



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**«ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ
ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2012

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**«ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ
ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Εισηγητής:

Βαρζάκας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής ΑΤΕΙ Καλαμάτας

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου μελέτης συνέβαλαν κάποιοι άνθρωποι, που χωρίς την πολύτιμη βοήθεια τους δεν θα μπορούσα να την ολοκληρώσω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας κ. Θεόδωρο Βαρζάκα, επίκουρο καθηγητή της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του τμήματος Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του ΑΤΕΙ Καλαμάτας, τόσο για τις πολύτιμες κατευθυντήριες οδηγίες, τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, όσο και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της παρούσας εργασίας. Η αδιάκοπη καθοδήγηση και στήριξη που ανιδιοτελώς μου προσέφερε, αποτέλεσε βασικό θεμέλιο για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Οφείλω ακόμα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές μου για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν με τη διδασκαλία τους όλα αυτά τα χρόνια, τους φίλους και συμφοιτητές μου για την κατανόηση, στήριξη και συμπαράσταση τους όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, την οικογένεια μου για την υποστήριξη, την ηθική και οικονομική συμπαράσταση, όχι μόνο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για την αγάπη που πάντα μου προσφέρουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευρετήριο εικόνων και πινάκων.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	9
ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.....	9
1.1 Γενικά στοιχεία για την ελιά.....	9
1.2 Το ιδανικό κλίμα καρποφορίας της ελιάς.....	10
1.3 Τύποι ελαιόλαδου.....	11
1.4 Κατηγορίες ελαιόλαδου.....	12
1.5 Σύσταση Ελαιόλαδου.....	15
1.5.1 Σαπωνοποιήσιμο μέρος.....	16
1.5.2 Μη σαπωνοποιήσιμο μέρος.....	17
1.6 Βασικά χαρακτηριστικά και παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου.....	19
1.7 Το ελαιόλαδο στην υγεία του ανθρώπου.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	26
ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	26
2.1 Κατηγορίες πολυφαινολών και χημικοί τύποι.....	26
2.1.1 Απλές Φαινόλες και Φλαβονοειδή.....	27
2.1.2 Ταννίνες.....	30
2.2 Φυσιολογικές δράσεις.....	31
2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	32
2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	36
2.4 Μεταβολισμός των πολυφαινολών.....	36
• Διαλυτότητα.....	39
2.5 Ανεύρεση στη φύση.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	42
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	42
3.1 Γενικά στοιχεία για τα αντιοξειδωτικά.....	42
3.2 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών.....	43

3.3 Πηγές αντιοξειδωτικών	44
3.4 Αντιοξειδωτικά ελαιόλαδου	44
3.4.1 Τοκοφερόλες	44
3.4.2 Βιταμίνη E και αντιοξειδωτική δράση	46
3.4.3 Μη αντιοξειδωτικές λειτουργίες της Βιταμίνης E.....	48
3.4.4 Η σημασία των τοκοφερολών του ελαιολάδου στην ανθρώπινη υγεία.....	49
3.5 Φύλλα ελιάς και αντιοξειδωτικά	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	60
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	60
4.1 Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography).....	60
4.1.1 Γενικά στοιχεία για τη μέθοδο HPLC	60
4.1.2 Αρχή της μεθόδου.	63
4.1.3 Ανάλυση των πολυφαινολών με HPLC.....	63
4.2 Η μέθοδος CGC-MS.....	64
4.2.1 Γενικά	64
4.2.2 Αρχή της μεθόδου	66
4.2.3 Ανάλυση των πολυφαινολών με CGC-MS	66
4.3 Προσδιορισμός Ολικών φαινολών	67
4.4. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	68
4.5 Δοκιμές δέσμευσης ελευθέρων ριζών	69
4.5.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• ..	70
4.5.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+ ..	71
4.6 Άλλες τεχνικές.....	72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Ο καρπός της ελιάς.....	11
Εικόνα 2: Χημική δομή τριγλυκεριδίου.....	15
Εικόνα 3: Η βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών.....	28
Εικόνα 4: Οξειδωση ρίζας ημικινόνης προς κινόνη.....	34
Εικόνα 5 : Μερικές δομές συντονισμού που σταθεροποιούν τη ρίζα των φλαβονοειδών...35	
Εικόνα 6: Οι κυριότερες πολυφαινόλες του ελαιολάδου.....	41
Εικόνα 7: Μηχανισμός εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών με κεντρικό άτομο το οξυγόνο από τη βιταμίνη E.....	48
Εικόνα 8: Δομές φαινολικών ενώσεων στα φύλλα της <i>Olea Europaea</i>	54
Εικόνα 9: Δομές φλαβονοειδών που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς της ποικιλίας chemhal.....	56
Εικόνα 10: Δομές φαινολικών ενώσεων των φύλλων ελιάς <i>Olea Europaea</i>	57
Εικόνα 11: Χημικές δομές των πιο άφθονων φαινολικών ενώσεων στα φύλλα ελιάς <i>Olea Europaea</i>	59
Εικόνα 12: Δημιουργία τρυμεθυλοσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS.....	67
Εικόνα 13: Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών –μετάλλων	69
Εικόνα 12: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH:H	71
Εικόνα 13: Η οξειδωση του ABTS σε δραστική ρίζα	72

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Κριτήρια κατηγοριοποίησης ελαιολάδου	14
Πίνακας 2: Εκατοστιαία σύσταση του μη σαπωνοποιήσιμου μέρους του ελαιολάδου και του πυρηνελαίου	17
Πίνακας 3: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων	27
Πίνακας 4: Η κατάταξη των φλαβονοειδών τροφίμων	29
Πίνακας 5: Περιεκτικότητα ορισμένων φυτικών ελαίων σε τοκοφερόλες.....	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα πιο πολύτιμα έλαια, το οποίο καταναλώνεται με μεγάλη συχνότητα τόσο στην Ελλάδα όσο και στις άλλες Μεσογειακές χώρες και το οποίο διακρίνεται για την θρεπτική του αξία, καθώς περιέχει πλήθος πολύτιμων μικροσυστατικών. Μερικά από τα μικροθρεπτικά συστατικά του ελαιολάδου που είναι σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία είναι οι πολυφαινόλες και οι τοκοφερόλες (βιταμίνη E), οι οποίες έχουν αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλουν στην πρόληψη και αντιμετώπιση πολλών ασθενειών.

Η παρούσα μελέτη προσπαθεί να διερευνήσει τον ρόλο των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικά στο ελαιόλαδο, αναλύοντας τον τρόπο δράσης τους και την προστατευτική τους επίδραση στην υγεία.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στο δέντρο της ελιάς, στο ιδανικό κλίμα καρποφορίας της, καθώς και στους τύπους του ελαιόλαδου. Αναλύονται τα κριτήρια κατηγοριοποίησής του, η σύστασή του και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητά του. Επιπλέον, παρατίθενται οι θεραπευτικές του ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια βιβλιογραφική αναφορά στην χημεία των πολυφαινολών με επιμέρους αναφορές στις πηγές, στους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δράσης και στην προστατευτική τους επίδραση στην υγεία. Γίνεται, επίσης, λεπτομερής αναφορά στις πολυφαινόλες του ελαιόλαδου.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αντιοξειδωτικά και οι μηχανισμοί δράσης τους. Παρατίθενται, επιπλέον, οι κατηγορίες των αντιοξειδωτικών, οι πηγές τους και παρουσιάζονται τα κύρια αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου.

Τέλος, στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται ανάλυση των εργαστηριακών μεθόδων απομόνωσης πολυφαινολών, όπως είναι για παράδειγμα η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

ABSTRACT

Olive oil is one of the most precious oils, which is consumed with great frequency both in Greece and other Mediterranean countries and is known for its nutritional value as it contains many valuable micronutrients. Some of the micronutrients of oil, which are important for human health, are the polyphenols and tocopherols (vitamin E), which have antioxidant activity and contribute to the prevention and treatment of many diseases.

This study attempts to investigate the role of polyphenols as antioxidants in olive oil, analyzing how they act and their protective effect on health.

The first chapter refers to the olive tree, the ideal climate of fruiting, and the types of olive oil. The classification criteria, the recommendation and the factors affecting its quality are analyzed. Moreover, the therapeutic effects of olive oil on human health are given.

The second chapter is a literature about the chemistry of phenols with partial reference to the sources, mechanisms of antioxidant activity and protective effect on health. There is also a detailed reference to polyphenols in olive oil.

In the third chapter, the antioxidants and their mechanisms of action are presented. Moreover, the categories of antioxidants, their sources and the main antioxidants in olive oil are presented.

Finally, in the fourth chapter there is an analysis of laboratory methods of isolating polyphenols, such as for example the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το δέντρο της ελιάς καλλιεργείται από τα πανάρχαια χρόνια, κυρίως στις χώρες που βρίσκονται στην λεκάνη της μεσογείου. Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα σημαντικά προϊόντα που εξάγεται από την Ελλάδα, σε παγκόσμια κλίμακα κατέχει εξέχουσα θέση καθώς είναι Τρίτη στην παραγωγή ελαιολάδου και δεύτερη στη σειρά σε παραγωγή βρώσιμης ελιάς.

Το ελαιόλαδο είναι κυρίως, μείγμα εστέρων της γλυκερίνης (τριγλυκερίδια) με τα ανώτερα λιπαρά οξέα, μερικά από τα οποία είναι ακόρεστα ενώ άλλα είναι κορεσμένα. Εκτός από τα τριγλυκερίδια το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά όπως: ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατίδια (λεκιθίνες), στερόλες, φαινόλες, τοκοφερόλες, χρωστικές και διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες.

Έρευνες έχουν δείξει ότι το ελαιόλαδο περιέχει πολυφαινόλες, οι οποίες λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά προσφέροντας πολλά οφέλη στον οργανισμό. Με προτροπή τις εξελίξεις στον ιατρικό τομέα, όπου μετά από μακροχρόνιες έρευνες έδειξαν ότι το ελαιόλαδο βοηθάει στην πρόληψη των ασθενειών και στην διατήρηση της καλής φυσικής κατάστασης, προχωρήσαμε στην παρακάτω βιβλιογραφική έρευνα ώστε να μελετήσουμε το ρόλο των πολυφαινολών και την αντιοξειδωτική τους δράση στο ελαιόλαδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1⁰

ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

1.1 Γενικά στοιχεία για την ελιά

Η ονομασία της ελιάς στη βοτανική είναι *Olea europaea*. Η προέλευση του όρου *olea* είναι ελληνική. Η ελιά υπάγεται στην οικογένεια των ελαιδών (*oleaceae*) η οποία περιλαμβάνει γύρω στα 30 είδη. Τα κυριότερα γνωστά γένη της οικογένειας αυτής είναι τα εξής: *Fraximous* (ash), *Syringa* (lilac), *Ligustrum* (privet), *Forsythia* (Golden Bell), *Jasminium* (the jasmines) και *Forestiera* (*Forestiera neomexicana*-The California “wild olive”).

Η ελιά είναι το μόνο είδος της οικογένειας *Oleaceae* που δίνει βρώσιμο καρπό. Τα 850 εκατομμύρια ελαιόδεντρα του πλανήτη ανήκουν σε περίπου 1.000 καταγεγραμμένες ποικιλίες, που έχουν αναπτυχθεί μέσα στους αιώνες.

Το κύριο χαρακτηριστικό του γένους *olea* είναι η μακροζωία και η διατήρηση της παραγωγικότητας. Υπάρχουν δέντρα στην περιοχή της Μεσογείου πολλών εκατοντάδων ετών, τα οποία παράγουν ακόμα καρπό. Γνωστή είναι η ελιά του Πλάτωνα που σώζεται ακόμη και σήμερα. Επίσης, στην περιοχή της Καλαμάτας σώζεται ένα ελαιόδεντρο ηλικίας 800 περίπου ετών με περίμετρο κορμού 8 μέτρα, ύψος 8 μέτρα και διάμετρο κόμης 9 μέτρα. Είναι ποικιλίας Καλαμάτα και διασώθηκε όταν ο ελαιώνας στον οποίο βρίσκεται είχε πυρποληθεί από τα στρατεύματα του Ιμπραήμ Πασά και έχει χαρακτηριστεί «διατηρητέο μνημείο της φύσης».

Υπεραιωνόβια ελαιόδεντρα βρίσκονται και σε άλλες περιοχές της χώρας μας και ιδιαίτερα στην Κρήτη. Στο νόμο Χανίων, στο χωριό Βούβες, βρίσκεται ένα από τα αρχαιότερα δέντρα του πλανήτη μας, το οποίο έχει βραβευτεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Από το δέντρο αυτό χρησιμοποιήθηκαν συμβολικά κλωνάρια για τα στεφάνια των αθλητών των Ολυμπιακών αγώνων της Αθήνας το 2004.

Η ελιά είναι δέντρο αειθαλές και σε ορισμένες ποικιλίες το ύψος των δέντρων μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 20 μέτρα. Ο κορμός είναι κυλινδρικός και ανώμαλος και

έχει άφθονα εξογκώματα ιδιαίτερα στα ηλικιωμένα δέντρα. Αρκετές φορές δημιουργούνται κοιλότητες μέσα στον κορμό και στους βραχίονες, οι οποίες οφείλονται σε προσβολή από μύκητες ή από άλλες αιτίες. Ο φλοιός είναι τεφροπράσινος στα μικρά δέντρα, αργότερα όμως παίρνει χρώμα τεφρό ή σκοτεινό. Τα φύλλα της ελιάς είναι δερματώδη, λογχοειδή, ακέραια, και βραχύμισχα. Τα άνθη της είναι μικρά, κιτρινοπράσινα και αναπτύσσονται στις μασχάλες των φύλλων με μορφή βότρεων (Κυριτσάκης, 1997).

1.2 Το ιδανικό κλίμα καρποφορίας της ελιάς

Το δέντρο της ελιάς γενικά δεν είναι απαιτητικό όσον αφορά την σύσταση του εδάφους, αλλά για να αναπτυχθεί χρειάζεται ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες. Δεν ευδοκμεί σε περιοχές που οι θερμοκρασίες το χειμώνα πέφτουν κάτω από μείον 9. Οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί ακόμα και να νεκρώσουν τα δέντρα, ενώ αντίθετα σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες είναι απαραίτητες για την καρποφορία του δέντρου. Το πόσο χαμηλές πρέπει να είναι οι θερμοκρασίες, καθώς και η διάρκεια τους διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Γενικά το δέντρο της ελιάς θέλει ήπιο, ζεστό κλίμα, χωρίς πολλές και απότομες αλλαγές.

Το ύψος από την θάλασσα που αντέχει η ελιά, κυμαίνεται από τόπο σε τόπο. Όπου το μέρος είναι βορεινό, ψυχρό, ανεμόπληκτο, η ελιά δεν ευδοκμεί πάνω από τα 200-300 μέτρα. Σε αντίθεση όπου το μέρος είναι ανατολικό, ζεστό και προφυλασσόμενο από τους ανέμους, η καλλιέργεια φτάνει ως τα 600-700 μέτρα.

Το κλίμα, όπως προαναφέρθηκε, περιορίζει την καλλιέργεια της ελιάς, δεν συμβαίνει όμως το ίδιο με την ποιότητα του εδάφους. Η ελιά ευδοκμεί στους κήπους, στα χωράφια, στις γόνιμες πεδιάδες και στις πλαγιές, σε ποτιστικές και σε ξηρές εκτάσεις, ακόμα και σε πετρώδη εδάφη που είναι δύσκολο ή και αδύνατον να αναπτυχθούν άλλα καρποφόρα δέντρα. Μόνο σε βαλτώδη εδάφη δεν καλλιεργείται η ελιά (Λύχνος, 1949).



Εικόνα 1: Ο καρπός της ελιάς.

1.3 Τύποι ελαιόλαδου

Οι τύποι του ελαιόλαδου είναι οι εξής:

- **Αγουρέλαια:** Προέρχονται από άγουρο ελαιόκαρπο και έχουν χαρακτηριστική πικρή γεύση.
- **Πικρά ελαιόλαδα:** Παραλαμβάνονται από ελαιόκαρπο, ο οποίος περιέχει μεγάλες ποσότητες φύλλων.
- **Φρουτώδη:** Έχουν τη γεύση φρέσκου καλής ποιότητας και φυσιολογικά ώριμου ελαιόκαρπου.
- **Ελαιόλαδα με καλή γεύση, γλυκά:** Ευχάριστη γεύση, όχι ακριβώς ζαχαρώδη. Όλα τα ελαιόλαδα με την χαρακτηριστική διακριτική γεύση, χωρίς την παρουσία δυσάρεστων οσμών.
- **Ελαττωματικά:** Ελαιόλαδα τα οποία παρουσιάζουν γεύση και οσμή μούχλας, χωματίλας, ταγγάδας, κλπ.
- **Ξινό:** Πολύπλοκη αίσθηση που δημιουργείται στο στόμα σαν τα οξέα.

1.4 Κατηγορίες ελαιόλαδου

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου και η Ευρωπαϊκή Ένωση με αποφάσεις τους που βασίζονται σε ορισμένα κριτήρια και χαρακτηριστικά, κατατάσσουν το ελαιόλαδο σε διάφορες κατηγορίες. Τα κυριότερα ποιοτικά κριτήρια είναι:

- Η οξύτητα
- Ο βαθμός οξειδωσης
- Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Οσμή – Χρώμα – Γεύση)

Σύμφωνα με τους κανονισμούς, διακρίνονται οι εξής κατηγορίες ελαιόλαδου και πυρηνέλαιου :

1. Παρθένο ελαιόλαδο:

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παραλαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικά ή φυσικά μέσα και κατά την παραλαβή του εφαρμόζονται συνθήκες, ιδίως θερμικές, οι οποίες δεν προκαλούν αλλοιώσεις στην ποιότητα του. Το ελαιόλαδο της κατηγορίας αυτής δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πέραν της πλύσης, μετάγγισης, φυγοκέντρισης και διήθησης. Στην κατηγορία αυτή δεν περιλαμβάνονται τα εστεροποιημένα ελαιόλαδα, μείγματα άλλων λαδιών, ούτε αυτά τα οποία εκχυλίζονται με διαλύτη. Το παρθένο ελαιόλαδο περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες:

- ✓ Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (extra virgin olive oil)

Είναι το παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει το 0.8%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε meq02 / kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος του 20, η σταθερά K270 μικρότερη ή ίση με 0,22 και η σταθερά K μικρότερη ή ίση με 0,01.

- ✓ Παρθένο ελαιόλαδο (virgin olive oil)

Είναι παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 2%. Ο αριθμός υπεροξειδίων και η τιμή K καθορίζονται όπως στο ελαιόλαδο της προηγούμενης κατηγορίας, ενώ η τιμή K270 ορίζεται στα 0,25.

- ✓ Ελαιόλαδο Λαμπάντε (virgin olive oil lampante)

Είναι παρθένο ελαιόλαδο με οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, που υπερβαίνει το 2%. Το ελαιόλαδο λαμπάντε είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως έχει και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση.

2. Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο:

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παραλαμβάνεται μετά από ραφινάρισμα παρθένων ελαιόλαδων και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν είναι δυνατό να υπερβαίνει τα 0,3g ανά 100g ελαιόλαδου, ενώ παράλληλα δεν έχει υποστεί αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε meq02 /kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 5, η σταθερά K270 μικρότερη ή ίση με 1,1 και η σταθερά K μικρότερη ή ίση με 0,16.

3. Ελαιόλαδο:

Είναι έλαιο το οποίο προκύπτει μετά από ανάμιξη εξευγενισμένου (ραφιναρισμένου) και παρθένου ελαιόλαδου (εκτός από λαμπαντέ) και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1%. Οι αναλογίες των προσμίξεων που χρησιμοποιούνται ποικίλλουν και εξαρτώνται από τις απαιτήσεις και την εμπορική πολιτική που ακολουθούν οι εταιρείες. Πάντως το τελικό προϊόν πρέπει να έχει ευχάριστη γεύση και οσμή, χρώμα ανοικτό κιτρινοπράσινο και σε καμία περίπτωση να μην ξεπερνά σε οξύτητα το 1,5%. Συχνά, τουλάχιστον παλαιότερα, το ελαιόλαδο αυτό στην ετικέτα του συνοδευόταν από τις λέξεις «γνήσιο» ή «αγνό». Ο καταναλωτής, πάντως, πρέπει να γνωρίζει ότι σίγουρα δεν πρόκειται για τον αγνό φυσικό φρουτοχυμό που παράγεται κατευθείαν από τον ελαιόκαρπο χωρίς καμία περαιτέρω διαδικασία.

Ουσιαστικά, ο τύπος ελαιόλαδο, που προωθείται από τις μεγάλες εταιρείες και βιομηχανίες παραγωγής, συσκευασίας και διακίνησης ελαιόλαδου, κατέχει το μεγαλύτερο κομμάτι της διεθνούς κατανάλωσης. Συνήθως, η ποιότητά του είναι πάντα σταθερή και η γεύση του ήπια χωρίς τα ιδιαίτερα πλούσια χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα, χρώμα) ενός παρθένου ελαιόλαδου.

4. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο:

Είναι το έλαιο το οποίο εξάγεται από την ελαιοπυρήνα ως υποπροϊόν της ελαιουργίας, με την χρησιμοποίηση διαλύτη. Το έλαιο αυτό δεν μπορεί να καταναλωθεί όπως είναι και πρέπει να υποστεί την επεξεργασία του εξευγενισμού.

5. Ραφινρισμένο πυρηνέλαιο:

Είναι το έλαιο το οποίο λαμβάνεται από ραφινάρισμα του ακατέργαστου πυρηνελαίου του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 0,3%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε meq02 /kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 10, η σταθερά K270 μικρότερη ή ίση με 2 και η σταθερά K μικρότερη ή ίση με 0,2.

6. Πυρηνέλαιο:

Είναι το έλαιο το οποίο αποτελείται από μείγμα ραφινρισμένου πυρηνελαίου και παρθένου (σε μικρότερο ποσοστό) του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1% και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

Πίνακας 1: Κριτήρια κατηγοριοποίησης ελαιόλαδου

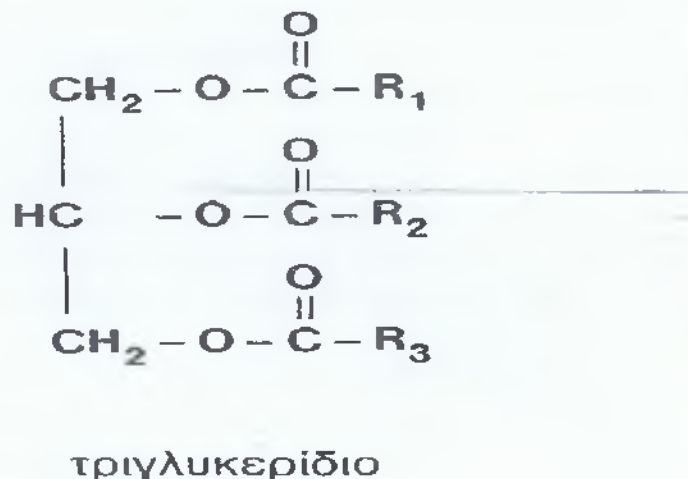
Όνομα Κατηγορίας	Μέθοδος Παραγωγής	Άρωμα - Γεύση	Οξύτητα
Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο	Απευθείας από ελιές και μόνο με μηχανικές μεθόδους	>6,5 (μέγιστο 9)	<0,8 %
Παρθένο Ελαιόλαδο	Απευθείας από ελιές και μόνο με μηχανικές μεθόδους	>5,5 (μέγιστο 9)	<2 %
Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο που έχει υποστεί επεξεργασία εξευγενισμού	Δεν έχει σημασία	Δεν έχει σημασία

(Πηγή: www.oliveoil.com)

1.5 Σύσταση Ελαιόλαδου

Το ελαιόλαδο είναι κυρίως, μείγμα εστέρων της γλυκερίνης (τριγλυκερίδια) με τα ανώτερα λιπαρά οξέα, μερικά από τα οποία είναι ακόρεστα ενώ άλλα είναι κορεσμένα. Εκτός από τα τριγλυκερίδια το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά όπως: ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατίδια (λεκιθίνες), στερόλες, φαινόλες, τοκοφερόλες, χρωστικές και διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες (Frezzotti and Manni, 1956).

Τα συστατικά αυτά του ελαιόλαδου διαιρούνται σε δύο μέρη: α) το σαπωνοποιήσιμο (98.5-99%) που αποτελείται από τριγλυκερίδια και β) το μη σαπωνοποιήσιμο (1-1.5%) που αποτελείται κυρίως από αντιοξειδωτικές ουσίες και στερόλες.



Εικόνα 2: Χημική δομή τριγλυκεριδίου.

Τα συστατικά του ελαιόλαδου κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

1. Τα συστατικά του σαπωνοποιήσιμου τμήματος του ελαίου (κυρίως τριακυλογλυκερόλες και λιγότερο τριτερπενικά οξέα, υδροξυοξέα, φωσφολιποειδή, χλωροφύλλες α και β και τα προϊόντα αποικοδόμησής τους και ορισμένους γλυκοζίτες.

2. Τα συστατικά του μη σαπωνοποιήσιμου τμήματος του ελαίου, ανάλογα αν μετατρέπονται ή όχι σε σάπωνες υπό την επίδραση θερμών αλκαλίων (υδρογονάνθρακες, στερόλες, τριτερπενικές αλκοόλες, ανώτερες λιπαρές αλκοόλες, καροτενοειδείς χρωστικές, τοκοφερόλες, φαινολικές ενώσεις και απροσδιόριστα συστατικά κ.ά.) (Μπαλατσούρας, 1997).

1.5.1 Σαπωνοποιήσιμο μέρος

Η σύνθεση του ελαιόλαδου σε λιπαρά οξέα, όπως και των άλλων φυτικών λαδιών, κυμαίνεται και εξαρτάται από την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής που καλλιεργούνται τα δέντρα και από διάφορους άλλους παράγοντες.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου συνίσταται από ακόρεστα οξέα. Μεταξύ αυτών το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. Το δεύτερο κατά σειρά ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιόλαδου είναι το λινελαϊκό (C18:2). Τα άλλα ακόρεστα οξέα, λινολενικό (C18:3), αραχιδονικό (C20:4), και παλμιτελαϊκό (C16:1) συναντώνται αλλά σε μικρότερες ποσότητες. Από τα κορεσμένα οξέα σε μεγαλύτερο ποσοστό συναντάται το παλμιτικό (C16:0) και ακολουθεί το στεατικό (C18:0).

Τα κύρια γλυκερίδια του ελαιόλαδου είναι αυτά του ελαϊκού οξέος, που μόνα τους ξεπερνούν το 70-80% του βάρους του λαδιού. Επειδή τα γλυκερίδια αυτά είναι υγρά, σε θερμοκρασία δωματίου, το ελαιόλαδο, στο σύνολό του, παραμένει σε υγρή κατάσταση στις συνήθεις θερμοκρασίες δωματίου (Frezzotti and Manni, 1956, Christakis *et al.*, 1980).

1.5.2 Μη σαπωνοποιήσιμο μέρος

Στο ελαιόλαδο εκτός από τα γλυκερίδια, συναντώνται και άλλα συστατικά σε μικρές ποσότητες που αναφέρονται ως δευτερεύοντα συστατικά. Τα συστατικά αυτά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2), όπως συναντώνται στο παρθένο ελαιόλαδο αλλά και το πυρηνέλαιο.

Πίνακας 2: Εκατοστιαία σύσταση του μη σαπωνοποιήσιμου μέρους του ελαιόλαδου και του πυρηνέλαιου

Συστατικά	Παρθένο ελαιόλαδο	Πυρηνέλαιο
Σκουαλένιο και άλλοι υδρογονάνθρακες	30-50%	12%
Στερόλες	15%	25%
Εστέρες στερολών	-	1%
Τριτερπενικές αλκοόλες	10%	10%
Ανώτερες λιπαρές αλκοόλες	-	15%
Κηροί	-	0,2%
Καροτενοειδή, τοκοφερόλες, πτητικά, αντιοξειδωτικά και άλλα συστατικά	25-45%	35%

(Πηγή: Gracian, 1968).

Στο ελαιόλαδο συναντώνται διάφορα καροτενοειδή. Η ξανθοφύλλη ($C_{40}H_{56}O_2$), που είναι το υδροξυλιωμένο α καροτένιο, καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό. Ακολουθούν τα καροτένια και σε ελάχιστες ποσότητες το λυκοπένιο.

Τα καροτένια είναι τρεις ισομερείς ακόρεστοι υδρογονάνθρακες (α, β και γ καροτίνη) του τύπου $C_{40}H_{56}$. Η β-καροτίνη υπάρχει σε αναλογία 85%, ενώ η α-καροτίνη σε 15% και η γ-καροτίνη σε ίχνη (Αλυγιάκης, 1982).

Ο Colakoglu (1966) προσδιόρισε τις τριτερπενικές αλκοόλες κυκλοαρτενόλη και β-αμυρίνη, σε δείγμα ελαιόλαδου. Συνολικά το ποσοστό των τριτερπενικών αλκοολών που προσδιορίστηκε ήταν 0,1%. Εστέρες μεθανόλης και αιθανόλης έχουν επίσης εντοπιστεί στο πτητικό κλάσμα. Οι μη γλυκεριδικοί εστέρες του ελαιόλαδου περιέχουν σχεδόν τα ίδια λιπαρά οξέα τα οποία συναντώνται και στο γλυκεριδικό τμήμα.

Μια άλλη κατηγορία συστατικών που συναντώνται στο μη σαπωνοποιημένο μέρος του ελαιόλαδου είναι οι στερόλες. Σύμφωνα με τους Boskou και Morton (1975) το ελληνικό ελαιόλαδο περιέχει ίχνη χοληστερόλης, καμπεστερόλη, σιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη (90% του συνόλου των στερολών) και ανεμαστερόλη. Η συνολική περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε στερόλες κυμαίνεται από 180-265 mg/100g.

Επίσης, σε όλα τα φυτικά λάδια συναντώνται οι τοκοφερόλες, οι οποίες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Διάφορα είδη τοκοφερολών έχουν προσδιοριστεί και είναι γνωστές σαν α, β, γ, δ, ε και ζ. Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη θέση στην οποία βρίσκονται οι μεθυλικές ομάδες και στο ελαιόλαδο βρίσκονται σε ποσοστό 88,5% η α τοκοφερόλη, σε ποσοστό 9,9% η β και γ, ενώ η δ σε ποσοστό 1,6% (Fedeli, 1977).

Το ελαιόλαδο περιέχει και μικρή ποσότητα φωσφολιπιδίων που κυμαίνεται από 40-135 ppm. Η μεγαλύτερη ποσότητα των φωσφολιπιδίων προέρχεται από τον πυρήνα του ελαιοκάρπου. Τα φωσφολιπίδια που συναντώνται συνήθως στο ελαιόλαδο είναι η λεικιθίνη και η κεφαλίνη.

Επιπλέον, στο ελαιόλαδο συναντώνται και διάφορες χρωστικές ουσίες, η κυριότερη των οποίων είναι η χλωροφύλλη. Η ουσία αυτή ευθύνεται για το πράσινο χρώμα του ελαιόλαδου, αλλά αποτελεί και την κύρια αιτία της οξειδωτικής αλλοίωσης, αν αυτό έρθει σε επαφή με το φως. Η χλωροφύλλη υπάρχει σε δύο μορφές: α) την α χλωροφύλλη (κυανοπράσινη) και β) την β χλωροφύλλη (κιτρινοπράσινη).

Τέλος, στο ελαιόλαδο συναντώνται και οι πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν μια μεγάλη ετερογενής ομάδα ενώσεων με κοινό χαρακτηριστικό ότι φέρουν ένα ή

περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απ' ευθείας σε ένα ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς πυρήνες. Οι πολυφαινόλες που παράγονται ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, συναντώνται στην φύση συνδεδεμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα συζευγμένα σάκχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ακόμη και ολιγοσακχαρίτες, με πιο κοινό την γλυκόζη. Άλλα σάκχαρα μπορεί να είναι: γλυκόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικά, γαλακτορονικά οξέα κλπ. Τα φαινολικά συστατικά είναι ευρύτατα διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο (Βεκιάρη, 2001).

Οι πολυφαινόλες προσδίδουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στα φυτά που ανιχνεύονται, όπως για παράδειγμα χρώμα και γεύση, προσδίδοντας σε αυτά κάποια ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά άλλοτε ωφέλιμα και άλλοτε ανεπιθύμητα.

Η συγκέντρωσή τους μπορεί να διαφέρει ακόμα και σε καλλιέργειες του ίδιου είδους, αφού εξαρτάται από τον βαθμό ωρίμανσης, το ιδιαίτερο κλίμα της περιοχής, τη μορφολογία του εδάφους, τον τρόπο καλλιέργειας του φυτού, αλλά και της ηλικίας του (Saitta *et al.*, 2002).

1.6 Βασικά χαρακτηριστικά και παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου

Τα βασικά χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου είναι η οξύτητα, το χρώμα, η οξειδωση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Με βάση την οξύτητα, το ελαιόλαδο διακρίνεται σε βρώσιμο και μη, ενώ το χρώμα εξαρτάται από το είδος των λιποδιαλυτών χρωστικών (χλωροφύλλες, ξανθοφύλλες, καροτένια κλπ.) που παρουσιάζει ο καρπός στο στάδιο της συγκομιδής. Ο υπολογισμός του βαθμού οξειδωσης γίνεται με διάφορες τεχνικές (μέτρηση των υπεροξειδίων, απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα κ.ά.). Για παράδειγμα στο παρθένο ελαιόλαδο ο αριθμός των υπεροξειδίων θα πρέπει να είναι μικρότερος ή ίσος του είκοσι. Το βασικότερο κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης αποτελούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η γεύση του ελαιόλαδου

εξαρτάται από την παρουσία πτητικών συστατικών και λιπαρών οξέων, κυρίως του ελαϊκού και του λινελαϊκού των πολυφαινολών.

Όσον αφορά στους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγόμενη ποσότητα και ποιότητα του ελαιόλαδου, αυτοί είναι οι εξής:

↓ Το κλίμα, το έδαφος και άλλοι εξωτερικοί παράγοντες.

Το ελαιόδεντρο αναπτύσσεται καλύτερα σε γόνιμα εδάφη, σε θερμές περιοχές με ήπιο χειμώνα.

↓ Η ποικιλία του δέντρου.

↓ Η υγιεινή κατάσταση του ελαιόκαρπου.

Όταν ο ελαιόκαρπος έχει προσβληθεί από μύκητες ή ασθένεια, αλλοιώνεται και η ποιότητα του λαδιού.

↓ Η εποχή και ο τρόπος συλλογής του ελαιόκαρπου.

Ο ελαιόκαρπος πρέπει να συλλέγεται όταν είναι φυσιολογικά ώριμος, γιατί τότε παρέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα λαδιού και όλα τα απαραίτητα συστατικά σε αναλογία τέτοια ώστε να χαρακτηρίζεται ως λάδι εξαιρετικής ποιότητας. Σημειώνεται ότι η παρατεταμένη παραμονή του καρπού στο δέντρο μετά την ωρίμανσή του, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του αρώματος και πιθανόν την αύξηση της περιεκτικότητας σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Ο τρόπος συλλογής των ελαιόκαρπων (πχ. μάζεμα με τα χέρια ή κτένες) επηρεάζει την ποιότητα του ελαιόλαδου, ανάλογα με τον τραυματισμό που προκαλείται στον καρπό.

↓ Η διατήρηση και αποθήκευση του ελαιόκαρπου.

Αυτή πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να μην τραυματίζεται ο καρπός και να αποφεύγεται η μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας. Επισημαίνεται ότι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη συλλογή μέχρι και την επεξεργασία του ελαιόσπορου στο ελαιουργείο πρέπει να είναι ο πλέον σύντομος.

↓ Οι μέθοδοι εξαγωγής του ελαιόλαδου, οι οποίοι αφορούν στην παραλαβή του καρπού, τη αποφύλλωσή του και την πλύση του ελαιόκαρπου.

↓ Η θραύση του ελαιόκαρπου (σπάσιμο και άλεση) που αποτελεί το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας.

Τα σπουδαιότερα από τα μηχανήματα που χρησιμοποιούνται για το σπάσιμο του ελαιόκαρπου είναι οι ελαιόμυλοι, οι κυλινδρόμυλοι και οι σφυρόμυλοι.

↓ Η μάλαξη.

Όλοι οι μαλακτήρες των φυγοκεντρικών ελαιουργείων κατασκευάζονται σήμερα από ανοξείδωτο χάλυβα και έχουν διπλά τοιχώματα, διαμέσου των οποίων κυκλοφορεί ζεστό νερό που εξασφαλίζει την απαιτούμενη θερμοκρασία της ελαιοζύμης στον μαλακτήρα ξεκινώντας από μια θερμοκρασία περιβάλλοντος 20^oC μέχρι το ανώτερο 37^oC. Όλα συγκλίνουν στο ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει την ποσότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου, αλλά και την ευπάθεια του στην οξείδωση.

↓ Ο διαχωρισμός

ο οποίος σήμερα πραγματοποιείται με τους γνωστούς διαχωριστήρες που υπάρχουν σε δύο τύπους: τον κοινό ή απλό τύπο και τον αυτόματο. Ανεξάρτητα από τον τύπο στον οποίο ανήκουν, η λειτουργία τους στηρίζεται στη διαφορά ειδικών βαρών προς τη διαχώριση υγρών. Μεγάλη σημασία στην ποιότητα του ελαιόλαδου έχει η θερμοκρασία του νερού στον διαχωριστήρα, αφού σε αρκετές περιπτώσεις η θερμοκρασία ξεπερνά τους 30^oC και έτσι καταστρέφονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του λαδιού και το λάδι οξειδώνεται ευκολότερα. Επίσης, μεγάλη σημασία έχει και ο συχνός καθαρισμός των διαχωριστήρων που πρέπει να γίνεται για τον απλό τύπο καθημερινά, ενώ για τον αυτόματο δύο φορές την εβδομάδα. Οι ξένες ύλες και η υγρασία υποβαθμίζουν την ποιότητα του λαδιού κατά την αποθήκευσή του.

↓ Η φυγοκέντρωση.

Στα φυγοκεντρικά συγκροτήματα η ποιότητα του περιλαμβανομένου ελαιόλαδου μπορεί να είναι ίδια με αυτή που περιέχει ο ελαιόκαρπος, εφόσον το συγκρότημα λειτουργεί βάση των σωστών κανόνων λειτουργίας.

↓ Η αποθήκευση.

Το ελαιόλαδο μετά το πέρασμά του από τους διαχωριστήρες, περιέχει διάφορες ουσίες (μούργες) που κατακάθονται με τον καιρό στα δοχεία αποθήκευσης. Το ελαιόλαδο πρέπει να απαλλαγεί από αυτές τις ουσίες, γιατί όσο μικρή κι αν είναι η ποσότητά τους προκαλούν ζυμώσεις και μεταδίδουν άσχημη μυρωδιά στο λάδι, υποβαθμίζοντας το ποιοτικά. Είναι προτιμότερο η μούργα να αφαιρείται από τον πυθμένα του δοχείου με μια στρόφιγγα. Επειδή το ελαιόλαδο κατακρατά εύκολα στη μάζα του διάφορες πτητικές ουσίες, η αποθήκευσή του θα πρέπει να γίνεται σε καθαρούς και καλά αεριζόμενους χώρους. Κατά την μετάγγιση το λάδι θα πρέπει να προφυλαχθεί από το φως και τον αέρα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντλίες που θα ενσωματώσουν αέρα στη μάζα του λαδιού. Για την αποθήκευση μεγάλων ποσοτήτων ελαιόλαδου, χρησιμοποιούνται ελαιοδεξαμενές κατασκευασμένες από αδρανές υλικό, απρόσβλητο για το λάδι που ταυτόχρονα το προστατεύουν από το φως και τον αέρα. Το υλικό αυτό είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας. Θα ήταν ιδανικό οι ελαιοπαραγωγοί να χρησιμοποιούν ανοξείδωτα δοχεία για το λάδι της οικιακής κατανάλωσης ή να παραδίδουν στις μονάδες συσκευασίας ποσότητα της παραγωγής τους για συσκευασία σε μικρότερα δοχεία. Θα πρέπει να αποφεύγονται σιδερένια βαρέλια που αποτελούν τον χειρότερο τρόπο αποθήκευσης, καθώς και τα πιθάρια των οποίων η εσωτερική επιφάνεια είναι αλλοιωμένη και δεν κλείνουν αεροστεγώς. Τέλος, καλό θα ήταν να αποφεύγονται και τα πλαστικά δοχεία που έχουν διαπερατότητα στον αέρα, καθώς και τα διαφανή (ICAP, 2003).

1.7 Το ελαιόλαδο στην υγεία του ανθρώπου

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιολάδου ήταν γνωστές στον Ιπποκράτη και γενικότερα στην ιατρική επιστήμη της αρχαιότητας. Οι κύριες διαπιστώσεις του θεραπευτικού ρόλου του ελαιολάδου φαίνονται περιληπτικά παρακάτω:

✓ Από τον περασμένο αιώνα ορισμένοι ερευνητές είχαν επισημάνει την ευεργετική επίδραση του ελαιολάδου στην θεραπεία της υπερχλωριδικής γαστρίτιδας και του δωδεκαδακτυλικού έλκους. Οι Ewald και Boas (1889) διαπίστωσαν ότι προσθήκη

ελαιόλαδου σε δοκιμαστικό γεύμα χυλού προκαλούσε μείωση της έκκρισης γαστρικού οξέος (Κυριτσάκης, 1993).

✓ Το ελαιόλαδο πιστευόταν και πιστεύεται ότι επιδρά ευνοϊκά στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού αγγειακού συστήματος και του εγκεφάλου και στην κανονική ανάπτυξη των παιδιών (Christakis et al, 1980; Grawford et al, 1980). Η συμβολή του ελαιόλαδου στην ανάπτυξη των παιδιών φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία του ελαϊκού οξέος. Ακόμα ευεργετική επίδραση ασκεί το λινελαϊκό το οποίο συναντάται στο ίδιο περίπου ποσοστό που βρίσκεται και στο μητρικό γάλα (Κυριτσάκης, 1993).

✓ Η αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων από μονοακόρεστα, όπως αυτά που περιέχονται στο ελαιόλαδο, μειώνει την συγκέντρωση της ολικής και της LDL-χοληστερόλης, χωρίς να μειώνει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης βελτιώνοντας έτσι το λιπιδαιμικό προφίλ και διαδραματίζοντας καταλυτικό ρόλο κατά της υπερχοληστερολαιμίας και της στεφανιαίας νόσου (EC3, 2000).

✓ Με σκεπτικό ίδιο με αυτό που περιγράφηκε παραπάνω, η μείωση των επιπέδων της LDL έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας της LDL που διεισδύει στο αρτηριακό τοίχωμα και θεωρητικά μειώνεται έτσι άμεσα και η διαθέσιμη για οξείδωση LDL, εμποδίζοντας έτσι την αθηροσκλήρωση (EC3, Assman and Wahrburg, 2000). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το ελαιόλαδο δρα ευεργετικά και στην περίπτωση του διαβήτη. Ο Sirtori (1986) υποστηρίζει ότι το ελαιόλαδο όταν λαμβάνεται ως μοναδική πηγή λίπους, ιδιαίτερα από άτομα με διαβήτη, δρα ευνοϊκά στην αργή εκκένωση του περιεχομένου του στομάχου στο δωδεκαδάκτυλο. Με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα δεν έχουν απότομες αυξομειώσεις (Λαμπράκη, 1999).

✓ Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η συστηματική κατανάλωση ελαιόλαδου είναι αντίστροφα συνδεδεμένη με τον καρκίνο (Κυριτσάκης, 1993).

✓ Έρευνες έδειξαν επίσης ότι η υπέρταση βελτιώνεται αισθητά. Η μείωση μάλιστα της αρτηριακής πίεσης ήταν τέτοια, ώστε η δόση της φαρμακευτικής αγωγής περιορίστηκε στο 50% της αρχικής (Tracey, 2000).

✓ Έχει διαπιστωθεί ότι τα λευκοτριένια και οι προσταγλαδίνες είναι απαραίτητες για τον οργανισμό σε μικρές ποσότητες. Υπερπαραγωγή όμως των ενώσεων αυτών οδηγεί σε προοδευτική εμφάνιση ορισμένων χρόνιων παθήσεων όπως οι καρδιαγγειακές (Lands,

1986). Το ελαιόλαδο όμως σε αντίθεση με άλλα φυτικά έλαια π.χ καλαμποκέλαιο, μειώνει την βιοσύνθεση των λευκοτριενίων (German *et al*, 1988).

✓ Το ελαιόλαδο προστατεύει το ανθρώπινο δέρμα από την ηλιακή ακτινοβολία και τα εγκαύματα που αυτή μπορεί να του προκαλέσει. Αυτή του η ιδιότητα οφείλεται στη δράση της βιταμίνης E , της προβιταμίνης A, στις πολυακόρεστες λιπαρές ουσίες του αλλά και πιθανώς στο σκουαλένιο. Επιπλέον, προστατεύει και αναστέλλει την εξέλιξη ιδιαίτερα των παιδικών εκζεμάτων και ανακουφίζει από τα τσιμπήματα των εντόμων. Το 1988 ανακοινώθηκαν τα αποτελέσματα μιας έρευνας, σύμφωνα με την οποία η χλωροφύλλη που ως ουσία συναντάται αποκλειστικά στο ελαιόλαδο προάγει το μεταβολισμό, διεγείρει την αύξηση των κυττάρων και συμβάλλει στην αιμοποίηση, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων.

✓ Το ελαιόλαδο ελαττώνει στον νεφρό την προσκόλληση των trans λιπαρών οξέων, που ενέχονται στην δημιουργία αρτηριοσκλήρωσης στα κύτταρα και ελαττώνει ορισμένα από τα ανεπιθύμητα συμπτώματα της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, ενώ προστατεύει τον νεφρό από την τοξική δράση άλλων λιπών ή φαρμάκων. Επιπλέον, τα νεφρικά αγγεία, προστατεύονται επίσης από την δράση των οξειδωμένων LDL, και την φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα των αρτηριών. Έτσι το ελαιόλαδο, περιορίζοντας την δημιουργία νεφρικής αρτηριοσκλήρυνσης, επιτρέπει την καλύτερη και αποδοτικότερη λειτουργία του οργάνου, επιτρέποντας την απέκκριση τοξικών ουσιών, ιδιαίτερα σε καταστάσεις ελαττωμένης νεφρικής λειτουργίας.

Ο Χρηστάκης και οι συνεργάτες του (1980) αποδίδουν την υψηλή βιολογική αξία του ελαιολάδου στα παρακάτω χαρακτηριστικά του:

- Στην καλή σχέση των κορεσμένων και των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων.
- Στην καλή σχέση μεταξύ της βιταμίνης E και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως λινελαϊκό).
- Στην παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- Στην παρουσία λινελαϊκού οξέος σε ποσοστό 10%, περίπου, ποσοστό που βρίσκεται μέσα στα όρια των απαιτήσεων του οργανισμού σε βασικά λιπαρά οξέα, καλύπτοντας έτσι τις ανάγκες του ακόμα και όταν το ελαιόλαδο χρησιμοποιείται ως μόνη πηγή λίπους.

➤ Στη μεγάλη περιεκτικότητα στον υδρογονάνθρακα σκουαλένιο, ο οποίος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στον μεταβολισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

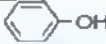

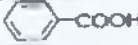
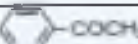
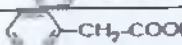
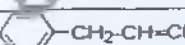
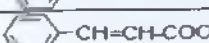

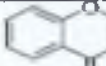

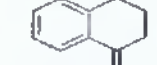

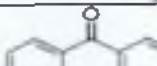
ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

2.1 Κατηγορίες πολυφαινολών και χημικοί τύποι

Οι πολυφαινόλες (φαινολικές ενώσεις, PP) είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές (Harborne, 1993). Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Βρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι PP μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια.

Οι πολυφαινόλες διακρίνονται τουλάχιστον σε 10 κατηγορίες (Harborne, 1989) ανάλογα με τη βασική χημική δομή τους. Από τις σημαντικότερες κατηγορίες είναι αυτή των φλαβονοειδών, η οποία διακρίνεται περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες διαθέτοντας επί συνόλου περισσότερα από 5000 μέλη. Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων δίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων

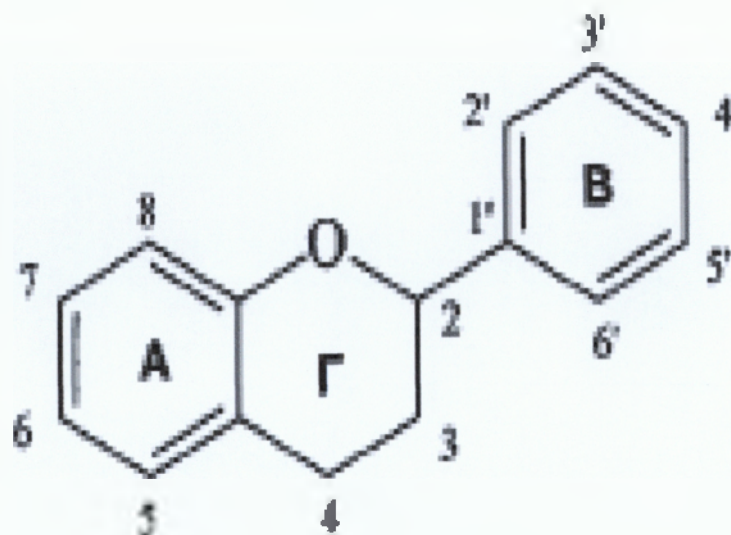
Απλές φαινόλες		Τυροσώλη, υδροξυτυροσώλη
Βενζοκινόνες		
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό, συριγγικό, βανιλικό (αλδεύδες)
Ακετοφαινόλες		Λιγότερο συχνά στα φυτά
Φαινυλοξικά οξέα		
Φαινυλοπροπανοειδή		
(Υδροξυ)κινναμμοϊκά οξέα		Φερουλικό, καφεϊκό, σιναπικό, κουμαρικό
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες		Συνήθως ως γλυκοζίτες
Χρωμόνες		
Ναφθοκινόνες		
Ξανθόνες		
Στυβένια		
Ανθρακινόνες		Εμοδίνη κλπ
Φλαβονοειδή	Λιγνάνες, νεολιγνάνες, λιγνίνες	

2.1.1 Απλές Φαινόλες και Φλαβονοειδή

Οι απλές φαινόλες όπως η φαινόλη, η θυμόλη, η κρεσόλη, η ορκινόλη, η ρεζορκινόλη, η υδροκινόνη και διάφορα παράγωγα, όπως η αρμπουτίνη και η σησαμόλη, είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Φαινολικά παράγωγα όπως τα υδροξυβενζοϊκά ή φαινολικά οξέα (βανιλικό, γαλλικό) και οι αλδεύδες, όπως η βανιλίνη, απαντούν σε ανώτερα φυτά και φτέρες. Βρίσκονται στη φύση ελεύθερες ή και με τη μορφή μεθυλο- και αιθυλο-εστέρων και γλυκοζιτών (Harborne, 1989). Τα φαινυλοπροπανοειδή και τα υδροξυκινναμμοϊκά οξέα είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, με σπουδαιότερους


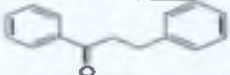

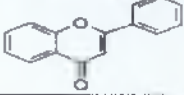
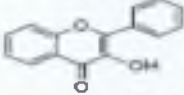
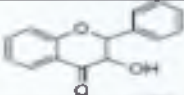
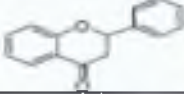
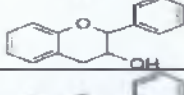

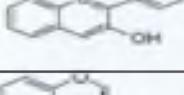

εκπροσώπους το *p*-κουμαρικό, το καφεϊκό και το σιναπικό, καθώς και τα παράγωγά τους. Οι ναφθοκινόνες αποτελούνται από 10 άτομα άνθρακα, οι ξανθόνες αποτελούνται από 13 άτομα άνθρακα, ενώ τα στυλβένια από 14 άτομα άνθρακα. Οι κινναμικές αλκοόλες, όπως η σιναπική αλκοόλη, αποτελούν το κύριο συστατικό των λιγνινών, ενώ οι χρωμόνες είναι λιγότερο γνωστές από τις κουμαρίνες, οι οποίες βρίσκονται υπό τη μορφή γλυκοζιτών (π.χ. σκοπολετίνη).

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και περιλαμβάνουν φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, κατεχίνες (φλαβανόλες) και χαλκόνες. Η γενική δομή των φλαβονοειδών φαίνεται στην Εικόνα 3 και η κατάταξη τους βάση Harborne στον Πίνακα 4.



Εικόνα 3: Η βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών.

Πίνακας 4: Η κατάταξη των φλαβονοειδών τροφίμων

Χαλκόνες		
Διυδροχαλκόνες		
Χρυσάνες		
Φλαβόνες		Απιγενίνη, λουτεολίνη, διοσμιτίνη O-γλυκοζίτες και C-γλυκοζίτες
Φλαβονόλες		Κερκετίνη, μυρισετίνη. Συνήθως ως O-γλυκοζίτες
Διυδροφλαβονόλες		
Φλαβανόνες		Ναριγγενίνη, εσπεριδίνη
Φλαβανόλες		
Φλαβονοδιόλες		
Ανθοκυανιδίνες		Σημαντικά υδατοδιαλυτά pigmenta λουλουδιών πελαργονιδίνη, δελφινιδίνη κλπ
Ισοφλαβονοειδή		γενιστεΐνη κλπ
Διφλαβονοειδή, Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες		

Τα φλαβονοειδή έχουν σχετικά μικρά μοριακά βάρη και είναι γενικά ευδιάλυτα, ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική τους δομή (βαθμός υδροξυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, ακυλίωσης, κλπ.). Οι διαφορές μεταξύ των επιμέρους τάξεων συνίστανται στο δακτύλιο πυρόνης (παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ή 3- υδροξυ ή 2-οξο ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτύλιους A και B (Vinson, 1998).

Μεταξύ αυτών η φλαβόνη λουτεολίνη και η φλαβονόλη κερκετίνη, είναι οι πιο κοινές ενώσεις, οι οποίες ανευρίσκονται σε πληθώρα φυτών. Οι φλαβονόλες συναντώνται ως O-γλυκοζίτες, ενώ οι O-γλυκοζίτες και οι C-γλυκοζίτες των φλαβονών είναι πολύ κοινοί (Herzmann, 1988). Φλαβανόνες όπως η εσπεριδίνη, απαντώνται ως O- αλλά και ως

C-γλυκοζίτες. Οι ανθοκυανίνες (γλυκοζίτες ανθοκυανιδινών) όπως π.χ. της κυανιδίνης, είναι η πιο σημαντική ομάδα υδατοδιαλυτών φυτικών χρωστικών και είναι υπεύθυνες για το χρώμα των λουλουδιών και των καρπών των ανώτερων φυτών. Οι πολυμερείς χρωστικές που προκύπτουν με συμπύκνωση των ανθοκυανιδινών με διάφορα άλλα φλαβονοειδή, δίνουν και το χρώμα του κόκκινου κρασιού (Mazza, 1995).

2.1.2 Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι ενώσεις μεσαίου έως υψηλού μοριακού βάρους. Είναι υδροξυλιωμένα μόρια, ικανά να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Σε αυτή τους την ιδιότητα οφείλεται η στυφή γεύση τροφών πλούσιων σε ταννίνες που σχηματίζουν ιζήματα με πρωτεΐνες του σιέλου. Οι ταννίνες κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες: Τις υδρολυόμενες, που περιέχουν γαλλικό οξύ και τις συμπυκνωμένες ταννίνες, πολυμερή των φλαβονοειδών.

Υδρολυόμενες ταννίνες: Οι υδρολυόμενες ταννίνες αποτελούνται από γαλλικό οξύ ή εξαϋδροξυ-διφενικό οξύ εστεροποιημένο με μία πολυόλη, που είναι κυρίως η γλυκόζη (Porter, 1989). Η συμπύκνωση των μεταβολιτών αυτών δημιουργεί πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Η πιο γνωστή υδρολυόμενη ταννίνη είναι το ταννικό οξύ.

Συμπυκνωμένες ταννίνες: Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Προκύπτουν από πολυμερισμό μίας φλαβαν-3-όλης (κατεχίνη, επικατεχίνη, κλπ.) με ένα μόριο φλαβαν-3,4-διόλης ή λευκοανθοκυανιδίνης. Η οξειδωτική συμπύκνωση πραγματοποιείται μεταξύ του άνθρακα C4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου και των ανθράκων C6 ή C8 των γειτονικών μονάδων (Porter, 1989). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προανθοκυανιδίνες και οι υδρολυόμενες ταννίνες χαμηλού μοριακού βάρους είναι διαλυτές σε διάφορους διαλύτες (νερό και οργανικούς), ενώ οι υδρολυόμενες υψηλού μοριακού βάρους ταννίνες είναι αδιάλυτες. Επιπλέον, αδιάλυτες παραμένουν και οι ταννίνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος.

2.2 Φυσιολογικές δράσεις

Οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Η στυφή και πικρή γεύση των τροφίμων και των ποτών εξαρτώνται από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Οξειδωτικές μεταβολές όπως η καφέ χρώση του κακάο κατά την επεξεργασία ή ο οξειδωτικός πολυμερισμός των πολυφαινολών κατά την παρασκευή του μαύρου τσαγιού έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Αντιστρόφως, η ενζυμική αντίδραση καφέ χρώσης των φαινολικών ενώσεων (καταλυόμενη από την οξειδάση της πολυφαινόλης) και οι μη- ενζυμικές αντιδράσεις καφέ χρώσης είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό ανεπιθύμητου χρώματος και γεύσης σε φρούτα και λαχανικά (Ho *et al.*, 1992).

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog *et al.*, 1995). Επιπλέον, οι PP παρουσιάζουν κι άλλες δράσεις, πολλές από τις οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία.

Οι κυριότερες δράσεις των PP συνοψίζονται παρακάτω:

1. Επίδραση στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών

Κυρίως οι εκτενώς πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και ένζυμα της πέψης λιπών και υδατανθράκων).

Αποτέλεσμα: καθυστερεί η απορρόφηση.

2. Επίδραση στην απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων

Παρεμποδίζουν τα ιόντα που συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών, κυρίως από φλαβονοειδή που προκαλούν μείωση της απορρόφησης Fe, Cu, Zn, Na, Al υπό τη δημιουργία συμπλόκων.

3. Ταννίνες (και PP ελαιολάδου) μειώνουν τα επίπεδα σακχάρου και γοληστερόλης στο αίμα

4. Προστασία επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος

5. Οι ταννίνες αυξάνουν τα επίπεδα της HDL και μειώνουν τα επίπεδα της

LDL

6. Αντικαρκινική δράση (στο παχύ έντερο, απόπτωση καρκινικών κυττάρων)

7. Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση

8. Αντιαλλεργικές ιδιότητες (παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων)

9. Αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO

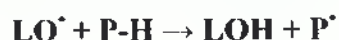
10. Προστασία του DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές

11. Αντιοξειδωτική δράση

Προστασία της LDL από οξείδωση που οδηγεί στη μείωση αποτιθέμενης χοληστερόλης στους ιστούς και επακόλουθα στην ελάττωση του ρυθμού παραγωγής αθηρωματικής πλάκας, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιοπαθειών.

2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

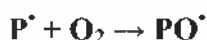
Η προστατευτική δράση των PP αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές των αλυσωτών οξειδωτικών αντιδράσεων, κυρίως όσων έχουν ορθο-διφαινολική, κατεχολική, σύνταξη στο μόριό τους. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (P-H) είναι άριστοι δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου σε ρίζες λιπιδίων ($\text{LOO}\cdot$, $\text{LO}\cdot$), όπως φαίνεται στο σχήμα (Shahidi and Wanasundara, 1992):



Οι φαινοξυ-ρίζες (P[•]) που σχηματίζονται είναι σχετικά σταθερές και δύσκολα επιτρέπουν τη συνέχιση της αλυσωτής αντίδρασης. Συγκεκριμένα, η φαινόξυ-ρίζα σταθεροποιείται με διασπορά των ασύζευκτων ηλεκτρονίων μέσω συντονισμού (Shahidi and Wanasundara, 1992). Επίσης, οι φαινοξυ-ρίζες έχουν τη δυνατότητα να τερματίζουν τις αλυσωτές αντιδράσεις αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες:



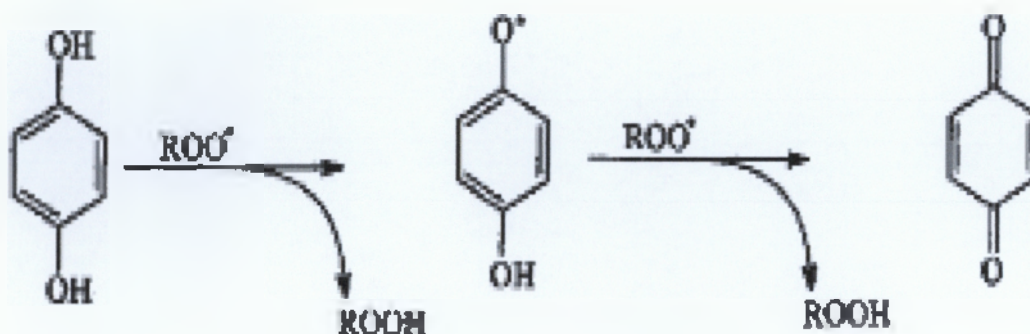
Επιπρόσθετα, όσο πιο ασθενής είναι ο δεσμός P-H, τόσο αυξάνεται η αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικά. Ενώ η φαινόλη είναι αδρανής ως αντιοξειδωτικό, τα ορθο- και παρα- διφαινολικά παράγωγα έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία αυξάνει με την υποκατάσταση ατόμων Η με αιθυλο- ή *n*-βουτυλο- ομάδες λόγω αύξησης της ηλεκτρονικής πυκνότητας του ΟΗ μέσω του επαγωγικού φαινομένου (Bravo, 1998). Η σταθερότητα της φαινοξυ- ρίζας αυξάνεται με την παρουσία μεγάλων ομάδων στην ορθο- θέση κι έτσι μειώνεται η ταχύτητα αντιδράσεων διάδοσης:



Η εισαγωγή μιας δεύτερης υδροξυ- ομάδας στην ορθο- ή παρα- θέση μιας φαινόλης αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητά της. Η δραστηριότητα ενός 1,2- διυδροξυ- βενζοϊκού παραγώγου αυξάνεται με τη σταθεροποίηση της φαινοξυ-ρίζας μέσω ενός ενδομοριακού υδρογονικού δεσμού.

Η αντιοξειδωτική δράση διυδροξυβενζοϊκών παραγώγων αποδίδεται σ' ένα βαθμό στο γεγονός ότι η αρχικά σχηματιζόμενη ρίζα ημικινόνης μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω

προς κινόνη, αντιδρώντας με μια δεύτερη λιπιδική ρίζα όπως στην Εικόνα 4 (Shahidi and Wanasundara, 1992).



Εικόνα 4: Οξείδωση ρίζας ημικινόνης προς κινόνη.

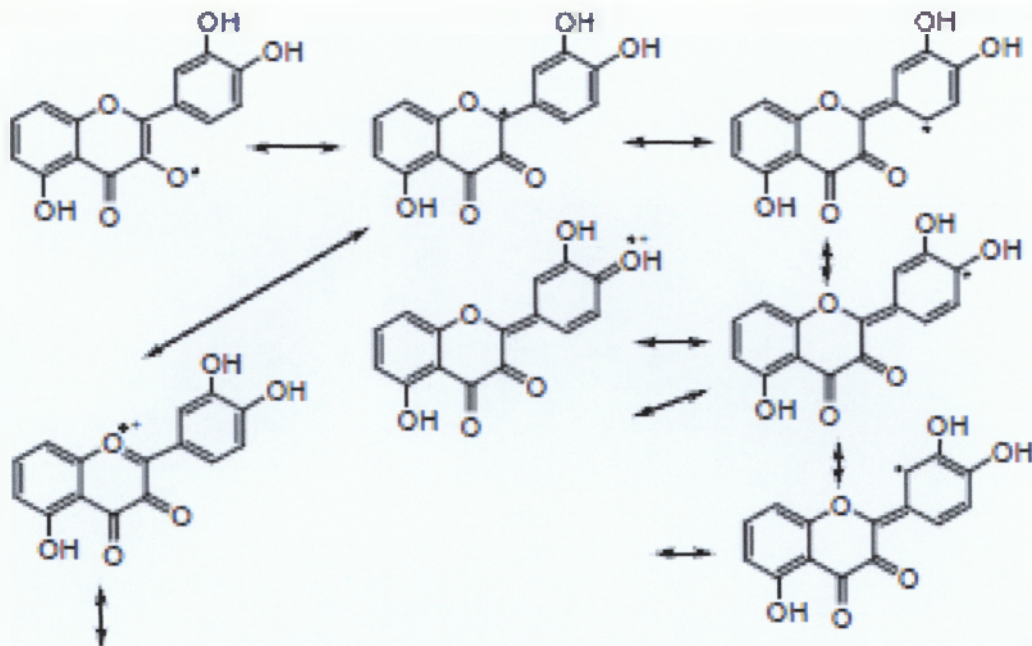
Η ορθο- διφαινολική δομή ορισμένων φαινυλαλκοολών, φαινυλοξέων και φλαβονοειδών τους προσδίδει αντίστοιχα πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Servili *et al.*, 1996). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η υδροξυτυροσόλη, μια *ο*-διφαινολική ένωση που θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό στο ελαιόλαδο (Deiana *et al.*, 1999).

Τα φλαβονοειδή είναι από τα πιο δραστικά αντιοξειδωτικά, γιατί έχουν ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα δομικά στοιχεία:

- A) δομή όρθο-κατεχόλης (όρθο- διφαινολική ομάδα στο Β δακτύλιο),
- B) 2-3 συζυγιακό διπλό δεσμό με 4-οξο λειτουργική ομάδα και
- Γ) ομάδες υδροξυλίου σε θέσεις 3, 5 (Ratty and Das, 1988; Bors *et al.*, 1990).

Έτσι, η κερκετίνη λόγω αυτής της δομής αναμένεται ισχυρότερο αντιοξειδωτικό από την κατεχίνη ή άλλες φλαβονόλες. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται μερικές δομές συντονισμού που σταθεροποιούν τη ρίζα των φλαβονοειδών.

Ο βαθμός υδροξυλίωσης των φλαβονοειδών επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία μειώνεται από την παρουσία σακχάρου στο μόριο. Έτσι, ενώ π.χ. κάποιοι γλυκοζίτες δεν είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι αντίστοιχες γλυκόνες μπορεί να είναι (Ratty and Das, 1988). Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι μη εκχυλιζόμενες πολυφαινόλες (πολυμερείς προανθοκυανιδίνες και υψηλού μοριακού βάρους υδρολυόμενες ταννίνες) είναι 15 έως 30 φορές ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από τα διαλυτά φαινολικά συστατικά, στα οποία αποδίδεται παραδοσιακά η αντιοξειδωτική δράση. Ενώσεις με πολλές ομάδες υδροξυλίου έχουν μεγάλη αντιοξειδωτική δράση. Για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική δράση των ισομερών της κατεχίνης είναι τουλάχιστον διπλάσια από αυτή της βιταμίνη E (Rice and Evans, 1995).



Εικόνα 5: Μερικές δομές συντονισμού που σταθεροποιούν τη ρίζα των φλαβονοειδών.

2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών εκτιμάται με διαφορετικές τεχνικές που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς, αφού οι πολυφαινόλες δρουν ως αντιοξειδωτικά μέσω διαφόρων μηχανισμών. Οι συνηθέστερες από αυτές τις τεχνικές είναι οι ακόλουθες:

- ✓ εκτίμηση της βλάβης του DNA υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες
- ✓ εκτίμηση της βλάβης πρωτεϊνών
- ✓ εκτίμηση της οξείδωσης λιπιδίων (TBARS)
- ✓ δέσμευση ελευθέρων ριζών [O_2^{\cdot} , $\cdot OH$, $\cdot NO$, $ABTS^{\cdot+}$, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)]
- ✓ μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση), αντιοξειδωτικών (ουρικό οξύ κ.α.) και βιταμινών (E, και β-καροτένιο).

2.4 Μεταβολισμός των πολυφαινολών

Μια μελέτη που έγινε στη Δανία, δείχνει πως η ημερήσια πρόσληψη φλαβονών, φλαβονολών και φλαβανονών ανέρχεται στα 28 mg, ενώ αντίστοιχα δεν έχουν γίνει μελέτες για τις υπόλοιπες πολυφαινόλες (Leth and Justesen, 1998). Ελάχιστα γνωρίζουμε και για την απορρόφηση των πολυφαινολών στο γαστρεντερικό σωλήνα, εάν συγκρατούνται στον οργανισμό μετά την απορρόφηση και ποιά η πλήρης βιολογική τους δράση. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση και το μεταβολισμό των φαινολικών παραγώγων των τροφίμων, είναι ο βαθμός γλυκοζυλίωσης/ακυλίωσης, η βασική τους δομή (παράγωγα βενζολίου ή φλαβόνης), η σύζευξη με άλλα φαινολικά παράγωγα, το μέγεθος του μορίου, ο βαθμός πολυμερισμού και η διαλυτότητα.

Τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα ελεύθερα απλά φαινολικά συστατικά και οι αγλυκόνες απορροφώνται απ' ευθείας από το βλεννογόνο του λεπτού εντέρου (King *et al.*,

1996). Τα ελεύθερα φαινολικά (κιναμικό οξύ και τα παράγωγά του όπως π-κουμαρικό, καφεϊκό κλπ.) έχειδειχθεί ότι απορροφώνται από τον πεπτικό σωλήνα επιμύων. Αντίθετα, οι γλυκοζίτες πρέπει να υδρολυθούν στις αντίστοιχες αγλυκόνες πριν την απορρόφηση. Στα θηλαστικά, όπου απουσιάζουν οι κατάλληλες β- γλυκοσιδάσες, θεωρείται ότι δεν πραγματοποιείται απορρόφηση στο λεπτό έντερο.

Μερική μόνο απορρόφηση γλυκοζιτών κερκετίνης πραγματοποιείται στο ανώτερο τμήμα του εντέρου, γεγονός που αποδίδεται στη δράση γλυκοσιδασών από βακτήρια που αποικίζουν τον ειλέο (King *et al.*, 1996; Hollman *et al.*, 1996). Οι περισσότεροι γλυκοζίτες ωστόσο περνούν στο παχύ έντερο όπου υδρολύονται από την εντερική μικροχλωρίδα δίνοντας ελεύθερες αγλυκόνες (Griffiths and Barrow, 1972).

Στο έντερο, οι α γλυκόνες απορροφώνται μέσω του εντερικού επιθηλίου, μεθυλιώνονται και σχηματίζουν ενώσεις είτε με γλυκουρονικό οξύ είτε με θειικό άλας. Το κύριο όργανο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των πολυφαινολών είναι το ήπαρ, ενώ η μεσολάβηση κι άλλων οργάνων όπως ο νεφρός ή ο εντερικός βλεννογόνος θεωρείται πιθανή, εφόσον και σε αυτά έχουν βρεθεί ένζυμα του μεταβολισμού των πολυφαινολών.

Σε έρευνες που έχουν γίνει σε αρουραίους, στους οποίους χορηγήθηκαν κατεχίνη, φλαβονόλες (κερκετίνη, ρουτίνη, ισοραμνετίνη) και γενιστεΐνη, ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα τους συζευγμένα και 3-Ο-μεθυλιωμένα παράγωγα. Οι παραπάνω μεταβολίτες εκκρίνονται στα ούρα ή στη χολή, αποδεσμεύονται με τη δράση της εντερικής μικροχλωρίδας, εισέρχονται στην εντεροηπατική κυκλοφορία και επαναπορροφώνται. Εναλλακτικά μπορεί να μεταβολισθούν πλήρως και να μετατραπούν σε απλά φαινολικά οξέα μετά από υδρόλυση των φλαβονικών δομών τους με βακτηριακά ένζυμα. Τα φαινολικά οξέα που σχηματίζονται ως προϊόντα διάσπασης, όπως π.χ. τα ελεύθερα διαλυτά φαινολικά οξέα, απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο κι εκκρίνονται στα ούρα (Hollman, 1997).

Γενικά, ελάχιστα είναι γνωστά για την ικανότητα πρόσληψης και παραμονής των φαινολικών συστατικών ή των συζυγών τους μορφών και των παραγώγων τους στον οργανισμό. Σε ότι αφορά στις ενδείξεις για απορρόφηση και μεταβολισμό των πολυφαινολών στο έντερο, μελέτες σε πειραματόζωα με ¹⁴C-σημασμένες φαινόλες δείχνουν ότι μόνο μερική απορρόφηση λαμβάνει χώρα. Έτσι, μόνο το 20% από την ¹⁴C-κερκετίνη που χορηγήθηκε σε αρουραίους απορροφήθηκε, το 30% εκκρίθηκε και το υπόλοιπο 50% μεταβολίσθηκε προς φαινολικό οξύ και CO₂. Επίσης, έχει αναφερθεί

απορρόφηση 20% των ισοφλαβονών σόγιας σε αρουραίους, από την οποία 21% εκκρίνεται στα κόπρανα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των αγλυκονών και των γλυκοζιτών (King *et al.*, 1996).

Μελέτη των φλαβονοειδών σε ανθρώπους έχει δείξει μερική μόνο απορρόφηση των πολυφαινολών. Η απορρόφηση της δια του στόματος χορηγούμενης κερκετίνης σε υγιή άτομα με ειλεοστομία έδειξε να κυμαίνεται σε 24% και 52% των χορηγηθέντων α γλυκονών και γλυκοζιτών, αντίστοιχα. Σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της κερκετίνης σε πλάσμα αρουραίων δεν είχε σημαντικές διαφορές 16 ώρες μετά τη στιγμή που έφθασαν στο μέγιστο όριο συγκέντρωσης (Hollman *et al.*, 1995). Επιπλέον, προτάθηκε ότι ο ρυθμός της αποβολής των μεταβολιτών της κερκετίνης ήταν σχετικά χαμηλός και ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα μπορούν εύκολα να διατηρηθούν με μια τακτική παροχή φλαβονοειδών στη διαίτα (Manach *et al.*, 1995). Σε μια παρόμοια έρευνα, βρέθηκε ότι μετά από πρόσληψη μαύρου τσαγιού η συγκέντρωση ολικών κατεχινών στο αίμα ήταν 0,17 $\mu\text{mol/L}$ ενώ μετά από πρόσληψη πράσινου τσαγιού 0,55 $\mu\text{mol/L}$ (Van der Hof *et al.*, 1998).

Οι τελευταίοι ερευνητές, μελέτησαν την κινητική της απορρόφησης και της αποβολής των κατεχινών του τσαγιού και βρήκαν ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο αίμα επιτυγχάνονται 2 ώρες μετά την πρόσληψη του τσαγιού και ότι ο χρόνος ημίσειας αποβολής ποικίλει μεταξύ 4,8 και 6,9 ωρών για τις κατεχίνες του πράσινου και του μαύρου τσάι αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είχαν μεγάλες διαφορές συγκριτικά με αυτά του Hollman και των συνεργατών του (1996), οι οποίοι βρήκαν ότι η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα της κερκετίνης ύστερα από την πρόσληψη σκόρδων πλούσιων σε κερκετίνη, παρατηρήθηκε 3,3 ώρες μετά την πρόσληψη κι ότι ο χρόνος ημίσειας αποβολής ήταν 16.8 ώρες.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο ρυθμό και στην έκταση της απορρόφησης και της αποβολής των διατροφικών πολυφαινολών, οι οποίες εξαρτώνται από τη χημική τους δομή. Έρευνες έδειξαν ότι η υδροξυτυροσόλη απορροφάται στο έντερο (Manna *et al.*, 2000), όπως και η ολευρωπαΐνη σε πειράματα με αρουραίους (Edgecombe *et al.*, 2000). Σχετικά όμως με την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη του ελαιολάδου, έχει προταθεί η αποβολή τους από τους νεφρούς σε αυτούσια μορφή ή με τη μορφή των μεταβολιτών τους (Visioli *et al.*, 2000). Σε αντίθεση με την προηγούμενη έρευνα, έχει προταθεί ότι μεγάλο μέρος των φαινολικών ενώσεων του

ελαιολάδου απορροφώνται από τον οργανισμό (Vissers *et al.*, 2002) και, σε *in vivo* πειραματική μελέτη σε αρουραίους, η υδροξυτυροσόλη σε διάλυμα ελαιολάδου είναι 99% βιοδιαθέσιμη, ενώ σε υδατικό διάλυμα 75% και η τυροσόλη σε διάλυμα ελαιολάδου είναι 98% βιοδιαθέσιμη, ενώ σε υδατικό διάλυμα 71% (Tuck *et al.*, 2001). Συμπερασματικά, μπορεί να λεχθεί ότι το ποσοστό απορρόφησης και μεταβολισμού μιας PP εξαρτάται από παράγοντες όπως:

- Χημική δομή (επηρεάζεται από βαθμό γλυκοζυλίωσης / ακυλίωσης)
- Βασική δομή (βενζολικός ή φλαβονοειδικός πυρήνας)
- Σύζευξη με άλλες PP
- MB
- Βαθμό πολυμερισμού
- Διαλυτότητα

2.5 Ανεύρεση στη φύση

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στα εδώδιμα φυτά (λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, φρούτα, ξηρούς καρπούς, κλπ.) και ποτά (κρασί, μπύρα, τσάι, κακάο, κλπ.). Βέβαια, διαφορές στη συγκέντρωση πολυφαινολών υπάρχουν ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους, καθώς η παρουσία των πολυφαινολών στα φυτά επηρεάζεται πολύ από παράγοντες όπως οι γενετικοί, η βλάστηση, ο βαθμός ωρίμανσης, η ποικιλία, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Hermann, 1988; Porter, 1989; Mazza, 1995).

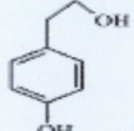
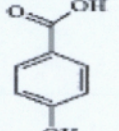
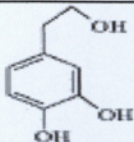
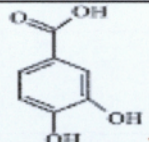
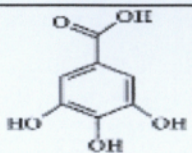
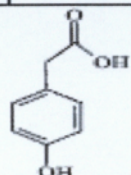
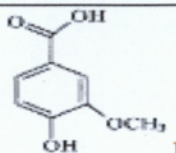
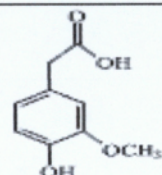
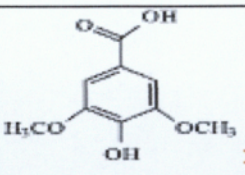
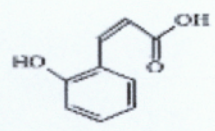
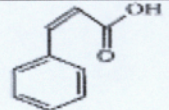
Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες των φυτικών τροφίμων μπορεί να κυμαίνεται σε αρκετά ευρέα όρια. Στα όσπρια και τα δημητριακά, οι κυριότερες πολυφαινόλες είναι φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, και ταννίνες. Η περιεκτικότητα των πολυφαινολών στα δημητριακά είναι συνήθως λιγότερη από το 1% της ξηρής ύλης. Σε ότι αφορά στα όσπρια, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχουν οι σκούρες ποικιλίες, όπως τα κόκκινα και τα μαύρα φασόλια (*Phaseolus vulgaris*). Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη,

ανευρίσκονται στα περισσότερα όσπρια, ενώ τα λαχανικά περιέχουν κυρίως φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Σε αντίθεση με αυτά, δεν συναντάμε σημαντικές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών σε ρίζες και βολβούς, εκτός από τα κρεμμύδια και τη γλυκόριζα. Επιπλέον, φρούτα όπως τα μήλα και τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, αντίστοιχα, ενώ οι φλαβανόνες είναι άφθονες σε εσπεριδοειδή (εσπεριδίνη) και δαμάσκηνα. Η κύρια φαινολική ένωση στα φρούτα είναι η φλαβονόλη και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απαντώνται στο φλουό (Kühnau, 1976).

Το τσάι περιέχει κυρίως κατεχίνες οι κυριότερες από τις οποίες είναι: ο (-)-3-γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), η (-) επιγαλλοκατεχίνη (EGC), ο (-)-3-γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (ECG) και η (-)- επικατεχίνη (EC), ενώ οι κύριες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η η μυρισετίνη κι ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από τις κατεχίνες. Απαντούν κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών.

Η EGCG είναι η πιο άφθονη κατεχίνη στο τσάι (50-60% του συνόλου των κατεχινών) και θεωρείται το δραστικό συστατικό του. Η σειρά αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των τεσσάρων κύριων παραγώγων κατεχίνης έχει βρεθεί να είναι: EGCG>EGC=ECG>EC (Hu and Kitts, 2001). Έτσι, ενώ το πράσινο τσάι είναι πολύ πλούσιο σε φλαβανόλες, το μαύρο περιέχει μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων πολυφαινολών όπως οι θεαφλαβίνες και οι θεαρουμπιγίνες (Shao *et al.*, 1995). Το κυριότερο φαινολικό συστατικό των σπόρων του καφέ είναι το χλωρογενικό οξύ. Η κυριότερη πολυφαινόλη στους σπόρους του κακάο είναι η φλαβανόλη επικατεχίνη, ενώ παράλληλα παρουσιάζεται υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και ταννίνες. Οι πολυφαινόλες του κρασιού περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, ταννίνες κι άλλα φλαβονοειδή.

Στο ελαιόλαδο περιέχονται φαινολικά οξέα και υδρολυόμενες ταννίνες (Visioli and Galli, 1998), ενώ πλούσιοι σε ταννίνες είναι και οι ξηροί καρποί. Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν το «πολικό κλάσμα» του και εμποδίζουν την αυτοοξειδωσή του, αποδίδοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την εξαιρετική θερμική σταθερότητά του και συνεισφέροντας στο χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση (Tsimidou *et al.*, 1992). Οι κυριότερες είναι: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ολευρωπαΐνη και τα πρωτοκατεχουικό, γαλλικό, βανιλλικό, *π*- υδροξυ-βενζοϊκό, συρινγκικό, 4-υδροξυ-φαινυλ-οξικό, ομαβανιλλικό, κινναμικό, *ο*- κουμαρικό, *π*-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξύ (Εικόνα 6).

 <p>Τυροσόλη</p>	 <p>π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ</p>
 <p>Υδροξυτυροσόλη</p>	 <p>Πρωτοκατεχικό οξύ</p>
 <p>Γαλλικό οξύ</p>	 <p>4-Υδροξυ-φαινοξικό</p>
 <p>Βανιλλικό οξύ</p>	 <p>Ομοβανιλλικό οξύ</p>
 <p>Συρινγικό οξύ</p>	 <p>α-Κουμαρικό οξύ</p>
 <p>Κινναμικό οξύ</p>	

Εικόνα 6: Οι κυριότερες πολυφαινόλες του ελαιόλαδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

3.1 Γενικά στοιχεία για τα αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες που εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την επιβλαβή δράση των τελευταίων (Vaclavik, 1998).

Υπάρχουν διαφορετικοί και πολύπλοκοι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών, τα οποία συνοπτικά είτε αποτρέπουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, είτε συλλέγουν κατεστραμμένες βιολογικές αλυσίδες, είτε επιδιορθώνουν βιολογικά μόρια (πρωτεολυτικά ένζυμα), είτε προσπαθούν να εντάξουν την οξειδωτική αντίδραση σε μια επωφελή μεταβολική οδό. Από χημική άποψη αυτά σημαίνουν, ότι ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να είναι δότης μοριακού υδρογόνου, δέκτες ηλεκτρονίων, παρεμποδιστής δράσης ενζύμων, συμπλεκτικός παράγοντας για μέταλλα κλπ.

Υπάρχουν στον οργανισμό μας αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως οι βισμουτάσες υπεροξειδίου (SOD), οι αναγωγάσες και υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH) , οι καταλάσες των μιτοχονδρίων, και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, το α-λιποϊκό, τα καροτενοειδή, η ουβικινόνη, ιόντα μετάλλων.

Αντιοξειδωτική δράση έχουν και ορισμένα παράγωγα χλωροφύλλης, τα αλκαλοειδή, οι ινδόλες, τα διτερπένια, οι φυτοστερόλες. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε πολλά αρωματικά φυτά , συνυπάρχει η αντιοξειδωτική με την αντιμικροβιακή δράση, όπως συμβαίνει στο θυμάρι, το δενδρολίβανο, τη ρίγανη και το μαύρο πιπέρι. Τα φυτά αυτά ως αντιμικροβιακά, μπορούν άριστα να χρησιμοποιηθούν τόσο σαν συντηρητικά τροφίμων όσο και σαν και βελτιωτικά γεύσης (Bray, 1999).

3.2 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με δύο τρόπους:

1) ως προς **τη φύση τους** διακρίνονται σε:

✓ **Φυσικά** : αντιοξειδωτικά που ανευρίσκονται φυσιολογικά στα τρόφιμα, με κύριους εκπροσώπους, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), τις τοκοφερόλες (βιταμίνη E), το κιτρικό οξύ, κάποιες αμίνες και τις φαινολικές ενώσεις.

✓ **Συνθετικά** : αντιοξειδωτικά που προστίθενται εξωγενώς σε λίπη, έλαια και τρόφιμα που περιέχουν λίπος και χαμηλές συγκεντρώσεις φυσικών αντιοξειδωτικών, με κύριο στόχο την επιβράδυνση της διαδικασίας της οξείδωσης (Μπόσκου, 1997). Κύριοι εκπρόσωποι είναι, το BHA (βουτυλιωμένη υδρομανισόλη) και το BHT (βουτυλιωμένο υδρομυτοζουόλιο). Οι ουσίες αυτές έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα φυσικά αντιοξειδωτικά, εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα και έχουν χαμηλό κόστος (Chen et al., 1992).

2) ως προς **τον τρόπο δράσης τους** διακρίνονται σε:

✓ **Κύρια** : μειώνουν την διάδοση των αντιδράσεων οξείδωσης προκαλώντας τερματισμό. Εδώ ανήκουν, οι φαινόλες, οι αμίνες, οι τοκοφερόλες και οι ενώσεις που περιλαμβάνουν ένα εκτενές σύστημα συζυγιακών διπλών δεσμών, όπως τα καροτενοειδή. Επίσης, οι φαινολικές ενώσεις BHA, BHT, TBHG και PG (Gunstone, 1999; Μπόσκου, 1997).

✓ **Δευτερεύοντα** : δεσμεύουν μέταλλα τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Σε αυτά ανήκουν διάφορα οξέα ή παράγωγα τους που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις όπως το EDTA, το κιτρικό οξύ, το φωσφορικό κλπ (Μπόσκου, 1997; Gunstone, 1999).

3.3 Πηγές αντιοξειδωτικών

Οι κυριότερες διατροφικές πηγές αντιοξειδωτικών διαφοροποιούνται ανάλογα με τη βιταμίνη ή το ιχνοστοιχείο στο οποίο αναφερόμαστε. Συγκεκριμένα, πηγές είναι οι:

Βιταμίνη Α: Αυγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, συκώτι, ιχθυέλαια.

Β-καροτένιο: Φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, κίτρα) λαχανικά, ιδιαίτερα τα κίτρινα και πορτοκαλί (καρότα, λεμόνια).

Βιταμίνη C: Φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή, φραγκοστάφυλα, φράουλες πράσινα φυλλώδη λαχανικά και κραμβοειδή (σπανάκι, μπρόκολο).

Βιταμίνη E: Φυτικά έλαια.

Σελήνιο: Κρέας, συκώτι, θαλασσινά.

Φλαβονοειδή: Κόκκινο κρασί, φρούτα, λαχανικά (Γεωργακάκης, 2005).

3.4 Αντιοξειδωτικά ελαιόλαδου

Ως κύρια αντιοξειδωτικά του ελαιολάδου θεωρούνται, οι τοκοφερόλες, με κύριο εκπρόσωπο την α-τοκοφερόλη καθώς και οι φαινολικές ενώσεις (Fster et al., 1998).

3.4.1 Τοκοφερόλες

Η βιταμίνη E με μητρική ένωση την τοκόλη συνίσταται από δύο σειρές ενώσεων: τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες. Οι τοκοφερόλες διακρίνονται στην α-τοκοφερόλη, τη β-τοκοφερόλη, τη γ-τοκοφερόλη, και τη δ-τοκοφερόλη, ενώ οι τοκοτριενόλες διακρίνονται στις α-, β-, γ- και δ- τοκοτριενόλη. Η ολική βιολογική δράση της βιταμίνης E οφείλεται κυρίως στην παρουσία της α-τοκοφερόλης. Η α- τοκοφερόλη ασκεί τη μέγιστη βιολογική δραστηριότητα στον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελεί σημείο αναφοράς για τη δράση των άλλων μορφών βιταμίνης E.

Όλες οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά των λαδιών, αφού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, η οποία αυξάνεται από την α προς την δ. Η σταθερότητα μάλιστα του ελαιόλαδου στην οξείδωση οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στην παρουσία των τοκοφερολών οι οποίες και οξειδώνονται εύκολα.

Εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση οι τοκοφερόλες παρουσιάζουν και βιταμινική ενέργεια η οποία αυξάνεται αντίθετα με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, δηλαδή από το δ προς το α (Κυριτσάκης, 1988).

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο, είναι χρήσιμος και βοηθά στην ανίχνευση νοθείας του με άλλα φυτικά έλαια, π.χ η παρουσία τοκοφερόλης γ αποτελεί σαφή ένδειξη νοθείας με καλαμποκέλαιο και άλλα σπορέλαια στα οποία συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι στο ελαιόλαδο (Κυριτσάκης, 1988).

Η α-τοκοφερόλη θεωρείται παραδοσιακά ως το κύριο αντιοξειδωτικό του ελαιόλαδου. Αποτελεί το 90% περίπου του συνόλου των τοκοφερολών και φυσιολογικά κυμαίνεται από 100 έως 300 ppm (Blekas et al., 1995; Psomiadou and Tsimidou, 1998). Η γ-τοκοφερόλη αποτελεί περίπου το 8% του συνόλου των τοκοφερολών του ελαιόλαδου, ενώ οι β-, δ-τοκοφερόλες περιέχονται μόνο σε ίχνη (Ανδρικόπουλος και συν., 1989).

Οι συγκεντρώσεις των τοκοφερολών διαφέρουν τόσο ανάμεσα στις διάφορες ποιοτικές κατηγορίες ελαιόλαδου, όσο και ανάμεσα στα δείγματα ίδιας ποιότητας. Οσον αφορά το παρθένο ελαιόλαδο, η συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης ποικίλει σε δείγματα διαφορετικής προέλευσης. Μια πιθανή εξήγηση που δόθηκε είναι ότι η συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης επηρεάζεται από την ποικιλία του ελαιοκάρπου, αλλά και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Ανδρικόπουλος και συν., 1989).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Περιεκτικότητες ορισμένων φυτικών ελαίων σε τοκοφερόλες

Είδος Λαδιού	Τοκοφερόλες			
	α	β + γ	δ	Σύνολο
Ελαιόλαδο	0,24	Ίχνη	ίχνη	0,24

Βαμβακέλαιο	0,56	0,38	ίχνη	0,94
Καλαμποκέλαιο	0,26	0,92	ίχνη	1,18
Σογιέλαιο	0,07	0,78	0,24	1,09
Φυστικέλαιο	0,23	0,31	ίχνη	0,54

(Πηγή: Κυριτσάκης, 1988).

Παρόλο που το ελαιόλαδο, όπως έχει αναφερθεί, έχει τη μικρότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη E, σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτικά έλαια, ωστόσο, διαθέτει τον υψηλότερο βιολογικό δείκτη. Με τον όρο "βιολογικός δείκτης" εννοείται ο λόγος της βιταμίνης E προς τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Σύμφωνα με τις συνιστώμενες, αναθεωρημένες το 2001 διαιτητικές προσλήψεις (DRI), οι ενήλικες θα πρέπει να λαμβάνουν 15 mg βιταμίνης E (ή α- τοκοφερόλης) ημερησίως (Krause's, 2005). Οι καπνιστές και οι αλκοολικοί έχουν μεγαλύτερες ανάγκες για βιταμίνη E, όπως και οι ηλικιωμένοι.

3.4.2 Βιταμίνη E και αντιοξειδωτική δράση

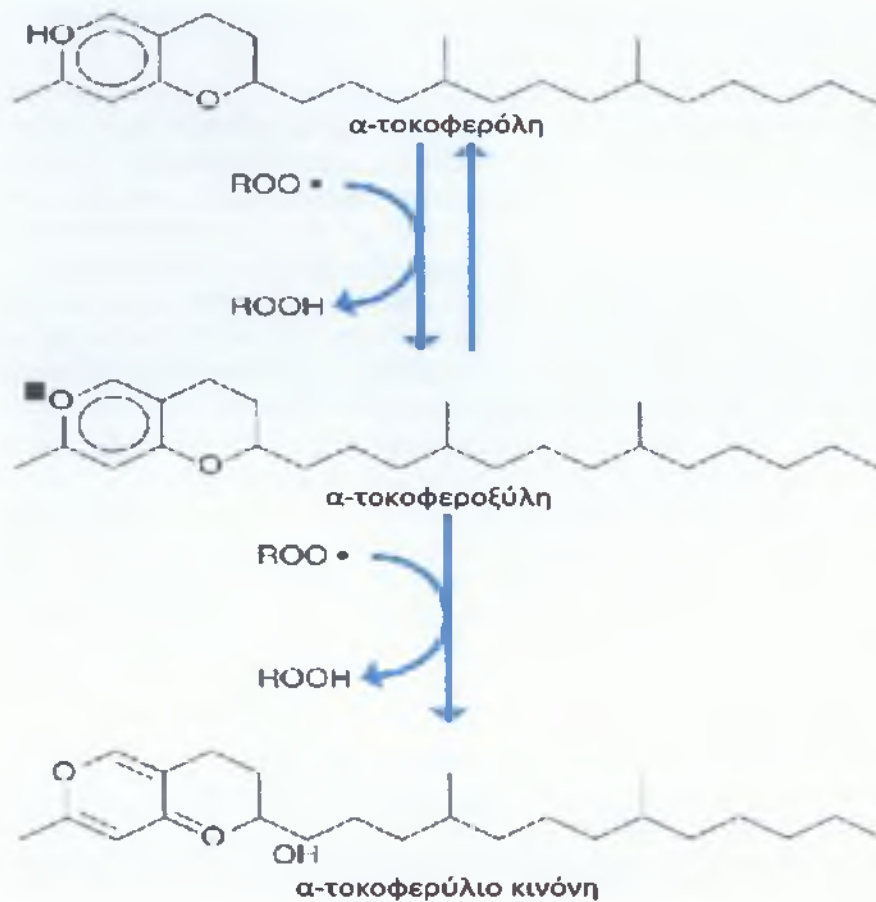
Ο κύριος ρόλος των τοκοφερολών στα τρόφιμα είναι η προστασία των οξέων των τριγλυκεριδίων από την οξείδωση. Αυτό γίνεται γιατί όταν κάποιο οξειδωτικό μέσο (π.χ. φως, θέρμανση και άλλα) προσβάλλει ένα έλαιο τότε οξειδώνεται πρώτα κατά προτίμηση η πλευρική αλυσίδα ατόμων άνθρακα των τοκοφερολών.

Η βιταμίνη E στο ανθρώπινο σώμα αντιδρά αποτελεσματικά και εξουδετερώνει τις ρίζες με κεντρικό άτομο τον άνθρακα. Οι ρίζες αυτές μπορούν να παραχθούν στο σώμα από αντιδράσεις μεταξύ οργανικών μορίων και άλλων ριζών, ειδικότερα ριζών υδροξυλίου. Εάν το οργανικό μόριο είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που βρίσκεται στο φωσφολιποειδικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης, τότε παρατηρείται βλάβη της μεμβράνης. Η οξείδωση των λιποειδών της μεμβράνης φαίνεται να αντιπροσωπεύει το κύριο φαινόμενο κατά την οξειδωτική κυτταρική βλάβη. Η πρόληψη της καταστροφής από

τις ρίζες του οξυγόνου εξαρτάται από ένα πολύπλοκο προστατευτικό σύστημα, του οποίου μέρος είναι και η βιταμίνη E.

Η βιταμίνη E που εντοπίζεται μέσα ή κοντά στις κυτταρικές μεμβράνες μπορεί να αντιδράσει με τις μη λιποειδικές ρίζες υπεροξειδίου, πριν αυτές αλληλεπιδράσουν με τις κυτταρικές μεμβράνες. Η βιταμίνη E μπορεί επίσης να διακόψει την αλυσίδα των επιθέσεων των ριζών, αντιδρώντας με τις λιπουπεροξειδικές ρίζες και προλαμβάνοντας περαιτέρω αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από τα λιπαρά οξέα ή άλλα οργανικά μόρια. Έτσι, η βιταμίνη E τερματίζει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις μετάδοσης. Παρ' όλα αυτά, η βιταμίνη E είναι λιγότερο αποτελεσματική στον τερματισμό της υπεροξειδωσης που παράγει ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, ή τις ρίζες αλκοξειδίου.

Η βιταμίνη E μπορεί να παρέχει ένα άτομο υδρογόνου για την αναγωγή των μη λιποειδικών ριζών υπεροξειδίου ή αντιδρά με τις λιπο-υπεροξειδικές ρίζες. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται και ως «εκκαθάριση ελευθέρων ριζών». Ο τερματισμός των αντιδράσεων αυτών επιτυγχάνεται όταν δύο ελεύθερες ρίζες συνδυάζονται για να σχηματίσουν ένα μόριο, το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα και δεν μπορεί να συνεχίσει την αντίδραση. Η οξειδωμένη βιταμίνη E θα πρέπει να αναγεννηθεί, κάτι που επιτυγχάνεται με την παρουσία της βιταμίνης C, της ανηγμένης γλουταθειόνης και NADPH. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι αντίστροφη προς τη βιταμινική τους, δηλαδή η τοκοφερόλη δ είναι ισχυρότερο αντιοξειδωτικό από την α-τοκοφερόλη.



Εικόνα 7: Μηχανισμός εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών με κεντρικό άτομο το οξυγόνο από την βιταμίνη E (Combs GF: The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health, ed 2, Orlando, 1998, Academic Press).

3.4.3 Μη αντιοξειδωτικές λειτουργίες της Βιταμίνης E

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές δράσεις της βιταμίνης E, έχουν αποδειχθεί και κάποιες μη αντιοξειδωτικές λειτουργίες για τις τοκοτριενόλες. Οι τοκοτριενόλες φαίνεται να επηρεάζουν το μεταβολισμό της χοληστερόλης. Από παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε ζώα και σε ανθρώπους έχει αποδειχθεί ότι οι τοκοτριενόλες μειώνουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης του πλάσματος. Οι τοκοτριενόλες μπορούν επίσης να καταστέλλουν την ανάπτυξη των όγκων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αν και δίαιτες πλούσιες σε

βιταμίνη Ε δεν σχετίζονται με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Η α-τοκοφερόλη μπορεί να αναστείλει την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία είναι σημαντική ως μοριακό σήμα για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση.

Η παρουσία των τοκοφερολών στα τρόφιμα είναι ευεργετική γιατί ως αντιοξειδωτικά προστατεύουν πολύτιμα συστατικά, όπως τα πολυακόρεστα οξέα, τα καροτένια και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).

3.4.4 Η σημασία των τοκοφερολών του ελαιολάδου στην ανθρώπινη υγεία

Η βιταμίνη Ε αποτελεί σημαντικό φυσικό αντιοξειδωτικό των ελαίων, αφού αναστέλλει την οξείδωση των λιπαρών ουσιών τους (τριγλυκερίδια), και προστατεύει το ελαιόλαδο από την υπεροξείδωση και από το μηχανισμό διάδοσης των ελευθέρων ριζών.

Οι τοκοφερόλες φαίνεται ότι έχουν ευεργετική δράση στην υγεία του ανθρώπου. Οι περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί περισσότερο, είναι οι εξής:

⬇ **Προστασία από στεφανιαία νόσο.**

Οι οξειδωτικές βλάβες θεωρείται ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη στεφανιαίων καρδιακών νοσημάτων (CHD) και καρκίνου. Οι Carmena et al (1966) εξέτασαν την επίδραση του ελαιόλαδου στη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), της οποίας οι αυξημένες συγκεντρώσεις σχετίζονται με τη στεφανιαία νόσο και παρατηρήθηκε ότι η βιταμίνη Ε, παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από δύο μελέτες των Choudhury et al. το 1995 και το 1997.

Γενικά τα αποτελέσματα των ερευνών πρόληψης, δείχνουν ότι η βιταμίνη Ε μπορεί να ασκήσει ευεργετικά αποτελέσματα, όσον αφορά τις καρδιαγγειακές παθήσεις μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Εντούτοις, καθώς αυτές οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν με συμπληρώματα υψηλών - δόσεων βιταμίνης Ε, παραμένει να ερευνηθεί εάν τα ίδια αποτελέσματα, μπορούν να ληφθούν με την πρόσληψη βιταμίνης Ε μέσα από τρόφιμα, όπως το ελαιόλαδο.

⬇ **Προστασία από τη νόσο Πάρκινσον**

Το ευεργετικό αποτέλεσμα φαίνεται ότι επιτυγχάνεται με τις συνήθεις ποσότητες της βιταμίνης που περιέχονται στα τρόφιμα.

↓ **Πρόληψη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως**

Σε έρευνα που έγινε στο Τέξας συμπεριλήφθηκαν 1000 άτομα και εξετάστηκε η ποσότητα βιταμίνης E που λάμβαναν από τη διατροφή τους. Επίσης, λήφθηκε υπ' όψη και η ποσότητα βιταμίνης E που έπαιρναν από φαρμακευτικά σκευάσματα. Ο στόχος της έρευνας ήταν να μελετηθεί η σχέση μεταξύ της πρόσληψης της βιταμίνης E και του κινδύνου προσβολής από τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτοί που έπαιρναν τη μεγαλύτερη ποσότητα βιταμίνης E από τη διατροφή τους είχαν 42% λιγότερο κίνδυνο για καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Εκείνοι που είχαν μια διατροφή πλούσια σε βιταμίνη E αλλά έπαιρναν και συμπληρώματα της βιταμίνης, είχαν 44% λιγότερο κίνδυνο για να προσβληθούν από τον καρκίνο αυτό. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η α-τοκοφερόλη είναι αυτή που προσφέρει προστασία από τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ενώ η γάμμα τοκοφερόλη δεν βρέθηκε να έχει μια τέτοια δράση.

Δεν είναι γνωστό με ποιο ακριβώς τρόπο ενεργεί η α-τοκοφερόλη για να προλαμβάνει την εμφάνιση καρκίνου. Οι επιστήμονες πιστεύουν ότι πιθανόν με την αντιοξειδωτική της δράση, η βιταμίνη E αποτρέπει αλλοιώσεις στο DNA των κυττάρων που οδηγούν σε καρκίνο.

Παρά το γεγονός ότι η βιταμίνη E μπορεί να λαμβάνεται δια μέσου φαρμακευτικών σκευασμάτων, φαίνεται ότι η πρόσληψη της δια μέσου των τροφίμων που είναι πλούσια σε αυτήν, είναι περισσότερο αποτελεσματική για την πρόληψη εναντίον του καρκίνου.

↓ **Πρόληψη του καρκίνου του προστάτη**

Σε μια επιδημιολογική έρευνα που συμπεριέλαβε 29.133 Φιλανδούς καπνιστές, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ της ποσότητας βιταμίνης E στο αίμα και του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη. Στην έρευνα αυτή βρέθηκε ότι οι άνδρες που είχαν ψηλότερα επίπεδα άλφα τοκοφερόλης στο αίμα τους, είχαν 53% λιγότερο κίνδυνο να προσβληθούν από καρκίνο του προστάτη. Οι άνδρες με τα ψηλότερα επίπεδα γάμμα τοκοφερόλης είχαν 39% χαμηλότερο κίνδυνο. Και στην έρευνα αυτή, η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης E διαμέσου χαπιών, αύξησε την προστασία από καρκίνο του προστάτη.

Έρευνες που παρουσιάστηκαν στο συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρείας για την Έρευνα στον Καρκίνο (American Association for Cancer Research), δείχνουν σημαντικό συσχετισμό μεταξύ της πρόληψης της βιταμίνης E και της πρόσληψης του καρκίνου του προστάτη και της ουροδόχου κύστης.

📌 Τοκοφερόλες και γονιμότητα

Η βιταμίνη E είναι αντιοξειδωτικό και αυτό σημαίνει ότι προστατεύει από τις οξειδωτικές ουσίες που παράγονται από τους ζωντανούς ιστούς. Οι ελεύθερες ρίζες που προκαλούν την οξείδωση αυτή μπορεί να βλάψουν σοβαρά την δομή των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και το περιεχόμενο των ζωντανών κυττάρων. Η βλάβη αυτή μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο των κυττάρων αυτών. Ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου βρίσκονται στο σπέρμα. Υψηλές ποσότητες τέτοιων ελευθέρων ριζών μπορεί να ευθύνονται για υπογονιμότητα.

Η βιταμίνη E βοηθά επίσης στην διατήρηση της ελαστικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων των σπερματοζωαρίων, πράγμα που βοηθά στην κινητικότητα τους και εμποδίζει την συγκόλληση τους.

📌 Αναπνευστικά προβλήματα

Τα υψηλά επίπεδα βιταμίνης E στο αίμα είναι πιθανό να συνδέονται με την προστασία των πνευμόνων, σύμφωνα με έρευνα επιστημόνων από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Μπάφαλο της Νέας Υόρκης.

Ο Δρ Χόλγκερ Τζ.Σούνεμαν και οι συνεργάτες του μελέτησαν την πνευμονική λειτουργία σε 1.616 άτομα ηλικίας 35 έως 79 ετών, χωρίς προβλήματα υγείας στο αναπνευστικό σύστημα και τη σύγκριναν με τα επίπεδα της βιταμίνης E και της β-κρυπτοξανθίνης, ενός καροτινοειδούς που υπάρχει στα πορτοκάλια.

Τα αποτελέσματα της έρευνας, που δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, έδειξαν ότι τα άτομα με υψηλά επίπεδα βιταμίνης E και β-κρυπτοξανθίνης είχαν υγιέστερους πνεύμονες σε σχέση με αυτούς που είχαν χαμηλές συγκεντρώσεις των αντίστοιχων ουσιών στο αίμα τους. Οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι και άλλες βιταμίνες, όπως η C και η A, πιθανόν να σχετίζονται με καλύτερη πνευμονική λειτουργία, αλλά η παρουσία της E έχει σημαντικότερη θετική επίδραση στο αναπνευστικό σύστημα.

⬇ Συμβολή στην μείωση κρίσεων επιληψίας

Έρευνα που εκπονήθηκε στην ιατρική σχολή του Τορόντο στον Καναδά, έδειξε πως η βιταμίνη E είναι δυνατόν να μειώσει τις κρίσεις επιληψίας ακόμη και σε ποσοστό που μπορεί να φτάσει το 100%. Η έρευνα περιλάμβανε 12 επιληπτικά παιδιά στα οποία δόθηκαν 400 IU βιταμίνης E μαζί με την συνηθισμένη φαρμακευτική αγωγή κατά της επιληψίας. Στα 10 από τα 12 παιδιά σημειώθηκε μείωση των κρίσεων σε ποσοστό 60% κατά μέσο όρο. Έξι από τα δώδεκα παιδιά παρουσίασαν 90-100% μείωση των κρίσεων, ενώ στους εθελοντές που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου (στους οποίους χορηγήθηκε μόνο βιταμίνη E και καθόλου φαρμακευτική αγωγή), η βελτίωσή τους ήταν αισθητή και οι κρίσεις τους μειώθηκαν κατά 70-100%.

⬇ Άλλες ευεργετικές δράσεις.

Επιπλέον, υπάρχουν πολλά στοιχεία όσον αφορά τα ευεργετικά αποτελέσματα της βιταμίνης E, στις μεταβολικές διαδικασίες που σχετίζονται με διάφορες άλλες ασθένειες.

Η έρευνα του Boscoboinik και των συνεργατών του έδειξε ότι η α-τοκοφερόλη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις παρεμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών κυττάρων των λείων μυϊκών ινών, μια διαδικασία που σχετίζεται με το σχηματισμό ενδιάμεσης αρτηριοσκληρυντικής βλάβης. Μια άλλη ομάδα, παρατήρησε μείωση στην απελευθέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου, στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, στην έκκριση ιντερλευκίνης -1β-, και στη προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μονοκύτταρα, σε υγιείς ανθρώπους, μετά από χορήγηση 800 mg/ημέρα βιταμίνης E, επί οκτώ εβδομάδες. Επίσης βρέθηκε, ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων εμποδίζεται από τη λήψη 268 έως 804 mg α-τοκοφερόλης/ημέρα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι τα οφέλη που παρατηρούνται δεν συσχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της βιταμίνης E, αλλά μάλλον, με το γεγονός ότι η α-τοκοφερόλη ασκεί άμεση επίδραση στην έκφραση των γονιδίων, σχετικά με τα μόρια προσκόλλησης, ή στη δραστηριότητα ενζύμων όπως η 5-λιποξυγενάση ή στην πρωτεϊνική κίνηση C.

3.5 Φύλλα ελιάς και αντιοξειδωτικά

Το ελαιόδεντρο (*Olea Europaea*, *Oleaceae*) είναι ένα από τα σημαντικότερα καρποφόρα δέντρα στις Μεσογειακές χώρες. Πολλά στοιχεία για τις πολυφαινόλες των

καρπών της ελιάς και του ελαιόλαδου έχουν παρουσιαστεί, αλλά λίγες μελέτες έχουν δημοσιευτεί για τις πολυφαινόλες των φύλλων του ελαιόδεντρου.

Λίγες έρευνες έχουν εστιάσει στην απομόνωση, την ταυτοποίηση και την ενδεχόμενη αντιοξειδωτική δράση ορισμένων ενώσεων που έχουν βρεθεί στα φύλλα του ελαιόδεντρου. Ωστόσο, στην σύγχρονη ιατρική και στην φυτοθεραπεία χρησιμοποιούν τα φύλλα της ελιάς για να θεραπεύσουν και να προλαμβάνουν την υπέρταση. Ιστορικά, τα φύλλα ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί ως παραδοσιακή θεραπεία για επίμονους πυρετούς και άλλες ασθένειες, όπως η ελονοσία.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα από τα φύλλα της ελιάς έχουν την ικανότητα να μειώνουν την πίεση του αίματος στα ζώα και να αυξάνουν τη ροή του αίματος στις στεφανιαίες αρτηρίες, να απαλλάσσουν από την αρρυθμία και να αποτρέπουν τους μυϊκούς σπασμούς του εντέρου.

Η πικρή ένωση ολευροπαΐνη, το σημαντικότερο συστατικό της οικογένειας των secoiridoid στα ελαιόδεντρα, έχει δείχθει ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό προικισμένο με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Η ολευροπαΐνη είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση και η υδρόλυσή της οδηγεί σε αντιμικροβιακές ενώσεις. Η υδροξυτυροσόλη είναι το κυριότερο προϊόν της υποβάθμισης της ολευροπαΐνης. Είναι προικισμένη με αρκετές βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντιοξειδωτικές ιδιότητες και δεν είναι διαθέσιμη στο εμπόριο. Τα φύλλα ελιάς μπορεί να είναι χρήσιμες πηγές για εξαγωγή ολευροπαΐνης.

Τα φύλλα της *Olea Europaea* χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση:

- 1) ολευροπαΐνης**, έναν γλυκοζιτικό εστέρα του ελενολικού οξέος
- 2) υδροξυτυροσόλη** (3,4 διυδροξυφαιθυλαιθανόλη).

Αρκετοί άλλοι 3,4 διυδροξυφαιθυλαιθελικοί εστέρες υπάρχουν ακόμα σε μικρά ποσά: Διμεθυλολευροπαΐνη, non-glycosidic secoiridoids, oleuroside και verbascoside, ένας εστέρας του καφεϊκού οξέος. Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί ligstroside, ένας γλυκοζιτικός εστέρας του ελενολικού οξέος και

- 3) τυροσόλη.**

Εκτός από τις παραπάνω ενώσεις, γλυκοζιωμένα φλαβονοειδή συχνά ανιχνεύονται στα φύλλα ελιάς της *Olea Europaea*. Κυρίως :

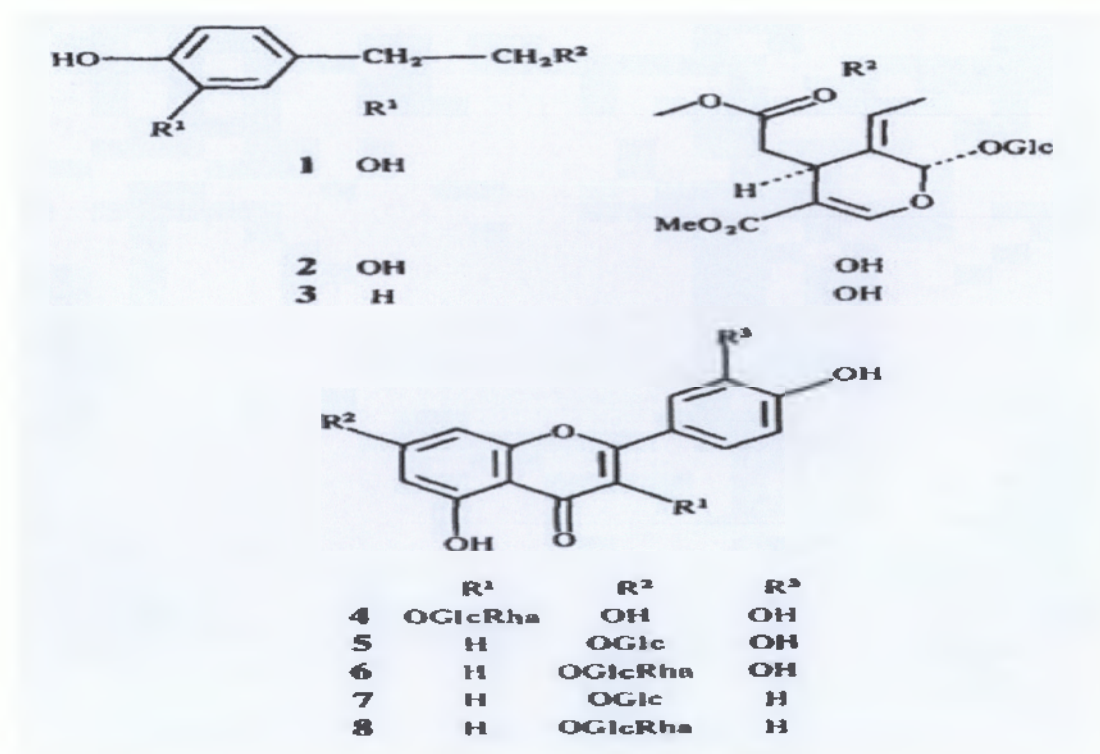
4) ρουτίνη

5) γλυκοζίτες της λουτεολίνης (λουτεολίνη 7-glucoside)

6) λουτεολίνη 4'- glucoside, και γλυκοζίτες της απιγενίνης

7) απιγενίνη 7-glucoside

8) απιγενίνη 7-rutinoside.



Εικόνα 8 : Δομές φαινολικών ενώσεων στα φύλλα της *Olea Europaea*.

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των αντιοξειδωτικών ενώσεων στα φύλλα του ελαιόδεντρου της *Olea Europaea* έχουν γίνει σε διάφορες ποικιλίες και καλλιέργειες της ελιάς. Όπως ξέρουμε, οι πολυφαινόλες

παρουσιάζουν διακυμάνσεις στα επίπεδά τους ακόμα και όταν μελετάμε καλλιέργειες του ίδιου είδους.

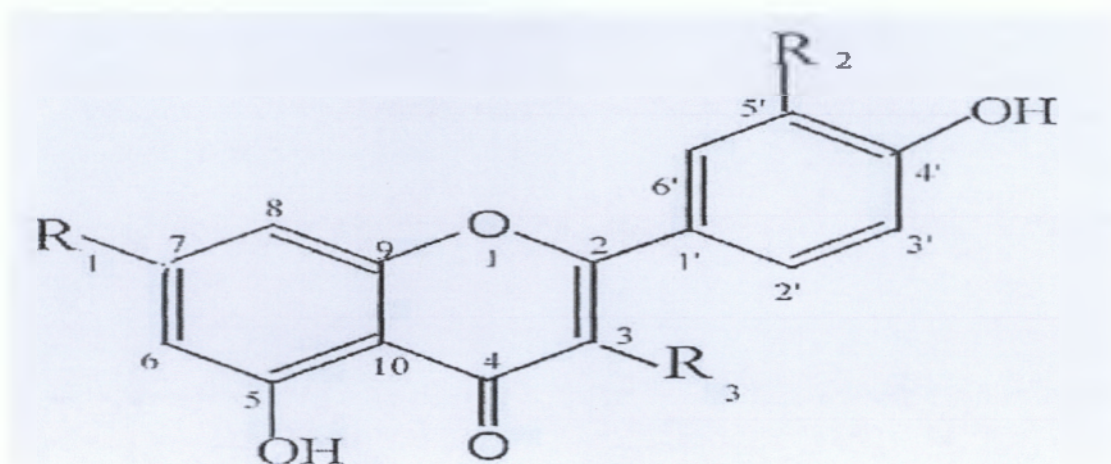
Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Mohamed Bouaziz και Sami Sayadi, χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ελιάς από την ποικιλία Chemlali της *Olea europaea*, που συνήθως καλλιεργείται στην Τυνησία.

Μαζεύτηκαν 9 δείγματα από φρέσκα πράσινα φύλλα από την αρχή του σχηματισμού του καρπού του ελαιόδεντρου και χρησιμοποίησαν διάφορα μίγματα διαλυτών για την εκχύλιση και την ταυτοποίηση της ολευροπαΐνης.

Το υψηλότερο ποσοστό ολευροπαΐνης αποκτήθηκε χρησιμοποιώντας μεθανόλη/νερό σε αναλογία 8:2 v/v ως εκχυλιστικό μίγμα. Η συγκέντρωση της ολευροπαΐνης στα φύλλα υπολογίστηκε για κάθε συγκομιδή. Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλές αποκλίσεις της συγκέντρωσης της ολευροπαΐνης καθ' όλη τη διάρκεια της συγκομιδής. Κυμαινόταν από 12,4 μέχρι 14,2% και ήταν σε περίσσεια σε σύγκριση με τις άλλες φαινολικές ενώσεις. Δηλαδή, η ολευροπαΐνη ήταν πάντα το κυρίαρχο συστατικό των φύλλων της ελιάς, σε αντίθεση με τις μονομερείς φαινόλες οι οποίες αποτελούσαν τα δευτερεύοντα συστατικά. Η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης υπολογίστηκε είτε ζυγίζοντας την καθαρή υδροξυτυροσόλη που ανακτήθηκε ή με τη μέθοδο HPLC. Η υδροξυτυροσόλη ανακτήθηκε με υδρόλυση από την ολευροπαΐνη και από άλλα συστατικά του εκχυλίσματος που περιέχουν υδροξυτυροσόλη μετά από επεξεργασία με οξύ.

Οι φαινολικές ενώσεις που επίσης ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς της ποικιλίας **Chemlali** ήταν οι φλαβόνες:

- ✓ λουτεολίνη 7- o- glucoside
- ✓ λουτεολίνη 7- o- rutinoside
- ✓ απιγενίνη 7- o- glucoside
- ✓ λουτεολίνη
- ✓ απιγενίνη και η
- ✓ ρουτίνη, μια φαλβονόλη



Εικόνα 9: Δομές των φλαβονοειδών που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς της ποικιλίας **Chemlali**. (1) Λουτεολίνη 7-O-glucoside, $R_1 = \text{O-γλυκόζη}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$. (2) Λουτεολίνη 7-O-rutinoside, $R_1 = \text{O-rutinoside}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$. (3) Ρουτίνη, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{O-rutinoside}$. (4) Απιγενίνη 7-O-glucoside, $R_1 = \text{O-γλυκόζη}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$. (5) Λουτεολίνη, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$. (6) Απιγενίνη, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$.

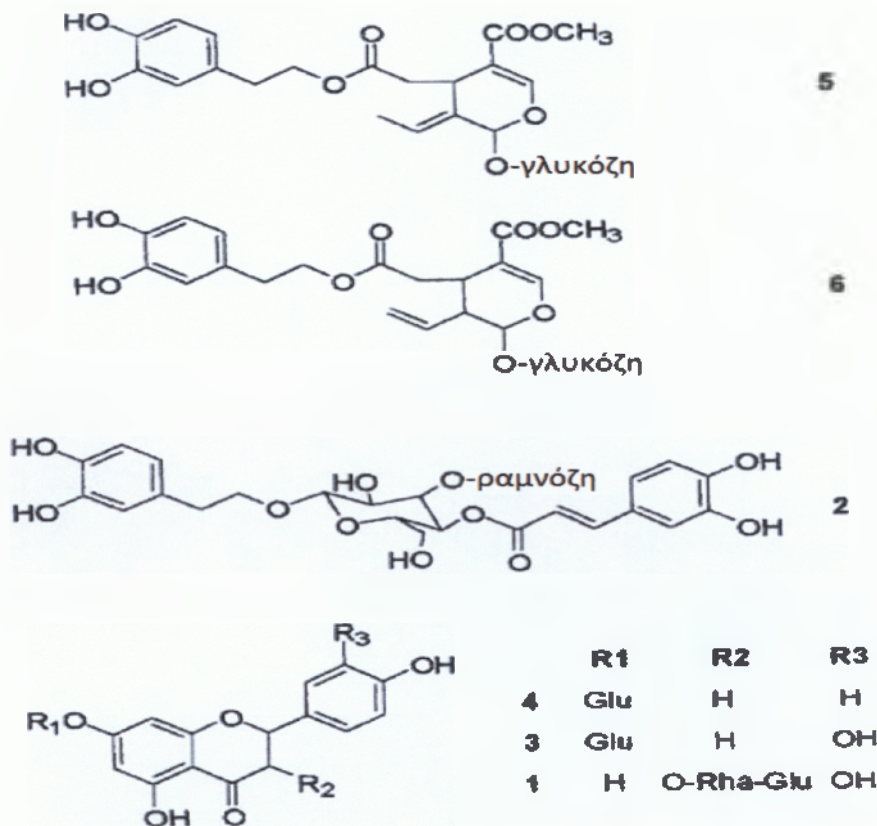
Οι Raffaella Briante και συνεργάτες χρησιμοποίησαν για την έρευνά τους φύλλα από την ποικιλία Moraiolo της περιοχής Umbria της Ιταλίας. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με διαλύτη αιθανόλη/ νερό σε αναλογία 1: 1 v/ v. Η ανάλυση του εκχυλίσματος με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας έδειξε την παρουσία **τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης, συριγγικού οξέος, ολευροπαΐνης και ολευροπαΐνης aglycon**. Επίσης, παρατηρήθηκε η ύπαρξη σε ίχνη **γαλλικού οξέος και φερουλικού οξέος**.

Οι Savournin και συνεργάτες εξέτασαν το φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων ελιάς 14 ποικιλιών της Olea europaea. Η έρευνα έγινε σε 11 γαλλικές ποικιλίες (Aglandau, Cailletier, Cayet Rouge, Cayon, Grossanne, Lucques, Picholine, Picholine Noire, Tanche, Verdale de l'Hérault, Verdale- Picholine hybrid) και 3 ποικιλίες που συνήθως καλλιεργούνται στην Τυνησία (Bid el Haman, Chemlali και Meski).

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο HPLC ήταν εκχυλίσματα από τα φύλλα σε 60% υδατική μεθανόλη. Τα χρωματογραφικά προφίλ των διαφόρων ποικιλιών που μελετήθηκαν δεν έδειξαν καμία διαφορά στην ποιοτική τους σύνθεση.

Οι σημαντικότερες ενώσεις που εκχυλίζονται από τα φύλλα της ελιάς είναι secoiridoids, φλαβονοειδή και verbascoside.

Οι κύριες ενώσεις που ανιχνεύτηκαν με την υγρή χρωματογραφία (HPLC) ήταν: η ρουτίνη, verbascoside, λουτεολίνη 7-glucoside, απιγενίνη 7-glucoside, ολευροπαΐνη και oleuroside. Η διμεθυλολευροπαΐνη δεν ανιχνεύτηκε στα εκχυλίσματα των φύλλων σε καμία από τις 14 ποικιλίες ελαιόδεντρου που μελετήθηκαν. Η συγκέντρωση της ολευροπαΐνης υπολογίστηκε για κάθε ποικιλία και υπήρχαν σημαντικές διακυμάνσεις.



Εικόνα 10: Δομές των φαινολικών ενώσεων των φύλλων ελιάς της *Olea europaea*: 1.ρουτίνη, 2.verbascoside, 3.λουτεολίνη 7-glucoside, 4.απιγενίνη 7-glucoside, 5.ολευροπαΐνη, 6.oleuroside.

Οι Benavente-Garcia και συνεργάτες μελέτησαν 5 ποικιλίες ελιάς της *Olea europaea* ως προς το φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων τους. Οι ποικιλίες προέρχονταν από τις περιοχές της Ανδαλουσίας και της Μούρθιας στη νότια Ισπανία και ήταν οι εξής: Villalonga, Alfafarenca, Picual, Cornicabra και Blanqueta.

5 κατηγορίες φαινολικών ενώσεων βρίσκονται κυρίως στα φύλλα.

- Oleuropeosides (ολευροπαΐνη και verbascoside)
- Φλαβόνες (λουτεολίνη 7-glucoside, απιγενίνη 7-glucoside, διοσμίνη 7- glucoside, λουτεολίνη, διοσμίνη)
- Φλαβονόλες (ρουτίνη)
- Φλαβανόλες (κατεχίνη)
- Substituted φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, βανιλίνη, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ).

Η πιο άφθονη ένωση στα φύλλα ελιάς είναι η ολευροπαΐνη, ακολουθεί η υδροξυτυροσόλη, οι φλαβόνες 7-γλυκοζίτες της λουτεολίνης και της απιγενίνης και verbascoside. Verbascoside είναι ένας συζευγμένος γλυκοζίτης υδροξυτυροσόλης και καφεϊκού οξέος.

Φαινολικές Ενώσεις	Χημικός Τύπος
Ελευρωπαΐνη	
Υδροξυτυροσόλη	
Verbascoside	
Απιγενίνη-7-γλυκοζίτης	
Λουστελίνη-7-γλυκοζίτης	

Εικόνα 11: Χημικές δομές των πιο άφθονων φαινολικών ενώσεων στα φύλλα ελιάς *Olea europaea*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

4.1 Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography)

4.1.1 Γενικά στοιχεία για τη μέθοδο HPLC

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*High Performance Liquid Chromatography*), ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή υγρού χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (οργανικοί, νερό, ρυθμιστικά διαλύματα και άλλα), υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή από πολυμερείς ενώσεις (Ανδρικόπουλος, 1999).

Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης, η μέθοδος HPLC αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού αυτών, ή της ιοντο-ανταλλαγής ή τέλος της μοριακής διήθησης.

Η συσκευή HPLC αποτελείται από διάφορα όργανα και εξαρτήματα, τα οποία συνδεδεμένα λειτουργούν ως ενιαίο συγκρότημα. Τα βασικότερα από αυτά είναι:

- **Αντλία:** Η αντλία είναι η καρδιά ενός συστήματος HPLC. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής) της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6000 psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλουση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλουση η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.

- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος:** Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής, η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-

500 μl. Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη.

- **Στήλες:** Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξειδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3 mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη λειτουργία του συστήματος. Το μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100 cm. Συνήθως κατασκευάζονται στήλες μήκους 25-30 cm. Η αποτελεσματικότητα μιας στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Από πρώτη άποψη είναι φανερό ότι μια μακριά στήλη ή μιας σειράς στηλών θα έχει οπωσδήποτε μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών. Όμως, ταυτόχρονα η διάρκεια του διαχωρισμού θα είναι μεγαλύτερη. Αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της διαμέτρου των κόκκων του πληρωτικού υλικού. Το μέγεθος των κόκκων δεν πρέπει να είναι μόνο μικρό αλλά και ομοιόμορφο, το δε σχήμα σφαιρικό. Βασικό στοιχείο καθορισμού του αριθμού των θεωρητικών πλακών είναι η σταθερότητα παροχής της αντλίας, καθώς και η ελάχιστη παροχή. Επίσης, σημαντικός παράγοντας είναι η εσωτερική διάμετρος της στήλης. Μια λεπτή στήλη απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος και φυσικά λίγο διαλύτη, επιτρέποντας εξοικονόμηση διαλύτη έως 80%.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης, ως προς τη φύση του μπορεί να είναι:

A) πορώδες, με βάση τη πυριτική γη (silica)

B) μη πορώδες (pellicular)

Γ) σκληρή πηκτή, με βάση το πολυστορόλιο.

Τα παραπάνω υλικά αντέχουν σε πιέσεις μέχρι 5000 psi (Romani A., et al., 2002).

Η στατική φάση μπορεί να καλυφθεί στο αδρανές υλικό:

A) κατόπιν διάλυσης της στατικής φάσης στον κατάλληλο διαλύτη, προσθήκης του αδρανούς υλικού, ανάμειξης και απομάκρυνσης του διαλύτη με εξάτμιση υπό «κενό»

B) χημικά, οπότε προκύπτει η λεγόμενη δεσμευμένη στατική φάση (bonded phase). Συνήθως χρησιμοποιούνται υποστρώματα με βάση τη πυριτική γη, επί της οποίας με χημική αντίδραση προστίθεται η επιθυμητή ομάδα.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και κινητής φάσης διακρίνεται σε:

A) κανονικής φάσης (normal phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλύονται τελευταίες από τη στήλη.

B) ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

• **Ανιχνευτές:** Χρησιμοποιούνται ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν.

Φωτόμετρο UV-Vis: Είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή για την HPLC. Οι ουσίες που μπορούν να αναλυθούν με αυτόν πρέπει να απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 190-600 nm. Υπάρχουν τρεις τύποι του ανιχνευτή αυτού:

- 1) Ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος
- 2) Ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μήκων κύματος
- 3) Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος, βοηθά στη διαπίστωση της «καθαρότητας» μιας χρωματογραφικής κορυφής (εάν δηλαδή αυτή οφείλεται σε μια μόνο ουσία), γιατί μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες από μια πλήρη σάρωση μιας ευρείας περιοχής συχνοτήτων.

• **Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής:** Ο καταγραφέας αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσιάσεως του χρωματογραφήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί καταγραφέα είναι εφοδιασμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή (Parageorgiou VP et al., 1997; Romani A., et al., 2002).

4.1.2 Αρχή της μεθόδου.

Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για το διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού.

4.1.3 Ανάλυση των πολυφαινολών με HPLC

Σε ότι αφορά στο διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολυφαινολών στα φυσικά προϊόντα, τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται σχεδόν αποκλειστικά μέθοδοι αναλυτικής χρωματογραφίας. Κατόπιν αποδοχής του Οργανισμού Αναλυτικής Χημείας (*Association of Official Analytical Chemists, AOAC*), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-ανάστροφης φάσης (*reversed-phase high pressure liquid chromatography, RP-HPLC*) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (*ultraviolet-visible, UV-Vis*), αποτελεί την πρώτιστη μέθοδο ανάλυσης, για δεδομένες αναλύσεις (Romani *et al.*, 1999). Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται με τη σύγκριση των εξαγόμενων κορυφών με αυτές πρότυπων (*standard*) ουσιών.

Με RP-HPLC, συνδυασμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και κινητή φάση ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ, έχει δείχθει ότι μπορούν ταυτόχρονα να διαχωριστούν και ποσοτικοποιηθούν οι κύριες φαινολικές ενώσεις, όπως π.χ. αυτές που παραλαμβάνονται από εκχύλιση του ελαιολάδου (Akasbi *et al.*, 1993). Το 1998 περιγράφηκε η ποσοτικοποίηση τεσσάρων κατεχινών και καφεΐνης σε εκχύλισμα τσαγιού με κινητή φάση ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ ή μεθανόλη-οξικό οξύ (Bronner *et al.*, 1998). Παρόμοια, τα επίπεδα των κερκετίνης, кемπερόλης, μυρισετίνης και λουτεολίνης σε εκχύλισμα τσαγιού μετρήθηκαν με RP-HPLC χρησιμοποιώντας κινητή φάση μεθανόλη-φωσφορικό οξύ ή ακετονιτρίλιο-φωσφορικό οξύ. Πολλά ακόμη RP-HPLC συστήματα έχουν εφαρμοσθεί στην προσπάθεια μέτρησης φαινολικών ενώσεων.

Έτσι, το 1999 ο Brenes και οι συνεργάτες του με εφαρμογή HPLC χαρακτήρισαν σε παρθένα ελαιόλαδα της Ισπανίας απλές φαινόλες, όπως το βανιλικό οξύ, και τη βανιλίνη και φλαβονοειδή, ενώ για την ταυτοποίηση της χημικής δομής μιας νέας ένωσης (4-

ακετοξυαιθυλο-1,2-διυδροξυ-βενζόλιο) εφαρμόστηκαν MS και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*nuclear magnetic resonance, NMR*). Όμοια, με MS και NMR βρέθηκαν στο ελαιόλαδο οι λιγνάνες (+)-1-ακετοξυπινορεσινόλη και (+)-πινορεσινόλη, μείζονα συστατικά του παρθένου ελαιολάδου και μόνο (Owen *et al.*, 2000).

Εκτός από τη RP-HPLC/UV-Vis ή ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, έχουν εφαρμοστεί συστήματα όπως υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή υπερύθρου (*infrared liquid chromatography, IR-LC*) (Visser *et al.*, 1997) και υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή κυκλικού διχρωϊσμού (*circular dichroism liquid chromatography, CD-LC*) (Bringmann *et al.*, 1999).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη κι εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*LC-NMR*) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα της χημικής δομής άγνωστων φαινολικών συστατικών, εκτός των μεγαλομοριακών ταννινών.

4.2 Η μέθοδος GSC-MS

4.2.1 Γενικά

Αντίστοιχα με την υγρή χρωματογραφία, υπάρχει και η αέρια χρωματογραφία, (*Gas Chromatography*) όπου ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή αέριου χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια (άζωτο ή ήλιο), υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή στερεό προσροφητικό μέσο που συνιστά τη στερεή ή φέρουσα φάση με μόνιμη επικάλυψη υγρής φάσης (Ανδρικόπουλος, 1999).

Με τη μέθοδο GLC οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί γίνονται με την αρχή της κατανομής (*Gas-Liquid Chromatography–GLC*), ενώ με τη μέθοδο GSC με την αρχή της προσρόφησης (*Gas-Solid Chromatography–GSC*). Τέλος, οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί μπορούν να γίνουν με συνδυασμό κατανομής- προσρόφησης.

Η συσκευή GSC αποτελείται από διάφορα όργανα και εξαρτήματα, τα οποία συνδεδεμένα λειτουργούν ως ενιαίο συγκρότημα. Τα βασικότερα από αυτά είναι:

- Οι φιάλες των αερίων της κινητής φάσης (carrier gases), He ή N₂ και των αερίων που απαιτούνται για τη λειτουργία των ανιχνευτών (π.χ. H₂ και αέρας για τον ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID)). Οι φιάλες αυτές (οβίδες) είναι σιδερένιοι κύλινδροι με ρυθμιστές πίεσης.

- Ο θάλαμος εισαγωγής του δείγματος (injector). Στο θάλαμο αυτό εισάγεται το δείγμα υπό μορφή διαλύματος με ειδική σύριγγα. Ο θάλαμος έχει υψηλή θερμοκρασία ρυθμιζόμενη με θερμοστάτη. Το δείγμα εξαερώνεται στον εισαγωγέα και τα αέρια της κινητής φάσης το παραλαμβάνουν και το οδηγούν μέσα από τη στήλη προς τον ανιχνευτή.

- Η στήλη ανάλυσης (column) μέσα στο θάλαμο θέρμανσης (oven). Στο εσωτερικό του βρίσκεται ειδικά συσκευασμένο υπό πίεση (packed) το προσροφητικό υλικό επί του οποίου θα γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η στήλη θερμαίνεται προηγουμένως σε καθορισμένη θερμοκρασία για το κάθε είδος ανάλυσης.

- Ο φούρνος (oven) με τους θερμοστάτες για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του και τα υπόλοιπα ηλεκτρονικά μέρη. Σε αυτόν μέσα βρίσκεται η στήλη και η θερμοκρασία του ρυθμίζεται μέχρι και 350-400⁰ C.

- Ο ανιχνευτής (detector), για την ανίχνευση των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος. Ανάλογα με τη μέθοδο ανίχνευσης κάθε εκλούσιμη κορυφή παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα το οποίο μεταβιβάζεται στον υπολογιστή.

- Το φασματοόμετρο μάζας (mass spectrometer) είναι ένας ανιχνευτής μέσω του οποίου καταγράφονται τα φάσματα μάζας των διαχωρισμένων συστατικών και χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση τους.

- Το σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων, αποτελούμενο από τον ολοκληρωτή (integrator) ή τον υπολογιστή (computer), για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και από τον καταγραφέα (recorder), για την καταγραφή του χρωματογραφήματος (Visser *et al.*, 1997).

4.2.2 Αρχή της μεθόδου

Με τρόπο ανάλογο της υγρής χρωματογραφίας, τα συστατικά μεταβαίνουν από τον εισαγωγέα στη στήλη και διαχωρίζονται με τη βοήθεια του φέροντος αερίου και της θερμοκρασίας του φούρνου. Επιπρόσθετα, για την αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας ορισμένων συστατικών συχνά απαιτείται παραγωγοποίηση αυτών.

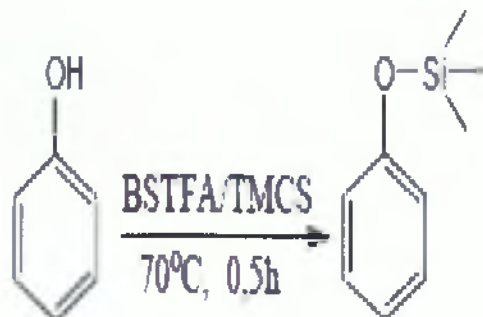
Σε ότι αφορά στο φασματόμετρο μάζας της συσκευής GSC, η διαδικασία περιλαμβάνει το βομβαρδισμό του συστατικού με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενεργείας έτσι ώστε αποβάλλεται από το μόριο της ένωσης ένα e⁻. Ως εκ τούτου, λαμβάνεται το φάσμα της ένωσης, χαρακτηριστικό για αυτήν (Miketova et al., 1998).

4.2.3 Ανάλυση των πολυφαινολών με GSC-MS

Κατά κοινή ομολογία, ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (*gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS*), θεωρείται βασικό εργαλείο για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου φυσικών προϊόντων, καθώς είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος, κατάλληλη για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων, από τη CGC. Στην περίπτωση των πολικών φαινολών εφαρμόζονται μέθοδοι παραγωγοποίησης για την αύξηση της πολικότητας και σταθερότητας των ενώσεων. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος δημιουργίας παραγώγων είναι η μέθοδος δημιουργίας τριμέθυλοσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS (Εικόνα 12).

Παράλληλα, σε ότι αφορά την εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας (*mass spectrometry, MS*) επιτρέπεται πλέον η ταυτοποίηση πολικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες. Έχει γίνει αποδεκτό, πως η απευθείας ανάλυση ολικού εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού με φασματομετρία μάζας-ανιχνευτή ιοντισμού ελάχιστα μπορεί να οδηγήσει σε ταυτοποίηση πολυφαινολών κι άλλων μικροσυστατικών, χωρίς να έχει προηγηθεί ανάλυση HPLC (Roop et al., 1998). Την ίδια εποχή, αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές φασματομετρίας μάζας με ιοντισμό για τον προσδιορισμό ήδη γνωστών κατεχινών του τσαγιού, οι οποίες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι καλύτερα αποτελέσματα είναι δυνατό να παραληφθούν, αν με φασματομετρία μάζας αναλυθούν συστατικά του εκχυλίσματος απομονωμένα μετά από ανάλυση HPLC (Miketova et al., 1998). Από τους

ίδιους ερευνητές απεδείχθει πως ο ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών μπορεί να είναι πολύ ακριβής με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (*liquid chromatographyelectrospray ionization mass spectrometry, LC-ESIMS*).



Εικόνα 12: Δημιουργία τριμέθυλοσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS.

4.3 Προσδιορισμός Ολικών φαινολών

Η εκτίμηση φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων γίνεται σχεδόν αποκλειστικά με τη χρωματομετρική δοκιμή Follin-Ciocalteau (F-C) (Singleton et al, Rancorbo et al, 2005). Παρά τα μειονεκτήματά της αυτή η δοκιμή, φαίνεται να πλεονεκτεί και να είναι αρκετά διαδεδομένη. Ο προσδιορισμός που διεξάγεται σε αλκαλικό περιβάλλον, στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστήριου Follin-Ciocalteau με τις λειτουργικές υδροξύ ομάδες των φαινολικών ενώσεων, οπότε λαμβάνει χώρα οξείδωση των φαινολών και αναγωγή του αντιδραστήριου σε μίγμα έγχρωμων οξειδίων (W_8O_{23} M_8O_{23} μπλε χρώμα). Η συγκέντρωση ενός φυτικού εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες εκφράζεται ως mg πρότυπης φαινόλης ανά kg ή (g) φυτικού υλικού ή δείγματος.

Το αποτέλεσμα μπορεί να επηρεαστεί ουσιαστικά από την επιλογή του προτύπου και η σχετική συγκέντρωση των επιμέρους φαινολών στο προς ανάλυση δείγμα, καθώς και η μοριακή απορρόφηση ανά δραστική ομάδα φαινολών διαφοροποιείται (Blekas et al., 2002a; Hencirik & Fritsche, 2004).

Το σημαντικότερο μειονέκτημα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η μικρή εκλεκτικότητα της, καθώς και η παρουσία αναγόντων σακχάρων, ασκορβικού οξέος, αμινοξέων, ιόντων σιδήρου και ψευδαργύρου όπου μπορούν να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό. Επιπρόσθετα, μεταξύ των μειονεκτημάτων της συγκαταλέγονται:

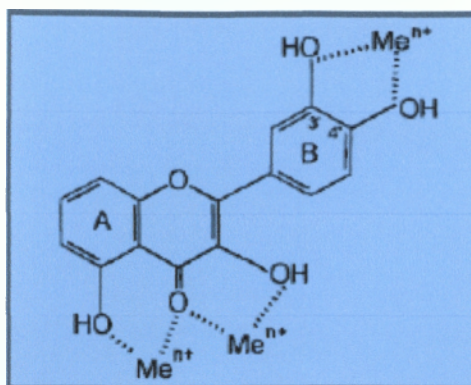
- Ο απαιτούμενος χρόνος (παραπάνω από 1h)
- Η μη εύχρηστη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων εφαρμογή της (τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου όπου εφαρμόστηκε από την Gutfinger (1981) σε πολικό εκχύλισμα ελαιόλαδου)
- Το σχετικό υψηλό κόστος του ειδικού αντιδραστηρίου
- Η σημαντική απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, η οποία μετά την αντίδραση, δεν μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

Τέλος, παρόλο όμως το συνεχές ενδιαφέρον για την αξιοποίηση φαινολικών πηγών και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος, δεν έχει αντικατασταθεί.

4.4. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Για την ανάπτυξη μεθόδων για την εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών που περιέχονται σε ένα φυτικό εκχύλισμα κατέληξαν στην βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων που στηρίζονται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης μεταξύ μετάλλων και φλαβονοειδών. Τα έγχρωμα προϊόντα της συμπλοκοποίησης μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν χρωματομετρικά (Harborne, 1989; Voirin, 1993; Naczki & Shahidi, 2004; Malesev & Kuntic, 2007). Παρόλο που συνιστώνται τέτοιου τύπου χρωστομετρικές δοκιμές, η εκλεκτικότητά τους θεωρείται αμφισβητήσιμη στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα (Malesev & Kuntic, 2007).

Σε ένα φλαβονοειδές τα πιθανά κέντρα συμπλοκοποίησης είναι οι κατεχολικές ομάδες του δακτυλίου B και οι 3- ή 5-υδροξύ 4-καρβομυλο ομάδες των δακτυλίων A και C.



Εικόνα 13: Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών-μετάλλων (Pietta, 2000).

Στην περίπτωση υποστρωμάτων με ταυτόχρονη παρουσία φλαβονοειδών και άλλων ενώσεων που έχουν παρόμοια δομικά και χημικά χαρακτηριστικά με αυτά των φλαβονοειδών (π.χ. κατεχολικές ομάδες) υπάρχει κίνδυνος λανθασμένων εκτιμήσεων.

4.5 Δοκιμές δέσμευσης ελευθέρων ριζών

Οι δοκιμές εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών, μεταξύ των διάφορων δοκιμών εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, βρίσκουν εφαρμογή σε τρόφιμα και βιολογικά συστήματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δέσμευση ελευθέρων ριζών αποτελεί τον κύριο μηχανισμό δράσης των παρεμποδιστών οξειδωσης, τουλάχιστον στα τρόφιμα (Gordon, 2001; Roginsky & Lissi, 2005). Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών μπορεί να αξιολογηθεί μέσω διάφορων απλών, οικονομικών και γρήγορων πειραματικών δοκιμών. Αυτές στοχεύουν στην προσφορά ποσοτικής πληροφορίας σχετικά με την αντιοξειδωτική ισχύ των μελετώμενων δειγμάτων σε συστήματα τροφίμων, αλλά και στην πρόβλεψη πιθανής συμπεριφοράς τους *in vivo*. Οι δοκιμές αυτές βρίσκουν ευρεία εφαρμογή, παρά το γεγονός ότι οι ρίζες που χρησιμοποιούνται δεν είναι πάντοτε συναφείς προς αυτές των ρεαλιστικών συνθηκών οξειδωσης ή ακόμα και οι εφαρμοζόμενες συνθήκες δεν παρομοιάζουν πάντοτε σε εκείνες που επικρατούν *in vivo* (Frankel, 2007).

Δημοφιλέστερο εργαλείο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα πεδία των επιστημών τροφίμων και υγείας αποτελεί η γρήγορη και απλή δοκιμή δέσμευσης της συνθετικής ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH•). Άλλη αξιόπιστη, γρήγορη

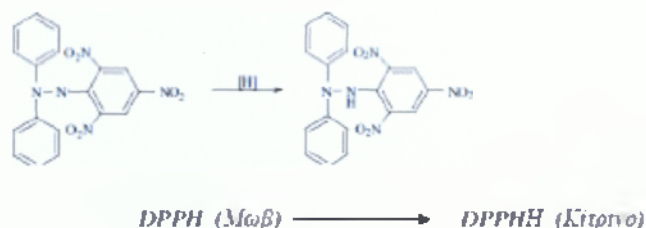
και απλή τεχνική που βρίσκει συχνή εφαρμογή είναι η δοκιμή δέσμευσης της κατιοντικής ρίζας του δις-αμμωνιακού άλατος του 2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) ή ABTS. Στην περίπτωση που επιθυμείται η αποφυγή της χρήσης συνθετικών ριζών και προτιμάται μια ρεαλιστικότερη προσέγγιση των συνθηκών που πραγματοποιούνται *in vivo*, είναι δυνατή η επιλογή ανάμεσα σε διάφορες μεθόδους που παρακολουθούν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν ρίζες (RO• ή ROO•) που ανήκουν στην κατηγορία εκείνων που σχηματίζονται *in vivo* σε βιολογικά συστήματα (Aruoma, 1994).

Μεταξύ των διαθέσιμων δοκιμών που στηρίζονται στη δέσμευση τέτοιου τύπου ριζών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν η δοκιμή ORAC (oxygen radical absorbance capacity) και η δοκιμή αποχρωματισμού της κροκίνης (crocin bleaching assay ή CBA)(Ordoudi & Tsimodou, 2006a; Frankel, 2007).

4.5.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al., 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•) είναι μια σταθερή ρίζα, φέρι μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH:H), όπως φαίνεται στην Εικόνα . Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της

οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

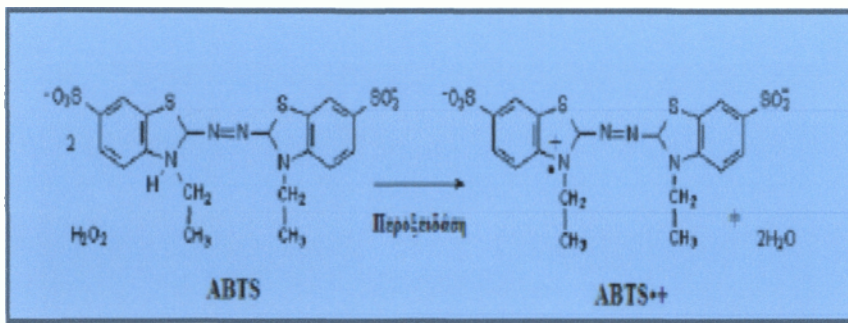


Εικόνα 14: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH·H.

4.5.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+

Η Μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή ρίζα ABTS•+. Το ABTS, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS•+. Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στη συνέχεια να ακολουθήσει η πρόσληψη της εξεταζόμενης ουσίας, ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα ABTS•+, ανάγεται είτε μέσω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET), είτε μέσω πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior et al., 2005; Miller et al., 1993; Re et al., 1999).



Εικόνα 15: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα.

4.6 Άλλες τεχνικές

Με φασματομετρία μάζας-χημικό ιοντισμό σε ατμοσφαιρική πίεση ανιχνευθεί σαφώς σε μεθανολικό εκχύλισμα ελαιολάδου τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, ελενολικό οξύ, οι αγλυκόνες διακετοξυ-λιγιστροσίδης και διακετοξυ-ολευρωπαΐνης και η 10-υδροξυ-ολευρωπαΐνη. Επίσης, με MS-APCI-MS έχουν προσδιοριστεί ποσοτικά η ολευρωπαΐνη και τα ισομερή της σε μεθανολικό εκχύλισμα ελαιολάδου χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό από τις άλλες φαινολικές ενώσεις (Caruso *et al.*, 2000).

Μια εξίσου νέα και πρωτοποριακή τεχνική, αποτελεί η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, με κύρια πλεονεκτήματα την ταχύτητα και την ευκολία για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών του τσαγιού (Horie and Kohata, 1998).

Παρά το γεγονός ότι στη μελέτη αυτή τα αποτελέσματα δεν ήταν απόλυτα ακριβή, το βασικό πλεονέκτημα της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι ο σχετικά μικρός χρόνος ανάλυσης (περίπου 10min σε αντίθεση με την HPLC στην οποία απαιτούνται 30min για την έκλουση των πολυφαινολών).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε ο ρόλος των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικά στο ελαιόλαδο. Διαπιστώθηκε ότι το ελαιόλαδο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικά αντιοξειδωτικά και θρεπτικά συστατικά (π.χ. πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, καροτένια κ.α.), και ρυθμίζει ενεργά το μεταβολισμό του οργανισμού.

Το ελαιόλαδο παρουσιάζει εξαιρετικές βιολογικές δράσεις με πολλαπλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Η βιβλιογραφική έρευνα έδειξε ότι έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη σύσταση του ελαιόλαδου και ότι είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αυτές του ελαιόλαδου λειτουργούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και προσφέρουν προστασία έναντι ασθενειών, όπως οι καρδιοπάθειες και διάφορες μορφές καρκίνου.

Για την απομόνωση των πολυφαινολών χρησιμοποιούνται εργαστηριακοί μέθοδοι όπως είναι η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*HPLC*), η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή υγρού χρωματογράφου). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη κι εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*LC-NMR*) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα της χημικής δομής άγνωστων φαινολικών συστατικών, προσφέροντας πολλές δυνατότητες περαιτέρω έρευνας στον τομέα των τροφίμων.

Συμπερασματικά, μπορεί να αναφερθεί ότι το ελαιόλαδο είναι μια σπουδαία λιπαρή ύλη στη διατροφή του ανθρώπου με αναμφισβήτητα βιολογική και θρεπτική αξία, καθώς είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο των διατροφικών μας συνηθειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Αλυγιζάκης, Ε. «Επεξεργασία και κονσερβοποίηση της επιτραπέζιας ελιάς», Εκδόσεις Ν. Μαυρομάτης και ΣΙΑ ΕΠΕ, Αθήνα, 1982.
- Βεκιάρη, Σ.Α. (2001): Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και η σημασία τους στην ποιότητά του. Χημικά χρονικά 2/01: 45-48.
- Κυριτσάκης, Α. «Το ελαιόλαδο», Τρίτη έκδοση, Αγροτικές Συνεταιριστικές Εκδόσεις, Θεσσαλονίκη, 1993.
- Λαμπράκη Μ., 1999 «Λάδι: Γεύσεις και πολιτισμός 5000 χρόνων», Ελληνικά Γράμματα.
- Λύχκος, Ν.Δ., «Το δέντρον της ελιάς», Τόμοι 1 και 2, Εκδόσεις Πυρσός, Αθήνα, 1949.
- Μπαλατσούρας, Γ., 1997. «Το ελαιόλαδο», Τόμος δεύτερος: 91-94.
- Μπόσκου, Γ. (1997). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη-Θεσσαλονίκη:183-184.
- Σφακιωτάκης Ε. Μαθήματα Ελαιοκομίας, Εκδοτικός οίκος Ζουμπούλης, Θεσσαλονίκη, 1987.

ΒΒΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Andrikopoulos N.K., Hassapidou M.N. and Manoukas A.G. (1989). The tocopherol content of Greek olive oils. *Journal of Science and Food Agricultural*. 46: 503-509.
- Benavante Garcia, O., J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno, J. A. Del Rio: Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*. 2000, 68, 457- 462.
- Bender D. *Nutritional biochemistry of the vitamins*. New York: Cambridge University Press, 1992:87- 105.
- Blekas G., Promiadou F., Tsimidou E. and Boskou D.;(2002b). On the importance of total polar polyphenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *Eur. J Lipid Sci Tech.* 104: 340-346.
- Blekas G., Vassilakis C., Harizanis C., Tsimidou M. and Boskou D. (2002a); Biophenols in table olives. *J. Agric. Food Chemistry*. 50: 3688-3692.
- Bonanome A., Pagnan A., Caruso D., Toia A., Xamin A., Fedeli E., Berra B., Zamburlini A., Urcini F. and Galli G. (2000); Evidence of postprandial absorption of olive oil polyphenols in humans. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular diseases*. 10(3):111-120.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990, 186: 343-355
- Bravo L: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Rev* 1998, 56: 317-333.
- Briante R., M. Patumi, S. Terenziani, E. Bismuto, F. Febbraio, R. Nucci: *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *J Agric Food Chem*. 2002, 50, 4934- 4940.
- Combs G. *The Vitamins*. New York: Academic Press, 1992:179- 203.

- Choudhury N. and Truswell A.S. (1995); Comparisons of palmolein and olive oil: effects on plasma lipids and vitamin E in young adults. *American journal of clinical nutrition*. 61:1043-1051.
- Choundhury N. McNeil V. and Truswell A.S. (1997) Comparison of plasma lipids and Vitamin E in young and middle- aged subjects on potatoe Crisps fried in palmolein and higly oleic sunflower oil. *Annals of nutrition and Metabolism*. 41: 137-148.
- Deiana M, Aruoma IO, De Lourdes P, Bianchi M, Spencer PEJ, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu PF: Inhibition of peroxyntirite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Rad Biol Med* 1999, 26: 762-769.
- De Laurentis, N.; Crescenzo, G.; Lai, O. R.; Milillo, M. A. Investigation on the extraction and concentration of oleuropein and flavonoids in *Olea europaea* L. based products. *Pharm. Pharmacol. Lett*. 1997, 7, 27-30.
- Edgecombe SC, Strech GL, Hayball PJ: Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfumed rat intestine. *J Nutr* 2000, 130: 2996-3002.
- Fedeli E (1986); Lipids of olives. *Progr. Chem. Fats other lipids*. 15:7.
- Griffiths LA, Barrow A: Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J* 1972, 130: 1161-1162.
- Harborne JB: *Methods in plant biochemistry, I: Plant phenolics*. London: Academic Press. 1989.
- Harborne JB: *The flavonoids: Advances in research since 1986*. London: Chapman and Hall. 1993.
- Hermann H: On the occurrence of flavonol and flavonone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988, 186: 1-5.

- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S et al: Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995, 155: 381-386.
- Ho CT, Lee CY, Huang MT: Phenolic compounds in food and their effects on health, I: analysis, occurrence and chemistry. ACS Symposium Series 506. Washington, DC: American Chemical Society. 1992.
- Hollman PCH, De Vries JHM, Van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995, 62: 1276-1282.
- Hollman PCH, Van der Gaag M, Mengelers MJB, Van Trijp JM, De Vries JE, Katan MB: Absorption and deposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol Med* 1996, 21: 703-707.
- Hollman PCH: Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr* 1997, 51(S1): 66-69.
- Hu C, Kitts DD: Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. *Mol Cell Biochem* 2001, 218: 147-155.
- ICAP: Ελαιόλαδο, Πυρηνέλαιο, «Επιτραπέζιες ελιές», Ιούνιος 2003.
- King RA, Broadbent JL, Head RJ: Absorption of the soy isoflavonone genistein in rats. *J Nutr* 1996, 126: 176-18.
- Kühnau J: The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976, 24: 117-191.
- Leth T, Justesen U: Analysis of flavonoids in fruits, vegetables and beverages by HPLC-UV and LC-MS and estimation of the total daily flavonoids intake in food. In: *Polyphenols in food*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 1998, pp 39-40.

- Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D' Angelo S, Zappia V: Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in CaCO₂ cells. *FEBS Letters* 2000, 470: 341-344.
- Manach C, Morand C, Texier O, Favie ML, Agullo G, Demigne C, Regerat F, Remesy C: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995, 125: 1911-1922.
- Mazza G: Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995, 35: 341-371.
- Mohamed Bouaziz and Sami Sayadi. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of Tunisian cultivar olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107 (2005) 497-504.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E and β - carotene. *Am J Clin Nutr* 1995;62 (suppl): 1322S-26S.
- Papageorgiou VP, Bakola-Christianopoulou MN, Apazidou KK, Psarros EE: Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J Chromatogr A* 1997, 769: 263-273.
- Porter LW: Tannins. In: *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. London: Academic Press. 1989, pp 389-419.
- Ratty AK, Das NP: Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 1988, 39: 69-79.
- Rice-Evans C, Miller JN: Antioxidants-the case for fruits and vegetables in the diet. *Brit Food J* 1995, 97: 35-40.
- Romani A, Pinelli P, Galardi C, Mulinacci N, Tattini M: Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal* 2002, 13: 79-86.

- Saitta M, Simona Lo Curto, Giacomo Dugo, Francesco Salvo (2002): Identification of phenolic compounds in olive oil by HRGC-MS/MS; Department of chemistry, university of Messina; 31, 98166 Messina Italy.
- Savournin C., B. Baghdikian, R. Elias, D. F. Kesraoui, K. Boukef, G. Balansard: Rapid high- performance liquid chromatography analysis for quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *J Agric Food Chem.* 2001, 49,618- 621.
- Servili M, Baldioli M, Miniati E, Montedoro GF: Antioxidant activity of new phenolic compounds extracted from virgin olive oil and their interaction with α -tocopherol and β -carotene. *Riv Ital Sostanze Grasse* 1996, LXXIII: 55-59.
- Shahidi F, Wanasundara J: Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*
- 1992, 32: 67-103.
- Shao W, Powell C, Clifford MN: The analysis by HPLC of green, black and Puer teas produced in Yunnan. *J Sci Food Agric* 1995, 57: 417-426.
- Tsimidou M, Papadopoulos G, Boskou D: Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by RP-HPLC by emphasis on UV detection. *Food Chem* 1992, 44: 53-60.
- Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I: The *in vivo* fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr* 2001, 131: 1993-1996.
- Van der Hof KH, Kivits GAA, Weststrate JA, Tijburg LBM: Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr* 1998, 52: 356-359.
- Vinson AJ: Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. In: *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum Press. 1998, pp 151-164.

- Visioli F., Bellomo G and Galli C. (1998); Free radical-Scavenging Properties of Olive Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 247:60-64.
- Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A: Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Comm* 2000, 278: 797-799.
- Visioli F, Galli C: The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* 1998, 56: 142-147.
- Vissers M.V., Zock P.L., Leenen R., Roodenberg A.G., J van Putte K.P. and Katan M.B. (2001); Effect on consumption of phenols from olives and extra olive oil on LDL oxidation in healthy humans. *Free Rad. Res.* 35(5):619-629.
- Vissers NM, Zock LP, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB: Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 2002, 132: 409-417.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- http://www.oliveoil.com.cy/mailling/mail_20040322.html Επίσημες Κατηγορίες

από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου και την Ευρωπαϊκή Ένωση.