



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής  
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική  
Υγιεινή»

Διπλωματική Εργασία

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΥΨΗΛΑ  
ΠΟΣΟΣΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ**

**ΤΣΙΑΦΟΓΛΟΥ Π. ΣΩΤΗΡΙΑ**  
ΤΕΧΝΟΛΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής  
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική  
Υγιεινή»

Διπλωματική Εργασία

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΥΨΗΛΑ  
ΠΟΣΟΣΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ**

**ΤΣΙΑΦΟΓΛΟΥ Π. ΣΩΤΗΡΙΑ**  
ΤΕΧΝΟΛΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:**

**Πρώτος Εξεταστής (Επιβλέπων):** Κωνσταντίνος Πετρωτός  
Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων, ΤΕΙ Θεσσαλίας

**Δεύτερος Εξεταστής:** Χρήστος Χατζηχριστοδούλου  
Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Τρίτος Εξεταστής:** Ανδρέας Τσακάλωφ  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

# **ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΥΨΗΛΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ**

**ΤΣΙΑΦΟΓΛΟΥ ΣΩΤΗΡΙΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής  
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή», 2015

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Κων/νος Πετρωτός, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος  
Μηχανικής Βιοσυστημάτων, ΤΕΙ Θεσσαλίας



*Στην οικογένειά μου*

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΥΨΗΛΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ**

Τα τελευταία χρόνια πολύ συχνά ακούμε τους επιστήμονες στο χώρο της υγείας να επισημαίνουν τρόφιμα που μπορούν να εκδηλώνουν πολλαπλά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων που απαντώνται στο φυτικό βασίλειο και έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες. Το τελευταίο έχει προσελκύσει έντονα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

Οι σπουδαιότερες ιδιότητες των πολυφαινολών είναι η αντιοξειδωτική δράση, η επίδραση στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών και την απορρόφηση μεταλλικών στοιχείων, η αντικαρκινική δράση, η αντιμικροβιακή δράση και οι αντιαλλεργικές ιδιότητες.

Τρόφιμα στα οποία έχουν αποδοθεί ευεργετικές επιδράσεις εξαιτίας του υψηλού τους περιεχομένου σε πολυφαινόλες είναι το ελαιόλαδο, το κρασί, το κακάο, ο καφές, τα φρούτα και τα λαχανικά με έντονο χρώμα, τα προϊόντα ολικής άλεσης, το τσάι και άλλα αφεψήματα βοτάνων.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσπάθεια εμπλουτισμού του ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς και συγκεκριμένα με υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη και τις αγλυκόνες αυτών για να προκύψει τελικό προϊόν με αυξημένη βιοδραστικότητα και επίσημο ισχυρισμό υγείας.

Αρχικά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε και πιστοποιήθηκε μία ταχεία και ακριβής μέθοδος ανάλυσης των ολικών πολυφαινολών του ελαιολάδου με τη μέθοδο UV-VIS, για να χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια για αξιολόγηση του βαθμού εμπλουτισμού των ελαιολάδων, με τις τρεις μεθόδους που επιλέχθηκαν να εξεταστούν, αλλά και για να μετρηθούν οι πολυφαινόλες εμπορικών ελαιολάδων σε σύγκριση με ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης.

Στην συνέχεια δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκαν τρεις εναλλακτικές μέθοδοι εμπλουτισμού ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς:

- I. Προσθήκη ενθυλακωμένου παραγώγου πολυφαινολών σε λιποσώματα.
- II. Εκχύλιση των πολυφαινολών από ελαιόλαδο με χρήση οργανικού διαλύτη και στην συνέχεια ενσωμάτωσή τους με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο.
- III. Εκχύλιση πολυφαινολών με φορέα το ίδιο το ελαιόλαδο από φύλλα ελιάς με χρήση υπερήχων σε ελεγχόμενη χαμηλή θερμοκρασία.

Τα αποτελέσματα μαρτυρούν ότι είναι αποτελεσματικές οι δύο πρώτες μέθοδοι, η προσθήκη δηλαδή ενθυλακωμένης πολυφαινόλης σε ελαιόλαδο και η απομόνωση πολυφαινολών με εκχύλιση από άλλο ελαιόλαδο και ο εμπλουτισμός κατόπιν του ελαιολάδου με τις πολυφαινόλες αυτές.

Το προϊόν που προκύπτει θα συνδυάζει διατροφικά και ιατρικά οφέλη στην πρόληψη των ασθενειών και θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία, για ενίσχυση – βελτίωση των προϊόντων διατροφής και των φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Επιπλέον προσδιορίστηκαν συγκριτικά οι πολυφαινόλες ελαιολάδων συμβατικής τεχνολογίας και ψυχρής έκθλιψης και αποδείχθηκε ότι τα ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης ολικών πολυφαινολών σε σχέση με τα συμβατικά παραγόμενα και επιπρόσθετα διαπιστώθηκε ότι εκτός της χρήσης ψυχρής έκθλιψης και άλλοι παράγοντες όπως για παράδειγμα το υψόμετρο και ο βαθμός ωρίμανσης του ελαιοκάρπου έχουν σημαντική συνεισφορά στην συγκέντρωση των πολυφαινολών του.

**Λέξεις κλειδιά: Ελαιόλαδο, Φυσικές Πολυφαινόλες, Λειτουργικά τρόφιμα**

## **ABSTRACT**

### **THE STUDY OF OLIVE OIL PRODUCTION WITH HIGH CONCENTRATION OF NATURAL POLYPHENOLS**

In the last years, has been a sudden and increased interest by scientists in producing creating plant origin food products. This is explained by their polyphenolic content, to which has been attributed a large scale bioactivity as described in many studies.

Polyphenols are a large group of compounds which belong to the plant kingdom with multiple benefits for the human health. The last has captivated the strong interest of the scientific community.

The most important properties of the polyphenols is their antioxidant activity, their effect on the digestion of macronutrients and absorption of metal elements, their anticancer and antibacterial effect and their antiallergic properties.

Foods that have beneficial effects due to their high content in polyphenols are olive oil, wine, cocoa, coffee, fruits and vegetables with intense color, whole grain products, tea and other herbal beverages.

The purpose of this study was the enrichment of olive oil with olive polyphenols and specifically with hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein aglycones in order to produce a final product with increased bioactivity and official health claim.

Initially, we developed a fast and accurate method of total polyphenols analysis by UV-VIS method, in order to evaluate the degree of enrichment of olive oils, by three specific chosen methods. Also, the UV-VIS method was used to examine and to measure the commercial olive polyphenols compared with cold pressed olive oil.

The three alternative oil enrichment methods with olive polyphenols are:

- I. Addition of encapsulated polyphenol derivatives into liposomes.
- II. Extraction of polyphenols from olive oil using an organic solvent and then incorporating them with cryogenics sublimation with another olive oil.
- III. Extraction of polyphenols in the body olive oil from olive leaves using ultrasound at a controlled low temperature.

Consequently, based on the results, the first two methods are effective. The final product combines nutritional and medical benefits in the prevention of diseases and can be used by the industry, for food and pharmaceutical products improvement.

Moreover, we determined comparatively polyphenols of olive oils which were produced with conventional technology and cold pressed and we demonstrated that cold pressed olive oils exhibit significantly higher concentrations of total polyphenol compared to conventional outputs and additionally we found that besides using cold pressing, other factors such as altitude and degree of ripeness of olives have also a significant contribution to the concentration of polyphenols.

**Keywords: Olive Oil, Natural Polyphenols, Functional Foods**

## Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	i
Κατάσταση πινάκων .....	ii
Κατάσταση διαγραμμάτων .....	iv

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1	Ορισμός ελαιολάδου .....	σελ.1
1.2	Η καλλιέργεια της Ελιάς.....	σελ.1
1.3	Η ιστορία του Ελαιόλαδου.....	σελ.2
1.4	Χημική σύσταση του ελαιολάδου .....	σελ.3
1.4.1	Σαπωνοποιήσιμο κλάσμα .....	σελ.4
1.4.2	Ασαπωνοποιήτο κλάσμα.....	σελ.4
1.4.2.1	Φαινόλες .....	σελ.4
1.4.2.1.1	Φυσικές Ιδιότητες.....	σελ.5
1.4.2.2	Πολυφαινόλες .....	σελ.6
1.4.2.3	Φυτικές πολυφαινόλες .....	σελ.6
1.4.2.4	Πολυφαινόλες του ελαιολάδου.....	σελ.8
1.4.2.5	Αντιοξειδωτικές ουσίες στο ελαιόλαδο .....	σελ.11
1.4.2.6	Ελευρωπαΐνη .....	σελ.12
1.4.2.7	Υδροξυτυροσόλη .....	σελ.14
1.4.2.8	Τυροσόλη .....	σελ.15
1.5	Πηγές πολυφαινολών .....	σελ.15
1.5.1	Ανεύρεση πολυφαινολών στη Φύση.....	σελ.16
1.5.2	Πολυφαινολικές ενώσεις στα φύλλα της ελιάς.....	σελ.17
1.5.3	Πολυφαινόλες στον Κατσίγαρο.....	σελ.17
1.5.4	Πολυφαινόλες στα στέμφυλα .....	σελ.18
1.6	Συνολικό πολικό φαινολικό περιεχόμενο σε ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα.....	σελ.19
1.7.1	Βιοδραστικότητα πολυφαινολών- Γενικά.....	σελ.24
1.7.2	Οξειδωτικό Στρές .....	σελ.24
1.7.2.1	Ορισμός Οξειδωτικού Στρές.....	σελ.24
1.7.2.2	Ελεύθερες ρίζες .....	σελ.25
1.7.2.3	Πως παράγονται οι ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό μας.....	σελ.26
1.7.2.4	Επίδραση ελευθέρων ριζών στην υγεία του ανθρώπου .....	σελ.28
1.7.3	Βιοδραστικότητα πολυφαινολών ελαιολάδου .....	σελ.30
1.7.3.1	Πολυφαινόλες και Καρδιαγγειακό .....	σελ.30
1.7.3.2	Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊική Δραστηριότητα .....	σελ.37
1.7.3.3	Πολυφαινόλες και Καρκίνος.....	σελ.39
1.7.4	Διατροφικός ισχυρισμός για τις πολυφαινόλες.....	σελ.41
1.7.5	Τρόφιμα εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες.....	σελ.41
1.8	Μέθοδοι απομόνωσης πολυφαινολών ελιάς και προσδιορισμού πολυφαινολών στο ελαιόλαδο .....	σελ.44
1.8.1.	Μέθοδοι Εξαγωγής των Πολυφαινολών .....	σελ.44
1.8.1.1	Εκχύλιση .....	σελ.45
1.8.1.2	Εκχύλιση με υπερήχους.....	σελ.45
1.8.1.3	Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE: microwave assisted extraction) .....	σελ.45
1.8.2	Μέθοδοι προσδιορισμού των πολυφαινολών.....	σελ.45
1.8.2.1	Η Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	σελ.45
1.8.2.2	Μέθοδος HPLC .....	σελ.47
1.8.2.3	Η Μέθοδος TLC.....	σελ.47

1.8.2.4	Η Μέθοδος CGC-MS.....	σελ.48
1.8.2.5	Μέθοδος προσδιορισμού της αντοχής των ελαίων στην οξείδωση (Μέθοδος Rancimat) .....	σελ.48
1.9	Σκοπός.....	σελ.50

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 2. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού πολυφαινολών και μεθόδων εμπλουτισμού λαδιών με πολυφαινόλες ελιάς

2.1	Υλικά και Μέθοδοι .....	σελ.52
2.1.1	Υλικά.....	σελ.52
2.1.2	Διαλύτες και Αντιδραστήρια .....	σελ.56
2.1.3	Όργανα .....	σελ.57
2.1.4	Μέθοδοι.....	σελ.60
2.1.4.1	Μέθοδος Μέτρησης Ολικών Πολυφαινολών σε δείγματα ελαιολάδων .....	σελ.60
2.1.4.2.	Μέθοδοι εμπλουτισμού ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς .....	σελ.72
2.1.4.2.1.	Εμπλουτισμός ελαίου με προσθήκη ενθυλακωμένου παραγώγου πολυφαινολών σε λιποσώματα λεκιθίνης .....	σελ.72
2.1.4.2.2.	Εκχύλιση των πολυφαινολών από ελαιόλαδο με χρήση οργανικού διαλύτη και στην συνέχεια ενσωμάτωσή τους με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο .....	σελ.76
2.1.4.2.3.	Εκχύλιση πολυφαινολών με φορέα το ίδιο το ελαιόλαδο από φύλλα ελιάς με χρήση υπερήχων σε ελεγχόμενη χαμηλή θερμοκρασία .....	σελ.78

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών

3.1	Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης, καθώς και ελαιολάδων μετά το decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό .....	σελ.80
3.2	Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης από παραγωγούς της Αγιάς (ν. Λαρίσης) .....	σελ.84
3.3	Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών ελαιολάδων από διαφορετικούς παραγωγούς ελαιολάδου .....	σελ.89
3.4	Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών ελαιολάδων από διαφορετικούς παραγωγούς ελαιολάδου από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και από εμπορικά λάδια.....	σελ.91
3.5	Αποτελέσματα Εκχύλισης των πολυφαινολών από ελαιόλαδο με χρήση οργανικού διαλύτη και στην συνέχεια ενσωμάτωσή της με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο .....	σελ.96
3.6	Αποτελέσματα προσδιορισμού των πολυφαινολών από ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με φύλλα ελιάς .....	σελ.98
3.7	Αποτελέσματα προσδιορισμού των πολυφαινολών από ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με προσθήκη ενθυλακωμένου παραγώγου πολυφαινολών σε λιποσώματα λεκιθίνης .....	σελ.101

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1	Συμπεράσματα.....	σελ.105
-----	-------------------	---------

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>σελ.106</b>
---------------------------	----------------

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια:

- α) του τμήματος Μηχανικής Τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας και
- β) του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για την δημιουργία και την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα πρώτα απ' όλα, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου, αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό, που με τις γνώσεις και το ενδιαφέρον του, με βοήθησε να γράψω σωστά την εργασία μου και να επιλέξω το κατάλληλο θέμα πτυχιακής.

Ευχαριστώ ακόμα τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου: κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου και κ. Ανδρέα Τσακάλωφ καθηγητές του πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες υποδείξεις τους κατά την διόρθωση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ την οικογένεια μου και όλα τα αγαπημένα μου πρόσωπα για την κατανόηση, την υποστήριξη και την βοήθειά τους, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των τελευταίων μηνών της προσπάθειάς μου.

Τσιλφόγλου Σωτηρία  
Λάρισα, 2016

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας I.</b> Κύριες χώρες παραγωγής ελιάς (Ετος 2011 από FAOSTAT)	<b>Σελ.2</b>
<b>Πίνακας II.</b> Φυτικές πολυφαινόλες	<b>Σελ.7</b>
<b>Πίνακας III.</b> Κύριες πολυφαινόλες στο παρθένο ελαιόλαδο. ( Bulotta S. Et al, 2014)	<b>Σελ.9</b>
<b>Πίνακας IV.</b> Αντιοξειδωτική αξία των πολυφαινολών ελιάς	<b>Σελ.12</b>
<b>Πίνακας V.</b> Φυσικοχημικές ιδιότητες Ελευρωπαΐνης	<b>Σελ.12</b>
<b>Πίνακας VI.</b> Συγκεντρώσεις πολυφαινολών στον Κατσίγαρο. (Lesage et.al.,2001).	<b>Σελ.18</b>
<b>Πίνακας VII.</b> Ολική φαινολική συγκέντρωση των ελληνικών παρθένων ελαιολάδων, προσδιοριζόμενη με H P-NMR (Agiomyrgianaki, A. et al, 2012) πηγή: (Kalogeropoulos Nick et al, 2014)	<b>Σελ.19</b>
<b>Πίνακας VIII.</b> Φαινολικές ενώσεις που συναντώνται σε ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα. (πηγή: (Kalogeropoulos Nick et all, 2014)	<b>Σελ.20</b>
<b>Πίνακας IX.</b> Τυροσόλη και Υδροξυτυροσόλη (mg/kg) σε Ελληνικά μονοποικιλιακά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα κατά την διάρκεια των περιόδων συγκομιδής (2002–2006 & 2007–2008) [Agiomyrgianaki, A et al, 2012].	<b>Σελ.23</b>
<b>Πίνακας X.</b> Αποτελέσματα των συμμετεχόντων στη μελέτη (πηγή: Olga Castaner, et. al., 2011)	<b>Σελ.31</b>
<b>Πίνακας XI.</b> Ελάχιστες Συγκεντρώσεις Αναστολής της Ελευρωπαΐνης και Υδροξυτυροσόλης, κατά των Βακτηρίων. (Η Αμπικιλίνη χρησιμοποιείται ως Σημείο Αναφοράς).	<b>Σελ.38</b>
<b>Πίνακας XII.</b> Κωδικοί και προέλευση δειγμάτων λαδιού από διαφορετικές πηγές που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των πολυφαινολών και τις μεθόδου εμπλουτισμού.	<b>Σελ.53</b>
<b>Πίνακας XIII.</b> Αποτελέσματα απορροφήσεων και ολικών πολυφαινολών σε κάθε μία από τις τρεις εκχυλίσσεις.	<b>Σελ.67</b>
<b>Πίνακας XIV.</b> Αποτελέσματα απορροφήσεων και ολικών πολυφαινολών των επαναληπτικών δειγμάτων λαδιού.	<b>Σελ.69</b>
<b>Πίνακας XV.</b> Αποτελέσματα απορροφήσεων και ολικών πολυφαινολών των επαναληπτικών δειγμάτων λαδιού.	<b>Σελ.71</b>
<b>Πίνακας XVI.</b> Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων στα 725 nm.	<b>Σελ.81</b>
<b>Πίνακας XVII.</b> Η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στα δείγματα λαδιού ψυχρής έκθλιψης καθώς και λαδιών μετά το Decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό.	<b>Σελ.82</b>



<b>Πίνακας XVIII.</b> Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.	<b>Σελ.85</b>
<b>Πίνακας XIX:</b> Η συγκέντρωση ολικών πολυφαινόλων στα δείγματα λαδιού ψυχρής έκθλιψης της Αγιάς ν. Λάρισας	<b>Σελ.86</b>
<b>Πίνακας XX.</b> Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος σε μήκος κύματος 725 nm.	<b>Σελ.90</b>
<b>Πίνακας XXI.</b> Η συγκέντρωση ολικών πολυφαινόλων στα δείγματα λαδιού.	<b>Σελ.91</b>
<b>Πίνακας XXII.</b> Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.	<b>Σελ.92</b>
<b>Πίνακας XXIII:</b> Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινόλων στα χύμα και εμπορικά λάδια.	<b>Σελ.93</b>
<b>Πίνακας XXIV:</b> Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.	<b>Σελ.97</b>
<b>Πίνακας XXV.</b> Συνολική συγκέντρωση πολυφαινόλων σε δείγμα λαδιού πριν και μετά τον εμπλουτισμό.	<b>Σελ.98</b>
<b>Πίνακας XXVI:</b> Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.	<b>Σελ.99</b>
<b>Πίνακας XXVII.</b> Συνολική συγκέντρωση πολυφαινόλων στα δείγματα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό με φύλλα ελιάς.	<b>Σελ.100</b>
<b>Πίνακας XXVIII.</b> Αποτελέσματα της μέτρησης της οξειδωτικής αντοχής των εμπλουτισμένων λαδιών με υγρή πολυφαινόλη και με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λιποσώματα λεκιθίνης.	<b>Σελ.102</b>

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Διάγραμμα I.</b> Επίπεδα πολυφαινολών ελιάς και χρώμα ανάλογα με την εποχή.	<b>Σελ. 10</b>
<b>Διάγραμμα II.</b> Σύγκριση των Αντι-ιικών Αποτελέσματος της Υδροξυτυροσόλης σε Ιούς. (πηγή: Γερασόπουλος Κ. , 2012)	<b>Σελ. 37</b>
<b>Διάγραμμα III.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης	<b>Σελ.62</b>
<b>Διάγραμμα IV.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης	<b>Σελ.66</b>
<b>Διάγραμμα V.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης	<b>Σελ. 68</b>
<b>Διάγραμμα VI.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης	<b>Σελ. 70</b>
<b>Διάγραμμα VII.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης	<b>Σελ. 81</b>
<b>Διάγραμμα VIII.</b> Συγκέντρωση πολυφαινολών σε δείγματα λαδιού ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή Γόννων ν. Λάρισας.	<b>Σελ. 83</b>
<b>Διάγραμμα IX.</b> Συγκέντρωση πολυφαινολών σε δείγματα λαδιού μετά το decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό.	<b>Σελ. 84</b>
<b>Διάγραμμα X.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.	<b>Σελ. 85</b>
<b>Διάγραμμα XI.</b> Συγκέντρωση πολυφαινολών σε δείγματα λαδιού ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή Αγιάς του ν. Λάρισας.	<b>Σελ. 87</b>
<b>Διάγραμμα XII.</b> Συγκέντρωση πολυφαινολών σε δείγματα λαδιού ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή Αγιάς και Γόννων του ν. Λάρισας.	<b>Σελ. 88</b>
<b>Διάγραμμα XIII.</b> Ποσοστό λαδιών ψυχρής έκθλιψης διαφορετικών συγκεντρώσεων πολυφαινολών.	<b>Σελ. 88</b>
<b>Διάγραμμα XIV.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.	<b>Σελ. 90</b>
<b>Διάγραμμα XV.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.	<b>Σελ. 92</b>
<b>Διάγραμμα XVI.</b> Συγκέντρωση πολυφαινολών χύμα λαδιών από διαφορους παραγωγούς της Ελλάδας καθώς και ορισμένων τυποποιημένων λαδιών.	<b>Σελ. 94</b>
<b>Διάγραμμα XVII.</b> Συγκέντρωση πολυφαινολών λαδιών ψυχρής έκθλιψης και τυποποιημένων λαδιών (θερμής έκθλιψης).	<b>Σελ. 95</b>
<b>Διάγραμμα XVIII.</b> Ποσοστό λαδιών (χύμα και τυποποιημένων) ανάλογα με την συγκέντρωσή τους σε πολυφαινόλες.	<b>Σελ. 96</b>
<b>Διάγραμμα XIX.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.	<b>Σελ. 97</b>

<b>Διάγραμμα XX.</b> Συγκέντρωση πολυφαινόλων (ppm) σε δείγμα λαδιού πριν και μετά τον εμπλουτισμό.	<b>Σελ. 98</b>
<b>Διάγραμμα XXI.</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.	<b>Σελ. 99</b>
<b>Διάγραμμα XXII.</b> Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πολυφαινόλων (ppm) στο δείγμα λαδιού πριν και μετά τον εμπλουτισμό με τα φύλλα ελιάς (διαφορετικών συγκεντρώσεων).	<b>Σελ. 101</b>
<b>Διάγραμμα XXIII.</b> Αριθμός των υπεροξειδίων στο αρχικό δείγμα λαδιού (μάρτυρας) και στα εμπλουτισμένα δείγματα με υγρή πολυφαινόλη (200ppm, 500ppm, 1000ppm) και με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λιποσώματα λεκιθίνης (1000ppm).	<b>Σελ. 103</b>
<b>Διάγραμμα XXIV.</b> Οξειδωτική αντοχή των εμπλουτισμένων λαδιών με υγρή και με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λιποσώματα.	<b>Σελ. 103</b>

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την αρχαιότητα είναι γνωστό ότι το ελαιόλαδο στη διατροφή μας είναι καθοριστικής σημασίας για την υγεία του οργανισμού. Ο πατέρας της Ιατρικής Ιπποκράτης, καθώς και οι μεγαλύτεροι γιατροί της εποχής εκείνης, ο Γαληνός, ο Διοσκουρίδης και ο Διοκλής πίστευαν ακράδαντα στην ευεργετική επίδρασή του στην υγεία και το συνιστούσαν ως θεραπεία σε αρκετές περιπτώσεις στην καθημερινή ζωή.

Το ελαιόλαδο χρησιμοποιούνταν για την συντήρηση του δέρματος και την στιλπνότητα των μυών, την θεραπεία των εκδορών, την επούλωση των εγκαυμάτων και την αφυδάτωση που προκαλεί ο ήλιος.

Προκειται για ένα προϊόν με εξίσου θαυματικές ιδιότητες τόσο για την υγεία όσο και για την ομορφιά. Τα κύτταρα του σώματος ενσωματώνουν τα πολύτιμα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου, κάνοντας τις αρτηρίες πιο στιλπνές και το δέρμα πιο λείο.

Ο Αριστοτέλης αποκάλυψε την επιστήμη της ελαιοπαραγωγής, ενώ ο Σόλων, ο μεγάλος νομοθέτης της Αθήνας, εισήγαγε την πρώτη νομοθεσία για την προστασία της ελαιοκαλλιέργειας και των ελαιοπαραγωγών.

Σήμερα, 3.000 χρόνια μετά, η σύγχρονη Ιατρική συνεχίζει να συστήνει την ευρεία χρήση του ελαιολάδου στη διατροφή ενηλίκων και παιδιών, υγιών και ασθενών, χάρη στα πολύτιμα συστατικά του που παρέχουν υγεία, ευεξία και μακροβιότητα.

Η Μεσογειακή Διατροφή που προέρχεται, από τις ελαιοπαραγωγές χώρες της Μεσογείου την Ελλάδα, την Ισπανία και την Κάτω Ιταλία είναι ξακουστή σε όλη τη γη για τις ευεργετικές της ιδιότητες. Η σπονδυλική στήλη της Μεσογειακής Διατροφής, είναι το ελαιόλαδο.

Η ωφέλιμη δράση του ελαιολάδου οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά του σε ουσίες με αντιοξειδωτική δράση με αποτέλεσμα να λειτουργούν συνδυαστικά και να περιορίζουν αποτελεσματικά την καταστροφική δράση των ελευθέρων ριζών, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού και θωρακίζοντας την καρδιά και τα αγγεία.

Έτσι, το «υγρό» χρυσάφι, όπως συνήθιζε να αναφέρει και ο Όμηρος ξεχειλίζει από πληθώρα θρεπτικών συστατικών όπως είναι οι Τοκοφερόλες (βιταμίνη E), οι Φαινόλες, το Σκουαλένιο, οι Αρωματικές ενώσεις, οι Φυτοστερόλες και η Ελευρωπαΐνη.

Μετά από πολλές επιστημονικές μελέτες, έχει πλέον αποδειχθεί ότι το ελαιόλαδο αποτελεί πολύτιμο συστατικό και ισχυρότατο όπλο έναντι χρόνιων νοσημάτων και συμβάλλει στη μείωση της «κακής» χοληστερίνης (LDL) στο αίμα, στη διατήρηση της περιεκτικότητας του αίματος σε «καλή» χοληστερίνη (HDL), στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων και στην προστασία του οργανισμού από τη στεφανιαία νόσο λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών που περιέχει, στην καλύτερη απορρόφηση του ασβεστίου από τον οργανισμό, στο σωστό μεταβολισμό των διαβητικών και κατά συνέπεια στην ισορροπία των τιμών του σακχάρου, στην καλή λειτουργία του εντέρου, στη θεραπεία του έλκους στομάχου και δωδεκαδάκτυλου, αφού διευκολύνει την πέψη, στην πρόληψη του καρκίνου, ενώ τέλος... αναζωογονεί το δέρμα!

Η παρούσα διπλωματική εργασία θα επικεντρώσει το ενδιαφέρον της αποκλειστικά στις πολυφαινόλες του ελαιολάδου (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη και τις αγγλικόνες αυτών), σε αυτά τα αντιοξειδωτικά δηλαδή, που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου στην υγεία.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η προσπάθεια εμπλουτισμού του ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς και συγκεκριμένα με υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελεωρωπαΐνη και τις αγλυκόνες αυτών για να προκύψει τελικό προϊόν με αυξημένη βιοδραστικότητα και ευεγερτικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία.

# Κεφάλαιο 1.

## Ελαιόλαδο

### 1.1 Ορισμός ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται ως το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea europaea*) με μηχανικά αποκλειστικά μέσα και φυσικές μεθόδους ή επεξεργασίες, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1).

Το ελαιόλαδο από την αρχαιότητα αποτελεί πηγή ζωής και ευημερίας για τους λαούς της Μεσογείου. Το υγρό χρυσάφι όπως χαρακτηρίζεται από τον Όμηρο, αποτελεί βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής, ενώ το κλαδί της ελιάς συμβολίζει την ειρήνη και την φιλία μεταξύ των λαών (Ανδρουλάκη Α., 2007).

### 1.2 Η καλλιέργεια της Ελιάς

Η **ελιά** ή **ελαιόδενδρο** ή **λιόδεντρο** (επιστ. *Ελαιία*, *Olea*) είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*), το οποίο συναντάται και στην Ελλάδα. Ο καρπός του ονομάζεται επίσης ελιά και από αυτόν παράγεται έπειτα το ελαιόλαδο. Η ελιά υπήρξε το σύμβολο της θεάς Αθηνάς.

Η ελιά είναι γνωστή από τους αρχαιότετους χρόνους, και πιθανότατα κατάγεται από το χώρο της ανατολικής Μεσογείου. Σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από την θεά Αθηνά στην Ακρόπολη.

Οι Έλληνες ήταν ο πρώτος λαός που καλλιέργησε την ελιά στον ευρωπαϊκό μεσογειακό χώρο. Την μετέφεραν είτε Έλληνες άποικοι είτε Φοίνικες έμποροι. Όπως αναφέρει ο Πλίνιος, κατά το 580 π.Χ, ούτε το Λάτιο ούτε η Ισπανία ούτε η Τύνιδα γνώριζαν την ελιά και την καλλιέργειά της.

Ο καρπός της ελιάς ωριμάζει στα μέσα προς τέλη του φθινοπώρου, οπότε και ξεκινάει η συγκομιδή.

Κύριες χώρες παραγωγής ελιάς είναι η Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Τουρκία, το Μαρόκο και η Συρία (Πίνακας Ι).

**Πίνακας Ι. Κύριες χώρες παραγωγής ελιάς (Έτος 2011 από FAOSTAT),**  
(πηγή: el.wikipedia.org)

Θέση	Χώρα	Παραγωγή (σε τόνους)	Καλλιεργήσιμη περιοχή (σε Εκτάρια)	Απόδοση (q/εκτάριο)
01	Ισπανία	7.820.060	2.330.400	29.781
02	Ιταλία	3.182.204	1.144.420	27.806
03	Ελλάδα	2.000.000	850.000	23.529
04	Τουρκία	1.750.000	798.493	21.916
05	Μαρόκο	1.415.902	597.513	22.839
06	Συρία	1.095.043	684.490	15.997
07	Αλγερία	610.776	295.000	14.237
08	Τυνησία	562.000	1.779.950	4.848
09	Αίγυπτος	459.650	52.668	87.273
10	Πορτογαλία	443.800	343.200	12.931
—	Συνολική παγκόσμια παραγωγή	19.845.300	9.634.576	20.598

### 1.3 Η ιστορία του Ελαιόλαδου

Το λάδι ελιάς κατά την αρχαιότητα δεν ήταν απλά μία τροφή, αλλά αποτελούσε σύμβολο υγείας και δύναμης, φάρμακο, καθώς επίσης και πηγή μαγείας και θαυμασμού.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τις μαρτυρίες από τα αρχαιολογικά ευρήματα, η καλλιέργειά της ξεκίνησε στην Κρήτη, πριν από 3.500 χρόνια.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το λάδι είναι:

- Η ποικιλία της ελιάς.
- Η τοποθεσία και το είδος του χώματος, όπου καλλιεργείται.
- Οι περιβαλλοντολογικές και καιρικές συνθήκες κάτω από τις οποίες καλλιεργείται και αναπτύσσεται η ελιά.
- Η ωριμότητα της ελιάς.
- Η εποχή και ο τρόπος συγκομιδής της ελιάς.
- Το διάστημα που ακολουθεί από τη συγκομιδή της μέχρι την παραγωγή του λαδιού.
- Ο τρόπος της παραγωγής του ελαιολάδου.
- Οι τεχνικές της αποθήκευσης, ο τρόπος συσκευασίας του λαδιού, καθώς και ο τρόπος μεταφοράς των ελιών στα ελαιοτριβεία.

Το ελαιόλαδο ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κατατάσσεται στις παρακάτω κατηγορίες:

- ✓ **Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο:** Πρόκειται για το καλύτερο σε ποιότητα λάδι. Έχει εξαιρετικό χρώμα, άρωμα και γεύση, ενώ η οξύτητά του δεν ξεπερνά το 1%.



- ✓ **Παρθένο ελαιόλαδο:** Διαφοροποιείται από το εξαιρετικά παρθένο, όχι μόνον ως προς τον βαθμό οξύτητας (<2%), αλλά και γευστικά.
- ✓ **Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο:** Πρόκειται για λάδι μέτριας ποιότητας και γεύσης, με οξύτητα > 2 %.
- ✓ **Μείγμα ελαιολάδου από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα:** Έχει ευχάριστη γεύση και οσμή, ανοικτό κιτρινοπράσινο χρώμα και οξύτητα <1%.
- ✓ **Ραφινρισμένο ελαιόλαδο:** Πρόκειται για ένα σχεδόν άγευστο λάδι με οξύτητα έως 0,3%.
- ✓ **Πυρηνέλαιο:** Έχει απαλή, ήπια γεύση και προέρχεται από την ανάμειξη ραφινρισμένου πυρηνέλαιου και παρθένου ελαιολάδου.
- ✓ **Αγουρέλαιο:** Το αγουρέλαιο είναι το πρώτο λάδι της ελιάς. Στα μέσα με τέλη του Οκτώβρη, οι πιο φρέσκοι και γερές ελιές, άγουρες και πράσινες, που δεν έχουν ζαρώσει, αλλά ούτε έχουν χτυπηθεί για να πέσουν από το δέντρο, συλλέγονται για να δώσουν τον χυμό τους, ο οποίος αμέσως αναλύεται για να επιβεβαιωθούν και τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι όλα τα πρώτα λάδια είναι και αγουρέλαια. Το λάδι του πρώτου, άγουρου καρπού, της πρώτης σοδειάς είναι ξεχωριστό και μάλιστα, σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, τα βασικά οργανοληπτικά κριτήρια αξιολόγησής του επικεντρώνονται σε τρία κύρια χαρακτηριστικά του: Στο φρουτώδες, το πικρό και το πικάντικο. Με λίγα λόγια πρόκειται για ένα λάδι με έντονη γεύση ελιάς και άρωμα.

## 1.4 Χημική σύσταση του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι μίγμα διαφόρων ουσιών με κυριότερο ποσοστό τα τριγλυκερίδια. Αυτά είναι υπεύθυνα για την λιπαρή αίσθηση στην αφή και το στόμα. Τα τριγλυκερίδια είναι εστέρες της γλυκερίνης με τρία λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα κατατάσσονται σε κεκορεσμένα π.χ. το στεατικό οξύ και σε ακόρεστα π.χ. ελαϊκό, λινελαϊκό, λινολενικό με ένα, δύο ή τρεις ακόρεστους διπλούς δεσμούς. Ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών κατατάσσουμε τα λιπαρά οξέα σε μονοακόρεστα (με ένα διπλό δεσμό) και πολυακόρεστα (με περισσότερους από έναν διπλούς δεσμούς).

Διαφορές υπάρχουν ως προς τη ρευστότητα. Τα κεκορεσμένα είναι κατά κανόνα στερεά, ενώ τα ακόρεστα ρευστά. Η διάσπαση των τριγλυκεριδίων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι αυτή που δίνει την οξύτητα. Όσο χαμηλότερη είναι η ελεύθερη οξύτητα τόσο καλύτερη είναι η ποιότητα του ελαιολάδου.

Τα τριγλυκερίδια αποτελούν περίπου το 98.5 - 99.5 % των συστατικών του ελαιολάδου και είναι αυτά που αποκαλούμε σαπωνοποιήσιμο κλάσμα, ενώ το υπόλοιπο 0.5 - 1.5 % που συνιστά το ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου, είναι υπεύθυνο για τις κυριότερες γευστικές και οσφραντικές ιδιότητες ([www.sgp-sitia.com](http://www.sgp-sitia.com))

### 1.4.1 Σαπωνοποιήσιμο κλάσμα

Η σύνθεση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα, εξαρτάται από την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής όπου καλλιεργούνται τα δένδρα καθώς και από διάφορους άλλους παράγοντες.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου αποτελείται από ακόρεστα οξέα. Μεταξύ αυτών το μονοακόρεστο ελαϊκό (18:1) περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. Το δεύτερο κατά σειρά ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το λινελαϊκό (18:2). Τα άλλα ακόρεστα οξέα, λινολενικό (18:3), αραχιδονικό (20:4) και το παλμιτελαϊκό (16:1) συναντώνται, στο ελαιολάδο, σε πολύ μικρές ποσότητες.

Από τα κορεσμένα οξέα σε μεγαλύτερο ποσοστό συναντάται το παλμιτικό (16:0) και ακολουθεί το στεατικό (18:0). Τα κύρια γλυκερίδια του ελαιολάδου είναι αυτά του ελαϊκού οξέος, που μόνα τους ξεπερνούν το 70 - 80 % του βάρους του λαδιού. Επειδή τα γλυκερίδια αυτά είναι υγρά, σε θερμοκρασία δωματίου, το ελαιολάδο, στο σύνολο του παραμένει σε υγρή κατάσταση στις συνήθεις θερμοκρασίες δωματίου. Εκατοστιαία διακύμανση της περιεκτικότητας του ελαιολάδου, σε λιπαρά οξέα. ([www.sgp-sitia.com](http://www.sgp-sitia.com))

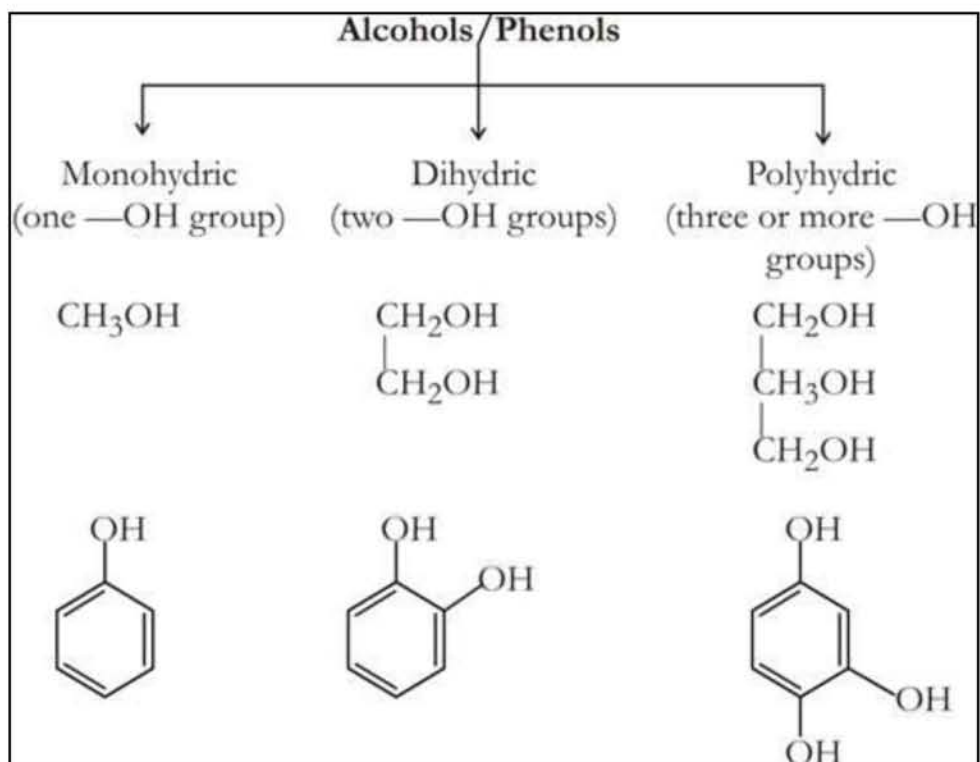
### 1.4.2 Ασαπωνοποιήτο κλάσμα

Τα κυριότερα από τα συστατικά στο ασαπωνοποιήτο κλάσμα του ελαιολάδου είναι: Υδρογονάνθρακες, Στερόλες, Τοκοφερόλες, Καροτινοειδείς χρωστικές, Τριτερπενικές αλκοόλες, Φαινόλες, Φωσφολίπη, Χρωστικές, Πτητικά συστατικά, Ελευρωπαΐνη.

Στα συστατικά αυτά ευθύνονται οι κυριότερες γευστικές και οσφραντικές ιδιότητες του ελαιολάδου. ([www.sgp-sitia.com](http://www.sgp-sitia.com))

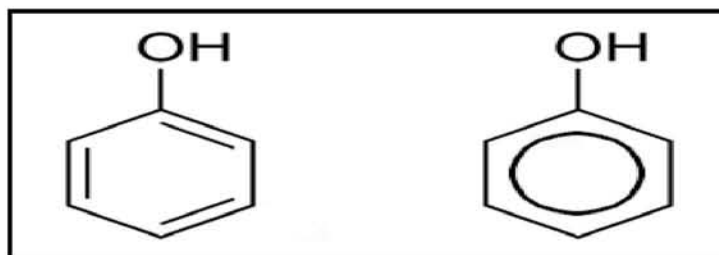
#### 1.4.2.1 Φαινόλες

**Φαινόλες** ονομάζονται τα υδροξυπαράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που έχουν τουλάχιστον ένα υδροξύλιο ενωμένο με άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Οι φαινόλες, ανάλογα με τον αριθμό των υδροξυλίων που είναι ενωμένα με τον αρωματικό δακτύλιο, διακρίνονται σε μονοσθενείς, δισθενείς, τρισθενείς κλπ. (Εικόνα Ι).



Εικόνα Ι. Φαινόλες (πηγή: NN Melnikov, 1971)

Η απλούστερη από τις φαινόλες είναι η φαινόλη (Εικόνα ΙΙ).



Εικόνα ΙΙ. Φαινόλη

#### 1.4.2.1.1 Φυσικές Ιδιότητες

Η φαινόλη είναι άχρωμο, υγροσκοπικό, κρυσταλλικό στερεό, ελάχιστα διαλυτό στο νερό, ενώ διαλύεται στην αιθανόλη και στο διαιθυλαιθέρα. Είναι ουσία τοξική και προσβάλλει το δέρμα γι' αυτό το λόγο πρέπει να αποφεύγεται η επαφή της με το δέρμα (ebooks.edu.gr).

### 1.4.2.2 Πολυφαινόλες

Με τον όρο **πολυφαινόλες** χαρακτηρίζεται μια μεγάλη ετερογενής ομάδα ενώσεων με κοινό χαρακτηριστικό το ότι φέρουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απευθείας σε ένα ή περισσότερους αρωματικούς και ή και ετεροκυκλικούς πυρήνες. Είναι γνωστές ως τώρα περισσότερες από 8000 πολυφαινόλες και στα φυτά περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. (Χριστοφορίδου Σ., 2001).

### 1.4.2.3 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες προκύπτουν ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Τις συναντάμε στην φύση συνδεδεμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα συζευγμένα ζάχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή και ολιγοσακχαρίτες. Το πιο κοινό σάκχαρο είναι η γλυκόζη ενώ άλλα σάκχαρα είναι η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη κ.

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

- Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά με σημαντική βιολογική δράση.
- Δρουν ως αντιοξειδωτικά και με παρόμοια δράση με αυτή των ορμονών.
- Παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, του χρώματος και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

Τα φρούτα, τα λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, ο καφές και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et. al., 2005).

Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του.

Οι ταννίνες, οι λιγνίνες και τα φλαβονοειδή είναι υποκατηγορίες των πολυφαινολών (Πίνακας II).

Πίνακας II. Φυτικές Πολυφαινόλες.

α/α	Κατηγορία	Υποκατηγορία	Χημικοί Τύποι
1	Φλαβονοειδή	Φλαβονόλες	
		Φλαβανόλες	
		Ανθοκυανιδίνες	
2	Πολυφαινολικά οξέα	Υδροξυβενζοϊκό οξύ	
		Υδροξυκινναμικό οξύ	
3	Στιλβένια	<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	

**Φλαβονοειδή:** Αποτελούν την μεγαλύτερη υποομάδα πολυφαινόλων και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Τις λαμβάνουμε κάθε φορά που πίνουμε τσάι, καφέ, κακάο, που τρώμε κόκκινο λάχανο, ελαιόλαδο κ.α.

**Φαινολικά Οξέα :** Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από Φαινολικά οξέα. Παραδείγματα από τροφές που περιέχουν Φαινολικά οξέα είναι: τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι, ο καφές, το κόκκινο κρασί, το ρύζι, η βρώμη, τα δημητριακά κ.α.

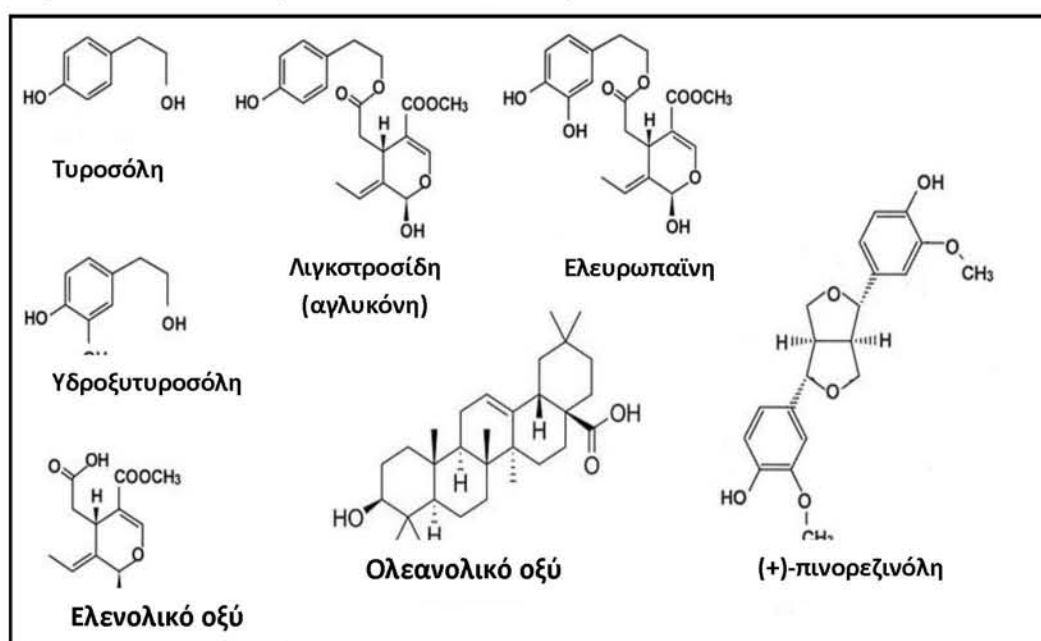
**Ανθοκυανίνες:** Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους! Στην ουσία πρόκειται για τις χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μοβ χρώμα στα ρόδια, στα σταφύλια, στα κόκκινα κρεμμύδια, στα μπλε μούρα κ.α.

**Στιλβένια:** Με την πιο διάσημη από αυτά την *Ρεσβερατρόλη* - είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Αλτσχάιμερ, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στην φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές ουσίες (Γερασόπουλος Κ., 2012)

#### 1.4.2.4. Πολυφαινόλες του ελαιολάδου

Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου αποτελείται από ένα σύνολο απλών φαινολών και πολυφαινολών. Από διάφορους τύπους ελαιολάδου έχουν απομονωθεί περισσότερες από 20 πολυφαινόλες. Χαρακτηριστικότερες είναι: Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Βανιλλικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, Φερουλικό οξύ, Βανιλίνη, ρ-κουμαρικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, Ελαιασίνη, Ελευρωπαΐνη και διάφορες αγλυκόνες της, Λιγκστροσίδη και διάφορες αγλυκόνες της, Ελαιοκανθάλη, Κινναμικό οξύ, Λουτεολίνη, Προτοκατεχικό.

Στην Εικόνα III απεικονίζονται οι χημικές δομές μερικών από των πολυφαινολών του ελαιολάδου και στον Πίνακα III αναφέρονται οι κύριες πολυφαινόλες που υπάρχουν στο παρθένο ελαιόλαδο (Bulotta S. Et al, 2014).





Υδρόφιλες		Λιπόφιλες
Φαινολικές αλκοόλες	Φλαβονοειδή	Τοκοφερόλες
Υδροξυτυροσόλη	Απιγενίνη	(α, β, γ, δ)
Τυροσόλη	Λουτεολίνη	
Σεκοϊριδοειδή	Φαινολικά οξέα	Τοκοτριενόλες
Ελευρωπαΐνη	Γαλλικό οξύ	(α, β, γ, δ)
Λιγκστροσίδη αγλυκόνη	Βανιλλικό οξύ	
Λιγνάνες	Βενζοϊκό οξύ	
(+)-1- πινορεζινόλη	Κιναμικό οξύ	
(+)-1- ακετοξυπινορεζινόλη	Καφεϊκό οξύ	
	Κουμαρικό οξύ	

**Πίνακας ΙΙΙ. Κύριες πολυφαινόλες στο παρθένο ελαιόλαδο. ( Bulotta S. Et al, 2014)**

Οι τρεις πολυφαινόλες με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο είναι ο γλυκοζίτης ελευρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη. Αυτές οι τρεις ενώσεις σχετίζονται δομικά. Οι δύο τελευταίες είναι δομικά όμοιες εκτός από το ότι η υδροξυτυροσόλη κατέχει μία υδροξυ ομάδα στην μέτα - θέση.

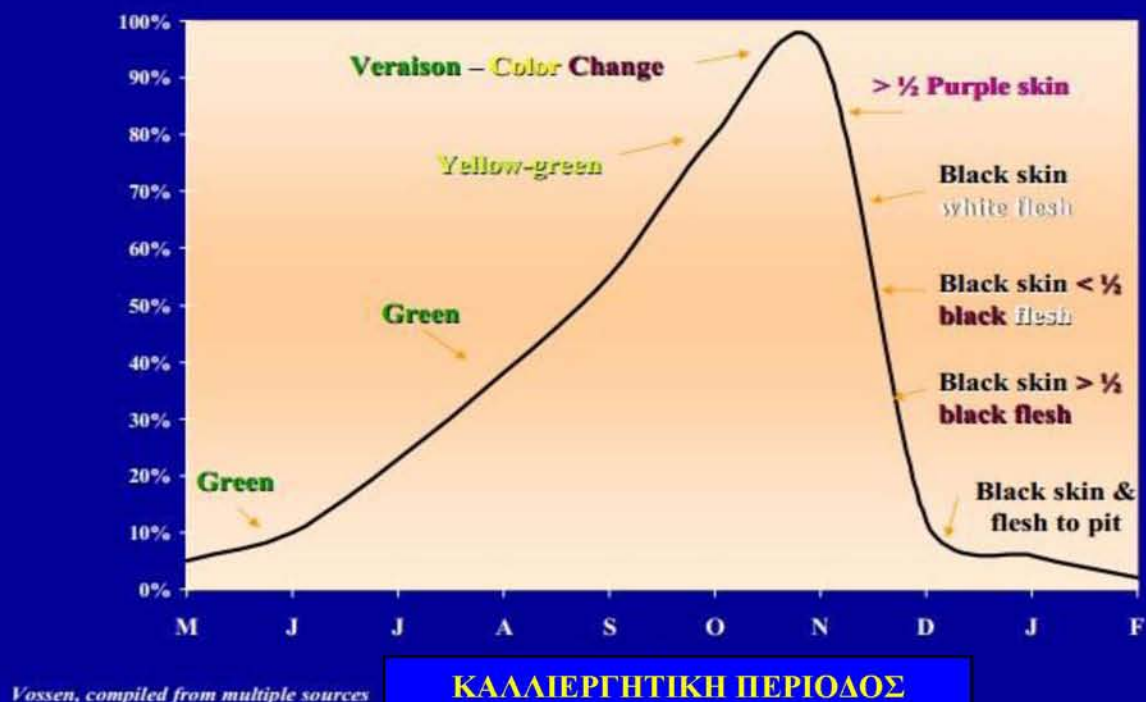
Οι πολυφαινόλες υπάρχουν στο ελαιόλαδο από την φύση, λειτουργούν αντιοξειδωτικά και το προστατεύουν από το τάγγισμα, όταν αυτό δέχεται την καταστροφική επίθεση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας.

Συνεπώς ένα ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχει υψηλό βαθμό προστασίας και άρα αντοχής στον χρόνο, ενώ ταυτόχρονα η κατανάλωσή του προστατεύει τα ανθρώπινα κύτταρα από το οξειδωτικό stress.

Μεγάλο μέρος της φρουτώδους και πικρής γεύσης του ελαιολάδου οφείλεται τόσο στο φαινολικό κλάσμα του αλλά και σε αλδεύδες και τερπένια. Οι πολυφαινόλες αυξάνονται στον ελαιόκαρπο με την πρόοδο της ωριμάνσεως του καρπού και εμφανίζουν την μέγιστη τιμή τους στο στάδιο του πλήρους χρωματισμού της επιδερμίδας και της έναρξης της βαφής της σάρκας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η σύσταση των πολυφαινολών του ελαιολάδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το υψόμετρο της περιοχής όπου καλλιεργούνται τα ελαιόδεντρα, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού (Διάγραμμα Ι), το έδαφος και τις κλιματικές συνθήκες (ύψος βροχπτώσεων, θερμοκρασία), τις εργασίες κατά την καλλιέργεια, από την ποικιλία των ελαιοκάρπων αλλά και από τον τύπο του ελαιουργείου που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του ελαιολάδου (Cinquanta et al, 1997; Ryan and Robards, 1998).

## ΕΠΙΠΕΔΟ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ & ΧΡΩΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ



**Διάγραμμα Ι. Επίπεδα πολυφαινόλων ελιάς και χρώμα ανάλογα με την εποχή. (πηγή: Vossen Paul, 2009)**

Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου είναι κατά ένα ποσοστό πολικές και κατά το υπόλοιπο άπολες. Την προστασία έναντι του ταγγίσματος την προσφέρουν οι πολυφαινόλες που είναι διαλυμένες στο άπολο τμήμα του ελαιολάδου, καθώς οι διαλυμένες στο πολικό τμήμα προσφέρουν μικρή προστασία.

Υπάρχει σημαντικός συσχετισμός μεταξύ των πολυφαινόλων και των γευστικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου. Συγκέντρωση φαινόλων μεταξύ των 70 και 250 ppm εξασφαλίζει ευχάριστη γλυκιά και φρουτώδη γεύση. Όταν οι πολυφαινόλες περιέχονται σε ποσότητες 250 έως 450 ppm προσδίδουν έντονα φρουτώδη, πικάντικη και από ελαφρώς έως αρκετά πικρή γεύση. Σε συγκεντρώσεις άνω των 450 ppm το ελαιόλαδο αποκτά μια έντονα πικρή γεύση που σε πολλές περιπτώσεις καταλήγει να μην είναι σε ισορροπία με τα υπόλοιπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, να είναι δυσάρεστη και τελικά μη αποδεκτή από τον καταναλωτή.

Η συγκέντρωση των πολυφαινόλων στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 50 έως 1000 µg/g (ppm) ελαίου, ανάλογα με την ποικιλία ελιάς και του συστήματος εκχύλισης και αυτή η ποσότητα των αντιοξειδωτικών στο ελαιόλαδο είναι μόνο το 1-2% (Rodis et al., 2002; Tsimidou et al., 1992; [www.olivenews.gr](http://www.olivenews.gr))

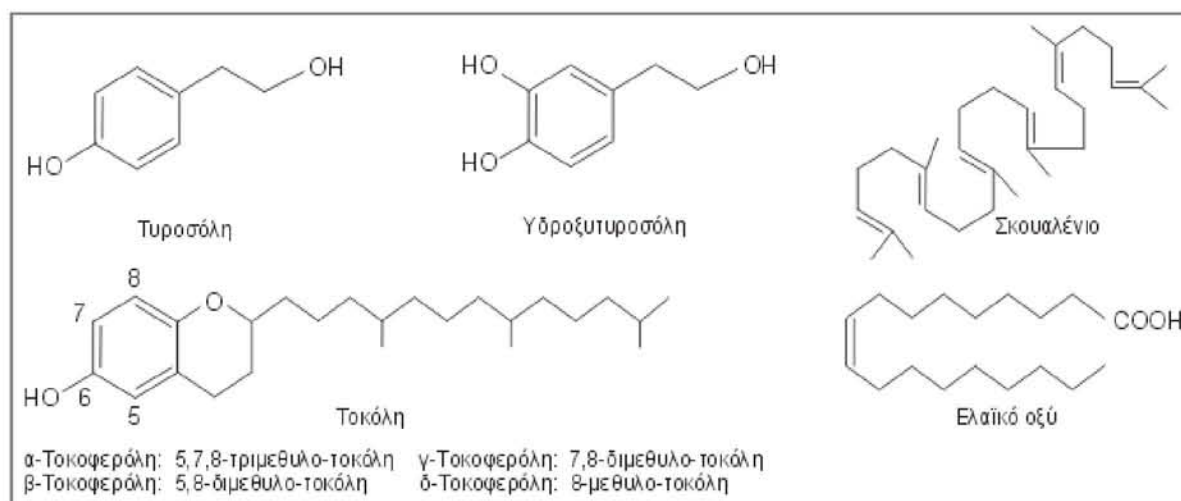


#### 1.4.2.5 Αντιοξειδωτικές ουσίες στο ελαιόλαδο

Κατά την κατεργασία του ελαιολάδου μέρος της ελευρωπαϊνης υδρολύεται και έτσι παράγονται αρκετές ενώσεις που προσδίδουν στο ελαιόλαδο τις εκλεκτές οργανοληπτικές ιδιότητες και ιδιαίτερα την πικρή του γεύση. Επίσης οι πολυφαινόλες και ο ακόρεστος υδρογονάνθρακας σκουαλένιο παίζουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της οξείδωσης των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (τάγγισμα) (Βεκιάρη ΣΑ, 2001; Brenes M, 1995).

Η **ελευρωπαϊνη**, η **τυροσόλη**, η **υδροξυτυροσόλη** και το **σκουαλένιο** (ένας υδρογονάνθρακας και τριτερπένιο, πρόδρομη ένωση της χοληστερόλης και άλλων στεροειδών) αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου (Εικόνα IV). Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της  **$\alpha$ -τοκοφερόλης** (βιταμίνη E) και του φυτικού λιπαρού οξέος, του **ελαϊκού οξέος**, εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και το οξειδωτικό stress των αερόβιων οργανισμών. Αυτή η αντιοξειδωτική και βακτηριοκτόνος δράση, όπως και άλλες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία (κυρίως σελήνιο) είναι εξαιρετικά ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου.

Αλλα συστατικά του ελαιολάδου είναι τα οξέα καφεϊκό, βανιλικό, συριγγικό και κουμαρικό. Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες (Visioli F et al, 1998; Benavente-Garcia O et al, 2002; Scalbert et al., 2005 a; [www.chem.uoa.gr](http://www.chem.uoa.gr)).



**Εικόνα IV. Χημική δομή Τυροσόλης, Υδροξυτυροσόλης, Σκουαλένιου, Τοκόλης, Ελαϊκού οξέος (Πηγή: [www.chem.uoa.gr](http://www.chem.uoa.gr))**

Η αντιοξειδωτική αξία των πολυφαινολών ελιάς σε σχέση με τα άλλα αντιοξειδωτικά, φαίνεται στον Πίνακα IV.

**Πίνακα IV. Αντιοξειδωτική αξία των πολυφαινολών ελιάς (πηγή: [www.polyhealth.gr](http://www.polyhealth.gr))**

Ιχνοστοιχεία	ORAC (micromole *TE/g)
Υδροξυτυροσόλη	27,000
Φουστίνη	13,600
Μυρικετίνη	13,600
Πρωτοκατεχικό οξύ	13,400
Λουτεολίνη	12,500
Ελευρωπαΐνη	12,000
Ταξιφολίνη	11,800
Κερσετίνη	10,900
Επικατεχίνη (από πράσινο τσάι)	8,100
Απόσταγμα φλούδας σταφυλιού	6,200
Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)	2,100

\*TE= Ισοδύναμο Trolox (αντιοξειδωτικό)

Ο δείκτης **ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity- Ικανότητα Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου)** προσμετρά την αντιοξειδωτική ικανότητα των τροφίμων βάσει της αντιοξειδωτικής τους δύναμης.

Από τον πίνακα είναι εμφανές ότι η **υδροξυτυροσόλη είναι ένα φυσικό πανίσχυρο αντιοξειδωτικό** καθώς η ισχύς του είναι 13 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ασκορβικού οξέος και περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από το απόσταγμα της φλούδας σταφυλιού. Γενικά η υδροξυτυροσόλη θεωρείται ως το πιο ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό ([www.polyhealth.gr](http://www.polyhealth.gr); Sandra Martín-Peláez et al, 2013; EFSA Journal, 2011 ).

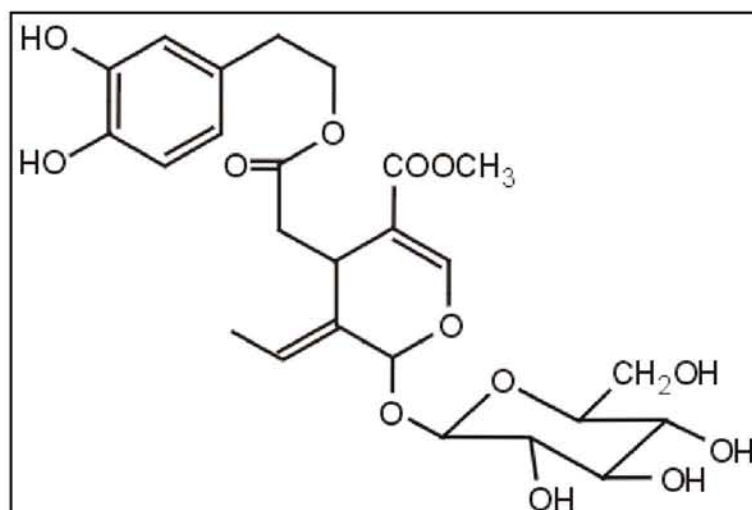
#### 1.4.2.6 Ελευρωπαΐνη

Η **ελαιοευρωπεΐνη (oleuropein)** ή άλλες ελληνικές αποδόσεις: **ελευρωπαΐνη, λαιοευρωπαΐνη, ολευρωπαΐνη, ολευρωπεΐνη**) είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης (secoiridoid glucoside) χαρακτηριστικός των Ολεασών (Oleaceae) και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία πήρε και το όνομά της. Στον πίνακα V αναφέρονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες αυτής.

**Πίνακας V. Φυσικοχημικές ιδιότητες Ελευρωπαΐνης**

Φυσικοχημικές ιδιότητες	
Εμφάνιση	Λευκοκίτρινη άμορφη υγροσκοπική ουσία
Μοριακός τύπος	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>
Σχετική μοριακή μάζα	540,53
Σημείο τήξης	89-90°C
Διαλυτή σε	Νερό, Μεθανόλη, Οξικό αιθυλεστέρα

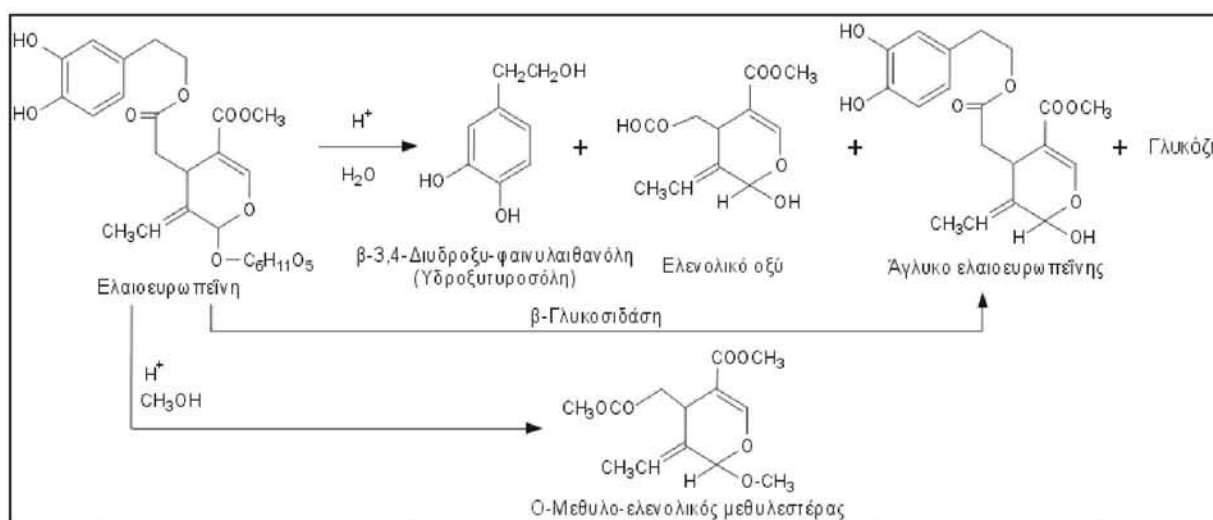
Η ελευρωπαΐνη (Εικόνα V) ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco στο ελαιόλαδο, οι οποίοι της έδωσαν και το χαρακτηριστικό της όνομα. Αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente απόδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιοκάρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε συσταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Bourquelot et al, 1908; Panizzi LM et al; 1960).



**Εικόνα V. Ελευρωπαΐνη (Oleuropein)**

Η ελευρωπαΐνη βρίσκεται τόσο στα φύλλα της ελιάς όσο και στον ελαιόκαρπο. Η περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη είναι μεγαλύτερη στους ανώριμους ελαιόκαρπους και σε αυτήν οφείλεται κυρίως η έντονα πικρή γεύση τους.

Αργότερα το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με υδρόλυση της ελευρωπαΐνης (Εικόνα VI), επιβεβαίωσαν τον χημικό τύπο της. Στην ίδια έρευνα περιγράφουν μια μέθοδο απομόνωσής της από τις ελιές. Χρησιμοποίησαν την τεχνική της εκχύλισης κατ'αντιρροή (counter-current extraction) και απομόνωσαν 7,2 g σχεδόν καθαρής ουσίας από 500 g καρπών μιας ποικιλίας ελιάς (Manzanillo) (Fleming HP et al, 1973).

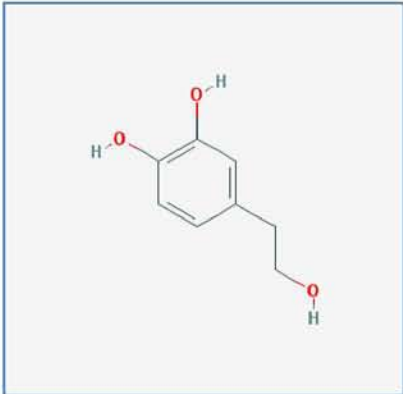


**Εικόνα VI. Υδρολυτικές αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της ελευρωπαΐνης.**



Τα τελευταία χρόνια, η ελευρωπαΐνη καθώς και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες όπως η **τυροσόλη**, η **υδροξυτυροσόλη** καθώς και διάφορα παράγωγά τους έχουν μελετηθεί ως προς την φαρμακολογική τους δράση, ιδιαίτερα την αντιοξειδωτική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, καθώς και τη μείωση της "συγκόλλησης" των αιμοπεταλίων (blood platelet aggregation). Τόσο η ελευρωπαΐνη όσο και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο στα φυτά, γιατί με την προστατευτική τους δράση (κυρίως αντιοξειδωτική, αλλά και λόγω της πικρής γεύσης) υπερασπίζονται τις ελιές από παθογόνους μύκητες καθώς και από τα κεντρίσματα των εντόμων (www.chem.uoa.gr).

#### 1.4.2.7 Υδροξυτυροσόλη

<b>Άλλα ονόματα</b>	3-υδροτυροσόλη; 3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη; 4-(2-υδροξυ αιθυλ βενζόλιο-1,2-διολη	
<b>Μοριακός τύπος</b>	$C_8H_{10}O_3$	
<b>Μοριακό Βάρος</b>	154.1632 g/mol	

**Εικόνα VII. Υδροτυροσόλη**

Η υδροξυτυροσόλη, μπορεί πέρα από την υγεία της καρδιάς, να προστατεύει και τον οργανισμό από εκφυλιστικές ασθένειες των νεύρων όπως η νόσος του “Alzheimer”. Επίσης μπορεί να προστατεύσει και τα κύτταρα του εγκεφάλου μειώνοντας την ποσότητα ATP, πηγής ενέργειας στο μεταβολισμό των κυττάρων. Μία ακόμα πρόσφατη μελέτη πάνω σε πολυφαινόλες ελιάς έχει ως εύρημα ότι η υδροξυτυροσόλη πιθανόν να έχει τη δυνατότητα απενεργοποίησης τόσο των παθογόνων *Staphylococcus aureus* καθώς και την παραγόμενη από αυτά τοξίνη.

Στην εικόνα VIII φαίνονται τα ευεργετικά αποτελέσματα, που σχετίζονται κυρίως στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών.



**Εικόνα VIII. Αντιοξειδωτική δράση και τα σχετικά αποτελέσματα της ελευρωπαΐνης και υδροξυτυροσόλης.**

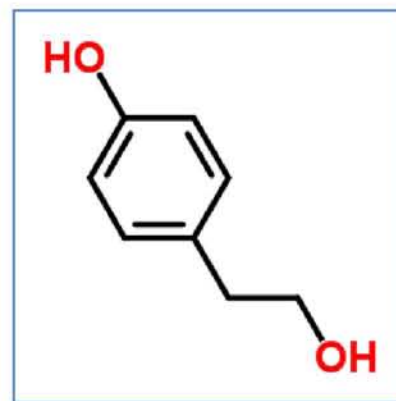
Η υδροτυξυροσόλη έχει αναγνωριστεί επίσημα, από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (E.A.A.T) (European Food Safety Authority (EFSA)), ότι διατηρεί την καλή υγεία της καρδιάς.

Από έρευνα που δημοσιεύτηκε από το περιοδικό της E.A.A.T, η κατανάλωση της υδροτυξυροσόλης και των υπόλοιπων πολυφαινολών που παράγονται από τις ελιές και το ελαιόλαδο, παρέχουν προστασία στα λιπίδια του αίματος από την οξείδωση, βλάβη που είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη καρδιαγγειακή υγεία.

Η επιστημονική ομάδα του Οργανισμού, βασισμένη στα αποτελέσματα διαφόρων μελετών κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το ποσό της τάξεως των 5mg υδροτυξυροσόλης και παραγώγων της (πχ σύμπλοκο ελευρωπαίνης και τυροσόλης) πρέπει να περιέχεται στο προϊόν ώστε να επιτυγχάνεται η προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος (Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 432/2012).

#### 1.4.2.8 Τυροσόλη

<b>Άλλα ονόματα</b>	2-(4-υδροξυ-φαινυλ)αιθανόλη; 4-υδροξυφαινυλαιθανόλη
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
<b>Μοριακό Βάρος</b>	138.164 g/mol



Εικόνα IX. Τυροσόλη

Η τυροσόλη (Εικόνα IX) είναι μια φαινολική ένωση παρούσα σε δύο από τα παραδοσιακά συστατικά της μεσογειακής διατροφής: το κρασί και το παρθένο ελαιόλαδο. Η ύπαρξη της τυροσόλης έχει περιγραφεί στα κόκκινα και λευκά κρασιά. Η τυροσόλη είναι επίσης παρόν στο βερμούτ και την μύρα.

Η τυροσόλη αποτρέπει την οξείδωση της «κακής» χοληστερόλης LDL, γεγονός με εξέχουσα σημασία, αν αναλογιστούμε πως η εν λόγω οξείδωση αποτελεί ένα από τα κύρια στάδια της διαδικασίας της αρτηριοσκληρωτικής βλάβης (Covas MI et al, 2003).

### 1.5 Πηγές πολυφαινολών

Η σημαντικότερη πηγή πολυφαινολών είναι η διατροφή μας. Οι πολυφαινόλες συναντώνται σε πολλούς καρπούς όπως ρόδι, μήλο, σταφύλι, αχλάδι, βατόμουρα, σταφύλια, ελιές, καρύδια άλλα και σε ποτά όπως κρασί, τσάι, καφές. Τα τελευταία περιέχουν περίπου 100 mg πολυφαινόλες σε κάθε ποτήρι (Scalbert et al., 2005 a).

Τα σκουρόχρωμα μούρα, διάφορα μπαχαρικά και οι ξηροί καρποί, σπόροι καθώς και λαχανικά όπως οι ελιές και οι αγκινάρες αποτελούν τα πιο πλούσια τρόφιμα σε πολυφαινόλες (Perez- Jimenez et al, 2010)

### 1.5.1 Ανεύρεση πολυφαινολών στη Φύση

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στα εδώδιμα φυτά όπως στα λαχανικά, στα δημητριακά, στα όσπρια, στα φρούτα, στους ξηρούς καρπούς, κλπ. και στα ποτά όπως στο κρασί, μπίρα, τσάι, κακάο, κλπ. Βέβαια, διαφορές στη συγκέντρωση πολυφαινολών υπάρχουν ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ιδίου είδους, καθώς η παρουσία των πολυφαινολών στα φυτά όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα επηρεάζεται πολύ από παράγοντες όπως οι γενετικοί, η βλάστηση, ο βαθμός ωρίμανσης, η ποικιλία, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Hermann, 1988; Porter, 1989; Mazza, 1995).

Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες των φυτικών τροφίμων μπορεί να κυμαίνεται σε αρκετά ευρύ όρια. Στα όσπρια και τα δημητριακά, οι κυριότερες πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, και οι ταννίνες, με την περιεκτικότητα συνήθως να είναι λιγότερη από το 1% της ξηρής ύλης. Όσον αφορά στα όσπρια, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχουν οι σκούρες ποικιλίες, όπως τα κόκκινα και τα μαύρα φασόλια. Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη, ανευρίσκονται στα περισσότερα όσπρια, ενώ τα λαχανικά περιέχουν κυρίως τους φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Επιπλέον, φρούτα όπως τα μήλα και τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, ενώ οι φλαβανόνες είναι άφθονες σε εσπεριδοειδή και δαμάσκηνα. Η κύρια φαινολική ένωση στα φρούτα είναι η φλαβονόλη και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συναντώνται στο φλοιό (Kuhnau, 1976).

Ακολουθώς, το τσάι περιέχει κυρίως κατεχίνες οι κυριότερες από τις οποίες είναι: ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), η επιγαλλοκατεχίνη (EGC), ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (ECG) και η επικατεχίνη (EC), ενώ οι κύριες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρισετίνη και ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από τις κατεχίνες. Η EGCG είναι η πιο άφθονη κατεχίνη στο τσάι (50-60% του συνόλου των κατεχινών) και θεωρείται το δραστικό συστατικό του. Αναλυτικότερα, το πράσινο τσάι είναι πολύ πλούσιο σε φλαβανόλες, ενώ το μαύρο περιέχει μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων πολυφαινολών όπως είναι οι θεαφλαβίνες και οι θεαρουμπιγίνες (Shao, et. al., 1995). Στο κακάο τώρα, η κυριότερη πολυφαινόλη στους σπόρους, είναι η φλαβανόλη επικατεχίνη, ενώ παρουσιάζεται υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και ταννίνες. Τέλος στο κρασί, οι πολυφαινόλες αποτελούνται από φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, ταννίνες και άλλα.

Στο ελαιόλαδο τώρα, περιέχονται φαινολικά οξέα και υδρολυόμενες ταννίνες (Visioli & Galli, 1998). Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν το πολικό κλάσμα του και εμποδίζουν την αυτοοξείδωσή του, αποδίδοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την εξαιρετική θερμική σταθερότητά του και συνεισφέροντας στο χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση (Tsimidou, et. al., 1992; Ντζιαδήμας Βασίλειος, 2013).

### 1.5.2 Πολυφαινολικές ενώσεις στα φύλλα της ελιάς

Όπως αναφέρεται από τους Benavente – Garcia et al, (2000), πέντε ομάδες φαινολικών ουσιών είναι παρούσες στα φύλλα της ελιάς:

- Oleuropeosides (ελευρωπαίνη και βερμπασκοζίτης)
- Flavones (7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-O- γλυκοζίτης της απιγενίνης, λουτεολίνη)
- Flavonols (Ρουτίνη)
- Flavan- 3- ols (κατεχίνη)
- Substituted phenols (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, βανιλικό οξύ, καφεϊκό οξύ)

Τις μεγαλύτερες ποσότητες στο φύλλο της ελιάς παρουσιάζουν κατά σειρά οι παρακάτω ενώσεις:

Ελευρωπαίνη, υδροξυτυροσόλη, 7-ο- γλυκοζίτης της Λουτεολίνης, 7-ο- γλυκοζίτης της Απιγενίνης, Βερμπασκοζίτης. Ο βερμπασκοζίτης είναι παράγωγο υδροξυκιναμωμικού οξέος.

Οι ιδιότητες των φύλλων ελιάς οφείλονται κατά κύριο λόγο στα σεκοϊριδοειδή ελευρωπαίνη και υδροξυτυροσόλη. Τα δύο αυτά σεκοϊριδοειδή είναι γνωστά και για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους, ενώ θεωρείται ότι δίνουν στο δέντρο τις ελιάς αντοχή κατά των βλαβών από έντομα και βακτήρια. Ειδικά η ελευρωπαίνη έχει βρεθεί ότι είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και έχει αντιμικροβιακή δράση σε ιούς, μύκητες βακτήρια και παράσιτα σύμφωνα με μελέτες των Aziz et al, (1998), Juven and Henys (1972), Koutsoumanis et al, (1998) και Tassou and Nychas, (1995) (Μητσόπουλος Γ., 2012).

### 1.5.3. Πολυφαινόλες στον Κατσίγαρο

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά την εξαγωγή των πολυφαινολών από τα απόβλητα του ελαιολαιού. Αυτά είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά κυρίως του κουκουτσιού, τα φύλλα ελιάς που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιόκαρπο και μια σημαντική ποσότητα (σε όγκο και οργανικό φορτίο) υγρών αποβλήτων που είναι γνωστά ως 'λιοζούμι' 'κατσίγαρος' ή 'μούργκα'.

Ο κατσίγαρος αποτελεί ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μια σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου.

Οι φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στον κατσίγαρο είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές αλκοόλες (Πίνακας VI) (Πετρωτός Κ.; Γερασόπουλος Κ., 2012).

**Πίνακας VI. Συγκεντρώσεις πολυφαινολών στον Κατσίγαρο. (Lesage et.al.,2001).**

Φαινολικά Συστατικά	Εύρος Τιμών (mg/L)
tyrosol	5 – 100
hydroxytyrosol	35 – 130
Caffeic acid	4 – 12
Elenolic acid	17 – 1430
luteolin	2 – 623
Cinnamic acid	1 – 118

#### 1.5.4 Πολυφαινόλες στα στέμφυλα

Οι φαινολικές ενώσεις του κρασιού λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων θεωρούνται πολύτιμα συστατικά μιας ισορροπημένης διατροφής. Εκτός από το ίδιο το κρασί και τα στέμφυλα σταφυλής, παραπροϊόντα της οινοποίησης, περιέχουν σημαντική ποσότητα φαινολικών ενώσεων.

Τα φαινολικά παράγωγα που συναντάμε στους φλοιούς είναι κυρίως οι ανθοκυάνες, χρωστικές που δίνουν το χρώμα στα σταφύλια και σε μικρότερα ποσοστά φαινολοξέα, κατεχίνες και προκυανιδίνες.

Σε αντίθεση στα κουκούτσια των σταφυλιών συναντάμε κατεχίνες και προκυανιδίνες. Κατά την οινοποίηση των ερυθρών σταφυλιών το 50% περίπου των φαινολικών ουσιών περνάει στον οίνο και το υπόλοιπο παραμένει στα στέμφυλα.

Στα ερυθρά σταφύλια η περιεκτικότητα των στεμφύλων σε ανθοκυάνες είναι περίπου 0,4g/kg στεμφύλων και σε υπόλοιπες φαινολικές ουσίες 0,9g/kg (Τιτάκης - Καρτσωνάκης, Γεώργιος, 2007).



## 1.6 Συνολικό πολικό φαινολικό περιεχόμενο σε ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα, και αναφέρεται ότι κυμαίνονται από 50 έως 1000 mg καφεϊκό οξύ/kg σε παρθένο ελαιόλαδο από Ελλάδα, Ισραήλ, Ιταλία, Ισπανία και Τουρκία, με συνήθεις τιμές μεταξύ 100 και 300 mg καφεϊκό οξύ /kg (Πίνακας VII, VIII, IX). Υψηλότερα επίπεδα δεν είναι συνήθως αποδεκτά από τους καταναλωτές. (Boskou, D et al, 2005; Tsimidou, M et al, 1998).

Τα ιταλικά παρθένα ελαιόλαδα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την συνολική τους συγκέντρωση σε πολυφαινόλες ως ‘χαμηλά’ με 50-200ppm, ως ‘ενδιάμεσα’ με 200-500ppm και ως ‘υψηλά’ με 500-1000 ppm γαλλικού οξέος/ kg.

Η συνολική συγκέντρωση των πολυφαινολών στα ελληνικά ελαιόλαδα κυμαίνεται από 18,7-242,5 ppm (Kalogeropoulos Nick et al, 2014).

**Πίνακας VII. Ολική φαινολική συγκέντρωση των ελληνικών παρθένων ελαιολάδων, προσδιοριζόμενη με <sup>1</sup>H P-NMR (Agiomyrgianaki, A. et al, 2012) πηγή: (Kalogeropoulos Nick et al, 2014)**

Προέλευση	Ποικιλία	Συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες (εύρος) (mg/kg)
<b>2007–2008</b>		
Κρήτη (Χανιά)	Κορωνέικη (n = 26)	138–441
	Τσουνάτη * (n = 9)	173–641
Κρήτη (Ρέθυμνο)	Κορωνέικη (n = 25)	65–320
	Θρουμπολιά (n = 5)	118–294
Κρήτη (Σητεία)	Κορωνέικη (n = 23)	95–351
<b>2005–2006</b>		
Κρήτη (Ηράκλειο)	Κορωνέικη (n = 2)	53–92
Κρήτη (Χανιά)	Κορωνέικη (n = 6)	25–120
Πελοπόννησος (Λακωνία)	Κορωνέικη (n = 1)	95
Πελοπόννησος (Λακωνία)	Τσουνάτη (n = 7)	72–208
Πελοπόννησος (Μεσσηνία)	Κορωνέικη (n = 13)	37–118
Ζάκυνθος	Κορωνέικη (n = 12)	49–142
Λέσβος	Αδραμυτινή (n = 5)	31–163
<b>2004–2005</b>		
Κρήτη (Ηράκλειο)	Κορωνέικη (n = 2)	130–205
Κρήτη (Ρέθυμνο)	Κορωνέικη (n = 1)	83
Κρήτη (Χανιά)	Τσουνάτη (n = 5)	91–216

Προέλευση	Ποικιλία	Συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες (εύρος) (mg/kg)
Πελοπόννησος (Λακωνία)	Κορωνέικη (n = 5)	87–225
Πελοπόννησος (Μεσσηνία)	Κορωνέικη (n = 16)	39–189
Ζάκυνθος	Κορωνέικη (n = 9)	67–145
Λέσβος	Αδραμυτινή (n = 8)	23–212
<b>2003–2004</b>		
Κρήτη (Χανιά)	Κορωνέικη (n = 2)	145–248
Πελοπόννησος (Λακωνία)	Κορωνέικη (n = 3)	40–183
Πελοπόννησος (Λακωνία)	Τσουνάτη (n = 9)	72–225
Πελοπόννησος (Μεσσηνία)	Κορωνέικη (n = 9)	82–175
<b>2002–2003</b>		
Κρήτη (Ηράκλειο)	Κορωνέικη (n = 7)	77–164
Κρήτη (Ηράκλειο)	Τσουνάτη (n = 2)	46–86
Κρήτη (Χανιά)	Κορωνέικη (n = 2)	67–108
Κρήτη (Χανιά)	Τσουνάτη (n = 2)	89–114
Πελοπόννησος (Λακωνία)	Τσουνάτη (n = 5)	85–134

\*: Η ποικιλία “Τσουνάτη” αναφέρεται επίσης και ως “Μαστοειδής” και “Αθηνολιά”

**Πίνακας VIII. Φαινολικές ενώσεις που συναντώνται σε ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα. (πηγή: (Kalogeropoulos Nick et al, 2014))**

Αναλυτικές Τεχνικές	Ποικιλία	Αριθμός Δειγμάτων	Ενώσεις
HPLC	Δεν διευκρινίζεται	24	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη
HPLC με διάφορους ανιχνευτές	Δεν διευκρινίζεται	Δεν παρέχεται	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Βανιλικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, Συριγγικό οξύ, ο-κουμαρικό, p- κουμαρικό οξύ, Γαλλικό οξύ, Ομοβανιλικό οξύ, Φερουλικό οξύ
HPLC	Δεν διευκρινίζεται θολά και φιλτραρισμένα λάδια	6	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη
HPLC	Κορωνέικη	8	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Άγλυκο ελευρωπαίνης, διααλδευδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένη με Υδροξυτυροσόλη, παράγωγο τυροσόλης, Καφεϊκό οξύ, Βανιλικό οξύ
LC-SPE-NMR	Κορωνέικη Κολοβή	2 2	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Οξική Υδροξυτυροσόλη, Οξική Τυροσόλη, μεγάλος αριθμός από παράγωγα σεκοϊριδοειδή όπως

Αναλυτικές Τεχνικές	Ποικιλία	Αριθμός Δειγμάτων	Ενώσεις
			Ελενολικό οξύ, Βανιλλικό οξύ, Βανιλίνη, p-κουμαρικό οξύ, πινορεζινόλη, 1-ακετοξυπινορεζινόλη, Απιγενίνη, Λουτεολίνη
<sup>31</sup> P-NMR	Κορωνέικη Μαστοειδής	2 2	Ολική και ελεύθερη Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, Βανιλίνη, Βανιλλικό οξύ, Ομοβανιλλικό οξύ, (+)-πινορεζινόλη, (+)-1-ακετοξυπινορεζινόλη, Συρινγκαρεσινόλη, Λουτεολίνη, Απιγενίνη
<sup>1</sup> H-NMR, <sup>31</sup> P-NMR and HPLC	Κορωνέικη, Κολοβή, Μαστοειδής *	111	Ολική και ελεύθερη Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, (+)-πινορεζινόλη, (+) 1-ακετοξυπινορεζινόλη, Λουτεολίνη, Απιγενίνη
<sup>1</sup> H-NMR, <sup>31</sup> P-NMR	Κορωνέικη	131	Ολική και ελεύθερη Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, p-κουμαρικό οξύ, Ομοβανιλική αλκοόλη, (+)-πινορεζινόλη, (+)-1-ακετοξυπινορεζινόλη, Συρινγκαρεσινόλη, Λουτεολίνη, Απιγενίνη
<sup>1</sup> H-NMR, <sup>31</sup> P-NMR	Κορωνέικη	4	Ολική Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, Αλδευδική μορφή Ελευρωπαίνης, αγλυκόνη Λιγκστροσίδης, αλδευδική μορφή Ελευρωπαίνης και Λιγκστροσίδη, διαλδευδική μορφή Ελευρωπαίνης, Λιγκστροσίδη διαλδευδική μορφή υδροξυμεθυλο ελευρωπαίνης και Λιγκστροσίδης, p-κουμαρικό οξύ, Βανιλίνη, Βανιλλικό οξύ, Ομοβανιλική αλκοόλη, (+)-πινορεζινόλη, (+)-1-ακετοξυπινορεζινόλη, Συρινγκαρεσινόλη, Απιγενίνη
<sup>1</sup> H-NMR, <sup>31</sup> P-NMR	Αδραμυτινή, Κορωνέικη, Θρουμπολιά, Μαστοειδής	221	Ολική και ελεύθερη Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, p-κουμαρικό οξύ, Ομοβανιλική αλκοόλη, (+)-πινορεζινόλη, (+)-1-ακετοξυπινορεζινόλη, Συρινγκαρεσινόλη, Λουτεολίνη, Απιγενίνη
HPLC	Κορωνέικη ποτιστικά εναντίον μη ποτιστικά	6	Ολική Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, p-κουμαρικό οξύ, Ομοβανιλική αλκοόλη, (+)-πινορεζινόλη, (+)-1-ακετοξυπινορεζινόλη, Συρινγκαρεσινόλη, Λουτεολίνη, Απιγενίνη
HPLC	Κορωνέικη 2- εναντίον 3- φάσεων ντεκάντερ	9	Ολική Υδροξυτυροσώλη και Τυροσώλη, άγλυκο Ελευρωπαίνης, διαλδευδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένη με Υδροξυτυροσώλη, διαλδευδική μορφή Ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με Τυροσώλη, παράγωγο Τυροσώλης
HPLC/MSD	Μαστοειδής	3	Τυροσώλη, Βανιλλικό οξύ, Λουτεολίνη, Απιγενίνη



Αναλυτικές Τεχνικές	Ποικιλία	Αριθμός Δειγμάτων	Ενώσεις
<sup>1</sup> H-NMR	13 ποικιλίες	158**	Ολεοκανθάλη, Ολεοσίνη
LC-MS	Κορωνέικη Λιανολιά	20 20	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Αγλυκόνη Ολεοσίνη, Αλδευδική μορφή αγλυκόνης της Ελευρωπαίνης, Άγλυκο της Ολεοκανθάλης, αλδευδική μορφή της Λιγκστροσίδης αγλυκόνης, p- κουμαρικό οξύ, Φερουλικό οξύ, Βανιλλικό οξύ, 1-ακετοξυπινορεζινόλη, Απιγενίνη, Λουτεολίνη
HPLC-GCMS	Λιανολιά	Δεν παρέχεται	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη και παράγωγα
HPLC	Κορωνέικη	20	Ολική Υδροξυτυροσόλη και Τυροσόλη
HPLC-Orbitrap-HRMS/MS	Κορωνέικη	Δεν παρέχεται	Εντοπίστηκαν 25 ενώσεις, ποσοτικοποιημένες: ολική Υδροξυτυροσόλη, ολική Τυροσόλη, αλδευδική μορφή Ελευρωπαίνης, άγλυκο της Ελευρωπαίνης, αλδευδική μορφή Ελευρωπαίνης και Λιγκστροσίδη, Ολεοκανθάλη, Ολεοσίνη
HPLC	Θρουμπολιά, Κορωνέικη 3 στάδια ωρίμανσης	6	Ολική Υδροξυτυροσόλη και Τυροσόλη, άγλυκο Ελευρωπαίνης, διαλδευδική μορφή του Ελενολικού οξέος συνδεδεμένη με Υδροξυτυροσόλη, διαλδευδική μορφή Ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με Τυροσόλη
GC-MS, παράγωγα TMS	Κορωνέικη	1	Ελεύθερη Υδροξυτυροσόλη και Τυροσόλη, p-κουμαρικό οξύ, Βανιλίνη, Βανιλλικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, Φερουλικό οξύ, p-υδροξυ-φαινυλακετικό οξύ, Ομοβανιλική Αλκοόλη, Καμφερόλη
GC-MS, παράγωγα TMS	Κορωνέικη	1	Ελεύθερη Υδροξυτυροσόλη και Τυροσόλη, Καφεϊκό οξύ, p- κουμαρικό οξύ, Βανιλίνη, Βανιλλικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, Φερουλικό οξύ, p-υδροξυ-φαινυλακετικό οξύ, Συριγγικό οξύ, Κινναμικό οξύ, Ομοβανιλική Αλκοόλη, Πρωτοκατεχικό οξύ, Καμφερόλη
GC-MS, παράγωγα TMS	Κορωνέικη 2 χρονίες από βιολογικές καλλιέργειες εναντίον συμβατικές	32	Ελεύθερη Υδροξυτυροσόλη και Τυροσόλη, Καφεϊκό οξύ, p- κουμαρικό οξύ, Βανιλλικό οξύ, Φερουλικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, Συριγγικό οξύ, Κινναμικό οξύ, Ομοβανιλική Αλκοόλη, Πρωτοκατεχικό οξύ
GC-MS, παράγωγα TMS	Κορωνέικη 3 στάδια ωρίμανσης	3	Ελεύθερη Υδροξυτυροσόλη και Τυροσόλη, Καφεϊκό οξύ, p- κουμαρικό οξύ, Βανιλλικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, Φερουλικό οξύ, Κινναμικό οξύ, Ομοβανιλική Αλκοόλη, Καμφερόλη, Ναρινγενίνη, Γενιστεΐνη

Ολική Υδροξυτυροσόλη και Ολική Τυροσόλη: το άθροισμα των ελεύθερων και εστεροποιημένων μορφών και των δύο φαινυλικών αλκοολών; \*: Η ποικιλία Μαστοειδής αφέρεται επίσης και ως “Αθηνολιά” ή “Τσουνάτη”; \*\*: Αδραμυτινή, Αγουρομανάκι, Αθηνολιά, Χαλκιδικής, Κονσερβολιά, Κολοβή, Κορωνέικη, Κουτσουρολιά, Λιανολιά, Μανάκι, Μεγαρίτικη, Θρούμπα, Αγρελιά; TMS: τριμεθυλοσιλυλ.

**Πίνακας ΙΧ. Τυροσόλη και Υδροξυτυροσόλη (mg/kg) σε Ελληνικά μονοποικιλιακά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα κατά την διάρκεια των περιόδων συγκομιδής (2002–2006 & 2007–2008) [Agiomyrghianaki, A et al, 2012].**

Περιοχή	Ποικιλία	Ολική Υδροξυτυροσόλη	Ολική Τυροσόλη	Ελεύθερη Υδροξυτυροσόλη	Ελεύθερη Τυροσόλη
Κρήτη	Κορωνέικη	8.6–330	8.9–54.5	Μη ανιχνεύσιμο-6.3	Μη ανιχνεύσιμο -5.7
Πελοπόννησος	Κορωνέικη	3.4–132	9.1–40.3	Μη ανιχνεύσιμο -8.4	0.2–10.7
Ζάκυνθος	Κορωνέικη	13.1–83.0	23.8–81.2	0.1–2.9	0.3–7.1
Κρήτη	Μαστοειδής	14.7–432	16.1–136	0.1–25.4	0.7–46.6
Πελοπόννησος	Μαστοειδής	13.7–131	27.1–131	0.4–10.2	Μη ανιχνεύσιμο -8.4
Κρήτη	Θρουμπολιά	52.1–201	40.3–87.8	5.0–19.3	Μη ανιχνεύσιμο -6.6
Λέσβος	Αδραμυτινή	7.1–121	7.7–72.9	Μη ανιχνεύσιμο -12.5	0.7–23.4

## 1.7 Βιοδραστικότητα πολυφαινολών

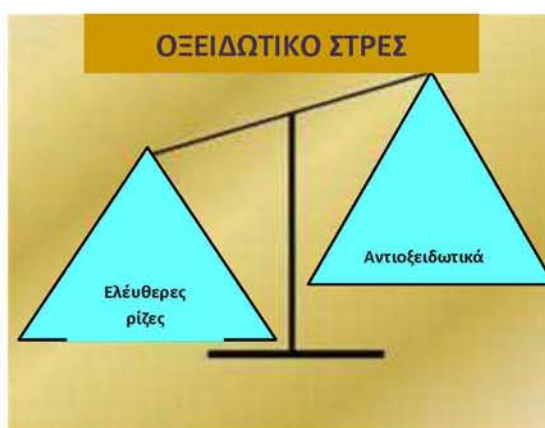
### 1.7.1 Γενικά

Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να εξολοθρεύουν τις ελεύθερες ρίζες και να ανάγουν ορισμένες χημικές αντιδράσεις: τα δραστικά ιόντα που περιέχουν οξυγόνο (ελεύθερες ρίζες) πρέπει να αφαιρούνται από τα κύτταρα συνεχώς για να διατηρηθεί ο σωστός μεταβολισμός. Από έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν:

- Να μειώσουν τις φλεγμονώδεις επιδράσεις, όπως της στεφανιαίας νόσου, και να βελτιώσουν την υγεία των ενδοθηλίων, περιορίζοντας την οξείδωση της χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL).
- Να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου – οι πολυφαινόλες που αναφέρονται για την πρόληψη του καρκίνου είναι η κατεχίνη.
- Να καθυστερήσουν την διαδικασία της γήρανσης.
- Να προστατεύσουν τις λιπομεμβράνες των κυττάρων, τις πρωτεΐνες και το DNA.

### 1.7.2 Οξειδωτικό Στρες

#### 1.7.2.1 Ορισμός Οξειδωτικού Στρες



Εικόνα Χ. Οξειδωτικό στρες

Οξειδωτικό στρες είναι η φθορά που προκαλείται στον οργανισμό μας, λόγω της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η φθορά αυτή προκαλείται μέσω της διαδικασίας οξείδωσης.

Η οξείδωση αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία που συντελείται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς μέσω της πρόσληψης οξυγόνου. Στον ανθρώπινο οργανισμό κατά την οξείδωση παράγονται ουσίες γνωστές ως ελεύθερες ρίζες.

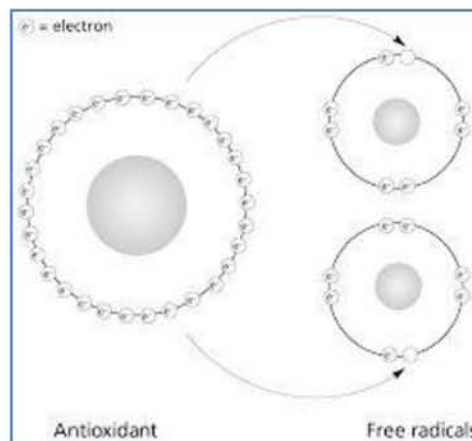
Μπορούμε να αντιληφθούμε τη βλάβη που προκαλείται στον οργανισμό μας από τις ελεύθερες ρίζες, αρκεί να φανταστούμε την οξείδωση του σιδήρου ("σκουρία") μετά από την επαφή του με το οξυγόνο.



Η οξειδωτική καταστροφή από τις ελεύθερες ρίζες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες της διαδικασίας της γήρανσης καθώς και πλήθος εκφυλιστικών παθήσεων, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης, ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer, η σκλήρυνση κατά πλάκας κ.α.

### 1.7.2.2 Ελεύθερες ρίζες

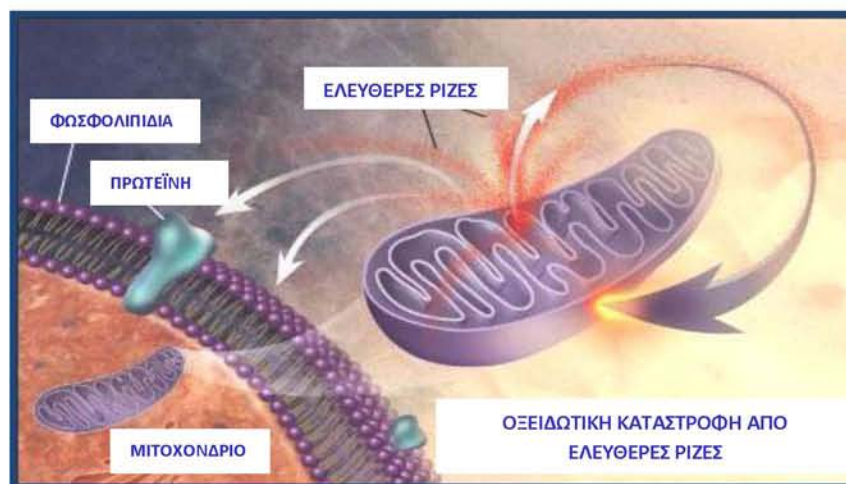
Με τον όρο ‘ελεύθερες ρίζες’ αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Halliwell & Gutteridge, 1999). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθή και πολύ δραστικά μόρια καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Sen 2001; Prior & Cao, 1999) (εικόνα XI). (Κερασιώτη Ε., 2014)



**Εικόνα XI. Μεταφορά ηλεκτρονίου στην εξωτερική στοιβάδα της ελεύθερης ρίζας (πηγή: Κουρέτας Δ. 2001)**

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά τη διάρκεια των διεργασιών του μεταβολισμού μέσω της πρόσληψης του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τις βιολογικές καύσεις. Οι ουσίες αυτές είναι απαραίτητες για την εξολόθρευση παθογόνων μικροβίων και ιών που εισβάλλουν στο σώμα μας. Μόλις οι ελεύθερες ρίζες επιτελέσουν την αποστολή τους καταστρέφονται από τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού.

Όταν το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση διαρκούς υπερδιέγερσης (π.χ. εξαιτίας του καπνίσματος ή του έντονου στρες) παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες ελευθέρων ριζών από όσες μπορεί να εξουδετερώσει ο οργανισμός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών που παράγονται και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού και να προκαλείται το οξειδωτικό στρες - φαινόμενο καταστροφικό για τους ιστούς και την υγεία μας, καθώς χιλιάδες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου πολιορκούν τα κύτταρα μας, εισχωρούν στο εσωτερικό τους και καταστρέφουν το DNA τους (εικόνα XII).



**Εικόνα XII. Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών (πηγή: Γερασόπουλος Κ., 2012)**

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ουσίες πολύ επιθετικές προς τα κύτταρα του οργανισμού μας και μπορούν να προκαλέσουν πρόωρη γήρανση και σοβαρές μεταβολικές ασθένειες όταν η φυσιολογική ικανότητα του οργανισμού μας να τις εξουδετερώσει δεν επαρκεί. Σε αυτήν την περίπτωση γίνονται αναγκαία τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής τα οποία περιέχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες προστατεύοντάς μας.

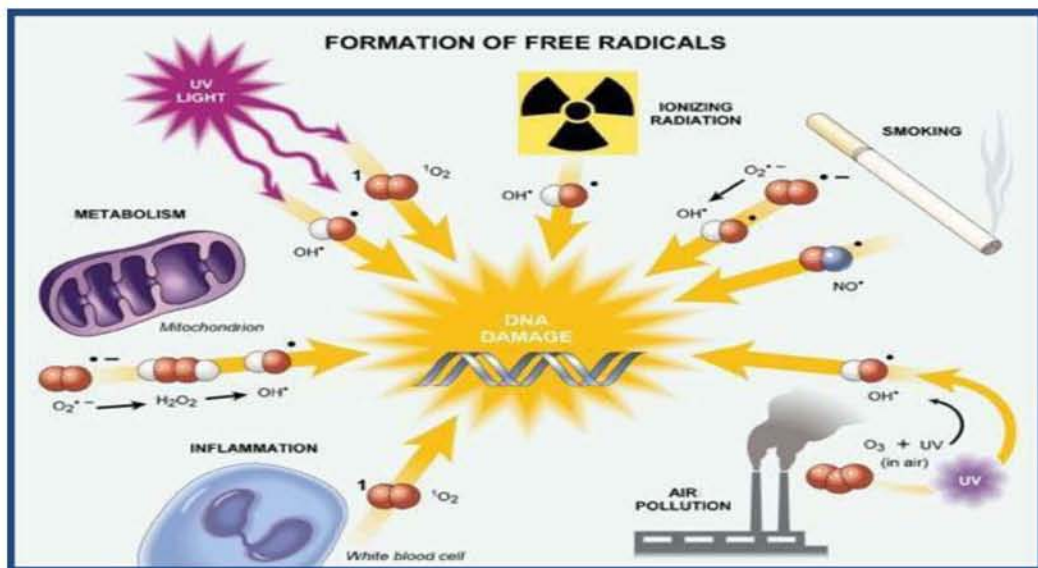
### 1.7.2.3 Πως παράγονται οι ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό μας

Η πλειονότητα των ελευθέρων ριζών παράγεται από τον ίδιο τον οργανισμό μας, όταν:

- Υπάρχει αυξημένη ανάγκη για αποτοξίνωση (όπως π.χ υπερβολική έκθεση οργανισμού σε τοξικές ουσίες).
- Υπάρχει αυξημένη παραγωγή ενέργειας (υπερβολική κατανάλωση θερμίδων και ιδιαίτερα λίπους και «κενών» θερμίδων).
- Υπάρχει παρατεταμένη ανοσολογική απάντηση.
- Υπάρχει αυξημένη παραγωγή στεροειδών (π.χ σε καταστάσεις στρες – όπως η έντονη φυσική δραστηριότητα, στην εφηβεία, από διαταραχές εμμήνου ρύσεως κ.α).
- Μετά από έκθεση του οργανισμού σε συντηρητικά τροφίμων, και μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ καπνός τσιγάρου, ρύποι που μολύνουν την ατμόσφαιρα).
- Κατά την έκθεση σε ακτινοβολία (π.χ υπεριώδης ακτινοβολία UV).
- Κατά την αυτοοξείδωση διαφόρων χημικών ουσιών και βιομορίων (π.χ πολυακόρεστα λιπαρά οξέα).



- Κατά την λιπιδική υπεροξειδωση (δηλ. την επίδραση ελευθέρων ριζών επί των λιπιδίων που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, και ιδιαίτερα των πολυακόρεστων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υπεροξειδίων.
- Σε αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ.



**Εικόνα XIII. Παράγοντες που συμβάλουν στον σχηματισμό των Ελευθέρων Ριζών.** (πηγή: Γερασόπουλος Κ., 2012)

Οι ελεύθερες ρίζες, δεν δρουν ανεξέλεγκτα. Ο οργανισμός μας είναι εφοδιασμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα από την φύση του για να αμύνεται στην δράση των ελευθέρων ριζών και ενεργών παραγώγων οξυγόνου:

### 1. Ένζυμα

- Υπεροξειδική δισμουτάση –SOD
- Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
- Καταλάση

### 2. Διαιτητικά αντιοξειδωτικά

- Βιταμίνη C
- Σελήνιο (Se)
- Βιταμίνη E
- Καροτενοειδή, φλαβονοειδή

### 3. Ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια

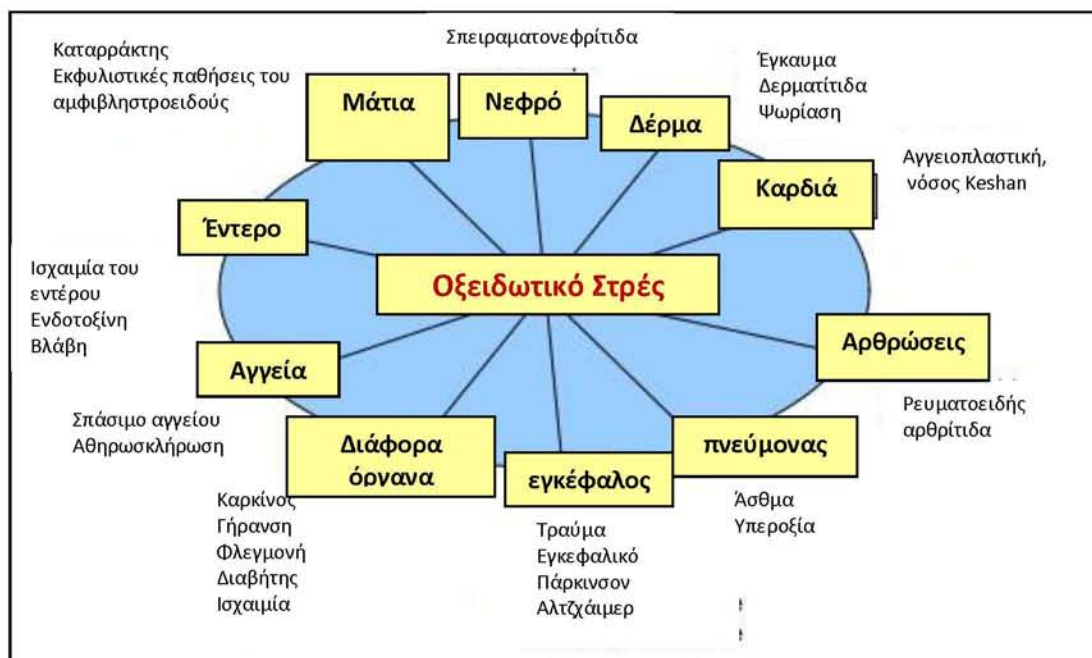
4. Γλουταθειόνη, συνένζυμο Q10, λιποϊκό οξύ κ.α (V. Lobo, 2010; [www.clickatlife.gr](http://www.clickatlife.gr)).

#### 1.7.2.4 Επίδραση ελευθέρων ριζών στην υγεία του ανθρώπου

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί σοβαρές κυτταρικές βλάβες και γι'αυτό θεωρείται η κύρια αιτία που οδηγεί στη γήρανση αλλά και στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Ασθένειες που είναι άμεσα συνδεδεμένες με τα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες είναι:

- Καρκίνος
- Αρτηριακή πίεση
- Αρτηριοσκλήρωση
- Έμφραγμα του μυοκαρδίου
- Ρευματικά Νοσήματα
- Νόσος Alzheimer
- Νόσος Parkinson
- Διαβήτης
- Αλλεργίες
- Ελκώδης Κολίτιδα
- Φλεγμονές
- Λοιμώξεις
- Υπογονιμότητα
- Ηπατοπάθειες



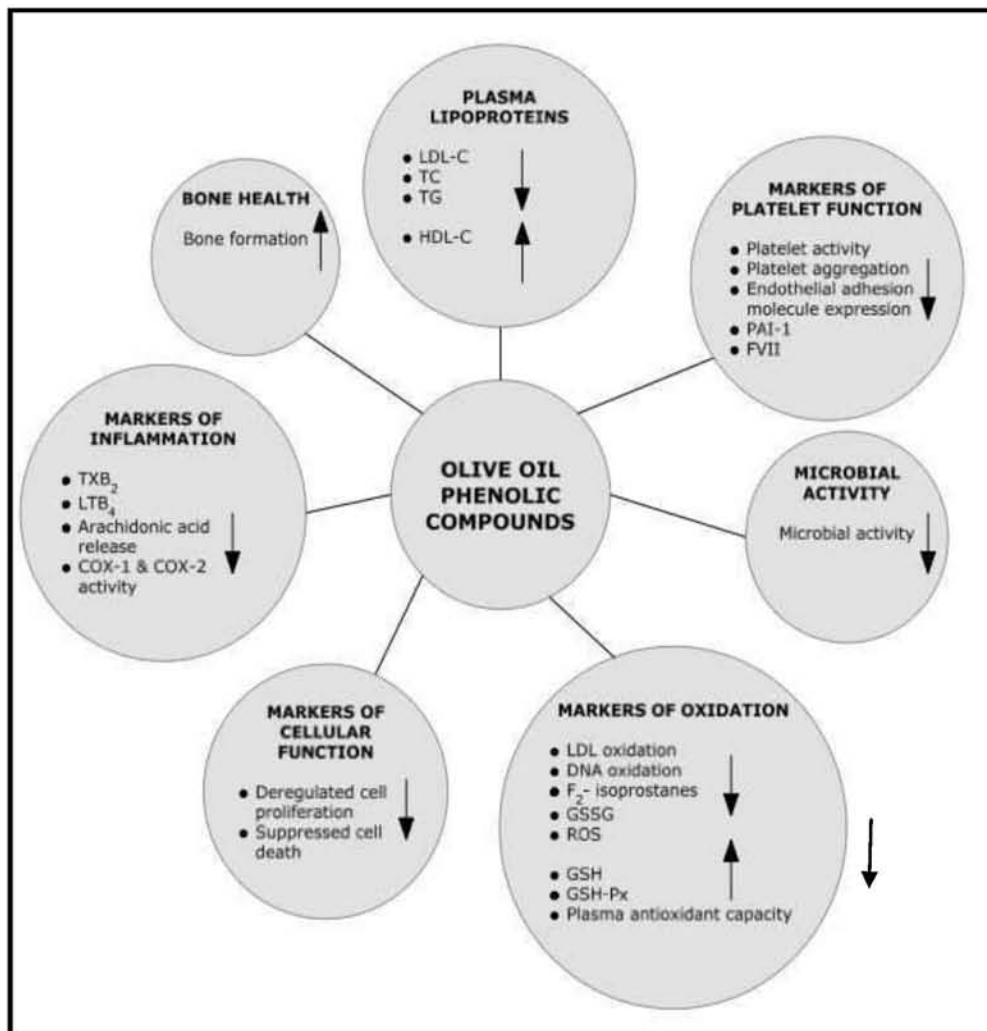
Εικόνα XIV. Επίδραση ελευθέρων ριζών στην υγεία.

Το οξειδωτικό στρες δεν αποτελεί ασθένεια, αλλά μια αρνητική κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει ή να επιταχύνει μια ασθένεια. Σύμφωνα με μελέτες, η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και τα αντιοξειδωτικά παίζει σημαντικό ρόλο

στην διατήρηση της υγείας, της ευεξίας και της μακροβιότητας και μια διατάραξη της μπορεί να προκαλέσει διαταραχές και ασθένειες (V. Lobo, 2010; [www.holistic-greece.com](http://www.holistic-greece.com)).

### 1.7.3. Βιοδραστικότητα πολυφαινολών ελαιολάδου.

Οι πολυφαινόλες είναι φυτικές οργανικές ενώσεις γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση. Μια σειρά μελετών παρακάτω αποδεικνύουν την βιοδραστικότητά τους ως φυτοχημικά αντιοξειδωτικά.



Εικόνα XV. Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας (Cicerale, S. et.al., 2010; Γερασόπουλος K., 2012 ).

#### 1.7.3.1. Πολυφαινόλες και Καρδιαγγειακό.

Παρακάτω παρατάσσεται μια σειρά μελετών που αποδεικνύουν την επίδραση των πολυφαινολών στο καρδιαγγειακό σύστημα.

❖ Η επίδραση των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στα αντισώματα, κατά της οξειδωμένης LDL - Low Density Lipoprotein (Olga Castaner, et. al., 2011).

Στην συγκεκριμένη μελέτη εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στην ανοσογονικότητα της οξειδωμένης LDL, σε σχέση με την δημιουργία αυτοαντισωμάτων.

Διακόσιοι (200) υγιείς άνδρες, σε διάστημα τριών (3) εβδομάδων διαχωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες. Στην πρώτη ομάδα δόθηκε υψηλή φαινολική δόση (366mg/kg). Στην δεύτερη ομάδα μία μέση δόση (164 mg/kg) και στην τρίτη ομάδα μία χαμηλή δόση (2.7 mg/kg) (Πίνακας Χ).

**Πίνακας Χ. Αποτελέσματα των συμμετεχόντων στη μελέτη (πηγή: Olga Castaner, et. al., 2011)**

Μεταβλητή	OLAB* 1 <sup>η</sup> <306 U/L	OLAB 2 <sup>η</sup> <(306- 1099) U/L	OLAB 3 <sup>η</sup> > 1099 U/L	P- value για γραμμική τάση
Ηλικία , χρόνια	37 (12)	33 (11)	30 (9)	0,020
Μορφωτικό επίπεδο 1, (%) Τριτοβάθμια εκπαίδευση	21 (12,5 %)	12 (7,3 %)	15 (9,1 %)	0,260
Μορφωτικό επίπεδο 2, (%) Πρωτοβάθμια και Δευτεροβάθμια εκπαίδευση	37 (22,4%)	42 (25,5%)	38(23%)	0,494
Φυσική δραστηριότητα Kcal/ ημέρα που καταναλώθηκαν	320 (270)	262 (172)	303 (254)	0,192
Αναλογία μέσης και γοφών	0,87 (0,06)	0,87 (0,05)	0,56 (0,06)	0,108
BMI (δείκτης μάζας σώματος), Kg/m <sup>2</sup>	24,3 (2,9)	23,8 (2,8)	23,5 (2,7)	0,428
SBP(μέση συστολική πίεση του αίματος), mm Hg	124 (11)	123 (13)	125 (13)	0,697
DBP (διαστολική αρτηριακή πίεση), mm Hg	77 (8)	76 (8)	77 (8)	0,181
Γλυκόζη, mg/ dL	87 (10)	83 (8)	87 (11)	0,025
Ολική χοληστερόλη, mg/ dL	194 (43)	182 (39)	173 (37)	0,979
HDL- Χοληστερόλη, mg/ dL	49 (12)	45 (10)	47,5 (11)	0,046
LDL- Χοληστερόλη, mg/ dL	125 (39)	119 (37)	107 (31)	0,532
Τριγλυκερίδια, mg/ dL	79,5 (62-114)	88 (64- 115)	78 (58-109)	0,145
Οξειδωμένη LDL, U/L	55,7 (24,9)	49,6 (23,2)	43,5 (19,3)	0,001





Οι SOD σε 3 κατηγορίες δεσμεύουν, χαλκό και ψευδάργυρο ή μαγγάνιο και σίδηρο ή νικέλιο.

Η μείωση αυτή έχει παρατηρηθεί και στο τερπενοειδές ολεανολικό οξύ, παρόλο που ο μηχανισμός δεν είναι σήμερα γνωστός. Οι τοκοφερόλες και οι φαινολικές ενώσεις ως ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, με την απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και των νιτρικών μονοξειδίων NO~.

Το νιτρικό μονοξείδιο είναι ένα σημαντικό μόριο κυτταρικής σηματοδότησης, που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Ισχυρό αγγειοδιασταλτικό με μια σύντομη ημιζωή από λίγα δευτερόλεπτα στο αίμα.

Επίσης, μειώνεται ο σχηματισμός των νιτρικών ιόντων OONO~. Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου μπορεί να ενεργοποιήσουν τον πυρηνικό παράγοντα NFκB που είναι ένας πρωτεϊνικός παράγοντας που ανακαλύφθηκε το 1986. Σήμερα, είναι γνωστό ότι εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών (Karin et al., 2005). Αυτός ο παράγοντας, που συνδέεται με αλληλουχίες αναγνώρισης στο DNA και επάγει την γονιδιακή έκφραση, με την παρουσία των ελευθέρων ριζών, μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα.

❖ **Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου καταστέλνουν την προσκόλληση της ομοκυστεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανεξάρτητα από την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση. (Manna C, et.al., 2009).**

Πρέπει να αναφερθεί πως, η ομοκυστεΐνη παράγεται ενδοκυτταρικά, από τον μεταβολισμό της μεθειονίνης (ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα) και διοχετεύεται στην κυκλοφορία μέσω του πλάσματος, κυρίως σε οξειδωμένη μορφή, δεσμευμένη σε πρωτεΐνες.

Η ομοκυστεΐνη, επηρεάζει τη μεθυλίωση και γι' αυτό είναι πολύ σημαντική. Η μεθυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία χιλιάδες νευροδιαβιβαστές, ορμόνες και άλλα βασικά βιοχημικά συστατικά βρίσκονται σε ισορροπία, δηλαδή τα μεθύλια προσκολλώνται σε τοξίνες με σκοπό να τις αποβάλλουν από τον οργανισμό.

Η μεθυλίωση βοηθά στην δημιουργία των φιλικών λιπαρών για τον εγκέφαλο (φωσφολιπίδια) και ακόμα ελέγχει την έκφραση των γονιδίων.

Όταν είναι χαμηλή η ομοκυστεΐνη έχουμε ισορροπία στο σώμα, εάν όμως έχουμε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, διαταράσσεται η μεθυλίωση, προκαλείται ερεθισμός και φλεγμονή στα εσωτερικά τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και αυξάνεται ο κίνδυνος του εμφράγματος, γιατί οι βλάβες στα τοιχώματα των αρτηριών προκαλούν την εναπόθεση πλακών, που οδηγούν στη στένωση και τελικώς στο έμφραγμα.

❖ **Επιδράσεις των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων. (Paiva-Martins F., et.al, 2009).**

Στην μελέτη αυτή διαπιστώθηκε πως η 3,4-DHPEA-EDA (3-Υδροξυτυροσόλη), μία πολυφαινόλη του ελαιολάδου, μπορεί να διαδραματίσει έναν αξιοσημείωτο

προστατευτικό ρόλο έναντι των ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα του ανθρώπου.

❖ **Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από φαινόλες ελαιολάδου, μέσω cAMP-φωσφοδιεστεράσης. (Dell'Agli M., et.al., 2008).**

Το κυκλικό AMP (cAMP ή 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη), είναι ένας σημαντικός αγγελιοφόρος σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Προέρχεται από τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και χρησιμοποιείται για την ενδοκυττάρια μετάδοση σημάτων στους οργανισμούς. Η cAMP, συντίθεται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) από την αδενυλική κυκλάση, που βρίσκεται στην εσω πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Καταλύεται από το ένζυμο της φωσφοδιεστεράσης, το οποίο καταλύει με υδρόλυση τον φωσφοδιεστερικό δεσμό.

Στην παραπάνω μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα αιμοπετάλια, που διεγείρονταν με θρομβίνη και υπολογίσθηκε η συγκέντρωσης αυτών. Χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα και πολυφαινόλες ελαιολάδου. Το φαινολικό ποσό των HPE (high phenol content), κυμαινόταν από 250 έως 500 mg/kg, ενώ των LPH (low phenol levels) 46 mg/kg. Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 50% λόγω των φαινολών του ελαιολάδου, κυμάνθηκε από 1,23 έως 11,2 µg/ml.

❖ **Αντι-Αθηρωματικά συστατικά του ελαιολάδου. (Visioli F, et.al., 2001).**

Σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση προκύπτει ότι το ελαιόλαδο, είναι η κύρια πηγή των λιπαρών στην Μεσογειακή διατροφή, με αποτέλεσμα, την παρουσία μικρού σχετικά αριθμού της στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου. Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών (ελαϊκό οξύ), αλλά η κύρια ιδιαιτερότητα του έξτρα-παρθένου ελαιολάδου, είναι η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων φαινολών, και κυρίως υδροξυτυροσόλης και ελευρωπαΐνης.

❖ **Η προστατευτική δράση του ελαιολάδου λόγω των φαινολικών του συστατικών, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. (Fito M, et.al. 2000).**

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν πως το παρθένο ελαιόλαδο [0.1-0.3 mg/L caffeic acid equivalents (CAE) - ισοδύναμο καφεϊκού οξέως], που περιέχει πολυφαινόλες, έχει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με αυτή του εξευγενισμένου ελαιόλαδου (0 mg/L CAE).

Συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών μεγαλύτερες από 20 mg/L, παρεμπόδισαν την δημιουργία των δραστικών ουσιών από το θειοβαρβιτουρικό οξύ, όταν το AAPH [(2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride), σαν ελεύθερη ρίζα, ξεκίνησε την οξείδωση της LDL.



❖ **Ελαιόλαδο και αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Ο ρόλος των φαινολικών συστατικών. (Fito M, et.al., 2000).**

Ο σκοπός της μελέτης ήταν να ερευνηθεί η προστατευτική επίδραση των ελαιολάδων, με διαφορετική φαινολική σύσταση, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ελαιόλαδα:

- Εξευγενισμένο ελαιόλαδο, με φαινολικό περιεχόμενο: 0 mg/l CAE),
- Κοινό ελαιόλαδο (0.1 - 0.3 mg/l CAE) και
- Παρθένο ελαιόλαδο, αραιωμένο με εξευγενισμένο ελαιόλαδο .

Η υδροξυτυροσώλη και η ελευρωπαΐνη, αναστέλλουν την οξείδωση της LDL, που προκαλείται από το θειικό χαλκό (CuSO<sub>4</sub>). Ο θειικός χαλκός, μειώνει ταχύτητα την αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης E, στην LDL. (Afanas IB, 1985). Τα λιπαρά οξέα που προσβάλλονται από την επίδραση του θειικού χαλκού είναι κυρίως τα πολυακόρεστα (λινολεϊκό, αραχιδονικό και εικοσαπεντοϊκό), τα οποία είναι περισσότερο ευπαθή στην οξείδωση. Η υδροξυτυροσώλη και η ελευρωπαΐνη, μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή να δρουν σαν παράγοντες χηλικοποίησης, διακόπτοντας έτσι την αλυσίδα του πολλαπλασιασμού των υπεροξειδίων. Μετά από πολλές αναλύσεις, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι πολυφαινόλες στο παρθένο ελαιόλαδο, επιδεικνύουν μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα, στην οξείδωση της LDL, σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο.

❖ **Αντιθρομβωτικές δυνατότητες του ελαιολάδου σε κουνέλια με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. (De La Cruz JP, et.al. 2000).**

Σκοπός αυτής της μελέτης, ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση των διατροφικών συμπληρωμάτων με παρθένο ελαιόλαδο, σε ένα πειραματικό μοντέλο με κουνέλια που τρέφονταν με μία συγκεκριμένη διαίτα (κορεσμένα λιπαρά 48% των συνολικών λιπαρών).

Μελετήθηκαν, τέσσερις (4) διαφορετικές ομάδες κουνελιών:

1. Στην πρώτη ομάδα δόθηκε μία εμπορική τυποποιημένη διαίτα.
2. Στην δεύτερη ομάδα δόθηκε μία τυπική διαίτα, συμπληρωμένη από 1% χοληστερόλη και υψηλά κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.
3. Στην τρίτη ομάδα δόθηκε μια διαίτα όμοια της πρώτης ομάδας, εμπλουτισμένη όμως κατά 15% σε ελαιόλαδο και
4. Στην τέταρτη ομάδα δόθηκε η διαίτα της δεύτερης ομάδας, εμπλουτισμένη όμως κατά 15% σε παρθένο ελαιόλαδο.

Στα κουνέλια που τρέφονταν με ελαιόλαδο, μειώθηκε η προθρομβωτική δραστηριότητα. Στα αιμοπετάλια βρέθηκαν μειώσεις στη συσσωμάτωση, στη σύνθεση θρομβοξάνης, και στον σχηματισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στο αρτηριακό τοίχωμα, βρέθηκε μειωμένη θρομβογονικότητα του υποενδοθηλίου και αυξημένη αντιθρομβωτική δράση στο ενδοθήλιο.

❖ **Επίδραση των φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου, στην οξείδωση των ανθρώπινων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, στο εργαστήριο (Caruso D, et.al. 1999).**

Η μελέτη δείχνει ότι οι οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) συμπράτουν στην παθογένεση και την εξέλιξη της ανθρώπινης αρτηριοσκλήρυνσης. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) είναι παρούσα σε αθηρωματικές πλάκες και περιέχουν οξυστερόλες, που παρουσιάζουν μια ποικιλία ανεπιθύμητων βιολογικών δραστηριοτήτων.

Τα αντιοξειδωτικά, έχουν επίσης αποδειχθεί ότι προλαμβάνουν την τροποποίηση LDL. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των φαινολικών ενώσεων από παρθένο ελαιόλαδο στην πρόληψη της οξείδωσης της ανθρώπινης LDL, η οποία οξειδώνεται από υπεριώδες φως.

Τα οξείδια της χοληστερόλης, που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια LDL φωτο-οξείδωσης, προσδιορίστηκαν με UV-HPLC, υπό την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων με τα καθαρά συστατικά τους (τυροσόλη, ελευρωπαΐνη) και προβουκόλη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό αντιοξειδωτικό. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ πιο ισχυρές στην πρόληψη της σχηματισμού οξειδίου της χοληστερόλης.

❖ **Αναστολή της δραστηριότητας της αραχιδονικής λιποξυγενάσης, από την Υδροξυτυροσόλη, ένα φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου. (Kohyama N, et.al, 1997).**

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι λιποξυγενάσες, είναι ένζυμα που περιέχουν σίδηρο και καταλύουν την διοξυγέννεση των λιπαρών οξέων στα λιπίδια. Συγκεκριμένα καταλύουν την παρακάτω αντίδραση: (fatty acid + O<sub>2</sub> = fatty acid hydroperoxide). Εδώ, αναφέρεται πως μελετήθηκαν οι επιδράσεις της ελιάς, στις δραστηριότητες της λιποξυγενάσης του αραχιδονικού οξέως, πάνω σε αιμοπετάλια και πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα (PMNL - polymorphonuclear leukocytes) ποντικών. Υπήρξε ισχυρή αναστολή από την Υδροξυτυροσόλη με IC<sub>50</sub>, 4.2 microM για την δραστηριότητα της 12-lipoxygenase (12-LO) και IC<sub>50</sub>, 13 microM για την PMNL 5-lipoxygenase (5-LO).

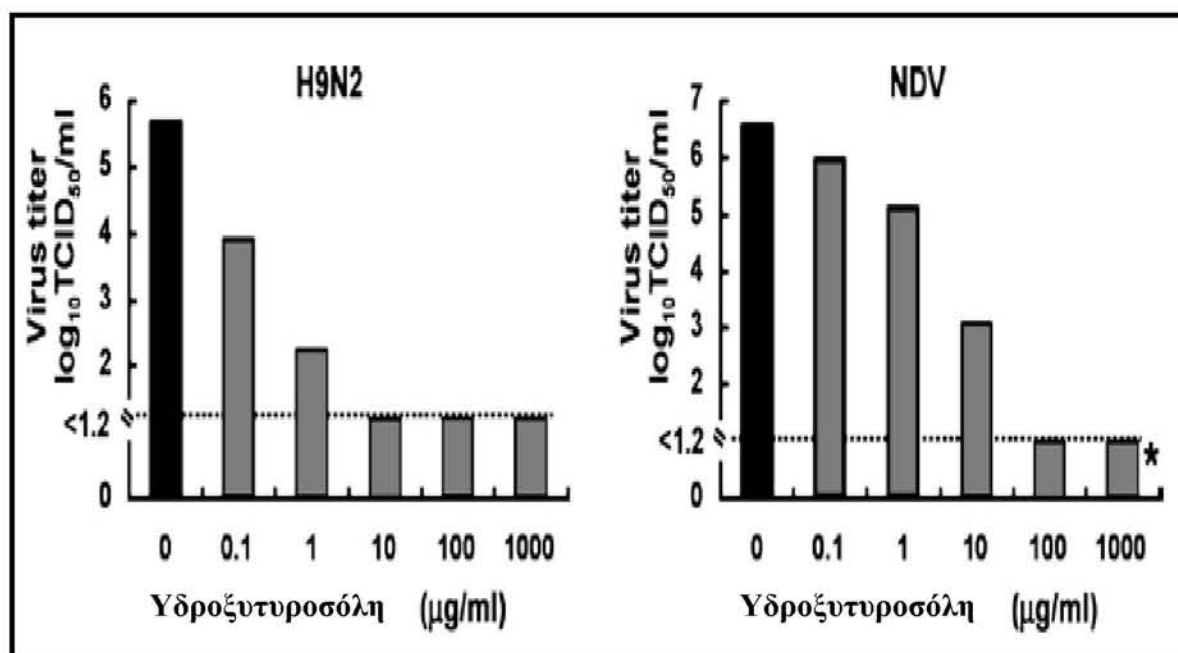
### 1.7.3.2. Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊκή Δραστηριότητα.

- ❖ Βακτηριοκτόνος δράση της γλουταραλδεϋδης, σε σχέση με τα συστατικά των ελαιοκομικών προϊόντων. (Medina E, et.al., 2009)

Στην συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκε η βακτηριοκτόνος δράση συστατικών του ελαιολάδου, όπως η ελευρωπαΐνη, η τυροσόλη και η διαλδεϊκή μορφή του δεκαρβοξυμέθυλου ελανολικού οξέως, κατά στελεχών της *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, και *Escherichia coli*.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν πως οι παραπάνω φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου, έχουν μια ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση ακόμη μεγαλύτερη από εκείνη των άλλων φαινολικών ενώσεων των τροφίμων ή των συνθετικών βιοκτόνων.

- ❖ Ο αντι-ϊκός μηχανισμός της υδροξυτυροσόλης, στον ιό της γρίπης, φαίνεται να συμμετέχει στην μορφολογική αλλαγή του ιού. (Yamada K. et.al., 2009).



Διάγραμμα Π. Σύγκριση των Αντι-ϊκών Αποτελεσμάτων της Υδροξυτυροσόλης σε Ιούς. (πηγή: Γερασόπουλος Κ., 2012)

Στην μελέτη αυτή οι ιοί υποβλήθηκαν σε θεραπεία με διάλυμα υδροξυτυροσόλης, σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στο παραπάνω γράφημα οι μαύρες μπάρες αντιπροσωπεύουν τα control που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, απουσία της υδροξυτυροσόλης. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι παρουσία της υδροξυτυροσόλης, ιικοί υπότυποι της γρίπης τύπου Α όπως H1N1, H3N2, H5N1, and H9N2, αδρανοποιούνται.

❖ **Αντιμικροβιακή δραστηριότητα της Ελευρωπαΐνης και της Υδροξυτυροσόλης (Bisignano G, et.al. 1999).**

Σ' αυτήν την μελέτη, φαίνεται πως οι βιοφαινόλες ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη, μπορεί να θεωρηθούν ως αντιμικροβιακά συστατικά, έναντι των παθογόνων βακτηρίων. Μέσα από πολλές δοκιμές εξετάστηκαν 44 κλινικά απομονωμένα βακτήρια. Διαπιστώθηκε πως και οι δύο αυτές πολυφαινόλες, εισέρχονται στις διαφορετικά δομημένες κυτταρικές μεμβράνες, των Gram- αρνητικών και Gram Θετικών βακτηρίων, με την υδροξυτυροσόλη να φαίνεται πιο δραστική. Παρακάτω φαίνονται μερικά από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής. (Πίνακας XI)

**Πίνακας XI. Ελάχιστες Συγκεντρώσεις Αναστολής της Ελευρωπαΐνης και Υδροξυτυροσόλης, κατά των Βακτηρίων. (Η Αμπικιλλίνη χρησιμοποιείται ως Σημείο Αναφοράς).**

Γένος ATCC = American Type Culture Collection.	Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής (mg/ml)		
	Ελευρωπαΐνη	Υδροξυτυροσόλη	Αμπικιλλίνη
Haemophilus influenzae ATCC 9006	500	0~97	1~91
Moraxella catarrhalis ATCC 8176	> 500	1~92	0~48
Salmonella typhi ATCC 6539	125	3~94	1~93
Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	62~5	0~24	3~90
Staphylococcus aureus ATCC 25923	62~5	7~85	0~48

Άλλες μελέτες επίσης που έχουν πραγματοποιηθεί και στις οποίες αποδεικνύονται οι αντιμικροβιακές δυνατότητες των πολυφαινολών είναι η αντιμικροβιακή δραστηριότητα και αναστολή του σχηματισμού αφλατοξίνης B1 από συστατικά του φυτικού ιστού της ελιάς. (Paster N, et.al. 1988), η παρασκευή αντιμικροβιακών συστατικών από την ελευρωπαΐνη, από τα φύλλα της ελιάς (Walter WM Jr, et.al. 1973) και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυσικών φαινολών και οι σχετικές ενώσεις (Jurd L, et.al. 1971).

### 1.7.3.3. Πολυφαινόλες και Καρκίνος.

- ❖ Οι πολυφαινόλες της Μεσογειακής διαίτας μειώνουν την φλεγμονώδη αγγειογένεση μέσω αναστολής των MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9), (μεταλλοπρωτεΐνασες, μία ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης) και COX-2 (Cyclooxygenase 2 – Κυκλοοξυγενάση), (πρωτεΐνη που η υπερέκφρασή της εμπλέκεται σε ασθένειες), σε ανθρώπινα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα: Ένας δυνητικά προστατευτικός μηχανισμός στην αθηροσκλήρωση και στον καρκίνο. (Scoditti, E., 2012).

Η φλεγμονώδης αγγειογένεση είναι μία βασική παθογόνος διαδικασία τόσο στον καρκίνο όσο και στην αθηροσκλήρωση, και ρυθμίζεται στενά από το ένζυμο COX-2 και τις μεταλλοπρωτεΐνασες. Μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών ελευρωπαΐνης και υδροξυτυροσόλης του ελαιόλαδου, της ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης του κόκκινου κρασιού, πάνω στην αγγειογόνο απόκριση, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ώστε να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών. Καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προ-επωάστηκαν με 0,1 έως 50  $\mu\text{mol} / \text{L}$  πολυφαινολών, πριν από τη διέγερσή τους με οξική μυριστική φορβόλη (PMA). Όλες οι πολυφαινόλες, μείωσαν την εκφύλιση των ενδοθηλίων κυττάρων (ποροειδείς αυλοί).

- ❖ Η πρόληψη του καρκίνου στην Ευρώπη: Η μεσογειακή διαίτα ως προστατευτική επιλογή. (Giacosa A., et.al. 2012).

Η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρει πως ένα υγιές πρότυπο διατροφής στις ευρωπαϊκές χώρες είναι η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή, η οποία βασίζεται στην πλούσια και ποικίλα κατανάλωση φυτικών τροφίμων, στην υψηλή κατανάλωση δημητριακών, στο ελαιόλαδο ως το κύριο λιπαρό, στην χαμηλή κατανάλωση (κόκκινου) κρέατος και στην μέτρια κατανάλωση κρασιού. The Mediterranean diet is associated with a reduced risk of cardiovascular disease and cancer. Η μεσογειακή διατροφή συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. The biological mechanisms for cancer prevention associated with the Mediterranean diet have been related to the favourable effect of a balanced ratio of omega 6 and omega 3 essential fatty acids and high amounts of fibre, antioxidants and polyphenols found in fruit, vegetables, olive oil and wine. Οι βιολογικοί μηχανισμοί για την πρόληψη του καρκίνου που σχετίζονται με τη μεσογειακή διατροφή έχουν σχέση με την ευνοϊκή επίδραση της ισορροπημένης αναλογίας των ωμέγα-6 και ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, στην μεγάλη ποσότητα φυτικών ινών, των αντιοξειδωτικών και των πολυφαινολών που βρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά, το ελαιόλαδο και το κρασί. The Mediterranean diet also involves a 'Mediterranean way of drinking', that is, regular, moderate consumption of wine mainly with food. Η μεσογειακή διατροφή περιλαμβάνει επίσης και την μέτρια κατανάλωση κρασιού, κυρίως με το φαγητό. This pattern of drinking increases longevity, reduces the risk of cardiovascular disease and does not appreciably influence the overall risk of cancer.

Επίσης μερικά ακόμα από τα οφέλη που προκύπτουν από τις πολυφαινόλες είναι τα παρακάτω:

❖ **Κάποιες πολυφαινόλες έχει αποδειχθεί ότι επιβραδύνουν την απώλεια οστικής μάζας, η οποία οδηγεί στην οστεοπόρωση.**

Οι περισσότερες προκαταρκτικές μελέτες σε αυτόν τον τομέα έχουν διεξαχθεί σε πειραματόζωα. Φαίνεται ότι τα καλύτερα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα σχετίζονται με την πρόσληψη ελαιολάδου. Οι δύο σημαντικές πολυφαινόλες του ελαιολάδου - η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη-έχουν συνδεθεί με αύξηση του σχηματισμού του οστίτη ιστού σε αρουραίους. Μια ομάδα ερευνητών έχει προτείνει ότι το ελαιόλαδο μπορεί τελικά να αποδειχθεί πως έχει ιδιαίτερα οφέλη στα οστά μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, αφού βρήκαν βελτιωμένους δείκτες στο αίμα και στη συνολική υγεία των οστών σε θηλυκούς αρουραίους που είχαν τραφεί με ελαιόλαδο, μετά από αφαίρεση των ωοθήκες τους.

Οι παραπάνω μελέτες είναι ενθαρρυντικές. Απαιτούνται όμως περισσότερες έρευνες και βέβαια μελέτες και σε ανθρώπους.

❖ **οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συντελούν στην προστασία του πεπτικού σωλήνα.**

Πρόσφατες έρευνες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το ελαιόλαδο, τις περιεχόμενες πολυφαινόλες (ελευρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη, και η τυροσόλη) και την προστασία του πεπτικού σωλήνα. Μια ενδιαφέρουσα περιοχή έρευνας είναι η αναζήτηση της συσχέτισης των πολυφαινολών του ελαιολάδου με τον πληθυσμό και την δράση των βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα. Φαίνεται ότι οι πολυάριθμες πολυφαινόλες του ελαιολάδου επιβραδύνουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων βακτηρίων (όπως βακτήρια που είναι υπεύθυνα για πεπτικές λοιμώξεις).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι ορισμένες από αυτές τις πολυφαινόλες-μαζί με άλλες πολυφαινόλες του ελαιολάδου όπως το λιγκοστρίδιο, είναι σε θέση να αναστέλλουν την ανάπτυξη του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*). Η επίδραση των πολυφαινολών του ελαιολάδου μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική, δεδομένου ότι ο υπερπληθυσμός των ελικοβακτηριδίων σε συνδυασμό με την υπερβολική επαφή τους με τον βλεννογόνο του στομάχου μπορεί να οδηγήσει σε έλκος στομάχου και σε άλλα πεπτικά προβλήματα (Scalbert et al., 2005 a; Scalbert et al., 2005 b; EFSA Journal, 2011; [www.foodbites.eu](http://www.foodbites.eu)).

❖ **Μείωση Κινδύνου Ηπατικής Νόσου**

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι μια διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο, και κατ'επέκταση πλούσια σε πολυφαινόλες, μειώνει τη συσσώρευση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, βελτιώνει την μεταγευματική τριγλυκεριδαίμια, τη γλυκόζη και τη γλυκαγόνη, την ινσουλινοανθεκτικότητα και την έκκριση του μεταφορέα-2 γλυκόζης (GLUT2) ο οποίος εκφράζεται στο ήπαρ. Με λίγα λόγια, οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου προστατεύουν τον οργανισμό από τους κινδύνους που έχουν οι ασθενείς να προχωρήσουν σε ίνωση και σε κίρρωση του ήπατος (Assy, et. al., 2009).

## ❖ Προστασία από Λευχαιμία & Σακχαρώδη Διαβήτη

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν πως οι πολυφαινόλες του παρθένου ελαιολάδου εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (HL60) επάγοντας απόπτωση και διαφοροποίηση (Fabiani, et. al., 2006). Επίσης, προκαλούν χαμηλές συγκεντρώσεις τριγλυκερίδιων και υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης HDL και GLP-1, γεγονός που δείχνει ότι βοηθούν στην πρόληψη του σακχαρώδους διαβήτη (Thomsen, et. al., 2003; Ντζιαδήμας Βασίλειος, 2013).

### 1.7.4 Διατροφικός ισχυρισμός για τις πολυφαινόλες

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε με Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1924/2006) (τον διατροφικό ισχυρισμό που είχε κατ' αρχήν δεχθεί η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA).

Σύμφωνα με τον ισχυρισμό **«Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συνεισφέρουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από την οξείδωση»** .[Olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress].

Ο ισχυρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ελαιόλαδο το οποίο περιέχει τουλάχιστον 5mg υδροξυτυροσόλης και τα παράγωγά της (π.χ. σύμπλεγμα ελευρωπαΐνης και τυροσόλης) για κάθε 20 γραμμάρια ελαιολάδου. Τα ευεργετικά αποτελέσματα εξασφαλίζονται με την ημερήσια πρόσληψη 20 g ελαιολάδου.

### 1.7.5 Τρόφιμα εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες

Παρόλο που υπάρχουν πολλά τρόφιμα που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, λόγω των πλεονεκτημάτων και των οφελών των πολυφαινολών, έχει αποκτήσει ενδιαφέρον τον τελευταίο καιρό ο εμπλουτισμός των τροφίμων με πολυφαινόλες. Μερικά από τα τρόφιμα που έχουν εμπλουτισθεί μέχρι τώρα σύμφωνα με την βιβλιογραφική ανασκόπηση είναι:

## ❖ Αλλαντικά με πολυφαινόλες

Πρόκειται για ένα σαλάμι αέρος δηλαδή ένα κρεατοσκεύασμα υψηλής προστιθέμενης αξίας που παράγεται με ζύμωση από χοιρινό κρέας αλλά δεν περιέχει ούτε ίχνος από τα συντηρητικά που συνήθως αναγράφονται στην ετικέτα των συμβατικών προϊόντων αυτής της κατηγορίας που κυκλοφορούν στην διεθνή αγορά. Συγκεκριμένα, στη συνταγή του αλλαντικού "δια ελίας και αέρος" δεν περιέχονται καθόλου νιτρώδη, όπως στα συμβατικά σαλάμια και καθόλου άλατα του ασκορβικού οξέος. Αυτά υποκαθίστανται πλήρως με φυσικό αντιοξειδωτικό εκχύλισμα που παράγεται από τα φυτικά νερά του ελαιотριβείου και έχει αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες ανώτερες από τα χημικά συντηρητικά και πρόσθετα χωρίς να έχει τις αντίστοιχες παρενέργειες.

Τα νιτρώδη που προτίθενται στα συμβατικά σαλάμια σαν αντιμικροβιακά και

ενισχυτικά του ερυθρού χρώματος σχηματίζουν με την κατανάλωση τους νιτροζαμίνες στον ανθρώπινο οργανισμό που αποτελούν υπ' αριθμόν ένα παράγοντα για πρόκληση καρκίνου του στομάχου.

Επιπλέον, η προστιθέμενη σκόνη εκχυλίσματος πολυφαινόλης ενεργοποιεί τα χρήσιμα γαλακτικά βακτήρια, δημιουργώντας προϋποθέσεις για καλύτερη χώνευση στο στομάχι του καταναλωτή και στον γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ εξουδετερώνει τυχόν βλαβερούς παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, όπως τα κλωστρήδια και οι ψευδομονάδες.

το συγκεκριμένο αλλαντικό έχει σημαντική αντιοξειδωτική προστασία όσον αφορά την τάγγιση του λίπους του και πολύ ωραία γεύση λόγω των αρωμάτων της καλύτερης ζύμωσης που παράγει η ενισχυμένη από την πολυφαινόλη γαλακτική χλωρίδα.

#### ❖ **Βιοδραστικό Γιαούρτι με πολυφαινόλες ελιάς** ([www.fabe.gr](http://www.fabe.gr))

#### ❖ **Σνακ ζαγορίσιου φύλλου εμπλουτισμένα με βιοδραστικές φυτικές πολυφαινόλες**

Στην παρούσα μελέτη έγινε ενσωμάτωση βιοδραστικών πολυφαινολών φυτικής προέλευσης στα σνακ παραδοσιακής ζαγορίσιας ζύμης. Έγινε προσθήκη απλών πολυφαινολών και ενκαψωλλιωμένων σε διάφορους φορείς όπως πχ λιποσώματα. (Πετρωτός Κ., 2010).

#### ❖ **Ελιές εμπλουτισμένες με πολυφαινόλες.**

Μελετήθηκε η δυνατότητα να αυξηθεί η θρεπτική αξία των επιτραπέζιων ελιών χρησιμοποιώντας πολυφαινόλες που προέρχονται από φύλλα ελιάς. Φύλλα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με νερό με αναλογίες του 1%, 5% και 10% των φύλλων και διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους (θερμοκρασία δωματίου/24 h, 40 ° C/10 λεπτά και 70 ° C/5 min). Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ήταν σύμφωνα με τη μέθοδο του Rancimat και το περιεχόμενό τους σε ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλης ήταν προσδιορισμένη με HPLC. Το εκχύλισμα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και πολυφαινολικό περιεχόμενο (10% αναλογία της ελιάς εξάγονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h) χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία ξεπικρίσματος των επιτραπέζιων ελιών. Μια αύξηση 457% παρατηρήθηκε σε ελευρωπαΐνη και 109% για την περιεκτικότητα της υδροξυτυροσόλης μετά την επεξεργασία (Stavros Lalas et al, 2011).

#### ❖ **Τρόφιμα που έχουν εμπλουτισθεί λόγω τηγανίσματος σε έλαια εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες**

Στην παρούσα μελέτη τηγανίστηκε ένα από τα δημοφιλέστερα τρόφιμα που καταναλώνονται τηγανισμένα, η πατάτα, σε τρία διαφορετικά έλαια εμπορίου (ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, φοινικέλαιο) τα οποία είχαν προηγουμένως εμπλουτιστεί με εκχύλισμα φύλλων ελιάς πλούσιο σε πολυφαινόλες σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα στα έλαια αυτά προστέθηκε εκχύλισμα φύλλων ελιάς που να αντιστοιχεί στην προσθήκη (α) 100 mg/Kg ελαίου και (β) 200 mg/Kg ελαίου ολικών πολυφαινολών,



όπως προσδιορίστηκε από την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Για σύγκριση έγιναν επί πλέον τηγανίσματα και στα μη εμπλουτισμένα έλαια.

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση του κατά πόσον η αυξημένη συγκέντρωση πολυφαινόλων στα έλαια τηγανίσματος αντανakλάται στο πολυφαινολικό περιεχόμενο του τηγανισμένου τροφίμου, ενώ παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση της διαδικασίας του τηγανίσματος στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των τηγανισμένων ελαίων και η κατανομή των πολυφαινόλων μεταξύ ελαίου τηγανίσματος και απορροφηθέντος από το τρόφιμο ελαίου.

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις πολυφαινόλες που προέρχονται από το εκχύλισμα του εμπλουτισμού (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, κερκετίνη και ολεωρωπαΐνη). Τόσο το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο όσο και οι επιμέρους πολυφαινόλες αυξήθηκαν με τον εμπλουτισμό στα φρέσκα έλαια και, αν και παρατηρήθηκε μείωσή τους μετά το τηγάνισμα, οι συγκεντρώσεις τους εξακολούθησαν να είναι μεγαλύτερες από αυτές των φρέσκων μη εμπλουτισμένων ελαίων.

Οι πατάτες που τηγανίστηκαν στα εμπλουτισμένα έλαια βρέθηκε ότι εμπλουτίστηκαν σε πολυφαινόλες, οι οποίες βρέθηκαν σε υψηλότερη συγκέντρωση στο απορροφηθέν από το έλαιο τρόφιμο σε σύγκριση με τη συγκέντρωσή τους στο έλαιο τηγανίσματος. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου όσο και των πολυφαινόλων στις πατάτες που τηγανίστηκαν με εμπλουτισμένα έλαια. (Ευσταθίου Π., 2010).

#### ❖ Εμπλουτισμός ρυζιού με αντιοξειδωτικά βασιλικού

Σχεδιάστηκε ο εμπλουτισμός του ρυζιού, με σκοπό να παρασκευαστεί ένα λειτουργικό τρόφιμο που θα είναι αφενός οικονομικά προσιτό στον καταναλωτή και αφετέρου ευεργετικό για την υγεία του. Τα συστατικά με τα οποία εμπλουτίστηκαν οι κόκκοι ρυζιού είναι αντιοξειδωτικά που περιέχονται σε αποξηραμένα φύλλα βασιλικού. (Παπαδημητρίου Α., 2013)

## **1.8 Μέθοδοι απομόνωσης πολυφαινολών ελιάς και προσδιορισμού πολυφαινολών στο ελαιόλαδο.**

Η ανάλυση του φαινολικού κλάσματος γίνεται χωρίς διαχωρισμό (φωτομετρικά) ή μετά από διαχωρισμό με: α) υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed phase HPLC), β) GC- FID/MS μετά από παραγωγοποίηση των φαινολικών συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες γ) με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζωνών (CZE- UV).

### **1.8.1. Μέθοδοι Εξαγωγής των Πολυφαινολών.**

Συνήθως το φαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου παραλαμβάνεται με εκχύλιση διαλύματος ελαίου σε εξάνιο με υδατομεθανολικό διάλυμα διαφορετικών αναλογιών. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη από την υδατική φάση και προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών (ολικών ή επιμέρους).

Οι Montedoro & Cantarelli (1969) βελτιστοποίησαν την αναλογία διαλύτη/ ελαίου για διάφορα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η εκχύλιση υγρού- υγρού είναι καλύτερη με μίγμα μεθανόλης 80%. Οι Vazquez- Roncero et al (1976), πρότειναν την χρήση μίγματος μεθανόλης σε αναλογία 60% αφού έτσι διαχωρίζεται καλύτερα η υδατομεθανολική στιβάδα. Έπειτα οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) με διαφοροποιήσεις ως προς την ποσότητα του ελαίου, τις συνθήκες φυγοκέντρησης κλπ (Tsimidou, 1999).

Οι Brenes et al (2000) ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο υγρής / υγρής εκχύλισης των φαινολών του ελαιόλαδου χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το N,N- διμεθυλοφορμαμίδιο. Η μέθοδος παρουσιάζεται ως πιο οικονομική και γρήγορη και απαιτεί μικρότερη ποσότητα ελαιόλαδου σε σύγκριση με την υγρή/ υγρή και στερεή/ υγρή εκχύλιση. Το φαινολικό κλάσμα απομονώνεται επίσης και με την διαδικασία της στερεής/ υγρής εκχύλισης σε μικροστήλες αντίστροφης φάσης πληρωμένες με C8 ή C18 ή διόλη. Με τη μέθοδο αυτή μειώνονται οι ποσότητες δείγματος και διαλυτών καθώς και η διάρκεια της εκχύλισης.

Σύμφωνα με τους Servilli et al (2004), οι απλές φαινόλες παραλαμβάνονται καλύτερα με την SPE ενώ οι σύνθετες φαινόλες ανακτώνται καλύτερα με την LLE. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Hancirik & Fritsche (2004) που απέδειξαν ότι η ανάκτηση των ολικών πολικών φαινολών και των πικρών φαινολών αυξάνεται: SPE-C18 (έκλυση με μεθανόλη) < SPE-diol (έκλυση με μεθανόλη) < LLE (έκλυση με μεθανόλη 60%).

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση τελευταία χρησιμοποιείται για την παραλαβή πολυφαινολών από φυτικές πηγές πχ από φύλλα ελιάς. Πρόκειται για ταχύτερη διαδικασία με το πλεονέκτημα της απουσίας του αέρα και του φωτός αλλά με μικρότερη απόδοση σε σύγκριση με την κλασική LLE. (Ανδρουλάκη Α., 2007)

### **1.8.1.1 Εκχύλιση**

Η συνήθης περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση, είναι η υγρό- υγρό εκχύλιση. Η εκχύλιση αυτή με υγρούς διαλύτες (συνήθως νερό – οργανικός διαλύτης) βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών, τα οποία είναι πρακτικώς μη αναμίξιμα (υδατική – οργανική φάση). Στην υδατική φάση κατά κύριο λόγο συλλέγονται οι πολικές ουσίες και τα ανόργανα συστατικά, ενώ στην οργανική οι μη πολικές ουσίες.

Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εκχυλιστικό υλικό, διακρίνεται σε εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες και σε υπερκρίσιμη εκχύλιση.

### **1.8.1.2. Εκχύλιση με υπερήχους**

Στην εκχύλιση με υπερήχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο διαλύτη, σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραίωσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την ελεγχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. (Kamaljit Vilkhue et al, 2008)

### **1.8.1.3. Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE: microwave assisted extraction)**

Τελευταία προτείνονται νέες εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης φιλικές προς το περιβάλλον όπως είναι η εκχύλιση με μικροκύματα σε ελεγχόμενη και χαμηλή θερμοκρασία. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από το χρόνο, την θερμοκρασία εκχύλισης και την αναλογία στερεού- υγρού. Η βασική αρχή της μεθόδου εκχύλισης με μικροκύματα βασίζεται στην άμεση επίδραση της ενέργειας των μικροκυμάτων στα μόρια των υλικών που πρόκειται να εκχυλιστούν. Τα πολικά μόρια απορροφούν την ενέργεια των μικροκυμάτων με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι κυτταρικές δομές των φυτικών ιστών διευκολύνοντας έτσι την εκχύλιση (Fatiha Amarni et al, 2010; Σ. Χανιώτη και Συν., 2015; chimikoergastirio.blogspot.gr).

## **1.8.2 Μέθοδοι προσδιορισμού των πολυφαινολών.**

### **1.8.2.1 Η Μέθοδος Folin-Ciocalteu**

Οι πολυφαινόλες προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά με την χρήση του ειδικού αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Tsimidou, 1998).

Η μέθοδος αναπτύχθηκε στην Ιατρική σχολή του πανεπιστημίου του Χάρβαντ από τον Folin και τους συνεργάτες του το 1912, για την μελέτη του μεταβολισμού των

πρωτεϊνών του ανθρώπου. Το 1927 τροποποιήθηκε από τους Folin και Ciocalteu (Folin, 1927) και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών συστατικών (Vermeris and Nicholson, 2008). Συγκαταλέγεται στις επίσημες μεθόδους της A.O.A.C (Association of Analytical Commities). (Μητσόπουλος, Γεώργιος, 2012).

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης των φαινολικών υδροξυομάδων του δείγματος. Το φαινολικό ιόν οξειδώνεται σε αλκαλικό περιβάλλον με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού συμπλόκου του αντιδραστηρίου με αποτέλεσμα το χρωματισμό του διαλύματος από κίτρινο σε μπλέ και την μέτρηση έπειτα της απορρόφησής του στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο ορατού και υπεριώδους (UV-VIS).



**Εικόνα XVII. Χρωματισμός δείγματος από το αντιδραστήριο Folin (Πηγή:www.olivenews.gr)**

Με την μέθοδο αυτή συνπροσδιορίζονται εκτός από τις μονο- και διφαινόλες και άλλα συστατικά του εκχυλίσματος που έχουν αναγωγική δράση (λιγνάνες, φλαβόνες). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των ολικών πολικών φαινολών σε τρόφιμα όπως το κρασί, οι χυμοί φρούτων, το παρθένο ελαιόλαδο κλπ.

Οι πρότυπες ενώσεις αναφοράς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολών κυμαίνεται συνήθως από 50-200 ppm εκφρασμένη ως καφεϊκό οξύ, όπως έχει αναφερθεί από διάφορους ερευνητές ή από 150 σε 300 mg/kg σε γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πολυφαινολών εκφράζονται ως 'mg πρότυπης ένωσης / kg ελαίου (ppm πρότυπης ένωσης)'.

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι μία απλή, ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολών. Μειονέκτημα της είναι ότι δεν προσδιορίζει μόνο τα εκχυλιζόμενα φαινολικά συστατικά αλλά και μεγαλομοριακές ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους φαινολική υδροξυλομάδα όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, ασκορβικό οξύ κλπ. (Prior et al, 2005). Επίσης από την συγκεκριμένη μέθοδο δίνεται μια απλή εικόνα για το ολικό ποσό των πολυφαινολών σε ένα εκχύλισμα και όχι πληροφορίες για συγκεκριμένα επιμέρους φαινολικά συστατικά. (Μητσόπουλος, Γεώργιος, 2012)

Ειδικότερα για τα ελληνικά ελαιόλαδα αναφέρονται τιμές που κυμαίνονται από 20 έως 339 ppm εκφρασμένα ως καφεϊκό οξύ (Blekas et al., 2002). Στην διαμόρφωση αυτών των επιπέδων συμβάλουν όλοι εκείνοι οι παραμετροί που επηρεάζουν την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου (ποιότητα, ωριμότητα

καρπού, τεχνολογία παραλαβής, συνθήκες αποθήκευσης, πρωτόκολλο που ακολουθεί ο ερευνητής κλπ) (OJ Houshia et al, 2014; Ανδρουλάκη Α., 2007).

### 1.8.2.2 Η Μέθοδος HPLC

Από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών των τροφίμων είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Ως HPLC, ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτηματος οργάνων (συσκευή υγρού χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (οργανικοί, νερό, ρυθμιστικά διαλύματα και άλλα), υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή από πολυμερείς ενώσεις (Ανδρικόπουλος, 1999).

Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης, η μέθοδος HPLC αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού αυτών, ή της ιοντοανταλλαγής ή τέλος της μοριακής διήθησης. Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για τον διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού.

Τα τελευταία χρόνια, η υγρή χρωματογραφία υψηλής τάσης-ανάστροφης φάσης (Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography, RP-HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis), αποτελεί την πρώτιστη μέθοδο ανάλυσης, για δεδομένες αναλύσεις (Romani, et. al., 1999). Με RP-HPLC, συνδυασμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και κινητή φάση ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ, έχειδειχθεί ότι μπορούν ταυτόχρονα να διαχωριστούν και ποσοτικοποιηθούν οι κύριες φαινολικές ενώσεις, όπως αυτές που παραλαμβάνονται από εκχύλιση του ελαιολάδου (Akasbi, et. al., 1993). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τη RP-HPLC/UV-Vis, έχουν εφαρμοστεί συστήματα όπως υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή υπέρυθρου (Infrared Liquid Chromatography, IR-LC) (Visser, et. al., 1997) και υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism Liquid Chromatography, CD-LC) (Bringmann et al., 1999).

### 1.8.2.3 Η Μέθοδος TLC

Άλλη μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των πολυφαινολών των τροφίμων είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC). Στην TLC, ο διαχωρισμός γίνεται σε πλάκες με στατική φάση κυτταρίνη, πολυαμίδιο και συνήθως silica gel, ενώ ως σύστημα ανάπτυξης μίγματα διαφόρων διαλυτών. Για την επιλογή των καταλληλότερων από τα παραπάνω, λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα των συστατικών των οποίων επιδιώκεται ο διαχωρισμός. Επειδή ελάχιστες φαινολικές ενώσεις είναι έγχρωμες και επομένως απευθείας ανιχνεύσιμες πάνω στην πλάκα, συνήθως η τελευταία παρατηρείται στο υπεριώδες φως και ψεκάζεται με διάφορα αντιδραστήρια. Η εμφάνιση φθορισμού και χαρακτηριστικών χρώσεων αποτελεί ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά ή και αντιοξειδωτική δράση (Harborne, 1997).

#### 1.8.2.4 Η Μέθοδος CGC-MS

Αντίστοιχα με την υγρή χρωματογραφία, υπάρχει και η αέρια χρωματογραφία, (Gas Chromatography - CGC) όπου ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή αέριου χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια (άζωτο ή ήλιο), υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία, ενώ η στατική φάση αποτελείται από τυριτική ή πηκτική ή στερεό προσροφητικό μέσο που συνιστά τη στερεή ή φέρουσα φάση με μόνιμη επικάλυψη υγρής φάσης (Ανδρικόπουλος, 1999). Με τρόπο ανάλογο της υγρής χρωματογραφίας, τα συστατικά μεταβαίνουν από τον εισαγωγέα στη στήλη και διαχωρίζονται με τη βοήθεια του φέροντος αερίου και της θερμοκρασίας του φούρνου. Επιπρόσθετα, για την αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας ορισμένων ουσιαστικών συχνά απαιτείται παραγωγοποίηση αυτών.

Τα τελευταία χρόνια, ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS), θεωρείται βασικό εργαλείο για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου φυτικών προϊόντων, καθώς είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος» κατάλληλη για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων, από τη CGC. Στην περίπτωση των πολικών φαινολών εφαρμόζονται μέθοδοι παραγωγοποίησης για την αύξηση της πολικότητας και σταθερότητας των ενώσεων. Παράλληλα, σε ότι αφορά την εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry, MS) επιτρέπεται πλέον η ταυτοποίηση πολικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες. Οι Miketova, et. al. (1998) απέδειξαν ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών μπορεί να είναι πολύ ακριβής με υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτρονεκασμό (Liquid Chromatography-electrospray Ionization Mass Spectrometry, LC-ESIMS).

#### 1.8.2.5 Μέθοδος προσδιορισμού της αντοχής των ελαίων στην οξείδωση (Μέθοδος Rancimat)

Η μέθοδος του Metrohm Rancimat αναπτύχθηκε αρχικά από τους Hadorn και Zurcher (1974). Πρόκειται για μια γρήγορη, αυτοματοποιημένη μέθοδο, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό του χρόνου επαγωγής δηλαδή του χρονικού διαστήματος που τα έλαια υφίστανται τις πρώτες αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παραδοχή ότι τα λίπη και τα έλαια συμπεριφέρονται ανάλογα τόσο στις κανονικές συνθήκες όσο και στη γρήγορη επιταχυνόμενη οξείδωση.

Η Μέθοδος Rancimat έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για να προσδιοριστεί η αντοχή των ελαίων στην οξείδωση. Με τη χρήση της συσκευής Rancimat γίνεται γρήγορος, αυτόματος και ακριβής προσδιορισμός του χρόνου επαγωγής ή εισαγωγής (induction time), δηλαδή του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για να προκληθούν οι πρώτες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ελαίων.

Με τη μέθοδο αυτή, μπορεί να αναλυθούν 3 ή 6 δείγματα (ελαίου ή λίπους) ταυτόχρονα. Οι καμπύλες οξείδωσης καταγράφονται συνεχώς σε καταγραφικό χαρτί, με ένα εύρος του καταγραφέα από 0-200  $\mu$  Siemens/cm.

Προκειμένου να επιταχυνθεί η οξειδωτική υποβάθμιση το δείγμα δέχεται σε υψηλή θερμοκρασία ρεύμα αέρα. Η θερμοκρασία της συσκευής μπορεί να ρυθμιστεί από 50-200°C, ενώ η ροή του αέρα μεταξύ 4-25 lt/h.

Η συσκευή Rancimat βασίζει τη λειτουργία της στην αλλαγή της αγωγιμότητας που παρατηρείται σε ειδική φιάλη όπου συγκεντρώνονται τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης των δειγμάτων που εξετάζονται. Τα περισσότερα από τα δευτερογενή πτητικά προϊόντα της οξείδωσης, τα οποία σχηματίζονται, αποτελούνται από μυρμηκικό οξύ.

Τα παραπροϊόντα είναι κυρίως υδροϋπεροξειδία, καρβονυλικά και άλλα πολικά προϊόντα (TPA). Τα πτητικά αυτά προϊόντα μεταβάλλουν την αγωγιμότητα (conductivity) του χώρου (Laubli and Bruttel, 1986), η οποία καταγράφεται αυτόματα, οπότε σχηματίζεται η τυπική καμπύλη οξείδωσης.

Ο χρόνος που αντιστοιχεί στη μέγιστη κλίση των καμπυλών της οξείδωσης σημείο τομής των εφαπτομένων αντιστοιχεί στον χρόνο που χρειάζεται για να συμπληρωθεί το αρχικό στάδιο της οξείδωσης, δηλαδή στο χρόνο επαγωγής (induction time) (Κοντοπρία, Παναγιώτα, 2007).

## 1.9 Σκοπός

Η παρούσα εργασία, είχε σαν σκοπό την ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου μέτρησης των πολυφαινολών ελιάς σε ελαιόλαδο καθώς επίσης και τον εμπλουτισμό του ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς και συγκεκριμένα με υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη και τις αγλυκόνες αυτών ώστε να προκύψει τελικό προϊόν με αυξημένη βιοδραστητικότητα και αυξημένες ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες.

Ο εμπλουτισμός του ελαιολάδου επιτεύχθηκε με προσθήκη πολυφαινολών στο ελαιόλαδο είτε με προσθήκη ενθυλακωμένου παραγώγου πολυφαινολών σε λιποσώματα είτε με προσθήκη πολυφαινολών που εκχυλίστηκαν από ελαιόλαδο και την ενσωμάτωσή τους με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο. Επίσης πραγματοποιήθηκε εκχύλιση πολυφαινολών με φορέα το ίδιο το ελαιόλαδο από φύλλα ελιάς με χρήση υπερήχων σε ελεγχόμενη χαμηλή θερμοκρασία.

Το εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με πολυφαινόλες ελιάς συνδυάζει διατροφικά και ιατρικά οφέλη στην πρόληψη των ασθενειών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

- Για την παραγωγή βιοδραστικών τροφίμων πχ μαργαρίνη με ελαιόλαδο, προϊόντα ζύμης με ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με πολυφαινόλες κλπ
- Για την παραγωγή ενός αντιοξειδωτικού υγρού το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα ανθρώπινης διατροφής.
- Ως πρώτη ύλη για καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας



## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **2. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού πολυφαινόλων και μεθόδων εμπλουτισμού ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς.**

### **2.1 Υλικά και Μέθοδοι**

#### **2.1.1 Υλικά**

##### **❖ Δείγματα ελαιολάδων**

Πρόκειται για ελαιοάδα (παρθένα και εξαιρετικά παρθένα) προερχόμενα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και από διαφορετικές πηγές.

Ως επι των πλείστων επρόκειτο για ελαιοάδα που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θεσσαλίας (νομός Λάρισας, νομός Μαγνησίας) αλλά και από άλλα μέρη της Ελλάδας όπως την Κρήτη (νομός Χανίων), από την Μακεδονία (νομός Καβάλας) και από την Πελοπόννησο (νομός Μεσσηνίας, νομός Αχαΐας, νομός Ηλείας, νομός Αργολίδας).

Τα ελαιοάδα προέρχονταν από διαφορετικές πηγές:

##### **α) Εμπορικά ελαιοάδα**

Ελαιοάδα τυποποιημένα που αγοράστηκαν από το σούπερ μάρκετ.

##### **β) Ελαιοάδα χύμα από παραγωγούς**

Ελαιοάδα χύμα που συγκεντρώθηκαν από παραγωγούς από διαφορετικά μέρη της Ελλάδος.

##### **γ) Ελαιοάδα από το ελαιοτριβείο μετά το decanter (φυγοκεντρικός διαχωριστής) και μετά τον τελικό διαχωρισμό (2<sup>η</sup> φυγοκέντριση).**

##### **δ) Ελαιοάδα που παράχθηκαν με την τεχνική της Ψυχρής έκθλιψης**

Λάδι ψυχρής έκθλιψης: πρόκειται για το ελαιοάδα που κατά το στάδιο της μάλαξής του η θερμοκρασία διατηρείται κάτω των 25-27 °C. Η διαδικασία παραγωγής αυτού του λαδιού είναι περισσότερο χρονοβόρα και δύσκολη, αλλά το παραγόμενο λάδι διατηρεί ανέπαφα πολλά από τα πολύτιμα θρεπτικά συστατικά του ελαιολάδου. Οι πολυφαινόλες πάνω από τους 28 βαθμούς γίνονται πιο υδατοδιαλυτές και φεύγουν με τα υδατικά απόβλητα του ελαιοτριβείου.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά οι κωδικοί των ελαιολάδων και η προέλευσή τους (Πίνακας XII).

**Πίνακας XII. Κωδικοί και προέλευση ελαιολάδων, προερχόμενα από διαφορετικές πηγές, που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των πολυφαινολών καθώς και για τις μεθόδους εμπλουτισμού.**

α/α Δειγμάτων	Κωδικός Δείγματος	Προέλευση
Τα δείγματα αυτά συγκεντρώθηκαν από την περιοχή του Ν. Λαρίσας και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πολυφαινολών τους.		
1	1	Ψυχρής έκθλιψης
2	2	Ψυχρής έκθλιψης
3	3	Ψυχρής έκθλιψης
4	4	Ψυχρής έκθλιψης
5	5	Ψυχρής έκθλιψης
6	6	Ψυχρής έκθλιψης
7	7	Ψυχρής έκθλιψης
8	8	Ψυχρής έκθλιψης
9	9	Ψυχρής έκθλιψης
10	10	Ψυχρής έκθλιψης
11	A	Μετά το decanter
12	A1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό
13	B	Μετά το decanter
14	B1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό
15	Γ	Μετά το decanter
16	Γ1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό
17	Δ	Μετά το decanter
18	Δ1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό
19	E	Μετά το decanter
20	E1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό
Τα δείγματα αυτά συγκεντρώθηκαν από την περιοχή του Ν. Λάρισας και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πολυφαινολών τους.		
21	1	Χύμα από παραγωγό (Κουρέτας)
22	2	Χύμα από παραγωγό (Κουρέτας)
23	3	Χύμα από παραγωγό (Κουρέτας)
24	4	Χύμα από παραγωγό (Κουρέτας)
25	5	Χύμα από παραγωγό (Κουρέτας)

26	6	Χύμα από παραγωγό (Κουρέτας)
27	7	Χύμα από παραγωγό (ν. Λαρίσης)
28	8	Χύμα από παραγωγό (ν. Χανίων)
Τα δείγματα αυτά συγκεντρώθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πολυφαινολών τους. Πρόκειται για χύμα ελαιόλαδα διαφόρων παραγωγών καθώς και για εμπορικά ελαιόλαδα από σούπερ μάρκετ.		
29	1	Εμπορικό ελαιόλαδο (Αρχαϊκά)
30	2	Εμπορικό ελαιόλαδο (Αίγλη)
31	3	Εμπορικό ελαιόλαδο ι (Xenia)
32	4	Εμπορικό ελαιόλαδο (Ελαιών)
33	5	Χύμα από παραγωγό (ν. Μεσσηνίας)
34	6	Χύμα από παραγωγό (ν. Λάρισας)
35	7	Χύμα από παραγωγό (ν. Αργολίδας)
36	8	Χύμα από παραγωγό (ν. Λάρισας)
37	9	Χύμα από παραγωγό (ν. Λάρισας)
38	10	Χύμα από παραγωγό (ν. Καβάλας)
39	11	Χύμα από παραγωγό (ν. Μαγνησίας)
40	12	Χύμα από παραγωγό (ν. Μαγνησίας)
Τα δείγματα αυτά συγκεντρώθηκαν από την περιοχή Αγιάς ν. Λάρισας και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πολυφαινολών τους. Πρόκειται για χύμα ελαιόλαδα παραγωγών ψυχρής έκθλιψης.		
41	1	Ψυχρής έκθλιψης (Χύμα από παραγωγό Αγιάς ν. Λάρισας)
42	2	Ψυχρής έκθλιψης (Χύμα από παραγωγό Αγιάς ν. Λάρισας )
43	3	Ψυχρής έκθλιψης (Χύμα από παραγωγό Αγιάς ν. Λάρισας )
44	4	Ψυχρής έκθλιψης (Χύμα από παραγωγό Αγιάς ν. Λάρισας )
45	5	Ψυχρής έκθλιψης (Χύμα από Συρακούλης, Αγιάς ν. Λάρισας )
46	6	Ψυχρής έκθλιψης (Χύμα από Συρακούλης, Αγιάς ν. Λάρισας )
Πρόκειται για ελαιόλαδο από παραγωγό του νομού Λάρισας που χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο εμπλουτισμού με χρήση οργανικού διαλύτη.		

47	1α	Χύμα ελαιόλαδο από παραγωγό (Χ. Παπαιωαννου)
48	Εα	Δείγμα 1α μετά τον εμπλουτισμό
Πρόκειται για ελαιόλαδο από παραγωγό του νομού Λάρισας που χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό με χρήση φύλλων ελιάς.		
49	A1	Χύμα από παραγωγό (Χ. Παπαιωάννου)
50	B1	Δείγμα ελαιολάδου (A1) με προσθήκη φύλλων ελιάς (1%)
51	Γ1	Δείγμα ελαιολάδου (A1) με προσθήκη φύλλων ελιάς (5%)
52	Δ1	Δείγμα ελαιολάδου (A1) με προσθήκη φύλλων ελιάς (10%)
Πρόκειται για δείγμα ελαιόλαδο από παραγωγό του νομού Λάρισας που χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό με προσθήκη υγρής και ενθυλακωμένης πολυφαινόλης σε λιποσώματα λεκιθίνης.		
53	Δ0	Αρχικό δείγμα ελαιολάδου (Μάρτυρας)
54	Δ1	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη υγρής πολυφαινόλης (200ppm)
55	Δ2	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη υγρής πολυφαινόλης (500 ppm)
56	Δ3	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη υγρής πολυφαινόλης (1000ppm)
57	Δ4	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη ενθυλακωμένης πολυφαινόλης σε λιπόσωμα λεκιθίνης (1000ppm)

#### ❖ Φύλλα ελιάς

Φύλλα ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή πολυφαινολών ελιάς και για την ενίσχυση του ελαιολάδου.

#### ❖ Υγρή πολυφαινόλη

Χρησιμοποιήθηκε υγρή πολυφαινόλη ελιάς (**MEDOLIVA®**) που προμηθεύτηκε από την εταιρία 'PolyHealth A.E.'.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Υγρό φυσικό αντιοξειδωτικό, που παράγεται από την υδατώδη φάση του ελαιοκάρπου, με υψηλή περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη οι οποίες είναι γνωστές ως τα πιο αποτελεσματικά φυσικά αντιοξειδωτικά με πλήθος επιστημονικών αναφορών για την συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία που οφείλεται στη δράση τους ως επιβραδυντές ελεύθερων ριζών. Το προϊόν περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες καφεϊκού και κουμαρικού οξέος, κατεχίνες και ανθοκυάνες. Η περιεκτικότητα το

προϊόντος MEDOLIVA ® σε υδροξυτυροσόλη / τυροσόλη είναι 30 φορές περισσότερο από ότι στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.

## ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

- Χρώμα: σκούρο μαύρο
- Ιξώδες: Χαμηλό
- Συνολικά στερεά: 10% w / w ελάχιστο ή 24 BRIX
- Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου
- Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης  
pH:  $4,5 \pm 0,1$

## ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες: 6.000 ppm min. επί υγρού ή 6% (60.000 ppm) επί ξηρού (μέθοδος Folin-Ciocalteu).

Το προϊόν έχει αναλυθεί με HPLC και περιέχει τις ακόλουθες πολυφαινόλες:

- A) Υδροξυτυροσόλη (500ppm)
- B) Τυροσόλη (554ppm)
- Γ) Καφεϊκό οξύ (20ppm)
- Δ) ρ-κουμαρικό οξύ (42ppm)
- E) Ανθοκυάνες και κατεχίνες

### ❖ *Λιπόφιλους φορείς (λεκιθίνη σόγιας)*

Χρησιμοποιήθηκε λεκιθίνη σόγιας (LECICO) που προμηθεύτηκε από την εταιρία 'PolyHealth A.E.'.

## 2.1.2 Διαλύτες και Αντιδραστήρια

### ❖ *Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας της εταιρίας SIGMA- ALDRICH*

### ❖ *Εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας της εταιρίας SIGMA- ALDRICH*

### ❖ *Αντιδραστήριο F.C (Folin-Ciocalteu) της εταιρίας SIGMA- ALDRICH*

### ❖ *Ανδρο ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )*

### ❖ *Γαλλικό οξύ (3,4,5 trυδροξυβενζοϊκό οξύ)*



### 2.1.3 Όργανα- Εξοπλισμός

#### ❖ *Αναλυτικός ζυγός (KERN)*

Χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (KERN) του εργαστηρίου Μηχανικής Μεταποίησης του τμήματος Μηχανικής τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

#### ❖ *Συσκευή στροβιλίσματος (Vortex)*

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Vortex του εργαστηρίου Μηχανικής Μεταποίησης του τμήματος Μηχανικής τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

#### ❖ *Φυγόκεντρος (HERMLE Z323K)*

Χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



**Εικόνα XVIII. Φυγόκεντρος (HERMLE Z323K) που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των δειγμάτων Λαδιού**

#### ❖ *Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού –υπεριώδους (Εικόνα XIX)*

Χρησιμοποιήθηκε το Φασματοφωτόμετρο UV-VIS του εργαστηρίου του τμήματος Μηχανικής τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας.



**Εικόνα XIX. Φασματοφωτόμετρο UV-VIS**

❖ *Συσκευή λυοφιλίωσης (Freeze Dryer), CoolSaf (SCANVAC).*

Για την κρυογενική ταχεία απομάκρυνση του διαλύτη μεθανόλης από το δείγμα λαδιού χρησιμοποιήθηκε η συσκευή λυοφιλίωσης (Freeze Dryer) του εργαστηρίου του τμήματος Μηχανικής τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας.



**Εικόνα XX. Συσκευή λυοφιλίωσης (Freeze Dryer)**

❖ *Συσκευή ακίδας υπερήχων (Εικόνα XXI).*

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ακίδας υπερήχων του εργαστηρίου του τμήματος Μηχανικής τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας.



**Εικόνα XXI. Συσκευή Ακίδας Ηπερήχων**

❖ *Συσκευή προσδιορισμού οξειδωτικής σταθερότητας (RANCIMAT) (Εικόνα XXII).*

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή RANCIMAT της εταιρίας MINEPBA A.E.



**Εικόνα XXII. Συσκευή Rancimat**

- ❖ *Μαγνητικός αναδευτήρας*
- ❖ *Υδατόλουτρο*
- ❖ *Χρονόμετρο*
- ❖ *Αυτόματες πιπέτες*
- ❖ *Φίλτρα (0,20μm), Falcon (15ml), Σύριγγες (5ml)*

## 2.1.4 Μέθοδοι

### 2.1.4.1. Μέθοδος Μέτρησης Ολικών Πολυφαινολών σε δείγματα ελαιολάδων.

Η μέτρηση των ολικών πολυφαινολών στα ελαιόλαδα της παρούσας διπλωματικής εργασίας στηρίχθηκε στην μέθοδο που αναφέρεται στην βιβλιογραφία (Baiano A. et al, 2007) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των πολυφαινολών, χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu και μέτρηση στα 725nm.

#### **Αναλυτική πορεία:**

#### **A. Δημιουργία Πρότυπης Καμπύλης Βαθμονόμησης**

1. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γαλλικού οξέος και ανθρακικού νατρίου. Η προετοιμασία των παραπάνω διαλυμάτων έγινε ως εξής:

- *Διάλυμα γαλλικού οξέως:*

Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml διαλύθηκαν 0,5g γαλλικού οξέος σε 10 ml μεθανόλης και συμπληρώθηκε η ογκομετρική φιάλη με αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου.

- *Διάλυμα ανθρακικού νατρίου:*

Σε ποτήρι ζέσεως 1L διαλύθηκαν 200 gr άνυδρου ανθρακικού νατρίου και προστέθηκαν 800 ml απιονισμένου νερού. Το μίγμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε θερμαντική πλάκα, αναδεύτηκε και ήρθε σε βρασμό μέχρι να διαλυθεί όλο το άνυδρο ανθρακικό νάτριο. Μετά την ψύξη προστέθηκαν μερικοί κρύσταλλοι άνυδρου ανθρακικού νατρίου και το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για ένα 24 ώρο. Μετά τις 24 ώρες ακολούθησε διήθηση, μεταφορά του διηθήματος σε ογκομετρική φιάλη του 1 L και προσθήκη αποσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου.

2. Παρασκευάστηκαν προτύπα διαλύματα γαλλικού οξέος για την πραγματοποίηση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Σε 5 ογκομετρικές φιάλες των 50 ml τοποθετήθηκαν 2ml, 1ml, 0,5ml, 0,25, και 0,1 ml από το παραπάνω διάλυμα γαλλικού οξέως με αποτέλεσμα να προκύψουν πέντε διαλύματα των 200ppm, 100ppm, 50ppm, 25ppm και 10ppm αντίστοιχα (Εικόνα XXIII).



**Εικόνα XXIII. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων.**

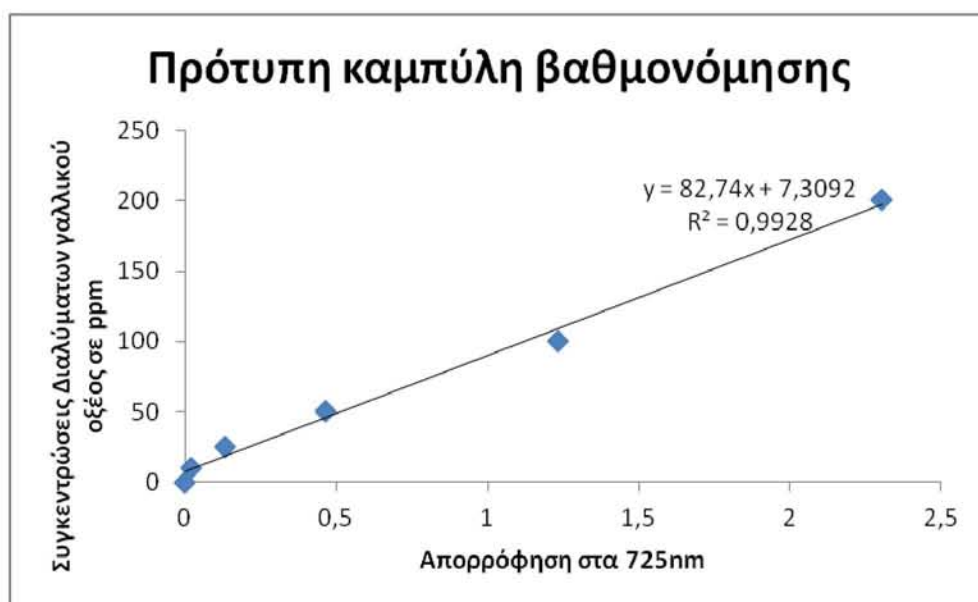
3. Στην συνέχεια σε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 1ml από κάθε μία ογκομετρική φιάλη (No: 1, 2, 3, 4, 5) και προστέθηκαν 5ml Folin–Ciocalteu (20%). Μετά την ανάδευση των δειγμάτων σε συσκευή vortex και την πάροδο 5 λεπτών ακολούθησε προσθήκη 1ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
4. Ακολούθησε ανάδευση στην συσκευή vortex.
5. Έπειτα οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 1 ώρα (Εικόνα XXIV).



**Εικόνα XXIV. Δείγματα μετά την παραμονή τους για 1 ώρα στο σκοτάδι.**

6. Στην συνέχεια ακολούθησε εκ νέου ανάδευση στην συσκευή vortex και λήψη της απορρόφησης σε μήκος κύματος 725nm σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS έναντι τυφλού δείγματος που αντί για πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος είχε απεσταγμένο νερό.

7. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με την βοήθεια των διαλυμάτων του γαλλικού οξέος (Διάγραμμα ΙΙΙ).



**Διάγραμμα ΙΙΙ. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης**

#### **Β. Προετοιμασία & Ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδου**

1. Το δείγμα ελαιολάδου (2,5ml) αναμίχθηκε σε vortex με 2,5ml εξάνιο και 2,5 ml υδατικού δια/τος μεθανόλης (70 μεθανόλη/30 νερό) για 10 λεπτά. (Εικόνα XXV)



**Εικόνα XXV. Ανάμιξη δείγματος ελαιολάδου με εξάνιο και δια/μα μεθανόλης.**

2. Το σύνολο φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 4800 στροφές ανά λεπτό (rpm) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Εικόνα XXVI)



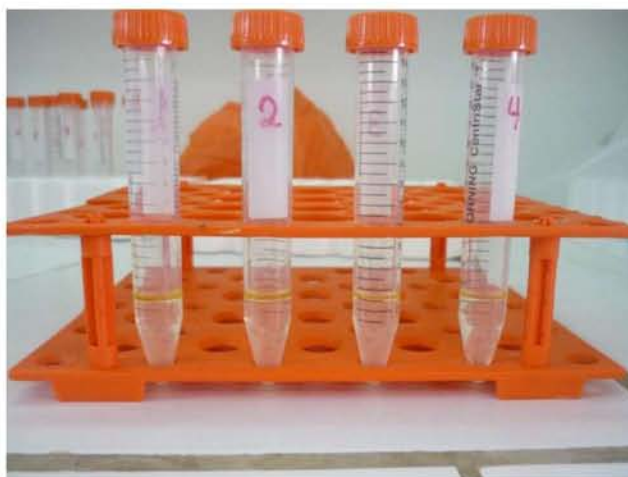


**Εικόνα XXVI.** Φυγοκέντριση δειγμάτων ελαιολάδου με εξάνιο και δια/μα μεθανόλης για διαχωρισμό φάσεων.

3. Έπειτα λήφθηκε η υδροαλκοολική φάση (όπου είχαν διαλυθεί οι πολυφαινόλες), η κάτω φάση δηλαδή (Εικόνα XXVII) και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στα 4800 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



**Εικόνα XXVII.** Δείγματα ελαιολάδου με εξάνιο και διαλ/μα μεθανόλης, μετά την φυγοκέντριση, διαχωρισμένα σε δυο φάσεις.



**Εικόνα XXVIII.** Παραλαβή υδροαλκοολικής φάσης, όπου περιέχονται οι φαινόλες.

4. Μετά την δεύτερη φυγοκέντριση λήφθηκε με σύριγγα (με φίλτρο) το διαυγές δείγμα, χωρίς ίχνος λαδιού, σε ένα falcon (Εικόνα XXIX) και συμπληρώθηκε το εκχύλισμα με διάλυμα μεθανόλης (70:30) μέχρι όγκου 10 ml (Εικόνα XXX).



**Εικόνα XXIX. Λήψη υδροαλκολικής φάσης με σύριγγα με φίλτρο.**



**Εικόνα XXX. Αραίωση εκχυλίσματος με διάλυμα μεθανόλης μέχρι τα 10ml.**

5. Στην συνέχεια 1ml από την υδατομεθανολική στιβάδα (εκχύλισμα λαδιού) μεταφέρθηκε σε falcon των 10 ml και προστέθηκαν 5ml αντιδραστηρίου 20% folin–Ciocalteu.
6. Ανακατεύθηκε το δείγμα καλά σε συσκευή vortex και μετά από 5 λεπτά προστέθηκε 1ml κορεσμένου διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Εικόνα XXXI).



**Εικόνα XXXI. Δείγματα εκχυλισμάτων λαδιού μετά την προσθήκη αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu και διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).**

7. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 1 ώρα στο σκοτάδι.
8. Ακολούθησε εκ νέου ανάδευση στην συσκευή vortex.
9. Πραγματοποιήθηκε λήψη της απορρόφησης σε μήκος κύματος 725nm σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS.
10. Από την καμπύλη βαθμονόμησης, οι ενδείξεις του φασματοφωτομέτρου (απορροφήσεις) που μετρήθηκαν στα αναλυθέντα δείγματα ελαιολάδου, μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πολυφαινολών στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/l εκχυλίσματος).
11. Υπολογίσθηκε κατόπιν η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm) αφού είχαν ληφθεί υπόψιν και οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Για την μέτρηση των ολικών πολυφαινολών των δειγμάτων ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων για να διαπιστωθεί ο ικανοποιητικός αριθμός εκχυλίσεων που έπρεπε να υλοποιηθεί, η ακρίβεια καθώς και η επαναληψιμότητά της μεθόδου.

Συγκεκριμένα ο βέλτιστος αριθμός εκχυλίσεων είναι 1 ενώ πειραματικά χρησιμοποιήθηκαν μέχρι και 3 εκχυλίσεις. Επίσης ελέγχθηκε και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων όταν η παραλαβή της υδροαλκολικής φάσης γίνεται με φίλτρο και βρέθηκε ότι η χρήση φίλτρου παρουσιάζει ακρίβεια της τάξης 90-110%.



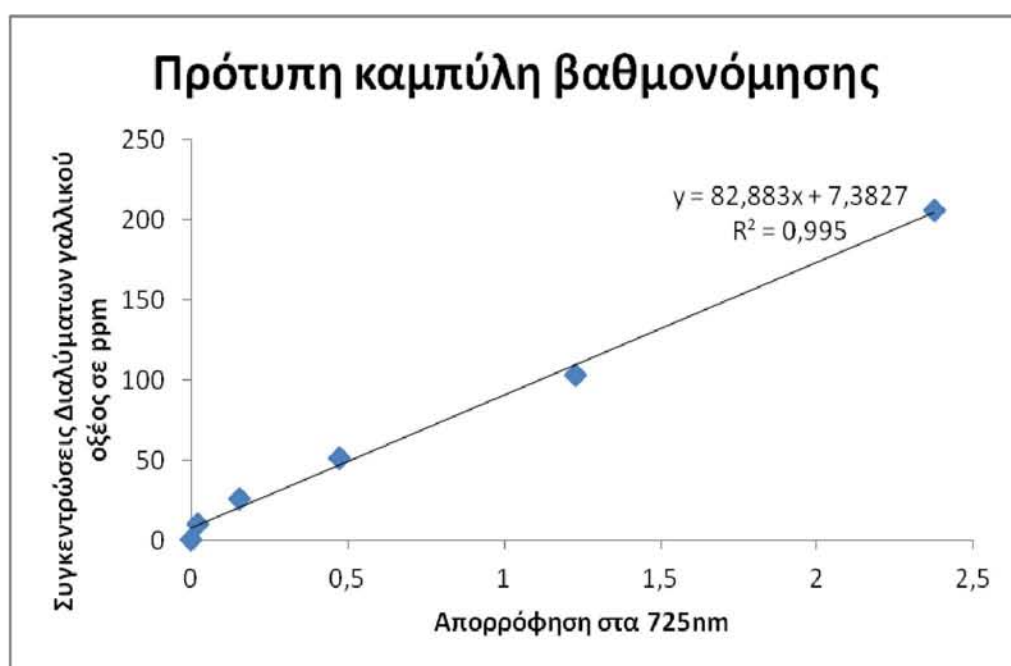
## ✓ Προσδιορισμός αριθμού εκχυλίσεων

### Πειραματική πορεία:

Σε ένα δείγμα λαδιού πραγματοποιήθηκαν 3 εκχυλίσεις για να διαπιστωθεί πόσος είναι ο ικανοποιητικός αριθμός εκχυλίσεων ώστε να συγκεντρωθεί το μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών του ελαιολάδου.

Σε κάθε ένα από τα τρία εκχυλίσματα έγινε προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών.

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε σύμφωνα με τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνεται στο διάγραμμα IV.



**Διάγραμμα IV. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης**

Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι:  $y = 82,883X + 7,3827$  και ο συντελεστής συσχέτισης ( $R$ ) είναι 0,995.

Οι απορροφήσεις των τριών εκχυλισμάτων που βρέθηκαν φαίνονται στον πίνακα XIII. Από την καμπύλη βαθμονόμησης, οι απορροφήσεις αυτές μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πολυφαινολών στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/l εκχύλισματος).

Κατόπιν λαμβάνοντας υπόψιν τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν, υπολογίστηκε η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm).

**Πίνακας XIII. Αποτελέσματα απορροφήσεων και ολικών πολυφαινολών σε κάθε μία από τις τρεις εκχυλίσσεις.**

Εκχυλίσσεις	Απορόφηση στα 765 nm	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lt εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
1 <sup>η</sup> εκχύλιση	0,466	46,006	184,024
2 <sup>η</sup> εκχύλιση	0,069	13,101	52,406
3 <sup>η</sup> εκχύλιση	0,032	10,035	40,140

**Προέκυψε το συμπέρασμα ότι μία εκχύλιση είναι αρκετή. Με την πρώτη εκχύλιση παραλαμβάνεται το μεγαλύτερο ποσοστό των πολυφαινολών. Επίσης στις επόμενες δύο εκχυλίσσεις η συγκέντρωση πολυφαινολών που λαμβάνεται είναι η ίδια. Αυτό σημαίνει ότι οι πολυφαινόλες έχουν παραληφθεί με την πρώτη εκχύλιση.**

#### ✓ **Έλεγχος Επαναληψιμότητας**

**Η πιστότητα (precision) – Επαναληψιμότητα (repeatability) και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)**

Η **πιστότητα (precision)** μιας μεθόδου εκφράζεται με την **επαναληψιμότητα (repeatability)** και την **αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)**. Η επαναληψιμότητα μαζί με την ακρίβεια, αποτελούν τους σημαντικότερους παραμέτρους που καθορίζουν την αξιοπιστία μιας μεθόδου.

Ως **επαναληψιμότητα** ορίζεται η δυνατότητα της μεθόδου να δίνει το ίδιο αποτέλεσμα σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου δείγματος και είναι συνώνυμο με τη συνέπεια (consistency). Μας δείχνει το βαθμό διασποράς των τιμών της ανάλυσης κατά τον προσδιορισμό μιας ουσίας με μία συγκεκριμένη μέθοδο. Η επαναληψιμότητα μας δείχνει το μέγεθος των τυχαίων λαθών που μπορεί να οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες, όπως διαφορετικά όργανα μέτρησης, αντιδραστήρια διαφορετικής προέλευσης, αλλαγή προσωπικού στην εργαστηριακή ανάλυση, κα.

**Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)** είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων ελέγχων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή, διαφορετικοί αναλυτές, ίδιο ή διαφορετικά εργαστήρια, κα. Διακρίνεται σε ενδο - εργαστηριακή και δι - εργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα.

Ο ποσοτικός τρόπος έκφρασης της επαναληψιμότητας είναι ο προσδιορισμός της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation). Ουσιαστικά η τυπική απόκλιση εκφράζει την έλλειψη αναπαραγωγικότητας (imprecision), δηλαδή την έλλειψη σύμπτωσης μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Οι όροι τυχαίο λάθος, τυπική απόκλιση και έλλειψη επαναληψιμότητας είναι ταυτόσημοι. Όσο μεγαλύτερη η τυπική απόκλιση τόσο

μεγαλύτερο το τυχαίο λάθος. Όσο μικρότερη η τυπική απόκλιση τόσο καλύτερη είναι η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση (SD), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) ή συντελεστής μεταβλητότητας ή διακύμανσης (coefficient of variation, CV), που είναι καθαρός αριθμός.

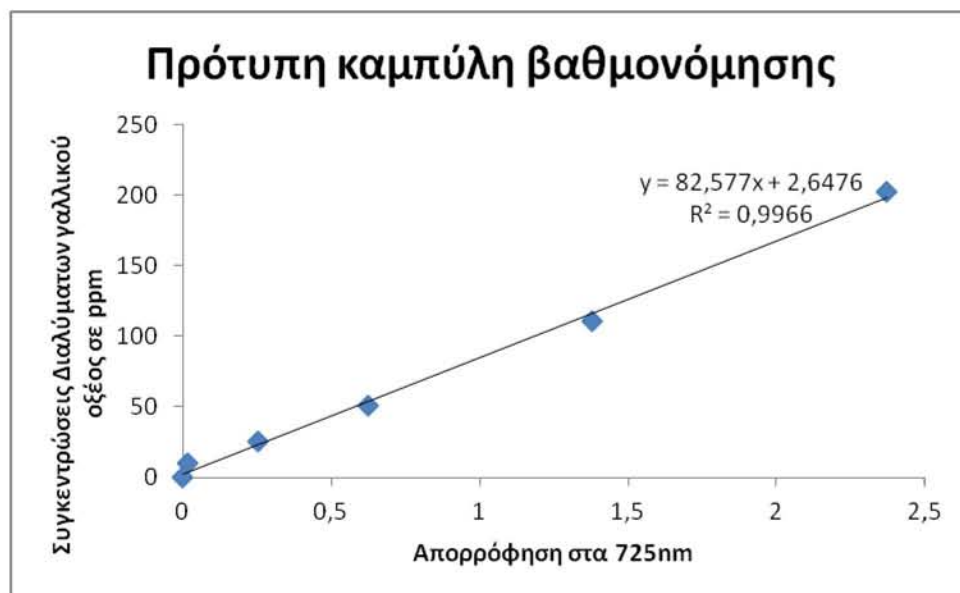
Η διακύμανση (variance) είναι ένας όρος, ο οποίος ισούται με το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης.

Ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV), που εκφράζεται σε ποσοστό και υπολογίζεται από τη σχέση:  $CV \% = SD / \bar{x} \cdot 100$ . Ο συντελεστής μεταβλητότητας δίνει το μέτρο της αναλυτικής διακύμανσης των μετρήσεων, δηλαδή τη σταθερή απόκλιση προς τη μέση τιμή των μετρήσεων, επί της εκατό. (elqa.teilar.gr)

### Πειραματική πορεία:

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας μετρήθηκε δείγμα ελαιολάδου 10 φορές, την ίδια μέρα, στις ίδιες συνθήκες.

Παρασκευάστηκε την ίδια μέρα η καμπύλη βαθμονόμησης η οποία φαίνεται στο διάγραμμα V.



Διάγραμμα V. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:  $y = 82,577X + 2,6476$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) είναι 0,9966.

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων ελαιολάδου φαίνονται στον πίνακα XIV. Από την καμπύλη βαθμονόμησης, οι απορροφήσεις αυτές μετατράπηκαν σε συγκεντρώση πολυφαινολών στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/l εκχυλίσματος).



Κατόπιν λαμβάνοντας υπόψιν τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν, υπολογίστηκε η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm) (πίνακας XIV).

**Πίνακας XIV. Αποτελέσματα απορροφήσεων και ολικών πολυφαινολών των επαναληπτικών δειγμάτων ελαιολάδου.**

Δείγματα ελαιολάδου	Απορόφηση στα 765 nm	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lit εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
A1	0,65	56,25	225
A2	0,67	58,50	234
A3	0,63	55,00	220
A4	0,64	56,00	224
A5	0,63	54,75	219
A6	0,62	54,50	218
A7	0,66	57,25	229
A8	0,63	54,75	219
A9	0,62	54,25	217
A10	0,64	55,75	223

Μέσος όρος (MO)= 222,9 και τυπική απόκλιση (SD) = 5,34

**Προέκυψε το συμπέρασμα ότι στα αποτελέσματα υπήρχε επαναληψιμότητα εφόσον η τυπική απόκλιση είναι μικρότερη από 10% .** (Commission Decision, 2002)

#### ✓ **Έλεγχος ακρίβειας**

Η **ακρίβεια** μας δείχνει το βαθμό της απόκλισης του αποτελέσματος ενός προσδιορισμού από τη πραγματική ή αληθή τιμή (true ή correct) της ουσίας που υπάρχει στο δείγμα ή με άλλα λόγια τον βαθμό ταύτισης της προσδιοριζόμενης και της πραγματικής τιμής. Όσο πιο μικρή η απόκλιση τόσο πιο μεγάλη η ακρίβεια.

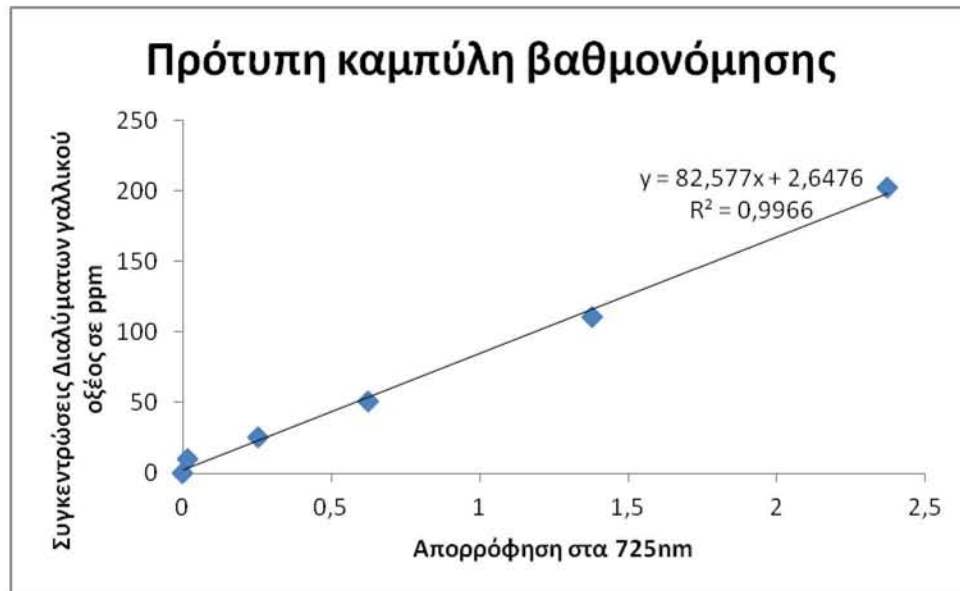
Η ακρίβεια αποτελεί κριτήριο για τα λεγόμενα «συστηματικά λάθη», δηλαδή λάθη που οφείλονται στα όργανα μέτρησης, στα αντιδραστήρια, κ.α.

Η ακρίβεια μπορεί να προσδιοριστεί με ποικίλους τρόπους. Ένας εξ' αυτών είναι ο προσδιορισμός της διαφοράς (d) μεταξύ της πραγματικής (μ) και της προσδιοριζόμενης (x) και της σχετικής απόκλισης (R). ( $d = \mu - x$ ,  $R = (d / \mu) \cdot 100$ ). (elqa.teilar.gr)

### Πειραματική πορεία:

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου σε δείγμα λαδιού (σπορέλαιο) προστέθηκε γαλλικό οξύ γνωστής συγκέντρωσης (100ppm και 150ppm). Πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση και προσδιορίστηκε στο εκχύλισμα η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο Διάγραμμα VI.



Διάγραμμα VI. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:  $y = 82,577X + 2,6476$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) είναι 0,9966.

Από την καμπύλη βαθμονόμησης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίστηκε η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lit εκχυλίσματος).

Κατόπιν λαμβάνοντας υπόψιν τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν, υπολογίστηκε η συγκέντρωση (ppm) στα αρχικά δείγματα. (Πίνακας XV)

**Πίνακας XV. Αποτελέσματα συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος για έλεγχο της ακρίβειας.**

Θεωρητική συγκέντρωση σε ppm	Μετρηθήσα συγκέντρωση σε ppm	Ανάκτηση (Recovery %)
100	95,479	95,5
150	141,637	94,4

Η ανάκτηση πρέπει να είναι μεταξύ των τιμών 90-110% (Commission Decision 2002)

**Οπότε η μέθοδος έχει ακρίβεια.**

## 2.1.4.2. Μέθοδοι εμπλουτισμού ελαιολάδου με πολυφαινόλες ελιάς

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις παρακάτω πρωτότυπες μέθοδοι εμπλουτισμού:

1. Προσθήκη ενθυλακωμένου παραγώγου πολυφαινολών σε λιποσώματα.
2. Εκχύλιση των πολυφαινολών από ελαιόλαδο με χρήση οργανικού διαλύτη και στην συνέχεια ενσωμάτωσή της με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο.
3. Εκχύλιση πολυφαινολών με φορέα το ίδιο το ελαιόλαδο από φύλλα ελιάς με χρήση υπερήχων σε ελεγχόμενη χαμηλή θερμοκρασία.

### **2.1.4.2.1. Εμπλουτισμός ελαίου με προσθήκη ενθυλακωμένου παραγώγου πολυφαινολών σε λιποσώματα λεκιθίνης.**

#### ➤ Αρχή της μεθόδου:

Ο εγκλεισμός (**ενθυλάκωση, encapsulation**) είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται τόσο στη φαρμακευτική βιομηχανία για την μεταφορά φαρμάκων, όσο και στη τεχνολογία τροφίμων κυρίως για τη μεταφορά αρωματικών ενώσεων. Μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί για τον εγκλεισμό λειτουργικών συστατικών, δηλαδή συστατικών που έχουν θετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (πχ πολυφαινολών).

Η εφαρμογή του μικροεγκλεισμού μπορεί να ξεπεράσει τα προβλήματα που προκύπτουν από την ενσωμάτωση των συστατικών αυτών μέσα σε διατροφικά συστήματα, όπως πχ. τη σταδιακή υποβάθμισή τους, χάνοντας έτσι τις ιδιότητές τους ή ακόμη την πιθανότητα να καταστούν επικίνδυνα λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων.

Ακόμη τα συστατικά αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά που βρίσκονται στο τρόφιμο μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους ή αλλάζοντας το χρώμα ή τη γεύση του προϊόντος (Schooyen, 2001).

Με το μικροεγκλεισμό περιβάλλονται μικρά στερεά σωματίδια, υγρά σταγονίδια ή αέρια με μια μορφή καλύμματος (Betrolini et.al.,2001, Schrooyen, et.al, 2001) και ένα υγρό συστατικό μπορεί να μετατραπεί σε στερεή σκόνη.

Οι στόχοι του εγκλεισμού στη χημεία των τροφίμων είναι:

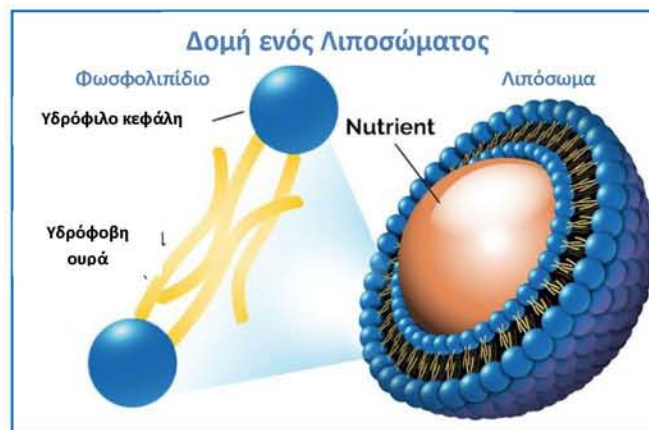
- Ο διαχωρισμός συστατικών
- Η μείωση την τοξικότητας ενός υλικού
- Η αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων ενός υλικού
- Η μείωση της ευφλεκτότητας των υγρών
- Η αύξηση στην διάρκεια αποθήκευσης
- Η επικάλυψη της δυσάρεστης γεύσης συγκεκριμένων συστατικών
- Η μείωση της υποβάθμισης και παραγωγή τοξικών προϊόντων λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων
- Η αύξηση της διαλυτότητας συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο

Στην τεχνολογία του εγκλεισμού το συστατικό που εγκλείεται αναφέρεται ως πυρηνικό υλικό, ενεργή φάση, ή εσωτερική φάση. Το υλικό που περιβάλλει το εγκλεισμένο συστατικό αναφέρεται ως βάση εγκλεισμού, μεταφορέας, κάλυμμα (Gibbs, et.al, 1999).

Οι πιο γνωστές τεχνικές εγκλεισμού είναι:

- spray drying (ξήρανση με ψεκασμό)
- Lyophilization or freeze-drying (λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη)
- spray cooling ή spray chilling (ψύξη με ψεκασμό)
- co-crystallization (συγκρυστάλλωση)
- absorption (απορρόφηση)
- spinning disk (περιστρεφόμενος δίσκος)
- rapid expansion of supercritical solution (ταχεία εκτόνωση υπερκρίσιμου διαλύματος)
- liposome entrapment (εγκλεισμός με λιποσώματα)
- fluidized bed (ρευστοποιημένη κλίνη)
- extrusion (εξώθηση ή εκβολή),
- formation of inclusion complex (σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού) (Szente & Szejtli, 2004) (Πετρωτός Κ., 2011).

Στην παρούσα εργασία η ενθυλάκωση των πολυφαινολών έγινε σε λιποσώματα λεκιθίνης. Η δράση της λεκιθίνης βασίζεται στη δομή του μορίου της, δηλαδή στα φωσφολιπίδια, που χάρη στην «αμφιφιλική» συμπεριφορά τους, το ένα άκρο του μορίου τους (υδρόφιλο), που περιέχει φώσφορο ενωμένο με χολίνη ή ινοσιτόλη, ενώνεται με την υδατική φάση ενώ το άλλο άκρο (λιπόφιλο) αποτελείται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία έλκουν τα λιπαρά συστατικά (εικόνα XXXII). Κατ' αυτόν τον τρόπο η λεκιθίνη ενώνεται με τα μόρια των πολυφαινολών.



Εικόνα XXXII. Δομή λιποσώματος

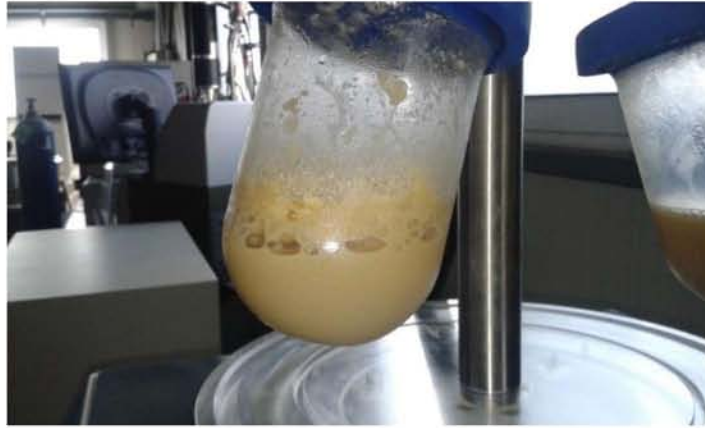
#### ➤ Πειραματική πορεία

- **Βήμα 1<sup>ο</sup>:** Πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση πολυφαινόλης σε λεκιθίνη στο εργαστηριακό freeze dryer του τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας με το εξής τρόπο:

1. Σκόνη λεκιθίνης διαλύθηκε στο νερό



2. Στο διάλυμα αυτό προστέθηκε υγρή πολυφαινόλη (σε αναλογία 1/2 επί των στερεών) και ακολούθησε ανάδευση για δυο ώρες σε ογκομετρικό κύλινδρο και και με την χρήση υπέρηχου με σκοπό την δημιουργία νανοσωματιδίων.
3. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στο Freez Dryer για 24 ώρες (εικόνα XXXIII).



**Εικόνα XXXIII. Ενθηλάκωση πολυφαινολών σε λεκιθίνη.**

4. Παρασκευάστηκε ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λεκιθίνη
- **Βήμα 2<sup>ο</sup>:** Μετά την ολοκλήρωση της ξήρανσης πραγματοποιήθηκε ανάμιξη της σκόνης (λεκιθίνη με πολυφαινόλη) σε ελαιόλαδο σε αναλογίες 200, 500 και 1000 ppm, με σκοπό την αύξηση της αντιοξειδωτικότητάς του (εικόνα XXXIV).

Η ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του υπέρηχου επί συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά.



**Εικόνα XXXIV. Το πρώτο δείγμα από αριστερά προς τα δεξιά είναι το ελαιόλαδο με τα 200 ppm πολυφαινόλης, δίπλα είναι ο μάρτυρας, ακολουθεί το ελαιόλαδο με τα 500 ppm πολυφαινόλης και τέλος είναι το ελαιόλαδο με τα 1000 ppm.**



- **Βήμα 3<sup>ο</sup>:** Δημιουργήθηκαν επίσης και τρία δείγματα ελαιολάδου στα οποία προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρής πολυφαινόλης, χωρίς λεκιθίνη (200ppm, 500ppm, 1000ppm).
- **Βήμα 4<sup>ο</sup>:** Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν στάλθηκαν στην εταιρία MINEPBA Α.Ε. και μετρήθηκαν με τη μέθοδο RANCIMAT για την αντοχή τους στην οξείδωση.

### **Μέθοδος RANCIMAT**

#### **Αρχή της μεθόδου:**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παραδοχή ότι τα λίπη και τα έλαια συμπεριφέρονται ανάλογα τόσο στις κανονικές συνθήκες όσο και στη γρήγορη επιταχυνόμενη οξείδωση. Πρόκειται για μια γρήγορη, αυτοματοποιημένη μέθοδο, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό του χρόνου επαγωγής δηλαδή του χρονικού διαστήματος που τα έλαια υφίστανται τις πρώτες αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Με την χρήση της συσκευής Rancimat προσδιορίζεται με ακρίβεια ο χρόνος επαγωγής, δηλαδή το διάστημα που απαιτείται για να προκληθούν τα πρώτα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

#### **Πειραματική πορεία:**

Για τον καθορισμό της σταθερότητας των δειγμάτων ελαίων στην οξείδωση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Rancimat της εταιρίας MINEPBA Α.Ε.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η ακόλουθη:

1. Αρχικά το όργανο ρυθμίστηκε στην επιθυμητή θερμοκρασία οξείδωσης (120 °C) και αφέθηκε να θερμανθεί.
2. Στη συνέχεια, τα δείγματα ελαίου, σε συγκεκριμένη ποσότητα, τοποθετήθηκαν σε γυάλινο κυλινδρικό σωλήνα αντίδρασης (reaction vessel) ο οποίος τοποθετήθηκε στην ειδική υποδοχή της συσκευής και θερμάνθηκε σε θερμοκρασία 120 °C.
3. Κατόπιν ρυθμίστηκε κατάλληλα η ροή του αέρα που διαβιβάστηκε στα δείγματα ελαίων ώστε να είναι 20lt/h.
4. Με την επίδραση της θερμοκρασίας και του αέρα, τα έλαια άρχισαν να οξειδώνονται και τα πτητικά προϊόντα της οξείδωσης μεταφέρθηκαν από το ρεύμα αέρα και παγιδεύτηκαν μέσα στους σωλήνες υποδοχής (measuring vessel) οι οποίοι περιείχαν 60 ml τρις απεσταγμένο νερό.
5. Οι αλλαγές της αγωγιμότητας, του τρις απεσταγμένου νερού, παρακολουθούνταν και καταγράφονταν από ένα ηλεκτρόδιο που βρισκονταν εμβαπτισμένο σ' αυτό.
6. Η αγωγιμότητα μετρήθηκε και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα.

#### **2.1.4.2.2. Εκχύλιση των πολυφαινόλων από ελαιόλαδο με χρήση οργανικού διαλύτη και στην συνέχεια ενσωμάτωσή τους με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο.**

##### **➤ Αρχή της μεθόδου:**

Η διαδικασία διαχωρισμού της μεθανόλης από το ελαιόλαδο επιτεύχθηκε με την μέθοδο της λυοφιλίωσης (με συσκευή freeze dryer). Η μέθοδος της ξήρανσης των τροφίμων με λυοφιλίωση, συνίσταται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν την εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να παραχθεί το αφυδατωμένο προϊόν.

Το μηχάνημα της λυοφιλίωσης αποτελείται από ένα μεγάλο θάλαμο για κατάψυξη και από μία αντλία κενού για απομάκρυνση της υγρασίας. Η επεξεργασία περιλαμβάνει 4 στάδια:

- 1) Κατάψυξη, ώστε να δημιουργηθούν οι συνθήκες για ξήρανση σε χαμηλή θερμοκρασία,
- 2) Αντλία κενού για να επιτυγχάνεται η εξάτμιση του παγωμένου νερού/διαλύτη χωρίς να περνά από την υγρή φάση, π.χ. εξάχνωση,
- 3) Εφαρμογή θερμότητας για να επιταχυνθεί η εξάχνωση,
- 4) Συμπύκνωση του εξατμισμένου διαλύτη από τον θάλαμο κενού με τη μετατροπή του ξανά σε στερεό. (Πετρωτός Κ, 2010)

Ο διαλύτης στη παρούσα έρευνα ήταν η μεθανόλη. Αυτή έπρεπε να διαχωριστεί (με εξάχνωση) από το δείγμα ώστε τελικά να μείνει το λάδι εμπλουτισμένο με πολυφαινόλες και απαλλαγμένο από την μεθανόλη που προστέθηκε αρχικά.

Η μεθανόλη παραλήφθηκε από ειδική έξοδο της συσκευής την επόμενη μέρα ομοίως σε υγρή μορφή.

##### **➤ Πειραματική πορεία:**

**1<sup>ο</sup> Βήμα:** Ελήφθησαν 60ml ελαιόλαδου και εκχυλίσθηκαν. Συγκεντρώθηκε η υδροαλκοολική φάση όπου περιέχονταν οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου.

**2<sup>ο</sup> Βήμα:** Στην παραπάνω υδροαλκοολική φάση προστέθηκαν 60 ml από το ίδιο δείγμα ελαιολάδου.

**3<sup>ο</sup> Βήμα:** Το διάλυμα που προέκυψε τοποθετήθηκε στο Freeze Dryer του εργαστηρίου (Εικόνα XLIV).

Στο Freeze Dryer εξατμίστηκε η μεθανόλη οπότε προέκυψε ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με πολυφαινόλες και απαλλαγμένο από την μεθανόλη που προστέθηκε αρχικά.

Ακολούθησε η συμπύκνωση της εξατμισμένης μεθανόλης στο θάλαμο κενού. Στη ειδική φιάλη έμεινε το ελαιόλαδο.



**Εικόνα XXXV.** Η Συσκευή Freeze Dryer που χρησιμοποιήθηκε, για την εξάτμιση του διαλύτη (μεθανόλη).

**4<sup>ο</sup> Βήμα:** Έγινε μέτρηση των ολικών πολυφαινολών με την μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα (2.1.4.1).

#### **2.1.4.2.3. Εκχύλιση πολυφαινολών με φορέα το ίδιο το ελαιόλαδο από φύλλα ελιάς με χρήση υπερήχων σε ελεγχόμενη χαμηλή θερμοκρασία.**

##### **➤ Αρχή της μεθόδου:**

Στην εκχύλιση με υπερήχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο διαλύτη, στην προκειμένη περίπτωση φορέας είναι το ίδιο το ελαιόλαδο, στη συσκευή ακίδας υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διεύθυνσης και μεταφοράς, ενώ με την ελεγχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης.

Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. (Kamaljit Vilkhut et al, 2008)

##### **➤ Πειραματική πορεία:**

**1<sup>ο</sup> Βήμα:** Πραγματοποιήθηκε συλλογή φύλλων ελιάς από την περιοχή της Λάρισας. Τα φύλλα ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό βρύσης για να φύγει η σκόνη και σκουπίστηκαν για να απομακρυνθεί η υγρασία. Στην συνέχεια τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά κομμάτια.

**2<sup>ο</sup> Βήμα:** Τα τεμαχισμένα φύλλα ελιάς ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε ελαιόλαδο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις:

- Δείγμα B1: 50 g Ελαιόλαδο και 0,5g φύλλων ελιάς (1%)
- Δείγμα Γ1: 50 g Ελαιόλαδο και 2,5g φύλλων ελιάς (5%)
- Δείγμα Δ1: 50 g Ελαιόλαδο και 5g φύλλων ελιάς (10%) (Εικόνα XXXVI).



**(Εικόνα XXXVI). Δείγμα ελαιολάδου με τεμαχισμένα φύλλα ελιάς (10%)**

**3<sup>ο</sup> Βήμα:** Τα τρία δείγματα ελαιολάδου που προέκυψαν τοποθετήθηκαν στην συσκευή ακίδας υπερήχων για 5 λεπτά.

**4<sup>ο</sup> Βήμα:** Έγινε μέτρηση ολικών πολυφαινολών των εμπλουτισμένων δειγμάτων ελαιολάδου με την μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα (2.1.4.1).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3. Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών

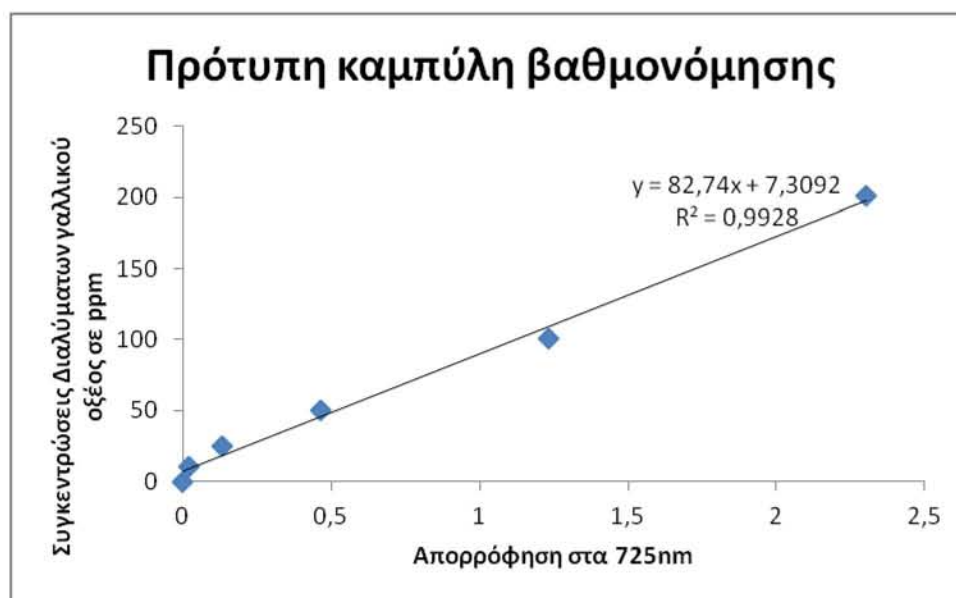
#### 3.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινολών ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης, καθώς και ελαιολάδων μετά το decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό.

Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας XVI).

**Πίνακας XVI. Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων στα 725 nm.**

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος (ppm)	Απορρόφηση στα 725 nm
10,06	0,019
25,15	0,132
50,30	0,465
100,60	1,231
201,20	2,304
Τυφλό	0,000

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο Διάγραμμα VII.



**Διάγραμμα VII. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.**

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς ήταν:  $y = 82,74X + 7,3092$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) ήταν 0,9928.



Η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών που υπολογίστηκε στα ελαιόλαδα φαίνεται στον πίνακα XVII.

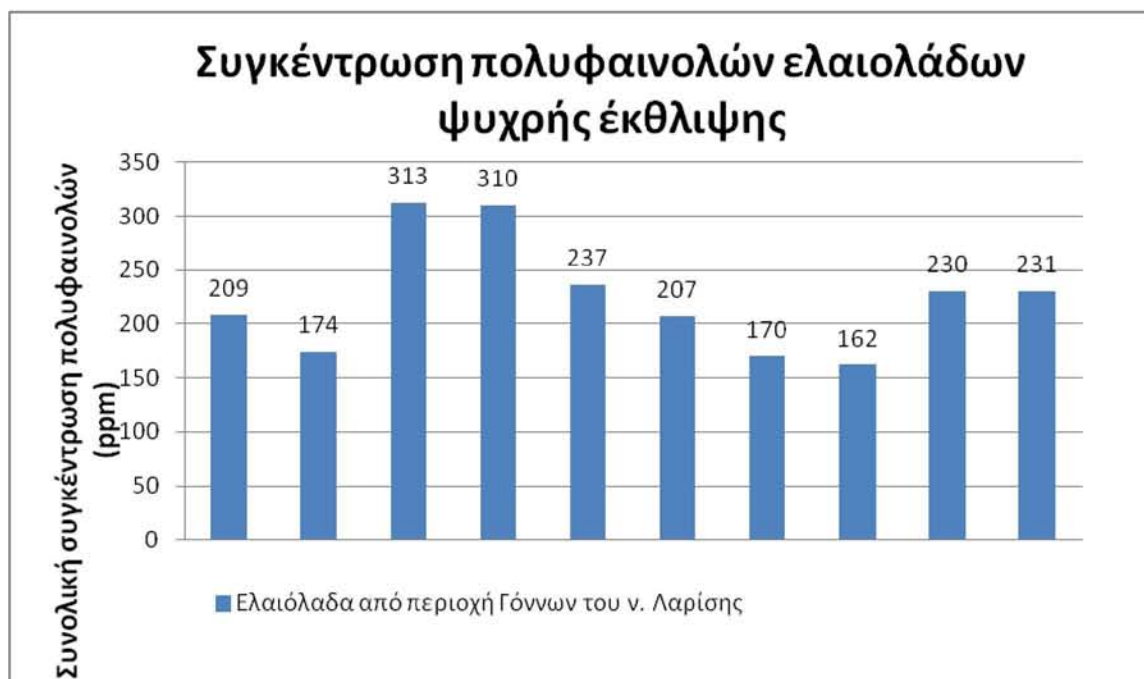
**Πίνακας XVII. Η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στα ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης καθώς και σε ελαιόλαδα μετά το Decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό.**

α/α Δειγμάτων	Κωδικός Δείγματος	Προέλευση	Απορόφηση σε μήκος κύματος 725 nm *	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/l εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
1	1	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,542	52,154	208,617
2	2	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,437	43,466	173,866
3	3	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,857	78,217	312,869
4	4	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,849	77,555	310,221
5	5	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,627	59,187	236,748
6	6	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,538	51,823	207,293
7	7	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,426	42,556	170,225
8	8	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,401	40,487	161,951
9	9	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v. Λάρισας)	0,608	57,615	230,460
10	10	Ψυχρής έκθλιψης (Γόνι v.	0,609	57,697	230,791

		Λάρισας)			
11	A	Μετά το decanter	0,200	23,857	95,428
12	A1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό	0,164	20,878	83,512
13	B	Μετά το decanter	0,154	20,051	80,204
14	B1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό	0,139	18,810	75,240
15	Γ	Μετά το decanter	0,23	26,339	105,356
16	Γ1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό	0,177	21,954	87,816
17	Δ	Μετά το decanter	0,148	19,554	78,216
18	Δ1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό	0,130	18,065	72,26
19	E	Μετά το decanter	0,193	23,278	93,112
20	E1	Μετά τον τελικό διαχωρισμό	0,163	20,795	83,18

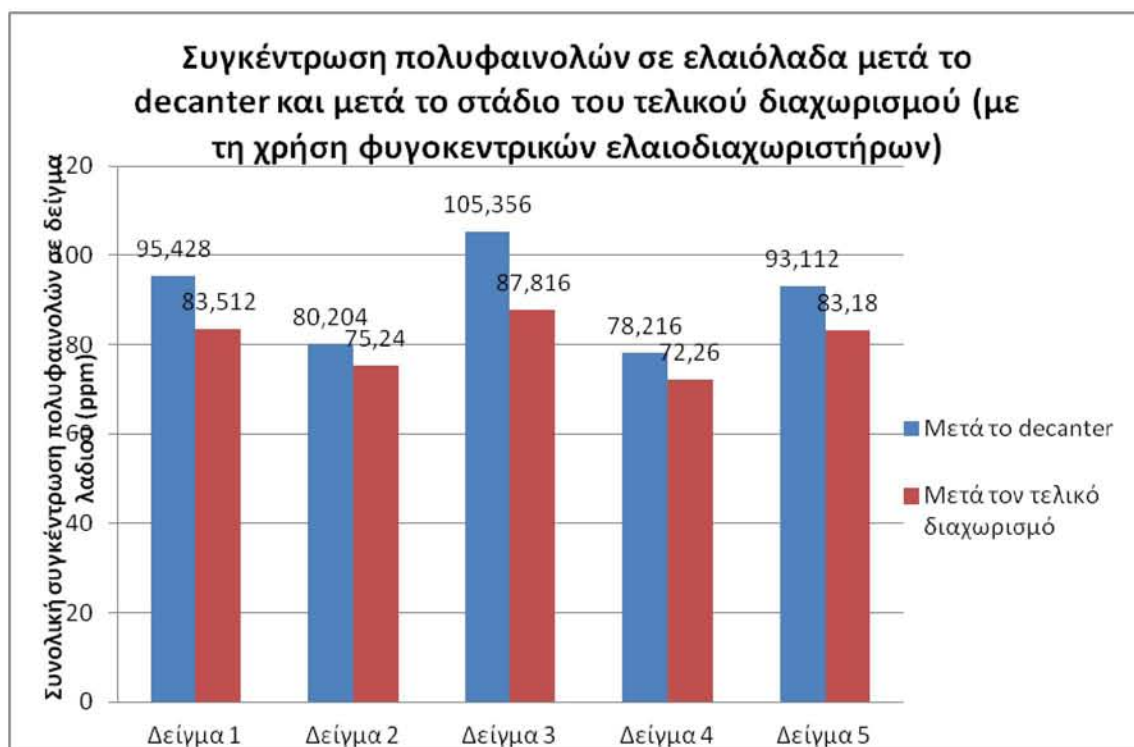
\*Η τιμή της απορρόφησης είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων σε κάθε δείγμα λαδιού.

Παραστατικά η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης που συλλέχθηκαν από την περιοχή των Γόννων του ν. Λάρισας παρουσιάζεται στο διάγραμμα VIII.



**Διάγραμμα VIII. Συγκέντρωση πολυφαινολών σε ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή Γόννων ν. Λάρισας.**

Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ολικών πολυφαινολών σε ελαιόλαδα μετά το decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό παρουσιάζονται στο Διάγραμμα IX.



**Διάγραμμα IX. Συγκέντρωση πολυφαινολών σε ελαιόλαδα μετά το decanter και μετά τον τελικό διαχωρισμό.**

Όπως παρατηρούμε στο Διάγραμμα IX η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών μετά το decanter είναι υψηλότερη από ότι στο τελικό προϊόν, μετά το στάδιο δηλαδή του τελικού διαχωρισμού. Αυτό συμβαίνει γιατί στο στάδιο του τελικού διαχωρισμού του λαδιού, μετά την 2<sup>η</sup> φυγοκέντριση δηλαδή, απομακρύνονται μαζί με το νερό που χρησιμοποιείται και οι υδατοδιαλυτές πολυφαινόλες.

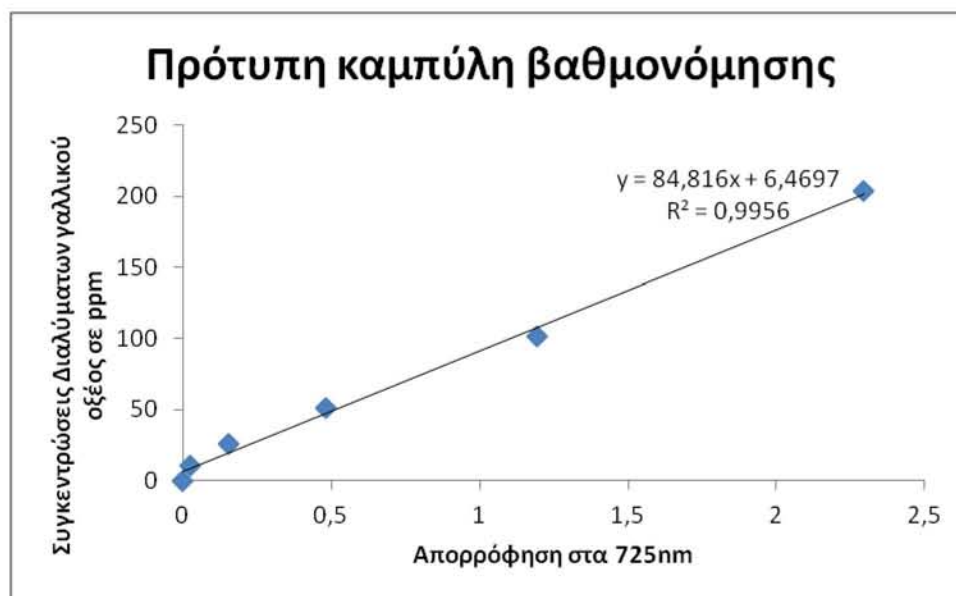
### 3.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού ολικών πολυφαινολών ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης από παραγωγούς της Αγιάς (ν. Λαρίσης).

Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας XVIII).

**Πίνακας XVIII. Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.**

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος (ppm)	Απορρόφηση στα 725 nm
10,16	0,026
25,4	0,156
50,81	0,483
101,62	1,195
203,24	2,295
Τυφλό	0,000

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει φαίνεται στο Διάγραμμα X.



**Διάγραμμα X. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.**

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς ήταν:  $y = 84,816X + 6,4697$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) ήταν 0,9956.

Τα αποτελέσματα των ολικών πολυφαινολών των ελαιολάδων φαίνονται στον πίνακα XIX.

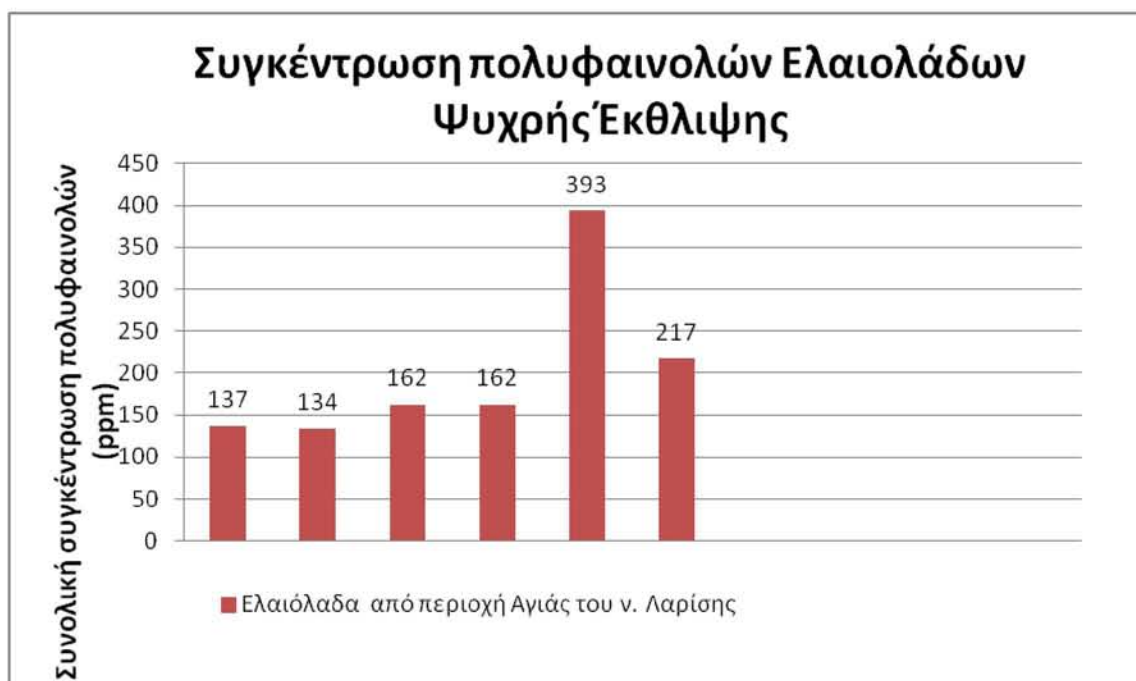


**Πίνακας XIX: Η συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης της Αγιάς ν. Λάρισας**

α/α Δειγμάτων	Κωδικός Δείγματος	Προέλευση	Απορόφηση σε μήκος κύματος 725 nm *	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lit εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
1	1	Ψυχρής έκθλιψης (Αγιάς, ν. Λαρίσης)	0,328	34,260	137,0
2	2	Ψυχρής έκθλιψης (Αγιάς, ν. Λαρίσης)	0,318	33,410	133,670
3	3	Ψυχρής έκθλιψης (Αγιάς, ν. Λαρίσης)	0,402	40,50	162,0
4	4	Ψυχρής έκθλιψης (Αγιάς, ν. Λαρίσης)	0,325	40,501	162,0
5	Συρακούλης Α	Ψυχρής έκθλιψης (Αγιάς, ν. Λαρίσης)	1,088	98,370	393,480
6	Συρακούλης Β	Ψυχρής έκθλιψης (Αγιάς, ν. Λαρίσης)	0,566	54,330	217,340

\*Η τιμή της απορρόφησης είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων στο κάθε δείγμα λαδιού.

Παραστατικά η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης που συλλέχθηκαν από την περιοχή Αγιάς του ν. Λάρισας απεικονίζεται στο Διάγραμμα XI.



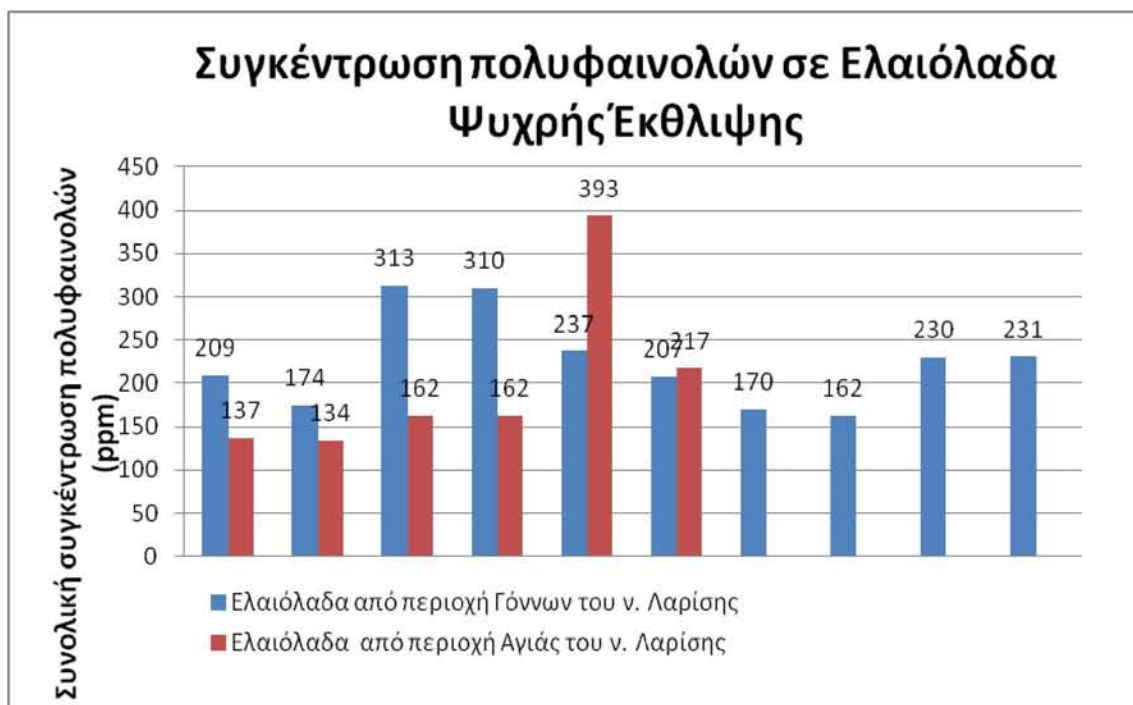
**Διάγραμμα XI. Συγκέντρωση πολυφαινολών ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή Αγιάς του ν. Λάρισας.**

Παρατηρώντας τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή της Αγιάς βλέπουμε ότι το 5<sup>ο</sup> δείγμα παρουσιάζει αρκετά υψηλή συγκέντρωση σε σχέση με τα άλλα λάδια (~400 ppm).

Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι το 6<sup>ο</sup> δείγμα ελαιολάδου παράχθηκε από τα ίδια ελαιόδεντρα που παράχθηκε και το 5<sup>ο</sup> δείγμα με την διαφορά ότι η συλλογή των καρπών έγινε μεταγενέστερα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει τους Cinquanta et al, 1997 και Ryan and Robards, 1998 που αναφέρουν ότι η ποσότητα των πολυφαινολών μεταβάλλεται αναλογα με την εποχή συλλογής των καρπών και την ωριμότητά τους. (Διάγραμμα I).

Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ολικών πολυφαινολών στα ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης που συλλέχθηκαν από την περιοχή Αγιάς και των Γόννων του ν. Λάρισας παρουσιάζονται στο Διάγραμμα XII.

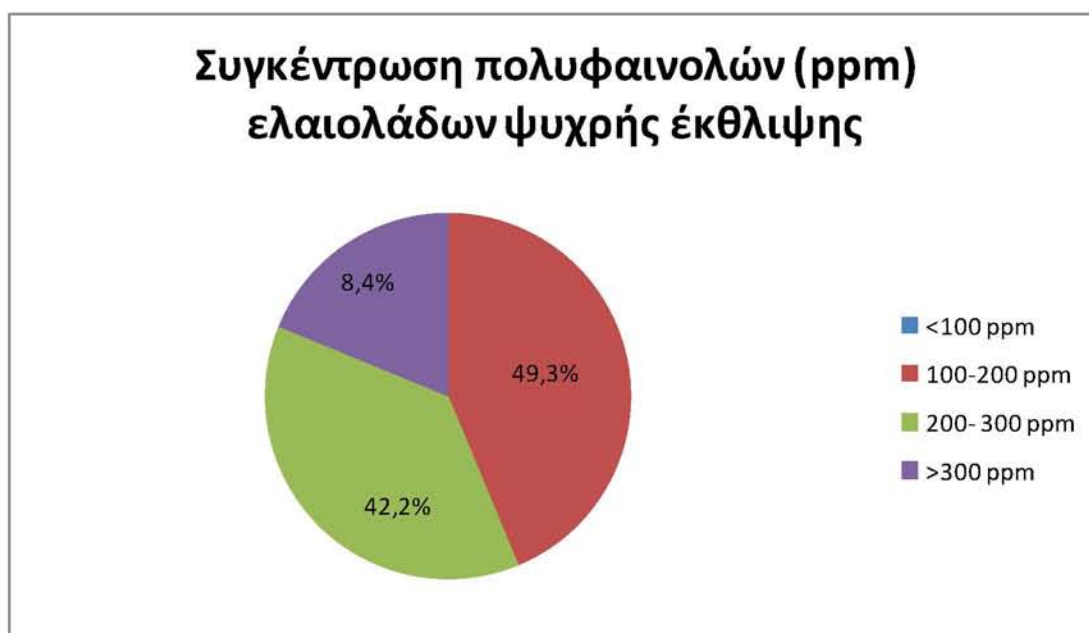




**Διάγραμμα XII. Συγκέντρωση πολυφαινολών σε ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης από την περιοχή Αγιάς και Γόννων του ν. Λάρισας.**

Παρατηρώντας τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης από τις δυο διαφορετικές περιοχές του ν. Λάρισας βλέπουμε ότι την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει το ελαιόλαδο από την περιοχή της Αγιάς.

Το ποσοστό των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης ανάλογα με την συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών τους παρουσιάζεται στο Διάγραμμα XIII.



**Διάγραμμα XIII. Ποσοστό ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης διαφορετικών συγκεντρώσεων πολυφαινολών.**

Παρατηρώντας τα ποσοστά των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης ανάλογα με την συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών τους διαπιστώνουμε ότι τα περισσότερα ελαιόλαδα έχουν συγκέντρωση πολυφαινολών από 100 έως 200 ppm. Το ποσοστό των ελαιολάδων με υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολών (>300ppm) είναι πολύ μικρό.

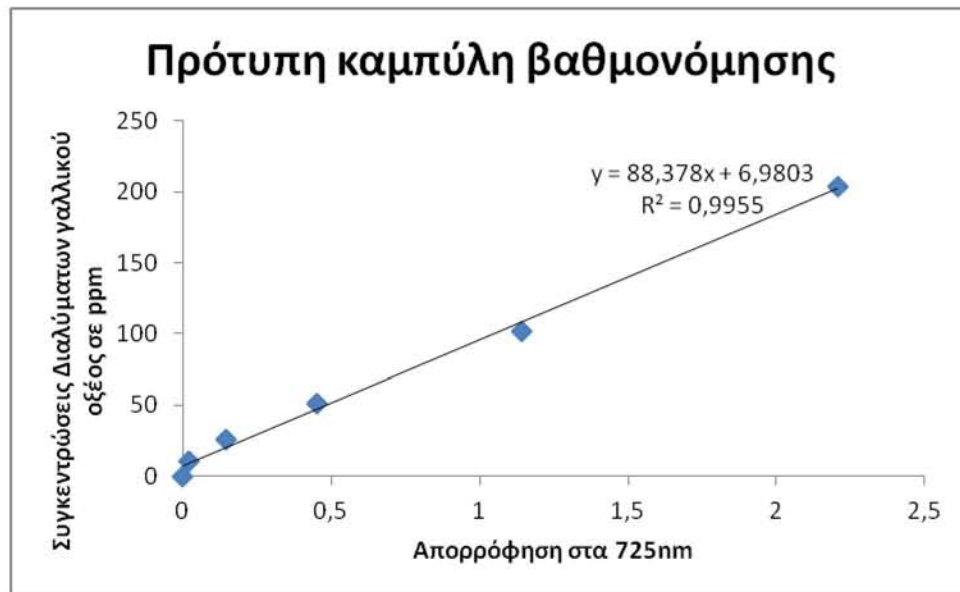
### 3.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινόλων ελαιολάδων από διαφορετικούς παραγωγούς ελαιολάδου.

Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνονται στον πίνακα XX.

**Πίνακας XX. Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος σε μήκος κύματος 725 nm.**

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος (ppm)	Απορρόφηση στα 725 nm
10,19	0,02
25,48	0,146
50,96	0,453
101,92	1,14
203,84	2,207
Τυφλό	0,000

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο Διάγραμμα XIV.



**Διάγραμμα XIV. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.**

Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν:  $y = 88,378X + 6,9803$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) ήταν 0,9955.

Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινόλων των ελαιολάδων φαίνεται στον πίνακα XXI.

**Πίνακας XXI. Η συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών ελαιολάδων**

<b>a/a Δειγμάτων</b>	<b>Κωδικός Δείγματος</b>	<b>Προέλευση</b>	<b>Απορρόφηση στα 725 nm *</b>	<b>Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lι εκχυλίσματος)</b>	<b>Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)</b>
1	1	Χύμα λάδι (Κουρέτας)	0,209	25,451	101,84
2	2	Χύμα λάδι (Κουρέτας)	0,212	25,710	102,84
3	3	Χύμα λάδι (Κουρέτας)	0,192	23,948	95,792
4	4	Χύμα λάδι (Κουρέτας)	0,266	30,488	121,952
5	5	Χύμα λάδι (Κουρέτας)	0,335	36,587	146,348
6	6	Χύμα λάδι (Κουρέτας)	0,348	37,736	150,944
7	Π	Χύμα λάδι (Γκουτσιδής)	0,124	17,939	71,756
8	Κ	Χύμα λάδι (Κάτσουρας), Κρήτη	0,239	28,1026	112,408

\*Η τιμή της απορρόφησης είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων στο κάθε δείγμα ελαιολάδου.

Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ολικών πολυφαινολών των χύμα ελαιολάδων απεικονίζονται στο Διάγραμμα XVI.

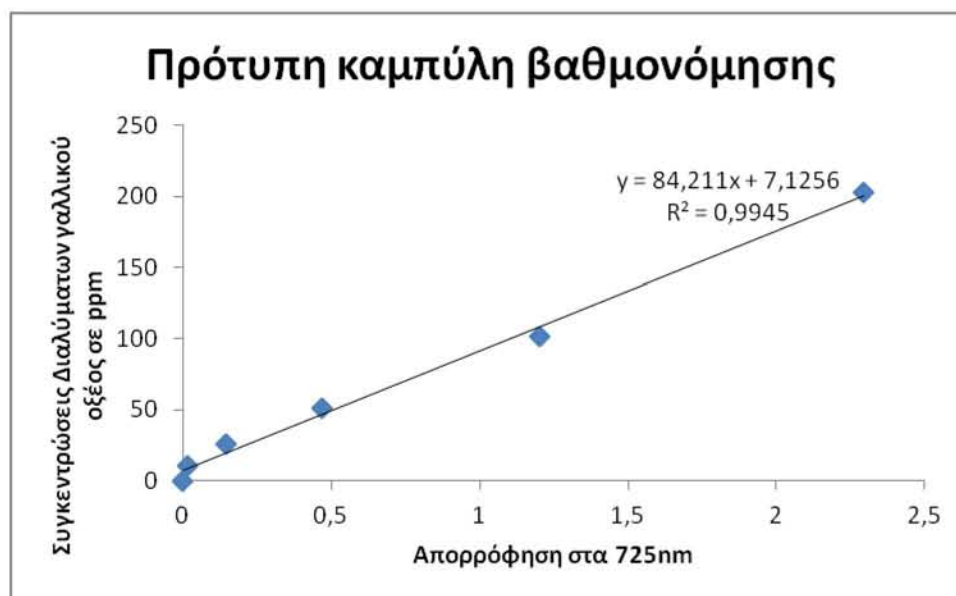
### 3.4 Αποτελέσματα προσδιορισμού ολικών πολυφαινολών χύμα ελαιόλαδων από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και εμπορικών ελαιόλαδων

Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνονται στον πίνακα XXII.

**Πίνακας XXII. Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.**

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος (ppm)	Απορρόφηση στα 725 nm
10,14	0,016
25,35	0,146
50,71	0,469
101,42	1,203
202,84	2,295
Τυφλό	0,000

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο Διάγραμμα XV.



**Διάγραμμα XV. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.**

Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν:  $y = 88,211X + 7,1256$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) ήταν 0,9945.

Έπειτα η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών στα δείγματα ελαιολάδου φαίνεται στον πίνακα XXIII.



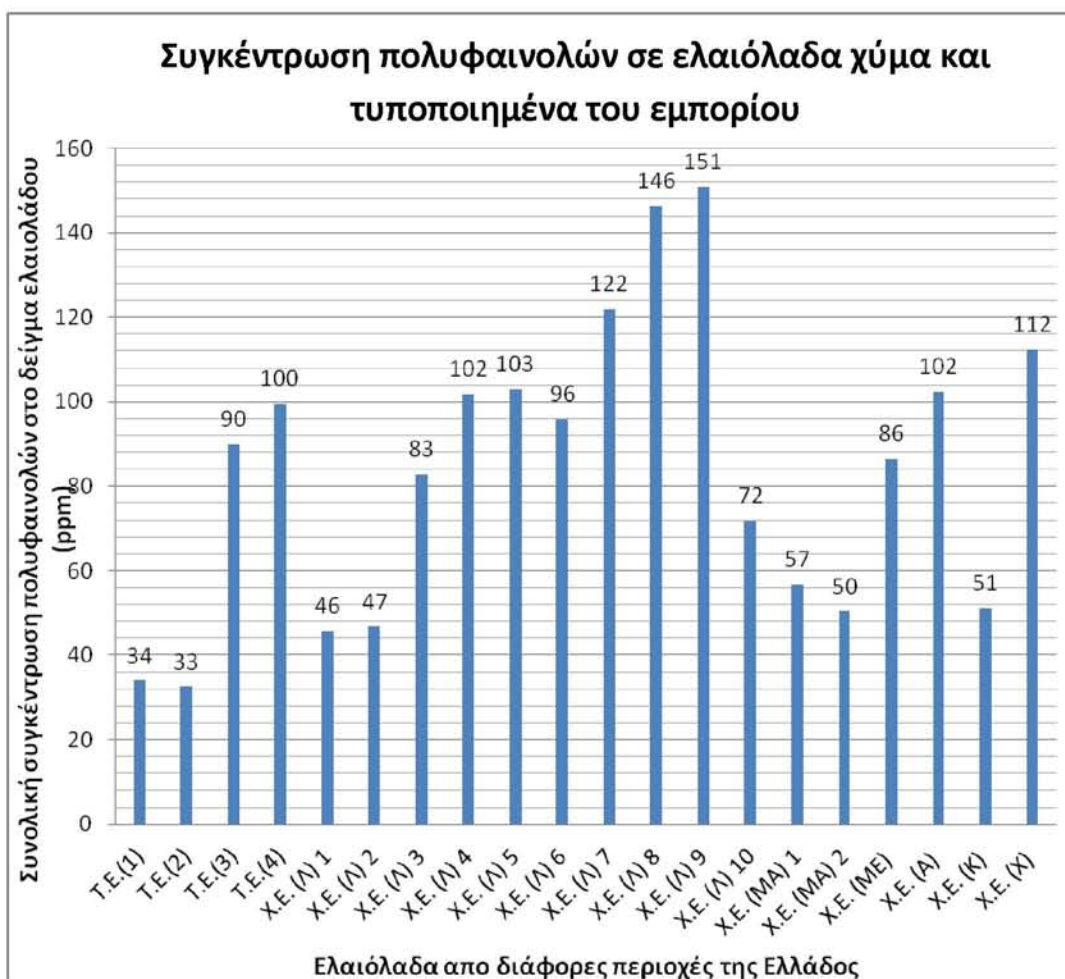
**Πίνακας XXIII: Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών στα χύμα και εμπορικά ελαιόλαδα.**

α/α Δειγμάτων	Κωδικός Δείγματος	Προέλευση	Απορρόφηση στα 725 nm *	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lit εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
1	1	Εμπορικό (Αρχαϊκά)	0,016	8,48	33,92
2	2	Εμπορικό (Αίγλη)	0,012	8,13	32,52
3	3	Εμπορικό (Xenia)	0,182	22,45	89,80
4	4	Εμπορικό (Ελαιών)	0,211	24,89	99,56
5	5	Χύμα από παραγωγό (v. Μεσσηνίας)	0,172	21,61	86,44
6	6	Χύμα από παραγωγό (v. Λάρισας)	0,051	11,42	45,68
7	7	Χύμα από παραγωγό (v. Αργολίδας)	0,219	25,56	102,27
8	8	Χύμα από παραγωγό (v. Λάρισας)	0,054	11,67	46,69
9	9	Χύμα από παραγωγό (v. Λάρισας)	0,161	20,68	82,73
10	10	Χύμα από παραγωγό (v. Καβάλας)	0,067	12,76	51,07
11	11	Χύμα από παραγωγό (v. Μαγνησίας)	0,084	14,20	56,80
12	12	Χύμα από παραγωγό (v. Μαγνησίας)	0,065	12,60	50,40

\*Η τιμή της απορρόφησης είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων στο κάθε δείγμα ελαιόλαδου.

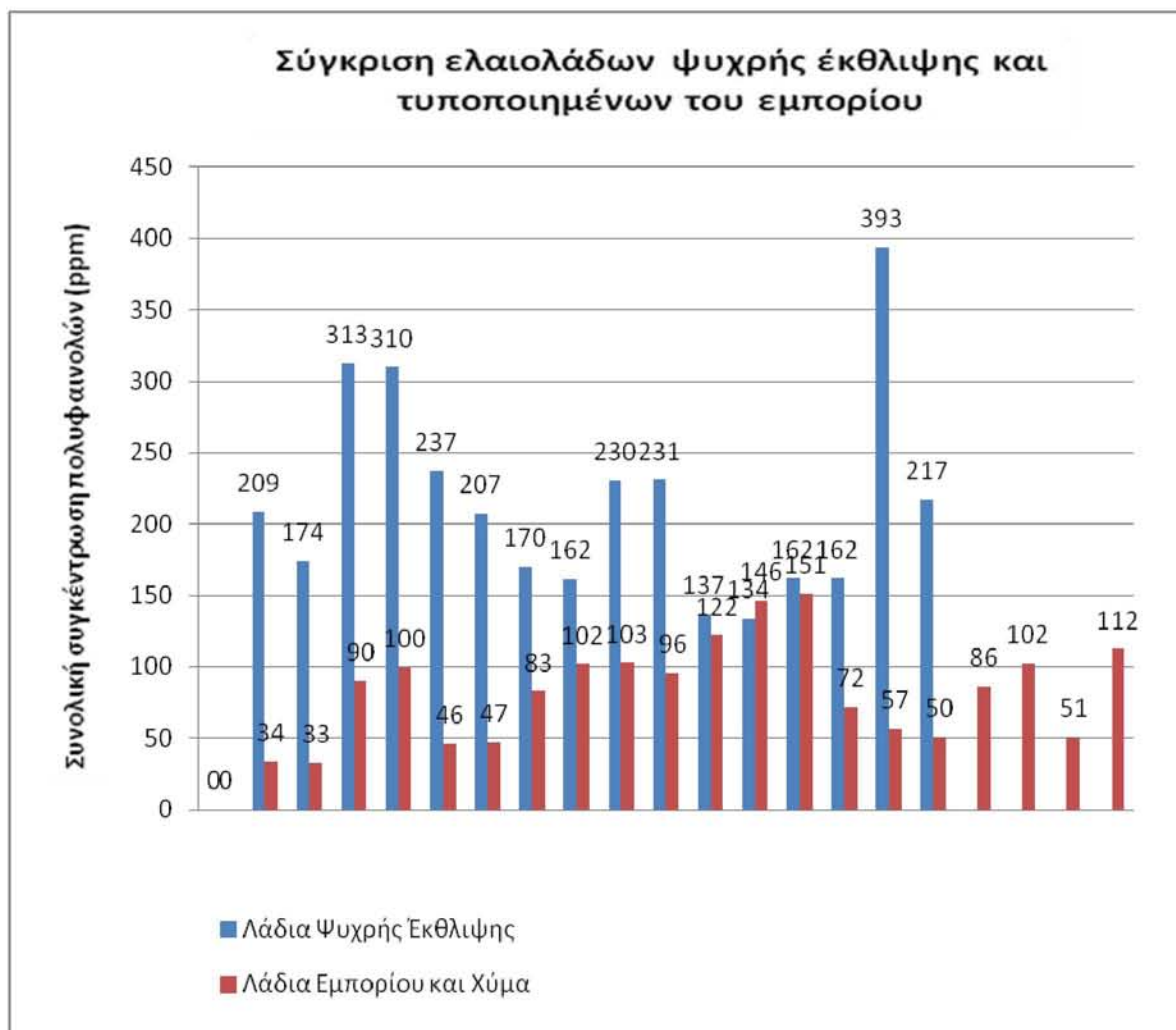
Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ολικών πολυφαινολών των χύμα και εμπορικών ελαιολάδων φαίνονται στο Διάγραμμα XVI.





**Διάγραμμα XVI. Συγκέντρωση πολυφαινολών ελαιολάδων χύμα, από διαφορους παραγωγούς της Ελλάδας, καθώς και ορισμένων τυποποιημένων.**

Στο παρακάτω διάγραμμα XVII γίνεται σύγκριση των ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης με τα τυποποιημένα ελαιόλαδα (θερμής έκθλιψης).



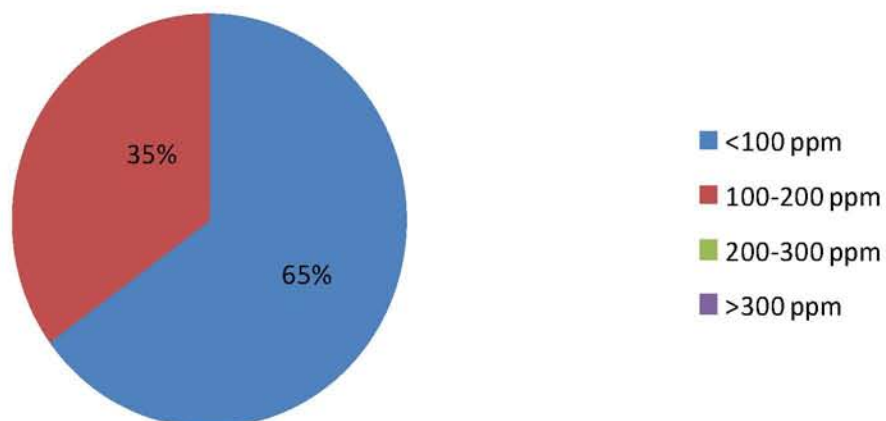
**Διάγραμμα XVII. Συγκέντρωση πολυφαινόλων ελαιολάδων ψυχρής έκθλιψης και τυποποιημένων (θερμής έκθλιψης).**

Παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι και τα τυποποιημένα και τα χύμα ελαιόλαδα παραγωγών έχουν μικρότερη συγκέντρωση ολικών πολυφαινόλων σε σχέση με τα ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης λόγω της θερμής επεξεργασίας που υφίστανται στα ελαιοτριβεία.

Συνεπώς επιβεβαιώνεται ο ισχυρισμός ότι η θερμοκρασία επεξεργασίας του ελαιολάδου παίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα αυτού καθώς επηρεάζει και την περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες. ([www.chem.uoa.gr](http://www.chem.uoa.gr)).

Στο διάγραμμα XVIII παρατηρούμε ότι τα περισσότερα χύμα και τυποποιημένα ελαιόλαδα του εμπορίου έχουν χαμηλό ποσοστό πολυφαινόλων (<100ppm).

## Συγκέντρωση πολυφαινολών (ppm) σε ελαιόλαδα χύμα και τυποποιημένα



**Διάγραμμα XVIII.** Ποσοστό ελαιολάδων (χύμα και τυποποιημένων) ανάλογα με την συγκέντρωσή τους σε πολυφαινόλες.

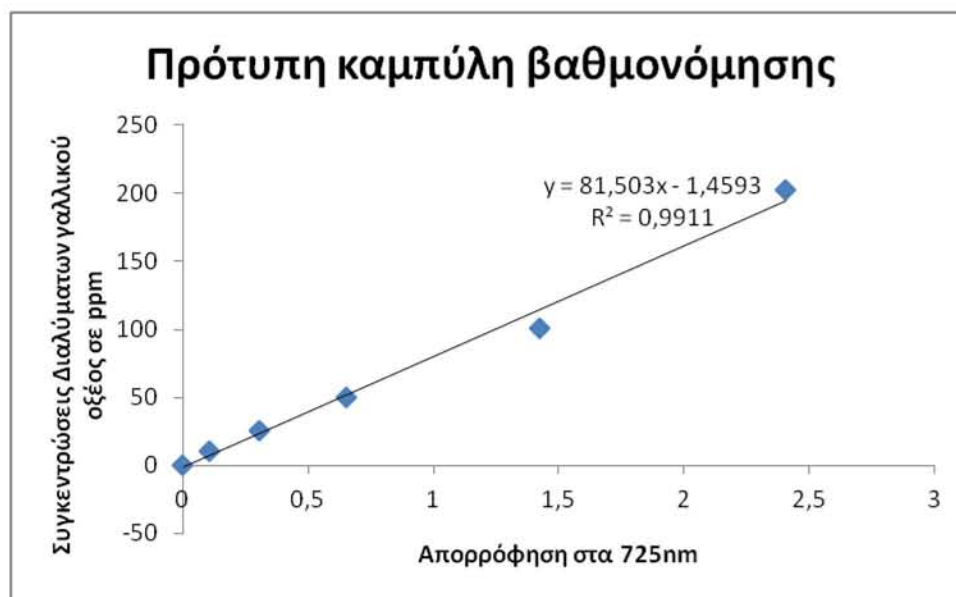
### 3.5 Αποτελέσματα Εκγύλισης των πολυφαινολών από ελαιόλαδο με χρήση οργανικού διαλύτη και στην συνέχεια ενσωμάτωσή της με κρυογονική εξάχνωση με άλλο ελαιόλαδο.

Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνονται στον πίνακα XXIV.

**Πίνακας XXIV: Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.**

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος (ppm)	Απορρόφηση στα 725 nm
10,12	0,104
25,29	0,303
50,58	0,651
101,16	1,424
202,32	2,404
Τυφλό	0,000

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο Διάγραμμα XIX.



**Διάγραμμα XIX. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.**

Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν:  $y = 81,503X - 1,4593$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) ήταν 0,9911.

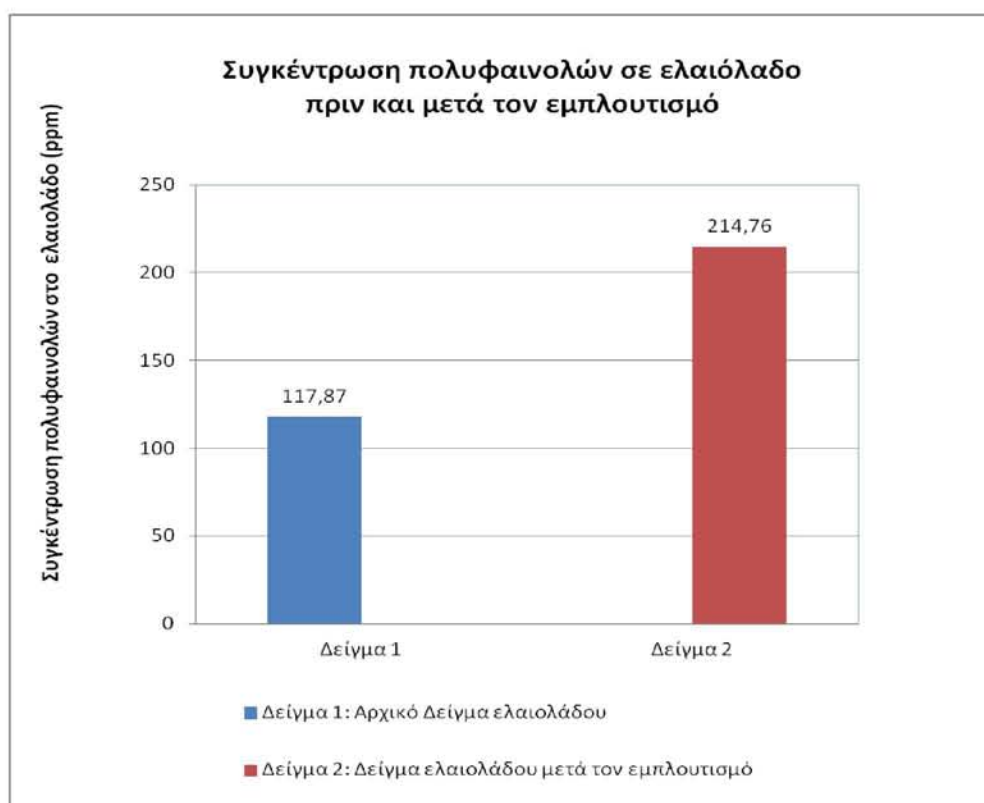
Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό φαίνεται στον πίνακα XXV.

**Πίνακας XXV. Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών σε δείγμα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό.**

α/α Δειγμάτων	Κωδικός Δείγματος	Προέλευση	Απορρόφηση σε μήκος κύματος 725 nm *	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/l εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
1	1α	Δείγμα λαδιού (χύμα από παραγωγό Παπαιωάννου)	0,354	29,467	117,87
2	Εα	Δείγμα λαδιού μετά τον εμπλουτισμό	0,675	53,695	214,76

\*Η τιμή της απορρόφηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων στο κάθε δείγμα ελαιολάδου.

Στο διάγραμμα XX απεικονίζεται η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών (ppm) στο αρχικό δείγμα ελαιολάδου και σε αυτό μετά τον εμπλουτισμό.



**Διάγραμμα XX. Συγκέντρωση πολυφαινολών (ppm) σε δείγμα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό.**

Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών μετά τον εμπλουτισμό σχεδόν διπλασιάστηκε. Συνεπώς η συγκεκριμένη μέθοδος θεωρείται αποτελεσματική.



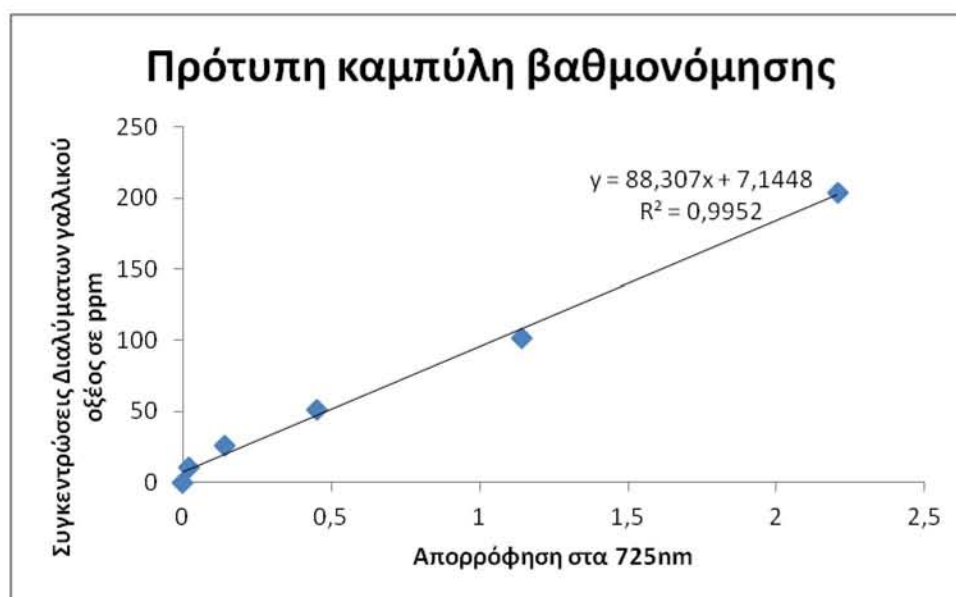
### 3.6 Αποτελέσματα προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών σε ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με φύλλα ελιάς.

Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος φαίνονται στον πίνακα XXVI.

**Πίνακας XXVI:** Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μήκος κύματος 725 nm.

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος (ppm)	Απορρόφηση στα 725 nm
10,19	0,02
25,48	0,14
50,96	0,451
101,92	1,141
203,84	2,206
Τυφλό	0,000

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο Διάγραμμα XXI.



**Διάγραμμα XXI.** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς ήταν:  $y = 88,307X + 7,1448$  και ο συντελεστής συσχέτισης (R) ήταν 0,9952.

Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών στα ελαιόλαδα πριν και μετά τον εμπλουτισμό φαίνεται στον πίνακα XXVII.

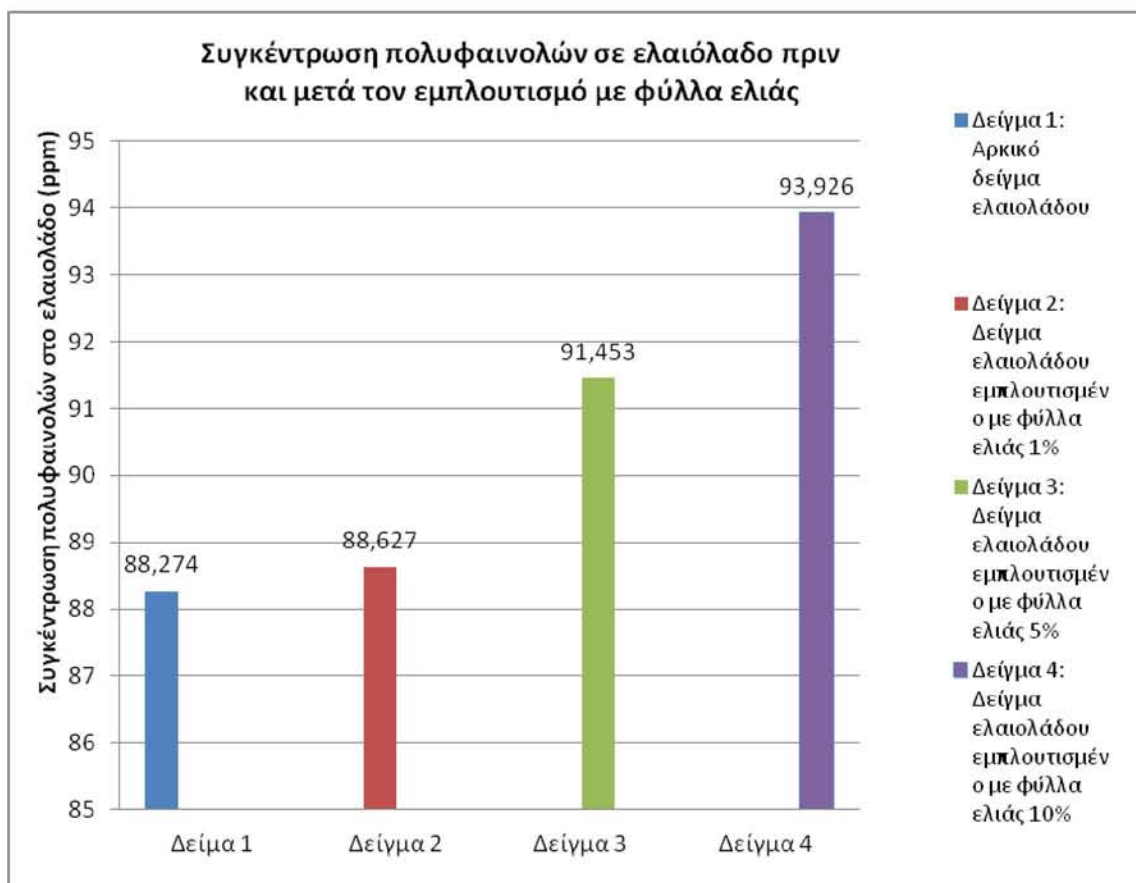


**Πίνακας XXVII. Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στα δείγματα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό με φύλλα ελιάς.**

α/α Δειγμάτων	Κωδικός Δείγματος	Προέλευση	Απορρόφηση στα 765 nm *	Συγκέντρωση στο εκχύλισμα (mg γαλλικού/lit εκχυλίσματος)	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα ελαιολάδου (ppm)
1	A1	Αρχικό δείγμα ελαιολάδου	0,169	22,068	88,274
2	B1	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη φύλλων 1%	0,170	22,156	88,627
3	Γ1	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη φύλλων 5%	0,178	22,863	91,453
4	Δ1	Δείγμα ελαιολάδου με προσθήκη φύλλων 10%	0,185	23,481	93,926

\*Η τιμή της απορρόφησης είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων σε κάθε δείγμα ελαιολάδου.

Στο διάγραμμα XXII φαίνονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πολυφαινολών (ppm) στο δείγμα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό με τα φύλλα ελιάς.



**Διάγραμμα XXII. Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πολυφαινολών (ppm) στο δείγμα ελαιολάδου πριν και μετά τον εμπλουτισμό με τα φύλλα ελιάς (διαφορετικών συγκεντρώσεων).**

Παρατηρούμε ότι η μέθοδος εμπλουτισμού με τα φύλλα ελιάς δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Δεν πραγματοποιήθηκε δηλαδή μεγάλη αύξηση της ποσότητας των ολικών πολυφαινολών (αύξηση 6%).

**3.7 Αποτελέσματα προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών σε δείγμα ελαιολάδου που εμπλουτίστηκε με υγρή πολυφαινόλη καθώς και ενθυλακωμένα παραγώγα πολυφαινολών σε λιποσώματα λεκιθίνης.**

Στον πίνακα XXVIII φαίνονται τα αποτελέσματα της μέτρησης της οξειδωτικής αντοχής των εμπλουτισμένων ελαιολάδων με υγρή πολυφαινόλη καθώς και του ελαιολάδου που εμπλουτίστηκε με ενθυλακωμένα παράγωγα πολυφαινολών σε λιποσώματα λεκιθίνης.

**Πίνακας XXVIII. Αποτελέσματα της μέτρησης της οξειδωτικής αντοχής των εμπλουτισμένων ελαιολάδων με υγρή πολυφαινόλη και με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λιποσώματα λεκιθίνης.**

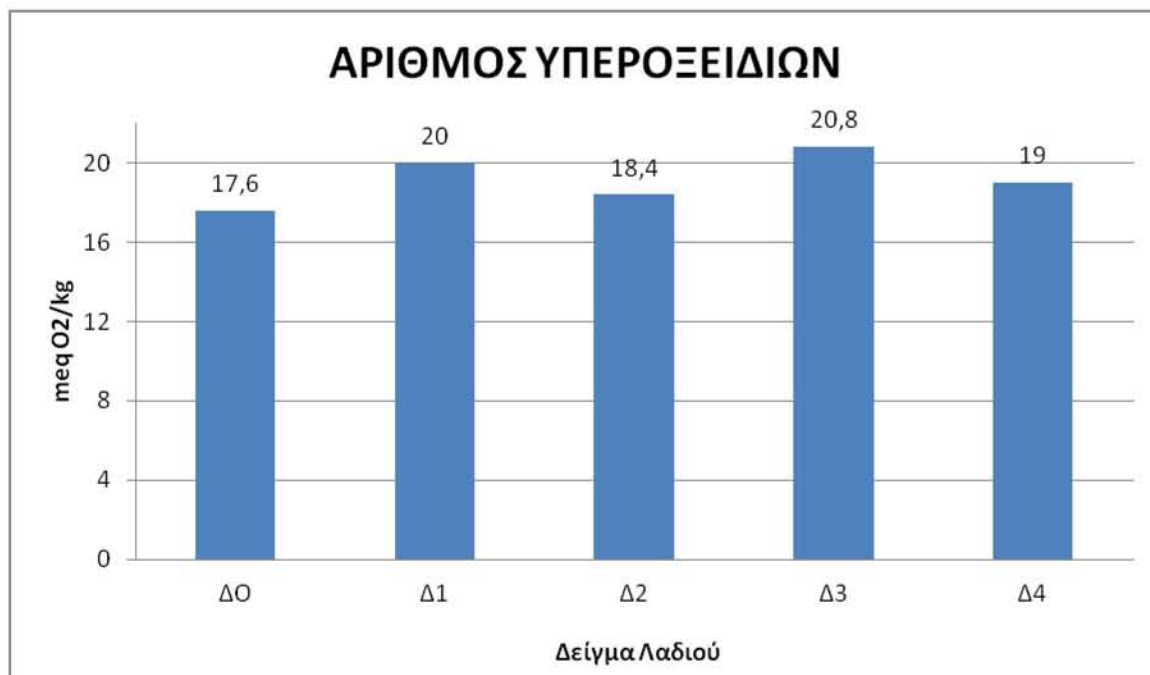
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ: 15/06/2015		
ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ, meq O <sub>2</sub> /kg	RANCIMAT, h (120°C/ΠΑΡΟΧΗ ΑΕΡΑ 20lt/h)
ΔΟ	17,6	6,95
Δ1	20,0	6,09
Δ2	18,4	6,90
Δ3	20,8	6,16
Δ4	19,0	9,77

Από τις τιμές του πίνακα διαπιστώνουμε ότι παρότι η οξειδωτική κατάσταση όλων των δειγμάτων είναι παρόμοια (αυξημένος αριθμός υπεροξειδίων), δεν ισχύει το ίδιο και για την οξειδωτική αντοχή (rancimat). Φαίνεται ότι το δείγμα Δ4 ξεχωρίζει και είναι πιο ανθεκτικό.

Στο διάγραμμα XXIII φαίνεται ο αριθμός των υπεροξειδίων στα εμπλουτισμένα ελαιοάδα.

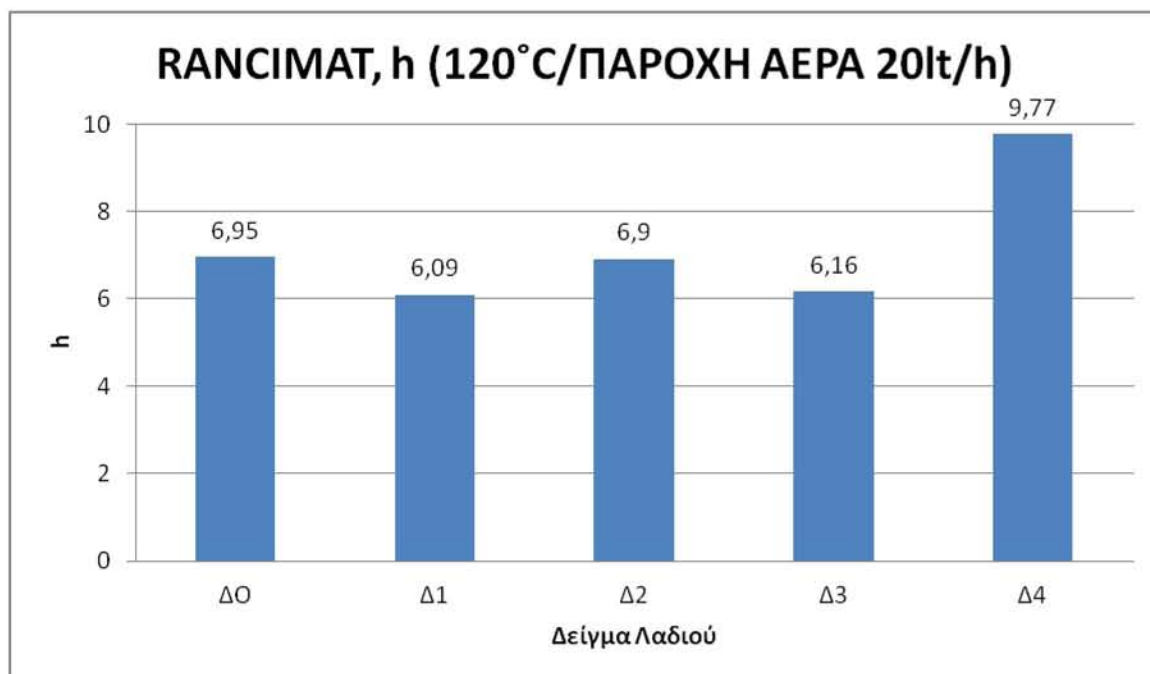
Τα υψηλά υπεροξειδία υποδηλώνουν, ότι το ελαιοάδο έχει υποστεί οξειδωτικές ή άλλες αλλοιώσεις και συνδέονται με μείωση της διάρκειας ζωής του.

Στα φρέσκα ελαιοάδα ο αριθμός υπεροξειδίων είναι συνήθως μικρότερος των 10 meqO<sub>2</sub> / kg, στοιχείο που δείχνει ότι η οξείδωση, προχωρεί με αργό ρυθμό όταν το ελαιοάδο βρίσκεται στον καρπό.



**Διάγραμμα XXIII.** Αριθμός των υπεροξειδίων στο αρχικό δείγμα ελαιολάδου (μάρτυρας) και στα εμπλουτισμένα ελαιολάδα με υγρή πολυφαινόλη (200ppm, 500ppm, 1000ppm) και με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λιποσώματα λεκιθίνης (1000ppm).

Στο Διάγραμμα XXIV απεικονίζεται η οξειδωτική αντοχή του αρχικού δείγματος ελαιολάδου καθώς και των εμπλουτισμένων.



**Διάγραμμα XXIV.** Οξειδωτική αντοχή των εμπλουτισμένων ελαιολάδων με υγρή και με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λιποσώματα.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι το δείγμα 4 που εμπλουτίστηκε με ενθυλακωμένη πολυφαινόλη σε λεκιθίνη (1000 ppm) παρουσιάζει μεγαλύτερη οξειδωτική αντοχή από αυτή των δειγμάτων που εμπλουτίστηκαν με υγρή πολυφαινόλη. Η λεκιθίνη συγκρατεί

τις πολυφαινόλες στο λάδι οι οποίες με την σειρά τους το προστατεύουν από την οξείδωσή του.

**Συνεπώς η συγκεκριμένη μέθοδος εμπλουτισμού είναι αποτελεσματική καθώς επιτυγχάνεται αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών της τάξης του 40%.**

## **Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



## 4.1 Συμπεράσματα μελέτης

Με την ολοκλήρωση της παραπάνω μελέτης προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα ελαιόλαδα ψυχρής έκθλιψης έχουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεως πολυφαινολών από τα ελαιόλαδα που παράγονται με την συμβατική τεχνολογία σε κανονικές θερμοκρασίες.
- Επίσης και άλλοι παράμετροι επηρεάζουν την συγκέντρωση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο όπως το υψόμετρο της ελαιοκαλλιέργειας και η εποχή συλλογής, με την ελιά των πρώτων ημερών συλλογής να δίνει τα υψηλότερα ποσοστά.
- Η χρήση υπερήχων σε δείγματα ελαιολάδου με εμβαπτισμένα φύλλα ελιάς έδωσε αύξηση του ποσοστού πολυφαινολών στο επεξεργασμένο λάδι, αλλά όχι ιδιαίτερα αξιόλογη και υψηλή (6%).
- Η ενθυλάκωση σε λεκιθίνη, εμπορικών πολυφαινολών σε μορφή υγρού εκχυλίσματος, παράγει σκόνη πολυφαινολών ευδιάλυτη στο λάδι, σε ποσοστό 1000 ppm η οποία ενισχύει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ελαιολάδου, αυξάνοντας κατά ένα μεγάλο ποσοστό (40%) την αντοχή του σε οξείδωση όπως αποδεικνύεται με το test RANCIMAT. **Το αποτέλεσμα είναι η παρούσα διαδικασία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί εμπορικά για παραγωγή ενισχυμένου ελαιολάδου με αντιοξειδωτικά και με ευχάριστη και όχι πικρή γεύση.**
- Επίσης μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση της περιεκτικότητας ελαιολάδου σε πολυφαινόλες ελιάς με εκχύλιση αυτών των πολυφαινολών από άλλη ποσότητα λαδιού και ενσωμάτωση τους με την μέθοδο της εξάχνωσης του διαλύτη υπό υψηλό κενό. Αυτή η τεχνική επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ελαιολάδου με υψηλά ποσοστά πολυφαινολών και με ευεργητικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία.

**Ξενογλώσση**

1. **Agiomyrgianaki, A.; Petrakis, P.V.; Dais, P.**, 2012, «*Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: A study by NMR spectroscopy and biometric analysis*», **Food Chem.**, 135, 2561–2568.
2. **Amarni Fatiha, Kadi Hocine**, 2010, «*Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane: Comparison with the conventional extraction*», **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Volume 11, Issue 2, Pages 322–327
3. **Anastasopoulos, E.; Kalogeropoulos, N.; Kaliora, A.C.; Kountouri, A.; Andrikopoulos, N.K.**, 2011, «*The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Κορωνέικη cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method* », **Int. J. Food Sci. Technol.**, 46, 170–178.
4. **Andrikopoulos, N.K.; Dedoussis, G.V.Z.; Falirea, A.; Kalogeropoulos, N.; Hatzinikola, H.S.**, 2002, «*Deterioration of natural antioxidant species of vegetable edible oils during the domestic deep-frying and pan-frying of potatoes*», **Int. J. Food Sci. Nutr.**, 53, 351–363.
5. **Assy, N., Nassar, F., Nasser, G. and Grosovski, M.**, 2009, "Olive Oil Consumption and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease", **World Journal of Gastroenterology**, Vol. 15, No. 15, pp. 1809-15.
6. **Baiano A, Gambacorta G, Terracone C, Previtali MA, Lamacchia C, La Notte E.**, 2009, 'Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage.', **J Food Sci.**, 74(2):C177-83. doi: 10.1111
7. **Benavente-Garcia O, Castillio J, Lorente J, Alcaraz M**, 2002, "Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur-containing compounds", **J. Med. Food**, 5:125-135.
8. **Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Eccella N, Saija A.** 1999, "On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and Υδροξυτυροσόλη". **J. Pharm. Pharmacol Aug**, 51(8):971-4
9. **Blekas, G.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M.; Boskou, D.**, 2002, 'On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil', **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 104, 340–346
10. **Boskou, D.; Blekas, G.; Tsimidou, M.Z.**, Phenolic compounds in olive oil and olives., **Curr. Top. Nutraceutical Res.**, 2005, 3, 125–136
11. **Bourquelot E, Vintilesco JCR**, "Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retre de l'olivier (*Olea europaea* L.)", **Cmpt. Rend. Herbd. Acad. Sci.** 147:533-535, 1908
12. **Brenes M, Rejano L, Garcia P, Sanchez AH, Garrido A.**, 1995, "Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing", **J. Agric. Food Chem.**, 43:2702-2706.
13. **Bulotta Stefania, Celano Marilena, Lepore Saverio Massimo, Montalcini Tiziana, Pujia Arturo and Russo Diego**, 2014, 'Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and Υδροξυτυροσόλη: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases', **Journal of Translational Medicine** 2014, 12:219, DOI: 10.1186/s12967-014-0219-9

14. **Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G., 1995,** “Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters.”, **J. Appl. Bacteriol**, 79(4): 393-398.
15. **Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli G., 1999,** “Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins”, **Nutr Metab Cardiovasc. Dis.**, 9(3):102-107.
16. **Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I., 2011,** “The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial”, **Clinical Nutrition**, 30 (4), pp. 490-493.
17. **Commission Decision 2002/657/EC,** ‘Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results’. **Official Journal L 221** , P. 0008 - 0036
18. **Covas MI, Miró-Casas E, Fitó M, Farré-Albadalejo M, Gimeno E, Marrugat J, De La Torre R., 2003,** ‘Bioavailability of *Τυροσόλη*, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans.’, **Drugs Exp Clin Res.**; 29(5-6):203-6.
19. **DellAglia, M., Maschi, M, O., Galli, G, V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., Bosisio, E., 2008,** “Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase”, **British Journal of Nutrition.**, Volume 99, pp 945 – 951.
20. **De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martín-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS., 2000,** “Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol”, **Thromb Res**, 15; 100(4):305-15.
21. **Dew T., Day A., Morgan M., 2005,** “Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components”. **Department of Food Science**, University of Leeds.
22. **EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2011,** «Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006», **EFSA Journal**, 9(4):2033 [25 pp.]
23. **Fang Z and Bhandari B, 2010,** «Encapsulation of polyphenols –a review», **Trends in Food Science & Technology**, 21 (10): 510 -523
24. **Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A., 2002,** « Production in large quantities of highly purified *Υδροξυτυροσόλη* from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”», **J Agric Food Chem.**, 50(23):6804-11.
25. **Fitó M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, Marrugat J., 2000,** “Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation”, **Lipids Jun**, 35(6): 633-8.
26. **Fleming HP, Walter WM, Etchells JL, 1973,** «Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives», **Appl. Microbiol**, 26:773-776
27. **Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., Johnston, B., Rondanelli, M., 2012,** “Cancer prevention in Europe: The mediterranean diet as a protective choice”.. **European Journal of Cancer Prevention**. Article in Press.

28. **Gortzi Olga, Lalas Stavros, Chatzilazarou Arhontoula, Katsoyannos Evangelos, Papaconstandinou, Spyros Dourtoglou Euthalia**, 2008 '*Recovery of Natural Antioxidants from Olive Mill Wastewater Using Genapol-X080*', **Journal of the American Oil Chemists Society**, Volume 85, Issue 2, pp 133-140
29. **Grigoriadou, D.; Androulaki, A.; Tsimidou, M.Z.**, 2005, '*Levels of phenolic antioxidants in virgin olive oil purchased in bulk*'. **Ital. J. Food Chem.**, 17, 195–202.
30. **Houshia OJ, A Zaid Qutit, O, H, M Zaid Shqair**, 2014, '*Determination of Total Polyphenolic Antioxidants Contents in West-Bank Olive Oil*', **Journal of Natural Sciences Research**, Vol 4, No 15
31. **Jaber Houshia Orwa, Qutit Ansam, Zaid Oday, Shqair Hazem, Zaid Motasem**, 2014, '*Determination of Total Polyphenolic Antioxidants Contents in West-Bank Olive Oil*', **Journal of Natural Sciences Research**, Vol 4, No 15
32. **Jurd L, King AD Jr, Mihara K, Stanley WL.**, 1971, "*Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds*", **Appl Microbiol Mar**, 21(3):507-10.
33. **Kaliora, A.C.; Artemiou, A.; Giogios, I.; Kalogeropoulos, N.**, 2013, '*The impact of fruit maturation on bioactive microconstituents, inhibition of serum oxidation and inflammatory markers in stimulated PBMCs and sensory characteristics of Κορωνέικη virgin olive oils from Messenia, Greece.*', **Food Funct.**, 4, 1185–1194.
34. **Kalogeropoulos Nick, Maria Z. Tsimidou**, '*Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils*', **Antioxidants**, 2014, 3(2), 387-413, doi:10.3390
35. **Kamaljit Vilkh, Mawson Raymond, Lloyd Simons, Bates Darren**, 2008, '*Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review*', **Food Innovation: Emerging Science, Technologies and Applications (FIESTA) Conference**, Volume 9, Issue 2, Pages 161–169
36. **Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K.**, 1997, "*Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives*", **Biosci Biotechnol Biochem.**, 61(2):347-350.
37. **Kuhnau, J.**, 1976, "*The Flavonoids: A Class of Semi-essential Food Components: Their Role in Human Nutrition*", **World Review of Nutrition and Dietetics**, Vol. 24, pp. 117-191.
38. **Lesage-Meessena L, Navarroa D, Mauniera S, Sigoillota J-C, Lorquinb J, M Delattrea, J-L Simonc, M Asthera, M Labatb**, 2001, '*Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems*', **J Agric Food Chem.**, Volume 75, Issue 4, Pages 501–507
39. **Le Tutour B and Guedon D**, 1992, '*Antioxidative activities of Olea Europaea leaves and related phenolic compounds*', **Phytochemistry**, 31(4): 1173-1178
40. **Lobo V. , A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra**, 2010, '*Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*', **Pharmacognosy Review.**, 4(8): 118–126. doi: 10.4103/0973-7847.70902
41. **Longobardi, F.; Ventrella, A.; Casiello, G.; Sacco, D.; Tasioula-Margari, M.; Kiritsakis, A.K.; Kontominas, A.G.**, 2012, '*Characterisation of the geographical origin of Western Greek virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis.*', **Food Chem.**, 133, 169–175.
42. **Luciano Cinquanta, Marco Esti, Ennio La Notte**, 1997, '*Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage*', **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Volume 74, Issue 10, pp 1259-1264
43. **Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Zappia, V.**, 2009, "*Olive Oil Phenolic Compounds Inhibit Homocysteine - Induced Endothelial Cell Adhesion Regardless of Their Different Antioxidant Activity*", **Agric. Food Chem.**, 57, 3478-3842

44. **Medina E, Brenes M, Garcia A, Romero C, de Castro A.**, 2009, "*Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products*", **Food Prot.**, 72(12):2611-2614.
45. **Mulinacci N1, Romani A, Galardi C, Pinelli P, Giaccherini C, Vincieri FF**, 2001, "*Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples*", **J Agric Food Chem**, 49(8):3509-14.
46. **Niaounakis, M., Halvadakis C.P.**, 2006, "*Olive Processing Waste Management*". **Literature Review and Patent Survey**, Second Edition, Elsevier
47. **NN Melnikov**, *Chemistry of Pesticides*, **Springer**, 1971, Chapter 'Alcohols, Phenols and Ethers', pp 89-110.
48. **Panizzi LM, Scarpatti JM, Oriente EG**, "*Constituzione della oleuropeina, glucoside, glicoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo*", **Org. Prep. Proc. Int.** 4:97-104
49. **Paiva-Martins F., Fernandez, J., Rocha, S., Nascimento, E., Vitorino, R.**, 2009, "*Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage*", **Mol. Nut. Food Res.**, 53. 609-616.
50. **Paiva- Martins F, Pinto M.**, 2008, "*Isolation and characterization of a new Υδροϋπεροσόλη derivative from olive (Olea europaea) leaves*", **J Agric Food Chem.**, 2008 Jul 23;56(14):5582-8. doi: 10.1021/jf800698y. Epub 27.
51. **Paster N, Juven BJ, Harshemesh H.**, 1988, "*Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents*". **J. Appl Bacteriol.**, 64(4): 293-7.
52. **Pelaez-Martin, Covas Sandra Maria Isabel, Fitó Montserrat, Kušar Anita and Pravst, Igor**, 2013, "*Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims*", **Molecular Nutrition & Food Research**, Volume 57, Issue 5, pages 760–771
53. **Pereira AP1, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA**, 2007, "*Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (Olea europaea L. Cv. Cobrançosa) leaves*", **PubMed, Molecules.**, 12(5):1153-62.
54. **Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos and Scalbert A**, 2010, "*Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol Explorer database*", **European Journal of Clinical Nutrition**, 64, S112–S120
55. **Rodis P.S, Karathanos V.T, Mantzavinou A.**, 2002, '*Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases.*', **J Agric Food Chem.**, 30;50(3):596-601.
56. **Romero C, Brenes M, Garcia P, Garrido A**, 2002, "*Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties*", **J Agric Food Chem.**, 50:3835–3839
57. **Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, Castro AD**, 2007, "*In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against Helicobacter pylori*", **J Agric Food Chem.**, 7;55(3):680-6
58. **Ryan, D. and Robards, K.**, 1998, '*Phenolic compounds in olives*', **Analyst**, 123: 31R-44R.
59. **Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V, Galli C, Romani A, Mulinacci N, Bortolomeazzi R, Dolara P, Palli D.**, 2006, "*Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women.*", **Br J Nutr.**, 95(4):742-51.
60. **Santiago-Mora R, Casado-Diaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM.**, 2011, "*Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow.*", **Osteoporos Int.**, , 22(2):675-84.
61. **Scalbert A, Johnson IT, and Saltmarsh M**, 2005, "*Polyphenols: antioxidants and beyond*", **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81: 215S–217S

62. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L., 2005, «*Dietary polyphenols and the prevention of diseases*», **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45: 287 – 306
63. Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., Carluccio, M.A., 2012, “*Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer*”. **Archives of Biochemistry and Biophysic**.
64. Segura-Carretero, A.; Menéndez-Menéndez, J.; Fernández-Gutiérrez, A., 2010, ‘*Polyphenols in olive oil: The importance of phenolic compounds in the chemical composition of olive oil. In Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention,*’ Preedy, V.R., Watson, R.R., Eds.; Elsevier: London, UK, pp. 167–175.
65. Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.F.; Morozzi, G., 2004, ‘*Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil.*’, **J. Chromatogr. A**, 1054, 113–127.
66. Shao, W., Powell, C. and Clifford, M. N., 1995, "The Analysis by HPLC of Green, Black and Puer Teas Produced in Yunnan", **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Vol. 57, pp. 417-426.
67. Stavros Lalas, Vasilios Athanasiadis , Olga Gortzi, Maria Bounitsi, Ioannis Giovanoudis, John Tsaknis, Filippos Bogiatzis, 2011, ‘*Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves*’ **Volume 127, Issue 4, Pages 1521–1525**
68. Stefanoudaki, E.; Kotsifaki, F.; Koutsaftakis, A., 2000, ‘*Sensory and chemical profiles of three European olive varieties (Olea europea L); an approach for the characterisation and authentication of the extracted oils*’, **J. Sci. Food Agric.**, 80, 381–389.
69. Stefanoudaki, E.; Williams, M.; Chartzoulakis, K.; Harwood, J., 2009, ‘*Effect of irrigation on quality attributes of olive oil*’, **J. Agric. Food Chem.**, 57, 7048–7055.
70. Stefanoudaki, E.; Koutsaftakis, A.; Harwood, J.L., 2011, ‘*Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil*’, **Food Chem.**, 127, 1481–1486.
71. Syed Harris Omar., 2010, “*Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive*”, **Saudi Pharmaceutical Journal** 18, 111-121.
72. Thomsen, C, Storm, H., Hoist, J. J. and Hermansen, K., 2003, "Differential Effects of Saturated and Monounsaturated Fats on Postprandial Lipemia and Glucagon-like Peptide 1 Responses in Patients with Type 2 Diabetes", **American Journal of Clinical Nutrition**, Vol. 77, No. 3, pp. 605-611.
73. Tsimidou, M., 1998, “*Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect*”, **Ital. J. Food Sci.**, 10, 99–116.
74. Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D., 1992, ‘*Phenolic compounds and stability of virgin olive oil.*’, **Part I Food Chem**, 45, 141–144.
75. Tsimidou, M.Z.; Georgiou, A.; Koidis, A.; Boskou, D., 2005, ‘*Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage.*’, **Food Chem.**, 93, 377–383.
76. Tsimidou, M., Papadopoulos, G. and Boskou, D., 1992, "Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by RP-HPLC by Emphasis on UV Detection", **Food Chemistry**, Vol. 44, pp. 53-60.
77. Vekiari, S.A.; Oreopoulou, V.; Kourkoutas, Y.; Kamoun, N.; Msallem, M.; Psimouli, V.; Arapoglou, D., 2010, ‘*Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Κορωνέικη varieties from Southern Greece*’, **Grasas Aceites**, 61, 221–231.
78. Visioli F, Bellomo G, Galli C, 1998, "Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols", **Biochem. Biophys. Res Comm**, 247:60-64.



79. **Visioli F, Galli C.**, 2001, "Antitherogetic Components of Olive Oil.", **Atheroscler Rep**, 3(1):64-67.
80. **Visioli, F. and Galli, C.**, 1998, "The Effect of Minor Constituents of Olive Oil on Cardiovascular Disease: New Findings", **Nutrition Reviews**, Vol. 56, pp. 142-147.
81. **Visioli, F. and Galli, C.**, 1998, "Olive Oil Phenols and their Potential Effects on Human Health", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 46, pp. 4292-96.
82. **Visioli F, Bernardini E.**, 2011, 'Extra Virgin Olive Oil's Polyphenols: Biological Activities', **Curr Pharm Des.**, 17(8):786-804.
83. **Walter WM Jr, Fleming HP, Etchells JL.**, 1973, "Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives" **Appl. Microbiol.**, 26(5): 773-6.
84. **Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K.**, 2009, "Mechanism of the antiviral effect of Υδροξυτυροσόλη on influenza virus appears to involve morphological change of the virus", **Antiviral Res.**, 83(1):35-44.

### Ελληνόγλωσσα

85. **Ανδρουλάκη Άννα**, 2007, 'Αντικειμενική εκτίμηση της πικρής γεύσης του παρθένου ελαιόλαδου με φασματομετρικές μεθόδους', **Διπλωματική εργασία**.
86. **Βεκιάρη ΣΑ**, 2001, "Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου και η σημασία τους στην ποιότητά του", **Χημικά Χρονικά**, (2): 45-48.
87. **Ευσταθίου Παναγιώτα**, 2010, 'Διατροφική πρόσληψη αντιοξειδωτικών από φυτικά τρόφιμα τηγανισμένα σε έλαια εμπλουτισμένα με αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές κατά το διαδοχικό τηγάνισμα' **Μεταπτυχιακή εργασία**.
88. **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 432/2012 της επιτροπής της 16ης Μαΐου 2012**, «σχετικά με την θέσπιση καταλόγου επιτρεπόμενων ισχυρισμών υγείας που διατυπώνονται για τα τρόφιμα, εξαιρουμένων όσων αφορούν τη μείωση του κινδύνου εκδήλωσης ασθένειας και την ανάπτυξη και υγεία των παιδιών», **Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης**, L136/1, 25.05.2012, 32.
89. **Κερασιώτη Ευθαλία**, 2014, 'επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής, και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους' **Διδακτορική Διατριβή**
90. **Κοντοπρία, Παναγιώτα**, 2007, 'Μελέτη της οξειδωτικής ικανότητας ελαιόλαδου στην περιοχή της Μεσσηνίας με τη μέθοδο 'Rancimat'', **Πτυχιακή Εργασία**
91. **Κουρέτας Δημήτριος, Στάγκος Δημήτριος**, 2001, 'Μελέτη Βιολογικών Ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα και φυτικές πολυφαινόλες από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (VITIS VINIFERA)', **Πρόγραμμα 'Οίνος και Υγεία' (Παρουσίαση)**.
92. **Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Άρθρο 71, παράγραφος 1, Αθήνα 2004.
93. **Μητσόπουλος, Γεώργιος**, 2012, 'Ταυτοποίηση, ποσοτικός προσδιορισμός και εποχικές μεταβολές φαινολικών ενώσεων μεταξύ και εντός ποικιλιών ελιάς και μοριακή ταυτοποίηση: ιχνηλασία των προϊόντων ελιάς' **Μεταπτυχιακή Διατριβή**.
94. **Ντζιαδήμας Βασίλειος**, 2013, 'Οι περιεχόμενες πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο και οι ενεργητικές δράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία'. **Πτυχιακή εργασία**.
95. **Παπαδημητρίου, Αναστασία**, 2013, 'Διάχυση μικροσυστατικών της διατροφής κατά την επεξεργασία των τροφίμων: εφαρμογή κατά τον εμπλουτισμό των τροφίμων: εμπλουτισμός ρυζιού με αντιοξειδωτικά βασιλικού'. **Πτυχιακή Εργασία**.

96. **Πετρωτός Κ.**, 'Ανάπτυξη μεθόδου ολικής αξιοποίησης αποβλήτων ελαιοτριβείου για παραγωγή βιο-δραστικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας και αγρο-υλικών'. **Αρχιμήδης ΙΙΙ (Πρόγραμμα)**
97. **Πετρωτός Κ.**, 2010, 'Ανάπτυξη μεθόδου αποχρωματισμού λιπαρών οξέων με βιομηχανική χρωματογραφία', **Τεχνική Έκθεση** (αρ. κουπονιού 15991593- 01-000042)
98. **Πετρωτός Κ.**, 2011, «Παραγωγή Βιοδραστικού Παραδοσιακού Γιαουρτιού με Ενσωμάτωση Φυτικών Πολυφαινόλων» **Τεχνική Έκθεση** (αρ. κουπονιού: 69206003-01- 000050)
99. **Τιτάκης - Καρτσωνάκης Γεώργιος**, 2007, 'Αξιοποίηση των στεμφύλων (στερεά υπολείμματα οινοποίησης) σε μονάδες παραγωγής εκχυλισμάτων σταφυλής πλούσιων σε πολυφαινόλες', **Διπλωματική εργασία**.
100. **Χανιώτη Σ., Σιαμανδούρα Π., Τζιά Κ.**, 2015, «Μελέτη εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από παραπροϊόντα επεξεργασίας ελαιολάδου με εφαρμογή ενζύμων-μικροκυμάτων» **Διπλωματική εργασία**.
101. **Χριστοφορίδου Σ.**, 2001, 'Μελέτη φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων προτύπων πολυφαινόλων. Μία πρώτη προσέγγιση προσδιορισμού πολυφαινόλων στο παρθένο ελαιόλαδο.' **Μεταπτυχιακή Διατριβή**. Ηράκλειο Κρήτης.

### Ιστοσελίδες

102. **ΒΙΚΙΠΑΙΔΙΑ**, «ελιά», Στο: <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CE%BB%CE%B9%CE%AC>, (τελευταία πρόσβαση στις 11/03/2016)
103. **clickatlifegr**, 'Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες και γιατί απειλούν την υγεία μας', Στο: <http://www.clickatlifegr/euzoia/story/4842>, (τελευταία πρόσβαση στις 26/05/2016)
104. **chem.uoa.gr**, «Η χημική ένωση του μήνα», Στο: [http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_oleuropein.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_oleuropein.htm), (τελευταία πρόσβαση στις 05/11/2015)
105. **Διατροφή σήμερα**, 'Οι Πολυφαινόλες με απλά και κατανοητά λόγια', Στο : <http://www.diatrofisimera.gr/diatrofi/oi-polifainoles-me-apla-kai-katanoita-logia/>, (τελευταία πρόσβαση στις 19/03/2016)
106. **ebooks.edu.gr**, 'Φαινόλες', Στο: <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-B132/471/3119,12545/>, (τελευταία πρόσβαση στις 19/03/2016)
107. **ELQA**, «Επανοληψιμότητα», Στο: <https://elqa.teilar.gr/nea-anakoinwseis/item/256-epanalipsimotita>, (τελευταία πρόσβαση στις 30/06/2016)
108. **Foodbites**, 'Encapsulation, Ενθυλάκωση', Στο: <http://www.foodbites.eu/j15/el/foodpedia/626-encapsulation-->, (τελευταία πρόσβαση στις 01/06/2016)
109. **olivenews.gr**, 'Φαινόλες ελαιολάδου & ισχυρισμός υγείας', Στο: <http://www.olivenews.gr/el/article/5483/%CF%86%CE%B1%CE%B9%CE%BD%CF%8C%CE%BB%CE%B5%CF%82-%CE%B5%CE%BB%CE%B1%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%AC%CE%B4%CE%BF%CF%85-%CE%B9%CF%83%CF%87%CF%85%CF%81%CE%B9%CF%83%CE%BC%CF%8C%CF%82-%CF%85%CE%B3%CE%B5%CE%AF>, (τελευταία πρόσβαση στις 19/03/2016)
110. **Polyhealth**, «Πολυφαινόλες», Στο: <http://www.polyhealth.gr/el/%CE%B2%CE%B9%CE%B2%CE%BB%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AF%CE%B1->

- [%CF%80%CF%81%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CE%BD%CF%84%CF%89%CE%BD](#),  
(τελευταία πρόσβαση στις 01/11/2015)
111. **ΠΕΙΣΗΣ**, 'Ωριμότητα της ελιάς', Στο:  
<http://www.reissis.gr/Drupal/sites/default/files/the-olive-maturity-and-polyphenols.jpg>,  
(τελευταία πρόσβαση στις 26/05/2016)
112. **sgp-sitia.com** «Θάρρος για βαθύτερη γνώση γύρω από το ελαιόλαδο», Στο:  
[http://www.sgp-sitia.com/all-Dateien/A\\_MehrInfo2\\_gr.htm#D.8](http://www.sgp-sitia.com/all-Dateien/A_MehrInfo2_gr.htm#D.8), (τελευταία πρόσβαση  
στις 15/03/2016)
113. **ΣΚΕΨΗ- ΤΡΟΦΗ- ΚΙΝΗΣΗ**, «Τι είναι το ελαιόλαδο πρώτης ψυχρής  
έκθλιψης», Στο: [http://skepsitrofikinisi.blogspot.gr/2011/02/blog-post\\_4544.html](http://skepsitrofikinisi.blogspot.gr/2011/02/blog-post_4544.html),  
(τελευταία πρόσβαση στις 01/11/2015)
114. **Wikipedia**, 'Hidroxitirosol', Στο: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hidroxitirosol>,  
(τελευταία πρόσβαση στις 03/04/2016)
115. **ΧΗΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**, «Παραλαβή αιθερίων ελαίων», Στο:  
[http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/02/blog-post\\_12.html](http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/02/blog-post_12.html), (τελευταία  
πρόσβαση στις 19/03/2016)