την ελιά, σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει την αντιχοληστερολαιμική, αγγειοδιασταλτική, υποτασική, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση της, ενώ νέες δράσεις είναι υπό μελέτη. Τα δραστικά συστατικά στα οποία οφείλονται αυτές οι ιδιότητες είναι κυρίως το ελαιϊκό οξύ και οι φαινολικές ουσίες.
- Το προστατευτικό αποτέλεσμα των φρούτων και συγκεκριμένα του μήλου, οφείλεται στις περιεχόμενες ουσίες, όπως είναι τα φλαβονοειδή, τα ισοφλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα τριτερπένια. Οι ουσίες αυτές φαίνεται πως περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση και προστατεύουν ενάντια στην οξείδωση των λιπιδίων.

Η παραγωγή και η κατανάλωση και των δύο αυτών φυσικών προϊόντων είναι πολύ μεγάλη στη χώρα μας, γι' αυτό η έρευνα των ωφέλιμων ιδιοτήτων τους στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ένα καίριο θέμα. Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από τη διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου και του χυμού μήλου, αφορούν μια πολύ μεγάλη και ανεκμετάλλευτη ποσότητα, καθώς γνωρίζουμε από διάφορες μελέτες ότι αποτελούνται από αξιόλογες ποσότητες ευεργετικών ουσιών, που απαντούν στους ίδιους τους καρπούς.

## ΣΚΟΠΟΣ

Το θέμα της εργασίας αυτής είναι σχετικό με έναν από τους ερευνητικούς τομείς του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής σχολής Αθηνών και συγκεκριμένα με την επεξεργασία γεωργικών αποβλήτων για την παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ως παράδειγμα, αναφέρονται η επεξεργασία αποβλήτων ελαιοτριβείου (‘κατσίγαρος’) και η εκχύλιση στεμφύλων για την παραγωγή πολυφαινολών. Στα πλαίσια της ερευνητικής αυτής προσπάθειας, διερευνήθηκε η δυνατότητα απομόνωσης ουσιών που υπάρχουν στα **απόβλητα διφασικού συστήματος ελαιοτριβείου**, στο **νερό ξεπικρίσματος** που απομένει κατά τη διαδικασία παραγωγής βρώσιμων ελαίων και στο **ξηρό υπόλειμμα του μήλου** που απομένει μετά τη διαδικασία παραγωγής χυμού.

Οι πρώτες ύλες που επιλέχθηκαν για μελέτη (ελιά και μήλο), είναι γνωστό πως κατέχουν σημαντική θέση στη διατροφή μας, αλλά έχουν και σημαντική συνεισφορά στην υγεία μας. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο να μελετήσουμε την ύπαρξη ουσιών, ωφέλιμων για την υγεία του ανθρώπου, στα απόβλητα της επεξεργασίας τους, ώστε να προταθεί η αξιοποίησή τους.

## Α) ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

### Ελιά – Ιστορικά στοιχεία

Η ελιά είναι είδος ενδημικό στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου από την τριτογενή περίοδο. Το φυτό της ελιάς είναι ελάχιστα απαιτητικό και ιδιαίτερα ανθεκτικό σε όλες τις συνθήκες. Τα φύλλα, ο καρπός και το λάδι της ελιάς κατέχουν σημαντική θέση στη γεωργία, τη διατροφή και την παραδοσιακή φαρμακοποιία και ιατρική πολλών χωρών, κυρίως της Μεσογείου.

Όσον αφορά το ελαιόλαδο, πολλοί γιατροί της αρχαιότητας αντιλήφθηκαν το διπλό του ρόλο, σαν τροφή και σαν φάρμακο και προήγαγαν τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε το ελαιόλαδο σαν θεραπευτικό σε έλκη, στην χολέρα και στους πόνους των μυών. Τα φύλλα και το λάδι της ελιάς χρησιμοποιήθηκαν και στην παραδοσιακή ιατρική των νεώτερων χρόνων. Τσάι παρασκευασμένο από τα φύλλα της ελιάς ήταν πολύ δημοφιλές σαν παραδοσιακό φάρμακο για την καταπολέμηση του πυρετού.

- **Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς:**

Η ελιά ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας Oleaceae. Το γένος αυτό περιλαμβάνει συνολικά 40 είδη και 5 υποείδη από τα οποία το πιο διαδεδομένο είναι η *Olea europaea* L. (Ευρωπαϊκή ελιά), η οποία καλλιεργείται σήμερα σε 40 χώρες σε όλο τον κόσμο.

### Ταξινόμηση της ελιάς

**Βασίλειο:** Plantae

**Διαίρεση:** Magnoliophyta

**Τάξη:** Lamiales

**Κλάση:** Magnoliopsida

**Οικογένεια:** Oleaceae

**Γένος:** *Olea*

**Είδος:** *O. europaea* L.



## Ορισμός επιτραπέζιου ελαιόκαρπου

Ως επιτραπέζιος ελαιόκαρπος ορίζεται το «υγιές φρούτο ορισμένων ποικιλιών του καλλιεργούμενου ελαιοδέντρου, το οποίο συγκομιδείται σε κατάλληλο στάδιο ωριμότητας». Η ποιότητα του είναι τέτοια που όταν υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα, δίνει ένα εδώδιμο προϊόν και διασφαλίζει τη διατήρησή του σε καλά επίπεδα. Μια τέτοια επεξεργασία μπορεί να περιλαμβάνει την προσθήκη διαφόρων προϊόντων ή μπαχαρικών καλής επιτραπέζιας ποιότητας.

## Παραγωγή και κατανάλωση επιτραπέζιου ελαιόκαρπου

Η παγκόσμια παραγωγή των επιτραπέζιων ελαιόκαρπων ανέρχεται περίπου σε 1.466.500 τόνους από τους οποίους κατά προσέγγιση το 80%, παράγεται στις χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Η Ευρώπη έχει μερίδιο 43%, με πρώτη σε παραγωγή την Ισπανία. Στην Αμερική η παραγωγή είναι περίπου 8% (IOOC,2005). Η **Ελλάδα** παράγει περίπου 90.000-100.000 τόνους ελιές (κυρίως μαύρες), από τους οποίους καταναλώνει 25.000-30.000 τόνους (τέταρτη στην παγκόσμια κατανάλωση μετά από την Συρία, τον Λίβανο και την Τουρκία) και τους υπόλοιπους τους εξάγει προς τις χώρες της Ε.Ε και κυρίως προς Τρίτες Χώρες.

Με μέσο ετήσιο ποσοστό αύξησης μεγαλύτερο του 4%, οι επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο αποτελούν έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους αγρό-διατροφικούς κλάδους στην Ευρώπη. Σε όλο και περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες το ελαιόλαδο έχει γίνει μέρος της καθημερινής διατροφής.

Η παγκόσμια κατανάλωση επιτραπέζιων ελιών αυτήν την περίοδο είναι 1,3 εκατομμύρια τόνοι, έναντι του 1 εκατομμυρίου που ήταν τη δεκαετία του '90. Η ΕΕ είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής (33%), ακολουθούμενη από τις Ηνωμένες Πολιτείες (16%), την Τουρκία (11%), τη Συρία (7%), την Αίγυπτο (5%) και τέλος τη Βραζιλία (3%). Αυτά τα ποσοστά τείνουν να παραμείνουν αμετάβλητα τα τελευταία χρόνια.

Στην ΕΕ, η κατανάλωση υπολογίζεται κατά μέσο όρο σε 500.000 τόνους τα τελευταία τρία χρόνια, με την Ελλάδα να καταναλώνει 27.000 τόνους (5,4%).

## Η προσφορά της ελιάς στον ανθρώπινο οργανισμό

- Μεσογειακή διατροφή

Τα τελευταία χρόνια γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στην Μεσογειακή διατροφή, βασικά συστατικά της οποίας αποτελούν η ελιά και το ελαιόλαδο. Αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών δείχνουν ότι η διαίτα αυτή, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου, διαφόρων μορφών καρκίνου και νευρολογικών ανωμαλιών (Owen et al., 2000, Valavanidis et al., 2000, Huxley et al., 2003).

Υπάρχει μεγάλος αριθμός στοιχείων που συνηγορούν στο γεγονός ότι η Μεσογειακή διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο έναντι μεγάλου αριθμού ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος (Buzina et al., 1991). Η Μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε μόνο- και πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες και ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες αλλά φτωχή σε κεκορεσμένα ή υδρογονωμένα λίπη. Το κύριο χαρακτηριστικό της αποτελεί το ελαιόλαδο και η ελιά, που είναι και οι κύριες πηγές πρόσληψης λιπαρών συστατικών (Nestle, 1995; Willet et al., 1995). Μεσογειακοί πληθυσμοί όπως οι Έλληνες και οι Ιταλοί έχουν πολύ μεγάλο προσδόκιμο ζωής και χαμηλά ποσοστά καρκίνου, αν και έχουν μεγάλα ποσοστά καπνιστών (Menotti, 1991). Σε πρόσφατη μελέτη της Αμερικάνικης Καρδιολογικής Εταιρίας αναφέρθηκε ότι από 605 εθελοντές που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου σε διάστημα 27 μηνών, η ομάδα που της χορηγήθηκε η Κρητική διατροφή είχε 75% μικρότερη θνησιμότητα (Renaud et al., 1995) ενώ μετά από πάροδο 4 και 5 ετών τα ποσοστά ήταν 56% (Lorgeril et al., 1998) και 70% (Lorgeril et al., 1994), αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα και από καρκίνο και το μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής που παρατηρήθηκε στις παραπάνω περιπτώσεις αποδίδεται κυρίως στην υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, λαχανικών και φρούτων και στην πρόσληψη φυτικών ινών, βιταμινών, πολυφαινολικών ουσιών και φλαβονοειδών που χαρακτηρίζουν την Κρητική διατροφή.

## Μέθοδοι επεξεργασίας επιτραπέζιου ελαιόκαρπου

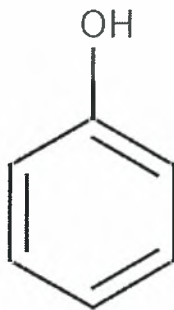
Οι ελιές όταν συλλέγονται δεν είναι άμεσα καταναλώσιμες, ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης. Η σάρκα συνήθως είναι στυφή και πικρή. Η «ελευρωπαίνη» είναι η κύρια ένωση που ευθύνεται για την πικράδα του καρπού της ελιάς, η οποία πρέπει να αφαιρεθεί ή να υδρολυθεί προκειμένου να καταστεί το προϊόν βρώσιμο. Υπάρχουν τέσσερις μέθοδοι επεξεργασίας για την απομάκρυνση αυτής της πικρής ουσίας, που αναφέρονται παρακάτω. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από την ποικιλία, το βαθμό ωρίμανσης, την τεχνολογία που απαιτείται και τις παραδοσιακές πρακτικές.

1. **Ξεπίκρισμα με χονδρό αλάτι ή πυκνή άρμη:** Σε αυτή την περίπτωση οι ελιές, που είναι εντελώς ώριμες, πλένονται με άφθονο κρύο νερό και σκεπάζονται με χονδρό αλάτι μέσα σε κοφίνια, ή βαρέλια, ή τσουβάλια. Στη χώρα μας η αναλογία είναι 15-20 κιλά αλάτι για 100 κιλά καρπών. Το αλάτι δρα ως αφιδρωτικό και προκαλεί εκχύλιση μέρους των φυτικών υγρών του καρπού που παρασύρουν μαζί τους και την ελευρωπαίνη.
2. **Ξεπίκρισμα με διάλυμα καυστικού νατρίου (ποτάσσα):** Στην Ελλάδα το διάλυμα του καυστικού νατρίου χρησιμοποιείται μόνο για το ξεπίκρισμα των πράσινων ελιών. Οι πράσινες ελιές εμβαπτίζονται για 6-9 ώρες στο διάλυμα αυτό οπότε συντελείται και το ξεπίκριμά τους. Αμέσως μετά πλένονται με καθαρό νερό και αφού παραμείνουν για 15 ώρες στο νερό συσκευάζονται εμβαπτισμένες σε δυνατή άρμη.
3. **Ξεπίκρισμα με στάχτη (αλισίβα) ή με ασβέστη:** Και οι δύο μέθοδοι τείνουν να ξεχαστούν, ωστόσο ήταν πολύ δημοφιλείς ιδιαίτερα για τις πράσινες ελιές, μιας και με τη στάχτη εξασφαλίζεται ταχύτατο ξεπίκρισμα, ενώ με τον ασβέστη οι ελιές διατηρούν την τραγανή σάρκα τους.
4. **Με χάραγμα:** Οι ελιές αυτές ονομάζονται χαραχτές σε οξάλμη και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι δημοφιλέστετες εκτός και εντός της χώρας μας ελιές Καλαμών. Οι ελιές πρέπει να είναι εντελώς ώριμες, με συμπαγή σάρκα και να χαράσσονται κατά μήκος του μεγάλου άξονα και σε δύο πλευρές, με τη μια απέναντι στην άλλη. Οι χαραγμένες ελιές εμβαπτίζονται σε νερό για 8-10 ημέρες. Το νερό πρέπει να αλλάζεται καθημερινά, ώστε να ξεπικρίσουν εντελώς οι ελιές.

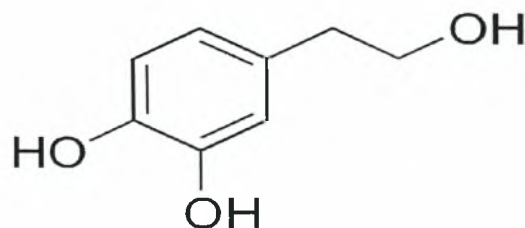
Το απόβλητό μας από τη διαδικασία ξεπικρίσματος προέρχεται από την τελευταία μέθοδο επεξεργασίας και είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερος πλούσιο από την απλή φαινολική ένωση που ονομάζεται **υδροξυτυροσόλη**. Η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται στη σάρκα σε ποσότητες 200-430 mg/kg (Bastoni et al., 2001) και 0,14-0,28 mg/g (Bianco et al., 1998).

### Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις, γνωστές και σαν πολυφαινόλες, είναι οι ενώσεις εκείνες που αποτελούνται από ένα (τουλάχιστον) βενζολικό δακτύλιο C<sub>6</sub>, με απευθείας ενωμένες μία ή περισσότερες υδροξυλοομάδες, ελεύθερες ή δεσμευμένες σαν αιθέρες, εστέρες ή ετεροσίδες. Στην πλειοψηφία τους είναι ουσίες υδατοδιαλυτές και στη φύση εμφανίζονται κυρίως ενωμένες με σάκχαρο. Η απλούστερη εκπρόσωπος τους είναι η φαινόλη (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Απλή φαινόλη



**Εικόνα 2:** Χημικός τύπος υδροξυτυροσόλης

## Βιολογικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων του ελαιόκαρπου

Σύγχρονες μελέτες διατροφής οδήγησαν στην εκτίμηση των ευεργετικών ιδιοτήτων μεγάλου αριθμού ουσιών που προέρχονται από τα φυτά. Τέτοιου είδους ουσίες, στους καρπούς, τα φύλλα της ελιάς και το ελαιόλαδο, σε μεγάλες ποσότητες, είναι το ελαϊκό οξύ (στο λάδι) και τα **φαινολικά συστατικά**.

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, με πιθανά ευεργετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου (Arts and Peter, 2005). Τα φλαβονοειδή, (φαινολικά συστατικά, παράγωγα του βενζο-γ-πυρανίου) εμφανίζουν ευρύτατο φάσμα βιολογικών δράσεων όπως, η αντιοξειδωτική δράση, η αντιφλεγμονώδης, η αντισπασμωδική, η αντιπηκτική κ.ά και θεωρούνται από τα πλέον υποσχόμενα αντικαρκινικά φυσικά προϊόντα (Pathak et al., 1991; Havsteen, 2002).

### Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών

Οι κύριες πολυφαινόλες της ελιάς είναι οι αντιοξειδωτικές ουσίες *ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη*. Η αντιοξειδωτική τους δράση θεωρείται πως είναι ένας τρόπος άμυνας έναντι διαφόρων παθήσεων και έγκειται στην παγίδευση των **ελευθέρων ριζών** και στην παρεμπόδιση του **οξειδωτικού stress**.

- Ελεύθερες ρίζες

Στα κύτταρα το οξυγόνο αντιδρά με μια σειρά από χημικές ενώσεις, από τις οποίες αποσπά ένα ηλεκτρόνιο. Έτσι δημιουργείται μια σειρά από χημικές ενώσεις γνωστές ως **ελεύθερες ρίζες** που τους λείπει ένα ηλεκτρόνιο και το «αναζητούν όπου μπορούν», προκαλώντας έτσι τη φθορά των κυττάρων και του γενετικού τους υλικού. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα του κυττάρου σχετίζεται κυρίως με την **υπεροξείδωση των λιπών και των πρωτεϊνών αλλά και του κυτταρικού DNA**.

- Οξειδωτικό stress:

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν μεγάλη ποικιλία βλαβών στα νουκλεϊκά οξέα (Helbock et al., 1998). Υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο κύτταρο είναι εκτεθειμένο σε 10.000-20.000 ελεύθερες ρίζες ημερησίως (Valco et al., 2004). Παρά το ότι ο οργανισμός μας διαθέτει ισχυρούς μηχανισμούς εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών δεν καταφέρνει πάντα να τις αντιμετωπίσει με επιτυχία λόγω του μεγάλου αριθμού τους. Σε περίπτωση που η παραγωγή ελευθέρων ριζών υπερβεί την προστατευτική ικανότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού, φαινόμενο το οποίο καλείται «οξειδωτικό stress», τότε θα προκύψουν μη αναστρέψιμες βλάβες της κυτταρικής δομής και της λειτουργίας του κυττάρου και πιθανά την ανάπτυξη ασθενειών. Το οξειδωτικό stress των βιομορίων αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και θεωρείται ότι αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες της διαδικασίας της γήρανσης, καθώς και η αιτία πλήθους εκφυλιστικών παθήσεων, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη τύπου 2, καρκίνος, σκλήρυνση κατά πλάκας και νόσος Alzheimer (Masella et al., 2005).

Ο μόνος σύμμαχος στον αγώνα του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού είναι οι **αντιοξειδωτικές ουσίες** που μπορεί να προστεθούν μέσω της διαίτας και στις οποίες οι επιστήμονες στηρίζουν πολλές ελπίδες για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων. Οι ουσίες αυτές, είναι ενώσεις που δρουν κυρίως σαν δότες υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους ή σαν εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών, χηλικοί παράγοντες, αποικοδομητές υπεροξειδίων ή αναστολείς ενζύμων (Masella et al., 2005).

### **Βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις της υδροξυτυροσόλης**

Συγκεκριμένα, η **υδροξυτυροσόλη**, η οποία έχει βρεθεί σε επιτραπέζιους ελαιόκαρπους εμπορίου καθώς και σε υγρά απόβλητα αυτών, θεωρείται μία από τις κύριες αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιόλαδου, η οποία προλαμβάνει την αυτό-οξειδωσή του αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τον χρόνο ζωής του.

Οι φαρμακολογικές της δράσεις αποτελούν τα τελευταία χρόνια αντικείμενο μελέτης από πολλές ερευνητικές ομάδες. Πρόκειται για μια ένωση με δύο φαινολικά υδροξύλια τα οποία και θεωρούνται υπεύθυνα για την υψηλή δραστηριότητά της σε

σχέση με ουσίες που έχουν μόνο ένα φαινολικό υδροξύλιο (Kohyama et al., 1997; Manna et al., 1997). Η υδροξυτυροσόλη αναφέρεται σαν πιο δραστική από την βιταμίνη E, το βουτυλικό-υδροξυτολουόλιο ή άλλα συνθετικά αντιοξειδωτικά, που η χρήση τους επιτρέπεται στη βιομηχανία τροφίμων (Zheng et al., 1993).

Άλλες μελέτες που έχουν γίνει αναφέρουν πως η υδροξυτυροσόλη έχει τις εξής ιδιότητες:

- Προλαμβάνει την οξείδωση της LDL, η οποία μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αθηροσκλήρωσης (Grignaffini et al., 1994; Visioli et al., 1995a)
- Έχει αντιθρομβωτικές ιδιότητες, αφού είναι αναστολέας της κυκλοξυγονάσης που οδηγεί σε σχηματισμό του θρομβοξανίου B<sub>2</sub> της προσταγλαδίνης, που ενοχοποιείται για τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και τη στένωση των αρτηριών (Petroni et al., 1995).
- Η προσθήκη υδροξυτυροσόλης στο διαιτολόγιο υπερλιπιδαιμικών κουνελιών είχε ως αποτέλεσμα μείωση κατά 42%-50% της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων και αύξηση 2-3 φορές της HDL χοληστερόλης και προκάλεσε υποστροφή των αθηροσκληρωτικών βλαβών, οι οποίες μετρήθηκαν στις εσωτερικές στιβάδες της αορτής (Coni et al., 2000).
- Τέλος, η αντικαρκινική δράση της υδροξυτυροσόλης αποδείχθηκε με παρεμπόδιση που προκάλεσε σε αλλαγές στο DNA και στα αμινοξέα του κυττάρου (Aruoma et al., 1987, Deiana et al., 1999).

## Άλλες χημικές κατηγορίες των συστατικών της ελιάς και η δράση τους

### α) Ιριδοειδή

Τα ιριδοειδή ανήκουν στην κατηγορία των μονοτερπενίων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυκλοπέντανο-(c)-πυρανικού δακτυλίου. Στην ελιά, από την οικογένεια των ιριδοειδών, έχουν εντοπισθεί η ελευρωπαϊνή, το ολεανολικό οξύ (προϊόν υδρόλυσης της ολευρωπαϊνης) και η ολεασίνη.

#### Βιολογικές δράσεις ιριδοειδών

Τα ιριδοειδή έχουν παρουσιάσει σημαντικές βιολογικές δράσεις (Petkov and Manolon, 1975; Ghisalberti, 1998), οι κυριότερες από τις οποίες αναφέρονται στη συνέχεια:

**Καρδιοτονωτική δράση:** Η ελευρωπαϊνή, βασικό φυσικό συστατικό των καρπών και των φύλλων της ελιάς δρα ως αντι-υπερτασικό (Petkov and Manolon, 1972; Max, 1989; Somova et al., 2003), διασταλτικό των στεφανιαίων αγγείων, αντιαρρυθμικό (Somova et al., 2003), σπασμολυτικό (Occhiuto et al., 1985) και προστατεύει το μυοκάρδιο από τραυματισμό κατά το οξειδωτικό stress (Manna et al., 2004), με αποτέλεσμα να συναντάται σε φυτοθεραπευτικά σκευάσματα για τη διατήρηση της πίεσης σε φυσιολογικά επίπεδα. Το ολεανολικό οξύ παρουσιάζει υποτασική δράση (Tuck and Hayball, 2002).

**Υπογλυκαιμική και υπολιπιδαιμική δράση:** Η ελευρωπαϊνή έχει δείξει ισχυρή υπογλυκαιμική δράση σε κουνέλια (Al-Azzawie and Alhamdani, 2006).

**Αντιφλεγμονώδης δράση:** Το πικρό συστατικό της ελιάς, η ελευρωπαϊνή είναι ένα από τα ιριδοειδή που παρουσίασαν αντιφλεγμονώδη δράση σε *in vivo* μοντέλο όπου το οίδημα είχε προκληθεί με καραγενάση στις πατούσες και στο αυτί ποντικών (Recio et al., 1994)

Τα ιριδοειδή παρουσιάζουν ακόμα αντισπασμωδική-σπασμολυτική (βαλτράτη) (Wagner and Jurcic, 1979), αντιογκογόνο (γενιποσίδης) (Ghisalberti, 1998), αντιυική (φουλβοπλουμερίνη) (Tan et al., 1991), αντιοξειδωτική (γενιποσίδης) (Toda et al., 1985), και αντιμικροβιακή (ολευρωπείνη) δράση (Ghisalberti, 1998).



## β) Τριτερπένια

Τα τριτερπένια ανήκουν σε μια ευρύτερη κατηγορία φυσικών προϊόντων που ονομάζονται τερπένια, τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή (Banthhorpe, 1991). Τα τριτερπένια είναι ενώσεις που αποτελούνται από 30 άτομα άνθρακα και προκύπτουν από τη συμπύκνωση και υδρογόνωση 6 ατόμων ισοπρενίου. Τα πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα, όπως το **ολεανολικό** και το **μασλινικό** βρίσκονται στο επικάρπιο (επιδερμίδα ή φλούδα της ελιάς) σε μεγάλη ποσότητα.

### Βιολογική δράση τριτερπενίων

Ορισμένα από αυτά έχουν δείξει *in vitro* δράση έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών (σαπελίνες Α και Β, παχυμικό οξύ). Παράγωγα του γλυκυρρετικού οξέος έχουν δείξει αντιαλλεργική και αντιελκωτική δράση *in vivo* σε ποντίκια χωρίς να εμφανίζουν τις ανεπιθύμητες δράσεις της αλδοστερόνης. Τέλος, τα τριτερπένια φαίνεται να επιδρούν στον μεταβολισμό και τη βιοσύνθεση.

## Β) ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

### Παραγωγή του ελαιόλαδου

Τα στερεά σωματίδια (τεμαχίδια σάρκας, φλοιού, θρύμματα πυρηνόξυλου, κλπ) που βρίσκονται διαλυμένα στην υγρή φάση, το βάρος των οποίων υπολογίζεται σε ποσοστό 0,5-1% επί του συνολικού βάρους της υγρής φάσης, απομακρύνονται με τη χρήση παλινδρομικά κινούμενων κόσκινων (κόσκινα απολάσπωσης). Ακολουθεί ο τελικός διαχωρισμός του ελαιολάδου από τα φυτικά υγρά με τη χρήση φυγοκεντρικών ελαιοδιαχωριστήρων.

Τρεις διαφορετικές επεξεργασίες για την παραλαβή του ελαιόλαδου εφαρμόζονται, οι οποίες είναι: η παραδοσιακή, η τριφασική και η διφασική. Αυτές διαφέρουν σημαντικά στον όγκο και τη σύνθεση των αποβλήτων που παράγουν. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικές από τις διαφορές μεταξύ των τριών διαδικασιών.

**Πίνακας 1:** Σύγκριση ορισμένων χαρακτηριστικών αποβλήτων από τις διάφορες επεξεργασίες παραγωγής ελαιολάδου.

	Παραδοσιακή	3 Φάσεων	2 Φάσεων
Στερεό υπόλειμμα(kg/τόνο καρπού)	330	500	800
Υγρά απόβλητα(L/τόνο καρπού)	600	1200	250
BOD5* υγρών αποβλήτων(g/L)	100	80	10

(\*τιμές BOD5 ισοδυναμούν με βιολογική απαίτηση οξυγόνου)

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι το διφασικό σύστημα δημιουργεί μεγαλύτερο όγκο στερεού υπολείμματος, παράγει όμως μικρότερα ποσά υγρών αποβλήτων και χαμηλότερες τιμές BOD5. Τέλος, το ελαιόλαδο που προκύπτει από τη διφασική επεξεργασία είναι υψηλής ποιότητας και σταθερό στην οξείδωση (Salvador et al., 2001; Gomez-Alonso et al., 2002).

Γενικά, η Ευρωπαϊκή βιομηχανία ελαιολάδου καταναλώνει πάνω από 8.000.000 τόνους νερού, ενώ παράγονται πάνω από 4.600.000 τόνοι υγρών αποβλήτων και 6.800.000 τόνοι στερεών (Mulinacci et al., 2001).

### **Είδη ελαιοτριβείων – Διαφορές**

Ανάλογα με το σύστημα που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του ελαιολάδου από την ελαιομάζα, λειτουργούν επίσημα στις μέρες μας οι ακόλουθοι τρεις τύποι ελαιοτριβείων:

#### **A) Κλασικά**

Ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου και των φυτικών υγρών επιτυγχάνεται με την εφαρμογή υδραυλικής πίεσης. Με την πίεση που ασκείται διαχωρίζεται η χυμώδης φάση (ελαιόλαδο-νερό) από τη στερεά φάση, τον ελαιοπυρήνα. Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιόλαδου από το νερό και τις ξένες ύλες, γίνεται με φυγοκέντριση σε κάθετο διαχωριστήρα. Η ελαιοπυρήνα που παράγεται από τα κλασικά ελαιοτριβεία έχει μικρό ποσοστό υγρασίας(25-30%), σε σχέση με του φυγοκεντρικού τύπου που η ξηρασία ξεπερνάει το 45%.

#### **B) Φυγοκεντρικά τριών φάσεων ή τριφασικά decanters**

Η παραλαβή του ελαιόλαδου από την ελαιομάζα γίνεται με φυγοκέντριση σε ειδικούς οριζόντιους φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες (decanters) τριών φάσεων και βασίζεται στη διαφορά του ειδικού βάρους που παρουσιάζουν τα συστατικά της ελαιομάζας (ελαιόλαδο, νερό, στερεά συστατικά) και προκύπτουν τρία κλάσματα: το ελαιόλαδο, που περιέχει και λίγα φυτικά υγρά, οπότε και οδηγείται στον τελικό φυγοκεντρικό διαχωρισμό για να διαυγάσει, την ελαιοπυρήνα και τα υγρά απόβλητα. Το ελαιόλαδο που προκύπτει είναι θολό και περνάει από δεύτερο διαχωριστήρα ώστε να διαυγασθεί. Τα ελαιοτριβεία αυτού του τύπου εγκαταστάθηκαν στη χώρα μας το 1972 και από τότε εκτοπίζουν συνεχώς τα κλασικού τύπου ελαιοτριβεία.

#### **Γ) Φυγοκεντρικά δύο φάσεων ή οικολογικά decanters**

Η παραλαβή του ελαιόλαδου από την ελαιομάζα γίνεται πάλι με φυγοκέντριση, αλλά λαμβάνονται δύο φάσεις, το ελαιόλαδο και η ελαιοπυρήνα, που περιέχει και το

σύνολο των φυτικών υγρών του καρπού. Η βασική διαφορά τους από τα τριφασικά είναι ότι δε γίνεται αραίωση της ελαιοζύμης πριν από τη φυγοκέντριση. Εμφανίστηκαν με στόχο να δώσουν μια λύση στο πρόβλημα των υγρών αποβλήτων των τριφασικών φυγοκεντρικών ελαιουργείων, όμως η παραγόμενη από αυτά ελαιοπυρήνα, είναι επίσης ένα προϊόν με ποσοστό υγρασίας πάνω από 60%. Αυτός είναι και ο βασικός λόγος που τα διφασικά συστήματα δεν έχουν εδραιωθεί στην αγορά, αφού η ελαιοπυρήνα που παράγουν έχει μεγάλο ποσοστό υγρασίας και τα πυρηνελαιουργεία δεν μπορούν να επεξεργαστούν ένα τόσο υδαρές προϊόν. Έτσι, είναι φανερό ότι ενώ τα διφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία δίνουν μια προοπτική στο πρόβλημα του τεράστιου όγκου των υγρών αποβλήτων των τριφασικών, αμφισβητείται η αξία τους, λόγω της έλλειψης κατάλληλων πυρηνελαιουργείων.

Συγκεντρώνοντας τα τεχνολογικά γνωρίσματα των παραπάνω τύπων ελαιοτριβείων, που χρησιμοποιούνται σήμερα, μπορούμε να πούμε ότι τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία έχουν αντικαταστήσει και συνεχίζουν να κερδίζουν έδαφος έναντι των κλασσικών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα κλασσικά επειδή απαιτούν μεγάλο χώρο στο ελαιοτριβείο, πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικά φίλτρα, τα οποία έχουν μεγάλο κόστος και πολλές φορές είναι δυνατόν να υποβαθμίσουν την ποιότητα του λαδιού. Από την άλλη πλευρά όμως, καταναλώνουν τη μισή ηλεκτρική ενέργεια και το κόστος συντήρησής τους είναι πολύ μικρότερο. Επιπλέον, χρησιμοποιούν το 1/3-1/4 του νερού που χρησιμοποιούν τα τριφασικά φυγοκεντρικά ελαιουργεία και το λάδι που παράγεται είναι πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες και αρωματικές ουσίες.

### **Διφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία**

Τα διφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία πλεονεκτούν έναντι των τριφασικών, κυρίως γιατί λειτουργούν χωρίς προηγούμενη αραίωση της ελαιομάζας με χλιαρό νερό, οπότε εξοικονομούν νερό και δεν παράγουν τον μεγάλο όγκο των υγρών αποβλήτων. Σημαντικό επίσης είναι, ότι το παραγόμενο ελαιόλαδο περιέχει το φαινολικό κλάσμα και τα αρωματικά συστατικά του καρπού, αφού δεν απομακρύνονται στο νερό όπως στα τριφασικά ελαιουργεία, κάνοντάς το περισσότερο εύγευστο, υγιεινό και ανθεκτικό στην οξείδωση.

Παρά το γεγονός ότι τα διφασικά ελαιοτριβεία έδωσαν λύση στο τεράστιο πρόβλημα των υγρών αποβλήτων, αμφισβητείται η πλεονεκτική τους θέση. Αυτό συμβαίνει γιατί η ελαιοπυρήνα τους θα πρέπει πρώτα να αφυδατωθεί μέχρι 8-11% υγρασία, σε σχέση με το 60% περίπου που περιείχε, ώστε όταν οδηγηθεί στο πυρηνελαιουργείο να είναι ευκολότερη η επεξεργασία της. Μια διαδικασία, η οποία έχει υψηλό ενεργειακό κόστος.

Το απόβλητο που θα επεξεργαστούμε στην παρούσα εργασία είναι το παραπροϊόν κατά την παραγωγή ελαιόλαδου από ελαιοτριβεία διφασικού συστήματος.



**Εικόνα 3:** Στην φωτογραφία παρουσιάζεται ένα μηχάνημα για την εξαγωγή εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, δύο φάσεων, χωρίς χρήση ζεστού νερού, σε συνεχή κύκλο.

### **Τα παραγόμενα απόβλητα επιβαρύνουν το περιβάλλον**

Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο, παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού), τα ελαιόφυλλα που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιοκάρπο και μια σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως "κατσίγαρος".

Ο κατσίγαρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο

ελαιουργείο. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση του κατσίγαρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του.

Ο κατσίγαρος είναι απόβλητο άκρως φυτοτοξικό αφού 1 κυβικό μέτρο κατσίγαρου ισοδυναμεί με 150 περίπου κυβικά μέτρα αστικών αποβλήτων. Όταν πέφτει στο νερό, όχι μόνο το χρωματίζει μαύρο, αλλά και συντελεί σε μια σειρά από χημικές αντιδράσεις που αφαιρούν το οξυγόνο από το υδάτινο περιβάλλον.

Το υψηλό οργανικό φορτίο του κατσίγαρου σε συνάρτηση με την παρουσία των πολυφαινολών δεν επιτρέπει την απευθείας διάθεση του στο περιβάλλον, αλλά καθιστά αναγκαία την πρότερη επεξεργασία του. Για την επεξεργασία και διάθεση του κατσίγαρου έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι σε εργαστηριακή και πραγματική κλίμακα. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία ολοκληρωμένη λύση, αλλά έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές κατά περίπτωση που παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα τεχνικής ή οικονομικής φύσεως και δεν έχουν επιλύσει ικανοποιητικά το πρόβλημα.

Σήμερα η Ισπανία και η Ιταλία (οι δυο χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή σε ελαιόλαδο), εφαρμόζουν τις νέες τεχνολογίες με επιτυχία. Στην Ελλάδα, που αποτελεί την τρίτη ελαιοπαραγωγό χώρα σε παγκόσμιο επίπεδο, λειτουργούν 2.700 ελαιοτριβεία, πολλά από τα οποία έχουν εκσυγχρονιστεί αλλά συνεχίζουν να λειτουργούν με την πεπαλαιωμένη τεχνολογία, αφού οι επενδύσεις που έγιναν με σημαντικές κρατικές και κοινοτικές επιδοτήσεις για την αναβάθμιση των τριφασικών ελαιοτριβείων σε διφασικά, δεν συνοδεύτηκαν από τις απαιτούμενες επενδύσεις για την αναβάθμιση και των πυρηνελαιουργείων.

Ποικίλες μελέτες, επιστημονικά έργα και προγράμματα, παραμένουν ανεφάρμοστα τη στιγμή μάλιστα που τα «άχρηστα» απόβλητα των ελαιοτριβείων είναι πηγή πολλών άλλων χρήσιμων. Αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή κυρίως στερεών βιοκαυσίμων, αλλά και φαρμάκων, λιπασμάτων, καλλυντικών, όπως και για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

## Αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αν και αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα μόλυνσης και ένα δισεπίλυτο πρόβλημα στο χώρο των γεωργικών βιομηχανιών μπορούν να αξιοποιηθούν αφού είναι πλούσια σε απλές και πολύπλοκες υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις με πιθανές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Visioli et al., 1995b). Η περιεκτικότητα του κασιόγαρου σε φαινολικές ενώσεις είναι 0,15%-0,18%. Περιέχει επίσης, σε μικρότερα ποσοστά φλαβονοειδή, ανθοκυάνες και ταννίνες που παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις.

Στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαίνη. Η υδροξυτυροσόλη είναι φυσικό προϊόν που εμφανίζει φαρμακολογικές και αντιοξειδωτικές δράσεις (Visioli et al., 2001). Σε ένα λίτρο υγρών αποβλήτων υπάρχουν περίπου 130mg από την ουσία αυτή και αν αναλογιστούμε ότι 30 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων παράγονται ετησίως από τα ελαιοτριβεία, γίνεται κατανοητό ότι είναι μια τεράστια και ανεκμετάλλευτη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών.

Η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει, επίσης, αντιμικροβιακή και φυτοτοξική δράση με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν συντηρητικό τροφίμων, στη γεωργία για την προστασία της ελιάς, σαν αντιοξειδωτικό στον άνθρωπο και σε τοπικά σκευάσματα ενάντια στη γήρανση και τις φλεγμονές (Visioli et al., 1999).

Η ελευρωπαίνη βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες, τόσο στον καρπό της ελιάς, όσο και στα απόβλητα που προέρχονται από τις διαδικασίες παραγωγής του ελαιολάδου και επεξεργασίας της βρώσιμης ελιάς. Απομονώνεται σε σημαντικές ποσότητες και από τα φύλλα της ελιάς, τα οποία περιλαμβάνονται στα στερεά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

Τα προϊόντα και τα υποπροϊόντα της ελαιουργίας αποτελούν φυσική πηγή βιολογικά ενεργών ουσιών και στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια απομόνωσης και καθορισμού της δομής δευτερογενών μεταβολιτών από αυτά.

## Γ) ΜΗΛΟ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΜΗΛΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΟΥ

### Εισαγωγικά

Το μήλο είναι ο καρπός του δέντρου *Malus domestica*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Είναι μια από τις πιο γνωστές ποικιλίες δέντρων, τα οποία είναι φυλλοβόλα και φτάνουν τα 3 έως 12 μέτρα σε ύψος. Τα φύλλα τους έχουν 5 έως 12 εκατοστά μήκος και 3 έως 6 εκατοστά φάρδος. Τα φρούτα ωριμάζουν το φθινόπωρο και συνήθως έχουν 5 έως 9 εκατοστά διάμετρο. Το μήλο αποτελείται κατά 85% από νερό, 11% από υδρογονάνθρακες, 0,6% από υδατάνθρακες, 0,5% από οργανικά οξέα και 0,3% από πρωτεΐνες (Van der Sluis, 2005). Η βοτανική ταξινόμηση της ελιάς είναι η ακόλουθη:

**Βασίλειο:** Plantae

**Διαίρεση:** Magnioliophyta

**Τάξη:** Magnioliopsida

**Κλάση:** Rosales

**Οικογένεια:** Rosaceae

**Γένος:** Malus

**Είδος:** M. Domestica

Η μηλιά προέρχεται από την Κεντρική Ασία, όπου ο άγριος προγονός της βρίσκεται ακόμα εκεί. Υπάρχουν πάνω από 7.500 ποικιλίες μήλου γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός μεγάλου εύρους επιθυμητών χαρακτηριστικών. Οι ποικιλίες διαφέρουν στη σοδειά και στο μέγεθος του δέντρου ακόμα και όταν μεγαλώνουν στο ίδιο ρίζωμα.



## **Παραγωγή μήλου**

Η καλλιέργεια της μηλιάς είναι διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο. Καταλαμβάνει την τρίτη θέση στα οπωροφόρα δένδρα, με ετήσια παγκόσμια παραγωγή που πλησιάζει τους 59.000.000 τόνους. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η ετήσια παραγωγή μήλων κυμαίνεται από 8.500.000 έως 10.000.000 τόνους. Αυτά τα νούμερα κατατάσσουν το μήλο πρώτο σε παραγωγή στην Ευρώπη.

Η μηλιά αποτελεί για τη χώρα μας τη δεύτερη σε σπουδαιότητα δενδροκομική καλλιέργεια, μετά τη ροδακινιά, από τα φυλλοβόλα οπωροφόρα και τρίτη μετά τα εσπεριδοειδή. Στην Ελλάδα υπερέχουν οι κόκκινες ποικιλίες (ποσοστό 70%) σε αντίθεση με τις πλείστες Ευρωπαϊκές χώρες όπου υπερέχουν οι πράσινες ποικιλίες (αντίστοιχο ποσοστό για την Ελλάδα περίπου 20%). Δεν υπάρχει τάση δραματικής ανακατάταξης των ποικιλιών, παρά μόνο μία ελαφρά τάση αύξησης των Granny Smith τα τελευταία χρόνια, εις βάρος των μήλων Renette, που κυριολεκτικά εξαφανίζονται ενώ πριν 15-20 χρόνια αποτελούσαν σημαντικό κομμάτι της ελληνικής παραγωγής μήλων.

Η Ελλάδα παράγει σε μια μέση φυσιολογική χρονιά 300.000 – 350.000 τόνους μήλα. Τα μεγέθη αυτά μπορεί να ακούγονται μικρά σε σχέση με τις μεγάλες παραγωγικές χώρες της Ευρώπης, ωστόσο σε σχέση με τον πληθυσμό της χώρας είναι αρκετά σημαντικά. Τέλος, αναφέρεται πως η κατά κεφαλήν κατανάλωση μήλων στην Ελλάδα είναι αρκετά καλή, περίπου 23 κιλά, ενώ ο μέσος όρος των χωρών της Ε.Ε. είναι 18 κιλά.

## **Τα οφέλη της υγιεινής διατροφής**

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπως και σε όλες τις βιομηχανοποιημένες χώρες, οι καρδιαγγειακές ασθένειες και ο καρκίνος, τοποθετούνται στις δυο πρώτες αιτίες θανάτου. Τα αίτια και των δυο αυτών ασθενειών έχουν συνδεθεί με τον τρόπο ζωής, με πρωταγωνιστικό ρόλο τη διατροφή. Έχει εκτιμηθεί πως η υγιεινή διατροφή μπορεί να αποτρέψει περίπου το 30% όλων των ειδών του καρκίνου. Η υψηλή χοληστερόλη και η παχυσαρκία, επηρεάζονται σημαντικά από τη διατροφή και από τον τρόπο ζωής και κοστίζουν στις Ηνωμένες Πολιτείες δισεκατομμύρια δολαρίων για την αντιμετώπισή τους. Συγκεκριμένα, το 1998 εκτιμήθηκε ότι η παχυσαρκία, η οποία

αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση πολλών ασθενειών (καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, διαβήτης κ.ά.), κοστίζει στα Ενωμένα Έθνη πάνω από 92 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο. Κατανοώντας λοιπόν τα οφέλη της υγιεινής διατροφής σε σχέση με την εμφάνιση των χρόνιων ασθενειών, θα ήταν πολύ πιθανό να βοηθήσει στη μείωση της εμφάνισης αυτών.

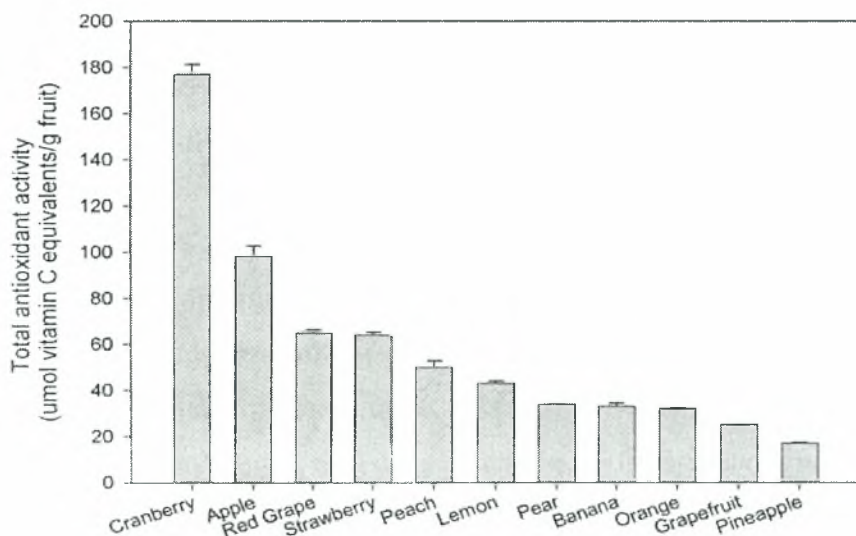
Σαν παιδιά ακούσαμε πολλές φορές τη φράση «ένα μήλο την ημέρα τον γιατρό τον κάνει πέρα». Πρόσφατα, πολλές έρευνες έρχονται να επιβεβαιώσουν αυτή τη φράση. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, πολλοί ερευνητές πραγματοποίησαν πάνω από εκατό επιδημιολογικές μελέτες σχετιζόμενες με τον καρκίνο και τη διατροφή και διαπίστωσαν ότι 128 από τους 156 συμμετέχοντες που κατανάλωσαν μικρές ποσότητες φρούτων και λαχανικών, είχαν διπλάσια πιθανότητα να πάθουν καρκίνο σε σχέση με εκείνους που ακολούθησαν διατροφή πλούσια σε αυτά. Πρόσφατα, έρευνα σε γυναίκες της Κίνας συνέδεσε την πρόσληψη φρούτων και λαχανικών με τη μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Επίσης, συνδέθηκε με την πρόληψη της εμφάνισης της στεφανιαίας καρδιαγγειακής νόσου. Περίπου 84.000 γυναίκες παρακολούθηθηκαν για 14 χρόνια και 42.000 άντρες για 8 χρόνια. Το συμπέρασμα ήταν πως τα άτομα που κατανάλωναν μεγάλες ποσότητες φρούτων και λαχανικών παρουσίασαν 20% μικρότερη πιθανότητα για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, και μάλιστα τα χαμηλότερα ποσοστά εμφανίστηκαν σε όσους κατανάλωσαν πράσινα λαχανικά και φρούτα πλούσια σε βιταμίνη C. Ωστόσο, αναφέρεται πως η διατροφή που είναι πλούσια σε φρούτα και λαχανικά μπορεί να βοηθήσει σε ένα πλήθος άλλων ασθενειών, όπως ο καταρράκτης, ο διαβήτης, το Alzheimer ακόμα και το άσθμα.

### **Οι ευεργετικές ουσίες των φρούτων και των λαχανικών**

Το προστατευτικό αποτέλεσμα των φρούτων και των λαχανικών, οφείλεται στις περιεχόμενες ουσίες, όπως είναι τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, τα ισοφλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα τριτερπένια. Εκατοντάδες ουσίες έχουν ταυτοποιηθεί στα τρόφιμα, αλλά υπάρχουν ακόμα πολλές που είναι άγνωστες. Διαφορετικές φυτοχημικές ομάδες έχουν βρεθεί να βοηθούν στην πρόληψη και την προστασία έναντι των χρόνιων ασθενειών. Για παράδειγμα, οι ουσίες αυτές μπορεί να περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, να ρυθμίζουν την

ανοσολογική απόκριση, και να προστατεύουν ενάντια στην οξείδωση των λιπιδίων. Ο σπουδαιότερος ρόλος των φυτοχημικών είναι αυτός της προστασίας έναντι της οξείδωσης. Τόσο οι καρδιαγγειακές ασθένειες όσο και ο καρκίνος, θεωρείται ότι μπορεί να είναι το αποτέλεσμα «οξειδωτικού stress», το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη μεγαλύτερων βιομορίων όπως DNA, λιπιδίων και πρωτεϊνών.

Τα μήλα, θεωρούνται επίσης πολύ καλή πηγή αντιοξειδωτικών. Όταν συγκρίθηκαν με πολλά άλλα φρούτα που καταναλώνονται ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα μήλα είχαν τη δεύτερη θέση στο επίπεδο της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Εικόνα 4). Επίσης, ταξινομούνται στη δεύτερη θέση όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, και ακόμη πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελεύθερες φαινολικές ενώσεις, συγκρινόμενα με άλλα φρούτα. Αυτό σημαίνει πως αυτές οι ενώσεις δεν είναι συνδεδεμένες με άλλες ενώσεις που βρίσκονται μέσα στα φρούτα, κι έτσι είναι πιο διαθέσιμες για την ενδεχόμενη απορρόφηση στην κυκλοφορία του αίματος.



**Εικόνα 4:** Αντιοξειδωτική ικανότητα από διάφορα εκχυλίσματα φρούτων. Boyer and Liu *Nutrition Journal* 2004 3:5.

## Ερευνητικές αποδείξεις για την προσφορά της κατανάλωσης μήλου στον ανθρώπινο οργανισμό

**Διαβήτης:** Η κατανάλωση μήλων μπορεί να συνδεθεί με έναν χαμηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση διαβήτη. Σε μια φιλανδική μελέτη 10.000 ανθρώπων, παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο (Knekt P. et al., 1997). Η υψηλότερη πρόσληψη κερκετίνης, ένα σημαντικό συστατικό των φλουδών των μήλων, συνδέθηκε επίσης με μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση διαβήτη τύπου II. Ωστόσο, η κατανάλωση κρεμμυδιών, πορτοκαλιών, γκρέιπφρουτ και άσπρων λάχανων δεν είχε παρόμοιο αποτέλεσμα. Επίσης, η διϋδροχαλκόνη φλοριζίνη, παίζει σημαντικό ρόλο στο διαβήτη. Η φαρμακολογική της δράση έγκειται στην παραγωγή νεφρικής γλυκοζουρίας και στην αναστολή της απορρόφησης της γλυκόζης μέσω της εντερικής οδού.

**Αντι-πολλαπλασιαστική ικανότητα:** Τα μήλα έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες ότι έχουν ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα. Όταν caco-2 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου αντιμετωπίστηκαν με εκχυλίσματα μήλων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εμποδίστηκε κατά τρόπο ανάλογο της δόσης, φθάνοντας σε μια μέγιστη παρεμπόδιση 43% σε δόση 50 mg/ml. Το ίδιο αποτέλεσμα φάνηκε σε Hep G2 καρκινικά κύτταρα συκωτιού με τη μέγιστη παρεμπόδιση να φθάνει το 57% σε δόση 50 mg/ml. Ο Eberhardt και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι ο μοναδικός συνδυασμός φυτοχημικών στα μήλα είναι υπεύθυνος για την παρεμπόδιση της αύξησης των ογκογόνων κυττάρων (Eberhardt et al., 2001). Τα μήλα κατέκτησαν την τρίτη υψηλότερη θέση όσον αφορά την αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα όταν συγκρίθηκαν με έντεκα άλλα φρούτα που καταναλώνονται ευρέως.

Οι διαφορετικές ποικιλίες των μήλων είχαν διαφορετικά αποτελέσματα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων συκωτιού. Σε μια δόση 50 mg/ml, το μήλο ποικιλίας Fuji παρεμπόδισε τον πολλαπλασιασμό Hep G2 καρκινικών κυττάρων κατά 39% και τα μήλα ποικιλίας Red Delicious εμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό τους κατά 57%. Τα μήλα χωρίς φλούδες ήταν σημαντικά λιγότερο αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού Hep G2 κυττάρων, σε σύγκριση με τα μήλα με τη φλούδα, κι έτσι προτάθηκε ότι οι φλούδες μήλων κατέχουν από μόνες τους σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα. Ο Wolfe

και οι συνεργάτες του κατέδειξαν ότι οι φλούδες του μήλου παρεμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό Her G2 κυττάρων σημαντικά περισσότερο από ολόκληρα τα μήλα (Wolfe et al., 2003). Για παράδειγμα, οι φλούδες μήλων από την ποικιλία Idared είχαν EC50 13.6 mg/ml ενώ ολόκληρο το μήλο είχε EC50 125.1 mg/ml. Το EC50 αναφέρεται στη δόση του μήλου που απαιτείται για να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 50%.

**Καρκίνος:** Διάφορες μελέτες έχουν συνδέσει την κατανάλωση μήλων με τη μείωση του κινδύνου της εμφάνισης καρκίνου, ειδικότερα του καρκίνου του πνεύμονα. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Χαβάη, διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση μήλων και κρεμμυδιών συνδέεται με τον μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα και στους άντρες και τις γυναίκες (Le Marchand et al., 2000). Το ιστορικό καπνίσματος και η κατανάλωση τροφίμων αξιολογήθηκαν για 582 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 582 άτομα ελέγχου χωρίς καρκίνο του πνεύμονα. Υπήρξε ένας 40%-50% μικρότερος κίνδυνος για εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα στους συμμετέχοντες με την υψηλότερη πρόσληψη των μήλων, των κρεμμυδιών, και του άσπρου γκρέιπφρουτ όταν συγκρίθηκε με εκείνους που κατανάλωσαν το χαμηλότερο ποσό αυτών των φρούτων. Ο μειωμένος κίνδυνος στο καρκίνο του πνεύμονα παρατηρήθηκε και στους άνδρες και στις γυναίκες και σχεδόν σε όλες τις εθνικές ομάδες.

**Αντιοξειδωτική ικανότητα:** Τα μήλα, και ειδικά οι φλούδες των μήλων, έχουν βρεθεί να αναπτύσσουν μια ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, ικανή να μειώσει ακόμα και την ανάπτυξη του καρκίνου στο συκώτι. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, βρέθηκε ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα από 100gr μήλου (δηλαδή όσο είναι περίπου το βάρος ενός μήλου), είναι ισοδύναμη με περίπου 1500 mg της βιταμίνης C. Εντούτοις, το ποσό της βιταμίνης C σε 100gr μήλου είναι μόλις περίπου 5,7 mg. Η βιταμίνη C είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, αλλά αυτή η έρευνα δείχνει ότι σχεδόν όλη η αντιοξειδωτική δραστηριότητα από τα μήλα προέρχεται από ποικίλες άλλες ενώσεις. Η βιταμίνη C στα μήλα συνέβαλε λιγότερο από 0,4% της συνολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.

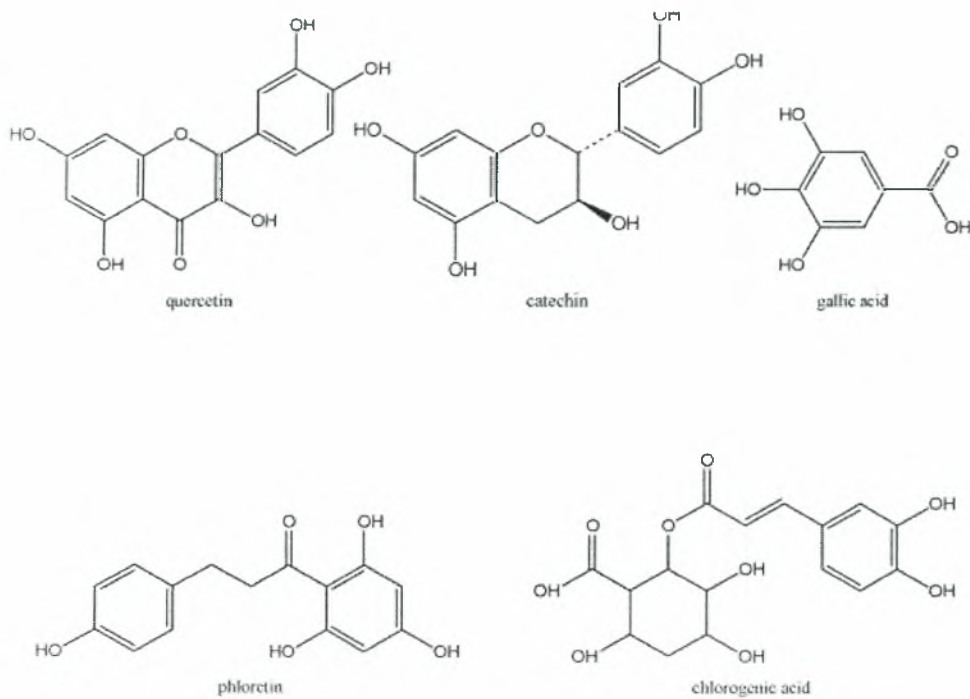
Άλλες ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου, οφειλόμενες στην κατανάλωση μήλων, αναφέρονται οι εξής: μείωση της χοληστερόλης, παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων, καθώς και μείωση της εμφάνισης άσθματος. Επίσης,

ασθένειες όπως ο καταρράκτης, η αρθρίτιδα και οι δυσλειτουργίες του εγκεφάλου, που είναι αποτέλεσμα βλάβης των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες που είναι πιθανό να σχηματιστούν, μπορούν να προληφθούν αν προσθέσουμε στη διατροφή μας φυσικά αντιοξειδωτικά. Τέλος, προσφάτα βρέθηκε ότι ακατέργαστα εκχυλίσματα ανώριμων μήλων περιόρισαν τις ενζυματικές δραστηριότητες της τοξίνης της χολέρας, με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

### **Φυτοχημικές ουσίες των μήλων**

Τα μήλα είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, καθώς και άλλα φυτοχημικά, αλλά η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία του μήλου, η συγκομιδή, η φύλαξη και η επεξεργασία του. Η συγκέντρωση επίσης διαφέρει μεταξύ της φλούδας του μήλου και της σάρκας του.

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι ενώσεις που βρίσκονται συνήθως στις φλούδες των μήλων είναι οι προκυανιδίνες, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, το χλωρογενικό οξύ, η φλοριζίνη καθώς και οι ενώσεις της κερκετίνης. Στη σάρκα του μήλου υπάρχει κατεχίνη, προκυανιδίνη, επικατεχίνη και φλοριζίνη αλλά σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση από αυτή που βρέθηκε στις φλούδες. Εξαιτίας αυτού, οι φλούδες των μήλων έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοδραστικότητα σε σχέση με τη σάρκα του μήλου.



**Εικόνα 5:** Δομές από επιλεγμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχονται στα μήλα.  
Boyer and Liu *Nutrition Journal* 2004 3:5

Έρευνα έδειξε ότι τα μήλα με τη φλούδα, ήταν πιο ικανά να αποτρέψουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα μήλα που δεν είχαν φλούδα. Επίσης πιο πρόσφατη ανακάλυψη, αποκαλύπτει ότι οι φλούδες των μήλων περιέχουν από 2 έως 6 φορές περισσότερο, συγκρινόμενες με τη σάρκα τους, φαινολικά παράγωγα και 2 έως 3 φορές περισσότερα флаβονοειδή. Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν 2 έως 6 φορές υψηλότερη, αναλόγως με την ποικιλία του μήλου. Οι Leontowicz και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι ποντίκια που τράφηκαν με φλούδες μήλων έδειξαν μεγαλύτερη ανοχή στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος σε σχέση με εκείνα που κατανάλωσαν μήλα χωρίς τη φλούδα (Leontowicz et al., 2003).

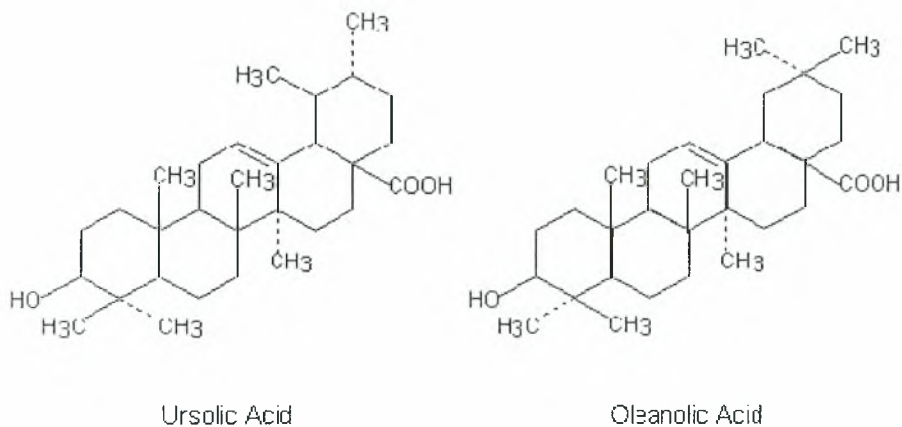
Τόσο οι μελέτες ζώων όσο και οι μελέτες πάνω σε κύτταρα, που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν καταφέρει να συνδέσουν τα πολυφαινολικά παράγωγα των μήλων με μια ποικιλία διαδικασιών που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόληψη έναντι χρόνιων ασθενειών. Αυτό στηρίζει την υπόθεση πως οι φυτοχημικές ουσίες των μήλων είναι εκείνες που συνεισφέρουν στα οφέλη της υγείας.

## Τριτερπένια:

Επίσης, σημαντική θέση ανάμεσα στα συστατικά των μήλων, κατέχουν τα τριτερπένια. Στην κατηγορία αυτή, απαντούν κυρίως το ουρσολικό οξύ, το μασλινικό οξύ καθώς και το ολεανολικό. Πρόκειται για χημικές ενώσεις, οι οποίες εντοπίζονται σε διάφορα τρόφιμα όπως και στα μήλα και ειδικά στις φλούδες αυτών.

- Ουρσολικό οξύ - Ολεανολικό οξύ:

Το ολεανολικό οξύ (3β-υδροξυολεα-12-εν-28-οϊκό οξύ) και το ισομερές του, ουρσολικό οξύ (3β-υδροξυουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ) είναι τριτερπενικές ενώσεις που υπάρχουν σε πολλά φυτά είτε ως ελεύθερα οξέα, είτε ως γενίνες τριτερπενικών σαπωνινών (Jie Liu, 1995).



**Εικόνα 6:** Χημικές δομές ουρσολικού και ολεανολικού οξέος.

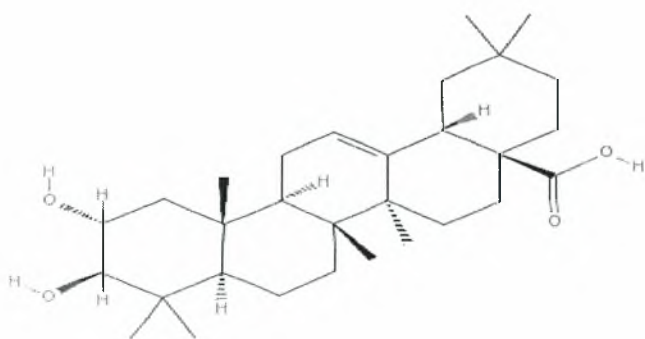
Το ολεανολικό και το ουρσολικό οξύ διαθέτουν πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι παρακάτω: **αντιφλεγμονώδεις, ηπατοπροστασία, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντι-υπερλιπιδαιμικές, καρδιοτονωτικές και αντιδιουρητικές** (Somova L. O. et al., 2003). Το μεγάλο ενδιαφέρον για το ουρσολικό αλλά και για το ολεανολικό οξύ προέρχεται από το γεγονός πως αυτές οι δυο ενώσεις είναι παρούσες σε πολλά φυτά και έχουν αντιοξειδωτική δράση αλλά και διουρητική, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Σε μια έρευνα μελετήθηκε η καρδιαγγειακή (συστολική και διαστολική πίεση του αίματος, καρδιακός ρυθμός), η αντι-υπερλιπιδαιμική (τριγλυκερίδια, ολική



χοληστερόλη), η αντιοξειδωτική (υπεροξειδάση γλουταθειόνης-GPx και υπεροξειδική δισμουτάση-SOD), η διουρητική και υπογλυκαιμική δράση μετά από χορήγηση 98% καθαρού ολεανολικού και ουρσολικού οξέος σε ποντίκια που έπασχαν από υπέρταση εκ γενετής. Και τα δυο οξέα παρουσίασαν χαμηλή οξύτητα με LC50 0,10 και 0,95mg/ml αντιστοίχως. Αν και τα δύο τριτερπένια δεν είχαν άμεση υποτασική δράση, μετά από 6 εβδομάδες καθημερινής χορήγησης σε δόση 60mg/kg ουρσολικού και ολεανολικού οξέος, αποτράπηκε η ανάπτυξη σοβαρής υπέρτασης. Η **αντιυπερτασική δράση** στα DSS ποντίκια αποδόθηκε στην ισχυρή διουρητική δράση, στην απ' ευθείας καρδιακή δράση (ο ρυθμός της καρδιάς μειώθηκε κατά 34% και 32% αντίστοιχα), στην αντιοξειδωτική δράση (η GPx μειώθηκε κατά 12% και 10% αντίστοιχα, ενώ η SOD κατά 12% και 22% αντιστοίχως), και στην υπογλυκαιμική δράση (η γλυκόζη του αίματος ελαττώθηκε κατά 20% και 50% αντίστοιχα). Εκτός από την αντιυπερλιπιδαιμική δράση που αναφέρεται, τα αντιυπερτασικά αποτελέσματα από την χορήγηση *in vivo* των δύο οξέων αναφέρονται πρώτη φορά και οι μηχανισμοί δράσης είναι υπό εξέταση.

#### **Μασλινικό οξύ:**

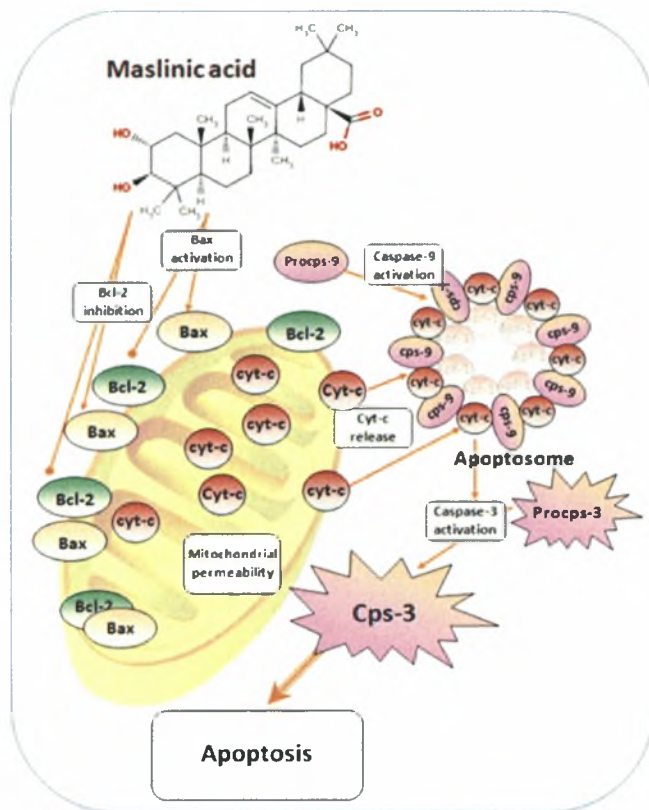


Χαμηλές συγκεντρώσεις μασλινικού οξέος έχουν βρεθεί σε πολλά φυτά με φαρμακολογικές ιδιότητες. Το μασλινικό οξύ έχει αναφερθεί ως **αντιοξειδωτικό** και **αντιφλεγμονώδες**, ενώ επίσης είναι γνωστό για τις **αντιμικροβιακές** και **αντιυικές** του ιδιότητες.

Αξίζει να αναφερθεί μια πρόσφατη μελέτη του 2009, η οποία αναφέρει πως το μασλινικό οξύ επηρεάζει την **απόπτωση** σε HT29 καρκινικά κύτταρα του εντέρου

του ανθρώπου μέσω του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού (Fernando J. et al., 2008). Σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές, η φυσιολογική διαδικασία της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είναι ανενεργή. Ωστόσο, ορισμένες φυσικές ουσίες, μπορούν να αποκαταστήσουν αυτή τη λειτουργία μέσω δύο βασικών μονοπατιών: το εγγενές και το εξωτερικό. Ένας μηχανισμός των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μηχανισμού. Η μιτοχονδριακή απόπτωση, ελέγχεται από την οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών. Η αναστολή της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και η ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής Bax πρωτεΐνης, (ανήκουν και οι δύο στην οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών), έχουν σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών μιτοχονδριακών παραγόντων, όπως είναι το κυτόχρωμα c. Το κυτόχρωμα c αντιδρά με την πρωτεΐνη Araf-1 κι έτσι ενεργοποιείται η κασπάση 9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί καθοδικά την κασπάση 3, που είναι η κύρια πρωτεάση στο μονοπάτι της απόπτωσης.

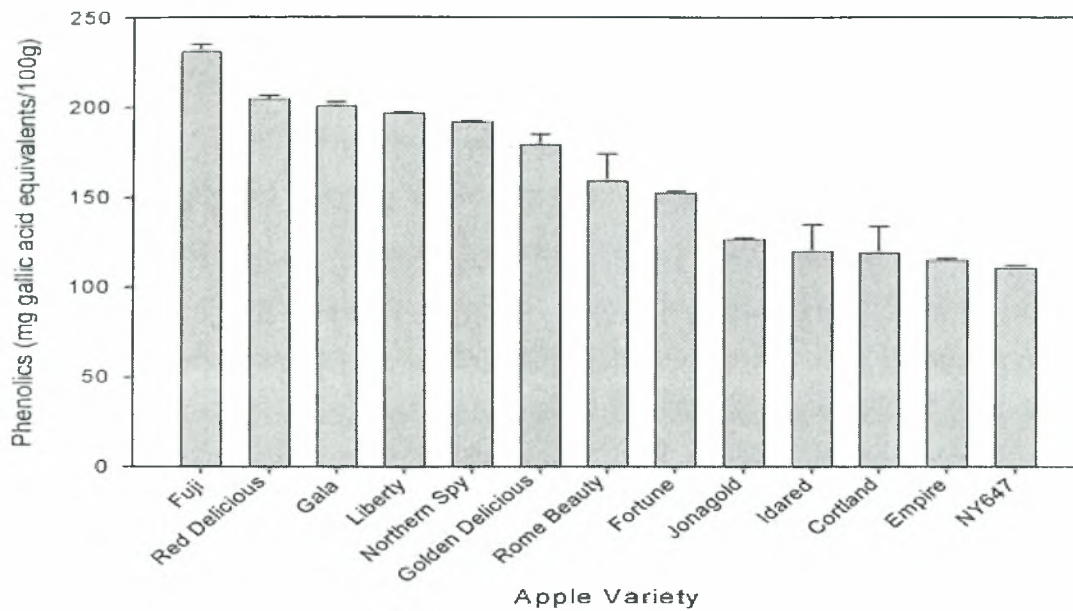
Τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας μελέτης αποδεικνύουν πως το μασλιτικό οξύ, ασκεί αντί-πολλαπλασιαστική και προ-αποπτωτική δράση, σε HT-29 καρκινικά εντερικά κύτταρα, μέσω της **απευθείας** ενεργοποίησης του αποπτωτικού μιτοχονδριακού μονοπατιού. Ασκεί **άμεση δράση** στην πρωτεΐνη Bcl-2, αυξάνοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από την πρωτεΐνη Bax, με τελική ενεργοποίηση των κασπασών. Όντας λοιπόν ικανό για ενεργοποίηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, αποδεικνύεται χρήσιμο εργαλείο για τη χημειοθεραπεία του καρκίνου (Εικόνα 7).



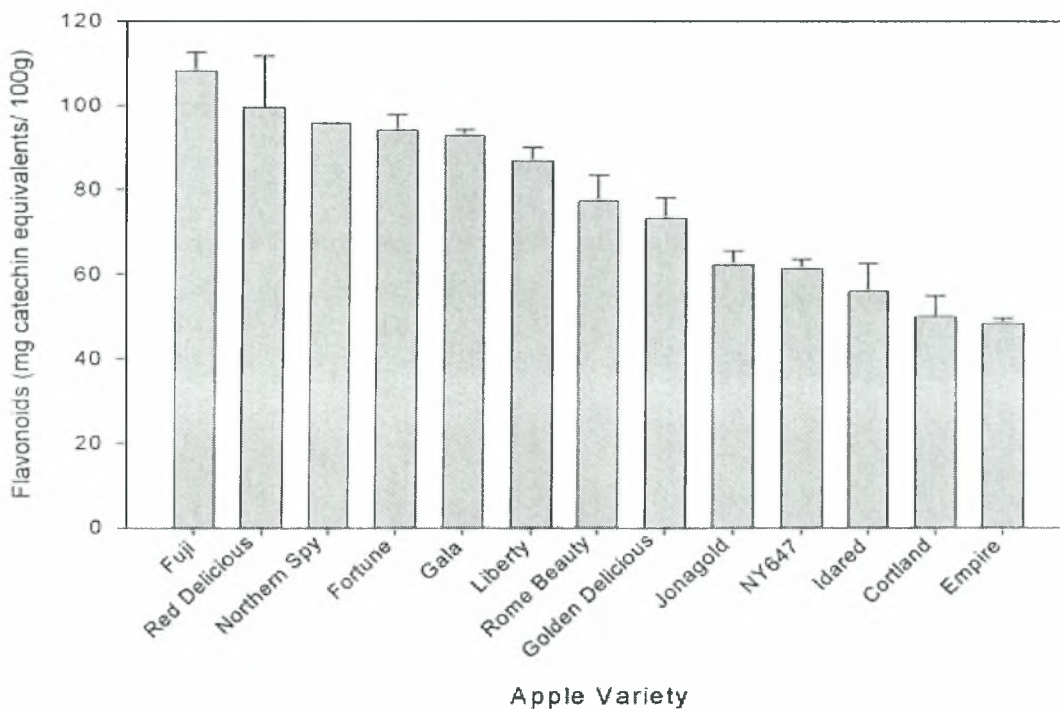
**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού για την επαγωγή της απόπτωσης από το μασλινικό οξύ σε HT29 καρκινικά κύτταρα του εντέρου. Ο μηχανισμός αυτός ρυθμίζεται μέσω της αναστολής της Bcl-2 και της επαγωγής της Bax πρωτεΐνης, προκαλώντας μιτοχονδριακή διάσπαση, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και 3.

### Διαφορές μεταξύ των ποικιλιών των μήλων

Ερευνητές του πανεπιστημίου Cornell, έχουν βρει ευδιάκριτες διαφορές στο συνολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών και πολυφαινόλων, μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών. Ανάμεσα σε 10 ποικιλίες που είναι αρκετά γνωστές στις Ηνωμένες Πολιτείες, η ποικιλία Fuji είχε την πρώτη θέση σχετικά με τη συγκέντρωση των περιεχόμενων φλαβονοειδών και των φαινολικών παραγώγων (Εικόνες 8,9).



**Εικόνα 8:** Ολική συγκέντρωση φαινολικών σε διάφορες ποικιλίες μήλων. Boyer and Liu  
*Nutrition Journal* 2004 3:5



**Εικόνα 9:** Ολική συγκέντρωση φλαβονοειδών σε διάφορες ποικιλίες μήλων. Boyer and Liu  
*Nutrition Journal* 2004 3:

### Απόβλητα μήλου

Το ξηρό υπόλειμμα του μήλου αφορά μια τεράστια ποσότητα αποβλήτου, παγκοσμίως, η οποία παράγεται κυρίως κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του μήλου για την παραγωγή χυμού. Στην Νέα Ζηλανδία, το 1997, το βάρος αυτού εκτιμήθηκε 2-4 εκατομμύρια τόνους. Μεγάλη προσπάθεια έχει καταπονηθεί ώστε να αξιοποιηθεί αυτό το απόβλητο, με διάφορους τρόπους, όπως στο βιοαέριο, για παραγωγή ενέργειας και ως συστατικό σε τρόφιμα. Επειδή πλήθος ασθενειών, όπως έχουμε αναφέρει, προκύπτουν από την κυτταρική βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες, υπάρχει ένα μαζικό ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, που έχει οδηγήσει στην εκτεταμένη έρευνα για την εύρεσή τους και την αξιοποίησή τους.

Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε σκοπός ήταν η αναζήτηση, στο ξηρό υπόλειμμα του μήλου, προϊόντων υψηλής αξίας τα οποία μπορεί να άξιζαν οικονομικά για εμπορική εκμετάλλευση. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως οι πολυφαινόλες που είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζουν τα μήλα, ήταν διαθέσιμες και παρούσες στο ξηρό υπόλειμμα του μήλου. Μια ποικιλία από πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν, όπως η φλοριζίνη, η 3-υδροξυφλοριζίνη, το χλωρογενικό οξύ, η επικατεχίνη και τα ολιγομερή της και οι γλυκοσίδες της κερκετίνης, μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Όλες οι ενώσεις βρέθηκαν να κατέχουν καλές αντιοξειδωτικές ικανότητες.

Γι' αυτό γίνεται ξεκάθαρο πως το ξηρό υπόλειμμα του μήλου θα μπορούσε να αποτελέσει μια φτηνή και διαθέσιμη πηγή αντιοξειδωτικών στη διατροφή μας.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Α) ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

#### Απομόνωση υδροξυτυροσόλης από νερό ξεπικρίσματος ελαιοκάρπου

**Στάδιο πρώτο:** Επεξεργασία υγρών αποβλήτων με ρητίνες προσροφήσεως

Στην παρούσα διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 2 λίτρα από νερό ξεπικρίσματος βρώσιμων επιτραπέζιων ελαίων. Η επεξεργασία τους είχε ως στόχο την παραλαβή των φαινολικών συστατικών τους και την περαιτέρω μελέτη της ταυτότητας αυτών μετά από απομόνωσή τους. Η τεχνική που εφαρμόστηκε συνίσταται στη διέλευση των υγρών αποβλήτων από περιέκτες πληρωμένους με προσροφητική ρητίνη XAD-4, την παραλαβή των συστατικών που προσροφήθηκαν στη ρητίνη με χρήση οργανικών διαλυτών και τη μελέτη της χημικής σύστασης του στερεού υπολείμματος μετά την απομάκρυνση των τελευταίων.

Προσρόφηση: Η προσρόφηση είναι μια διαδικασία διαχωρισμού, η οποία συνίσταται στην εκλεκτική συγκέντρωση των μορίων της μιας φάσης (υγρής ή αέριας) πάνω σε στερεές επιφάνειες (δεύτερη φάση). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όλες οι επιφάνειες των στερεών δεν είναι λείες σε μικροσκοπική κλίμακα αλλά ανώμαλες. Σε αυτές τις θέσεις τα επιφανειακά άτομα του στερεού μπορούν να ασκήσουν ελκτικές δυνάμεις σε άλλα άτομα ή μόρια από την περιβάλλουσα αέρια ή υγρή φάση.

Ρητίνες προσροφήσεως: Οι ρητίνες προσροφήσεως είναι υψιμοριακές πολυμερείς οργανικές ενώσεις, αδιάλυτες στο νερό και στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες. Οι μακροδικτυωτές αυτές ρητίνες είναι σκληρά, αδιάλυτα σφαιρίδια πορώδους πολυμερούς με κυμαινόμενες φυσικές ιδιότητες από αισθητά μη πολικές μέχρι πολύ πολικές. Ένας απλός κόκκος ρητίνης XAD αποτελείται από συσσωματώματα πολύ μικρών σφαιρών. Η δομή του πόρου μοιάζει με ανοικτό κύτταρο και συνεπώς το νερό μπορεί εύκολα να διεισδύει σε αυτόν. Η ρητίνη XAD έχει μια συνεχή gel φάση και μια συνεχή πορώδη φάση. Κατά την προσρόφηση το υδρόφοβο τμήμα του μορίου

προσροφάται στην υδρόφοβη επιφάνεια της ρητίνης ενώ το υδρόφιλο προσανατολίζεται προς την υδατική φάση.

Συνήθως τα προσροφημένα μόρια δεν εισχωρούν σημαντικά στη φάση των μικροσφαιρών αλλά συγκρατούνται στην επιφάνεια. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η εκρόφηση και οι τεχνικές αναγέννησης.

Η προσρόφηση σε ρητίνες είναι σήμερα η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος καθαρισμού των υγρών αποβλήτων βιομηχανιών που περιέχουν οργανικές ουσίες καθώς παρουσιάζουν πολύ μεγάλη προσροφητική ικανότητα και με αυτόν τον τρόπο πλεονεκτούν σε σχέση με τα υπόλοιπα προσροφητικά μέσα (γέλη πυριτίου, αλουμίνα) (Li et al., 2001). Κάθε τύπος ρητίνης διαθέτει ξεχωριστά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα να προσροφά και διαφορετικά συστατικά. Στην επιφάνεια των ρητινών XAD-4 και XAD-16 προσροφούνται τα φαινολικά συστατικά σχετικά μικρού μοριακού βάρους ενώ η ρητίνη XAD-7HP έχει την ικανότητα δέσμευσης συστατικών μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

#### Προετοιμασία ρητίνης:

Η ρητίνη για να καταστεί ικανή να συγκρατήσει τα μονομερή και πολυμερή προϊόντα που επιθυμείται πρέπει να ενεργοποιηθεί με μια σειρά βημάτων που περιλαμβάνει τα εξής:

- Αρχικά, ζυγίζουμε περίπου 400 γραμμάρια ρητίνης, την τοποθετούμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και ξεπλένουμε με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα που εμπεριέχονται σε αυτή, τα οποία εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε μεθανόλη, αφήνουμε για 3 λεπτά και την αποχύνουμε. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για 4 φορές.
- Έπειτα, προσθέτουμε για τελευταία φορά μεθανόλη και αφήνεται το διάλυμα για μισή ώρα. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τη ρητίνη με μια εξώθερμη διαδικασία.

Η ενεργοποιημένη ρητίνη εισάγεται σε μια στήλη με διάμετρο 2 εκατοστών. Ανοίγουμε τη βάνα ώστε να εξέλθει η μεθανόλη και να εισαχθεί εν συνεχεία το διάλυμά μας. Η ροή ρυθμίζεται έτσι ώστε τα δύο λίτρα να εξέλθουν εντός 2 ωρών και

να επιτευχθεί καλή κατακράτηση των πολυφαινολών. Για να πάρουμε το επιθυμητό, πλούσιο σε πολυφαινόλες διάλυμα, αφού εξέλθει το νερό ξεπικρίσματος, προσθέτουμε στη στήλη με τη ρητίνη, 500 ml μεθανόλης. Και πάλι η αντίδραση είναι εξώθερμη, η στήλη θερμαίνεται και ανοίγουμε τη βάνα για να συλλέξουμε τα 500 ml διαλύματος.

Μετά το πέρας της διαδικασίας το διάλυμα που αποκτήθηκε είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, των οποίων ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση θα γίνει σε παρακάτω στάδιο. Πριν όμως από αυτό πρέπει να ελεγχθεί η παρουσία ουσιών στο προϊόν επεξεργασίας με τη ρητίνη. Έτσι, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του διαλύματος σε Rotavapor R-114 Buchi υπό μειωμένη πίεση σε θερμοκρασία 45°C. Το ξηρό υπόλειμμα ζύγιζε **10,5 gr**.

#### Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας:

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα φάση για ένα γρήγορο έλεγχο της ταυτότητας των πολυφαινολών. Πρόκειται για μια αρκετά αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της παρουσίας και της σχετικής συγκέντρωσης αυτών στο εκχύλισμά μας. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης (Silica gel 60 F<sub>254</sub>) και η ανάπτυξη τους έγινε σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 85/15 καθώς και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 80/20. Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων έγινε σε λάμπα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) σε μήκη κύματος 254nm και 366nm. Στη συνέχεια ψεκάστηκαν με αντιδραστήριο μεθανολικού διαλύματος θειικής βανιλίνης 1% (Εικόνες 10 και 11).





**Εικόνες 10 και 11:** Χρωματογραφήματα σε συστήματα ανάπτυξης 20% MeOH-80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και 15%-85% αντίστοιχα.

Η κύρια ουσία που φαίνεται στις πλάκες αλουμινίου παρουσίασε απορρόφηση σε μήκος κύματος 254 nm και μετά από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με διάλυμα θειικής βανιλίνης διαπιστώσαμε πως είναι η υδροξυτυροσόλη. Όπως φαίνεται και στις εικόνες η κηλίδα της υδροξυτυροσόλης χρωματίζεται μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης με έντονο κόκκινο χρώμα ενώ έχει σημειωθεί και η απορρόφηση που παρατηρήθηκε σε λάμπα υπεριώδους-ορατού.

Επίσης, στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρατηρήσαμε την ύπαρξη μιας κηλίδας στην γραμμή εκκίνησης, η οποία παρουσιάζει απορρόφηση στο υπεριώδες και χρωματίζεται έντονα όταν ψεκάζεται με το διάλυμα εμφάνισης. Για να απομακρύνουμε αυτή την ουσία ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα.

1. Πραγματοποιήσαμε κρυστάλλωση του ανεπιθύμητου προϊόντος με ακετόνη
2. Στη συνέχεια προκαλέσαμε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση του ιζήματος.
3. Και τέλος πήραμε το διήθημα και το συμπυκνώσαμε με απόσταξη υπό κενό.  
Το ξηρό υπόλειμμα ζύγιζε **3 gr**.

Με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, για την οποία χρησιμοποιήθηκε σύστημα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 85/15, παρατηρήσαμε ότι απομακρύνθηκε η ανεπιθύμητη ουσία με το ίζημα (βάρους 7,5gr) που σχηματίστηκε κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης.

Τέλος, το ξηρό προϊόν που προέκυψε καταψύχθηκε μέχρι να το ξαναχρησιμοποιήσουμε.



**Εικόνα 12:** TLC μετά από ανακρυστάλλωση σε σύστημα  
15% MeOH-85%CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Στάδιο δεύτερο:** Διαχωρισμός πολυφαινολών με χρωματογραφία ανοικτής στήλης με σκοπό την απομόνωση της υδροξυτυροσόλης σε καθαρή μορφή.

Το προϊόν που προέκυψε από το πρώτο στάδιο αναλύθηκε περαιτέρω με σκοπό να διαχωρισθούν οι περιεχόμενες ουσίες και να απομονωθούν οι επιθυμητές πολυφαινόλες. Η επίτευξη αυτού του στόχου έγινε με τη χρωματογραφία στήλης. Με τη βοήθεια διαλυτών έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας τα προϊόντα εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν σε κλάσματα. Τα επιμέρους συστατικά κατακρατούνται από την στατική φάση διαφορετικά και χωρίζουν μεταξύ τους ενώ απομακρύνονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους.

#### Προετοιμασία ανοικτής στήλης χρωματογραφίας

Η στατική φάση, η οποία ήταν SiO<sub>2</sub> (Silica gel 40-63 μm/Silica flash), προστέθηκε στη στήλη διαχωρισμού (διαμέτρου 3 cm) ως εναιώρημα στον πρώτο διαλύτη έκλουσης (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99/1).

### Προετοιμασία της στερεής φάσης

Για να μεταφέρουμε το μείγμα των ουσιών που επρόκειτο να διαχωρίσουμε στη στήλη διαχωρισμού εφαρμόσαμε την τεχνική του ξηρού 'depot'. Στη συγκεκριμένη τεχνική, συνήθως σε διάλυμα του μίγματος στον κατάλληλο διαλύτη προστίθεται αρχικά ποσότητα SiO<sub>2</sub> (Silica gel 70-200 μm) διπλάσια από το βάρος του στερεού και ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση υπό μειωμένη πίεση. Ως αποτέλεσμα το μίγμα προσροφάται στο SiO<sub>2</sub> και η σκόνη που προκύπτει έχει καλές ρεολογικές ιδιότητες. Στη διαδικασία που πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιήσαμε 2 gr από το προϊόν μας και προσθέσαμε 5 gr SiO<sub>2</sub>.

### Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία

Αφού εξατμιστεί το διάλυμά μας και γίνει σκόνη το προσθέτουμε στη στήλη. Στη συνέχεια σιγά και προσεκτικά προσθέτουμε το υγρό έκλουσης, έτσι ώστε να μην ανακινηθεί η ουσία μας καθώς πρέπει να προσροφηθεί στην silica. Ξεκινήσαμε να παίρνουμε κλάσματα των 50 ml και πραγματοποιούμε ανά 2 κλάσματα ποιοτικό έλεγχο με χρωματογραφία TLC κανονικής φάσης, για να διαπιστωθεί το περιεχόμενό τους και να προβούμε σε συνένωση των ομοίων.

Από το κλάσμα 19 και μετά συλλέξαμε 40 ml με την ίδια πολικότητα. Από το κλάσμα 61 κι έπειτα συνεχίσαμε με διαλύτη έκλουσης πολικότητας CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 98.5/1.5. Από το κλάσμα 177 μέχρι το 186 το σύστημα έκλουσης είναι πολικότητας CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 97/30. Μετά το 186 προστέθηκαν 100 ml πολικότητας CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 90/10 και τέλος άλλα 200 ml πολικότητας CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 80/20 και η διαδικασία ολοκληρώθηκε.

Με τη βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας παρατηρήσαμε πως από το κλάσμα 114 έως 166 η ουσία που εξέρχεται από τη στήλη είναι καθαρή υδροξυτυροσόλη, κι έτσι συνενώσαμε τα κλάσματα αυτά συνολικού όγκου 230 ml. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη προέκυψαν **685.2 mg** ξηρού προϊόντος.

## Φασματοσκοπία NMR:

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι το βασικό εργαλείο της σύγχρονης χημείας για την αναγνώριση της μοριακής δομής. Στην οργανική χημεία οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μοριακών δομών, την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και τον έλεγχο της καθαρότητας των ενώσεων. Οι πλέον βασικές μέθοδοι για την οργανική χημεία είναι η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR), η φασματομετρία μαζών, η φασματοσκοπία υπερύθρου και η φασματοσκοπία UV/Vis. ([http://kriemhild.uft.uni-bremen.de/nop\\_www/el/articles/pdf/Spectroscopy\\_el.pdf](http://kriemhild.uft.uni-bremen.de/nop_www/el/articles/pdf/Spectroscopy_el.pdf)).

Στην περίπτωση μας, ελήφθη φάσμα  $\text{H}^1$ -NMR με σκοπό τη διαπίστωση της ταυτότητας και της καθαρότητας της ουσίας που απομονώσαμε.

Για τη λήψη του χρησιμοποιήθηκε συσκευή πυρηνικού συντονισμού NMR Bruker Ultrashield™ Plus 400 (400MHz), το οποίο παρατίθεται στην παρακάτω φωτογραφία.



**Εικόνα 13:** Φωτογραφία από συσκευή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

### Προετοιμασία δειγμάτων για φασματοσκοπία NMR:

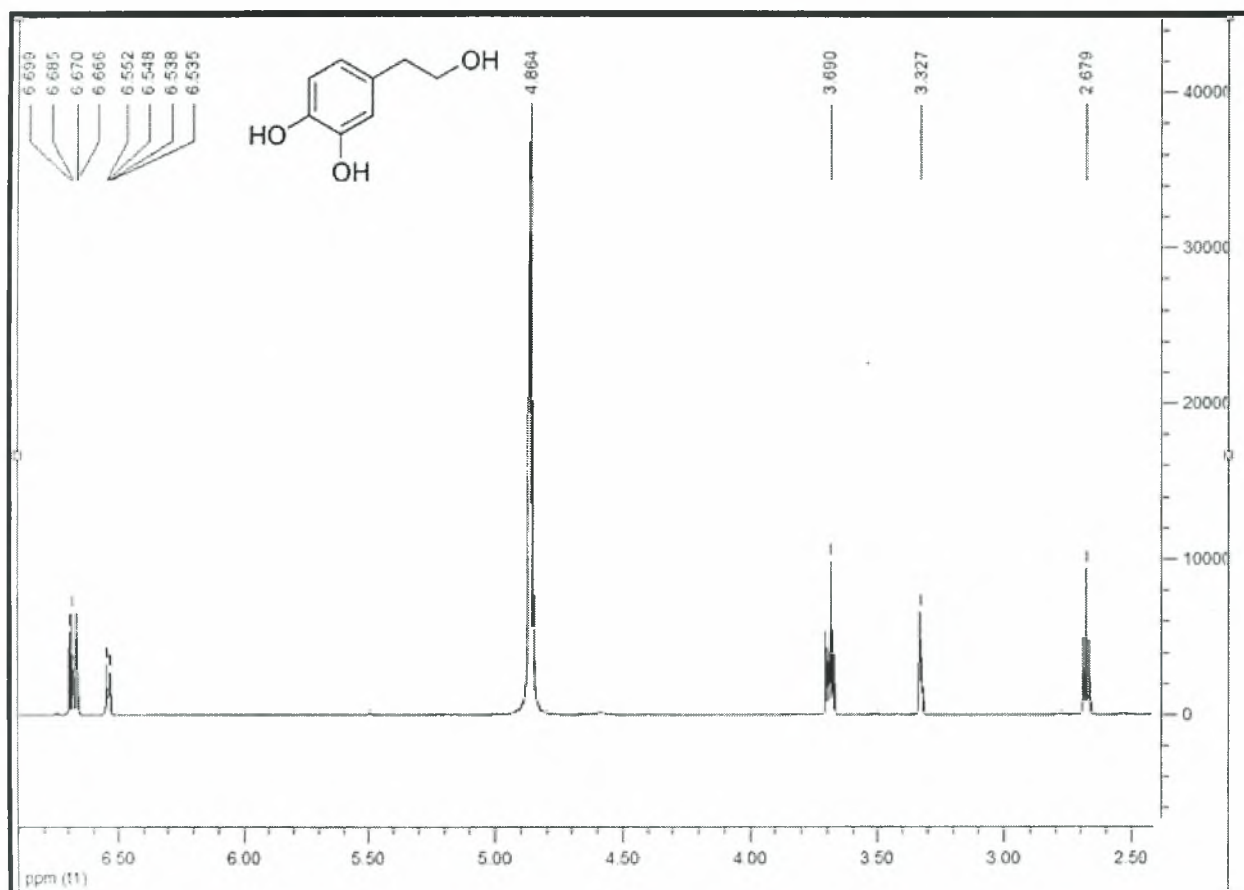
Η προετοιμασία του δείγματος ήταν η ακόλουθη: Μέσα στη σφαιρική όπου βρίσκεται αποθηκευμένη η υδροξυτυροσόλη προστέθηκε 1 ml δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD). Ανακινήθηκε το διάλυμά μας στους υπερήχους ώστε να διαλυθεί η ουσία μας τέλεια στο διαλύτη και έτσι να μην δημιουργήσει προβλήματα κατά τη διαδικασία λήψης του φάσματος. Στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας πιπέτας μεταφέρθηκαν 0.8 ml διαλύματος στον ειδικό σωλήνα για το NMR (Εικόνα 14).



**Εικόνα 13:** Ειδικός σωλήνας NMR (NMR tube) που εισάγουμε το διάλυμα που πρόκειται να ταυτοποιηθεί.

## Φασματοσκοπική μελέτη υδροξυτυροσόλης

Η δομή του μορίου αποδόθηκε με βάση τα στοιχεία της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ ). Έγινε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και διαπιστώθηκε πλήρη συμφωνία (Carasso et al., 2001). Το φάσμα που παραλήφθηκε από την προαναφερόμενη διαδικασία παρατίθεται παρακάτω.



## Β) ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ

### Απομόνωση βιοδραστικών φυσικών προϊόντων από απόβλητα ελαιοτριβείου διφασικού συστήματος

Το απόβλητο είναι παχύρευστο ελαιώδες πράσινο υγρό (200ml). Προσθέτουμε 500ml c-Hexane στο απόβλητό μας για να ξεπλυθεί (απομάκρυνση άπολων και λιπαρών συστατικών) και το αφήνουμε υπό την επίδραση συσκευής υπερήχων για 30 λεπτά της ώρας. Παρατηρείται καθίζηση λευκού ιζήματος το οποίο και διηθείται και ξεπλένεται με επιπλέον c-Hexane. Το ίζημα αυτό ζυγίζει 9 g και αποτελεί μίγμα κυρίως δύο τριτερπενικών παραγώγων, του μασλινικού και ολεανολικού οξέος (με κυριότερο συστατικό το μασλινικό) όπως φάνηκε από την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας που πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με βιβλιογραφικά στοιχεία.



**Εικόνα 14:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας όπου διακρίνονται τα δύο προϊόντα μας, στην πάνω θέση βρίσκεται το μασλινικό οξύ και πιο κάτω το ολεανολικό οξύ.

Το μίγμα αυτό υπεβλήθη σε χρωματογραφικό διαχωρισμό (με υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης) με κινητή φάση σύστημα διαλυτών c-Hexane/ EtOAc. Το μίγμα μας επεξεργάστηκε πάλι με τη διαδικασία ξηρού 'depot', όπου σε 700 mg προσθέσαμε 1.4 g silica και 200 ml c-Hexane. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό και προέκυψαν 700 mg μίγματος, από τα οποία παραλάβαμε **320 mg** μασλινικού οξέος και **60 mg** ολεανολικού οξέος.

Σύστημα (EtOAc/c-Hexane)	διαλυτών	Κλάσματα	Συνενώσεις
15/85		1-12	20-30 (Ολεανολικό οξύ)
25/75		13-36	51-90 (Μασλινικό οξύ)

### Φασματοσκοπία NMR

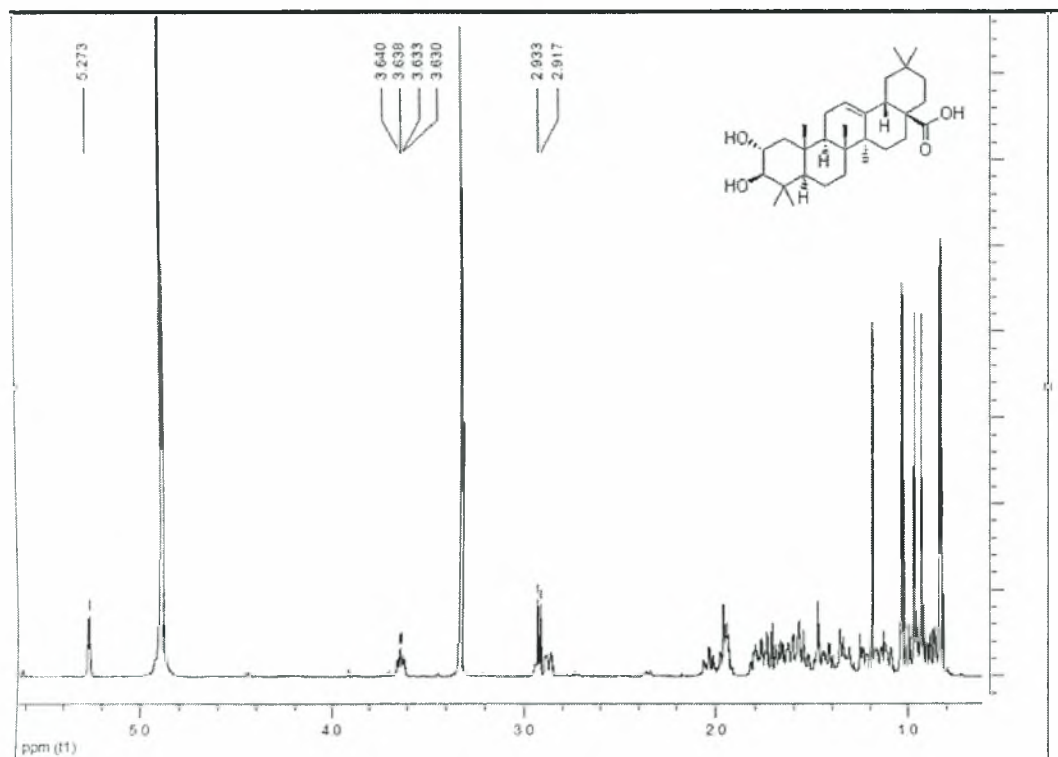
#### *Προετοιμασία δειγμάτων για NMR*

Ζυγίστηκε στο ζυγό ποσότητα 20mg από μασλινικό οξύ και 20 mg από ολεανολικό οξύ και διαλύθηκαν με προσθήκη 5ml από το διαλύτη μεθανόλη (δευτεριωμένη). Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκε συσκευή πυρηνικού συντονισμού NMR Bruker Ultrashield™ Plus 400 (400MHz). Τα φάσματα των δύο αυτών φυσικών προϊόντων παρατίθενται στη συνέχεια.



## Μασλινικό οξύ:

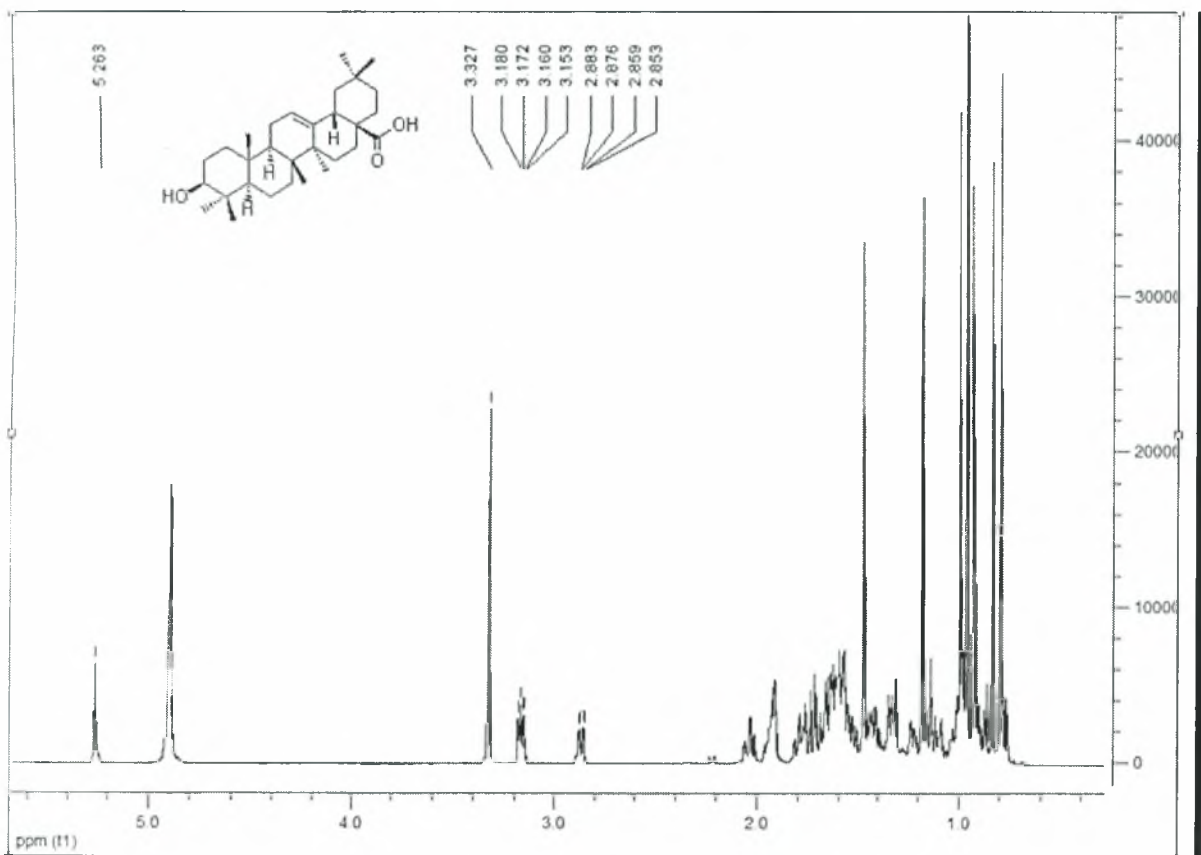
Το μασλινικό οξύ είναι πεντακυκλικό τριτερπένιο με σκελετό ολεαν-12-ενίου που υπάρχει σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στην επιδερμίδα του καρπού της ελιάς. Η συγκέντρωση του μασλινικού οξέος στο εκχύλισμα των καρπών ελιάς, μπορεί να φτάσει έως 68%.



## Ολεανολικό οξύ:

Το ολεανολικό οξύ είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο με σκελετό ολεαν-12-ενίου που υπάρχει σε πλήθος φυτών. Κυρίως βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στα φύλλα της ελιάς (3% του ξηρού βάρους) (Guinda et al., 2004) και επίσης στην επιδερμίδα του ελαιοκάρπου. Η συγκέντρωση του ολεανολικού οξέος στο εκχύλισμα των καρπών της ελιάς μπορεί να φτάσει έως 44% του εκχυλίσματος και εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης και τη μέθοδο επεξεργασίας (Blekas et al., 2002).

Η δομή του μορίου αποδόθηκε με βάση τα στοιχεία της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H-NMR}$  και ερχόταν σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Seebacher et al., 2003). Η εικόνα του φάσματος είναι η ακόλουθη.



## Γ) Αξιοποίηση αποβλήτων που προέρχονται από τη διαδικασία παραγωγής χυμών μήλου.

Είχαμε στη διάθεσή μας επεξεργασμένα απόβλητα μήλων από 3 διαφορετικές ποικιλίες. Στα απόβλητα αυτά υπήρχε η φλούδα, η σάρκα και τα κουκούτσια, όλα δηλαδή τα μέρη από το φρούτο του μήλου που παραμένει μετά την παραγωγή χυμού. Οι ποικιλίες στις οποίες ανήκουν τα ξηρά αυτά υπολείμματα μήλου και οι διαδικασίες επεξεργασίας τους αναφέρονται παρακάτω:

1. Ποικιλία Delicious, μήλα Ζαγοράς Πηλίου. Εισήχθηκαν σε θάλαμο απλής ψύξης τον 10/2007 και εξάχθηκαν τον 02/2008 για την πραγματοποίηση πολτοποιήσης, διαχωρισμού του χυμού από την σάρκα και κατάψυξής τους μέχρι τον 02/2009.
2. Ποικιλία Renette, μήλα Ζαγοράς Πηλίου. Ισχύουν τα όμοια με τα παραπάνω όσον αφορά την αποθήκευση και την επεξεργασία τους.
3. Ποικιλία Φυρίκια, μήλα Νεοχωρίου Πηλίου. Εισήχθηκαν κι εξήχθησαν από θάλαμο απλής ψύξης τις ίδιες ημερομηνίες και είχαν την ίδια επεξεργασία με τα παραπάνω.

Για να μελετηθεί η περιεκτικότητα αυτών των μήλων σε βιοδραστικές ουσίες, έπρεπε να γίνει η εκχύλισή τους. Η εκχύλιση λοιπόν έγινε σε ένα μηχάνημα που ονομάζεται ASE (Accelerated Solvent Extractor), το οποίο πραγματοποιεί εκχυλίσεις σε ελεγχόμενες συνθήκες. Επειδή, με τη συσκευή αυτή εφαρμόζονται αυξημένες θερμοκρασίες και υψηλές πιέσεις ο χρόνος που απαιτείται για κάθε μία εκχύλιση είναι σημαντικά μικρότερος έναντι της κλασικής εκχύλισης. Επίσης, η κατασκευή αυτή λειτουργεί με παροχή αζώτου το οποίο δεν ευνοεί την οξείδωση στα περιεχόμενα συστατικά (σε αντίθεση με τον ατμοσφαιρικό αέρα). Η συσκευή αυτή επιτρέπει εκχυλίσεις σε πολλά δείγματα και με πολλούς διαλύτες, ανάλογα με την ανάγκη της κάθε πειραματικής διαδικασίας, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι πιο συνηθισμένοι είναι το  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , η  $\text{MeOH}$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Στη δική μας πειραματική διαδικασία θα πραγματοποιηθούν τρεις εκχυλίσεις για κάθε ποικιλία μήλου, με τους διαλύτες  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MeOH}$  και  $\text{EtOAc}$ . Στην παρακάτω φωτογραφία απεικονίζεται το μηχάνημα που βρίσκεται στο χώρο του εργαστηρίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις εκχυλίσεις.



**Εικόνα 15:** Φωτογραφία από ASE.

Προετοιμασία δειγμάτων για την εκχύλιση:

Τα απόβλητα από τα μήλα αλέστηκαν με τη βοήθεια ενός μύλου ώστε να πάρουν τη μορφή σκόνης για να μπορέσουν να εισαχθούν στα ειδικά δοχεία εκχύλισης του μηχανήματος.

Στη συνέχεια ζυγίστηκαν περίπου 20 gr από την κάθε ποικιλία για να εκχυλισθούν.

- Βάρος ποικιλίας Renette: 20,19 gr
- Βάρος ποικιλίας Delicious: 20,10 gr
- Βάρος ποικιλίας φυρίκια: 20,50 gr

Τα δοχεία εκχύλισης, τα οποία φαίνονται στην παρακάτω εικόνα, πληρώθηκαν με το προς εκχύλιση υλικό.



**Εικόνα 16:** Ειδικά δοχεία εκχύλισης.

Δημιουργήσαμε στο μηχάνημα ένα πρόγραμμα εκχύλισης το οποίο πραγματοποιεί διπλές εκχυλίσεις για τον κάθε ένα διαλύτη. Η όλη διαδικασία διήρκησε περίπου 6 ώρες. Μετά το πέρας των 6 ωρών συλλέγονται τα δείγματα και μετρούμε το βάρος τους.

Για την ποικιλία Delicious ισχύουν τα εξής:

- Ποσότητα εκχυλίσματος με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 300 ml
- Ποσότητα εκχυλίσματος με MeOH: 330 ml
- Ποσότητα εκχυλίσματος με EtoAc: 290 ml

Για την ποικιλία Renette:

- Ποσότητα εκχυλίσματος με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 220 ml
- Ποσότητα εκχυλίσματος με MeOH: 300 ml
- Ποσότητα εκχυλίσματος με EtoAc: 330 ml

Για την ποικιλία φυρίκια:

- Ποσότητα εκχυλίσματος με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 260 ml
- Ποσότητα εκχυλίσματος με MeOH: 300 ml
- Ποσότητα εκχυλίσματος με EtoAc: 310 ml

Έπειτα τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν υπό μειωμένη πίεση σε θερμοκρασία  $45^\circ\text{C}$  και υπολογίστηκαν τα ξηρά βάρη τους τα οποία παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Εκχύλισμα	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	MeOH	EtoAc
Delicious	542,2 mg	12,0839 g	557.9 mg
Reinetta	523,7 mg	10,1208 g	377,6 mg
Φυρίκια	641,1 mg	13,26 87 g	247,6 mg

**Πίνακας 2**

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε κάθε ένα από τα παραπάνω εκχυλίσματα για να ανιχνεύσουμε τις ουσίες που περιέχονται σε αυτά.

Μετά από μελέτη των χρωματογραφημάτων ιδιαίτερο ενδιαφέρον μάς κίνησε το εκχύλισμα από  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  της ποικιλίας Delicious το οποίο φαίνεται πως περιέχει 2 τερπένια των οποίων η μελέτη και ταυτοποίηση θα ήταν επιθυμητή.

### **Χρωματογραφία στήλης στο $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ εκχύλισμα των ξηρών αποβλήτων από μήλα ποικιλίας Delicious:**

Το βάρος του προς διαχωρισμό μίγματος ήταν 542,2 mg.

#### Προετοιμασία της στερεάς φάσης:

Προσθέσαμε περίπου 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  στη σφαιρική με το προϊόν μας και το αφήσαμε για 10 λεπτά στους υπερήχους μέχρι να γίνει διαυγές και να μην υπάρχει ίζημα. Στη συνέχεια, μεταφέραμε το διάλυμα σε μια σφαιρική των 250 ml και προσθέσαμε 1,2 gr silica. Έπειτα εξατμίσαμε το διαλύτη υπό κενό στο Rotavapor, μέχρι να ληφθεί μία σκόνη με καλές ρεολογικές ιδιότητες και χωρίς ίχνος υγρασίας γιατί αυτό θα κατέστρεφε την όλη διαδικασία.

#### Προετοιμασία της στήλης χρωματογραφίας:

Στην παρούσα διαδικασία χρησιμοποιήσαμε στήλη διαμέτρου 2 εκ. και ως στατική φάση  $\text{SiO}_2$  (Silica gel 40-63  $\mu\text{m}$ /Silica flash). Ακολούθως προστέθηκε η σκόνη ως εναιώρημα στο αρχικό μας σύστημα έκλουσης, το οποίο ήταν c-Hexane/EtOAc 90/10.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας:

Ελήφθησαν κλάσματα των 15 ml περίπου και πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ανά 2 κλάσματα.

Μία εικόνα της στήλης κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής διαδικασίας φαίνεται ακολούθως.



**Εικόνα 17:** Φωτογραφία από στήλη ανοικτής χρωματογραφίας.

Όλες οι χρωματογραφίες TLC έγιναν σε σύστημα ανάπτυξης *c*-Hexane/ EtOAc 60/40 και τα αποτελέσματα αυτών φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.

Τα 30 πρώτα κλάσματα δεν περιείχαν καμία ουσία ενώ στα κλάσματα **46-60** φάνηκε να περιέχεται μία ουσία, πιθανότατα ένα τερπένιο (απουσία απορρόφησης στη λάμπα UV, κηλίδα μώβ χρώματος μετά την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης). Το ξηρό βάρος τους ήταν **209.2 mg**.

Έπειτα συνενώσαμε τα κλάσματα **63-70** τα οποία ήταν περίπου 100 ml και όπως φάνηκε στις πλάκες αλουμινίου είναι ένα μίγμα το οποίο θα αποθηκευτεί για μετέπειτα επεξεργασία και διαχωρισμό των ουσιών του με άλλη τεχνική. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, το βάρος ήταν **30.8 mg**.

Τέλος, συνενώθηκαν τα κλάσματα **72-80**, (100 ml περίπου) τα οποία φαίνεται πως περιέχουν ένα ακόμα τερπένιο το οποίο είναι καλά απομονωμένο. Το ξηρό βάρος του ήταν **16.1 mg**.

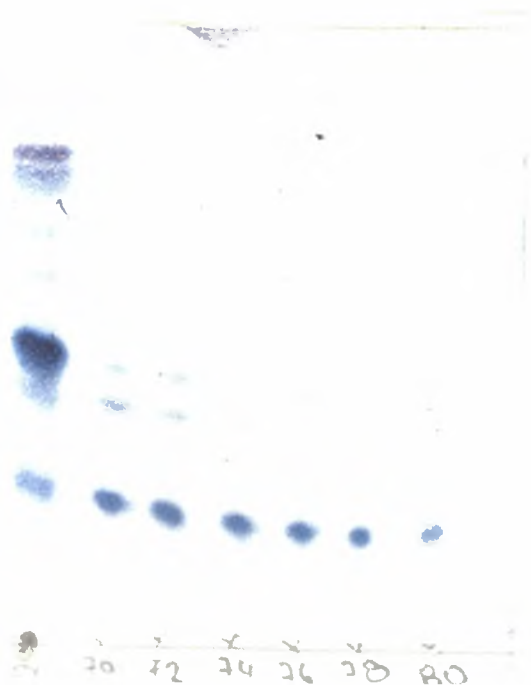


**Εικόνα 18:** TLC από κλάσματα 40-60. Πραγματοποιήθηκε συνένωση από το 46<sup>ο</sup> μέχρι το 60<sup>ο</sup>.



**Εικόνα 19:** Συνενώθηκαν τα κλάσματα από το 63<sup>ο</sup> μέχρι το 70<sup>ο</sup>. Αλλά αποτελούν μίγμα 3 ουσιών.





**Εικόνα 20:** Συνενώθηκαν τα κλάσματα από 72-80.

#### Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR):

Μετά από την απομόνωση των δύο παραπάνω ουσιών κρίθηκε αναγκαία η πραγματοποίηση φασμάτων NMR ώστε να ταυτοποιήσουμε τις ουσίες.

#### Προετοιμασία δειγμάτων για NMR:

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των διαλυμάτων ήταν η δευτεριωμένη πυριδίνη για τα κλάσματα 46-60 και η δευτεριωμένη μεθανόλη για τα κλάσματα 72-80. Προσθέσαμε 2 ml περίπου από τον αντίστοιχο διαλύτη σε κάθε μία σφαιρική και με τη βοήθεια των υπερήχων δημιουργήθηκε ένα διαυγές διάλυμα. Με τη βοήθεια πιπέτας πήραμε μία μικρή ποσότητα και τη μεταφέραμε στα ειδικά σωληνάκια του NMR.

Για τη λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  χρησιμοποιήθηκε συσκευή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR Bruker Ultrashield<sup>TM</sup> Plus 600 (600MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις είναι σε τιμές  $\delta$  (ppm), με εσωτερικό πρότυπο TMS και οι σταθερές σύζευξης  $J$  σε Hz.

Το μηχάνημα το οποίο χρησιμοποιήσαμε για τη λήψη των φασμάτων απεικονίζεται στην παρακάτω φωτογραφία (Εικόνα 21).



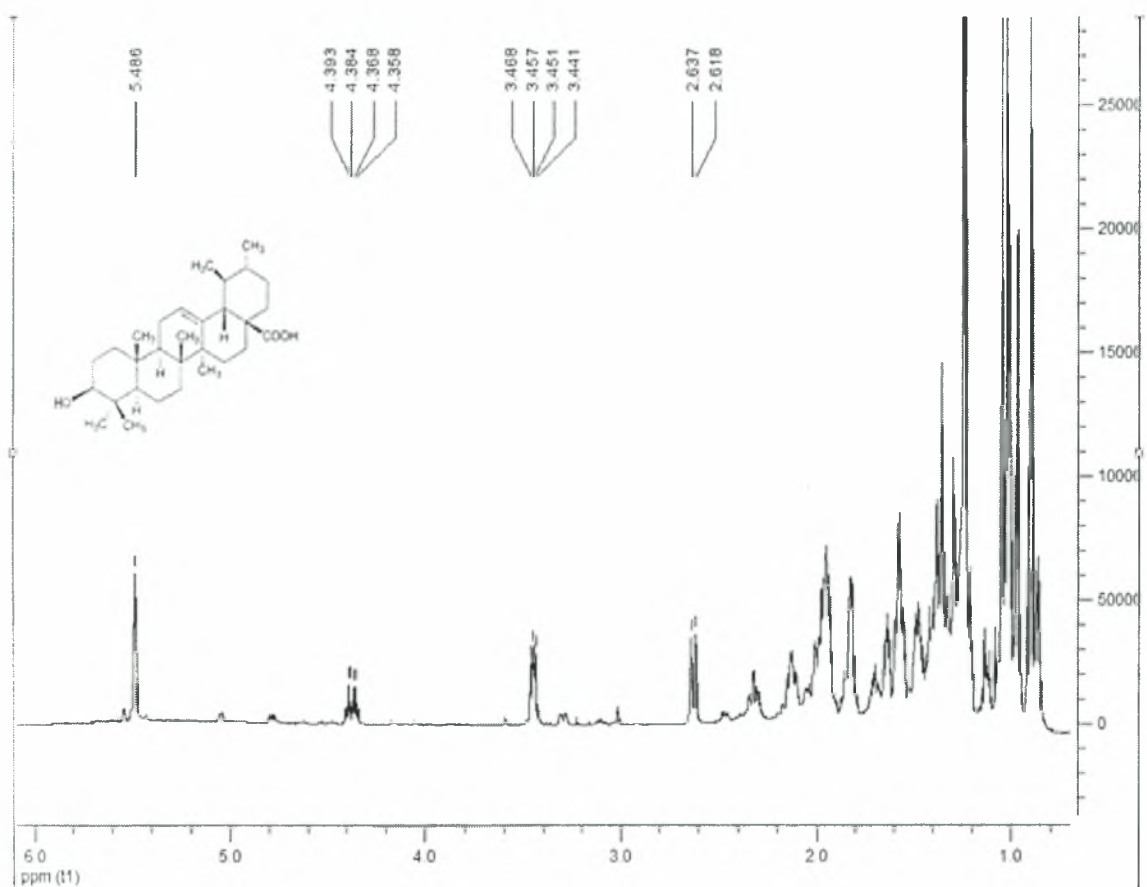
**Εικόνα 21:** Μηχάνημα NMR



**Εικόνα 22:** Σημείο του μηχανήματος που τοποθετούνται τα ειδικά tubes, τα οποία περιέχουν το διάλυμα στο οποίο θα πραγματοποιήσουμε φασματοσκοπική μελέτη.

## Φασματοσκοπική μελέτη

Σύμφωνα με τα φάσματα που παραλάβαμε και μελετήσαμε όντως οι ουσίες που απομονώθηκαν ήταν δυο τριτερπένια. Το τριτερπενικό παράγωγο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (209,2 mg), σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τη μελέτη του φάσματος πρόκειται για το ουρσολικό οξύ ενώ το δεύτερο είναι το μασλινικό οξύ το οποίο απομονώθηκε και από τη διαδικασία επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων διφασικού ελαιοτριβείου (το φάσμα του δεν παρατίθεται γιατί έχει απεικονιστεί και ανώτερα). Η εικόνα του φάσματος ( $^1\text{H-NMR}$ ) του ουρσολικού οξέος είναι η ακόλουθη.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία απομόνωσης υδροξυτυροσόλης από νερό ξεπικρίσματος ελαιοκάρπου, το οποίο αν και αποτελεί απόβλητο της διαδικασίας αυτής, είναι πλούσιο στο προαναφερόμενο φυσικό αντιοξειδωτικό. Πιο συγκεκριμένα από 2 λίτρα νερού, μετά από επεξεργασία με ρητίνες προσροφήσεως και εφαρμογή ανοικτής στήλης, απομονώθηκαν 685mg υδροξυτυροσόλης. Το γεγονός ότι από ένα απόβλητο απομονώθηκε μια ουσία με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου, καθιστά επιτακτική την εφαρμογή της περιγραφόμενης διαδικασίας σε πιλοτική κλίμακα στο μέλλον.

Επιτεύχθηκε η απομόνωση δύο τριτερπενικών παραγώγων με σπουδαίες φαρμακολογικές δράσεις από τα υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου. Από 200ml υγρών αποβλήτων απομονώθηκαν 320mg μασλινικού οξέος και 60mg ολεανολικού οξέος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι απομονώθηκαν τα προαναφερόμενα φυσικά προϊόντα από ένα υλικό, το οποίο όχι μόνο δεν ήταν χρήσιμο έως σήμερα αλλά είχε και σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Επίσης, όπως αποδείχτηκε, η περιεκτικότητα του μασλινικού οξέος είναι υψηλή κι έτσι δικαιολογημένα τα υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου μπορούν να θεωρηθούν ως μία από τις κύριες πηγές παραλαβής του τριτερπενίου αυτού.

Τέλος, από 20g ξηρού υπολείμματος του μήλου το οποίο έχει προέλθει από τη διαδικασία παραγωγής του χυμού από τον καρπό του, απομονώθηκαν 209,2 mg ουρσολικού οξέος και 16,1mg μασλινικού οξέος. Είναι σημαντικό πως από το θεωρητικώς μικρής αξίας αυτό απόβλητο απομονώθηκαν φυσικά προϊόντα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αρκετές θεραπευτικές εφαρμογές.

Ολοκληρώνοντας, θα μπορούσαμε να πούμε ότι ο σκοπός της παρούσης εργασίας, ο οποίος ήταν η απομόνωση δραστικών ουσιών από διάφορα αγροτικά απόβλητα, επιτεύχθηκε αφού προέκυψαν ουσίες με κυρίως αντιοξειδωτική δράση αλλά και αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις.

## Βιβλιογραφία:

- Al-Azzawie, H. F. and M. S. S. Alhamdani (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences* **78**(12): 1371-1377
- Arts, I. C. W. and H. H. Peter (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**(1): 317-325.
- Banthorpe, D. V. (1991). *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*: - Edited by J. B. Harborne and F.A. Tomasbarberan. *Phytochemistry* **31**(1): 375-384.
- Bastoni L., Bianco A., Piccioni F., Uccella N., Biophenolic profile in olives by NMR, *Food Chemistry* (2001), **73**,145-151.
- Bianco, A., Mazzei R. A., Melchioni C., Romeo G., Scarpati M. L., Soriero A. and Uccella N. (1998). Microcomponents of olive oil-III. Glucosides of 2(3,4-dihydro-xypheny)ethanol, *Food Chemistry* **63**(4): 461-464.
- Blekas G., Vassilakis C., Harizanis C., Tsimidou M., and Boschou D. G., (2002). Biophenols in table olives, *J. Agriculture Food Chemistry* **50**: 3688-3692.
- Byzina, R., K. Suboticanec and M. Sari (1991). Diet patterns and health problems: diet in Southern Europe. *Ann. Nutr. Metab* **35**: 32-40.
- Capasso R., Cristinzio G., Evidente A. and Scognamiglio F., (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters, *Phytochemistry* **31**(12): 4125-4128
- Coni, E., R. D. Benedetto, M. D. Pasquale, R. Masella, D. Modesti, R. Mattei and E. A. Carlini (2000). Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* **35**(1): 45-54.
- Deiana M, Aruoma O.I, Bianchi M.L.P, Spencer J.P.E, Kur H., Halliwell B., Schbach, R., Banni S., Dessi M.A., Corongioui F.P (1999). Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the

extra virgin olive oil derived antioxidant hydroxytyrosol, *Free Rad. Biol. Med.*, **26** 762-769.

- Eberhardt M., Lee, C., Liu, R.H., (2001) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000 **405**: 903-904
- Fernando J., Reyes-Zurita, Eva E. Rufino-Palomares, Jose A. Lupianez, Marta Cascante (2009). Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, *Cancer Letters* **273**: 44-54.
- Ghisalberti, E. L. (1998). Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine* **5**(2): 147-163.
- Gomez-Alonso, S., S. Marva Desamparados and F. Giuseppe (2002). Phenolic compounds profile of cornicarpa virgin oil. *J Agric Food Chem* **50**(23): 6812-6817.
- Grignaffini, P., P. Roma, C. Galli and A. L. Catapano (1994). Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet* **343**(8908): 1296-1297.
- Guinda A., Albi T., M. Garmen Pirez-Camino, Lanzn A. (2004). Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*), *Eur. J. Lipid Science Technology*, **106**: 22-26.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* **96**(2-3): 67-202.
- Helbock H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B.N. (1998). DNA oxidation matter: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanoine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 288-293.
- Huxley R.R., Neil H.A.W. (2003). The relation between dietary flavonoid intake and coronary heart disease mortality: a meta analysis of prospective cohort studies, *European J. Clinical Nutrition* **57**: 904-908.

- International Olive Oil Council (IOOC), Διεθνές Συμβούλιο ελαιόλαδου, <http://www.internationaloliveoil.org/>
- Jie Liu (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *Journal of Ethnopharmacology* **49** 57-68.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* **76**: 560-568.
- Kohyama, N., T. Nagata, S. Fujimoto and K. Sekiya (1997). Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(2): 347-350.
- Le Marchand, L., Murphy, S., Hankin, J., Wilkens, L., Kolonel, L. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Canc Inst* **80**: 1081-1093.
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krezeminski, R., Lojek, A., et al., (2003). Apple and pear peel and pulp and their influences on plasma lipids and antioxidant potential in rats fed cholesterol-containing diet. *J Agric Food Chem* **51**: 5780-5785.
- Li, A., Q. Zhang, J. Chen, Z. Fei, C. Long and W. Li (2001). Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4. *Reactive and Functional Polymers* **49**(3): 225-233.
- Lorigeril, M. d., S. Renaud, N. Mamelle, P. Salen, J.L. Martin, I. Monjaud, J. Guidollet, P. Touboul and J. Delaye (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* **343**(8911): 1454-1459.
- Lorigeril, M. d., P. Salen, J. L. Martin, I. Monjaud, P. Boucher and N. Mamelle (1998). Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Arch Intern Med* **158**(11): 1181-1187.
- Manna, C., V. Migliardi, P. Golino, A. Scognamiglio, P. Galletti, M. Chiariello and V. Zappia (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial

injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry* **15**(8): 461-466.

- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *Journal Nutritional Biochemistry* **16**: 577-586
- Max, B. (1989). This and that: exotic foods – prophylaxis and peril. *Trends in Pharmacological Sciences* **10**(8): 313-315.
- Menotti, A. (1991). Food patterns and health problems: health in Southern Europe. *Ann Nutr Metav* **35**: 69-77.
- Mulinacci, N., A. Romani, C. Galardi, P. Pinelli, C. Giaccherini and F. F. Vincieri (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(8): 3509-3514.
- Nestle, M. (1995). Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr* **61**(6): 1313-1320.
- Occhiuto, F., C. Circosta, S. Ragusa, P. Ficarra and R. Costa De Pasquale IV. Effects on some isolated muscle preparations. *Journal of Ethnopharmacology* **13**(2): 201-208.
- Owen R.W., Gianosa A., Hull W.E., Haubern r., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European Journal of Cancer* **36** 1235-1247.
- Pathak D., Pathak K. and S. A. K. (1991). Flavonoids as medicinal agents- recent advances. *Filoterapia* **62**: 371-389.
- Petkov, V. and P. Manolov (1975). To the pharmacology of iridoids. *Agressologie* **16**(25-29).
- Petkov, V. and P. Manolov (1978). Pharmacological studies on substances of plant origin with coronary dilatating and antiarrhythmic action. *Comp Med East West* **6**(2): 123-129.



- Petroni, A., M. Blasevich, M. Salami, N. Papini, G. F. Montedoro and C. Galli(1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* **78**(2): 151-160.
- Recio, M. C., R. M. Giner, S. Mapez and J. L. Rvos (1994). Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med* **60**(3): 232-239.
- Renaud, S., M. d. Lorgeril, J. Delaye, J. Guidollet, F. Jacquard, N. Mamelle, J.L. Martin, I. Monjaud, P. Salen and P. Toubol (1995). Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* **61**(6): 1360-1367.
- Salvador, M. D. Coskun and T. Maoka (1995). Hydroxybenzoic acids from *boreava orientalis*. *Phytochemistry* **40**(1): 257-261.
- Somova, L. O, F. O. Shode, P. Rammanan and A. Nadar (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *J Ethnopharmacol* **84**(2-3): 299-305.
- Somova, L. O., A. Nadar, P. Rammanan and F. O Shode (2003). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* **10**: 115-121.
- Tan, G. T., J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn and S. H. Hughes (1991). Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Nat Prod* **54**(1): 143-154.
- Toda, S., T. Miyase, H. Arichi, H. Tanizawa and Y. Takino (1985). Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1725-1728.
- Tuck, K. L. and P. J. Hayball (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**(11): 636-644.

- Valavanis A., Zinieris N., Zygalki E. (2000). Pharmacological properties of olive oil constituents as antioxidants and antitumorogenic agents. Can olive oil be used for medical purposes? , *Pharmakeytiki* **13**: 129-138.
- Valco M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., and Tesler J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry* 37-56.
- Van der Sluis, A. A., Dekker, M., van Boekel, M. A. J. S. (2005). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during Storage. *J. Agric. Food Chem.* **53** 1073-1080.
- Visioli, F., G. Bellomo , G. Montedoro and C. Galli (1995a). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* **117**(1): 25-32.
- Visioli, F., D. Caruso, E. Plasmati, R. Patelli, N. Mulinacci, A. Romani, G. Galli and C. Galli (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant. *Free Radic Res* **34**(3): 301-305.
- Visioli, F., A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F. F. Vincieri and C. Galli (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(8): 3397-3401.
- Visioli, F., F. F. Vincieri and C. Galli (1995b). Waste waters' from olive oil productions are rich in natural antioxidants. *Experientia* **51**(1): 32-34.
- Wagner, H. and K. Jurcic (1979). On the spasmolytic activity of valeriana extracts. *Planta Med* **37**(1): 84-86.
- Willett, W. C., F. Sacks, A. Trichopoulou, G. Drescher, A. Ferro-Luzzi, E. Helsing and D. Trichopoulos (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* **61**(6): 1402S-1406S.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu. R.H. (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* **51**: 609-614.

- Zheng R.L, Wang P.F, Li J., Liu Z.M and Jia Z.J (1993). Inhibition of the autoxidation of linoleic acid by phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* in miceless, *Chemistry and Physics of Lipids* **65** 151-154.

