



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΟΙΚΟΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ IN VITRO
ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ»**



ΤΑΓΑΡΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΗΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλιών
ελιάς *in vitro* με συνδυασμό μοριακών τεχνικών

In vitro assessment of antioxidant activity of olive
varieties in combination with molecular techniques

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας

του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αριστείδης Βεσκούκης: Επίκουρος καθηγητής του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα: Εντεταλμένη διδάσκουσα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Τα αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες που μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό, και αντισταθμίζοντας βλάβες που προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Οι καρποί του δέντρου της ελιάς *Olea europaea* φημίζονται για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες, οι οποίες μάλιστα παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών. Οι πολυφαινόλες της ελιάς είναι φυσικά χημικά μόρια., τα οποία έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των θετικών επιδράσεων που έχουν στην υγεία, ιδιαίτερα εξαιτίας των αντιοξειδωτικών τους λειτουργιών. Οι θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών της ελιάς μπορούν να συμβάλλουν στην προστασία από το οξειδωτικό στρες, βελτιώνοντας την εξέλιξη πολλών χρόνιων ασθενειών. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη σειράς δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές του ελαιώνα της Νοτιοδυτικής (ΝΔ) Μαγνησίας χρησιμοποιώντας τρεις κοινά αποδεκτές αντιοξειδωτικές δοκιμασίες (DPPH, Reducing Power), καθώς και προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 περιοχές μελέτης (Αμαλιάπολη, Πτελεός, Αχίλλειο) στις εξεταζόμενες μεθόδους, καθώς και ασθενή αρνητική συσχέτιση με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Ωστόσο σε σύγκριση με δείγματα του καλλιεργητικού έτους 2021, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέθοδο Reducing power, με τα δείγματα του 2021 να είναι ισχυρότερα. Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι οι κλιματικές συνθήκες που επικράτησαν τις δυο χρονιές στις ίδιες περιοχές είχαν ως αποτέλεσμα τη διαφορετική σύσταση του ελαιόκαρπου, άρα υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, η οποία χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Τέλος, τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να ωφελήσουν την περιοχή της ΝΔ Μαγνησίας, ενισχύοντας και την τοπική οικονομία αφού αναδεικνύουν την υψηλή βιοδραστικότητα των προϊόντων της.

Abstract

Antioxidants play an important role in maintaining cellular homeostasis by neutralizing free radicals which have the capacity to be hazardous. What is more, these substances can minimize the damage caused by oxidative stress, which results from free radicals. *Olea Europaea*'s fruits are known for their antioxidant properties, which may also vary between different cultivars. Olive polyphenols are natural chemical compounds that have drawn scientific attention because of their positive impact on health, mainly due to their antioxidant capacities. These substances have been shown to protect from oxidative stress, which is associated with many chronic diseases, thus improving their long-term effects. In this study, samples from three different areas from the Southern-Western Magnesia prefecture were studied using three commonly accepted assays (DPPH, Reducing Power assay). Lastly, the total polyphenolic content was determined using the Folin – Ciocalteu method. The results did not show statistically significant differences between the samples from the three studied areas (Amaliapolis, Pteleos, Achilion). During the comparison of samples from the same areas from 2020 and 2021, statistically significant differences were found in the Reducing power assay, with the samples from 2021 being more potent. The total polyphenolic content did not show any significant differences between the two cultivation years. Consequently, we can hypothesize that the climate conditions in each year were the main reason for these observed differences, by altering the polyphenolic substances present in each sample, thus exhibiting different antioxidant capacities in each year. Even so, little is known and more research must be done to determine the factors affecting the quality and the substances of the final olive drupe. Finally, these results can contribute in boosting the local economy and the income of the olive producers, by highlighting the antioxidant capacity of the SW Magnesia prefecture olive products.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον κύριο Κουρέτα Δημήτριο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του, στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωντανών Οργανισμών. Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Αριστεΐδη Βεσκούκη και την κυρία Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Τέλος, είμαι πολύ ευγνώμων σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για την διάθεσή τους να μοιραστούν τις γνώσεις τους σχετικά με το θέμα μαζί μου καθώς και για την φιλική ατμόσφαιρα, εκτός από την επαγγελματική, που ανέπτυξαν σε καθημερινό επίπεδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. Εισαγωγή	8
1.1 Ιστορική αναδρομή ελιάς.....	8
1.2 Σύγχρονη εποχή	9
1.3 Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα	10
1.4 Ελαιόδενδρο: Κύκλος ζωής και μορφολογία του	11
1.4.1 Η μορφολογία του ελαιόκαρπου.....	12
1.5 Συλλογή ελιάς και προϊόντα	13
2.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου	14
2.2.1 Θετικές επιδράσεις ROS	16
2.2.2 Αρνητικές επιδράσεις ROS	17
3.1 Αντιοξειδωτικά	18
3.2.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	18
3.2.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά	19
3.3 Πολυφαινόλες	19
3.3.1 Κατηγορίες πολυφαινολών	20
3.4 Πολυφαινόλες της ελιάς.....	21
3.5 Σύνθεση πολυφαινολών	22
4.1 Επεξεργασία ελαιόκαρπου	22
4.2 Παραγωγή ελαιόλαδου	23
4.3 Παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς	24
Σκοπός	26
Πειραματικό Μέρος	27
1. Υλικά.....	27

1.1 Χημικά Αντιδραστήρια	27
1.2 Μέθοδοι	27
1.2.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH	27
1.2.2 Προσδιορισμός της αναγωγικής ισχύος με την δοκιμασία reducing power	28
1.2.3 Προσδιορισμός συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu	30
Αποτελέσματα	31
1.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα ελαιόκαρπων (δέσμευση ρίζας DPPH)	31
1.2 Αναγωγική ικανότητα ελαιόκαρπων (μέθοδος reducing power assay)	32
1.3 Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ελαιόκαρπων (μέθοδος Folin – Ciocalteu)	32
2.1 Σύγκριση ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ελαιόκαρπων με τις in vitro αντιοξειδωτικές μεθόδους	33
2.2 Σύγκριση δειγμάτων ελαιόκαρπου ανά περιοχή μεταξύ των ετών 2021-2022 στις in vitro μεθόδους	34
2.3 Σύγκριση δειγμάτων ελαιόκαρπου συγκεντρωτικά για τα έτη 2021-2022	35
Συζήτηση	36
1.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων ελαιόκαρπου in vitro	36
1.2 Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων ελαιόκαρπου των περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας για τα έτη 2021-2022	37
1.3 Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικά βήματα	39
Βιβλιογραφία	41
Παράρτημα	16

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή Ελιάς

Η καλλιέργεια του καρπού *Olea europaea L.* και των ελαιόδεντρων είναι χαρακτηριστικό της αγροτικής παραγωγής των χωρών της Μεσογείου από το 6.000 π.Χ. Οι καρποί της ελιάς στα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούνταν από τους κατοίκους των περιοχών αυτών για διατροφή, για θρησκευτικούς, και ιατρικούς σκοπούς. Σήμερα αξιοποιούνται κυρίως για την παραγωγή ελαιόλαδου και επιτραπέζιων ελιών, σημαντικών προϊόντων της εγχώριας Μεσογειακής δίαιτας (Riley, F.R, 2002).

Η ελιά και το ελαιόλαδο δεν αποτελούσαν μόνο ένα σημαντικό κομμάτι της αρχαίας μεσογειακής διατροφής, αλλά και μια από τις πιο επιτυχημένες βιομηχανίες της αρχαιότητας. Η καλλιέργεια του ελαιόδεντρου εξαπλώθηκε με την Ελληνική αποικιοκρατία από την Μικρά Ασία μέχρι την Ιβηρία και την Βόρεια Αφρική, και το ελαιόλαδο έγινε ένα σημαντικό ανταλλακτικό αγαθό κατά την διάρκεια της Ρωμαϊκής Περιόδου, μέχρι και σήμερα. Η ελιά απέκτησε ιδιαίτερη σημασία όταν συσχετίστηκε με το κλαδί της ειρήνης, και δινόταν σαν έπαθλο στον νικητή στους αρχαίους Ολυμπιακούς Αγώνες. (Cartwright M., 2016).



Εικόνα 1: Κότινος (στεφάνι) (Cartwright M., 2016)

Το 98% των ελαιόδενδρων παγκοσμίως καλλιεργούνται στη Μεσόγειο. Ο καρπός της ελιάς συλλέγεται από το είδος *Olea europaea* (Dos Santos VR, Goncalves V, et al., 2022). Οι ελιές υπήρξαν μέγιστης σημασίας για το ελαιόλαδο που παρήγαγαν από την εποχή του χαλκού. Επιπλέον, η σημασία της ελιάς στην Ελληνική καλλιέργεια φαίνεται και από την παρουσία του κλαδιού ελιάς στα κλασσικά Αθηναϊκά νομίσματα. Οι Αθηναίοι θεωρούσαν την ελιά δώρο της Θεάς Αθηνάς, με αυτό το δέντρο να απαντάται στην Ακρόπολη. Είχαν επίσης ένα ολόκληρο ιερό άλσος με ελαιόδεντρα, από το οποίο πατούσαν τις ελιές και παρήγαγαν ελαιόλαδο, με το οποίο διακοσμούσαν αγγεία για να δοθούν ως βραβεία για την ετήσια γιορτή των Παναθηναίων (Oleson, J.P. et al. 2009).

1.2 Σύγχρονη Εποχή

Υπάρχουν περίπου 805 εκατομμύρια ελαιόδεντρα στον κόσμο καλύπτοντας περίπου 24 εκατομμύρια στρέμματα. Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή ελιάς είναι περίπου 9.4 εκατομμύρια τόνους. Περίπου 720 χιλιάδες τόνοι καταναλώνονται ως επιτραπέζιες ελιές, ενώ οι υπόλοιποι 8.680.000 τόνοι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαιόλαδου. Από τους 1600 περίπου τόνους ελαιόλαδου που παράγονται, περίπου 600 τόνοι παράγονται στην Ιταλία, 360 τόνοι παράγονται στην Ισπανία και 260 τόνοι παράγονται στην Ελλάδα. Μικρότερα ποσά προέρχονται από την Τυνησία, την Τουρκία, την Πορτογαλία, το Μαρόκο, τη Λιβύη και άλλες χώρες παρακαείμενες στην Μεσόγειο (Dos Santos VR, Goncalves V, et al 2022). Επιπλέον, έχουμε μερική παραγωγή ελαιόλαδου και στην Αργεντινή και στην Καλιφόρνια. Οι ελιές και το ελαιόλαδο είναι ένα παραδοσιακό είδος της διατροφής για τους κατοίκους της Μεσογείου.

Η αξία των προϊόντων της ελιάς εκτιμάται σε περίπου 2.8 εκατομμύρια δολάρια, εκ των οποίων τα 2.5 εκατομμύρια αντιπροσωπεύουν την αξία του ελαιόλαδου και τα υπόλοιπα 300 χιλιάδες την αξία της επιτραπέζιας ελιάς. Στην λεκάνη της Μεσογείου, το 25% των αγροτικών εσόδων οφείλονται στην καλλιέργεια της ελιάς.

Η μεγαλύτερη κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς γίνεται από τους Έλληνες, με περίπου 20.8 κιλά/χρόνο ανά άτομο. Στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 117.6 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Από

αυτά προκύπτουν 259.3 τόνοι ελαιόλαδου, και 71.2 τόνοι επιτραπέζιων ελιών. Η μισή από την ετήσια συγκομιδή εξάγεται στο εξωτερικό, με το 75% αυτής να προορίζεται για την Ιταλία. Την περίοδο 1990-2003, το ελαιόλαδο καταλάμβανε το 65-76% της εγχώριας αγοράς. Ωστόσο, η έλλειψη συσκευασμένων προϊόντων και η έλλειψη επεξεργασίας είχε πολύ σημαντικό αντίκτυπο στην αγορά, με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να μειωθεί στο 38% (ICAP 2016).

Όσον αφορά την περιοχή της Μαγνησίας διαθέτει ένα ημιορεινό ανάγλυφο, στο οποίο σχηματίζονται οι πεδιάδες του Αλμυρού και του Βόλου. Η πεδιάδα του Αλμυρού είναι η βασική πεδιάδα του Νομού Μαγνησίας. Το κλίμα της γεωγραφικής περιοχής αυτής παρουσιάζει αρκετές διαφοροποιήσεις στις διάφορες περιοχές της, γενικά όμως είναι εύκρατο- μεσογειακό καθώς δεν παύει να αποτελεί μια παραθαλάσσια περιοχή. Στον νομό Μαγνησίας οι δεντροκαλλιέργειες αντιπροσωπεύουν το 1/3 της αγροτικής παραγωγής. Από αυτά, το 75% αποτελείται από ελαιόδεντρα. Η Νοτιοδυτική Μαγνησία αποτελείται έναν παραδοσιακό ελαιώνα, και παρά το γεγονός ότι κάποια τμήματά του είναι δύσβατα λόγω του ορεινού του ανάγλυφου, περιέχει ελαιόδεντρα που παράγουν ελιές υψηλής θρεπτικής αξίας. Ένα από τα χαρακτηριστικά που καθιστά τους καρπούς της περιοχής θρεπτικά μοναδικούς είναι η μεγάλη διαφορά της θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύκτας. Η κύρια ποικιλία ελιάς, επιτραπέζια και ελαιοποιήσιμη, που καλλιεργείται εκεί είναι αυτή της Άμφισσας και Καλαμών. Εκτάσεις αυτού του παραδοσιακού ελαιώνα βρίσκονται στα χωριά Αμαλιάπολη, Πτελεός, Αχίλλειο, Άγιοι Θεόδωροι, Αργαλαστή και Λεχώνια. (editors, database of civil duth).

Στην Μαγνησία υπάρχουν περίπου 8.000 πιστοποιημένοι ελαιώνες, και η συνολική έκταση των καλλιεργήσιμων εκτάσεων υπολογίζεται στα 17.700 εκτάρια (GAIA Registry).

1.3 Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα υπάρχουν περισσότερες ποικιλίες μαύρης ελιάς σε σχέση με άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες, όπως για παράδειγμα στην Ισπανία που ασχολείται κυρίως με την καλλιέργεια πράσινων ποικιλιών. Οι ποικιλίες βρώσιμης ελιάς είναι διαφορετικές από τις ελαιοποιήσιμες. Υπάρχουν δηλαδή ποικιλίες που προορίζονται μόνο για κατανάλωση, και ποικιλίες που προορίζονται μόνο για την παραγωγή ελαιόλαδου (Kourti M, Alvanou M et al. 2023).

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα. Ξεχωρίζοντας τις πιο σημαντικές έχουμε τις εξής. Η Κορωνέικη είναι οι ποικιλία που καλλιεργείται περισσότερο στην Ελλάδα. Καλλιεργείται στην Πελοπόννησο, στην Κρήτη και στις Ιόνιες Νήσους. Είναι μια εξαιρετική ποικιλία για την παραγωγή ελαιόλαδου. Παρόλα αυτά, στην Κρήτη οι καρποί της ποικιλίας αυτής καταναλώνονται και ως επιτραπέζιες ελιές γιατί παρά το γεγονός ότι δεν έχουν μεγάλο ποσοστό σάρκας, έχουν έντονη γεύση και άρωμα. Η ποικιλία Καλαμών καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία, στη Λακωνία και στην Αχαΐα. Παράγει μεγάλους καρπούς και τα φύλλα του ελαιόδενδρου είναι μεγαλύτερα σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες. Επιπλέον ο πυρήνας ξεχωρίζει από την σάρκα πολύ εύκολα. Είναι μια από τις καλύτερες επιτραπέζιες ποικιλίες ελιών που παρουσιάζει συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση στο εξωτερικό. Η ποικιλία Αδραμυτινή ή/και Κολοβή καλλιεργείται στο νησί της Λέσβου. Η ποικιλία Σαμοθράκη καλλιεργείται στο ομώνυμο νησί (Kosma I, Vatavali A. et al. 2015). Πιο σπάνιες, αλλά εξίσου σημαντικές ποικιλίες, είναι η Μανάκι της Κορίνθου, και η Μάκρης του Έβρου. Τέλος, η Χοντρολιά και η Κουτσουρελιά καλλιεργούνται στην Αιτωλοακαρνανία (Kosma I, Vavoura M. et al. 2016).

1.4 Ελαιόδεντρο: Κύκλος ζωής και μορφολογία του



Εικόνα 2: Ελαιόδεντρο(Lanza B. 2005). .

Το ελαιόδεντρο (ή ελιά) είναι ένα σχετικά μικρό αειθαλές δέντρο με στενά φύλλα και μικρά άσπρα άνθη. Είναι γνωστό για τη μεγάλη διάρκεια ζωής τους, για αυτό λέγεται και αιωνόβιο δέντρο. Ο πρόγονος της ελιάς και του είδους *Olea Europaea* φαίνεται να ήταν η αγριελιά *Olea Sylvestris*, η οποία παρήγαγε ένα μικρό και στυφνό καρπό ο οποίος υπάρχει ακόμα σε κάποιες περιοχές της Μεσογείου. Αυτό το καλλιεργήσιμο είδος ελιάς εξαπλώθηκε γύρω από την Ανατολική Μεσόγειο έως και στη Νότια Ευρώπη και στη Βόρεια Αφρική.

Το ελαιόδεντρο ευημερεί σε ξηρά εδάφη με άνυδρη ατμόσφαιρα και μέτριες θερμοκρασίες, οι οποίες δεν πέφτουν ποτέ χαμηλότερα από -9 βαθμούς Κελσίου για να παραχθεί καρπός. Παρόλα αυτά, μια περίοδος ψύχους είναι απαραίτητη για την παραγωγή του ελαιόκαρπου από το δέντρο.

Η παραγωγή της ελιάς ακολουθεί ένα κύκλο δύο χρόνων, με μια καλή σοδειά τον πρώτο χρόνο και μια φτωχή σοδειά τον δεύτερο. Αυτό το μοτίβο μπορεί ωστόσο να δημιουργήσει προβλήματα στην βιομηχανία παραγωγής ελιάς.

Οι ελιές περιέχουν κατά μέσο όρο 22% έλαιο, 50% νερό, 1,6% πρωτεΐνη, 19,1% υδατάνθρακες, 5,8% κυτταρίνη, και 1,5% μέταλλα. Το ελαιόλαδο αποτελείται από ένα μίγμα τριγλυκεριδίων, τα οποία περιέχουν κυρίως μονοακόρεστα λιπαρά οξέα εστεροποιημένα με γλυκερόλη. Η ακορεστότητά του, καθιστά το ελαιόλαδο υγρό σε θερμοκρασία δωματίου και μειώνει το σημείο ζέσεως. Το πιο κοινό μονοακόρεστο λιπαρό οξύ στο ελαιόλαδο είναι ο-ολεϊκό οξύ. Είναι επίσης αυτό που ξεχωρίζει το ελαιόλαδο από τα άλλα έλαια. Δυο πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το λινολενικό και το α-λινολενικό οξύ. Το γεγονός ότι αυτά τα λιπαρά οξέα περιέχουν περισσότερο από έναν διπλούς δεσμούς τα καθιστά διατροφικά σημαντικά και θα πρέπει να προσλαμβάνονται ως κομμάτι της διατροφής. Τέλος, δυο κορεσμένα λιπαρά οξέα που περιέχει το ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό και το στεαρικό (Dos Santos VR, Goncalves V, et al 2022). Η ενέργεια που περιέχουν οι ελιές είναι περίπου 180 με 250 kcal ανά 100 γραμμάρια, με εξαίρεση συγκεκριμένες ποικιλίες όπως η Ιταλική La Majatica με 455 kcal ανά 100 γραμμάρια, και η Bella di Cerignola 164 kcal ανά 100 γραμμάρια (Lanza B., 2005).

1.4.1 Μορφολογία του ελαιόκαρπου

Ο καρπός της ελιάς περιέχει ένα σπόρο με μια εξωτερική στοιβάδα, η οποία μπορεί να χωριστεί δομικά σε τρεις ξεχωριστές κατηγορίες: στο επικάρπιο, στο μεσόκαρπο δηλαδή στο σώμα της, και στο ενδοκάρπιο δηλαδή στον πυρήνα, ο οποίος περιέχει και τον σπόρο. Το επικάρπιο είναι η προστατευτική στοιβάδα και αποτελεί το 1-3% του βάρους της ελιάς. Το χρώμα του επικάρπιου αλλάζει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς λόγω της συσσώρευσης χλωροφύλλης. Τα χρώματα τα οποία καταλαμβάνει ο καρπός είναι με τη σειρά πράσινο, ανοιχτό κίτρινο, ροζ/μωβ και τελικά μαύρο. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στο χρώμα οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις χημικών χρωστικών ουσιών που περιέχονται στον καρπό. Τέτοιες χρωστικές είναι οι χλωροφύλλες, οι ανθοκυανίνες, και τα καροτενοειδή. Το επικάρπιο και το μεσοκάρπιο αντιπροσωπεύουν περίπου το 70-85% του βάρους του ελαιόκαρπου. Το μεσοκάρπιο αποτελείται κατά 75% από νερό, και κατά 15% από λιπαρά, ενώ στις μαύρες (ώριμες) ελιές το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει και στο 30% (Rocha J, Borges N. et al., 2020).

1.5 Συλλογή ελιάς και προϊόντα

Οι μέθοδοι συλλογής της ελιάς δεν έχουν αλλάξει για πολλούς αιώνες. Οι νέες τεχνικές που έχουν εμφανιστεί χρησιμεύουν μόνο για να διευκολύνουν τη συλλογή της ελιάς. Σύμφωνα με την παράδοση, οι ελιές μαζεύονται χειρωνακτικά το φθινόπωρο έως και τις αρχές του χειμώνα. Οι ελιές που προορίζονται για την ελαιοποίηση συλλέγονται μαστίζοντας τα κλαδιά του δέντρου με μακριά ραβδιά, συνήθως όταν ο καρπός της ελιάς έχει αποκτήσει σκούρο χρώμα και ο χυμός της ελιάς έχει αυξηθεί αρκετά. Στην Ελλάδα, καθώς και σε άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες χρησιμοποιούνται επίσης με μικρότερη συχνότητα πλαστικά δίχτυα στα οποία οι καρποί αφήνονται να πέσουν φυσικά. Οι καρποί μπορούν να συλλεχθούν στα δίχτυα και με τη χρήση χημικών ουσιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκομιδή αποτελεί το 50-70% του συνολικού κόστους της παραγωγής ελιών.

Οι ελαιόκαρποι μπορούν να καταναλωθούν επιπλέον και ως θρούμπες ελιές. Η επεξεργασία τους αυτή περιλαμβάνει την πλήρη ωρίμανση και το ζάρωμα της ελιάς. Κατά τη συλλογή, δίχτυα τοποθετούνται κάτω από το δέντρο και οι ελιές πέφτουν όταν είναι πλήρως ώριμες. Η παρασκευή τους περιλαμβάνει την επώαση σε σκιερό μέρος για 2-3 εβδομάδες, παρουσία αλκαλικού διαλύματος. Με αυτόν τον τρόπο το μεγαλύτερο υδατικό περιεχόμενο τους αποβάλλεται.

Εκτός από το ελαιόλαδο, το ελαιόδεντρο παράγει και άλλα προϊόντα, τα οποία είναι πολύ δημοφιλή στο εμπόριο. Ένα από αυτά είναι εκχύλισμα των φύλλων του ελαιόδεντρου. Τα εκχυλίσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικό φάρμακο με μια ποικιλία θετικών επιδράσεων στην υγεία με περισσότερη έμφαση να δίνεται στην αντιοξειδωτική ιδιότητα των εκχυλισμάτων, και στις καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Τα φύλλα του ελαιόδενδρου περιέχουν πολλές διαφορετικές χημικές ενώσεις οι οποίες συνήθως χαρακτηρίζονται ως βιοφαινόλες της ελιάς, και φαίνεται να προσδίδουν στο εκχύλισμα τις ανάλογες θεραπευτικές ιδιότητες (Kiritsakis K, Kontominas M. Et al 2009).

Εκχυλίζοντας αναλόγως το πολυφαινολικό περιεχόμενο και τις αντιοξειδωτικές ενώσεις του ελαιόκαρπου σχεδιάζονται προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες, καθώς και μια σειρά καλλυντικών (Rodrigues F, Pimentel F et al. 2015).

2.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου

Ένα μόριο αποτελείται από έναν ή περισσότερους πυρήνες ατόμων, οι οποίοι αντίστοιχα περιέχουν πρωτόνια και νετρόνια. Επίσης, μια σειρά ηλεκτρονίων βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα, με την μορφή ενός ηλεκτρονιακού νέφους, το οποίο είναι πιο πυκνό στο κέντρο και όσο απομακρυνόμαστε από τον πυρήνα αυτό εξασθενεί. Τα ηλεκτρόνια, σύμφωνα με τους υπολογισμούς από την εξίσωση του Σρέντιγκερ, είναι κατανεμημένα σε ένα συγκεκριμένο αριθμό τροχιακών που βρίσκονται σε συγκεκριμένες αποστάσεις από τον πυρήνα, με σκοπό να υπάρχει η θεμελιώδης κατάσταση (ελάχιστη ενέργεια). Ηλεκτρόνια που βρίσκονται στο ίδιο τροχιακό συζευγνύονται και περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους αντίρροπα. Όσο επικρατεί η κατάσταση της ελάχιστης ενέργειας, το μόριο παραμένει σταθερό, άρα έχει μειωμένη δραστηριότητα. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, κυρίως αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά ατομικά/μοριακά τροχιακά αποδεσμευτούν, το ηλεκτρόνιο που παραμένει στο τροχιακό γίνεται ασύζευκτο και παρουσιάζει μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Αυτά τα άτομα/μόρια ονομάζονται πλέον παραμαγνητικά, και στην προσπάθεια πρόσληψης ηλεκτρονίου για να αποκατασταθεί αυτή η ισορροπία, αυξάνεται κατά πολύ η δραστηριότητά του καθώς πρέπει να προσληφθεί ηλεκτρόνιο για να αποκατασταθεί η μαγνητική ροπή (δίπολο) και να επανέλθει στη σταθερή κατάσταση ενέργειας (Tamaki H, Miyake K et al 2009).

Τα άτομα/μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες, και συμμετέχουν σε οξειδαναγωγικές αντιδράσεις με γειτονικά μόρια, με σκοπό να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο και να αποκαταστήσουν την κατάσταση χαμηλής ενέργειας. Σαν αποτέλεσμα, μπορούν να επηρεαστούν αρνητικά τα γειτονικά μόρια και η ανισορροπία αυτή να επάγει μια αλυσιδωτή αντίδραση, καθώς η ελεύθερη ρίζα αναπληρώνει το ηλεκτρόνιο που είχε χάσει και εξουδετερώνεται αλλά το γειτονικό της μόριο εμφανίζει έλλειμα ηλεκτρονίων κοκ (Trombly G, Said AM et al 2023). Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσιολογικά προϊόντα του κυττάρου και ανάλογα με τη συγκέντρωση, στην οποία βρίσκονται αλλά και τον ρυθμό παραγωγής τους μπορούν να έχουν είτε θετική είτε αρνητική επίδραση.

Όλες αυτές οι ενώσεις που περιέχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι πιο σημαντικές που συναντάμε είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$),
- η ρίζα υδροξυλίου ($OH \bullet$)
- η ρίζα περοξυλίου ($ROO \bullet$)
- το μοριακό οξυγόνο O_2
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

(Με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με πλην συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας) (Aquil et al 2012).

Δραστική μορφή, η οποία είναι σημαντική προς αναφορά αλλά δεν περιέχει οξυγόνο ως κεντρικό άτομο, είναι οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), όπως για παράδειγμα το μονοξειδίο του αζώτου NO (Sengupta et al., 2004).

Ενδογενείς πηγές παραγωγής

Ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών γίνεται συνεχώς ενδογενώς στα κύτταρα ως αποτέλεσμα ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων. Στις ενζυμικές αντιδράσεις, οι οποίες αποτελούν μια τέτοια πηγή, περιλαμβάνονται οι διαδικασίες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές ROS στον άνθρωπο, καθώς υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μιτοχόνδρια μετατρέπουν περίπου το 5% του οξυγόνου που καταναλώνουν σε ιόν υπεροξειδίου και μετά σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Valko, M., et al., 2007).

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί εξίσου σημαντική πηγή ROS, καθώς τα κύτταρα που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια-εισβολείς. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα προκαλούν μια αύξηση στην πρόσληψη οξυγόνου, η οποία δίνει γένεση σε πλήθος ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το ανιόν υπεροξειδίου και το οξείδιο του αζώτου (Pani and Galeotti, 2010).

Εξωγενείς πηγές παραγωγής

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν επίσης από την έκθεση σε ατμοσφαιρική ρύπανση, από το κάπνισμα, και από την χρόνια κατανάλωση αλκοόλ. Επιπλέον, αίτιο σχηματισμού τους μπορεί να είναι η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, σε συγκεκριμένα φάρμακα, όπως τα αντιβιοτικά, αλλά και μέσω της ιονίζουσας ακτινοβολίας και τέλος μέσω της διατροφής, όπως για παράδειγμα από την κατανάλωση ψητών κρεάτων και ήδη χρησιμοποιημένων μαγειρικών ελαίων.

2.2.1 Θετικές επιδράσεις των ROS

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι απαραίτητες για την ωρίμανση κυτταρικών δομών που μπορούν να δράσουν ως άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος. Για παράδειγμα, τα ουδετερόφιλα του ανοσοποιητικού συστήματος απελευθερώνουν ROS για να εξουδετερώσουν παθογόνα μικρόβια (Pham-Huy LA, He H. et al 2008).

Ένας άλλος ωφέλιμος ρόλος των ROS είναι η συμμετοχή τους στη μεταγωγή σήματος όταν αυτές βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι σκελετικοί μύες, όταν συσπώνται κατά τη διάρκεια

οξείας άσκησης, απελευθερώνουν το O₂- καθώς και NO. Αυτά, με τη σειρά τους μετά το πέρας της άσκησης, μπορούν να ενεργοποιήσουν παράγοντες όπως ο πυρηνικός υποδοχέας PGC-1, που συμμετέχει στην βιογένεση μιτοχονδρίων (Wagner K.H., 2015).

2.2.2 Αρνητικές επιδράσεις των ROS

Όταν παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, οι ελεύθερες ρίζες και τα οξειδωτικά μόρια μπορούν να προκαλέσουν ένα φαινόμενο που ονομάζεται οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση που μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες σε δομές όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, ακόμα και στο DNA.

Ο όρος οξειδωτικό στρες διατυπώθηκε πρώτη φορά ως «ο ανταγωνισμός των οξειδωτικών ουσιών και των αντιοξειδωτικών με υπεροχή των πρώτων, και άρα διατάραξη της ισορροπίας τους» (Sies H., 1985). Το οξειδωτικό στρες μπορεί λοιπόν να επάγει μια οξειδοαναγωγική ανισορροπία στο κύτταρο, και συσσώρευση ROS, ενώ αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών παθογενειών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των αρνητικών επιπτώσεων του οξειδωτικού στρες αποτελεί η λιπιδική υπεροξειδωση. Συγκεκριμένα, η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να αντιδράσει με λιπίδια και να προκαλέσει βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες και σε λιποπρωτεΐνες, με τελικό προϊόν την μαλονιαλδεΐδη (MDA), ένα τοξικό προϊόν. Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελεί μια αλυσιδωτή διαδικασία, δηλαδή όταν ξεκινήσει ο σχηματισμός του προϊόντος, επιμηκύνεται ταχέως και μπορεί δυνητικά να προκαλέσει βλάβη σε έναν σημαντικό αριθμό λιπιδικών μορίων. Τέτοιες ανισορροπίες μέσα στο κύτταρο μπορούν να οδηγήσουν τελικά στον κυτταρικό θάνατο καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε ρήξη κυτταρικών οργανιδίων (Kobi JBBS, Matias A.M. et al., 2023).

3.1 Αντιοξειδωτικά

Ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια ένωση, η οποία σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να εμποδίζει ή να καθυστερεί την οξείδωση των βιομορίων (Vaya J, Aviram M. 2001).

Αυτές οι ουσίες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση είτε αντιδρώντας με τα ROS, είτε εμποδίζοντας την παραγωγή των ROS. Ο όρος αντιοξειδωτικά ωστόσο, αποτελεί μια υπεραπλούστευση καθώς τα διάφορα είδη αντιοξειδωτικών όπως για παράδειγμα οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες κα, αποτελούνται από οικογένειες μορίων που έχουν διαφορετική δραστικότητα, διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα και διαφορετικό «dose dependence».

Ένα καλό αντιοξειδωτικό θα πρέπει να εξουδετερώνει ειδικώς τις ελεύθερες ρίζες, να αντιδρά και να αναγεννά άλλα αντιοξειδωτικά μέσα στον οργανισμό, να έχει ένα θετικό αντίκτυπο στην έκφραση των γονιδίων, να μπορεί να απορροφάται επαρκώς, να έχει μια ικανοποιητική συγκέντρωση τόσο στους ιστούς όσο και στα βιολογικά υγρά και τέλος, να λειτουργεί τόσο σε υδατικά διαλύματα του κυττάρου όσο και στις μεμβρανικές δομές (Pham-Huy LA, He H. et al 2008).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατανεμηθούν σε δύο διακριτές κατηγορίες: στα ενδογενή και στα εξωγενή.

3.2.1 Ενδογενή Αντιοξειδωτικά

Στην κατηγορία των ενδογενών αντιοξειδωτικών βρίσκονται προϊόντα του μεταβολισμού και μπορεί να είναι ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ένα από τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά που αποτελούν και την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και νερό. Άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά είναι η καταλάση (CAT), και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Αυτά τα ένζυμα μπορούν να εξουδετερώσουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου και να το μετατρέψουν σε νερό και οξυγόνο. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συντίθεται από τον οργανισμό και η αυξημένη παραγωγή τους είναι στενά συνδεδεμένη με τη χρόνια έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες. Χαρακτηριστικά μη ενζυμικά ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι η τρανσφερίνη, η φερριτίνη και η αλβουμίνη (Joye K, Ash S. et al 2004). Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να αναστείλουν τον σχηματισμό νέων δραστικών μορφών μέσω της δέσμευσης σε μεταλλικά ιόντα. Σε αντίθεση με άλλα σπονδυλωτά, ο άνθρωπος δεν έχει την ικανότητα να συνθέτει αντιοξειδωτικές βιταμίνες. Για αυτό το λόγο κάποια μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά πρέπει να προσλαμβάνονται από τη διατροφή.

3.2.2 Εξωγενή Αντιοξειδωτικά

Σημαντικά εξωγενή αντιοξειδωτικά, είναι οι βιταμίνες και οι προβιταμίνες (βιταμίνη E, β-καροτένιο), τα φλαβονοειδή και πολυφαινόλες, οι θειόλες (πχ. γλουταθειόνη), και άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια. Αυτές οι ουσίες μπορούν είτε να εμποδίσουν την παραγωγή ROS, είτε να προσβάλουν τις ρίζες και να τις εξουδετερώσουν. Επιπλέον, μπορούν να εμποδίσουν την μετατροπή ριζών σε πιο δραστικές μορφές, όπως το O_2^- σε $HO\cdot$. Αυτά τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται και στις δύο πλευρές των μεμβρανών, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις που οδηγούν στην ελαχιστοποίηση του οξειδωτικού στρες (Bouayed J, Bohn T et al 2010).

Παρά την παρουσία του αντιοξειδωτικού συστήματος του κυττάρου, οξειδωτική βλάβη (στρες) είναι δυνατόν να συσσωρευτεί κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και το DNA, τα λιπίδια, και οι πρωτεΐνες να υφίστανται βλάβη που μπορεί να οφείλεται στις ελεύθερες ρίζες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία όπως ο καρκίνος, η αρθρίτιδα κα. Μάλιστα, οξειδωτική βλάβη είναι δυνατόν να προκύψει και λόγω βλάβης των προστατευτικών μηχανισμών του κυττάρου, δηλαδή διατάραξη της επιθυμητής ισορροπίας των αντιοξειδωτικών συστημάτων, που επικρατεί στον οργανισμό.

3.3 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες κέντρισαν την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας των πιθανών ευεργετικών ιδιοτήτων τους, καθώς έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα μόριο υδρογόνου. (Dew T.P, et al., 2005). Μετά από αυτή την αντίδραση το αντιοξειδωτικό μόριο μετατρέπεται το ίδιο σε ρίζα, η οποία έχει πολύ μεγαλύτερη σταθερότητα από ότι η αρχική. Αυτή η δομή δίνει τη δυνατότητα στο μονήρες ηλεκτρόνιο που έχει προκύψει να μετακινείται από άτομο σε άτομο στη δομή του βενζολίου, γεγονός που καθιστά τη ρίζα της φαινολικής ένωσης εξαιρετικά σταθερή. Συμπερασματικά, οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να εξουδετερώσουν την οξειδωτική δράση των ενεργών μορφών οξυγόνου. Επιπλέον μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες (βασικό παράδειγμα η αναγέννηση της βιταμίνης E), αναστέλλοντας επίσης την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και

αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Ωστόσο, επειδή πολύ απλά, κατά την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες (αλλά λιγότερο δραστικές), σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορούν να αποτελέσουν προ-οξειδωτικό παράγοντα, αποδεικνύοντας έτσι της δοσο-εξαρτώμενη δράση τους.

Το βασικό μονομερές των πολυφαινολών, όπως αναφέρθηκε είναι ο φαινολικός δακτύλιος. Ανάλογα με την σταθερότητα του φαινολικού δακτυλίου οι πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται σε πολλές τάξεις (Crozier A, Jaganath I. et al 2007).

3.3.1 Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι κύριες τάξεις των πολυφαινολών είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, οι φαινολικές αλκοόλες και οι λιγνίνες. Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που αποτελούνται από δεκαπέντε άνθρακες, με δυο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με μια γέφυρα τριών ανθράκων. Αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα των φαινολικών ενώσεων, και βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην επιδερμίδα των φύλλων, και στη φλούδα των φρούτων. Κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες, ισοφλαβόνες, φλαβονόνες, και σε ανθοκυανιδίνες ανάλογα με τον αριθμό των υδροξυλίων πάνω στο μόριο, καθώς και τον αριθμό και το είδος άλλων υποκαταστατών (Del Rio D, Rodriguez-Mateos A. et al. 2012).

Οι πολυφαινόλες εξαρτώνται από την βιοδιαθεσιμότητά τους για να εκφράσουν τις βιολογικές τους ιδιότητες. Η ταχύτητα απορρόφησης τους από το έντερο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την χημική δομή τους. Με ένα προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα και στα ούρα μπορούμε να εκτιμήσουμε την ποσότητα που εν τέλει έχει απορροφηθεί. Επιπλέον, όταν δεν απορροφώνται από το λεπτό έντερο, οι πολυφαινόλες περνάνε στο παχύ έντερο όπου μπορούν να δράσουν στο εντερικό μικροβίωμα. Εκεί, αρχικά υφίστανται τροποποίηση σε μια πιο βιοδιαθέσιμη ένωση, και στη συνέχεια επιδρούν στην μικροβιακή κοινότητα του εντέρου

αναστέλλοντας έτσι τα παθογόνα βακτήρια και επωφελώντας αυτά που είναι χρήσιμα για τον οργανισμό (Munawar A, Farhan S. et al. 2017).

3.4 Πολυφαινόλες της ελιάς

Η φαινολική σύσταση των διάφορων ποικιλιών ελιάς είναι ετερογενής, με τουλάχιστον 36 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις να απαντώνται στον ελαιόκαρπο. Η συγκέντρωση των διάφορων φαινολικών ενώσεων που θα προκύψουν σε μια σοδειά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ποικιλία, η περιοχή στην οποία καλλιεργείται το ελαιόδεντρο, οι γεωργικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, και ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού κατά τη συγκομιδή. Οι πιο σημαντικές φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στον καρπό της ελιάς είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες όπως η 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη), και π-υδροξυφαινυλαιθανόλη (τυροσόλη), τα φλαβονοειδή όπως η λουτεολίνη--7-*O*-γλυκοσίδη, η ρουτίνη, η απιγενίνη-7-*O*-γλυκοσίδη, αλλά και τα σεκοιριδοειδή όπως η ελευρωπαΐνη και λιγουστροσίδη (Amira A., Dhouha K. et al. 2009). Φυτικές πολυφαινόλες μπορούμε να παραλάβουμε από τα φύλλα, από τον καρπό, από τους σπόρους, αλλά και από τα προϊόντα ολικής αλέσεως.

Οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν χαρακτηριστεί από ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων και μπορούν να έχουν θετικές επιδράσεις στην έκβαση φάσματος ανθρώπινων ασθενειών όπως ο καρκίνος, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, παρεμβαίνοντας στους μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Rocha J, Borges N. et al 2020).

3.5 Σύνθεση πολυφαινολών

Οι περισσότερες πολυφαινόλες συντίθενται από τα φαινυλοπροπανοειδή, ενώσεις που προέρχονται από αρωματικά αμινοξέα στη φύση. Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν ένα βενζυλικό κατάλοιπο συνδεδεμένο με μια προπυλική αλυσίδα, και ως δομική μονάδα χρησιμοποιούνται τα αμινοξέα L-φαινυλαλανίνη και L-τυροσίνη. Το πρώτο βήμα για το σχηματισμό τους είναι η απαμίνωση. Στη συνέχεια, τα φαινυλοπροπανοειδή προϊόντα μετασχηματίζονται στους αντίστοιχους CoA-θειοεστέρες. Οι περισσότερο άφθονες ομάδες πολυφαινολικών ενώσεων, τα στυλβένια και τα φλαβονοειδή, παράγονται από φαινυλοπροπανοειδείς CoA-θειοεστέρες μέσω της ενζυμικής δραστηριότητα των συνθασών του στυλβενίου (Pereira DM., Valentão P. et al. 2009).

Τρία τμήματα του ελαιόδεντρου είναι πλούσια σε πολυφαινόλες: ο καρπός της ελιάς, τα φύλλα, και τα άνθη της . Τα φύλλα του ελαιόδενδρου περιέχουν σημαντικές πολυφαινόλες, όπως η ολευροπεΐνη, η υδροξυτυροσόλη, η βερμπασκοσίδη και η λουτεολίνη (Aurelia N, D'Oracio C. et al., 2009). Ο καρπός της ελιάς περιέχει μια μεγάλη ποικιλία πολυφαινολών. Οι ωφέλιμες βιολογικές επιδράσεις του ελαιόκαρπου μπορεί να σχετίζονται λοιπόν και με την φαινολική σύστασή τους.

Επιπλέον, τα άνθη της ελιάς έχουν τραβήξει την προσοχή λόγω της επίσης σημαντικής περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες, ενώ χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα για φαρμακευτικούς σκοπούς στην παραγωγή εκχυλισμάτων, τσαγιών και αρωμάτων (Goulas V, Exarchou V. et al 2009)

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιόκαρπου είναι η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, η ρουτίνη), οι ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα, και η βερμπασκοσίδη. Τα τριτερπενικά οξέα είναι η κύρια μη φαινολική ένωση που συναντάται στις επιτραπέζιες ελιές, και ιδιαίτερα το μασλινικό και το ολεανολικό οξύ (Ana F. V, Federico F. et al., 2005).

4.1 Επεξεργασία ελαιόκαρπου

Ιδανικά, η παραγωγή του ελαιόλαδου θα πρέπει να ακολουθεί αμέσως μετά την συγκομιδή. Εφόσον όμως αυτό είναι μη πρακτικό, οι ελιές θα πρέπει να αποθηκεύονται για ένα χρονικό διάστημα πριν υποστούν επεξεργασία. Κατά την αποθήκευση, μπορεί να προκύψουν συγκεκριμένες χημικές και βιοχημικές διεργασίες που μπορούν να οδηγήσουν στην υποβάθμιση

της ποιότητας του καρπού, και κατ' επέκταση του τελικού προϊόντος. Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω της δράσης ενζυμικών διεργασιών που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση. Για αυτό το σκοπό, οι ελαιόκαρποι αρχικά αποθηκεύονται σε σκιερούς χώρους με χαμηλή θερμοκρασία (Dos Santos VR, Goncalves V, et al 2022).

4.2 Παραγωγή ελαιόλαδου

Για την παραγωγή του ελαιόλαδου πρέπει πρώτα οι ελιές να αλεσθούν και να συνθλιθούν. Στη συνέχεια, η πάστα που προκύπτει τοποθετείται σε ένα κομμάτι ύφασμα και υφίσταται υδραυλική πίεση. Εκεί διαχωρίζεται το νερό από το έλαιο. Παρόλα αυτά για να διαχωριστεί στην υδατική φάση, στην ελαιώδη φάση, και στα στερεά κατάλοιπα, πρέπει να υποστεί διήθηση και φυγοκέντρηση με συγκεκριμένα πρωτόκολλα (Leontopoulos S, Skenderidis P et al 2020).

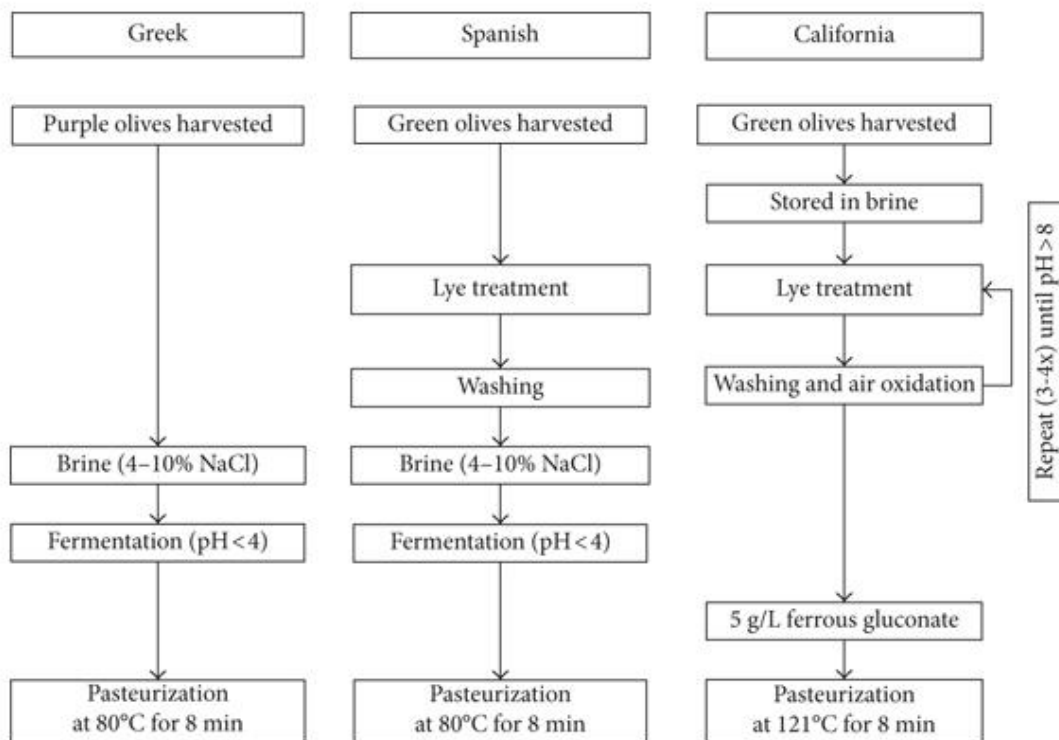
Τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα εφαρμόζονται σε χώρες όπως η Ισπανία, όπου εκτός από την συμβατική τεχνική φυγοκέντρηση δύο φάσεων, έχει εμφανιστεί και η τεχνική της φυγοκέντρησης τριών φάσεων. Σε αυτή, η ελαιώδης φάση, η υδατική φάση, και η στερεή φάση της ελιάς διαχωρίζονται σε μια συνεχή διαδικασία, σε αντίθεση με την σύνθλιψη των καρπών, η οποία χωρίζει την ελαιόπαστα σε δύο φάσεις και είναι μια ασυνεχής διαδικασία. Ένα μικρό ποσοστό πολυφαινόλων διαλύεται στην ελαιώδη φάση (περίπου 1-2% σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που βρίσκονται στον αρχικό καρπό) εφόσον το νερό είναι καλύτερος διαλύτης για αυτές τις ουσίες. Το κύριο μειονέκτημα της τριφασικής φυγοκέντρησης είναι ότι οδηγεί σε παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων ελαιοτριβείου, ένα προϊόν το οποίο αποτελείται από την υδατική φάση σε συνδυασμό με το νερό που χρησιμοποιήθηκε για τα διάφορα βήματα της παραγωγής του ελαίου. Ωστόσο, αυτό το απόβλητο είναι αρκετά πλούσιο σε πολυφαινόλες, καθώς το ποσοστό που δεν διαλύεται στην υδατική φάση αποβάλλεται στα υγρά απόβλητα (περίπου 53%) (Albuquerque A, Gonzalez J. et al 2004).

4.3 Παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς

Η κύρια φαινολική ένωση που περιέχουν οι ελαιόκαρποι ακριβώς μετά τη συγκομιδή είναι η ελευρωπαΐνη, υπεύθυνη και για την πικρή γεύση τους, η οποία με ειδικές διεργασίες ξεπικρίσματος απομακρύνεται (σε ποσοστό 80%) κατά την παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς με σκοπό να την κάνει πιο εύγευστη. Η διαδικασία αφαίρεσης της πικρής γεύσης καθορίζει σημαντικά την ποσοτική και ποιοτική σύσταση της σε βιοφαινόλες του τελικού προϊόντος (Ramirez E, Garcia P. et al 2013).

Υπάρχουν 3 διαδεδομένοι τύποι απομάκρυνσης της πικρής γεύσης από την ελιά: (1) ο ισπανικός τύπος, δηλαδή οι κατεργασμένες πράσινες ελιές, (2) οι ελιές που σκουραίνουν λόγω οξειδωσης, μια τεχνική που χρησιμοποιείται στην Καλιφόρνια και τέλος, (3) ο ελληνικός τύπος, δηλαδή φυσικές μαύρες ελιές. Όταν οι ελιές είναι ακόμα πράσινες περιέχουν πολύ υψηλά επίπεδα χλωροφύλλης και καροτενοειδών. Κατά την ωρίμανση, όταν ο ελαιόκαρπος αρχίζει να αλλάζει χρώμα, τα επίπεδα αυτά της χλωροφύλλης μειώνονται. Τέλος, κατά το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης, δηλαδή όταν οι ελιές αποκτήσουν το μωβ προς μαύρο χρώμα, σχηματίζονται μια σειρά μονομερών ανθοκυανινών. Χαρακτηριστικές ανθοκυανίνες της ώριμης ελιάς είναι η κυανιδιν-3-O-ρουτινοσίδη και η κυανινδο-3-O-γλυκοσίδη. Σε αυτό το στάδιο, η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή πλέον δεν επηρεάζουν το χρώμα του καρπού.

Κατά την Ελληνική διαδικασία ξεπικρίσματος, πολύ ώριμοι καρποί (χρώματος μωβ προς μαύρου) τοποθετούνται σε ένα διάλυμα άλατος (8-10% NaCl) όπου οι φαινολικές ενώσεις που ευθύνονται για την πικρή γεύση διαχέονται από τον καρπό. Η ελευρωπαΐνη υδρολύεται μέσω των β-γλυκοσιδασών και εστερασών κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας από το μικροβίωμα που βρίσκεται στο διάλυμα και στην επιφάνεια του καρπού. Ανάλογα με τη μέθοδο ξεπικρίσματος μπορεί να παραχθεί ένα διαφορετικό προϊόν επιτραπέζιας ελιάς με μοναδικό χημικό και μικροβιακό προφίλ. Από σύγκριση επιτραπέζιων ελιών χρησιμοποιώντας τις τρεις διαφορετικές μεθόδους, έχει παρατηρηθεί ότι οι Ελληνικές ελιές έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, άρα και μεγαλύτερη διατροφική αξία (Johnson R, Mitchell A. et al., 2018).



Εικόνα 4: Οι τρεις μέθοδοι ξεπικρίσματος της ελιάς. Ελληνική μέθοδος, Ισπανική μέθοδος, μέθοδος της Καλιφόρνια (Johnson R, Mitchell A. et al 2018)

Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη δειγμάτων ελαιόκαρπου από διαφορετικές περιοχές του ελαιώνα της Νοτιοδυτικής Μαγνησίας, με σκοπό την διερεύνηση της βιοδραστικότητας κάθε περιοχής και της πιστοποίησης της υψηλής ποιότητας του καρπού των συγκεκριμένων ελαιόδεντρων προς όφελος των παραγωγών, καθώς και της περιοχής. Για τον προσδιορισμό της βιοδραστικότητας χρησιμοποιήθηκαν τρεις τεχνικές. Αρχικά έγινε προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Στη συνέχεια ελέγχεται η αναγωγική ισχύς των δειγμάτων μέσω της αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή (Fe^{3+} σε Fe^{2+}). Τέλος, προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων δειγμάτων μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Χρησιμοποιήθηκαν: διάλυμα DPPH 2mM (Alfa Aesar, USA), ασκορβικό οξύ (Karochem, UK), Iron (III) chloride (Sigma – Aldrich, USA), Sodium carbonate (Riedel de Haen, Germany), di-Sodium hydrogen phosphate – 2 H₂O (Serva, Germany), Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Merck, Germany), Potassium Ferricyanide (Applichem, Germany), Methanol (Riedel de Haen, Germany), αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu (Sigma – Aldrich, USA)

Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά, έγινε προετοιμασία των ελαιόκαρπων. Αρχικά έγινε διαχωρισμός του ελαιόκαρπου από τον πυρήνα του. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των καρπών και φυγοκέντρησή τους στα 15.000g για 20min στους 4°C. Από τις φάσεις, που προέκυψαν μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, απομονώθηκε η προς μελέτη φάση, δηλαδή η υδατική φάση και οι υπόλοιπες πετάχτηκαν. Ακολούθησε άλλη μία φυγοκέντρωση στα 15.000g για 10min στους 4°C στην υδατική φάση, και φύλαξη στους -20 °C μέχρι την εξέταση.

1.2 Μέθοδοι

1.2.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων βασίζεται στην εξουδετέρωση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο από τα αντιοξειδωτικά μόρια που δυνητικά περιέχονται στο προς εξέταση εκχύλισμα. Η ρίζα DPPH εξουδετερώνεται είτε με την πρόσληψη ηλεκτρονίου, είτε με την πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Έχει ένα βαθύ μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν αλληλεπιδράσει με μια χημική ουσία που έχει αντιοξειδωτική δράση, το DPPH ανάγεται και

μετατρέπεται στην ένωση 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Όταν το αντιδραστήριο ανάγεται παρατηρείται χρωματική μεταβολή από μωβ σε κίτρινο. Η μεταβολή είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας. Σαν αποτέλεσμα, έχουμε μεταβολή στην απορρόφηση κατά τη φωτομέτρηση.

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, προστέθηκε σε πλαστικά σωληνάκια erpendorf των 1,5 mL 50μl από το εκχύλισμα προς εξέταση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το τυφλό περιείχε μόνο τη μεθανόλη σε όγκο 1000μL. Ο τελικός όγκο αντίδρασης ήταν 1mL. Ο θετικός μάρτυρας περιείχε 950 μL μεθανόλης και 50μL από τη ρίζα DPPH, ενώ για το εξεταζόμενο δείγμα παρασκευάστηκαν σωληνάκια erpendorf που περιείχαν 50μL δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, 900μL από την μεθανόλη και 50μL DPPH. Τέλος, ο αρνητικός μάρτυρας περιείχε 950μL μεθανόλη και 50 μL από το εκχύλισμα. Μετά από καλή ανάδευση με vortex, και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 λεπτά, έγινε φωτομέτρηση με την συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1mL, στα 517 nm.. Μετά τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου με το τυφλό προσδιορίστηκε η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις διπλούν, και ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ.

Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε δείγματος εκτιμήθηκε ως το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH. Ο τύπος, με τον οποίο υπολογίζεται είναι ο εξής:

$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} * 100$$

όπου RSC = radical scavenging capacity.

Τελικά, έγινε προσδιορισμός του δείκτη IC₅₀, δηλαδή υπολογίστηκε η συγκέντρωση δείγματος, που είναι αναγκαία για την αναστολή της ρίζας DPPH σε ποσοστό 50%. Η τιμή IC₅₀ είναι αντιστρόφως ανάλογη με αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

1.2.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος με την δοκιμασία Reducing Power

Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας είναι συνδεδεμένη με την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Αναγωγικές ενώσεις, δηλαδή δότες ηλεκτρονίων, έχουν την ικανότητα να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Με αυτόν τον τρόπο δρουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η συγκεκριμένη δοκιμασία περιλαμβάνει την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου Fe^{3+} σε δισθενή Fe^{2+} . Όταν το προϊόν, δηλαδή ο δισθενής σίδηρος αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο, δίνει ένα σύμπλοκο, το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση στα 700nm. Όσο πιο ισχυρή είναι η αναγωγική ουσία, τόσο πιο μεγάλη είναι η μεταβολή του χρώματος από κίτρινο σε πράσινο που παρατηρείται, δηλαδή η απορρόφηση είναι ανάλογη με την αναγωγική δύναμη.

Πειραματική Διαδικασία

Σε πλαστικά σωληνάκια erpendorf των 1,5 mL παρασκευάστηκε ένα τυφλό, το δείγμα προς μελέτη, ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας. Στο τυφλό προστέθηκαν 500mL από το διάλυμα φωσφορικών ιόντων (buffer), ενώ στο θετικό μάρτυρα προστέθηκαν 250μL από το buffer και 250 mL από το σιδηροκυανιούχο κάλιο. Στο δείγμα προστέθηκαν 50μL από το προς εξέταση δείγμα, 200μL από το buffer και 250μl από το σιδηροκυανιούχο κάλιο. Τέλος, το αρνητικό control περιείχε ίδια ποσότητα εκχυλίσματος (50μL) και 450μL από το buffer.

Μετά από μια καλή ανάδευση με vortex πραγματοποιήθηκε επώαση σε θερμική πλάκα, η οποία είχε ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 50°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια 250μL TCA προστέθηκαν σε όλους τους σωλήνες και έγινε φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για διάρκεια 10 λεπτών. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, έγινε συλλογή του υπερκείμενου και τοποθετήθηκε σε καθαρούς σωλήνες erpedorf, όπου έγινε προσθήκη 250μL απιονισμένο νερό και 50μL του χλωριούχου σιδήρου. Τέλος ακολούθησε επώαση 10 λεπτών σε σκοτεινό μέρος και φασματοφωτομέτρηση στα 700nm (Nayan R. et al 2013). Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ.

Υπολογισμός αναγωγικής δύναμης

Η αναγωγική ικανότητα του κάθε δείγματος υπολογίζεται από τη διαφορά μεταξύ απορρόφησης ουσίας και απορρόφησης control. Πιο αναλυτικά, υπολογίστηκε μέσω του τύπου:

AU 0,5= απορρόφηση ουσίας -απορρόφηση control

όπου AU = absorbance unit, δηλαδή η συγκέντρωση του δείγματος, στην οποία προκαλείται απορρόφηση 0,5.

1.2.3 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu

Η τεχνική αυτή βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση, και με αυτή εκτιμάται το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ενός εκχυλίσματος. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το Folin-Ciocalteu. Είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων αποτελούμενο από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Έχει την ικανότητα οξείδωσης φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$), ($H_2P_2Mo_{18}O_6^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$), παράγοντας ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης με μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 765 nm.

Πειραματική Διαδικασία

Σε πλαστικά σωληνάκια erpendorf των 2mL παρασκευάστηκε ένα τυφλό, το προς μελέτη δείγμα και ένας αρνητικός μάρτυρας. Για το τυφλό έγινε προσθήκη απεσταγμένου νερού 1020 μ L και 100 μ L από το αντιδραστήριο. Για τις διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε 1mL απεσταγμένο νερό, 100 μ L αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, και 20 μ L από το προς μελέτη δείγμα, και στον αρνητικό μάρτυρα προστέθηκε απεσταγμένο νερό 1100 μ L. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης σε κάθε σωληνάκι προστέθηκαν 280 μ l Na_2CO_3 (25% w/v) και 600 μ l απιονισμένο νερό, και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765nm. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίστηκε με το blank, και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

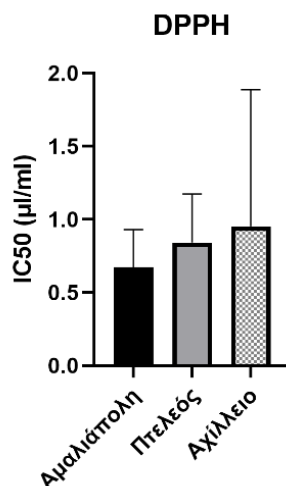
Για να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος, η οποία κατασκευάζεται με μια σειρά συγκεντρώσεων του οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/ml εκχυλίσματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των ελαιόκαρπων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH

Συνολικά μετρήθηκαν 49 δείγματα ελαιόκαρπων του ΝΔ Αλμυρού. Οι περιοχές από τις οποίες έγινε συλλογή των δειγμάτων ελαιόκαρπου ήταν η Αμαλιάπολη (9 δείγματα), ο Πτελεός (18 δείγματα) και το Αχίλλειο (6 δείγματα). Η αντιοξειδωτική τους δράση προσδιορίστηκε σε μια σειρά συγκεντρώσεων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως τα υδατικά εκχυλίσματα ελαιόκαρπου μείωσαν με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο την απορρόφηση στα 517nm, στη μέθοδο DPPH (Διάγραμμα 1).

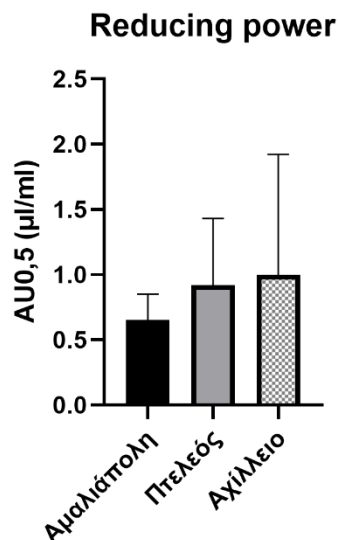
Μεγαλύτερη αναστολή της ρίζας DPPH παρουσίασαν τα δείγματα του ελαιώνα της Αμαλιάπολης, στη συνέχεια του ελαιώνα του Πτελεού και στη συνέχεια του Αχιλλείου, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιοχών ($p=0.2402$).



Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH για τα δείγματα ελαιόκαρπου της ΝΔ Μαγνησίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SD

1.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας με την μέθοδο Reducing Power Assay

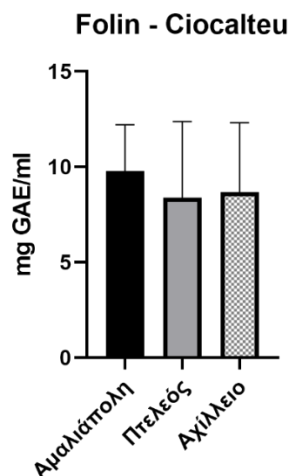
Στα δείγματα έγινε επιπλέον και προσδιορισμός της αναγωγικής ικανότητας, εφόσον αυτή σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το εύρος τιμών για τη μέθοδο Reducing power ήταν από 0,65 μ l/ml έως 0,99 μ l/ml (Παράρτημα 1). Την μεγαλύτερη αναγωγική ικανότητα εμφάνισαν και σε αυτή τη μέθοδο τα δείγματα που προέρχονταν από την Αμαλιάπολη, ενώ τα δείγματα από τον Πτελεό και το Αχίλλειο είχαν περίπου παρόμοιες τιμές, με αυτές του Πτελεού να είναι λίγο πιο αυξημένες (Διάγραμμα 3). Ωστόσο, και σε αυτή τη μέθοδο δε παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0.3936$).



Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα μεθόδου Reducing Power για τα δείγματα ελαιόκαρπου της ΝΔ Μαγνησίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SD.

1.3 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin – Ciocalteu

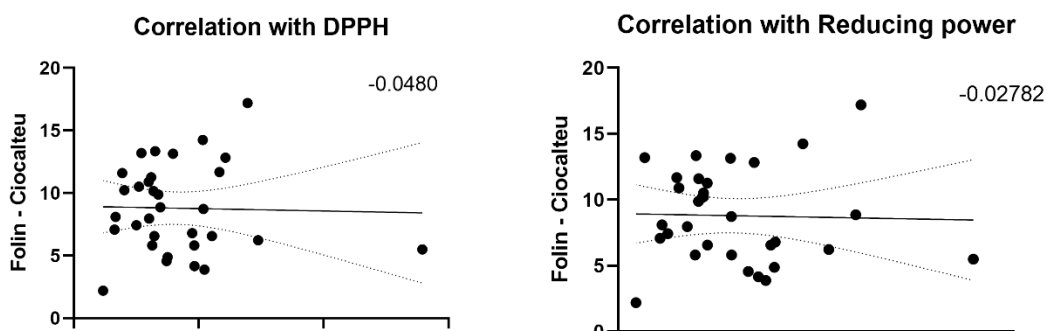
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (Total Polyphenolic Content) των δειγμάτων ελαιόκαρπου, με την βοήθεια της μεθόδου Folin – Ciocalteu. Το εύρος τιμών ήταν από 8,37 mg GAE/ml έως 9,78 GAE/ml (Παράρτημα 1). Μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών παρουσίασαν τα δείγματα των ελαιώνων της Αμαλιάπολης, χωρίς να έχουν μεγάλη διαφορά από αυτά του Πτελεού και του Αχιλλείου, και χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0.6587$) (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα μεθόδου Folin – Ciocalteu για τα δείγματα ελαιόκαρπου της ΝΔ Μαγνησίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\pm SD$.

2.1 Σύγκριση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ελαιόκαρπων με τις *in vitro* αντιοξειδωτικές μεθόδους

Σύμφωνα με την συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε (Διάγραμμα 4), είναι εμφανές ότι παρουσιάζεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου αναφορικά με τις δύο τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν, όπως φαίνεται από το συντελεστή συσχέτισης. Συγκριτικά με την μέθοδο DPPH ο συντελεστής συσχέτισης με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο που μετρήθηκε στη μέθοδο Folin-Ciocalteu είναι $-0,048$, ενώ συγκριτικά με την δοκιμασία Reducing Power ο συντελεστής συσχέτισης είναι $-0,02782$.



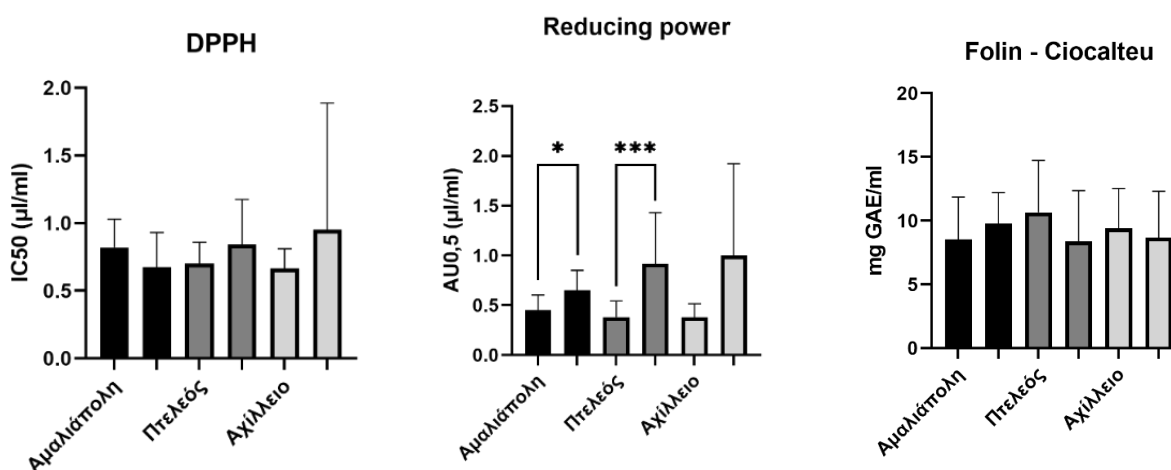
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων ελαιόκαρπου της ΝΔ Μαγνησίας με τις αντιοξειδωτικές μεθόδους DPPH, Reducing power.

2.2 Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου ανά περιοχή μεταξύ των ετών 2021-2022 στις in vitro μεθόδους

Από σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου που πραγματοποιήθηκε για τις περιοχές Αμαλιάπολη, Πτελεός, και Αχίλλειο για τα έτη 2021 και 2022, στη μέθοδο DPPH δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιοχών για τα καλλιεργητικά έτη 2021 και 2022, όπως φαίνεται και από τις τιμές p , οι οποίες είναι $p=0.1613$ για την Αμαλιάπολη, $p=0,999$ για τον Πτελεό και $p=0,9307$ για το Αχίλλειο.

Στην δοκιμασία Reducing power ωστόσο, έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα δύο καλλιεργητικά έτη, καθώς η τιμή p για την Αμαλιάπολη είναι 0,0172, για τον Πτελεό είναι 0,0007. Για το Αχίλλειο δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ετών, όπως φαίνεται από την τιμή p που είναι 0,1733.

Τέλος, το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο στην τεχνική Folin – Ciocalteu δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι τιμές p ήταν για την Αμαλιάπολη $p=0,591$, για τον Πτελεό $p=0,1071$ και για το Αχίλλειο $p=0,999$ (Διάγραμμα 5).



2 Διάγραμμα 5. Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας για τα καλλιεργητικά έτη 2021 και 2022. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\pm SD$, και σε όλα τα γραφήματα αριστερά απεικονίζονται οι τιμές για το 2021 και δεξιά για το 2022.

Συγκεντρωτικά, για τη μέθοδο DPPH δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα δύο καλλιεργητικά έτη 2021 και 2022, καθώς η τιμή p value για αυτή τη μέθοδο ήταν $p=0,7671$. Οι διαφορές για τη μέθοδο Reducing power είχαν στατιστική σημαντικότητα καθώς η τιμή p ήταν $p=0,0001$. Τέλος η διαφορά, συγκεντρωτικά, για το συνολικό πουλυφαινόλικό περιεχόμενο σύμφωνα με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu δεν είχε στατιστική σημαντικότητα καθώς η τιμή p value ήταν $p=0,4165$ (Διάγραμμα 6).

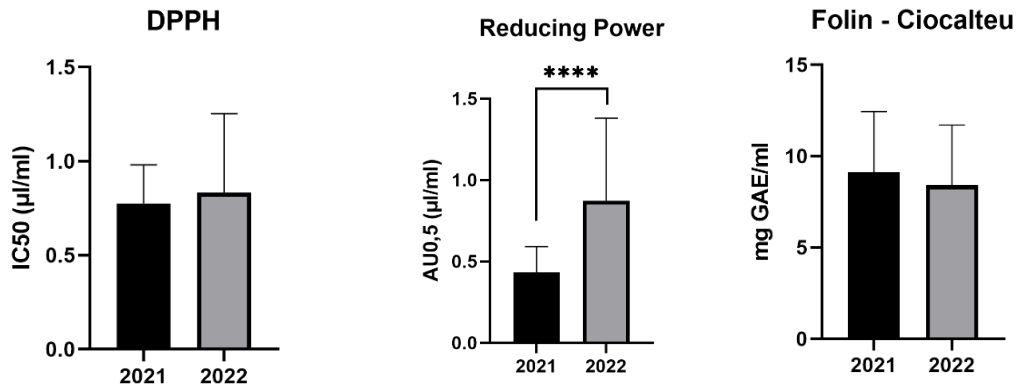


Figure 1 Διάγραμμα 6. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών μεθόδων για δείγματα ελαιόκαρπου περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας για τα έτη 2021 και 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\pm SD$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολυφαινόλες της ελιάς είναι βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες είναι άφθονες στις επιτραπέζιες ελιές και στο ελαιόλαδο. Παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις, κάτι που τις κάνει πολύτιμες στην βελτίωση της ανθρώπινης υγείας, ιδιαίτερα όταν προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Σε αυτό συμβάλει ιδιαίτερα η Μεσογειακή διατροφή, στη βάση της οποίας βρίσκεται η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, αλλά και ελαιόλαδου. Το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες συντελεί στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, δίνοντάς τους την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες που μπορούν να προκύψουν από τη δράση των ελεύθερων ριζών (Delgado-Lista J, Perez-Martinez P. et al 2017).

Στην Ελλάδα υπάρχει ολοένα και μεγαλύτερη ανάγκη πιστοποίησης των ελαιώνων της σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, καθώς τα προϊόντα που παράγουν παρουσιάζουν πολύ υψηλή θρεπτική αξία, γεγονός που αυξάνει τον ανταγωνισμό στην αγορά κυρίως λόγω των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων που παρουσιάζουν τα προϊόντα της ελιάς. Το πρώτο βήμα σε αυτή την κατεύθυνση αποτελεί η επιστημονική τεκμηρίωση και η επιστημονική επαλήθευση αυτής της υπόθεσης με απώτερο σκοπό μια διεθνώς αναγνωρισμένη πιστοποίηση ποιότητας, η οποία θα στρέψει το καταναλωτικό ενδιαφέρον στην κατανάλωση αυτών των προϊόντων, συντελώντας και στην περαιτέρω ανάπτυξη της τοπικής οικονομίας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία, έγινε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων ελαιόκαρπων από διαφορετικές περιοχές της ΝΔ Μαγνησίας για το καλλιεργητικό έτος 2022. Οι ελαιόκαρποι προέρχονταν από τις περιοχές της Αμαλιάπολης, του Πτελεού και του Αχιλλείου.

1.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων ελαιόκαρπου in vitro

Σύμφωνα τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν, τα δείγματα ελαιόκαρπου της χρονιάς 2022 παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, και συγκεκριμένα ικανότητα αναστολής της τεχνητής ρίζας DPPH ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Αυτή η αντιοξειδωτική δράση είναι πιθανόν να οφείλεται στις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχουν οι ελαιόκαρποι. Πράγματι, εφόσον οι πολυφαινόλες της ελιάς έχουν μελετηθεί εκτενώς, και παρουσιάζουν ικανότητα αναστολής και εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, (Delgado-Lista

J, Perez-Martinez P. et al 2017), η παραπάνω υπόθεση βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα. Επιπλέον, σύμφωνα με τη συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε για κάθε αντιοξειδωτική μέθοδο με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων, παρατηρούμε ότι αυτά εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση, δηλαδή όσο αυξάνεται το πολυφαινολικό περιεχόμενο τόσο μειώνονται οι μετρούμενες τιμές IC₅₀. Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή είναι ασθενής, άρα είναι πιθανό ότι η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων οφείλεται όχι τόσο στην ποσότητα των πολυφαινολών που περιέχουν, αλλά στη σύστασή τους και πιθανώς σε μια συνεργιστική δράση μεταξύ των πολυφαινολικών ενώσεων ή ακόμη και με άλλες ουσίες του ελαιόκαρπου. Παρόμοια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί σχετικά με τις πολυφαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου, καθώς ο συνδυασμός συγκεκριμένων πολυφαινολών έχει βρεθεί ότι μπορεί να ρυθμίσει μονοπάτια που σχετίζονται με τη φλεγμονή, αλλά και να αναστέλλει την οξείδωση της LDL χοληστερόλης. (Perez-Jimenez J, Serrano J. et al 2008). Συμπερασματικά, μπορούμε να οδηγηθούμε στην υπόθεση πως κάτι παρόμοιο μπορεί να συμβαίνει και με τις πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στην υδατική φάση του ελαιόκαρπου.

1.2 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων ελαιόκαρπου των περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας για τα έτη 2021-2022

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των *in vitro* μεθόδων σε δείγματα ελαιόκαρπου που προέρχονταν από 2 καλλιεργητικά έτη (2021-2022), ώστε να διερευνηθεί η πιθανή διαφοροποίησή τους στις ίδιες περιοχές.

Για τη μέθοδο DPPH, οι τιμές IC₅₀ των δειγμάτων κυμαίνονται από 0,674 μl/ml έως 0,95 μl/ml για το 2022. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Ωστόσο, συγκριτικά με την πρώτη χρονιά, δηλαδή το 2021, οι τιμές IC₅₀ ήταν πιο υψηλές. Αναφορικά με την μέθοδο Reducing Power, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης χρονιάς, με τις τιμές AU_{0,5} για το 2022 να είναι υψηλότερες σε σχέση με το 2021. Επιπλέον, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια μεταξύ των δειγμάτων σοδειάς των ετών 2021 και 2022 σχετικά με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο με την μέθοδο Folin – Ciocalteau.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παράγοντες όπως οι εδαφοκλιματικές συνθήκες έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν σημαντικά τη σύσταση του τελικού προϊόντος του ελαιόδενδρου. Συγκεκριμένα, εφόσον οι τρεις περιοχές μελέτης δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους σχετικά με το ανάγλυφο, ο παράγοντας που πιθανώς να ευθύνεται για τις παραπάνω διαφορές ανάμεσα στα δύο έτη είναι οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούσαν κάθε χρονιά. Πράγματι, παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η βροχόπτωση μπορούν να καθορίσουν ποιοτική σύσταση του καρπού της ελιάς, επιδρώντας είτε θετικά είτε αρνητικά.

Αναφορικά με την θερμοκρασία, το ελαιόδενδρο μπορεί να προσαρμοστεί σε διαφορετικά κλίματα, ακόμη και σε συνθήκες ξηρασίας, για αυτό το λόγο μάλιστα κατάφερε να καλλιεργηθεί και σε περιοχές μακριά από τη λεκάνη της Μεσογείου. Ωστόσο το ήπιο κλίμα που χαρακτηρίζει τις Μεσογειακές χώρες συμβάλλει στην ευημερία της, και στην παραγωγή καρπών υψηλής διατροφικής αξίας. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με καιρικά δεδομένα του κοντινότερου μετεωρολογικού σταθμού (Βόλος), η μέση θερμοκρασία των ετών 2021 και 2022 δε παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Παρόλα αυτά, τους καλοκαιρινούς μήνες τους 2021 καταγράφηκαν υψηλότερες θερμοκρασίες, με μέσο όρο 41,9°C, σε σχέση με το 2022, που είχε μέση θερμοκρασία 37,5 °C για την ίδια περίοδο (meteosearch). Η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να μεταβάλλει την ανάπτυξη του ελαιόκαρπου και να οδηγήσει σε πιο πρόωμη ωρίμανση, άρα και σε διαφορετική πολυφαινολική σύσταση του τελικού προϊόντος (Mafrica R, Piscopo A. et al 2021).

Επιπλέον, η παροχή νερού, ιδιαίτερα κατά την ωρίμανση και την ανάπτυξη του ελαιόκαρπου συμβάλλει σημαντικά στη διαφοροποίηση της σύστασης του τελικού καρπού. Η διαθεσιμότητα σε νερό μπορεί να επηρεάσει την ωρίμανση του ελαιόκαρπου, καθυστερώντας την έναρξη της περιόδου ωρίμανσης (Gucci R, et al 2009). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως η διαθεσιμότητα του ελαιόδενδρου σε νερό μπορεί να επηρεάσει την πολυφαινολική σύσταση ελαιόλαδων μέσω της μεταβολής βιοσυνθετικών μονοπατιών. Τέλος, η σύσταση του ελαιόκαρπου σε πολυφαινόλες παρουσιάζει μεταβολές κατά τα στάδια της ωρίμανσής του, με τους παραπάνω παράγοντες να παίζουν σημαντικό ρόλο (Ahamad J, Toufeeq I et al 2019).

Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα βροχόπτωσης το 2021, με μέση τιμή 12,6 mm, ενώ για τους ίδιους μήνες του 2022 παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα με μέση τιμή 64,1 mm (meteosearch). Συνεπώς, οι ξηρικές συνθήκες που επικρατούσαν κατά το καλοκαίρι του 2021 θα μπορούσαν πιθανώς να οδηγήσουν σε ιδιαίτερα αυξημένο

πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με το 2022 στα δείγματα, ωστόσο οι τιμές μεταξύ των δύο ετών δε διέφεραν σημαντικά. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των δειγμάτων κάθε περιοχής σε πολυφαινόλες, και στη διαφορετική ποσότητά τους που καθορίζεται από το στάδιο της ωρίμανσης. Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν τα δείγματα πιθανώς δεν οφείλεται στο συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες αλλά σε αλληλεπιδράσεις τους με άλλα συστατικά του καρπού, ακόμα και με τα διαφορετικά χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μέθοδο.

1.3 Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικά βήματα

Τα δείγματα ελαιόκαρπου της περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας για την καλλιεργήσιμη χρονιά 2022 εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση, εξουδετερώνοντας την ρίζα DPPH, ενώ έδειξαν και αναγωγική ικανότητα. Ωστόσο συγκριτικά με την καλλιεργητική χρονιά 2021 υπήρξαν διαφορές στη δραστηρότητα, οι οποίες πιθανώς να οφείλονται στις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες που επικρατούσαν σε αυτά τα δύο έτη. Όπως προαναφέρθηκε, οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να είναι ένα αίτιο που διαφοροποίησε την σύσταση του τελικού προϊόντος.

Ένα επιπλέον βήμα για την περαιτέρω ανάλυση και εξήγηση των αποτελεσμάτων θα ήταν ο προσδιορισμός της ποσοτικής και της ποιοτικής σύστασης των δειγμάτων για να δούμε πως διαφοροποιούνται τα δείγματα, και συγκεκριμένα οι περιοχές, από τις οποίες προήλθαν. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μεθόδους όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Επιπρόσθετα, με την δημιουργία εκχυλισμάτων από τα ήδη υπάρχοντα δείγματα, και από την ευρύτερη περιοχή της ΝΔ Μαγνησίας, και με την χορήγησή τους σε κυτταρικές σειρές ή ακόμα και σε πειραματόζωα σε επόμενο στάδιο, μπορούμε να έχουμε ένα πιο ολοκληρωμένο αποτέλεσμα για το εάν η οξειδωτική δράση έχει σύμφωνα αποτελέσματα και σε επίπεδο *in vivo*.

Αξίζει να σημειωθεί πως η περιοχή του ελαιώνα της ΝΔ Μαγνησίας δεν έχει ξαναμελετηθεί στο παρελθόν, αν και αποτελεί σημαντική ελαιοπαραγωγική περιοχή της Ελλάδας, συνεπώς η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ανάδειξης της δραστηρότητας των προϊόντων της. Άρα, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αποτελούν ένα πρώτο βήμα στην απόδειξη για την υψηλή βιοδραστηρότητα των ελαιώνων της γεωγραφικής περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας, και κατ' επέκταση

της σχετικής πιστοποίησης που θα οδηγήσει και στην υψηλότερη οικονομική απολαβή των παραγωγών.

Βιβλιογραφία

- Wagner KH (2015). Antioxidants in sport nutrition: All the same effectiveness? In *Antioxidants in Sport Nutrition*, ed. Lamprecht M. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 73 3(4), 228-237.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2007). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (November), 1–24.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202–2211.
- Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, Valentao P, Goncalves A, Pereira JA, Oliveira MB, Seabra RM, Andrade PB. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* 2005;89:561–568.
- Riley FR: Olive oil production on bronze age crete: Nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil. *Oxford J Archaeol* 21: 63-75, 2002.
- Kourti, M.; Alvanou, M.V.; Skaperda, Z.; Tekos, F.; Papaefstathiou, G.; Stathopoulos, P.; Kouretas, D. Antioxidant and DNA-Protective Activity of an Extract Originated from Kalamon Olives Debittering. *Antioxidants* 2023, 12, 333. <https://doi.org/10.3390/antiox12020333>
- 9. Lanza B. (2005) Nutritional and Sensory Quality of Table Olives, Olive Germplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy, Innocenzo Muzzalupo. IntechOpen.
- Table olives and health: a review Janete Rocha,1 Nuno Borges,1,2,* and Olívia Pinho1
- Mark Cartwright, “The olive in the ancient mediterranean”, *World History Encyclopedia*, 09 Sep 2016
- Dos Santos VR, Goncalves V, Deng P, Ribeiro AC, Teigao MM, Dias B, Mendes Pinto I, Gallo J, Peng WK. Novel time-domain NMR-based traits for rapid, label-free Olive oils profiling. *NPJ Sci Food.* 2022 Dec 13;6(1):59.

- Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C. et al. Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *J Am Oil Chem Soc* 87, 369–376 (2009).
- Amira Allalout, Dhouha Krichène, Kawther Methenni, Ameni Taamalli, Imen Oueslati, Douja Daoud, Mokhtar Zarrouk, Characterization of virgin olive oil from Super Intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia, *Scientia Horticulturae*, Volume 120, Issue 1, 2009, Pages 77-83, ISSN 0304-4238
- Aurelia N. Sudjana, Carla D’Orazio, Vanessa Ryan, Nooshin Rasool, Justin Ng, Nabilah Islam, Thomas V. Riley, Katherine A. Hammer, Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 33, Issue 5, 2009, Pages 461-463
- S. Leontopoulos, P. Skenderidis, I. K. Vagelas, Potential Use of Polyphenolic Compounds Obtained from Olive Mill Waste Waters on Plant Pathogens and Plant Parasitic Nematodes, *Plant Defence: Biological Control*, 10.1007/978-3-030-51034-3_6, (137-177), (2020).
- Olsson, J.P et al . *The Oxford Handbook of Engineering and Technology in the Classical World*. Oxford University Press (2009)
- Kosma, I., Vavoura, M., Kontakos, S., Karabagias, I., Kontominas, M., Apostolos, K. and Badeka, A. (2016), Characterization and Classification of Extra Virgin Olive Oil from Five Less Well-Known Greek Olive Cultivars. *J Am Oil Chem Soc*, 93: 837-848
- Kosma, I., Badeka, A., Vatavali, K., Kontakos, S. and Kontominas, M. (2016), Differentiation of Greek extra virgin olive oils according to cultivar based on volatile compound analysis and fatty acid composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 118: 849-861
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May 10;18(14):1818-92
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016 Jul 11;21(7):901.

- Rocha J, Borges N, Pinho O. Table olives and health: a review. *J Nutr Sci.* 2020 Dec 2;9:e57. doi: 10.1017/jns.2020.50. PMID: 33354328; PMCID: PMC7737178.
- Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Gerothanassis IP. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol Nutr Food Res.* 2009 May;53(5):600-8. doi: 10.1002/mnfr.200800204. PMID: 19194970.
- Munawar Abbas, Farhan Saeed, Faqir Muhammad Anjum, Muhammad Afzaal, Tabussam Tufail, Muhammad Shakeel Bashir, Adnan Ishtiaq, Shahzad Hussain & Hafiz Ansar Rasul Suleria (2017) Natural polyphenols: An overview, *International Journal of Food Properties*, 20:8, 1689-1699
- Ramírez, E., García-García, P., de Castro, A., Romero, C. and Brenes, M. (2013), Bittering of black dry-salted olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 115: 1319-1324
- Aqil F, Gupta A, Munagala R, Jeyabalan J, Kausar H, Sharma RJ, Singh IP, Gupta RC. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutr Cancer.* 2012 Apr;64(3):428-38
- Tamaki H, Miyake K, Ohashi Y, D-Wave Spin Density Wave phase in the Attractive Hubbard Model with Spin Polarization. *Journal of the Physical Society of Japan* (2009)
- Sengupta P, Sessler DI, Maglinger P, Wells S, Vogt A, Durrani J, Wadhwa A. Endotracheal tube cuff pressure in three hospitals, and the volume required to produce an appropriate cuff pressure. *BMC Anesthesiol.* 2004 Nov 29;4(1):8.
- Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29(2):351-78. doi: 10.1007/s10555-010-9225-4.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4.
- Vaya, J. And Aviram, M. (2001) Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 99-117.
- Kobi JBBS, Matias AM, Gasparini PVF, Torezani-Sales S, Madureira AR, da Silva DS, Correa CR, Garcia JL, Haese D, Nogueira BV, de Assis ALEM, Lima-Leopoldo AP,

- Leopoldo AS. High-fat, high-sucrose, and combined high-fat/high-sucrose diets effects in oxidative stress and inflammation in male rats under presence or absence of obesity. *Physiol Rep*. 2023 Apr;11(7):e15635. doi: 10.14814/phy2.15635
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008 Jun;4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697
 - Willcox, Joye K., Sarah L. Ash, and George L. Catignani. "Antioxidants and prevention of chronic disease." *Critical reviews in food science and nutrition* 44.4 (2004): 275-295
 - Dew, Day AJ, Morgan, M 2005/08/10, Xanthine oxidase activity in vitro: Effects of food extracts and components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
 - Albuquerque, J. A., et al. "Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction." *Bioresource technology* 91.2 (2004): 195-200.
 - Εικόνα 1: Retrieved from https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CF%8C%CF%84%CE%B9%CE%BD%CE%BF%CF%82_%28%CF%83%CF%84%CE%B5%CF%86%CE%AC%CE%BD%CE%B9%29
 - Εικόνα 2: Retrieved from <https://www.messinianspa.gr/index.php/gr/about-us/olive-tree-gr>
 - Johnson, R. L., & Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *Journal of Food Quality*, 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/3193185
 - Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Βάση Δεδομένων Στατιστικά καλλιεργειών Νομού Μαγνησίας, GAIA επιχειρείν
 - Trombly G, Said AM, Kudin AP, Peeva V, Altmüller J, Becker K, Köhrer K, Zsurka G, Kunz WS. The Fate of Oxidative Strand Breaks in Mitochondrial DNA. *Antioxidants* (Basel). 2023 May 12;12(5):1087.
 - Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*. 2010 Jul-Aug;3(4):228-37. doi: 10.4161/oxim.3.4.12858.

- Delgado-Lista, J., Perez-Martinez, P., Garcia-Rios, A., Perez-Caballero, A. I., Perez-Jimenez, F., & Lopez-Miranda, J. (2017). Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 8(3), 348–359.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., & Sánchez-Rovira, P. (2008). Bioavailability of phenolic compounds: a European project within the framework of the European Food Safety Authority. *Trends in Food Science & Technology*, 19(7), 414-423.
- Mafra, R.; Piscopo, A.; De Bruno, A.; Poiana, M. Effects of Climate on Fruit Growth and Development on Olive Oil Quality in Cultivar Carolea. *Agriculture* **2021**, *11*, 147.
- Riccardo Gucci and others, Water deficit-induced changes in mesocarp cellular processes and the relationship between mesocarp and endocarp during olive fruit development, *Tree Physiology*, Volume 29, Issue 12, December 2009, Pages 1575–1585
- Ahamad, J, Toufeeq, I, Khan, MA, et al. Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. *Phytotherapy Research*. 2019; 33: 3112– 3128.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα 1. Μετρήσιμες τιμές ανά μέθοδο για κάθε περιοχή

ΠΤΕΛΕΟΣ

DPPH – IC50 (μl/ml)	REDUCING – AU0,5 (μl/ml)	FOLIN- CIOCALTEU (mg GAE/ml)
0,694	1,805	6,794
1,039	0,859	8,863
0,653	0,590	8,730
0,327	0,318	13,344
0,543	0,200	13,135
1,168	0,444	13,187
0,958	1,032	6,606
0,639	0,636	11,672
0,629	0,585	10,152
1,108	1,160	5,805
0,744	0,987	6,562
1,477	1,599	4,551
0,753	1,185	6,231
1,279	1,121	4,882
1,392	1,845	3,872
0,235	0,134	17,192
0,967	1,064	2,192

ΑΜΑΛΙΑΠΟΛΗ

DPPH – IC50 (μl/ml)	REDUCING – AU0,5 (μl/ml)	FOLIN- CIOCALTEU (mg GAE/ml)
1,035	1,142	3,985
0,523	0,647	10,506
0,389	0,611	7,833
0,502	0,376	11,591
1,215	1,033	7,430
0,601	0,460	12,821
0,965	0,861	10,889
0,620	0,675	5,805
0,604	0,524	11,254
0,646	0,678	7,964

ΑΧΙΛΛΕΙΟ

DPPH – IC50 (μl/ml)	REDUCING – AU0,5 (μl/ml)	FOLIN- CIOCALTEU (mg GAE/ml)
2,793	2,697	4,162
1,034	1,403	5,491
0,677	0,609	14,249
0,337	0,333	9,879

Παράρτημα 2. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

