



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης προϊόντων ελιάς *in vitro*
με συνδυασμό μοριακών τεχνικών (ABTS, Superoxide,
Folin-Ciocalteu)**

**Antioxidant capacity of olive products combining *in vitro*
molecular techniques (ABTS, Superoxide, Folin-Ciocalteu)**

Κακαέ Ζωή του Ευαγγέλου

Λάρισα, 2023

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Κουρέτας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής)**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Βεσκούκης Αριστείδης**, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Σκαπέρδα Ζωή-Βασιλική**, Εντεταλμένη Διδάσκουσα, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το εαρινό εξάμηνο του 2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να υλοποιήσω την παρούσα εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Αριστείδη Βεσκούκη και την διδάκτορα Σκαπέρδα Ζωή για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Γκασδρόγκα για την πολύτιμη καθοδήγησή της σε όλη την πειραματική και συγγραφική διαδικασία, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν καθ' όλη την παρουσία μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τις φίλες μου για την υποστήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελιά είναι ένα υπεραιώνιο δέντρο, του οποίου οι καρποί χρησιμοποιούνται είτε για την παραγωγή ελαιόλαδου είτε για την παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς. Η κατανάλωση των προϊόντων της ελιάς είναι διαδεδομένη στους λαούς της Μεσογείου και ιδιαίτερα στην Ελλάδα. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει τα οφέλη για την υγεία που προσφέρει η κατανάλωση των προϊόντων του ελαιόκαρπου, οι οποίες βασίζονται κυρίως στο υψηλό περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες. Οι πολυφαινολικές ενώσεις παράγονται φυσιολογικά στα φυτά και μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Η Ελλάδα έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των προϊόντων του ελαιόκαρπου. Ιδιαίτερα, ο νομός Μαγνησίας συνεισφέρει σε μεγάλο ποσοστό στην παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς. Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων ελαιόκαρπου από ελαιώνες της ΝΔ Μαγνησίας με στόχο της διερεύνησης της βιοδραστικότητας της περιοχής, μέσω *in vitro* τεχνικών. Οι περιοχές της ΝΔ Μαγνησίας που εξετάστηκαν είναι η Αμαλιάπολη, ο Πτελεός και το Αχίλλειο. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων της κάθε περιοχής και στις δύο *in vitro* μεθόδους. Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρουσιάστηκε ούτε κατά τη μελέτη του πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων των τριών περιοχών που εξετάστηκαν. Επίσης, εντοπίστηκε ασθενής αρνητική συσχέτιση του πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων με τις *in vitro* μεθόδους. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στη μέθοδο ABTS βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ίδιων δειγμάτων που εξετάστηκαν για τα έτη 2021 και 2022 αντίστοιχα, με τα δείγματα του 2021 να εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Συνολικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα και των δύο ετών εμφανίζουν ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών και διατροφικά μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών, αναδεικνύοντας έτσι τον ελαιώνα της ΝΔ Μαγνησίας. Τα αποτελέσματα θα επωφελήσουν τους παραγωγούς και εν τέλει θα βοηθήσουν στην ενίσχυση της τοπικής οικονομίας.

ABSTRACT

Olive tree is a plant with a high lifespan, whose fruits are used for olive oil production and table olive production. The consumption of its products is widespread in the Mediterranean nations, especially in Greece. Many studies have shown the health benefits deriving from olive product consumption, which rely on their high polyphenol content. Polyphenols are substances produced in plants with an increased antioxidant action. Greece has a major role in olive producing. Especially, the prefecture of Magnesia contributes to a high percentage of table olive production. The aim of this study is the evaluation of the antioxidant capacity of olive fruit samples, taken from orchards in SE Magnesia. The purpose was to study the bioactivity of this area using in vitro techniques. The regions of SE Magnesia that were evaluated, were Amaliapolis, Pteleos and Achillio. The results didn't show any statistical significant differences between the samples from different regions. Also, no statistical significant difference was shown in the polyphenol content between the samples. As well, a weak negative correlation was evaluated between the polyphenol content and the in vitro methods. The results from the ABTS method showed statistical significant difference between the same samples from years 2021 and 2022, with 2021 samples being more potent than 2022 samples. Overall, the results from both years demonstrated a high radical scavenging capacity, thus making them nutritionally an important source of antioxidants. These results will highlight the importance of SE Magnesia orchards, benefiting the producers and eventually helping boost the regional economy.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1 Ιστορική Αναδρομή..... | 8 |
| 1.2 Η ελιά στον ελλαδικό χώρο..... | 9 |
| 1.3 Η φυσιολογία του ελαιόκαρπου | 13 |
| 1.4 Η παραγωγή προϊόντων ελιάς | 15 |
| 1.4.1 Παραγωγή ελαιόλαδου | 15 |
| 1.4.2 Παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς..... | 16 |
| 1.5 Οι πολυφαινόλες της ελιάς | 16 |
| 1.5.1 Σεκοϊριδοειδή | 17 |
| 1.5.2 Φαινολικά οξέα..... | 18 |
| 1.5.3 Φαινολικές αλκοόλες..... | 18 |
| 1.5.4 Λοιπές φαινολικές ενώσεις στην ελιά | 19 |
| 1.6 Ελεύθερες ρίζες | 20 |
| 1.7 Παραγωγή των ελεύθερων ριζών | 20 |
| 1.7.1 Ενδογενής μηχανισμός παραγωγής των ελεύθερων ριζών..... | 20 |
| 1.7.2 Εξωγενής παραγωγή..... | 23 |
| 1.8 Κατηγορίες ελεύθερων ριζών..... | 24 |
| 1.8.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)..... | 24 |
| 1.8.2 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS) | 24 |
| 1.9 Η δράση των ελεύθερων ριζών | 24 |
| 1.9.1 Θετικές επιδράσεις | 25 |
| 1.9.2 Αρνητικές επιδράσεις | 25 |
| 1.10 Αντιοξειδωτικά..... | 29 |
| 1.11 Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις της ελιάς | 33 |
| 1.12 Απορρόφηση των πολυφαινολών κατά την πέψη | 35 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ | 36 |
| 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 37 |
| 3.1 Γενικά..... | 37 |
| 3.2 Χημικά αντιδραστήρια | 37 |
| 3.3 Προετοιμασία των δειγμάτων..... | 37 |
| 3.4 Πειραματική Διαδικασία | 38 |
| 3.4.1 Προσδιορισμός την ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS ⁺ | 38 |
| 3.4.2 Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης του σουπεροξειδικού ανιόντος (O ₂ ⁻) | 40 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.3 | Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu..... | 41 |
| 3.5 | Στατιστική ανάλυση | 42 |
| 4. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 43 |
| 4.1 | Σύγκριση των ποικιλιών ελιάς ανά περιοχή..... | 43 |
| 4.2 | Συσχέτιση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ελαιόκαρπων με κάθε in vitro μέθοδο..... | 45 |
| 4.3 | Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου ανά περιοχή μεταξύ των ετών 2021-2022 σε in vitro μεθόδους..... | 47 |
| 4.4 | Σύγκριση δειγμάτων ελαιόκαρπου συγκεντρωτικά μεταξύ των ετών 2021-2022... | 48 |
| 5. | ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 51 |
| 5.1 | Γενικά..... | 51 |
| 5.2 | Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας για τη χρονιά 2022 | 51 |
| 5.3 | Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας μεταξύ των ετών 2021-2022..... | 54 |
| 5.4 | Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι..... | 56 |
| 6. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 58 |
| 7. | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 64 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα υπεραιώνιο φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Ελαιιδών (*Oleaceae*) και έχουν καταγραφεί δύο υποείδη της, η καλλιεργήσιμη ελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) και η αγριελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) [1]. Η προέλευση του ελαιόδεντρου δεν είναι ακόμα γνωστή, ωστόσο πιστεύεται ότι η αγριελιά αποτελεί πρόγονο της καλλιεργήσιμης ελιάς, ενώ ακόμη και σήμερα παρατηρείται η αγριελιά σε συγκεκριμένα δάση της Ελλάδας [2]. Η καλλιέργειά της ελιάς είναι στενά συνδεδεμένη με τους λαούς της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής από τη Νεολιθική ακόμα εποχή. Αρχαιολογικά και φυλογενετικά δεδομένα δείχνουν ότι η καλλιέργεια της ελιάς ξεκίνησε από λαούς της Μέσης Ανατολής περίπου το 6000 π.Χ. [3]. Στην Ελλάδα αρχαιολογικές μελέτες έχουν εντοπίσει γύρη προερχόμενη από την ελιά, η οποία χρονολογείται το 7000 π.Χ. [4]. Αργότερα, κατά τη Μινωική περίοδο υπολογίζεται ότι ξεκίνησε η καλλιέργεια ελαιόδεντρων στην Κρήτη, όπου αποτελούσε πηγή πλούτου για τον μινωικό πολιτισμό, καθώς πραγματοποιούσαν εξαγωγές λαδιού στην ηπειρωτική Ελλάδα, στη Μικρά Ασία και στη βόρεια Αφρική [5]. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες, οι Αρχαίοι Έλληνες απέδιδαν στον νικητή κότινο ελιάς ως σύμβολο της νίκης και ακόμη και σήμερα η ελιά συμβολίζει την ειρήνη, υγεία και μακροζωία [4].

Σήμερα, η ελιά συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό κομμάτι της καθημερινότητας των χωρών που βρέχονται από τη Μεσόγειο, καθώς είναι βασικό στοιχείο της Μεσογειακής διατροφής είτε υπό τη μορφή λαδιού είτε ως επιτραπέζια ελιά [6]. Οι εκτάσεις καλλιεργήσιμης ελιάς υπολογίζονται στα 10,6 εκατομμύρια εκτάρια παγκοσμίως. Οι χώρες της Μεσογείου παίζουν σημαντικό ρόλο αφού καλύπτουν το 84% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόκαρπου, καθώς και το 97% της παγκόσμιας παραγωγής λαδιού [7]. Συγκεκριμένα, πρώτη σε παραγωγή παγκοσμίως ανέρχεται η Ισπανία με καλλιεργήσιμη έκταση 2,5 εκατομμυρίων εκταρίων, δεύτερη η Ιταλία με 1,159 εκατομμύρια εκτάρια και τρίτη η Ελλάδα με 765.000 εκτάρια. Άλλες χώρες που συμβάλλουν σημαντικά στην παγκόσμια παραγωγή ελαιόκαρπου είναι η Πορτογαλία, η Τουρκία, η Κύπρος, η Συρία, το Μαρόκο και η Λιβύη. Όσον αφορά την παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς, η Ελλάδα κατατάσσεται δεύτερη σε παραγωγή μετά την Ισπανία. Οι εξαγωγές των προϊόντων του ελαιόκαρπου, αποτελούν πολύ σημαντικά για την οικονομία της Ελλάδας [8].

1.2 Η ελιά στον ελλαδικό χώρο

Η Ελλάδα έχει σημαντική συμβολή τόσο στην παραγωγή της ελιάς, όσο και στην κατανάλωση των προϊόντων της. Το κλίμα της Ελλάδας αποτελεί ιδανικό για την καλλιέργεια των ελαιόδεντρων, καθώς είναι Μεσογειακό, με ζεστά και ξηρά καλοκαίρια και ήπιους, υγρούς χειμώνες. Το ελαιόδεντρο προκειμένου να ανθοφορήσει και να ξεκινήσει να παράγει ελαιόκαρπους χρειάζεται έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και χαμηλή υγρασία. Επιπλέον, η τοπογραφία της χώρας έχει σημαντικό ρόλο στην καλλιέργεια των ελαιόδεντρων, καθώς λόγω του ιδιαίτερου γεωγραφικού αναγλύφου τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνται κυρίως σε πλαγιές, το οποίο διευκολύνει την καλύτερη αποστράγγιση του εδάφους, τον καλύτερο αερισμό των ελαιόδεντρων και τη βέλτιστη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία [9]. Όσον αφορά την παραγωγή και την κατανάλωση, στην Ευρώπη παράγει το 13% του συνολικού ελαιόλαδου, ενώ παράλληλα καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην κατανάλωση του, αφού αντιστοιχούν 12 κιλά λαδιού ανά κεφαλή το χρόνο [10]. Όσον αφορά την παραγωγή της επιτραπέζιας (βρώσιμης) ελιάς, η Ελλάδα βρίσκεται στους πρώτους παραγωγούς παγκοσμίως για τις χρονιές 2017 με 2018 [11]. Ο ελλαδικός χώρος παράγει περισσότερους από 350.000 τόνους ελαιόλαδου και περισσότερους από 80.000 τόνους επιτραπέζιας ελιάς ανά χρονιά. Ακόμη, το 60% της συνολικής καλλιεργήσιμης γης της Ελλάδας, χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια ελαιόδεντρων. Στην παραδοσιακή καλλιέργεια της ελιάς, τα ελαιόδεντρα αναπτύσσονται ως ξηρικά, ενώ η πυκνότητα των δέντρων ανά στρέμμα είναι χαμηλή. Στις εντατικές καλλιέργειες, χρησιμοποιείται σύστημα άρδευσης και η πυκνότητα των δέντρων είναι πυκνή, από 30 δέντρα ανά στρέμμα ως και 150 - 180 δέντρα ανά στρέμμα[12].

Πίνακας 1 Τα στρέμματα των ελαιώνων ανά τους νομούς της Ελλάδας για την χρονιά 2019

| Νομοί της Ελλάδας | Στρέμματα ελαιώνων |
|--------------------------|---------------------------|
| Ηράκλειο Κρήτης | 903.001 |
| Μεσσηνία | 859.559 |
| Λακωνία | 698.318 |
| Χανιά | 436.613 |
| Λέσβος | 415.734 |
| Ηλεία | 410.750 |
| Φθιώτιδα | 334.730 |
| Ρέθυμνο | 281.161 |
| Λασιθί | 275.889 |
| Αργολίδα | 272.357 |
| Εύβοια | 269.380 |
| Χαλκιδική | 259.214 |
| Κορινθία | 197.399 |
| Αχαΐα | 181.272 |
| Αρκαδία | 179.405 |
| Μαγνησία | 164.865 |

Το γεωγραφικό διαμέρισμα της Μαγνησίας, το οποίο τοποθετείται στην κεντρική Ελλάδα και ανήκει στην περιφέρεια Θεσσαλίας, συμβάλλει σημαντικά στην ετήσια ελληνική παραγωγή της ελιάς. Συγκεκριμένα, για τις χρονιές 2017-2018, στον νομό Μαγνησίας παρήχθησαν 13.500 τόνοι ελαιόκαρπου, καλύπτοντας έτσι το 3,5% της συνολικής παραγωγής ελαιόκαρπου στην Ελλάδα για το διάστημα αυτό. Στην περιοχή αυτή, για το 2019 καταμετρήθηκαν 164.865 στρέμματα ελαιώνων, ξεπερνώντας ακόμη και το άθροισμα των στρεμμάτων όπου καλλιεργείται η ελιά των υπόλοιπων νομών της Θεσσαλίας. Επιπλέον, ο νομός παράγει το 40% της επιτραπέζιας ελιάς της χώρας. Ειδικότερα, η ευρύτερη περιοχή του Αλμυρού, που τοποθετείται στην νοτιοδυτική Μαγνησία, είναι ιδανική για την καλλιέργεια της ελιάς. Διαθέτει Μεσογειακό κλίμα με ζεστά και ξηρά καλοκαίρια και ήπιους, υγρούς χειμώνες. Η μέση θερμοκρασία της περιοχής είναι 15 °C και η συνολική έκταση της είναι 856 km², ενώ η συνολική καλλιεργήσιμη γη είναι 205 km². Η ευρύτερη περιοχή του Αλμυρού χωρίζεται στις εξής Δημοτικές ενότητες, του Αλμυρού, της Σούρπης, του Πτελεού και της Αναύρας. Η συνολική καλλιεργούμενη έκταση των ελαιόδεντρων στον δήμο είναι 70.000 στρέμματα. Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται στην περιοχή είναι η Αμφίσσης (90% των καλλιεργειών), η Καλαμών, η Χαλκιδικής και η Κορωνέικη. [13,14, 15]



Εικόνα 1 Ελαιώνας στον νομό Μαγνησίας

Υπολογίζονται ότι υπάρχουν πάνω από 40 διαφορετικές ποικιλίες ελιάς, οι 20 εκ των οποίων παρατηρούνται στην πλειονότητα των καλλιεργούμενων εκτάσεων [16]. Οι κυριότερες ποικιλίες που συναντώνται είναι ονομαστικά οι: Αδραμυτινή, Αμυγδαλολιά, Ασπρολιά, Βαλανολιά, Βασιλικάδα, Γαϊδουρελιά, Δαφνελιά, Θιακή, Θρουμπολιά, Καλαμών, Καλοκαιρίδα, Καρολιά, Καρυδολιά, Κοθρέικη, Κολυμπάδα, Κονσερβολιά, Κορωνέικη, Κουτσουρελιά, Λιανολιά Κέρκυρας, Μαστοειδής (γνωστή ως Αθηνολιά ή Τσουνάτη), Μαυρελιά, Μεγαρείτικη, Μιττολιά, Στρογγυλολιά και Τραγολιά [17].

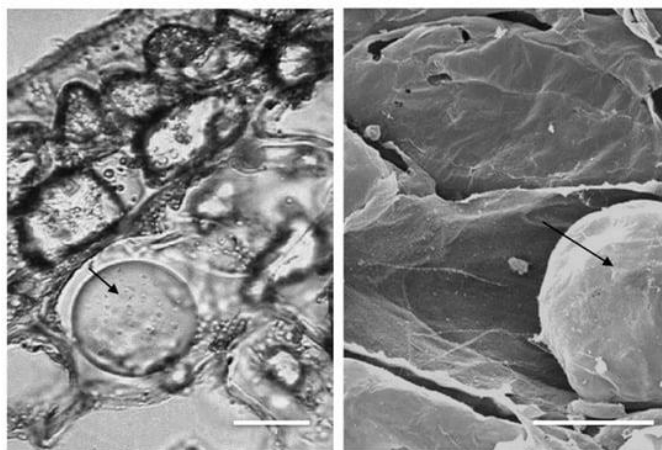
Από τις ποικιλίες της ελιάς που παρατηρούνται στην ελληνική γη, άλλες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαιόλαδου και άλλες για της παραγωγή της επιτραπέζιας (βρώσιμης) ελιάς, ενώ κάποιες χρησιμοποιούνται και για τα δύο αναφερθέντα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς, οι ποικιλίες που αποφέρουν το μεγαλύτερο οικονομικό όφελος στο κράτος είναι η Κονσερβολιά, η Καλαμών και η Γαϊδουρελιά (γνωστή και ως ελιά Χαλκιδικής). Η Κονσερβολιά καλλιεργείται κατά κύριο λόγο στην Κεντρική Ελλάδα και συγκεκριμένα κυρίως στους νομούς Φθιώτιδας, Μαγνησίας και Ευβοίας. Η ποικιλία Καλαμών συναντάται στη δυτική Ελλάδα, κυρίως στον νομό Αιτωλοακαρνανίας, και στην Νότια Πελοπόννησο, στους νομούς Μεσσηνίας και Λακωνίας. Αντίστοιχα, στη Βόρεια Ελλάδα, στη Χαλκιδική και στην Καβάλα, καλλιεργείται η Γαϊδουρελιά. Οι παραπάνω ποικιλίες συναντώνται με την εμπορική ονομασία Κονσερβολιά ή Αμφίσσης, ελιές Καλαμών ή Καλαμάτας, και ελιές Χαλκιδικής αντίστοιχα [18]. Όσον αφορά την παραγωγή ελαιόλαδου, η Κορωνέικη αποτελεί την πιο εμβληματική ποικιλία ελιάς, η οποία καλλιεργείται κατά κόρον στην Πελοπόννησο και την Κρήτη. Άλλες ποικιλίες ελιάς που χρησιμοποιούνται είναι η Κονσερβολιά, που όπως προαναφέρθηκε εντοπίζεται στην Κεντρική Ελλάδα, η Μεγαρείτικη, που καλλιεργείται επίσης στην Κεντρική Ελλάδα και Θεσσαλία αλλά και στην Πελοπόννησο και την Αττική, η Λιανολιά Κέρκυρας που βρίσκεται στις παραθαλάσσιες τοποθεσίες της Βορειοδυτικής Ελλάδας και η Μαυρελιά ή Μαυρολιά στη Μεσσηνία [19,20]. Ακόμη μία πολύ σημαντική ποικιλία για την παραγωγή ελαιόλαδου είναι η Μαστοειδής, η οποία καλλιεργείται στη Λακωνία, Αργολίδα και στη Δυτική Κρήτη [21].

1.3 Η φυσιολογία του ελαιόκαρπου

Το ελαιόδεντρο φύτεται σε περιοχές με ήπιο κλίμα και παράγει τον ελαιόκαρπο, ο οποίος συλλέγεται και χρησιμοποιείται κατά κόρον για την παραγωγή του ελαιόλαδου και της επιτραπέζιας, ή αλλιώς βρώσιμης, ελιάς. Στο ώριμο ελαιόδεντρο παράγονται περίπου 500.000 άνθη εκ των οποίων μόνο το 1-2% θα διαφοροποιηθούν και θα οδηγήσουν στον σχηματισμό του καρπού. Για την έναρξη της ανθοφορίας και την διαφοροποίηση των ανθών παίζουν αρκετοί παράγοντες ρόλο, όπως η θερμοκρασία και η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, αλλά και η περιεκτικότητα του εδάφους σε θρεπτικά συστατικά. Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των ανθών, καθώς και η καρποφορία και η ωρίμανση των καρπών, είναι μία διαδικασία η οποία διαρκεί 1 χρόνο. Τα άνθη της ελιάς ανήκουν σε δύο κατηγορίες, τα τέλεια στα οποία είναι ανεπτυγμένα τόσο τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα (στήμονες) όσο και τα θηλυκά (ύπερος) και τα ατελή, στα οποία έχουν αναπτυχθεί μόνο οι στήμονες. Η αναλογία στην οποία συναντώνται οι δύο κατηγορίες που αναφέρθηκαν, είναι εξαρτώμενη από αρκετούς παράγοντες, όπως την ποικιλία της ελιάς αλλά και τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή. Η αναπαραγωγή του ελαιόδεντρου γίνεται μέσω της μεταφοράς τις γύρης από τους στήμονες στον ύπερο, είτε μέσω του ανέμου είτε μέσω της επικονίασης από τις μέλισσες. Έπειτα, αφού πέσουν τα πέταλα των ανθών, τα άνθη τα οποία έχουν αναπαράχθει επιτυχώς ξεκινούν τον σχηματισμό του καρπού [22].

Από την έναρξη του σχηματισμού του καρπού ως την ωρίμανσή του, περνάει ένα χρονικό διάστημα περίπου 5 μηνών. Συνήθως η συγκομιδή του πραγματοποιείται στα τέλη του φθινοπώρου. Ο καρπός ανήκει στην κατηγορία των δρυπών, έχει μέγεθος 2 με 3 εκατοστά και αποτελείται από το εξωκάρπιο (φλούδα), το οποίο καλύπτει εξωτερικά τον ελαιόκαρπο, το μεσοκάρπιο, που απαρτίζει την περιοχή μεταξύ του εξωκάρπιου και του ξυλώδους πυρήνα στο κέντρο του καρπού, και το ενδοκάρπιο (πυρήνας) [23]. Το μεσοκάρπιο καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του ελαιόκαρπου, σε ποσοστό 70-85% και μαζί με το επικάρπιο αποτελούν το βρώσιμο μέρος του. Ειδικότερα, συνίσταται κυρίως από νερό (50%), λιπίδια (22%), υδατάνθρακες (19,1%), κυτταρίνη (5,8%), πρωτεΐνες (1,6%) και πηκτίνες, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις περιέχει βιοφαινόλες (1-3%), χρωστικές, βιταμίνες και μέταλλα. Η σύσταση του ελαιόκαρπου στα παραπάνω συστατικά, εξαρτάται τόσο από την ποικιλία της ελιάς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η περιεκτικότητα του εδάφους σε θρεπτικά. Οι φάσεις της ωρίμασης είναι δύο, η

ωρίμαση και η γήρανση. Κατά την ωρίμαση του καρπού παρατηρούνται συγκεκριμένες μεταβολές στη σύστασή του αλλά και την μορφολογία του. Στο επικάρπιο, το πράσινο χρώμα των άωρων καρπών που οφείλεται στη χλωροφύλλη, δίνει τη θέση του στις ανθοκυανίνες στους ώριμους καρπούς, προσδίδοντας ένα μαύρο πλέον χρώμα. Ακόμη, κατά την ωρίμαση παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των λιπαρών οξέων και ταυτόχρονη μείωση των φαινολικών ενώσεων που συνιστούν τον καρπό. Σταγονίδια ελαίου μπορούν να παρατηρηθούν στα κενοτόπια των κυττάρων του μεσοκαρπίου, τα οποία αποτελούν το 10-25% του συνολικού βάρους του ώριμου ελαιόκαρπου (Εικόνα 2). Κατά την φάση της γήρανσης που συμβαίνει το φθινόπωρο, το ποσοστό σε έλαια φτάνει το ζενίθ και ξεκινά η αποικοδόμηση του ελαιόκαρπου. Η φάση της γήρανσης σηματοδοτεί το τέλος της φάσης της ωρίμασης και την έναρξη της περιόδου συγκομιδής [24,25].



Εικόνα 2 Η σταγόνα ελαίου στα κύτταρα του μεσοκαρπίου του ελαιόκαρπου. Αριστερά φαίνεται εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο, ενώ δεξιά στιγμιότυπο από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [25]



Εικόνα 3 Τα στάδια ωρίμασης του ελαιόκαρπου [29]

1.4 Η παραγωγή προϊόντων ελιάς

Η παραγωγή των προϊόντων της ελιάς, δηλαδή του ελαιόλαδου και της επιτραπέζιας ελιάς, ξεκινούν από την συγκομιδή του ελαιόκαρπου. Η περίοδος συγκομιδής του ελαιόκαρπου, εξαρτάται από το αν ο ελαιόκαρπος προορίζεται για βρώση ή για την παρασκευή ελαιόλαδου. Συνήθως η συγκομιδή πραγματοποιείται τους μήνες Οκτώβριο με Ιανουάριο. Βέβαια, η περίοδος συγκομιδής εξαρτάται και από το κλίμα της περιοχής, την ωρίμαση του ελαιόκαρπου και την ποικιλία [26].

1.4.1 Παραγωγή ελαιόλαδου

Η παραγωγή του ελαιόλαδου πραγματοποιείται στα ελαιοτριβεία. Αφού γίνει συγκομιδή, οι ελαιόκαρποι μεταφέρονται το ελαιοτριβείο, όπου αρχικά αφαιρούνται τυχόν φύλλα και κλαδιά πριν να ξεκινήσει η διαδικασία μάλαξης μέσω μηχανικών πιέσεων του καρπού. Έτσι, από την ομογενοποίηση προκύπτει μία πάστα από την οποία πρέπει στη συνέχεια να εξαχθεί το έλαιο μέσω φυγοκέντρωσης. Δύο μέθοδοι φυγοκέντρωσης χρησιμοποιούνται, η τριφασική και η διφασική. Κατά την διφασική, προκύπτουν δύο μόνο φάσεις μετά την φυγοκέντρωση, η ελαιώδης και η ελαιόπαστα. Η τριφασική είναι η κατά κόρον χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην Ευρώπη για την παραγωγή ελαιόλαδου, όπου αφού πραγματοποιηθεί η φυγοκέντρωση της πάστας, προκύπτουν τρεις φάσεις. Οι φάσεις αυτές είναι η ελαιώδης, η υδατική και τα υπολείμματα του ελαιόκαρπου, όπως κομμάτια της φλούδας του. Τέλος πραγματοποιείται φιλτράρισμα, για την αφαίρεση της υγρασίας στο τελικό προϊόν [27].

Στην κάθε φάση που προκύπτει από την φυγοκέντρωση γίνεται και διαφορετική κατανομή των συστατικών του ελαιόκαρπου. Λόγω της διαφορετικής πυκνότητάς τους, και του συντελεστή κατανομής κατανέμονται από πάνω προς τα κάτω ως εξής, πρώτα η ελαιώδης φάση, ενδιάμεσα η ελαιόπαστα και τέλος η υδατική φάση. Η ελαιώδης φάση συνίσταται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (99%), αλλά και από μόνο- και διάκυλογλυκερόλες, στερόλες, τοκοφερόλες, χρωστικές καθώς και από φαινολικές ενώσεις. Το ελαιόλαδο, συγκεκριμένα το έξτρα-παρθένο, αποτελείται κυρίως από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) σε ποσοστό περίπου 80%, αλλά και από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), ενώ σε μικρές συγκεντρώσεις περιέχονται τα κορεσμένα λιπαρά οξέα. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό, παλμιτολεϊκό, στεαρικό, ολεϊκό, λινολεϊκό και λινολενικό, ενώ σε

μικρότερες ποσότητες παρατηρούνται το εικοσανοϊκό, το μυριστικό και το επταδεκανοϊκό. Η συγκεντρώσεις των παραπάνω λιπαρών οξέων μεταβάλλονται ανάλογα με την ποικιλία αλλά και τις συνθήκες της περιοχής στην οποία καλλιεργούνται. Σε αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε ελαιόλαδα της Ισπανίας, Ιταλίας και της Ελλάδας ανιχνεύονται μεγαλύτερες ποσότητες ολεϊκού οξέος και χαμηλότερες ποσότητες σε λινολεϊκό και παλμιτικό οξύ [28]. Όσον αφορά το ποσοστό των πολυφαινολικών ενώσεων, ή αλλιώς πολυφαινολών, στο ελαιόλαδο μόνο το 0,3-1,5% του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του ελαιόκαρπου περνάει σε αυτή τη φάση, ενώ το 40% των πολυφαινολών βρίσκεται στην υδατική φάση. Αυτή η κατανομή των πολυφαινολών προκαλείται λόγω της αμφίφιλης φύσης τους, καθώς παρατηρείται ότι διαλύονται πιο εύκολα στην υδατική σε σχέση με την ελαιώδη φάση. Επομένως, η αναλογία του νερού στον ελαιόκαρπο σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά, είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το ποσοστό των πολυφαινολικών ενώσεων που καταλήγουν στο ελαιόλαδο, ωστόσο παίζουν ρόλο και οι συνθήκες τις καλλιέργειας και η διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου. Κατά την διαδικασία παραγωγής πραγματοποιούνται αντιδράσεις μετατροπής ενώσεων, όπως η υδρόλυση της ελευροπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη [29].

1.4.2 Παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς

Η επιτραπέζια ελιά διακρίνεται από τρεις διαφορετικούς τύπους επεξεργασίας με τις ακόλουθες εμπορικές ονομασίες, οι πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου, οι μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας και οι φυσικές μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου. Η επεξεργασία διαφέρει από τύπο σε τύπο και στην κάθε μέθοδο οι ελαιόκαρποι συλλέγονται σε διαφορετική φάση της ωρίμασης. Η επεξεργασία τους, δηλαδή το ξεπίκρισμα, αναφέρεται στην ολική ή μερική απομάκρυνση της ελευροπαΐνης που προσδίδει πικρή γεύση στον καρπό. Στις δύο πρώτες μεθόδους το ξεπίκρισμα γίνεται μέσω αλκαλικής κατεργασίας. Στις επιτραπέζιες ελιές Ελληνικού τύπου, ο ελαιόκαρπος συλλέγεται και τοποθετείται απευθείας σε άλμη (8-10% w/v NaCl) και η απομάκρυνση της ελευροπαΐνης είναι αργή και μερική [30].

1.5 Οι πολυφαινόλες της ελιάς

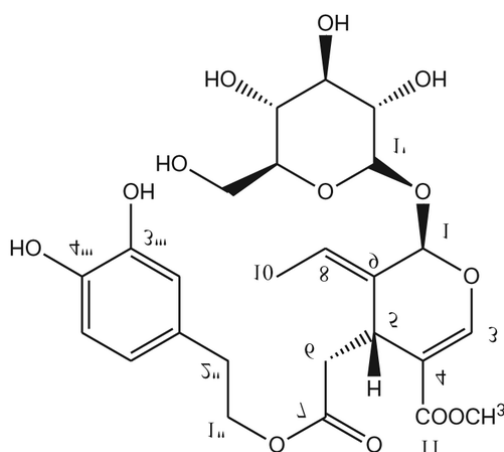
Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που υπάρχουν φυσιολογικά στα φυτά και συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού, όταν αυτό εκτίθεται σε βιοτικούς και αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία του

ηλίου, η μόλυνση από παθογόνους που προσβάλλουν τα φυτά καθώς και τραυματισμοί και καταπονήσεις [25]. Οι πολυφαινόλες (ή βιοφαινόλες ή πολυφαινολικές ενώσεις) είναι άφθονες στη φύση, μάλιστα διακρίνονται 8000 διαφορετικές πολυφαινολικές ενώσεις στον αριθμό με βάση την χημική τους δομή. Οι πολυφαινόλες διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο και τουλάχιστον μία υδροξυλομάδα στην δομή τους, και βιοσυντίθενται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Οι πολυφαινόλες εντοπίζονται στον κορμό του ελαιόδεντρου, στα φύλλα, τα άνθη και τον καρπό. Στον κορμό ανιχνεύονται κυρίως φλαβονόλες, λιγνάνες και γλυκοσίδια. Στα φύλλα οι κυριότερες ενώσεις είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή και τα σεκοϊριδοειδή. Ειδικότερα, τα ποσοστά της ελευροπαΐνης στα φύλλα είναι πάρα πολύ υψηλά, υψηλότερα ακόμη και από τον ελαιόκαρπο. Στα άνθη, παρατηρούνται πολυφαινολικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ανθοκυανίνες [22,48]. Οι κατηγορίες των πολυφαινολικών ενώσεων στον ελαιόκαρπο μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: τα παράγωγα σεκοϊριδοειδών, τα φαινολικά οξέα και τις φαινολικές αλκοόλες. Αυτές ανήκουν στις πολικές φαινολικές ενώσεις, μαζί με τα φλαβονοειδή και τις λιγνάνες, ενώ στις λιπόφιλες φαινολικές ενώσεις ανήκουν οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες [31].

1.5.1 Σεκοϊριδοειδή

Τα σεκοϊριδοειδή είναι παράγωγα του ελενολικού οξέος, παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων, και οι πιο γνωστές ενώσεις είναι η ελευρωπαΐνη (3,4 διυδροξυφαινύλαιθανολ-ελενολικό οξύ) και ο λιγκστροζίτης. Έχουν μελετηθεί εκτενώς και τα δύο, και κυρίως η ελευρωπαΐνη, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ποιότητα του ελαιόλαδου, όσο και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Η ελευρωπαΐνη απομονώθηκε πρώτη φορά το 1960 από τον Panizzi και είναι ένας μεθυλεστέρας της διμεθυλευροπαΐνης. Είναι ένα πολύπλοκο χημικό μόριο, το οποίο περιλαμβάνει τρεις δομικές μονάδες, μία υδροξυτυροσόλη, ένα ελενολικό οξύ και ένα μόριο γλυκόζης. Η ελευρωπαΐνη βιοσυντίθεται από το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, με τον λιγκστροζίτη να αποτελεί πρόδρομο μόριο της, και μεγάλες ποσότητες παρατηρούνται στον ελαιόκαρπο όταν αυτός είναι ακόμη άγουρος. Συγκεκριμένα στον άγουρο ελαιόκαρπο, η ελευρωπαΐνη σε ποσότητα φτάνει ως και το 14% του συνολικού ξηρού βάρους του καρπού. Η ίδια προσδίδει πικρή επίγευση στον ελαιόκαρπο και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του, καταβολίζεται δίνοντας νέες ενώσεις, με αποτέλεσμα

στον ώριμο καρπό να υπάρχει ελάχιστη ποσότητά της. Κατά την ωρίμανση και την μετατροπή του καρπού από πράσινο χρώμα σε πιο σκούρο, η ελευροπαΐνη υδρολύεται δίνοντας υδροξυτυροσόλη, ελενολικό οξύ και άγλυκο της ελευροπαΐνης. Επίσης, μέσω της προσθήκης μιας μεθανόλης, η ελευροπαΐνη μπορεί να μετατραπεί σε διμεθυλευροπαΐνη. Στο ελαιόλαδο ανιχνεύεται κυρίως το άγλυκο της ελευροπαΐνης. Στην ελιά η ελευροπαΐνη εντοπίζεται στον καρπό και στα φύλλα και συμβάλλει στην άμυνα του φυτού ενάντια σε παθογόνα και έντομα (Εικόνα 4) [32,33].



Εικόνα 4 Η χημική δομή της ελευροπαΐνης [32]

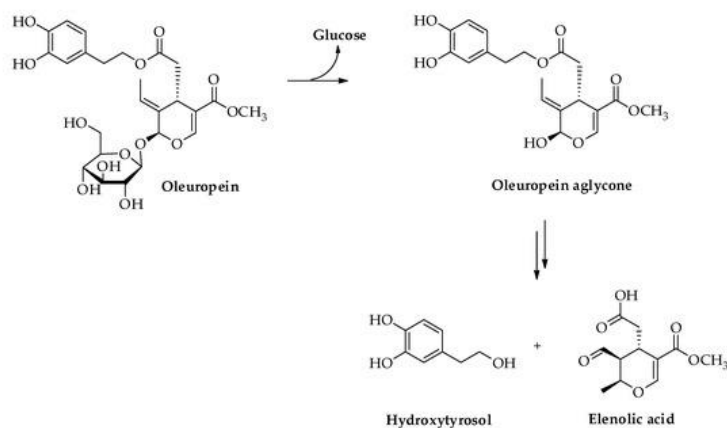
1.5.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε δύο διακριτές κατηγορίες, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Η κατηγορία των φαινολικών οξέων ήταν η πρώτη που ανιχνεύτηκε στο ελαιόλαδο. Στα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος ανήκουν ενώσεις όπως το γαλλικό οξύ, το βανιλλικό οξύ και το συριγγικό οξύ. Το κινναμωμικό οξύ βιοσυντίθεται από τη φαινυλαλανίνη και τα παράγωγα του που εντοπίζονται στον ελαιόκαρπο είναι το συναπικό, το φερουλικό και το καφεϊκό οξύ.[34]

1.5.3 Φαινολικές αλκοόλες

Οι κυριότερες φαινολικές αλκοόλες (ή φαινυλαιθανοειδή) που απαντώνται στην ελιά είναι η υδροξυτυροσόλη (3,4 διυδροξυφαινυλαιθανόλη ή 3,4 DHPEA) και η τυροσόλη (p-υδροξυφαινυλαιθανόλη ή p-HPEA). Η συγκέντρωσή τους στον

ελαιόκαρπο δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή, ωστόσο αυξάνεται κατά την αποθήκευσή του μέσω της περαιτέρω υδρόλυσης των σεκοϊριδοειδών. Η υδροξυτυροσώλη είναι η υδροξυλιωμένη μορφή της τυροσώλης και όπως προαναφέρθηκε προέρχεται από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης. Παρατηρείται στην ελιά είτε ως ελεύθερη φαινόλη είτε στα παράγωγα σεκοϊριδοειδών. Ο υδρόφιλος χαρακτήρας της οδηγεί στο να εμφανίζεται κυρίως στα απόβλητα του ελαιοτριβείου (Εικόνα 5) [30].



Εικόνα 5 Η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσώλη και ελενολικό οξύ [30]

1.5.4 Λοιπές φαινολικές ενώσεις στην ελιά

Άλλες φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στην ελιά είναι τα φλαβονοειδή και οι λιγνάνες. Η χημική δομή των φλαβονοειδών διακρίνεται από δύο βενζολικούς δακτυλίους που συνδέονται με τρεις ανθρακικές αλυσίδες. Συνήθως τροποποιούνται περαιτέρω μέσω γλυκοζυλίωσης και άλλων διαδικασιών, με αποτέλεσμα να προκύπτουν νέες ενώσεις όπως οι φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες και φλαβανόλες. Η λουτεονίνη και η απιγενίνη που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονών απαντώνται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Αντίστοιχα, οι λιγνάνες προκύπτουν από την συμπύκνωση των αρωματικών αλδεϋδων και βρίσκονται τόσο στο μεσοκάρπιο όσο και στον πυρήνα του ελαιόκαρπου. Στο ελαιόλαδο ανιχνεύονται κυρίως οι λιγνάνες η πινορεσινόλη και η ακετόξυπινορεσινόλη [35].

1.6 Ελεύθερες ρίζες

Τα άτομα διακρίνονται από έναν πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από πρωτόνια και νετρόνια, γύρω από τον οποίο σχηματίζεται ένα ηλεκτρονιακό νέφος. Κάθε άτομο μπορεί είναι να προσλάβει, είτε να δώσει ηλεκτρόνια σε ένα άλλο άτομο οδηγώντας σε αναγωγή ή οξειδωσή του αντίστοιχα. Όταν ένα ηλεκτρόνιο φύγει από την εξωτερική στιβάδα σθένους, τότε μένει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και το άτομο πλέον μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα, η οποία είναι αρκετά ασταθής. Ο χρόνος ημιζωής, ή χρόνος ημίσειας ζωής, των ριζών κυμαίνεται από λίγα νανοδευτερόλεπτα ως και λίγα δευτερόλεπτα ή ακόμη και ώρες. Λόγω της ασταθούς φύσης τους, αντιδρούν με άλλα μόρια μέχρι να φτάσουν σε μία σταθερή κατάσταση, δηλαδή σε μία κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας, οδηγώντας έτσι δυναμικά στην ενεργοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS, Reactive Nitrogen Species), τις δραστικές μορφές θείου και τις δραστικές μορφές χλωρίου. Η ταξινόμηση αυτή γίνεται με βάση το κεντρικό άτομο της κάθε ρίζας, δηλαδή το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο και το χλώριο αντίστοιχα. Πέρα από τις ελεύθερες ρίζες υπάρχουν και μόρια τα οποία είναι δραστικά χωρίς να αποτελούν ρίζες.

1.7 Παραγωγή των ελεύθερων ριζών

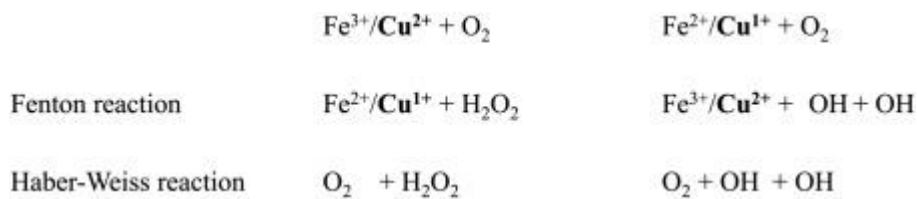
Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών συμβαίνει είτε φυσιολογικά μέσα στα κύτταρα, είτε προέρχεται έπειτα από επαγωγή από συγκεκριμένους εξωτερικούς παράγοντες. Έτσι χωρίζεται είτε σε ενδογενή παραγωγή, είτε σε εξωγενή.

1.7.1 Ενδογενής μηχανισμός παραγωγής των ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών συμβαίνει φυσιολογικά στα κύτταρα μέσω των μιτοχονδρίων, του κυτοχρώματος P450, της οξειδάσης της ξανθίνης, της φαγοκυττάρωσης, της ενεργοποίησης της φλεγμονώδους απόκρισης, και των υπεροξειδιοσωμάτων.

A. Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα «εργοστάσια ενέργειας» του κυττάρου, καθώς μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH₂ στο O₂. Τα δύο κύρια σημεία παραγωγής ελεύθερων ριζών, και συγκεκριμένα δραστικών μορφών οξυγόνου, είναι τα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα σύμπλοκα I και III παράγουν σουπεροξειδικό ανιόν (O₂^{•-}) κατά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας, στην μήτρα των μιτοχονδρίων. Το σύμπλοκο III επίσης παράγει O₂^{•-} και στην διαμεμβρανική περιοχή, μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στη συνέχεια, το O₂^{•-} ανάγεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) από την δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD), ενώ έπειτα το H₂O₂ ανάγεται σε ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (Εικόνα 6) [39,40].



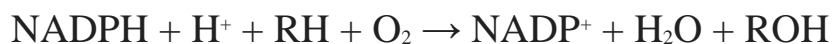
Εικόνα 6 Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss

Στην παραγωγή της ρίζας του υδροξυλίου συμμετέχει και το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το οποίο εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια κυρίως σε κατάσταση υποξίας και συμμετέχει στη ρύθμιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το NO αντιδρά με το O₂^{•-} δίνοντας υπερόξυνιτρικό ανιόν (OONO^{•-}), που παράγει στη συνέχεια NO[•] και OH[•] [41].

B. Κυτόχρωμα P450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 1960. Ο ρόλος τους είναι η οξείδωση και η αναγωγή οργανικών ουσιών στους οργανισμούς, αλλά και ο μεταβολισμός φαρμάκων, στεροϊδών και ξενοβιοτικών. Το 75% των αντιδράσεων που τελούν αφορούν τον μεταβολισμό των φαρμάκων,

προκειμένου να τα οδηγήσουν σε απέκκριση κάνοντάς τα πιο υδατοδιαλυτά. Στον άνθρωπο υπάρχουν συνολικά 57 διαφορετικά ένζυμα κυτοχρώματος P450, 50 εκ των οποίων βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ τα υπόλοιπα 7 εντοπίζονται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Οι αντιδράσεις που τελούν είναι της μορφής:



Κυρίως τα υποστρώματα αυτής της αντίδρασης (RH) είναι ξеноβιοτικές ουσίες. Παρά τη θετική επίδραση που έχουν στον οργανισμό τα ένζυμα αυτά, μπορεί να οδηγήσουν στην δημιουργία πιο δραστικών ενώσεων. Στο ήπαρ τελείται ο μεταβολισμός των ξеноβιοτικών, κατά τον οποίο τα κυτοχρώματα P450 καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις προκειμένου να οδηγήσουν στην απέκκριση των ουσιών αυτών. Ωστόσο, μερικές φορές δημιουργούν ενώσεις τοξικές για τον οργανισμό [42].

Γ. Αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο το οποίο εντοπίζεται τόσο σε μονοκύτταρους όσο και σε πολύπλοκους οργανισμούς, από τα βακτήρια, ως και τον άνθρωπο. Συμμετέχει ενεργά στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και συγκεκριμένα δραστικών μορφών οξυγόνου. Ανήκει στην κατηγορία των υδροξυλασών και καταλύει την υδροξυλίωση των πουρινών, δηλαδή της αδενίνης και της γουανίνης, αποτελώντας βασικό κομμάτι του καταβολισμού των πουρινών. Αρχικά, τελεί την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη, οδηγώντας σε αναγωγή του O_2 και παραγωγή του ανιόντος $\text{O}_2^{\cdot-}$. Στη συνέχεια, μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ, ανάγοντας το $\text{O}_2^{\cdot-}$ που προέκυψε από την προηγούμενη αντίδραση σε H_2O_2 [43].

Δ. Φαγοκυττάρωση και φλεγμονώδης απόκριση

Η φαγοκυττάρωση είναι μία διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται εγκόλπωση και αποικοδόμηση εξωκυτταρικών υλικών από συγκεκριμένα κύτταρα. Τα κύρια κύτταρα που επιτελούν την φαγοκυττάρωση είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα που ανήκουν στα λευκά αιμοσφαίρια, τα μονοκύτταρα και τα δενδροκύτταρα. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται για κύτταρα του οργανισμού τα οποία καταστρέφονται μετά από την απόπτωση, αλλά και για βακτήρια και ιούς που εισέρχονται στον οργανισμό. Στη φαγοκυττάρωση, συμμετέχουν τόσο τα φαγοκύτταρα

όσο και τα B- λεμφοκύτταρα και ο ρόλος τους αφορά την άμυνα σε διάφορους ιούς και βακτήρια. Στην πλασματική τους μεμβράνη έχει εντοπιστεί το ένζυμο οξειδάση του NADPH (NOX) που έχει σημαντικό ρόλο κυρίως στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στα βακτήρια, μέσω της παραγωγής του σουπεροξειδικού ανιόντος [44,43].

Η φλεγμονώδης απόκριση συμπεριλαμβάνει μία σειρά αντιδράσεων που συμβαίνει όταν στον οργανισμό επιδρούν διάφοροι βλαπτικοί παράγοντες, όπως παθογόνα, διάφορες χημικές ουσίες και τραυματισμένοι ιστοί. Κατά τη φλεγμονή παρατηρείται αγγειοδιαστολή στον συγκεκριμένο ιστό με αποτέλεσμα την αυξημένη ροή αίματος στην περιοχή. Στη διαδικασία αυτή λαμβάνουν χώρα διάφορες διεργασίες, όπως η φαγοκυττάρωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων για την αποκατάσταση του κατεστραμμένου ιστού. Τα λευκοκύτταρα που συγκεντρώνονται σε αυτή την περιοχή προκαλούν «αναπνευστική έκρηξη», προσλαμβάνοντας μεγάλες ποσότητες οξυγόνου, προκαλώντας αύξηση των ROS στην περιοχή. Επιπλέον, παράγονται κυτοκίνες, αραχιδονικό οξύ και χημειοκίνες που με τη σειρά τους παράγουν και αυτά περισσότερες ελεύθερες ρίζες [45].

E. Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια και συμμετέχουν στον καταβολισμό συγκεκριμένων μορίων, κυρίως λιπιδίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν H_2O_2 , προερχόμενο κυρίως από την διαδικασία της αποδόμησης των λιπαρών οξέων, που πραγματοποιείται έπειτα από πολύωρη νηστεία.

1.7.2 Εξωγενής παραγωγή

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό μπορεί να ενισχυθεί από μία πληθώρα εξωγενών παραγόντων. Μερικοί από αυτούς είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, το κάπνισμα, η υπέρυθη ακτινοβολία και η έκθεση σε διάφορα μεταλλικά ιόντα, κυρίως βαρέα μέταλλα (όπως το χρώμιο, το κοβάλτιο, το κάδμιο, το αρσενικό και το νικέλιο). Ακόμη, η διατροφή καθώς και η περιβαλλοντική ρύπανση είναι βασικοί παράγοντες για την παραγωγή των ελεύθερων ριζών [43].

1.8 Κατηγορίες ελεύθερων ριζών

1.8.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βρίσκονται σε πληθώρα στη φύση και σχηματίζονται από το μοριακό οξυγόνο (O_2). Για την παραγωγή του ύδατος (H_2O) απαιτείται αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά τέσσερα ηλεκτρόνια. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται από την «ατελή» αναγωγή του οξυγόνου. Η πιο απλή ρίζα οξυγόνου είναι το σουπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), το οποίο προκύπτει από την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Κατά την αναγωγή του O_2 κατά δύο ηλεκτρόνια προκύπτει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ η αναγωγή με τρία ηλεκτρόνια καταλήγει στην ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot). Παρόλο που το H_2O_2 δεν κατατάσσεται στις ρίζες, είναι αρκετά δραστικό και έχει την ικανότητα να μεταφέρεται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων. Γενικά έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής και μαζί με το σουπεροξειδικό ανιόν είναι αρκετά σημαντικά για την μεταγωγή σήματος. Το OH^\cdot προκύπτει από τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss, με την παρουσία σιδήρου ή χαλκού. Είναι αρκετά δραστική και πολλές φορές προκαλεί δυσμενή αποτελέσματα στα κύτταρα. Άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι το όζον (O_3), η ρίζα αλκοξειδίου (RO^\cdot), η ρίζα περοξυλίου (ROO^\cdot) καθώς και το μοριακό οξυγόνο (O_2).

1.8.2 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Η πιο δραστική ρίζα αζώτου είναι το ανιόν του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\cdot). Το ανιόν του μονοξειδίου του αζώτου δρα κυρίως ως νευροδιαβιβαστής και παράγεται από το αμινοξύ, L-αργινίνη. Η L-αργινίνη αντιδρά με το σουπεροξειδικό ανιόν παράγοντας NO^- και OH^\cdot [37, 38].

1.9 Η δράση των ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται από αρκετούς επιβλαβείς καθώς συνδέονται με την οξειδωτική βλάβη στα βιομόρια των κυττάρων. Ωστόσο στην πραγματικότητα, ο ρόλος των ελεύθερων ριζών είναι διττός, καθώς είναι τόσο απαραίτητες για βασικές λειτουργίες του οργανισμού, αλλά και δυνητικά επιβλαβείς. Συγκεκριμένα, οι δραστικές αυτές ενώσεις όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βασικές λειτουργίες στο κυτταρικό περιβάλλον, ενώ αντίθετα όταν οι συγκεντρώσεις αυτές ξεπεράσουν ένα συγκεκριμένο όριο τότε είναι πιθανόν να είναι επιζήμιες για τα βιομόρια.

1.9.1 Θετικές επιδράσεις

Κυρίως οι θετικές επιδράσεις των δραστικών αυτών μορφών αφορούν τη μεταγωγή σήματος, καθώς συμβάλλουν στην ενεργοποίηση διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών στα κύτταρα και έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τόσο τον ενδοκυττάριο όσο και τον εξωκυττάριο μεταβολισμό. Ο ασταθής χαρακτήρας των ελεύθερων ριζών είναι μείζονος σημασίας τόσο για το κύτταρο όσο και για τον ίδιο τον οργανισμό. Αποτελούν βασικό σημείο στην έναρξη κυτταρικών αντιδράσεων και για την τέλεση συγκεκριμένων λειτουργιών. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύσπαση των μυών, την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενζύμων καθώς και τη μεταγραφή γονιδίων. Ακόμη, είναι απαραίτητα για την σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων. Επίσης, ενισχύουν την απόπτωση όταν βρίσκονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και βοηθούν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς συμβάλλουν στη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών. Τέλος, μπορούν να τελέσουν και ως νευροδιαβιβαστές, όπως η ρίζα NO, η οποία μάλιστα είναι απαραίτητη για την αγγειοσυστολή [38].

1.9.2 Αρνητικές επιδράσεις

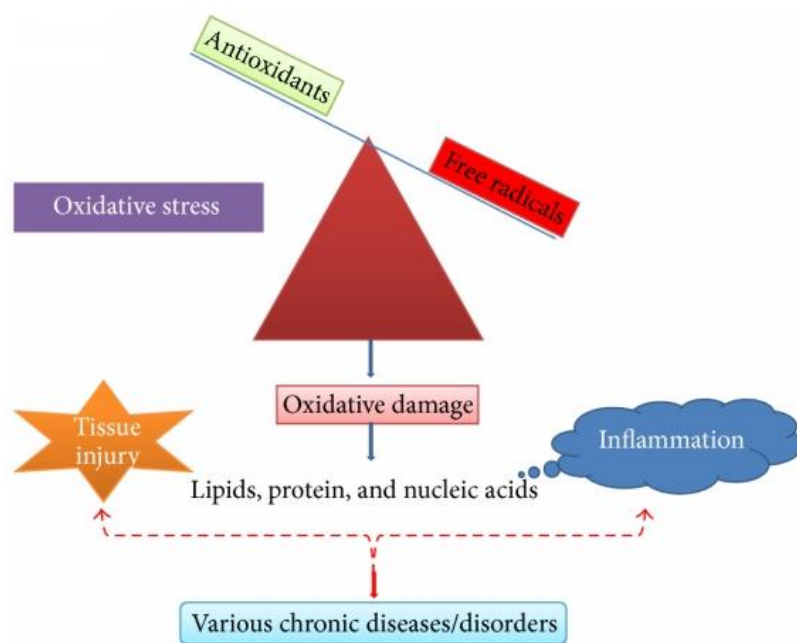
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, όταν οι ασταθείς αυτές ενώσεις βρίσκονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μέσα στα κύτταρα, μπορούν να προκαλέσουν μία πληθώρα βλαβών.

Οξειδωτικό στρες

Πρώτη φορά ο όρος «οξειδωτικό στρες» εμφανίστηκε τη δεκαετία του 1950 και περιγραφόταν από τους ερευνητές ως οι επιβλαβείς επιδράσεις που είχε το μοριακό οξυγόνο, η ιονίζουσα ακτινοβολία και οι ελεύθερες ρίζες, συσχετιζοντάς το με την γήρανση. Αργότερα, ο όρος αυτός άρχισε να χρησιμοποιείται συχνότερα και να μελετάται εκτενέστερα από την ερευνητική κοινότητα. Γενικά, ο συγκεκριμένος όρος ήταν στενά συνδεδεμένος με τις συνέπειες που είχε το ανιόν του σουπεροξειδίου στα κύτταρα και ευρύτερα στους οργανισμούς.

Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής πραγματοποιούνται φυσιολογικά στα κύτταρα. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση, δηλαδή η συγκέντρωση των ηλεκτρονίων μέσα σε ένα κύτταρο, σε φυσιολογικές συνθήκες έχει ένα μικρό εύρος μεταβολής, δηλαδή,

διατηρείται σε μία ισορροπία. Όταν η ισορροπία διαταραχτεί τότε μπορούν να προκληθούν δυσμενείς συνέπειες στον οργανισμό. Με τον όρο οξειδωτικό στρες εννοούμε τη διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, με τους προοξειδωτικούς μηχανισμούς να υπερτερούν σε βάρος των αντιοξειδωτικών (Εικόνα 7). Η ανισορροπία μπορεί να προκύπτει από την έκθεση του οργανισμού σε εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν την αύξηση των δραστικών ριζών, λόγω διάφορων παθολογικών καταστάσεων, αλλά και λόγω έλλειψης ή βλάβης μηχανισμών που έχουν την ικανότητα να αντισταθμίζουν τις βλάβες από τα ROS. Με τον όρο προοξειδωτικό, εννοείται κάθε ουσία που μπορεί να δράσει ως οξειδωτικό μέσο, δηλαδή να προσλάβει ηλεκτρόνια. Αντίθετα, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να έχουν αναγωγική δράση, καθώς στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής μπορούν να προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο [43].



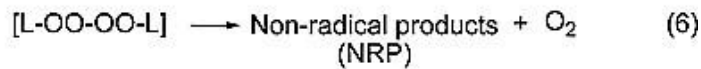
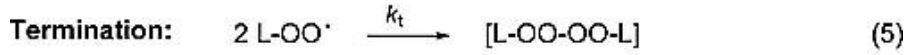
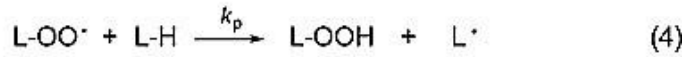
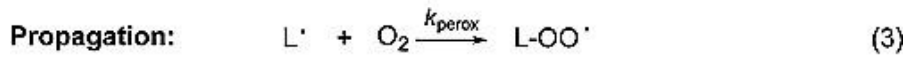
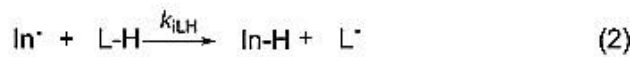
Εικόνα 7 Η διατάραξη του ισοζυγίου των προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, εις βάρος του δεύτερου, με αποτέλεσμα την πρόκληση του οξειδωτικού στρες [43]

Οι βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες προσβάλλουν κυρίως στα μακρομόρια, δηλαδή στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια.

A. Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι δομικά συστατικά της πλασματικής μεμβράνης και διακρίνουν τον εξωκυττάριο από τον ενδοκυττάριο χώρο. Αποτελούν στόχους κυρίως των ROS, με τα οποία και αντιδρούν οδηγώντας σε ένα φαινόμενο που ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση. Μάλιστα, η λιπιδική υπεροξειδωση έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η αθηροσκλήρωση και ο διαβήτης, καθώς και με τις νευροεκφυλιστικές νόσους, το Parkinson και το Alzheimer. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης, το οποίο είναι αρκετά πιθανό να προκαλέσει ακόμη και κυτταρικό θάνατο.

Η λιπιδική υπεροξειδωση τελείται σε τρία βασικά στάδια. Αρχικά, το έναυσμα της υπεροξειδωσης προκαλείται από τον σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας, μέσω ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων, που προσλαμβάνει ένα H (πρωτόνιο) από μία ομάδα μεθυλενίου ενός λιπιδίου. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει μία ρίζα λιπιδίου (L·), η οποία στη συνέχεια δέχεται ένα οξυγόνο σχηματίζοντας μία ρίζα υπεροξυλίου (LOO·). Η συγκεκριμένη ρίζα είναι αρκετά δραστική. Προκειμένου να οδηγηθεί σε μία χαμηλότερη ενεργειακά κατάσταση, άρα και πιο σταθερή, προσλαμβάνει ένα H από κάποιο άλλο λιπίδιο. Άρα, προκύπτει ένα λιπιδικό υδροϋπεροξείδιο (LOOH) και μία νέα ρίζα λιπιδίου. Στο τελικό στάδιο, δύο μόρια LOOH μπορούν να αντιδράσουν δίνοντας ως προϊόντα το μοριακό οξυγόνο και ενώσεις η οποίες δεν είναι ρίζες. Γενικά, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το αραχιδονικό, είναι πιο επιρρεπή στο να οξειδωθούν λόγω της δομής τους καθώς οι δεσμοί δεν είναι τόσο ισχυροί, με αποτέλεσμα να αποσπώνται πιο εύκολα. Αντίθετα, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ελαϊκό οξύ, είναι πιο δύσκολο να υποστούν οξείδωση (Εικόνα 8) [46].



Εικόνα 5 Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση [45]

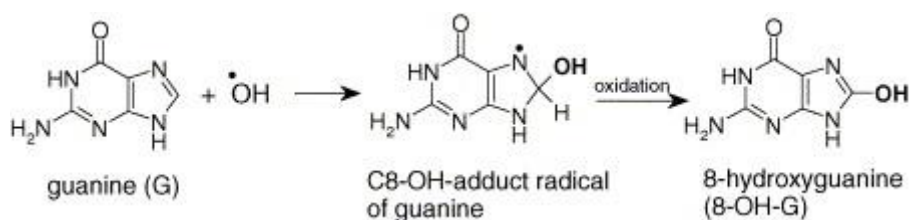
B. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες, ως προϊόντα της έκφρασης γονιδίων, αποτελούν έναν από τους βασικούς στόχους των ελεύθερων ριζών. Ειδικότερα, τα αμινοξέα αργινίνη, ιστιδίνη, λυσίνη και προλίνη είναι αρκετά επιρρεπή στο να υποστούν οξειδωση. Οι ελεύθερες ρίζες ενισχύουν τον σχηματισμό καρβονυλομάδων, δηλαδή αλδεϋδομάδες και κετονομάδες, στα αμινοξέα. Το πρωτεάσωμα είναι ένα σύμπλοκο το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα και ολιγοπεπτίδια, με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους από το κύτταρο. Οι καρβονυλομάδες όμως που σχηματίζονται δεν μπορούν να αποδομηθούν, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται. Επιπλέον, οι ομάδες θείου που παρατηρούνται σε συγκεκριμένα αμινοξέα (μεθειονίνη και κυστεΐνη) και σχηματίζουν φυσιολογικά δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, και μπορούν να οξειδωθούν και να μετατραπούν σε ρίζες θείου (RS[·]). Γενικά, η οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει απώλεια της λειτουργίας τους, διότι είναι μη αναστρέψιμη διαδικασία.

Γ. DNA

Οι ελεύθερες ρίζες καθώς προσπαθούν να προσλάβουν ένα ηλεκτρόνιο, συχνά το παίρνουν από το DNA, οδηγώντας σε ρήξεις και προκαλώντας βλάβες στους επιδιορθωτικούς του μηχανισμούς. Φαίνεται ότι οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν και τις αζωτούχες βάσεις του DNA, και ιδιαίτερα τη γουανίνη, σχηματίζοντας 8-υδρόξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη. Αν δεν επιδιορθωθεί το προϊόν αυτό από τους επιδιορθωτικούς

μηχανισμούς που διαθέτει το κύτταρο, τότε μπορεί να προκληθούν μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές μακροπρόθεσμα, όσο συσσωρεύονται, μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση και γήρανση των κυττάρων [38]. Επιπλέον, οι RNS μπορούν να αντιδράσουν και αυτές με την γουανίνη οδηγώντας στη δημιουργία νιτρογουανίνης. Η συγκεκριμένη αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε μεταστροφή, δηλαδή όταν μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη και το αντίστροφο. Η συνέπεια είναι η πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων, οι οποίες μπορεί να προβούν επιβλαβείς για το κύτταρο και ευρύτερα για τον οργανισμό (Εικόνα 9) [43].



Εικόνα 6 Η οξειδωση της αζωτούχου βάσης, γουανίνης και παραγωγή της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης [43]

1.10 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις οι οποίες έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και γίνονται οι ίδιες ρίζες, οι οποίες όμως σε αντίθεση με τις ελεύθερες ρίζες είναι σταθερές. Για τα αντιοξειδωτικά δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος ορισμός, ωστόσο περιγράφονται ως οποιαδήποτε ουσία που εξουδετερώνει, προλαμβάνει ή καθυστερεί την οξειδωτική βλάβη ενός υποστρώματος. Προκειμένου μία ουσία να θεωρείται καλός αντιοξειδωτικός παράγοντας πρέπει να διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Μερικά από αυτά είναι η γρήγορη απορρόφηση, η ικανότητα δράσης τους τόσο σε υδατικό όσο και λιπόφιλο περιβάλλον, και η δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τον ενδογενή αντιοξειδωτικό μηχανισμό, με σκοπό την παραγωγή περισσότερων αντιοξειδωτικών. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν αρκετοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που παράγουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά. Ακόμη, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να προσληφθούν και από εξωγενείς πηγές, όπως για παράδειγμα από την κατανάλωση συγκεκριμένων τροφών. Γενικά, τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά [43,38].

A. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

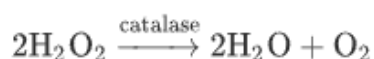
Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά στους οργανισμούς και ρόλος της είναι η κατάλυση της αναγωγής του O_2^- στις λιγότερο δραστικές μορφές H_2O_2 και O_2 . Στο ενεργό του κέντρο διαθέτει μία περιοχή στην οποία προσδένεται κάποιο μεταλλικό ιόν, και έτσι απαντώνται διαφορετικές ισομορφές αυτού του ενζύμου, ανάλογα με το μέταλλικό ιόν το οποίο προσδένεται. Στον ανθρώπινο οργανισμό εντοπίζονται τρεις ισομορφές του ενζύμου, η εξωκυτταρική SOD (EC-SOD), η CuZn-SOD που βρίσκεται στο κυτοσόλιο, και η μιτροχονδριακή Mn-SOD. Όπως προαναφέρθηκε τα μιτοχόνδρια είναι οι κύριοι παραγωγείς O_2^- στα οποία δρα η Mn-SOD, παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου.

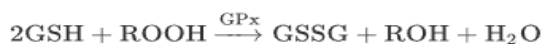
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο το οποίο είναι παρόν σε πληθώρα οργανισμών, εφόσον παρατηρείται σε ζωικά και φυτικά κύτταρα αλλά και σε αερόβια βακτήρια. Καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο όπως φαίνεται και στην αντίδραση:



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Το ένζυμο αυτό ανιχνεύεται σε δύο μορφές, τη μη- και την εξαρτώμενη από σελήνιο μορφή. Στον άνθρωπο υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές σελήνιο-εξαρτώμενες GPx. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιούν το H_2O_2 , παρεμποδίζοντάς το να συμμετέχει στις αντιδράσεις Fenton. Επομένως, ανταγωνίζεται με την καταλάση καθώς και τα δύο ένζυμα χρησιμοποιούν το ίδιο υπόστρωμα. Υπόστρωμα για αυτή την κατάλυση μπορεί να αποτελέσει επίσης το οργανικό υπεροξειδίο (ROOH). Κατά την αντίδραση αυτή, το H_2O_2 ή το ROOH, μέσω της οξείδωσης της γλουταθειόνης, (GSH) δίνουν ως προϊόντα νερό και αλκοόλη όπως παρατηρείται και στην αντίδραση:



B. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η γλουταθειόνη, η θειορεδοξίνη, το λιποϊκό οξύ, η βιταμίνη C και E, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και το σελήνιο.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί τη βασικότερη αντιοξειδωτική θειόλη και η δράση της στηρίζεται στην ομάδα θείου που διαθέτει. Απαντάται σε δύο μορφές στον οργανισμό, είτε στην ανηγμένη της μορφή (GSH), είτε στην οξειδωμένη (GSSG). Η σύνθεσή της πραγματοποιείται τόσο ενδογενώς, όσο και από αμινοξέα που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Ωστόσο η *de novo* σύνθεσή της πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ. Παρουσία μιας ελεύθερης ρίζας το υδρογόνο μπορεί εύκολα να αποσπαστεί από την γλουταθειόνη, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της ρίζας. Η ρίζα της γλουταθειόνης που παράγεται (GS[•]) είναι πιο σταθερή σε σύγκριση με άλλες ελεύθερες ρίζες και έχει την ικανότητα να διμερίζεται. Άρα το τελικό προϊόν που παράγεται, η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) δεν αποτελεί πλέον ρίζα. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής (όπου R[•] είναι η ελεύθερη ρίζα):



Η αναλογία GSH/GSSG χρησιμοποιείται ως δείκτης του οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς, με την ανηγμένη μορφή (GSH) να απαντάται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με την οξειδωμένη. Η γλουταθειόνη έχει τον βασικό ρόλο της προστασίας από το οξειδωτικό στρες, καθώς δρα ως συνένζυμο σε διάφορα ένζυμα που δρουν ως προστατευτικά ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, όπως το ένζυμο GPx. Επιπλέον, συμβάλλει στη μεταφορά αμινοξέων μέσα από την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και έχει τη δυνατότητα επαναφοράς της ενεργούς μορφής των βιταμινών C και E. Τέλος, η γλουταθειόνη έχει την ικανότητα της άμεσης εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου.

Θειορεδοξίνη και Λιποϊκό οξύ

Η θειορεδοξίνη (TRX) στην ανηγμένη της μορφή, διαθέτει μία σουλφομάδα, ενώ στην οξειδωμένη της μορφή μετατρέπεται σε δισουλφίδιο. Συνδράμει στην ρύθμιση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

Το λιποϊκό οξύ είναι παράγωγο του οκτανοϊκού οξέος και αποτελεί ένα δισουλφίδιο. Έχει αμφιπολική φύση, με αποτέλεσμα να απαντάται στο κυτταρόπλασμα αλλά και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό καθώς αλληλεπιδρά με τις δραστικές μορφές οξυγόνου εξουδετερώνοντάς τες, και συμβάλλει στην «αναγέννηση» των βιταμινών C και E, καθώς και της γλουταθειόνης.

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ, είναι ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό, το οποίο λόγω της υδροφιλικότητάς του εντοπίζεται και δρα σε περιοχές του οργανισμού με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, όπως ο φακός του οφθαλμού. Δρα συνήθως μαζί με τη βιταμίνη E και τα καροτενοειδή, όπου μαζί με τη βιταμίνη E μπορούν να παράξουν α-τοκοφερόλη από ρίζες α-τοκοφερολών που τοποθετούνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ο άνθρωπος μπορεί να προσλάβει τη βιταμίνη C μόνο εξωγενώς, δηλαδή μέσω της διατροφής ή της λήψης συμπληρωμάτων.

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, η οποία αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό. Η α-τοκοφερόλη, η πιο ενεργή μορφή βιταμίνης E, στον άνθρωπο εντοπίζεται κυρίως προσδεδεμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Βασικός της ρόλος της είναι η προστασία των λιπιδίων από την λιπιδική υπεροξείδωση.

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή αποτελούν χρωστικές, οι οποίες συντίθενται στους φυτικούς οργανισμούς και τους μικροοργανισμούς και τους προσδίδουν κόκκινο και πορτοκαλί χρώμα. Πέρα από την ιδιότητά τους ως χρωστικές δρουν και ως αντιοξειδωτικά. Το β-καροτένιο, ένα ισχυρό καροτενοειδές, έχει παρατηρηθεί ότι προστατεύει τα λιπίδια από την λιπιδική υπεροξείδωση.

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις και παράγονται στα φυτά. Έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν πλήθος ελεύθερων ριζών και ιδιαίτερα των δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ παράλληλα μπορούν να αναστείλουν την λιπιδική υπεροξειδωση. Σε αρκετές αντιδράσεις εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών λαμβάνουν τον ρόλο του τερματιστή, καθώς η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι αρκετά σταθερή και συνήθως δεν επάγει περαιτέρω αντιδράσεις.

Σελήνιο

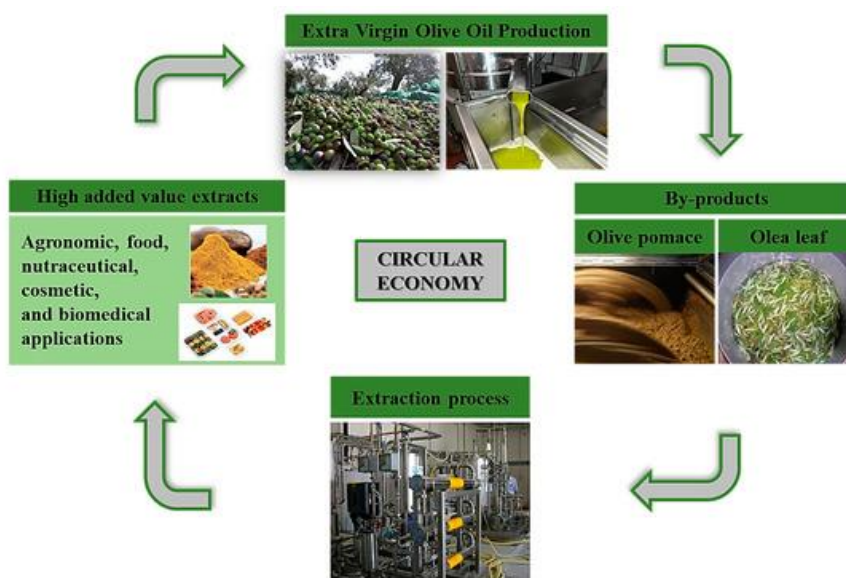
Το σελήνιο είναι ένα μέταλλο το οποίο μέσω της σύνδεσής του με την GPx λαμβάνει μέρος και στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού. Γενικά, τα ένζυμα που συνδέονται με το σελήνιο φαίνεται να ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του οξυγόνου και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος [43].

1.11 Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις της ελιάς

Η ελιά και τα προϊόντα που παράγονται από αυτή, αποτελούν βασικά στοιχεία της Μεσογειακής διατροφής. Η κατανάλωση τους προσφέρει πληθώρα θετικών επιδράσεων ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως τη μείωση εμφάνισης συγκεκριμένων παθήσεων του καρδιαγγειακού συστήματος, την πρόληψη εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νόσων καθώς και την πρόληψη εμφάνισης ορισμένων μορφών καρκίνου. Τα κύρια αντιοξειδωτικά του ελαιόκαρπου είναι οι φαινολικές ενώσεις και συγκεκριμένα οι πολυφαινόλες, οι οποίες εμφανίζουν πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική τους δράση σχετίζεται με τον αρωματικό δακτύλιο που διαθέτουν, καθώς κατά την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών η πολυφαινολική ρίζα που προκύπτει είναι σταθερή, με αποτέλεσμα να μην ενισχύει κάποια αλυσίδα αντιδράσεων για την εξουδετέρωσή της.

Τα αντιοξειδωτικά της ελιάς μπορούν να προσληφθούν από τον άνθρωπο τόσο μέσω του ελαιόλαδου όσο και μέσω της επιτραπέζιας ελιάς. Στο ελαιόλαδο οι κύριες πολυφαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται είναι η τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα μικρό ποσοστό των συνολικών πολυφαινολών του ελαιόκαρπου καταλήγει στο ελαιόλαδο. Ωστόσο, κατά την

παραγωγή ελαιόλαδου, στο υδατικό κλάσμα που παράγεται, στο οποίο ανήκουν και τα απόβλητα του ελαιοτριβείου, παρουσιάζει υψηλό φαινολικό περιεχόμενο. Ειδικότερα, περίπου το 50% των συνολικών πολυφαινολών που ανιχνεύονται στον ελαιόκαρπο καταλήγουν στα υδατικά κλάσματα και στην ελαιόπαστα. Στα υδατικά απόβλητα κυριαρχούν οι πολυφαινόλες, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, όπως και το βανιλλικό και ομοβανιλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το 3,4-διυδροξυμαντελικό οξύ και το p- κουμαρικό οξύ. Επιπλέον διαθέτουν και άλλες μη φαινολικές ενώσεις, όπως ταννίνες, λιγνίνη, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και ανηγμένα σάκχαρα. Τα υδατικά απόβλητα χαρακτηρίζονται από καφέ χρώμα και χαρακτηριστική έντονη οσμή, ενώ παράλληλα διαθέτουν όξινο pH. Λόγω του υψηλού πολυφαινολικού περιεχομένου των υδατικών αποβλήτων της ελιάς δεν μπορεί να γίνει απορριψή τους στο φυσικό περιβάλλον, καθώς είναι τοξικά για τα φυτά, τους υδρόβιους οργανισμούς και τους μικροοργανισμούς του εδάφους [47].



Εικόνα 10 Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την παραγωγή ελαιόλαδου και η αξιοποίησή τους ως συμπληρώματα σε βρώσιμα, φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα [35]

1.12 Απορρόφηση των πολυφαινολών κατά την πέψη

Η απορρόφηση των πολυφαινολών λαμβάνει χώρα στην αρχή του λεπτού εντέρου αφού πρώτα καταναλωθεί τροφή που περιέχει τέτοιου είδους ενώσεις, όπου και υδρολύονται. Προκειμένου να απορροφηθούν από τον οργανισμό, υδρολύονται από ενζυμα του εντερικού σωλήνα, όπως είναι οι λακτάσες και οι β-γλυκοσιδάσες, ή μεταβολίζονται από την εντερική χλωρίδα. Τα προϊόντα που προκύπτουν από τον μεταβολισμό παρουσιάζουν καλύτερη απορρόφηση από το έντερο. Οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο αίμα και τους ιστούς διαφέρουν σε σύγκριση με τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στην τροφή. Η απορρόφηση, ο μεταβολισμός αλλά και η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών είναι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την θετική επίδραση που έχουν αυτές οι ενώσεις στην ανθρώπινη υγεία [36, 37].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η μελέτη δειγμάτων ελαιόκαρπου από περιοχές τις Νοτιοδυτικής Μαγνησίας, με στόχο τη διερεύνηση της βιοδραστικότητας της περιοχής. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε υδατικό κλάσμα δειγμάτων ελαιόκαρπου που λήφθηκαν από ποικιλίες της περιοχής του ελαιώνα του νομού Μαγνησίας. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS^{•+}) (μέθοδος ABTS), η ικανότητα εξουδετέρωσης των ανιοντικών ριζών σουπεροξειδίου (μέθοδος Superoxide), και ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (μέθοδος Folin-Ciocalteu).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης σειράς πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιόκαρπου, που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες της ευρύτερης περιοχής του ελαιώνα της Νοτιοδυτικής Μαγνησίας το έτος 2022, με στόχο τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων ελιάς και τον έλεγχο της βιοδραστικότητας της περιοχής. Γι'αυτή την αξιολόγηση, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ικανότητας εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας ABTS⁺ καθώς και της ικανότητας εξουδετέρωσης του σουπεροξειδικού ανιόντος. Παράλληλα υπολογίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων με τη βοήθεια του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Οι συγκεκριμένες πειραματικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν σε υδατικό κλάσμα δειγμάτων ελιάς. Τέλος, όλες οι μέθοδοι έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

.....

3.2 Χημικά αντιδραστήρια

2,2 -Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt (ABTS) (1mM) (Alfa Aesar), H₂O₂ (30 μM) (Sigma-Aldrich), Peroxidase from horseradise (HRP) (6 mM) (SERVA), ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (16 mM) (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, SERVA), Nitro blue tetrazolium (NBT) (300 μM) (SERVA), β-Nicotinamide adenine dinucleotide reduced- Na₂ (NADH) (468 μM) (SERVA), Phenazine methosulfate (PMS) (60μM) (Sigma), διάλυμα Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich), ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) (25% w/v) (Riedel-de Haen), απιονισμένο νερό (dH₂O), 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (γαλλικό οξύ) (Alfa Aesar), ασκορβικό οξύ (KAROCHEM).

3.3 Προετοιμασία των δειγμάτων

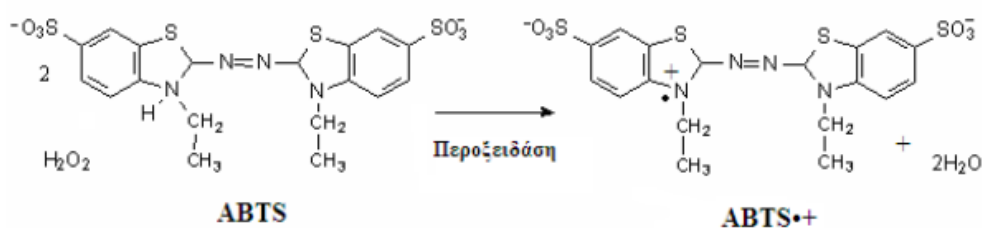
Προκειμένου να πραγματοποιηθεί λήψη των υδατικών κλασμάτων στα δείγματα ελιάς, έγινε αρχικά διαχωρισμός του επικαρπίου και του μεσοκαρπίου από τον πυρήνα του ελαιόκαρπου και απόρριψη του τελευταίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίησή τους και έπειτα η ελαιόπαστα φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 20min, στους 4°C. Από τη φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου προέκυψαν τρεις διακριτές φάσεις. Στην πάνω φάση εντοπίζεται το ελαιώδες κλάσμα, ενδιάμεσα υπάρχουν υπολείμματα του επικαρπίου, ενώ στο κάτω μέρος βρίσκεται η υδατική

φάση. Έπειτα, με τη χρήση πιπέτας έγινε λήψη αρχικά της ελαιώδους φάσης και στη συνέχεια της υδατικής, στην οποία πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 10min, στους 4°C. Το υδατικό κλάσμα αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια erpendorf στους -20 °C μέχρι την ανάλυση.

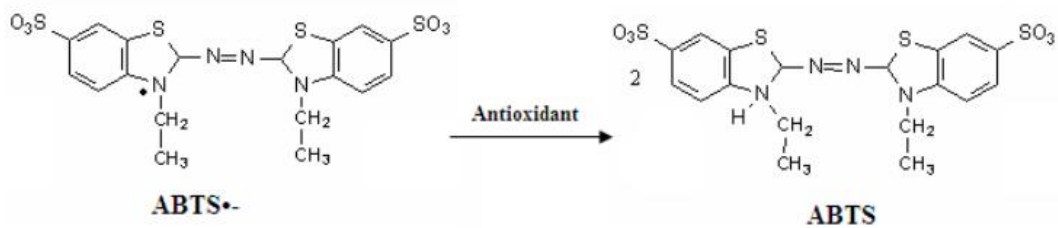
3.4 Πειραματική Διαδικασία

3.4.1 Προσδιορισμός την ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων του εξεταζόμενου δείγματος με τη σταθερή ρίζα ABTS^{•+} και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η ρίζα αυτή είναι τεχνητή και παράγεται από την οξείδωση του ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)), μέσω της δράσης υπεροξειδάσης (HRP, Horseradish peroxidase) παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Το ABTS^{•+} είναι μία ουσία που φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της υπό εξέταση ουσίας προηγείται ο σχηματισμός της ρίζας και έπειτα επωασή της με την εν λόγω ουσία (Εικόνα 11). Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση, η οπτική απορρόφηση στα 730 nm ελαττώνεται λόγω της αναγωγής του ABTS^{•+} με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (Εικόνα 12).



Εικόνα 11 Παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} μέσω της δράσης υπεροξειδάσης παρουσία H₂O₂



Εικόνα 12 Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με την ρίζα του ABTS⁺

Σε πλαστικά σωληνάκια erppendorf όγκου 1,5 ml προστέθηκαν 0,400 ml απιονισμένο νερό, 0,500 ml διάλυμα ABTS 1mM, 0,050 ml διάλυμα H₂O₂ 30 μM και 0,050 ml διάλυμα HRP 6 mM για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης του δείγματος. Ίδιες ποσότητες των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή του θετικού μάρτυρα. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν αρνητικά δείγματα ελέγχου και το τυφλό, όπου προστέθηκαν 0,450 ml απιονισμένο νερό, 0,500 ml διάλυμα ABTS 1mM, και 0,050 ml διάλυμα H₂O₂ 30 μM. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάδευση των δειγμάτων με vortex και επώαση τους για 45 min στο σκοτάδι. Ακολούθησε προσθήκη 0,050 ml διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος στα θετικά δείγματα και στους αρνητικούς μάρτυρες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάδευση όλων των δειγμάτων στο vortex και μέτρηση της απορροφησής τους στα 730 nm. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το πρότυπο αντιοξειδωτικό, ασκορβικό οξύ.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν σε % ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και υπολογίστηκαν από τον τύπο :

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

Από τον συγκεκριμένο τύπο υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀, η οποία ορίζεται ως η συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος στην οποία επιτυγχάνεται εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50 %.

RSC: Radical Scavenging Capacity

3.4.2 Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$)

Η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ παράγεται φυσιολογικά από τον ανθρώπινο οργανισμό και έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί βλάβες στο DNA, στα ένζυμα, τους πολυσακχαρίτες και τις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ ίσως να είναι υπεύθυνη για την υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Το $O_2^{\cdot-}$ προέρχεται από την οξείδωση του NADH και αναλύεται μέσω της αναγωγής του NBT. Το NBT²⁺ έχει κίτρινο χρώμα και το $O_2^{\cdot-}$ το μειώνει με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτική δράση μπορούν να αναστείλουν τον σχηματισμό του μπλε χρώματος από το NBT.

Σε σωληνάκια erpendorf όγκου 1,5 ml προστέθηκαν 0,050 ml διαδοχικών αραιώσεων δείγματος στο θετικό δείγμα και στο αρνητικό δείγμα ελέγχου ενώ 0,050 ml dH₂O προστέθηκαν στον θετικό μάρτυρα. Ακολούθησε προσθήκη του διαλύματος Tris-HCl 16 mM 0,800 ml στο τυφλό, 0,650 ml στο θετικό δείγμα και στον θετικό μάρτυρα και 0,750 ml στο αρνητικό δείγμα ελέγχου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,125 ml διαλύματος NBT 300 μM και 0,125 ml διαλύματος NADH 468 μM σε όλα τα δείγματα. Έπειτα, προστέθηκαν 0,125 ml διαλύματος PMS 60 μM στο θετικό δείγμα και στον θετικό μάρτυρα. Ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων vortex, επώαση για 5 min στο σκοτάδι, και μέτρηση της απορρόφησης στα 560 nm. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το πρότυπο αντιοξειδωτικό, γαλλικό οξύ.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν σε % ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και υπολογίστηκαν από τον τύπο :

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100.$$

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η τιμή IC50.

3.4.3 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο της υπό εξέτασης ουσίας προσδιορίζεται μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, το οποίο είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$, $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$). Το προϊόν που προκύπτει είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo – W) το οποίο φέρει μπλε χρώμα και απορροφά στα 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία φαινολικών ιόντων χωρίς να διαταράσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης.

Σε σωληνάκια eppendorf 2ml προστέθηκαν 1ml dH_2O , 0,100 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και 0,020 ml του εξεταζόμενου δείγματος στο θετικό δείγμα. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν αρνητικά δείγματα ελέγχου και ένα τυφλό δείγμα. Στα αρνητικά δείγματα ελέγχου προστέθηκαν 1,100 ml dH_2O και 0,020 ml του εξεταζόμενου δείγματος, ενώ στο τυφλό προστέθηκαν 1,020 ml dH_2O και 0,100 ml αντιδραστηρίου FolinCiocalteu. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύτηκαν στο vortex και επώαστηκαν για 3 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 280 ml Na_2CO_3 και 600 ml dH_2O σε όλα τα δείγματα, αναδευσή τους σε vortex και επώασή τους για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η οπτική απορρόφηση μετράται στα 765 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/ml εκχυλίσματος και υπολογίζονται με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος.

3.5 Στατιστική ανάλυση

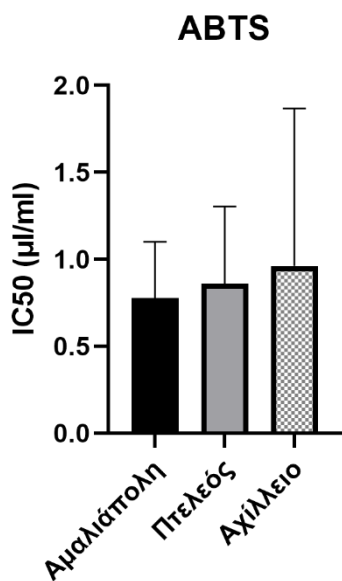
Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά ανάλυση διακύμανσης μέσω του τεστ Kruskal-Wallis, με σκοπό τον μη παραμετρικό έλεγχο της διαφοράς των μέσων τιμών τριών ανεξάρτητων τοποθεσιών. Επίσης πραγματοποιήθηκε συσχέτιση του πολυφαινολικού περιεχομένου με τις *in vitro* μεθόδους και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε τεστ Mann-Whitney με σκοπό τον έλεγχο των μέσων τιμών ανάμεσα σε συσχετιζόμενα δείγματα. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο υπολογιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 9 και τα δεδομένα εκφράζονται ως mean \pm SD, ενώ οι διαφορές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

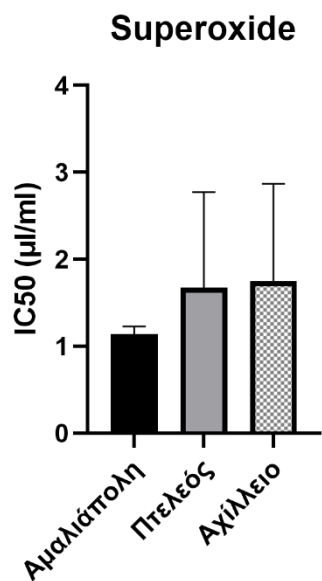
4.1 Σύγκριση των ποικιλιών ελιάς ανά περιοχή

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συνολικά 49 δειγμάτων ελαιόκαρπου μέσω *in vitro* δοκιμασιών. Μελετήθηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών ABTS^{•-} (μέθοδος ABTS) και η ικανότητα εξουδετέρωσης του O₂^{•-} (μέθοδος Superoxide). Τα αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους παρουσιάζονται ως IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση δείγματος που απαιτείται για της εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu) από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Παράρτημα).

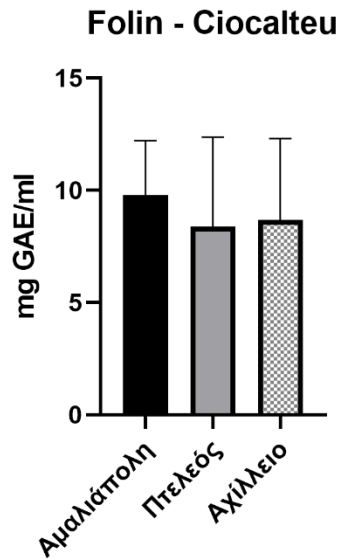
Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ δειγμάτων που λήφθηκαν από ελαιώνες στις περιοχές της Αμαλιάπολης, του Πτελεού και του Αχιλλείου, που ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή της Νοτιοδυτικής Μαγνησίας. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών IC₅₀ των ελαιόκαρπων από κάθε περιοχή στις τεχνικές ABTS ($p=0,8866$) και Superoxide ($p=0,6561$) (Γράφημα 1, Γράφημα 2). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των ελαιόκαρπων που συλλέχθηκαν από τις συγκεκριμένες περιοχές ($p=0.6587$) (Γράφημα 3).



Γράφημα 1: Σύγκριση 3 ελαιοπαραγωγικών περιοχών της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας με τη μέθοδο ABTS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.



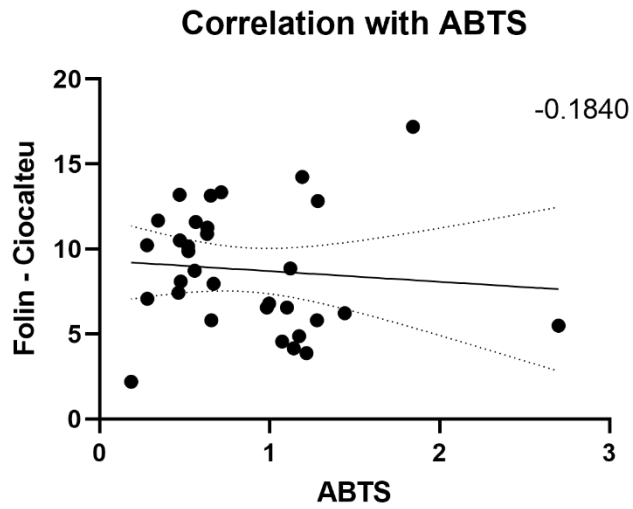
Γράφημα 2: Σύγκριση 3 ελαιοπαραγωγικών περιοχών της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας με τη μέθοδο Superoxide. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.



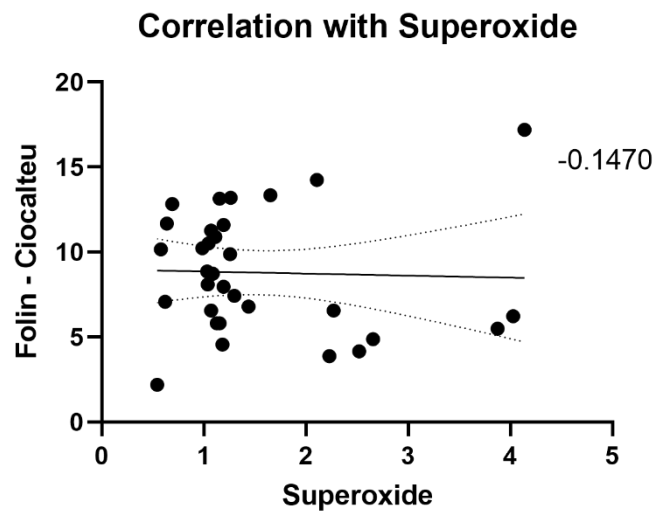
Γράφημα 3: Σύγκριση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου 3 ελαιοπαραγωγικών περιοχών της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ±SD.

4.2 Συσχέτιση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ελαιόκαρπων με κάθε *in vitro* μέθοδο

Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση του πολυφαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο ABTS, όπου προέκυψε αρνητική συσχέτιση με συντελεστή -0,1840 (Γράφημα 4). Αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε και κατά τη συσχέτιση του πολυφαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Superoxide, με συντελεστή -0,1470 (Γράφημα 5).



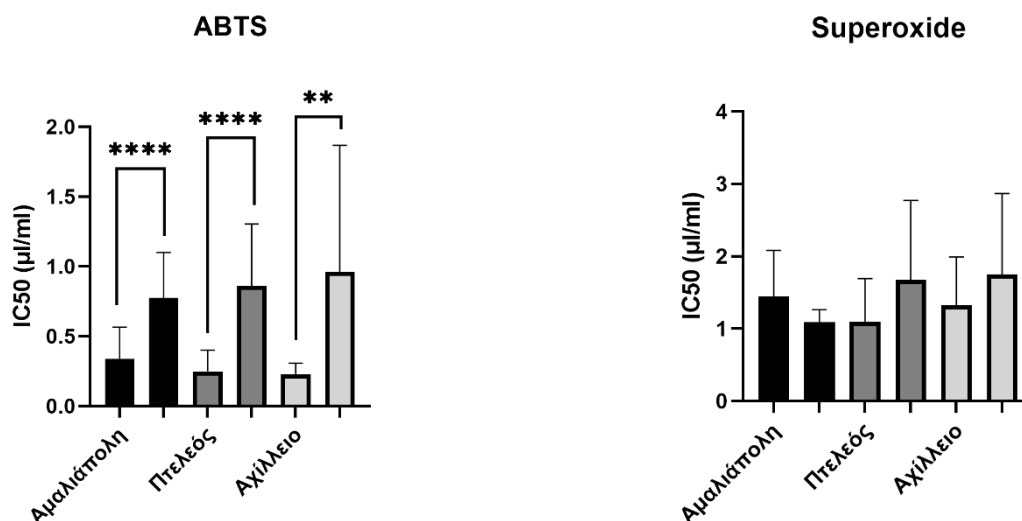
Γράφημα 4: Συσχέτιση του πολυφαινολικού περιεχομένου ελαιόκαρπου με τη μέθοδο ABTS.



Γράφημα 5: Συσχέτιση του πολυφαινολικού περιεχομένου ελαιόκαρπου με τη μέθοδο Superoxide .

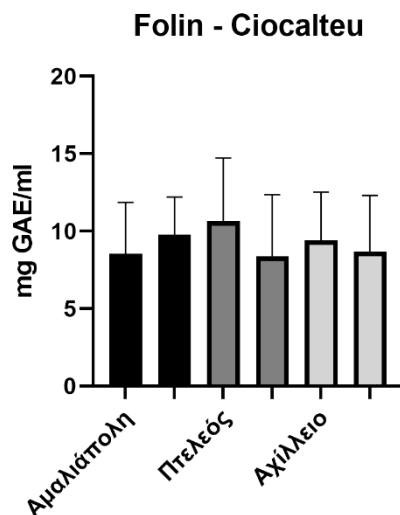
4.3 Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου ανά περιοχή μεταξύ των ετών 2021-2022 σε in vitro μεθόδους

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ποικιλιών ελαιόκαρπου ανά περιοχή για τα καλλιεργητικά έτη 2021- 2022, όπου στη μέθοδο ABTS παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για την περιοχή της Αμαλιάπολης, του Πτελεού, και του Αχιλλείου (** $\rightarrow p < 0,01$, **** $\rightarrow p < 0,0001$) με τη χρονιά 2021 να παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές IC50 (Γράφημα 6). Στη μέθοδο Superoxide, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ετών (Γράφημα 7). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο πολυφαινολικό περιεχόμενο μεταξύ των ετών 2021 και 2022 (Γράφημα 8).



Γράφημα 6: Σύγκριση 3 ελαιοπαραγωγικών περιοχών της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας για τις χρονιές 2021-2022 με τη μέθοδο ABTS. Σε κάθε ράβδο αριστερά φαίνεται η χρονιά 2021, ενώ δεξιά η χρονιά 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.

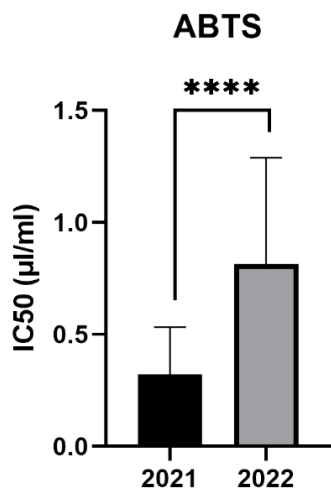
Γράφημα 7: Σύγκριση των ελαιοπαραγωγικών περιοχών της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας για τις χρονιές 2021-2022 με τη μέθοδο Superoxide. Σε κάθε ράβδο αριστερά φαίνεται η χρονιά 2021, ενώ δεξιά η χρονιά 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.



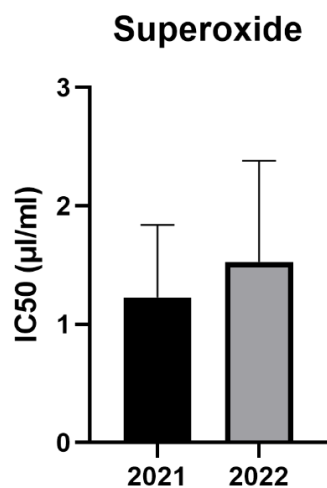
Γράφημα 8: Σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου των ελαιοπαραγωγικών περιοχών της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας για τις χρονιές 2021-2022 . Σε κάθε ράβδο αριστερά φαίνεται η χρονιά 2021, ενώ δεξιά η χρονιά 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ±SD.

4.4 Σύγκριση δειγμάτων ελαιόκαρπου συγκεντρωτικά μεταξύ των ετών 2021-2022

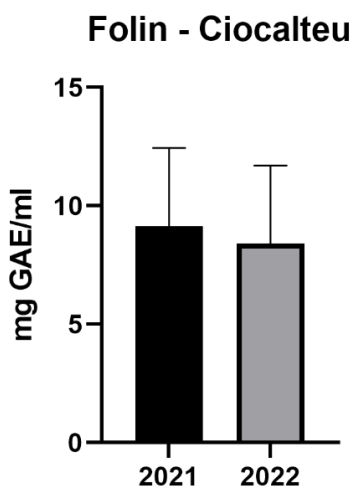
Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου ανά μέθοδο για τις χρονιές 2021 και 2022 συγκεντρωτικά, και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (**** $\rightarrow p < 0,0001$) στη μέθοδο ABTS, με τα δείγματα ελαιόκαρπου που συλλέχθηκαν το 2021 να εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές IC50 (Γράφημα 9). Στη μέθοδο Superoxide δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων για τα δύο έτη (Γράφημα 10). Επίσης, το πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων που εξετάστηκαν τις δύο χρονιές δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά (Γράφημα 11).



Γράφημα 9: Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου για τις χρονιές 2021-2022 με τη μέθοδο ABTS. Σε κάθε ράβδο αριστερά φαίνεται η χρονιά 2021, ενώ δεξιά η χρονιά 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.



Γράφημα 10: Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου για τις χρονιές 2021-2022 με τη μέθοδο Superoxide. Σε κάθε ράβδο αριστερά φαίνεται η χρονιά 2021, ενώ δεξιά η χρονιά 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.



Γράφημα 11: Σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου δειγμάτων ελαιόκαρπου για τις χρονιές 2021-2022. Σε κάθε ράβδο αριστερά φαίνεται η χρονιά 2021, ενώ δεξιά η χρονιά 2022. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SD.

Πίνακας 2 Υπολογισμένες τιμές του πολυφαινολικού περιεχομένου και των τιμών IC50 των *in vitro* τεχνικών (ABTS, Superoxide, Folin-Ciocalteu) σε δείγματα ελαιόκαρπου ανά περιοχή.

| Δείγμα ελαιόκαρπου | | ABTS IC50 (μl/ml) | Superoxide IC50 (μl/ml) | Folin-Ciocalteu mg GAE/ml |
|--------------------|-----------|----------------------|----------------------------|------------------------------|
| Αμαλιάπολη | Δείγμα 14 | 0,566 | 1,193 | 7,833 |
| | Δείγμα 22 | 0,465 | 1,300 | 11,591 |
| | Δείγμα 25 | 1,284 | 0,691 | 7,430 |
| | Δείγμα 53 | 0,632 | 1,113 | 12,821 |
| | Δείγμα 54 | 1,280 | 1,155 | 10,889 |
| | Δείγμα 55 | 0,635 | 1,071 | 5,805 |
| | Δείγμα 56 | 0,671 | 1,193 | 11,254 |
| | Δείγμα 58 | 0,985 | 1,071 | 7,964 |
| Πτελεός | Δείγμα 3 | 1,122 | 1,033 | 6,794 |
| | Δείγμα 8 | 0,559 | 1,087 | 8,863 |
| | Δείγμα 12 | 0,715 | 1,650 | 8,730 |
| | Δείγμα 16 | 0,654 | 1,154 | 7,076 |
| | Δείγμα 21 | 0,471 | 1,262 | 13,135 |
| | Δείγμα 32 | 0,573 | 0,627 | 9,618 |
| | Δείγμα 76 | 1,102 | 2,270 | 5,805 |
| | Δείγμα 78 | 1,443 | 4,030 | 4,551 |
| | Δείγμα 80 | 1,175 | 2,656 | 6,231 |
| | Δείγμα 81 | 1,217 | 2,229 | 4,882 |
| Αχίλλειο | Δείγμα 19 | 2,701 | 3,877 | 4,162 |
| | Δείγμα 23 | 1,193 | 2,106 | 5,491 |
| | Δείγμα 33 | 0,522 | 1,258 | 14,249 |
| | Δείγμα 82 | 0,478 | 1,037 | 9,879 |
| | Δείγμα 83 | 0,588 | 0,986 | 8,094 |

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Γενικά

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις έχουν βασικό ρόλο στην προστασία των βιομορίων, των κυττάρων και γενικά του οργανισμού από τις βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες και κατ' επέκταση του οξειδωτικού στρες. Γι' αυτό η προσληψή τους ιδιαίτερα μέσω της τροφής κρίνεται απαραίτητη για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των προοξειδωτικών παραγόντων στον οργανισμό. Οι πολυφαινόλες είναι ενώσεις που έχουν την ικανότητα να δράσουν ως αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Παράγονται φυσιολογικά από τους φυτικούς οργανισμούς και λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Η προσληψή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί από τον άνθρωπο μόνο μέσω της διατροφής, και συνδέεται με αρκετά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία που αφορούν το αντιοξειδωτικό προφίλ του οργανισμού.

Ο ελαιόκαρπος και τα παραγωγά του αποτελούν σημαντική πηγή πολυφαινόλων για τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ συνδέονται άρρικτα με τη Μεσογειακή Διατροφή η οποία χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση πληθώρας φρούτων, λαχανικών, ψαριών και δημητριακών, από τη χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος και μεσαία με χαμηλή κατανάλωση από γαλακτοκομικά και αβγά. Η βιβλιογραφία σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις του ελαιόλαδου είναι εκτεταμένη και η συνιστώμενη καταναλωσή του είναι 20 g τη μέρα για τη διατήρηση των υγιών επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, καθώς και για την προστασία των λιπαρών οξέων από οξείδωση. Για την κατανάλωση της επιτραπέζιας ελιάς δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα, ωστόσο τα οφέλη που αποκομίζει ο οργανισμός από την κατανάλωση της είναι αρκετά και σχετίζονται τόσο την πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών οξέων όσο και πληθώρας πολυφαινόλων.

5.2 Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας για τη χρονιά 2022

Στην παρούσα *in vitro* μελέτη εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα υδατικής φάσης δειγμάτων ελαιόκαρπου που συλλέχθηκαν από ελαιώνες της νοτιοδυτικής Μαγνησίας, με στόχο τη σύγκριση της βιοδραστικότητας των δειγμάτων ανά περιοχή.

Οι *in vitro* μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε υδατικά κλάσματα ελαιόκαρπου, που λήφθηκαν από την ομογενοποίηση και τη φυγοκέντρηση των συγκεκριμένων δειγμάτων. Τα υδατικά κλάσματα επιλέχθηκαν με σκοπό την προσομοίωση των διαδικασιών που εκτελούνται στο ελαιοτριβείο κατά την παραγωγή ελαιόλαδου, αλλά και λόγω της καλύτερης υδατοδιαλυτότητας των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στη φάση αυτή. Οι πολυφαινόλες έχουν αμφίφιλη φύση και παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στην υδατική φάση, με αποτέλεσμα μετά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης κατά την επεξεργασία του ελαιόκαρπου, να καταλήγει η πλειοψηφία των πολυφαινολικών ενώσεων στο υδατικό κλάσμα και στην ελαιόπαστα [29]. Επιπρόσθετα, οι *in vitro* δοκιμασίες που επιλέχθηκαν για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων αλλά και του πολυφαινολικού περιεχομένου τους (ABTS, Superoxide, Folin-Ciocalteu) χρησιμοποιούν ως διαλύτη το νερό, επομένως κρίνονται κατάλληλες για τους πειραματικούς ελέγχους στα υδατικά κλάσματα.

Σε σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου που πραγματοποιήθηκε με βάση τη γεωγραφική περιοχή, σε όλες τις μεθόδους (Γραφήματα 1-3) δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι τρεις διαφορετικές περιοχές που εξετάστηκαν δεν έχουν μεγάλες διαφορές τόσο στην εδαφική τους σύσταση όσο και στο κλίμα που επικρατεί στην κάθε μία, αλλά και πιθανώς να οφείλεται και στην ετερογένεια των δειγμάτων κάθε περιοχής.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι εδαφικές συνθήκες και το κλίμα της κάθε περιοχής είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ποιότητα και τη μορφολογία του ελαιόκαρπου, καθώς η ωρίμανση του καρπού συνδέεται με τις συνθήκες που επικρατούν. Συγκεκριμένα, οι ξηρικές συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή τα ελαιόδεντρα που ποτίζονται μόνο από το νερό της βροχής, αλλά και η εκτεταμένη έκθεση των ελαιόκαρπων στην ηλιακή ακτινοβολία, ιδιαίτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, μπορούν να συντελέσουν σε αυξημένα επίπεδα των πολυφαινολών στον ελαιόκαρπο, ως αποτέλεσμα του εκτεταμένου στρες που υφίστανται τα ελαιόδενδρα. Επίσης, οι παράγοντες αυτοί μπορούν να επηρεάσουν και τη μορφολογία του καρπού, οδηγώντας στην παραγωγή μικρότερων καρπών, αλλά και να μεταβάλλουν τη σύσταση σημαντικών ενώσεων, οδηγώντας στην αύξηση των

λιπαρών οξέων και στην αύξηση του ποσοστού των ανθοκυανινών κατά την ωρίμαση του καρπού [49].

Οι περιοχές που μελετήθηκαν (Αμαλιάπολη, Πτελεός, Αχίλλειο) τοποθετούνται στην ευρύτερη περιοχή του ελαιώνα της ΝΔ Μαγνησίας, και βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους. Συνεπώς, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στις συγκεκριμένες περιοχές είναι αρκετά όμοιες. Επιπλέον, τα ελαιόδεντρα που καλλιεργούνται στις περιοχές αυτές ανήκουν στην ίδια ποικιλία, καθώς η επικρατούσα ποικιλία στην περιοχή της Μαγνησίας είναι η ποικιλία Αμφίσσης. Επομένως, για τις συγκεκριμένες αιτίες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της βιοδραστικότητας της κάθε περιοχής. Επιπλέον, καθώς η καλλιεργητική κατεύθυνση της συγκεκριμένης περιοχής είναι η παραγωγή ελαιόκαρπου που προορίζεται για επιτραπέζια κατανάλωση, αλλά και ελαιόλαδου, η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Συνεπώς, η σύσταση των καρπών ακόμη και στο ίδιο το δένδρο μπορεί να ποικίλει σημαντικά, και το πολυφαινολικό προφίλ των ελαιόκαρπων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ωρίμασης [59].

Στη συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου με τις *in vitro* μεθόδους αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS και Superoxide), φάνηκε αρνητική, αλλά ασθενής συσχέτιση (Γράφημα 4 και 5). Δηλαδή, φαίνεται ότι δείγματα ελαιόκαρπου που διαθέτουν υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο, στις μεθόδους αντιοξειδωτικής δράσης εμφανίζουν χαμηλότερη τιμή IC50, δηλαδή οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των δειγμάτων μπορούν να αποδοθούν στις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχουν. Αντίστοιχα, από τα δείγματα με χαμηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο προκύπτουν υψηλές τιμές IC50. Δηλαδή, όσο μικρότερη είναι η τιμή IC50, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας που εξετάζεται. Ωστόσο, η ασθενής συσχέτιση που παρατηρήθηκε πιθανώς να οφείλεται στη μεγάλη ετερογένεια που εμφάνισαν τα δείγματα, ακόμη και στην ίδια περιοχή.

Τέλος, η κάθε αντιοξειδωτική μέθοδος περιλαμβάνει διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης και διαφορετικά αντιδραστήρια, συνεπώς οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που εμπεριέχονται στα δείγματα αντιδρούν κάθε φορά με διαφορετικά συστατικά, εμφανίζοντας διαφορετική δραστηριότητα.

5.3 Σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου περιοχών της ΝΔ Μαγνησίας μεταξύ των ετών 2021-2022

Στη συνέχεια, από σύγκριση των δειγμάτων ελαιόκαρπου που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των ετών 2021 και 2022, βρέθηκε πως τα δείγματα που συλλέχθηκαν τη χρονιά 2021 εμφάνισαν στατιστικά χαμηλότερες τιμές IC50 σε σχέση με τα δείγματα που συλλέχθηκαν το 2022 από την ίδια περιοχή στη μέθοδο ABTS (Γράφημα 9 και 6). Παρά ταύτα, η σύγκριση των ίδιων δειγμάτων μεταξύ των δύο ετών δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά το πολυφαινόλικο περιεχόμενο και τη μέθοδο Superoxide (Γράφημα 7, 8, 10 και 11).

Η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι πιθανό να οφείλεται σε διαφορές στις καιρικές συνθήκες που επικρατούσαν μεταξύ των δύο ετών. Η μέση ετήσια θερμοκρασία για την περιοχή του Βόλου, δηλαδή στον κοντινότερο μετεωρολογικό σταθμό, ήταν παρόμοια και για τις δύο χρονιές. Ωστόσο, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, δηλαδή όταν ξεκινά η ωρίμαση του ελαιόκαρπου παρατηρήθηκαν υψηλότερες μέγιστες θερμοκρασίες, με μέσο όρο 41,9 °C το 2021, σε σχέση με το 2022, όπου η μέση υψηλότερη θερμοκρασία τους ίδιους μήνες ήταν 37,5 °C [56]. Η αυξημένη θερμοκρασία μπορεί να συντελέσει στη μεταβολή των φαινολογικών χαρακτηριστικών του ελαιόκαρπου, οδηγώντας σε πρόωπη ωρίμανση, και συνεπώς σε διαφορετική σύσταση του τελικού καρπού [57].

Επιπλέον, η ετήσια βροχόπτωση διέφερε μεταξύ των δύο ετών, ειδικά στις περιόδους κατά τις οποίες ξεκινά η ανάπτυξη του ελαιόκαρπου και στις περιόδους που πραγματοποιείται η ωρίμασή του, δηλαδή κατά προσέγγιση από τον Μάιο μέχρι αρχές Σεπτεμβρίου. Σε αυτή τη φάση, το ποσοστό νερού που προσλαμβάνει το ελαιόδεντρο από το έδαφος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη μορφολογία του ελαιόκαρπου όσο και στη σύστασή του. Συγκεκριμένα, τη χρονιά 2021, για τους μήνες Μάιο με Αύγουστο η βροχόπτωση στην περιοχή του Βόλου ήταν αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με τη βροχόπτωση των αντίστοιχων μηνών το 2022 (Πίνακας 3) [53]. Συνεπώς, οι ελαιόκαρποι αναπτύσσονταν και ωρίμαζαν σε ξηρότερες συνθήκες για τη χρονιά 2021.

Πίνακας 3 Υπολογισμένες τιμές βροχόπτωσης (mm) για τις χρονιές 2021 και 2022 ανά μήνα (Βόλος).

| Μήνας | Βροχόπτωση (mm) | |
|-------------|-----------------|-------|
| | 2021 | 2022 |
| Ιανουάριος | 86,47 | 146,9 |
| Φεβρουάριος | 63,1 | 68,5 |
| Μάρτιος | 88,04 | 112,1 |
| Απρίλιος | 52,77 | 44,6 |
| Μάιος | 13,49 | 18,2 |
| Ιούνιος | 7,83 | 21,32 |
| Ιούλιος | 5,7 | 33,6 |
| Αύγουστος | 4 | 119 |
| Σεπτέμβριος | 61,1 | 27,5 |
| Οκτώβριος | 122,8 | 47,5 |
| Νοέμβριος | 56,9 | 112,3 |
| Δεκέμβριος | 80 | 24,3 |

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έλλειψη νερού για τους κρίσιμους μήνες της ανάπτυξης και ωρίμασης των ελαιόκαρπων, μπορεί να οδηγήσει το ελαιόδεντρο σε κατάσταση στρες. Έχει παρατηρηθεί ότι το φυτό προκειμένου να ανταπεξέλθει την κατάσταση ξηρασίας ενεργοποιεί συγκεκριμένους προστατευτικούς μηχανισμούς. Ένας από αυτούς είναι η αύξηση της παραγωγής των ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών. Η αύξηση των αντιοξειδωτικών μορίων στο φυτό έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στις ελεύθερες ρίζες που παράγονται ως στρεσογόνος απόκριση στην έλλειψη νερού. Ιδιαίτερα στα φύλλα, η αύξηση της ποσότητας των αντιοξειδωτικών συμβάλλει στη προστασία της φωτοσυνθετικής διεργασίας και των φυτικών κυττάρων από βλάβες που μπορεί να προκληθούν από τις ελεύθερες ρίζες. Ελαιόλαδα που προέρχονται από ελαιόκαρπους οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί και ωριμάσει σε κατάσταση έλλειψης νερού, διαθέτουν πιο πικρή γεύση λόγω της αυξημένης ποσότητας των πολυφαινολών. Επιπλέον, η έλλειψη νερού μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μεγαλύτερων καρπών, καθώς το φυτό ως απόκριση στο στρες συγκρατεί μεγάλες

ποσότητες νερού έτσι ώστε να επιβιώσει σε περίπτωση που η ξηρασία διαρκέσει μεγάλο χρονικό διάστημα [54, 55].

Η διαθεσιμότητα σε νερό έχει βρεθεί πως μπορεί να συντελέσει στη διαφοροποίηση της πολυφαινολικής σύστασης σε ελαιόλαδα, τροποποιώντας τα μονοπάτια σύνθεσης βιοσυνθετικών ενζύμων, και μεταβάλλοντας τη διαλυτότητά τους [58].

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε *in vitro*, παρά το γεγονός ότι παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων της χρονιάς 2021 για τη μέθοδο ABTS, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο πολυφαινολικό περιεχόμενο μεταξύ των δύο ετών, όπως θα αναμέναμε με βάση τα κλιματικά δεδομένα. Δηλαδή, η υψηλότερες θερμοκρασίες και η έλλειψη βροχόπτωσης για το 2021 δε φαίνεται να επηρέασε την ποσότητα του πολυφαινολικού περιεχομένου, αλλά πιθανώς συνέβαλε στη διαφοροποίηση της σύστασης των δειγμάτων. Επομένως, η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται στη μέθοδο ABTS πιθανώς να οφείλεται τόσο σε διαφορές στη σύσταση μεταξύ των δειγμάτων, αλλά και στη διαφορετική δράση του κάθε πολυφαινολικού συστατικού, όσο και στην πιθανή συνεργιστική δράση των πολυφαινολών μαζί με άλλα αντιοξειδωτικά που απαντώνται στον ελαιόκαρπο [54,55].

5.4 Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Οι ωφέλιμες επιδράσεις των αντιοξειδωτικών στην υγεία του ανθρώπου είναι πλέον αδιαμφισβήτητες, ωστόσο είναι αναγκαίο να μελετηθούν εκτενέστερα, καθώς στη βιβλιογραφία δεν παρουσιάζονται επαρκή κλινικά δεδομένα. Επιπλέον, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την πολυφαινολική σύσταση υδατικής φάσης ελαιόκαρπου, συνεπώς η φάση αυτή χρήζει διερεύνησης καθώς σε αυτήν εντοπίζονται πλήθος πολυφαινολικών ενώσεων, διαθέσιμες στον άνθρωπο μέσω της διατροφής [50,51,52].

Εφόσον, οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των πολυφαινολών βασίζονται στη δομή τους είναι δύσκολο να διερευνηθεί η βιολογική τους δράση μόνο μέσω *in vitro* μεθόδων. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα των *in vitro* μεθόδων αποτελούν μία αρχική ένδειξη για τη βιοδραστικότητα των ελαιώνων της ευρύτερης περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας, και για την αντιοξειδωτική ικανότητα των ελαιόκαρπων και τα πιθανά οφέλη από την καταναλωσή τους. Παρά τη μεγάλη συνεισφορά της περιοχής της ΝΔ Μαγνησίας στην παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς, η συγκεκριμένη περιοχή δεν έχει

μελετηθεί στο παρελθόν σε επίπεδο βιοδραστικότητας των δειγμάτων της. Επομένως, η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί κάτι το πρωτοποριακό, το οποίο μπορεί να αποφέρει οικονομικό όφελος στους παραγωγούς, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την τοπική οικονομία.

Σε μελλοντικό χρόνο, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω διερεύνηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ελαιόκαρπου στη ΝΔ Μαγνησία. Συγκεκριμένα, θα μπορούσε πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ενώσεων που περιέχονται στον καρπό, και ιδιαίτερα σε υδατικά κλάσματα, που ευθύνονται για την αντιοξειδωτική δράση, μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι συγκεκριμένες ενώσεις θα μπορούσαν στη συνέχεια να απομονωθούν αυτόνομες ή να παραχθούν εκχυλίσματα, με στόχο τη χρήση τους ως πρόσθετα τροφίμων, σε ζωοτροφές και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Επιπλέον, στο μέλλον θα μπορούσαν να διεξαχθούν και πειράματα σε κυτταρικές σειρές, ώστε να ελεγχθεί εάν η *in vitro* βιοδραστικότητα των δειγμάτων μεταφράζεται και σε κυτταρικές σειρές, ακόμη και σε *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα. Με αυτό τον τρόπο, θα αναδειχθούν τα οφέλη του ελαιόκαρπου στην υγεία και ιδιαίτερα της επιτραπέζιας ελιάς.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., & Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*, 30(4), 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0991-9>
- [2] Bombarely, A., Doulis, A. G., Lambrou, K. K., Zioutis, C., Margaritis, E., & Koubouris, G. (2021). Elucidation of the Origin of the Monumental Olive Tree of Vouves in Crete, Greece. *Plants*, 10(11), 2374. <https://doi.org/10.3390/plants10112374>
- [3] Sales, H., Šatović, Z., Alves, M. L., Fevereiro, P., Nunes, J., & Vaz Patto, M. C. (2021). Accessing Ancestral Origin and Diversity Evolution by Net Divergence of an Ongoing Domestication Mediterranean Olive Tree Variety. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.688214>
- [4] Bombarely, A., Doulis, A. G., Lambrou, K. K., Zioutis, C., Margaritis, E., & Koubouris, G. (2021). Elucidation of the Origin of the Monumental Olive Tree of Vouves in Crete, Greece. *Plants*, 10(11), 2374. <https://doi.org/10.3390/plants10112374>
- [5] Conde, C., Delrot, S., & Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165(15), 1545–1562. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.018>
- [6] Kourti, M., Alvanou, M. v., Skaperda, Z., Tekos, F., Papaefstathiou, G., Stathopoulos, P., & Kouretas, D. (2023). Antioxidant and DNA-Protective Activity of an Extract Originated from Kalamon Olives Debittering. *Antioxidants*, 12(2), 333. <https://doi.org/10.3390/antiox12020333>
- [7] Bernardi, B., Falcone, G., Stillitano, T., Benalia, S., Bacenetti, J., & de Luca, A. I. (2021). Harvesting system sustainability in Mediterranean olive cultivation: Other principal cultivar. *Science of The Total Environment*, 766, 142508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142508>
- [8] Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>
- [9] Loumou, A., & Giourga, C. (2003). Olive groves: “The life and identity of the Mediterranean.” In *Agriculture and Human Values* (Vol. 20).
- [10] Gyftokostas, N., Nanou, E., Stefanis, D., Kokkinos, V., Bouras, C., & Couris, S. (2021). Classification of Greek Olive Oils from Different Regions by Machine Learning-Aided Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Absorption Spectroscopy. *Molecules*, 26(5), 1241. <https://doi.org/10.3390/molecules26051241>

- [11] Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-Gonzalez, N., Khairul Alam, M., & Corsetti, A. (2020). Table Olives More than a Fermented Food. *Foods*, 9(2), 178. <https://doi.org/10.3390/foods9020178>
- [12] Mougiou, N., Trikka, F., Trantas, E., Ververidis, F., Makris, A., Argiriou, A., & Vlachonasios, K. E. (2018). Expression of hydroxytyrosol and oleuropein biosynthetic genes are correlated with metabolite accumulation during fruit development in olive, *Olea europaea*, cv. Koroneiki. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.004>
- [13] [Ελληνική Στατιστική Αρχή](#)
- [14] Lyra, A., Loukas, A., Sidiropoulos, P., Voudouris, K., & Mylopoulos, N. (2022). Integrated Modeling of Agronomic and Water Resources Management Scenarios in a Degraded Coastal Watershed (Almyros Basin, Magnesia, Greece). *Water (Switzerland)*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/w14071086>
- [15] www.almyros-city.gr
- [16] Hagidimitriou, M., Katsiotis, A., Menexes, G., Pontikis, C., & Loukas, M. (2005). Genetic Diversity of Major Greek Olive Cultivars Using Molecular (AFLPs and RAPDs) Markers and Morphological Traits. In *J. AMER. SOC. HORT. SCI* (Vol. 130, Issue 2).
- [17] Kalogeropoulos, N., & Tsimidou, M. (2014). Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants*, 3(2), 387–413. <https://doi.org/10.3390/antiox3020387>
- [18] Mikrou, T., Kasimati, K., Doufexi, I., Kapsokefalou, M., Gardeli, C., & Mallouchos, A. (2021). Volatile Composition of Industrially Fermented Table Olives from Greece. *Foods*, 10(5), 1000. <https://doi.org/10.3390/foods10051000>
- [19] Revelou, P., Pappa, C., Kakouri, E., Kanakis, C. D., Papadopoulos, G. K., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2021). Discrimination of botanical origin of olive oil from selected Greek cultivars by <sc>SPME-GC</sc> - <sc>MS</sc> and <sc>ATR-FTIR</sc> spectroscopy combined with chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2994–3002. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10932>
- [20] Tarapoulouzi, M., Skiada, V., Agriopoulou, S., Psomiadis, D., Rébufa, C., Roussos, S., Theocharis, C. R., Katsaris, P., & Varzakas, T. (2021). Chemometric Discrimination of the Geographical Origin of Three Greek Cultivars of Olive Oils by Stable Isotope Ratio Analysis. *Foods*, 10(2), 336. <https://doi.org/10.3390/foods10020336>
- [21] Skiada, V., Tsarouhas, P., & Varzakas, T. (2020). Comparison and Discrimination of Two Major Monocultivar Extra Virgin Olive Oils in the Southern Region of Peloponnese, According to Specific Compositional/Traceability Markers. *Foods*, 9(2), 155. <https://doi.org/10.3390/foods9020155>
- [22] Kouka, P., Tekos, F., Valta, K., Mavros, P., Veskoukis, A., Angelis, A., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). Olive tree blossom polyphenolic extracts

exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines.

Oncology Reports. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7386>

[23] López-Sánchez, M., Ayora-Cañada, M. J., & Molina-Díaz, A. (2010). Olive Fruit Growth and Ripening as Seen by Vibrational Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 82–87. <https://doi.org/10.1021/jf902509f>

[24] Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>

[25] Lanza, B., & Ninfali, P. (2020). Antioxidants in Extra Virgin Olive Oil and Table Olives: Connections between Agriculture and Processing for Health Choices. *Antioxidants*, 9(1), 41. <https://doi.org/10.3390/antiox9010041>

[26] Saglam, C., Tuna, Y. T., Gecgel, U., & Atar, E. S. (2014). Effects of Olive Harvesting Methods on Oil Quality. *APCBEE Procedia*, 8, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.050>

[27] Munekata, P., Nieto, G., Pateiro, M., & Lorenzo, J. (2020). Phenolic Compounds Obtained from *Olea europaea* By-Products and Their Use to Improve the Quality and Shelf Life of Meat and Meat Products—A Review. *Antioxidants*, 9(11), 1061. <https://doi.org/10.3390/antiox9111061>

[28] Vrdoljak, J., Kumric, M., Vilovic, M., Martinovic, D., Tomic, I. J., Krnic, M., Ticinovic Kurir, T., & Bozic, J. (2022). Effects of Olive Oil and Its Components on Intestinal Inflammation and Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*, 14(4), 757. <https://doi.org/10.3390/nu14040757>

[29] Kouka, P., Tsakiri, G., Tzortzi, D., Dimopoulou, S., Sarikaki, G., Stathopoulos, P., Veskoukis, A. S., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/1870965>

[30] Grubić Kezele, T., & Ćurko-Cofek, B. (2022). Neuroprotective Panel of Olive Polyphenols: Mechanisms of Action, Anti-Demyelination, and Anti-Stroke Properties. *Nutrients*, 14(21), 4533. <https://doi.org/10.3390/nu14214533>

[31] Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: a review. *Journal of Nutritional Science*, 9, e57. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.50>

[32] Ahamad, J., Toufeeq, I., Khan, M. A., Ameen, M. Sh. M., Anwer, E. T., Uthirapathy, S., Mir, S. R., & Ahmad, J. (2019). Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. *Phytotherapy Research*, 33(12), 3112–3128. <https://doi.org/10.1002/ptr.6511>

[33] Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., & Hatzopoulos, P. (2015). A defence-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 2093–2106. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv002>

- [34] Gouvinhas, I., Machado, N., Sobreira, C., Domínguez-Perles, R., Gomes, S., Rosa, E., & Barros, A. (2017). Critical Review on the Significance of Olive Phytochemicals in Plant Physiology and Human Health. *Molecules*, 22(11), 1986. <https://doi.org/10.3390/molecules22111986>
- [35] Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C., & Bernini, R. (2019). Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 11(8), 1776. <https://doi.org/10.3390/nu11081776>
- [36] Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.001>
- [37] Grubić Kezele, T., & Ćurko-Cofek, B. (2022). Neuroprotective Panel of Olive Polyphenols: Mechanisms of Action, Anti-Demyelination, and Anti-Stroke Properties. *Nutrients*, 14(21), 4533. <https://doi.org/10.3390/nu14214533>
- [38] Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0293-3>
- [39] Giorgi, C., Marchi, S., Simoes, I. C. M., Ren, Z., Morciano, G., Perrone, M., Patalas-Krawczyk, P., Borchard, S., Jędrak, P., Pierzynowska, K., Szymański, J., Wang, D. Q., Portincasa, P., Węgrzyn, G., Zischka, H., Dobrzyn, P., Bonora, M., Duszyński, J., Rimessi, A., ... Wieckowski, M. R. (2018). *Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases* (pp. 209–344). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006>
- [40] Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- [41] Chen, J., Chen, C.-L., Alevriadou, B. R., Zweier, J. L., & Chen, Y.-R. (2011). Excess no predisposes mitochondrial succinate–cytochrome c reductase to produce hydroxyl radical. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(5), 491–502. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.03.001>
- [42] Guengerich, F. P., Waterman, M. R., & Egli, M. (2016). Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(8), 625–640. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>
- [43] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- [44] Cockram, T. O. J., Dundee, J. M., Popescu, A. S., & Brown, G. C. (2021). The Phagocytic Code Regulating Phagocytosis of Mammalian Cells. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.629979>
- [45] Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in

Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2016/5276130>

[46] Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972.

<https://doi.org/10.1021/cr200084z>

[47] Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., Petrotos, K., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.021>

[48] Bucciantini, M., Leri, M., Nardiello, P., Casamenti, F., & Stefani, M. (2021). Olive Polyphenols: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Antioxidants*, 10(7), 1044. <https://doi.org/10.3390/antiox10071044>

[49] Caruso, G., Gucci, R., Sifola, M. I., Selvaggini, R., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., & Servili, M. (2017). Irrigation and fruit canopy position modify oil quality of olive trees (cv. Frantoio). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3530–3539. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8207>

[50] Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

[51] Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: a review. *Journal of Nutritional Science*, 9, e57. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.50>

[52] Kouka, P., Tekos, F., Papoutsaki, Z., Stathopoulos, P., Halabalaki, M., Tsantarliotou, M., Zervos, I., Nepka, C., Liesivuori, J., Rakitskii, V. N., Tsatsakis, A., Veskoukis, A. S., & Kouretas, D. (2020). Olive oil with high polyphenolic content induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue. *Toxicology Reports*, 7, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.007>

[53] www.worldweatheronline.com

[54] Brito, Dinis, Moutinho-Pereira, & Correia. (2019). Drought Stress Effects and Olive Tree Acclimation under a Changing Climate. *Plants*, 8(7), 232. <https://doi.org/10.3390/plants8070232>

[55] Razouk, R., Hssaini, L., Alghoum, M., Adiba, A., & Hamdani, A. (2022). Phenotyping Olive Cultivars for Drought Tolerance Using Leaf Macro-Characteristics. *Horticulturae*, 8(10), 939. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100939>

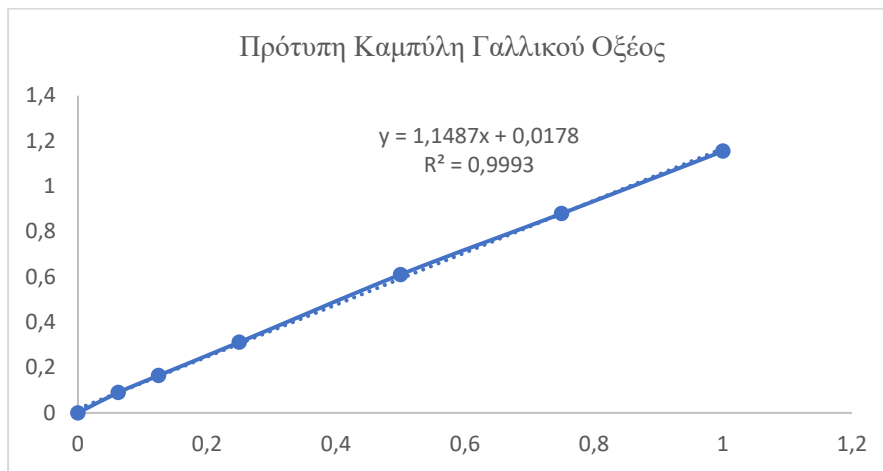
[56] <https://meteosearch.meteo.gr/data/index.cfm>

[57] Mafrika, R., Piscopo, A., de Bruno, A., & Poiana, M. (2021). Effects of Climate on Fruit Growth and Development on Olive Oil Quality in Cultivar Carolea. *Agriculture*, 11(2), 147. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020147>

[58] Romero, N., Saavedra, J., Tapia, F., Sepúlveda, B., & Aparicio, R. (2016). Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 583–592. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7127>

[59] Johnson, R. L., & Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *Journal of Food Quality*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/3193185>

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Καμπύλη 1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος