



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**“Προσδιορισμός της προστασίας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων  
από απόβλητα ελαιοτριβείου έναντι της οξείδωσης της LDL  
χοληστερόλης”**

*Determination of the protection of polyphenolic extracts from olive mills  
wastes against the oxidation of LDL cholesterol.*

**ΜΑΝΤΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ**

Μηχανικός Βιοσυστημάτων

**Λάρισα 2018**

**“Προσδιορισμός της προστασίας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων  
από απόβλητα ελαιοτριβείου έναντι της οξείδωσης της LDL  
χοληστερόλης”**

*Determination of the protection of polyphenolic extracts from olive mills  
wastes against the oxidation of LDL cholesterol.*

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Κωνσταντίνος Πετρωτός:** Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας κ. Δημήτριο Στάγκο για την εμπιστοσύνη, τη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω απο καρδιάς έναν ιδιαίτερα σημαντικό άνθρωπο για τη μέχρι τώρα πορεία μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό για τη συνεχή και ουσιαστική υποστήριξή του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την υψηλή επίβλεψη και καθοδήγηση του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Δημήτριου Κουρέτα, που μου έδωσε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του εργαστηρίου του για ένα μέρος της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερω, την Επίκουρη Καθηγήτρια Μακέδου Καλή, για την πολύτιμη βοήθειά της να φέρω εις πέρας και να ολοκληρώσω την πειραματική διαδικασία, μέρος της οποίας τελέσθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.).

Και τον διδακτορικό φοιτητή και φίλο Υπάτιο Σπανίδη που με στήριξε με τις γνώσεις και την φιλία του σε ολόκληρη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract .....	7
1. Θεωρητικό μέρος .....	8
1.1 Η ελιά ανάμεσα στο μύθο και την ιστορία .....	8
1.2 Ελαιόλαδο .....	9
1.2.1 Ορισμός ελαιολάδου .....	9
1.2.2 Διαδικασία παραλαβής ελαιολάδου.....	10
1.2.3 Χημική σύσταση του ελαιολάδου.....	10
1.2.4 Σαπωνοποιήσιμα συστατικά του ελαιολάδου.....	13
1.2.5 Κυριότερα ασαπωνοποιήτα συστατικά του ελαιολάδου .....	15
1.3 Σχέση δομής-αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοφαινολών.....	18
1.4 Ενθυλάκωση .....	22
1.4.1 Μέθοδοι Ενθυλάκωσης.....	23
1.5 Χοληστερόλη .....	24
1.5.1 Ορισμός και Κατηγορίες.....	24
1.5.2 Προσδιορισμός και Επιπεδα LDL Χοληστερόλης .....	25
1.6 Ελεύθερες ρίζες.....	27
1.7 Αντιοξειδωτική Άμυνα Οργανισμού .....	29
1.7.1 Αντιοξειδωτική ουσία .....	30
1.7.2 Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών .....	30
1.8 Οξειδωτικό στρες.....	31
1.9 Επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε στην οξείδωση της LDL .....	31
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	32
2.1 Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου.....	32
2.2 Κρυοξήρανση – Ενθυλακωση με Freeze Drying .....	33
2.2.1 Αρχή λειτουργίας Κρυοξήρανσης .....	34
2.3. Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας <i>Εκνίνο</i> σε απομονωμένες Λιποπρωτείνες Χαμηλής Πυκνότητας.....	35
2.3.1 Απομόνωση, καθαρισμός και οξείδωση της LDL .....	36
3. Αποτελέσματα .....	38
3.1 Οξείδωση παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών .....	38
3.2 Οξείδωση παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη .....	39
3.3. Οξείδωση παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών ενθυλακωμένο σε λεκιθίνη .....	40
4. Συζήτηση .....	44
Βιβλιογραφία.....	45

## Περίληψη

Ένα από τα πολυτιμότερα αγαθά, αναπόσπαστα συνδεδεμένο με την ιστορία και την παράδοση της Ελλάδας είναι το ελαιόλαδο, που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τόσο στη διατροφή όσο και στη λαϊκή θεραπευτική. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο έχει βρεθεί στο επίκεντρο επιστημονικών μελετών λόγω των καταγεγραμμένων ευεργετικών ιδιοτήτων των περιεχομένων σε αυτό βιοφαινολών. Η μελέτη αυτή αφορά κυρίως την ανάλυση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών των βιοφαινολών αυτών καθώς και στην εκτίμηση των βιολογικών ιδιοτήτων των συστατικών του. Αυτές οι ενώσεις συναντώνται επίσης και στα υγρά απόβλητα που παράγονται κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου και τα μετατρέπουν σε έναν “πολύτιμο” ρύπο.

Η εξέταση λοιπόν της επίδρασης των πολυφαινολών του ελαιολάδου στην προστασία έναντι της οξειδωσης της χοληστερόλης LDL κρίθηκε ενδιαφέρουσα. Έτσι, δημιουργήθηκε ένα μεικτό σκεύασμα πολυφαινόλης ελιάς σε μορφή σκόνης προστιθέμενης αξίας και εκτελέστηκε ενθυλάκωση του πολυφαινολικού υγρού σε μαλτοδεξτρίνη και λεκιθίνη με τη χρήση συσκευής Freeze Dryer ώστε να μελετηθεί η επίδρασή του στην ανασχεση της οξειδωσης της LDL χοληστερόλης. Παράλληλα εξετάστηκε η ανασχεση της οξειδωσης της LDL χοληστερόλης παρουσία μόνο υδατικού διαλύματος πολυφαινολών.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τα τρία εκχυλίσματα παρέχουν σημαντική αντιοξειδωτική προστασία στις απομονωμένες LDL *ex vivo* ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά μεταξύ τους ως προς τον τρόπο της αντιοξειδωτικής προστασίας σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (< 50 μg/ml), καθώς οι πολυφαινόλες σε μαλτοδεξτρίνη είχαν κυρίως επίδραση στο χρόνο καθυστέρησης και στο ρυθμό της οξειδωσης, οι πολυφαινόλες σε λεκιθίνη είχαν επίδραση μόνο στο χρόνο καθυστέρησης και όχι στο ρυθμό της. Φάνηκε ωστόσο ότι το υγρό υδατικό διάλυμα πολυφαινολών επηρέαζε αποτελεσματικότερα την οξειδωση της LDL σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις έναντι των ενθυλακωμένων μορφών.

## Abstract

Virgin Olive oil (VOO) is one of the most valuable products, strongly associated with the Greek history and tradition and widely used both in nutrition and in traditional medicine. However, in recent years, the scientific interest has focused on its analysis due to the documented beneficial properties on human health of its biophenols. Specifically, the present study aimed at the analysis of the qualitative and the quantitative characteristics of these biophenols. These compounds are also found in the olive oil mill wastes produced during the production of olive oil, which makes them a very “valuable “ waste.

Therefore, the examination of the effect of olive oil polyphenols on the protection against LDL cholesterol oxidation was considered important. Thus, a mixed oval polyphenol formulation was made in the form of added value powder, and encapsulation of the polyphenolic liquid into maltodextrin and lecithin was performed by using a Freeze Dryer, so as to study its effect on the inhibition of oxidative LDL cholesterol. At the same time, the inhibition of oxidative LDL cholesterol was examined in the presence of only an aqueous solution of polyphenols.

The results demonstrated that the three extracts provided significant antioxidant protection to isolated LDL *ex vivo* even at low concentrations. However, they exhibited different ways of protection, as the polyphenols encapsulated in maltodextrin had mainly an effect on the delay time and the rate of oxidation, the polyphenols encapsulated in lecithin had an effect only on the delay time and not on its rhythm. However, it appeared that the liquid aqueous solution of polyphenols most effectively prevented the oxidation of LDL at lower concentrations compared with the encapsulated forms.

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Η ελιά ανάμεσα στο μύθο και την ιστορία

Η Αθήνα πήρε το όνομά της από τη Θεά Αθηνά, που έφερε την ελιά στους Έλληνες ως δώρο. Ο Δίας είχε υποσχεθεί να δώσει την Αττική, στο Θεό ή στη Θεά που θα έκανε την πιο χρήσιμη εφεύρεση. Δώρο της Αθηνάς ήταν το δέντρο της ελιάς, χρήσιμο για το φως, τη θερμότητα, τη διατροφή, τα φάρμακα και τα αρώματα. Επιλέχθηκε από τους πολίτες, ως μια πιο ειρηνική εφεύρεση, που συμβόλιζε την ειρήνη, τη φρόνηση και τη σοφία. Προτιμήθηκε από το άλογο του Ποσειδώνα, που ήταν ένα ταχύ και περήφανο ζώο, αλλά θεωρήθηκε σύμβολο του πολέμου. Η Θεά Αθηνά φύτεψε την πρώτη ελιά σε ένα βραχώδη λόφο, στην Ακρόπολη. Η ελιά που φυτρώνει εκεί σήμερα λέγεται ότι προέρχεται από τις ρίζες του αρχικού δέντρου, που ήταν ιερό.

Οι ιστορικοί αναζητούν την καταγωγή της στη Συρία και στις μακρόστενες κοιλάδες μεταξύ Ταύρου και Λιβάνου. Άλλοι ιστορικοί αναφέρουν ότι το δέντρο της ελιάς είναι ιθαγενές, στη λεκάνη της Μεσογείου και ότι η αγριελιά προέρχεται από τη Μικρά Ασία και από την Αρχαία Ελλάδα. Παρότι λοιπόν η ελιά ήταν αναπόσπαστο μέρος της ζωής στην ανατολική Μεσόγειο, δεν μπορούμε να πούμε με ακρίβεια πότε άρχισε η συστηματική καλλιέργειά της.

Υπάρχουν κονιάματα λίθων και πρέσες που χρησιμοποιούνταν για την εξαγωγή ελαιολάδου που χρονολογούνται από το 5000 π.Χ. Τα αρχαιολογικά ευρήματα από τα μινωικά ανάκτορα της Κρήτης μαρτυρούν τον πολλαπλό ρόλο του ελαιολάδου στον κρητικό πολιτισμό της Μινωικής περιόδου, η οποία έφθασε στο αποκορύφωμά της μεταξύ των ετών 2000 με 1450 π.Χ. Οι απαρχές της ελαιοκαλλιέργειας τοποθετούνται χρονικά στην πρώιμη Χαλκοκρατία, στην 3η δηλαδή χιλιετία π.Χ. Το προβάδισμα ως προς την ελαιοκαλλιέργεια πληρούσε η Μινωική Κρήτη λόγω του εύκρατου κλίματός της, της γεωμορφολογίας της, αλλά και της εντατικοποίησης της πρωτογενούς γεωργικής παραγωγής της. Μάλιστα η Κρήτη διέθετε ένα δίκτυο εμπορικών συναλλαγών με πολιτισμούς της ανατολικής Μεσογείου όπου υλοποιούνταν η συστηματική εκμετάλλευση της ελιάς, απ' όπου πιθανόν να



μεταλαμπαδεύτηκαν στο νησί και οι σχετικές ελαιοκομικές γνώσεις. Οι ανασκαφές στην Κρήτη έφεραν στο φως τεράστιους πίθους για την αποθήκευση του λαδιού, πιστοποιώντας πως η δύναμη των Μινωικών βασιλιάδων προερχόταν σε μεγάλο βαθμό και από την εξαγωγή του ελαιολάδου, τόσο στην Αίγυπτο, όσο και σε άλλες περιοχές της Μεσογείου, καθώς μάλιστα από το 1450 π.Χ. και εξής η εκμετάλλευση του προϊόντος άρχισε βαθμιαία να συστηματοποιείται. Αναφορές στην εκμετάλλευση της ελιάς, αλλά και τη διακίνηση και την εμπορία του λαδιού στο προϊστορικό Αιγαίο παρέχουν και τα ανακτορικά αρχεία της Κνωσού, της Πύλου και των Μυκηνών στη Γραμμική Β'. Αναφέρεται ότι το πρώτο ελαιοτριβείο βρέθηκε στις Κλαζομενές της Ιωνίας (στη σύγχρονη Τουρκία). Άλλες πηγές σημειώνουν ότι, το αρχαιότερο ελαιοτριβείο βρέθηκε από τον Δέφνερ, σε οροπέδιο των Μεθάνων (υπολογίζεται την 4η χιλιετία π.Χ.), αλλά υπάρχουν και άλλες σχετικές αναφορές. Κατά τους ομηρικούς χρόνους, το λάδι χρησιμοποιείται κυρίως για την επάλειψη του σώματος και όχι για τροφή ή φωτισμό. Από πινακίδες της Γραμμικής Β, που βρέθηκαν στην Πύλο και όπου διαβάζουμε τη λέξη ro-qa (φοβρή / φοβράς), συμπεραίνουμε ότι την περίοδο εκείνη ο καρπός της ελιάς χρησιμοποιείται ως τροφή των κτηνών. Εξάλλου οι συνεχείς αναφορές σε αρωματικά ελαιόλαδα μας κάνει να συμπεράνουμε ότι τουλάχιστον στη συγκεκριμένη εποχή η χρήση του λαδιού εντοπίζεται κυρίως στις θρησκευτικές τελετές, στον καλλωπισμό του σώματος και στην παρασκευή θεραπευτικών αλοιφών.

Σήμερα, εκτιμάται ότι υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε όλο τον κόσμο, και ότι η συντριπτική πλειοψηφία (95%) βρίσκεται στις χώρες της Μεσογείου. Τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνται ευρέως στην Ελλάδα, πολύ περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο οπωροφόρο δένδρο. Αντιστοιχούν στο 75% της συνολικής δενδροκομίας και καλύπτουν περίπου το 15% της γεωργικής γης.

## 1.2 Ελαιόλαδο

### 1.2.1 Ορισμός ελαιολάδου

Επίσημα, το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται ως το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαίας της Ευρωπαϊκής (*Olea europaea* L.) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και

Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1).

### 1.2.2 Διαδικασία παραλαβής ελαιολάδου

Η παραλαβή του ελαιολάδου γίνεται από τον καρπό του δένδρου της ελιάς (*Olea europaea* L.). Η μέση χημική σύσταση του ελαιόκαρπου (Lipsky 1964) είναι: νερό (50%), έλαιο (22%), πρωτεΐνες (1.6%), σάκχαρα (19.1%), κυτταρίνη (5.8%) και ανόργανα συστατικά (1.5%). Άλλα σημαντικά συστατικά των ελαιόκαρπων είναι πηκτίνες, οργανικά οξέα, χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοειδή και ανθοκυάνες), και γλυκοζίδια των φαινολών (ολευρωπεΐνη) (Μπαλατσούρας 1997). Στους ελαιοκάρπους έχουν ανιχνευθεί και ένζυμα, όπως κυτταρινάσες (MORENO & GUZMAN 1985), χλωροφυλλάσες (Minguez-Mosquera et al. 1994), πολυγαλακτουρονάση και πηκτινестεράση (Fernández et al. 1997) καθώς και λιπάση (Kiritsakis et al. 1998; Fernández et al. 1997), λιποξυγονάση (LOX) (M. D. Georgalaki et al. 1998; M. Georgalaki et al. 1998) φαινολοξειδάση (PO) (Mignuez-Mosquera 1982; Marina D Georgalaki et al. 1998; Toscano et al. 2003; Valgimigli et al. 2001; Sciancalepore et al. 1995; Ben-Salah et al. 1986) και υπεροξειδάση (POD) (Olias et al. 1993; Gandul-Rojas et al. 2004; Saraiva, et al. 2007). Το 96-98% του του ελαιολάδου βρίσκεται στο μεσοκάρπιο (Fedeli 1977; Hoffman 1991) και η παραλαβή του πραγματοποιείται μετά την έκθλιψη των καρπών με μηχανικά μέσα. Τα βασικά στάδια της μεθόδου εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, είναι το σπάσιμο του καρπού, η μάλαξη της ελαιοζύμης και τέλος ο διαχωρισμός του ελαιολάδου. Η διαδικασία για τη παραλαβή του ελαιολάδου συμπεριλαμβάνει τα εξής στάδια:

### 1.2.3 Χημική σύσταση του ελαιολάδου

Το κύριο συστατικό του ελαιολάδου, όπως και κάθε λιπαρής ύλης, είναι οι τριακυλογλυκερόλες. Εκτός από τις τριακυλογλυκερόλες, το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα δευτερεύοντα συστατικά που παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και στο άρωμα του ελαιολάδου και για το λόγο αυτό ο ποσοτικός τους προσδιορισμός είναι καθοριστικός για την ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων του (Boskou, 1996). Τα δευτερεύοντα συστατικά του ελαιολάδου, που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο ή σχηματίζονται κατά την παραλαβή του

(Fedeli 1977; Kiritsakis & Dugan 1985; Kiritsakis, 1998), είναι:

- Ελεύθερα λιπαρά οξέα (προϊόντα υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων)
- Μονο- και διακυλογλυκερόλες
- Φωσφατίδια (ή φωσφολιπίδια)
- Στερόλες
- Αλειφατικές αλκοόλες
- Φαινόλες
- Τοκοφερόλες
- Χρωστικές
- Πτητικές οργανικές ενώσεις
- Διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες κ.λ.π.

Τα συστατικά του ελαιολάδου διακρίνονται σε σαπωνοποιήσιμα (ακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κ.α.) και μη σαπωνοποιήσιμα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α.). Το 98,0-99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο μη σαπωνοποιήσιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά πολύ μικρότερο, τα συστατικά που περιλαμβάνονται σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό και βιολογικό ρόλο (Boskou et al. 2006). 1.9 Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε.)

Το ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με το πολυφαινολικό προφίλ του ελαιολάδου και κατ' επέκταση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε ), είναι ιδιαίτερα αυξημένο αφού αυτά είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις που παρουσιάζουν αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, έχουν δείξει ότι τα πολυφαινολικά συστατικά τους παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες που μπορούν να συμβάλουν στην πρόληψη ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

Η ελαιευρωπαϊνή είναι ένας γλυκοζίτης και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία και ονομάστηκε. Η ελευρωπαϊνή ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και VintileSCO στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpatí και Oriente υπέδειξαν 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 και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Guiso & Marra, 2005). Τα τελευταία χρόνια, η ελαιευρωπαϊνή και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες όπως 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. Η ελαιευρωπαϊνή και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς έχουν προστατευτική δράση, κυρίως αντιοξειδωτική.

Η ελαιευρωπαϊνή, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου. Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη E) και του φυτικού λιπαρού οξέος, του ελαϊκού οξέος, εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και το οξειδωτικό στρες των αερόβιων οργανισμών (F Visioli, Bellomo, & Galli, 1998). Αυτή η αντιοξειδωτική και βακτηριοκτόνος δράση, όπως και άλλες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία είναι εξαιρετικά ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου. Άλλα συστατικά του ελαιολάδου είναι τα οξέα καφεϊκό, βαννιλικό, συριγγικό και κουμαρικό. Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες.

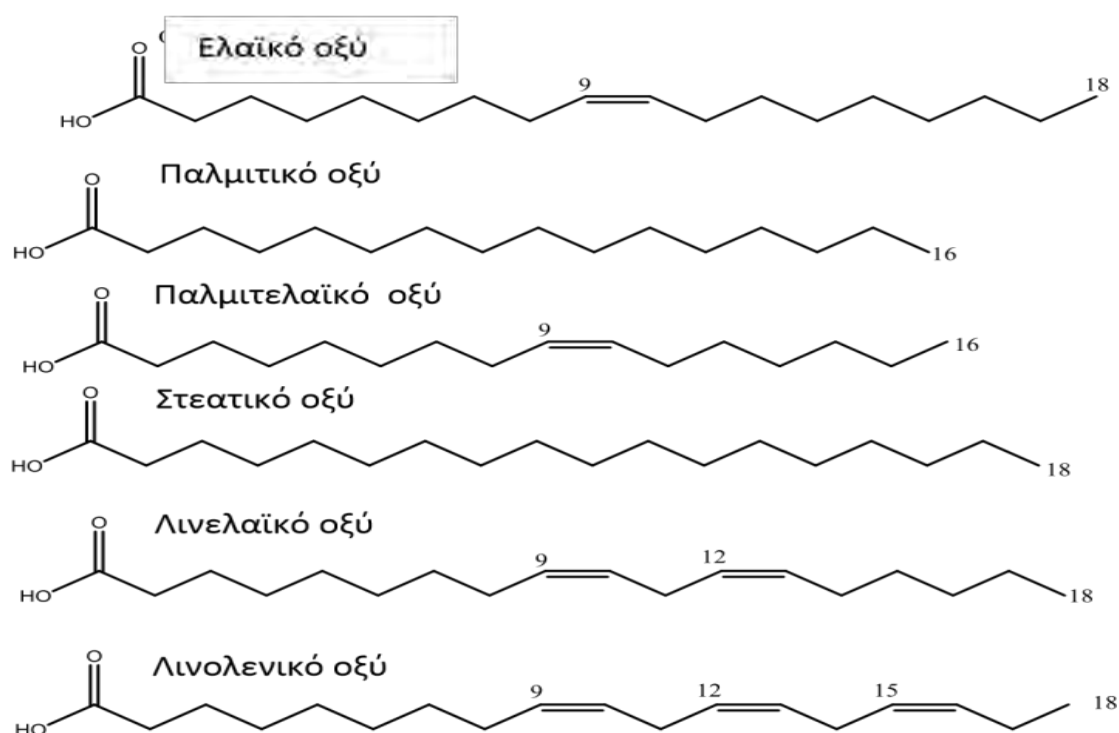
Γενικά οι ουσίες που περιέχονται στο ελαιόλαδο έχουν καρδιοπροστατευτικό και νευροπροστατευτικό ρόλο και ενδοκυτταρικά ενδέχεται να μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και να δημιουργούν ένα λιγότερο οξειδωτικό περιβάλλον. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου καταστέλλουν την προσκόλληση της ομοκυστεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανεξάρτητα από την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, διαπιστώθηκε πως οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου επιδρούν στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα 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. Χαμηλότερες δόσεις αυτής της ένωσης ήταν ικανές για την προστασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων *in vitro* και την αποτροπή της αιμόλυσης. Επίσης, αποτελέσματα ερευνών αποδεικνύουν ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου, έχουν μια ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση

ακόμη μεγαλύτερη από εκείνη των άλλων φαινολικών ενώσεων των τροφίμων ή των συνθετικών βιοκτόνων (Castaner et al., 2011; Cicerale, Conlan, Giacosa et al., 2013; Kalogerakis, Politi, Foteinis, Chatzisyneon, & Mantzavinos, 2013; Yamada et al., 2009) .

#### 1.2.4 Σαπωνοποιήσιμα συστατικά του ελαιολάδου

##### Λιπαρά οξέα

Η σύνθεση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία της ελιάς και κατά δεύτερο λόγο από τις κλιματολογικές συνθήκες, το υψόμετρο και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού (Aparicio et al. 1994; Gómez-Rico et al. 2007; FGutiérrez et al. 1999). Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο ελαιόλαδο σε μεγαλύτερη αναλογία, κατά αύξοντα αριθμό ατόμων άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας, είναι: το παλμιτικό (C16:0), το παλμιτελαϊκό (C16:1), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1), το λινελαϊκό (C18:2) και το λινολενικό (C18:3).



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση της δομής των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου

### *Τριακυλογλυκερόλες*

Στη σύνθεση των διαφόρων τριακυλογλυκερολών χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά λιπαρά οξέα. Επειδή σε κάθε μόριο τριακυλογλυκερόλης είναι δυνατό να περιέχονται τρία μόρια του ίδιου λιπαρού οξέος, είτε και δύο ή τρία μόρια διαφορετικών λιπαρών οξέων, οι δυνατοί συνδυασμοί είναι πάρα πολλοί, και συνεπώς και τα είδη των τριακυλογλυκερολών είναι πάρα πολλά (Boskou et al. 2006).

Στο ελαιόλαδο οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύνθεση των τριακυλογλυκερολών εξαρτώνται κυρίως από τις ποσότητες του ελαϊκού, του παλμιτικού και του λινελαϊκού οξέος. Οι τριακυλογλυκερόλες που βρίσκονται σε σημαντική ποσότητα στο ελαιόλαδο είναι οι OOO (40–59 %), POO (12-20 %), OOL (12,5-20 %), POL (5,5-7 %) και SOO (3-7 %) ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση απαντώνται και οι POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO και LLL όπου O = ελαϊκό οξύ, P = παλμιτικό οξύ, S = στεατικό οξύ, L = λινελαϊκό οξύ και Ln = λινολενικό οξύ (Boskou et al. 2006).

### *Μονο- και διακυλογλυκερόλες*

Οι μονοακυλογλυκερόλες και διακυλογλυκερόλες που απαντώνται στο ελαιόλαδο προκύπτουν από τη μη ολοκληρωμένη βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών ή από αντιδράσεις υδρόλυσης που συμβαίνουν κατά τη συλλογή του ελαιόκαρπου, την παραγωγή ή την αποθήκευση του ελαίου (Amelotti, Daghetta, & Ferrario, 1989; Kiosseoglou & Kouzounas 1993).

### *Φωσφολιπίδια*

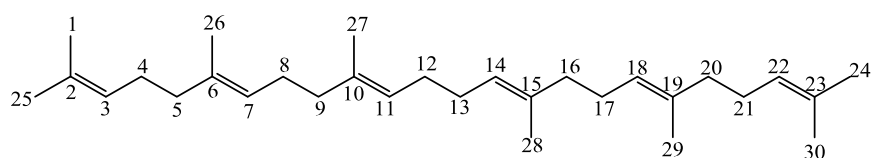
Το ελαιόλαδο περιέχει μία πολύ μικρή ποσότητα φωσφολιπιδίων τα οποία προέρχονται από τον πυρήνα του ελαιόκαρπου. Με χρήση διαφόρων αναλυτικών μεθόδων έχουν ταυτοποιηθεί οι: φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη), λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (κεφαλίνη), σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (Hatzakis et al. 2008; Jiménez et al. 2007; Koidis & Boskou 2006). Τα φωσφολιπίδια, έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και μπορούν να

συμβάλουν στην αύξηση της σταθερότητας ενός ελαίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν συνεργιστική δράση με τις τοκοφερόλες (Hudson&Lewis 1983a; Kashima et al. 1991).

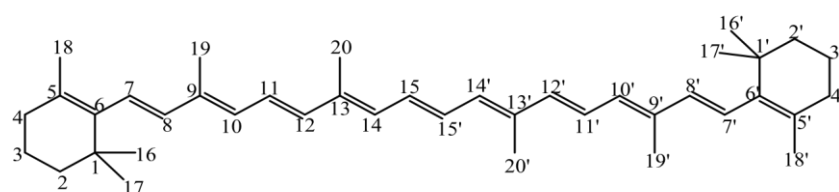
### 1.2.5 Κυριότερα ασαπωνοποίητα συστατικά του ελαιολάδου

#### Υδρογονάνθρακες

Οι σημαντικότεροι υδρογονάνθρακες στο ασαπωνοποίητο μέρος του ελαιολάδου είναι το σκουαλένιο και το β-καροτένιο (το δεύτερο περιγράφεται στις χρωστικές). Το σκουαλένιο, το οποίο απαντάται σε επίπεδα μέχρι και 12,5 g/kg και αποτελεί περισσότερο από 90% του κλάσματος των υδρογονανθράκων (Lanzón et al. 1994; Nenadis & Tsimidou 2002; Owen, Mier, et al. 2000b; Psomiadou & Tsimidou 1999), θεωρείται συστατικό με μεγάλη βιολογική αξία λόγω της προληπτικής δράσης του ως προς κάποια είδη καρκίνου (Newmark 1997). Τα επίπεδα του σκουαλενίου στο παρθένο ελαιόλαδο σχετίζονται με την ποικιλία (Guinda et al. 1996).



Εικόνα 2: Σκουαλένιο



Εικόνα 3: β-καροτένιο

#### Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και συναντώνται σε όλα τα φυτικά λάδια. Οι τοκοφερόλες διακρίνονται ως προς τη θέση και τον αριθμό των μεθυλικών ομάδων σε α-, β-, γ- και δ-, ενώ στο σύνολό τους είναι γνωστές και ως βιταμίνη Ε. Στο ελαιόλαδο απαντάται κυρίως η

$\alpha$ -τοκοφερόλη (μέχρι και 90% επί των συνολικών). Όλες οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά και συγκεκριμένα η σταθερότητα του ελαιόλαδου στην οξείδωση, οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στην παρουσία αυτών των ενώσεων. Η διακύμανση που παρατηρείται στη βιβλιογραφία, όσον αφορά τη συγκέντρωση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης ανά κιλό ελαιόλαδου, οφείλεται στη ποικιλία, σε τεχνολογικούς παράγοντες, στο στάδιο ωρίμανσης του καρπού κ.α. (Beltrán et al. 2005; Psomiadou & Tsimidou 1998). Επεξεργασίες όπως είναι ο εξευγενισμός και η υδρογόνωση προκαλούν μείωση στη συγκέντρωση των τοκοφερολών (Andrikopoulos et al. 1989). Η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες των ελληνικών ελαιόλαδων κυμαίνεται από 98 έως 370 mg/kg ελαίου (Psomiadou et al. 2000).

#### ***Φαινολικά Συστατικά***

Ο όρος βιοφαινόλες χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο εναλλακτικά αντί των συνήθων όρων φαινόλες ή πολυφαινόλες ή φαινολικές ενώσεις (Harborne 1989; Cuppett et al. 1997; Saija & Uccella 2000; Yanishlieva-Maslarova 2001). Ο όρος υποδηλώνει ότι οι ενώσεις είναι φυσικά μόρια που παρουσιάζουν κάποια ευεργετική επίδραση στον οργανισμό όταν καταναλώνονται καθημερινά (Ho, 1992; Saija&Uccella 2000; Scalbert et al. 2002).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου (C6) με ένα ή περισσότερα υδροξύλια και αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία φυτικών αντιοξειδωτικών. Παρουσιάζουν ιδιαίτερη χρησιμότητα στην άμυνα των φυτών απέναντι σε μικρόβια, έντομα και ζώα, καθώς και από την υπερϊώδη ακτινοβολία. Επιπλέον, συμβάλλουν στις μηχανικές ιδιότητες της δομής του φυτού (π.χ. ελαστικότητα ιστού), στο χρώμα και στο άρωμά τους (Scalbert et al. 2002). Επιπλέον, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για τη σταθερότητα στην οξείδωση και είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσης παρθένου ελαιολάδου στην υγεία (Bendini et al. 2007; Servili et al. 2004; Tasioula-Margari&Tsabolatidou 2015).

Οι φαινολικές ενώσεις του καρπού της ελιάς είναι κυρίως γλυκοζίτες σεκοϊριδοειδών ενώσεων (όπως η ελαιοευρωπαϊνή και ο λιγκστροζίτης), φλαβονών (γλυκοζίτης της λουτεολίνης), φλαβονολών (ρουτίνη), ελενολικού οξέος και του βερμπασκοζίτη (παράγωγο του καφεϊκού οξέος) (Amiot et al. 1989; Ryan et al. 2002) και εντοπίζονται σε όλα τα τμήματα των φυτών από τις ρίζες και



τα στελέχη μέχρι τα φύλλα και τους καρπούς. Με την ωρίμανση του καρπού και την αύξηση της υδρολυτικής δράσης, αυξάνονται οι απλές φαινόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη) καθώς και οι αγλυκόνες της ελαιοευρωπαϊνης και του βερμπασκοζίτη (Gómez-Rico et al. 2008). Η πλειονότητα των φαινολικών ενώσεων αποθηκεύονται σχεδόν αποκλειστικά ως σύμπλοκες ενώσεις, γεγονός που μετριάζει την τοξικότητά τους. Επιπρόσθετα, η σύζευξη ενισχύει τη διαλυτότητα και μπορεί να εμπλέκεται στον περιορισμό ορισμένων φαινολικών ενώσεων σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Ακόμα, η σύζευξη πιθανώς βοηθάει στη μεταφορά των φαινολικών ενώσεων στα κύτταρα (Damtoft et al. 1993; Ryan et al. 2002).

Ως πολικές ενώσεις είναι κατά κανόνα υδατοδιαλυτές, ελάχιστα λιποδιαλυτές και παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση. Λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης συμβάλλουν στην παρεμπόδιση ή την επιβράδυνση της οξείδωσης των ελαίων. Η εισαγωγή στο μόριο της δεύτερης ή τρίτης φαινολικής υδροξυλικής ομάδας αυξάνει σε ανάλογο βαθμό με την αντιοξειδωτική δράση. Στο ελαιόλαδο απαντούν φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο, αλλά σε μικρό βαθμό και από τα φύλλα της ελιάς που πιθανόν να μην έχουν απομακρυνθεί στο αποφυλλωτήριο του ελαιουργείου και αλέθονται με τον καρπό (Servili & Montedoro 2002; Kiritsakis, A. 1998).

Το πιο πολικό μέρος του φαινολικού κλάσματος περιέχει φαινυλαλκοόλες και φαινυλοξέα, ενώ το άπολο μέρος περιέχει τα άγλυκα του λιγκστροσίδη και της ελαιοευρωπαϊνης, διαλδεϋδικές μορφές αυτών των άγλυκων, τις φλαβόνες λουτεολίνη και απιγενίνη και τα λιγνάνια 1-ακετοξυπινορεξινόλη και πινορεξονόλη (Bendini et al. 2007).

Στην κατηγορία αυτή βρίσκονται επίσης η τυροσόλη (4-υδρόξυφαινυλο αιθανόλη) και η υδρόξυ-τυροσόλη (2- (3,4-διϋδρόξυφαινυλο αιθανόλη) που είναι τα πιο άφθονα μόρια στο ελαιόλαδο, και συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον καρπό και στα φύλλα του ελαιόδεντρου. Με το πέρασμα του χρόνου αποθήκευσης του ελαιολάδου και καθώς τα πιο σύνθετα μόρια αποδομούνται η παρουσία τους γίνεται πιο έντονη (Cinquanta et al. 1997).

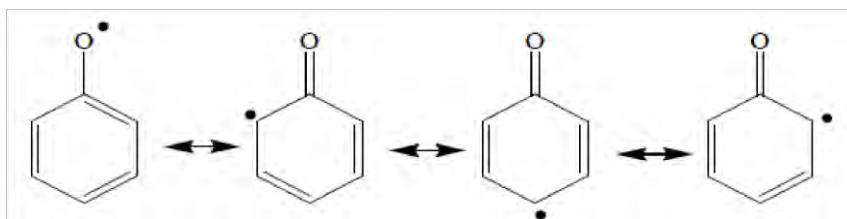
Τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται για πληθώρα δράσεων όπως η αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτική κτλ (Bendini et al. 2007; Fito et al. 2000; Kohyama et al. 1997).

### 1.3 Σχέση δομής-αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοφαινολών

Οι βιοφαινόλες όπως και τα συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά ανήκουν στην κατηγορία των πρωτοταγών αντιοξειδωτικών. Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά δρουν δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες με μετατροπή τους σε σταθερά προϊόντα. Για την εξήγηση της δράσης των βιοφαινολών γίνονται δεκτοί δύο μηχανισμοί (Gordon 1990). Ο πρώτος, που είναι και ο σημαντικότερος από κινητική άποψη, περιλαμβάνει την απευθείας απόδοση ατόμου υδρογόνου από το φαινολικό υδροξύλιο προς τις υπεροξυ-(ROO·) ή τις αλκοξυ-(RO·) ρίζες και την αντίστοιχη μετατροπή τους σε υδροϋπεροξειδία (ROOH) ή υδροξυ- παράγωγα (ROH) (Αντιδράσεις R. 1 και R. 2). Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει δύο στάδια. Η AH (βιοφαινόλη) ανάγει την ROO· προς το αντίστοιχο ανιόν με απόδοση μονήρους ηλεκτρονίου και στη συνέχεια ακολουθεί μετατροπή του ανιόντος σε υδροϋπεροξειδίο (Αντίδραση R. 3).



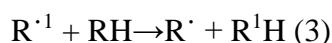
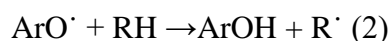
Με βάση τα υπάρχοντα στοιχεία στη βιβλιογραφία η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών θα μπορούσε να εξηγηθεί ως εξής: Οι φαινοξυ-ρίζες (A·) που παράγονται είναι λιγότερο δραστικές από τις ROO· και RO· καθώς σταθεροποιούνται λόγω δομών συντονισμού (Εικόνα 4).



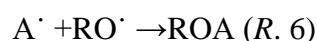
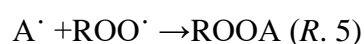
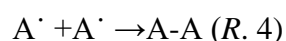
**Εικόνα 4:** Σταθεροποίηση φαινοξυ-ρίζας λόγω δομών συντονισμού

Η σταθερότητα της ρίζας ArO· ελαττώνει την ταχύτητα των αντιδράσεων διάδοσης της αυτοξειδωσης διότι οι αντιδράσεις διάδοσης στις οποίες συμμετέχει

π.χ. με το ακόρεστο λιπίδιο RH (2) είναι πολύ αργές σε σχέση με εκείνες που θα γίνονταν χωρίς τη συμμετοχή του αντιοξειδωτικού όπως η (3) (Gordon 1990)

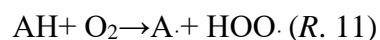


Επίσης οι A $\cdot$  αντιδρούν με ομοειδείς ή άλλου τύπου ελεύθερες ρίζες (π.χ. ROO $\cdot$ ) προς σχηματισμό σταθερών προϊόντων (Αντιδράσεις R. 4-R. 6), (Frankel, 1998).



Όλες οι A $\cdot$  των AH με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση δεσμεύονται με τον παραπάνω τρόπο (R. 4-R. 6). Αντίθετα, στην περίπτωση ασθενών AH είναι δυνατόν να λάβουν χώρα και άλλες παράπλευρες αντιδράσεις που είναι όμως πιο βραδείες σε σχέση με την R. 1. Έτσι, για παράδειγμα, η A $\cdot$  μπορεί να αντιδράσει με το οξυγόνο ( $^3\text{O}_2$ ) της ατμόσφαιρας και στη συνέχεια με το λιπαρό υπόστρωμα (RH), (R. 7 και R. 8) ή απευθείας με το λιπαρό υπόστρωμα (RH) και τα υδροϋπεροξειδία όταν δεν είναι σταθερή (R. 9, R. 10). Επίσης, η ίδια η AH μπορεί να οξειδωθεί απευθείας από το οξυγόνο ή και να αντιδράσει με υπάρχοντα υδροϋπεροξειδία (R.11, R.12) εμφανίζοντας τελικά προοξειδωτική δράση.





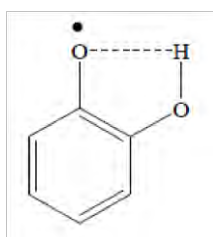
Αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζεται πάνω από μια συγκέντρωση, διαφορετική για κάθε ΑΗ, που ονομάζεται κρίσιμη. Όταν όμως το επίπεδο προσθήκης είναι εξαιρετικά υψηλό αντί της αντιοξειδωτικής μπορεί να παρατηρηθεί και προοξειδωτική δράση (R. 11, R. 12). Όταν η ΑΗ απαντά σε υψηλές συγκεντρώσεις η ταχύτητα των αντιδράσεων R. 1, και R. 2 είναι σταθερή καθώς το περιεχόμενο σε ROO· και RO· είναι περιορισμένο. Υπό αυτές τις συνθήκες αντιδράσεις όπως οι R. 7, R. 11 και R. 12, στις οποίες δεν συμμετέχουν οι παραπάνω ρίζες, γίνονται πιο σημαντικές με αποτέλεσμα την παραγωγή R· (R. 8 και R. 9). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ΑΗ που μπορεί να εμφανίσει προοξειδωτική δράση με αύξηση της συγκέντρωσης είναι η α-τοκοφερόλη (Pokorny, 1987).

Όπως γίνεται φανερό η αντιοξειδωτική ικανότητα των ΑΗ εξαρτάται αφενός από την ευκολία απόδοσης ατόμου υδρογόνου προς τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου από τη σταθερότητα της φαινοξυ-ρίζας A·. Καθοριστικό ρόλο και στις δύο περιπτώσεις παίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά της ΑΗ όπως η υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο. Ο ρόλος των δομικών χαρακτηριστικών στην αντιοξειδωτική ικανότητα των πρωτοταγών αντιοξειδωτικών, όπως οι συνθετικές και φυσικές φαινόλες, έχουν περιγραφεί σε μονογραφίες και σε άρθρα επισκόπησης (Pokorny 1987; Gordon 1990; Rice-Evans et al. 1996; Cuppett *et al.* 1997; Yanishlieva 2001)

Έτσι η απλή φαινόλη δεν εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση παρά μόνο όταν υπάρχει υποκατάσταση σε ο- ή π- θέση με ομάδες δότες ηλεκτρονίων (π.χ. υδροξυ-, αλκυλο-, μεθοξυ-) που προκαλούν αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο φαινολικό υδροξύλιο. Με τον τρόπο αυτό ελαττώνεται η ενέργεια του δεσμού υδρογόνου-οξυγόνου και είναι δυνατή η ευκολότερη απόδοση ατόμου υδρογόνου προς τις ROO·. Η υποκατάσταση σε μ- θέση δεν επιφέρει κάποια βελτίωση στην αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς σε μια τέτοια θέση οι υποκαταστάτες έχουν ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα.

Προϋπόθεση για καλή αντιοξειδωτική συμπεριφορά είναι η σταθερότητα της A· καθώς, διαφορετικά, αυτή θα δράσει προοξειδωτικά συμμετέχοντας σε

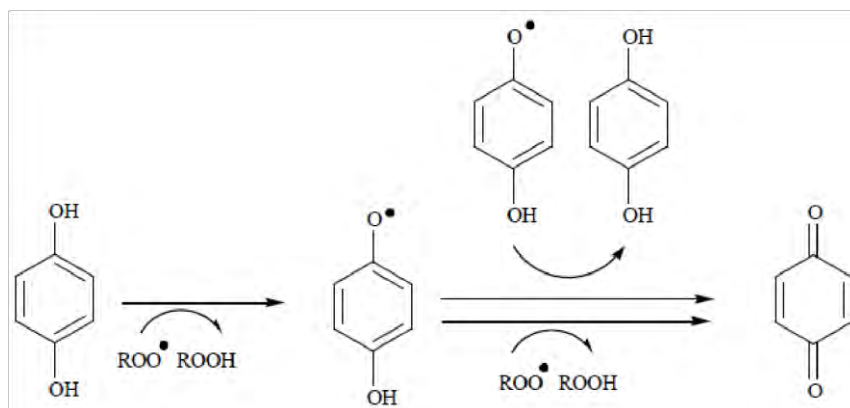
παράπλευρες αντιδράσεις (*R.* 7-*R.* 10). Η σταθεροποίησή της οφείλεται σε δομές συντονισμού (Εικόνα 5). Περαιτέρω σταθεροποίηση είναι δυνατή με την υποκατάσταση σε *ο*- θέση με υδροξυ- ή με ογκώδεις αλκυλο- ομάδες. Στην πρώτη περίπτωση η εισαγωγή δεύτερης υδροξυ- ομάδας οδηγεί σε σταθεροποίηση της φαινοξυ-ρίζας λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου (Εικόνα 5). Κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό όταν υπάρχει άλλου τύπου υποκατάσταση και για αυτό οι μονοφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλότερη δραστηριότητα.



**Εικόνα 5:** Σταθεροποίηση φαινοξυ-ρίζας *ο*-διφαινόλης λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου

Η παρουσία ογκωδών υποκαταστατών, όπως για παράδειγμα, δύο τριτοταγών βουτυλο- ομάδων στην ένωση BHT (βουτυλο-υδροξυτολουένιο), αν και δεν ευνοεί το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου, προκαλεί φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης. Με τον τρόπο αυτό αντιδράσεις όπως οι *R.* 9 και *R.* 10 επιβραδύνονται, καθώς η ρίζα δεν μπορεί να προσεγγίσει εύκολα το λιπαρό υπόστρωμα ή τα υδροϋπεροξειδία και να αλληλεπιδράσει μαζί τους. Το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της φαινόλης. Από όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, η υποκατάσταση της φαινόλης με υδροξυ- ομάδες έχει τη μεγαλύτερη σημασία για την αποτελεσματικότητα των ΑΗ. Εκτός από την πρόσθετη σταθεροποίηση που προσφέρει στην Α·, η ημικινοειδής ρίζα που παράγεται αρχικά μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω με αντίδρασή της με δεύτερη ROO· προς κινόνη παρέχοντας και δεύτερο άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες (Εικόνα 6). Επίσης είναι δυνατή η αλληλεπίδραση δύο Α· που μπορούν να οδηγήσουν σε αναγέννηση ενός μορίου της αρχικής ΑΗ. Η σημασία της παρουσίας πρόσθετων υδροξυ- ομάδων φαίνεται όταν υπάρχει και τρίτη στην ΑΗ. Έτσι η πυρογαλλόλη και τα παράγωγά της (π.χ. γαλλικό οξύ) είναι οι πλέον αποτελεσματικές φαινόλες. Ωστόσο, περισσότερες από τρεις υδροξυ- ομάδες στον

αρωματικό δακτύλιο δεν ενισχύουν περισσότερο τη δραστηριότητα. Αύξηση της αποτελεσματικότητας παρατηρείται επίσης όταν υπάρχει και δεύτερος δακτύλιος με κατεχολική ομάδα στο μόριο της ΑΗ.



**Εικόνα 6:** Οξείδωση 1,4-διφαινόλης προς κινόνη κατά τη διαδοχική αντίδραση με δύο υπεροξυ-ρίζες

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται φανερό, ότι οι σχέσεις δομής-αντιοξειδωτικής ικανότητας (Structure Activity Relationship, SAR) που έχουν αναπτυχθεί ερμηνεύουν την αντιοξειδωτική δράση με τα φαινόμενα που εισάγουν οι διάφοροι υποκαταστάτες. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ΑΗ καθορίζεται από τα δομικά χαρακτηριστικά της ενώ οι SAR εξαρτώνται από το υπόστρωμα στο οποίο γίνεται η μελέτη, τις συνθήκες της αντίδρασης (π.χ. θερμοκρασία, συγκέντρωση ΑΗ) και τελικά την έκφραση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Καθώς οι παραπάνω σχέσεις έχουν προκύψει κυρίως με πειραματικές μεθόδους, διατυπώθηκαν διάφορες θεωρίες ή υποθέσεις για την ερμηνεία κανονικοτήτων ή μη αναμενόμενων συμπεριφορών των ΑΗ. Έτσι, για παράδειγμα, η υπόθεση του πολικού παράδοξου (polar paradox) (Porter 1980), διατυπώθηκε για την ερμηνεία της δραστηριότητας πολικών και μη πολικών ΑΗ σε διάφορα λιπαρά υποστρώματα ή ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων με ιόντα μεταβατικών μετάλλων από ΑΗ όπως τα φλαβονοειδή σε λιπαρά υποστρώματα (Hudson & Lewis 1983b).

#### 1.4 Ενθυλάκωση

Η ενθυλάκωση είναι η τεχνολογία που χρησιμοποιείται για εγκλεισμό ευαίσθητων συστατικών ( βιοενεργά συστατικά, βιταμίνες, αρώματα κλπ) μέσα σε προστατευτικά πλέγματα από άλλα υλικά (υδατάνθρακες, μαλτοδεξτρίνες, κολλοειδή κλπ) ώστε να

προστατευθούν από δυσμενείς επιδράσεις του περιβάλλοντος το οποίο βρίσκονται ή κατά την εφαρμογή επεξεργασιών το οποίο υφίστανται. Ευαίσθητα συστατικά στη θερμότητα ή την οξείδωση μπορούν να προστατευτούν με εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας. Κατά την ενθυλάκωση έχουμε από τη μία την ουσία η οποία πρόκειται να ενθυλακωθεί (load) και από την άλλη έναν αμφίφιλο φορέα ενθυλάκωσης (carrier). Αυτές οι δύο ουσίες ομογενοποιούνται σε νερό και κατόπιν το εναιώρημα που προκύπτει διοχετεύεται σε ειδικά μηχανήματα που πραγματοποιούν την ενθυλάκωση.

Επίσης, με την κατάλληλη επιλογή του μέσου μέσα στο οποίο θα προστατευθεί το ευαίσθητο υλικό, μπορεί να ελεγχθεί και ο χρόνος απελευθέρωσης του ώστε να προκύψει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

#### 1.4.1 Μέθοδοι Ενθυλάκωσης

Αντίστοιχη μέθοδος ξήρανσης και ενθυλάκωσης είναι και η λυοφιλίωση και την οποία χρησιμοποιήσαμε. Λυοφιλίωση, η οποία βασίζεται στην εξάτμιση του νερού σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και εφαρμόζεται στην επεξεργασία ουσιών που διασπώνται ή αλλοιώνονται εύκολα με τη θέρμανση. Ο όρος λ. (αλλιώς, λυοφίλιση) προέρχεται από το γεγονός ότι οι ουσίες που αφυδατώνονται με τη μέθοδο αυτή εμφανίζουν μια πολύ εκτεταμένη επιφάνεια και, συνεπώς, είναι αρκετά υγροσκοπικές (λυόφιλοι). Η απορρόφηση του νερού από μια ουσία που λυοφιλιώνεται είναι ταχύτερη, ακόμα και αν η ουσία αυτή είναι λίγο διαλυτή ή αδιάλυτη· στη δεύτερη περίπτωση, η προσθήκη νερού προκαλεί τον άμεσο σχηματισμό ενός γαλακτώματος ή ενός κolloειδούς διαλύματος.<sup>[P]</sup>Επειδή η τάση των ατμών του νερού κάτω του σημείου της πήξης του (0°C) είναι ελάχιστη, η εξάτμιση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μόνο με τη βοήθεια ενός πολύ υψηλού κενού, με πιέσεις που φτάνουν την τάξη των 10 mm στήλης υδραργύρου. Με ένα κενό σχεδόν απόλυτο, των 1-2 mm στήλης υδραργύρου, είναι δυνατή η επίτευξη ξήρανσης μέχρι τους – 75°C. Στη λ., η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την απευθείας μετατροπή του νερού από τη στερεά κατάσταση του πάγου στην κατάσταση του ατμού, χωρίς να μεσολαβήσει υγρή κατάσταση, δηλαδή με εξάχνωση.<sup>[P]</sup>Οι παράγοντες που ενεργούν ώστε να διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα τα χημικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ξηραίνόμενων ουσιών είναι ουσιαστικά η χαμηλή θερμοκρασία,

οι συνθήκες του υψηλού κενού και η απευθείας εξάχνωση του νερού. Οι δύο πρώτες συνθήκες αποτρέπουν τις αλλοιώσεις που οφείλονται στη θέρμανση και στην οξείδωση από το οξυγόνο του αέρα, ενώ η εξάχνωση αποτρέπει την απώλεια συστατικών.

Σκοπός της ενθυλάκωσης στην παρούσα μελέτη, είναι να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα χρησιμοποιώντας ως ενθυλακωτικό μέσο τη μαλτοδεξτρίνη παρουσία γλυκομαννάνης.

## **1.5 Χοληστερόλη**

### **1.5.1 Ορισμοί και Κατηγορίες**

Η χοληστερίνη ή χοληστερόλη είναι κηρώδης στερόλη που βρίσκεται στη μεμβράνη των κυττάρων όλων των ιστών του σώματος, και στο πλάσμα του αίματος όλων των ζώων. Μικρότερες ποσότητες χοληστερίνης συναντώνται στις μεμβράνες των φυτών. Ουσιαστικά πρόκειται για μια λιπαρή ουσία, απαραίτητη για τη λειτουργία των κυττάρων, όπως και για την παραγωγή και το μεταβολισμό των ορμονών. Η χοληστερόλη που υπάρχει στον οργανισμό μας προέρχεται από δύο πηγές: την τροφή και το συκώτι, το οποίο παράγει την απαραίτητη ποσότητα χοληστερόλης που χρειαζόμαστε.

Ένα μεγάλο τμήμα των λιπιδίων είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό. Για να μπορούν να μεταφερθούν λοιπόν διά του αίματος έως το σημείο όπου θα χρησιμοποιηθούν, θα πρέπει να αποκτήσουν μία διαλυτή μεταφερόμενη μορφή. Τη μορφή αυτή αποκτούν τα λιπίδια όταν ενωθούν με ειδικά πρωτεϊνικά μόρια, τις απολιποπρωτεΐνες, με τις οποίες σχηματίζουν μακρομοριακές σύμπλοκες ενώσεις. Οι μορφές μεταφοράς είναι ποικίλες. Οι μεν έχουν μοριακά μεγέθη – λιποπρωτεΐνες και οι δε είναι μικροσκοπικά ορατά σωματίδια – χυλομικρά. Οι λιποπρωτεΐνες βρίσκονται είτε στο πλάσμα του αίματος, ή είναι συστατικά της μεμβράνης των κυττάρων. Η ταξινόμηση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, βασίζεται κύρια στην πυκνότητά τους. Έχει αποδειχθεί ότι οι λιποπρωτεΐνες είναι σφαιρικά σωματίδια, στο εσωτερικό των οποίων βρίσκονται υδρόφοβα λιπίδια, όπως οι τριακυλογλυκερόλες, οι εστέρες της γλυκερόλης και στο εξωτερικό τμήμα το οποίο βρίσκεται σε επαφή με



το πλάσμα, περιέχονται αμφίφιλα λιπίδια, όπως: η φωσφατιδυλοχολίνη. Τα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεϊνικής σύστασης, είναι τοποθετημένα κύρια στο εσωτερικό τμήμα, ενώ τα υδρόφιλα κύρια στην επιφάνεια των σωματιδίων.

Στις μεταφερόμενες λιποπρωτεΐνες, έχουν βρεθεί 5 είδη απολιποπρωτεϊνών: A, B, C, D και E. και τα 5 είδη παράγονται στο ήπαρ. Η απολιποπρωτεΐνη B παράγεται επίσης και στο έντερο.

Η σύνδεση των λιποπρωτεϊνών και των λιπιδίων δεν γίνεται με ομοιοπολικούς δεσμούς, όπως γίνεται στις γλυκοπρωτεΐνες, μεταξύ της πρωτεΐνης και του υδατανθρακικού τμήματος, αλλά με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις – υδρόφοβους δεσμούς (όπως και στη δημιουργία των μεμβρανών).

Με βάση την πυκνότητά τους ταξινομούνται σε λιποπρωτεΐνες:

- Χυλομικρά (CM)
- Πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoproteins – VLDL)
- Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL)
- Χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoproteins – LDL)
- Υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoproteins – HDL)

(Παπαϊωάννου Α., Πλαγεράς Π. 2012 )

### 1.5.2 Προσδιορισμός και Επίπεδα LDL Χοληστερόλης

Οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες αποτελούν την τελική μορφή αποικοδόμησης των VLDL. Περιέχουν κυρίως χοληστερόλη την οποία μεταφέρουν στους ιστούς και την εναποθέτουν ως επί το πλείστον στα κύτταρα που φέρουν ειδικούς υποδοχείς LDL. Τέτοιους υποδοχείς διαθέτουν τα ηπατικά κύτταρα αλλά και κύτταρα εκτός ηπατικών ιστών όπως τα λεμφοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι λείες μυϊκές ίνες, οι ινοβλάστες, ο φλοιός των επινεφριδίων, κ.τ.λ.

Οι περισσότεροι ερευνητές διακρίνουν περίπου 5 βασικά υποκλάσματα ή υποκατηγορίες LDL. Πρόκειται για ετερογενή μεταξύ τους σωματίδια που έχουν διαφορές:

- α) στη χημική τους σύσταση (πυρήνας & επιφάνεια)
- β) στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέγεθος, πυκνότητα)

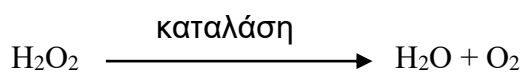
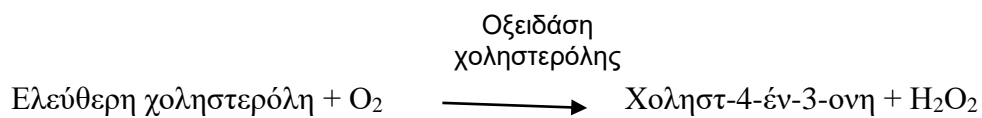
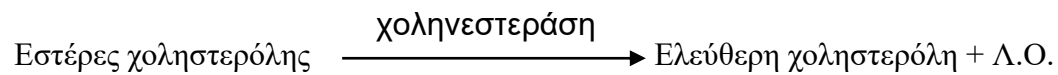
Ο προσδιορισμός της LDL – χοληστερόλης πραγματοποιείται με ενζυμική μέθοδο δύο σταδίων.



**Εικόνα 7:** Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL)

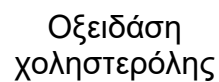
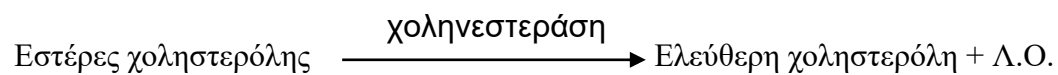
### Στάδιο πρώτο

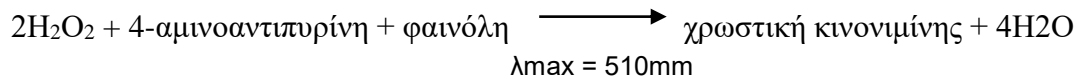
Αρχικά πραγματοποιείται η διάσπαση των HDL, VLDL και των χυλομικρών:



### Στάδιο δεύτερο

Πραγματοποιείται η διάσπαση των LDL:



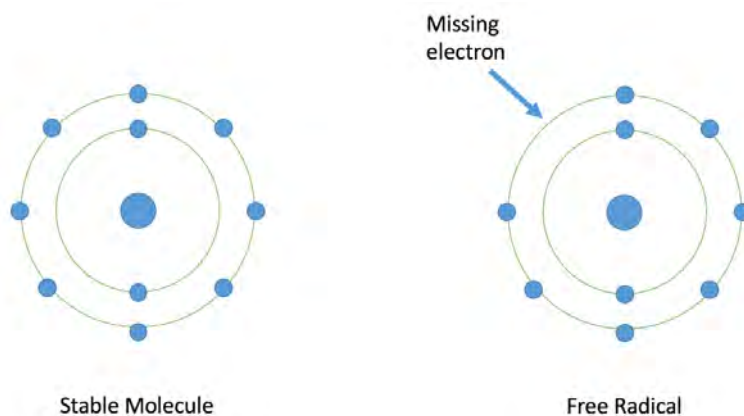


Η ποσότητα της κινονιμίνης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της χοληστερόλης που περιέχεται στις LDL.

### 1.6 Ελεύθερες ρίζες

Τα άτομα αποτελούνται από έναν πυρήνα, ο οποίος περιέχει πρωτόνια και νετρόνια. Γύρω από τον πυρήνα περιστρέφονται τα ηλεκτρόνια σε τροχιακά. Σε κάθε τροχιακό υπάρχει η δυνατότητα να συνυπάρχουν δύο ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλα spin που λειτουργούν ως ζεύγος. Η δομή αυτή κάνει τα άτομα πιο σταθερά.

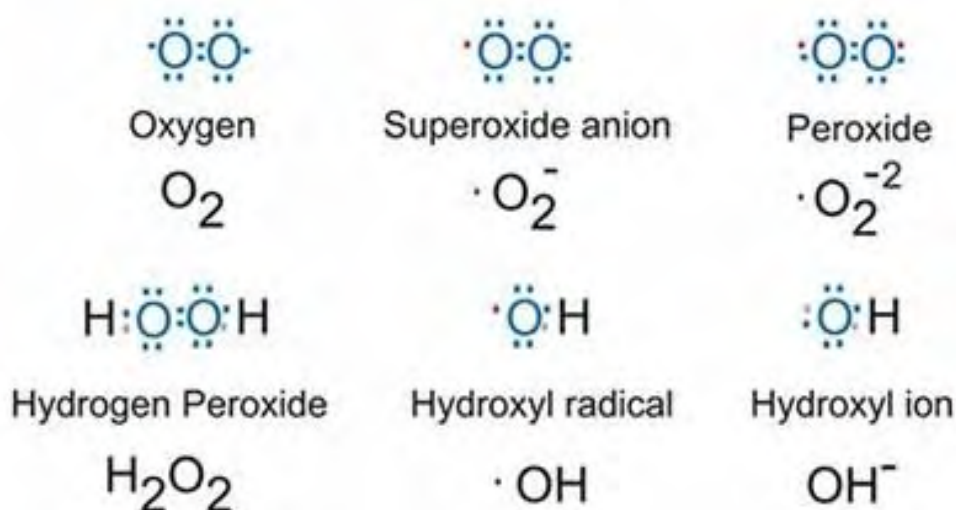
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins 1988). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς δομές με σύντομη διάρκεια ζωής αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο με στόχο να συζευχθεί με το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της μοριακής τάξης και την πυροδότηση μίας αλυσιδωτής αντίδρασης που οδηγεί σε κυτταρική βλάβη (J. G. Salaway, 2006). Ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν και μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή (ή ακόμα και πολυμερή) αν δύο (ή περισσότερες από αυτές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι σταθερές μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε αδρανή μέσα (συνήθως ευγενή αέρια) ή σε κενό.



**Εικόνα 8:** Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με δύο διακριτούς τρόπους. Ο συνηθέστερος για τα βιολογικά συστήματα είναι μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Εναλλακτικά, σχηματισμός ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ομοιοπολικής διάσπασης, κατά την οποία το ζεύγος των ηλεκτρονίων είτε θα παραμείνει στο μητρικό μόριο και θα σχηματιστούν δύο ιόντα, είτε θα διαχωριστεί και θα προκύψουν δύο ρίζες.

Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, το οποίο διαθέτει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Στο εσωτερικό των κυττάρων οι συνηθέστερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στις οποίες συγκαταλέγονται οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), αλκοξειδίου ( $\text{RO}\cdot$ ) και υπεροξειδίου ( $\text{RO}_2\cdot$ ), καθώς επίσης και τα ανιόντα σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) και υπεροξειδίου ( $\text{O}_2\cdot^{-2}$ ). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman & Slater 1993). Στις **ROS** επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $\text{HOCl}$ ) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2015).



**Εικόνα 9:** Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν επίσης και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), με συνηθέστερα εμφανιζόμενη στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO\cdot$ ). Η ρίζα  $NO\cdot$  παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη και είναι πολύ δραστική. Επιπρόσθετα, έχει μεγάλη βιολογική σημασία, καθώς χρησιμεύει στη μεταγωγή σήματος μεταξύ των κυττάρων, συμμετέχει στην αγγειοσυστολή και είναι νευροδιαβιβαστής (Halliwell & Gutteridge, 2007). Τέλος, ελεύθερες ρίζες αποτελούν και οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο, καθώς και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny 2001).

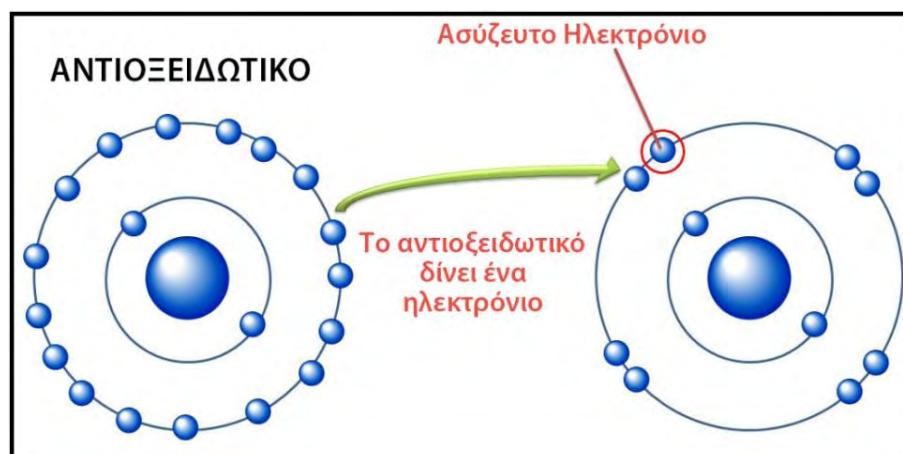
### 1.7 Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, οι ελεύθερες ρίζες είναι τοξικές για όλους τους οργανισμούς και κυρίως για τους αερόβιους, οι οποίοι έρχονται σε άμεση επαφή με το  $O_2$ . Έτσι, η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών τους οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών, που αφορούν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, οι οργανισμοί που διαθέτουν δυνατότητα κίνησης μπορούν έμμεσα να αποφύγουν το οξειδωτικό στρες, αποφεύγοντας περιοχές υψηλής πίεσης  $O_2$ , όπως έχει παρατηρηθεί στα βακτήρια, ενώ στους πολυκύτταρους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί αποδοτικοί τρόποι μεταφοράς και τροφοδότησης των ιστών με οξυγόνο διατηρώντας όσο το δυνατόν τα επίπεδα του χαμηλά. Εκτός όμως

από αυτούς, έχουν εξελιχθεί ειδικότεροι κυτταρικοί βιοχημικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας που αντισταθμίζουν άμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

### 1.7.1 Αντιοξειδωτική ουσία

Οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων ορίζεται ως *αντιοξειδωτική ουσία* (Krinsky, 2002)(Kaplan et al., 2001).



**Εικόνα 10:** Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικού

Για την εξάλειψη του οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητη η ύπαρξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών από τον οργανισμό. Ο οργανισμός μας είναι εφοδιασμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα από την φύση του για να αμύνεται στην δράση των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου.

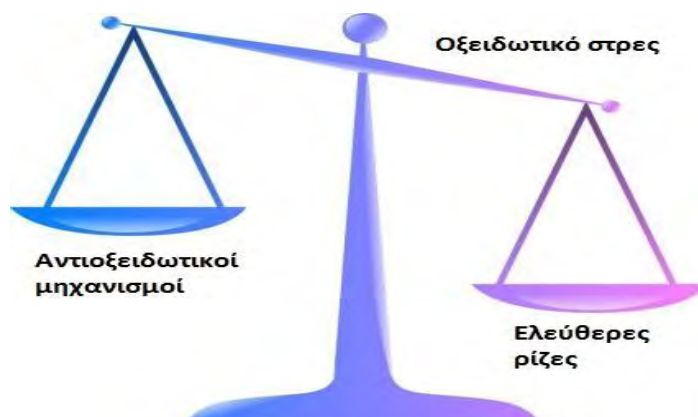
### 1.7.2 Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους:

1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.
2. Συμβάλουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.
3. Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με την εξουδετέρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
4. Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μέταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
5. Δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

## 1.8 Οξειδωτικό στρες

Σε φυσιολογικές συνθήκες ή σε κατάσταση ηρεμίας οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Ο όρος αυτός, έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 2007, Dotan, 2004). Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής μπορεί οφείλεται αφενός σε μειωμένη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων και αφετέρου σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαιτίας παρατεταμένης έκθεσης σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα. Έτσι, η εμφάνισή του εξαρτάται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες και εμπλέκεται στη παθογένεια πολλών νοσημάτων (Mylonas C and Kouretas D., 1999; Meeus M. Et al., 2013). Το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί τόσο αιτία όσο και αποτέλεσμα ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001).



**Εικόνα 11:** Οξειδωτικό στρες

## 1.9 Επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε στην οξείδωση της LDL

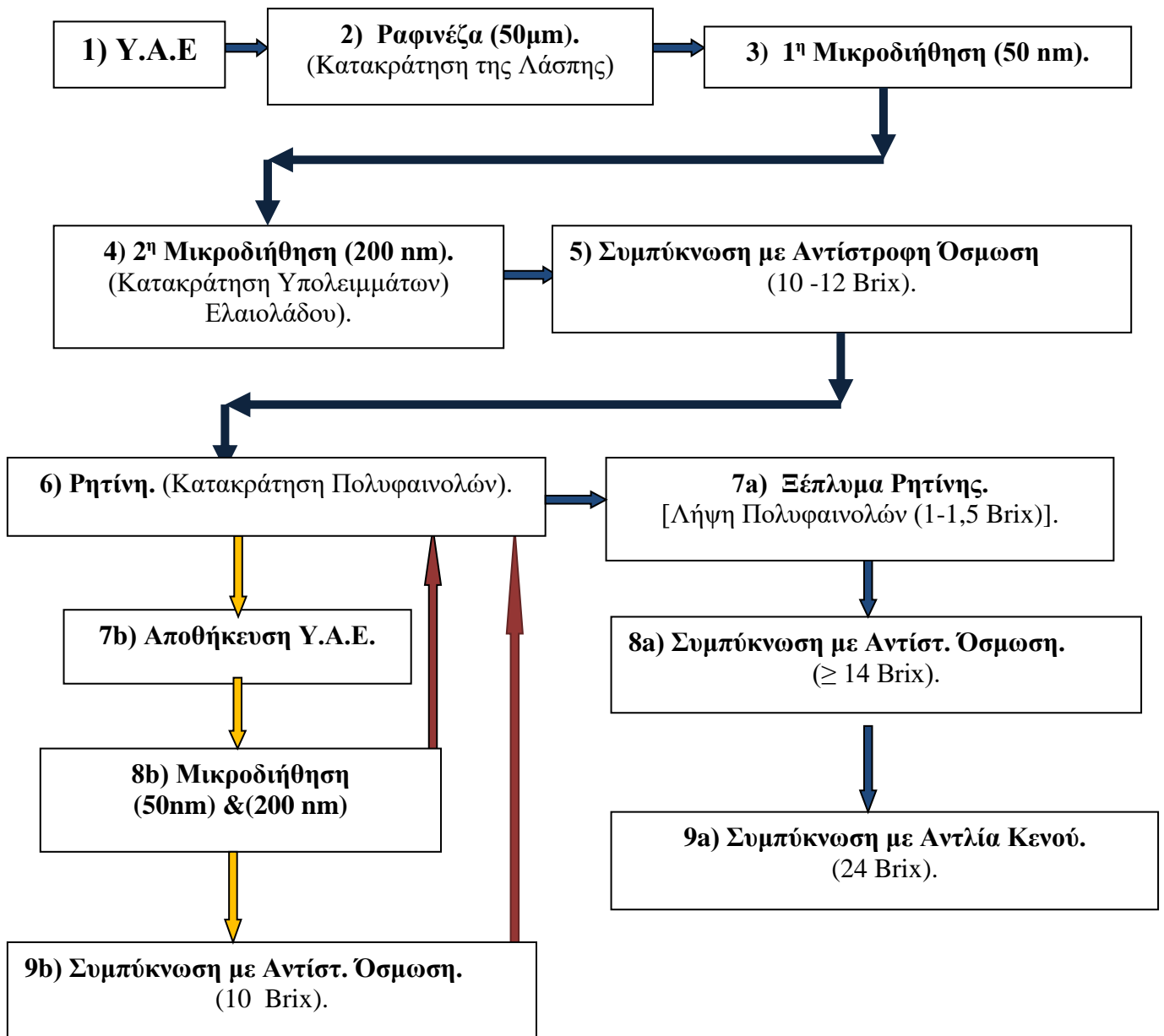
Η οξείδωση της LDL (ox-LDL) θεωρείται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου (Witztum, 1994). Η οξείδωση της LDL προκαλεί βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα, διεγείροντας την πρόσληψη μακροφάγων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της πλάκας εντός του αρτηριακού τοιχώματος (Fito, 2005). Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (in vivo) έχουν δείξει ότι το επίπεδο στο οποίο η LDL οξειδώνεται, μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών (Covas et al., 2006; Nicolaiew et al., 1998; Ramirez-Tortosa et al., 1999).

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1 Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου**

Παρουσιάζεται διαγραμματικά η πατενταρισμένη διαδικασία επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων, από την εταιρεία POLYHEALTH, με έδρα την Λάρισα, για την λήψη πολυφαινολικού υγρού.





**Εικόνα 12:** Μέθοδος επεξεργασίας υγρών αποβλήτων

## 2.2 Κρυοξήρανση – Ενθυλάκωση με Freeze Drying.

Η κρυοξήρανση ή λυοφιλοποίηση είναι μία μέθοδος αφυδάτωσης, που χρησιμοποιείται συνήθως για την διατήρηση ευαίσθητων υλικών ή να τα καταστήσει ικανά, για πιο ασφαλή μεταφορά. Χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση του πλάσματος του αίματος, χωρίς την ανάγκη ψύξης και την παραγωγή στιγμιαίου καφέ.

Από τότε, η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για τη διατήρηση εκατοντάδων διαφορετικών ειδών τροφίμων και φαρμάκων. Τα λυοφιλωμένα προϊόντα έχουν μακρά διάρκεια ζωής: σε σφραγισμένη συσκευασία που προστατεύονται από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια. Η ξήρανση των διαλυμάτων και η λήψη των δειγμάτων,

σε μορφή σκόνης, για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτελέστηκε στην συσκευή *Freeze Dryer, CoolSafe*, με κατασκευάστρια εταιρεία την *SCANVAC*, από την Δανία.

### 2.2.1 Αρχή λειτουργίας Κρυοξήρανσης

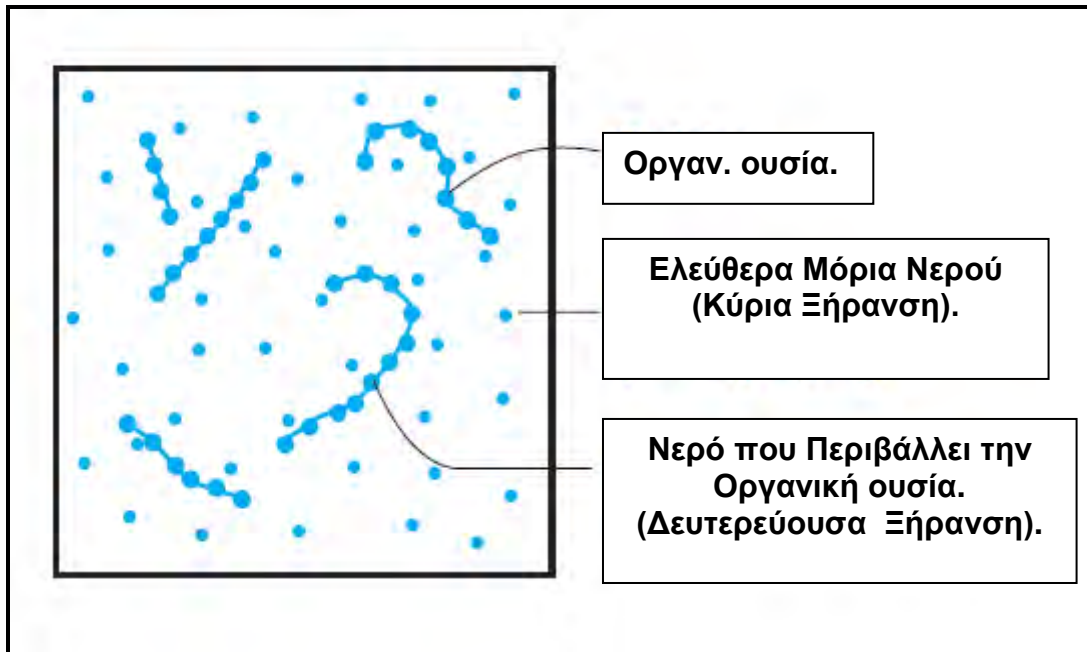
Η λειτουργία περιγράφεται ως εξής: Κατεβάζοντας σε μεγάλο βαθμό την θερμοκρασία (-110 °C) και ελαττώνοντας την πίεση που περιβάλλει το υλικό, με την βοήθεια αντλίας, το νερό που βρίσκεται στο υλικό, από την στερεά φάση, μεταβαίνει στην αέρια φάση. Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξεως του 1-4%, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και μούχλας, αλλά και τη δράση των ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις αλλοίωσης στο προς ξήρανση υλικό. Ο κατασκευαστής περιγράφει τέσσερα (4) στάδια στο *Freeze Drying*.

α) Πριν την Ξήρανση. (*Pre – Freeze step*).

β) Δημιουργία Κενού. (*Vacuum step*). Εδώ, αφαιρείται ο αέρας και έτσι μειώνεται η πίεση στο σύστημα.

γ) Κύρια Ξήρανση. (*Primary Drying step*). Το νερό μετακινείται από το προϊόν, σε χαμηλή θερμοκρασία και πίεση, ρέοντας στο σύστημα σαν ατμός (εξάχνωση), προς τον συμπυκνωτή.

δ) Δευτερεύουσα Ξήρανση. (*Secondary Drying step*). Αφαιρείται και το νερό που περιβάλλει τις πρωτεΐνες.



**Εικόνα 13:** Αφαίρεση Νερού από το Freeze Dryer.

### 2.3. Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας *Εκνίνο* σε απομονωμένες Λιποπρωτεΐνες Χαμηλής Πυκνότητας

#### ΥΛΙΚΑ

##### *Για Απομόνωση LDL*

Πλάσμα EDTA από 10 τυχαίους δότες

KBr 0,325 g / ml πλάσματος

Διάλυμα EDTA σε PBS συγκέντρωσης 1 mg/ml

Φίλτρα 0,22μm

##### *Για την οξείδωση*

Απομονωμένες LDL

Στήλη χρωματογραφίας Econo-Pack 10DG της Bio-Rad

Διάλυμα  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , με συγκέντρωση 5μM στην κυψελίδα

Φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2101PC

Κιτ για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης της εταιρείας Ζαφειρόπουλος

## Αντιοξειδωτικό

### 2.3.1 Απομόνωση, καθαρισμός και οξείδωση της LDL

#### Μέθοδος

Μετά από δοκιμές καταλήξαμε ότι οι συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού στην κυβελίδα που δίνουν κάποιο αποτέλεσμα οξείδωσης στις συνθήκες των πειραμάτων μας είναι οι εξής: 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml, 1 mg/ml

Τα δείγματα που δοκιμάστηκαν ήταν 3 συνολικά.

Δείγμα 1: υδατικό διάλυμα

Δείγμα 2: γλυκομαννάνη 40%, πολυφαινόλη 3% και μαλτοδεξτρίνη 57%

Δείγμα 3: γλυκομαννάνη 40%, πολυφαινόλη 6% και λεκιθίνη 54%

#### Απομόνωση LDL

Για το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού αίματος (20ml) σε EDTA, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 στροφές/min επί 10 λεπτά στους 4 °C και στη συνέχεια απομονώθηκαν περίπου 10ml πλάσμα. Η απομόνωση της LDL πραγματοποιήθηκε ύστερα από ανάμιξη του πλάσματος με την κατάλληλη ποσότητα KBr και αφού τοποθετήθηκε κάτω από διάλυμα EDTA σε PBS φυγοκεντρήθηκε στις 50.000 στροφές/min επί 3 ώρες. Στη συνέχεια απομονώθηκε η στιβάδα των LDL, διαβιβάστηκε το διάλυμα μέσα από φίλτρο 0,2 µm και διατηρείται στους 4 °C μέχρι την επόμενη μέρα. Οι λιποπρωτεΐνες διατηρούνται προστατευμένες από την οξείδωση χάρη στο EDTA.

#### Καθαρισμός LDL

Για τον καθαρισμό των LDL από το EDTA προκειμένου να οξειδωθούν στη συνέχεια με χαλκό, το διάλυμα των λιποπρωτεϊνών διαβιβάστηκε σε χρωματογραφική στήλη. Συνολικά, διαβιβάστηκαν 3ml διαλύματος και εκλούστηκαν 6ml με PBS ως κινητή φάση. Η οξείδωση πραγματοποιήθηκε μέσα σε μια ώρα από την έκλυση.

## Οξείδωση LDL

Πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του EDTA, χρωματογραφικά και στη συνέχεια, μέσα στην επόμενη ώρα, υπεβλήθη σε οξείδωση με την προσθήκη διαλύματος  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , στους  $37^\circ\text{C}$  σε φασματοφωτόμετρο παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των παρακάτω εκχυλισμάτων, και η οξείδωση παρακολούθηθηκε στα 234nm για 5 ώρες :

1. Υδατικό διάλυμα πολυφαινολών
2. Υδατικό διάλυμα πολυφαινολών ενθυλακωμένων σε μαλτοδεξτρίνη
3. Υδατικό διάλυμα πολυφαινολών ενθυλακωμένων σε λεκιθίνη

Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Οξείδωση παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών

Από την παρακολούθηση της οξείδωσης της χοληστερόλης προέκυψαν καμπύλες από τις οποίες υπολογίστηκε ο χρόνος καθυστέρησης της οξείδωσης (lag time) και ο ρυθμός οξείδωσης στο τυφλό (χωρίς εκχύλιση) και στα δείγματα παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 1.

Δείγμα	Lag time (min)	% αύξησης lag time	% ελάττωση ρυθμού οξείδωσης
Τυφλό (χωρίς εκχ)	67		
Με 12,5 µg/ml εκχ	67	-	75%
Με 25 µg/ml εκχ	67	-	75%
Με 50 µg/ml εκχ	>300	>347	100%
Με 100 µg/ml εκχ	>300	>347	100%
Με 200 µg/ml εκχ	>300	>347	100%
Με 250 µg/ml εκχ	>300	>347	100%
Με 1 mg/ml εκχ	>300	>347	100%
Με 4 mg/ml εκχ	>300	>347	100%

**Πίνακας 1:** Αποτελέσματα οξείδωσης LDL παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών

Φαίνεται ότι το εκχύλισμα των πολυφαινολών με τη μορφή υδατικού διαλύματος αναστέλλει πλήρως την οξείδωση για τις 5 ώρες της φασματοφωτομετρικής παρακολούθησης για τις συγκεντρώσεις  $\geq 50\mu\text{g/ml}$ . Στις συγκεντρώσεις των  $25\mu\text{g/ml}$

και 12,5μg/ml δεν παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην οξείδωση, μόνο ελάττωση του ρυθμού της οξείδωσης.

### 3.2 Οξείδωση παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη

Δείγμα	Lag time (min)	% αύξησης lag time	% ελάττωσης ρυθμού οξείδωσης
Τυφλό (χωρίς εκχ)	21		
Με 25 μg/ml εκχ	23	9,5	0
Με 50 μg/ml εκχ	105	400	45,10
Με 100 μg/ml εκχ	110	424	50,82
Με 200 μg/ml εκχ	>300	>1329	100
Με 250 μg/ml εκχ	>300	>1329	100
Με 1 mg/ml εκχ	>300	>1329	100
Με 4 mg/ml εκχ	>300	>1329	100

**Πίνακας 2:** Αποτελέσματα παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος πολυφαινολών σε μαλτοδεξτρίνη.

Φαίνεται ότι το εκχύλισμα των πολυφαινολών που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη αναστέλλει πλήρως την οξείδωση σε συγκεντρώσεις  $\geq 200$  μg/ml υδατικού διαλύματος του εκχυλίσματος, κατά το χρονικό διάστημα των 5 ωρών της παρακολούθησης της οξείδωσης. Στη συγκέντρωση των 50 μg/ml και 100 μg/ml παρατηρήθηκε σημαντική καθυστέρηση της οξείδωσης, αλλά και ελάττωση του ρυθμού της, με μικρή διαφορά ανάμεσα στις δύο συγκεντρώσεις.

### 3.3. Οξείδωση παρουσία υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος πολυφαινολών ενθυλακωμένο σε λεκιθίνη

Δείγμα	Lag time (min)	% αύξησης lag time	% ελάττωσης ρυθμού οξείδωσης
Τυφλό (χωρίς εκχ)	60		
Με 25 µg/ml εκχ	210	250	0
Με 50 µg/ml εκχ	230	283	0
Με 100 µg/ml εκχ	>300	>400	100
Με 200 µg/ml εκχ	>300	>400	100
Με 250 µg/ml εκχ	>300	>400	100
Με 1 mg/ml εκχ	>300	>400	100
Με 4 mg/ml εκχ	>300	>400	100

**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος πολυφαινολών σε λεκιθίνη

Φαίνεται ότι το εκχύλισμα των πολυφαινολών σε λεκιθίνη αναστέλλει πλήρως την οξείδωση σε συγκεντρώσεις  $\geq 100$  µg/ml υδατικού διαλύματος του εκχυλίσματος, κατά το χρονικό διάστημα των 5 ωρών της παρακολούθησης της οξείδωσης. Στη συγκέντρωση των 25 µg/ml και 50 µg/ml παρατηρήθηκε σημαντική καθυστέρηση της οξείδωσης, αλλά χωρίς ελάττωση του ρυθμού της.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση που δημιουργείται λόγω της επικράτησης των ελευθέρων ριζών έναντι των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού και είναι υπεύθυνη για μια σειρά από δυσλειτουργίες λόγω καταστροφών στα βιομόρια του οργανισμού. Αποτέλεσμα αυτών των δυσλειτουργιών είναι η πρόκληση ασθενειών όπως η εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, σακχαρώδη διαβήτη καθώς και καρκίνου μεταξύ άλλων (Halliwell B., 2001).

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν την άμυνα του οργανισμού απέναντι στις ελεύθερες ρίζες λειτουργώντας ουσιαστικά ως προστατευτικές ασπίδες. Κυριότεροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες αποτελούν ορισμένες βιταμίνες (βιταμίνη E, βιταμίνη C), ιχνοστοιχεία αλλά και φυτοχημικές ενώσεις (νιασίνη, σελήνιο, καροτενοειδή). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ουσιών με αντιοξειδωτική δράση αποτελούν επίσης οι πολυφαινόλες. Οι ουσίες αυτές απαντώνται σε πολλές τροφές που συμπεριλαμβάνονται στην καθημερινή διατροφή των ανθρώπων όπως τα λαχανικά, τα φρούτα, το κόκκινο κρασί και το ελαιόλαδο και για αυτό το λόγο είναι εύκολη η λήψη τους.

Η σύγχρονη έρευνα επιβεβαίωσε την διατροφική αξία του ελαιόλαδου. Συγκεκριμένα από την αρχαιότητα ακόμα αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιόλαδου, μεταξύ άλλων, δερματολογικές ασθένειες, μυϊκούς πόνους, θεραπεία του έλκους και της χολέρας, φλεγμονές των ούλων, αϋπνία, ναυτία, πυρετό και στομαχικούς πόνους.

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι το ελαιόλαδο αποτελεί έναν διατροφικό θησαυρό. Όντως, το ελαιόλαδο αποτελεί ένα προϊόν γεμάτο αντιοξειδωτικά, και έχει βρεθεί ότι μειώνει την LDL και αυξάνει την HDL. Έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, βοηθάει στην καταπολέμηση ασθενειών όπως η νόσος Alzheimer, ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, και διάφορες δερματικές ασθένειες (Covas et al, 2006; Witztum, 1994; Fito et al, 2005; Vissers et al, 2001; Nicolaiew et al, 1998). Η καλλιέργεια της ελιάς και η παραγωγή του ελαιόλαδου εξελίσσεται με την πάροδο των ετών. Η σύγχρονη παραγωγή του ελαιόλαδου περιλαμβάνει την χρήση ελαιουργείων. Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης στις ελαιοκομικές

περιοχές αλλά και ένα σημαντικό πρόβλημα προς επίλυση για τη γεωργική βιομηχανία. Τα απόβλητα αυτά χαρακτηρίζονται από έντονα ιώδες- σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα, πολύ έντονη οσμή ελαιόλαδου, πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο, υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα και μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων. Έτσι, αρκετοί επιστήμονες επέλεξαν να στρέψουν το ενδιαφέρον τους σ' αυτά τα απόβλητα, επιτυγχάνοντας όχι μόνο μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης η οποία μπορεί να επιτευχθεί με την επεξεργασία και τη χρήση των αποβλήτων, αλλά και την ανάκτηση των αντιοξειδωτικών συστατικών τους με σκοπό την εφαρμογή τους στην καθημερινή ζωή (Gerasopoulos et al, 2015a; Gerasopoulos et al, 2015b).

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η εκτίμηση της βιοδραστικότητας ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου αλλά και των ενθυλακωμένων παραγώγων του σε μαλτοδεξτρίνη, και λεκιθίνη και συγκεκριμένα η επίδρασή τους στην ανασχεση της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης.

Αρχικά, οι πολυφαινόλες των φυτικών νερών του ελαιοτριβείου απομονώθηκαν σε μορφή καθαρισμένου εκχυλίσματος με τη χρήση πατενταρισμένης παραγωγικής διαδικασίας, της εταιρείας Polyhealth. Στην συνέχεια για την ενθυλάκωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, εκτός του επεξεργασμένου υγρού χρησιμοποιήθηκαν η μαλτοδεξτρίνη και η λεκιθίνη ενώ στο τελικό στάδιο της εργασίας έγινε εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του υγρού εκχυλίσματος και των ενθυλακωμένων μορφών του στην ανασχεση της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης. Οι συγκεντρώσεις του πολυφαινολικού εκχυλίσματος ή των ενθυλακωμένων μορφών του που εξετάστηκαν κυμαίνονταν από 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  έως 4  $\text{mg}/\text{ml}$  και υπολογίστηκε τόσο ο χρόνος καθυστέρησης της οξείδωσης (lag time), όσο και το ποσοστό αύξησης του χρόνου καθυστέρησης οξείδωσης ( % αύξηση lag time) σε σύγκριση πάντα με αντίστοιχα τυφλά δείγματα χωρίς προσθήκη αντιοξειδωτικών

Τα αποτελέσματα κρίθηκαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα καθώς σε κάθε μέθοδο παρατηρήθηκε διαφορετικό είδος επίδρασης στην προστασία έναντι της οξείδωσης της LDL. Αρχικά συγκρίνοντας τις μεθόδους ενθυλάκωσης του υδατικού εκχυλίσματος πολυφαινολών σε μαλτοδεξτρίνη και λεκιθίνη, παρατηρούμε ότι παρότι η λεκιθίνη αναστέλει πλήρως την οξείδωση της LDL σε μικρότερη συγκέντρωση πολυφαινολών (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  έναντι 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) είναι λιγότερο αποτελεσματική στην ελάττωση του ρυθμού οξείδωσης αλλά και στην αύξηση του χρόνου καθυστέρησης της οξείδωσης σε μικρές συγκεντρώσεις (<100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Αντίθετα, φαίνεται ότι η χορήγηση των πολυφαινολών σε μη ενθυλακωμένη μορφή παρουσιάζει μεγαλύτερη

αποδοτικότητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις πολυφαινόλων καθώς ακόμα και στη συγκέντρωση των 50  $\mu\text{g/ml}$  υπάρχει πλήρης αναστολή οξειδωσης ενώ η ελάττωση του ρυθμού οξειδωσης ενεργοποιείται από την συγκέντρωση των 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Αν και η μη ενθυλακωμένη μορφή παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα, ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι σε πραγματικά βιολογικά συστήματα οι ενθυλακωμένες μορφές λόγω της καλύτερης βιοαπορροφησιμότητας θα αποκρίνονται καλύτερα από ότι στις ex-vivo δοκιμές και επίσης αν η λήψη τους γίνει μέσω τροφίμων (βιολειτουργικά τρόφιμα) οι ενθυλακωμένες μορφές θα παρουσιάζουν καλύτερη αποδοχή από τον καταναλωτή λόγω της κάλυψης που παρέχουν έναντι άσχημης/μη αποδεκτής γεύσης και χρώματος.

Σε κάθε περίπτωση πάντως, καθίσταται σαφές ότι οι πολυφαινόλες που προέρχονται από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου μπορούν να δράσουν με ιδιαίτερα ικανοποιητικό τρόπο προστατευτικά και να αξιοποιηθούν με τον πλέον ενδεδειγμένο τρόπο, συμβάλλοντας στη βελτίωση του αντιοξειδωτικού προφίλ των οργανισμών. Η επεξεργασία τους μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται απ' την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο περιβάλλον. Επιπλέον μελλοντική έρευνα πρέπει να κατευθυνθεί σε εξέταση και άλλων μέσων ενθυλάκωσης για καλύτερη ακόμη αποτελεσματικότητα και σε δοκιμές in-vivo για αριστοποίηση της δράσης σε πραγματικούς όρους επίδρασης στην υγεία του καταναλωτού.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

- Το υγρό αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα φυτικά νερά του ελαιοτριβείου έχει σημαντική επίδραση στην ανάσχεση της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης.
- Η ενθυλακωμένη μορφή του υγρού εκχυλίσματος από τα φυτικά νερά του εκαιοτριβείου σε μαλτοδεξτρίνη παρουσιάζει επίσης σημαντική θετική επίδραση στην ανάσχεση της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης και την υψηλότερη καθυστέρηση στην έναρξη της μη επιθυμητής οξείδωσης της σε σχέση με το υγρό εκχύλισμα και σε σχέση με το ενθυλακωμένο παράγωγο σε λεκιθίνη.
- Η ενθυλακωμένη μορφή του υγρού εκχυλίσματος από τα φυτικά νερά του ελαιοτριβείου σε λεκιθίνη παρουσιάζει επίσης σημαντική θετική επίδραση στην ανάσχεση της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης και η 100% μείωση του ρυθμού οξείδωσης επέρχεται σε συγκέντρωση 100 µg/ml, δηλαδή διπλάσια της αντίστοιχης του υγρού εκχυλίσματος και το μισό της αντίστοιχης του ενθυλακωμένου παραγώγου με μαλτοδεξτρίνη,
- Το ενθυλακωτικό υλικό παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της βιοδραστικότητας του ενθυλακωμένου παραγώγου σε σχέση με την ανάσχεση της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αν και σε πρώτη ματιά δείχνουν ότι η ενθυλάκωση μειώνει τη δραστηριότητα στην πραγματικότητα το αποτέλεσμα είναι αντίθετο διότι το ενθυλακωμένο παράγωγο σε in-vivo συνθήκες αναμένεται να παρουσιάζει υψηλότερη βιοαπορροφησιμότητα αλλά και καλύτερη αποδοχή σε περίπτωση χρήσης τους σε βιολειτουργικά τρόφιμα.
- Μελλοντική έρευνα πρέπει να κεντραχθεί σε in vivo δοκιμές με χρήση διαφόρων ενθυλακωμένων παραγώγων με σκοπό την βελτιστοποίηση της δράσης μέσω επιλογής καταλλήλου φορέα ενθυλάκωσης αλλά και με παράμετρο την μείωση του μεγέθους των σωματιδίων σε νάνο μορφή για καλύτερη αποτελεσματικότητα.

## Βιβλιογραφία

- Amelotti, G., Daghetta, A., & Ferrario, A. (1989). Content and structure of partial glycerides in virgin olive oil: Their evolution by different working process and preservation form. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 66, 681–692.
- Amiot, M.-J., Fleuriet, A. & Macheix, J.-J., 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation.
- Andrikopoulos, N.K., Hassapidou, M.N. & Manoukas, A.G., 1989. The tocopherol content of greek olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(4), pp.503–509.
- Aparicio, R., Ferreiro, L. & Alonso, V., 1994. Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 292(3), pp.235–241.
- Beltrán, G. et al., 2005. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89(2), pp.207–215.
- Ben-Salah, A., Marzouk, B., and Cherif, A., *Olivae.*, 1986, 3, 14-17.
- Bendini, A. et al., 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects
- Boskou D. (2006). The culture of olive tree (Mediterranean world). In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil Chemistry*
- Boskou, D., ed., *Olive Oil: Chemistry and Technology*, AOCS Press, Champaign, IL, 1996
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28, 25-30.
- Castaner, O., Fito, M., Lopez-Sabater, M. C., Poulsen, H. E., Nyssonen, K., Schroder, H., ... Covas, M.-I. (2011). The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 30(4), 490–493.
- Cheeseman, K.H. & Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), pp.481–493.

- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 218–236. <http://doi.org/10.1080/10408390701856223>
- Cinquanta, L., Esti, M. & Notte, E. La, 1997. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(10), pp.1259–1264.
- Cuppett, S., Schnepf, M., Hall, C. Natural antioxidants are they a reality. In *Natural antioxidants, chemistry and health effects*, Shahidi, F. (Ed.), AOCS, Champaign, Illinois, 1997, pp.12-24.
- Covas, M.-I., Nyyssonen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kiesewetter, H., ... Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), 333–341.
- Damtoft, S., Franzyk, H. & Jensen, S.R., 1993. The International Journal of Plant Biochemistry Biosynthesis of secoiridoid glucosides in oleaceae. *Phytochemistry*, 34(5), pp.1291–1299.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
- Fedeli, E., 1977. Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, 15(1), pp.57–74.
- Fernández, A.G., Adams, M.R. & Fernández-Díez, M.J., 1997. *Table olives production and processing*, Springer Science & Business Media.
- Fito, M. et al., 2000. Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids*, 35(6), pp.633–638.
- Fito, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Marti, J., Alcantara, M., Pujadas-Bastardes, M., Covas, M. I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181(1), 149–158
- Frankel, N.E. Lipid oxidation. The Oily Press Ltd., Dundee, Scotland, 1998
- Gandul-Rojas, B., Roca, M. and Minguez-Mosquera, M.I., *J. Plant Physiol.*, 2004, 161, 499- 507.

- Georgalaki, M. et al., 1998. *Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms*,
- Georgalaki, M.D., Sotiroudis, T.G. & Xenakis, A., 1998. The presence of oxidizing enzyme activities in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), pp.155–159.
- Gerasopoulos, K. et al. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem. Toxicol.* 82, 42–49 (2015). 2
- Gerasopoulos, K. et al. Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater. *In Vivo* 30, 291–301
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., ... Rondanelli, M. (2013). Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 22(1), 90–95.
- Gómez-Rico, A. et al., 2007. Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*, 100(2), pp.568–578.
- Gordon, M.H., 1990. The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. In B. J. F. Hudson, ed. *Food Antioxidants*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–18.
- Guinda, A., Lanzón, A. & Albi, T., 1996. Differences in Hydrocarbons of Virgin Olive Oils Obtained from Several Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), pp.1723–1726.
- Guiso, M., & Marra, C. (2005). Highlights in oleuropein aglycone structure. *Natural Product Research*, 19(2), 105–109.
- Gutiérrez, F. et al., 1999. Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive
- Halliwell B (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). *Nature Publishing Group*, New York.
- Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
- Halliwell, Barry (Mar 2015) *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*.

- Harborne, J.B. Plant phenolics. In methods in plant biochemistry. P.M. Dey and Harborne J.B., (Eds.), Academic Press, London, 1989, Ch. 1, pp.1-27.
- Hatzakis, E. et al., 2008. Determination of Phospholipids in Olive Oil by <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), pp.6232–6240.
- Ho, C.T. Phenolic compounds in food. An overview. In Phenolic compounds in food and their effects on health I. C.T. Ho, C.Y. Lee and M.T., Huang (Eds), American Chemical Society, Washington DC, 1992, Ch.1, pp. 2-7.
- Hudson, B.J.F. & Lewis, J.I., 1983a. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. *Food Chemistry*, 10(2), pp.111–120.
- Hudson, B.J.F. & Lewis, J.I., 1983b. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. structural criteria for activity. *Food Chemistry*, 10(1), pp.47–55.
- Jenkins, R. R. (1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 5(3), 156–170.
- Jiménez, M.S., Velarte, R. & Castillo, J.R., 2007. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. *Food Chemistry*, 100(1), pp.8–14.
- Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., & Mantzavinos, D. (2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of Environmental Management*, 128, 749–758.
- Kashima, M. et al., 1991. The antioxidant effects of phospholipids on perilla oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(2), pp.119–122.
- Kiosseoglou, V. & Kouzounas, P., 1993. THE ROLE OF DIGLYCERIDES, MONOGLYCERIDES, AND FREE FATTY ACIDS IN OLIVE OIL MINOR SURFACE-ACTIVE LIPID INTERACTION WITH PROTEINS AT OILWATER INTERFACES. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 14(5), pp.527–539.
- Kiritsakis, A. & Dugan, L.R., 1985. Studies in photooxidation of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*
- Kiritsakis, A. (Paul) K. et al., 1998. *Olive oil: from the tree to the table*, Food & Nutrition Press.
- Kohyama, N. et al., 1997. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Bioscience*,



biotechnology, and biochemistry, 61(2), pp.347–350.

-Koidis, A. & Boskou, D., 2006. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), pp.323–328.

-Lanzón, A. et al., 1994. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(3), pp.285–291.

-Lipsky, S.R., 1964. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids. *The Yale journal of biology and medicine*, 36(5), p.401.

-Meeus M, Nijs J, Hermans L, Goubert D and Calders P: The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin Ther Targets* 17: 1081–1089, 2013.

-Minguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. & Gallardo-Guerrero, L., 1994. Measurement of chlorophyllase activity in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of biochemistry*, 116(2), pp.263–268.

-Moreno, A.H. & Guzman, j.f., 1985. Cellulases in olives and their possible influence in texture changes. 2. cellulolytic activity in hojiblanca variety. *grasas y aceites*, 36(2), pp.130–133.

-Mylonas C and Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295–309, 1999.

-Nenadis, N. & Tsimidou, M., 2002. Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(3), pp.257–259.

-Newmark, H.L., 1997. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 6 (12), pp.1101–1103

-Nicolaiew, N., Lemort, N., Adorni, L., Berra, B., Montorfano, G., Rapelli, S., ... Jacotot, B. (1998). Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 42(5), 251–260.

-Olias, H., Prez, A.G., Rios, J.J., and Sans, L.C., *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 2368-2373.

- Owen, R.W., Mier, W., et al., 2000b. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), pp.647–659.
- De Pablos, L.M. et al., 2010. Action of a pentacyclic triterpenoid, maslinic acid, against *Toxoplasma gondii*. *Journal of natural products*, 73(5), pp.831–834.
- Pokorny J., 1987. "Major factors affecting the autoxidation of lipids", in "Autoxidation of unsaturated lipids", edited by Chan S.H.W., Academic press, London, p.141-198.
- Porter, W.L., 1980. Recent Trends in Food Applications of Antioxidants. In M. G. Simic & M. Karel, eds. *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Boston, MA: Springer US, pp. 295–365
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53, 4290-4302.
- Psomiadou, E. & Tsimidou, M., 1998. Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), pp.5132–5138.
- Psomiadou, E. & Tsimidou, M., 1999. On the Role of Squalene in Olive Oil Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), pp.4025–4032.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. & Boskou, D., 2000.  $\alpha$ -Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils. *Journal of*
- Ramirez-Tortosa, C., Lopez-Pedrosa, J. M., Suarez, A., Ros, E., Mataix, J., & Gil, A. (1999). Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *The British Journal of Nutrition*, 82(1), 31–39.
- Ryan, D. et al., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), pp.147–176.
- Saija, A. & Uccella, N., 2000. Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9–10), pp.357–363.
- Salaway J. G. *Medical Biochemistry at a Glance*, 2006.
- Saraiva, J. A., Nunes, C.S., and Coimbra, M.A., *Food Chem.*, 2007, 101, 1571-1579.

-Scalbert, A. et al., 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), pp.276–282.

-Sciancalepore, V., and De Stefano, G., *Grasas y Aceites*, 1995, 46, 251-254.

-Servili, M. & Montedoro, G., 2002. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), pp.602–613.

-Tasioula-Margari, M. & Tsabolatidou, E., 2015. Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 4(3), pp.548–562.

-Toscano, G., Colarieti, M.L., and Greco, G.Jr., *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33,47-54.

-Valgimigli, L. et al., 2001. Photometric assay for polyphenol oxidase activity in olives, olive pastes, and virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(12), pp.1245–1248.

-Vissers, M. N., Zock, P. L., Wiseman, S. a, Meyboom, S. & Katan, M. B. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55, 334–341 (2001)

-Witztum, J. L. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet (London, England)*, 344(8925), 793–795.

-Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., ... Imai, K. (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research*, 83(1), 35–44.

-Young, I.S. & McEneny, J., 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 2), pp.358–362.

*Δρ. Άγγελος Παπαϊωάννου Αναπληρωτής Καθηγητής – Δρ. Παναγιώτης Πλαγεράς, Ειδικά Θέματα Βιοχημείας, Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2012*