

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
της ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΣ Μ. ΧΡΥΣΟΣΤΟΜΟΥ

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Τριμελής επιτροπή:
Ανδρικόπουλος Ν.Κ.
Μπόσκου Γ.
Χίου Α.

Αθήνα, Ιούνιος 2003

ΠΤΥ
ΧΡΥ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της **ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΣ Μ. ΧΡΥΣΟΣΤΟΜΟΥ**

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ



Τριμελής επιτροπή:
Ανδρικόπουλος Ν.Κ.
Μπόσκου Γ.
Χίου Α.

Αθήνα, Ιούνιος 2003

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα επιστολή εκδόθηκε σύμφωνα με το απόφατικό έτος 2002-2003 στο Γενικό και Χειμάρ-Βαγινιώ και Φωτεινόχρηστος Τριτομύ, από την επιτροπή και εκπαιδευτική Επιτροπή κ. Νικόλαου Ανδριανού.

Αρκεί να γίνει να αναγνωρίσει την ευθύνη μου κ. Νικόλαο Χ. Ανδριανού, Αναπληρωτή Καθηγητή Βαγινιώ-Χειμάρ Τριτομύ και Χειμάρ-Βαγινιώ, που έχει πάντα πρόθυμο να με βοηθήσει και να με βοηθήσει με την παύση της παύσης μου.

Αφιερωμένη στους γονείς μου....

Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Ελένη Ανδριανού, για να είναι πάντα δίπλα μου, πρόθυμοι να με βοηθήσουν και να μου συμπαρυσταθούν σε κάθε μου πρόβλημα.

Μου έχουν προσφέρει πάρα πολλά, για αυτό και εγώ αφιερώνω την παρούσα Πτυχιακή Μελέτη ως ελάχιστη ένδειξη της εκτίμησης,

της ευγνωμοσύνης και της τεράστιας αγάπης μου προς αυτούς”.

Ευχαριστώ επίσης θα ήθελα να εκφράσω στη Φωτεινή Σόλη για να βοηθήσει και την βοήθει της σε όλη τη διάρκεια της παύσης μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ανδριανού Καλλιόπη και την κ. Βασιλική Σπυριδίου για την βοήθεια και την ηθική συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια της παύσης μου στην εργασιακή ζωή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω στην κοίτη μου κ. Βίλη Ιωάννη για την βοήθεια στην εργασία της σε όλη τη διάρκεια της παύσης μου.

Χρυσόστομος Σπυριδίου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2002-2003 στο Εργαστήριο Χημείας- Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαου Ανδρικόπουλου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Νικόλαο Κ. Ανδρικόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, που ήταν πάντοτε πρόθυμος να με ακούσει και να με βοηθήσει κατά την πορεία της πτυχιακής μου μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον δρ. Γεώργιο Μπόσχου, για το αμείωτο ενδιαφέρον του και την πολύτιμη βοήθειά του κατά την οργάνωση και εκπόνηση τόσο του πειραματικού όσο και του θεωρητικού μέρους της πτυχιακής μου μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την δρ. Αντωνία Χίου και δρ. Αναστασία Μυλωνά για τη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της υγρής και αέριας χρωματογραφίας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στη Φωτεινή Σάλτα για το ενδιαφέρον και την βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ανδριάννα Καλιώρα και την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα για την βοήθεια και την ηθική συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στον εργασιακό χώρο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην πολύ καλή μου φίλη Ελίνα Ιωάννου για την πολύτιμη στήριξη και συντροφιά της σε όλη τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους.

Χρυσοστόμου Σταυρούλα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	4

A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΧΗΜΕΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	6
1.1 Βιταμίνη E	7
1.2 Βιταμίνη C	8
1.3 Βιταμίνη A	9
1.4 Σελήνιο	11
1.5 Συνένζυμο Q	11
1.6 Φαινόλες	11
1.7 Δράση αντιοξειδωτικών	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΗΓΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	16
2.1 Πολυφαινόλες στο κρασί	16
2.2 Πολυφαινόλες στο τσάι	17
2.3 Πολυφαινόλες στον καφέ	18
2.4 Πολυφαινόλες στα φρούτα και λαχανικά	19
2.5 Πολυφαινόλες στη σοκολάτα	19
2.6 Πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ	26
3.1 Αντιοξειδωτικά και υπέρταση	26
3.2 Αντιοξειδωτικά και διαβήτης	27

3.3 Αντιοξειδωτικά και παχυσαρκία	28
3.4 Αντιοξειδωτικά και θρομβογένεση	29
3.5 Αντιοξειδωτικά και γαστρεντερικός σωλήνας	30
3.6 Αντιοξειδωτικά και καρκίνος	31
3.7 Αντιοξειδωτικά και Ανοσοποιητικό σύστημα	34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ 35

4.1 Μεθοδοι ανάλυσης	35
4.2 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης – Μέθοδος DPPH	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ 48

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ 52

6.1 Λυοφυλίωση ελιών	53
6.2.α Παραλαβή πολυφαινολών από ελιές	54
6.2.β Παραλαβή πολυφαινολών από ελαιόλαδο	55
6.2.γ Παραλαβή πολυφαινολών από άλμη	56
6.3 Μέθοδος Folin – Ciocalteu	58
6.4 Μέθοδος Soxhlet	60
6.5 Μέθοδος DPPH	61
6.6 GC-MS ανάλυση	63
6.7 HPLC ανάλυση	66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
---------------------------------	-----------

7.1 Αποτελέσματα ποσοστών βάρους	69
7.2 Αποτελέσματα λυοφιλίωσης	69
7.3 Αποτελέσματα μεθόδου Folin- Ciocalteau	70
7.4 Αποτελέσματα εκχύλισης Soxhlet	71
7.5 Αποτελέσματα μεθόδου DPPH	72
7.6 Αποτελέσματα GC-MS ανάλυσης	76
7.7 Αποτελέσματα HPLC ανάλυσης	82

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	84
---	-----------

8.1 ΕΠΙΛΟΓΟΣ	88
---------------------	-----------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	89
---------------------	-----------

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πολλά και διάφορα ακούγονται καθημερινά για τη “χαρισματική” Μεσογειακή δίαιτα. Σύμφωνα με πολλούς ερευνητές, τα μειωμένα ποσοστά θνησιμότητας διαφόρων χρόνιων νοσημάτων στις μεσογειακές χώρες συγκρινόμενα με άλλες ευρωπαϊκές χώρες, οφείλονται κατά κύριο λόγο στη διατροφή των μεσογειακών λαών.

Χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διαίτας είναι η αυξημένη πρόσληψη τροφίμων φυτικής προέλευσης, όπως φρούτα λαχανικά, όσπρια και κύρια πηγή λίπους είναι οι ελιές και το ελαιόλαδο. Όλα τα παραπάνω τρόφιμα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και για αυτό αποτελούν καλές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών αφού οι πολυφαινόλες είναι ενώσεις γνωστές ως φορείς αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ποικιλιών ελιάς και ελαιολάδου, ελληνικής προέλευσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών. Κυριότερες πηγές των πολυφαινολών αποτελούν τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως φρούτα, λαχανικά, ελιές και ορισμένα ροφήματα όπως το τσάι και ο καφές. Πολλοί ερευνητές και επιδημιολόγοι υποστηρίζουν πως η κατανάλωση αυτών των τροφίμων και ροφημάτων, σε καθημερινή βάση, προστατεύουν από διάφορες παθήσεις, όπως καρδιαγγειακά και διάφορους τύπους νεοπλασιών και πως αυτή τους η ιδιότητα οφείλεται κυρίως στη φαινολική τους σύσταση.

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, έγινε προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης 5 διαφορετικών ποικιλιών ελιάς, ελληνικής προέλευσης (Καλαμών, Τσακιστές, Αμφίσης και Ψυλάκη). Ο προσδιορισμός έγινε στη σάρκα, στο κουκούτσι και στην άλμη κάθε ποικιλίας ελιάς.

Αρχικά, ο προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών σε σάρκα, κουκούτσι και άλμη, έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu ενώ στη συνέχεια ο προσδιορισμός του ολικού λίπους έγινε με επαναλαμβανόμενη εκχύλιση Soxhlet. Ακολούθως, ποιοτική ανάλυση των πολυφαινολών, έγινε με αέρια χρωματογραφία /φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) ενώ ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Τελικά ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης έγινε με τη μέθοδο DPPH, στη σάρκα των διαφόρων ελιών.

Συμπεράσματα των πιο πάνω πειραματικών διαδικασιών είναι πως σε όλα τα είδη ελιών, η σάρκα έχει πιο πολλές πολυφαινόλες από τα κουκούτσια, ενώ η συγκέντρωσή τους στην άλμη είναι πολύ μικρή. Οι ελιές Καλαμών είχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών ενώ οι ελιές Ψυλάκη είχαν τη μικρότερη. Με βάση την GC-MS ανάλυση, ποικιλία πολυφαινολών είχαν όλα τα είδη ελιών. Τη μικρότερη ποικιλία είχαν οι ελιές Ψυλάκη, ενώ οι υπόλοιπες ποικιλίες ελιών είχαν παρόμοια φαινολική σύσταση. Οι πολυφαινόλες τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη και βανιλικό οξύ (φαινολικό οξύ), βρέθηκαν σε όλα τα είδη ελιών, σε σάρκα και κουκούτσι. Με τη μέθοδο DPPH, οι ελιές Καλαμών και οι Τσακιστές είχαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ οι ελιές Ψυλάκη, τη μικρότερη.

Σαν γενικό συμπέρασμα της παρούσας πτυχιακής μελέτης, όλες οι ελιές, οποιασδήποτε ποικιλίας, περιέχουν πολυφαινόλες, διαφορετικής σύστασης και ποσότητας. Συνεπώς, η κατανάλωση ελιών και κυρίως τύπου Καλαμών, προσφέρουν σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών, σε μορφή πολυφαινολών, που έχουν αρκετές

ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, κυρίως συμβάλλοντας στην πρόληψη χρόνιων νοσημάτων.

Polyphenols belong to the category of natural antioxidants. Major sources of polyphenols are plant foods like fruits, vegetables, olives and some beverages like tea and coffee. Many scientists and epidemiologists support that the daily consumption of such foods and beverages protects us from many diseases and especially from heart diseases, atherosclerosis formation and that this protection is due to their phenolic structure.

This thesis work determined the total antioxidant activity of 5 different varieties of greek olive (Kalamon, Tsakirova, Kritikos, Amfiox and Pitsaki). The experiments and the determination were done on the flesh, the kernel and the brine of each variety of olive.

Finally, determination of total polyphenols was determined with Folin-Ciocalteu assay (on flesh, kernel and brine) and then the determination of total fat of each variety was done with Soxhlet extraction. Qualitative analysis was performed with gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) and reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC-UV) for the determination of total phenols (on flesh and kernel). Finally the antioxidant activity of each variety of olive's flesh was assessed by scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals.

The most important conclusions were that all varieties of olives have similar phenolic compounds in different quantities. Kalamon olives had the highest content of polyphenols and the lowest was found in Pitsaki olives. Also for all varieties, the flesh have much more polyphenols than kernel and the brine has a very little content of polyphenols. Due to the qualitative analysis, similar phenols were found in all varieties but mostly 3 polyphenols, quercetin, OH-quercetin and vanillic acid were found in all varieties, in flesh and kernel. According to HPLC analysis, Kalamon and Amfiox olives had the highest content of total phenols and the lowest content was found in Pitsaki olive. Also Pitsaki olive had the weakest DPPH radical scavenging activity but Kalamon and Tsakirova olives had the greatest.

As a general conclusion from the present thesis work it could be stated that consumption of any olive and especially Kalamon olives could offers us a large amount of antioxidants, known as polyphenols, which benefits health by preventing many disease-related disorders.

ABSTRACT

Polyphenols belongs to the category of natural antioxidants. Major sources of polyphenols are plant foods like fruits, vegetables, olives and some beverages like tea and coffee. Many scientists and epidemiologists supports that the daily consumption of such foods and beverages protects us from many diseases and especially from heart diseases, neoplasm formation and that this protection is due to their phenolic structure.

This thesis work determined the total antioxidant activity of 5 different varieties of greek olives (Kalamon, Tsakistes, Kritikes, Amfisis and Psilaki). The experiments and the determination were done on the flesh, the kernel and the brine of each variety of olive.

Firstly, determination of total polyphenols was determined with Folin-Ciocalteu assay (on flesh, kernel and brine) and then the determination of total fat of each variety was done with Soxhlet extraction. Qualitative analysis was performed with gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) and reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC-UV) for the determination of total phenols (on flesh and kernel). Finally the antioxidant activity of each variety of olive's flesh was assessed by scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals.

The most important conclusion were that all varieties of olives have similar phenolic compounds in different quantities. Kalamon olives had the highest content of polyphenols and the lowest was found in Psilaki olives. Also for all varieties, the flesh have much more polyphenols than kernel and the brine has a very little content of polyphenols. Due to the qualitative analysis, similar phenols were found in all varieties but mostly 3 polyphenols, tyrosol, OH-tyrosol and vanillic acid were found in all varieties, in flesh and kernel. According to HPLC analysis Kalamon and Amfisis olives had the highest content of total phenols and the lowest content was found in Psilaki olives. Also Psilaki olives had the weakest DPPH radical scavenging activity but Kalamon and Tsakistes olives had the greatest.

As a general conclusion from the present thesis work it could be stated that consumption of any olives and especially Kalamon olives could offers us a large amount of antioxidants, known as polyphenols, which benefits health by preventing many decadent diseases.

Α'. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΧΗΜΕΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Αντιοξειδωτικά είναι μια κατηγορία ενώσεων που έχουν την ικανότητα να "μπλοκάρουν" την διαδικασία της οξείδωσης και έτσι να προστατεύουν τους διάφορους οργανισμούς, από τις ανεπιθύμητες και επιβλαβείς επιδράσεις της. Ο όρος φυσικά αντιοξειδωτικά αναφέρεται σε εκείνα τα οποία προέρχονται από διάφορες φυσικές πηγές, για τα οποία στη συνέχεια θα αναφερθούμε συγκεκριμένα για το κάθε ένα από αυτά.

Προτού γίνει ανάλυση των φυσικών αντιοξειδωτικών, θα αναφερθούμε γενικά στη διαδικασία της οξείδωσης για να κατανοηθεί έτσι καλύτερα η δράση των ουσιών αυτών. Η οξείδωση είναι μία "διαδικασία" που έχει σαν αποτέλεσμα να καταστρέφει σημαντικές δομές των κυττάρων ή ακόμα και τα ίδια τα κύτταρα. Η οξειδωτική αυτή καταστροφή προκαλείται απ' τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες είναι αρκετά δραστήρια μόρια που ελευθερώνονται μέσα στο σώμα σαν προϊόντα μεταβολισμού. Παρόλα αυτά όμως, ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσέλθουν στον οργανισμό και από άλλες οδούς όπως κάπνισμα, μόλυνση και έκθεση σε ραδιενέργεια. Τα μόρια αυτά, αφού εισέλθουν στα κύτταρα καταστρέφουν πρωτεΐνες, μεμβράνες, γενετικό υλικό και άλλες σημαντικές δομές του κυττάρου. Έτσι οι ελεύθερες ρίζες που λέγονται αλλιώς και οξειδωτικοί παράγοντες, αντιδρούν με διάφορα μόρια, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της δομής τους, είτε την καταστροφή τους. Τα αντιοξειδωτικά όμως, όπως φαίνεται άλλωστε και από την ονομασία τους, αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα ελεύθερο άτομο ηλεκτρονίου που διαθέτουν και έτσι προφυλάσσουν αλλά μόρια που πιθανόν να ήταν στόχοι των οξειδωτικών αυτών παραγόντων.

Σήμερα χρησιμοποιείται και ένας άλλος όρος για τα φυσικά αντιοξειδωτικά σε αντιδιαστολή με τα "χημικά αντιοξειδωτικά" που είναι ο όρος βιολογικά αντιοξειδωτικά. Αυτά περιλαμβάνουν το σύνολο των αντιοξειδωτικών που προστατεύουν τα βιολογικά συστήματα όπως κύτταρα και οργανισμούς από το οξειδωτικό stress. Συγκεκριμένα, τα βιολογικά αντιοξειδωτικά δρουν είτε σαν δότες e^- , είτε σαν δεσμευτές ελεύθερων ιόντων και έτσι ενισχύουν την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Ορισμένες απ' τις σημαντικότερες ιδιότητες τους στον ανθρώπινο οργανισμό είναι οι εξής:

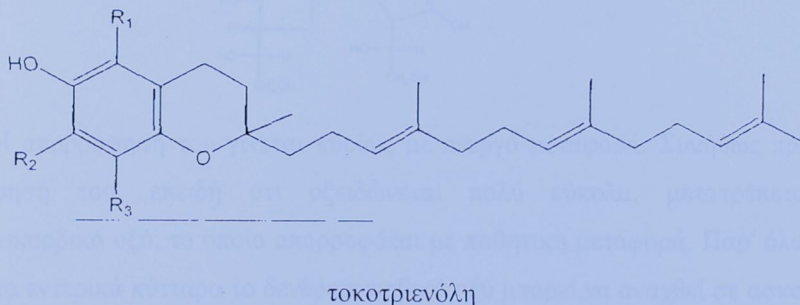
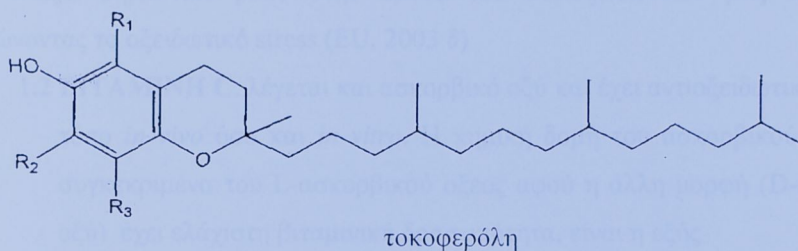
Α. Μπορούν ελεύθερα να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες και έτσι έχουν "ανασταλτική" δράση και εντός και εκτός κυττάρων.

Β. Μπορούν και δεσμεύουν ενεργά οξειδωαναγωγικά ιόντα μετάλλων που προκαλούν κυτταρικές βλάβες.

Γ. Συμμετέχουν σε διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων όπως για παράδειγμα στην απομάκρυνση H_2O_2 το οποίο είναι τοξικό για τον οργανισμό.

ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

1.1 Βιταμίνη Ε: οργανική ένωση που συντίθεται από τους φυτικούς οργανισμούς. Πλουσιότερη πηγή της είναι τα φυτικά έλαια. Η ένωση αυτή αποτελείται από 8 μόρια τις α,β,γ,δ τοκοφερόλες και α,β,γ,δ τοκοτριενόλες.

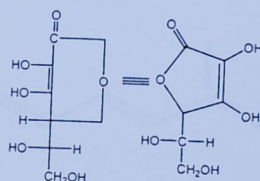


Ο αντιοξειδωτικός ρόλος της βιταμίνης Ε εξηγείται με την αντίδρασή της με τις ελεύθερες ρίζες. Όπως έχουμε αναφέρει, αυτές παράγονται απ' τον οργανισμό και αφού παραχθεί για ελεύθερη ρίζα π.χ. η ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$) που είναι και πολύ δραστική, λαμβάνει γρήγορα ηλεκτρόνια απ' το "περιβάλλον της", από άλλα οργανικά μόρια και σχηματίζεται έτσι μια νέα ελεύθερη ρίζα που αντιδρά με άλλα οργανικά μόρια και έτσι έχουμε ένα σύνολο αλυσιδωτών αντιδράσεων των ριζών αυτών με αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων. Έτσι ο ρόλος της βιταμίνης Ε

είναι ότι αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες πριν ακόμα αυτές αλληλεπιδράσουν με τις κυτταρικές μεμβράνες και έτσι διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Γενικά η βιταμίνη E ελαττώνει την οξείδωση της LDL λιποπρωτεΐνης, συμμετέχει ενεργά στην άμυνα του οργανισμού, συμβάλλει στην πρόληψη του καρκίνου, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καταρράκτη και της τοξικής δράσης του σιδήρου. Επίσης σε μερικές περιπτώσεις δίνεται σε διαβητικούς ασθενείς αφού η βιταμίνη αυτή φαίνεται να ενισχύει τη δράση της ινσουλίνης. Ακόμη, έρευνες που έγιναν σε ανθρώπους και ζώα, έδειξαν πως η βιταμίνη αυτή επιδρά στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, μειώνοντας τη συγκέντρωσή της στο πλάσμα. Από όλες τις μορφές της βιταμίνης E, η α- τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή της και παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του αντιοξειδωτικού μας συστήματος μειώνοντας το οξειδωτικό stress (EU, 2003 δ)

1.2 BITAMINH C: λέγεται και ασκορβικό οξύ και έχει αντιοξειδωτικές δράσεις τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η χημική δομή του ασκορβικού οξέος και συγκεκριμένα του L-ασκορβικού οξέος αφού η άλλη μορφή (D-ασκορβικό οξύ) έχει ελάχιστη βιταμινική δραστηριότητα, είναι η εξής



Η απορρόφησή του γίνεται κυρίως με ενεργό μεταφορά. Συνήθως πριν την απορρόφησή του, επειδή ότι οξειδώνεται πολύ εύκολα, μετατρέπεται σε δενδροασκορβικό οξύ, το οποίο απορροφάται με παθητική μεταφορά. Παρ' όλα αυτά όμως, στα εντερικά κύτταρα το δενδροσκορβικό οξύ μπορεί να αναχθεί σε ασκορβικό οξύ με ένα ένζυμο (αναγωγάση) που για να δράσει απαιτεί την παρουσία γλουταθειόνης. Μετά την απορρόφησή της, μεταφέρεται στο πλάσμα κυρίως υπό την μορφή δευδροασκορβικού οξέος. Η συγκέντρωσή της στους διάφορους ιστούς ποικίλει και σχετίζεται απ' την συγκέντρωσή της στο πλάσμα και συνεπώς απ' την ημερήσια πρόσληψή της (Quilesetal *et al*, 2002)

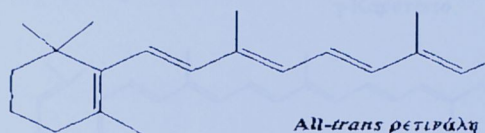
Κύριες λειτουργίες της βιταμίνης αυτής α) έχει ισχυρή αντιοξειδωτική στο αίμα και στα κύτταρα αφού δίνει ηλεκτρόνια και υδρογόνο και μπορεί να ανάγει οξειδωμένα μόρια, β) συμμετέχει στο μεταβολισμό ορισμένων αμινοξέων γ)

συμμετέχει στο σχηματισμό κολλαγόνου, δ) είναι απαραίτητη για την απορρόφηση του σιδήρου και ε) λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμός των λιπών(Χίου, 2001)

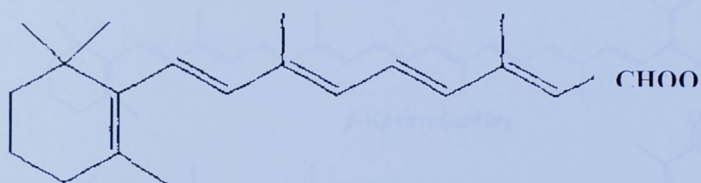
1.3 ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α: Ο όρος αυτός αναφέρεται σε 2 ενώσεις στην ρετινόλη που είναι αλκοόλη και στη ρετινάλη που είναι μια αλδεύδη. Στα ζωτικά τρόφιμα η βιταμίνη Α βρίσκεται υπό την μορφή ρετινόλης ή ρετινάλης. Στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης όμως, η βιταμίνη βρίσκεται υπό την μορφή της προβιταμίνης Α που αποτελεί το β- καροτένιο αλλά και άλλα καροτενοειδή που βρίσκονται στα φυτά ως χρωστικές ουσίες όπως α- καροτένιο, λυκοπένιο, γ- καροτένιο, κρυπτοξανθίνη, κανθαξανθίνη και άλλες. Οι χημικοί τύποι των ενώσεων που αναφέρθηκαν πιο πάνω (οι πιο σημαντικοί) περιγράφονται πιο κάτω

Δακτύλιος β- ιονόνης

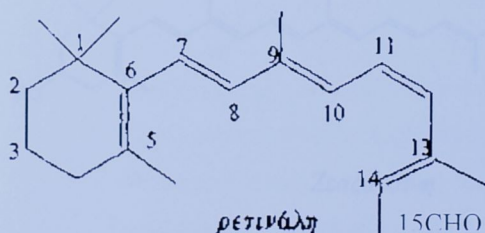
All -trans ρετινόλη



All-trans ρετινάλη



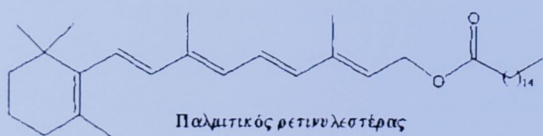
All trans ρετινοϊκό οξύ



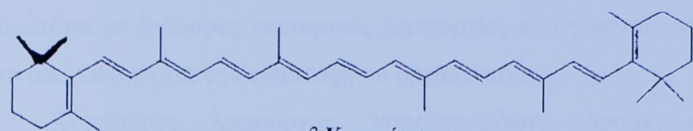
ρετινάλη

11 cis-

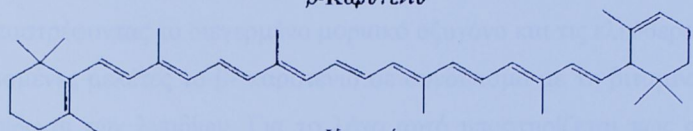
ρετινάλη



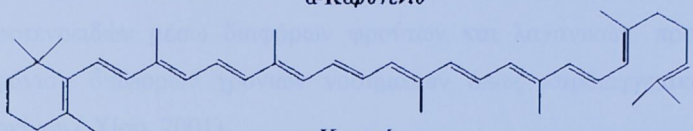
Παλμιτικός ρετινυλεστέρας



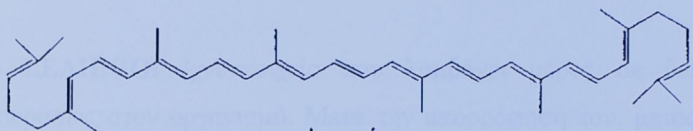
β-Καροτένιο



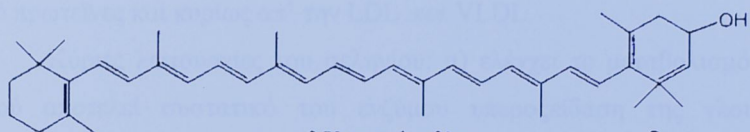
α-Καροτένιο



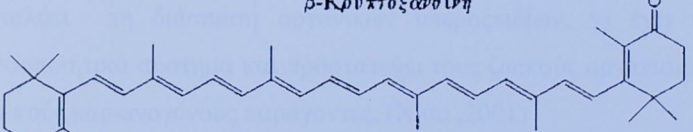
γ-Καροτένιο



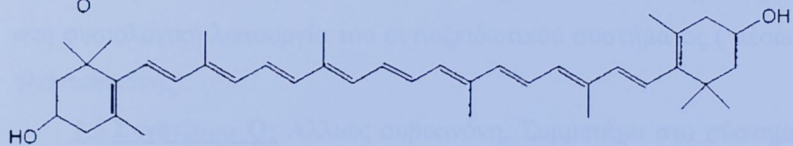
Λυκοσπένιο



β-Κρυπτοξανθίνη



Κανθαξανθίνη



Ζεαξανθίνη

Όσον αφορά τα καροτενοειδή, είναι ενώσεις που αποτελούν τις χρωστικές των φυτών. Υπάρχουν περισσότερα από 600 καροτενοειδή. Το καροτενοειδές με τη μεγαλύτερη βιταμινική δράση είναι το β- καροτένιο.

Κύριες λειτουργίες της βιταμίνης Α είναι οι εξής: α) έχει επιδράσεις στο ανοσολογικό σύστημα και συγκεκριμένα στη λειτουργία των Τ- λεμφοκυττάρων, β) συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες που γίνονται στις επιφάνειες και γ) είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του οργανισμού.

Κυριότερες λειτουργίες καροτενοειδών: Δρουν ως αντιοξειδωτικά καταστρέφοντας το διεγερμένο μοριακό οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες το β- καροτένιο σε συνδυασμό με τη βιταμίνη Ε αποτρέπουν την οξείδωση των λιπιδίων. Για το λόγο αυτό υποστηρίζεται πως αυξημένη πρόσληψη καροτενοειδών μέσω διαφόρων φρούτων και λαχανικών, προστατεύουν απ' την εμφάνιση διάφορων χρονίων νοσημάτων όπως καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου (Χίου ,2001)

1.4 ΣΕΛΗΝΙΟ: Ιχνοστοιχείο που λαμβάνει μέρος σε διάφορες οξειδωτικές αντιδράσεις στον οργανισμό. Μετά την απορρόφηση του, μεταφέρεται στο πλάσμα από πρωτεΐνες και κυρίως απ' την LDL και VLDL.

Κύριες λειτουργίες του σεληνίου: α) ελέγχει το μεταβολισμό του οξυγόνου αφού αποτελεί συστατικό του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, β) Καταλύει τη διάσπαση οργανικών υπεροξειδίων, γ) έχει κάποια δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα και προστατεύει τους ζωικούς οργανισμούς από ιογενείς και χημικούς καρκινογόνους παράγοντες. (Χίου ,2001)

Λογικά το σελήνιο δεν είναι αντιοξειδωτικό αλλά έχει σημαντική επίδραση στη φυσιολογική λειτουργία του αντιοξειδωτικού συστήματος (μέσω υπεροξειδάσης γλουταθειόνης).

1.5 Συνένζυμο Q: Αλλιώς ουβικινόνη. Συμμετέχει στο σύστημα μεταφοράς e^- στην αναπνευστική αλυσίδα. Αποτελεί επίσης το σύνδεσμο μεταξύ φλαβοπρωτεϊνών και κυτοχρωμάτων μέσα στα μιτοχόνδρια. Άρα δρα σαν λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό στις βιολογικές μεμβράνες και στις λιποπρωτεΐνες. Τα επίπεδά του στους ιστούς και στο αίμα εξαρτώνται απ' την ενδογενή βιοσύνθεσή του (Quiles *et al*, 2002)

1.6 ΦΑΙΝΟΛΕΣ: είναι αρωματικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια με αντικατάσταση ενός ή

περισσότερων ατόμων υδρογόνου. Μια τυπική μορφή της φαινόλης είναι ένας υδρογονανθρακικός δακτύλιος με μία ομάδα υδροξυλίου συνδεδεμένη σε αυτόν. Οι πολυφαινόλες είναι μία ομάδα φαινολικών ενώσεων, που δεν ανήκουν στην κατηγορία των θρεπτικών συστατικών, γι' αυτό άλλωστε και δεν έχουν καμία θερμιδική αξία, έχουν όμως ενεργητικές επιπτώσεις στον οργανισμό, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Ανάλογα με τη χημική τους δομή, διακρίνονται σε δέκα κατηγορίες εκ των οποίων όμως οι κυριότερες είναι τα φλαβονοειδή, οι φαινολικές αλκοόλες και τα φαινολικά οξέα.

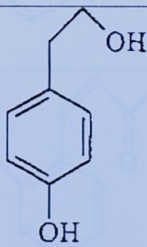
Στην κατηγορία των φλαβονοειδών ανήκουν οι φλαβανόλες (κερκετίνη, καιμπφερόλη), οι φλαβόνες (απιγενίνη) και οι φλαβονόλες, οι ισοφλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες, οι ανθοκυανίνες και οι ταννίνες.

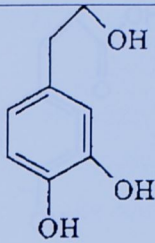
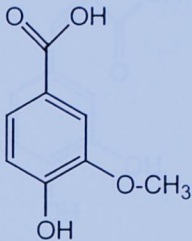
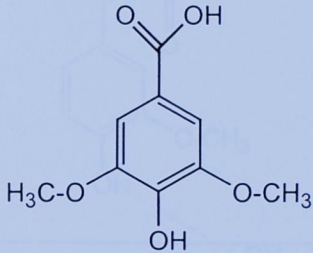
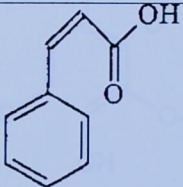
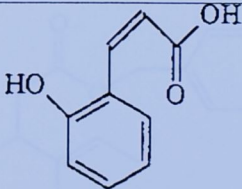
Στην κατηγορία των φαινολικών αλκοολών ανήκουν δύο πολυφαινόλες που αποτελούν τις σημαντικότερες πολυφαινόλες του ελαιολάδου και αυτές είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη.

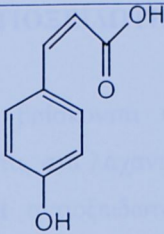
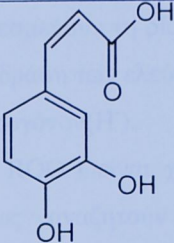
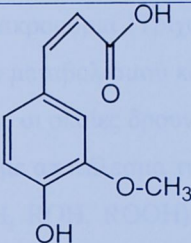
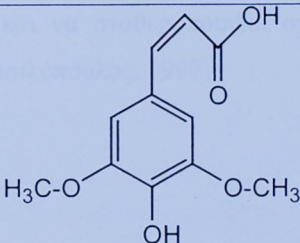
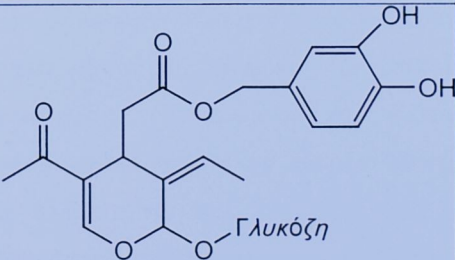
Στην τελευταία κατηγορία των φαινολικών οξέων συναντάμε δύο είδη οξέων, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. (Boskou, 1996).

Τα πιο κάτω σχήματα δείχνουν τις χημικές δομές ορισμένων σημαντικών πολυφαινολών κάθε κατηγορίας.

Πίνακας 2. Οι κυριότερες πολυφαινόλες του ελαιολάδου

Ονομασία	X.T.	M.B.
Τυροσόλη (4-υδροξυ-φαιν- αθυλ- αλκοόλη)		138

Τδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυ-φαι- αθυλ- αλκόολη)		154
Βανιλικό οξύ (3-υδροξυ-3-μεθοξυ- βενζοϊκό οξύ)		168
Συριγγικό οξύ (4-υδροξυ-3,5- διμεθοξυ-βενζοϊκό οξύ)		198
Κινναμικό οξύ (όχι φαινολική ένωση)		148
ο-Κουμαρικό οξύ (2-υδροξυ-κινναμικό οξύ)		164

π-Κουμαρικό οξύ (4-υδροξυ-κινναμικό οξύ)		164
Καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυ- κινναμικό οξύ)		180
Φερουλικό οξύ (4-υδροξυ-3- μεθοξύ- κινναμικό οξύ)		194
Σιναιπικό οξύ (4-υδροξυ-3,5 διμεθοξύ- κινναμικό οξύ)		224
Ολευρωπαϊνή (γλυκοζίτης)		690

1.7 ΔΡΑΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά βρίσκονται κυρίως σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως στις ελιές, στα φρούτα, στα λαχανικά, στο κρασί, στο καφέ, στη σοκολάτα, στα όσπρια, στο τσάι. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αποτελεί αντικείμενο ερευνάς πολλών επιστημόνων και από τα μέχρι σήμερα δεδομένα, αυτή οφείλεται α) στην ικανότητα τους να δεσμεύουν τη ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$) και β) στην ικανότητα τους να εμποδίζουν τη δράση των ελεύθερων ριζών ($\text{ROO}^\cdot$) και ($\text{RO}^\cdot$) δίνοντας στις ρίζες αυτές ένα άτομο υδρογόνου ($\text{H}^\cdot$).

Οι ελεύθερες ρίζες ($\text{R}^\cdot$, $\text{RO}^\cdot$, $\text{ROO}^\cdot$) είναι χημικές ουσίες που διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και συνήθως αναζητούν άλλα ηλεκτρόνια για να δημιουργήσουν ζεύγος. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς ενώσεις που προσβάλλουν άλλα μόρια, συνήθως μακρομόρια (Τριχόπουλος, 2000). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού και η δράση τους αναστέλλεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες δρουν ως δωρητές υδρογόνου (AH) δεσμεύοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους με το σχηματισμό μη ριζικών ενώσεων (RH , ROH , ROOH). Οι αντιοξειδωτική ρίζα που γίνεται πλέον μία ρίζα ($\text{A}^\cdot$), μπορεί να αντιδράσει με άλλες όμοιες ρίζες ($\text{A}^\cdot$), είτε με μια άλλη ρίζα ($\text{RO}^\cdot$, $\text{ROO}^\cdot$), και να σταθεροποιηθεί σχηματίζοντας μη ριζικές ενώσεις (AA , ROA , ROOA) (Βασιλόπουλος, 1997).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΠΗΓΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε αρκετά τρόφιμα και λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης έχουν γίνει μέχρι τώρα πάρα πολλές έρευνες από διάφορους επιστήμονες για τη διερεύνηση και τη διευκρίνιση των λειτουργιών τους. Κύριες πηγές πολυφαινολών είναι το τσάι, το κρασί, η σοκολάτα, η ελιά το ελαιόλαδο. Βέβαια το καθένα απ' αυτά έχει διαφορετική συγκέντρωση και διαφορετικά είδη πολυφαινολών που στο σύνολό της αποδίδουν στο συγκεκριμένο τρόφιμο ή ρόφημα μια μοναδική αντιοξειδωτική δράση.

2.1 Πολυφαινόλες στο κρασί: Πολλές επιδημιολογικές έρευνες υποστηρίζουν πως μία μέτρια καθημερινή πρόσληψη κρασιού μειώνει σημαντικά τη θνησιμότητα από διάφορες παθήσεις και ιδίως καρδιοπάθειες. Η μέτρια πρόσληψη αιθανόλης από οποιοδήποτε αλκοολούχο ποτό βελτιώνει το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και μειώνει τη θνησιμότητα καρδιοπαθειών.

Το κρασί είναι προϊόν από φρούτο (σταφύλι) που περιλαμβάνει και μία μικρή ποσότητα αιθανόλης, περίπου 8%- 15% αιθανόλη ανά κιλό κρασιού. Είναι πλούσια πηγή πολυφαινολών και φαινολικών οξέων και ιδίως το κόκκινο κρασί στο οποίο τα βιολογικά ενεργά φυτοχημικά με αντιοξειδωτικές ιδιότητες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ότι στο λευκό κρασί. Συγκεκριμένα η ολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο λευκό κρασί κυμαίνεται μεταξύ 100-250 mg/L γαλλικού οξέος ενώ το κόκκινο κρασί κυμαίνεται μεταξύ 1000-4000 mg/L γαλλικού οξέος. Αυτή η διαφορά πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές τεχνικές επεξεργασίας και στα διαφορετικά είδη φρούτου που χρησιμοποιούνται (Blanco, et al, 2000)

Τα φαινολικά οξέα και οι πολυφαινόλες στα σταφύλια είναι τα συστατικά με τις κυριότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επομένως τα διάφορα είδη κρασιού διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, κάτι το οποίο εξαρτάται απ' τη συγκέντρωση των πολυφαινολών και των φαινολικών οξέων στο κάθε είδος κρασιού. Μετά από έρευνες επιβεβαιώνεται πως το κόκκινο κρασί αποτελεί πλούσια πηγή διαφόρων φαινολικών οξέων και πολυφαινολών που το καθένα από αυτά έχει ξεχωριστές βιολογικές επιδράσεις και στο σύνολό τους αποδίδουν μια ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα σε αυτό που εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Ανάμεσα στα πολλά θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στο κρασί όπως υδατάνθρακες, αλκοόλες, οργανικά οξέα, ιχνοστοιχεία υπάρχουν και

πολλά αντιοξειδωτικά συστατικά σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Τα κυριότερα από αυτά είναι τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, (γαλλικό και σαλικιλικό οξύ), τα υδροξυκινναμινά οξέα (καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ), τα φλαβονοειδή (κατεχίνη, επικατεχίνη και προκυανιδίνη) και οι ανθοκυανίνες. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα επιστημονικών ερευνών, η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μικρού ποτηριού με κόκκινο κρασί (150mL) ισοδυναμεί με 12 ποτηράκια λευκού κρασιού ή με 2 φλιτζάνια τσαγιού, ή με 5 μήλα, με 100 γρ. κρεμμυδιού, με 500 mL μύζας, με 7 ποτηράκια χυμό πορτοκαλιού ή με 20 ποτηράκια χυμό μήλο (German, *et al*, 2000). Σύμφωνα με αυτά μπορούμε να διανοηθούμε τη μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα του κόκκινου κρασιού εξαιτίας της πλούσιας περιεκτικότητάς του σε πολυφαινόλες και φαινολικά οξέα.

Μία μέτρια πρόσληψη κρασιού καθημερινά (250mL /ημέρα) συνεισφέρει θετικά στην υγεία λόγω των φαινολικών συστατικών που περιέχονται σε αυτό, και προστατεύουν από την εμφάνιση διάφορων χρόνιων νοσημάτων και ιδίως από τη διαδικασία της θρόμβωσης των αρτηριών. Συγκεκριμένα η επικατεχίνη έχει προστατευτική επίδραση στην πρόληψη της οξείδωσης της LDL και μάλιστα η επίδραση αυτή είναι ισχυρότερη απ' την αντίστοιχη της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλης). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη, είναι τα φαινολικά του κρασιού που βρίσκονται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα άλλα αντιοξειδωτικά. Η συγκέντρωσή τους στο λευκό κρασί είναι 15 mg/L ενώ στο κόκκινο κρασί είναι 150 mg/L. Η ρεσβερατρόλη είναι επίσης ένα σημαντικό διατροφικό αντιοξειδωτικό στο κόκκινο κρασί, σε συγκεντρώσεις όμως αρκετά μικρότερες από εκείνες της κατεχίνης και επικατεχίνης (Blanco *et al*, 2000).

Έτσι μια μέτρια πρόσληψη κόκκινου κρασιού ημερησίως δηλαδή 250 mL / ημέρα για τους άνδρες και 125 mL/ημέρα για τις γυναίκες συνίσταται από γιατρούς και διαιτολόγους αφού με τις συγκεκριμένες ποσότητες ο οργανισμός θα προσλαμβάνει επαρκώς τις ποσότητες των αντιοξειδωτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της υγείας του. Βεβαίως οι συστάσεις αυτές απευθύνονται σε υγιή άτομα χωρίς άλλα προβλήματα υγείας όπως διαβήτης, δισλιπιδαιμίες κ.α.

2.2 Πολυφαινόλες στο τσάι: Το τσάι όπως και πολλά άλλα τρόφιμα αποτελεί μια σπουδαία πηγή πολυφαινόλων με αντιοξειδωτική δράση γι' αυτό άλλωστε και

πρόσληψή του συνίσταται τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία διάφορων νοσημάτων.

Καταρχήν υπάρχουν 2 είδη τσαγιού, το μαύρο και το πράσινο τσάι που λόγω της διαφορετικής τεχνικής επεξεργασίας τους κατά την παρασκευή τους, έχουν διαφορετική φαινολική σύσταση. Στο πράσινο τσάι συναντάμε 3 κατηγορίες πολυφαινόλων, τις φλαβονόλες, τις φλαβανόλες και τις φλαβόνες. Στις φλαβονόλες ανήκουν οι κατεχίνες που αποτελούν το 30-42% του ξηρού βάρους του τσαγιού ενώ στις φλαβανόλες συναντάμε την κερκετίνη, την καιμπφερόλη, την μυρισετίνη και τους γλυκοζίτες της (Lee *et al*, 1995). Τέλος στην κατηγορία των φλαβονών συναντάμε την απιγενίνη και τους γλυκοζίτες της. Η συγκέντρωση των φλαβονόλων και φλαβονών είναι αρκετά μικρή. Το μαύρο τσάι λόγω της διαδικασίας της ζύμωσης που επιδέχεται κατά την επεξεργασία του έχει διαφορετικές πολυφαινόλες. Οι κυριότερες πολυφαινόλες που συναντάμε σε αυτό είναι οι θεαφλαβίνες (πορτοκαλοκόκκινες χρωστικές), οι θεαρουμπιγίνες που αποτελούν το 10-30% του ξηρού βάρους του τσαγιού και ορισμένες κατεχίνες που αποτελούν το 5% του ξηρού βάρους του τσαγιού (Beecher, 1999).

Επίσης σημαντικό συστατικό του τσαγιού είναι και η καφεΐνη που περιέχεται σε ποσότητα 3-6% του ξηρού βάρους του κρασιού. Η καφεΐνη σαν διεγερτικό του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, κάνει το τσάι να είναι τονωτικό, διουρητικό και να χαρίζει ξεχωριστή γεύση και άρωμα (Harler, 1963). Γενικά το τσάι λόγω αυτής της πολυφαινολικής του σύστασης, αποτελεί ένα ξεχωριστό ρόφημα, ιδανικό για την πρόληψη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων όπως καρδιαγγειακά, κακοήθειες νεοπλασίες, διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις.

2.3 Πολυφαινόλες στον καφέ: Ένα άλλο ρόφημα που αποτελεί πηγή πολυφαινόλων είναι ο καφές. Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του καφέ είναι 2 είδη φαινολικών οξέων, το υδροξυβενζοϊκό οξύ και το υδροξυκινναμικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ το οποίο είναι παράγωγο του υδροξυκαμμινικού οξέος λαμβάνεται από τα άτομα που πίνουν καφέ σε μέση ημερήσια πρόσληψη 206 mg/ημέρα. Ορισμένες έρευνες που έχουν γίνει από διάφορους επιστήμονες για τη διερεύνηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων διαφόρων ειδών ροφημάτων καφέ, βρέθηκε πως τα μεσαίου σκούρου χρώματος ροφήματα καφέ έχουν τις υψηλότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Nicol *et al*, 1997).

2.4 Πολυφαινόλες στα φρούτα και λαχανικά: Κύριο χαρακτηριστικό της Μεσογειακής Δίαιτας είναι η αυξημένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών και γενικά τροφίμων φυτικής προέλευσης. Το γεγονός ότι μία πληθώρα ερευνών έδειξε πως τα ποσοστά θνησιμότητας διαφόρων χρόνιων νοσημάτων είναι αρκετά μικρότερα στις Μεσογειακές χώρες παρά στις άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι διαιτητικές συνήθειες των Μεσογειακών χωρών συμβάλλουν στις διαφορές αυτές. Πράγματι τα φρούτα και λαχανικά είναι τρόφιμα πλούσια σε πολυφαινόλες με σπουδαία αντιοξειδωτική δράση. Περιέχουν κυρίως φλαβονοειδή, τα οποία υποδιαιρούνται σε διάφορες κατηγορίες. Μία κατηγορία είναι οι ανθοκυανιδίνες που είναι χρωστικές ουσίες, στις κατεχίνες που βρίσκονται ιδίως στο τσάι, στις φλαβονόλες, φλαβανόλες και στις φλαβόνες (EU, 2002 γ). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα φρούτα και λαχανικά βρίσκονται οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους. Επίσης, τα όσπρια που κατέχουν σημαντική θέση στη Μεσογειακή Διατροφή αποτελούν πηγή πολυφαινολών κυρίως περιέχοντας ταννίνες και σαπωνίδες.

2.5 Πολυφαινόλες στη σοκολάτα: Η σοκολάτα είναι πλούσια πηγή συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών με τη βασική δομή της κατεχίνης και της επικατεχίνης και ιδίως με τα πολυμερή προκυανιδίνων δηλαδή πολυφαινολών που μοιάζουν με αυτές που συναντάμε στα λαχανικά και στο τσάι. Διάφορες επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν πως μια μέτρια πρόσληψη τέτοιων προϊόντων αυξάνουν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο πλάσμα, πράγμα το οποίο είναι επιθυμητό για την εξουδετέρωση της δράσης των ελευθέρων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά που βρίσκονται στο κακάο και στη σοκολάτα συμβάλλουν στην πρόσληψη καρδιοπαθειών μειώνοντας την οξείδωση της LDL χοληστερόλης αλλά και την πρόληψη διάφορων μορφών καρκίνου μειώνοντας τις επιδράσεις κάποιων γονιδιοτοξικών καρκινογενετικών κυττάρων. Κυριότερα αντιοξειδωτικά που συναντούμε στη σοκολάτα και στο κακάο είναι η θεοβρωμίνη σε ποσοστό 2-3% ανά Kg και πολύ μικρά ποσά καφεΐνης, 0,2%. Η θεοβρωμίνη έχει πολύ μικρές επιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα συγκρινόμενη με τη καφεΐνη, γι' αυτό μπορεί να προσληφθεί και από παιδιά χωρίς το φόβο του να προκαλέσει υπερενεργητικότητα ή αϋπνία. Επίσης στη σοκολάτα βρίσκονται και κάποια άλλα αντιοξειδωτικά που ανήκουν στην τάξη των πολυφαινολών και λέγονται προκυανιδίνες οι οποίες βρίσκονται σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα άλλα αντιοξειδωτικά που έχουν αναφερθεί πιο πάνω δηλ. θεοβρωμίνη και καφεΐνη.

Το κυριότερο λιπαρό οξύ στο κακάο είναι το στεαρικό οξύ, το οποίο σε αντίθεση με τα άλλα λίπη πιθανόν να μην έχει υπερχοληστερολαιμικές ιδιότητες. (Weisburger, *et al*, 2000)

Η συνολική συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στο κακάο είναι $224 \pm 66,4 \mu\text{mol/g}$, στην σκούρα σοκολάτα είναι $1267,4 \mu\text{mol/g}$, ενώ στη σοκολάτα γάλακτος είναι $52,2 \pm 2,04 \mu\text{mol/g}$. Εντούτοις η αντιοξειδωτική διαθεσιμότητα του κακάου και της σοκολάτας είναι πολύ μικρότερη συγκρινόμενη με αυτής των λαχανικών και του τσαγιού. Έχει υπολογιστεί πως 8 ποτηράκια των 150mL τσάι, που περιέχουν συνήθως 2,25 g μαύρο ή πράσινο τσάι, προσφέρει 5,4 πολυφαινόλες ενώ ένα κομμάτι σοκολάτας βάρους 7oz (198gr) προσφέρει μόνο 1,7 g προκυανιδίνες. Έτσι είναι απίθανο κάποιο άτομο να προσλαμβάνει 8 ποτηράκια των 125 mL κακάο ημερησίως λόγω του υψηλού θερμιδικού του περιεχομένου, κάτι το οποίο δεν ισχύει για το τσάι το οποίο είναι υγρό χωρίς καμιά θερμιδική αξία (Weisburger *et al*, 2001). Για το λόγο αυτό είναι δύσκολο να καθοριστούν οι προστατευτικές επιδράσεις των αντιοξειδωτικών στο κακάο και στη σοκολάτα μέσω επιδημιολογικών προσεγγίσεων.

Παρόλα αυτά όμως η σοκολάτα και το κακάο περιέχουν σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών μονομερείς κατεχίνες και πολυμερείς προκυανιδίνες. Αυτά τα αντιοξειδωτικά, μοιάζουν πολύ με αυτά που συναντάμε στο τσάι αλλά παρουσιάζουν διαφορετικές χημικές δομές από μεταβολικές λειτουργίες.

2.6. Οι πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο

Τα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο λέγονται πολυφαινόλες και αποτελούν το πολικό κλάσμα που μπορεί να παραληφθεί από το ελαιόλαδο μετά την εκχύλισή του με μίγμα μεθανόλης και νερού (Boskou, 1996). Κυριότερες πολυφαινόλες του ελαιολάδου, για τις οποίες θα αναφερθούμε στη συνέχεια με μεγαλύτερη λεπτομέρεια είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη που προέρχονται απ' την υδρόλυση της ολεωρωπαΐνης ενώ άλλες πολυφαινόλες όπως το ομοβανιλλικό, πρωτοκατεχικό και συριγγικό οξύ, προέρχονται από την υδρόλυση φλαβονοειδών που βρίσκονται επίσης στο καρπό. Αλλά φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο λάδι της ελιάς είναι η ολεωρωπαΐνη, το καφεϊκό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το συγγικικό οξύ, το π- και ο- κουμαρικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το π- υδροξυφαινολακτικό οξύ και το ομοβανιλλικό οξύ. (Βεκιάρη, 2001). Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των

πολυφαινολών στο ελαιόλαδο είναι: α) η ποικιλία - είδος ελιών (Solinas *et al*, 1975), β) ωριμότητα του καρπού, αφού όσο πιο άγουρα είναι τα φρούτα της ελιάς τόσο πιο μεγάλο το ποσοστό των πολυφαινολών σε αυτά. γ) το σύστημα παραλαβής του ελαιόλαδου. Υπάρχουν δύο συστήματα παραλαβής: το σύστημα πίεσης, όπου το ελαιόλαδο έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ιδίως σε υδροξυτυροσόλη και το σύστημα φυγοκέντρωσης, που μειώνεται η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο σε ποσοστό 40-50% λόγω διάλυσής τους στο νερό που χρησιμοποιείται στο σύστημα αυτό. (Βεκιάρη, 2001)

Βασικός δείκτης ποιότητας του ελαιόλαδου είναι η παρουσία τοκοφερολών και πολυφαινολών σε αυτό. Αυτά τα αντιοξειδωτικά δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στα αρχικά στάδια της οξείδωσης και έτσι παρεμποδίζεται η έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων. Το παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο παράγεται απ' το φρούτο της ελιάς χωρίς να δεχτεί καμία διαδικασία εξευγενισμού, περιέχει πιο πολλές πολυφαινόλες από άλλα εδάδια έλαια, γι' αυτό το λόγο άλλωστε δικαιολογείται και η μεγάλη σταθερότητά του στην οξείδωση. Επομένως η ποιότητα του ελαιόλαδου καθορίζεται απ' τη συγκέντρωση πολυφαινολών σε αυτό οι οποίες επηρεάζουν τη γεύση και το άρωμα του.

Στο ελαιόλαδο γενικά ταυτοποιήθηκαν πάνω από εκατό συστατικά όπως υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, εστέρες, φαινόλες, φαινολικά παράγωγα, οξυγονωμένα τερπένια και φουρανικά παράγωγα. Παρόλα αυτά όμως το φαινολικό κλάσμα στο ελαιόλαδο, συμβάλλει αποκλειστικά στη γεύση, στο άρωμα αλλά και στη σταθερότητά του. (Βεκιάρη, 2001)

Όπως έχει προαναφερθεί, κυριότερες πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη. Η τυροσόλη ή αλλιώς π- υδροξυφαινολαιθανόλη, είναι μία πολυφαινόλη που αν και έχει χαμηλή αντιοξειδωτική δράση εντούτοις έχει μία σταθερή προστατευτική επίδραση στην οξείδωση ακόμα και σε κρίσιμες καταστάσεις όπως στην παρουσία υπεροξειδίων. Όπως είναι γνωστό, τα προϊόντα οξείδωσης του φυσιολογικού μεταβολισμού μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένες ζημιές στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Ορισμένα κύτταρα έχουν την ιδιότητα να επιδιορθώνουν τις βλάβες αυτές αλλά το έργο αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα από τα αντιοξειδωτικά. Σύμφωνα με μία έρευνα που έγινε για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της τυροσόλης που έγινε από τους Giovannini *et al*, 1999 φάνηκε πως αυτή είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό αφού μετά από φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος 234 nm, όπου η LDL οξειδώθηκε με τη βοήθεια θειικού χαλκού

(CuSO₄), παρουσία τυροσόλης έδειξε μικρότερο φάσμα απορρόφησης (85±33 min). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν υψηλότερα σε σχέση με τη χρήση βανιλλικού οξέος ως αντιοξειδωτικό, όπου το φάσμα απορρόφησης ήταν μικρότερο (90 ±11 min), ενώ ήταν παρόμοιο με το φάσμα που έδωσε το ο- κουμαρικό οξύ (194±23 min). Το φάσμα τυροσόλης ήταν πολύ χαμηλό σε σχέση με τα φάσματα που έδωσαν άλλα αντιοξειδωτικά όπως η ολεωρωπαΐνη, το καφεϊκό οξύ τα οποία θεωρούνται απ' τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά στο ελαιόλαδο, δίνοντας αρκετά μεγάλα φάσματα απορρόφησης (500>min).

Συμπερασματικά η τυροσόλη είναι ένα αρκετά σταθερό αντιοξειδωτικό όπως φαίνεται απ' τη δράση της σε «κρίσιμες» καταστάσεις, που ενώ άλλα αντιοξειδωτικά, όπως τα φλαβονοειδή, δείχνουν κάποια μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, η τυροσόλη παραμένει αναλλοίωτη στην αντιοξειδωτική της δράση. Σαν αντιοξειδωτικό δεν είναι πολύ ισχυρό αφού δεσμεύει μόνο υδροξυλικές ρίζες ενώ άλλα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν διάφορα είδη ριζών και μεταλλικά ιόντα. Χαρακτηριστικό της όμως είναι η σταθερότητα που παρουσιάζει ως αντιοξειδωτικό (Giovannini *et al*, 1999). Σύμφωνα με έρευνες οι συγκεντρώσεις τυροσόλης στο ελαιόλαδο είναι 4,69±0,77mg/Kg, στο extra παρθένο ελαιόλαδο είναι 27,45±4,05mg/Kg, ενώ στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο είναι 2,98±33mg/Kg(Turketal *et al*, 2002)

Το δεύτερο κυριότερο φαινολικό συστατικό στο ελαιόλαδο είναι η υδροξυτυροσόλη, που μοιάζει δομικά με την τυροσόλη με τη μόνη διαφορά στο ότι έχει μια υδροξυλομάδα στα μέτα – θέση. Τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη προέρχονται από την υδρόλυση της ολεωρωπαΐνης, ενός εστέρα που αποτελεί το κυριότερο φαινολικό συστατικό στον καρπό της ελιάς. Καθώς ωριμάζει ο καρπός της ελιάς, τα επίπεδα της ολεωρωπαΐνης μειώνονται ενώ τα επίπεδα υδροξυτυροσόλης αυξάνονται αφού είναι προϊόν υδρόλυσής της. Οι συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης στο ελαιόλαδο κυμαίνονται μεταξύ 1,4-5,6 mg/L, στο extra παρθένο 14,42±3,01 mg/Kg και στα εξευγενισμένα έλαια 1,74±0,84 mg/Kg (Tuck *et al*, 2002).

Κύριες λειτουργίες της υδροξυτυροσόλης ως αντιοξειδωτικό είναι η μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων. Σαν συστατικό με ορθοδιαφαινολική δομή έχει αντιοξειδωτική δράση και δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης αναστέλλει την λιποοξυγενάση του αραχιδονικού οξέος και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο της θρόμβωσης των αρτηριών.

Επίσης η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την καταστροφή του DNA από τα υπεροξυνιτρώδη, προστατεύει τους ηλεκτρολύτες του σώματος από την δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που παράγεται κατά τον οξειδωτικό μεταβολισμό και στη συνέχεια αυξάνει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, ενός μορίου που συμμετέχει στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η υδροξυτυροσόλη είναι το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό στο παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο αποτελεί και τη μοναδική εδώδιμη πηγή της, αν και η συγκέντρωσή της στην ελεύθερη της μορφή είναι σχετικά μικρή. Ορισμένες έρευνες που έγιναν με τη μέθοδο Rancimat φάνηκε πως στους $120^\circ C$ η οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης. Σε κάποια άλλη έρευνα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης συγκρινόμενη με άλλα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. Αυτό έγινε με τη μέθοδο DPPH (έλεγχος του βαθμού εξουδετέρωσης των ριζών DPPH από τα φαινολικά συστατικά) αφού πρώτα προηγήθηκε ο διαχωρισμός των φαινολών που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Στα πρώτα 15min, η οξειδωτική σταθερότητα στα γαλακτώματα που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών του DPPH μέχρι και 50%, μειώνονταν ως εξής: ισομερές αγλυκόνης ολεωρωπαΐνης > υδροξυτυροσόλη > ολεωρωπαΐνη > ακετοϋδροξυτυροσόλη, α- τοκοφερόλη, trolox > άλλα φαινολικά συστατικά. Επομένως με βάση το πείραμα αυτό μπορούμε να κατανοήσουμε την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης (Gordon *et al*, 2001).

Επίσης όσον αφορά την εξέλιξη αυτών των 2 φαινολικών συστατικών κατά την αποθήκευσή τους έγινε μία έρευνα από τους Luciano *et al*, 1999, για να εξεταστεί η εξέλιξη τους κατά τη 18μηνη αποθήκευσή τους. Η έρευνα αυτή έδειξε πως όσο πιο ώριμες ήταν οι ελιές, τόσο πιο μικρότερη ήταν η συγκέντρωση των ολικών φαινολών. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα των εστερασών, όταν οι ελιές βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης. Μείωση στην ολική συγκέντρωση των φαινολών παρουσιάστηκε μετά από 18μηνη αποθήκευση του ελαιολάδου σαν αποτέλεσμα οξειδωτικών και υδρολυτικών διαδικασιών που αυξάνονται κατά την αποθήκευση. Μετά από 6μηνη αποθήκευση του ελαιολάδου, η συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης αυξήθηκε σαν αποτέλεσμα αυξημένων υδρολυτικών διεργασιών των φαινολών σύνθετων, που πιθανόν να γίνονταν λόγω υψηλότερων θερμοκρασιών του καλοκαιριού. Ενώ στο τέλος της 18μηνιαίας αποθήκευσής, η πτώση των σύνθετων φαινολών είχε σαν αποτέλεσμα τη

μείωση της υδροξυτυροσόλης και σχεδόν την πλήρη εξαφάνισή της. Γενικά ενώ στους πρώτους 6 μήνες οι σύνθετες φαινόλες όπως η υδροξυτυροσόλη αυξάνονται, στους επόμενους μήνες μειώνονται κάτι το οποίο δεν ισχύει για τις απλές φαινόλες όπως είναι η τυροσόλη. Η τυροσόλη τους πρώτους 6 μήνες αποθήκευσης παρουσίαζε μείωση της συγκέντρωσής της ενώ τους επόμενους μήνες παρουσίαζε αύξηση. Η μέση συγκέντρωση της τυροσόλης για την περίοδο μετά τους 6 μήνες αποθήκευσης ήταν παρόμοια με τη συγκέντρωσή της, στους 12 και στους 18 μήνες αποθήκευσης πράγμα που επιβεβαιώνει τη σταθερότητα της κατά την αποθήκευση.

Ένα άλλο φαινολικό συστατικό στο ελαιόλαδο είναι η ολεωρωπαΐνη που με τη διάσπασή της μέσω υδρόλυσης δίνει τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη. Οι Briante *et al*, 1999 οι οποίοι μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση του συστατικού αυτού και την ικανότητα να αναστέλλει το βαθμό υπεροξειδωσης των λιπαρών οξέων από τα προϊόντα αντίδρασης, μετά από υδρόλυση της ολεωρωπαΐνης με υπερθερμοφιλική β-γλυκοσιδάση. Κυριότερα προϊόντα ήταν η αγλυκόνη ολεωρωπαΐνης, η υδροξυτυροσόλη και το ελενολικό οξύ. Η αντιοξειδωτική δράση των μορίων αυτών σχετίζεται με το βαθμό των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Επίσης η έρευνα αυτή έδειξε πως η υδροξυτυροσόλη και η ολεωρωπαΐνη έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το ελενολικό οξύ (Tucketa, 2002).

Άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά στο ελαιόλαδο είναι οι τοκοφερόλες οι οποίες έχουν βιολογική δράση και συμβάλλουν στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου. Όσον αφορά την α- τοκοφερόλη, η αντιοξειδωτική δράση της είναι μεγαλύτερη σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης 500-1000mg/Kg. Παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών όπως οι ο- διφαινόλες, η α- τοκοφερόλη δεν έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, αλλά η δράση της ενισχύεται όταν τα προϊόντα οξειδωσης αυξηθούν πολύ. Η περιεκτικότητα των ελίων σε τοκοφερόλη είναι αρκετά μεγαλύτερη στις αρχές τις συγκομιδής. Τα επίπεδά της κυμαίνονται μεταξύ 5-300 mg/Kg ενώ στα ελαιόλαδα 100-300mg/Kg (Owen *et al*, 2000). Τα εδωδιμα έλαια έχουν μικρότερα ποσά α- τοκοφερόλης λόγω απωλειών της κατά την επεξεργασία τους.

Επίσης στο ελαιόλαδο υπάρχουν τα φλαβονοειδή με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και ισοφλαβόνες που έχουν παρόμοιες λειτουργίες με τα φλαβονοειδή. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και οι λιγνίνες που είναι φυτικά φαινολικά τα οποία μεταφέρονται στα έντερα υπό την μορφή φυτοοιστρογόνων και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου που

σχετίζεται με τις ορμόνες, δεσμεύοντας τον υποδοχέα των οιστρογόνων στα κύτταρα. Επίσης οι λιγνίνες προκαλούν μείωση της LDL χοληστερόλης, της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.

Άλλη κατηγορία αντιοξειδωτικών είναι οι τερπένες. Αυτά είναι μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες χημικών συστατικών μέσα στα απαραίτητα έλαια των φυτών. Αυτά ανήκουν στην κατηγορία των ισοπρενοειδών και λιποειδών και είναι ενώσεις με 100 άτομα άνθρακα τα οποία έχουν διάταξη 2 ισοπρενικών ομάδων. Προστατεύουν τα φυτά απ' την οξειδωτική καταστροφή και έχοντας αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας τα λίπη, το αίμα και άλλα υγρά του σώματος απ' τη δράση των ελευθέρων ριζών. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα καροτενοειδή, τα οποία είναι απ' τις κυριότερες χρωστικές των φυτών με αντιοξειδωτική δράση. Ανήκουν στα ισοπρενοειδή (τερπένια δηλαδή) και στα λιποειδή και είναι πολυτερπένια με 40 άτομα άνθρακα και 8 ισοπρενοειδείς ομάδες που περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες και οξυγονούχες ενώσεις (Ανδρικόπουλος, 1998). Τα καροτενοειδή προστατεύουν από την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Συγκεκριμένα το α- καροτένιο είναι ένα αντιοξειδωτικό που μετατρέπεται σε βιταμίνη Α όταν τα επίπεδα της στον οργανισμό είναι μειωμένα. Το ίδιο ισχύει και για το β- καροτένιο. Ένα άλλο αντιοξειδωτικό που ανήκει στην κατηγορία των καροτενοειδών είναι η λουτεΐνη, η οποία βρίσκεται στο μάτι. Είναι κίτρινου χρώματος και μειώνει τον κίνδυνο τύφλωσης σε άτομα άνω των 65 ετών. Αντιστέκεται περισσότερο στο μαγείρεμα από άλλα καροτενοειδή και μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των πνευμόνων.

Γενικά το ελαιόλαδο είναι ένα μίγμα τριγλυκεριδίων. Περιέχει μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης, φωσφατιδίων, στερολών εκ των οποίων η κυριότερη στερόλη του είναι η β- σιτοστερόλη, μία φυτοστερόλη που βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα φυτικά έλαια και που αποτελεί το 95% των ολικών στερολών. Η καμπεστερόλη αποτελεί το 3% των στερολών ενώ το υπόλοιπο 2% είναι μίγμα στερολικών συστατικών. Οι ολικές στερόλες είναι πολύ αυξημένες στο παρθένο ελαιόλαδο παρά στο ραφινρισμένο και η ποσότητα αυτών δείχνει κατά πόσο ένα παρθένο έχει αναμειχθεί με ένα ραφινρισμένο δηλ. αποτελεί παράμετρο αγνότητας. Το κυριότερο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C18:1, 9cis). Η μέση συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών του οξέων είναι οι εξής: α) παλμιτικό οξύ σε συγκέντρωση 7,5%-20%, β) παλμιτολεϊκό οξύ σε συγκέντρωση 0,3-3,5%, γ) στεαρικό οξύ σε συγκέντρωση 0,5-5%, δ) ελαϊκό οξύ σε

συγκέντρωση 3,5-21% ε) ελενολικό οξύ σε συγκέντρωση 3,5-21% και άλλα οξέα σε ποσοστό 1,5-3,2%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Τα διάφορα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας μπορούν να επηρεάσουν θετικά την υγεία μας και να βοηθήσουν στην πρόληψη είτε και στη θεραπεία αρκετών χρόνιων νοσημάτων. Μέχρι τώρα έχουν γίνει από διάφορους επιστήμονες πολλές έρευνες που δείχνουν μια ισχυρή σχέση μεταξύ της πρόσληψης διαφόρων αντιοξειδωτικών π.χ. ακόρεστων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και της θνησιμότητας χρόνιων νοσημάτων, όπως για παράδειγμα της στεφανιαίας νόσου. Συγκεκριμένα, έρευνα που έγινε στις Νότιες και Δυτικές Ευρωπαϊκές χώρες και στις Μεσογειακές απέδειξε πως στις Νότιες και Ευρωπαϊκές χώρες όπου η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι αρκετά υψηλή, το ποσοστό θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο είναι επίσης υψηλό, ενώ στις Μεσογειακές χώρες όπου η πρόσληψη κορεσμένου λίπους είναι χαμηλότερη, το ποσοστό θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο είναι επίσης χαμηλό (EU, 2002 β).

• ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.

Η προδιάθεση για στεφανιαία νόσο καθορίζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ανάμεσα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες ανήκει και η διατροφή που ακολουθεί κάθε άτομο.

3.1 Αντιοξειδωτικά και Υπέρταση: Αρκετές έρευνες δείχνουν μια ισχυρή σχέση μεταξύ διατροφής και αρτηριακής υπέρτασης αλλά και μεταξύ Μεσογειακής διαίτας και αρτηριακής υπέρτασης. Επίσης οι χορτοφάγοι αλλά και άτομα που ζουν στις Μεσογειακές χώρες, είχαν χαμηλότερη αρτηριακή πίεση από άλλα άτομα και αυτό μας οδηγεί στο «συμπέρασμα» πως αυτή η μειωμένη αρτηριακή πίεση πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων, φυτικών ινών, μικροθρεπτικών συστατικών όπως νατρίου, καλίου, ασβεστίου και στη μειωμένη πρόσληψη αλατιού που χαρακτηρίζει τις δίαιτες των ατόμων αυτών (EU, 2002 β).

Πρόσφατη έρευνα που έγινε στην Ισπανία, στην οποία συμμετείχαν 20 υγιείς εθελοντές, εξετάστηκαν οι επιδράσεις δύο υψηλών σε λίπος δίαιτες, εμπλουτισμένες με μονοκόρεστα λιπαρά οξέα (40% λίπος εκ των οποίων το 22% ήταν MUFA). Η μία

δίαιτα περιλάμβανε ως πηγή λίπους το παρθένο ελαιόλαδο ενώ η άλλη φυτικό λάδι εμπλουτισμένο με ελαϊκό οξύ. Οι δύο αυτές δίαιτες συγκρίθηκαν με τη δίαιτα STEP 1, στην οποία το λίπος αποτελεί το 30% της συνολικής ενέργειας, ενώ τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν μόνο το 12% της ενέργειας. Σε όλες τις δίαιτες, οι συγκεντρώσεις των άλλων θρεπτικών συστατικών ήταν ίδιες. Η έρευνα αυτή εφαρμόστηκε συνολικά για τέσσερις βδομάδες και έδειξε πως τα άτομα που ακολούθησαν της MUFA - δίαιτες παρουσίασαν κάποια σημαντική μείωση τόσο της συστολικής όσο και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης, ενώ τα άτομα που ακολουθούν τη δίαιτα STEP 1 δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, δίαιτα εμπλουτισμένη σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα οδηγεί στη μείωση της αρτηριακής υπέρτασης (EU, 2003 β).

Βέβαια η ακριβής σχέση μεταξύ δίαιτας και Αρτηριακής Υπέρτασης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Κάποια στοιχεία δείχνουν πως η Μεσογειακή δίαιτα που χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρόσληψη ελαιολάδου, δημητριακών, λαχανικών και φρούτων, έχει θετικές επιδράσεις στην αρτηριακή υπέρταση. Εντούτοις δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη εάν η θετική επίδραση οφείλεται στη δράση μεμονωμένων συστατικών της δίαιτας αυτής είτε γενικά στην Μεσογειακή δίαιτα.

3.2 Αντιοξειδωτικά και Διαβήτης: Τα ποσοστά εμφάνισης του μη ινσουλινοεξαρτώμενου Διαβήτη ολοένα και αυξάνονται μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο σε αρκετές αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες. Διάφοροι παράγοντες όπως γενετικοί, διαιτητικοί, η φυσική δραστηριότητα, καθορίζουν την εμφάνιση αυτού του τύπου διαβήτη και η πρόληψη του μπορεί να γίνει μέσω σωστής διατροφής και φυσικής δραστηριότητας.

Μέχρι τώρα δεν έχουν γίνει αρκετές έρευνες που να δείχνουν τις επιδράσεις της Μεσογειακής δίαιτας στην εμφάνιση του διαβήτη. Ορισμένα στοιχεία δείχνουν πως η αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων και διαιτητικών ινών, σε συνδυασμό με τη μειωμένη πρόσληψη κορεσμένου λίπους μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης Διαβήτη Τύπου II. Μία έρευνα που έγινε σε Ιάπωνες και Αμερικάνους με δυσανοχή στην γλυκόζη, φάνηκε πως η αυξημένη πρόσληψη ζωικού λίπους οδηγούσε στην εμφάνιση διαβήτη ενώ η αυξημένη πρόσληψη φυτικού λίπους οδηγούσε σε μειωμένο ποσοστό εμφάνισής του. Κάποιοι άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν πως οι δίαιτες αυξημένες σε λίπος και συγκεκριμένα αυξημένο ποσοστό μονοακόρεστου σε συνδυασμό με μειωμένο ποσοστό κορεσμένου λίπους, είχαν σαν αποτέλεσμα τον

καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο σε διαβητικά άτομα παρά τις δίαιτες που ήταν αυξημένες σε υδατάνθρακες. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών (MUFA) και της πρώτης δίαιτας να μειώνουν τα τριγλυκερίδια και την VLDL(λιποπρωτεΐνη) του πλάσματος και να αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (EU, 2003 β).

Επίσης, ως γνωστό η αυξημένη πρόσληψη λίπους οδηγεί στην αύξηση σωματικού βάρους και στην εμφάνιση της παχυσαρκίας, η οποία αποτελεί ένα καθοριστικό παράγοντα κινδύνου για το Διαβήτη.

Συμπερασματικά τόσο ο τύπος όσο και η ποιότητα του διαιτητικού λίπους μπορεί να επηρεάσει, την εμφάνιση της παχυσαρκίας και την μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες στην εμφάνιση και πρόληψη του Διαβήτη είναι η μείωση του σωματικού βάρους στα παχύσαρκα άτομα και ο περιορισμός της πρόσληψης κορεσμένου λίπους σε συνδυασμό με την αύξηση της πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και φυσικά αύξηση της φυσικής δραστηριότητας.

3.3 Αντιοξειδωτικά και Παχυσαρκία: Η παχυσαρκία αποτελείτο ίσως το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για αρκετές ασθένειες. Μία απ' τις σημαντικότερες συνέπειές της είναι η δυσλιπιδαιμία λόγω αυξημένων VLDL και LDL χοληστερολών και μειωμένης HDL χοληστερόλης. Αυτά συμβαίνουν στην παχυσαρκία λόγω αυξημένης παραγωγής της VLDL χοληστερόλης, σε συνδυασμό με κάποια γενετική ανωμαλία στην ικανότητα του οργανισμού για εκκαθάριση των VLDL και LDL χοληστερολών. Επίσης η παχυσαρκία συμβάλλει στην εμφάνιση χοληστερολιθίας λόγω του ότι η αυξημένη πρόσληψη ενέργειας συμβάλλει στην αυξημένη σύνθεση χοληστερόλης στον οργανισμό για την οποία η μόνη οδός έκκρισης αυτής της «επιπλέον» χοληστερόλης είναι η χοληδόχος κύστη. Όταν η διαδικασία αυτή γίνεται σε συνδυασμό με την έλλειψη χολικών οξέων και την γενετική προδιάθεση δημιουργίας κρυστάλλων τότε ο κίνδυνος χολολιθίας αυξάνεται σημαντικά (EU, 2003 ζ). Ακόμη η παχυσαρκία έχει συσχετισθεί άμεσα και με άλλες ασθένειες όπως καρδιοπάθειες, υπέρταση και ορισμένες μορφές καρκίνου.

Παρόλα αυτά, η παχυσαρκία είναι μία σύνθετη νόσος με πολλαπλές αιτίες. Ο τρόπος ζωής, το περιβάλλον και τα γονίδια συνεισφέρουν στην εμφάνισή της. Επίσης, αν και οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της παχυσαρκίας δεν έχουν διευκρινιστεί

πλήρως, είναι αποδεδειγμένο πως αυτή είναι αποτέλεσμα της μη ισορροπημένης σχέσης μεταξύ ενεργειακής πρόσληψης και κατανάλωσης.

Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν πως η εμφάνιση παχυσαρκίας στις Μεσογειακές χώρες είναι λιγότερη συχνή από άλλες βιομηχανικές χώρες και αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η παραδοσιακή Μεσογειακή διαίτα αποτελείται κυρίως από τρόφιμα φυτικής προέλευσης, τα οποία είναι πλούσια σε φυσικά αντιοξειδωτικά. Κύρια πηγή λίπους της Μεσογειακής Δίαιτας είναι το ελαιόλαδο και έχει συνεπώς θερμιδική αξία 9 Kcal /gr. Όπως συμβαίνει και στα υπόλοιπα λίπη, η υπερβολική πρόσληψη του ελαιόλαδου μπορεί να επιφέρει αύξηση σωματικού βάρους και παχυσαρκία. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στη Μεσογειακή διαίτα γιατί η πρόσληψη του προσαρμόζεται σύμφωνα με τις προσωπικές ανάγκες του καθενός (EU, 2003 β).

Συμπερασματικά, η παχυσαρκία ως διεθνές πλέον πρόβλημα υγείας, είναι αποτέλεσμα (όσον αφορά τους διαιτητικούς παράγοντες) της αυξημένης πρόσληψης ζωικού λίπους και της μειωμένης πρόσληψης υδατανθράκων και διαιτητικών ινών. Ένας καλός τρόπος για την πρόληψη και την θεραπεία της παχυσαρκίας, είναι η αυξημένη πρόσληψη φυτικού λίπους, δηλαδή μέσω δίαιτας εμπλουτισμένης κυρίως με τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως φρούτα, λαχανικά και δημητριακά. Τα κριτήρια αυτά πληρεί σε σημαντικό βαθμό η παραδοσιακή Μεσογειακή Δίαιτα.

3.4. Αντιοξειδωτικά και Θρομβογένεση:

Η αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων πιστεύεται πως αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης των αρτηριών. Ο ρόλος των ακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλων αντιοξειδωτικών στην διαδικασία της θρομβογένεσης παραμένει αμφιλεγόμενο.

Σε μια έρευνα στην οποία δόθηκαν συμπληρώματα λιπαρών οξέων σε υγιή άτομα, έδειξε πως τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μετέβαλλαν την λειτουργία των αιμοπεταλίων μειώνοντας την σύνθεσή τους, την έκκρισή τους και την παραγωγή θροβοξάνης. Αυτή η επίδραση τους φαίνεται να είναι σημαντική για την πρόληψη αθηροσκλήρωσης. Σε άλλα άτομα που δόθηκαν ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φάνηκε πως οι επιδράσεις τους δεν ήταν πλήρως ξεκαθαρισμένες αφού άλλοτε προκαλούσαν αύξηση και άλλοτε μείωση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Συμπερασματικά φαίνεται πως όχι μόνο η παρουσία λινελαϊκού οξέος επηρεάζει τη

διαδικασία της θρόμβωσης, αλλά και η αναλογία των ω -6 προς τα ω -3 λιπαρά οξέα (EU, 2003 α,β).

Παρόλα αυτά όμως δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να ενθαρρύνουν την πρόσληψη του ελαιόλαδου (ακόρεστων λιπαρών οξέων) για τη μείωση του κινδύνου της θρόμβωσης. Εντούτοις, η πλειοψηφία των ερευνών για τα λιπαρά οξέα δηλώνουν πως οι δίαιτες που αποτελούνται κυρίως από φυτικό λίπος είναι προτιμότερες από τις δίαιτες ζωικού λίπους για την πρόσληψη της θρόμβωσης των αρτηριών.

3.5 Αντιοξειδωτικά και παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα: Σύμφωνα με μια πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων, όχι μόνο η ποσότητα, αλλά και η ποιότητα διαιτητικού λίπους επηρεάζει την παθοφυσιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα. Συγκεκριμένα η πρώτη έρευνα σχετικά με το θέμα αυτό έγινε το 1886 από τους Ewald και Bow για την διερεύνηση της επίδρασης του λίπους στη γαστρεντερική λειτουργία και έδειξε πως το λίπος επηρέασε την έκκριση του γαστρικού οξέος. Στις έρευνες αυτές, σαν πηγή λίπους χρησιμοποιήθηκε το ελαιόλαδο το οποίο προκαλούσε μείωση της έκκρισης του γαστρικού οξέος στους ανθρώπους. Μια άλλη έρευνα που έγινε το 1997 από το Serrano, μελετήθηκε η επίδραση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων του λαδιού και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, στην έκκριση του γαστρικού οξέος και έδειξε πως τα μονοακόρεστα προκαλούσαν μείωση της έκκρισης του γαστρικού οξέος συγκρινόμενα με τα πολυακόρεστα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ελαϊκό οξύ (συστατικό του ελαιολάδου) και στη δράση μας πεπτιδικής ορμόνης που ελευθερώνεται στο αίμα όταν το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ έρθει σε επαφή με το ενδοθηλιακό βλεννογόνο (EU, 2003 γ).

Η χολολιθίαση είναι μία πάθηση του γαστρεντερικού σωλήνα που εξαρτάται σημαντικά από την πρόσληψη διαιτητικού λίπους. Συγκεκριμένα η πρόσληψη ζωικού λίπους αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισής της ενώ η πρόσληψη φυτικού λίπους τον μειώνει. Στις περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα σχετικά με το θέμα αυτό, όπου κύρια μορφή φυτικού λίπους ήταν το ελαιόλαδο, φάνηκε πως η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανόν και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων έχει προστατευτικές επιδράσεις όσον αφορά την εμφάνιση χολολιθίασης κάτι το οποίο δεν ισχύει για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Γενικά η πρόσληψη φυτικού λίπους (μονοακόρεστων λιπαρών οξέων από ελαιόλαδο), έχει θετικές επιδράσεις στην λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα μειώνοντας την έκκριση του γαστρικού οξέος, συμβάλλοντας έτσι και στην πρόληψη

της χολολιθίασης. Η σαφής επίδραση της μορφής του διαιτητικού λίπους στις γαστρεντερικές παθήσεις, όπως γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, δυσκοιλιότητα και άλλες, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (EU, 2003 γ). Έτσι αν και πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα στις διάφορες μεταβολικές λειτουργίες του γαστρεντερικού σωλήνα.

3.6 Αντιοξειδωτικά και καρκίνος: Ο καρκίνος αποτελεί το 20% ως κύρια αιτία των θανάτων στην Ευρώπη. Τα ποσοστά θνησιμότητας του καρκίνου είναι αρκετά υψηλότερα στις νότιες και δυτικές Ευρωπαϊκές χώρες απ' ότι στις Μεσογειακές χώρες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαιτητικούς παράγοντες. Η διαίτα παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου με διάφορους τρόπους όπως α) συγκεκριμένα συστατικά της διαίτας ή συνδυασμός τροφίμων που δρουν ως καρκινογόνα, β) άλλα θρεπτικά ή μη θρεπτικά συστατικά που δρουν ως αντικαρκινογόνα, γ) έλλειψη ή υπερβολική πρόσληψη θρεπτικών συστατικών που συμβάλλει στην εμφάνιση βιοχημικών τροποποιήσεων προάγοντας τη διαδικασία νεοπλασίας, δ) αλλαγές στην πρόσληψη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών που δημιουργούν μεταβολικές και βιοχημικές διαταραχές, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Αρκετές επιδημιολογικές έρευνες έγιναν για να μελετήσουν τη σχέση του καρκίνου και της πρόσληψης ελαιολάδου και σύμφωνα με αυτές υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, ελαϊκού οξέος και της εμφάνισης κάποιων μορφών καρκίνου, όπως στήθους και στομάχου. Όσον αφορά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φάνηκε πως τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν κάποιες προστατευτικές επιδράσεις σχετικά με τον καρκίνο ενώ τα ω-6 λιπαρά οξέα φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου με διάφορους τρόπους, όπως α) αυξάνοντας την παραγωγή υπεροξειδίων, β) αυξάνοντας το ποσοστό υγρασίας στις μεμβράνες των κυττάρων και γ) μειώνοντας τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (EU, 2003 στ).

Παρόλα αυτά όμως υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά την ακριβή σχέση του ελαιολάδου και του καρκίνου. Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν αυτή προστατευτική του επίδραση οφείλεται εξ ολοκλήρου στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα είτε και σε άλλα συστατικά του όπως τοκοφερόλες, πολυφαινόλες που λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Συμπερασματικά το ελαιόλαδο είναι αντιοξειδωτικό και έχει αρκετές προστατευτικές επιδράσεις σε διάφορες παθήσεις.

Εκτός από το ελαιόλαδο υπάρχουν και άλλα τρόφιμα που συστήνονται για την πρόληψη του καρκίνου, όπως τα φρούτα και λαχανικά. Συνίσταται πως η πρόσληψη 5-9 μερίδων/ ημέρα, έχει προστατευτικές επιδράσεις επειδή ότι περιέχουν και πολλά φυσικά και χημικά αντιοξειδωτικά που εμποδίζουν την εμφάνιση νεοπλασίας. Επίσης το τσάι (μαύρο ή πράσινο) περιέχει αρκετές αντιοξειδωτικές πολυφαινόλες που προστατεύουν από καρδιοπάθειες και διάφορες μορφές καρκίνου, όπως οισοφάγου, πνευμόνων, στήθους και παγκρέατος. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού συγκεκριμένα, προωθούν τα κυτοχρώματα του ενζυμικού συστήματος P450 και ιδίως κάποιες τρανσφεράσες που αναμιγνύονται στην παρεμπόδιση της καρκινογένεσης, μειώνοντας έτσι την ικανότητα κάποιων κυττάρων για την ανάπτυξη όγκων (Weisburger *et al*, 2002).

Τα τελευταία χρόνια πολλά έχουν ειπωθεί σχετικά με τις θετικές επιδράσεις της Κρητικής Μεσογειακής Δίαιτας στην εμφάνιση καρκίνου, γι' αυτό και θα γίνει μικρή αναφορά στην περιεκτικότητα της δίαιτας αυτής, έτσι ώστε να κατανοηθούν καλύτερα οι θετικές της επιδράσεις.

Η Κρητική Δίαιτα περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες φρούτων λαχανικών, κρασιού και ελαιόλαδου, τα οποία παρέχουν μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών συστατικών όπως ρεσβερατρόλης, γλουταθειόνης, βιταμίνης C, βιταμίνης E, λυκοπενίου, καροτίνης, πολυφαινόλων και πολλών άλλων αντιοξειδωτικών. Συγκεκριμένα, η ρεσβερατρόλη έχει διάφορες αντιογκώδεις και αντιμεταστατικές ιδιότητες, αφού αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τη λιπογένεση στο ήπαρ, τη δημιουργία προϊόντων λιποοξυγένασης και την ανάπτυξη όγκων. Η γλουταθειόνη που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής, απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα και μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα αυξάνει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών στους ανθρώπους. Η διαιτητική γλουταθειόνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη γλουταθειόνη που συντίθεται στο σώμα και μαζί συμβάλλουν στη μείωση της απορρόφησης των υπεροξειδίων. Τα επίπεδα γλουταθειόνης στο πλάσμα εξαρτώνται από το φύλο και την ηλικία. Το σελήνιο που επίσης βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στην Κρητική Μεσογειακή Δίαιτα, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, των πνευμόνων και του κόλου εντέρου. (Simopoulos *et al*, 2001).

Συμπερασματικά όσον αφορά τη σπουδαιότητα της Ελληνικής Μεσογειακής Διάτας φαίνεται να οφείλεται στη πρόσληψη απαραίτητων λιπαρών οξέων από λαχανικά, ψάρια, με αναλογία ω -6/ ω -3 λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με τις έρευνες που έχουν γίνει μέχρι τώρα σχετικά με το θέμα αυτό, μεγαλύτερη σημασία έχει η αναλογία των ω -6/ ω -3 λιπαρά οξέα, παρά η μεμονωμένη συγκέντρωση του καθενός από αυτά. Επίσης, η Μεσογειακή Δίαιτα είναι αρκετά πλούσια σε αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνες C και E, καροτένιο, γλουταθειόνη, ρεσβεραρόλη, φυλλικό οξύ, σελήνιο, φυτοοιστρογόνα και άλλα φυτοχημικά από τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Επίσης παρέχει μεγάλες ποσότητες πολυφαινόλων μέσω του ελαιολάδου και κρασιού αλλά και η πρόσληψη ντομάτας, κρεμμυδιού, σκόρδου και βοτάνων, παρέχουν σημαντικές ποσότητες λυκοπενίου, καροτενοειδών, ινδολών, μονοτερπενίων, πολυφαινόλων, φλαβονοειδών και άλλων φυτοχημικών, που στο σύνολό τους συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου. (Simopoulos *et al*, 2001).

3.7 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Αρκετές έρευνες δείχνουν πως η Μεσογειακή διαίτα μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και άλλων χρόνιων νοσημάτων. Με βάση τα δεδομένα διαφόρων επιδημιολογικών ερευνών, συγκεκριμένα συστατικά της διαίτας αυτής επιδρούν θετικά στο Ανοσοποιητικό Σύστημα.

Σύμφωνα με την έρευνα που έγινε από τους Karantonis *et al.*, 2002, ορισμένα λιποειδή της Μεσογειακής διαίτας και συγκεκριμένα τα πολικά λιποειδή, φωσφολιποειδή και γλυκολιποειδή, έχουν βιολογικές ιδιότητες αναστολής των παραγόντων συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (PAF), ενώ τα ουδέτερα λιποειδή φάνηκε πως συμβάλλουν σε αρκετό μικρότερο βαθμό. Οι παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και τη δέσμευσή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στη διαδικασία της αθηρογένεσης.

Η βιταμίνη Ε αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό με ανοσολογικές ιδιότητες (Sabat *et al.*, 2001). Έρευνες έχουν δείξει πως έλλειψη της βιταμίνης αυτής συνεπάγεται αρνητικές επιδράσεις στο ανοσολογικό επίπεδο των πνευμόνων, κάτι το οποίο μπορεί να ανατραπεί με την επαρκή πρόσληψη συμπληρωμάτων της βιταμίνης αυτής (Sabat *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως η βιταμίνη Ε αναστέλλει την έκκριση της ιντερλευκίνης-1 από τα μονοκύτταρα, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και ενέχεται στην έκκριση της PGI₂. Με βάση τις ενέργειες αυτές αντιλαμβάνομαστε εκτός από την αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης που είναι γνωστή και μια άλλη εξίσου σημαντική, την αντιαθηρογόνο.

Η συσχέτιση του ελαιολάδου με το μειωμένο κίνδυνο κίνδυνο των καρδιακών παθήσεων οφείλεται κυρίως στη φαινολική του σύσταση. Η ολευρωπαϊνή, μία από τις κυριότερες φαινόλες του ελαιολάδου έχει δείχθει πως αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω αραχιδονικού οξέος και διφωσφορο-αδενοσίνης (ADP) και αποτελεί έτσι ένα σημαντικό αναστολέα των PAF. Επίσης έχει αποδειχθεί πως και άλλα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου όπως η υδροξυτυροσόλη, έχει παρόμοιες επιδράσεις. Συγκεκριμένα αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων *in vitro*, το σχηματισμό της TXB₂ από διεγερμένα αιμοπετάλια και τη συσσώρευση της τελευταίας στο πλάσμα (Petroni *et al*, 1995). Ακόμη έχει δείχθει ότι τα φαινολικά του ελαιολάδου αναστέλλουν τη 5-λιποξυγενάση των λευκοκυττάρων, ενώ ευνοούν τη γένεση προσταγλανδινών (Duert *et al*, 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η ανάλυση των πολυφαινολών διακρίνεται σε δύο είδη. Το πρώτο είδος είναι η ποσοτική ανάλυση, στην οποία προσδιορίζεται η ολική ποσότητα των πολυφαινολών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο ή ρόφημα και το δεύτερο είναι η ποιοτική ανάλυση, στην οποία γίνεται ταυτοποίηση της κάθε πολυφαινόλης και προσδιορίζονται έτσι τα είδη των πολυφαινολών που υπάρχουν στο συγκεκριμένο τρόφιμο ή ρόφημα, ως επίσης και η αντίστοιχη ποσότητα του.

4.1. Μία μέθοδος ποσοτικής ανάλυσης πολυφαινολών που χρησιμοποιείται και στα πειράματα της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, είναι ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός μέσω της αντίδρασης *Folin- Ciocalteu*. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο και ανάλογα με την τιμή απορρόφησης που εμφανίζει το κάθε δείγμα, με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς συγκεκριμένης πολυφαινόλης, βρίσκουμε την ποσότητα των ολικών πολυφαινολών στο συγκεκριμένο δείγμα. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς επιλέγεται εκείνη η πολυφαινόλη που είναι η πιο αντιπροσωπευτική για το συγκεκριμένο δείγμα. Στην περίπτωση των ελαίων, πιο αντιπροσωπευτική θεωρείται η υδροξυτυροσόλη. Επειδή όμως η πλειοψηφία των δημοσιεύσεων ανταποκρίνονται σε πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος, συνήθως οι συγκεντρώσεις εκφράζονται με βάση το οξύ αυτό. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε πολλές φορές από πολλούς επιστήμονες, για τον προσδιορισμό ολικών πολικών φαινόλων στα διάφορα τρόφιμα.

HPLC: Είναι η μέθοδος ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των πολυφαινολών και ονομάζεται υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης.

GC: Αέρια χρωματογραφία (*Gas chromatography*), μέθοδος ποιοτικού διαχωρισμού πολυφαινολών και ποσοτικής ανάλυσης αυτών.

Η ελιά και το ελαιόλαδο απασχολεί πολλούς επιστήμονες τα τελευταία χρόνια λόγω της εξαιρετικής πολυφαινολικής τους σύστασης και των πολλαπλών τους ενεργητικών επιπτώσεων που συνεπάγονται απ' την αυξημένη πρόσληψή τους μέσω της Μεσογειακής διαίτας. Πληθώρα ερευνών έχουν γίνει στα τρόφιμα αυτά για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν διαφέρουν μερικώς μεταξύ τους εντούτοις τα συμπεράσματα αυτών είναι παρόμοια. Σε κάθε έρευνα, είτε γίνονταν στις ελιές είτε στο λάδι που

έπαιρναν από αυτές, γίνονταν η παραλαβή πολυφαινολών με διαφορές εκχυλιστικές μεθόδους και ακολούθως ποσοτική ανάλυση με την αντίδραση *Folin-Ciocalteu* και ποιοτική (και ποσοτική) ανάλυση της κάθε πολυφαινόλης με χρωματογραφικές και φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

Οι μέθοδοι εκχύλισης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι πάρα πολλοί. Στο σύνολό τους όμως χρησιμοποιούσαν οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας για παραλαβή των πολικών φαινολών και ο μίγμα ξεπλενόταν με μη πολικούς διαλύτες όπως πετρελαϊκός αιθέρας ή εξάνιο για απομάκρυνση λιπιδίων ή άλλων σωματιδίων που υπάρχουν στις ελιές και στο ελαιόλαδο. Βέβαια οι εκχυλίσεις στις ελιές ήταν πιο πολύπλοκες από ότι στο ελαιόλαδο επειδή η πάστα των ελιών ήταν λιγότερο ομοιογενής και παρουσίαζε αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα (Ryan *et al*, 1999).

Οι Pirissi *et al*, 2000, χρησιμοποίησαν δύο μεθόδους εκχύλισης για προσδιορισμό ολικών πολυφαινολών και αυτές ήταν η LLE (liquid-liquid extraction) και η SPE (solid-phase extraction) σε ελιές τύπου frantoio. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ήταν παρόμοια αν και η μέθοδος SPE ήταν προτιμότερη λόγω του ότι ήταν πιο απλή και πιο γρήγορη, σε σχέση με τη μέθοδο LLE που ήταν χρονοβόρα και υψηλότερου κόστους. Ακολούθως έγινε στα δείγματα ποιοτική ανάλυση με HPLC-UV και βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις ολικών φαινολών, σύνθετων φαινολών και απλών φαινολών για την κάθε μία μέθοδο ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφονται στον πίνακα 2 και εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Επίσης η μέθοδος αυτή, στην οποία προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις ολικών, σύνθετων και απλών φαινολών (Total, complex, simple phenols) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της «ηλικίας» του ελαίου αφού όπως είναι γνωστό από άλλα πειράματα, οι συγκεντρώσεις των απλών φαινολών αυξάνονται όσο μεγαλύτερης «ηλικίας» είναι το ελαιόλαδο (Pirissi *et al*, 2000).

Μια άλλη έρευνα από τους Monti *et al* (2001), έγινε για τον έλεγχο της επίδρασης των αντιοξειδωτικών ουσιών του παρθένου ελαιόλαδου στην παραγωγή ετεροκυκλικών αμινών που παράγονται κατά το μαγείρεμα του κρέατος και του ψαριού και θεωρούνται καρκινογόνες για τον άνθρωπο. Για το σκοπό αυτό έγινε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών σε δείγμα παρθένου ελαιόλαδου από ελιές τύπου *Olea europaea* των οποίων η παραλαβή ελαίου και πολυφαινολών έγινε με εκχυλιστικές διαδικασίες και φυγοκέντρηση. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση έγινε με χρωματογραφία LC-MS (liquid chromatography – mass

spectrometry) και με HPLC-UV DAD για ακριβή προσδιορισμό της κάθε πολυφαινόλης (ιδίως για προσδιορισμό σύνθετων πολυφαινόλων).

Οι Patumi *et al*, (2001) έκαναν μια έρευνα σε ποικιλίες ελιών *Olea europaea* τύπου «Kalamata» για τον έλεγχο της επίδρασης της άρδευσης των ελαιοδέντρων στη φαινολική σύσταση των ελαιοκάρπων. Για το λόγο αυτό έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινόλων με τη μέθοδο αντίδρασης Folin-Ciocalteu και ακολούθως ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της κάθε πολυφαινόλης με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας GC και GC-MS. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον πίνακα 1 και 2 και εκφράζονται σε ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος. Τελικό συμπέρασμα της έρευνας αυτής ήταν πως η άρδευση των δέντρων μειώνει τη φαινολική σύσταση των ελαιοκάρπων τους.

Οι Ryan *et al*, (2001) χρησιμοποίησαν διάφορες μεθόδους για προσδιορισμούς της φαινολικής σύστασης ελαιοκάρπων και έλεγξαν την επίδραση της μεθόδου εκχύλισης που χρησιμοποιείται στον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των πολυφαινόλων. Συγκεκριμένα στις ελιές τύπου wagga-wagga χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συνολικά μέθοδοι για παραλαβή πολυφαινόλων. Αυτές ήταν η οξική εκχύλιση, η βασική εκχύλιση, η όξινη υδρόλυση και η βασική υδρόλυση.

Στην όξινη υδρόλυση, από 0,25g πυρήνα ελιάς και αναμίχθηκαν με 5mL μίγματος μεθανόλης και νερού (5:5 v/v) σε Ultra Turrax high speed blender για 20s. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30min. Στη συνέχεια φιλτράρεται σε ειδικό χαρτί και το φιλτραρισμένο διάλυμα ξεπλένεται με εξάνιο και προστίθεται σε αυτό 2mL HCl 1M. Αφήνεται για 2h σε συνεχή κίνηση και στη συνέχεια πήραν μισή ποσότητα από το οξικό αυτό εκχύλισμα για εξουδετέρωση με NaOH 5M και το υπόλοιπο μισό εξουδετερώθηκε με την ίδια ποσότητα βάσης μετά από 24h. Και τα δύο εκχυλίσματα, αφού έφτασαν σε τελικό όγκο 4,5g, φιλτραρίστηκαν και αναλύθηκαν με χρωματογραφίας LC-MS. Στη βασική υδρόλυση έγινε η ίδια διαδικασία μόνο που μετά το ξέπλυμα με εξάνιο, προστίθεται στο μίγμα 2mL NaOH 1M και στο τέλος χρησιμοποιείται η αντίστοιχη ποσότητα HCl 5M για εξουδετέρωση των εκχυλισμάτων μετά από 2h και 24h παραμονής.

Στη μέθοδο της όξινης εκχύλισης, 0,25g ελιάς αναμίχθηκαν με 5mL μεθανόλη και νερό (50:50 v/v) στο blender για 20s. Μετά από 30min παραμονή παραλαμβάνεται το μίγμα, προστίθενται 2ml HCl 1M και τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 2h. Πήραν ½ ποσότητα εκχυλίσματος, η οποία φιλτράρεται με ειδικό

χαρτί και το φιλτραρισμένο μίγμα ξεπλένεται με 5mL εξάνιο και εξουδετερώνεται με NaOH 5M μέχρι να φτάσει σε τελικό όγκο 4,5g και αφού φιλτραριστεί οδηγείται για LC ανάλυση. Το άλλο μισό εκχύλισμα παραμένει για 24h στη φυγόκεντρο και υπόκειται την ίδια διαδικασία. Η ίδια μέθοδος γίνεται και στη βασική εκχύλιση με τη διαφορά ότι μετά τα πρώτα 30min παραμονής προστίθενται 2mL NaOH 1M και όχι HCl 1M και στο τέλος η εξουδετέρωση γίνεται με HCl 5M και όχι με NaOH 5M.

Τόσο στην όξινη όσο και στη βασική επεξεργασία γίνεται υδρόλυση και διάσπαση πολλών σύνθετων πολυφαινολών με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται πολλές κορυφές καμπυλών στο χρωματογράφημα. Αποτελέσματα της έρευνας είναι ότι η μέθοδος παραλαβής πολυφαινολών που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τη φύση του υλικού (φύλλο, πυρήνας, κουκούτσι) και από το είδος των πολυφαινολών που υπάρχουν σε αυτό. Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων στην έρευνα αυτή, διακρίνεται η μεγάλη απώλεια που εμφανίζει ολεωρωπαΐνης κατά τις διάφορες μεθόδους. Συγκεκριμένα είχε 40% απώλεια στις 2h παραμονή και 99% στις 24h με όξινη υδρόλυση και εκχύλιση ενώ στις βασικές επεξεργασίες είχε 98% απώλεια στην εκχύλιση με βάση και 100% απώλεια στη βασική υδρόλυση. Οι υπόλοιπες πολυφαινόλες δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον πίνακα 2.

Επίσης οι Ryan *et al*, 1998, έκαναν ανάλυση πολυφαινολών σε διάφορες ποικιλίες ελιών, μαύρες και πράσινες ελιές. Η παραλαβή πολυφαινολών έγινε με εκχύλιση υγρού σε υγρό δηλαδή ξέπλυμα του διαλύματος με μη πολικό διαλύτη για απομάκρυνση λιπιδίων και άλλων σωματιδίων και ακολούθως παραλαβή φαινολών με μεθανόλη. Η ανάλυση πολυφαινολών έγινε με υγρή χρωματογραφία RP HPLC (Reversed phase high performance liquid chromatography) που θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες αναλυτικές μεθόδους και ακολούθως φασματομετρικός προσδιορισμός. Στο πείραμα αυτό, τα εκχυλίσματα των ελιών με μαύρο χρώμα είχαν χρώμα κόκκινο-καφέ ενώ τα εκχυλίσματα των πράσινων ελιών είχαν χρυσαφί χρώμα. Σύμφωνα με τους ερευνητές το κόκκινο-καφέ χρώμα οφείλεται στις οξικές καταλάσεις των λευκοανθοκυανιδινών που υπάρχουν σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις μαύρου χρώματος ελιές παρά στις πράσινες.

Στην Ελλάδα μία έρευνα έγινε από τους Blekas *et al*, (2002) με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο υπάρχει σχέση μεταξύ της σταθερότητας του ελαιολάδου και των ολικών πολυφαινολών του. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών έγινε με την μέθοδο αντίδρασης Folin-Ciocalteu και σαν πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το

καφεϊκό οξύ. Η έρευνα έγινε σε 100 δείγματα ελιών εκ των οποίων οι 80 ήταν ποικιλίες που παράγονταν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας ενώ οι υπόλοιπες 20 ήταν τύπου Κορονέϊκες. Το 34% των δειγμάτων έδειξαν πολυφαινολική σύσταση >150mg/Kg ενώ το 10% έδειξε είτε πολύ υψηλή (>250mg/Kg) είτε πολύ χαμηλή φαινολική σύσταση (<50mg/Kg). Επίσης όσον αφορά τις Κρητικές ελιές φάνηκε πως είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολών από τις Πελοποννησιακές, ενώ οι Πελοποννησιακές είχαν υψηλότερη συγκέντρωση α-φαιουφτίνης και μικρότερη συγκέντρωση α-τοκοφερολών. Τα ιταλικά, ισπανικά και ελληνικού τύπου παρθένα ελαιόλαδα είχαν παρόμοια πολυφαινολική σύσταση. Επίσης, απ' όλα τα είδη ελιών, οι ελιές Καλαμάτας είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών ενώ οι μαύρου χρώματος ελληνικές ελιές και ισπανικού τύπου πράσινες ελιές είχαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών (Blekas *et al*, 2002). Ακόμη ένα άλλο συμπέρασμα της έρευνας αυτής είναι πως αν και ορισμένα δείγματα ελιών τύπου Κορονέϊκες είχαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης εντούτοις παρουσίασαν αρκετά υψηλή συγκέντρωση ολικών φαινολών και αυξημένη σταθερότητα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 1 και 2.

Οι Cinquanta *et al*, (1997), χρησιμοποίησαν δείγματα παρθένου ελαιόλαδου για ποσοτικό προσδιορισμό με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και ποιοτικό προσδιορισμό με τη μέθοδο GC-MS των πολυφαινολών τους. Το συμπέρασμα τους ήταν πως όσο πιο ώριμες είναι οι ελιές τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση των ολικών φαινολών σε αυτές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη δραστικότητα εστερασών όταν οι ελιές βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης. Επίσης σύμφωνα με την έρευνα αυτή μετά από 18 μήνες αποθήκευσης των ελαιολάδων φάνηκε μείωση της ολικής συγκέντρωσης των πολυφαινολών τους και αυτό πιθανά να οφείλεται στις υδρολυτικές και οξειδωτικές διεργασίες που αναπτύσσονται κατά την αποθήκευση των ελαίων. Όσον αφορά τις παραμέτρους ποικιλία, έδαφος και κλιματολογικές συνθήκες, οι δύο τελευταίες φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο κατά την αποθήκευση (Cinquanta *et al*, 1997). Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 1 και 2.

Οι Tuck *et al*, (2002) διαπίστωσαν μετά από ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό πολυφαινολών σε δείγματα ελαίου, πως η σταθερότητα του ελαιόλαδου σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης σε αυτό αλλά καμία σχέση με τη συγκέντρωση της πολυφαινόλης τυροσόλης. Αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 1 και 2.

Τέλος οι Gomez-Alonso *et al*, (2002) ερευνήσαν ένα άλλο τύπο ελαίου, το ελαιόλαδο Cornicabra, έκαναν προσδιορισμό ολικών φαινολών με τη μέθοδο SPE και ποιοτική ανάλυση με χρωματογραφία RP-HPLC. Συγκεκριμένα στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο σύστημα ελαιοτρίβισης γνωστό ως διπλής και τριπλής φάσης φυγοκέντρωση. Η μόνη διαφορά είναι ότι στη μέθοδο αυτή είναι η προσθήκη σημαντικής ποσότητας νερού στην πάστα ελιάς έτσι ώστε να γίνεται ξεχωριστά ο διαχωρισμός του λαδιού, του νερού και των λοιπών υγρών. Συμπέρασμα αυτής της έρευνας ήταν ότι εκτός από το είδος-ποικιλίας ελιών, την ποιότητα των ελιών, τις συνθήκες αποθήκευσής τους, υπάρχει και μια άλλη παράμετρος που πιθανόν να επηρεάζει την πολυφαινολική τους σύσταση και αυτή είναι η μέθοδος ελαιοτρίβισης που χρησιμοποιείται για παραλαβή των πολυφαινολών στο έλαιο(Gomez-Alonso *et al*, 2002) αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στο σύστημα διπλής φάσης φάνηκε υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολών από ότι στο σύστημα τριπλής φάσης. Επίσης στο πρώτο σύστημα τα ελαιόλαδα είχαν υψηλότερη σταθερότητα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως το σύστημα ελαιοτρίβισης δεύτερης φάσης δίνει υψηλότερης ποιότητας ελαιόλαδο και πιο σταθερό στην οξείδωση από το σύστημα ελαιοτρίβισης τριπλής φάσης. Αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 1 και 2.

Ακόμη σύμφωνα με τους Owen *et al*, (2000) έγινε προσδιορισμός φαινολικών συστατικών σε παρθένο και ραφινρισμένο ελαιόλαδο με υγρή χρωματογραφία HPLC για ολικό προσδιορισμό πολυφαινολών και GC-MS για ποιοτική ανάλυση αυτών. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή τα κυριότερα φαινολικά συστατικά είναι οι απλές φαινόλες τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, τα σεκοϊροδοειδή και οι λιγνίνες (ακετοξυρινορεδινόλη και πινορεσινόλη). Τα σεκοϊροδοειδή (ολεωρωπαϊνή) και οι λιγνίνες ανήκουν στην κατηγορία των σύνθετων φαινολών και βρίσκονται σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις μέσα στο ελαιόλαδο. Βέβαια συγκρινόμενες οι συγκεντρώσεις των φαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο ήταν αρκετά υψηλότερες (ολικές και επιμέρους) απ' ότι στο ραφινρισμένο. Συγκεκριμένα τα ολικά σεκοϊροδοειδή στο παρθένο ήταν $27,72 \pm 6,84 \text{ mg/Kg}$ ενώ στο ραφινρισμένο $9,3 \pm 3,81 \text{ mg/Kg}$ και η ολική συγκέντρωση λιγνίνων ήταν $41,53 \pm 3,93 \text{ mg/Kg}$ στο παρθένο ελαιόλαδο και $7,29 \pm 2,50 \text{ mg/Kg}$ στο ραφινρισμένο (Owen *et al*, 2000). Αποτελέσματα στους πίνακες 1 και 2.

Σε πρόσφατη έρευνα έγινε από τους Owen *et al*, (2003) έγινε απομόνωση και καθορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σημαντικών φαινολικών συστατικών και φλαβονοειδών από ελιές με άλμη. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν 2 ποικιλίες

ελιών, σε πράσινες και σε μαύρες ενώ ο έλεγχος για τη φαινολική τους σύσταση έγινε τόσο στις ελιές όσο και στην άλμη τους. Η εκχύλιση των ελιών έγινε στα εξής στάδια: α) εκχύλιση Soxhlet για απομάκρυνση του ανεπιθύμητου λίπους, β) εκχύλιση με μεθανόλη στο ξηρό επικάρπιο, γ) εξάτμιση μεθανόλης μέχρι ξηρού, δ) ανάμειξη του υπερκείμενου με ακετονιτρίλιο και εξάνιο για 3 φορές έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα λιπδικά συστατικά, ε) εξάτμιση ακετονιτρίλιου ενώ το ξηρό υπόλειμμα αναμιγνύεται με μεθανόλη για ανάλυση με HPLC. Οι αναλύσεις που έγιναν ήταν HPLC, GC-MS και NMR. Επίσης ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έγινε με βάση την υποξανθίνη/οξειδάση της ξανθίνης. Η συγκέντρωση μεμονομένων συστατικών και η υδροξυλίωση της υποξανθίνης υπολογίστηκαν μέσω UV απορρόφησης σε $\lambda=278\text{nm}$. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής όσον αφορά την υγρασία των ελιών είναι ότι οι μαύρες ελιές έχουν 50% υγρασία ενώ οι πράσινες 73,7% υγρασία. Επίσης όσον αφορά το ποσοστό λίπους που περιέχεται στις ελιές αυτές, οι μαύρες έχουν ποσοστό λίπους 5,52% ενώ οι πράσινες, ποσοστό λίπους 18,22%.

Τα αποτελέσματα της HPLC ήταν ότι στις μαύρες ελιές υπάρχει μίγμα 8 σημαντικών φαινολικών συστατικών, τα οποία ανήκουν σε 3 μεγάλες κατηγορίες: α) απλές φαινόλες όπως τυροσόλη, υδρόξυτυροσόλη, διυδρο-καφεϊκό οξύ και φλορετικό οξύ (διυδρο-π-κουμαρικό οξύ), β) 2 μεγάλες ακυλογλυκοσίδες και γ) φλαβονοειδή όπως λουτεολίνη και απιγενίνη. Ενώ οι πράσινες ελιές έχουν στο περικάρπιό τους κυρίως υδρόξυτυροσόλη σε ποσότητα παρόμοια με αυτή στις μαύρες ελιές αλλά έχουν ασήμαντες ποσότητες από τα άλλα φαινολικά συστατικά. Στην άλμη των μαύρων ελιών βρέθηκαν πολύ μικρές ποσότητες φαινολικών συστατικών αλλά καθόλου φλαβονοειδή ενώ στην άλμη των πράσινων βρέθηκε υδρόξυτυροσόλη (σχεδόν σε διπλάσια ποσότητα από την άλμη των μαύρων) αλλά τίποτα από τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά. Συγκεκριμένα, στις μαύρες ελιές, το 5,4% των ολικών φαινολών της, βρίσκονται στην άλμη ενώ στις πράσινες ελιές, το 23% των ολικών φαινολών της βρίσκονται στην άλμη (Owen *et al*, 2003).

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση με υποξανθίνη/οξειδάση της ξανθίνης, η κάθε φαινόλη προκαλούσε αναστολή της υδροξυλίωσης του σαλικιλικού οξέος από τις ελεύθερες ρίζες σε βαθμό δοσοεξάρτησης. Ο έλεγχος αυτός δεν μπορούσε να γίνει για τα φλαβονοειδή λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους, παρ'όλα αυτά όμως είναι γνωστό και από άλλες έρευνες πως σαν αντιοξειδωτικά που είναι, έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και έτσι να αναστέλλουν

την οξειδωση. Τελικό συμπέρασμα της έρευνας αυτής είναι πως η κατανάλωση είτε μαύρων, είτε πράσινων ελιών, είναι αρκετά ευεργετική αφού και των δύο οι πολυφαινόλες τους προστατεύουν από τη δράση των ελεύθερων ριζών (ROS), αφού έχουν παρόμοιες ποσότητες υδροξυτυροσόλης. Το επιπλέον θετικό στις μαύρες ελιές είναι ότι περιέχουν και άλλα επιπρόσθετα φαινολικά συστατικά και ιδίως φλαβονοειδή, τα οποία αναστέλλουν την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης. Αυτό είναι σημαντικό γιατί σε αερόβιες συνθήκες γίνεται μια “οξειδωτική έκρηξη” από την αντίδραση οξειδάσης της ξανθίνης με υποξανθίνη και απελευθερώνονται υπεροξειδία τα οποία παρουσία χηλικού σιδήρου καταλύουν τη δημιουργία πολύ ισχυρών οξειδωτικών ριζών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοπικής ισχαιμίας μέσα στο σώμα. Για το λόγο αυτό, τα φλαβονοειδή είναι πολύ σημαντικά και έχουν χημειοπροστατευτικές επιδράσεις. Οι ερευνητές αυτοί συνιστούν την πρόσληψη ελιών παρά λαδιού αφού σε ποσότητα 50g μαύρων ελιών περιέχονται 400mg φαινολικά συστατικά ενώ, η ίδια ποσότητα extra παρθένου ελαιολάδου παρέχει μόνο 12mg φαινολικά συστατικά. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής φαίνονται στους πίνακες 1 και 2.

4.2 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας φαινολικών συστατικών με βάση τη μέθοδο DPPH.

Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, τα οποία παραλαμβάνονται με εκχυλίσες, έχουν αντιοξειδωτική δράση στην οποία οφείλεται η σταθερότητα του ελαίου. Επειδή η αντιοξειδωτική τους δράση είναι διαφορετική έτσι και τα διάφορα είδη ελαίων δεν έχουν την ίδια σταθερότητα στην οξείδωση.

Μία μέθοδος για τον καθορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολικών συστατικών σε δείγμα ελαίου είναι η μέθοδος DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλικές ρίζες). Το DPPH είναι σταθερή ρίζα που εξουδετερώνεται από τις αντιοξειδωτικές ουσίες.

Συγκεκριμένα, στη μέθοδο DPPH, παραλαμβάνεται μικρή ποσότητα μεθανολικού εκχυλίσματος και προστίθεται σε αυτό μικρή ποσότητα αντιδραστήριου DPPH. Η μείωση της οπτικής απορρόφησης του δείγματος μετρείται σε φασματοφωτόμετρο στα 515nm σε χρόνους, 0,5, 10, 15min και μετά κάθε 15min

μέχρι την συμπλήρωση 1h. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης αξιολογούνται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox, το οποίο είναι πρότυπο αντιοξειδωτικό (ανάλογα της α-τοκοφερόλης, υδατοδιαλυτό) με εύρος συγκεντρώσεων 0,19-0,93mM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mM/Kg Trolox (Gomez *et al*, 2003).

Σύμφωνα με μία έρευνα που έγινε από τους Gordon *et al*, (2001) για τον υπολογισμό αντιοξειδωτικής δράσης δείγματος ελαιολάδου υπολογίστηκε η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών που απαιτείτο για μείωση της συγκέντρωσης των ριζών DPPH σε ποσοστό 50% για 15min. Η ποσότητα αυτή των αντιοξειδωτικών σε mg αντιστοιχεί στο συντελεστή IC50, που είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος και εξεργάζεται από την ποσότητα αλλά και την ποιότητα των πολυφαινόλων του.

Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν (κατά σειρά μείωσης) 3,4 DHPEA-EA>>υδροξυτυροσόλη>ολευρωπαΐνη>ακετουδροξυτυροσόλη, α-τοκοφερόλη, trolox φαινολικό εκχύλισμα. Μετά τα 15min, η αντίδραση με τις ρίζες DPPH παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα (Gordon *et al*, 2001).

Επίσης, μία άλλη μέθοδος για τον έλεγχο σταθερότητας δείγματος ελαιολάδου, είναι με βάση τον αριθμό υπεροξειδίων (PV) σαν αρχικά προϊόντα οξείδωσης. Βασιζόμενοι σε ένα ποσοστό PV=50meq/Kg που αντιστοιχούσε σε μείωση αντιοξειδωτικών κατά 0,3mmol/Kg, η σειρά μείωσης ήταν η εξής: υδροξυτυροσόλη>ακετουδροξυτυροσόλη, φαινολικό εκχύλισμα, 3,4-DHPEA-EA>>α-τοκοφερόλη>ολευρωπαΐνη>δείγμα ελέγχου. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η ακετούδροξυτυροσόλη έχει παρόμοια αντιοξειδωτική δράση με την υδροξυτυροσόλη αν και είναι λιγότερο πολική (Gordon *et al*, 2001).

Οι Gomez-Alonso *et al*, (2002) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση παρθένου ελαιολάδου και πως αυτή μεταβάλλεται κατά το τηγάνισμα. Η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH και βρέθηκε πως αυτή μειώθηκε απότομα μετά τις πρώτες έξι φορές τηγανίσματος αφού ενώ αρχικά η αντιοξειδωτική δράση ήταν 740mmol/Kg Trolox μειώθηκε στα 250mmol/Kg. Στο σημείο αυτό όμως, παρουσιάζεται αύξηση των πολικών συστατικών όπως οξειδωμένων τριακυλογλυκερολών (μονομερών και πολυμερών), με αποτέλεσμα το ελαιολάδο να γίνεται ακόμα πιο εύλωτο στην οξείδωση.

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH για υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων μεθανολικών εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ελιών.

Από τους Owen *et al*, (2003) μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών σε παρθένο και ραφινρισμένο ελαιόλαδο με μεθόδους σύγκρισης *in vivo* και *in vitro* εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών από Trolox και DMSO (διμέθυλο σουλφοξείδιο). Όλα τα φαινολικά συστατικά έδειξαν σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την Trolox και σε μερικές περιπτώσεις από το DMSO. Από όλα τα φαινολικά συστατικά, ισχυρότερη ήταν η υδροξυτυροσόλη ενώ η αγγλικόνη ολευροπαΐνης έδειξε τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενη με την Trolox. Υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη έδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την Trolox και η υδροξυτυροσόλη ισχυρότερη και από το DMSO.

Όσον αφορά τα δείγματα, το παρθένο ελαιόλαδο έδειξε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα ραφινρισμένα έλαια και αυτή η αντιοξειδωτική δράση ήταν ανάλογη της ολικής φαινολικής συγκέντρωσης του ελαιολάδου.

Επίσης μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην ίδια έρευνα ήταν η αναστολή στη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης με βάση HPLC. Αποτέλεσμα ήταν τα παρθένα ελαιόλαδα να προκαλούν αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης σε ποσοστό 73% ενώ τα ραφινρισμένα σε ποσοστό 48%. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη του ουρικού οξέος. Η αναστολή του ενζύμου (ποσοστό) ήταν ανάλογη της ολικής φαινολικής σύστασης των ελαίων. Επομένως συμπέρασμα είναι ότι παρθένο ελαιόλαδο το οποίο δεν υπόκειται καμία τεχνητή επεξεργασία, περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών κυρίως υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης, σεκοριδοειδών και λιγνινών και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενο με άλλα επεξεργασμένα έλαια (Owen *et al*, 1999).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών σε διάφορες ποικιλίες ελιών που έγιναν από δοάφορους ερευνητές.

ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ	ΕΙΔΟΣ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ (total phenols)
Owen et al, 1999	Παρθένο και ραφινάρισμένο ελαιόλαδο	HPLC	Μέση συγκέντρωση= 196mg/Kg Extra παρθένο= 232mg/Kg Ραφινάρισμένο= 62mg/Kg
Blekas and Boskou, 2000	Μη επεξεργασμένες ελιές (καλαμάτας, ελληνικές μαύρες και ισπανικές πράσινες)	F.C	Μέση συγκέντρωση=178-1718mg/Kg καφεϊκού οξέος ελιές Καλαμάτας= 1046mg/Kg μαύρες ελληνικές= 708mg/kKg ισπανικές πράσινες= 632mg/Kg
Pirisi et al, 2000	Ελιές Franntoio	LLE, SPE	SPE: 120.4mg/Kg καφεϊκού οξέος LLE: 123.3mg/Kg καφεϊκού οξέος
Patumi et al, 2001	Ελιές Καλαμάτας και στο λάδι τους	F.C.	Ελιές= 22744ppm γαλλικού οξέος Με ύδρευση= 18026ppm γαλλικού οξέος Λάδι= 253ppm γαλλικού οξέος Με ύδρευση= 166ppm γαλλικού οξέος
Monti et al, 2001	Φρέσκο ελαιόλαδο και αποθηκευμένο ενός έτους	F.C.	Στο φρέσκο= 810mg/Kg καφεϊκού οξέος Στο αποθηκευμένο= 780mg/Kg καφεϊκού οξέος
Blekas et al, 2002	Ελιές από Κρήτη και Πελοπόννησο	F.C.	Μέση συγκέντρωση= 20-1700mg/Kg καφεϊκού οξέος Κρητικές= 178mg/Kg καφεϊκού οξέος Κορονέικες= 20-339mg/Kg καφεϊκού οξέος Τσουνάτη= 160-221mg/Kg καφεϊκού οξέος Αμφίσης= 32-91mg/Kg καφεϊκού οξέος Πατρινές= 63mg/Kg καφεϊκού οξέος Χονδρόλια= 51-166mg/Kg καφεϊκού οξέος
Gomez,-Alonso et al, 2002	Ελαιόλαδο cornicarba	SPE	38mg/Kg συριγγικού οξέος ακριβής συγκέντρωση= 314mg/Kg
Kellie et al, 2002	Extra παρθένο και ραφινάρισμένο ελαιόλαδο	F.C.	Γενικά στο ελαιόλαδο= 100-800mg/Kg Extra παρθένο= 232mg/Kg καφεϊκού οξέος Ραφινάρισμένο= 62mg/Kg καφεϊκού οξέος
Luciano et al, 2002	Παρθένο ελαιόλαδο	F.C.	121-410mg/Kg
Psomiadou and Tsimidou, 2002	Παρθένο ελαιόλαδο	F.C.	200-700mg/Kg καφεϊκού οξέος
Owen et al, 2003	Ελιές πράσινου και μαύρου χρώματος και στην άλμη τους	HPLC	Μαύρες ελιές= 16.4g/Kg Άλμη μαύρων ελιών= 0.939g/Kg Πράσινες ελιές=4.48g/Kg Άλμη πράσινων ελιών= 1.361g/Kg

Πίνακας 2: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός σημαντικών πολυαρωματικών στο ελαιόλαδο και τις ελιές από περιγράμματα ερευνητών

Ερευνητές	Είδος	Μέθοδος Ανάλυσης	υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	ολεωροπαίνη	Αγλυκόνη ολεωροπαίνης	Ελαιικό οξύ	α- τοκο- φερόλη	λουτεοίνη	Βανυλλικό οξύ	ρ- κομμαρικό οξύ	Καφεϊκό Οξύ
Owen <i>et al</i> , 1999	Παρθένο και ραφινარიμένο	HPLC Και GC-MS	11,66±2,60mg/Kg	22,13±3,82								
Blekas <i>et al</i> , 2002	Ελιές Καλαμιάς Ελλην. Μαύρες Ισπ. Πράσινες Μαύρες σε άμμη	HPLC	Καλαμ.=250-760 mg/Kg Ελλην.=100-340 mg/Kg Ισπαν.=170-510 mg/kKg Μαύρες σε άμμη	170 mg/Kg ↓↓↓ ↓↓↓					74mg/ Kg			
Ryan <i>et al</i> , 2001	Ελιές wagga wagga	RPLC	Οξίνη εκχύλιση 2h:(0,01 mg/g τυροσόλης) 24h:0,07 mg/g τυροσόλης) Οξίνη υδρόλυση 2h: 0,06 mg/g τυρ. 24h:<0,01 mg/g τυρ. Βασική εκχύλιση 2h:<0,01 Βασική υδρόλυση 2h:0,12 mg/g τυρ. 24h:0,12 mg/g τυρ. Βασική υδρόλυση 2h:0,13 mg/g τυρ. 24h:<0,01 mg/g τυρ.	Οξίνη εκχύλιση 2h: 0,38 24h:0,98 Οξίνη υδρόλυση 2h: 0,32 24h:0,94 Βασική εκχύλιση 2h:1,3 24h:1,2 Βασική υδρόλυση 2h:<0,01 24h:<0,01 Βασική υδρόλυση 2h:<0,01 24h:<0,01	Οξίνη εκχύλιση 2h: 21,2 24h:<0,01 Οξίνη υδρόλυση 2h: 24,3 24h:<0,01 Βασική εκχύλιση 2h:<0,01 Βασική υδρόλυση 2h:<0,01 24h:<0,01						Ο.Ε. 2h: 0,3 24h:0,01 Ο.Υ. 2h: 0,18 24h:0,17 Β.Ε. 2h:1,1 24h:0,01 Β.Υ. 2h:0,95 24h:<0,01	
Putumi <i>et al</i> , 2001	Olea- europaea « kalamatas »	GS-MS	660 ppm γαλλικού οξέος	800 ppm γαλλικού οξέος	10 ppm γαλλικού οξέος	180 ppm γαλλικού οξέος					15 ppm γαλλικού οξέος	
Sinoma <i>et al</i> , 2001	Ελαιόλαδο από olea europaea φρέσκο και 1 έτους	HPLC- UVDAD	Διαελδευκή μορφή υδροξυτυροσόλης με ελενολικό: φρέσκο:350mg/Kg 1 έτους:230 mg/Kg	φρέσκο:240mg/Kg 1 έτους:200 mg/Kg			75,49 g/100g ελαίου					
Gomez Alonzo <i>et al</i> , 2002	Ελαιόλαδο Gomitearda	RP-HPLC	0,93mg/Kg εκχύλιση διπλής φάσης 1,57±0,23mg/Kg εκχύλιση τριπλής φάσης 1,13±0,18mg/Kg	1,74 mg/kg εκχύλιση διπλής φάσης 2,05±0,19mg/Kg εκχύλιση τριπλής φάσης 2,14±0,2mg/Kg		7,53mg/Kg εκχύλιση διπλής φάσης 8,7±0,57mg/Kg εκχύλιση τριπλής φάσης 6,03±0,62mg/Kg g					0mg/kg	0,16 mg/kg

Πίνακας 2: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός σημιαντικών πολυφαινολών στο ελαιόλαδο και τις ελιές από πειράματα ερευνητών

Ερευνητές	Είδος	Μέθοδος Ανάλυσης	υδροξυτυροσάλη	Τυροσάλη	ολευρωπαίνη	Αγλυκόνη ολευρωπαίνης	Ελαιικό οξύ	α- τοκο- φερόλη	λουτεοίνη	Βανιλλικό οξύ	ρ- κουμαρικό οξύ	Καφεϊκό Οξύ
Kellie <i>et al</i> , 2002	Ελαιόλαδο extra παρθένο κα ραφινარიμένο	HPLC	μέση συγκέντρωση: 1,63±0,25mg/L στο extra: 14,42±3,01mg/Kg ραφινარიμένο: 1,74 ±0,84mg/Kg	μέση συγκέντρωση: 4,69±0,77mg/L στο extra: 27,45±4,05mg/Kg ραφινარიμένο: 2,98 ±1,33mg/Kg	μέση συγκέντρωση: 2,3±9mg/L στο extra: 2,04±0,78mg/K G ραφινარიμένο: 18,64 ±3,36mg/Kg							
Psomiadou and Tsimidou, 2002	Ελιές	HPLC						100mg/K g				
Blekas <i>et al</i> , 2002	Ελιές κορονεικό και κρητικές	HPLC	Κορονεικές: 0,1-1,3mg/Kg Κρητικές: 0,2-6 mg/Kg									
Owen <i>et al</i> , 2003	μαύρες και πράσινες ελιές και στην άμμη τους	HPLC GC-MS NMR	Μαύρες: 5,78g/Kg Πράσινες: 4,48 g/Kg Άλλη μαύρων=0,062 gl Άλλη πράσινων=1,361gl	Μαύρες=0,49g/K g Πράσινες=- Άλλη μαύρων=0,40g Άλλη πράσινων=-					Μαύρες:0,35g/K g Πράσινες:- άμμη μαύρων=- Άμμη πράσινων=-			
Pirissi <i>et al</i> , 2000	ελαιόλαδο	HPLC	SP(Eσχόληση): CP(σύνθετες φαινόλες)= 93,1 ±6,9mg/Kg SP (απλές φαινόλες)= 27,3 ±7,3mg/Kg LLE (Εσχόληση): CP(σύνθετες φαινόλες)=86,8 ±11mg/Kg SP (απλές φαινόλες)= 36,5 ±5,6mg/Kg									
Luciano <i>et al</i> , 2002	Παρθένο ελαιόλαδο 3 ποικιλίες ελιών LecicinoGentile Ronsciola μετά από 1 μήνα και 18 μήνες αποθήκευσης	GS-MS	Lecicino α)σε 1μήνα 1,1-4,5mg/Kg β) σε 18 μήνες 0,1-2mg/Kg Gentile α)σε 1μήνα 1,8-2,8mg/Kg β) σε 18 μήνες 0,2-2,2mg/Kg Ronsciola α)σε 1μήνα 1,8-2,4mg/Kg β) σε 18 μήνες 0,1-2mg/Kg	Lecicino α)σε 1μήνα 1-2,7mg/Kg β) σε 18 μήνες 7,2-22,3mg/Kg Gentile α)σε 1μήνα 1,8-3 mg/Kg β) σε 18 μήνες 10-51,4mg/Kg Ronsciola α)σε 1μήνα 1-1,9mg/Kg β) σε 18 μήνες 12,2-26,6mg/Kg		64,7- 76,4mg/100g ελαίου	10-32 mg/100g ελαίου					

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Όπως έχουμε αναφέρει μέχρι τώρα διάφορα είδη πολυφαινολών βρίσκονται σε τρόφιμα όπως φρούτα, λαχανικά, ελιές, όσπρια και σε ροφήματα όπως τσάι, καφέ και κρασί. Οι πολυφαινόλες αυτές διαφέρουν ως προς τη χημική τους δομή αλλά και ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Η χημική τους δομή επηρεάζει την απορρόφηση τους που γίνεται είτε στο λεπτό είτε στο παχύ έντερο. Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει την απορρόφησή τους, το μεταβολισμό τους και την απέκκρισή τους.

Οι περισσότερες πολυφαινόλες απορροφούνται στο λεπτό έντερο μέσω παθητικής διάχυσης. Επειδή οι πιο πολλές πολυφαινόλες που φτάνουν στο λεπτό έντερο είναι γλυκοσυλιωμένες, όπως τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανιδίνες, αυτό εμποδίζει την απευθείας απορρόφησή τους. Στην περίπτωση αυτή γίνεται διάσπαση του μορίου με τη βοήθεια ενός ενζύμου, της β-γλυκοσιδάσης, η οποία απομακρύνει το μόριο του σακχάρου από την πολυφαινόλη και έτσι μπορεί να απορροφηθεί στην ψυκτροειδή παρυφή του λεπτού εντέρου. Κάποιες άλλες πολυφαινόλες που φτάνουν στο λεπτό έντερο, είναι ακετυλιωμένες με οξέα όπως είναι για παράδειγμα το γαλλικό οξύ. Στην περίπτωση αυτή, η απορρόφηση των ακετυλιωμένων πολυφαινολών δεν επηρεάζεται και τόσο όπως στην περίπτωση των γλυκοζυλιωμένων και έτσι μπορούν να απορροφηθούν και στην ακετυλιωμένη τους μορφή. Επίσης υπάρχει μία άλλη ομάδα πολυφαινολών που φτάνουν στο λεπτό έντερο και είναι εστεροποιημένες ενώσεις με λιπίδια ή σάκχαρα. Στην περίπτωση αυτή όπως και η γλυκοζυλίωση έτσι και η εστεροποίηση επηρεάζει τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των πολυφαινολών γι' αυτό οι εστεροποιημένες πολυφαινόλες όπως είναι τα φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ) είναι δύσκολο να απορροφηθούν στη μορφή τους αυτή. Επειδή όμως ο οργανισμός δεν διαθέτει τις κατάλληλες εστεράσες που είναι απαραίτητες στην περίπτωση αυτή, τα μόρια αυτά απορροφούνται σε πολύ μικρό ποσοστό στο λεπτό έντερο ενώ αυτά που δεν απορροφούνται κατευθύνονται στο παχύ έντερο όπου με τη βοήθεια εστερασών που υπάρχουν εκεί απορροφούνται από το ενδοθήλιο του εντέρου.

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών που εισέρχονται στον οργανισμό γίνεται στο ήπαρ. Οι πολυφαινόλες μετά την απορρόφησή τους, κινούνται στο πλάσμα υπό την ελεύθερη μορφή τους. Πηγαίνοντας στο ήπαρ, με τη δράση διαφόρων ενζύμων, επανασυνδέονται με άλλους αντικαταστάτες και έτσι υπάρχουν και πάλι σε μια

συζευγμένη μορφή. Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο σε μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινόλων αφού στις περιπτώσεις που η συγκέντρωσή τους είναι μικρή λόγω μειωμένης διαιτητικής πρόσληψής τους, τότε ο μεταβολισμός τους γίνεται και στο λεπτό έντερο και απλά στο ήπαρ επιδέχονται κάποιες επιπλέον τροποποιήσεις.

Όσον αφορά την απέκκρισή τους, αυτή γίνεται με δύο τρόπους. Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφούνται στο λεπτό έντερο αλλά ούτε και στο παχύ τότε απεκκρίνονται μέσω των κοπράνων. Ενώ οι πολυφαινόλες που απορροφούνται είτε στο λεπτό, είτε στο παχύ έντερο τότε αφού εισέλθουν στον οργανισμό, καταλήγουν στα νεφρά όπου και αποβάλλονται στα ούρα (Tuck *et al*, 2002).

Πολλές έρευνες και πολλά πειράματα έχουν γίνει μέχρι τώρα για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων στο πλάσμα. Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα, η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα ως αυτούσιες πολυφαινόλες, είναι πάρα πολύ μικρή όταν η πρόσληψή τους γίνεται μέσω μιας συνηθισμένης δίαιτας. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών τους είναι αρκετά μεγαλύτερη. Μετά από πειράματα που έγιναν από Singleton και Rossi (1965) βρέθηκε πως η πρόσληψη συνολικά 500mg πολυφαινόλων από 300mL κόκκινο κρασί είχαν συνολική συγκέντρωση στο πλάσμα περίπου 50mM.

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου, τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, κάποια πειράματα απ' τους Visioli *et al*, (1998) έχουν γίνει σε ανθρώπους για έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Συγκεκριμένα δόθηκε σε μια ομάδα εθελοντών ελαιολάδο με πολύ λίγες πολυφαινόλες αλλά εμπλουτισμένο σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη και στη συνέχεια καθορίστηκαν οι συγκεντρώσεις τους στα ούρα με τη μέθοδο GC-MS μετά από εκχύλιση των δειγμάτων. Τα επίπεδα των δύο πολυφαινόλων στα ούρα σχετίζονταν με την πρόσληψή τους πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η απορρόφησή τους είναι δοσοεξαρτώμενη. Πριν γίνει η πρόσληψη του ελαιολάδου από τους εθελοντές μετρήθηκε η συγκέντρωση τυροσόλης στα ούρα και βρέθηκε να είναι 2-47,4mg/L. Αμέσως μετά τη δόση η συγκέντρωση τυροσόλης στα ούρα ήταν 2,4-25,2mg/L ενώ 24h μετά η συγκέντρωσή της ανήλθε στα 281-708mg/L. Μέγιστες συγκεντρώσεις τυροσόλης εμφανίστηκαν στα δείγματα ούρων στις 0-4h απ' τη δόση (Casas-Miro *et al*, 2001). Η τυροσόλη απεκκρίνεται στα ούρα κυρίως σε συζευγμένη μορφή και μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξης 6-11% αποβάλλεται στην ελεύθερή της μορφή. Σε όλες σχεδόν τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα τα ποσά των υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης που απεκκρίνονταν υπό την ελεύθερή τους μορφή δεν ξεπερνούσε το 15% της ολικής τους ποσότητας πράγμα

που υποδηλώνει πιθανόν τον εκτεταμένο μεταβολισμό που υπόκειται οι πολυφαινόλες αυτές στο ήπαρ (Tuck *et al*, 2002).

Συμπερασματικά φαίνεται πως υπάρχει μία δοσοεξαρτώμενη σχέση ανάμεσα στην πρόσληψη πολυφαινολών ελαιολάδου και στην απορρόφησή τους. Όσον αφορά τις πολυφαινόλες που μένουν στο σώμα και δεν απεκκρίνονται είτε στα ούρα είτε στα κόπρανα, παραμένει ακόμα άγνωστη η τελική κατάληξή τους.

Β'. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: Περιγραφή Πειραματικού Μέρους

Στα πλαίσια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση 5 είδη ελιάς, συμπεριλαμβανομένου και της άλμης τους και 2 είδη ελαιολάδου. Οι ποικιλίες ελιών και ελαιολάδου, ως επίσης και ορισμένα χαρακτηριστικά τους φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.1

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΘΡΟΥΜΠΕΣ	Μαύρες, ζαρωμένες σε άλμη
ΨΥΛΑΚΗ	Μεγάλες, ποικιλόχρωμες ελιές
ΚΑΛΑΜΩΝ	Μεγάλες, χονδρές, μακρόστενου σχήματος, μαύρου χρώματος σε άλμη
ΤΣΑΚΙΣΤΕΣ	Μικρές, πράσινου χρώματος σε άλμη
ΑΜΦΙΣΑΣ	Μεγάλες, χονδρές, μαύρου χρώματος ελιές σε άλμη
ΚΡΗΤΙΚΕΣ	Μικρές, μαύρου χρώματος ελιές σε άλμη

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2

ΕΙΔΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΕΥΖΗΝ	Παρθένο, οξύτητας 0-1%
ΑΣΗΜΙ ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗΣ	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Κρήτης, βιολογικής γεωργίας

Προτού αρχίσει η επεξεργασία των ελιών, ζυγίσαμε συγκεκριμένη ποσότητα από το κάθε είδος και αφού απομονώσαμε τη σάρκα από τα κουκούτσια από το κάθε είδος, τα ζυγίσαμε ξεχωριστά για να υπολογίσουμε το ποσοστό του βάρους των ελιών που αντιστοιχεί στο κουκούτσι και το ποσοστό που αντιστοιχεί στη σάρκα, για το κάθε είδος ελιάς ως επίσης και το λόγο του βάρους της σάρκας ως προς το βάρος του κουκουτσιού. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.1.

6.1) ΣΤΑΔΙΟ 1: ΛΥΟΦΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΕΛΙΩΝ

ΟΡΓΑΝΑ

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο αυτό είναι:

A) Ζυγός ακριβείας:

ANALYTICAL Standard, Model AS1120 (Serial No 19750) της εταιρίας OHAUS

B) Λυοφυλοποιητής:

CRYODOS της εταιρίας TELESTAR

ΜΕΘΟΔΟΣ

Αφού μετρήθηκαν στο ζυγό ορισμένη ποσότητα ελιών από το κάθε είδος, απομονώνουμε τη σάρκα από τα κουκούτσια αυτών. Στη συνέχεια τοποθετούνται ξεχωριστά σάρκα και κουκούτσια σε ειδικά προζυγισμένα μπουκάλια του λυοφυλοποιητή και ξαναζυγίζονται για υπολογισμό του βάρους τους πριν τη λυοφυλοποίηση. Ακολούθως, αφού η διαδικασία αυτή γίνει σε όλα τα είδη ελιών, τοποθετούνται στον λυοφυλοποιητή σε πίεση 1mbarg, σε θερμοκρασία -40°C , για 24 ώρες. Μετά από την πάροδο 24 ωρών, τα μπουκαλάκια ξαναζυγίζονται και η διαφορά του βάρους που βρίσκουμε αντιστοιχεί στην υγρασία που απομακρύνεται από σάρκα και κουκούτσια κατά την λυοφυλοποίηση. Έτσι υπολογίζεται το ποσοστό υγρασίας σε σάρκα και κουκούτσια για το κάθε είδος ελιάς. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.2.

Μετά την λυοφυλοποίηση ακολουθεί η πολτοποίησή τους σε ειδικό γουδί και η αποθήκευσή τους σε καθαρά δοχεία, στο ψυγείο.

6.2) ΣΤΑΔΙΟ 2: ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

A) ΑΠΟ ΕΛΙΕΣ (σάρκα και κουκούτσι)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις είναι

A) Μεθανόλη, Purex pro analysi, Ref UV 1230 της εταιρίας Merck

B) Για την εξάτμιση των διαλυτών στα διάφορα στάδια των εκχυλίσεων χρησιμοποιήθηκε N₂, της εταιρίας Αεροσκόπιο.

ΟΡΓΑΝΑ

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις είναι

A) Ζυγός ακριβείας

B) Φυγόκεντρος: Η φυγόκεντρος είναι κατασκευής Hermle, σειρά Z 320. Ο ρότορας είναι ο 22072VOI.

Γ) SONYCATOR 2210-BRANSON

Δ) VORTEX

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η διαδικασία που διεξάχθηκε στην παραλαβή πολυφαινολών από σάρκα και κουκούτσια ήταν η ίδια. Στο κάθε δείγμα έγιναν συνολικά 5 εκχυλίσεις με διαλύτη τη μεθανόλη. Για το κάθε είδος σάρκας και κουκουτσιού έγιναν εκχυλίσεις σε 2 δείγματα (A+B).

Ζυγίστηκαν 500mg δείγματος και το τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15mL. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 5mL μεθανόλη και

τοποθετήθηκε στο vortex για 1λεπτά. Ακολούθως τοποθετείται στο sonycator (για καλύτερη εισχώρηση των πολυφαινολών στη μεθανόλη) για 10 λεπτά και μετά στη φυγόκεντρο για άλλα 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το κάθε μεθανολικό εκχύλισμα χύθηκε με προσοχή σε ένα άλλο καθαρό σωληνάκι το οποίο τοποθετήθηκε για εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στο σωληνάκι με το δείγμα προστέθηκαν άλλα 5mL μεθανόλης και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία εκχύλισης.

Στο τέλος, αφού έγιναν και οι 5 εκχυλίσεις στο κάθε δείγμα και τα μεθανολικά εκχυλίσματα τοποθετούνταν κάθε φορά στο ίδιο σωληνάκι για εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, τα σωληνάκια με τις πολυφαινόλες παραλήφθηκαν με 5ml μεθανόλης. Μικρή ποσότητα από το εκχύλισμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στο κάθε δείγμα, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.3α.

B) ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A) Μεθανόλη, Purex pro analysi, Ref UV 1230 της εταιρίας Merck

B) Εξάνιο, Purex pro analyses, 1092067 της εταιρίας Merck

Γ) Για την εξάτμιση των διαλυτών στα διάφορα στάδια των εκχυλίσεων χρησιμοποιήθηκε N₂, της εταιρίας Αεροσκόπιο.

ΟΡΓΑΝΑ

A) Ζυγός ακριβείας

B) VORTEX

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παραλαβή πολυφαινολών από δείγμα ελαιολάδου έγινε με 2 διαλύτες, το εξάνιο για απομάκρυνση λιπιδίων ή άλλων σωματιδίων στο δείγμα ελαίου και με μεθανόλη-νερό (80:20 V/V) για παραλαβή των πολικών φαινολών. Για το κάθε είδος ελαιολάδου, οι εκχυλίσεις έγιναν σε 2 δείγματα.

Αρχικά ζυγίστηκαν 500mg από το δείγμα και τα βάλαμε σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα με 5mL εξάνιο και 2mL μεθανόλη 80%. Ο σωλήνας αναδεύεται στο vortex για 1λεπτό και αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να γίνει ο διαχωρισμός των 2 στοιβάδων, του εξανίου και της μεθανόλης. Αφού έγινε ο διαχωρισμός, με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur παραλήφθηκε η στοιβάδα μεθανόλης και τη τοποθετήθηκε σε ένα άλλο σωληνάκι για εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Στο μίγμα λαδιού και εξανίου που παραμένει προστέθηκαν άλλα 2mL μεθανόλης-νερό (80:20 V/V) και έγινε ξανά η ίδια διαδικασία εκχύλισης. Συνολικά έγιναν 3 εκχυλίσεις.

Το στερεό υπόλειμμα που παραμένει από την εξάτμιση της μεθανόλης, παραλαμβάνεται με 1ml μεθανόλης για να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.3β.

Γ) ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΜΗ ΤΩΝ ΕΛΙΩΝ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A) Μεθανόλη, Purex pro analysi, Ref UV 1230 της εταιρίας Merck

B) Εξάνιο, Purex pro analysi, 1092067 της εταιρίας Merck

ΟΡΓΑΝΑ

A) Διαχωριστική χοάνη

Β) Περιστρεφόμενος εξατμιστής (Rotavapour) της εταιρίας **EYELA** με υδρόλουτρο της όδίας εταιρίας και υδραντλία κενού.

Γ) Ζυγός ακριβείας

Δ) Μικροπιπέτες ERPPENDORF με κίτρινου και μπλε χρώματος tips.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Αρχικά τοποθευήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο 30mL άλμη από το κάθε είδος ελιών, τοποθετήθηκαν στην διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν άλλα 60mL εξάνιο(με ογκομετρικό κύλινδρο). Ανακινήστηκε η χοάνη αρκετές φορές για καλή ανάμειξη με σταδιακό άνοιγμα της στρόφιγγας για απελευθέρωση της πίεσης του αέρα που δημιουργείται στο εσωτερικό της χοάνης. Η χρήση του εξανίου γίνεται για τη διάλυση λιπιδίων και άλλων σωματιδίων που υπάρχουν στην άλμη. Στη συνέχεια, αφού αφέθηκε η χοάνη σε ηρεμία για λίγα λεπτά, έγινε διαχωρισμός των 2 στοιβάδων, της άλμης και του εξανίου. Η στοιβάδα του εξανίου συλλέχθηκε σε ειδική προζυγισμένη σφαιρική φιάλη του rotavapour ενώ η στοιβάδα της άλμης ξανατοποθετείται στη χοάνη για ανάμειξη με άλλα 60mL εξανίου. Η πιο πάνω διαδικασία έγινε συνολικά 3 φορές.

Το εξάνιο που συλλέχθηκε κατά τις εκχυλίσσεις στην ειδική σφαιρική φιάλη εξατμίστηκε στο rotavapour και στη συνέχεια ζυγίστηκε η σφαιρική φιάλη. Η διαφορά βάρους που βρέθηκε οφείλεται στα λιποειδή και σε άλλα σωματίδια της άλμης, συμπεριλαμβανομένου και πολυφαινόλες που διαλύθηκαν στο εξάνιο. Το στερεό υπόλειμμα της σφαιρικής φιάλης παραλαήφθηκε με 5mL εξανίου και το όλον αφού μεταφέρθηκε σε μικρό σωληνάκι των 15mL, αναμίχθηκε με 2mL μεθανόλη-νερό (80:20 V/V) και εφαρμόστηκε η μέθοδος παραλαβής πολυφαινόλων από ελαιόλαδο η οποία περιγράφηκε πιο πάνω. Στο τέλος, οι πολυφαινόλες παραλήφθηκαν με 1mL μεθανόλης και έγινε ποσοτικός προσδιορισμός τους με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Η ποσότητα άλμης (30mL) που χρησιμοποιήθηκε, μεταφέρθηκε σε ειδικό πλαστικό σωλήνα και φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, παραλήφθηκε με πιπέτα Eppendorf 1ml και αραιώθηκε σε ένα άλλο ωληνάκι με 9ml μεθανόλης. Το όλο μίγμα φυγοκεντρήθηκε και πάλι στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και τελικά με πιπέτα Eppendorf παραλαμβάνεται μικρή ποσότητα από αυτό για να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.3γ.

6.3) ΣΤΑΔΙΟ 3: ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEAU

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A) Διάλειμμα Folin-Ciocalteu

B) Διάλειμμα κορεσμένου ανθρακικού νατρίου (45g Na_2CO_3 / 100mL νερού)

ΟΡΓΑΝΑ

A) **Φασματοφωτόμετρο, UV-VIS.** Το φασματοφωτόμετρο είναι διπλής δέσμης, υπεριώδους ορατού της εταιρίας UVICON spectrophotometer model 931.

B) **Μικροπιπέτες ERPENDORF** με κίτρινου και μπλε χρώματος tips.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Με πιπέτα Eppendorf παραλήφθηκαν 0,1mL από το δείγμα. Το αναμίχθηκαν με 5mL αποσταγμένο νερό και 0,5mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu σε δοκιμαστικό σωλήνα. Μετά από παραμονή του μίγματος αντίδρασης για 3 λεπτά, προστέθηκε 1mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 . Το περιεχόμενο αναδεύτηκε και αραιώθηκε με νερό έως τελικό όγκο 10mL (3,4mL νερό). Η αντίδραση αυτή έγινε 2 φορές για το κάθε δείγμα και στο τέλος κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων που έδωσαν οι απορροφήσεις του κάθε δείγματος.

Η απορρόφηση του κάθε δείγματος μετρήθηκε μετά από μία ώρα σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, στα 725nm ως προς το τυφλό δείγμα. Ο προσδιορισμός συγκέντρωσης των πολυφαινόλων έγινε με αναφορά σε πρότυπες καμπύλες καφεϊκού οξέος που φτιάχνονταν κατά διαστήματα στο εργαστήριο.

Για κάθε νέο διάλυμα Folin-Ciocalteu που παρασκευαζόταν δημιουργείτο και νέα πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος που αντιστοιχούσε στο συγκεκριμένο διάλυμα. Συνολικά κατά την διάρκεια των πειραμάτων αυτής της πτυχιακής εργασίας παρασκευάστηκαν 3 διαλύματα Folin-Ciocalteu στα οποία αντιστοιχούν 3 καμπύλες καφεϊκού οξέος, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των ολικών πολυφαινόλων, εκφρασμένες σε mg καφεϊκού οξέος, ανάλογα με την τιμή απορρόφησης που έδινε το κάθε δείγμα. Οι εξισώσεις των πρότυπων καμπύλων αναφοράς ($\text{Abs} = f(\mu\text{g καφεϊκού οξέος}/10\text{mL Folin})$) έχουν ως εξής:

A) Στις 10/11/2002: $\psi = 0,0088\chi + 0,1157$ με $R^2 = 0,9924$

B) Στις 10/02/2003: $\psi = 0,011\chi + 0,0822$ με $R^2 = 0,9974$

Γ) Στις 03/04/2003: $\psi = 0,0135\chi + 0,1067$ με $R^2 = 0,9994$

6.4) ΣΤΑΔΙΟ 4: ΕΠΑΝΑΛΑΒΜΑΝΟΜΕΝΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ. ΜΕΘΟΔΟΣ SOXLHET

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A) Πετρελαϊκός αιθέρας, Purex pro analysi 0450528 της εταιρίας Merck

ΟΡΓΑΝΑ

A) Συσκευή Soxhlet

Αποτελείται από μια γυάλινη κυλινδρική φιάλη μέσα στην οποία τοποθετείται το προς εκχύλιση δείγμα, μέσα σε ειδική φύσιγγα φιλτραρίσματος. Η κυλινδρική φιάλη είναι κλειστή στο άνω μέρος της και επικοινωνεί με πλευρικό άνω σωλήνα με σφαιρική φιάλη ζέσης που βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής και σε αυτήν τοποθετείται ο διαλύτης εκχύλισης. Η σφαιρική φιάλη θερμαίνεται με θερμομανδύα, μέχρι βρασμού του διαλύτη.

B) Ζυγός ακριβείας.

Γ) Περιστρεφόμενος εξατμιστής (Rotavapour)

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εκχύλιση έγινε σε όλα τα είδη ελιάς, σε κουκούτσι και πυρήνα. Αρχικά τοποθετήθηκαν τα δείγματα στις προζυγισμένες φύσιγγες και ζυγίστηκαν ούτως ώστε η ποσότητα δείγματος να είναι περίπου 10gr. Στη συνέχεια με ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετήθηκαν 350mL πετρελαϊκού αιθέρα στις προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες και αφού συναρμολογήθηκε η συσκευή, τέθηκε σε λειτουργία για 4 ώρες έτσι ώστε να γίνουν περίπου 20-30 επαναλαμβανόμενες εκχυλίσσεις.

Μετά το τέλος της εκχύλισης, αφήνεται η συσκευή για λίγη ώρα μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ζυγίστηκαν οι

φύσιγγες, στις οποίες η διαφορά βάρους αντιστοιχεί στην ποσότητα λίπους ή άλλων υγρών που απομακρύνθηκαν από το τρόφιμο με την εκχύλιση και διαλύθηκαν στον πετρελαϊκό αιθέρα. Για να βρεθεί η ακριβή ποσότητα λίπους που είχε το κάθε κοκούτσι ή πυρήνας, εξατμίστηκε ο πετρελαϊκός αιθέρας της κάθε φιάλης σε rotavapour και ακολούθως ζυγίστηκαν. Η διαφορά βάρους αντιστοιχεί στην ποσότητα λίπους που περιείχε το κάθε είδος πυρήνα ή κουκουτσιού. Άλλωστε μετά την εξάτμιση ήταν ορατή η παρουσία του λαδιού σε κάθε φιάλη. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.4.

6.5) ΣΤΑΔΙΟ 5: ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ DPPH

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A) Μεθανόλη, Purex pro analysi, Ref UV 1230 της εταιρίας Merck

B) Πυκνό διάλειμμα DPPH 1Mm (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl), το οποίο αραιώθηκε στα 60μM.

Γ) Μεθανολικά διαλείμματα πολυφαινόλων (της σάρκας) που ετοιμάσαμε στο στάδιο 2

ΟΡΓΑΝΑ

A) Φασματοφωτόμετρο, UV-VIS.

B) Μικροπιπέτες EPPENDORF.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος αυτή έγινε στη σάρκα των ειδών ελιάς για να υπολογιστεί η ολική αντιοξειδωτική τους δράση με βάση την ικανότητα δέσμευσής τους με τις ελεύθερες ρίζες DPPH. Για το κάθε δείγμα ξεχωριστά έγιναν συνολικά 6 αραιώσεις και για κάθε αραιώση γινόταν έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης στο φασματοφωτόμετρο.

Αρχικά παραλαμβάνονται από το κάθε μεθανολικό διάλειμμα σάρκας ποσότητα 0.5mL με πιπέττα Eppendorf και η κάθε ποσότητα αναγνύεται με 0.5mL μεθανόλη. Αναδεύεται ελαφρά και στη συνέχεια παπαλήφθησαν 0.1mL από αυτό το διάλυμα και τα αναμείχθηκαν με 3.9mL αραιού διαλείμματος DPPH με τη βοήθεια σιφωνίου των 5mL σε ειδικά πλαστικά σωληνάκια. Το όλον αναδεύτηκε στο vortex για 1 λεπτό και αμέσως μετά τοποθετήθηκε στο φασματοφωτόμετρο. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 515nm με τυφλό μεθανόλη. Η κυψελίδα παρέμεινε στο φασματοφωτόμετρο και παραλήφθησαν οι τιμές απορρόφησης για τους χρόνους $t=0$, $t=10'$, $t=20'$, $t=30'$ δηλαδή ανά 10 λεπτά μέχρι να γίνει σταθεροποίηση της τιμής απορρόφησης, δηλαδή οι τελευταίες 2-3 τιμές να είναι παραπλήσιες.

Αφού έγινε η διαδικασία αυτή για το δείγμα με την αραιώση 1, ακολούθησε η αραιώση $\frac{1}{2}$. Για να γίνει η αραιώση αυτή παραλήφθησαν 0.5mL από την αραιώση 1 και τα αναμείχθηκαν με 0.5mL μεθανόλη σε ένα άλλο δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια παραλήφθησαν 0.1mL από το διάλυμα αυτό και αναμείχθηκαν με 3,9mL αραιού διαλύματος DPPH. Ακολούθως έγινε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε πιο πάνω για την αραιώση 1.

Με τον ίδιο τρόπο έγιναν και οι άλλες αραιώσεις ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ και $\frac{1}{32}$). Κάθε φορά, πριν την έναρξη των μετρήσεων στο φασματοφωτόμετρο, υπολογίστηκε η απορρόφηση ενός blank, δηλαδή διάλυμα που προκύπτει από την ανάμειξη 0.1mL μεθανόλης και 3,9mL αραιού διαλύματος DPPH. Λογικά η τιμή απορρόφησης ενός τέτοιου διαλείμματος είναι αρκετά μεγάλη αφού δεν έχει καθόλου πολυφαινόλες, γι'αυτό και όσο μεγαλώνουν οι αραιώσεις στα δείγματα (και άρα μειώνεται η συγκέντρωση πολυφαινολών σε αυτά), οι τιμές απορρόφησης που εμφανίζουν πλησιάζουν την τιμή

απορρόφησης που έδειξε το blank. Συνήθως στις τελευταίες δύο αραιώσεις, η τιμή απορρόφησης σταθεροποιείται πολύ σύντομα λόγω της μικρής συγκέντρωσης πολυφαινολών στα διαλύματα αυτά. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων το αραιό διάλυμα DPPH, φυλαγόταν σε σκοτεινό μέρος με αλουμινόχαρτο επειδή είναι αρκετά ισχυρό οξειδωτικό.

Στη συνέχεια, η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε στο πρόγραμμα EXCEL και με εκθετικές συναρτήσεις $\%Remaining DPPH = f(mg PP)$ υπολογίσαμε την ολική αντιοξειδωτική δράση του κάθε δείγματος με βάση τα mg πολυφαινολών που απαιτούνται για τη μείωση της μισής ποσότητας του DPPH (50%). Αποτελέσματα στον πίνακα 7.5.

6.6) ΣΤΑΔΙΟ 6: ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ / ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC/MS)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα συλλιωτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μεθανολικών διαλυμάτων στον αέριο χρωματογράφο είναι:

A) BSTFA, Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, της εταιρίας Aldrich

B) TMCS, Trimethylchlorosilan, της εταιρίας Merck.

ΟΡΓΑΝΑ

A) Αέριος Χρωματογράφος / Φασματογράφος Μάζας (GC/MS)

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Hewlett Packard, σειρά HP 6890, συζευγμένος με ανιχνευτή μαζών MSD 5972 (Hewlett Packard, Wallbronn) εφοδιασμένος με εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη. Το φέρον αέριο ήταν το He με ροή 0.6ml/min. Ο εισαγωγέας διατηρήθηκε στους 280°C και η γραμμή μεταφοράς (transfer line MSD) στους 300°C, σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η αναλυτική στήλη

ήταν τριχοειδής, μήκους 30m, εσωτερικής διαμέτρου 250μm και πάχους φιλμ 0,25μm. Το υλικό πλήρωσης της στήλης ήταν 5% φαίνυλο- και 95% μέθυλο σιλοεξάνιο.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Προετοιμασία των δειγμάτων για τη μέτρηση GC-MS. Παρελήφθησαν 500μl από τα μεθανολικά δείγματα πολυφαινόλων που είχαμε στην κατάψυξη και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Για τη συλانوποίηση των δειγμάτων στο ξηρό υπόλειμμα, προστέθηκαν 400μl BSTFA και 10μl TMCS και το δείγμα παρέμεινε στο υδατόλουτρο στους 70°C για 0.5 ώρες. Στη συνέχεια 3μl από το προκύπτον διάλυμα εγχύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση, χωρίς σχάση του δείγματος (splitless injection) με τους δύο εξής τρόπους:

A) Full scan mode: Στην περίπτωση αυτή ο ανιχνευτής τίθεται ώστε να καταγράφει όλα τα ιόντα με m/z 35-600amu. Έτσι λαμβάνεται χρωματογράφημα (TIC: total ion chromatogram) που η κάθε κορυφή του αντιπροσωπεύει το άθροισμα των ιόντων που προκύπτουν από τη θραυσματοποίηση της ένωσης. Αυτό, δίνει τη δυνατότητα λήψης φάσματος μάζας για κάθε μία κορυφή, που αντιστοιχεί σε μια εκλούμενη ένωση. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ταυτοποίηση της ένωσης με τη βοήθεια βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας (Nist 98, Wiley) που συνοδεύει το λογισμικό (HP Chemstation G1701) λήψης αποτελεσμάτων.

B) Single Ion Monitoring (SIM mode): Ο ανιχνευτής ρυθμίζεται ώστε να παρακολουθεί εκλεκτικά 1-3 χαρακτηριστικά ιόντα για κάθε εκλούμενο συστατικό με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης περίπου 10-50 φορές. Τα ιόντα που παρακολουθούνται για την κάθε πολυφαινόλη φαίνονται στον πίνακα 6.3

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3

Παράθυρο Χρόνου Κατακράτησης (RT)	Πολυφαινόλη	Ιόντα που παρακολουθούνται
6-18	Κινναμικό οξύ Τυροσόλη	205, 220, 161 179, 282, 193
18-20	P-OH-βενζοϊκό οξύ P-OH-φαινυλακετικό οξύ	282, 267, 223 296, 179, 164
20-24	Βανιλλικό οξύ OH-τυροσόλη Ομοβανιλλικό οξύ	312, 297, 267 370, 267, 193 326, 209, 179
24-28	O-κουμαρικό οξύ Πρωτοκατεχικό οξύ 3,4δифαινυλακετικό οξύ	308, 293, 219 370, 355, 173 384, 267, 179
28-30.5	Συριγγικό οξύ	342, 327, 312, 297
30.5-33	P-κουμαρικό οξύ	308, 293, 219
33-37	Γαλλικό οξύ	458, 281, 179
37-39	Φερουλικό οξύ	338, 323, 308
39-40	Καφεϊκό οξύ	396, 381, 219
40-44	Σιναπτικό οξύ	368, 353, 338
44-46.5	Ρεσβερατρόλη	446, 445, 444
46.5-50	Επικατεχίνη	368, 355, 179
50-54	B-αμυρίνη	218, 203, 189
54-55	Ουβαόλη Ολεανολικό οξύ Ορσολικό οξύ	496, 216, 203 482, 320, 283 482, 320, 283

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου που χρησιμοποιήθηκε ρυθμίστηκε έτσι ώστε να λαμβάνεται πολύ καλός διαχωρισμός των πολυφαινολών που προσδιορίζονται και είναι το παρακάτω:

Αρχική θερμοκρασία: 70°C για min

Πρώτη άνοδος της θερμοκρασίας: 5%/min μέχρι τους 130°C

Δεύτερη άνοδος θερμοκρασίας: 4%/min μέχρι τους 170°C για 15min

Τρίτη άνοδος της θερμοκρασίας: 10%/min μέχρι τους 300°C

Τελική θερμοκρασία: 300°C για 30min

Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 77min (πέραν του οποίου δν εκλούεται τίποτα από τη στήλη).

6.7) ΣΤΑΔΙΟ 7: ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ:

A) Διαλύτες HPLC : μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό EasyPure με φωσφορικό οξύ.

B) Δείγματα που αναλύθηκαν, όγκου=40μl το κάθε δείγμα εκτός της ποικιλίας Ψιλάκη όπου ήταν όγκου=100μl.

ΟΡΓΑΝΑ

A) Υγρός Χρωματογράφος Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Ο υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Hewlett Packard, σειρά 1050. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν, C18 Nucleosil 120 (5μm) (120 x 4mm) σε χρωματογραφία ανάστροφης φάσης με βαθμιδωτή έκλυση και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπεριώδους-ορατού, UV-Vis (280, 214, 295, 254 nm), Φθορισμού (lex=295 nm, lem=330nm) και με ροή διαλυτών 1ml/min.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Έγινε η προετοιμασία των δειγμάτων για τη μέτρηση HPLC. Αφού παρελήφθησαν 500μl από τα μεθανολικά δείγματα πολυφαινολών που είχαμε στην κατάψυξη και τα βάλαμε σε vials (1,5ml) με αλουμινένια καπάκια. Στη

συνέχεια, διαλύματα τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη του υγρού χρωματογράφου.

Το πρόγραμμα της Βαθμιδωτής Έκλουσης ήταν (Andrikopoulos *et al*,1991):

Χρόνος (min)	%A	%B	%C	%D
0	70,0	17,5	12,5	0
35	0	58,3	41,7	0
45	0	58,3	41,7	0
51	0	23,4	16,6	60,0
56	0	23,4	16,6	60,0
60	0	58,3	41,7	0
65	70,0	17,5	12,5	0
70	70,0	17,5	12,5	0

A = υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος με pH=3

B = CH₃CN (ακετονιτρίλιο)

C = CH₃OH (μεθανόλη)

D = CH₃CH(OH)CH₃ (ισοπροπανόλη)

Με αυτό το σύστημα ανάλυσης οι πολυφαινόλες έχουν retention time (χρόνο κατακράτησης) 1-16min. Αποτελέσματα στον πίνακα 7.7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.1: Αποτελέσματα διαφορετικών δοκιμών αίματος των αλφιδών

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΙΔΟΣ	% ΣΑΡΚΑ	% ΚΟΥΚΟΥΤΣΙ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΣΑΡΚΑ/ΚΟΥΚΟΥΤΣΙ
Καλαμών	80.6	19.4	4.2
Αλφιδας	82.0	18.0	4.6
Τοκκιστής	66.6	33.3	2.0
Κριτικός	78.1	21.9	3.6
Υπόλοιπα	80.5	19.5	4.1

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.2: Αποτελέσματα δοκιμών αίματος

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΙΔΟΣ	% ΥΓΡΑΣΙΑ ΣΑΡΚΑΣ	% ΥΓΡΑΣΙΑ ΚΟΥΚΟΥΤΣΙΟΥ
Καλαμών	6.9	11.7
Αλφιδας	20.4	14.7
Τοκκιστής	80.3	18.6
Κριτικός	24.4	1.1
Υπόλοιπα	21.5	18.1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.1: Αποτελέσματα μεμονωμένων ζυγίσεων σάρκας και πυρήνα

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	% ΣΑΡΚΑ	%ΚΟΥΚΟΥΤΣΙ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΣΑΡΚΑ/ΚΟΥΚΟΥΤΣΙ
Καλαμών	80.6	16.5	4.9
Άμφισας	82.0	14.5	5.7
Τσακιστές	66.6	31.2	2.1
Κρητικές	78.3	17.9	4.3
Ψυλάκη	80.5	16.5	4.9

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.2: Αποτελέσματα λυοφυλίσωσης

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	% ΥΓΡΑΣΙΑ ΣΑΡΚΑΣ	% ΥΓΡΑΣΙΑ ΚΟΥΚΟΥΤΣΙΟΥ
Καλαμών	6.9	11.7
Άμφισας	10.4	14.7
Τσακιστές	50.5	18.6
Κρητικές	56.4	2.1
Ψυλάκη	21.3	18.8

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.3α: Αποτελέσματα συγκέντρωσης ολικών πολυφαινολών σε σάρκα και κουκούτσι, με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEAU

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	Ολικές φαινόλες σάρκας =>mg/100g καφεϊκού οξέος	Ολικές φαινόλες κουκουτσιού =>mg/100g καφεϊκού οξέος
Θρούμπες	472.4	137.4
Καλαμών	418.9	364.6
Άμφισας	282.5	174.3
Τσακιστές	278.2	716
Κρητικές	310.2	172.2
Ψυλάκη	216.3	61.3

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.3β: Αποτελέσματα συγκέντρωσης ολικών πολυφαινολών στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteau.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	Ολικές φαινόλες ελαιολάδου στο δείγμα Α=>mg/100g Καφεϊκού οξέος	Ολικές φαινόλες ελαιολάδου στο δείγμα Β=>mg/100g Καφεϊκού οξέος
ΕΥΖΗΝ	28.5	32.4
ΑΣΗΜΙ ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗ	33.6	32.6

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.3γ: Αποτελέσματα συγκέντρωσης ολικών πολυφαινόλων στην άλμη με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	Ολικές φαινόλες άλμης στο μεθανολικό εκχύλισμα=>mg/100ml άλμης	Ολικές φαινόλες άλμης στο εκχύλισμα με εξάνιο=>mg/100ml Άλμης
Καλαμών	8.6	0.4
Άμφισας	8.7	0.7
Κρητικές	5.6	0.03
Τσακιστές	8.8	0.5

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SOXHLET
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ EXCEL

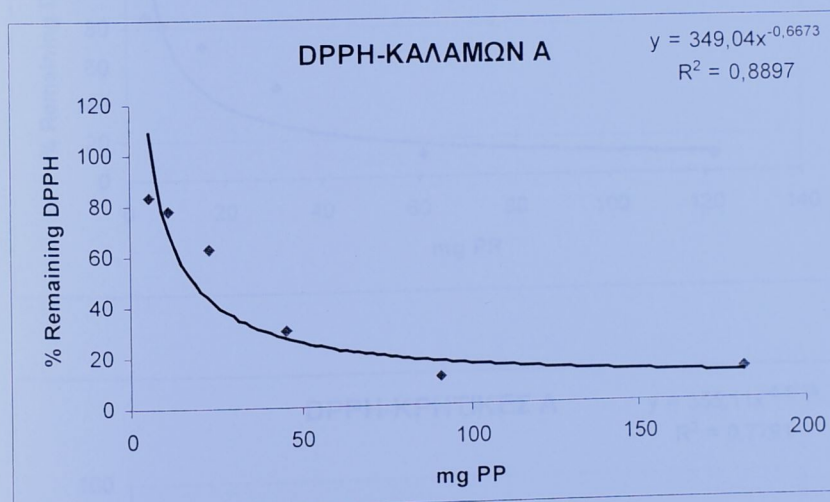
ΠΙΝΑΚΑΣ Γ7.4: Αποτελέσματα εκχύλισης Soxhlet

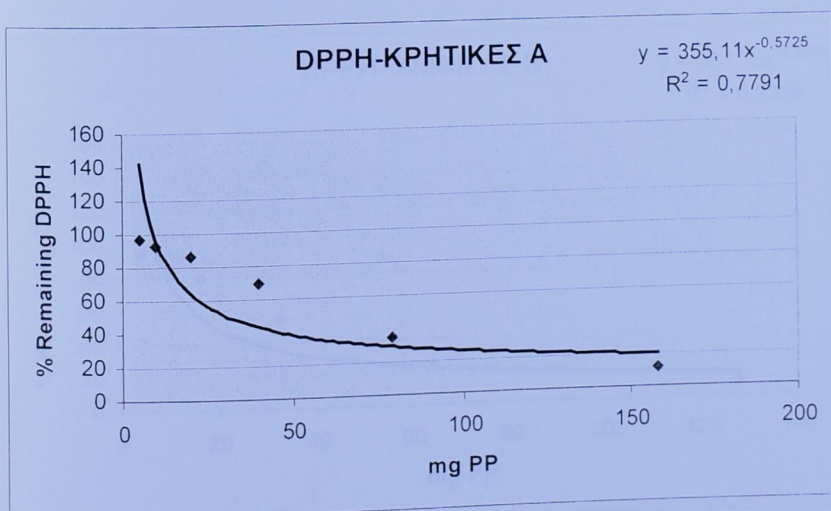
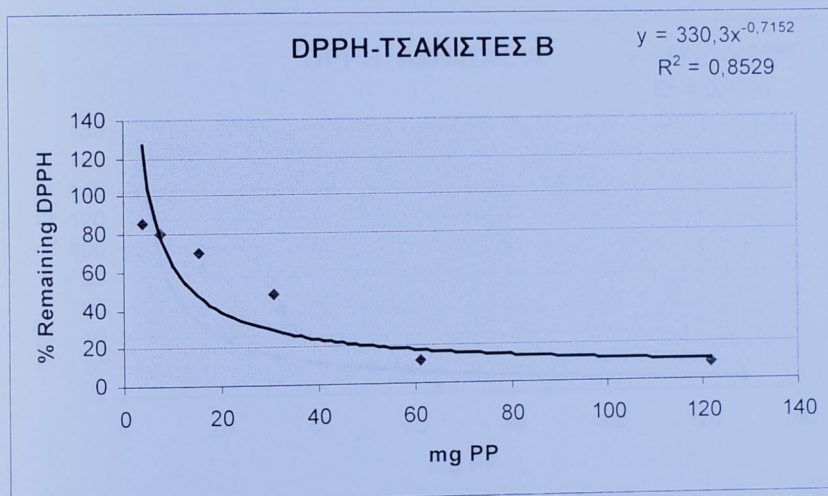
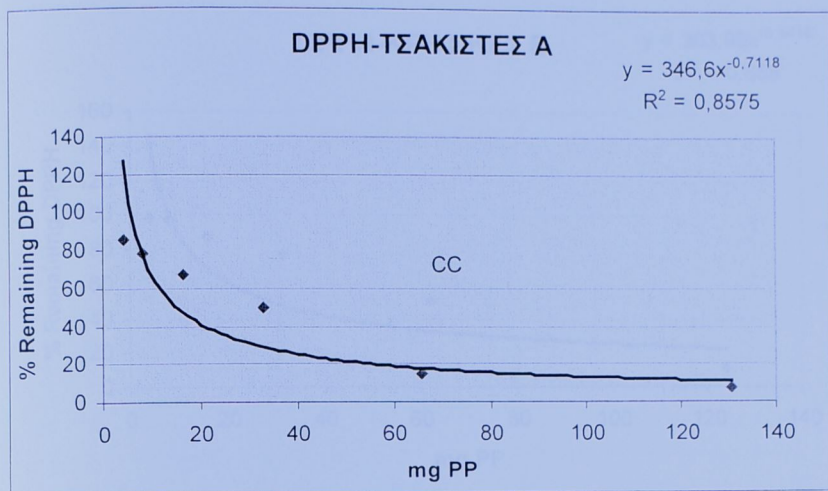
ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	% ΛΙΠΟΣ ΣΑΡΚΑΣ ξηρού βάρους	% ΛΙΠΟΣ ΚΟΥΚΟΥΤΣΙΟΥ ξηρού βάρους
Καλαμών	74.6	17.9
Άμφισας	67.3	15.5
Τσακιστές	66.2	26.7
Κρητικές	90.2	22.0
Ψυλάκη	79.0	20.9

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ (σάρκα)	AC ₅₀ : mg ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ
Καλαμών	28,2
Άμφισας	32.1
Τσακιστές	26.6
Κρητικές	51.9
Ψυλάκη	565.7

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ DPPH ΣΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ EXCEL.

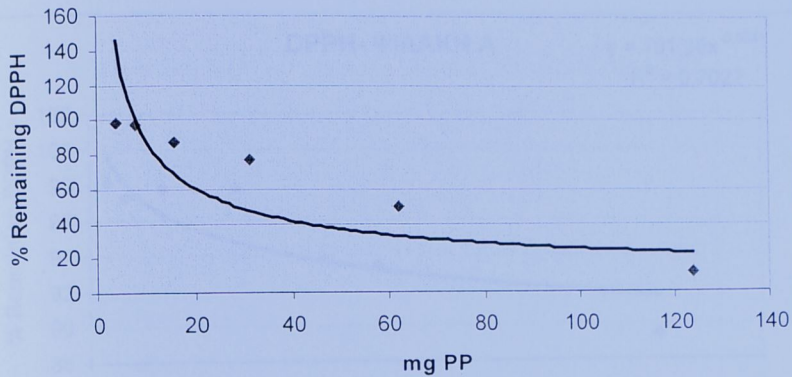




DPPH-ΚΡΗΤΙΚΕΣ Β

$$y = 303,99x^{-0,5416}$$

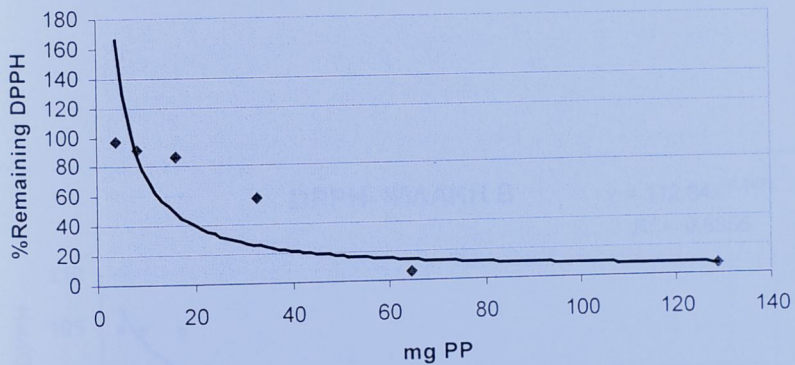
$$R^2 = 0,688$$



DPPH- ΑΜΦΙΣΑΣ Α

$$y = 571,37x^{-0,8897}$$

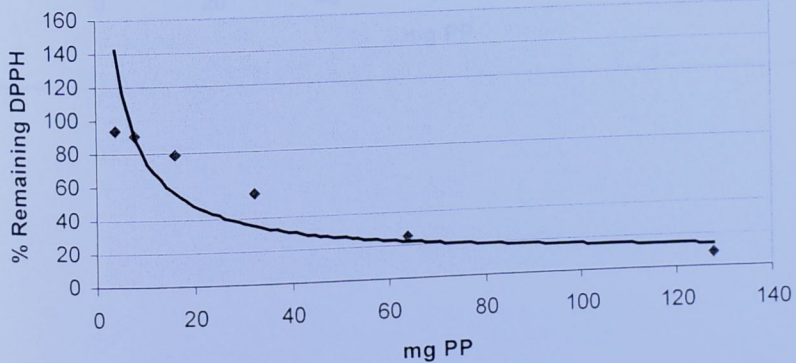
$$R^2 = 0,7796$$

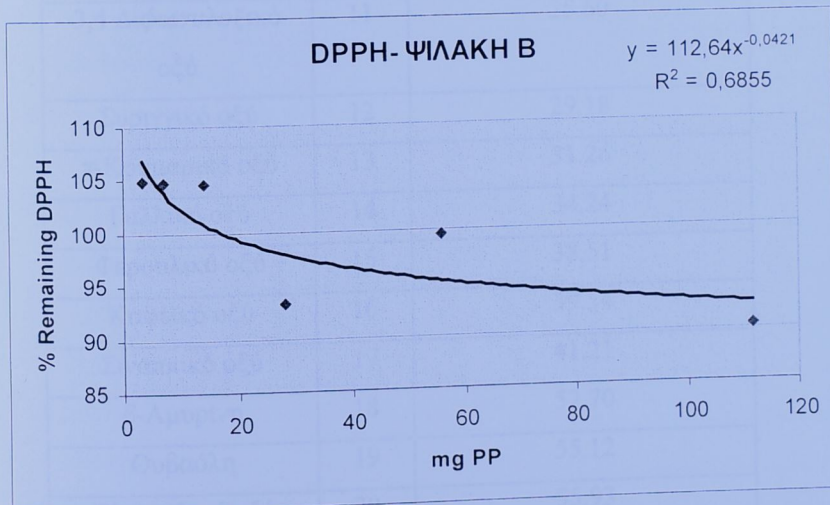
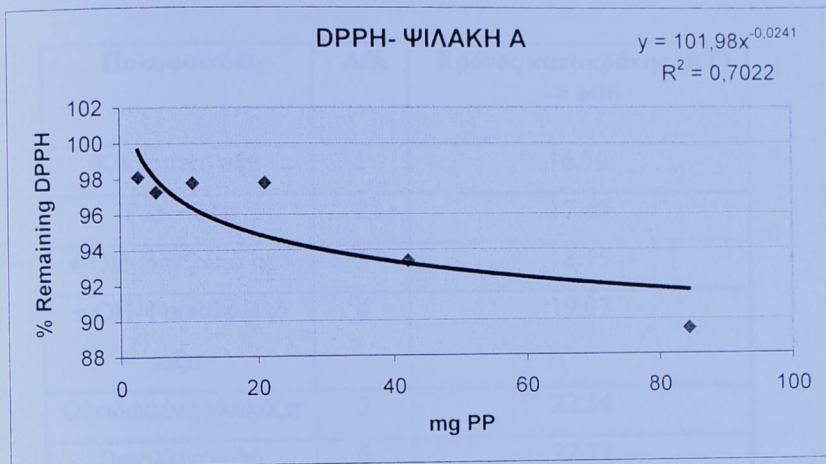


DPPH- ΑΜΦΙΣΑΣ Β

$$y = 357,73x^{-0,6689}$$

$$R^2 = 0,8359$$





ΠΙΝΑΚΑΣ 7.6α: Αποτελέσματα του χρόνου κατακράτησης κάθε πολυφαινόλης, με την Αέρια Χρωματογραφία GC-MS

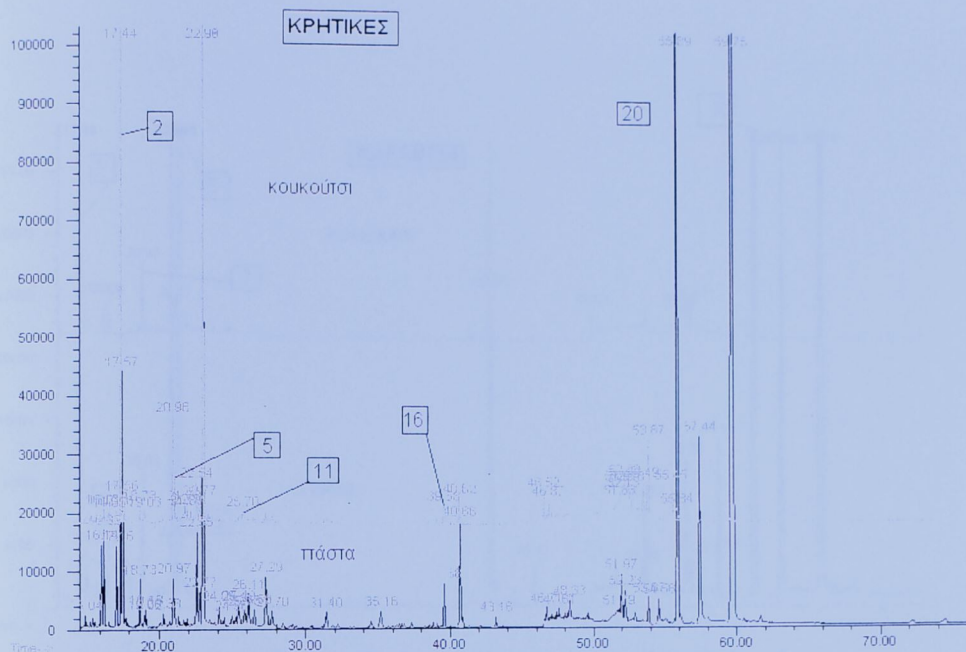
Πολυφαινόλη	A/A	Χρόνος κατακράτησης (RT) -> min
Κινναμικό οξύ	1	16.70
Τυροσόλη	2	17.40
π-OH-Βενζοϊκό οξύ	3	18.75
π-OH-Φαινυλοξικό οξύ	4	19.07
Οξειδωμένη γλυκόζη	5	22.54
Βανιλλικό οξύ	6	22.77
Ομοβανιλλικό οξύ	7	23.02
OH-τυροσόλη	8	22.88
ο-Κουμαρικό οξύ	9	24.34
Πρωτοκατεχικό οξύ	10	25.10
3,4 Διφαινυλοξικό οξύ	11	25.60
Συριγγικό οξύ	12	29.18
π-Κουμαρικό οξύ	13	31.26
Γαλλικό οξύ	14	34.24
Φερουλικό οξύ	15	38.51
Καφεϊκό οξύ	16	39.54
Σιναππικό οξύ	17	41.21
β-Αμυρίνη	18	52.70
Ουβαόλη	19	55.12
Ολεανολικό οξύ	20	55.93
Ορσολικό οξύ	21	56.72

Πίνακας 7.6β: Αποτελέσματα Ποιοτικής ανάλυσης με GC-MS στα δείγματα σάρκας.

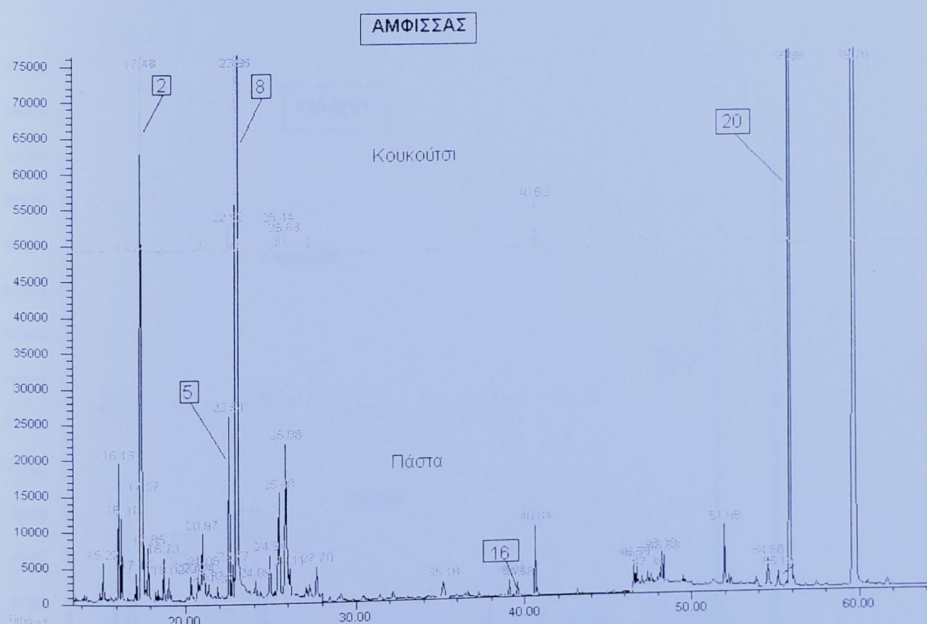
Ποικιλία Είδος Πολυφα- Νολών	Άμφισας	Καλαμών	Τσακιστές	Κρητικές	Ψιλάκη
Τυροσόλη	+	+	+	+	+
Υδροξυτυροσόλη	+	+	+	+	+
Βανιλλικό οξύ	+	+	+	+	+
Οξειδ. Τυροσόλη	+	+	+	+	
Ολεανολικό οξύ	+	+	+	+	+
Υδρική ρουτίνη	+			+	
Καφεϊκό οξύ	+	+	+	+	+(traces)
π-Τδροξυ- βενζοϊκό οξύ	+	+	+	+	+
3,4-Τδροξυ- φαινυλοξικό	+		+	+	
Φερουλικό οξύ	+(traces)		+	+	+(traces)
Κινναμικό οξύ		+		+	
Συριγγικό οξύ		+	+(traces)		
Γαλλικό οξύ		+(traces)	+(traces)	+	
Επικατεχίνη		+(traces)			
Συναπτικό οξύ				+	
Ουβαόλη	+		+	+	+(traces)
Ουρσολικό οξύ	+	+(traces)	+(traces)	+	+(traces)
ο-Κουμαρικό				+	
π-Κουμαρικό οξύ				+	
π-OH- Φαινυλοξικό	+	+	+	+	+

Πίνακας 7.6γ: Αποτελέσματα Ποιοτικής ανάλυσης με GC-MS στα δείγματα
κουκουτσιού.

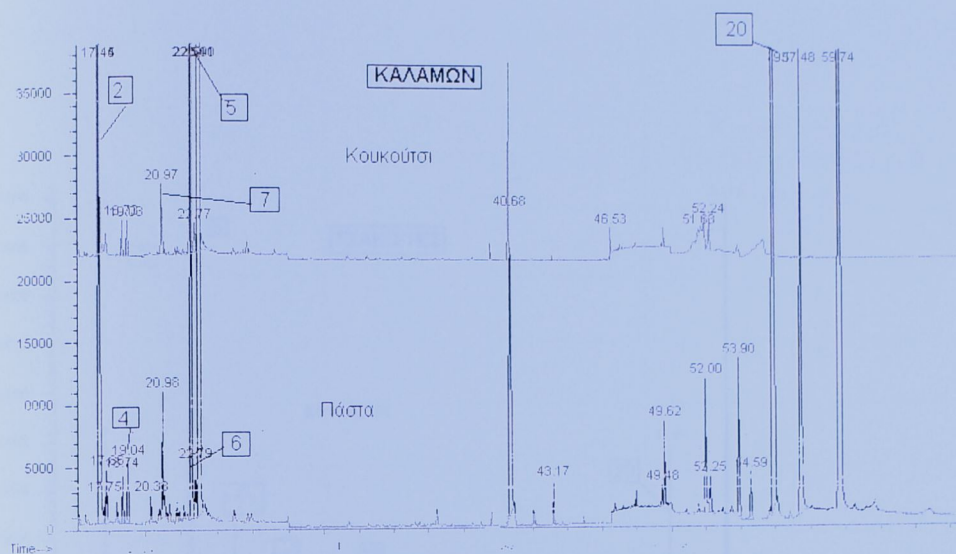
Ποικιλία Είδος Πολυ- φαινολών	Άμφισας	Καλαμών	Τσακιστές	Κρητικές	Ψιλάκη
Τυροσόλη	+	+	+	+	+
Υδρόξυ- τυροσόλη	+	+	+	+	
Βανιλλικό οξύ	+	+	+	+	+
Οξειδ. Τυροσόλη	+		+	+	
Ολεανολικό οξύ	+(traces)		+(traces)	+(traces)	
Καφεϊκό οξύ	+	+	+	+	+
π-Υδροξύ- βενζοϊκό οξύ		+	+	+	+
3,4-Υδροξύ- φαινυλακετικό οξύ					+
Φερουλικό οξύ	+	+	+	+	+
Γαλλικό οξύ		+	+	+(traces)	
π-Υδροξύ- φαινυλοξικό		+	+	+	
Ουβαόλη		+	+		
Ολεανολικό οξύ		+			
Συναπικό οξύ				+	
ο-Κουμαρικό οξύ	+		+	+	+



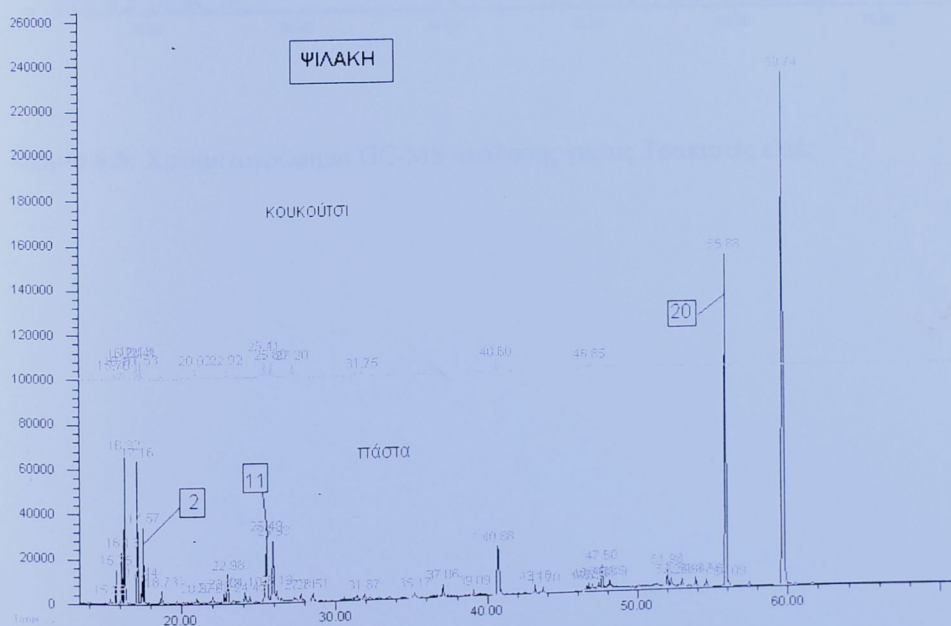
Σχήμα 6.1: Χρωματογράφημα GC-MS ανάλυσης στις Κρητικές ελιές



Σχήμα 6.2: Χρωματογράφημα GC-MS ανάλυσης στις ελιές Άμφισσας



Σχήμα 6.3: Χρωματογράφημα GC-MS ανάλυσης για τις ελιές Καλαμών

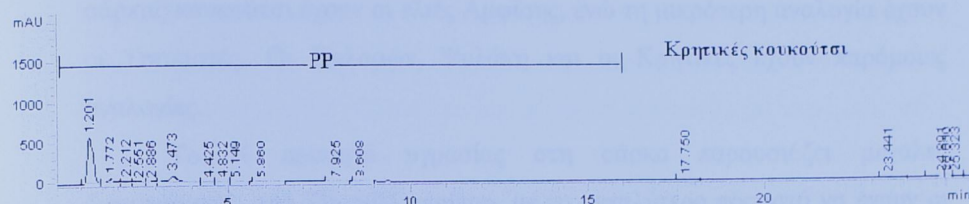
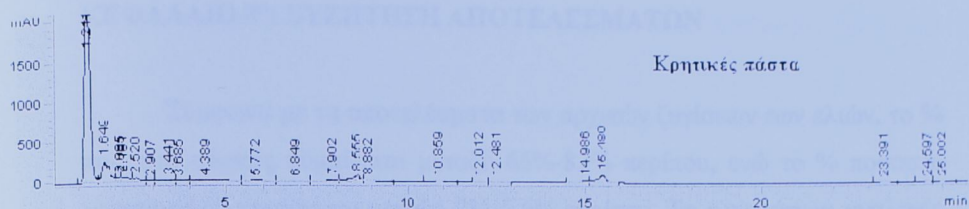


Σχήμα 6.4: Χρωματογράφημα GC-MS ανάλυσης για τις ελιές Ψιλάκη

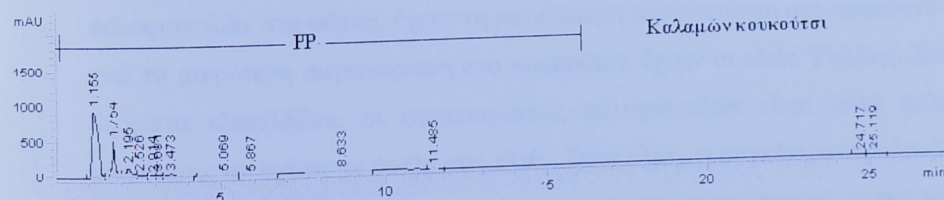
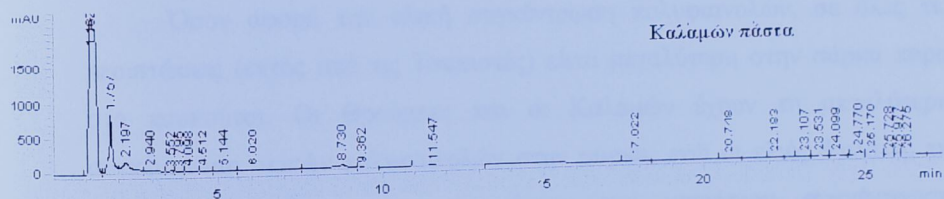
Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα Υγρής Χρωματογραφίας HPLC σε πάστα και κουκούτσι.

Ποικιλία ελιάς	Πάστα ελιάς (10 ³ Au*s/100g ξηρού βάρους)	Κουκούτσι ελιάς (10 ³ Au*s/100g ξηρού βάρους)
Καλαμών	1563	560
Άμφισας	1560	378
Τσακιστές	1375	567
Κρητικές	1262	368
Ψιλάκη	659	208

Au*s = μονάδες απορρόφησης στα 280nm * χρόνο (εμβαδον κορυφής). Αναφέρεται στο σύνολο των κορυφών που ελήφθησαν.



Σχήμα 7.1: Χρωματογράφημα από HPLC ανάλυση



Σχήμα 7.2: Χρωματογράφημα από HPLC ανάλυση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8º: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αρχικών ζυγίσεων των ελιών, το % ποσοστό σάρκας κυμαίνεται μεταξύ 66%-82% περίπου, ενώ το % ποσοστό κουκουτσιού κυμαίνεται μεταξύ 2%-5,6% περίπου. Τη μεγαλύτερη αναλογία σάρκας/κουκούτσι έχουν οι ελιές Αμφίσης, ενώ τη μικρότερη αναλογία έχουν οι Τσακιστές. Οι Καλαμών, Ψυλάκη και οι Κρητικές έχουν παρόμοιες αναλογίες.

Το % ποσοστό υγρασίας στη σάρκα παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, από 7%-56% περίπου, με το μεγαλύτερο ποσοστό να έχουν οι Κρητικές και οι Τσακιστές, ενώ το μικρότερο έχουν οι Καλαμών. Το % ποσοστό υγρασίας στα κουκούτσια κυμαίνεται από 2%-19% περίπου και ενώ οι ελιές Αμφίσης και Καλαμών, έχουν πιο πολλή υγρασία στο κουκούτσι παρά στη σάρκα, αυτό δεν ισχύει στα υπόλοιπα είδη ελιών. Το ποσοστό υγρασίας στις Τσακιστές και στις Κρητικές είναι αρκετά μεγάλο και αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι από διαδικαστικό λάθος οι ελιές ζυγίστηκαν μετά την κατάψυξή τους, ενώ λογικά έπρεπε να ζυγιστούν πριν την τοποθέτησή τους σε αυτήν.

Όσον αφορά την ολική συγκέντρωση πολυφαινολών, σε όλες τις περιπτώσεις (εκτός από τις Τσακιστές) είναι μεγαλύτερη στην σάρκα παρά στο κουκούτσι. Οι Θρούμπες και οι Καλαμών έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών στην σάρκα, ενώ οι ελιές Ψυλάκη, τη μικρότερη. Οι Τσακιστές, που έχουν την μικρότερη συγκέντρωση πολυφαινολών στη σάρκα, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κουκούτσι, ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση στο κουκούτσι, έχουν οι ελιές Ψυλάκη. Στα δείγματα ελαιολάδου, οι συγκεντρώσεις πολυφαινολών είναι κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με αυτές στις ελιές. Στην άλμη, η συγκέντρωση ολικών φαινολών ήταν πολύ μικρή, συγκρινόμενη με τις συγκεντρώσεις σε σάρκα και κουκούτσι των αντίστοιχων ελιών. Οι τιμές ολικών φαινολών στην άλμη είναι παρόμοιες σε όλα τα είδη, εκτός από τις Κρητικές, που έχουν τη μικρότερη συγκέντρωση.

Το ολικό ποσοστό λίπους στη σάρκα, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις, μεγαλύτερο από αυτό στα αντίστοιχα κουκούτσια. Το πιο μεγάλο ποσοστό λίπους στη σάρκα έχουν οι Κρητικές, ενώ το λιγότερο, έχουν οι Τσακιστές και

οι ελιές Αμφίσης. Οι Τσακιστές έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους στο κουκούτσι.

Όσον αφορά τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους δράσης (IC₅₀) με τη μέθοδο DPPH, όσο μικρότερη είναι η ποσότητα των πολυφαινολών που απαιτείται για την εξουδετέρωση της μισής ποσότητας της ελεύθερης ρίζας του DPPH, τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική δράση της συγκεκριμένης ελιάς, αφού αυτό σημαίνει πως με λιγότερη ποσότητα πολυφαινολών, εξουδετερώνεται η ίδια ποσότητα των ριζών. Αυτό οφείλεται ίσως και στην ποιότητα των πολυφαινολών που έχει το κάθε είδος ελιάς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου, η ολική αντιοξειδωτική τους δράση έχει ως εξής: Καλαμών> Τσακιστές> Άμφισας> Κρητικές> Ψυλάκη. Οι ελιές Ψυλάκη παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά στην αντιοξειδωτική τους δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη ελιών.

Από αυτά που έχουν συζητηθεί μέχρι τώρα συμπεραίνουμε πως οι ελιές Καλαμών, που έχουν μεγάλο ποσοστό σάρκας, μικρό ποσοστό υγρασίας και μέτριο ποσοστό λίπους στη σάρκα, πάντοτε σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη ελιών, έχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολών αλλά και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ οι Τσακιστές, οι οποίες έχουν μικρότερο ποσοστό σάρκας, μεγάλο ποσοστό υγρασίας και μικρότερο ποσοστό λίπους στη σάρκα, έχουν μικρότερη συγκέντρωση ολικών φαινολών και μικρότερη αντιοξειδωτική δράση, συγκριτικά με τις Καλαμών.

Το ελαιόλαδο έχει πολύ πιο μικρή συγκέντρωση ολικών φαινολών από τις ελιές, κάτι το οποίο είναι απόλυτα φυσιολογικό, λόγω των απωλειών των πολυφαινολών κατά την επεξεργασία τους σε λάδι. Στην άλμη των ελιών, έχει βρεθεί πολύ μικρή ποσότητα πολυφαινολών.

Όσον αφορά την αέρια χρωματογραφία GC-MS, στην οποία έγινε μόνο ποιοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών, βρέθηκε πως σε όλα τα είδη σάρκας, υπάρχει μίγμα φαινολών, φαινολικών οξέων, μεταβολιτών τους και τερπενίων. Συγκεκριμένα την πλουσιότερη ποιοτική σύσταση έχουν οι Κρητικές, ακολουθούν οι Τσακιστές με τις Καλαμών, πιο μικρή έχουν οι ελιές Αμφίσης και τη μικρότερη οι ελιές Ψυλάκη. Στις τελευταίες, φαίνεται να υπάρχει ανάλογη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών της, της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης και της ποιοτικής σύνθεσης σε φαινολικά συστατικά. Σχετικά με την ανάλυση στα κουκούτσια, έχουν βρεθεί λιγότερα

είδη φαινολικών συστατικών, ενώ βρέθηκαν κυρίως φαινολικά οξέα. Τη μεγαλύτερη σύσταση φαινολικών στα κουκούτσια έχουν οι Τσακιστές, κάτι το οποίο σχετίζεται ανάλογα με την ολική συγκέντρωση των πολυφαινολών (η μεγαλύτερη) και την ολική συγκέντρωση λίπους σε αυτά (η μεγαλύτερη). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως σε όλα τα είδη σάρκας και κουκουτσιού, έχουν ταυτοποιηθεί οι φαινόλες, τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη (εκτός από το κουκούτσι στις ελιές Ψυλάκη) και τα φαινολικά οξέα, καφεϊκό οξύ και βανιλλικό οξύ, χωρίς να γνωρίζουμε βέβαια τις ποσότητες που βρίσκονται σε αυτά.

Τέλος, στην υγρή χρωματογραφία HPLC, έγινε μόνο ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών και βρέθηκε πως τη μεγαλύτερη ποσότητα στη σάρκα (περισσότερες καμπύλες κορυφής στο χρωματογράφημα) έχουν οι Καλαμών ενώ τη μικρότερη οι ελιές Ψυλάκη, κάτι το οποίο συμφωνεί με την ολική συγκέντρωση φαινολικών, με βάση την μέθοδο Folin-Ciocalteau και την ολική αντιοξειδωτική τους δράση, με βάση τη μέθοδο DPPH. Όσον αφορά τα κουκούτσια, στις ελιές Καλαμών και Τσακιστές, έχει βρεθεί η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών, ενώ στις Ψυλάκη, η μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της ποσοτικοποίησης, βρέθηκε πως η συγκέντρωση ολικών φαινολών στη σάρκα Ψυλάκη, είναι παρόμοια με αυτήν που έχει βρεθεί στα κουκούτσια των ελιών Καλαμών και Άμφισας. Σαφώς, αντιλαμβανόμαστε και πάλι τη μικρή φαινολική σύσταση των ελιών αυτών. Γενικά έχει βρεθεί πως η σάρκα των ελιών είναι πλουσιότερη σε φαινολικά συστατικά από τα κουκούτσια.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ HPLC:

Μια έρευνα που έγινε στις ελιές Ιταλίας στις Ελληνικές ελιές και στα αντίστοιχα λάδια των ελιών αυτών, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση πολυφαινολών (mg/Kg) στο κάθε είδος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, βρέθηκε πως τη μεγαλύτερη σύσταση πολυφαινολών έχουν οι ελιές Ιταλίας, ενώ και τα δύο είδη ελιών έχουν μεγαλύτερη φαινολική σύσταση από τα αντίστοιχα ελαιόλαδά τους.

Στο σύνολο βρέθηκαν φαινόλες, φαινολικά οξέα, φαινολικά παράγωγα, σεκοϊροειδή (ελενολικό, ολευρωπαΐνη), φλαβονοειδή (φλαβόνες,

φλαβανόνες και φλαβονόλες) και ανθοκυανίνες. Η συγκέντρωση ολικών φαινολών στο ελαιόλαδο Ιταλίας βρέθηκε 61-377mg/Kg, στο Ελληνικό ελαιόλαδο 38-180mg/Kg και στις Ελληνικές ελιές 178-1718mg/Kg, εκφρασμένες σε καφεϊκό οξύ. Σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν, βρέθηκαν οι φαινόλες τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, με τη μεγαλύτερη ποσότητα στις ελιές Ιταλίας, όσον αφορά τα είδη ελιάς και στο ελαιόλαδο Ιταλίας, όσον αφορά τα είδη ελαιολάδου. Στο Ελληνικό ελαιόλαδο, οι δύο αυτές φαινόλες, ήταν τα μοναδικά φαινολικά που είχαν βρεθεί. Στις Ελληνικές ελιές, εκτός από τις φαινολικές αλκοόλες, βρέθηκαν και σεκοροειδή (περισσότερα απ' ότι στις ελιές Ιταλίας) και μία φλαβόνη, η λουτεολίνη. Στο ελαιόλαδο Ιταλίας, εκτός από τις 2 φαινολικές αλκοόλες που προαναφέρθηκαν, βρέθηκαν επίσης και φαινολικά οξέα, φαινολικά παράγωγα, κινναμωμικά οξέα, σεκοϊροειδή και φλαβόνες, ενώ στις ελιές τους, οι οποίες είχαν και την πλουσιότερη φαινολική σύσταση, βρέθηκαν φαινολικές αλκοόλες, φαινολικά οξέα και παράγωγά τους, κινναμωμικά οξέα, πολλά σεκοροειδή, φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως στις ελιές Ιταλίας βρέθηκαν μόνο 2 είδη φαινολικών αλκοολών, ενώ στις Ελληνικές ελιές βρέθηκαν 6 είδη, αλλά όσον αφορά τα σεκοϊροειδή, τη μεγαλύτερη ποικιλία είχαν οι Ιταλικές παρά οι Ελληνικές ελιές. Αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα σύγκρισης μεταξύ των ελιών Ελλάδας και Ιταλίας, εξαρτώνται από την επιλογή διαφορετικών ποικιλιών ή ειδών επιτραπέζιας ελιάς.

Σύμφωνα με άλλες έρευνες, στις οποίες έγινε ποιοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών σε δευτερεύοντα μέρη της ελιάς: στα φύλλα, στο κουκούτσι, στο φλοιό και στο πυρηνόλυμα. Γενικά, βρέθηκε ποικιλία φαινολικών συστατικών όπως, φαινολικές αλκοόλες, φαινολικά οξέα, κινναμωμικά οξέα, φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες. Την πλουσιότερη ποιοτική σύνθεση είχαν τα φύλλα ελιάς, τα οποία είχαν όλα τα είδη φαινολικών που προαναφέρθηκαν. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι δεν είχαν καθόλου τυροσόλη. Το πυρηνόλυμα, είχε τη μικρότερη φαινολική σύσταση (καθόλου τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, αλλά είχε ολεωρωσίδη, λουτεολίνη και ένα φλαβονοειδές, τη ρουτίνη). Ο φλοιός είχε παρόμοια φαινολική σύσταση με το κουκούτσι, δεν είχε καθόλου φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες αλλά είχε φαινολικά οξέα (μόνο ο φλοιός), υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη (μόνο στα κουκούτσια). Επίσης, τα φαινολικά υδροξυτυροσόλη, ολεωρωπαΐνη

και διμεθυλο-ολευρωπαΐνη βρέθηκαν στα φύλλα, στο κουκούτσι και στο φλοιό αλλά καθόλου στο πυρηνόλυμα.

8.1 ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας, οι ελιές αποτελούν πλούσια πηγή πολυφαινόλων. Η ποιοτική σύνθεση των πολυφαινόλων σε κάθε είδος ελιάς διαφέρει και σε αυτό οφείλεται ίσως, η διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση. Βεβαίως, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την πολυφαινολική τους σύσταση, όπως συνθήκες ανάπτυξης, κλιματολογικές συνθήκες, χρόνος συγκομιδής, μέθοδος αποθήκευσης και πολλοί άλλοι παράγοντες. Πιστεύω, πως με βάση τα ευρήματα αυτής της έρευνας, θα μπορούσαν να γίνουν και άλλες επιπλέον έρευνες, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης της ελιάς και του ελαιολάδου, λαμβάνοντας υπόψη και τους παράγοντες που έχω προαναφέρει. Σίγουρα, τέτοιου είδους έρευνες είναι πιο χρονοβόρες, πιο πολύπλοκες και υψηλότερου κόστους.

Ανάλογες έρευνες έγιναν από διάφορους επιστήμονες και κατά τη δική μου προσωπική άποψη, αξίζει να συνεχιστεί η διεξαγωγή τέτοιων ερευνών, αν ληφθούν υπόψη τα οφέλη της Μεσογειακής δίαιτας, η οποία συνιστά την πρόσληψη λίπους κυρίως από τις ελιές και το ελαιόλαδο. Η υγεία του καθενός αποτελεί πλέον προσωπική υπόθεση και ευθύνη. Η διατροφή επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την υγεία, συμβάλλοντας όχι μόνο στην πρόληψη, αλλά και στη θεραπευτική αντιμετώπιση ακόμη και των χρόνιων νοσημάτων. Έτσι, συνίσταται στον πληθυσμό, η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες και κατόπιν στους επιστήμονες, η διεξαγωγή περισσότερων ερευνών για τις πολυφαινόλες και την αντιοξειδωτική τους δράση, έτσι ώστε, να δοθούν ακόμη πιο αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την ακριβή δράση και επίδραση των αντιοξειδωτικών, αυτών ουσιών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Andrikopoulos N, Antonopoulou S, Kaliora A. Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor
- 2) Bastoni L, Bianco A, Piccioni F, Uccella N (2001). Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. Food Chem. 50: 145-151
- 3) Beecher G, Warden B.A. and Merken H. The chemistry of tea Polyphenols (1999). P.S. E.B.M., 220: 267-270
- 4) Blekas G, Vassilakis c, Harizanis C, Tsimidou M, Boskou D. Biophenols in table olives.(2002). J. Agric. Food Chem., 50: 3688-3692
- 5) Blekas G, Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D. On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. (2002). Eur.J. Lipid Sci. Technol. 104: 340-346
- 6) Boskou D, Visioli F. Biophenols in olive oil oil olives (2003). Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds, metabolic and technological aspects:ISBN81-7736-165-1
- 7) Boskou D, And Visioli. Biophenols in table olives. (2003). Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds, metabolic and technological aspects:ISBN81-7736-165-1
- 8) Blanco V.Z, Auw J.M, Sims C.A, and O' Keefe S.F. Effect of processing on phenolics of wines. (1998). Food science and human nutrition department: 32611-0370
- 9) Brune G., The health benefits of wine. (2000). Annu. Rev. Nutr, 20:561-93
- 10) Casas Miro Elisabet, Albadalejo Magi Farre, Covas M.I, Colomer M.F, Raventos R.L. Tyrosol Bioavailability in Humans after Ingestion of virgin olive oil. (2001). Clinical Chemistry. 47:341-343
- 11) Chow C.K. Antioxidant nutrients and environmental health (2002). Toxicology 180: 1-3
- 12) Cinquanta L, Esti M, La Notte E. Evolution of Phenolic Compounds in virgin olive oil during storage. (1997). Agric. Food Environmental and Microbiological Science, 74/10

- 13) Giovannini G, Straface E, Modesti D, Conti E, Cantafora A, Vincenzi M, Malorni W, Masella R. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells. (1999) *Journal of Nutrition*, 129: 1269:1277
- 14) Gomez-Alonzo S, Giuseppe F, Salvador M, Gordon H. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying (2003). *J. Agric. Food Chem.* 51:667-672
- 15) Gomez-Alonso S, Desampados S, Fregapane G. Phenolic compounds profile of Cornicarpa virgin olive oil (2002). *J. Agric. Food Chem.* 50:6812-6817
- 16) Gordon M, Palva-Martins F, Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other virgin olive polyphenols (2001). *J. Agric. Food Chem.* 49:2480-2485
- 17) <http://www.bbc.co.uk/health/features/antioxidants.shtml>
- 18) http://www.europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact1.htm (EU, 2002 α)
- 19) http://www.europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact2.htm (EU, 2002 β)
- 20) http://www.europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact3.htm (EU, 2002 γ)
- 21) http://www.europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact4.htm (EU, 2002 δ)
- 22) http://www.europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact5.htm (EU, 2002 ε)
- 23) http://www.europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact7.htm (EU, 2002 ζ)
- 24) Karantonis H, Antonopoulou S, Demopoulos A. Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others (2002). *J. Agric. Food Chem.* 50:1150-1160
- 25) Lee M.J, Pradhu S, Meng X, Li C, Yang C.S. An improved Method for the Determination of Green and Black Tea Polyphenols in Biomatrices by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Array Detection.
- 26) Mincione B, Poianna M, Guiffre AM, Modafferri V, Guiffre F (1996) Ricerche sugli oli di oliva monovarietari. Nota II. Caratterizzazione dell'olio di Peranzana. *Riv. Ital. Sost. Gras.* 43: 245-257

- 27) Monti S, Ritieni A, Sacchi R, Skog R, Borgen E, Fogliano V. characterisation of Phenolic Compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of Carcinogenic/Mutagenic heterocyclic amines in a model system (2001). J. Agric. Food Chem., 49:3969-3975
- 28) Owen R.W, Mier W, Giacosa A, Hull W. E, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olives oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, sesecoiridoids, lignans and squalene (2000). Food and Chemical Toxicology, 38: 647-659
- 29) Owen R.W, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull W.E, Spiegelhadler B, Bartsch H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes (2003). Food and Chemical Toxicology, 41: 703-717
- 30) Patumi M, Andria R, Marsilo V, Fontanazza G, Morelli G, Lanza B. Olive and oil quality after intensive monocone olive growing (*olea europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes (2002). Food Chemistry, 77: 27-34
- 31) Pirisi F, Carbas P, Cao F.C, Mglorini M, Muggelli M. Phenolic Compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC Separation, and Quantification procedures (2000). J. AGRIC. Food Chem, 48: 1191-1196
- 32) Poianna M, Guiffre F, Modafferi V, Guiffre AM, Galogero S, Mincione B (1996) Ricerche sugli oli di oliva monovariety. Nota III. Contributo alla caratterizzazione dell' olio estratto dalle olive della cv Carolea, coltivata in due diversi areali della Calabria. Riv. Ital. Sost. Gras. 43: 499-509
- 33) Psomiadou E, Tsimidou M. Stability of virgin olive oil. 2.Photo oxidation studies (2002). J. Agric. Food Chem, 50 (4): 722-727
- 34) Quiles J, Huertas J, Battino M, Mataix Quiles J, Ramirez-Tortosa M.G. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity (2002). Toxicology 180: 79-95
- 35) Romero C, Brenes M, Garcia P, and Garrido A. Hydroxytyrosol 4- β -D-Glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and Derived Products (2002). J. Agric. Food Chem, 50: 3835-3839
- 36) Ryan D, Robards K, Lavee S. Determination of phenolic compounds in olive oils by reserved-phase chromatography and mass spectrometry (1998). Journal of Chromatography A, 832: 87-96
- 37) Ryan D, Lawrence H, Prenzler P, Antolovich M, Robards K. Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea* (2001) Analytical Chimica Acta 445: 67-77

- 38) Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Lavee S (2002) Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea*. *L. Scientia Horticulturae* 92:147-176
- 39) Sabat R, Kolleck I, Witt W, Volk H, Sinha P, Rustow B. Immunological Dysregulation of lung cells in response to vitamin E deficiency (2001). *PII SO891-584899(01)00523-8*
- 40) Scalbert A, Morand C, Manach C, Remecy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health (2002). *Biomed Pharmacother*, 56: 276-282
- 41) Simopoulos A. The Mediterranean Diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific Evidence (2001). *Journal of nutrition*, 131: 3065-3073
- 42) Takata J, Matsunaga K, Karube Y. Delivery systems for antioxidant nutrients (2002). *Toxicology* 180:183-193
- 43) Tuck K, Hayball P. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects (2002). *Journal of Nutrition Biochemistry* 13: 636-644
- 44) Visioli F. and Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings (1998). *Nutr. Reviews*, 56:142-7
- 45) Weisburger J. Approaches for chronic disease prevention based on current understanding of underlying mechanisms (2000). *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71, No. 6, 1710S-1714s
- 46) Weisburger J. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases (2001). *Experimental Biology and Medicine* 226: 891-897
- 47) Yla-Herttuala S. Macrophages and oxidised low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis (1991). *Ann-Med*, 23(5): 561-567
- 48) Ανδρικόπουλος Ν. (1998). Οργανική Χημεία και Δομική Βιοχημεία, 1: 136-144
- 49) Ανδρικόπουλος Ν. (1998). Γενική Χημεία-Εργαστηριακές Εξετάσεις, 2: 95
- 50) Ανδρικόπουλος Ν. (1999). Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων, 2: 161-172, 181-193
- 51) Βασιλοπούλου Β. Διατροφή Θηλαστικών και πτηνών (1997). Αθήνα. Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. σελ.42-43
- 51) Βεκιάρη Σ, Παρούτη Κ, Τριανταφύλλου-Μπλέκα Κ, Μπόσκου Δ. (1988). Πολυφαινόλες στα ελληνικά ελαιόλαδα.
- 51) Βεκιάρη Σ.Α. Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και η σημασία τους στην ποιότητά του (2001). Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων.

- 52) Γαλάνης Δημήτριος και Δούλιας Πασχάλης-θωμάς. Βιολογικά Αντιοξειδωτικά.(2001). Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή.
- 53) Ότου Ο. Μεταβολές των αντιοξειδωτικών ουσιών του ελαιολάδου κατά τη διατήρησή του. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Χημείας Τριφίμων.
- 54) Πατσαρίκα Π. (2002). Πολυφαινόλες του τσαγιού. Πτυχιακή μελέτη. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, σελ.11-14 και 21-24
- 55) Τριχόπουλος Δ, Καλαποθάκη Β, Πετρίδου Ε. Προληπτική Ιατρική και Δημόσια Υγεία (2000). Αθήνα. Ιατρικές Εκδόσεις “ΖΗΤΑ”. σελ. 406-409
- 56) Χίου Α. Μέταλλα, Βιταμίνες και διατροφή (2001).

ΑΝΤΙΠΟΘΕΙΔΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ . ΠΤΥ ΧΡΥ
ΕΛΙΑΣ Κ ΣΑΜΟΛΑΔΟΥ

ΧΡΥΣΟΣΤΟΜΟΥ ΣΤ. Η.

11314

9943

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



★ 1 1 3 1 4 ★