

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Χρήση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (PEF) για την εκχύλιση βίο-δραστικών ουσιών από φύλλα ελιάς»

“Pulsed Electric Field technique (PEF) evaluation to the extraction of polyphenols from olive leaves”

της Μανίκα Αθανασίας

Φεβρουάριος, 2023

«Χρήση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (PEF) για την εκχύλιση βίο-δραστικών ουσιών από φύλλα ελιάς»

“Pulsed Electric Field technique (PEF) evaluation to the extraction of polyphenols from olive leaves”

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΛΑΛΑΣ ΣΤΑΥΡΟΣ

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ
ΜΑΡΡΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΣΥΓΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ	9
1.2 ΣΚΟΠΟΣ & ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΡΕΥΝΑΣ	9
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	12
2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	12
2.1.1 Εκχύλιση με υπερήχους (<i>ultrasound-assisted extraction – UAE</i>).....	12
2.1.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (<i>microwave-assisted extraction – MAE</i>).....	14
2.1.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών (<i>supercritical fluid extraction – SFE</i>).....	15
2.1.4 Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (<i>pressurized liquid extraction – PLE</i>).....	16
2.1.5 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό (<i>supercritical water extraction – SWE</i>)	18
2.1.6 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (<i>pulsed electric fields – PEF</i>).....	18
2.2 ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ	19
2.2.1 Πολυφαινολική σύσταση των φύλλων ελιάς	20
2.2.2 Χρήσεις των φύλλων ελιάς	22
2.2.2.1 Βιολογική δράση φύλλων ελιάς	22
2.2.2.2 Αντιοξειδωτική δράση.....	23
2.2.2.3 Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση	25
2.2.2.4 Αντικαρκινική δράση	27
2.2.3 Τα φύλλα ελιάς ως λειτουργικά συστατικά.....	29
2.2.4 Εκχύλιση βιοενεργών κλασμάτων συστατικών από φύλλα ελιάς	30
2.3 Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ (ΠΑΛΜΙΚΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ – PEF)	32
2.3.1 Η μέθοδος επεξεργασίας με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων.....	32
2.3.1.1 Βασικά Μέρη Συστήματος Επεξεργασίας τροφίμων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία	32
2.3.2 Λειτουργία και προσδιοριστικές παράμετροι της μεθόδου	37
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ	44
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	49
4.1 Υλικά και μέθοδοι.....	49
4.1.1 Χημικά	49
4.1.2 Φυτικό Υλικό και Χειρισμός.....	49
4.1.3 Προσδιορισμός Περιεκτικότητας σε Νερό	50
4.1.4 Συσκευή PEF	50
4.1.5 Υποβοηθούμενη εξαγωγή PEF και μη PEF	50
4.1.6 Προετοιμασία δείγματος	52
4.1.7 Ολική περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φαινόλη	52
4.1.8 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	53
4.1.9 Στατιστική ανάλυση.....	53
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
5.1 Ολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινόλη	54
5.2 Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων με HPLC	56
5.2.1 Εκτίμηση της επίδρασης PEF με προσδιορισμό της συνολικής επιφάνειας των εκχυλισμάτων.....	56
5.2.2 Πολυφαινολική σύνθεση	58
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	66

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματικές αναπαραστάσεις υπερηχητικών συστημάτων (Roselló-Soto et al., 2015, σ.299).....	13
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση εξοπλισμού εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά (Roselló-Soto et al., 2015, σ.300).....	16
Εικόνα 3: Τρόποι επεξεργασίας & διάθεσης αποβλήτων & υποπροϊόντων της ελιάς (Δεδούση & Μαμουδάκη, 2017, σ.10, στο Federici et al., 2009).....	20
Εικόνα 4: Οι κύριοι χημικοί τύποι των πολυφαινολών στα φύλλα ελιάς (Δεδούση & Μαμουδάκη, 2017, σ.14).	21
Εικόνα 5: Αντιμικροβιακές ιδιότητες του εκχυλίσματος από τα φύλλα ελιάς (Κατικαριδίου, 2017, σ.29).....	26
Εικόνα 6: Διάγραμμα συστήματος PEF για την επεξεργασία τροφίμων. Ροζ περιοχή: παροχή υψηλού δυναμικού πεδίου. Πράσινη περιοχή: θάλαμος επεξεργασίας. Κίτρινη περιοχή: Σύστημα παρακολούθησης & ελέγχου. Γαλάζια περιοχή: Δείγμα προτού και κατόπιν επεξεργασίας (Πριλή, 2021, σ.19)	33
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του συστήματος PEF. Ροζ περιοχή: παροχή υψηλού δυναμικού πεδίου. Πράσινη περιοχή: θάλαμος επεξεργασίας. Μπλε περιοχή: Δείγμα τροφίμου (Πριλή, 2021, σ.20)	34
Εικόνα 8: Παράθεση παραμέτρων για την παροχή παλμών υψηλού δυναμικού (Πριλή, 2021, σ.20).....	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 9: Τρόπος διάταξης των δύο διαφορετικών ειδών παλμών. (a) Εκθετικά μειούμενος παλμός ενώ (b) τετράγωνος παλμός (Πριλή, 2021, σ.21)	35
Εικόνα 10: Τα τρία κυριότερα είδη θαλάμων επεξεργασίας PEF (Πριλή, 2021, σ.22, στο Maged et al., 2012).....	37
Εικόνα 11: Ενδεικτικά παραδείγματα ηλεκτροπόρωσης κυτταρικής μεμβράνης από εξωτερικό ηλεκτ/κό πεδίο (Ee) ενώ Ec: κρίσιμη ένταση ηλεκτ/κού πεδίου (Πριλή, 2021, σ.27).....	41
Εικόνα 12: Κλασικό πρωτόκολλο της τεχνολογίας PEF (Πριλή, 2021, σ.28, στο Lebonka & Vorobiev, 2011).....	42

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Y_{TP} for PEF and Reference samples in five different tested solvents and a pulse duration of 10 μ sec.	55
Σχήμα 2. Y_{TP} for PEF and Reference samples in five different tested solvents and a pulse duration of 100 μ sec.	56
Σχήμα 3. HPLC total area for PEF and Reference sample in five different tested solvents and a pulse duration of 10 μ sec.....	57
Σχήμα 4. HPLC total area for PEF and Reference sample in five different tested solvents and a pulse duration of 100 μ sec.....	57
Σχήμα 5. Overlay of chromatograms of extract and specific compounds at 345 nm after PEF with pulse duration 10 μ sec and extraction solvent 25% EtOH.	59
Σχήμα 6. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 1, b) peak 3, c) peak 7 and d) Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside reference substance.....	60
Σχήμα 7. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 3 identified as Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside, b) Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside reference substance.	60
Σχήμα 8. UV-vis spectra as obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 4 identified as Luteolin- 7- <i>O</i> -glucoside, b) peak 6 identified as Luteolin-3'- <i>O</i> -glucoside	61
Σχήμα 9. Overlay of chromatograms of extract after PEF with pulse duration 10 μ sec and extraction solvent 25% EtOH (above), and oleuropein reference standard (below) at 270 nm.....	62
Σχήμα 10. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 5 identified as Apigenin-7- <i>O</i> -rutinoside, b) Apigenin reference substance.....	62
Σχήμα 11. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 8 identified as Oleuropein, b) Oleuropein reference substance	63
Πίνακας 1: Μέσοι όροι (mg g ⁻¹ dw) σημαντικών ενώσεων εκχυλισμάτων PEF φύλλων ελιάς που έχουν υποστεί επεξεργασία με 25% αιθανόλη.....	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φύλλα ελιάς (OLL), ένα υποπροϊόν γεωργικών αποβλήτων, αποτελούν μία ιδιαίτερα εκτιμώμενη πηγή βιοδραστικών πολυφαινολικών φυτοχημικών. Αυτή η μελέτη είχε ως στόχο να αξιολογήσει την τεχνική παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (PEF) για την εξαγωγή πολυφαινολών από φύλλα ελιάς. Οι παράμετροι της μελέτης περιελάμβαναν μια σειρά «πράσινων» διαλυτών (αιθανόλη, νερό καθώς και μείγματα αυτών σε βαθμίδα 25%) και διάρκεια παλμού. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα των εκχυλισμάτων που ελήφθησαν χωρίς την εφαρμογή της τεχνικής PEF. Η εκτίμηση του βαθμού της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της ολικής συγκέντρωσης φαινολικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu) και με αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Το υψηλότερο αποτέλεσμα PEF παρατηρήθηκε σε δείγματα που εκχυλίστηκαν με 25% υδατική αιθανόλη, χρησιμοποιώντας διάρκεια παλμού 10μsec εντός περιόδου 1ms για συνολικό χρόνο εξαγωγής 30 λεπτών υπό παλμικό ηλεκτρικό πεδίο 1 kV/cm σε ορθογώνιο δοχείο. Η PEF παρουσιάζει εξαιρετική δυνατότητα για μια «πράσινη» διαδικασία και για την επιλεκτική εξαγωγή βιολειτουργικών συστατικών από φύλλα ελιάς (φαινολικές ενώσεις). Τέλος, μπορεί να έχει περαιτέρω χρήση στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων, παράγοντας βιώσιμα προϊόντα υψηλής ποιότητας που παρουσιάζουν πολυάριθμα οφέλη για τη δημόσια υγεία.

ABSTRACT

Olive leaves (OLL), an agricultural waste by-product, are considered to be a highly appreciated bioresource of bioactive polyphenolic phytochemicals. The present study aimed to evaluate Pulsed Electric Field (PEF) technique to the extraction of polyphenols from OLL. The study parameters included a series of “green” solvents (ethanol, water as well as mixtures of them at a 25% step gradient) and pulse duration. The results were compared with those of the extracts obtained without the application of PEF. Monitoring of the extraction was carried out by means of the total phenol concentration (Folin-Ciocalteu method) and by high performance liquid chromatography analyses.

The highest PEF effect was observed for aqueous ethanol, 25% v/v, using a pulse duration of 10 μ sec within a period of 1ms for a total extraction time of 30min under a PEF of 1 kV/cm in a rectangular vessel. PEF presents an excellent potential for a green process and the selective extraction of bio-functional constituents from olive leaves (phenolic compounds). Finally, PEF assisted extraction can be of further use in functional food manufacturing, sustainably producing high-quality products that present numerous public health benefits.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΥΓΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

Οι τεχνικές με τις οποίες είναι εφικτή τόσο η επεξεργασία των τροφίμων, ώστε να μπορούν να συντηρηθούν, όσο και η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών τα οποία προέρχονται από τα παραπροϊόντα αυτών εξελίχθηκαν ως βιώσιμες και αειφόρες, με την ονομασία «πράσινες» ή οικολογικές τεχνικές επεξεργασίας και εκχύλισης. Στην εξέλιξή τους συνέβαλαν τα βελτιωμένα επίπεδα διαβίωσης καθώς και συνεχώς αυξανόμενες καταναλωτικές απαιτήσεις για προϊόντα που είναι φυσικά και διακρίνονται για την υψηλή τους ποιότητα, την ασφάλεια και την θρεπτική τους αξία. Έτσι, οι εν λόγω τεχνικές αντικατέστησαν τις αντίστοιχες θερμικές και χημικές που θεωρούνται συμβατικές. Ειδικότερα, όσον αφορά την επεξεργασία στα τρόφιμα, αυτή αποσκοπεί στη διατήρηση των θρεπτικών ιδιοτήτων τους καθώς και των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών ως έχουν. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκαν εναλλακτικές τεχνικές, τόσο θερμικές όσο και μη, με τις οποίες η επεξεργασία των τροφίμων περιορίζεται σημαντικά, ενώ οι οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητές τους όπως και η εκχύλιση των βιοδραστικών τους συστατικών ενισχύονται. Στις τεχνικές αυτές συγκαταλέγονται η ακτινοβολήση, η εκχύλιση με μικροκύματα ή με υπερήχους ή υπερκρίσιμων ρευστών και, τέλος, η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ή με υπερύψηλη πίεση (Putnik et al., 2018· Πριλή, 2021).

Ποικιλία επιλεκτικότητας απαντά στην εκάστοτε τεχνική εκχύλισης όσον αφορά τα συστατικά τα οποία εκχυλίζονται. Έτσι, επί παραδείγματι, τόσο η εκχύλιση με μικροκύματα όσο και η συμβατική μέθοδος εκχύλισης με διαλύτες οδηγούν κυρίως σε εκχύλιση πολικών ενώσεων. Αντίθετα, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό ή αυτή που συντελείται υπό πίεση υγρού οδηγούν κυρίως στην εκχύλιση ενώσεων που διαθέτουν πολικότητα χαμηλού επιπέδου (Taamalli et al., 2012· Κατικαρίδου, 2017).

1.2 ΣΚΟΠΟΣ & ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να παρουσιάσει τις σημαντικότερες τεχνικές εκχύλισης των φύλλων ελιάς, και να διερευνήσει επισταμένως την τεχνική παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (PEF) για την εξαγωγή πολυφαινολών από αυτά. Η σημαντικότητα της έρευνας έγκειται ακριβώς σε αυτό: ότι από όσο τουλάχιστον

υπέπεσε στην αντίληψη της ερευνήτριας, δεν υπάρχει άλλη μελέτη που να διερευνά την εκχύλιση φύλλων ελιάς με την εν λόγω τεχνική (PEF).

Γενικό Μέρος

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

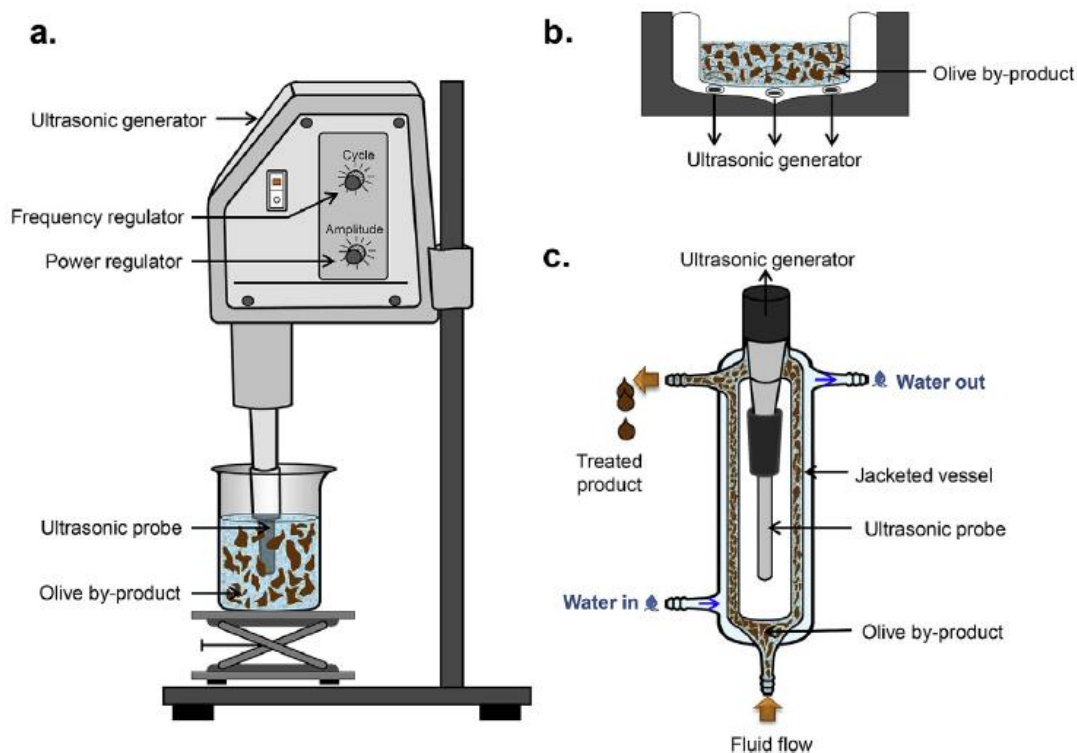
2.1.1 Εκχύλιση με υπερήχους (*ultrasound-assisted extraction – UAE*)

Η χρήση υπερήχων οδηγεί στην παραγωγή υψηλής συχνότητας κυμάτων, των οποίων η διέλευση εντός ενός μέσου συμβάλλει στη μεταφορά πίεσης και, ως εκ τούτου, στη δημιουργία περιοχών με υψηλή πίεση και άλλων με χαμηλή. Ο ορισμός της διακύμανσης της πίεσης περιλαμβάνει την αναλογία του πλάτους της με την ποσότητα της ενέργειας που εφαρμόζεται στο σύστημα. Αν σημειώνονται έντονες διακυμάνσεις της πίεσης, ένα υγρό μέσο δύναται να αποδομηθεί δημιουργώντας μικρές φυσαλίδες από αέριο και ατμό, ένα φαινόμενο που περιγράφεται με τον όρο «σπηλαιώση». Σε ό,τι αφορά την αποτελεσματικότητα που εμφανίζει η εκχύλιση με υπερήχους, αυτή οφείλεται στο ότι τα κύματα των υπερήχων διαδίδονται μέσα από το διαλύτη, με αποτέλεσμα τα τοιχώματα των κυττάρων να διασπώνται, τα σωματίδια να συρρικνώνονται και η μάζα να μεταφέρεται από τις κυτταρικές μεμβράνες. Οι μικροφυσαλίδες που είναι αποτέλεσμα της σπηλαιώσης ενδέχεται να καταρρεύσουν, γεγονός που οδηγεί σε αναταράξεις, με την ταχύτητα με την οποία συγκρούονται τα σωματίδια να χαρακτηρίζεται ως υψηλή. Η δημιουργία αναταράξεων έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση των συντελεστών μεταφοράς μάζας, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση και στην ποσότητα του διαλύτη ο οποίος ήρθε σε επαφή με το στερεό μέσο αλλά και σε μεταφορά διαλυτών συστατικών μαζί με αυτόν. Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: ο χρόνος που απαιτεί η εκχύλιση περιορίζεται, σημειώνεται ταυτόχρονη εκχύλιση σε πληθώρα δειγμάτων, απαιτείται μικρότερη ποσότητα από διαλύτες, η αποδοτικότητα της εκχύλισης είναι αυξημένη εξαιτίας της ρήξης του κυτταρικού τοιχώματος και, τέλος, ο ρυθμός που χαρακτηρίζει τη μεταφορά της μάζας αυξάνεται, ενώ η κατανάλωση ενέργειας περιορίζεται (Ahmad-Qasem et al., 2013· Θάνου, 2020).

Η εκχύλιση με υπερήχους (UAE) αποτελεί μια αποτελεσματική τεχνική για ένα ευρύ φάσμα αναλυτών που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους δειγμάτων (Chemat et al., 2011· Priego-Carote et al., 2004). Οι υπέρηχοι έχουν αποτελέσματα σπηλαιώσης που επιτείνουν τη μεταφορά θερμότητας και μάζας χάρη στη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, γεγονός που οδηγεί σε καλύτερη έκλυση των ενώσεων-στόχων από διάφορες φυσικές πηγές (Rosello-Soto et al., 2015).

Παράλληλα, υπεισέρχεται και η οξειδωτική ενέργεια των ριζών που δημιουργείται κατά την ηχόλυση του διαλύτη (υδροξύλιο και υπεροξείδιο του υδρογόνου για το νερό), με αποτέλεσμα οι υπέρηχοι να έχουν υψηλή εκχυλιστική ισχύ (Chemat et al., 2011· Luque de Castro & Luque Garcia, 2002· Rawson et al., 2011).

Υπάρχουν πληθώρα πλεονεκτημάτων και οφελών από τη συγκεκριμένη τεχνολογία για την εκχύλιση φυσικών συστατικών. Ειδικότερα, εξασφαλίζει ότι ο διαλύτης θα έχει μεγαλύτερη διείσδυση στο κυτταρικό υλικό, η επεξεργασία και η παραμονή θα συντελούνται σε μειωμένο χρόνο και ότι θα υπάρχει υψηλότερη αποδοτικότητα των προϊόντων και αναπαραγωγιμότητα, χαμηλότερη κατανάλωση διαλύτη και γαλακτωματοποιητών, υψηλή απόδοση επεξεργασίας, μείωση του θορύβου, εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών, σημαντική εξοικονόμηση συντήρησης, μικρότερη κατανάλωση ενέργειας για την επεξεργασία και, τέλος, λόγω των ανωτέρω, οικολογικότερη και αθροιστικά φθηνότερη επεξεργασία (Barba, Grimi, & Vorobiev, 2014· Deng et al., 2014· Knorr et al., 2004· Rosello-Soto et al., 2015). Στην **Εικόνα 1** απεικονίζεται μια σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων με υπερήχους τα οποία χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακό (**Σχήματα a και b**) και βιομηχανικό επίπεδο (**Σχήμα c**) στη διαδικασία επεξεργασίας τροφίμων (Roselló-Soto et al., 2015).



Εικόνα 1: Σχηματικές αναπαραστάσεις υπερηχητικών συστημάτων (Roselló-Soto et al., 2015, σ.299)

2.1.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (*microwave-assisted extraction – MAE*)

Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction - MAE) Η εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης με μικροκύματα αφορά φυσικά προϊόντα, για τα οποία συνήθως η εκχύλιση είναι μια πολύωρη διαδικασία αν χρησιμοποιηθούν λοιπές συμβατικές μέθοδοι. Στην περίπτωση εκχύλισης με μικροκύματα ο χρόνος υπολογίζεται περίπου στα 17 λεπτά (Perez-Serradilla & Luque de Castro, 2011). Συντελείται θέρμανση του δείγματος σε ελεγχόμενες συνθήκες όσον αφορά τους παράγοντες θερμοκρασία και πίεση. Η εκκίνηση της θέρμανσης πραγματοποιείται άμεσα στο δείγμα, δεδομένου ότι δεν υπάρχει απορρόφηση της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων από το δοχείο. Εν αντιθέσει, αναφέρεται ότι στην περίπτωση χρήσης άλλων συμβατικών μεθόδων η μετάδοση της θερμότητας συντελείται από τη διαδικασία αγωγής συναγωγής. Κατά την εκχύλιση, δοχεία που έχουν σφραγιστεί περιλαμβάνουν τόσο τον διαλύτη όσο και το δείγμα, επιτρέποντας αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύτη σε επίπεδα που υπερβαίνουν το σημείο βρασμού του, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του χρόνου που απαιτείται για την εκχύλιση και, κατά συνέπεια, τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα αυτής. Στους κύριους παράγοντες επιρροής, όσον αφορά την εκχύλιση με μικροκύματα, συγκαταλέγονται ο ίδιος ο διαλύτης, οι συνθήκες κατεργασίας και η φύση του δείγματος. Σχετικά με τους διαλύτες, η αιθανόλη, η ακετόνη, το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο, η μεθανόλη και το νερό ή και μίγματα σε διάφορες αναλογίες είναι μερικοί από αυτούς. Τέλος, η εκχύλιση με μικροκύματα παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες συμβατικές μεθόδους. Αυτά είναι: αποφυγή της ανάγκης για επιπλέον επεξεργασία των λυμάτων, εκλεκτικότητας της εκχύλισης σε υψηλό επίπεδο, λιγότερος χρόνος για την εκχύλιση, υψηλότερη απόδοση της εκχύλισης, υψηλότερη καθαρότητα του τελικού προϊόντος και χαμηλή κατανάλωση σε οργανικούς διαλύτες (Θάνου, 2020).

Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα (MAE), η ενέργεια από αυτά εφαρμόζεται τόσο για τη θέρμανση των διαλυτών που έρχονται σε επαφή με τα στερεά δείγματα όσο και για τον διαχωρισμό των σχετικών ενώσεων από το δείγμα στον διαλύτη εντός του κύτταρου, διευκολύνοντας στη συνέχεια τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και την απελευθέρωση των δραστικών ενώσεων στον διαλύτη (Chemat & Cravotto, 2013· Zhang, Yang, & Liu, 2008). Η εκχύλιση με μικροκύματα διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά: μικρό χρόνο εκχύλισης, απαίτηση για χαμηλή κατανάλωση

ενέργειας, υψηλή αποδοτικότητα εκχύλισης και ελάχιστη αποικοδόμηση των ενώσεων-στόχων (Camel, 2000· Barba et al., 2014· Roselló-Soto et al., 2015).

2.1.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών (*supercritical fluid extraction – SFE*)

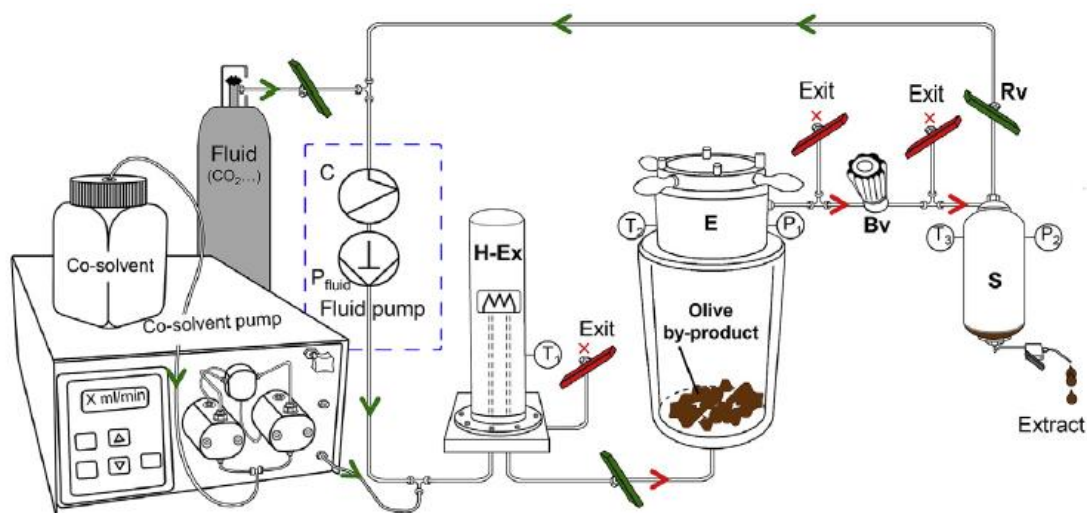
Αναφορικά με τη μέθοδο της εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού, αυτή στηρίζεται πρωτίστως στο κατά πόσο ισχυρή είναι η ιδιότητα της διαλυτοποίησης των υγρών, ενώ αυτά διατηρούνται υπερβαίνοντας το κρίσιμο σημείο τους. Τα υπερκρίσιμα υγρά διαθέτουν δύο ικανότητες, αυτή της μεταφοράς μάζας, κάτι ανάλογο με τα αέρια, και αυτή της διαλυτοποίησης, κάτι ανάλογο με τα υγρά. Η εν λόγω μέθοδος εκχύλισης είναι αυτοματοποιημένη. Συγκριτικά με συμβατικές μεθόδους, διαθέτουν πιο άμεσο χρόνο για την εκχύλιση και χαρακτηρίζονται από χαμηλή κατανάλωση διαλυτών. Η χρήση της αφορά την διάσπαση των ενώσεων σε θερμικά ασταθείς και σε χαμηλής πιητικότητας. Με την εφαρμογή της μεθόδου στα φύλλα της ελιάς εκχυλίζονται φαινόλες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις συναρτήσει του διαλύτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά (Le Floch et al., 1998).

Στα κύρια μειονεκτήματά της συγκαταλέγονται το υψηλό κόστος που απαιτεί η αγορά εξοπλισμού 5EE και η πληθώρα παραγόντων προς καθορισμό κάθε φορά ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση της ζητούμενης ουσίας (Sharif et al., 2014). Για την περίπτωση της εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού, το πλέον σύνηθες που χρησιμοποιείται είναι το διοξείδιο του άνθρακα. Η επιλογή αυτή υπαγορεύεται από το χαμηλό επίπεδο κόστους, ευφλεκτότητας και τοξικότητας, αλλά και από την υψηλού επιπέδου καθαρότητα που διαθέτει (Θάνου, 2020).

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την μέθοδο της εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά (SFE) δεδομένου ότι αποτελεί οικολογική τεχνολογία με την οποία αντικαθίσταται η χρήση οργανικών διαλυτών. Αυξάνοντας την πίεση και τη θερμοκρασία του υγρού/αερίου, σε επίπεδα άνω του κρίσιμου σημείου, προκύπτουν υπερκρίσιμα υγρά, τα οποία διαθέτουν διαλυτότητα παρόμοια με ενός υγρού και διαχυτικότητα παρόμοια με ενός αερίου, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως ιδανικοί καθαροί διαλύτες που επιτρέπουν την ανάκτηση πολύτιμων συστατικών από φυτικές μήτρες. Χάρη στη διαθεσιμότητά του, την μη τοξικότητα και τη μη ευφλεκτότητά του, αλλά και το χαμηλό κόστος (συγκριτικά με τους υγρούς οργανικούς διαλύτες), τις προσαρμόσιμες ιδιότητες του διαλύτη και την ευκολία χειρισμού της κρίσιμης θερμοκρασίας και πίεσης (31,1°C και 7,38 MPa), το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)

αποτελεί το πλέον ευρέως χρησιμοποιηθέν υπερκρίσιμο υγρό. Το κρίσιμο CO₂ (SCeCO₂) παρουσιάζει σχετικά χαμηλή ιξώδη τιμή, υψηλού βαθμού μοριακή διαχυτικότητα και χαμηλού βαθμού επιφανειακή τάση στο σύστημα.

Το σύνολο των παραπάνω ιδιοτήτων συνεπάγεται τη βελτίωση της μεταφοράς μάζας (Oliveira & Oliveira, 2000), πρόσθετη αξία των ενώσεων από το ξύλο και τα φύλλα της ελιάς (απόβλητα αποδόμησης) και οδήγησε τη βιομηχανία και τους ερευνητές να επικεντρωθούν στην εκχύλιση SCeCO₂. Η ρύθμιση της πίεσης και της θερμοκρασίας, τροποποιώντας κατά συνέπεια την πυκνότητα, δύναται να μεταβάλει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης των υπερκρίσιμων υγρών. Με την προσθήκη ενός συνδιαλύτη, όπως για παράδειγμα αιθανόλη, μεθανόλη, εξάνιο, ακετόνη, χλωροφόρμιο και νερό, μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί η πολικότητα, κάτι που επίσης ενδέχεται να αλλάξει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης. Στην **Εικόνα 2** παρατίθεται ένα παράδειγμα εξοπλισμού εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά υπό πιλοτική κλίμακα, που συνδέεται με αντλία συνδιαλύτη και το οποίο επιτρέπει την εκχύλιση ενώσεων με υψηλή προστιθέμενη αξία (π.χ. πολυφαινόλες) από φυτικές μήτρες, όπως για παράδειγμα τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα της ελιάς (Roselló-Soto et al., 2015).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση εξοπλισμού εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά (Roselló-Soto et al., 2015, σ.300)

2.1.4 Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (pressurized liquid extraction – PLE)

Η μέθοδος εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (PLE), η οποία ονομάζεται και επιταχυνόμενη εκχύλιση διαλύτη, λειτουργεί με βάση τον συνδυασμό της εφαρμογής θερμοκρασίας και πίεσης σε υψηλό επίπεδο σε υγρούς διαλύτες. Ειδικότερα, η

θερμοκρασία με την οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση ισούται ή υπερβαίνει το σημείο ζέσης του διαλύτη και για τον λόγο αυτό η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από συντομία όσον αφορά τους χρόνους εκχύλισης, χαμηλή κατανάλωση του διαλύτη και, τέλος, από αποδοτικότητα σε υψηλό επίπεδο (Martinez, 2007· Θάνου, 2020).

Η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (PLE) λογίζεται ως μια προηγμένη μέθοδος εκχύλισης κατά την οποία αξιοποιούνται ιδιαίτερες συνθήκες εκχύλισης όπου οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται θερμαίνονται σε υψηλό θερμοκρασιακό επίπεδο και συντηρούνται σε υψηλές πιέσεις, προκειμένου να διατηρούνται σε υγρή κατάσταση για όλη τη διαδικασία της εκχύλισης (Herrero et al., 2011). Έτσι, διευρύνεται η διαλυτότητα των αναλυτών, βελτιώνεται η διάχυση του νερού και ελαττώνεται το ιξώδες του νερού, με αποτέλεσμα την καλύτερη διείσδυση στη μήτρα και την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας, κάτι που συνεπάγεται βελτίωση στην απόδοση της εκχύλισης (Teo et al., 2010). Συνεπώς, πολλά είναι τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την εν λόγω μέθοδο, μεταξύ άλλων, η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, οι συντομότεροι χρόνοι εκχύλισης και η μειωμένη κατανάλωση τοξικών οργανικών διαλυτών (το νερό μαζί με την αιθανόλη αποτελούν τους πλέον χρησιμοποιούμενους διαλύτες) (Herrero et al., 2006· Mustafa & Turner, 2011). Επιπροσθέτως, με αυτή την μέθοδο εκχύλισης επιτυγχάνονται χαμηλότερο λειτουργικό κόστος και ελεγχόμενες συνθήκες εκχύλισης, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται ότι η σύνθεση του εκχυλίσματος θα είναι σταθερή ποιοτική και ποσοτική (Mustafa & Turner, 2011).

Οι συγκεκριμένες μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης διαθέτουν μεγάλη δυναμική όσον αφορά την παραγωγή εκχυλισμάτων που θα έχουν βελτιωμένες και καινοτόμες ιδιότητες, χαμηλότερο κόστος και περιορισμένες επιπτώσεις στο περιβάλλον, χάρη στον διαφορετικό τρόπο δράσης τους, δηλαδή στις μη θερμικές συνθήκες (ή σε χαμηλότερες θερμικές εισροές) και στον ταχύτερο τρόπο δράσης. Τα υποκρίσιμα υγρά ενδέχεται να ληφθούν υπόψη ως υγρά υπό πίεση, χρησιμοποιούμενα με σκοπό την ανάκτηση πολύτιμων ενώσεων. Μάλιστα, με την αύξηση μιας παραμέτρου (είτε πρόκειται για την πίεση είτε για τη θερμοκρασία) πάνω από το κρίσιμο σημείο προκύπτουν τα υποκρίσιμα υγρά. Χάρη στο μικρό κόστος και τη φιλικότητά του προς το περιβάλλον, το νερό συνιστά τον ιδανικό διαλύτη όσον αφορά τη βιομηχανική εκχύλιση ενώσεων από φυτά, οι οποίες διαθέτουν υψηλή προστιθέμενη αξία. Εντούτοις, δεδομένης της χαμηλής του απόδοσης στην εκχύλιση για τις περισσότερες οργανικές ενώσεις, η χρήση του νερού εξακολουθεί να είναι περιορισμένη. Τα κατάλληλα χημικά χαρακτηριστικά εκχύλισης του νερού (πολικότητα, πίεση)

απαντούν κάτω από τη θερμοκρασία των 374°C ή την πίεση 22.1MPa, τα οποία αποτελούν τα κρίσιμα σημεία όπου το νερό βρίσκεται σε υποκριτική κατάσταση. Ως εκ τούτου, το υποκρίσιμο νερό έχει τη δυνατότητα διάλυσης πολικών (σε χαμηλότερες θερμοκρασίες) και μη πολικών (σε υψηλότερες θερμοκρασίες) οργανικών ενώσεων (Roselló-Soto et al., 2015).

2.1.5 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό (*supercritical water extraction – SWE*)

Ως υπερκρίσιμο λογίζεται το νερό που βρίσκεται σε θερμοκρασία μεταξύ 100°C και 374°C και σε πίεση κάτω των 221 bar (Islam et al, 2013), η οποία θεωρείται τόσο υψηλή ώστε να συμβάλλει στη διατήρηση της υγρής κατάστασης του νερού. Αν και λογίζεται ως ο ιδανικός διαλύτης εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων (λ.χ. διαθεσιμότητα, περιορισμένο κόστος, μη τοξικότητα, όπως αναφέρθηκαν και σε προηγούμενη παράγραφο), αποφεύγεται η χρήση του νερού στην περίπτωση της εκχύλισης χαμηλών θερμοκρασιών λόγω της χαμηλού επιπέδου απόδοσής του (Θάνου, 2020).

2.1.6 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (*pulsed electric fields – PEF*)

Μια καινοτόμος, μη θερμική μέθοδος που αξιοποιείται στο πλαίσιο της συντήρησης των τροφίμων είναι η επεξεργασία τους με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (ΠΗΠ). Αποσκοπεί στην αδρανοποίηση είτε των ενζύμων είτε των μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας παλμούς σε υψηλή ένταση, οι οποίοι επιδρούν περιορισμένα τόσο στην οργανοληπτική ποιότητα όσο και στη θρεπτική αξία του υπό επεξεργασία δείγματος. Ως μέθοδος απαντά συχνά και ευρέως σε μια ποικιλία διαδικασιών που περιλαμβάνει την εκχύλιση με διάχυση διαλύτη, την κατάψυξη, την ξήρανση και την ωσμωτική αφυδάτωση, είτε αυτές διεξάγονται πιλοτικά σε εργαστηριακές συνθήκες είτε κανονικά στη βιομηχανία, όπως για παράδειγμα κατά την προεπεξεργασία που συντελείται πριν την παρασκευή τηγανητών πατατών ή κατά την κρύα παστερίωση σε υγρά τρόφιμα (π.χ. χυμοί φρούτων) (Ferreira et al., 2019· Martínez et al., 2019). Συγκριτικά με λοιπές μεθόδους θερμικής επεξεργασίας φαίνεται πως υπερτερεί, δεδομένου ότι περιορίζει τυχόν μεταβολές που επιδεινώνουν την ποιότητα και τη θρεπτική αξία των τροφίμων. Ταυτόχρονα, συμβάλλει στη διατήρηση των οργανοληπτικών και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των τροφίμων συγκριτικά με συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας (Arshad et al., 2020). Η εφαρμογή της απαντά σε

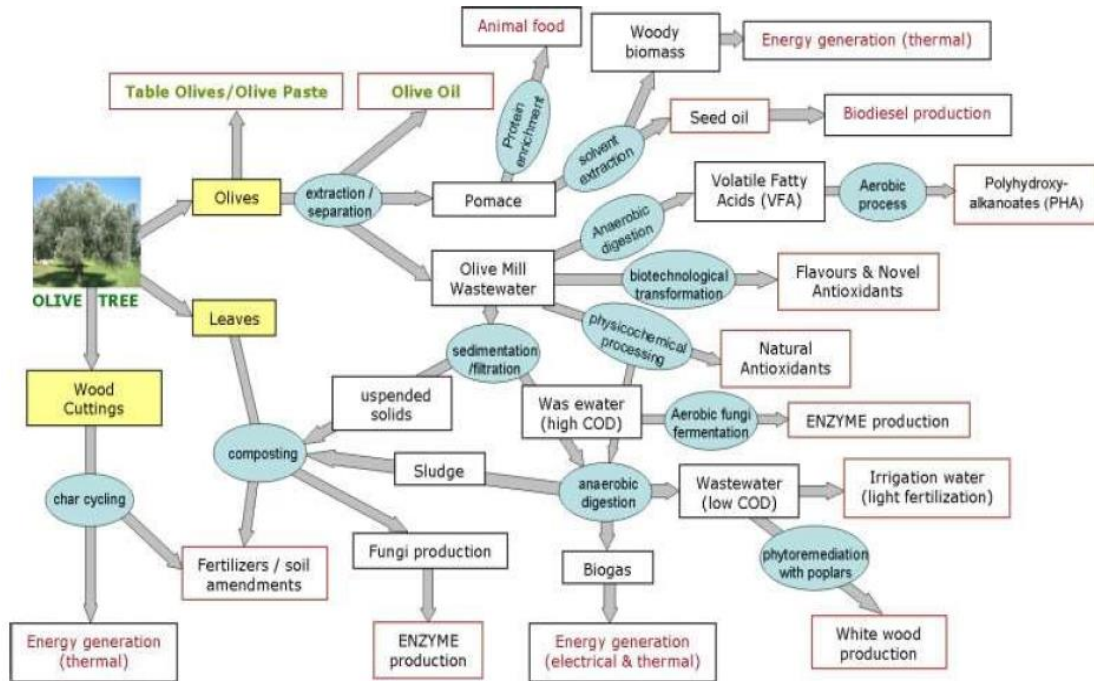
μια πληθώρα κατηγοριών τροφίμων (στερεά τρόφιμα, π.χ. μήλα, πατάτες, ημιστερεά τρόφιμα, π.χ. προϊόντα αυγών, ρευστά τρόφιμα, π.χ. γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, κρόκοι αυγών, χυμοί φρούτων ή γιαουρτιών, σούπες κ.ά.) (Mohamed & Amer Eissa, 2012)

Σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες, στις οποίες γίνεται αναφορά στην εν λόγω εργασία, η μέθοδος αυτής είναι αποτελεσματική όσον αφορά την ανάκτηση-εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτά, φρούτα, παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων όπως επίσης και στη βίο-ανάκτηση καταλοίπων και αποβλήτων από βιομάζες εξωτικών φρούτων και από λιγνοκυτταρικά και ελαιώδη συστατικά καλλιεργειών (Arshad et al., 2020).

Η εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία έχει οικολογικό χαρακτήρα και καθώς συμβάλλει στον περιορισμό της κατανάλωσης ενέργειας και με τη μη χρήση χημικών διαλυτών (Putnik et al., 2018). Ο ρόλος της εν λόγω μεθόδου είναι αυτός του αντικαταστάτη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, η λειτουργία των οποίων περιλαμβάνει τη χρήση διαλυτών μέσω της θέρμανσης ή και της ανάδευσής τους (Πριλή, 2021).

2.2 ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά, δέντρο του οποίου η καλλιέργεια είναι εκτεταμένη στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα, έχει λάβει τη συστηματική ονομασία *Olea europaea*. Ο καρπός της ελιάς χωρίζεται σε τρία βασικά μέρη, το επικάρπιο, το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο. Στα βασικά του συστατικά περιλαμβάνονται το ελαιόλαδο, το νερό, κόμμεα, οργανικά οξέα, πολυφαινόλες πρωτεΐνες, σάκχαρα και ανόργανα συστατικά (González-Hidalgo et al., 2012). Τόσο η σύσταση του ελαιόκαρπου όσο και αυτή του ελαιόλαδου επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, συγκεκριμένα από τη γεωγραφική θέση, το κλίμα, τις μεθόδους επεξεργασίας, την ποικιλία και τη χρονική περίοδο της συγκομιδής (Allouche et al., 2003· Obied et al., 2005). Αν και οι ελαιοπαραγωγές χώρες, όπως η Ελλάδα, καρπώνονται τα οικονομικά οφέλη της παραγωγής και των εξαγωγών ελαιόλαδου, έρχονται αντιμέτωπες με ένα σημαντικό ζήτημα, αυτό των τοξικών αποβλήτων, απόρροια της επεξεργασίας της ελιάς, τα οποία αγγίζουν σε ποσότητα τους 6-7 εκατομμύρια τόνους ετησίως όσον αφορά τη χρονική περίοδο της ελαιοποίησης (Ranalli et al., 2003· Fekia et al., 2006· Δεδούση & Μαμουδάκη, 2017) (**Εικόνα 3**).



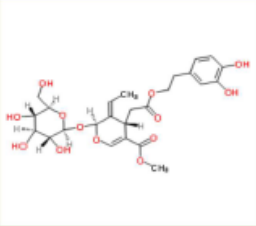
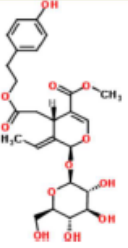
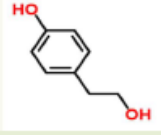
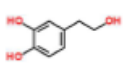
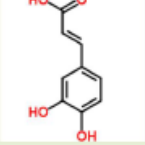
Εικόνα 3: Τρόποι επεξεργασίας & διάθεσης αποβλήτων & υποπροϊόντων της ελιάς (Δεδούση & Μαμουδάκη, 2017, σ.10, στο Federici et al., 2009)

2.2.1 Πολυφαινολική σύσταση των φύλλων ελιάς

Οι πολυφαινόλες είναι ενώσεις που ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά, των οποίων ως κατηγορία διαθέτει ιδιαίτερη σημασία. Πρόκειται για έναν όρο που χρησιμοποιείται για την περιγραφή πληθώρας δευτερευόντων μεταβολιτών, που εμφανίζουν διαφορές ως προς τη δραστηριότητα και τη χημική τους δομή (Sanchez et al., 2013). Εντούτοις, οι συγκεκριμένες ενώσεις που εντοπίζονται εν γένει στις ελιές και στα υποπροϊόντα τους, καθώς και στο ελαιόλαδο (Allouche et al., 2003) έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις (Sanchez et al., 2013· Obied et al., 2007· Angelino et al., 2011), στις οποίες απαντούν η καταστολή των όποιων οξειδωτικών αντιδράσεων συμβάλλουν στη γένεση και εξέλιξη πληθώρας ασθενειών (Jerman Klen et al., 2011), γεγονός που αναφέρεται και εν συνεχεία.

Πιο αναλυτικά, τα φύλλα ελιάς περιέχουν πολυφαινόλες που κατ' εκτίμηση βρίσκονται στα 15-35mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εκχυλίσματος φύλλων ελιάς. Η πληροφορία αυτή εξήχθη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Follin Ciocalteu (Hayes et al., 2011), ενώ ως βασικό συστατικό τους αναφέρεται το σεκοιριδοειδές ολευρωπαΐνη, του οποίου η περιεκτικότητα ανέρχεται στο 5-9% (Sedef et al, 2014· Giamarellos-Bourboulis et al. 2006· EMA, 2011). Ακόμη, τα φύλλα της ελιάς περιέχουν φλαβονοειδή (π.χ. απιγενίνη, κεμπφερόλη,

λουτεολίνη, χρυσοεριόλη,) σε σημαντικές ποσότητες, τριτερπένια (π.χ. μασλινικό και ολεανολικό οξύ), φαινολικές ενώσεις (π.χ. βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), όπως επίσης και ελενολικό οξύ, κερσετίνη, λιγκστοσίδη, πρωτοκατεχικό οξύ και ρουτίνη (Sedef et al, 2014· Hayes et al., 2011· EMA, 2011) (**Εικόνα 4**).

Όνομα	Χημική δομή
Ολζερωπαΐνη (σεκοιριδοειδές)	
Λιγκστροσίδη (σεκοιριδοειδές)	
Τυροσόλη (φαινόλη)	
Υδροξυτυροσόλη (φαινόλη)	
Καφεϊκό οξύ (φαινόλη)	

Εικόνα 4: Οι κύριοι χημικοί τύποι των πολυφαινολών στα φύλλα ελιάς (Δεδούση & Μαμουδάκη, 2017, σ.14).

Η δράση των προαναφερθεισών βιοφαινολών είναι πολυσχιδής, ούσα αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης και καρδιοπροστατευτική. Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, έρευνες *in vitro* στα ευρήματα των οποίων συγκαταλέγονται η αντιυπερτασική δράση που διαθέτει η ολζερωπαΐνη, η αντικαταθλιπτική δράση που διαθέτει το καφεϊκό οξύ και οι πάρα πολλές θετικές επιδράσεων της υδροξυτυροσόλης. Τα φύλλα της ελιάς διαφέρουν ως προς τη

σύστασή τους συναρτήσει της εποχής του χρόνου, των περιβαλλοντολογικών συνθηκών, της ποικιλίας του ελαιόδεντρου, της ποιότητας του εδάφους, του τρόπου καλλιέργειας που ακολουθείται και, τέλος, του τρόπου συλλογής τους (Giamarellos-Bourboulis et al., 2006).

2.2.2 Χρήσεις των φύλλων ελιάς

Η χρήση των φύλλων της ελιάς είναι ευρεία και απαντά σε παραδοσιακές θεραπείες σε μια πληθώρα χωρών γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα και γενικότερα στην Ευρώπη (Γαλλία, Ελλάδα, Ισπανία, Ισραήλ, Ιταλία, Μαρόκο, Τουρκία, Τυνησία κ.ά.). Επίσης, από τις αρχές του 19ου αιώνα έχουν χρησιμοποιηθεί και ως αφέψημα, εκχύλισμα όπως επίσης και με τη μορφή σκόνης (Sedef et al, 2014· EMA, 2011). Σε ό,τι αφορά την κατανάλωσή τους, ήταν κι αυτή ευρεία λόγω της περιεκτικότητας τους στις προαναφερθείσες βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες λειτουργούν ευεργετικά όπως επίσης προαναφέρθηκε (Sedef et al, 2014). Ακόμη, τα φύλλα της ελιάς με τη μορφή αφεψήματος εμφανίζουν αντιϊική και αντιμικροβιακή δράση, πρωτίστως όσον αφορά το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Τα φύλλα της ελιάς με τη μορφή εκχυλίσματος μπορούν να αξιοποιηθούν στην εναλλακτική ιατρική λόγω της δυνατότητάς τους στην εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών, ποικίλων βακτηρίων, ιών και μυκήτων μέσω της αναστολής της αναπαραγωγής τους (Giamarellos-Bourboulis et al., 2006). Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για ως αντιπυρετικά, λόγω της ολεωρωπαΐνης, αλλά και εναντίων λοιπών νοσημάτων (π.χ. διάρροια, ελονοσία, ουρολοίμωξη, ρευματισμοί). Η χρήση τους, μάλιστα, δεν περιορίζεται σ' αυτά, καθώς μπορούν να περιορίσουν την αρτηριακή πίεση, να αυξήσουν τη ροή του αίματος στις στεφανιαίες αρτηρίες, να προσφέρουν ανακούφιση από καρδιακές αρρυθμίες και, τέλος, να προλάβουν την εκδήλωση σπασμών στους μύες του εντέρου. Τέλος, τα φύλλα της ελιάς έχουν και διουρητική δράση ως σκεύασμα αν υπάρχει ελαφρά κατακράτηση ούρων, ενώ λειτουργούν και επουλωτικά όταν εφαρμόζονται εξωτερικά (EMA, 2011· Δεδούση & Μαμουδάκη, 2017).

2.2.2.1 Βιολογική δράση φύλλων ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς διαθέτουν βιολογική δράση καθώς περιέχουν ποικίλες βιοενεργές ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι δρουν ευεργετικά όσον αφορά την υγεία, έχουν θεραπευτικές δυνατότητες και

συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες. Διαχρονικά, παρατηρείται χρήση των φύλλων της ελιάς στο πλαίσιο παραδοσιακών θεραπειών απέναντι στον πυρετό και ποικίλα νοσήματα, μεταξύ των οποίων και η ανεμοβλογιά. Σύμφωνα με ερευνητικά στοιχεία, οι θεραπευτικές ιδιότητες που εμφανίζουν τα φύλλα της ελιάς αποδίδονται στην περιεκτικότητά τους σε βιοφαινόλες, οι οποίες αποτελούν μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Η καθημερινή κατανάλωση βιοφαινολών φαίνεται πως επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα στον ανθρώπινο οργανισμό (Ho, 1992· Saija et al., 2001· Scalbert et al., 2002).

2.2.2.2 Αντιοξειδωτική δράση

Με τον όρο αντιοξειδωτική δράση γίνεται αναφορά στην ικανότητα που διαθέτει μια ουσία στον μετριασμό των παραγόντων που η δράση τους ευνοεί την εμφάνιση οξείδωσης (Prior & Cao, 1999). Συγκεκριμένα, με τα αντιοξειδωτικά είναι εφικτή είτε η καθυστέρηση είτε η αποφυγή της οξείδωσης στα κυτταρικά υποστρώματα, γεγονός που τα καθιστά σημαίνουσας σημασίας για τη διαδικασία της επεξεργασίας τροφίμων. Το κόστος των συνθετικών αντιοξειδωτικών (π.χ. BHT, BHA) δεν είναι υψηλό, ενώ παράλληλα αυτά διακρίνονται για τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητά τους κατά τη χρήση, η οποία ωστόσο έχει περιοριστεί. Τα αίτια για τον περιορισμό της μπορούν να εντοπιστούν αρχικά στην υποψία πρόκλησης καρκινογένεσης και στην έλλειψη ενδιαφέροντος γι' αυτά από πλευράς των καταναλωτών. Αντιθέτως, αυξημένο είναι το ενδιαφέρον τους για φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως είναι τα φύλλα της ελιάς, ακριβώς για την αντιοξειδωτική δράση τους, η οποία είναι σε υψηλό επίπεδο (Erbay & Icier, 2010· Lai et al., 2010).

Μέσα από ποικίλες μελέτες καταδείχτηκε ότι τα πολικά εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς αποτελούν θετικούς παράγοντες για τη δέσμευση ποικίλων ειδών ελευθέρων ριζών. Επίσης, από μελέτες καταδείχτηκε η αυξημένη δραστηριότητα των υδρολυμένων εκχυλισμάτων, τα οποία αποτελούν πλούσια πηγή υδροξυτυροσόλης, σε σχέση με αυτήν των υδατοαλκοολικών και των πολικών εκχυλισμάτων, η παραγωγή των οποίων έγινε με τη συνδρομή οξικού αιθυλεστέρα (Pérez-Bonilla et al., 2006).

Αναφορικά με τα μη πολικά συστατικά τα οποία εντοπίζονται στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς, αυτά είναι το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ, που είναι ισομερή, όπως επίσης και η α-τοκοφερόλη. Τα συστατικά αυτά διαθέτουν ανάλογη

αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο περιορισμένη ικανότητα δέσμευσης ριζών (Pérez-Bonilla et al., 2006). Επιπλέον, οι Yin και Chan (2007) διερεύνησαν αρχικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο προαναφερθέντων οξέων σε συστήματα διασποράς (λιποσώματα) με ποικίλες συνθήκες θέρμανσης και pH και, στη συνέχεια, συνέκριναν τα ευρήματα τους με τα αντίστοιχα της διερεύνησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας της α-τοκοφερόλης. Εξ αυτών συμπεράναν ότι η δράση των δύο οξέων ήταν καλύτερη σε σχέση με αυτή της βιταμίνης E υπό ορισμένες συνθήκες.

Ακόμη ένα σημαντικό δραστικό αντιοξειδωτικό των προϊόντων της ελιάς είναι και η υδροξυτυροσόλη, καθώς τα προϊόντα υδρόλυσής της διαθέτουν βέλτιστη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με αυτή της ελευρωπαΐνης (Walter et al., 1973). Μάλιστα, έχει αποδειχτεί ότι η υδροξυτυροσόλη έχει την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και μορφών οξυγόνου και αζώτου μέσω πλήθους σε δοκιμές *in vitro* (Boskou et al., 2005· Boskou et al., 2006). Ακόμη, έρευνες έχουν καταδείξει ότι η εν λόγω ένωση λειτουργεί προληπτικά όσον αφορά μια ποικιλία νοσημάτων, στα οποία συγκαταλέγονται ο σακχαρώδης διαβήτης, καρδιαγγειακές διαταραχές, κάποιοι καρκινικοί τύποι και ιοί που θεωρούνται θανατηφόροι (π.χ. HIV) (Obied et al., 2005· Visioli et al., 2006· Nenadis & Tsimidou, 2009).

Σε ό,τι αφορά την ελευρωπαΐνη, η αντιοξειδωτική της ικανότητα είναι καλύτερη συγκριτικά με το λιποδιαλυτό ανάλογο της τοκοφερόλης (Speroni et al., 1998). Ως εκ τούτου, έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλλει συνολικά στην ελάττωση των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιεί το οξειδωτικό μυοκαρδιακό στρες (Agalias et al., 2007). Ακόμη ένα αντιοξειδωτικό, το οποίο μάλιστα θεωρείται ως ισχυρό πρωτοταγές, αποτελεί ο βερμπασκοζίτης. Η εν λόγω ένωση έχει 2 με 3 φορές μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ριζών συγκριτικά με την υδροξυτυροσόλη (Aldini et al., 2006).

Επίσης, η δραστηριότητα των σεκοϊριδοειδών και των συγγενών μ' αυτά ενώσεων εξαρτώνται από τις πειραματικές συνθήκες (Carrasco-Pancorbo et al., 2005b· Nenadis & Tsimidou, 2009). Οι Benavente-Garcia et al. (2000), οι οποίοι διερεύνησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα που διαθέτει το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς, διαπίστωσαν ότι αυτή ήταν υψηλότερου επιπέδου σε σχέση με την αντίστοιχη ικανότητα των βιταμινών C και E. Η αιτία γι' αυτή τη διαφοροποίηση εντοπίζεται στην εμφάνιση συνεργατικής δράσης ανάμεσα στα φλαβονοειδή και στα υποκατάστατα των φαινολών. Σύμφωνα με έρευνα που διενήργησαν οι Papoti et al. (2018) στην Ελλάδα, η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των φύλλων της

ελιάς δεν επηρεάζεται από την ποικιλία της. Μάλιστα, η διερεύνηση του παράγοντα «ποικιλία» πραγματοποιήθηκε με τη συμμετοχή επτά ποικιλιών που εντοπίζονται στην Ελλάδα και δεν είναι τόσο γνωστές (Asprolia, Atsilochou, Chrysophilli, Veroia, Gigas, Petrolia, and Pikrolia), και μιας από την Ισπανία (Arbequina).

Διαρκή αύξηση όσον αφορά την αποδοτικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς παρατηρήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσής του από 10,29mg σε 38mg GAE L-1, σε ποσοστό μάλιστα άνω του 80%. Ακόμη, έρευνες κατέδειξαν τη μεθανόλη ως τον πλέον κατάλληλος διαλύτης με τον οποίο μπορεί να παραχθεί εκχύλισμα πλούσιο σε πολυφαινόλες (Nashwa et al., 2014).

Επιπροσθέτως, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς έχουν ορισμένες περαιτέρω δράσεις, την αντι-HIV και την υπογλυκαιμική δράση (Yancheva et al., 2016· Mkaouar et al., 2016). Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας επί της ουσίας την LDL χοληστερόλης από οξείδωση όπως επίσης και τον επιθηλιακό ιστό από ανάλογους παράγοντες. Ως εκ τούτου, περιορίζεται ο κίνδυνος σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας και, συνεπώς, και ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιοπαθειών.

2.2.2.3 Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση

Το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς είναι εξίσου χρήσιμο και για την ελαχιστοποίηση του ενδεχόμενου προσβολής του ανθρώπινου οργανισμού από μικρόβια, συγκεκριμένα του αναπνευστικού και του εντερικού συστήματος αυτού, εξαιτίας των πολυφαινολών που διαθέτει, οι οποίες εμφανίζουν συνεργατική και προσθετική δράση. Σύμφωνα με τους Pereira et al. (2007), οι οποίοι προχώρησαν σε μελέτη της ανασταλτικής δράσης ενάντια σε μικροοργανισμούς οι οποίοι συμβάλλουν στην ποιοτική υποβάθμιση ενός τροφίμου και ταυτόχρονα έχουν την ικανότητα προσβολής του αναπνευστικού και εντερικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού, το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς δρα αποτελεσματικά ενάντια στους ακόλουθους μικροοργανισμούς: *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. neoformans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus* (Gram θετικοί) και *C. albicans* (μύκητας). Η σειρά καταγραφής των προαναφερθέντων μικροοργανισμών ακολουθεί τη σειρά ευαισθησίας του εκχυλίσματος στην καταπολέμησή τους.

Είναι αποδεδειγμένο ότι η ελευρωπαΐνη και οι μεταβολιτές ενώσεις αυτής, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, προσφέρουν στην ελιά (*Olea europaea*) την ικανότητα αντίστασης ενάντια σε μικρόβια και έντομα (Kubo et al., 1985).

Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί η δράση τους κατά των βακτηρίων γαλακτικού οξέος και άλλων μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν εμπλέκονται στην ωρίμανση των ελιών (Vaughn et al., 1954). Επίσης, έχει αποδειχτεί τόσο η ελευρωπαϊνή όσο και η υδροτυροσόλη που περιέχονται στα εκχυλίσματα των φύλλων των ελιάς αποτελούν πρώτης κατηγορίας αναστολείς του HIV-1, δρώντας αποτελεσματικά κατά της ιογενούς συγχώνευσης και ολοκλήρωσης (Lee-Huang et al., 2007). Στην **Εικόνα 5** που ακολουθεί απεικονίζονται οι αντιμικροβιακές δράσεις που διαθέτει το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς (Κατικαρίδου, 2017).

Ένωση εκχ. Φύλλων ελιάς	Όγκος	Επιδράσεις	Αναφορά
Ελευρωπαϊνή	0.1% (w/v)	Καθυστέρηση της ανάπτυξης του <i>Staphylococcus aureus</i>	Therios, 2009
	0.2%	Αποτροπή της ανάπτυξης και παραγωγής της εντεροτοξίνης Β στα τεχνητά θρεπτικά μέσα	
Καφεϊκά και πρωτοκατεχικά οξέα	0.3 mg/mL	Αναστολή ανάπτυξης της <i>E. coli</i> και της <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Συνεργιστικά οξέα	0.5 mg/mL	Αναστολή ανάπτυξης του <i>Bacillus cereus</i>	
Ελευρωπαϊνή και π-υδροξυ βενζοϊκό, Βανιλικά και π-κουματικά οξέα	0.4 mg/mL	Αναστολή ανάπτυξης των <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> και <i>B. cereus</i>	
Βανιλικά και καφεϊκά οξέα	0.2 mg/mL	Αναστολή παραγωγής αφλατοξίνης από <i>Aspergillus flavus</i> και <i>A. parasiticus</i>	
Εκχύλισμα νερού των φύλλων ελιάς	1.25% (w/v)	Αναστολή δερματόφυτων έπειτα από τριήμερη έκθεση	Markin, Duek, & Berdicevsky, 2003
	20% (w/v)	Εξουδετέρωση του <i>B. subtilis</i> από το νερό του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς	

Εικόνα 5: Αντιμικροβιακές ιδιότητες του εκχυλίσματος από τα φύλλα ελιάς (Κατικαρίδου, 2017, σ.29)

2.2.2.4 Αντικαρκινική δράση

Η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας καταδεικνύει την ύπαρξη ικανού αριθμού μελετών *in vivo* και *in vitro*, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν ότι η ελαιοευρωπαϊνή (OL) παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δράση, αποτελώντας ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό συστατικό.

Πιο αναλυτικά, οι Serpotta et al. (2014), διερευνώντας το κατά πόσον η OL ήταν σε θέση να αναστείλει την καρκινογενετική διαδικασία, πραγματοποίησαν μελέτη σε αθυμικά ποντίκια στα οποία εγχύθηκε ξενομόσχευμα MCF-7 στον λιπώδη ιστό των μαστών, τα οποία εν συνεχεία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, εκ των οποίων η μία έλαβε δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιοευρωπαϊνή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ελαιοευρωπαϊνή ανέστειλε την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων MCF-7 και εμπόδισε την μετάστασή τους στους πνεύμονες των πειραματόζωων που έλαβαν την εμπλουτισμένη δίαιτα.

Περαιτέρω, σε έρευνα των Bulotta et al. (2014) αξιολογήθηκε η επίδραση της ελαιοευρωπαϊνης και της υπερακετυλιωμένης ελαιοευρωπαϊνης έναντι θυροειδικών όγκων σε δύο κυτταρικές σειρές που παρουσίαζαν γονοτυπικές αλλαγές που στον ανθρώπινο οργανισμό εντοπίζονται ως θηλοειδής καρκίνος του θυροειδούς (TPC-1 και BCPAP). Η μελέτη έδειξε ότι η ελαιοευρωπαϊνή μπορούσε να μειώσει τα επίπεδα των ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα θυροειδικά κύτταρα και μέσω της οδού αυτής, να αναστείλει σε σημαντικό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του θυροειδούς (TPC-1 και BCPAP), εμφανίζοντας παράλληλα ήπια επίδραση στην μη καρκινική κυτταρική σειρά TAD-2. Η ίδια μελέτη παραπέμπει σε προγενέστερες έρευνες που έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της συμπληρωματικής χορήγησης ελαιοευρωπαϊνης και της αναστολής της ενεργοποίησης της εξωκυτταρικής κινάσης ρυθμιζόμενης με σήμα (ERK), που παρουσιάζεται σε περιπτώσεις νεοπλασίας στο μαστό (Sirianni et al., 2010, στο: Bulotta et al., 2014). Παράλληλα, βάσει των ευρημάτων της μελέτης προκύπτει ότι οι προαναφερθείσες επιδράσεις της ελαιοευρωπαϊνης βελτιώνονται με την υπερακετυλίωσή της.

Επιπλέον, οι Carrera-Gonzalez et al. (2013), αξιοποιώντας δευτερογενώς ευρήματα από *in vitro* και *in vivo* έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ελαιοευρωπαϊνή μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά και θεραπευτικά έναντι ποικίλων τύπων νεοπλασιών, όπως του καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού και του δέρματος,

καθώς έναντι νευρογλοιακών όγκων λόγω της ικανότητάς της να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Σύμφωνα με τους μελετητές, το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία παρενεργειών, την καθιστά ένα καινοτόμο φυσικό συστατικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με συμβατικές θεραπείες για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Επίσης, οι Grawish et al., 2011 σε κλινική μελέτη τους σε 80 αρουραίους μελέτησαν την χημειοπροστατευτική επίδραση της χορήγησης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στον οργανισμό, έναντι του καρκίνου της γλώσσας που προκαλείται από 4-NQO. Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, τα ζώα υποβλήθηκαν σε ευθανασία και οι γλώσσες τους υποβλήθηκαν σε ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ευεργετική επίδραση της ελαιοευρωπαϊνης στην εξέλιξη της νεοπλασίας.

Στο ίδιο πλαίσιο, ερευνητικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι το ακατέργαστο εκχύλισμα φύλλων ελιάς φαίνεται να δρα ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων μέσω της απόπτωσης, καθώς των καρκινικών κυττάρων που εντοπίζονται σε περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος του μαστού και της ουροδόχου κύστης (Fares et al., 2011· Goulas et al., 2009). Τέλος, σύμφωνα με τους Taamalli et al. (2012) η χορήγηση εκχυλίσματος φύλλων ελιάς πλουσιότερου σε φλαβόνες, φάνηκε να έχει υψηλή αντικαρκινική δράση έναντι νεοπλασιών του μαστού, υπογραμμίζοντας ωστόσο τον πολυπαραγοντικό χαρακτήρα των θεραπευτικών επιδράσεων, που σύμφωνα με τους ερευνητές επηρεάζονται από την παρουσία συγκεκριμένων ενώσεων και ουσιών στα εκχυλίσματα και όχι από την αποκλειστική παρουσία μιας και μόνης ένωσης.

Τέλος, μελέτη των Sumiyoshi και Kimura (2010) σε πειραματόζωα αξιολόγησε ως ευεργετική την επίδραση της από στόματος χορήγησης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (300mg/kg ή 1000mg/kg) και ελαιοευρωπαϊνης (25mg/kg ή 85mg/kg) αντίστοιχα στην αντικαρκινική προστασία έναντι της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία Β (UVB). Πιο λεπτομερώς, και οι δύο θεραπείες φάνηκε να είναι σε θέση να αναστείλουν την πάχυνση της κερατινικής στιβάδας της επιδερμίδας (υπερκεράτωση), καθώς και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του δέρματος, με αποτέλεσμα των περιορισμό της δερματικής βλάβης.

2.2.3 Τα φύλλα ελιάς ως λειτουργικά συστατικά

Τα λειτουργικά τρόφιμα και οι πρόσθετες προστατευτικές και θεραπευτικές τους ιδιότητες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Παρά το γεγονός ότι τα οφέλη των λειτουργικών τροφίμων στην προστασία και την βελτίωση της υγείας όσων τα καταναλώνουν έχουν καταδειχθεί ερευνητικά, τα τρόφιμα αυτά και ιδιαίτερα τα υποπροϊόντα τους που προκύπτουν από την επεξεργασία τους ως πρώτη ύλη, προς το παρόν δεν αξιοποιούνται πλήρως (Ayala-Zavala et al., 2011). Βάσει των κριτηρίων ταξινόμησης των διαφόρων τροφίμων, τα φύλλα ελιάς αποτελούν λειτουργικά συστατικά, καθώς περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά που παρουσιάζουν μια σειρά από επωφελείς δράσεις.

Πιο αναλυτικά, τα φύλλα ελιάς χρησιμοποιούνται από την βιομηχανία τροφίμων για την συντήρηση, την αύξηση της διάρκειας ζωής και την διατήρηση των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων, ενώ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης τους με την περιεκτικότητά τους σε φαινόλες και τους παράγοντες που την προσδιορίζουν, όπως η μέθοδος εκχύλισης και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται (Bouaziz et al., 2010). Οι παράμετροι αυτές εξετάστηκαν σε μελέτη των Kiritsakis et al. (2010), που χρησιμοποιώντας ως δείγμα αναφοράς τρεις διαφορετικές ποικιλίες ελαιόδεντρων (κορωνέικη, μεγαρίτικη και καλαμών), κατέληξαν ότι η πολικότητα του διαλύτη και η αναλογία του εκχυλίσματος επηρεάζουν την περιεκτικότητά τους σε ολικές φαινόλες, η οποία με την σειρά της παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση των φύλλων ελιάς. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι παρά τις μικρές διαφορές που παρουσιάστηκαν μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών, το εκχύλισμα με αναλογία μεθανόλης/νερού 60/40 ανέστειλε σημαντικά τη λιποξυγενάση της σόγιας.

Η επαρκώς τεκμηριωμένη δράση των φύλλων ελιάς για την συντήρηση των τροφίμων έχει ως αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο είτε ως ελαφρώς επεξεργασμένο φυτικό υλικό είτε σε μορφή εκχυλίσματος (Salta et al., 2007). Στο πλαίσιο αυτό, τα φύλλα ελιάς ενσωματώνονται σε συντηρητικά έλαια, καθώς και σε συστήματα τροφίμων και επεξεργασμένα τρόφιμα, με την βοήθεια πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών (Baycin et al., 2007· Bouaziz et al., 2008· Mourtzinis et al., 2007).

Πέραν αυτών, τα φύλλα ελιάς διατίθενται ανάλογα με την ισχύουσα νομοθεσία στα επιμέρους κράτη στο λιανικό εμπόριο με την μορφή συμπληρωματικών αντιοξειδωτικών και φαρμακευτικών σκευασμάτων, εκχυλισμάτων, φακέλων

αφεψήματος τύπου τσαγιού, ολόκληρων φύλλων και κονιορτοποιημένου ξηρού υλικού. Τα προϊόντα αυτά υπόκεινται στους περιορισμούς και τις προϋποθέσεις που θέτουν οι εθνικές νομοθεσίες των διαφόρων χωρών, ώστε να εξασφαλίζεται η νόμιμη διάθεσή τους και ασφαλής τους χρήση (Hanekamp & Bast, 2007).

2.2.4 Εκχύλιση βιοενεργών κλασμάτων συστατικών από φύλλα ελιάς

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα του φυτικού υλικού, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες με εστίαση και ευρήματα ικανά να υποδείξουν τις βέλτιστες συνθήκες και επεξεργασμένες μορφές του που παρουσιάζουν την μέγιστη δυνατή συγκέντρωση σε συστατικά και ενώσεις που μπορούν να δράσουν προστατευτικά ή/και θεραπευτικά έναντι του καρκίνου, όπως η υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες που προαναφέρθηκε. (Samuelsson, 1996). Επιπλέον, κρίσιμης σημασίας ζήτημα αποτελεί η διερεύνηση των συνθηκών και των προϋποθέσεων εκείνων που εξασφαλίζουν τις καταλληλότερες συνθήκες συντήρησης του υλικού, δεδομένου ότι η άμεση επεξεργασία της πρώτης ύλης δεν είναι πάντοτε εφικτή.

Βάσει των δεδομένων της υπάρχουσας διεθνούς βιβλιογραφίας, τα φύλλα ελιάς διατίθενται προς επεξεργασία ή/και κατανάλωση είτε νωπά, αφού φυσικά προηγηθούν οι εργασίες καθαρισμού τους, είτε κατεψυγμένα, είτε σε αποξηραμένη μορφή. Για την αποξήρανση μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία μεθόδων που περιλαμβάνουν την φυσική τους αποξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας, την ξήρανση με μικροκύματα, την θέρμανσή τους σε κλίβανο αέρα ή μη, καθώς και τη διαδικασία της κρυοξήρανσης ή λυοφιλίωσης, κατά την οποία το υλικό αρχικά ψύχεται σε χαμηλή θερμοκρασία και εν συνεχεία υπόκειται σε εξάχνωση για να απομακρυνθεί το νερό.

Η ξήρανση, πραγματοποιούμενη είτε με τεχνητά είτε με φυσικά μέσα, έχει ως στόχο να αφυδατωθεί το υλικό ούτως ώστε να περιοριστούν όσο είναι δυνατόν η υδρόλυση και η οξειδωση – ενζυμικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μετά το κόψιμο των φύλλων από τον βλαστό και συντελούν στην αποσύνθεσή του. Δεδομένου ότι οι διεργασίες αυτές συντελούνται σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας, χρησιμοποιώντας το νερό που εμπεριέχεται στα χυμοτόπια, η άμεση απομάκρυνση του νερού από τα φυτικά κύτταρα περιορίζει ταχύτατα την αποσύνθεση, καθώς και τον κίνδυνο ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων λόγω εξωτερικών προσβολών. Στο πλαίσιο αυτό,

η θερμοκρασία και ο χρόνος έκθεσης του υλικού στο εκάστοτε μέσο ξήρανσης αποτελούν παράγοντες μεγάλης σημασίας, καθώς λανθασμένοι χειρισμοί αυτών παραμέτρων ενδέχεται υπό συνθήκες να επιφέρουν αλλοιώσεις στα ευπαθή συστατικά του υλικού και στη χημική του σύνθεση (Pérez-Jiménez et al., 2008· Martín-García & Molina Alcaide, 2008).

Πέραν αυτού, κρίσιμης σημασίας για την συντήρηση του υλικού είναι και οι συνθήκες αποθήκευσής του. Πιο συγκεκριμένα, τα αποξηραμένα φύλλα ελιάς θα πρέπει να διατηρούνται σε δροσερό περιβάλλον χαμηλής υγρασίας, μέσα σε γυάλινους περιέκτες σκούρου χρώματος, που θα πρέπει να έχουν σφραγιστεί ερμητικά, αφού έχει προηγηθεί η διαδικασία αφαίρεσης του αέρα από το εσωτερικό της συσκευασίας (Samuelsson, 1996).

Σε κάθε περίπτωση, καθίσταται σαφές ότι τα χαρακτηριστικά, οι ιδιότητες και η σύνθεση ενός βιοενεργού κλάσματος αποτελούν συνάρτηση μιας σειράς παραγόντων που σχετίζονται με την σύσταση που είχε το υλικό στην φυσική του κατάσταση στην αρχή της διαδικασίας επεξεργασίας του, αλλά και από την διαχείρισή του στην συνέχεια, καθ' όλα τα στάδια επεξεργασίας, συσκευασίας και αποθήκευσης (Tura & Robards, 2002· Pérez-Jiménez et al., 2008).

Από την διεθνή βιβλιογραφία, προκύπτει ότι οι προστατευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς συναρτάται με την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες εντοπίζονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων και στο κενοτόπιο. Αναλυτικότερα, στο μεν κυτταρικό τοίχωμα εντοπίζονται τα φλαβονοειδή, οι λιγνίνες και τα εστεροποιημένα φερουλλικά οξέα, ενώ αντίστοιχα στο κενοτόπιο συγκεντρώνονται υδατοδιαλυτές κατηγορίες φαινολών και παράγωγα αυτών (Mkaouar et al., 2016).

Συνεχίζοντας, προκειμένου για την ανάκτηση των αντιοξειδωτικών ουσιών από φυτικές πρώτες ύλες, χρησιμοποιούνται μέθοδοι εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες, η πολικότητα των οποίων έχει αποδειχθεί ερευνητικά ότι επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση του υλικού (Oreopoulou et al., 2006).

Πιο λεπτομερώς, η εκχύλιση αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία με την βοήθεια ενός διαλύτη επιχειρείται ανάκτηση ενός ή περισσότερων συστατικών από ένα υγρό ή στερεό μίγμα, που αποτελεί το υλικό αναφοράς (εν προκειμένω τα φύλλα ελιάς). Η εκχύλιση είναι μια διαδικασία δύο αλληλένδετων φάσεων (υδάτινη και οργανική φάση), κατά τις οποίες το υλικό έρχεται σε επαφή με υγρούς κατά βάση διαλύτες σε ορισμένη κατά φάση αναλογία προκειμένου να καταστεί εφικτός ο

διαχωρισμών των ουσιών του υλικού. Η εκχύλιση βασίζεται στην κατανομή της ουσίας μεταξύ δύο υγρών, τα οποία είναι μη αναμίξιμα και σηματοδοτούν τις δύο διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας. Βασική προϋπόθεση επιτυχίας της διαδικασίας είναι οι δύο φάσεις να έρθουν σε επαφή, προκειμένου να μπορέσουν να διαχωριστούν τα συστατικά του μίγματος που ενδιαφέρουν κατά περίπτωση. Στην πρώτη φάση (υδατική) συλλέγονται ανόργανα συστατικά και πολικές ουσίες, ενώ στην δεύτερη (οργανική) οι οργανικές (Κατκαρίδου, 2017).

2.3 Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ (ΠΑΛΜΙΚΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ – PEF)

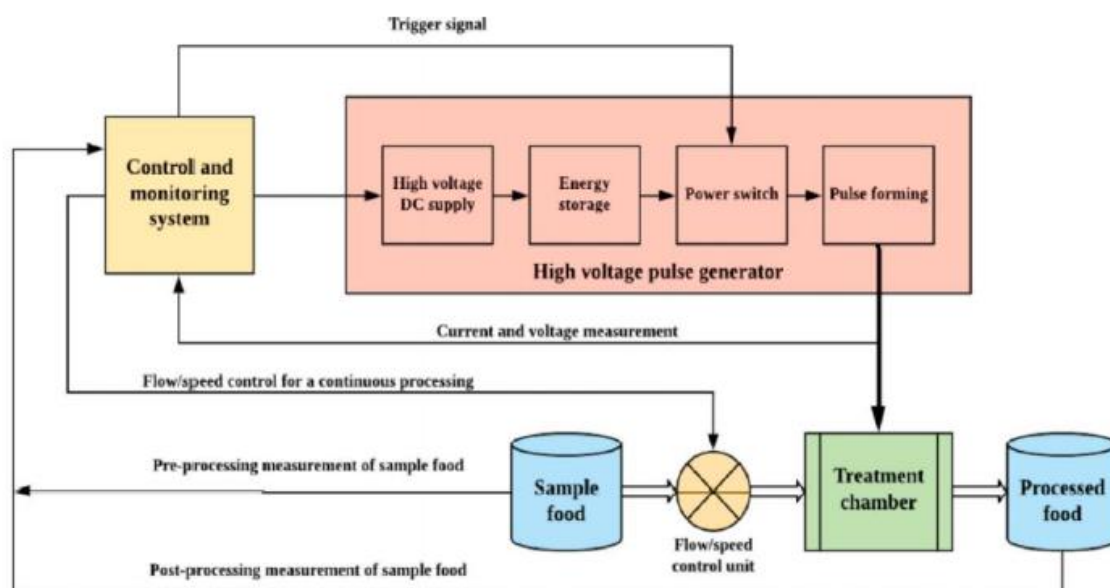
2.3.1 Η μέθοδος επεξεργασίας με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων

Η χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (ΠΗΠ) αποτελεί μια σχετικά νέα μέθοδο επεξεργασίας των φυσικών υλικών, που χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων, για την καλύτερη αξιοποίηση και συντήρηση των υλικών, καθώς και για την εκχύλιση βιοενεργών κλασμάτων από τα φυτικά και άλλα παραπροϊόντα που προκύπτουν κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Στο παρόν κεφάλαιο κρίθηκε σκόπιμο να παρουσιαστούν αναλυτικά η βασική διάταξη των συστημάτων ηλεκτρικών παλμικών πεδίων, καθώς και ο τρόπος και οι παράμετροι λειτουργίας τους, ενώ παράλληλα επιχειρείται μια παρουσίαση των βιοδραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή της διαδικασίας εκχύλισης. Τέλος, παρατίθενται στοιχεία που επιτρέπουν να γίνει σύγκριση μεταξύ της εκχύλισης με την χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου και άλλων τεχνικών εκχύλισης σε πιλοτικό και βιομηχανικό πλαίσιο αναφοράς.

2.3.1.1 Βασικά Μέρη Συστήματος Επεξεργασίας τροφίμων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Όσον αφορά στον εξοπλισμό, ένα σύστημα επεξεργασίας τροφίμων με την μέθοδο των ηλεκτρικών παλμικών πεδίων περιλαμβάνει τρία βασικά μέρη στην διάταξή του: μια ηλεκτρική πηγή παροχής παλμών υψηλής τάσης (συνήθως γεννήτρια), έναν θάλαμο επεξεργασίας του υλικού, καθώς και ένα σύστημα ελέγχου της λειτουργίας του συστήματος και των παραμέτρων της, των οποίων η διάταξη αποτυπώνεται συνοπτικά στην **Εικόνα 6** (Wan et al., 2009).

Ο τρόπος και οι παράμετροι λειτουργίας του συστήματος καθορίζονται από τις ρυθμίσεις της γεννήτριας και του θαλάμου επεξεργασίας, που αποτελούν τα σημαντικότερα μέρη του συστήματος.

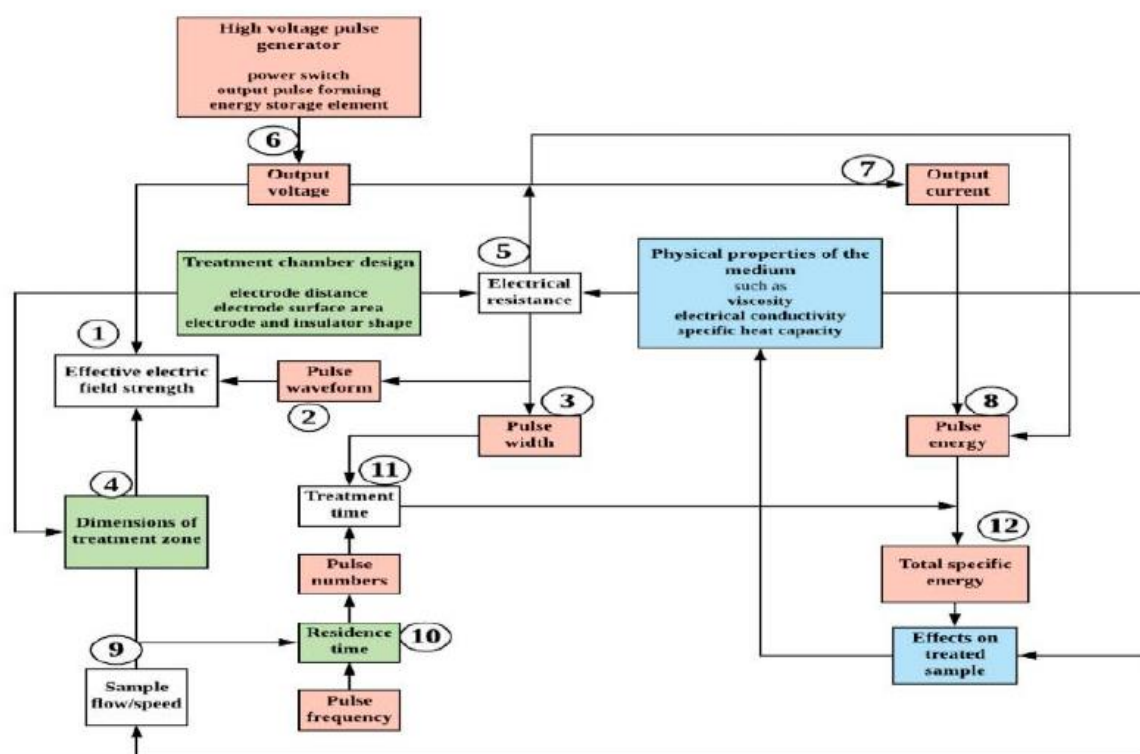


Εικόνα 6: Διάγραμμα συστήματος PEF για την επεξεργασία τροφίμων. Ροζ περιοχή: παροχή υψηλού δυναμικού πεδίου. Πράσινη περιοχή: θάλαμος επεξεργασίας. Κίτρινη περιοχή: Σύστημα παρακολούθησης & ελέγχου. Γαλάζια περιοχή: Δείγμα προτού και κατόπιν επεξεργασίας (Πιρλή, 2021, σ.19)

Αναλυτικότερα, η γεννήτρια παράγει ηλεκτρικούς παλμούς υψηλής τάσης, σε κατάλληλο σχήμα και κατάλληλη διάρκεια ανάλογα με το υπό επεξεργασία τρόφιμο, τους οποίους μεταδίδει στον θάλαμο επεξεργασίας, όπου είναι τοποθετημένο το υλικό. Στην ουσία πρόκειται για ένα ηλεκτρικό κύκλωμα, αποτελούμενο από ένα σύνολο διακριτών μερών (τροφοδοτικά συνεχούς ρεύματος, πυκνωτές, αντιστάσεις, επαγωγείς διακόπτες), που επιτρέπουν την δημιουργία, επαγωγή και αποθήκευση ηλεκτρικού δυναμικού υψηλής τάσης. Η ενέργεια αποθηκεύεται προσωρινά στους πυκνωτές και στην συνέχεια, δημιουργώντας το κατάλληλο κατά περίπτωση ηλεκτρικό πεδίο, μεταδίδεται με την μορφή ηλεκτρικών παλμών στο υπό επεξεργασία τρόφιμο στο εσωτερικό του θαλάμου (Arshad et al., 2020).

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, ο ρυθμός μετάδοσής του, η πυκνότητα της ειδικής ενέργειας, η συχνότητα και η μορφή των ηλεκτρικών κυμάτων, καθώς και η διάρκεια της έκθεσης και η διακύμανση της θερμοκρασίας στο υλικό που υπόκειται σε επεξεργασία, αποτελούν τις παραμέτρους λειτουργίας ενός συστήματος παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (ΠΗΠ), που φαίνονται να επικαθορίζουν το αποτέλεσμα της διαδικασίας επεξεργασίας του υλικού.

Προκειμένου για την καλύτερη κατανόηση των δομικών μερών του βασικού εξοπλισμού και των παραμέτρων λειτουργίας ενός συστήματος παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, ακολουθεί η συνοπτική παρουσίαση και χρωματική κωδικοποίησή τους στο σχήμα της **Εικόνας 7**. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι παράμετροι που σχετίζονται με την λειτουργία της γεννήτριας, με πράσινο όσες έχουν να κάνουν με τον θάλαμο επεξεργασίας και με μπλε το υπό επεξεργασία υλικό. Ευνόητο είναι ότι κατά την εφαρμογή της μεθόδου στο εκάστοτε υλικό, ορισμένες εξ αυτών των παραμέτρων παραμένουν σταθερές, ενώ άλλες προσαρμόζονται προκειμένου για την βέλτιστη επεξεργασία του υλικού. Πέραν αυτού, το πόσο οικονομική ή αντιθέτως κοστοβόρα ή ενεργοβόρα είναι η συγκεκριμένη μέθοδος επεξεργασίας, συναρτάται σε μεγάλο βαθμό από την διάταξη των μερών του συστήματος. Ως εκ τούτου, απαιτείται λεπτομερής και εξειδικευμένη κατά περίπτωση μελέτη εγκατάστασης και διάταξής του.



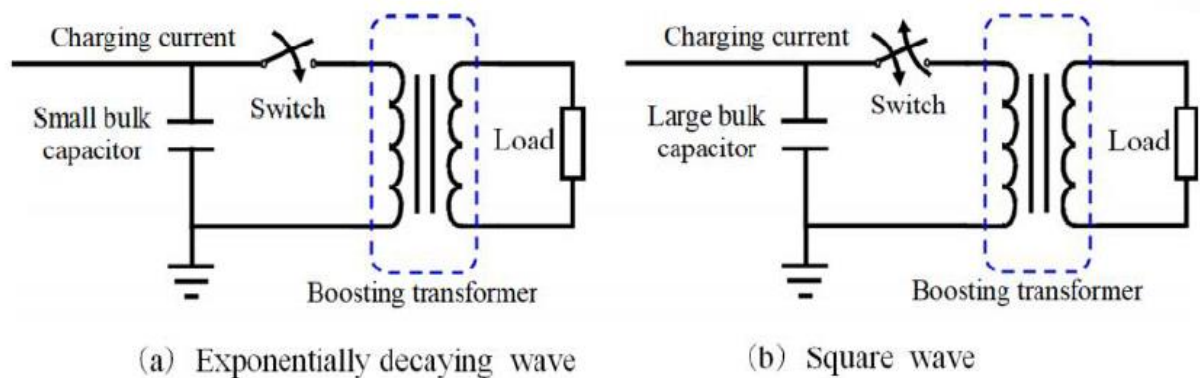
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του συστήματος PEF. Ροζ περιοχή: παροχή υψηλού δυναμικού πεδίου. Πράσινη περιοχή: θάλαμος επεξεργασίας. Μπλε περιοχή: Δείγμα τροφίμου (Πιρλή, 2021, σ.20)

Πιο αναλυτικά, οι παλμοί υψηλού δυναμικού έχουν άμεση σχέση με τις κάτωθι παραμέτρους:

1. Η κυματομορφή του παλμού

2. Το πλάτος του παλμού
3. Η ενέργεια που παράγεται στην γεννήτρια
4. Η ενέργεια του παλμού
5. Η συχνότητα του παλμού
6. Η ολική ειδική ενέργεια του συστήματος

Όσον αφορά στους θαλάμους επεξεργασίας, αυτού κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το σχήμα τους και το πλάτος τους, ενώ μπορεί να είναι μονοπολικοί ή διπολικοί (Mohamed & Amer Eissa, 2012· Lebonka, Vorobiev, & Chemat, 2011). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εξ αυτών είναι εκείνοι που χρησιμοποιούν εκθετικά μειούμενους τετραγωνικούς παλμούς και οι τετραγωνικών παλμών συνεχούς λειτουργίας. Η διάταξη των δύο κατηγοριών θαλάμων επεξεργασίας αποτυπώνεται σχηματικά στην **Εικόνα 9** που ακολουθεί:



Εικόνα 8: Τρόπος διάταξης των δύο διαφορετικών ειδών παλμών. (a) Εκθετικά μειούμενος παλμός ενώ (b) τετράγωνος παλμός (Πριλί, 2021, σ.21)

Δεδομένου ότι οι θάλαμοι επεξεργασίας τετραγωνικών παλμών παρουσιάζουν σύνθετη διάταξη, είναι πιο κοστοβόροι, ωστόσο διαθέτουν το σημαντικό πλεονέκτημα της συνεχούς και σταθερής λειτουργίας καθόλη τη διάρκεια μετάδοσης του παλμικού κύματος (Wan et al, 2009· Niu et al., 2020· Lebonka, Vorobiev, & Chemat, 2011). Ωστόσο, επισημαίνεται ότι οι διπολικοί παλμοί παρουσιάζουν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τους μονοπολικούς όσον αφορά στην διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών των υπό επεξεργασία τροφίμων, χωρίς να προκαλούν ασύμμετρη αλλοίωσή της, λόγω της εναλλασσόμενης έντασης και της αντιστροφής της πολικότητας των παλμών. Για το λόγο αυτό, απαιτούν χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας σε σχέση με τους μονοπολικούς, ενώ προκαλούν χαμηλή ηλεκτρόλυση στο υπό επεξεργασία υλικό και ελάχιστη εναπόθεση στερεών στα ηλεκτρόδια του συστήματος.

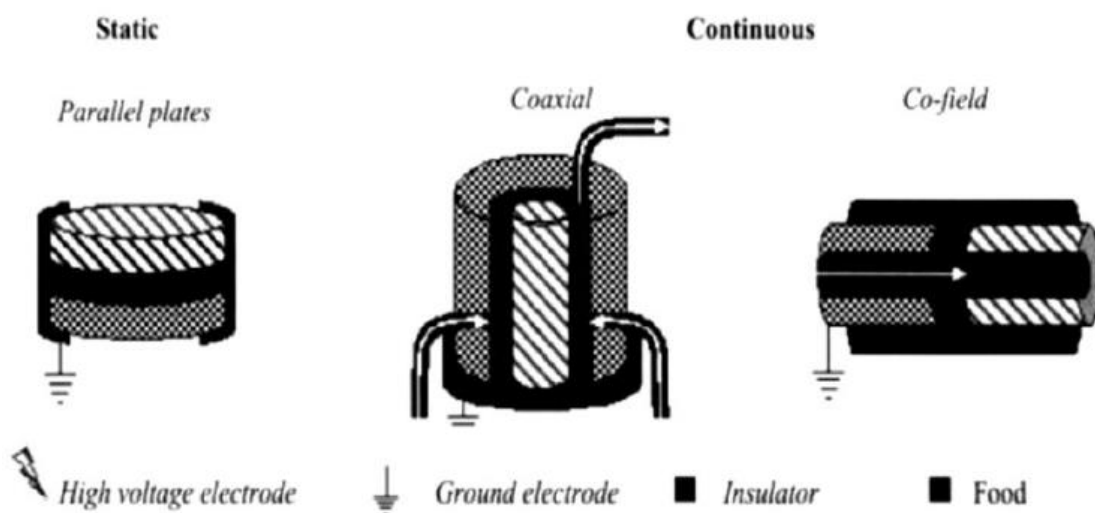
Συνεχίζοντας, όσον αφορά στις παραμέτρους λειτουργίας του θαλάμου επεξεργασίας, αυτοί αναφέρονται στην σχεδιαστική διάταξη των βασικών μερών του θαλάμου, το μέγεθος και τις διαστάσεις της περιοχής επεξεργασίας του τροφίμου και στις ρυθμίσεις σχετικά με την απαιτούμενη διάρκεια παραμονής του τροφίμου στο θάλαμο, προκειμένου να ολοκληρωθεί η επεξεργασία (Arshad et al., 2020)

Σε κάθε περίπτωση, ο θάλαμος θα πρέπει να διαθέτει τουλάχιστον ένα ηλεκτρόδιο συνδεδεμένο με την παροχή δυναμικού υψηλής τάσης και ένα ηλεκτρόδιο γείωσης, μεταξύ των οποίων τοποθετείται το προς επεξεργασία υλικό, το οποίο στην συνέχεια εκτίθεται για ορισμένο χρόνο (διάρκειας μερικών μs έως και ms) στο παλμικό κύμα, δημιουργώντας ηλεκτρικό πεδίο (Ferreira et al., 2019· Pizzichemi, 2009). Τα ηλεκτρόδια κατασκευάζονται από ανοξείδωτο ατσάλι, τιτάνιο ή γραφίτη, ενώ προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η εναπόθεση υλικών και μικρομορίων από τα ηλεκτρόδια προς το τρόφιμο, προτείνεται η επικάλυψη του υλικού κατασκευής με κεραμικά ή άλλα υλικά, που θα δρουν προστατευτικά για το τρόφιμο (Pizzichemi, 2009).

Κρίσιμης σημασίας παράμετρος για την αποτελεσματικότητα και την οικονομικότητα του συστήματος αποτελεί το σχήμα του θαλάμου επεξεργασίας, η επιλογή του οποίου γίνεται με βάση το είδος του τροφίμου που πρόκειται να υποστεί την επεξεργασία καθώς και τα επιδιωκόμενα αποτελέσματα αυτής, που καθορίζουν τα τεχνικά χαρακτηριστικά του θαλάμου αναφορικά με την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου, το υγρό και την θερμοκρασία. Επιπλέον, το κατάλληλο σχήμα θαλάμου εξαρτάται από το εάν πρόκειται για θάλαμο συνεχούς ή διαλείποντος έργου (Liu et al., 2018· Zhang et al., 2011). Βάσει αυτών, ένας θάλαμος μπορεί να είναι επίπεδος, αξονικός ή ομοαξονικός, ενώ όσον αφορά στα υλικά κατασκευής του, είναι είτε το ανοξείδωτο ατσάλι είτε το πολυτετραφλουοροαιθυλένιο, λόγω της αντιδιαβρωτικής τους ικανότητας και αντοχής (Zhang et al., 2011).

Αναλυτικότερα, οι θάλαμοι στατικής ροής ή παράλληλων πλακών (Σχέδιο A – **Εικόνα 10**) είναι κατάλληλοι για την επεξεργασία συγκεκριμένου όγκου τροφίμων, υγρών ή στερεών. Οι ομοαξονικοί θάλαμοι (Σχέδιο B – **Εικόνα 10**) διαθέτουν δύο κυλίνδρους κάθετους προς τον άξονα που σχηματίζει το ηλεκτρικό πεδίο, που βαίνει αυξανόμενο από τον εσωτερικό και εξωτερικό κύλινδρο και επί του οποίου τοποθετείται το υπό επεξεργασία τρόφιμο. Στην διάταξη αυτή, η κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα η διαφορά έντασης μεταξύ τους να μειώνεται όσο η απόστασή τους

μεγαλώνει. Από την άλλη πλευρά, οι ομοεπίπεδοι θάλαμοι συνεχούς ροής (Σχέδιο Γ – **Εικόνα 10**) παρουσιάζουν πιο σύνθετη διάταξη, αποτελούμενοι από τρεις αγωγούς και δύο μονωτές, οι οποίοι τοποθετούνται μεταξύ των ηλεκτροδίων. Η διάταξη αυτή θεωρείται από τις πλέον αποτελεσματικές, καθώς δημιουργεί το βέλτιστο ηλεκτρικό δυναμικό για την επεξεργασία τροφίμων όσον αφορά στους θαλάμους συνεχούς ροής. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι η χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων για την επεξεργασία τροφίμων αποτελεί μια καινοτόμα και πολύ αποτελεσματική μέθοδο, μέχρι πρότινος η αξιοποίησή της σε βιομηχανικό επίπεδο ήταν περιορισμένη, λόγω της μικρής διαθεσιμότητας τεχνικού εξοπλισμού και κυρίως γεννητριών υψηλής τάσης και θαλάμων επεξεργασίας. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή αυτών έχει αυξηθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου προοδευτικά να αυξάνεται (Arshad et al., 2020· Giacometti et al., 2018).



Εικόνα 9: Τα τρία κυριότερα είδη θαλάμων επεξεργασίας PEF (Πιρλή, 2021, σ.22, στο Maged et al., 2012)

2.3.2 Λειτουργία και προσδιοριστικές παράμετροι της μεθόδου

Η μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων με την χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (ΠΗΠ) υψηλής τάσης έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον του επιστημονικού και του βιομηχανικού κλάδου τα τελευταία χρόνια, αξιοποιούμενη κυρίως για την βελτίωση της συντήρησης και την αύξηση της διάρκειας ζωής υγρών προϊόντων, κυρίως γάλακτος και χυμών φρούτων. Πιο λεπτομερώς, η μέθοδος βασίζεται στην

αξιοποίηση των ιδιοτήτων ηλεκτρικής διαπερατότητας και ηλεκτροπόρωσης των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών με την δημιουργία και χρήση ηλεκτρικού δυναμικού υψηλής τάση και την έκθεση του τροφίμου σε αυτό, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται – μεταξύ άλλων – η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών και η καταστολή των μηχανισμών που συντελούν στην αλλοίωση της αρχικής σύνθεσης των υλικών (Fernandez-Diaz et al., 2000). Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιταχύνει και ευνοεί τις διαδικασίες αυτές και μάλιστα σε θερμοκρασίες της τάξεως των 30 έως 40°C, αρκετά δηλαδή χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται στις παραδοσιακές θερμικές μεθόδους επεξεργασίας (Rosello-Soto et al., 2014). Ως εκ τούτου, μέσω της μεθόδου αυτής εξοντώνεται ή αδρανοποιείται μια σειρά παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, όπως ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος, η σαλμονέλα, το Εσερίχια Κόλι, η Λιστέρια μονοκυτταρογόνος, και το Ακετοβακτήριο (Fernandez-Diaz et al., 2000).

Όσον αφορά στην διαδικασία με την οποία παράγεται το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης που απαιτεί η μέθοδος αυτή, εκκινεί με την διαδικασία μετασχηματισμού της ενέργειας χαμηλής έντασης που παράγεται στην πηγή (γεννήτρια) σε υψηλής έντασης εκκενώσεις παλμικού ηλεκτρικού πεδίου. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ της γεννήτριας και των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια, η ενέργεια αποθηκεύεται στους πυκνωτές που βρίσκονται στο θάλαμο επεξεργασίας και ακολούθως διοχετεύεται στο υπό επεξεργασία τρόφιμο, που βρίσκεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται με μονωτές, που εμποδίζουν την μεταφορά ηλεκτρισμού από το ένα στο άλλο, ώστε να μην υπάρχουν απώλειες (Guerrero-Beltrán & Welti-Chanes, 2016). Κατά την διαδικασία αυτή, το τρόφιμο συνήθως υποβάλλεται διακοπτόμενα στην παλμική ακτινοβολία για ελάχιστο χρόνο. Η ένταση και ο χρόνος έκθεσης του υλικού στο ηλεκτρικό παλμικό πεδίο εξαρτάται από το είδος του τροφίμου, τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, τα χαρακτηριστικά και το μέγεθος των ιστών, των κυττάρων και των κυτταρικών μεμβρανών του, καθώς και από τον σκοπό την επεξεργασίας του (Martínez et al., 2019· Puértolas et al., 2012). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι, για παράδειγμα, σε μαλακούς φυτικούς ιστούς είναι αρκετή η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έντασης μεταξύ 0,1-10kV/cm, ενώ σε υλικά σκληρότερα και ανθεκτικότερα απαιτούνται ηλεκτρικά πεδία έντασης μεγαλύτερης των 20kV/cm (Puértolas & Barba, 2016). Όσον αφορά στα κύτταρα των μικροοργανισμών, απαιτείται η έκθεσή τους σε ηλεκτρικό δυναμικό της τάξεως 10-14

kV/cm, δεδομένου ότι είναι πιο ανθεκτικά από αυτά των ζώων και των φυτών, για τα οποία επαρκεί δυναμικό 0,5-2 kV/cm., καθώς οι ιστοί τους αποτελούνται από μεγαλύτερα κύτταρα, στα οποία η ηλεκτροπόρωση και συνεπώς η εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών συντελούνται ευκολότερα (Redondo et al., 2017).

Όσον αφορά στην διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών αυτών, απαιτείται η έκθεση του υλικού σε ηλεκτρικά πεδία τάσης 5 έως 50 kV/cm περίπου, για διάρκεια από μερικά μs έως και ms, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ηλεκτροπόρωση (Barba, et al., 2015· Mohamed & Amer Eissa, 2012). Παράλληλα, δεδομένου ότι η ηλεκτροπόρωση καθιστά πορώδεις τις μεμβράνες προκαρυωτικών και ευκαριωτικών κυττάρων, ελάχιστη ενέργεια της τάξεως του 0,5-1,5V αρκεί για να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός επιλεκτικής διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και η επιλεκτική απελευθέρωση ορισμένων ενδοκυτταρικών ενώσεων και η μεταφορά μακρομορίων και ιόντων, χωρίς η έκθεση αυτή να επηρεάζει δυσμενώς την σύνθεση, τα χαρακτηριστικά και την καθαρότητα των εκχυλισμάτων, όπως συμβαίνει με τις παραδοσιακές θερμαντικές μεθόδους (Barba et al., 2015· Martínez et al., 2019· Parniakov et al., 2015· Redondo et al., 2017· Sun et al., 2019). Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα των ιστών του υλικού, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διαδικασία ώσμωσης και να παρατηρούνται αλλαγές στα επίπεδα και την κατανομή της υγρασίας στο υπό επεξεργασία τρόφιμο (Barba et al., 2020). Η διαδικασία αυτή είναι ελεγχόμενη και υπό προϋποθέσεις αντιστρέψιμη, υπό την έννοια ότι οι πόροι των κυτταρικών μεμβρανών μπορούν να ξανακλείσουν, όταν πάψει η έκθεση του υλικού στο ηλεκτρικό δυναμικό. Ανάλογα με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η αντιστροφή της διαδικασίας μπορεί να διαρκέσει από μερικά δευτερόλεπτα έως λίγες ώρες. Εξυπακούεται ότι το αποτέλεσμα της έκθεσης του υλικού στο ηλεκτρικό πεδίο δεν είναι αντιστρέψιμο, όταν η κυτταρική μεμβράνη έχει καταστραφεί πλήρως (Barba et al., 2015· Soliva-Fortuny, 2009).

Το προαναφερθέν αποτέλεσμα είναι συνάρτηση μιας σειράς παραγόντων που σχετίζονται με τις ιδιότητες και τα φυσιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, καθώς και τις παραμέτρους του παλμικού πεδίου, που είναι ικανές να προκαλέσουν μη αντιστρεπτή αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης του δείγματος και διαρροή του κυτταροπλάσματος. Ως εκ τούτου, απαιτείται πριν την εφαρμογή του δυναμικού ενδεδειγμένος έλεγχος και συνεχής εποπτεία των παραμέτρων του συστήματος σε συσχέτιση με το υπό επεξεργασία υλικό, τις ιδιότητες των κυττάρων του και τον

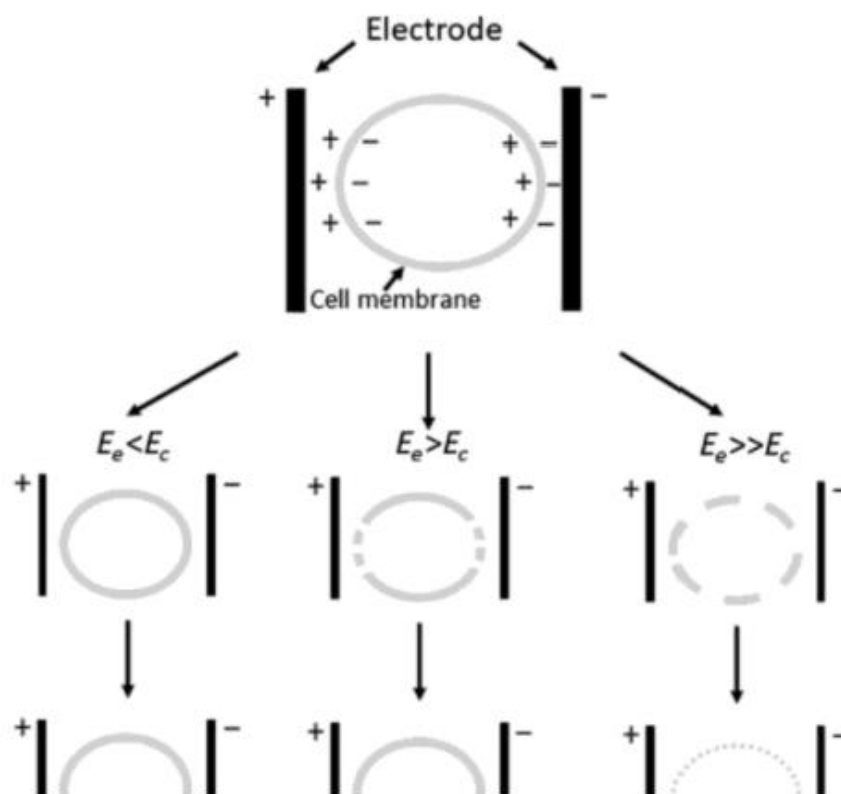
σκοπό για τον οποίο αυτό υποβάλλεται σε επεξεργασία (Thamkaew & Galindo, 2020). Προκειμένου να διασφαλιστεί τόσο η αποτελεσματική ηλεκτροπόρωση της μεμβράνης, όσο και η βιωσιμότητα του κυττάρου, λαμβάνεται υπόψη το επονομαζόμενο «κατώφλι ηλεκτροπόρωσης», η ελάχιστη δηλαδή ένταση που πρέπει να έχουν οι ηλεκτρικοί παλμοί που εφαρμόζονται στο πεδίο (Gagneten et al., 2019).

Σε γενικές γραμμές, αντιστρέψιμη ηλεκτροπόρωση μπορεί να συντελεστεί μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου έντασης από 20 έως 100V/cm. Η τεχνική αυτή θεωρείται η καταλληλότερη όταν η εφαρμογή στο δείγμα έχει ως σκοπό την ενσωμάτωση λειτουργικών ουσιών στους ιστούς και επομένως επιδιώκεται να διασφαλιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων που εκτίθενται στο ηλεκτρικό παλμικό πεδίο (Barba et al., 2020).

Γενικότερα, η κατάλληλη ένταση ηλεκτρικού πεδίου είναι από 100 έως 500V/cm για κύτταρα διαμέτρου 30-60 μm , από 3 έως 10kV/cm για μικρά μικροβιακά κύτταρα με διάμετρο 1-10 μm), δεδομένου ότι εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες επεξεργασίας (Barba et al., 2015).

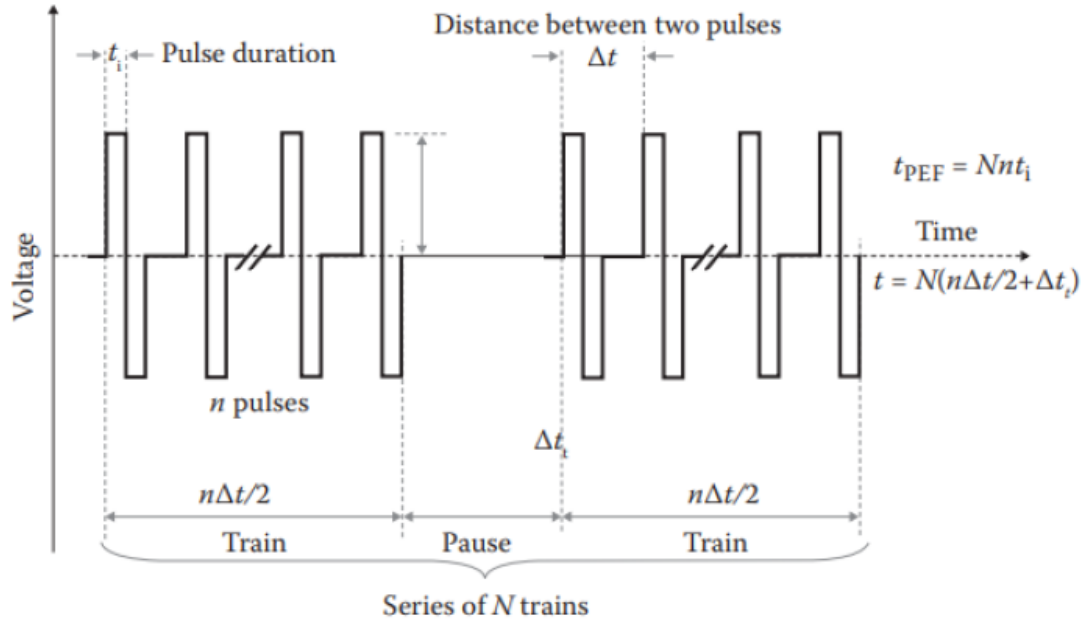
Η **Εικόνα 11** παρουσιάζει ορισμένες ενδεικτικές περιπτώσεις εφαρμογής παλμικού ηλεκτρικού πεδίου με ηλεκτροπόρωση, όπου:

- α) Όταν $E_e < E_c$, το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται είναι μικρότερο της ελάχιστης τιμής. Στην περίπτωση αυτή δεν επιτυγχάνεται ηλεκτροπόρωση.
- β) Όταν $E_e > E_c$, το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται είναι μεγαλύτερο (ή ίσο) από την ελάχιστη τιμή και συνεπώς προκαλείται αντιστρέψιμη διαπερατότητα κυτταρικής μεμβράνης και εξασφαλίζεται η διατήρηση της ακεραιότητας, και ως εκ τούτου η βιωσιμότητα των κυττάρων.
- γ) Όταν $E_e \gg E_c$, το ηλεκτρικό πεδίο υπερβαίνει κατά πολύ το «κατώφλι ηλεκτροπόρωσης», με αποτέλεσμα να προκαλείται μη αντιστρέψιμη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, διαρροή του κυτταροπλάσματος και πλήρης καταστροφή του κυττάρου.



Εικόνα 10: Ενδεικτικά παραδείγματα ηλεκτροπόρωσης κυτταρικής μεμβράνης από εξωτερικό ηλεκτ/κό πεδίο (E_e) ενώ E_c : κρίσιμη ένταση ηλεκτ/κού πεδίου (Πριλή, 2021, σ.27)

Συνοψίζοντας όσα προαναφέρθηκαν, κρίσιμες παραμέτρους εφαρμογής και λειτουργίας της μεθόδου παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (ΠΗΠ) αποτελούν ο χρόνος εφαρμογής/έκθεσης του υλικού, ο αριθμός των παλμών, η συχνότητα του παλμικού κύματος, το σχήμα του παλμού (εκθετικά μειούμενος ή τετραγωνικός, μονοπολικός ή διπολικός), η ωμική αντίσταση, η τάση και η διάταξη των ηλεκτροδίων και η ισχύς της ενέργειας που διοχετεύει στο σύστημα η γεννήτρια (Ferreira et al., 2019). Οι προαναφερθέντες παράγοντες, καθώς και η φύση και οι ιδιότητες του προς επεξεργασία υλικού, συσχετίζονται με κριτήρια οικονομικής και περιβαλλοντικής φύσεως, προκειμένου να ληφθούν αποφάσεις σχετικές με την διάταξη και τις λεπτομέρειες εφαρμογής του συστήματος. Τέλος, σημαντικό κριτήριο αποδοτικότητας της μεθόδου είναι ο βέλτιστος χρόνος έκθεσης του υλικού στο πεδίο ανάλογα με τον σκοπό της εκχύλισης, δεδομένου ότι η παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα να εκφυλίζεται η βιοδραστική ένωση (Πριλή, 2021). Στην τελευταία Εικόνα (12) περιγράφεται το πώς πραγματοποιείται η επεξεργασία με PEF καθώς και το πώς υπολογίζεται ο χρόνος που αυτή διαρκεί, πάντοτε σε σχέση με τη διάρκεια και τον αριθμό των παλμών.



όπου N =αριθμός διπολικών τετράγωνων παλμών, train=αλληλουχία παλμών, t_i =διάρκεια παλμού, Δt =διακοπή μεταξύ δύο παλμών, Δt_i = η διακοπή μεταξύ της αλληλουχίας παλμών και $t_{PEF}=nNt_i$.

Εικόνα 11: Κλασικό πρωτόκολλο της τεχνολογίας PEF. (Πριλή, 2021, σ.28, στο Lebonka & Vorobiev, 2011)

Ειδικό Μέρος

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ

Οι Chemat et al. (2010) προσάρμοσαν τον ορισμό της πράσινης χημείας σχετικά με την εξόρυξη φυσικών προϊόντων ως:

«Η πράσινη εκχύλιση βασίζεται στην ανακάλυψη και το σχεδιασμό διαδικασιών εκχύλισης που θα μειώσουν την κατανάλωση ενέργειας, θα επιτρέπουν τη χρήση εναλλακτικών διαλυτών και των ανανεώσιμων φυσικών προϊόντων και θα διασφαλίζουν ένα ασφαλές και υψηλής ποιότητας εκχύλισμα/προϊόν» (Chemat et al. (2010, σ.813).

Στην παραπάνω δήλωση, ο στόχος είναι διπλός υπό τον στόχο των προϊόντων υψηλής ποιότητας: ΣΚΟΠΟΣ Διερεύνηση πιο φιλικών προς το περιβάλλον καινοτόμων διεργασιών εκχύλισης που θα χρησιμοποιούν πιο πράσινους διαλύτες και ανανεώσιμα φυσικά προϊόντα. Αυτή η μελέτη αντιμετωπίζει και τις δύο πτυχές για την περίπτωση της στατικής εκχύλισης στερεού-υγρού με τη βοήθεια PEF των φρεσκοκομμένων φύλλων ελιάς (*Olea europaea L. folium*) με τη χρήση μείγματος πράσινων διαλυτών (EtOH: H₂O, 25% βαθμίδα) όπου υπάρχουν ελάχιστες έως καθόλου αναφορές. Η ερευνητική υπόθεση για επιβεβαίωση ή διάψευση είναι εάν χρησιμοποιώντας ελάχιστη ενέργεια μέσω της υποβοηθούμενης από PEF εκχύλισης σε σύγκριση με τη διαβροχή, συμβαίνει σημαντική αύξηση στα βιοενεργά συστατικά του εκχυλίσματος ενώ ελαχιστοποιείται η ανάγκη για χημικούς διαλύτες.

Αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στην εκχύλιση φύλλων ελιάς χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες ή διαφορετικές τεχνικές (Taamalli et al., 2012· Cifá et al., 2018· Souilem et al., 2017). Ωστόσο, οι περισσότερες χρησιμοποιούμενες μέθοδοι εκχύλισης απαιτούν χρόνο και ενέργεια και χρειάζονται επικίνδυνους διαλύτες ή χημικά με υψηλή περιεκτικότητα σε πράσινο, με αποτέλεσμα αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η μελέτη των Žuntar, et al., 2019 χρησιμοποιεί Ηλεκτρικές Εκκενώσεις Υψηλής Τάσης (HVED), που είναι επίσης μια καινοτόμος τεχνολογία υποβοήθησης μη θερμικής εξαγωγής, αλλά πολύ πιο επεμβατική από την τεχνολογία PEF, με αποτέλεσμα την πλήρη διάσπαση των κυττάρων και επομένως λιγότερο επιλεκτική.

Το PEF είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία οικολογικής εκχύλισης βιολογικά ενεργών ενώσεων (BACs) που χρησιμοποιεί πράσινους διαλύτες και είναι κατάλληλη για την ανάπτυξη της πράσινης χημικής μηχανικής και της βιώσιμης παραγωγής (Chemat et al., 2017). Η PEF είναι μια αναδυόμενη τεχνολογία όπου το φαινόμενο

της ηλεκτροδιάτρησης (ηλεκτρικά επαγόμενος σχηματισμός υδατικών πόρων στη διπλοστοιβάδα λιπιδίων υπό την επίδραση της επαγόμενης διαμεμβρανικής τάσης) εμφανίζεται περιοδικά με μη καταστροφικό τρόπο για το στοιχείο υπό την επίδραση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης εφαρμογή. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται ενίσχυση της μεταφοράς μάζας από τους κυτταρικούς πόρους στο διάλυμα μέσω της αυξημένης μετανάστευσης ενδοκυτταρικού νερού και διαλυμένων ουσιών (δευτερογενείς μεταβολίτες) στο εξωτερικό μέσο, βελτιώνοντας έτσι την απόδοση εκχύλισης για τα συστατικά ενδιαφέροντος (Bozinou et al., 2019).

Τα φύλλα ελιάς (*Olea europaea* L. folium) έχουν διπλή ταυτότητα, τόσο ως απόβλητο από την παραγωγή ελαιολάδου ή την περίοδο κλαδέματος της ελιάς όσο και ως αρωματικά και φαρμακευτικά βότανα (Şahin & Bilgin, 2018). Αποτελούν πηγή γεωργικών αποβλήτων πλούσια σε πολυφαινόλες (Souilem et al., 2017). Τα συστατικά τους είναι κυρίως μέταλλα και ιχνοστοιχεία, ιριδοειδή μονοτερπένια, τριτερπένια, φλαβονοειδή, χαλκόνες, φαινολικά οξέα και κουμαρίνες (Chinou, 2017). Εκτός από πολυάριθμες μελέτες σχετικά με τα οφέλη για την υγεία των συμπληρωμάτων ελιάς, πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι τα φύλλα ελιάς μπορεί να είναι ευεργετικά για καταστάσεις που σχετίζονται με έναν ιό, βακτήριο ή πρωτόζωο (El & Karakaya, 2009). Ως εκ τούτου, τα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς στον τομέα των τροφίμων και της υγείας παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον.

Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (OLEs) έχουν μια συνεργατική ικανότητα στην εξάλειψη των ελεύθερων ριζών που είναι ανώτερη από αυτή της βιταμίνης C και E (Ferreira et al., 2007· Wainstein et al., 2012· Lockyer et al., 2016· Vizza et al., 2019). Έτσι, τα OLEs ως αντιοξειδωτικό μπορεί να μειώσουν τους κινδύνους για επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία (Wainstein et al., 2012· Lockyer et al., 2016). Πρόσφατες μελέτες για OLEs επιβεβαίωσαν τη δυνατότητα για συνεπικουρική χρήση για θεραπείες για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Vizza et al., 2019), ανασταλτικές επιδράσεις στην παχυσαρκία (Jung Y.-C. et al., 2019) την προστατευτική ποιότητα των όρχεων και του σπέρματος (Ganjalikhan et al., 2019), την προστασία από τη δηλητηρίαση του ήπατος από τετραχλωράνθρακα, των νεφρών από το κάδμιο και εγκεφάλου από δηλητηρίαση από μόλυβδο (Wand et al., 2013). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες στα OLEs είναι χρήσιμες ως φυσικά πρόσθετα τροφίμων που έχουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, τα OLE είναι κατάλληλα για τη ζύμωση και τις οξειδωτικές διεργασίες των επιτραπέζιων ελιών και για τη βελτίωση των θρεπτικών τους ιδιοτήτων (Lalas et al., 2011).

Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εξόρυξη φύλλων ελιάς και ιδιαίτερα με την εφαρμογή φιλικών προς το περιβάλλον και βιώσιμων διαδικασιών στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Έτσι, αυτή η μελέτη υπογραμμίζει τη συγκριτική διαφορά της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά μεταξύ επεξεργασμένων και μη επεξεργασμένων μεσογειακών εκχυλισμάτων OLS μεταβάλλοντας (i) τη συγκέντρωση αιθανόλης στο νερό (με στόχο τη μείωση των χημικών ουσιών) και (ii) τους χρόνους επεξεργασίας με PEF (βελτιστοποίηση διαδικασίας).

Πιο λεπτομερώς, τα φύλλα ελιάς περιέχουν σημαντική ποσότητα βιοφαινολών συμπεριλαμβανομένων φαινολικών οξέων, φαινολικών αλκοολών (υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη), φλαβονοειδών (λουτεολίνη-7- *O* -γλυκοσίδη, ρουτίνη, απιγενίνη-7- *O* -γλυκοσίδη, λουτεολίνη-4- *O* -γλυκοσίδη), και σεκοιριδοειδών (ελευρωπαΐνη) (Herrero et al., 2011· Kaltsa et al., 2020· Lalas et al., 2011· Mylonaki et al., 2008). Εκτός από τα παραπάνω συστατικά, η ελευρωπαΐνη είναι η πιο σημαντική βιοφαινόλη στο εκχύλισμα φύλλων ελιάς (Briante et al., 2002· Lalas, et al., 2011). Τα OLL έχουν το υψηλότερο επίπεδο ελευρωπαΐνης της ελιάς. Δεδομένου ότι η διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου αποδίδει περίπου το 10% των φύλλων ως απόβλητα, του συνολικού βάρους των ελίων που επεξεργάζονται στα ελαιοτριβεία, αξίζει να ληφθούν ενώσεις υψηλής προστιθέμενης αξίας από αυτά τα απόβλητα.

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες τεχνικές για την παραγωγή OLL εκχυλισμάτων. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν υπάρχει μεγάλη εκμετάλλευση αυτών των αποβλήτων, καθώς οι διαθέσιμες τεχνικές παρουσιάζουν σοβαρά μειονεκτήματα (Araújo et al., 2015). Η συμβατική εκχύλιση είναι πολύπλοκη, δαπανηρή και μη φιλική προς το περιβάλλον καθώς απαιτεί μεγάλες ποσότητες τοξικών πτητικών οργανικών διαλυτών, εξάτμιση της τεράστιας ποσότητας διαλύτη, μεγάλους χρόνους εκχύλισης, εμφανίζεται χαμηλή εκλεκτικότητα εκχύλισης και οδηγεί στη θερμική αποσύνθεση των θερμοευαίσθητων ενώσεων. Άλλες μέθοδοι (π.χ. εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού, εκχύλιση με υπερήχους, τεχνικές εκχύλισης με ταχεία πίεση και υποβοηθούμενη από μικροκύματα) δεν είναι ικανοποιητικές για αναλυτικούς σκοπούς ή για βιομηχανική παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων για διαιτητικές εφαρμογές, επειδή οδηγούν σε χαμηλότερη ανάκτηση και απαιτούν ακριβό εξοπλισμό ή υψηλή ενεργειακή ζήτηση (ηλεκτρική ή/και θερμική) (Sosa Ferrera et al., 2004).

Το PEF επομένως, είναι μια αναδύομενη τεχνολογία κατάλληλη για την ανάπτυξη της «πράσινης» χημικής μηχανικής και της βιώσιμης παραγωγής. Η αρχή του PEF είναι η

διάσπαση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης για την αύξηση του βαθμού της εκχύλισης. Επιπλέον, αυτή η μη θερμική τεχνολογία μειώνει τον χρόνο επεξεργασίας, την υποβάθμιση των ευαίσθητων στη θερμότητα ενώσεων, το ενεργειακό κόστος και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Bozinou et al., 2019). Η εφαρμογή του PEF έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως ως μη θερμική επεξεργασία υγρών τροφίμων με στόχο την αδρανοποίηση μικροοργανισμών (Álvarez et al., 2003· Grahl & Märkl, 1996). Η αξιοποίηση της τεχνικής στην εξαγωγή του ενώσεις με υψηλή προστιθέμενη αξία ήταν πρώτη επιχειρήθηκε από τους Brodelius, Funk, & Shillito (1988) και εξακολουθεί να είναι περιορισμένη. Το PEF έχει επίσης χρησιμοποιηθεί πριν από τη διαδικασία εκχύλισης, προκειμένου να μειωθεί το λειτουργικό κόστος, να μειωθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις και να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις των επιθυμητών ενώσεων από ένα ευρύ φάσμα απορριμμάτων επεξεργασίας τροφίμων και υποπροϊόντων (Bobinaité et al., 2015· Boussetta et al., 2012· Carullo, Pataro, & Ferrarì, 2019· Luengo, Álvarez, & Raso, 2014· Martín et al., 2020· Pataro et al., 2020). Άλλοι ερευνητές έχουν εισαγάγει επεξεργασία ηλεκτρικού πεδίου για την επιτάχυνση της παλαίωσης του νεαρού κρασιού χάρη στην εξαγωγή γευστικών ενώσεων από ξύλο (Drosou et al., 2017· Zeng et al., 2008).

Πρόσφατα, κατά τη διάρκεια μιας προηγούμενης μελέτης (Bozinou et al., 2019), έγινε μια επιτυχημένη προσπάθεια εξαγωγής πολυφαινολών από τα λυοφιλοποιημένα φύλλα του *Moringa oleifera* χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη εκχύλισης. Επιπροσθέτως, οι Ntourtoglou et al. (2020) αποκάλυψαν ότι το PEF είχε θετική επίδραση στα άλφα οξέα του πικρού λυκίσκου αυξάνοντας τον ρυθμό εκχύλισης αυτών των οξέων κατά 20%. Τελικά, οι Tsarou et al. (2020) εφάρμοσαν παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (PEF) στο μούστο μπύρας, το οποίο εμπλουτίστηκε με σπόρους λιναριού, για να ρυθμίσει με ακρίβεια την παραγωγή φαινολικών αρωμάτων στην μπύρα, επίσης με ηλεκτροδιάτρηση και απόδοση παραγωγής έως και 120% (mg L^{-1}). Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε για πρώτη φορά (από όσο γνωρίζουμε) η επίδραση του PEF στην παραγωγή εκχυλισμάτων από φρέσκα φύλλα ελιάς. Εφαρμόστηκαν μέτρια ένταση ηλεκτρικού πεδίου (1kV/cm) και σχετικά χαμηλή είσοδος ενέργειας ($0,155\text{ kJ/kg}$ και $1,550\text{ kJ/kg}$) για την επιτυχία της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών με ηλεκτροδιάτρηση, διατηρώντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Καθαρό νερό, καθαρή αιθανόλη καθώς και τους μείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες εκχύλισης, ενώ οι συνθήκες PEF διαφοροποιείται ως προς τη διάρκεια του παλμού δοκιμάστηκαν για τη

βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Ο σκοπός της επιλογής του διαλύτη εκχύλισης ήταν να διερευνήσει την επίδραση της πολικότητας του διαλύτη σε ένα πιθανό αποτέλεσμα PEF, καθώς οποιαδήποτε πιθανή συσχέτιση δεν είχε προηγουμένως αξιολογηθεί στη βιβλιογραφία. Η παρακολούθηση της εκχύλισης για την επίτευξη βελτιστοποίησης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της ολικής συγκέντρωσης φαινόλης (με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu) και με χρωματογραφικό χαρακτηρισμό χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα δείγματα PEF συγκρίθηκαν με δείγματα αναφοράς, τα οποία παρασκευάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο χωρίς την εφαρμογή PEF.

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Υλικά και μέθοδοι

4.1.1 Χημικά

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφία ήταν βαθμού HPLC. Το ακετονιτρίλιο και το μυρμηκικό οξύ (99%) ήταν από το Carlo Erba (Val de Reuil, Γαλλία). Ανυδρο ανθρακικό νάτριο (99%), μονοένυδρο γαλλικό οξύ, ήταν από την Penta (Πράγα, Δημοκρατία της Τσεχίας). Λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη, απιγενίνη, ένυδρη ρουτίνη και ελευρωπαϊνή αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ΗΠΑ). Η αιθανόλη (99,8%) και το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αγοράστηκαν από την Panreac (Βαρκελώνη, Ισπανία).

4.1.2 Φυτικό Υλικό και Χειρισμός

Η μοναδική ποικιλία φύλλων ελιάς που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη προήλθε από ένα μόνο δέντρο ελιάς 30 ετών (*Olea europaea* L., cv. Χονδρολιά Χαλκιδικής), στην Περιφέρεια Καρδίτσας - Ελλάδα (στις 39°21'46" Β και 21°55'05" Α και υψόμετρο 108 m, σύμφωνα με το Google Earth έκδοση 9.124.0.1, Google, Inc., Mountain View, CA, ΗΠΑ). Η σειρά των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε εντός εννέα ημερών κατά τη διάρκεια της περιόδου συγκομιδής (από 12 έως 20 Οκτωβρίου 2020) όταν τα φύλλα εξακολουθούσαν να αναπτύσσονται σύμφωνα με τον βιολογικό κύκλο των φύλλων της ελιάς και τη συνολική περιεκτικότητά τους σε φαινόλη στο υψηλότερο επίπεδο (Brahmi, Mechri, Dabbou, Dhibi, & Hammami, 2012). Η μέση θερμοκρασία κυμαινόταν μεταξύ 10°C και 23°C και η μέση σχετική υγρασία ήταν 70%. Τα φύλλα ελιάς συλλέχθηκαν ως κλαδιά νωρίς το πρωί κάθε ημέρας πειραματικής σειράς και παραδόθηκαν στο εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Ανθρώπινης Διατροφής (Καρδίτσα, Ελλάδα) 10 λεπτά μετά τη συλλογή. Μετά τον διαχωρισμό από τα κλαδιά, τα φύλλα πλύθηκαν καλά με νερό βρύσης και ξηράθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη χρήση διηθητικού χαρτιού μέχρις ότου δεν υπήρχε επιπλέον υγρασία στην επιφάνεια των φύλλων. Πριν από κάθε δοκιμή εκχύλισης, τα φύλλα κονιοροποιήθηκαν σε ένα μπλέντερ για 2 λεπτά και εισήχθησαν σε διάτμηση για να εξασφαλιστεί η ελάχιστη αύξηση της θερμοκρασίας. Το τελευταίο οδήγησε σε σκόνες

με κατά προσέγγιση μέση διάμετρο σωματιδίων 0,8 mm όπως προσδιορίστηκε με ανάλυση κόσκινου.

4.1.3 Προσδιορισμός Περιεκτικότητας σε Νερό

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ξηρά ουσία, τοποθετήθηκε επαρκής ποσότητα κονιοποιημένων φύλλων σε κατάλληλο δοχείο. Αφού ζυγίστηκε, το δείγμα ξηράνθηκε σε φούρνο (Binder BD56, Bohemia, NY, USA) στους 85°C ° C για 6 ώρες. Η περιεκτικότητα σε υγρασία των φύλλων ήταν περίπου 50%.

4.1.4 Συσκευή PEF

Το σύστημα PEF που χρησιμοποιήθηκε ήταν μία εργαστηριακής κλίμακας συσκευή που αναφέρθηκε προηγουμένως (Bozinou, et al., 2019). Σε αυτό το σύστημα προστέθηκε ένα κατασκευασμένο κατόπιν ειδικής παραγγελίας ηλεκτρονικό κύκλωμα διακόπτη (σειρά διπολικών τρανζίστορ Insulated gate - IGBT) και ένας ορθογώνιος θάλαμος επεξεργασίας συγκεκριμένων διαστάσεων από ανοξείδωτο χάλυβα. Το κύκλωμα PEF μπορούσε να διαχειριστεί μέγιστη τάση 1,1 kV λόγω των περιορισμών του κυκλώματος διακόπτη. Η γεννήτρια παλμών παρείχε μονοπολικούς, ορθογώνιους παλμούς, με χρόνο διάρκειας παλμού 10μs και 100μs, και περίοδο 1ms. Ο ορθογώνιος θάλαμος επεξεργασίας αποτελούνταν από δύο πανομοιότυπες πλάκες από ανοξείδωτο χάλυβα (10*10 cm) που χωρίζονταν σε ομοιόμορφη απόσταση 1 cm από ένα ενιαίο κομμάτι τεφλόν σε σχήμα «Π» που λειτουργούσε ως μονωτικό. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, E , υπολογίστηκε ως $E=U/d$, όπου U είναι η εφαρμοζόμενη τάση και d είναι η απόσταση μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων ($d=1$ cm).

4.1.5 Υποβοηθούμενη εξαγωγή PEF και μη PEF

Οι παράμετροι της μελέτης περιελάμβαναν τον διαλύτη εκχύλισης και τον πραγματικό χρόνο επεξεργασίας PEF (διακύμανση διάρκειας παλμού 10μs και 100μs). Η σειρά των πέντε πράσινων διαλυτών εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν i) νερό (0% EtOH), ii) 25% v/v υδατική αιθανόλη (75% EtOH), iii) 50% v/v υδατική αιθανόλη (50% EtOH), iv) 75% v/v υδατική αιθανόλη (75% EtOH) και v) αιθανόλη (100% EtOH).

Όλα τα παραγόμενα δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με PEF συγκρίθηκαν με εκείνα αναφοράς που παρασκευάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο αλλά χωρίς

την εφαρμογή PEF. Όλες οι δοκιμές εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Σε κάθε περίπτωση εκτέλεσης εκχύλισης με τη βοήθεια PEF, ο πραγματικός χρόνος επεξεργασίας PEF προκύπτει από την ακόλουθη εξίσωση:

$$t = t_{\text{Pulse}} \times N$$

όπου t_{Pulse} = χρονική διάρκεια παλμού (μs) και N = αριθμός παλμών (χωρίς διάσταση).

Η περίοδος των φαινομένων ορίστηκε στο 1ms (Συχνότητα = 1000 Hz) ενώ ο συνολικός χρόνος εξαγωγής στα 30 λεπτά με αποτέλεσμα $N = 1,8 \times 10^6$ συνολικός αριθμός κύκλων παλμών.

Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν δύο διαφορετικοί χρόνοι παλμών ($t_{\text{Pulse}1}=10\mu\text{s}$ και $t_{\text{Pulse}2}=100\mu\text{s}$), ο συνολικός χρόνος θεραπείας με PEF μέσα στο διάστημα των 30 λεπτών κάθε δοκιμής εκχύλισης ήταν 18 και 180 δευτερόλεπτα.

Η συγκεκριμένη εισροή ενέργειας W_{spec} (kJ/kg) για τη στατική εξαγωγή με PEF που προέρχεται από την ακόλουθη εξίσωση (Roselló-Soto, Barba, Parniakov, Galanakis, Lebonka, Grimi, et al., 2014):

$$W_{\text{spec}} = \sum_0^N \frac{N}{m} \int_0^{t_{\text{Pulse}}} U(t) \times I(t) dt$$

όπου N είναι ο συνολικός αριθμός κύκλων παλμών (χωρίς διάσταση), m είναι το συνολικό βάρος του δείγματος (kg) που χύνεται στον θάλαμο επεξεργασίας PEF, t_{Pulse} είναι η διάρκεια κάθε παλμού, $U(t)$ είναι η τάση εξόδου και I κ) το ηλεκτρικό ρεύμα που εφαρμόζεται στο δείγμα.

Για την εφαρμογή του PEF σε μια στατική ομοιογενή εκχύλιση στερεού-υγρού όπου εφαρμόζεται ο ίδιος τύπος παλμού και η ίδια χρονική διάρκεια παλμού για κάθε κύκλο, οι τιμές των $U(t)$ και $I(t)$ μπορούν να θεωρηθούν σταθερές, απλοποιώντας την παραπάνω συνάρτηση στο ακόλουθη εξίσωση για αυτή τη μελέτη:

$$W_{\text{spec}} = \frac{N}{m} \times U \times I \times t_{\text{Pulse}}$$

Από την παραπάνω εξίσωση, υπολογίστηκε ότι η εισροή ενέργειας για όλες τις υποβοηθούμενες εξαγωγές PEF ήταν στην περιοχή των 0,155 kJ/kg και 1,55 kJ/kg, ή $2,52 \cdot 10^{-6}$ KWh και $2,52 \cdot 10^{-5}$ KWh, αντίστοιχα.

4.1.6 Προετοιμασία δείγματος

Μετά την άλεση, ο διαλύτης προστέθηκε στα φρεσκοκομμένα λεπτοαλεσμένα φύλλα ελιάς και το μείγμα χύθηκε στον θάλαμο επεξεργασίας PEF. Σε όλα τα πειράματα εκχύλισης, η αναλογία διαλύτη προς πρώτη ύλη ήταν 2,5:1 (β/β). Συγκεκριμένα, 18 g φρεσκοκομμένα και ψιλοκομμένα φύλλα ελιάς αναμίχθηκαν με 45 g διαλύτη. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά από 30 λεπτά, τα περιεχόμενα του θαλάμου εκχύλισης διηθήθηκαν υπό κενό χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί και χοάνη Buchner (HCT, 180/125, Γερμανία). Όλα τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν σε κατάλληλο σωλήνα Falcon πριν από την άμεση ανάλυση φαινολικού περιεχομένου. Η θερμοκρασία των περιεχομένων του θαλάμου επεξεργασίας μετρήθηκε πριν και μετά από κάθε εκτέλεση εκχύλισης με ένα υπέρυθρο θερμόμετρο (GM300, Benetech, Shenzhen Jumaoyuan Science and Technology Co., Ltd., Shenzhen, Κίνα).

4.1.7 Ολική περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φαινόλη

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα επικυρωμένο πρωτόκολλο που υιοθετήθηκε από τους Λάκκα, Γρηγοράκης, Καραγεώργου, Μπάτρα, Καλτσά, Μποζίνου κ.ά., 2019. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ΜΙΛΙΓΡΑΜΜΑΡΙΑ ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά γραμμάριο ξηρού βάρους (dw). Ολική απόδοση πολυφαινόλης (Y_{TP}) υπολογίστηκε ως εξής:

$$Y_{TP} (mgGAE/g \text{ of } dw) = \frac{C_{TP} \times V}{w}$$

όπου w είναι η συνολική συγκέντρωση πολυφαινόλης του εκχυλίσματος (mgL^{-1}), V είναι ο όγκος του μέσου εκχύλισης (L) και w είναι το ξηρό βάρος (g) του φυτικού υλικού (Karakashov, Grigorakis, Loupassaki, & Makris, 2015).

4.1.8 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Μια μεθοδολογία που περιγράφηκε προηγουμένως από Καλτσά, Λάκκα, Γρηγοράκης, Καραγεώργου, Μπάτρα, Μποζίνου κ.ά. (2020) εφαρμόστηκε. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας υγρό χρωματογράφο Shimadzu CBM-20A (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Γερμανία), συζευγμένο με ανιχνευτή Shimadzu SPD-M20A και διασυνδέθηκε με λογισμικό διαλύματος Shimadzu LC. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια Phenomenex Luna C18(2) (100 Å, 5 μm , 4,6x250 mm) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA). Η θερμοκρασία ανάλυσης ορίστηκε στους 40°C και η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με (A) 0,5% υδατικό μυρμηκικό οξύ και (B) 0,5% μυρμηκικό οξύ σε Ακετονιτρίλιο /νερό (6:4) ως διαλύτες έκλουσης.

Το πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 100% A έως 60% A σε 40 λεπτά. 60% A έως 50% A σε 10 λεπτά. 50% A έως 30% A σε 10 λεπτά, το οποίο διατηρήθηκε σταθερό για άλλα 10 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν 1 mL min^{-1} και ο εγχύσιμος όγκος 20 μL . Η ποσοτικοποίηση έγινε με καμπύλες βαθμονόμησης (0-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) κατασκευασμένο με ρουτίνη ($R^2 = 0,9990$), λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη ($R^2 = 0,9980$), απιγενίνη ($R^2 = 0,9999$) και ελευρωπαΐνη ($R^2 = 0,9990$). Η λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη και η απιγενίνη ποσοτικοποιήθηκαν στα 345 nm, η ρουτίνη στα 360 nm και η ελευρωπαΐνη στα 270 nm. Η εκτίμηση της συνολικής περιοχής που επιλέχθηκε το μήκος κύματος ήταν 230 nm καθώς θεωρήθηκε η πιο αντιπροσωπευτική για τις ενώσεις που περιέχονται.

4.1.9 Στατιστική ανάλυση

Οι εξαγωγές καθώς και όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Microsoft Excel 2019 (Redmond, WA, USA). Αξιολογήθηκε η στατιστική σημασία (στο $P < 0.05$) ανάμεσα στους Μέσους Όρους.

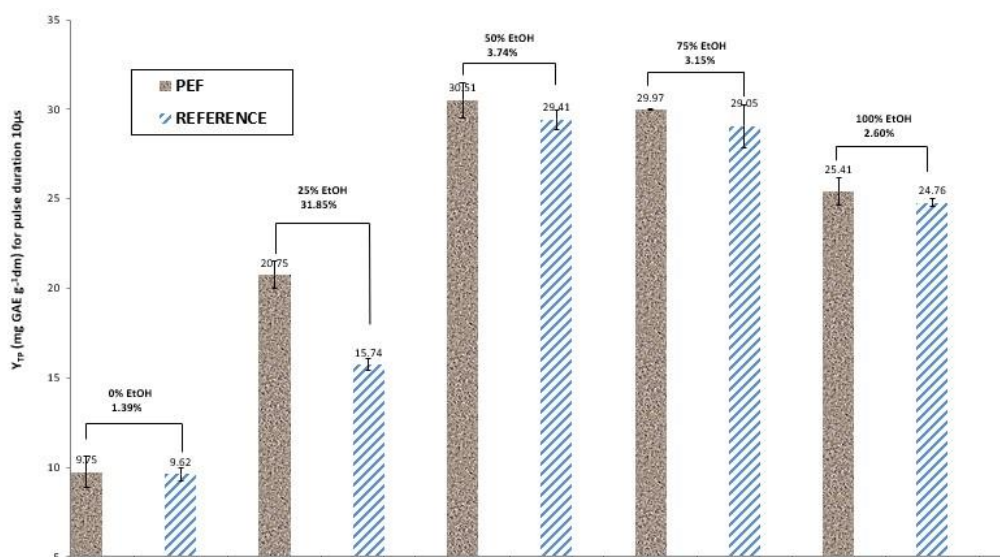
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης έλαβε χώρα η ανάπτυξη μιας «πράσινης» και βιώσιμης διαδικασίας εκχύλισης για πολυφαινόλες OLL με χρήση τεχνολογίας PEF. Δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες PEF και διαφορετικοί διαλύτες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν εξετάστηκαν ως προς την πολυφαινολική τους περιεκτικότητα και πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αξιολόγηση του εκχυλίσματος με ανάλυση του πολυφαινολικού προφίλ με ανίχνευση συστοιχίας υγρής χρωματογραφίας-φωτοδιόδου. Από όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν άλλες μελέτες σχετικά με την εξαγωγή OLL με χρήση τεχνολογίας PEF.

5.1 Ολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινόλη

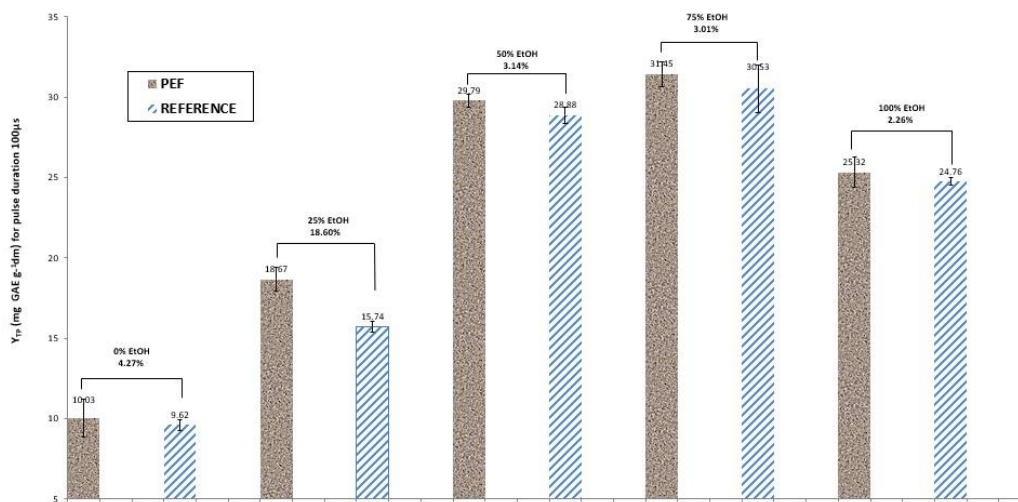
Διάρκεια παλμού 10μsec, περίοδος παλμού 1000μsec, ένταση ηλεκτρικού πεδίου 1kV/cm και χρόνος επαγωγής 30min ήταν οι αρχικές συνθήκες επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των φρέσκων αλεσμένων εκχυλισμάτων φύλλων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (**Σχήμα 1**), η υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση στο Y_{TP} . Ολική απόδοση πολυφαινόλης μεταξύ PEF και δείγματος αναφοράς επιτεύχθηκε με την προσθήκη 25% EtOH. Περαιτέρω προσθήκη EtOH οδήγησε σε μειωμένη αύξηση του Y_{TP} μεταξύ PEF και δείγματος αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα νερού οδήγησε στο Y_{TP} των 9,75 mg GAE g⁻¹ ξηρού βάρους (dw) για δείγμα PEF και 9,62 mg GAE g⁻¹ dw για δείγμα αναφοράς, που σημαίνει μη σημαντική αύξηση 1,39% ($P>0,05$). Σημαντική (PY_{TP} για εκχύλισμα PEF (σε σχέση με το εκχύλισμα αναφοράς) παρατηρήθηκε μετά την προσθήκη 25% EtOH, η οποία έφτασε στο μέγιστο 31,85%. Y_{TP} για 25% εκχύλισμα EtOH PEF ήταν 20,75 mg GAE g⁻¹ dw ενώ για 25% εκχύλισμα αναφοράς EtOH ήταν 15,74 mg GAE g⁻¹ dw. Στα ποσοστά των 50%, 75% και 100% EtOH, η αύξηση του Y_{TP} του εκχυλίσματος PEF (σε σχέση με το εκχύλισμα αναφοράς) ήταν 3,74%, 3,15% και 2,60%, αντίστοιχα, και δεν διέφερε σημαντικά ($P>0,05$).



Σχήμα 1. Y_{TP} for PEF and Reference samples in five different tested solvents and a pulse duration of 10µsec.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο σύνολο συνθηκών PEF. Η διάρκεια του παλμού αυξήθηκε από 10µsec σε 100µsec, ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι PEF, καθώς και ο χρόνος επαγωγής διατηρήθηκαν σταθερές. Τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ακριβώς τους ίδιους διαλύτες. Τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της προσθήκης EtOH για διάρκεια παλμού 100µsec ήταν παρόμοια με αυτά της διάρκειας παλμού 10µsec. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2**, σε διάρκεια παλμού 100µsec, ο διαλύτης 25% EtOH, είχε και πάλι ως αποτέλεσμα την υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση (σημαντική στο PY_{TP} μεταξύ PEF και δείγματος αναφοράς. Η Y_{TP} σε αυτή την περιεκτικότητα σε EtOH (25%), ήταν χαμηλότερη (κατά 21,25%) από την αντίστοιχη απόδοση που επιτεύχθηκε με συνθήκη PEF 10µsec αλλά υψηλότερη από αυτή που επιτεύχθηκε από το αντίστοιχο δείγμα αναφοράς σε ποσοστό 18,60%. Το καθαρό νερό ως διαλύτης εκχύλισης οδήγησε σε χαμηλή αύξηση Y_{TP} 4,27%, ενώ προσθήκη 50%, 75% και 100% EtOH, οδήγησε σε χαμηλότερες αυξήσεις από 3,14 έως 2,26 % (σε σχέση με το εκχύλισμα αναφοράς). Όλες οι διαφορές μεταξύ δειγμάτων PEF και μη PEF, εκτός από την περίπτωση του EtOH, δεν ήταν σημαντικές ($P>0,05$).

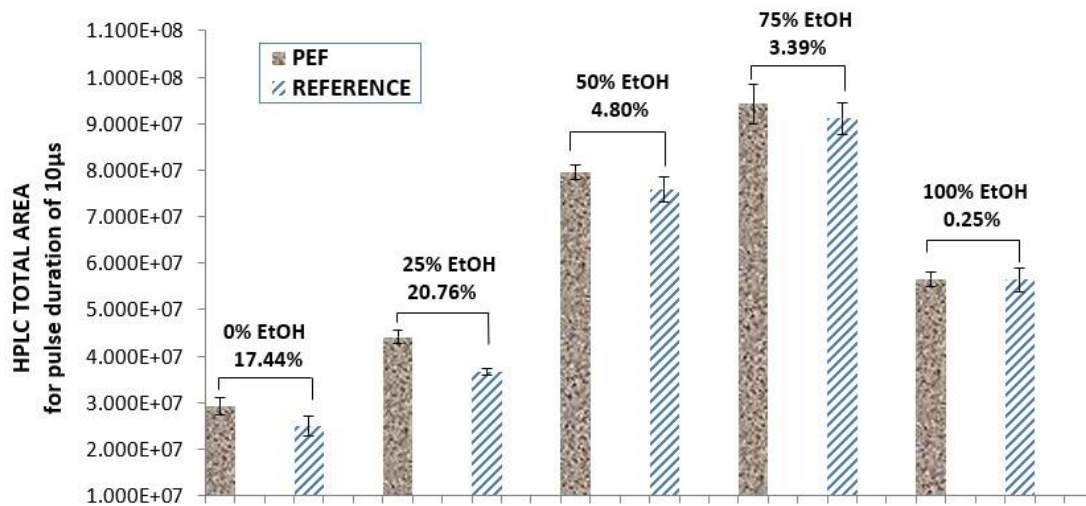


Σχήμα 2. Y_{TP} for PEF and Reference samples in five different tested solvents and a pulse duration of 100µsec.

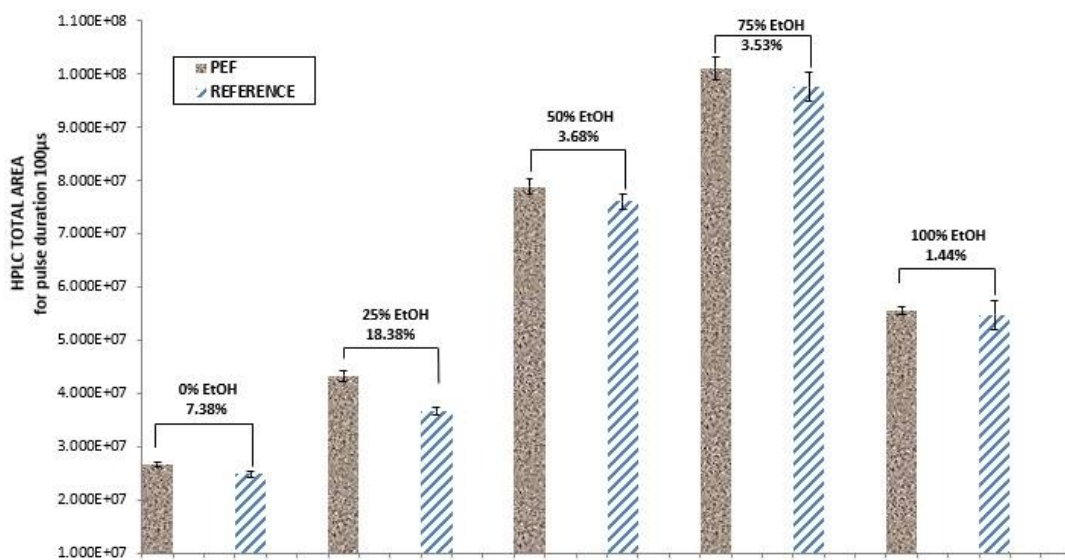
5.2 Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων με HPLC

5.2.1 Εκτίμηση της επίδρασης PEF με προσδιορισμό της συνολικής επιφάνειας των εκχυλισμάτων

Τα αποτελέσματα με βάση το εκτιμώμενο σύνολο είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε φαινόλη. Συνθήκη PEF με διάρκεια παλμού 10µsec σε 25% EtOH οδήγησε στην υψηλότερη ποσοστιαία διαφορά της συνολικής επιφάνειας μεταξύ PEF και δείγματος αναφοράς (**Σχήμα 3**). Συγκεκριμένα, η συνολική επιφάνεια για τη βέλτιστη συνθήκη διάρκειας παλμού 10 µsec σε 25% EtOH ήταν 44.156.899 για το δείγμα PEF και 36.566.097 για το δείγμα αναφοράς που αντικατοπτρίζει σημαντική ($P < 0.05$) ποσοστιαία αύξηση των 20,76%. Η αντίστοιχη ποσοστιαία αύξηση για την κατάσταση PEF με διάρκεια παλμού 100µsec (**Σχήμα 4**) ήταν 18,38% (και πάλι σημαντική στο $P < 0.05$).



Σχήμα 3. HPLC total area for PEF and Reference sample in five different tested solvents and a pulse duration of 10µsec.



Σχήμα 4. HPLC total area for PEF and Reference sample in five different tested solvents and a pulse duration of 100µsec.

Για την κατάσταση PEF καθαρού νερού με διάρκεια παλμού 10 µsec ήταν επίσης στατιστικά σημαντικά ανώτερο ($P < 0.05$) από την κατάσταση PEF με διάρκεια παλμού 100 µsec. Οι ποσοστιαίες αυξήσεις σε σχέση με το δείγμα PEF για καθαρό νερό έφθασαν στο 17,44% και 7,38% αντίστοιχα, για τις δύο συνθήκες PEF. Σταδιακή αύξηση της περιεκτικότητας σε EtOH έως και 100% δεν οδήγησε σε αντίστοιχη ποσοστιαία αύξηση της συνολικής επιφάνειας σε σχέση με το δείγμα PEF. Αντίθετα, η προσθήκη EtOH στο νερό σε ποσοστά υψηλότερα από 25% οδήγησε σε σταδιακή μείωση (ωστόσο, όχι σημαντική) της ποσοστιαίας αύξησης της συνολικής επιφάνειας σε σχέση με το δείγμα PEF. Κατά την εκχύλιση με καθαρό EtOH, το αποτέλεσμα PEF και για τις δύο συνθήκες, η διάρκεια του παλμού ελαχιστοποιείται και θεωρείται μη σημαντικό.

5.2.2 Πολυφαινολική σύνθεση

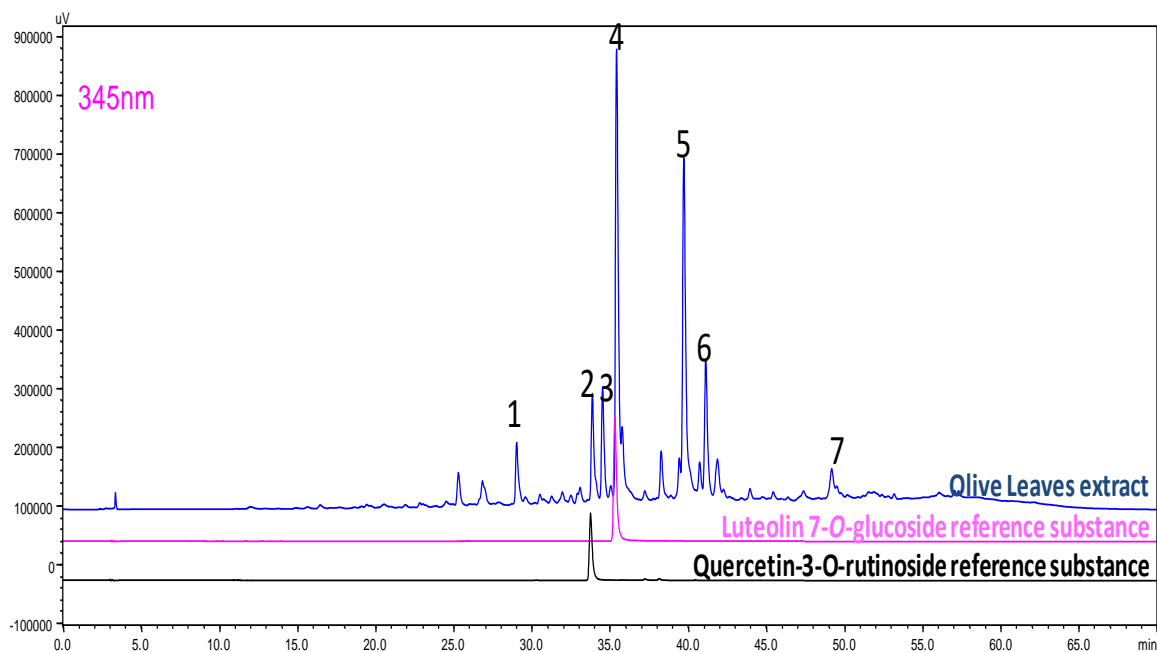
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η λουτεολίνη και οι σχετικές ενώσεις της είναι τα πιο συχνά φλαβονοειδή που βρίσκονται στο νερό των φύλλων της ελιάς και στα εκχυλίσματα EtOH, ενώ τα πιο άφθονα φυτοχημικά είναι η λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη και η ελευρωπεΐνη. Κερσετίνη-3-O-ρουτινοσίδη και η απιγενίνη-7-O-ρουτινοσίδη έχουν επίσης ταυτοποιηθεί (Herrero, et al., 2011· Kaltsa, et al., 2020· Lalas, et al., 2011· Mylonaki, et al., 2008· Olmo-García et al., 2018· Palmeri et al., 2019). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (**Πίνακας 1**) συνάδουν με την παραπάνω σχετική βιβλιογραφία.

Πίνακας 1: Μέσοι όροι ($\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$) σημαντικών ενώσεων εκχυλισμάτων PEF φύλλων ελιάς που έχουν υποστεί επεξεργασία με 25% αιθανόλη.

PEF Pulse duration	Compound	PEF Treated Extract		Reference Extract		Increase (%)
		Average	SD	Average	SD	
10μsec	Peak 1	0.13	0.01	0.08	0.01	49.53
	Quercetin-3-O-rutinoside	0.24	0.04	0.07	0.00	265.67
	Peak 3	0.21	0.00	0.13	0.01	57.32
	Luteolin-7-O-glucoside	0.82	0.02	0.48	0.02	71.87
	Apigenin-7-O-rutinoside	0.31	0.03	0.14	0.01	121.32
	Luteolin-3'-O-glucoside	0.29	0.01	0.20	0.01	41.76
	Oleuropein	0.63	0.19	0.58	0.06	9.22
100μsec	Peak 7	0.06	0.01	0.04	0.00	56.84
	Peak 1	0.12	0.00	0.08	0.01	44.48
	Quercetin-3-O-rutinoside	0.17	0.04	0.07	0.00	158.36
	Peak 3	0.21	0.01	0.13	0.01	60.30
	Luteolin-7-O-glucoside	0.77	0.04	0.48	0.02	61.52
	Apigenin-7-O-rutinoside	0.27	0.02	0.14	0.01	91.94
	Luteolin-3'-O-glucoside	0.27	0.02	0.20	0.01	33.02
Oleuropein	0.76	0.11	0.58	0.06	31.95	
	Peak 7	0.05	0.00	0.04	0.00	36.92

* Luteolin-3'-O-glucoside as well as peaks 1,3 and 7 were quantified as luteolin-7-O-glucoside. Apigenin-7-O-rutinoside was quantified as apigenin.

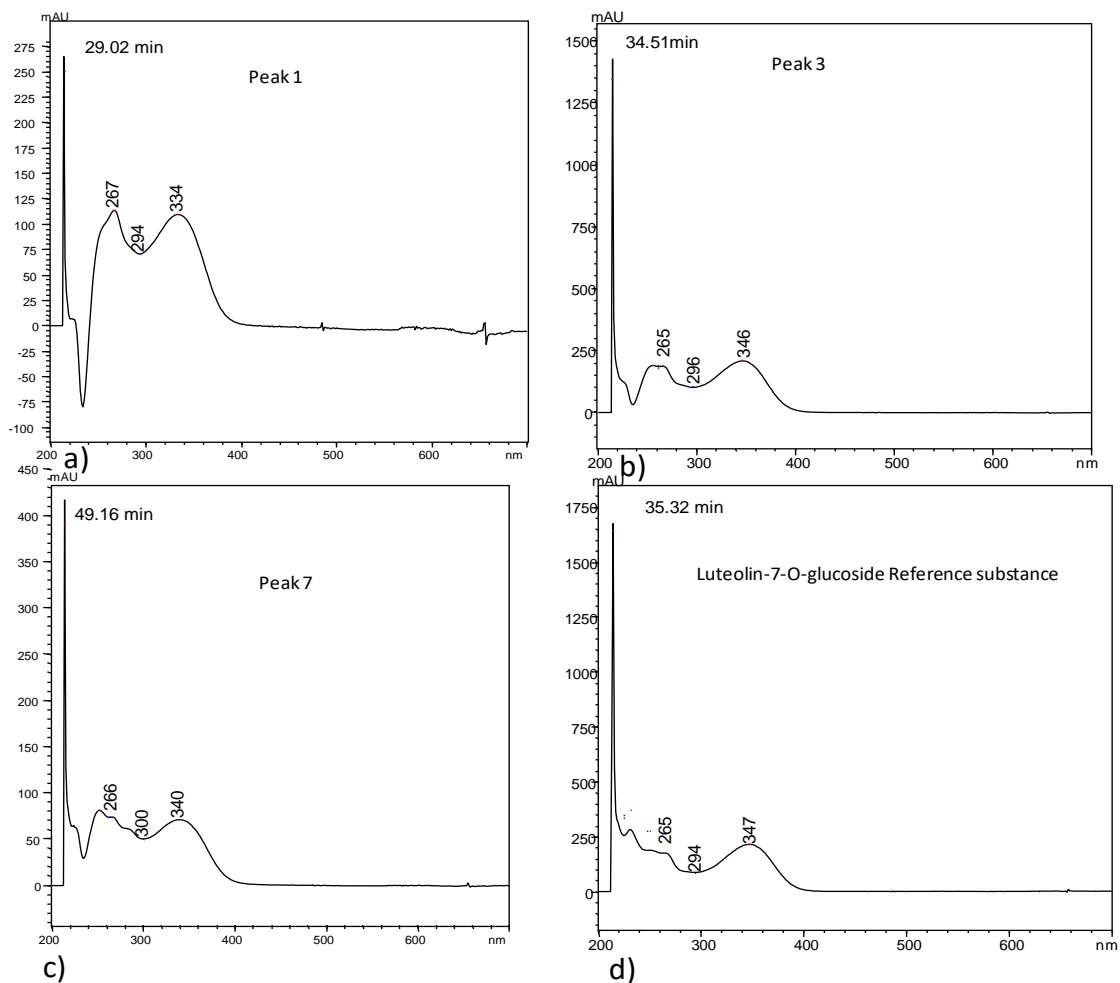
Τα χρωματογραφήματα στα 345 nm (**Σχήμα 5**) αποκάλυψαν την ύπαρξη έξι κύριων συστατικών. Οι κορυφές 2 και 4 με λ_{max} στα 351 nm και 347 nm, αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκαν ως κερκετίνη-3-O-ρουτινοσίδη και λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη αντίστοιχα.



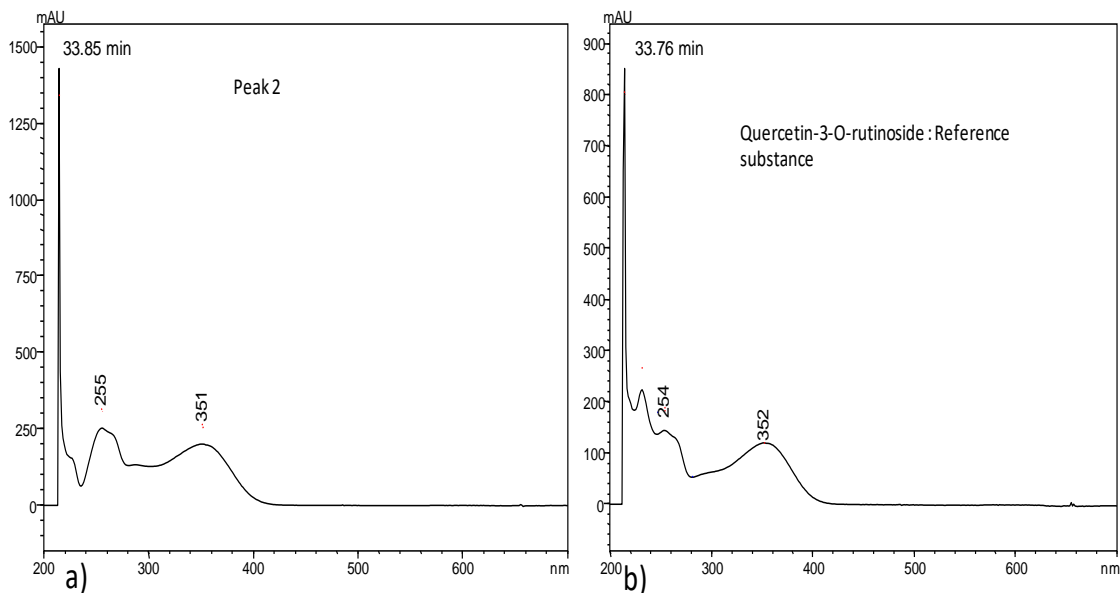
Σχήμα 5. Overlay of chromatograms of extract and specific compounds at 345 nm after PEF with pulse duration 10μsec and extraction solvent 25% EtOH.

*Peak 1: not identified; Peak 2: Quercetin-3-O-rutinoside; Peak 3: not identified; Peak 4: Luteolin-7-O-glucoside; Peak 5: Apigenin-7-O-rutinoside; Peak 6: Luteolin-3'-O-glucoside; Peak 7: not identified

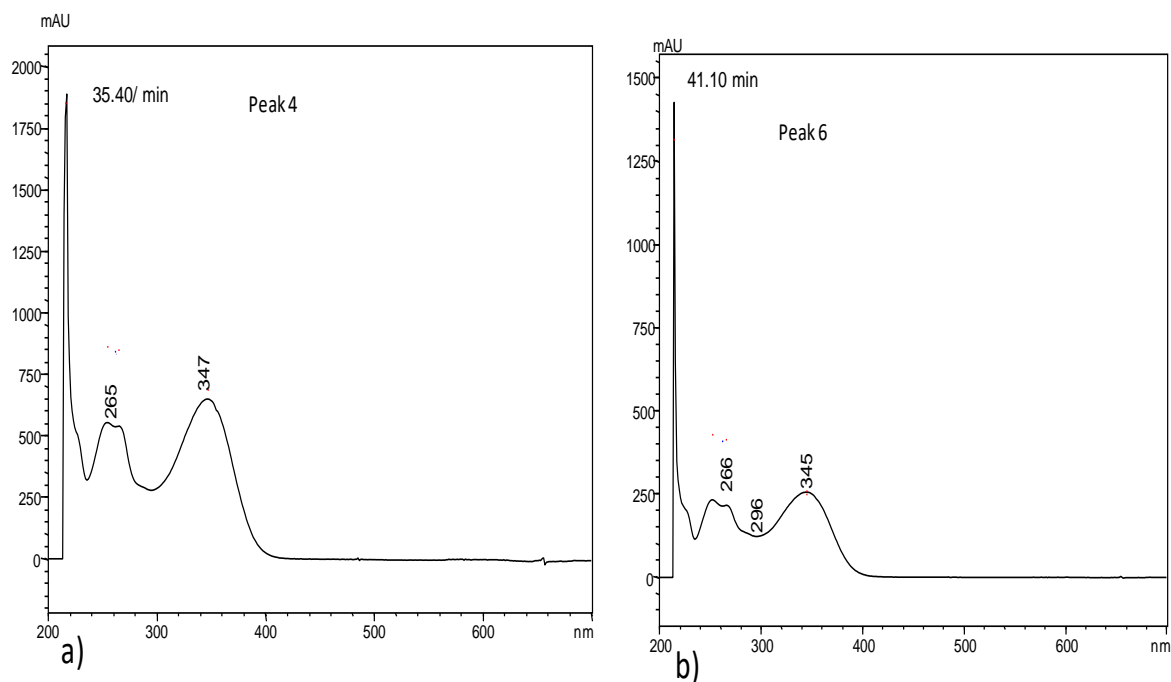
Η ταυτοποίηση βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης και στο φάσμα απορρόφησης των ενώσεων και των αντίστοιχων ουσιών αναφοράς (Σχήματα 5, 6, 7 και 8).



Σχήμα 6. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 1, b) peak 3, c) peak 7 and d) Luteolin-7-O-glucoside reference substance.



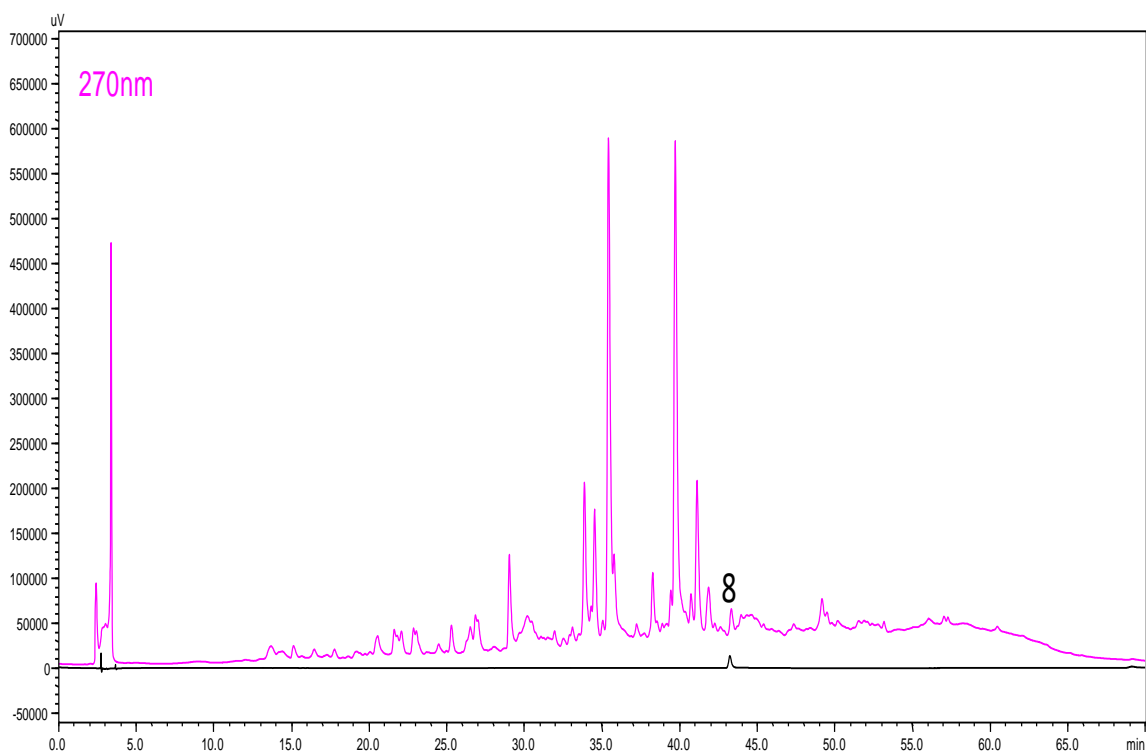
Σχήμα 7. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 2 identified as Quercetin-3-O-rutinoside, b) Quercetin-3-O-rutinoside reference substance.



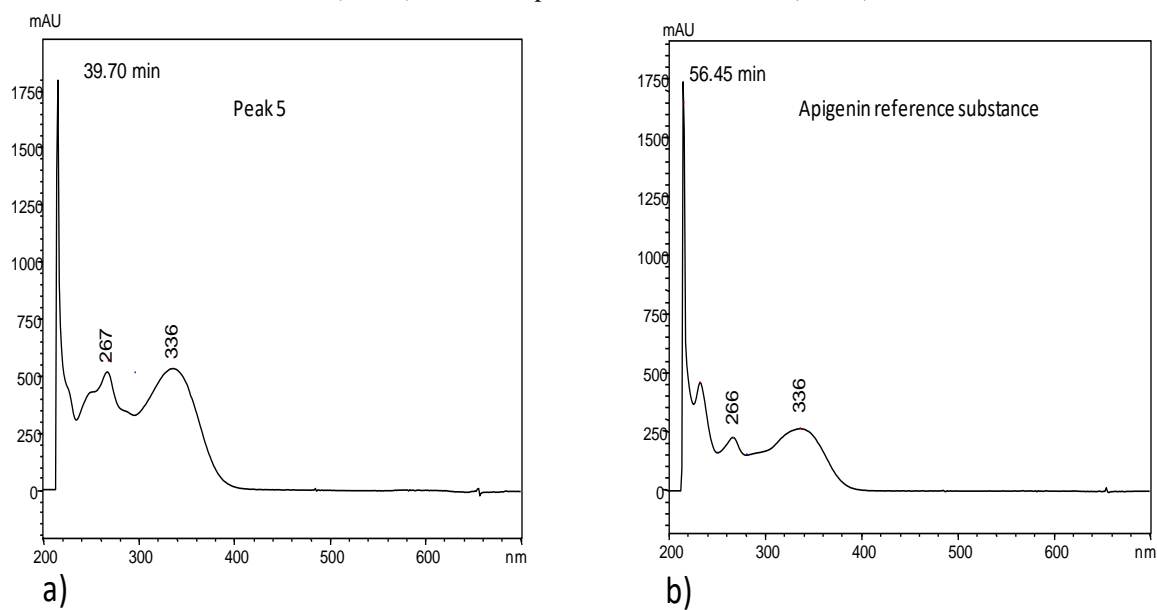
Σχήμα 8. UV-vis spectra as obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 4 identified as Luteolin- 7-O-glucoside, b) peak 6 identified as Luteolin-3'-O-glucoside

Οι κορυφές 5 και 6 εντοπίστηκαν δοκιμαστικά σε προηγούμενη εργασία (Kaltsa et al., 2020) ως απιγενιν-7-O-ρουτινοσίδη και λουτεολίνη-3'-O-γλυκοσίδη, αντίστοιχα (Σχήματα 8 και 10). Δεν ήταν δυνατή η αναγνώριση των κορυφών 1, 3 και 7 λόγω έλλειψης αντίστοιχων ουσιών αναφοράς. Αν και στο τυπικό φάσμα φλαβονών UV-VIS (Σχήμα 6) και στα βιβλιογραφικά τους δεδομένα (Herrero et al., 2011· Kaltsa et al., 2020), πιστεύεται ότι είναι η διγλυκοσίδη της λουτεολίνης, η ρουτινοσίδη της λουτεολίνης και η λουτεολίνη αγλυκόνη, αντίστοιχα. Οι Herrero et al. (2011) αναγνώρισαν τη ρουτινοσίδη της λουτεολίνης, εκλύοντας μεταξύ κερκετίνης-3-O-ρουτινοσίδης και λουτεολίνης-7-O-γλυκοσίδης με λ_{max} στα 340 nm. Η κορυφή 3 στο χρωματογράφημά μας εκλύεται με την ίδια σειρά, εμφανίζεται ένα λ_{max} στα 346 nm και παρόμοιο με το φάσμα UV-VIS της λουτεολίνης-7-O-γλυκοσίδης, επομένως πιστεύεται ότι είναι η ρουτινοσίδη της λουτεολίνης. Επίσης, σύμφωνα με τους Mylonaki et al. (2008), καθώς και τους Herrero et al. (2011), λίγο πριν την κερκετίνη-3-O-ρουτινοσίδη, η διγλυκοσίδη λουτεολίνης εκλύεται με μέγιστο UV-VIS στα 331 nm. Η κορυφή 1 εμφανίζεται ένα μέγιστο UV-VIS στα 334 nm και ένα φάσμα παρόμοιο με τη λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη, επομένως πιστεύεται ότι είναι διγλυκοσίδη λουτεολίνης. Η κορυφή 8 με λ_{max} στα 280 nm αναγνωρίστηκε ως ελευρωπαΐνη μετά τη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος απορρόφησής της με το αντίστοιχο της ουσίας αναφοράς (Σχήματα 9 και 11). Η

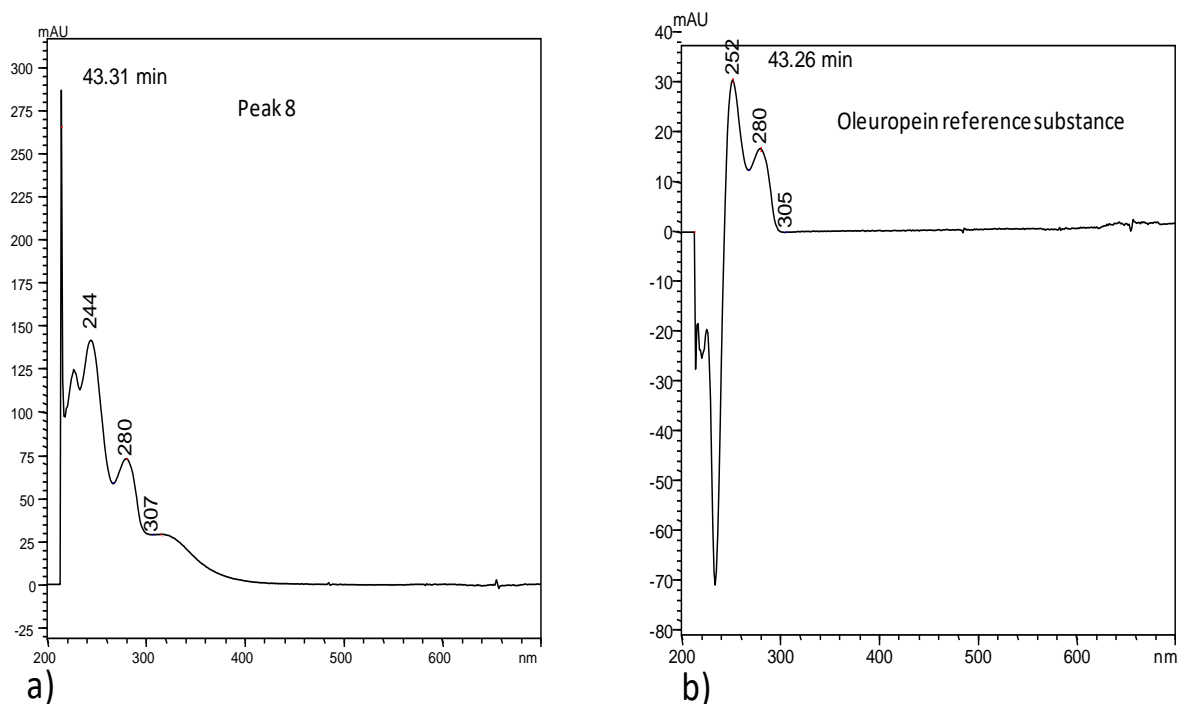
λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοσίδη και η ελευρωπαΐνη φαίνεται όντως να είναι τα κυρίαρχα φυτοχημικά. Η περιεκτικότητά τους σε δείγματα αναφοράς εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν σε 25% EtOH ήταν 0,48 και 0,58 mg g⁻¹ dw αντίστοιχα. Κερσετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη, απιγενιν-7-Ο-ρουτινοσίδη και λουτεολίνη-3'-Ο-γλυκοσίδη είχε χαμηλότερη περιεκτικότητα 0,07, 0,14 και 0,2 mg g⁻¹ dw αντίστοιχα.



Σχήμα 9. Overlay of chromatograms of extract after PEF with pulse duration 10μsec and extraction solvent 25% EtOH (above), and oleuropein reference standard (below) at 270 nm



Σχήμα 10. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 5 identified as Apigenin-7-O-rutinoside, b) Apigenin reference substance.



Σχήμα 11. UV-vis spectras obtained by HPLC-DAD analysis of a) peak 8 identified as Oleuropein, b) Oleuropein reference substance

Η επίδραση της εφαρμογής PEF στις βιοδραστικές ενώσεις εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε 25% EtOH παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Είναι προφανές ότι η εφαρμογή PEF έχει σημαντική θετική επίδραση στη συγκέντρωση αυτών των ενώσεων, φθάνοντας σε αύξηση έως 265,67%. Πιο συγκεκριμένα, για τις έξι από τις οκτώ ενώσεις που ερευνήθηκαν, η συνθήκη PEF με διάρκεια παλμού 10μsec οδήγησε σε υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση, από την Συνθήκη PEF με διάρκεια παλμού 100μsec, αν και αμφότερες οι συνθήκες έφεραν αξιοσημείωτη αύξηση. Το φαινόμενο PEF για την κατάσταση με διάρκεια παλμού 100μsec ήταν υψηλότερο για την ελευρωπαΐνη και την κορυφή 3, αν και για την κορυφή 3, η διαφορά μεταξύ των δύο εφαρμοζόμενων συνθηκών PEF φτάνει μόνο το 2,98%. Ειδικά, για την κερσετίνη- 3-O-ρουτινοσίδη, ποσοστιαία αύξηση 265,67% και 158,36% παρατηρήθηκε για καταστάσεις PEF με διάρκεια παλμού 10μsec και 100μsec, αντίστοιχα. Η απιγενίνη- 7-O-ρουτινοσίδη εμφανίστηκε τη δεύτερη υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση, φθάνοντας το 121,32% για την κατάσταση PEF με διάρκεια παλμού 10μsec και 91,94% για τη διάρκεια παλμού 100μsec. Εφέ PEF για κορυφή 1, κορυφή 3, κορυφή 7. Η λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη και η λουτεολίνη-3'-O-γλυκοσίδη κυμαίνονταν από 33,02% έως 71,87%, ενώ για την ελευρωπαΐνη είναι ελαφρώς χαμηλότερα φθάνοντας το 31,95%.

Είναι γνωστό ότι οι ποσότητες των μεταβολιτών που ανιχνεύονται κυμαίνονται ανάλογα με τον διαλύτη και τη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται, καθώς και την εποχικότητα (Brahmi et al., 2012· Brahmi et al., 2013). Στην τρέχουσα μελέτη η αύξηση κατά 71,87%, για την κατάσταση PEF με διάρκεια παλμού 10μsec, στην περίπτωση του βασικού μεταβολίτη luteolin-7-O-glucoside, οδήγησε σε ποσότητα 0,82 mg g⁻¹ dw στο εκχύλισμα. Στο ίδιο ακριβώς ποσό έφτασαν και οι Palmeri et al. (2019) χρησιμοποιώντας νερό στους 80° C ως διαλύτη εκχύλισης σε αναλογία υγρού προς στερεό 20:1 ml g⁻¹. Αυτό το αποτέλεσμα θεωρείται σημαντικό καθώς στην τρέχουσα μελέτη πραγματοποιήσαμε μη θερμική εκχύλιση, χρησιμοποιώντας πολύ χαμηλότερη αναλογία υγρού προς στερεό (μόλις 2,5:1 w/w), με προσθήκη πράσινου οργανικού διαλύτη (EtOH) σε ποσοστό μόνο 25%. Όσον αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες κερκετίνη-3-O-ρουτινοσίδη, απιγενιν-7-O-ρουτινοσίδη και λουτεολίνη-3'-O-γλυκοσίδη, καταφέραμε επίσης να εκχυλίσουμε ποσότητες περίπου 0,3 mg g⁻¹ dw. Επιπροσθέτως, αυτή η ποσότητα έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Kaltsa, et al., 2020· Palmeri, et al., 2019) χρησιμοποιώντας μεθόδους εκχύλισης που απαιτούν ενέργεια και σημαντική ποσότητα διαλύτη εκχύλισης.

Οι μελλοντικές εργασίες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην περαιτέρω βελτιστοποίηση των παραμέτρων της διαδικασίας PEF, συμπεριλαμβανομένης της ισχύος ηλεκτρικού πεδίου, του σχήματος παλμού, του πλάτους παλμού, του αριθμού παλμών, της ειδικής ενέργειας και της συχνότητας παλμού για μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών. Ένα άλλο σημείο ενδιαφέροντος για μελλοντική εργασία είναι η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της πολικότητας του διαλύτη στο φαινόμενο PEF.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Αυτή η μελέτη είχε ως στόχο την εξαγωγή πολυφαινολών από φύλλα ελιάς χρησιμοποιώντας την τεχνική PEF. Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μείγματα διαλυτών και διαφορετικές συνθήκες PEF. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, εκχυλίσματα φύλλων ελιάς που έχουν υποστεί

επεξεργασία με PEF έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών. Εφαρμογή PEF (διάρκεια παλμού: 10μsec, περίοδος παλμού: 1000μsec, ένταση ηλεκτρικού πεδίου: 1kV/cm και χρόνος επαγωγής: 30min) σε 25%EtOH, αύξησε τη συνολική απόδοση σε πολυφαινόλες έως και 31,85%. Η επεξεργασία με PEF ενίσχυσε την εκχύλιση των κύριων και δευτερογενών μεταβολιτών έως και 265,67%. Η ποσότητα των εκχυλισμένων πολυφαινολών ήταν συνάρτηση του διαλύτη και της διάρκειας παλμού της θεραπείας. Μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η εκχύλιση πολυφαινολών ενισχύθηκε με την εφαρμογή PEF υποδεικνύοντας ότι η τεχνική PEF παρουσιάζει μια εξαιρετική δυνατότητα για «πράσινη» εκλεκτική εκχύλιση βιολειτουργικών συστατικών από φύλλα ελιάς (φαινολικές ενώσεις) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω στη λειτουργική παραγωγή τροφίμων με βιώσιμο τρόπο παράγοντας προϊόντα υψηλής ποιότητας που παρουσιάζουν πολυάριθμα οφέλη για τη δημόσια υγεία.

Με βάση τα ευρήματα αυτής της μελέτης, προτείνουμε μια μελέτη παρακολούθησης που περιλαμβάνει την αξιολόγηση αρκετών άλλων κρίσιμων παραμέτρων διεργασίας των φαινομένων όπως η περίοδος (και συνεπώς η συχνότητα), η σχετική διάρκεια παλμικής θεραπείας, η εφαρμοζόμενη τάση και ο τύπος παλμού (μονοπολικός ή διπολικός). Προτείνουμε, επίσης, περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη σε αυτήν την πολλά υποσχόμενη μη θερμική και μη επεμβατική τεχνολογία εξαγωγής φυτικών υλικών για να αποκαλυφθούν πιθανές εφαρμογές σε συστήματα και εφαρμογές παρτίδας, ημι-συνεχή καθώς και συνεχή PEF. Μια τέτοια μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει όλους τους κρίσιμους παράγοντες της διαδικασίας για να αποκαλύψει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα, τις μελλοντικές τάσεις και το πεδίο εφαρμογής αυτής της τεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας και του αισθητηριακού προφίλ των προϊόντων για τις ανάγκες των βιομηχανιών που σχετίζονται με τη διατροφή, την υγεία και τα καλλυντικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Tarbopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I., & Manios, T. (2007). A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(7), 2671-2676.
- Ahmad-Qasem, M.H., Barraji n-Catal n, H., Micol, V., Mulet, A., & García-Pérez, J.V. (2013). Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, 50(1), 189-196.
- Aldini, G., Piccoli, A., Beretta, G., Morazzoni, Riva, A., Marinello, C., Facino, R. M, (2006). Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, 77, 121-128.
- Allouche, N., Fki, I., & Sayadi, S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(2), 267-73.
- Álvarez, I., Pag n, R., Condon, S., & Raso, J. (2003). The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International journal of food microbiology*, 87, 87-95. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00056-4).
- Angelino, D., Gennari, L., Blasa, M., Selvaggini, R., Urbani, S., Esposto, S., Servili, M., & Ninfali, P. (2011). Chemical and cellular antioxidant activity of phytochemicals purified from olive mill waste waters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(5), 2011–2018.
- Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.010>
- Arshad, R.N., Abdul-Malek, Z., Munir, A., Buntat, Z., Ahmad, M., Jusoh, Y.M.M., El-Din Bekhit, A., Roobab, U., Manzoor, M.F., & Aadil, M. (2020). Electrical Systems for pulsed electric field applications in the food industry: An engineering perspective. *Trends in food science and technology*, volume 87, p.1-13.
- Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Dominguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., et al. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 866-1874.
- Barba, F.J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2014). New approaches for the use of nonconventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews*, 7(1), 45-62.

- Barba, F., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2015). Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace . *Food and Bioprocess Technology*, volume 8, p.1139-1148.
- Barba, F., Parniakov, O., Pereira, S., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J., . . . Vorobiev, E. (2020). Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable food for tomorrow. In *Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable food for tomorrow* (p. 3). United Kingdom: Academic Press.
- Bayçin, D., Altiok, E., Semra, Ü., Bayraktar, O., (2007). Adsorption of olive leaf (*Olea europaea* L.) antioxidants on silk fibroin. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1227-1236.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuna, A., & del Rio, J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, 68(4), 457-462.
- Bobinaitė, R., Pataro, G., Lamanuskas, N., Šatkauskas, S., Viškelis, P., & Ferrari, G. (2015). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5898-5905. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1668-0>
- Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M., (2005). Phenolic compounds in olive oil and olives. *Curr. Top. Nutr. Res.*, 3 (2), 125-136.
- Boskou D, Tsimidou M, Blekas G. (2006). Polar phenolic compounds. *In: Olive oil Chemistry and Technology* (2nd ed), AOCS Press, Champaign Illinois, USA.
- Bouaziz, M., Feki, I., Ayadi, M., Jemai, H., & Sayadi, S., (2010). Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 894-905.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem.* 108, 253-262.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L. H., Cordin-Falcimaigne, A., & Lanoisellé, J. L. (2012). Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.016>
- Bozinou, E., Karageorgou, I., Batra, G., Dourtoglou, V., & Lalas, S. (2019). Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of *Moringa oleifera* Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques. *Beverages*, 5. <https://doi.org/10.3390/beverages5010008>

- Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., & Hammami, M. (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, 38, 146– 152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.023>
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., & Hammami, M. (2013). Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 49, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.042>
- Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Patumi, M., & Nucci, R. (2002). Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00387-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00387-X)
- Brodelius, P. E., Funk, C., & Shillito, R. D. (1988). Permeabilization of cultivated plant cells by electroporation for release of intracellularly stored secondary products. *Plant Cell Rep*, 7(3), 186-188. <https://doi.org/10.1007/BF00451632>
- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A., & Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of translational medicine*, 12, 219.
- Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D., Fernández-Gutiérrez, A., (2005b). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8918-8925.
- Carrera-Gonzalez, M. P., Ramirez-Exposito, M. J., Mayas, M. D., & Martinez-Martos, J. M. (2013). Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in Food Science & Technology*, 31, 92-99.
- Carullo, D., Pataro, G., & Ferrari, G. (2019). Effect of PEF Pre-Treatment and Extraction Temperature on the Recovery of Carotenoids from Tomato Wastes. *Chemical Engineering Transactions*, 75, 139-144. <https://doi.org/10.3303/CET1975024>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chemat, F., & Cravotto, G. (2013). *Microwaveassisted extraction for bioactive compounds*. US: Springer.
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian M. (2017). Review of green food processing techniques.

- Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg.*, *41*, 357-377. doi: 10.1016/j.ifset.2017.04.016
- Chinou, I. (2017). Assessment report on *Olea europaea* L., folium. *European Medicines Agency*, 2017. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). EMA/HMPC/359236/2016. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-olea-europaea-l-folium-first-version_en.pdf
- Cifá, D., Skrt, M., Pittia, P., Mattia, C., & Poklar, U.N. (2018). Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*, *6*(4), 701-1169. <https://doi.org/10.1002/fsn3.654>
- Deng, Q., Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M., Orlie, V., Grimi, N., Vorobiev, E., et al. (2014). The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications. *Food Engineering Reviews*, *7*, 357-381.
- Drosou, F., Yang, E., Marinea, M., Dourtoglou, T., Chatzilazarou, A., & Dourtoglou, V. (2017). An assessment of potential applications with pulsed electric field in wines. *BIO Web of Conferences*, *9*, 02010. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902010>
- El, S.N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition reviews*, *67*(11), 632-638. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x.
- Erbay, Z., & Icier, F. (2010). Thin layer drying behaviors of olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Food Process Engineering*, *33*, 287-308.
- European Medicines Agency – EMA (2011). Assessment report on *Olea Europaea* L., folium. Based on Article 16d(1), Article 16f and Article 16h of Directive 2001/83/EC as amended (traditional use). Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/superseded-assessment-report-olea-europaea-l-folium-first-version_en.pdf
- Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S. E., & Abdel-Massih, R. M. (2011). The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, *66*, 58-63.
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., & Mantzavinos, D. (2009). Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *84*, 895-900.
- Fekia, M., Allouche, N., Bouaziz, M., Gargoubi, A., & Sayadi, S. (2006). Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*(12), 1021-1027.

- Fernandez-Diaz, M., Barsotti, L., Dumay, E., & Cheftel, J. (2000). Effects of pulsed electric fields on ovalbumin solutions and dialyzed egg white. *Agric Food Chemistry*, volume 48, p.2332–2339.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Soares, M.E., Bastos, M.L., & Pereira, J.A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* l. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem.*, 103, 188-195. doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.006.
- Ferreira, V., Arnal, A., Royo, P., García-Armingol, T., Lopez-Sabiron, A., & Ferreira, G. (2019). Energy and resource efficiency of electroporation-assisted extraction as an emerging technology towards a sustainable bio-economy in the agri-food sector. *Journal of Cleaner Production*, volume 233, p.1123-1132.
- Gagneten, M., Salvatori, D., Schebor, C., & Olaiz, D. (2019). Optimization of pulsed electric field treatment for the extraction of bioactive compounds from blackcurrant. *Food and Bioprocess Technology*, volume 12, p.1102-1109.
- Ganjalikhan, H.S., Sharififar, F., Haghpanah, T., Babae, A., & Eftekhari-Vaghefi, S.H. (2019). The effects of olive leaf extract on the testis, sperm quality and testicular germ cell apoptosis in male rats exposed to busulfan. *Int. J. Fertil Steril*, 13, 57-65.
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F. J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., & Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, p.245-262.
- Giamarellos-Bourboulis, E. J., Geladopoulos, T., Chrisofos, M., Koutoukas, P., Vassiliadis, J., Alexandrou, I., Tsaganos, T., Sabracos, L., Karagianni, V., Pelekanou, E., Tzepe, I., Kranidioti, H., Koussoulas, V., & Giamarellou, H. (2006). Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock (Augusta, Ga.)*, 26(4), 410–416.
- González-Hidalgo, I., Bañón, S., & Ros, J.M. (2012). Evaluation of table olive by-product as a source of natural antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(4), 674–68.
- Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A. N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., et al., (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 600-608.
- Grahl, T., & Märkl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45(1-2), 148-157. <https://doi.org/10.1007/s002530050663>

- Grawish, M. E., Zyada, M. M., & Zaher, A. R. (2011). Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract. *Medical Oncology* 28, 1163-1168.
- Guerrero-Beltrán, J.A., & Welti-Chanes, J. (2016). Pulsed Electric Fields. In B. Caballero, P.M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (p.561-565). Academic Press.
- Hanekamp, J. C., Bast, A., (2007). Food supplements and European regulation within a precautionary context: A critique and implications for nutritional, toxicological and regulatory consistency. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 267-285.
- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N.P., O'Grady, M.N., & Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126, 948-955.
- Hendrawan, Y., Larasati, R., Wibisono, Y., Umam, C., Sutan, S., & Hawa, L. (2019). Extraction of Phenol and Antioxidant Compounds from Kepok Banana Skin with PEF Pre-Treatment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 305, 012065. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/305/1/012065>
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food byproducts, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148.
- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., & Ibanez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7511-7520.
- Ho, C.T., (1992). 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, Ch.1, pp. 2-7.
- Islam, M. N., Jo, Y. T., Jung, S. K., & Park, J. H. (2013). Thermodynamic and kinetic study for subcritical water extraction of PAHs. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(1), 129-136.
- Jerman Klen, T., & Mozetič Vodopivec, B. (2011). Ultrasonic extraction of phenols from olive mill wastewater: comparison with conventional methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 12725–12731.
- Kaltsa, O., Grigorakis, S., Lakka, A., Bozinou, E., Lalas, S., & Makris, D. (2020). Green Valorization of Olive Leaves to Produce Polyphenol-Enriched Extracts Using an Environmentally Benign Deep Eutectic Solvent. *AgriEngineering*, 2, 226-239. <https://doi.org/10.3390/agriengineering2020014>

- Kaltsa, O., Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Bozinou, E., Lalas, S., & Makris, D. P. (2020). A Green Extraction Process for Polyphenols from Elderberry (*Sambucus nigra*) Flowers Using Deep Eutectic Solvent and Ultrasound-Assisted Pretreatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(4), 921. <https://doi.org/10.3390/molecules25040921>
- Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Makris, D. P. (2015). Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2014.11.002>
- Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., & Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 369-376.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D.-U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261-266.
- Kubo, I., Matsumoto, A., Takase, I. (1985). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maruration. *J. Chem. Ecol.* 2, 251-263.
- Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., & Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydrate Polymers*, 81, 323-329.
- Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Kaltsa, O., Bozinou, E., Lalas, S., & Makris, D. P. (2019). Saffron Processing Wastes as a Bioresource of High-Value Added Compounds: Development of a Green Extraction Process for Polyphenol Recovery Using a Natural Deep Eutectic Solvent. *Antioxidants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/antiox8120586>
- Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., & Bogiatzis, F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, 127(4), 1521-1525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.009>
- Lebovka, N., Vorobiev, E., & Chemat, F. (2011). *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. U.K.: CRC Press.
- Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2011). Pulsed Electric field-Assisted Extraction. In N. Lebovka, E. Vorobiev, & F. Chemat, *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* (pp. 25-84). New York: CRC Press.
- Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A., Valcárcel, M., (1998). Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 46, 1123-1130.

- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., et al. (2007). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part I. integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 872-878.
- Liu, Z.-W., Zeng, X.-A., & Ngadi, M. (2018). Enhanced extraction of phenolic compounds from onion by pulsed electric field (PEF). *Journal of Food Processing & Preservation*, 42, e13755.
- Lockyer, S., Rowland, I., Spencer, J.P.E., Yaqoob, P., & Stonehouse, W. (2016). Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: A randomised controlled trial. *Eur. J. Nutr.*, 56, 1421-1432. doi: 10.1007/s00394-016-1188-y.
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Improving Carotenoid Extraction from Tomato Waste by Pulsed Electric Fields. *Frontiers in nutrition*, 1, 12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00012>
- Luque de Castro, M.D., & Luque García, J.L. (2002). *Acceleration and automation of solid sample treatment*. Amsterdam; Boston: Elsevier.
- Maged, E., Mohamed, Ayman Amer, H., & Eissa. (2012). Pulsed Electric Fields for food processing technology. *Structure and Function of Food Engineering*, 65, 337-343.
- Martín, B., Tylewicz, U., Verardo, V., Pasini, F., Caravaca, A. M. G., Caboni, M., & Dalla Rosa, M. (2020). Pulsed electric field (PEF) as pre-treatment to improve the phenolic compounds recovery from brewers' spent grains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102402. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102402>
- Martín-García, A.I., & Molina Alcaide, E. (2008). Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 142, 317–329.
- Martínez, J.M., Delso, C., Álvarez, I., & Raso, J. (2019). Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Wiley (Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, volume 19, Issue 2, p.530-552.
- Martinez, J.M. (2007). *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. CRC Press.
- Mkaouar, S., Gelicus, A., Bahloul, N., Allaf, K., Kechaou, N., (2016). Kinetic study of polyphenols extraction from olive (*Olea Europaea L.*) leaves using instant controlled pressure drop texturing. *Separation and Purification Technology* 165-171.

- Mohamed, M., & Amer Eissa, A. (2012). Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology. In *Structure and function of food engineering* (pp. 276-301). Intech.
- Mourtzinos, I., Salta, F., Yannakopoulou, K. Chiou, A., Karathanos, V. T., (2007). Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8088-8094.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8-18.
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D., & Kefalas, P. (2008). Optimization of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and RSM. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 977-985. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2353-9>
- Nashwa, F. S., Morsy, M., Abdel-Aziz E., (2014). Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(1), 46-53.
- Nenadis, N., Tsimidou, M. Z. (2009). Oleuropein and related secoiridoids, Antioxidant activity and sources other than *Olea europaea* L. (olive tree). *Recent Prog. Med. Plants*, 25 (6), 53–74.
- Niu, D., Zeng, X.-A., Ren, E.-F., Xu, F.-Y., Li, J., Wang, M.-S., & Wang, R. (2020). Review of the application of pulsed electric fields (PEF) technology for food processing in China. *Food Research International*, volume 137.
- Ntourtoglou, G., Tsapou, E. A., Drosou, F., Bozinou, E., Lalas, S., Tataridis, P., & Dourtoglou, V. (2020). Pulsed Electric Field Extraction of α and β -Acids From Pellets of *Humulus lupulus* (Hop). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(297). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00297>
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 823–837.
- Obied, H. K., Karuso, P., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 2848–2853.
- Oliveira, J.V., & Oliveira, D. (2000). Kinetics of the enzymatic alcoholysis of Palm kernel oil in supercritical CO₂. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39(12), 4450-4454.
- Olmo-García, L., Bajoub, A., Benlamaalam, S., Hurtado-Fernández, E., Bagur-González, M., Chigr, M., Mbarki, M., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2018). Establishing the Phenolic Composition of *Olea europaea* L. Leaves from Cultivars Grown in Morocco as a Crucial Step Towards Their

Subsequent Exploitation. *Molecules*, 23, 2524.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102524>

- Oreopoulou, V., Tzia, C., (2006). Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In V. Oreopoulou and W. Russ. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry (pp. 209-232).
- Palmeri, R., Parafati, Trippa, Siracusa, L., Arena, E., Restuccia, C., & Fallico, B. (2019). Addition of Olive Leaf Extract (OLE) for Producing Fortified Fresh Pasteurized Milk with An Extended Shelf Life. *Antioxidants*, 8, 255.
<https://doi.org/10.3390/antiox8080255>.
- Papoti, V.T., Papageorgiou, M., Dervisi, K., Alexopoulos, E., Apostolidis, K., & Petridis, D. (2018). Screening Olive Leaves from Unexploited Traditional Greek Cultivars for Their Phenolic Antioxidant Dynamic. *Foods*, 7(12), 197.
- Parniakov, O., Barba, F., Nabil, G., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, volume 192, p.842-848.
- Pataro, G., Carullo, D., Siddique, A., Falcone, M., Donsì, F., & Ferrari, G. (2018). Improved extractability of carotenoids from tomato peels as side benefits of PEF treatment of tomato fruit for more energy-efficient steam-assisted peeling. *Journal of Food Engineering*, 233.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.03.029>
- Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T. A., Linares-Palomino, P. J., Altarejos, J., Noguera, M., Sánchez, A., (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *J. Chromatogr. A*, 1112, 311-318.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Diaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goni, I., & Saura-Calixto, F., (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.
- Perez-Serradilla, J.A., & Luque de Castro, M.D. (2011). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124, 1652-1659.
- Pereira A., & Ferreira I., (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa). *Leaves Biological molecules*, 1153-1162.
- Pizzichemi, M. (2009). Pulsed Electric Field inactivation of microbial cells: the use of ceramic layers to increase the efficiency of treatment. *Nuclear Physics B Proceedings Supplements*, volume 197, p.374-37.

- Priego-Capote, F., Ruiz-Jimenez, J., & de Castro, M.D.L. (2004). Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis-diode array detection. Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A.*, 1045(1-2), 239-246.
- Prior L., Cao G. (1999). In vivo total capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine.* 27: 1173-1181.
- Putnik, P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., Montesano, D., & Bursać Kovačević, D. (2018). Novel Food Processing and extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods*, volume 7, Issue 7.
- Puértolas, E., Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2012). Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications. *Annual review of food science and technology*, 3, 263–282.
- Puértolas, E., & Barba, F. J. (2016). Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization. *Food and Bioproducts Processing*, volume 100, p.172-184.
- Ranalli, A., Lucera, L., & Contento, S. (2003). Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(26), 7636–7641.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875-1887.
- Redondo, D., Venturini, M. E., Luengo, E., Raso, J., & Arias, E. (2017). Pulsed Electric fields as a green technology for the extraction of bioactive compounds from thinned peach by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, volume 45, p.335-343.
- Roselló-Soto, E., Barba, F., Parniakov, O., Galanakis, C., Lebovka, N., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2014). High Voltage Electrical Discharges, Pulsed Electric Field and Ultrasound Assisted Extraction of Protein and Phenolic Compounds from Olive Kernel. *Food Bioprocess Technol*, volume 8, p.885–894. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1456-x>
- Rosello-Soto, E., Galanakis, C.M., Brncic, M., Orlie, V., Trujillo, F.J., Mawson, R., et al. (2015). Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, byproducts and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2), 134-149.
- Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R.P., Saraiva, J.A., Boussetta, N., Grimi, N., & Barba, F.J. (2015). Emerging opportunities for the effective

- valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 296-310.
- Şahin, S., & Bilgin M. (2018). Olive tree (*olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: A review. *J. Sci. Food Agric.*, 98, 1271-1279. doi: 10.1002/jsfa.8619
- Saija, A., Uccella, N. (2001). Olive biophenols: Functional effects on human wellbeing. *Trends in Food Sci. Tech.* 11, 357-363.
- Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. (2007). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Sci. Tech. Int.*, 13 (6),413-421.
- Samuelsson, G., (1996). *Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προέλευσης. Εγχειρίδια φαρμακογνωσίας*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα (Μτφ. στα ελληνικά).
- Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*, 49, 150–159.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C., (2002). Absorption and Metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.*, 56,276-282.
- Sepporta, M. V., Fuccelli, R., Rosignoli, P., Ricci, G., Servili, M., Morozzi, G., et al. (2014). Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of Functional Foods*, 8, 269-273.
- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F., & Zaidul, I.S.M. (2014). Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 124, 105-116.
- Speroni, E, Guerra, M.C., Minghetti, A., Crespi-Perellino, N., Pasini, P., & Piazza, F., (1998). Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phytother Res.*, 12, 98-100.
- Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review . *Trends in Food Science & Technology*, Volume 20, Issues 11–12,p.544-556.
- Sosa Ferrera, Z., Padrón Sanz, C., Mahugo Santana, C., & Santana Rodríguez, J. J. (2004). The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), 469-479. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00732-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00732-0)

- Souilem, S., Fki, I., Kobayashi, I., Khalid, N., Neves, M.A., Isoda, H., Sayadi, S., & Nakajima, M. (2017). Emerging technologies for recovery of value-added components from Olive Leaves and their applications in Food/Feed Industries. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 229-248. doi: 10.1007/s11947-016-1834-7
- Sukardi, S., Purwaningsih, I., & Sita, P. (2020). Extraction of phenolic compounds from basil (*Ocimum americanum* L.) leaves with pretreatment using pulsed electric field (PEF). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 475, 012056. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012056>
- Sumiyoshi, M., Kimura, Y. (2010). Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice.
- Sun, Y., Zhang, M., & Fang, Z. (2019). Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities A review. *Trends in Food Science & Technology*, volume 105,p. 468-482.
- Taamalli, A., Arraez-Roman, D., Barrajon-Catalan, E., Ruiz-Torres, V., Perez-Sanchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., SegMura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.F. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 1817-1825. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.090>
- Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., & Ong, E.S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A.*, 1217(16), 2484-2494.
- Thamkaew, G., & Galindo, F. (2020). Influence of pulsed and moderate electric field protocols on the reversible permeabilization and drying of Thai basil leaves. *Innovative food science and Emerging Technologies*, volume 64.
- Tsapou, E.A., Ntourtoglou, G., Drosou, F., Tataridis, P., Dourtoglou, T., Lalas, S., & Dourtoglou, V. (2020). In situ Creation of the Natural Phenolic Aromas of Beer: A Pulsed Electric Field Applied to Wort-Enriched Flax Seeds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(1219). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.583617>
- Tura, D., Robards, K., (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J. Chromatogr. A.*, 975, 71-93.
- Vaughn, R. H. (1954). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maruration, in Industrial fermentations, Underkofler, L.A. and Hickey, R.J., Chemical Inc., New York, 2.

- Visioli, F., Bogani, P., & Galli, C. (2006). Healthful properties of olive oil minor components. In Boskou, D. (Ed), *Olive oil Chemistry and Technology* (2nd ed), AOCS Press, Champaign Illinois USA.
- Vizza, D., Lupinacci, S., Toteda, G., Puoci, F., Ortensia, I.P., De Bartolo, A., Lofaro, D., Scrivano, L., Bonofiglio, R., La Russa, A., Bonofiglio, M., & Perri, A. (2019). An olive leaf extract rich in polyphenols promotes apoptosis in cervical cancer cells by upregulating p21^{Cip/WAF1} Gene expression. *Nutr. Cancer.*, 71(2), 320-333. doi: 10.1080/01635581.2018.1559934
- Wainstein, J., Ganz, T., Boaz, M., Bar, D.Y., Dolev, E., Kerem, Z., & Madar, Z. (2012). Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *J. Med. Food.*, 15, 605-610. doi: 10.1089/jmf.2011.0243
- Walter, W.M.Jr., Fleming, H.P., & Etchells, J.L., (1973). Preparation of Antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein *Appl. Microbiol.* 26, 773-776.
- Wan, Coventry, Swiergon, Sanguansri, & Versteeg. (2009). Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 20, Issue 9, p.414-424.
- Wang, Y., Wang, S., Cui, W., He, J., Wang, Z., & Yang, X. (2013). Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury. *Neural. Regen. Res.*, 8, 2021-2029.
- Yancheva, S., Mavromatis, P., Georgieva, L. (2016). Polyphenol profile and antioxidant activity of extracts from olive oils. *Journal of Central European Agriculture* 17(1), 154-163.
- Yin, M. C., & Chan, K. C. (2007). Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(17), 7177–7181.
- Jung, Y.-C., Kim, H.W., Min, B.K., Cho, J.Y., Son, H.J., Lee, J.Y., Kim, J.-Y., Kwon, S.-B., Li, Q., & Lee, H.-W. (2019). Inhibitory effect of olive leaf extract on obesity in high-fat diet-induced mice. *In Vivo*, 33, 707-715. doi: 10.21873/invivo.11529.
- Zeng, X.-A., Yu, S., Zhang, L., & Chen, X. (2008). The effects of AC electric field on wine maturation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 463-468. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.03.002>
- Zhang, R., Chen, J., Xiao, J., Liao, X., Wang, L., & Guan, Z. (2011). Pulsed electric fields system and its application in non-thermal food processing. *High Voltage Engineering*, volume 37, p. 777–786.

- Zhang, B., Yang, R., & Liu, C.-Z. (2008). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 480-483.
- Žuntar, I., Putnik, P., Bursać, Kovačević, D., Nutrizio, M., Šupljika, F., Poljanec, A., Dubrović, I., Barba, F.J., & Režek Jambrak, A. (2019). Phenolic and antioxidant analysis of Olive Leaves extracts (*Olea europaea* L.) obtained by High Voltage Electrical Discharges (HVED). *Foods*, 8(7), 248. doi: 10.3390/foods8070248.
- Δεδούση, Μ. & Μαμουδάκη, Π.-Β. (2017). *Εκχύλιση πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών από φύλλα ελιάς (Olea europaea) υποβοηθούμενη με υπερήχους, χρησιμοποιώντας μείγμα χαμηλής θερμοκρασίας μετάβασης (LTTM) Γλυκερόλης/ Τρυγικού Κάλιο-Νατρίου*. Διπλωματική εργασία στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, στο Πανεπιστήμιο Αιγαίου.
- Θάνου, Χρ. (2020). *Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς*. Διπλωματική εργασία στην Οργανική Χημική τεχνολογία, στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Κατικαρίδου, Ε. (2017). *Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς*. Μεταπτυχιακή διατριβή, στον Τομέα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Πριλή, Ε.-Δ. (2021). *Ανασκόπηση στη χρήση των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (ΠΗΠ) για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από φυτά και παραπροϊόντα βιομηχανίας τροφίμων*. Μεταπτυχιακή διατριβή, στο ΜΠΣ Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.