



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

Εργαστήριο : Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας

Διπλωματική εργασία:

## **Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς**

της φοιτήτριας

Θάνου Χριστίνα

Επιβλέπων Καθηγητής: Απόστολος Βλυσίδης

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Ιούνιος 2020

## *Ευχαριστίες*

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιο Πολυτεχνίου με σκοπό την ολοκλήρωση των προπτυχιακών μου σπουδών στην σχολή Χημικών Μηχανικών.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο καθηγητή της εργασίας μου κύριο Απόστολο Βλυσίδα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, την εμπιστοσύνη, το χρόνο και τη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Υποψήφιο Διδάκτορα Γιώργο Λάμπρου για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, την άμεση βοήθεια του σε οποιοδήποτε πρόβλημα αντιμετώπιζα, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, τη καθημερινή μέριμνα και την υπομονή του.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας που ήταν πρόθυμα πάντα να με βοηθήσουν σε επιστημονικά και διαδικαστικά θέματα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου που ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριξαν σε όλες μου τις δυσκολίες των φοιτητικών μου χρόνων. Σε κάθε τηλέφωνο, σε κάθε συνάντηση μας ήταν πάντα εκεί πρόθυμες να με βοηθήσουν να ξεπεράσω τα προβλήματα μου και να με κάνουν να αισθανθώ καλύτερα.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, Δημήτρη Θάνο και Δήμητρα Καραθανασοπούλου αλλά και τον αδερφό μου Γιάννη, για την στήριξη τους σε μία από τις πιο δύσκολες δοκιμασίες που πέρασα το τελευταίο χρόνο. Μαζί τους ξεπέρασα αυτή τη δυσκολία και κατάφερα να σταθώ στα πόδια μου πιο δυνατή από ποτέ και να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου.

## Περίληψη

Τα φύλλα της ελιάς θεωρούνται μία από τις πιο άφθονες πηγές γεωργικών αποβλήτων που είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιώντας μία νέα μέθοδο εξαγωγής των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα ελιάς μελετήθηκε πως μεταβάλλεται το συνολικό φαινολικό φορτίο και το κάθε φαινολικό συστατικό ανάλογα με τη ποικιλία του δέντρου, την ηλικία του και το χρόνο συγκομιδής των φύλλων σε δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης.

Η μέθοδος βασίστηκε στη προσθήκη θειικού οξέος και στην υδρόλυση των φύλλων ελιάς για την παραγωγή εκχυλισμάτων πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Η διεργασία της εκχύλισης έγινε σε δύο συνθήκες με μεταβολή των τριών παραγόντων: αναλογία υγρού:στερεού (v/w), όγκος θειικού οξέος και θερμοκρασία εκχύλισης. Η πρώτη συνθήκη για βέλτιστο TPC ήταν σε συνθήκες 25,20% αναλογία υγρού:στερεού, 6,40% όγκο θειικού οξέος και 31,9°C θερμοκρασία εκχύλισης και η δεύτερη συνθήκη για βέλτιστο ελευρωπαϊκής ήταν σε συνθήκες 30,00% αναλογία υγρού:στερεού, 2,00% όγκο θειικού οξέος και θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C.

Στο πρώτο πείραμα της παρούσας διπλωματικής 20 ποικιλίες από τα φυτώρια Κωστελένος, 3 ποικιλίες από αγρόκτημα στη Φωκίδα και μία ποικιλία από το αγρόκτημα του Εθνικού Μετσόβιο Πολυτεχνίου μελετήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και της κάθε φαινολικής ουσίας εκφράστηκε σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά gr ξηρού βάρους. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση του φαινολικών συστατικών έγινε με τη χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας HPLC-DAD. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των συνολικών φορτίων και το φαινολικό προφίλ διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών, των συνθηκών εκχύλισης, την ηλικία του δέντρου και το χρόνο συγκομιδής.

Στο δεύτερο πείραμα έγινε προσπάθεια να ανιχνευτούν οι βέλτιστες συνθήκες για μέγιστη συγκέντρωση συνολικού ελαιοκανθάλης. Διαπιστώθηκε ότι στους 30°C ήταν η καλύτερη απόδοση στη συγκέντρωση του συνολικού φαινολικού φορτίου και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης αφού σε συνθήκες αραιώσης με 250ml απιονισμένου νερού το συνολικό φαινολικό φορτίο ήταν 20,58 mg/g ξ.β. και η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης ήταν 7,01 mg/g ξ.β. και σε συνθήκες αραιώσης με 300ml απιονισμένου νερού η συγκέντρωση συνολικού φαινολικού φορτίου ήταν 14,31 mg/g ξ.β. και η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης 1,02 mg/g ξ.β. Στη συνέχεια, διατηρώντας της θερμοκρασία 30°C και μεταβάλλοντας τη ποσότητα του θειικού οξέος από 100ml έως 1500 ml παρατηρήθηκε ότι από μία ποσότητα και πάνω του θειικού οξέος υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης.

## Abstract

Olive leaves are considered to be one of the most abundant sources of agricultural waste, rich in phenolic compounds. In this thesis, using a new method of extracting phenolic compounds contained in olive leaves, it was studied how the total phenolic load and each phenolic component changes depending on the variety of the tree, its age and the time of leaf collection under two different conditions.

The method was based on the addition of sulfuric acid and the hydrolysis of olive leaves to produce extracts rich in phenolic compounds. The extraction process took place in two conditions with a change of three factors: liquid solid ratio (v / w), sulfuric acid volume and extraction temperature. The first condition for optimum TPC was in conditions of 25.20% liquid solid ratio, 6.40% volume of sulfuric acid and 31.9°C extraction temperature and the second condition for optimum oleuropein was in conditions of 30.00% liquid solid ratio , 2.00% sulfuric acid volume and extraction temperature 40 °C.

In the first experiment of the present thesis, 20 varieties from the Kostellenos plant nursery, 3 varieties from a farm in Fokida and a variety from the farm of the National Technical University of Athens were studied in terms of the concentration of total phenolic phenols and separation and identification of phenolic compound was carried out. The concentration of total phenolics and each phenolic substance was expressed in milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of dry weight. The concentration of total phenolics was measured using the Folin-Ciocalteu method. The separation and identification of the phenolic compounds was carried out with using an analytical HPLC-DAD system. According to the results of this thesis, it was found that the concentration of total loads and the phenolic profile differs between the varieties, the extraction conditions, the age of the tree and the harvest time.

In the second experiment, an attempt was made to detect the optimum conditions of the total phenolic content and the concentration of the oleocanthal. It was found that at 30°C it was the best performance of the total phenolic content load and the concentration of oleocanthal since in dilution conditions with 250ml of deionized water the total phenolic content was 20.58 mg / g d.w. and the concentration of oleocanthal was 7.01 mg / g d.w. In conditions of dilution with 300ml of deionized water the concentration of total phenolic content was 14.31 mg / g d.w.. and the concentration of oleocanthal was 1.02 mg / g d.w. Then, maintaining a temperature extraction of 30°C and changing the amount of sulfuric acid from 100µl to 1500 µl, it was observed that from an amount on top of the sulfuric acid there is an increase in the concentration of oleocanthal.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
<b>A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>8</b>
1.Ελιά και φύλλα ελιάς.....	8
1.1 Ιστορία.....	8
1.2 Τα φύλλα της ελιάς και οι ιδιότητες τους.....	9
1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	11
1.3.1.2 Αντικαρκινική Δράση.....	11
1.3.2 Χρήσεις φύλλων ελιάς.....	12
1.4 Χημικά Χαρακτηριστικά και Βιοδιαθεσιμότητα φύλλων ελιάς.....	15
2.Φαινολικές Ενώσεις.....	17
2.1 Γενικά.....	17
2.2 Κατηγοροποίηση φαινολικών ουσιών.....	18
2.3 Φαινολικές Ενώσεις στα φύλλα ελιάς.....	20
2.3.1 Φαινολικά οξέα.....	21
2.3.2 Φαινολικές αλκοόλες.....	22
2.3.3 Φλαβονοειδή.....	23
2.3.4 Σεκοϊριδοειδή.....	24
2.4 Ελαιοκανθάλη.....	24
2.5 Επίδραση Βιοτικών και Αβιοτικών παραγόντων.....	25
2.5.1 Αβιοτικοί Παράγοντες.....	25
2.5.1.1 Ξηρασία.....	25
2.5.1.2 Άλατα στο έδαφος και στο νερό.....	26
2.5.1.3 Τοποθεσία.....	26
2.5.1.4 Εποχή Δειγματοληψίας.....	26
2.5.1.5 Φως.....	26
2.5.1.6 Χαμηλές Θερμοκρασίες.....	27
2.5.2 Βιοτικοί παράγοντες.....	27
2.5.2.1 Μύκητες.....	27
2.5.2.2 Βακτήρια.....	28
2.5.2.3 Ηλικία Φύλλου.....	28
2.5.1.4 Γονότυπος.....	28
3.ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	29
3.1 Η έννοια της εκχύλισης.....	29
3.1.1 Διαλύτες της εκχύλισης.....	29
3.2 Τεχνικές εκχύλισης φύλλων ελιάς.....	30
3.3.1 Εκχύλιση φύλλων ελιάς με συμβατικές μεθόδους.....	31

3.3.1.1	Εκχύλιση στερεού υγρού .....	31
3.3.1.2	Εκχύλιση Soxhlet .....	31
3.3.2	Εκχύλιση φύλλων ελιάς με μη συμβατικές μεθόδους .....	33
3.3.2.1	Εκχύλιση υπό πίεση υγρού (Pressurized Liquid Extraction PLE) .....	33
3.3.2.2	Εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό (Supercritical Water Extraction SWE) .....	33
3.3.2.3	Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (Supercritical Fluid Extraction- SFE) .....	34
3.3.2.4	Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction-MAE) .....	34
3.3.2.4	Εκχύλιση με υπέρηχους (Ultrasound Assisted Extraction-UAE) .....	35
3.3	Εκχύλιση της παρούσας διπλωματικής εργασίας .....	36
<b>Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	.....	<b>37</b>
1.1.	Φυτικό Υλικό.....	37
1.2	Εκχύλιση Φαινολικών Συστατικών .....	39
1.2.1	1 <sup>ο</sup> Πείραμα .....	40
1.2.3	2 <sup>ο</sup> Πείραμα .....	41
1.3	Ανάλυση και μελέτη φαινολικών ενώσεων .....	42
1.3.1	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών, Μέθοδος Folin-Ciocalteu .....	42
1.3.1.1	Υλικά και εξοπλισμός.....	42
1.3.1.2	Πειραματική διαδικασία.....	43
1.3.2	Μελέτη του εκχυλίσματος με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC-DAD .....	44
<b>Γ.ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	.....	<b>45</b>
1.1	1 <sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑ.....	45
1.1.1	Συγκέντρωση Συνολικών Φαινολικών Συστατικών .....	45
1.1.1.1	Ποικιλία- Συνθήκες Εκχύλισης .....	45
1.1.1.2	Ηλικία Δέντρου .....	48
1.1.1.3	Χρόνος Συγκομιδής.....	50
1.1.2	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC .....	52
1.1.2.1	Ποικιλία- Συνθήκες Εκχύλισης .....	52
1.1.2.2	Χρόνο Συγκομιδής .....	53
•	1 <sup>η</sup> περίπτωση.....	53
•	2 <sup>η</sup> περίπτωση .....	56
1.1.2.3	Ηλικία Δέντρο .....	58
•	Σύνθηκες TPCmax.....	58
•	Σύνθηκες OLEmax.....	61
1.2	2 <sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑ.....	63
1.2.1	Θερμοκρασία εκχύλισης .....	63

• Συγκέντρωση Συνολικών Φαινολικών.....	63
• Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC.....	66
1.2.2 Θειικό Οξύ ( H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 98%).....	69
A σειρά πειραμάτων ( Δοκιμαστικό Πείραμα ) .....	69
• Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC.....	69
B σειρά πειραμάτων.....	70
• Συγκέντρωση Συνολικών Φαινολικών.....	71
• Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC.....	74
<b>Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>80</b>
1.1 1 <sup>ο</sup> πείραμα.....	80
1.2 2 <sup>ο</sup> πείραμα.....	82
<b>Ε. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΜΕΛΛΟΝ .....</b>	<b>82</b>
<b>Ζ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>84</b>

# Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.Ελιά και φύλλα ελιάς

### 1.1 Ιστορία

Το δέντρο της ελιάς είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την ιστορία της Μεσογείου και κατ'επέκταση με της χώρας μας. Η ελιά (*Olea europaea L.*) είναι ένα από τα παλαιότερα, γνωστά και καλλιεργημένα δέντρα στο κόσμο που αναπτύσσεται στο εύκρατο κλίμα της περιοχής της Μεσογείου. Κοιτίδα της είναι οι χώρες της Εγγύς Ανατολής, της Αιγύπτου και γενικά οι χώρες της λεκάνης της Μεσογείου.

Το ελαιόδεντρο είναι ένα αειθαλές δέντρο με επιμήκη φύλλα το οποίο από τους αρχαίους χρόνους συνέβαλε στην οικονομία, την υγεία και την διατροφή των κατοίκων της Μεσογείου.

Η εμφάνιση της ελιάς χρονολογείται για πάνω από 5000 χρόνια και η προέλευση της είναι η περιοχή που τότε αντιστοιχούσε στην Αρχαία Περσία και Μεσοποταμία. Έπειτα, από εκείνες τις περιοχές εξαπλώθηκε στη Συρία και τη Παλαιστίνη. (Kiritakis 1998, Di Giannacchino 2000) Οι κάτοικοι εκείνης της περιοχής ανέπτυξαν την καλλιέργεια της ελιάς και στη συνέχεια τη μετέφεραν στη Βόρεια Αφρική. Άλλοι πιστεύουν βέβαια ότι το δέντρο ήρθε από την Αφρική καθώς οι αρχαίοι Αιγύπτιοι καλλιεργούσαν το ελαιόδεντρο. (Loukas and Krimbas 1983) Στη συνέχεια, λέγεται ότι οι Φοίνικες ήταν υπεύθυνοι για τη διάδοσή τους και στα άλλα μέρη της λεκάνης της Μεσογείου μέσω του θαλάσσιου εμπορίου. Το 28<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. έφτασε στα ελληνικά νησιά, τη Λιβύη και τη Καρχηδόνα. (Kapellakis 2008)

Στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στο νησί της Κρήτης η καλλιέργεια του ξεκίνησε περίπου 3000 π.Χ. Για περισσότερα από 2000 χρόνια, η ελιά εμφανίζεται στην ιστορία και τους μύθους ως σύμβολο ειρήνης, γονιμότητας και χαράς. Για αυτό το λόγο, πρωταθλητές των Ολυμπιακών Αγώνων στέφονταν με ένα στεφάνι κατασκευασμένο από κλαδιά της ελιάς. Σε όλη την ιστορία του πολιτισμού η ελιά υπήρξε μια σημαντική διατροφική και φαρμακευτική πηγή. Το 1854 μάλιστα έγινε η πρώτη επίσημη αναφορά φαρμακευτικής χρήσης της ελιάς και συγκεκριμένα αναφέρεται πως το εκχύλισμα του φύλλου της ελιάς ήταν αποτελεσματικό στην θεραπεία του πυρετού και της ελονοσίας.



## 1.2 Τα φύλλα της ελιάς και οι ιδιότητες τους

Η ελιά ή ελαιόδεντρο (*Olea europaea L*) είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*), το οποίο συναντάται και στην Ελλάδα και μπορεί να είναι είτε ορθόκλαδο, είτε πλαγιόκλαδο. Το δέντρο φέρει κορμούς με τρεις ή περισσότερους βραχίονες και αυτοί με τη σειρά τους φέρουν βλαστούς, όπου εμφανίζονται τα φύλλα, τα άνθη και οι καρποί.

Το προϊόντα που εξάγονται από την ελιά είναι το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές. Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα της ελληνικής οικονομίας καθώς καλύπτει το 9% της συνολικής παραγόμενης αξίας από την ελληνική αγροτική παραγωγή. Ο τομέας χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα δυναμικός, μια που η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στο κόσμο μετά την Ισπανία και την Ιταλία, με ετήσια παραγωγή περίπου 320 χιλ. τόνους, που αντιστοιχεί στο 0,4% του ΑΕΠ. Ωστόσο, η παραγωγή του ελαιόλαδου συνοδεύεται από μεγάλες ποσότητες αποβλήτων που προκαλούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Η ζήτηση από το εξωτερικό είναι αυξανόμενη, λόγω της αναγνώρισης των ωφελειών της μεσογειακής διατροφής. Παρόλο που το ελαιόλαδο και τα προϊόντα της ελιάς έχουν μία ολόενα και μεγαλύτερη ζήτηση λόγω της διεθνούς αναγνώρισης της διατροφικής τους αξίας εντούτοις η προοπτική ανάπτυξής τους εξαρτάται, κατά πολύ, από την επίλυση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που δημιουργεί η παραγωγική διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου που λαμβάνει χώρα στα ελαιοτριβεία (*Vlyssides et. al, 2016*)

Τα υγρά απόβλητα, τα οποία συνηθίζεται να αποκαλούνται κασίγαρος, είναι σκούρου χρώματος, θολά, χαρακτηριστικής δυσάρεστης οσμής, πλούσια σε οργανικά και ανόργανα υλικά, διαλυμένα κύρια στην υδάτινη φάση. Περιέχουν κολλοειδή υλικά, πηκτίνες, ταννίνες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, ανόργανα άλατα και υπολείμματα μαλακών φυτικών ιστών του ελαιοπολτού, που του προσδίδουν τη μορφή γαλακτώματος. Τέλος, εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα λόγω των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν. Τα φύλλα των ελαιόδεντρων από το στάδιο του καθαρισμού/διαλογής του ελαιόκαρπου αποτελούν ένα τμήμα των στερεών αποβλήτων των ελαιοτριβείων και ανέρχονται σε 3-5% του αρχικού βάρους του ελαιόκαρπου. Ο ελαιοπυρήνας είναι το στερεό υπόλειμμα από την εξαγωγή ελαιόλαδου. Ο διφασικός ελαιοπυρήνας διαθέτει πολύ υψηλότερο ποσοστό περιεκτικότητας σε νερό και χρειάζεται να μεταφερθεί με βυτιοφόρα τα οποία τον αδειάζουν σε μεγάλες δεξαμενές αποξήρανσης. (*Vlyssides et. al, 2016*) Ο ελαιοπυρήνας είναι μία φθηνή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, σε συγκεντρώσεις μέχρι και 100 φορές υψηλότερες από ότι στο ελαιόλαδο γεγονός το οποίο είναι αποτέλεσμα της πολικής φύσης τόσο του ελαιοπυρήνα όσο και των φαινολών της ελιάς. Παρόλα αυτά, τα φύλλα ελιάς περιέχουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των διαφόρων μερών του ελαιόδεντρου αφού για παράδειγμα η ελαυρωπαΐνη στο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 0,005% και 0,12%, στον ελαιοπυρήνα 0,87% και στα φύλλα ελιάς μεταξύ 1% και 14%. (*Jaron-Lujan R et al, 2006*)



**Εικόνα 1:** Το ελαιόδεντρο

Τα φύλλα της ελιάς ως παραπροϊόν της ελαιοκαλλιέργειας είναι μία φτηνή πηγή και μπορούν να βρεθούν σε μεγάλες ποσότητες κατά το κλάδεμα των δέντρων , τη συγκομιδή του καρπού και από τα ελαιοτριβεία. (Tabera et al., 2004) Το κλάδεμα του δέντρου της ελιάς γίνεται περίπου κάθε δύο με τρία χρόνια , ενώ κάθε χρόνο γίνεται ένα τυπικό καθάρισμα. Από το κλάδεμα έχει υπολογιστεί ότι παράγονται 25kg παραπροϊόντα , δηλαδή φύλλα και κλαδιά , ανά ελαιόδεντρο ετησίως. (Niaounakis et al., 2004).



**Εικόνα 2:** Τα φύλλα της ελιάς

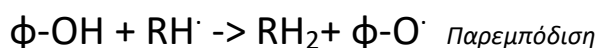
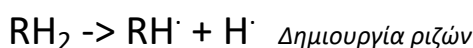
Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν μεγάλο αριθμό φαινολικών ενώσεων και για αυτό το λόγο ερευνητές από όλο το κόσμο σε διαφορετικές μελέτες έχουν παρουσιάσει την αντιοξειδωτική (Benavente-García O 2000) , την αντυπερτασική (Susalit E 2011), την υπογλυκαιμική (Kontogianni VG 2013), την αντικαρκινική (Boss 2016) και την αντιμικροβιακή

δράση των φύλλων ελιάς καθώς επίσης και την επίδραση τους σε προβλήματα καρδιάς (Nekooeian AA 2014) και παχυσαρκίας (Khalatbary AR 2011).

### 1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Αντιοξειδωτική δράση μιάς ουσίας ορίζουμε την ικανότητα μιας ένωσης να περιορίζει την δράση παραγόντων που ευνοούν την οξείδωση. (Prior & Cao, 1999) Η δράση των φύλλων ελιάς ως αντιοξειδωτικά μέσα γίνεται με τους εξής τρόπους:

1. Παρεμβαίνουν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών, σχηματίζοντας μία σταθερή φαινολική ρίζα και απενεργοποιώντας τις αρχικές ρίζες.



2. Δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα τα οποία είναι εκκινητές μίας οξείδωσης, δημιουργώντας χηλικό σύμπλοκο. (Mira et al 2002)
3. Αναγεννούν άλλα αντιοξειδωτικά απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό όπως για παράδειγμα τη  $\alpha$ -τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε) (Natella et al 1999)

### 1.2.2 Αντικαρκινική Δράση

Τα φύλλα της ελιάς σύμφωνα με έρευνες εμφανίζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση. Πολλοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η Μεσογειακή διατροφή παρέχει προστασία στον ανθρώπινο οργανισμό έναντι ορισμένων καρκίνων. Οι πολυφαινόλες των φύλλων ελιάς είναι αντιφλεγμονώδεις και προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες.

Συγκεκριμένα, η ελαιοευρωπαϊνή έχοντας τη δυνατότητα να αναγνωρίζει τα φυσιολογικά από τα καρκινικά κύτταρα προκαλεί απόπτωση μόνο των καρκινικών κυττάρων. (Boss 2016). Επίσης, οι πολυφαινόλες των φύλλων ελιάς έχουν παρόμοια δομή με τα οιστρογόνα και για αυτό το λόγο πιστεύεται ότι μειώνουν το πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων που σχετίζονται με τις ορμόνες αυτές. (Boss 2016)

Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς έδειξε αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση στα λευχαιμικά κύτταρα μέσω της απόπτωσης (*Fares et al., 2011*). Ακατέργαστο εκχύλισμα φύλλων ελιάς που περιέχει κυρίως ελαιουερωπαΐνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αδενοκαρκινώματος του μαστού και της ουροδόχου κύστης στον άνθρωπο (*Goulas et al., 2009*). Μέλετες έχουν δείξει, επίσης, ότι οι πολυφαινόλες συντελούν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος (*Goldsmith et al., 2015*) και του προστάτη (*Acquanina et al., 2012*).

### 1.3 Χρήσεις φύλλων ελιάς

Η χρήση των φύλλων της ελιάς στην ανθρώπινη ζωή ήταν γνωστή από την αρχαιότητα. Καθώς είναι ισχυρό μικροβιοκτόνο, οι Αιγύπτιοι το χρησιμοποιούσαν για την ταρίχευση των Φαραώ. Οι λαοί της Μεσογείου θεωρούσαν το χυμό από τα φύλλα της ελιάς ως φυσικό γιατρικό. Στις αρχές του 18ου αιώνα, τα φύλλα ελιάς πολτοποιούνταν και αναμιγνύονταν με υγρά για την αντιμετώπιση του πυρετού και της ελονοσίας. Άλλοι λαοί τα χρησιμοποιούσαν για τη σταθεροποίηση των επιπέδων σακχάρου. Το φύλλο ελιάς έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φάρμακο για πολλές χιλιάδες χρόνια στην ευρωπαϊκή Μεσόγειο, νησιά και χώρες. Τα φύλλα λαμβάνονταν από το στόμα για το στομάχι και ασθένειες του εντέρου και χρησιμοποιούνταν ως καθαρυστικό στο στόμα, ενώ τα αφέψημα των ξηρών φύλλων λαμβάνονταν από το στόμα για διάρροια και σε θεραπεία των λοιμώξεων του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος (*Delgado-Pertinez et al., 2000; Bellakhdar et al., 1991*).

Η έρευνα σχετικά με τις εφαρμογές φαινολικών ενώσεων έχει προσελκύσει διάφορους βιομηχανικούς τομείς. Σήμερα, οι φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιούνται πέρα από την ιατρική και τις βιομηχανίες φαρμακευτικών προϊόντων και σε βιομηχανίες καλλυντικών. Πρόσφατη έρευνα έδειξε τη χρήση τους στη παραγωγή υλικών για συσκευασία τροφίμων αλλά και ως βιολογικά μυκητοκτόνα. Ακόμη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη βιομηχανία τροφίμων αφού τα φυσικά αντιοξειδωτικά των φύλλων ελιάς βοηθούν στη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των τροφίμων και στη διατήρηση των θρεπτικών συστατικών τους (*Bouaziz et al., 2010*). Έτσι στις μέρες μας τα εμπορικά προϊόντα φύλλων ελιάς διατίθενται στο εμπόριο σε μορφή φαρμακευτικών σκευασμάτων, συμπληρωμάτων διατροφής σε μορφή δισκίων, φάκελων τσαγιού και εκχυλισμάτων.



Εικόνα 3: Εφαρμογές φύλλων ελιάς



Εικόνα 4: Εφαρμογές φύλλων ελιάς



**Εικόνα 5:** Εφαρμογές φύλλων ελιάς

Ανάλογα με τα ισχύοντα νομοθετικά πλαίσια των διαφόρων χωρών τα προϊόντα αυτά πρέπει να πληρούν όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις που εξασφαλίζουν την ασφάλεια της χρήσης τους . Το 2017, η Ευρωπαϊκή Ένωση δημοσίευσε τον κανονισμό 2017/2373, ο οποίος επιτρέπει την τοποθέτηση υδροξυτυροσόλης στα προϊόντα τροφίμων και την αγορά ως νέο συστατικό τροφίμων προοριζόμενο για τον γενικό πληθυσμό.

## 1.4 Χημικά Χαρακτηριστικά και Βιοδιαθεσιμότητα φύλλων ελιάς

Η χημική σύσταση των φύλλων ελιάς ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, την προέλευση, την αναλογία των κλαδιών που υπάρχουν, τις συνθήκες αποθήκευσης, τις καιρικές συνθήκες, την περιεκτικότητα σε υγρασία και το βαθμό μόλυνσης του εδάφους. (Martín-García AI 2008 , Delgado-Pertíñez M 2000)

Η ελιά είναι ένα εξαιρετικά μεταβλητό είδος με συνολικά 1250 ποικιλίες διασκορπισμένες σε 54 χώρες, όπως αναφέρεται στο OLEA DATABASE (<http://www.oleadb.it/>). Ένας μεγάλος αριθμός αρχαίων ποικιλιών εξακολουθεί να υπάρχει, αλλά μόνο λίγοι καλλιεργούνται για εμπορικούς λόγους. (Ilarioni 2014) Οι διαφορετικές ελαιοκαλλιέργειες παρουσιάζουν ποικίλα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποικιλίες που παρασιάζονται στο **Πίνακα 1**.

**Πίνακας 1 :** Χαρακτηριστικά ποικιλιών που χρησιμοποιούνται στη παρούσα μελέτη

<b>Ποικιλία</b>	<b>Χρήση</b>	<b>Μέγεθος Καρπού</b>	<b>Προέλευση</b>	<b>Περίοδος Συγκομιδής</b>	<b>Χαρακτηριστικά</b>
Αγουρομάννακο	Λάδι	Μεσαίο	Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία	Μέσα Νοεμβρίου-Μέσα Φεβρουαρίου	Μέτρια ανθεκτικότητα στη ξηρασία
Αμφίσησης	Βρώσιμη	Μεγάλο	Άμφισσα	Μέσα Οκτωβρίου-Μέσα Ιανουαρίου	Ανεθεκτική στο ψύχος Απαιτητική σε εδαφική υγρασία Πολυ ευαίσθητη σε ασθένειες
Βαλανολιά	Λάδι	Μεσαίο	Λέσβος , Χίος	Δεκέμβριο-Μέσα Φεβρουαρίου	Μέτριας παραγωγικότητας Ελάχιστες απαιτήσεις
Γαλάτιστας	Διπλή Χρήσεως	Μεσαίο	Άγιο Όρος		Ανθεκτική στο ψύχος Παραγωγική ποικιλία
Θιάκη	Λάδι	Μικρό	Κέρκυρα	Τέλη Νοεμβρίου-Μέσα Ιανουαρίου	Παραγωγική ποικιλία Ανεκτική στο κρύο Ανεκτική στη φυματίωση
Καλαμών	Βρώσιμη	Μεγάλο	Μεσσηνία, Λακωνία, Αιτωλο-καρνανία	Τέλη Οκτωβρίου-Μέσα Δεκεμβρίου	Ανθεκτική στο ψύχος Ανθεκτική στις ασθένειες
Καλοκαιρίδα	Λάδι	Μεσαίο	Κέρκυρα, Κρήτη	Τέλη Σεπτεμβρίου-Νοέμβριο	
Καρυδολιά Χαλκιδικής	Βρώσιμη	Μεγάλο	Χαλκιδικής	Οκτώβριο-Δεκέμβριο	Ανθεκτική και παραγωγική στο ψύχος

Κοθρέικη Μανάκι	Διπλή Χρήσεως	Μεσαίο	Ν. Αρκαδίας, Κορινθίας, Φωκίδας	Τέλη Ιανουαρίου- Τέλη Φεβρουαρίου	Ανθεκτική σε υψόμετρο Ανθεκτική σε ελαφρά όξινα εδάφη
Κορωνέικη	Λάδι	Μικρό	Κρήτη, Νότια και Κεντρική Πελοπόννη-σο, Νησιά Νότιου Αιγαίου	Νοέμβριο-Φεβρουάριο	Ανθεκτική στη ξηρασία Δεν αντέχει το ψύχος
Κουτσουρελιά	Λάδι	Μικρό	Ν.Κορινθίας ,Ν.Αχαΐας,Ν. Λακωνίας, Ν.Αιτωλο-καρνανίας	Μέσα Νοεμβρίου- Δεκέμβριο	Απαιτητική σε εδαφική υγρασία και θρεπτικά στοιχεία Ευαίσθητη στη φυματίωση και στο κυκλοκόνιο Μέτρια ανθεκτική στο δάκο
Λευκοελιές Σερρών	Λάδι	Μεσαίο	Σέρρες	Δεκέμβριο- Ιανουάριο	Ανθεκτική στο ψύχος Παραγωγική ποικιλία Ανθεκτική στην εδαφική αλατότητα Ανθεκτική στο κυκλοκόνιο Ευαίσθητη στο δάκο
Μαστοειδής	Λάδι	Μικρό	Λακωνία, Αρκαδία, Μεσσηνία, Χανιά, Ρέθυμνο	Μέσα Οκτωβρίου- Μέσα Δεκεμβρίου	Ανθεκτική στο ψύχος Μέτρια ανθεκτική στην ξηρασία Εύδοκιμη σε μεγάλα υψόμετρα Ευαίσθητη στο κυκλοκόνιο
Μαυροελιά Μεσσηνίας	Λάδι	Μικρό	Μεσσηνία	Οκτώβριο- Νοέμβριο	Μη ανθεκτική στη ξηρασία Απαιτεί εδαφική υγρασία
Μεγάρων	Διπλή Χρήσεως	Μεσαίο	Μέγαρα	Νοέμβριο- Δεκέμβριο	Ανθεκτική στο ψύχος Υψηλή παραγωγικότητα κάτω από δυσμενείς εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες
Τραγολιά	Λάδι	Μικρό	Μεσσηνία ,Κεφαλλονιά	Μέσα Νοεμβρίου- Μέσα Ιανουαρίου	Κανονική αντοχή στο ψύχος

έλη Ιανουαρίου- Φεβρουαρίου



Picual	Λάδι	Μεσαίο	Ισπανική	Νοέμβριο-Δεκέμβρη	Ανθεκτική στις αρρώστιες Δεν αντέχει την ξηρασία Ανθεκτική στο ψύχος
Leccino	Λάδι	Μικρό	Ιταλική	Μέσα Οκτώβρη-Μέσα Δεκέμβρη	Ανθεκτική στο ψύχος Μη ανθεκτική στη ξηρασία
Frantoio	Λάδι	Μικρό	Ιταλική	Μέσα Νοέμβρη-Μέσα Γενάρη	Μη ανθεκτική στη ξηρασία Μη ανθεκτική στο ψύχος
Arbequina	Λάδι	Μικρό	Ισπανική	Μέσα Νοέμβρη-Μέσα Δεκέμβρη	Πολύ Παραγωγική Αντοχή στο κρύο Ανεκτική στο αλατόνερο και μύκητες Κατάλληλη για καλλιέργεια σε σειρά

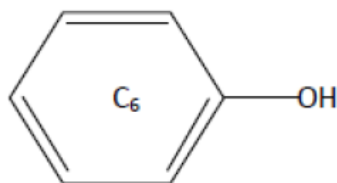
## 2.Φαινολικές Ενώσεις

### 2.1 Γενικά

Η μεσογειακή διατροφή είναι γνωστή για τα υγιεινά της οφέλη ιδιαίτερα λόγω της μεγάλης ποσότητας φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά και το λάδι. Τα τελευταία χρόνια οι φαινολικές ενώσεις έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους στην ανθρώπινη ζωή.

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις κύριες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών και περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες ενωμένες με αρωματικό δακτύλιο (**Εικόνα 6**). Αυτός ο ορισμός δεν είναι όμως απόλυτα σωστός διότι έτσι συμπεριλαμβάνει και τις τερπενοειδείς ενώσεις. Τα τελευταία χρόνια έχει επικρατήσει λοιπόν ο ορισμός ότι ως φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου (Ryan et al., 1999).

Grace, 2005



Εικόνα 6: Δομή φαινόλης

Οι χημικές δομές της φαινόλης ποικίλουν αφού μπορεί να είναι μία απλή ένωση όπως το καφεϊκό αλλά και μία ένωση υψηλού πολυμερισμού όπως οι τανίνες. Οι φαινόλες βρίσκονται συνήθως είτε σε μορφή γλυκοζιτών, με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σαν υποκαταστάτες της υδροξυλομάδας είτε άμεσα συνδεδεμένα με κάποιο άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου είτε ως αγλυκόνες. Το σάκχαρο που απαντάται πιο συχνά ως υποκαταστάτης είναι η γλυκόζη. Άλλα σάκχαρα που συναντάται σαν υποκαταστάτες είναι και η γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ δραστικές λόγω του όξινου χαρακτήρα των υδροξυλικών ομάδων και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων. Δρουν ως δότες υδρογόνου απενεργοποιώντας τις ελεύθερες λιπιδικές ρίζες, με συνέπεια να δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο, τα μέταλλα, καθώς και τις πολύ επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες επιταχύνουν τη γήρανση, μειώνουν την ενεργητικότητα των κυττάρων και «ενοχοποιούνται» για σοβαρές ασθένειες.

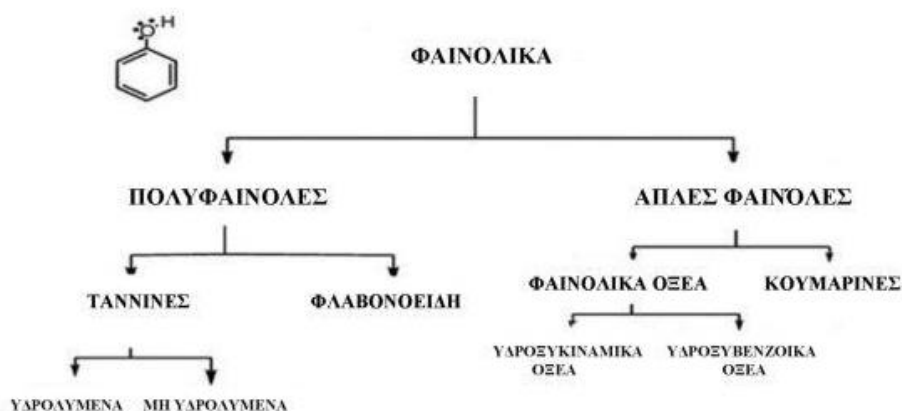
## 2.2 Κατηγοροποίηση φαινολικών ουσιών

Στη βιβλιογραφία, η κατηγοροποίηση των φαινολών γίνεται με πάνω από έναν τρόπους. Οι *Urquiaga & Leighton (2000)* ομαδοποίησαν τις φαινολικές ενώσεις ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο τους (**Πίνακας 2**) ενώ ο *Robbins (2003)* ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν. Με το τελευταίο τρόπο διακρίνονται σε απλές φαινόλες αν περιέχουν ένα αρωματικό δακτύλιο και σε πολυφαινόλες αν περιέχουν περισσότερους. Οι απλές χωρίζονται σε φαινολικά οξέα και κουμαρίνες, ενώ οι πολυφαινόλες σε φλαβονοειδή και ταννίνες. (**Πίνακας 3**)

**Πίνακας 2:** Κατηγοροποίηση φαινολών σύμφωνα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο τους (*Urquiaga & Leighton, 2000*)

Number of carbon atoms	Basic skeleton	Class	Examples
6	C6	Simple phenols Benzoquinones	Catechol, hydroquinone 2,6-Dimethoxybenzoquinone
7	C6-C1	Phenolic acids	Gallic, salicylic
8	C6-C2	Acetophenones Tyrosine derivatives Phenylacetic acids	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde Tyrosol p-Hydroxyphenylacetic
9	C6-C3	Hydroxycinnamic acids Phenylpropenes Coumarins Isocoumarins Chromones	Caffeic, ferulic Myristicin, eugenol Umbelliferone, aesculetin Bergenson Eugenin
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone, plumbagin
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Stilbenes Anthraquinones	Resveratrol Emodin
15	C6-C3-C6	Flavonoids Isoflavonoids	Quercetin, cyanidin Genistein
18	(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignans Neolignans	Pinoresinol Eusiderin
30	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Biflavonoids	Amentoflavone
n	(C6-C3) <sub>n</sub> (C6) <sub>n</sub> (C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Lignins Catechol melanins Flavolans (Condensed Tannins)	

**Πίνακας 3:** Κατηγοροποίηση των ενώσεων ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων



### 2.3 Φαινολικές Ενώσεις στα φύλλα ελιάς

Τα εκχυλίσματα φαινολικών συστατικών από φυτά είναι φυσικές εναλλακτικές λύσεις έναντι των συνθετικών αντιοξειδωτικών καθώς διαθέτουν παρόμοια ή υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Οι φαινόλες που βρίσκονται στα φυτά έχουν μεγάλη ποικιλία όσον αναφορά τη δομή τους και τη δραστηριότητά τους. Η κύρια έρευνα έχει προσανατολιστεί προς το τρόπο απόκτησης των πρώτων αυτών υλών.

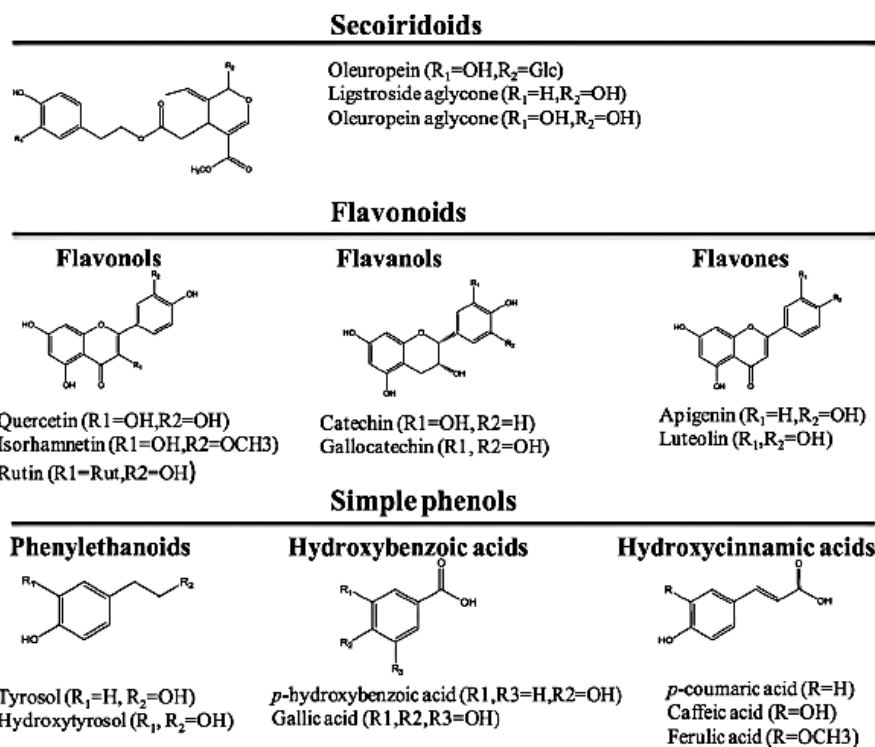
Τα φύλλα ελιάς περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων και συγκεκριμένα χωρίζονται σε :

- φαινολικά οξέα,
- φαινολικές αλκοόλες (υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη) ,
- φλαβονοειδή ( 7-Ο-γλυκοσίδη λουτεολίνης , ρουτινη , γονιδίνη 7-Ο-γλυκοσίδη , 4-Ο-γλυκοσίδη λουτεολίνης) και
- σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπαϊνή)

Τα δύο σημαντικότερα φαινολικά παράγωγα είναι η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη. Η υδροξυτυροσόλη είναι ευρέως γνωστή ως ένα από τα κύρια συστατικά

στα φύλλα ελιάς. ( Benavente-García et al , 2000 , Goulas et al 2009). Ακολουθεί η **Εικόνα 7** όπου απεικονίζονται οι φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στα φύλλα ελιάς.

N. Talhaoui et al. / Food Research International 77 (2015) 92–108



**Εικόνα 7:** Φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα φύλλα ελιάς

### 2.3.1 Φαινολικά οξέα

Με τον όρο φαινολικά οξέα προσδιορίζονται οι φαινόλες που φέρουν ένα καρβοξύλιο. Όταν ο όρος όμως χρησιμοποιείται για φυσικούς μεταβολίτες προσδιορίζει κυρίως φαινόλες με παράγωγα βενζοϊκού οξέος (C6-C1) και παράγωγα κινναμωμικού οξέος.

Ο ρόλος των φαινολικών οξέων δεν έχει διευκρινιστεί ακριβώς όμως σίγουρα συμμετέχουν στις λειτουργικές διαδικασίες του φυτού όπως φωτοσύνθεσης και θρέψης, σε ενζυμικές αντιδράσεις και αποτελούν δομικό υλικό των λιγνάνιων. Η συγκέντρωσή τους μέσα στο φυτό ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που βρίσκεται και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού.

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε μορφή εστέρων, αιθέρων ή γλυκοσίδων και μόνο ένα μικρό ποσοστό σε ελεύθερη μορφή. Τα φαινολικά οξέα που είναι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών ενώ τα οξέα

που είναι παράγωγα του κινναμωμικού οξέος είναι κυρίως εστεροποιημένα ή σε μορφή αμιδίων ή γλυκοζιτών.

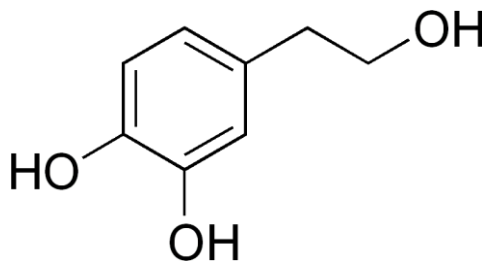
Τα πιο γνωστά και διαδεδομένα φαινολικά οξέα και από τις δύο υποκατηγορίες παρουσιάζονται στο παρακάτω **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4 : Φαινολικά Οξέα

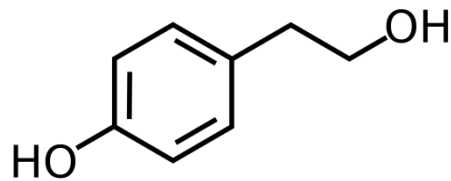
ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	
Παράγωγα βενζοϊκού οξέος	Παράγωγα κινναμωμικού οξέος
Γαλλικό οξύ	Καφεϊκό οξύ
Συριγγικό οξύ	Φερουλικό οξύ
Βανιλλικό οξύ	Σιναπικό οξύ
Βανιλίνη	π-κουμαρικό οξύ
π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	

### 2.3.2 Φαινολικές αλκοόλες

Οι φαινολικές αλκοόλες χαρακτηρίζονται από μία ομάδα υδροξυλίου ενωμένη με υποκαταστάτη του αρωματικού δακτυλίου μία φαινόλης. Στην ομάδα αυτή ανήκουν η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη.



Εικόνα 8: Υδροξυτυροσόλη

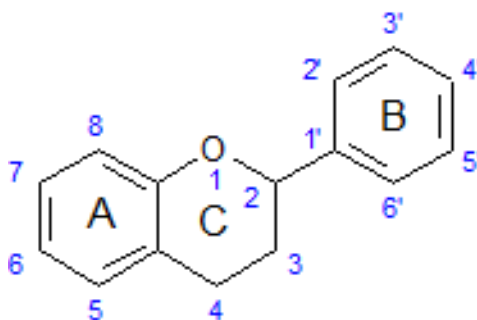


**Εικόνα 9:** Τυροσόλη

Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη είναι φαινολικά φυτοχημικά που απαντάται στα φύλλα της ελιάς και στο καρπό της και είναι από τα πιο φυσικά αντιοξειδωτικά εκχυλίσματα που βρίσκονται σε αυτήν. Η υδροξυτυροσόλη είναι υπεύθυνη για την έντονη γεύση και άρωμα του λαδιού αφού αποτελεί πρόδρομο της ελαυρωπαΐνης. Η χημική δομή της όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8** διαφέρει από την τυροσόλη (**Εικόνα 9**) μία υδροξυλομάδα (OH) στο δακτύλιο βενζολίου της πράγμα που τη καθιστά να έχει μεγαλύτερη λειτουργία ως σαρωτής ελευθέρων ριζών αυξάνοντας έτσι την αντιοξειδωτική της δράση και την αποτελεσματικότητα της υπό συνθήκες στρες.

### 2.3.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές χρωστικές που σχηματίζουν ένα σκελετό που περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτύλιους A και B (**Εικόνα 10**) συνδεδεμένους μεταξύ τους με ένα ετεροκυκλικό πυρηνικό δακτύλιο διαφορετικού βαθμού οξειδωσης.



**Εικόνα 10:** Βασική δομή ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε υποομάδες όπως είναι οι ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανίνες και ισοφλαβονοειδή. Τα πιο γνωστά φλαβονοειδή που συναντώνται στα φύλλα ελιάς είναι η λουτεολίνη, η ρουτίνη, η απιγενίνη και οι 7-O-και 4'-O-γλυκοζίτες της λουτεολίνης.

Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι είτε προσχηματισμένα κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών είτε επαγόμενα εξαιτίας μόλυνσης ή έκθεσης σε αντίοξοες συνθήκες όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία.

### 2.3.4 Σεκοϊριδοειδή

Τα σεκοϊροειδή είναι από τις επικρατέστερες ενώσεις στα φύλλα της ελιάς. Η δομική δομή αυτής της ομάδας αποτελείται από την παρουσία του ελενολικού οξέος η παραγώγων του ελενολικού. Στα βιβλιογραφία φαίνεται ότι η ελαιοευρωπαϊνή είναι το κύριο συστατικό στα φύλλα της ελιάς. Βέβαια αυτό δεν είναι απόλυτα σωστό γιατί σε διάφορες έρευνες που έχουν γίνει η ελαιοευρωπαϊνή δεν είναι πάντοτε το κύριο συστατικό και άλλα συστατικά υπερέρχουν ποσοτικά όπως το άγλυκο της ελαυρωπαϊνής(3,4 DHPEA-EDA) , η υδροξυτυροσόλη και ορισμένα φλαβονοειδή (Ryan et al ,2003).

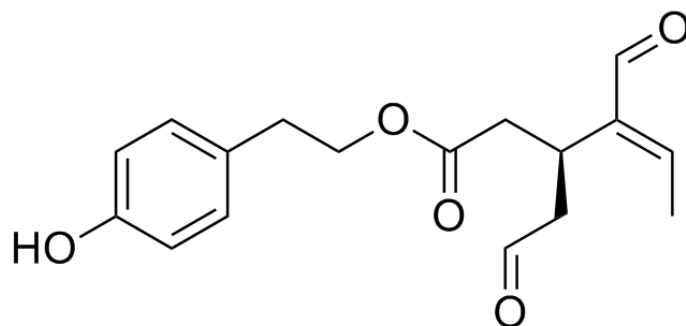
Η ελαιοευρωπαϊνή έχει ευεργητικές ιδιότητες τόσο για το φυτικό ιστό όσο και για τον άνθρωπο. Προστατεύει την ελιά από φυτογάγα ζώα, έντομα, μύκητες, ιούς και μικρόβια ενώ στον άνθρωπο μέλετες έχουν δείξει ότι συσχετίζεται με τη πρόληψη σοβαρών ασθενειών όπως διαβήτης , καρδιαγγειακές διαταραχές και ορισμένους τύπου καρκίνων. Ακόμη , γενικά τα σεκοϊριδοειδή επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού και του λαδιού και είναι υπεύθυνα για τις μεταβολές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια επεξεργασίας των επιτραπέζιων ελιών.

### 2.4 Ελαιοκανθάλη

Η ελαιοκανθάλη είναι μία ένωση που θεωρείται υπεύθυνη για την έντονη γεύση του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου. Η κατανάλωση φρέσκου έξτρα παρθένο ελαιόλαδου έχει συνδεθεί με οφέλη για την υγεία καθώς και τη μακροζωία (Parkinson, L., & Keast, R. ,2014). Η ελαιοκανθάλη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση ανάλογη του Ibuprofen. (Beauchamp 2005) . Ακόμη, η ελαιοκανθάλη έχει βρεθεί ότι έχει αντικαρκινική (Charalambous 2009) , αντιμικροβιακή (Medina 2006) και νευροπροστατευτική δράση χωρίς τοξικές επιδράσεις. (Qosa 2015). Η ελαιοκανθάλη θεωρείται ως μία ισχυρή ένωση για την άμυνα των φυτών κυρίως λόγω της ισχυρής δυνατότητας μαζικής συμπλοκοποίησης και διασύνδεσης πρωτεϊνών (Konno , 1999).

Η ελαιοκανθάλη είναι μια φαινόλη που εντοπίζεται κυρίως στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο .Η ελαιοκανθάλη (διαλδεϊδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα ,p-HPEA-EDA) είναι μια ουσία η οποία προκαλεί αίσθηση «καψίματος» στο πίσω μέρος της γλώσσας. Στην πραγματικότητα, κατόπιν έρευνας αποδείχτηκε πως ενεργοποιεί τον αισθητικό υποδοχέα TRPA1 που βρίσκεται στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα, προκαλώντας αυτή την ερεθιστική δράση.





Εικόνα 11: Ελαιοκανθάλη

## 2.5 Επίδραση Βιοτικών και Αβιοτικών παραγόντων

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει την προσοχή της έρευνας λόγω των οφελών για την ανθρώπινη υγεία. Ο φυσικός τους ρόλος βέβαια είναι να συσσωρεύονται σε «στρατηγικά» σημεία του φυτού συμμετέχοντας στη διαδικασία αναγνώρισης συγκεκριμένων παθογόνων και φυτοφάγων εντόμων παρέχοντας του έτσι προστασία. Άκομη, προστατεύουν τα φυτά από το «στρες» που προκαλείται από αβιοτικούς παράγοντες όπως η έλλψη νερού, η υψηλή συγκέντρωση αλάτων στο έδαφος, η χαμηλή γονιμότητα του εδάφους και οι κλιματικές συνθήκες. Οι μη ζώντες, οι χημικοί και οι φυσικοί παράγοντες ενός οικοσυστήματος αναφέρονται ως αβιοτικοί παράγοντες. Σε αντίθεση οι βιοτικοί παράγοντες είναι όλοι οι οργανισμοί φυτά, ζώα και μικροοργανισμοί ενός οικοσυστήματος. Αυτοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να αλλάξουν ποιοτικά και ποσοτικά τη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων της ελιάς. (Papoti and Tsimidou, 2009a, Markakis et al., 2010)

### 2.5.1 Αβιοτικοί Παράγοντες

#### 2.5.1.1 Ξηρασία

Ένα από τα χαρακτηριστικά του ελαιόδεντρου είναι η ανθεκτικότητά του στην ξηρασία. (Tubelleh et al, 2008). Η ελιά διαθέτει την ικανότητα να μπορεί να προσαρμόζεται στη διαθεσιμότητα του νερού με αποτέλεσμα να συμβαίνουν μεταβολές στο φύλλο που σχετίζονται με ανατομικά, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του. Επίσης, η προσαρμογή του δέντρου στη ξηρασία προκαλεί και αλλαγές στη χημική σύνθεση των φύλλων. Στην πραγματικότητα όμως, υπό αυτές τις συνθήκες, οι φαινολικές ενώσεις που παράγονται σε φύλλα αυξάνονται. Για παράδειγμα, η ελαιοευρωπαϊνή, η κύρια φαινολική ένωση των φύλλων ελιάς, αυξάνεται σε συνθήκες ξηρασίας τονίζοντας έτσι τη σημασία της στον αμυντικό μηχανισμό της ελιάς. (Talhoui, 2015)

### 2.5.1.2 Άλατα στο έδαφος και στο νερό

Η εμφάνιση αλάτων τόσο στο έδαφος όσο και στο νερό μπορεί να προκαλέσει αρνητικές συνέπειες στην ανάπτυξη των φυτών. Σε ένα πείραμα που έγινε στις ποικιλίες Arbequina και Koroniki φάνηκε ότι το συνολικό φαινολικό φορτίο των φύλλων ελιάς αυξήθηκε ελαφρά όταν ήρθε σε επαφή με μέτρια συγκέντρωση NaCl ενώ σε υψηλή συγκέντρωση NaCl σχεδόν διπλασιάστηκε. (Petridis et al, 2012)

### 2.5.1.3 Τοποθεσία

Το φαινολικό περιεχόμενο φαίνεται να επηρεάζεται από τη περιοχή που έχει καλλιεργηθεί η ελιά. Μία έρευνα που έγινε στη Τυνησία έδειξε ότι τα φύλλα της ελιάς από δέντρο στη Βόρεια Τηνυσία περιέχουν υψηλότερη συνολική φαινολικό φορτίο και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα φύλλα της ελιάς στη Νότια Τηνυσία. (Brahmi et al, 2014)

### 2.5.1.4 Εποχή Δειγματοληψίας

Η χρονική περίοδος που θα γίνει η συγκομιδή των φύλλων ελιάς έχει δείξει ότι επηρεάζει το φαινολικό φορτίο. Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει αύξηση των φλαβονοειδών την περίοδο της άνοιξης και αυτό θα μπορούσε να έχει σχέση με τη γενική αύξηση των βιολογικών δραστηριοτήτων κατά την ανανέωση των φύλλων. Σε ένα πείραμα που έγινε από τις Papoti και Tsimidou βρέθηκαν αποκλίσεις στο επίπεδο της ελαιοευρωπαϊνης στις ποικιλίες Koroniki και Χονδρολιά Χαλκιδικής τη περίοδο μεταξύ Ιουνίου και Νοεμβρίου και με υψηλότερη τιμή του Οκτωβρίου. (Papoti and Tsimidou, 2009a)

### 2.5.1.5 Φως

Το φως φαίνεται να είναι ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει το φαινολικό φορτίο και πιο συγκεκριμένα τις ενώσεις φλαβονοειδών. Ο σχηματισμός φλαβονών και φλαβονολών επιταχύνεται με τη παρουσία φωτός. Στην πραγματικότητα, τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά από την υπεριώδη ακτινοβολία αφού προσροφούν στα μέγιστα την ακτινοβολία στη υπεριώδη περιοχή ενώ επιτρέπουν στο ορατό μήκος κύματος που είναι φωτοσυνθετικά δραστικό να περάσει. (Markham et al, 2000a)

### 2.5.1.6 Χαμηλές Θερμοκρασίες

Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και στη ανθεκτικότητα των ελαιόδεντρων στις χαμηλές θερμοκρασίες εξαιτίας της ικανότητας τους να αναστέλλουν την υπεροξειδωση λιπιδικών μεμβρανών. Σε ένα πείραμα που έκαναν οι *Ortega-Gracia* και ο *Peragon* το 2009 βρέθηκε ότι η ελαιοευρωπαϊνή είχε μεγάλη αύξηση στις συγκεντρώσεις της έπειτα από έκθεση φύλλων ελιάς σε ψυχρό περιβάλλον. Η ελαιοευρωπαϊνή, λοιπόν, μπορεί να προσφέρει προστασία έναντι οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από ψυχρές θερμοκρασίες.

## 2.5.2 Βιοτικοί παράγοντες

### 2.5.2.1 Μύκητες

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν κυρίαρχο ρόλο στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού έναντι των εχθρών. Η παραγωγή τους στο ελαιόδεντρο έχει μελετηθεί ευρέως και έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στα επίπεδα τυροσόλης,κατεχίνης ,κουερσετίνης, λουτεολίνη και ελαιοευρωπαϊνης αποδεικνύοντας έτσι τον αμυντικό τους ρόλο κατά των μυκητών. Όσον αφορά τις φαινόλες των φύλλων λίγες έρευνες έχουν γίνει για τη συμμετοχή τους στην άμυνα του φυτού. Ωστόσο , ο *Rahoui et al.* το 2009 έδειξαν ότι τέσσερις οικογένειες πολυφαινολών:

1. υδροξυκιναμικά παράγωγα
2. παράγωγα ελαιωπαΐνης
3. παράγωγα τυροσόλης και
4. μονογλυκοσίδες φλαβονόλης

ήταν υπεύθυνες για την αντοχή της ελιάς έναντι του μύκητα *Fusicladium oleagineum*.

### 2.5.2.2 Βακτήρια

Η αντιβακτηριακή δράση των φύλλων ελιάς σχετίζεται με τη παρουσία φαινολικών ενώσεων της ελιάς. Στην επιφάνεια των φύλλων υπάρχει ένα φράγμα λόγω του ελαιολικού οξέος που ενισχύει τη φυσική αντοχή της ελιάς. Η φυματίωση είναι μια βακτηριολογική ασθένεια της ελιάς που οδηγεί στην εξασθένηση των δένδρων και τη μείωση της παραγωγής του. Η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. Μία έρευνα έδειξε αλλαγές στο φαινολικό φορτίο του δένδρου που είχε μολυνθεί από φυματίωση και πιο συγκεκριμένα αύξηση της βερσακοσίδης στα φύλλα. (Cayuela et al , 2006 )

### 2.5.2.3 Ηλικία Φύλλου

Η ηλικία των φύλλων επηρεάζει τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων σε αυτά. Σε μία έρευνα που έγινε έδειξε ότι τα παλιά φύλλα έδειξαν υψηλότερα επίπεδα καφεϊκού οξέος , γλυκοσίδης λουτελοΐνης και ελαουροσίδης σε σχέση με τα νέα φύλλα. Ακόμη , τα επίπεδα ελαυρωπαΐνης από δειγματοληψία τριών φύλλων διαφορετικής ηλικίας (νεαρά , μέσης ηλικίας και γηραία φύλλα) διέφεραν σημαντικά με μεγαλύτερη ποσότητα αυτής να βρίσκεται στα νεαρά φύλλα. Η μέση και γηραία ηλικία είχαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σχέση με τα νέα αποδεικνύοντας έτσι πόσο σημαντικός παράγοντας είναι η ηλικία του φύλλου και το τρόπο με το χρόνο αποκοδομείται σταδιακά η ελαυρωπαΐνη. (Ranalli 2006) Ωστόσο σε μία άλλη έρευνα που έγινε από τις *Paroti* και *Tsimidou* τα επίπεδα της ελαιοευρωπαΐνης βρέθηκαν υψηλότερα στα ώριμα φύλλα σε σύγκριση με τα νέα και παλαιά φύλλα.

### 2.5.1.4 Γονότυπος

Μελέτες έχουν δείξει ότι και ο γονότυπος επηρεάζει το μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων και τις ποσοτικές σχέσεις των διαφόρων ομάδων τους. Οι ανθεκτικές ποικιλίες φαίνεται να είναι πλουσιότερες σε ορισμένες φαινολικές ενώσεις έναντι των ευαίσθητων ποικιλιών. Σε μία έρευνα που έγινε έδειξε ότι τα φύλλα της ποικιλίας Κοθρέικης είχαν συγκέντρωση ελαιοευρωπαΐνης  $20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  FW ενώ τα φύλλα της ποικιλίας Καλαμών είχαν συγκέντρωση  $5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  FW ελαιοευρωπαΐνης. (Petridis et al , 2012)

## 3.ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

### 3.1 Η έννοια της εκχύλισης

Με τον όρο εκχύλιση ορίζεται η απομόνωση μίας ή και περισσότερων ενώσεων από στερεά ή υγρά μίγματα. Πρόκειται για μία φυσική μέθοδος διαχωρισμού και γίνεται με τη βοήθεια του κατάλληλου διαλύτη.

Η εκχύλιση είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απομόνωση πολυφαινολών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι πολυφαινόλες δηλαδή τα διαλυτά συστατικά διαχωρίζονται από ένα στερεό υπόστρωμα δηλαδή τα φύλλα ελιάς με τη βοήθεια ενός διαλυτικού μέσου.

Η εκχύλιση χρησιμοποιείται ευρέως εξαιτίας της ταχύτητας εκτέλεσης της, της απλότητας της, το χαμηλό της κόστος καθώς και τη δυνατότητα εφαρμογής της σε δείγματα που περιέχουν ελάχιστες ή μεγαλύτερες ποσότητες μίας ουσίας.

#### 3.1.1 Διαλύτες της εκχύλισης

Ένας από τους πιο καθοριστικούς παράγοντες στην διαδικασία της εκχύλισης είναι ο διαλύτης. Ένας ιδανικός διαλύτης πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- χαμηλή πίεση ατμών
- υψηλή θερμική σταθερότητα
- μη ευφλεκτότητα
- υψηλή ικανότητα διαλύσεως
- χημική σταθερότητα
- μη τοξικότητα
- βιοαποικοδομησιμότητα
- βιωσιμότητα και
- χαμηλό κόστος

Η μη ευφλεκτικότητα και μη τοξικότητα παρόλο που είναι επιθυμητά δεν είναι πάντα εφικτό να ικανοποιηθούν, έτσι απαιτείται στις εργασίες μεγάλη προσοχή. Ανάλογα με το είδος και την κατάσταση του ακατέργαστου υλικού από όπου θα γίνει η εκχύλιση διακρίνονται σε δύο κατηγορίες οι διαλύτες, στους υδατικούς και στους οργανικούς διαλύτες.

Υδατικοί διαλύτες είναι το νερό και αραιά διαλύματα ανόργανων οξέων μη αναμίξιμα με το νερό που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή από μια οργανική μη αναμίξιμη με το νερό

φάση πολικών ενώσεων, όπως οξέων και βάσεων υπό ιονική μορφή αλλά και άλλων ιονικών ή ιδιαίτερα πολικών ενώσεων. Οργανικοί διαλύτες είναι οι κοινοί μη αναμίξιμοι με το νερό διαλύτες όπως ο αιθέρας, το χλωροφόρμιο, το εξάνιο κλπ που χρησιμοποιούνται για τη παραλαβή ουδέτερων οργανικών ουσιών από υδατικά διαλύματα η αραιώματα.

Οι οργανικοί διαλύτες είναι οι κατεξοχήν διαλύτες της εκχύλισης που χρησιμοποιούνται ευρέως ενώ οι υδατικοί διαλύτες είναι βοηθητικοί διαλύτες με την έννοια ότι εφαρμόζονται στους χημικούς διαχωρισμούς μέσω της εκχύλισης όξινων και βασικών από τα ουδέτερα συστατικά τους.

### 3.2 Τεχνικές εκχύλισης φύλλων ελιάς

Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης εξαιτίας της χρήσης υψηλών θερμοκρασιών, τοξικών διαλυτών και μεγάλων ποσών ενέργειας που καταναλώνουν δεν αποτελούν την πιο οικονομική, γρήγορη και φιλική προς το περιβάλλον επιλογή. Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές προκειμένου να μειωθούν τα παραπάνω προβλήματα, όπως εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό, με υπέρθερμο υγρό υπό πίεση ή και συνδυασμός όλων των παραπάνω.

Η εκχύλιση με διαλύτες είναι η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι ερευνητές για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς. Η ποιοτική και ποσοτική πολυφαινολική σύνθεση των φύλλων ελιάς εξαρτάται από τη μέθοδο εκχύλισης και τις συνθήκες της όπως:

- τον τύπο του διαλύτη,
- το pH,
- τη θερμοκρασία
- τον αριθμό των σταδίων εκχύλισης,
- το χρόνο της εκχύλισης,
- την αναλογία υγρού προς στερεό και
- το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος.

Οι διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε εκχυλίσεις φύλλων ελιάς είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, το οξικό αιθύλιο, το νερό, το εξάνιο, ο διαιθυλεθέρας και η ακετόνη εξαιτίας της ικανότητάς τους να εκχυλίζουν λιπόφιλες και υδρόφιλες φαινόλες. Η μεθανόλη φαίνεται η πιο αποτελεσματική, ωστόσο η χρήση του οδηγεί σε ανεπιθύμητα τοξικά εκχυλίσματα. (Souilem et al 2017)

### 3.3.1 Εκχύλιση φύλλων ελιάς με συμβατικές μεθόδους

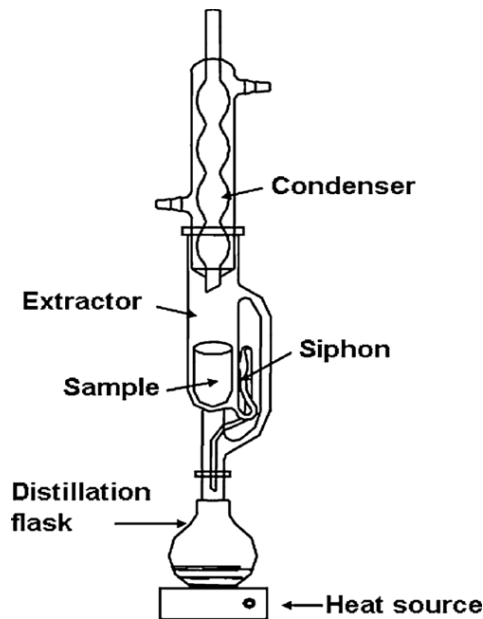
#### 3.3.1.1 Εκχύλιση στερεού υγρού

Η πιο συνηθισμένη συμβατική τεχνική εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού με χρήση οργανικών διαλυτών. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως σε βιομηχανικής κλίμακας εκχύλισης φαινολών από φύλλα ελιάς. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι μίγματα νερού-μεθανόλης ή εξάνιο. Αυτό είναι ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου γιατί τα εκχυλίσματα τα οποία λαμβάνονται είναι τοξικά για τον άνθρωπο και το περιβάλλον και απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία για την απομάκρυνση των τοξικών ουσιών. Ένα ακόμη μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο χρόνος για να ολοκληρωθεί η εκχύλιση που είναι συνήθως ένα με δύο 24ωρα κάνοντας την έτσι χρονοβόρα και υψηλού ενεργειακού κόστους (Rahmanian et al 2015). Τέλος, επειδή η θερμοκρασία εκχύλισης είναι υψηλή οι θερμοευαίσθητες ουσίες σε αυτές τις θερμοκρασίες μπορεί να υποστούν θερμική αποσύνθεση.

Παρόλα αυτά, γίνονται προσπάθειες για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων όπως για παράδειγμα εφαρμογή διαδικασιών προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης, με ζεμάτισμα ή με χρήση μη τοξικών διαλυτών, για να επιτευχθεί ένα καλύτερο αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου.

#### 3.3.1.2 Εκχύλιση Soxhlet

Στην κλασική εφαρμογή της μεθόδου το δείγμα τοποθετείται σε μία «δακτυλήθρα» και γεμίζει σταδιακά με το διαλύτη. Όταν η ποσότητα του υγρού φτάσει στην υπερχειλίση τότε συμβαίνει αναρρόφηση και το υγρό πέφτει πίσω στη φιάλη αποστάξεως, μεταφέροντας έτσι τις εκχυλιζόμενες ουσίες (**Εικόνα 12**). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθώς το υγρό λόγω της θέρμανσης περνά σε μορφή ατμού στο συμπυκνωτήρα και πέφτει στη δακτυλήθρα για να γίνει εκ νέου σιφωνισμός (αναρρόφηση). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι η εκχύλιση να είναι πλήρης. Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια συνεχής και διακριτή τεχνική. Στην πραγματικότητα, ο εκχυλιστήρας δρα σαν διαλείπωντος έργου, ωστόσο το εκχύλισμα ανακυκλώνεται μέσα από το δείγμα και το σύστημα τελικά λειτουργεί με τρόπο συνεχή.



Εικόνα 12: Διάταξη Soxhlet

Τα φύλλα της ελιάς θερμαίνονται σε ένα δοχείο που συνδέεται με ένα συμπυκνωτήρα και ρέει πίσω μέσα στο δοχείο χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς διαλύτες. Οι διαλύτες εξατμίζονται σε ένα ξηραντήριο κενού στους 35°C και το εκχύλισμα ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους με μία ήπια ροή αζώτου. Η διάρκεια αυτής της μεθόδου είναι περίπου 8 ώρες. (Abbasi et al, 2008a)

Τα βασικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι:

- Η θερμοκρασία του συστήματος παραμένει σχετικά σταθερή λόγω της διαρκούς θέρμανσης της φιάλης απόσταξης που φθάνει στην κοιλότητα μέσω του μανδύα
- Βελτιώνεται η απόδοση της εκχύλισης αφού το δείγμα έχει συνεχώς επαφή με νέο διαλύτη
- Μπορεί να γίνει ταυτόχρονα και δειγματοληψία και δεν είναι απαραίτητη η διήθηση μετά το τέλος της εκχύλισης αφού τα στερεά παραμένουν μέσα στη φύσιγγα και δεν παρασύρονται με το διαλύτη.
- Χαμηλό κόστος εξοπλισμού.
- Αποτελεί μια απλή μεθολογία που δεν απαιτεί μεγάλο χρόνο εκπαίδευσης και μπορεί να εκχυλίσει μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος συγκριτικά με τις μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης.

Παρόλα αυτά η μέθοδος εκχύλισης Soxhlet παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών εκχύλισης τα οποία είναι τα εξής:

- Η μέθοδος έχει μεγάλο κόστος και είναι χρονοβόρα
- Οι μεγάλες ποσότητες του διαλύτη προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα κατά την απόρριψη του



- Υπάρχει κίνδυνος θερμικής αποσύνθεσης των συστατικών επειδή τα δείγματα εκχυλίζονται στα σημεία ζέσεως του διαλύτη
- Η εκλεκτικότητα του διαλύτη προκαλεί δυσκολία στην αυτοματοποίηση της μεθόδου
- Μετά το πέρας της εκχύλισης πρέπει να εξατμιστεί ο διαλύτης για παραλαβή των εκχυλιζόμενων συστατικών

Η μέθοδος Soxhlet καταφέρνει να αντιμετωπίσει σε ένα ποσοστό τα μειονεκτήματα της με διάφορες τροποποιήσεις όπως με εφαρμογή πίεσης για επιτάχυνση της διαδικασίας της εκχύλισης και μείωση των χρησιμοποιημένων διαλυτών, με μερική αυτοματοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιώντας υπερήχους και μικροκύματα. (Rahmanian et al 2015)

### 3.3.2 Εκχύλιση φύλλων ελιάς με μη συμβατικές μεθόδους

#### 3.3.2.1 Εκχύλιση υπό πίεση υγρού (Pressurized Liquid Extraction PLE)

Η υπό πίεση υγρού εκχύλιση (PLE), επίσης γνωστή και ως επιταχυνόμενη εκχύλιση διαλύτη, είναι μία τεχνική εκχύλισης που συνδυάζει υψηλή θερμοκρασία και πίεση σε υγρούς διαλύτες. Οι θερμοκρασίες που γίνεται η εκχύλιση είναι ίσες ή μεγαλύτερες από το σημείο ζέσεως του διαλύτη. Εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων η PLE έχει μικρούς χρόνους εκχύλισης, χαμηλή κατανάλωση διαλύτη και υψηλή απόδοση. (Martinez, 2007)

Η PLE έχει εφαρμοστεί σε φύλλα ελιάς με τη χρήση διαλυτών φιλικών προς το περιβάλλον όπως η αιθανόλη και το νερό στους 150°C και 200°C αντίστοιχα, με σκοπό την αύξηση της ποσότητας της ελαιοευρωπαϊνης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επίσης, μίγμα αιθανόλης/ νερού, με αραίωση 43/57 αντίστοιχα, ως διαλύτης σε PLE με θερμοκρασία 190 °C έδωσε απόδοση ελαιοευρωπαϊνης 26,1%. (Xygnos, 2014)

#### 3.3.2.2 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό (Supercritical Water Extraction SWE)

Υπερκρίσιμο νερό είναι το νερό θερμοκρασίας από 100 °C μέχρι 374 °C και πίεσης μικρότερης από 221 bar (Islam et al., 2013). Η πίεση είναι υψηλή για να μπορεί να διατηρεί το νερό στην υγρή του κατάσταση. Το νερό παρόλο που είναι ιδανικός διαλύτης λόγω της εύκολης πρόσβασης του, του χαμηλού του κόστους και της μη τοξικότητας, δεν χρησιμοποιείται λόγω της χαμηλής απόδοσης του κατά την εκχύλιση χαμηλών θερμοκρασιών. Η συγκεκριμένη μέθοδος για την εκχύλιση φύλλων ελιάς είναι σπάνια αλλά

μελλοντικά μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για την εκχύλιση των συστατικών της.

### 3.3.2.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (Supercritical Fluid Extraction- SFE)

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού βασίζεται κυρίως στην ισχύ διαλυτοποίησης υγρών, τα οποία διατηρούνται πάνω από το κρίσιμο σημείο τους. Τα υπερκρίσιμα υγρά έχουν τις ικανότητες μεταφοράς μάζας όπως τα αέρια και διαλυτοποίησης όπως τα υγρά. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση ρευστού είναι μία τεχνική εκχύλισης που μπορεί να αυτοματοποιηθεί και χαρακτηρίζεται από σύντομους χρόνους εκχύλισης και χαμηλή κατανάλωση διαλυτών σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό θερμικά ασταθών και χαμηλής πτητικότητας ενώσεων.

Η εκχύλιση φαινολών από φύλλα ελιάς με τη μέθοδο αυτή έχει ως αποτέλεσμα παραλαβή διαφορετικών συγκεντρώσεων φαινολών ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο διαλύτη. (Le Floch *et al.*, 1998)

Τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος επένδυσης του εξοπλισμού SFE και ο μεγάλος αριθμός παραγόντων που πρέπει να ρυθμίζονται για την εκχύλιση της επιθυμητής ουσίας κάθε φορά. (Sharif *et al.*, 2014)

Το διοξείδιο του άνθρακα αποτελεί συχνά το υπερκρίσιμο ρευστό που χρησιμοποιείται στη SFE λόγω του χαμηλού του κόστους, της χαμηλής τοξικότητας και ευφλεκτότητας αλλά και της υψηλής καθαρότητας. Η εφαρμογή της εκχύλισης υπερκρίσιμων ρευστών στα φύλλα ελιάς με χρήση διοξείδιο του άνθρακα και 10% μεθανόλης, ως διαλύτες στα 334 bar και θερμοκρασία 100°C για 140 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα υψηλή απόδοση στο συνολικό φαινολικό φορτίο σε σχέση με άλλες μεθόδους αλλά μικρότερη απόδοση της εκχύλισης η οποία είναι 45% (Tabera *et al.*, 2004).

### 3.2.2.4 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction-MAE)

Η μέθοδος εκχύλισης υποβοηθούμενη με μικροκύματα έχει εφαρμοστεί για την εκχύλιση δραστικών ενώσεων και φυσικών προϊόντων όπου τυπικά χρειάζονται ώρες για να ολοκληρωθεί η εκχύλιση τους με τις άλλες συμβατικές μεθόδους ενώ σε αυτήν ο χρόνος εκχύλισης κυμαίνεται στα 17 λεπτά. (Perez- Serradilla & Luque de Castro, 2011) Το δείγμα θερμαίνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Η θέρμανση ξεκινά στο δείγμα κατευθείαν, καθώς το δοχείο δεν απορροφά ακτινοβολία μικροκυμάτων, σε αντίθεση με τις άλλες συμβατικές μεθόδους όπου η θερμότητα μεταδίδεται μέσω αγωγής- συναγωγής. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, ο διαλύτης και το δείγμα περιέχονται σε σφραγισμένα δοχεία εκχύλισης, που επιτρέπουν στη θερμοκρασία του διαλύτη να αυξηθεί

πάνω από το σημείο βρασμού του, μειώνοντας έτσι το χρόνο εκχύλισης και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά της.

Οι βασικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με μικροκύματα είναι :

- η φύση του δείγματος ,
- οι συνθήκες κατεργασίας και
- ο διαλύτης.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη , το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο και το νερό ή μίγματα σε διάφορες αναλογίες.

Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με μικροκύματα σε σύγκριση με τις συβατικές μεθόδους είναι:

- ο μειωμένος χρόνος
- η υψηλότερη απόδοση
- η υψηλότερη καθαρότητα του τελικού προϊόντος εξαλείφοντας τη μετέπειτα επεξεργασία των λυμάτων
- χαμηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών και τέλος
- υψηλής εκλεκτικότητας εκχύλιση.

Η εκχύλιση φαινολών από φύλλα ελιάς με μικροκύματα γίνεται συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες και ως εκ τούτου η απομόνωση των αντιοξειδωτικών πρέπει να γίνεται προσεκτικά ώστε να μην είναι δυνατή η αποικοδόμησή τους. (Grigonis et al.,2005).

#### 3.2.2.4 Εκχύλιση με υπέρηχους (Ultrasound Assisted Extraction-UAE)

Οι υπέρηχοι παρέχουν κύματα υψηλής συχνότητας που μεταφέρουν πίεση κατά τη διέλευσή τους σε ένα μέσο με αποτέλεσμα τη δημιουργία περιοχών χαμηλής και υψηλής πίεσης. Η διακύμανση της πίεσης ορίζεται ως πλάτος πίεσης και είναι ανάλογο της ποσότητας ενέργειας που εφαρμόζεται στο σύστημα. Στην περίπτωση που οι διακυμάνσεις της πίεσης είναι αρκετά υψηλές, τότε ένα μέσο σε υγρή κατάσταση μπορεί να αποδομηθεί, σχηματίζοντας έτσι μικροφουσαλίδες αερίου και ατμού. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σπηλαιώση.

Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με τη χρήση των υπέρηχων έχει αποδοθεί στη διάδοση των υπερηχητικών κυμάτων μέσα από το διαλύτη. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων, τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και τη μεταφορά μάζας από τις κυτταρικές μεμβράνες. Εξαιτίας της κατάρευσης των φυσαλίδων

που δημιουργήθηκαν, λόγω της σπηλαίωσης ,προκαλούνται αναταράξεις και η ταχύτητα σύγκρουσης μεταξύ των σωματιδίων είναι υψηλή. Οι αναταραχές μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τους συντελεστές μεταφοράς μάζας που συνεπάγεται και αύξηση ποσότητας διαλύτη που ήρθε σε επαφή με το στερεό καθώς και μεταφορά διαλυτων συστατικών μαζί με το διαλύτη.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής :

- μειωμένος χρόνος εκχύλισης,
- εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα,
- μικρότερες ποσότητες διαλυτών,
- αυξημένη απόδοση εκχύλισης λόγω ρήξης του κυτταρικού τοιχώματος και αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας και
- μείωση κατανάλωσης ενέργειας

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των στερολών και λιπαρών αλκοολών σε φύλλα ελιάς έχει πραγματοποιηθεί με την εκχύλιση με υπερήχους, αλλά και για τη ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων με αυτή τη μέθοδο μειώθηκε ο χρόνος εκχύλισης από 24 h σε 15 min (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013). Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στον φυτικό ιστό και καλύτερη διαλυτοποίηση των συστατικών σε αυτόν αυξάνοντας έτσι την απόδοση.

### 3.3 Εκχύλιση της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια από τις γνωστές μεθόδους εκχύλισης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η νέα μέθοδος για την εξαγωγή των φαινολικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην υδρόλυση των φύλλων ελιάς και την παραγωγή εκχυλισμάτων πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις. Πρόκειται για μια οικονομικά αποδοτική μέθοδο εξόρυξης φαινολικών συστατικών που μπορεί να βρει εφαρμογή εκτός από το εργαστήριο και σε μικρές και μεγάλες επιχειρήσεις ελαιοτριβίων. Χρησιμοποιώντας την συγκεκριμένη μέθοδο και αλλάζοντας τρεις διαφορετικούς παράγοντες μελετήθηκαν οι διαφορές στη ποσότητα του συνολικού φαινολικού φορτίου και έγινε προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση των διάφορων φαινολικών ενώσεων σε κάθε περίπτωση.

Οι τέσσερις παράγοντες που μελετήθηκαν είναι :

1. ποικιλία ελιάς
2. περίοδος δειγματοληψίας
3. συνθήκες εκχύλισης
4. ηλικία δέντρο

# Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1. Φυτικό Υλικό

Τα φύλλα ελιάς (*Olea europaea* L.) που χρησιμοποιήθηκαν για την διακπεραίωση των πειραματικών διεργασιών προέρχονται από:

- 20 ποικιλίες από τα φυτώρια Κωστελένος που βρίσκονται στο Πόρο Τροιζινίας ,
- μία ποικιλία εντός των εγκαταστάσεων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνίου και
- 3 ποικιλίες από αγρόκτημα στο Νομό Φωκίδας και συγκεκριμένα από τον Άγιο Σπυρίδωνα.

Οι ποικιλίες από τα φυτώρια Κωστελένος: «Αγουρομάνακο» , «Αμφίσσης» , «Βαλανολιά» , «Γαλατιστάς» , «Θιάκη» , «Καλαμών» , «Καλοκαιρίδα» , «Καρυδολιά Χαλκιδικής» , «Κοθρέικη Μανάκη» , «Κορωνέικη» , «Κουτσουρελιά» , «Λευκοελιές Σερρών» , «Μαστοειδής» «Μαυροελιά Μεσσηνίας» , «Μεγάρων» , «Τραγολιά» , «Arbequina» , «Frantoio» , «Leccino» και «Picual». Τα δέντρα από τα φυτώρια Κωστελένος ήταν όλα ηλικίας 4-5 χρονών και θεωρήθηκαν «νεαρά» δέντρα αφού δεν έχουν εισέλθει σε καρποφορίας. Οι ποικιλίες από το αγρόκτημα στο Νομό Φωκίδας ήταν «Αμφίσσης» , «Καλαμών» και «Κορωνέικη». Η ποικιλία από το τις εγκαταστάσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνίου ήταν Κορωνέικη. Τα δέντρα αυτά έχουν φτάσει σε στάδιο πλήρους καρποφορίας και για αυτό θεωρήθηκαν «ώριμα» δέντρα.



**Εικόνα 13:** «Νεαρά» δέντρα από τα φυτώρια Κωστελένου

Τα δέντρα κλαδεύτηκαν και συλλέχθηκαν τα φύλλα τους. Η συλλογή έγινε πρωινές ώρες και δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στη συλλογή υγιών φύλλων ελιάς απαλλαγμένα από οποιαδήποτε ασθένεια. Οι ημερομηνίες συλλογής της κάθε ποικιλίας και η ηλικία του κάθε δέντρου εμφανίζονται στο **Πίνακα 5**.

**Πίνακας 5:** Δεδομένα συλλογής των υπό μελέτη φυτικών δειγμάτων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΕΝΤΡΟΥ	
Ιούλιος 2019	«Θιάκη» «Κουτσουρελιά» Σερρών» «Μαυροελιά» «Τραγολιά»	«Κορωνέικη» «Λευκοελιές» «Μαστοειδής» Μεσσηνίας»	Νεαρά
Οκτώβριος 2019	«Αγουρομάνακο», «Αμφίσσης», «Βαλανολιά», «Γαλατιστάς», «Θιάκη», «Καλαμών», «Καλοκαιρίδα», «Καρυδολιά Χαλκιδικής», «Κοθρέικη Μανάκη», «Κορωνέικη», «Κουτσουρελιά», «Λευκοελιές Σερρών», «Μαστοειδής» «Μαυροελιά Μεσσηνίας», «Μεγάρων», «Τραγολιά», «Arbequina», «Frantoio», «Leccino» και «Picual».	Νεαρά	
Νοέμβριος 2019	«Αμφίσσης», «Καλαμών» και «Κορωνέικη».	Ώριμα	
Σεπτέμβριος 2019	Κορωνέικη ΝΤΥΑ	Ώριμα	
Οκτώβριος 2019	Κορωνέικη ΝΤΥΑ	Ώριμα	
Νοέμβριος 2019	Κορωνέικη ΝΤΥΑ	Ώριμα	
Ιανουάριος 2020	Κορωνέικη ΝΤΥΑ	Ώριμα	
Φεβρουάριος 2020	Κορωνέικη ΝΤΥΑ	Ώριμα	

Οι ποικιλίες που τα φύλλα τους συλλέχθηκαν τους μήνες Ιούλιο, Σεπτέμβριο, Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2019 χρησιμοποιήθηκαν για το πρώτο πείραμα ενώ η ποικιλία ΝΤΥΑ που συλλέχθηκε του μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο του 2020 χρησιμοποιήθηκε στο δεύτερο πείραμα.

Μετά τη συλλογή, τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες τροφίμων με φερμουάρ (zip it) που σφραγίζουν αεροστεγώς και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για περαιτέρω χρήση.

## 1.2 Εκχύλιση Φαινολικών Συστατικών

### 1.2.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Φύλλα ελιάς από 20 διαφορετικές ποικιλίες
- Φύλλα ελιάς από τις ποικιλίες από το αγρόκτημα στο Νομό Φωκίδας
- Φύλλα ελιάς από την ποικιλία στο Πολυτεχνίο
- Θεικό Οξύ ( H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% )
- Απιονισμένο νερό

### 1.2.1.2 Όργανα και σκεύη

Κατά την διεργασία της εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

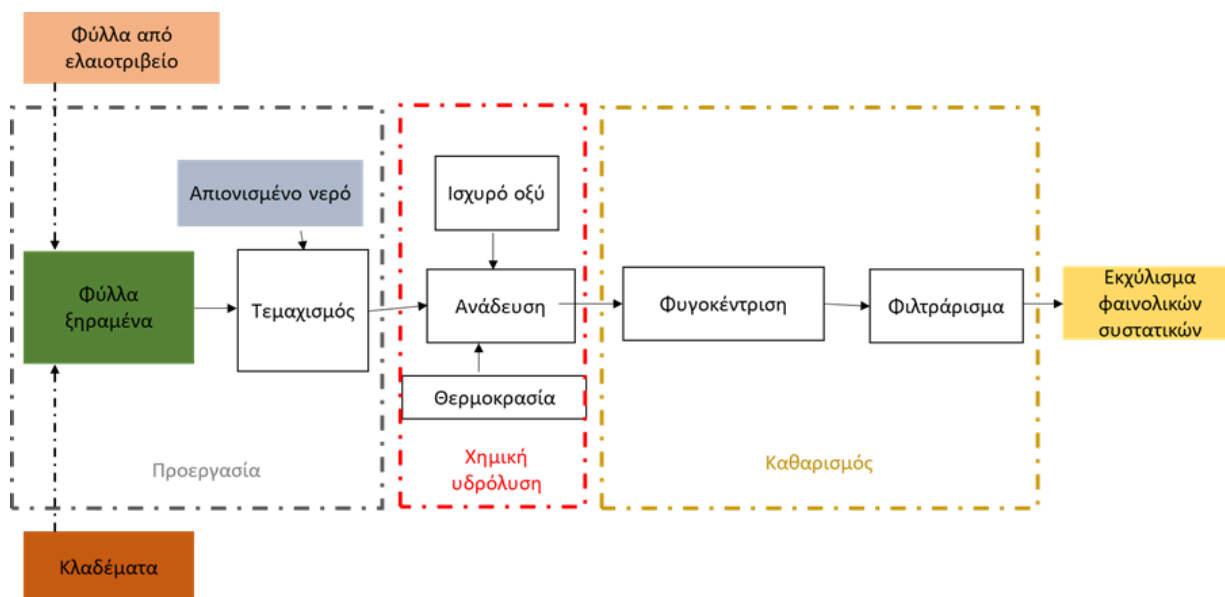
**Πίνακας 6:** Όργανα και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στην διεργασία της εκχύλισης.

<b>Όργανα</b>	Μπλέντερ Kenwood multi
	Ζυγός
	Υδατόλουτρο
	Φυγόκεντρος
<b>Σκεύη</b>	Ποτήρια ζέσεως
	Σωλήνες φυγόκεντρου
	Σύριγγα
	Φίλτρα
	Πλαστικά φιαλίδια Eppendorf
<b>Άλλα</b>	Πλαστικά μπουκάλια 0,5L
	Λεκάνες
	Χαρτί Κουζίνας

### 1.2.1.3 Μεθοδολογία

Αρχικά 10g αποξηραμένων φύλλων ελιάς προστέθηκαν σε αποσταγμένο νερό. Τα φύλλα αλέστηκαν χρησιμοποιώντας ένα σπιτικό μπλέντερ (Kenwoord ch550 multi). Η διαδικασία υδρόλυσης ξεκίνησε με τη προσθήκη θειικού οξέος ( H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% ) στο μίγμα φύλλων ελιάς/νερού. Το σύνθετο μίγμα αναδεύτηκε για 3 ώρες σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας μέσα στο υδατόλουτρο. Μετά το πέρας των τριών ωρών , το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 6000rpm για 10 λεπτά. Το υγρό κλάσμα διηθήθηκε περαιτέρω με 0,22 mm φίλτρο για την απομάκρυνση σωματιδίων. Το φιλτραρισμένο εκχύλισμα αποθηκεύτηκε σε πλαστικά φιαλίδια (Eppendorf) και τοποθετήθηκε στη κατάψυξη. Στην **Εικόνα 14**

απεικονίζεται σε σχήματα η διεργασία της εκχύλισης που αναφέρθηκε παραπάνω. Η διαδικασία είναι ίδια και για τα δύο πειράματα που έγιναν.



Εικόνα 14:Σχηματική απεικόνιση της διεργασίας εκχύλισης των φύλλων ελιάς(Lamprou et al., 2019)

### 1.2.1 1<sup>ο</sup> Πείραμα

Σε έρευνα που δημοσιεύθηκε από το εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας ΕΜΠ, μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την εξαγωγή φαινολικών συστατικών από τα φύλλα ελιάς. Η νέα μέθοδος για την εξαγωγή των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα ελιάς που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην υδρόλυση των φύλλων ελιάς και την παραγωγή εκχυλισμάτων πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις. Για την προετοιμασία των πειραματικών διεργασιών έγινε κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD), λαμβάνοντας υπόψη τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία (θερμοκρασία εκχύλισης, ποσότητα θειικού οξέος ανά ξηρό βάρος πρώτης ύλης, αναλογία όγκου-νερού προς ξηρό βάρος πρώτης ύλης). Αποτέλεσμα της μελέτης ήταν ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την εξαγωγή φαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς, με μία περιβαλλοντικά καθαρή διεργασία με εύκολη και οικονομικά βιώσιμη εφαρμογή.

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία οι συνθήκες εξαγωγής εκχυλίσματος με το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο ( $TPC_{max}$ ) είναι οι ακόλουθες: 31,9 °C, 6,4%  $H_2SO_4$  (v/w), 25,2 L:S (v/w). Αντίστοιχα οι συνθήκες εξαγωγής εκχυλίσματος με την υψηλότερη συγκέντρωση ελαιοευρωπαΐνης ( $OLE_{max}$ ), παράγεται κατόπιν εκχύλισης στις ακόλουθες συνθήκες: 40 °C, 2,0%  $H_2SO_4$  (v/w) και 30 L:S (v/w) (Lamprou et al., 2019) .



Πίνακας 7: Συνθήκες εκχύλισης για τις δύο περιπτώσεις

Περιγραφή	Συντομογραφία	Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/w)	Αραίωση (v/w)	L:S
Συνθήκες εξαγωγής εκχυλίσματος με το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο	TPC <sub>max</sub>	31,9	6,4%	25,2	
Συνθήκες εξαγωγής εκχυλίσματος με την υψηλότερη συγκέντρωση ελαιοευρωπαϊνης	OLE <sub>max</sub>	40	2,0%	30	

### 1.2.2 2<sup>ο</sup> Πείραμα

Στα πλαίσια του πρώτου πειράματος διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένα δείγματα ανιχνεύτηκε ποσότητα ελαιοκανθάλης. Έτσι πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης του πρώτου πειράματος για εξαγωγή μέγιστης συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης αλλάζοντας κάθε φορά έναν από τους δύο βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία και κρατώντας τον άλλον σταθερό.

Η ποικιλία που επιλέχθηκε ήταν η Κορωνέικη από τις εγκαταστάσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνίου επειδή παρουσίασε στο πρώτο πείραμα υψηλές συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Η πρώτη συνθήκη ήταν με αραίωση σε 250ml αποσταγμένου νερού που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στο βάρος των ξερών φύλλων και η δεύτερη με αραίωση σε 300ml αποσταγμένου νερού.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία είναι :

- *Θερμοκρασία εκχύλισης*

Η θερμοκρασία εκχύλισης μελετήθηκε στο εύρος 25<sup>ο</sup>C έως 60<sup>ο</sup>C με βήμα 5<sup>ο</sup>C. Τα φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν τον Ιανουάριο χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις εκχυλίσεις.

- *Ποσότητα θειικού οξέος ανά ξηρό βάρος πρώτης ύλης*

1. Δοκιμαστικό πείραμα όπου η ποσότητα θειικού οξέος μελετήθηκε στο εύρος από 4%(v/w) έως 8%(v/w) με βήμα 1%(v/w) και με θερμοκρασία και στις δύο συνθήκες

αραίωσης κάθε φορά 30°C. Τα φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν τον Φεβρουάριο χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις εκχυλίσεις.

2. Στη συνέχεια η ποσότητα θειικού οξέος μελετήθηκε σε μεγαλύτερο εύρος από 1%(v/w) έως 15%(v/w) με βήμα 1%(v/w) και με θερμοκρασία και στις δύο συνθήκες αραίωσης κάθε φορά 30°C. Τα φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν τον Φεβρουάριο χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις εκχυλίσεις.

### 1.3 Ανάλυση και μελέτη φαινολικών ενώσεων

#### 1.3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών, Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι μια φωτομετρική τεχνική που επιτρέπει την εκτίμηση του συνολικών φαινολικών συστατικών ακόμα και αυτών που δεν έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να ανάγουν τις ενώσεις των φωσφο-μολυβδαινικών και φωσφο-βολφραμικών οξέων που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το προϊόν που δημιουργείται είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε απόχρωσης που απορροφά στο ορατό 765nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης αλλά αποτελεί και προϋπόθεση για τη παρουσία των φαινολικών ιόντων. (Prior et al., 2005)

##### 1.3.1.1 Υλικά και εξοπλισμός

Τα υλικά και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Μεθανόλη
- Ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20% (w/v)
- Γαλλικό οξύ
- Εκχύλισμα φύλλων ελιάς
- Απιονισμένο νερό
- Ανακινητής Vortex

- Πιπέτες ή σιφώνια
- Ογκομετρικές φιάλες των 20 mL
- Αναλυτικός Ζυγός
- Φασματοφωτόμετρο, κυψελίδες

### 1.3.1.2 Πειραματική διαδικασία

#### *Παρασκευή διαλύματος $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (75g/l)*

1. Σε ογκομετρική φιάλη προστίθεται 37,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 500 ml απιονισμένο νερό.
2. Στην συνέχεια ακολουθεί ανάδευση για μισή ώρα.
3. Μετά το πέρας της μισής ώρας το διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση.

#### *Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων*

Αρχικά κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς απορρόφησης ως προς συγκέντρωση σε γαλλικό οξύ. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζεται αρχικό διάλυμα γαλλικού οξέος, συγκέντρωσης 1000 mg/L και από αυτό με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 125-1000 mg/L τα οποία φωτομετρώνται. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται μίγμα  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ , 70:30 v/v. Ποσότητα 0,2 mL πρότυπου διαλύματος αναμιγνύεται με 4,8 mL νερού σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5 mL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu και μετά από 3 min, 1 mL κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Το μίγμα αναδεύεται και συμπληρώνεται σε όγκο 10 mL με νερό. Μετά 1 h μετριέται η απορρόφηση στα 765 nm. Ως δείγμα αναφοράς για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

#### *Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου*

Με πιπέτα μεταφέρθηκαν 0,05 ml των εκχυλισμάτων από τα φύλλα ελιάς σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αραιώθηκαν με 0,45 ml αποσταγμένου νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2.5 ml αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu 0,2N. Το μείγμα αναδεύτηκε για 3 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν επίσης 2 ml κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Μετά το πέρας 1.5 h γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm (25 °C) χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο ορατού με υπεριώδη ακτινοβολία Hitachi U2000 (Hitachi, Tokyo, Japan). Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος (GAE) / g ξηρού φύλλου ελιάς. (mg/g ξ.β.)

### 1.3.2 Μελέτη του εκχυλίσματος με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC-DAD

Η μελέτη του εκχυλίσματος με την μέθοδο HPLC είχε ως στόχο τον προσδιορισμό της παρουσίας και την ποσοτικοποίηση γνωστών φαινολικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα έγινε μελέτη για την παρουσία των ενώσεων: ελαιοευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, σιναπικό οξύ, συριγγικό οξύ και ελαιοκανθάλη. Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στο εργαστήριο Οργανικών Βιομηχανιών της σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ.

Η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα Agilent 1290 Infinity II LC με έναν ανιχνευτή διόδου (DAD) Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA και μία στήλη Agilent C18 Proshell 120 (4 μm, 4.6 x 100 mm) με ροής 1 mL/min. Η κινητή φάση αποτελείται από 0,2% οξικό οξύ σε νερό (A) και ακετονιτρίλιο (B). Χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη βαθμίδωση έκλουσης: 2% B σε 0 λεπτά έως 30% B στα 40 έως 45 λεπτά και πίσω στο 2% B στα 45 έως 50 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL. Τα σήματα DAD καταγράφηκαν σε ένα εύρος από 210 έως 360 nm.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν για όλες τις φαινολικές ενώσεις του πυρήνα που αναμένεται να βρεθούν σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και η ελευροπαΐνη. Όλα τα αναλυτικά πρότυπα και οι χημικές ουσίες αγοράστηκαν από το Sigma-Aldrich, ενώ όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για χρωματογραφικές αναλύσεις ήταν βαθμού HPLC.

# Γ.ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

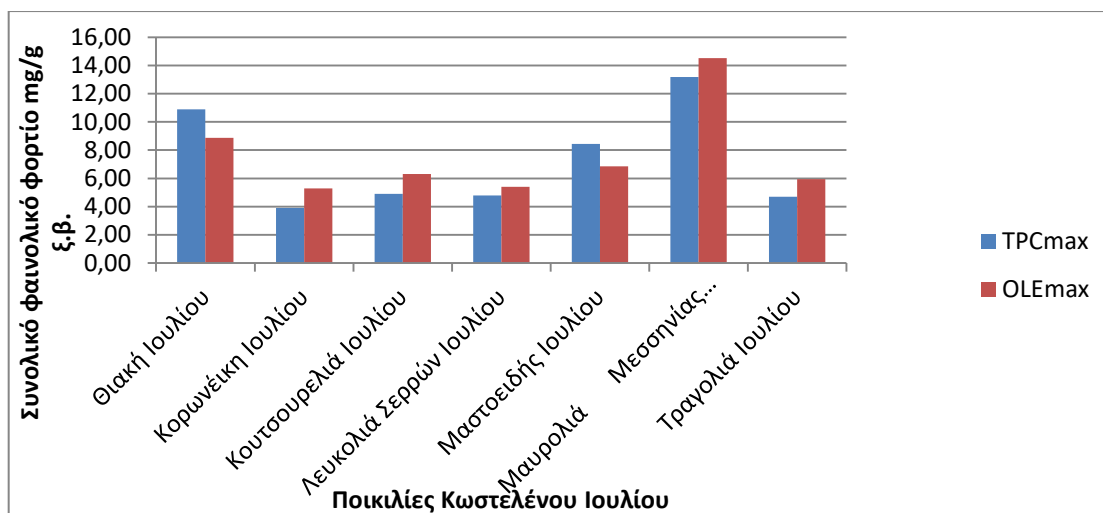
## 1.1 1<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑ

### 1.1.1 Συγκέντρωση Συνολικών Φαινολικών Συστατικών

Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε πως μεταβάλλεται το συνολικό φαινολικό φορτίο (TPC) και το κάθε φαινολικό συστατικό ξεχωριστά ανάλογα με τη ποικιλία του δέντρου, την ηλικία του και το χρόνο συγκομιδής των φύλλων ελιάς σε δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Οι συνθήκες εκχύλισης που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη διπλωματική όπως έχει αναφερθεί είναι δύο, η TPCmax και η OLEmax. Η πρώτη συνθήκη είναι πιο έντονη από τη δεύτερη εξαιτίας της μεγαλύτερης ποσότητας H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και της μικρότερης αραίωσης που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί στο βέλτιστο σημείο. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών των διαφορετικών ποικιλιών φύλλων ελιάς που μελετήθηκαν, υπολογίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg GAE/g ξηρού βάρους (mg/g ξ.β.). Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ανάλογα με τη ποικιλία του δέντρου, την ηλικία του, τις συνθήκες εκχύλισης και το χρόνο συγκομιδής των φύλλων ελιάς παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

#### 1.1.1.1 Ποικιλία- Συνθήκες Εκχύλισης

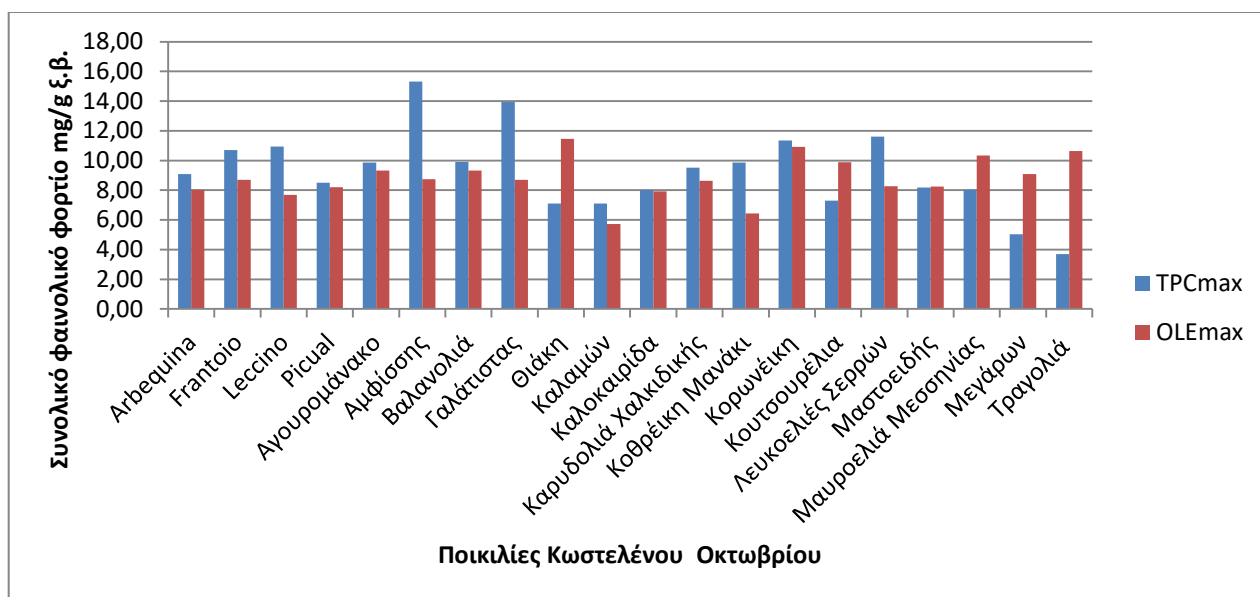
Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών για τις ποικιλίες από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν το μήνα Ιούλιο παρουσιάζονται στο **Γράφημα 1**. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών στις συνθήκες TPCmax κυμάνθηκε από 3,91 έως 13,18 mg/g ξ.β. ( «Κορωνέικη και Μαυροελιά Μεσσηνίας αντίστοιχα) και στις συνθήκες OLEmax ήταν από 5,28 έως 14,52 mg/g ξ.β.( «Κορωνέικη και Μαυροελιά Μεσσηνίας αντίστοιχα).



**Γράφημα 1:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικών οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. στα νεαρά φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο.

Στο **Γράφημα 2** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών φορτίων εκφρασμένη σε mg./g ξ.β. των 20 ποικιλιών από τα φυτώρια Κωστελένος που τα φύλλα τους συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο του 2019. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών μεταξύ των ποικιλιών και στις δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών για συνθήκες TPCmax κυμάνθηκε από 3,69 έως 15,31 mg/g ξ.β. («Τραγολιά» και «Αμφίσησης» αντίστοιχα) και στις συνθήκες OLEmax ήταν από 5,72 έως 11,45 mg/g ξ.β. («Καλαμών» και «Θιακή» αντίστοιχα).

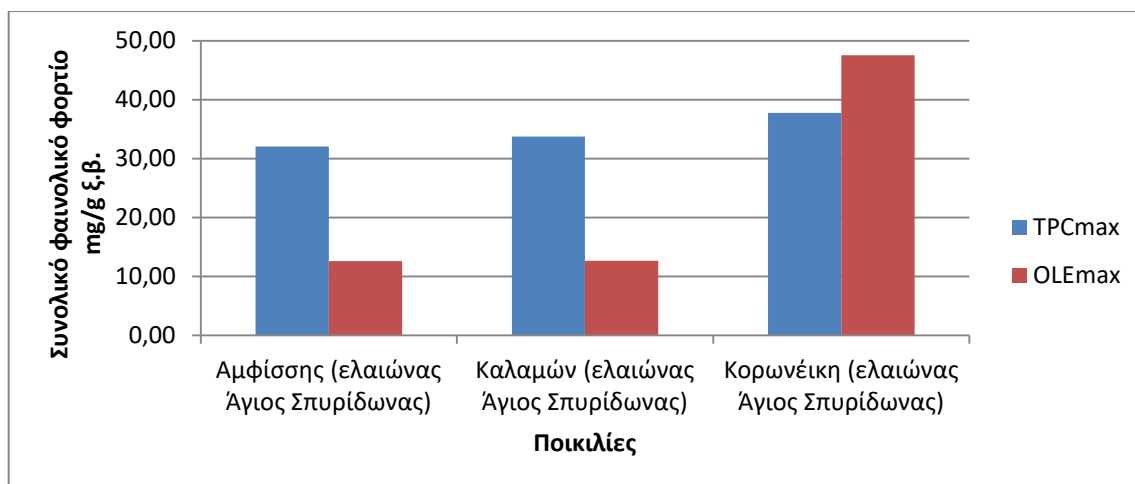
Ακόμη, η ίδια ποικιλία σε διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης παρουσιάζει διαφορά στη συγκέντρωση του συνολικού φαινολικού φορτίου. Στις περισσότερες ποικιλίες τα φύλλα που εκχυλίστηκαν σε συνθήκες TPCmax παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση από τα φύλλα που εκχυλίστηκαν σε συνθήκες OLEmax. Η ποικιλία «Αμφίσησης» παρουσιάζει την πιο υψηλή διαφορά στη συγκέντρωση φαινολικών αφού σε συνθήκες TPCmax έχει συγκέντρωση συνολικού φαινολικού φορτίου 15,31 mg/g ξ.β. ενώ σε συνθήκες OLEmax έχει 8,74 mg/g ξ.β.. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ποικιλίες «Κουτσουρελιά», «Θιακή», «Μαυροελιά Μεσσηνίας», «Μεγάρων», και «Τραγολιά», όπου η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών ήταν υψηλότερη σε συνθήκες OLEmax από τη συγκέντρωση σε συνθήκες TPCmax αλλά και οι ποικιλίες «Μαστοειδής» και «Καλοκαιρίδα» όπου η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών ήταν σχεδόν όμοια και στις δύο συνθήκες εκχύλισης αφού σε συνθήκες TPCmax η συγκέντρωσή τους ήταν 8,19 mg/g ξ.β. η «Μαστοειδής» και 8,00 mg/g ξ.β. η «Καλοκαιρίδα» ενώ σε συνθήκες OLEmax ήταν 8,24 και 7,92 mg/g ξ.β. αντίστοιχα.



**Γράφημα 2:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. στα νεαρά φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη.

Στο **Γράφημα 3** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών φορτίων των ποικιλιών «Αμφίσσης», «Καλαμών» και «Κορωνέικη» που συλλέχθηκαν από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα το Νοέμβριο του 2019. Τα δέντρα έχουν φτάσει στο στάδιο πλήρους καρποφορίας για αυτό αναφέρονται ως «ώριμα» δέντρα.

Τα φύλλα των ποικιλιών «Αμφίσσης» και «Καλαμών» παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών, 32,06 και 33,71 mg/g ξ.β. αντίστοιχα, σε συνθήκες TPCmax σχέση με τις συνθήκες OLEmax που ήταν 12,57 και 12,67 mg/g ξ.β. αντίστοιχα. Αντίθετα, η ποικιλία «Κορωνέικη» είχε υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών σε συνθήκες OLEmax με 47,56 mg/g ξ.β. ενώ σε συνθήκες TPCmax ήταν 37,72 mg/g ξ.β.



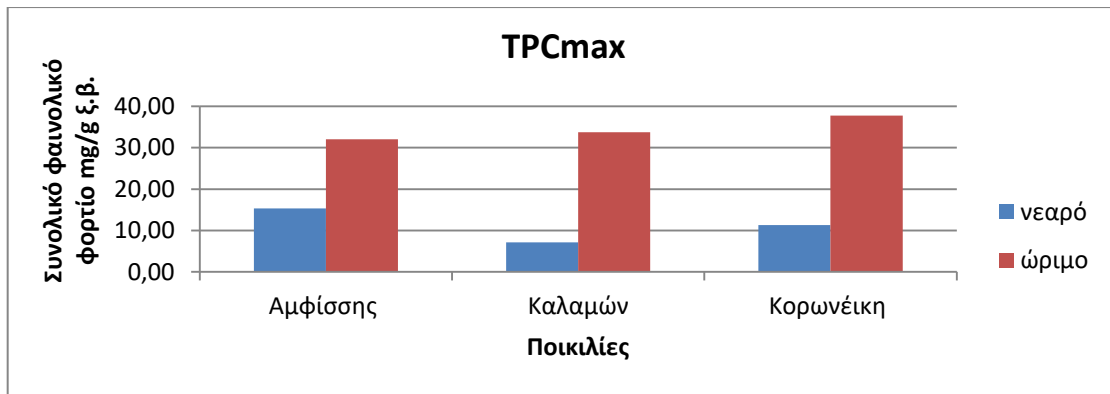
**Γράφημα 1:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο

### 1.1.1.2 Ηλικία Δέντρου

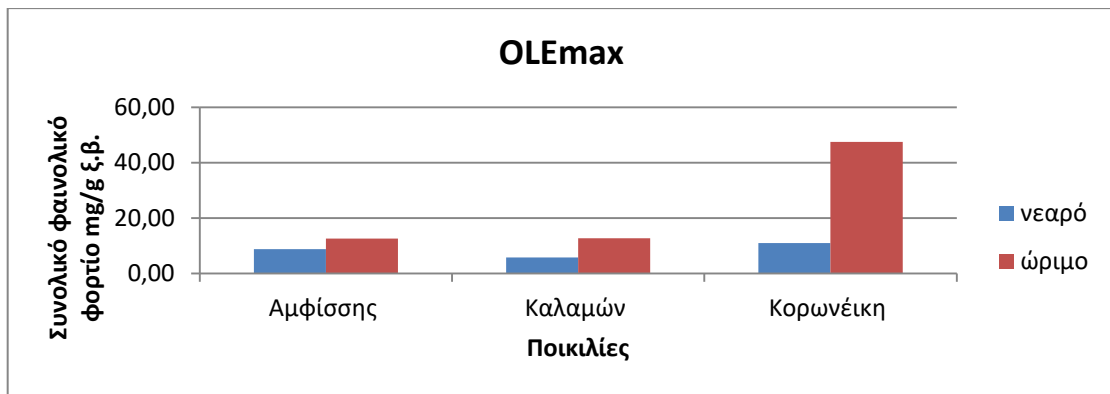
Οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι 20 ποικιλίες από τα φυτώρια Κωστελένου, 3 ποικιλίες από αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα Φωκίδας και 1 ποικιλία από το αγρόκτημα του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνίου. Τα δέντρα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα και του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνίου έχουν φτάσει στο στάδιο πλήρους καρποφορίας ενώ τα δέντρα από το αγρόκτημα του Κωστελένου δεν έχουν εισέλθει σε καρποφορία. Συνεπώς, οι πρώτες χαρακτηρίστηκαν ως «ώριμα» δέντρα και οι ποικιλίες του Κωστελένου ως «νεαρά» δέντρα.

Τα **Γραφήματα 4** και **5** παρουσιάζουν τη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών για τα φύλλα των «νεαρών» και «ώριμων» δέντρων σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax και OLEmax αντίστοιχα. Οι ποικιλίες που παρουσιάζονται είναι η «Αμφίσησης», η «Καλαμών» και η «Κορωνέικη». Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών για τα «νεαρά» δέντρα σε συνθήκες TPCmax κυμάνθηκε από 7,11 έως 15,31 mg/g ξ.β. («Καλαμών» και «Αμφίσησης» αντίστοιχα) και για τα «ώριμα» δέντρα ήταν από 32,06 έως 37,72 mg/g ξ.β. («Αμφίσησης» και «Κορωνέικη» αντίστοιχα). Στις συνθήκες OLEmax, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών για τα «νεαρά» κυμάνθηκε από 5,72 έως 10,91 mg/g ξ.β. («Καλαμών» και «Κορωνέικη» αντίστοιχα) και για τα «ώριμα» δέντρα ήταν από 15,57 έως 47,56 mg/g ξ.β. («Αμφίσησης» και «Κορωνέικη» αντίστοιχα). Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών των «ώριμων» δέντρων ήταν υψηλότερη από τη συγκέντρωση των «νεαρών» και στις δύο συνθήκες εκχύλισης. Με αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η ηλικία του δέντρου επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενο του δέντρου και ότι τα ώριμα δέντρα έχουν μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό φορτίο σε σχέση με τα νεαρά δέντρα.





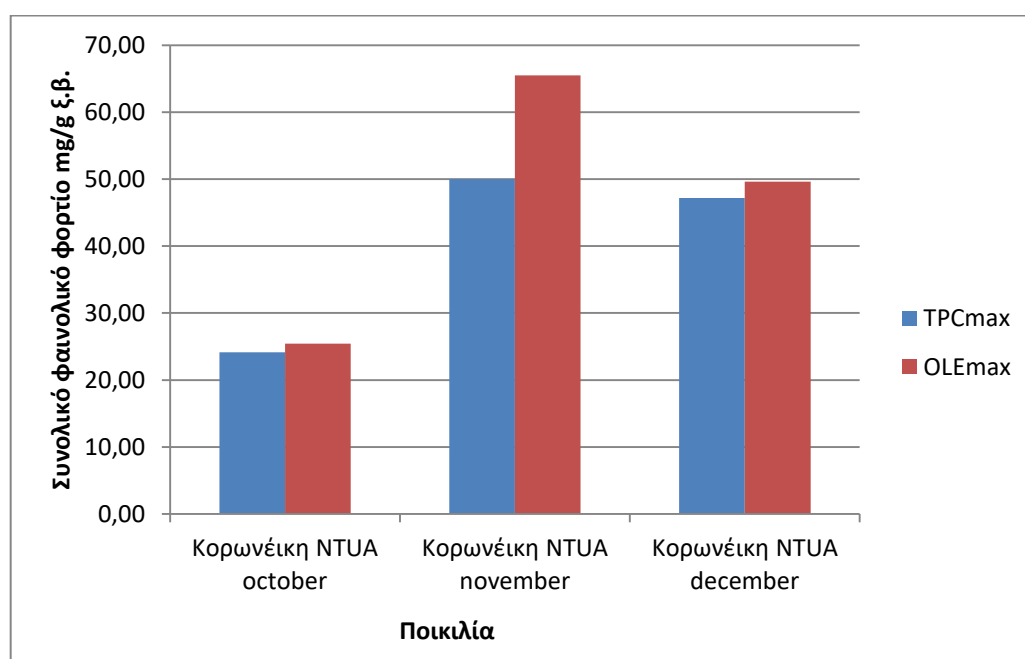
**Γράφημα 2:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες TPCmax.



**Γράφημα 3:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες OLEmax.

### 1.1.1.3 Χρόνος Συγκομιδής

Από τη ποικιλία Κορωνέικη του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνίου συλλέχθηκαν σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους φύλλα ελιάς. Το πρώτο κλάδεμα έγινε τον Οκτώβριο («NTUA October»), το δεύτερο το Νοέμβριο («NTUA November») και το τρίτο το Δεκέμβριο («NTUA December»). Τα αποτελέσματα που φαίνονται στο **Γράφημα 6** παρατηρείται ότι και στις δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης η υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών βρέθηκε στα φύλλα του Νοεμβρίου. Αυτό το συμπέρασμα είναι λογικό γιατί είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά δεν είναι σταθερά και μεταβάλλονται με το χρόνο.



**Γράφημα 4:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από τη ποικιλία Κορωνέικη του Πολυτεχνίου με διαφορετικό χρόνο συγκομιδής

Στο **Γράφημα 7** και **8** παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών συστατικών για τα φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν τους μήνες Ιούλιο και Οκτώβριο το έτος 2019 σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax και OLEmax αντίστοιχα. Οι ποικιλίες αυτές προέρχονται από τα φυτώρια Κωστελένος και είναι η «Θιάκη», «Κορωνέικη», «Κουτσουρέλια», «Λευκοελιές Σερρών», «Μαστοειδής», «Μαυροελιά Μεσσηνία» και «Τραγολιά».

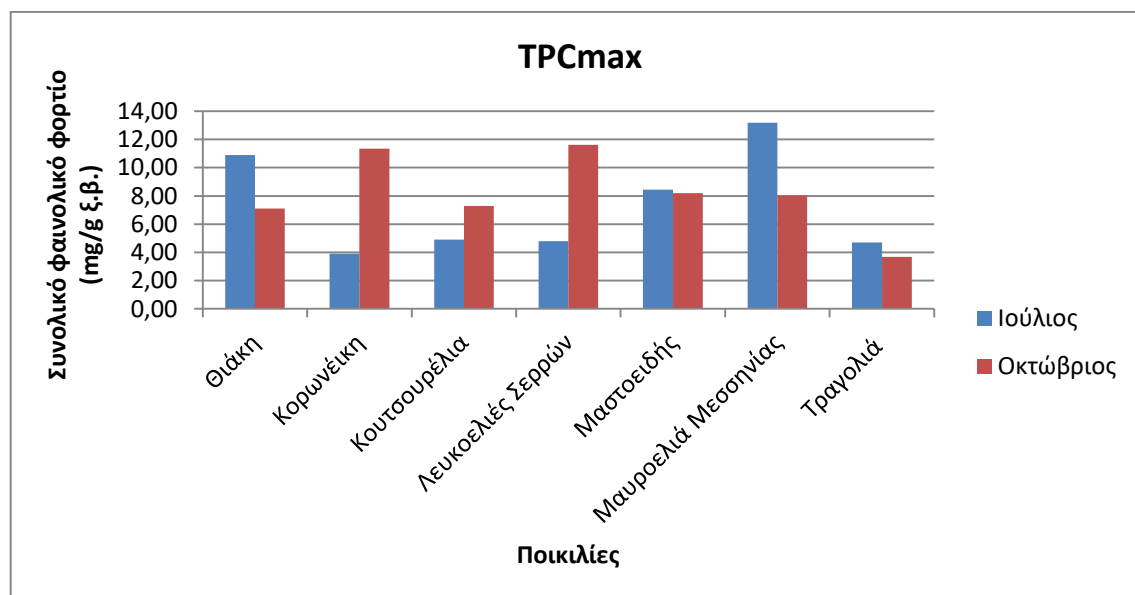
Στο **Γράφημα 7** απεικονίζεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών των φύλλων που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο η οποία κυμάνθηκε το από 3,91 έως 13,18 mg/g ξ.β. (

«Κορωνέικη» και «Μαυρολιά Μεσσηνίας» αντίστοιχα) και η συγκέντρωση των φύλλων που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη που κυμάνθηκε από 3,69 έως 11,61 mg/g ξ.β ( «Τραγολιά» και «Λευκοελιές Σερρών» αντίστοιχα).

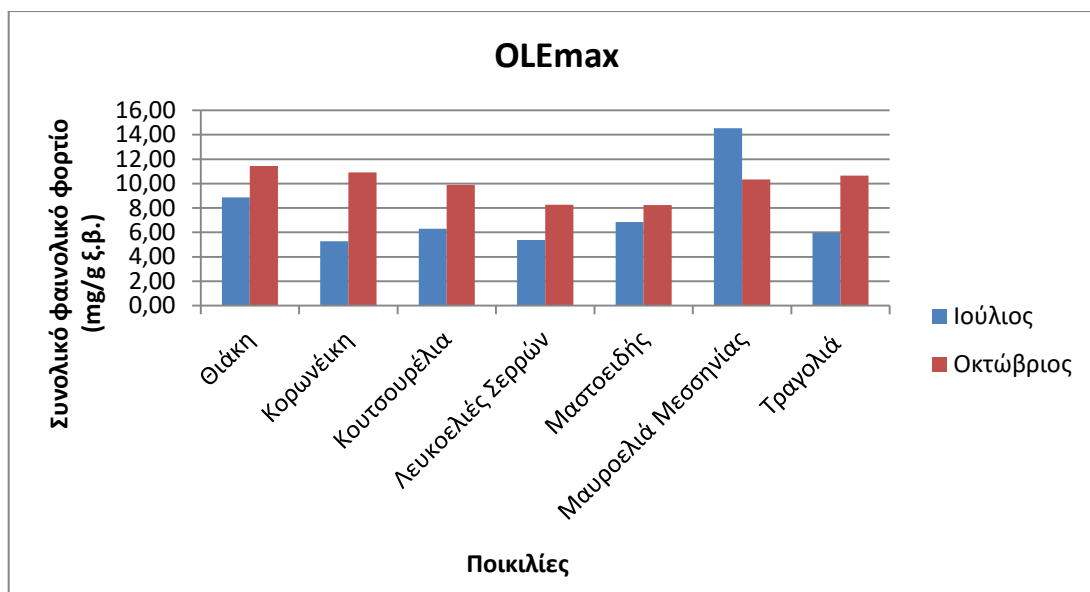
Στο **Γράφημα 8** η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών των φύλλων που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο κυμάνθηκε από 5,28 έως 14,52 mg/g ξ.β. ( «Κορωνέικη» και «Μαυροελιά Μεσσηνίας» αντίστοιχα και από 8,24 έως 11,45 mg/g ξ.β ( «Μαστοειδής» και «Θιάκη» αντίστοιχα) των φύλλων που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη.

Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών των φύλλων ελιάς που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο ήταν υψηλότερη από τη συγκέντρωση των φύλλων του Ιουλίου σε συνθήκες OLEmax για τη πλειοψηφία των ποικιλιών. Εξαιρέση αποτελεί η ποικιλία «Μαυροελιά Μεσσηνίας» όπου η συγκέντρωση των φύλλων Ιουλίου ήταν υψηλότερη από τη συγκέντρωση των φύλλων Οκτωβρίου. Μάλιστα, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών της «Μαυροελιάς Μεσσηνίας» του Ιουλίου βρέθηκε 14,52 mg/g ξ.β. και ήταν η υψηλότερη συγκέντρωση από τα όλα τα αποτελέσματα σε συνθήκες OLEmax.

Στις συνθήκες TPCmax, οι ποικιλίες «Θιάκη» , «Μαυροελιά Μεσσηνίας» και «Τραγολιά» παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών το μήνα Ιούλιο ενώ οι ποικιλίες «Κορωνέικη» , «Κουτσουρέλια» και «Λευκοελιές Σερρών» είχαν υψηλότερη συγκέντρωση το μήνα Οκτώβριο. Η ποικιλία «Μαστοειδής» παρουσίασε σχεδόν την ίδια συγκέντρωση και τον Ιούλιο και τον Οκτώβριο αφού η συγκέντρωση ήταν 8,45 και 8,19 mg/g ξ.β. αντίστοιχα.



**Γράφημα 5:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax.



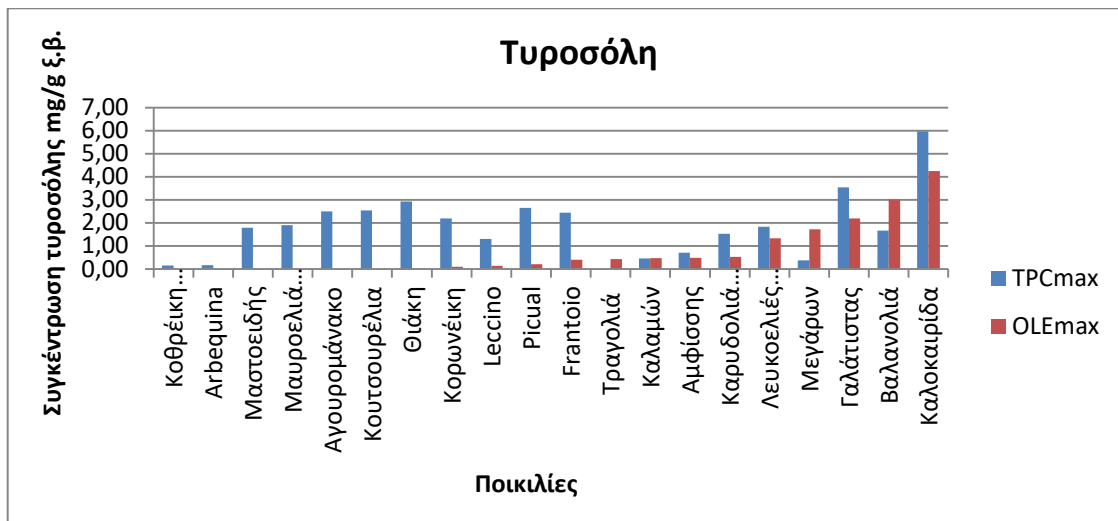
**Γράφημα 6:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένου που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης OLEmax.

### 1.1.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

#### 1.1.2.1 Ποικιλία- Συνθήκες Εκχύλισης

Οι ποικιλίες από το φυτώριο του Κωστελένου του Οκτωβρίου παρουσίασαν παρόμοιο φαινολικό προφίλ με μικρές διαφορές και στις δύο συνθήκες εκχύλισης. Η φαινολική ουσία που παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση ήταν η τυροσόλη που κυμάνθηκε από 0,00 έως 5,97 mg/g ξ.β. ( «Τραγολιά» και «Καλοκαιρίδα» αντίστοιχα) σε συνθήκες TPCmax και σε συνθήκες OLEmax κυμάνθηκε από 0,00 έως 4,25 mg/g ξ.β. ( «Κοθρέικη Μανάκι» και «Καλοκαιρίδα» αντίστοιχα). Οι φαινολικές ουσίες υδροξυτυροσόλη , σιναπικό οξύ ,συρριγγικό οξύ, ελαιοευρωπαϊνή και ελαιοκανθάλη δεν ανιχνεύτηκαν σε καμία από αυτές τις ποικιλίες και στις δύο συνθήκες εκχύλισης. Εξάιρεση αποτελούν οι ποικιλίες «Βαλανολιά» , «Καλοκαιρίδα» και «Κοθρέικη Μανάκι» όπου σε συνθήκες TPCmax εμφάνισαν ποσότητα συρριγγικού οξέος με συγκέντρωση 0,05 , 0,01 και 0,20 mg/g ξ.β. αντίστοιχα. Στο **Γράφημα 9** παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης της τυροσόλης. Σχεδόν όλες οι ποικιλίες εμφάνισαν ποσότητα τυροσόλης σε συνθήκες TPCmax ενώ σε συνθήκες OLEmax παρουσίασαν μόνο «Κορωνέικη» , «Leccino», ,«Picual» , «Frantoio», «Τραγολιά», «Καλαμών», «Αμφίσης» , «Καρυδολιά Χαλκιδικής» ,«Λευκοελιές Σερρών» , «Μεγάρων» , «Γαλάτιστας», «Βαλανολιά» και «Καλοκαιρίδα».



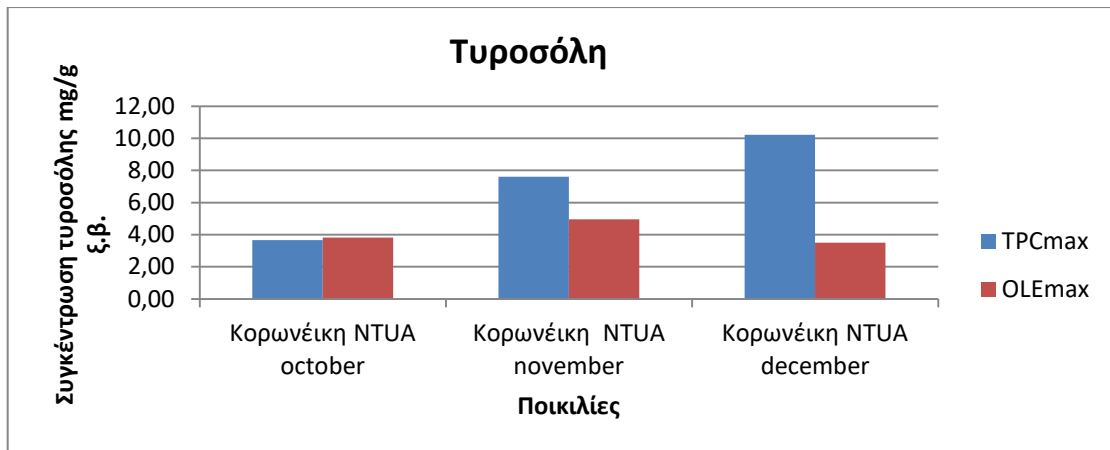
**Γράφημα 9:** Συγκέντρωση τυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης

### 1.1.2.2 Χρόνο Συγκομιδής

- 1<sup>η</sup> περίπτωση

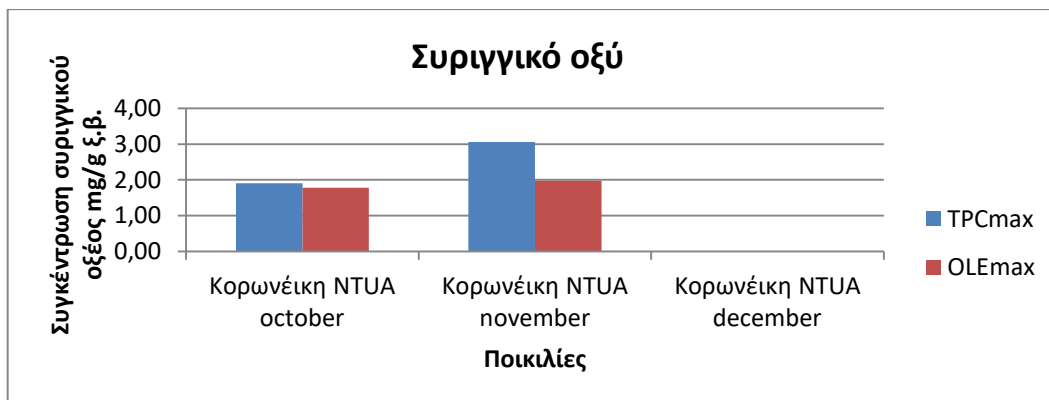
Στη ποικιλία Κορωνέικη από το αγρόκτημα του Πολυτεχνίου που συλλέχθηκαν φύλλα σε τρεις διαφορετικούς μήνες Οκτώβριο , Νοέμβριο, Δεκέμβριο ανιχνεύτηκαν οι φαιολικές ενώσεις τυροσόλη , συριγγικό οξύ, σιναπικό οξύ , ελαιοευρωπαϊνή και ελαιοκανθάλη και δεν ανιχνεύτηκε καθόλου η υδροξυτυροσόλη.

Στα **Γραφήματα 10 , 11 , 12 , 13 και 14** παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης της τυροσόλης, του συριγγικού οξέος , του σιναπικού οξέος , της ελαιοευρωπαϊνης και της ελαιοκανθάλης αντίστοιχα. Στο **Γράφημα 10** παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της τυροσόλης αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax αφού το μήνα Οκτώβριο έχει συγκέντρωση 3,66 mg/g ξ.β. , τον Νοέμβριο 7,60 mg/g ξ.β και τον Δεκέμβριο 10,22 mg/g ξ.β.. Αντίθετα στις συνθήκες OLEmax , η συγκέντρωση της τυροσόλης ανιχνεύτηκε στα ίδια επίπεδα αφού τον Οκτώβριο ήταν 3,83 mg/g ξ.β. , τον Νοέμβριο 4,95 mg/g ξ.β. και τον Δεκέμβριο 3,50 mg/g ξ.β.



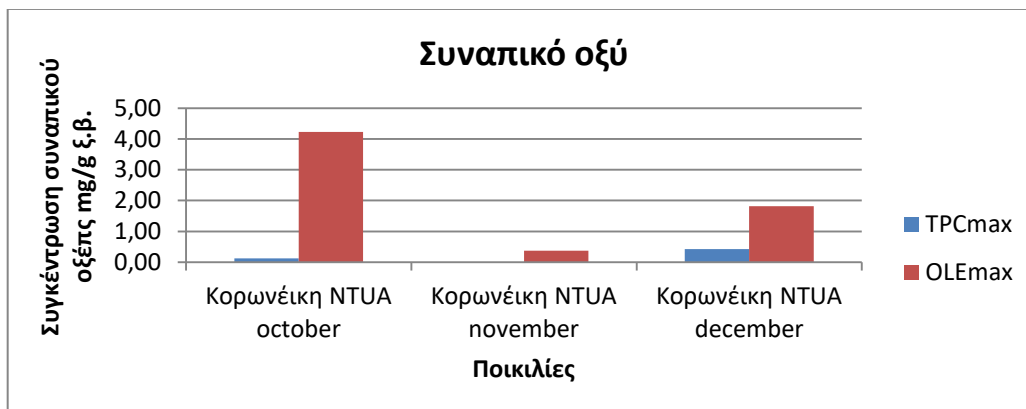
**Γράφημα 10:** Συγκέντρωση τυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από τη ποικιλία του Πολυτεχνίου με διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Στο **Γράφημα 11** φαίνεται ότι η συγκέντρωση του συριγγικού οξέος αυξάνεται από 1,90 mg/g ξ.β. τον Οκτώβριο σε 3,06 mg/g ξ.β. τον Νοέμβριο και το Δεκέμβριο δεν ανιχνεύτηκε καθόλου ποσότητα σε συνθήκες TPCmax. Στις συνθήκες OLEmax, ποσότητα συριγγικού οξέος ανιχνεύτηκε τον Οκτώβριο και Νοέμβριο με παρόμοια συγκέντρωση 1,78 και 1,97 mg/g ξ.β. αντίστοιχα και το μήνα Δεκέμβριο δεν ανιχνεύτηκε ούτε και σε αυτή τη συνθήκη εκχύλισης ποσότητα συριγγικού οξέος.



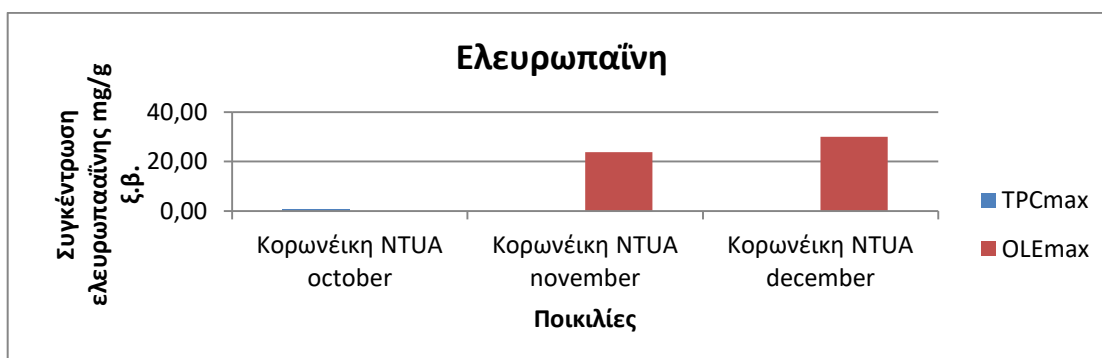
**Γράφημα 11:** Συγκέντρωση συριγγικού οξέος εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από τη ποικιλία του Πολυτεχνίου με διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Στο **Γράφημα 12** παρατηρείται ότι σε συνθήκες TPCmax η συγκέντρωση του συναπικού οξέος ήταν πολύ χαμηλή και τους τρεις μήνες αφού τον Οκτώβριο είναι 0,13 mg/g ξ.β., τον Νοέμβριο είναι 3,06 mg/g ξ.β. και τον Δεκέμβριο δεν ανιχνεύτηκε καθόλου ποσότητα. Στις συνθήκες OLEmax τον Οκτώβριο ανιχνεύτηκε η υψηλότερη συγκέντρωση συναπικού οξέος που ήταν 4,23 mg/g ξ.β. αλλά το Νοέμβριο βρέθηκε χαμηλότερη και ίση με 0,37 mg/g ξ.β. και το Δεκέμβριο ήταν ίση 1,82 mg/g ξ.β.



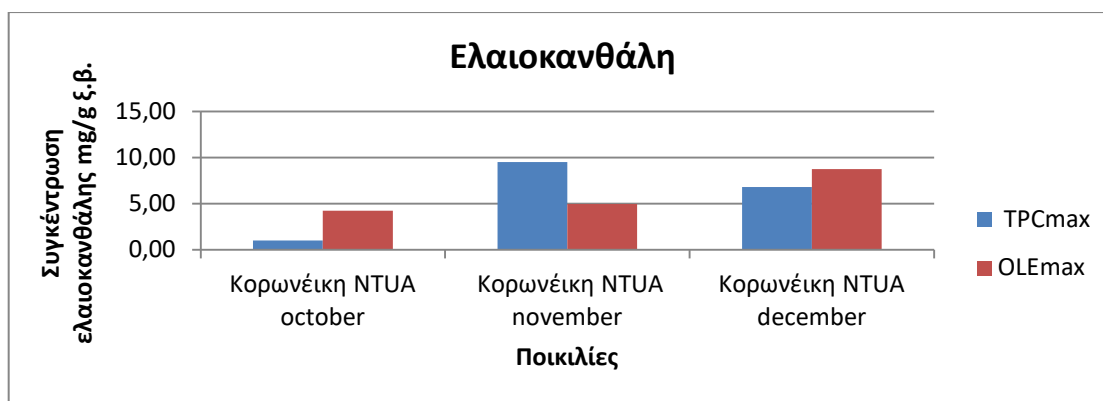
**Γράφημα 12 :** Συγκέντρωση συναπικού οξέος εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από τη ποικιλία του Πολυτεχνίου με διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Η συγκέντρωση της ελαιοευρωπαϊνης όπως παρουσιάζεται στο **Γράφημα 13** ήταν μηδενική και τους τρεις μήνες σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax με εξαίρεση τον Οκτώβριο που είναι 0,53 mg/g ξ.β. Στις λιγότερο έντονες συνθήκες OLEmax, η ελαιοευρωπαϊνή δεν ανιχνεύτηκε τον Οκτώβριο αλλά το Νοέμβριο και Δεκέμβριο ήταν αρκετά υψηλή και ίση με 23,81 και 30,01mg/gξ.β..



**Γράφημα 13:** Συγκέντρωση ελαιοευρωπαϊνης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από τη ποικιλία του Πολυτεχνίου με διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Στο **Γράφημα 14** παρουσιάζεται η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης στη ποικιλία του Πολυτεχνίου. Σε συνθήκες TPCmax, η συγκέντρωση της ήταν 1,04 mg/g ξ.β. τον Οκτώβριο, το Νοέμβριο αυξήθηκε σε 9,53 mg/g ξ.β. και τον Δεκέμβριο μειώθηκε σε 6,82 mg/g ξ.β.. Σε συνθήκες OLEmax, η συγκέντρωση της ήταν σχεδόν ίδια τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο αφού ήταν 4,24 και 4,96 mg/g ξ.β. αντίστοιχα και το Δεκέμβριο αυξήθηκε σε 8,77 mg/g ξ.β.



**Γράφημα 14:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από τη ποικιλία του Πολυτεχνίου με διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

- 2<sup>η</sup> περίπτωση

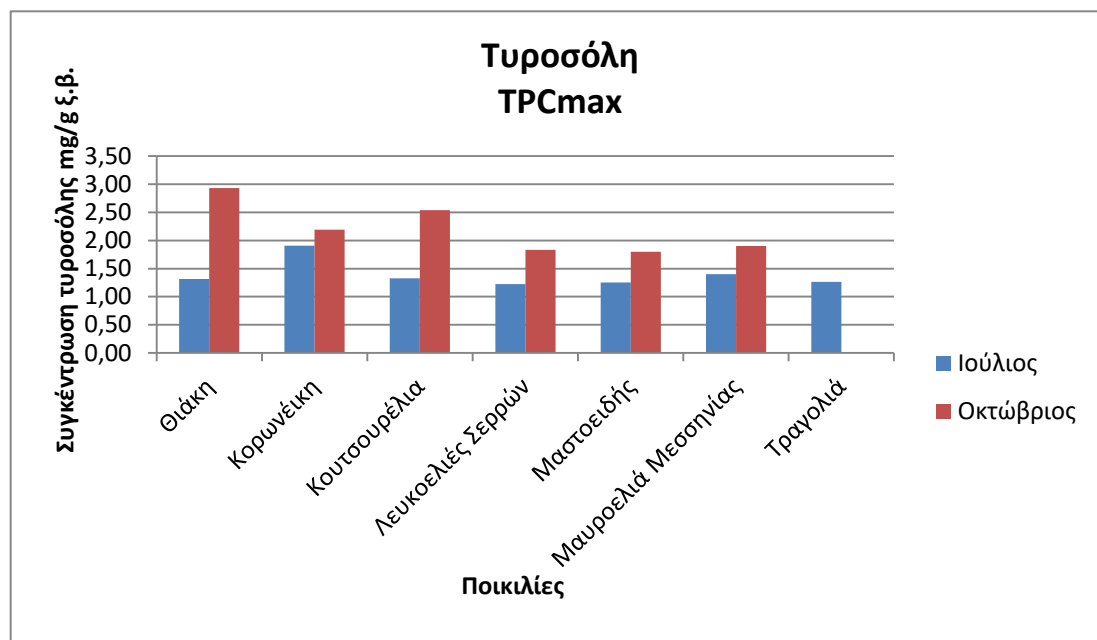
Στο **Γράφημα 15,16 και 17** παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που ανιχνεύτηκαν στα φύλλα ελιάς τα οποία συλλέχθηκαν τους μήνες Ιούλιο και Οκτώβριο το έτος 2019 σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax (**Γράφημα 15**) και OLEmax (**Γραφήματα 16 και 17**). Οι ποικιλίες αυτές προέρχονται από τα φυτώρια Κωστελένος και είναι η «Θιάκη», «Κορωνέικη», «Κουτσουρέλια», «Λευκοελιές Σερρών», «Μαστοειδής», «Μαυροελιά Μεσσηνία» και «Τραγολιά».

Σε συνθήκες TPCmax, η μοναδική φαινολική ουσία που εμφανίστηκε ήταν η τυροσόλη. Τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στα φύλλα που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο με μέγιστη συγκέντρωση 2,93 mg/g ξ.β. η ποικιλία «Θιάκη» και ακολουθούν η «Κουτσουρέλια» με συγκέντρωση 2,54 mg/g ξ.β. και η «Κορωνέικη» με συγκέντρωση 2,19 mg/g ξ.β. . Οι υπόλοιπες ποικιλίες «Λευκοελιές Σερρών», «Μαστοειδής» και «Μαυροελιά Μεσσηνίας» είχαν παρόμοια επίπεδα τυροσόλης με συγκέντρωση 1,84 mg/g ξ.β., 1,80 mg/g ξ.β. και 1,90 mg/g ξ.β. αντίστοιχα. Στη ποικιλία «Τραγολιά» δεν ανιχνεύτηκε ποσότητα τυροσόλης. Αντίθετα, στα φύλλα που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο από τη ποικιλία «Τραγολιά» ανιχνεύτηκε συγκέντρωση τυροσόλης 1,27 mg/g ξ.β.. Ακόμη, σε όλες τις ποικιλίες που τα φύλλα τους συλλέχθηκαν τον Ιούλιο ανιχνεύτηκαν παρόμοια επίπεδα τυροσόλης με συγκέντρωση από 1,22 έως 1,91 mg/g ξ.β. («Λευκοελιές Σερρών» και «Κορωνέικη» αντίστοιχα).

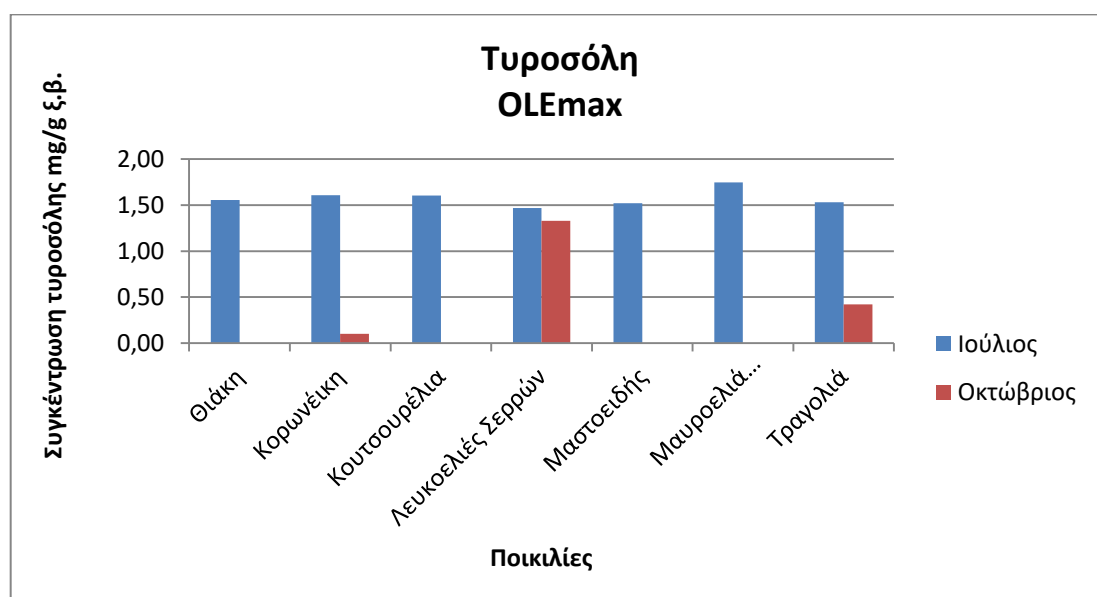
Σε συνθήκες OLEmax, οι φαινολικές ουσίες που ανιχνεύτηκαν ήταν η τυροσόλη και η ελαιοκανθάλη. Σε αυτές τις συνθήκες εκχύλισης, τα υψηλότερα επίπεδα τυροσόλης βρέθηκαν στις ποικιλίες που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο με όλες τις ποικιλίες να έχουν παρόμοια συγκέντρωση αφού το εύρος της ήταν από 1,47 έως 1,75 mg/g ξ.β. («Λευκοελιές Σερρών» και «Μαυροελιά Μεσσηνίας» αντίστοιχα). Στα φύλλα που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο ποσότητα τυροσόλης βρέθηκε μόνο στις ποικιλίες «Κορωνέικη» με συγκέντρωση 0,1 mg/g ξ.β., «Λευκοελιές Σερρών» με συγκέντρωση 1,33 mg/g ξ.β. και η Τραγολιά με συγκέντρωση 0,42 mg/g ξ.β.. Η φαινολική ουσία ελαιοκανθάλη ανιχνεύτηκε μόνο στις



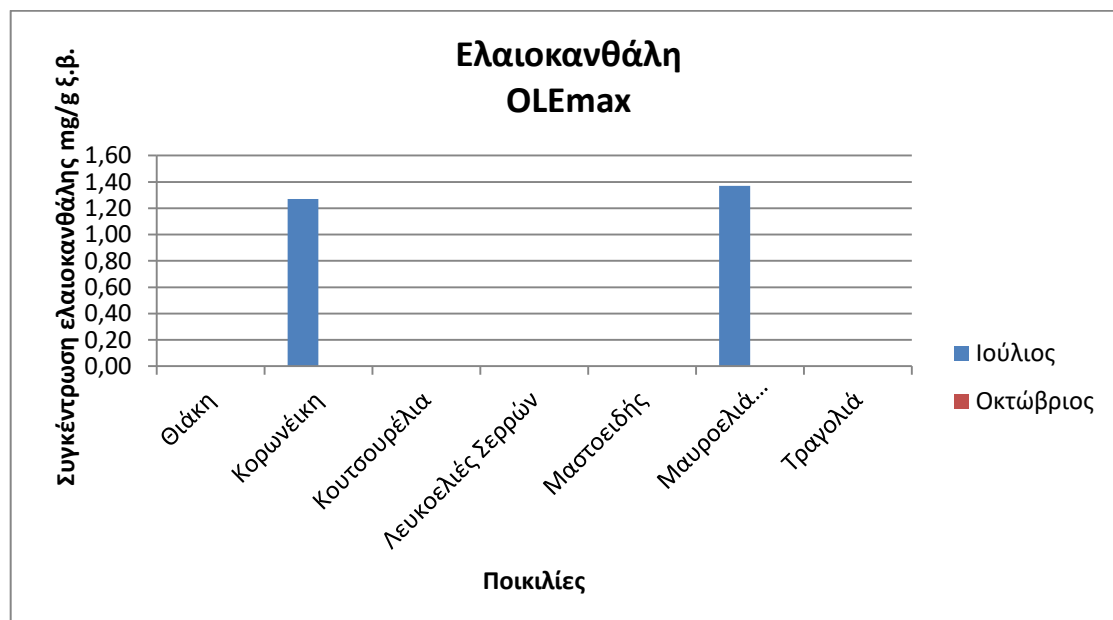
ποικιλίες «Κορωνέικη» και «Μαυροελιά Μεσσηνίας» που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο με συγκέντρωση 1,27 και 1,37 mg/g ξ.β. αντίστοιχα.



**Γράφημα 15:** Συγκέντρωση τυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax.



**Γράφημα 16:** Συγκέντρωση τυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης OLEmax.



**Γράφημα 17:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης OLEmax.

### 1.1.2.3 Ηλικία Δέντρο

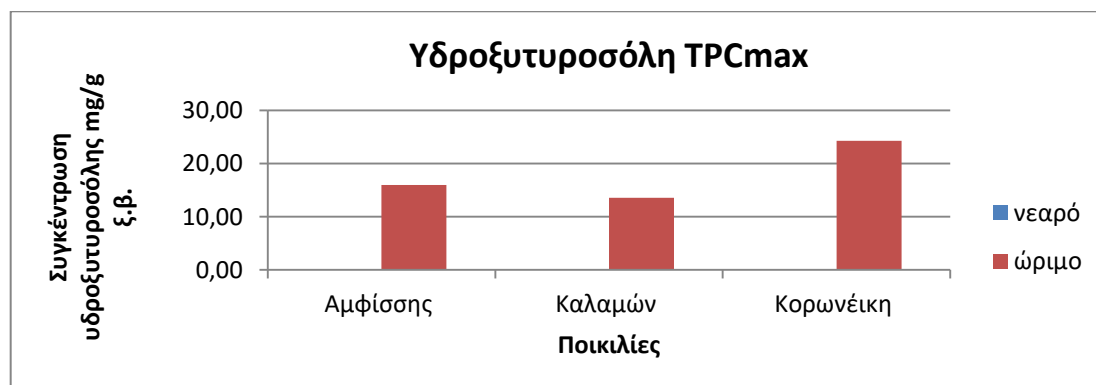
Οι ποικιλίες που παρουσιάζονται είναι η «Αμφίσσης», η «Καλαμών» και η «Κορωνέικη» και ως «νεαρά» δέντρα ορίζονται τα δέντρα από τα φυτώρια Κωστελένος και «ώριμα» τα δέντρα από το κτήμα στον Άγιο Σπυρίδωνα.

- **Σύνθηκες TPCmax**

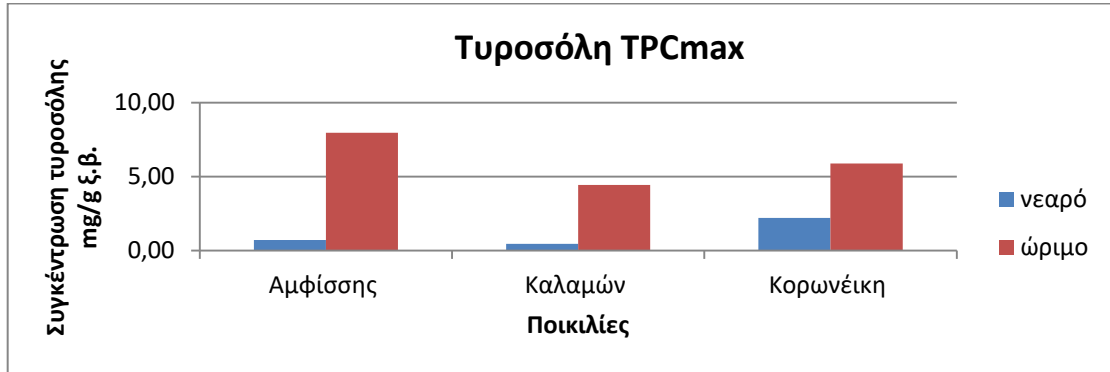
Τα **Γραφήματα 18-22** παρουσιάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών για τα φύλλα των «νεαρών» και «ώριμων» δέντρων σε συνθήκες εκχύλισης TPCmax.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών μεταξύ των «νεαρών» και των «ώριμων» φύλλων παρατηρήθηκαν διαφορές. Συγκεκριμένα, η τυροσόλη ήταν η

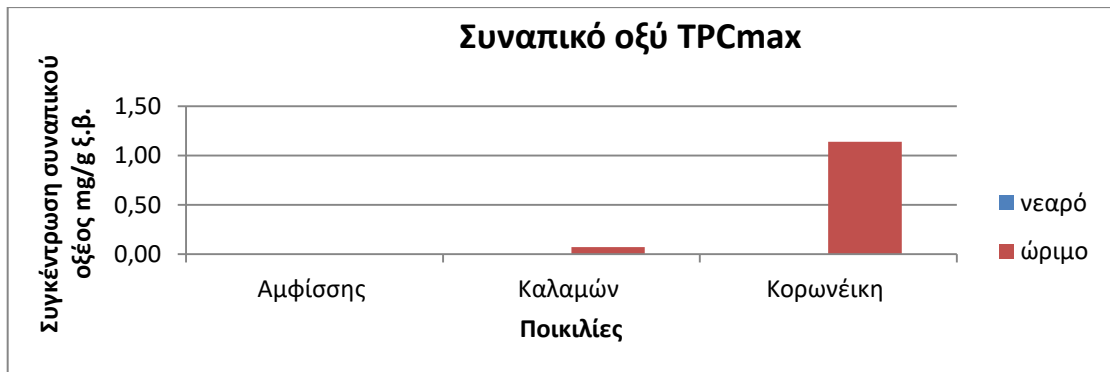
μοναδική ουσία που ανιχνεύτηκε στα «νεαρά» φύλλα με συγκεντρώση 0,70 mg/g ξ.β. στη ποικιλία «Αμφίσσης» , 0,45 mg/g ξ.β. η «Καλαμών» και 2,19 mg/g ξ.β. η «Κορωνέικη». Αντίθετα, στα «ώριμα» φύλλα ανιχνεύθηκαν οι φαινολικές ουσίες υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, σιναπικό οξύ , ελαυρωπαΐνη και ελαιοκανθάλη. Η υδροξυτυροσόλη ήταν η ουσία που εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση στα «ώριμα» φύλλα και στις τρεις ποικιλίες με συγκέντρωση 15,97 mg/g ξ.β. η ποικιλία «Αμφίσσης» , 13,57 mg/g ξ.β. η «Καλαμών» και 24,26 mg/g ξ.β. η «Κορωνέικη» . Ακόμη , οι φαινολικές ουσίες ελαιοκανθάλη και τυροσόλη ήταν από τις φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν υψηλή συγκέντρωση. Η συγκέντρωση της τυροσόλης ήταν 7,97 mg/g ξ.β στη ποικιλία «Αμφίσσης» , 4,42mg/g ξ.β. η «Καλαμών» και 5,89 mg/g ξ.β. η «Κορωνέικη». Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις της τυροσόλης μεταξύ των «νεαρών» και «ώριμων» παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της ήταν υψηλότερη στα «ώριμα» φύλλα από τα «νεαρά» φύλλα. Ακόμη , η ελαιοκανθάλη στα «ώριμα» φύλλα είχε συγκέντρωση 7,98 mg/g ξ.β στη ποικιλία «Αμφίσσης» , 7,98 mg/g ξ.β. η «Καλαμών» και 7,05 mg/g ξ.β. η «Κορωνέικη» . Οι φαινολικές ουσίες ελαιοευρωπαϊνή και σιναπικό οξύ ανιχνεύτηκαν μόνο στα «ώριμα» φύλλα και συγκεκριμένα στις ποικιλίες «Καλαμών» με συγκέντρωση ελαιοευρωπαϊνης 1,22 mg/g ξ.β. και το σιναπικό οξύ στις ποικιλίες «Καλαμών» και «Κορωνέικη» με συγκέντρωση 0,0 και 1,14 mg/g ξ.β. αντίστοιχα. Τέλος , η ουσία συριγγικό οξύ δεν ανιχνεύτηκε σε καμία ποικιλία ούτε στα «νεαρά» ούτε στα «ώριμα» φύλλα.



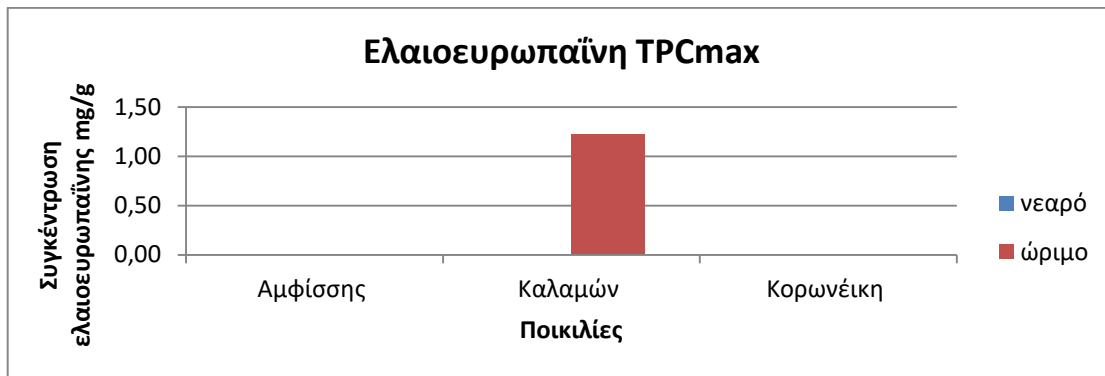
**Γράφημα 18:** Συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες TPCmax.



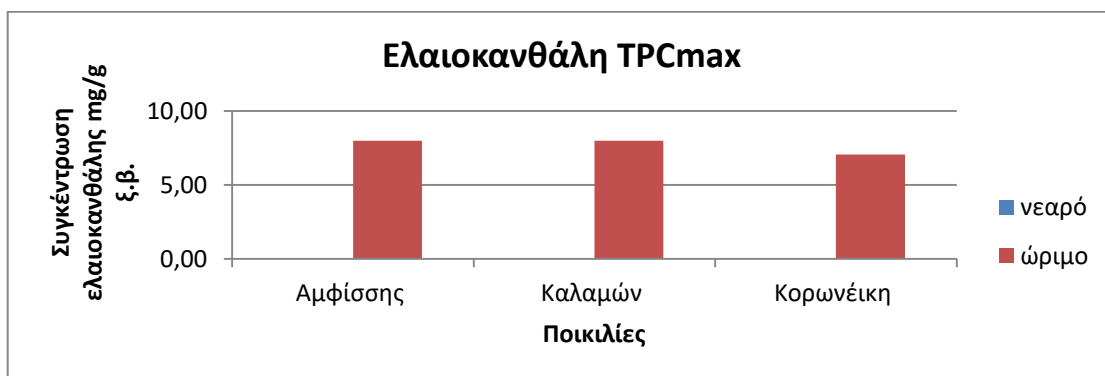
**Γράφημα 19:** Συγκέντρωση τυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες TPCmax.



**Γράφημα 20:** Συγκέντρωση συναπικού οξέος εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες TPCmax.



**Γράφημα 21:** Συγκέντρωση ελαιοευρωπαϊνης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες TPCmax.

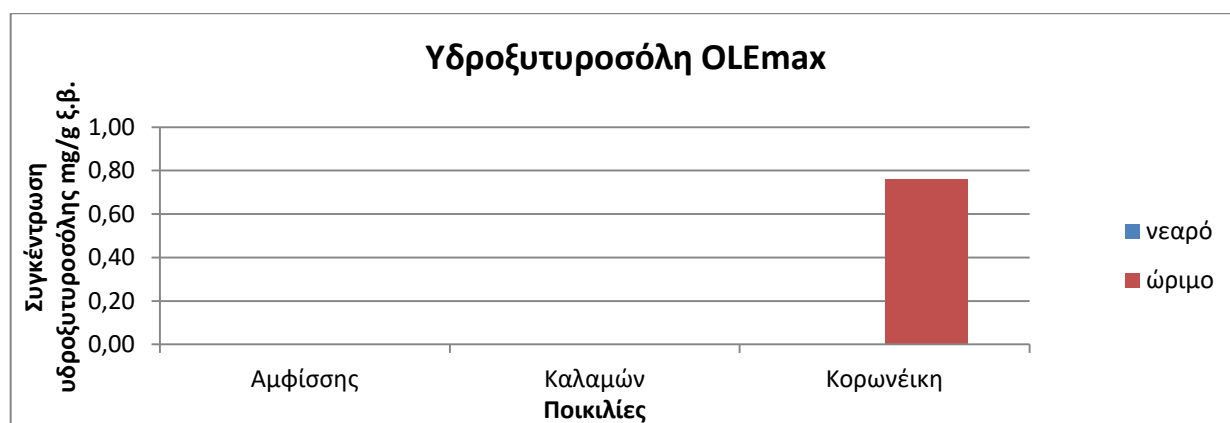


**Γράφημα 22:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το αγρόκτημα στον Άγιο Σπυρίδωνα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο και φύλλα από τα φυτώρια Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Οκτώβρη σε συνθήκες TPCmax.

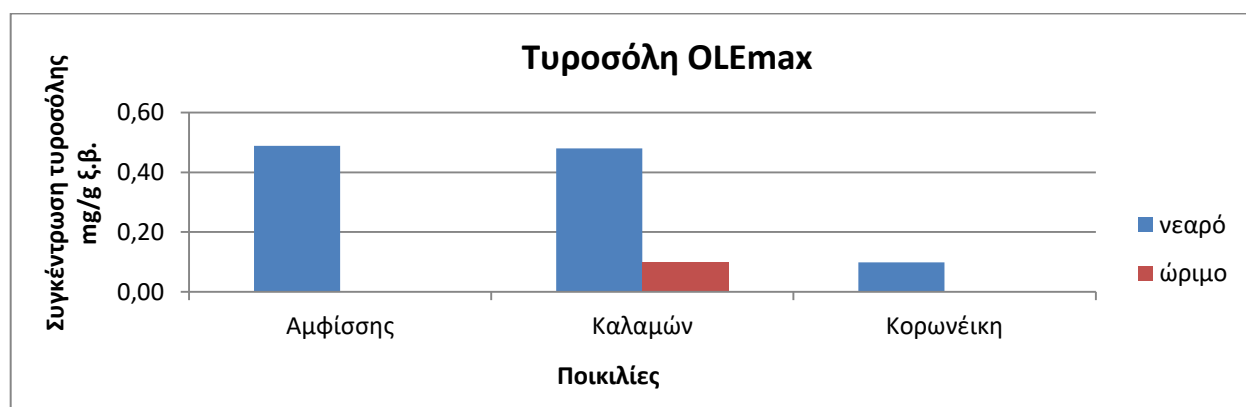
- **Σύνθηκες OLEmax**

Τα **Γραφήματα 23-25** παρουσιάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών για τα φύλλα των «νεαρών» και «ώριμων» δέντρων σε συνθήκες εκχύλισης optimum oleuropein. Οι φαινολικές ουσίες σιναπικό οξύ, συραγγικό οξύ και ελαιοευρωπαϊνή δεν ανιχνεύτηκαν σε

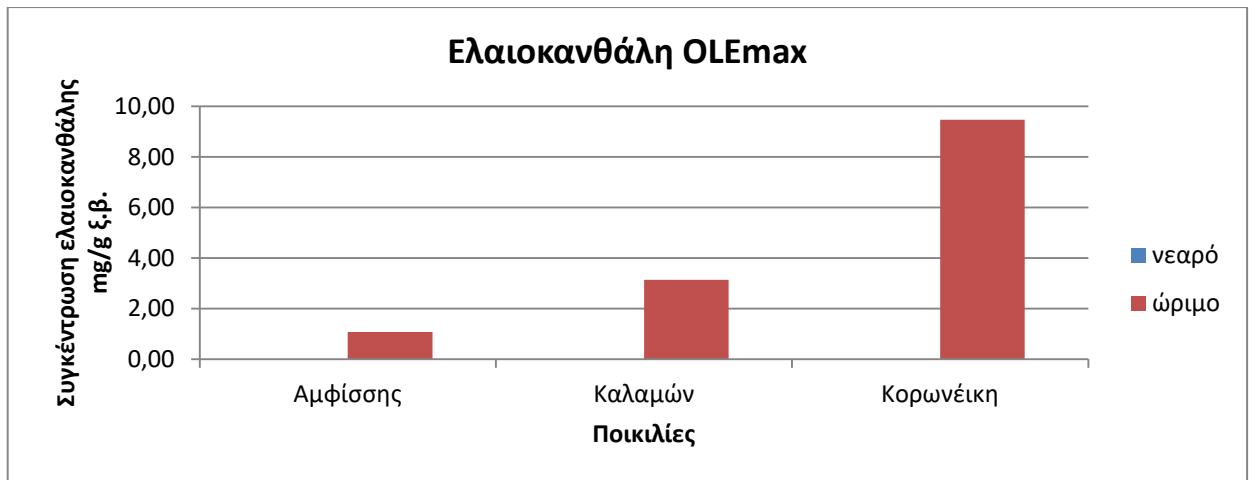
καμία ποικιλία. Στα «ώριμα» φύλλα την υψηλότερη συγκέντρωση εμφάνισε η φαινολική ουσία ελαιοκανθάλη με συγκέντρωση 1,08 mg/g ξ.β. η «Αμφίσσης» , 3,15 mg/g ξ.β. η «Καλαμών» και 9,47 mg/g ξ.β. η «Κορωνέικη». Ακόμη στα «ώριμα» φύλλα ανιχνεύτηκε στη ποικιλία «Καλαμών» τυροσόλη σε συγκέντρωση 0,1 mg/g ξ.β. και 0,76 mg/g ξ.β. υδροξυτυροσόλης στη ποικιλία «Κορωνέικη». Στα «νεαρά» φύλλα η μοναδική ουσία που ανιχνεύτηκε και σε αυτές τις συνθήκες ήταν η τυροσόλη με συγκεντρώσεις 0,49 mg/g ξ.β. η «Αμφίσσης» , 0,48 mg/g ξ.β. η «Καλαμών» και 0,10 mg/g ξ.β. η «Κορωνέικη».



**Γράφημα 23 :** Συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης OLEmax.



**Γράφημα 24:** Συγκέντρωση τυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης OLEmax.



**Γράφημα 25:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε φύλλα από το φυτώριο Κωστελένος που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Οκτώβριο σε συνθήκες εκχύλισης OLEmax.

## 1.2 2<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑ

Στο δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου αυτής που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο πείραμα αλλάζοντας κάθε φορά έναν από τους δύο βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία και κρατώντας τον άλλον σταθερό. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ποσότητα του θεικού οξέος και η θερμοκρασία εκχύλισης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Η πρώτη συνθήκη ήταν με αραιώση σε 250ml αποσταγμένου νερού που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στο βάρος των ξερών φύλλων και η δεύτερη με αραιώση σε 300ml αποσταγμένου νερού.

Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών φορτίων μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε mg/g ξ.β. και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων μετρήθηκε με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC. Για την εύρεση του βέλτιστου σημείου της θερμοκρασίας εκχύλισης και της ποσότητας θεικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των παραπάνω μεθόδων που αναφέρθηκαν.

### 1.2.1 Θερμοκρασία εκχύλισης

Στην πρώτη περίπτωση, ο παράγοντας που κρατήθηκε σταθερός ήταν το θειικό οξύ και η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν μεταβλητή. Το θειικό οξύ ήταν ίσο με 640μl για συνθήκες αραιώσης 250ml αποσταγμένου νερού και 200μl για συνθήκες αραιώσεων 300ml αποσταγμένου νερού. Η θερμοκρασία εκχύλισης είχε εύρος από 25°C έως 60°C με βήμα 5°C τη φορά.

- **Συγκέντρωση Συνολικών Φαινολικών**

Στο **Πίνακα 8 και 9** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών φορτίων εκφρασμένη σε mg./g ξ.β. με μεταβλητή θερμοκρασία εκχύλισης από 25°C έως 60°C και σε συνθήκες αραιώσης 250 ml και 300 ml αποσταγμένου νερού αντίστοιχα.

**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα μεθόδου Folin-Ciocalteu σε συνθήκες αραιώσης 250 ml αποσταγμένο νερό με μεταβλητή θερμοκρασία εκχύλισης.

Ποσότητα Νερού (ml)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσότητα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μl)	TPC(mg/g d.b)
250	25	640	18,40
250	30	640	20,58
250	35	640	16,67
250	40	640	16,40
250	45	640	11,56
250	50	640	18,02
250	55	640	16,80
250	60	640	21,56

**Πίνακας 9:** Αποτελέσματα μεθόδου Folin-Ciocalteu σε συνθήκες αραιώσης 300 ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή θερμοκρασία εκχύλισης.

Ποσότητα Νερού (ml)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσότητα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μl)	TPC(mg/g d.b)
300	25	200	17,09
300	30	200	14,31
300	35	200	17,47
300	40	200	17,42
300	45	200	17,77
300	50	200	18,33
300	55	200	20,27

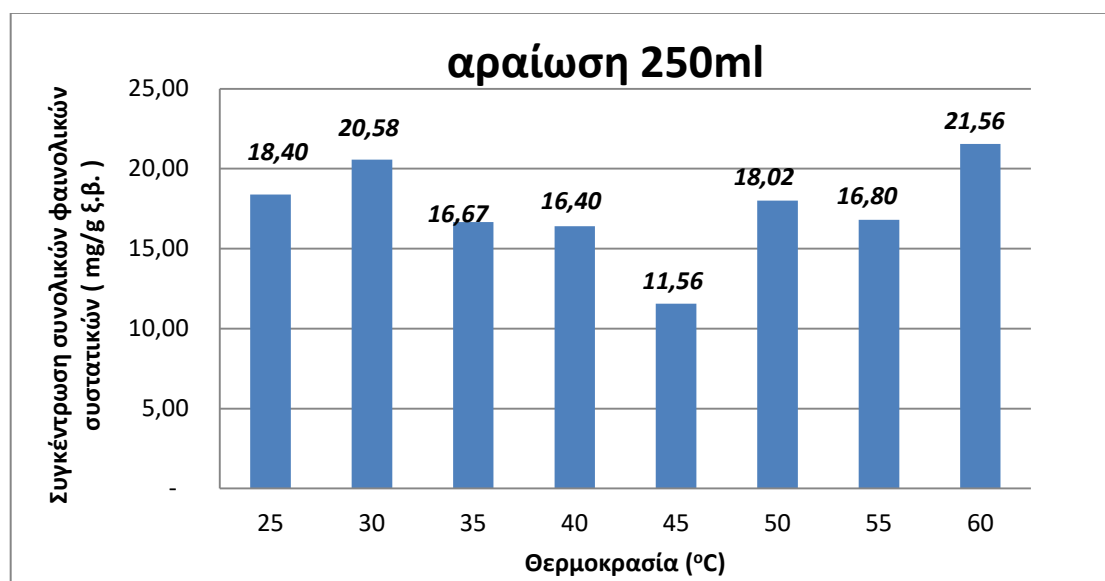


300	60	200	17,63
-----	----	-----	-------

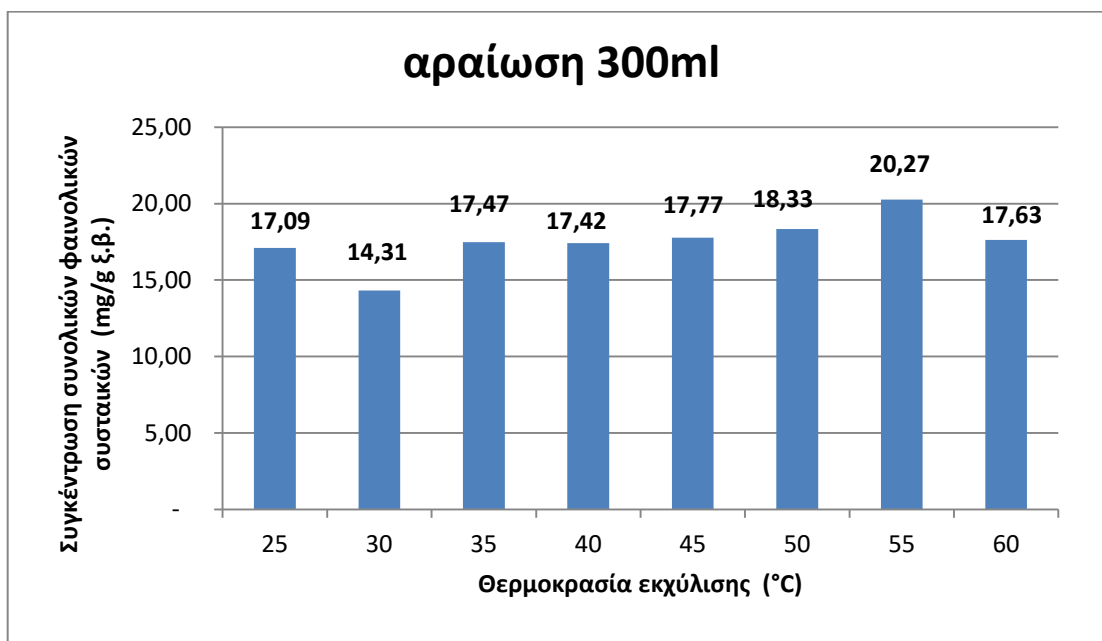
Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονήθηκαν στο **Γράφημα 26 και 27** όπου φαίνεται η πορεία που έχει η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών καθώς αυξανόταν η θερμοκρασία και στις δύο συνθήκες εκχύλισης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις συνολικών φαινολικών φορτίων με αραιώση 250ml αποσταγμένου νερού παρατηρήθηκαν σε θερμοκρασίες εκχύλισης 25°C , 30°C και 60°C με συγκεντρώσεις 18,40 mg/g ξ.β. , 20,58 mg/g ξ.β. και 21,56 mg/g ξ.β. αντίστοιχα. Η μικρότερη συγκέντρωση συνολικού φαινολικού φορτίου σε αυτή τη περίπτωση ήταν 11,56 mg/g ξ.β. σε θερμοκρασία εκχύλισης 45 °C.

Η υψηλότερη συγκέντρωση για αραιώση σε 300 ml αποσταγμένου νερού ήταν 20,27mg/g ξ.β. σε θερμοκρασία 55°C και η μικρότερη 14,31 mg/g ξ.β στους 30 °C. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις συνολικού φαινολικού φορτίου κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα αφού είχαν εύρος από 17,09 έως 18,33 mg/g ξ.β. για θερμοκρασία εκχύλισης 25 °C και 50°C.



**Γράφημα 26:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία εκχύλισης σε συνθήκες αραιώσης 250ml αποσταγμένου νερού.



**Γράφημα 27:** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία εκχύλισης σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού

- **Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC**

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

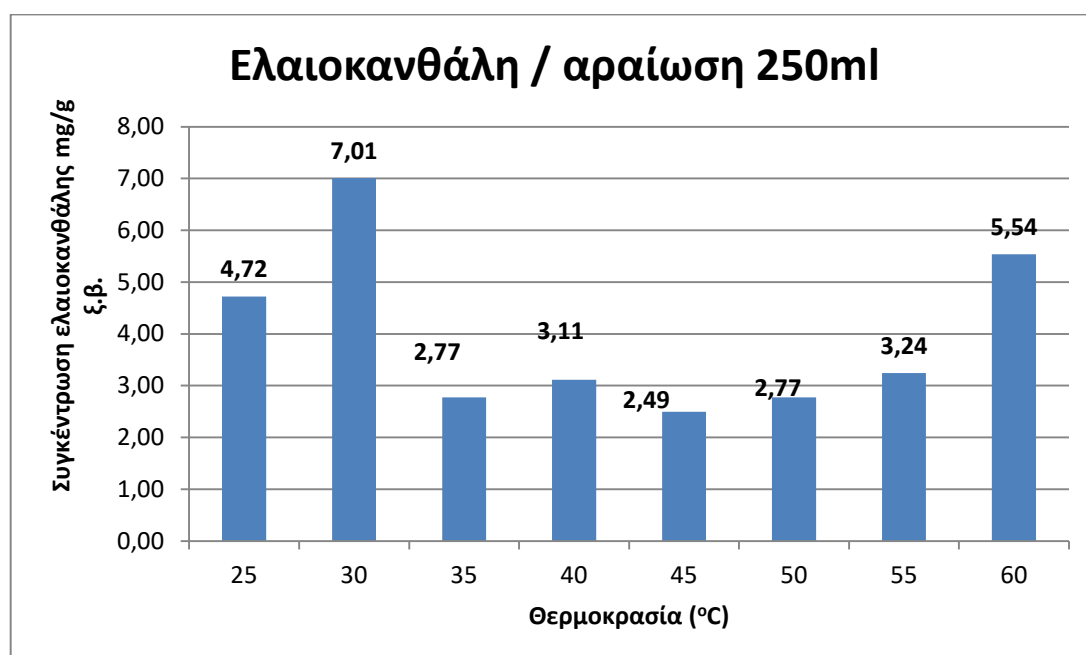
Στο **Πίνακα 10** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών σε mg/g ξ.β. με μεταβλητή τη θερμοκρασία εκχύλισης και σε συνθήκες αραίωσης 250ml αποσταγμένου νερού και. Από το **Πίνακα 10** προκύπτει ότι :

- Η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύτηκε μόνο στα φύλλα ελιάς που η εκχύλιση τους έγινε σε θερμοκρασία 30°C και είχε συγκέντρωση 5,16 mg/g ξ.β.
- Η φαινολική ουσία τυροσόλη δεν ανιχνεύτηκε σε καμία περίπτωση.
- Το συριγγικό οξύ ανιχνεύτηκε σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τη περίπτωση που η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν 25 °C. Η υψηλότερη συγκέντρωση συριγγικού οξέος 6,32mg/g ξ.β. βρέθηκε στα φύλλα ελιάς που εκχυλίστηκαν σε θερμοκρασία 30°C.
- Η συγκέντρωση του συναπικού οξέος ήταν πολύ χαμηλή σε όλες τις περιπτώσεις αφού είχε εύρος από 0,23 mg/g ξ.β. έως 0,07 mg/g ξ.β. (45 °C και 30°C αντίστοιχα).
- Η συγκέντρωση της ελαιουρωπαΐνης ανιχνεύτηκε μόνο στα φύλλα ελιάς που η εκχύλιση τους έγινε σε θερμοκρασία 30°C και είχε συγκέντρωση 4,01 mg/g ξ.β.
- Η φαινολική ουσία ελαιοκανθάλη εμφανίζεται σε όλα τα φύλλα ελιάς που εκχυλίστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η υψηλότερη συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης που ανιχνεύτηκε στα φύλλα ελιάς ήταν σε θερμοκρασία 30 °C με

συγκέντρωση 7,01 mg/g ξ.β.. Η χαμηλότερη συγκέντρωση ήταν στα φύλλα ελιάς που η εκχύλιση τους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες 35°C και 50 °C και ήταν 2,77 mg/g ξ.β.. Στο **Γράφημα 28** απεικονίζεται πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία.

**Πίνακας 10:** Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε συνθήκες αραίωσης 250 ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή τη θερμοκρασία εκχύλισης.

Ποσότητα Νερού (ml)(ml)	Θερμοκρασία (°C)	Υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	Συριγγικό οξύ	Σιναπικό οξύ	Ελαιοευρωπαϊνή	Ελαιοκανθάλη
250	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,72
250	30	5,16	0,00	6,32	0,07	4,01	7,01
250	35	0,00	0,00	2,63	0,07	0,00	2,77
250	40	0,00	0,00	3,29	0,21	0,00	3,11
250	45	0,00	0,00	3,34	0,23	0,00	2,49
250	50	0,00	0,04	3,70	0,19	0,00	2,77
250	55	0,00	0,08	3,74	0,00	0,00	3,24
250	60	0,00	0,23	3,77	0,00	0,00	5,54



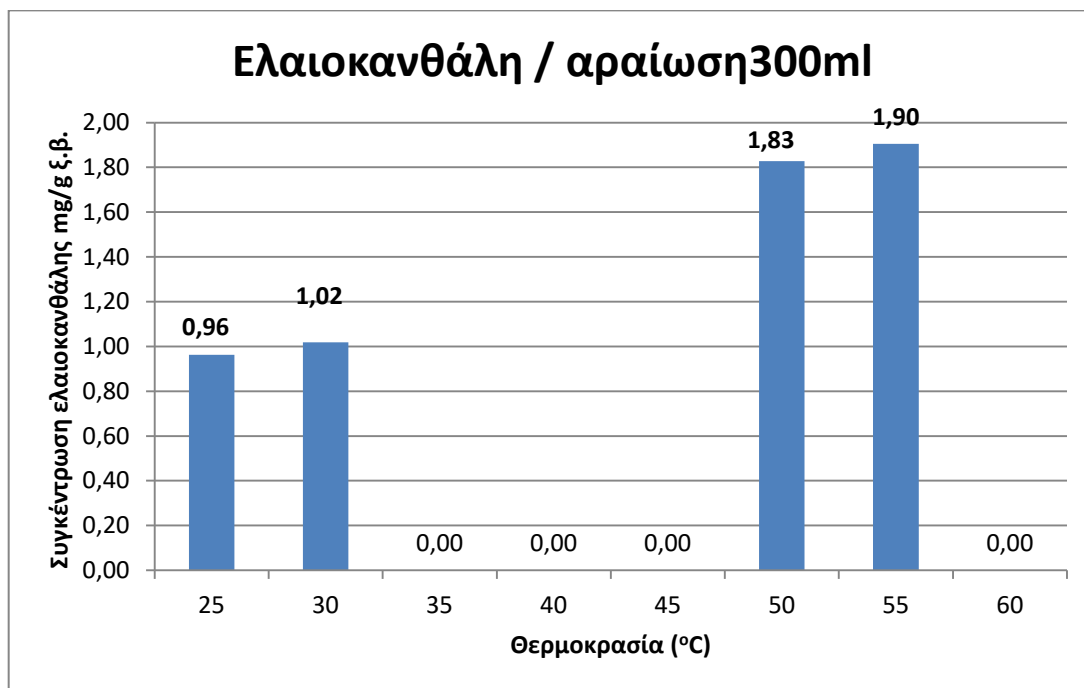
**Γράφημα 28:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία εκχύλισης °C σε συνθήκες αραίωσης 250ml αποσταγμένου νερού.

Στο **Πίνακα 11** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών σε mg/g ξ.β. με μεταβλητή τη θερμοκρασία εκχύλισης και σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού και. Από το **Πίνακα 11** προκύπτει ότι :

- Η φαινολική ουσία υδροξυτυροσόλη δεν ανιχνεύτηκε σε καμία περίπτωση.
- Η τυροσόλη δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές στη συγκέντρωση της καθώς αυξανόταν η θερμοκρασία εκχύλισης. Το εύρος της συγκέντρωσης της ήταν από 0,28 mg/g ξ.β. έως 0,34 mg/g ξ.β. στις θερμοκρασίες 40°C και 55 °C αντίστοιχα.. Στις θερμοκρασίες 25°C , 30 °C , 35°C και 60 °C δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση τυροσόλης.
- Η υψηλότερη συγκέντρωση του συριγγικού οξέος ανιχνεύτηκε σε θερμοκρασία εκχύλισης 30°C και ήταν 1,53mg/g ξ.β.. Στις υπόλοιπες θερμοκρασίες, οι συγκεντρώσεις του συριγγικού οξέος ήταν σε παρόμοιο επίπεδο και στους 25 °C δεν ανιχνεύτηκε καθόλου.
- Η φαινολική ένωση σιναπικό οξύ ανιχνεύτηκε μόνο σε θερμοκρασία 25 °C και είχε συγκέντρωση 0,82 mg/g ξ.β..
- Η ελαιοευρωπαϊνή ανιχνεύτηκε μόνο στις θερμοκρασίες 25 °C και 30 °C με συγκέντρωση 1,46 mg/g ξ.β και 2,23 mg/g ξ.β αντίστοιχα.
- Τέλος , η φαινολική ένωση ελαιοκανθάλη ανιχνεύτηκε στις θερμοκρασίες 25°C , 30°C ,50 °C και 55 °C με συγκέντρωση 0,96 mg/g ξ.β, 1,02 mg/g ξ.β , 1,83 mg/g ξ.β και 1,90 mg/g ξ.β αντίστοιχα.

**Πίνακας 11:** Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε συνθήκες αραίωσης 300 ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή τη θερμοκρασία εκχύλισης.

Ποσότητα Νερού (ml)(ml)	Θερμοκρασία (°C)	Υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	Συριγγικό οξύ	Σιναπικό οξύ	Ελαιοευρωπαϊνή	Ελαιοκανθάλη
300	25	0,00	0,00	0,00	0,82	1,46	0,96
300	30	0,00	0,00	1,53	0,00	2,23	1,02
300	35	0,00	0,00	0,70	0,00	0,00	0,00
300	40	0,00	0,28	0,79	0,00	0,00	0,00
300	45	0,00	0,31	0,87	0,00	0,00	0,00
300	50	0,00	0,29	0,83	0,00	0,00	1,83
300	55	0,00	0,34	0,82	0,00	0,00	1,90
300	60	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00	0,00



**Γράφημα 29:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία εκχύλισης °C σε συνθήκες αραιώσης 300ml αποσταγμένου νερού.

### 1.2.2 Θεικό Οξύ ( $H_2SO_4$ 98%)

Στην δεύτερη περίπτωση, ο παράγοντας που κρατήθηκε σταθερός ήταν η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του θεικού οξέος ήταν μεταβλητή. Η θερμοκρασία ορίστηκε 30°C αφού η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης ήταν μέγιστη σε αυτή τη θερμοκρασία και στις δύο συνθήκες εκχύλισης.

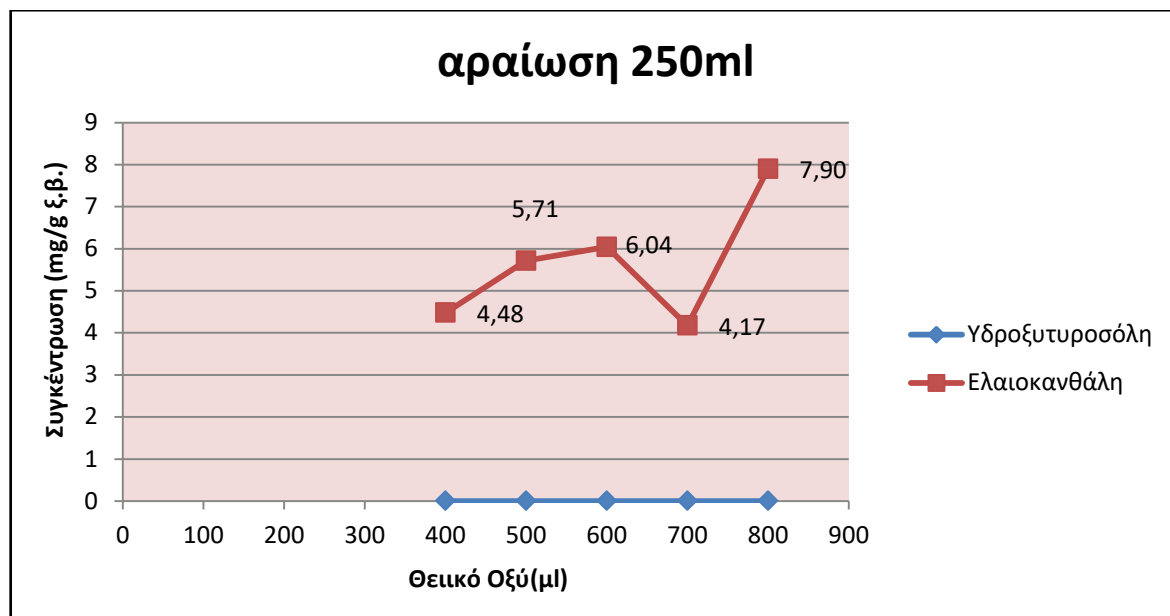
### Α σειρά πειραμάτων ( Δοκιμαστικό Πείραμα )

Πραγματοποιήθηκε δοκιμαστικό πείραμα όπου η ποσότητα θεικού οξέος μελετήθηκε σε ένα μικρό εύρος από 4% (v/w) έως 8% (v/w) με βήμα 1% (v/w) και με σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης 30°C.

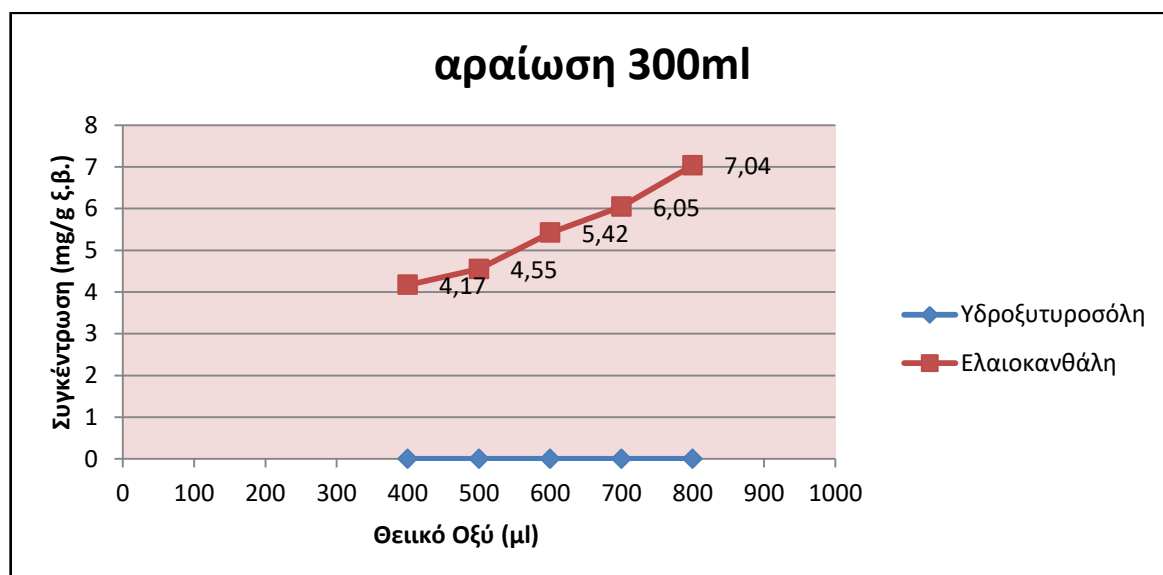
- Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC

Στο **Γράφημα 30 και 31** απεικονίζεται πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης και ελαιοκανθάλης σε συνάρτηση με τη ποσότητα θεικού οξέος σε

συνθήκες αραίωσης 250ml και 300ml απιονισμένου νερού αντίστοιχα. Και στα δύο γραφήματα η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης είναι μηδενική ενώ όλα τα δείγματα παρουσιάζουν ελαιοκανθάλη.



**Γράφημα 30:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και υδροξυτυροσόλης σε mg/g ξ.β. σε συνάρτηση με το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (μl) σε συνθήκες αραίωσης 250ml.



**Γράφημα 31:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και υδροξυτυροσόλης σε mg/g ξ.β. σε συνάρτηση με το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (μl) σε συνθήκες αραίωσης 300ml.

## Β σειρά πειραμάτων

Η ποσότητα θειικού οξέος μελετήθηκε στο εύρος από 1%(v/w) έως 15%(v/w) με βήμα 1%(v/w) τη φορά.

- **Συγκέντρωση Συνολικών Φαινολικών**

Στο **Πίνακα 12 και 13** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών φορτίων εκφρασμένη σε mg./g ξ.β. με μεταβλητή τη ποσότητα του θειικού οξέος η οποία κυμαίνεται από 100μl έως 1500μl και σε συνθήκες αραιώσης 250 ml και 300 ml αποσταγμένου νερού αντίστοιχα.

**Πίνακας 12** :Αποτελέσματα μεθόδου Folin-Ciocalteu σε συνθήκες αραιώσης 250 ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή ποσότητα θειικού οξέος.

Ποσότητα Νερού (ml)	Θερμοκρασία(°C)	Ποσότητα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μl)	TPC(mg/g ξ.β.)
250	30	100	28,22
250	30	200	23,51
250	30	300	36,97
250	30	400	44,11
250	30	500	39,03
250	30	600	36,84
250	30	700	21,88
250	30	800	20,95
250	30	900	21,05
250	30	1000	28,09
250	30	1100	29,36
250	30	1200	23,63
250	30	1300	38,14
250	30	1400	34,56
250	30	1500	33,90

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα μεθόδου Folin-Ciocalteu σε συνθήκες αραιώσης 300 ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή ποσότητα θειικού οξέος.

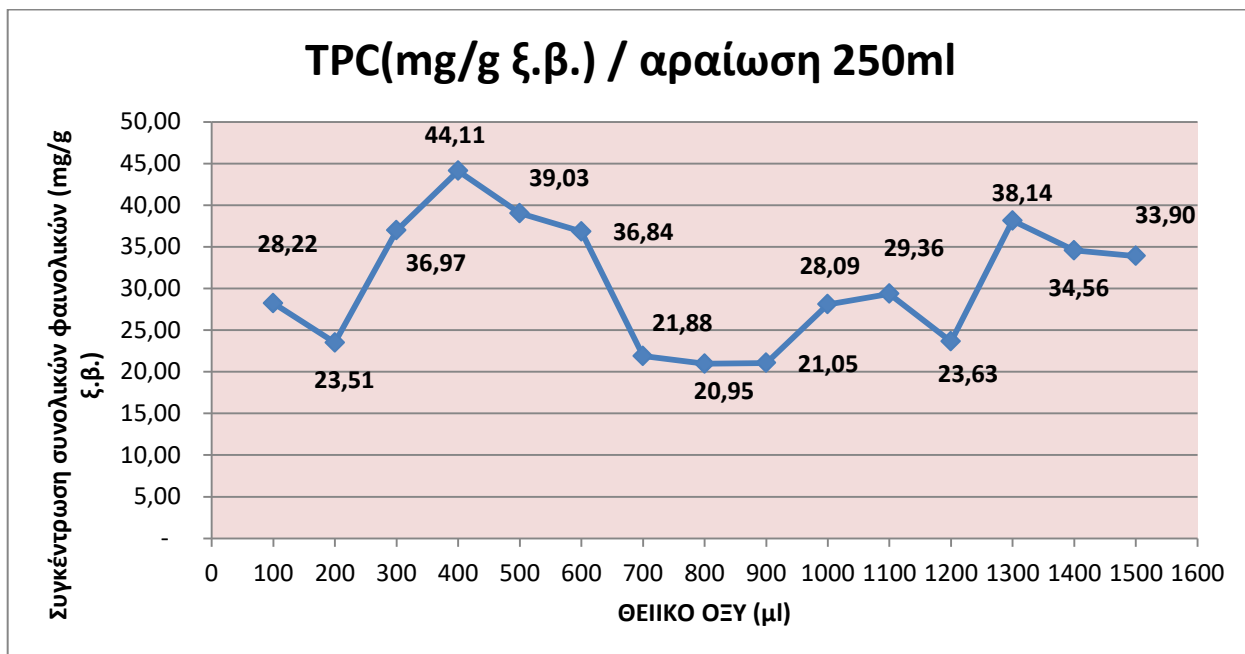
Ποσότητα Νερού (ml)	Θερμοκρασία(°C)	Ποσότητα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μl)	TPC (mg/g ξ.β.)
300	30	100	24,29
300	30	200	34,93
300	30	300	37,48

300	30	400	40,96
300	30	500	22,26
300	30	600	32,35
300	30	700	28,59
300	30	800	27,21
300	30	900	26,93
300	30	1000	29,05
300	30	1100	25,39
300	30	1200	34,46
300	30	1300	35,34
300	30	1400	22,66
300	30	1500	32,54

Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονήθηκαν στο **Γράφημα 32 και 33** όπου φαίνεται η πορεία που έχει η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών καθώς αυξανόταν η ποσότητα του θειικού οξέος και στις δύο συνθήκες εκχύλισης.

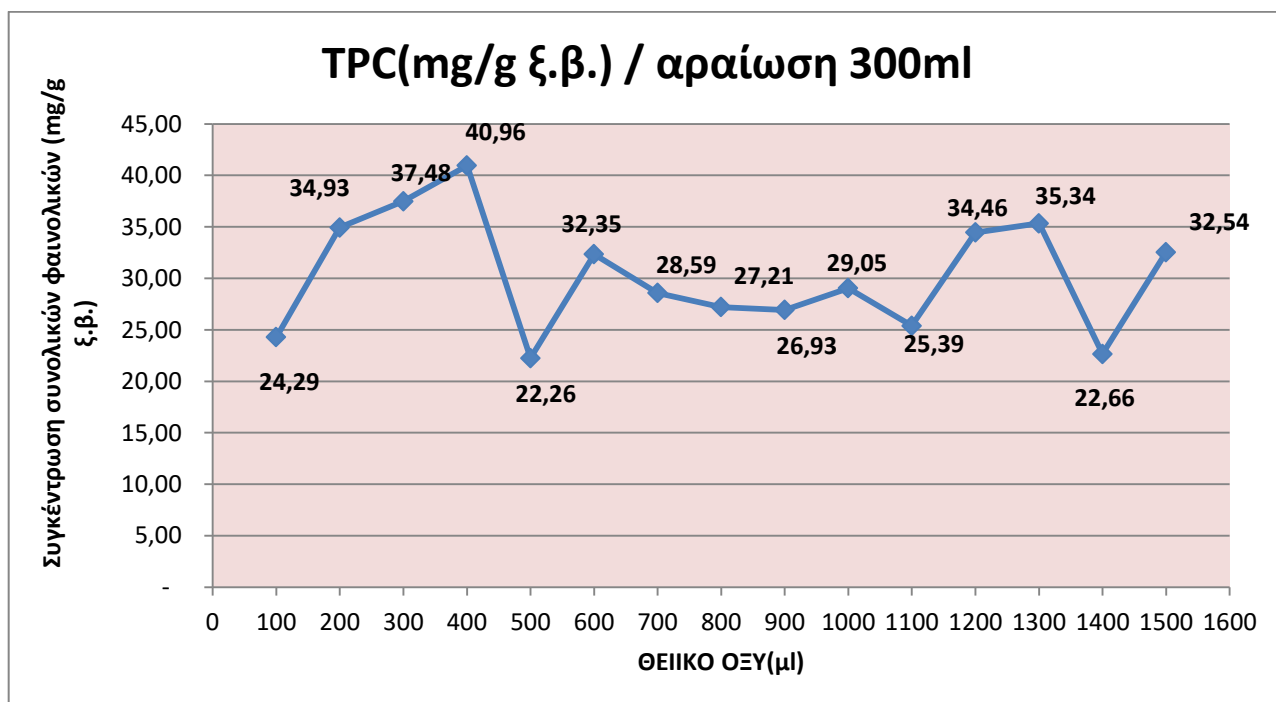
Σε συνθήκες αραιώσης 250ml αποσταγμένου νερού, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών φορτίων κυμάνθηκε από 20,95 έως 44,11 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα του θειικού οξέος ήταν 800 και 400μL αντίστοιχα. Καθώς αυξάνοταν η ποσότητα του θειικού οξέος, η συγκέντρωση παρουσίαζε αυξομειώσεις όπως φαίνεται στο **Γράφημα 31**. Στα 100μL θειικού οξέος η συγκέντρωση του συνολικού φαινολικού φορτίου ήταν 28,22mg/g ξ.β. ενώ στα 200μL μειώθηκε η συγκέντρωση σε 23,51mg/g ξ.β. Στα 300μL θειικού οξέος η συγκέντρωση συνολικού φαινολικού φορτίου αυξήθηκε στα 36,97mg/g ξ.β. και στα 400μL έφτασε στη μέγιστη τιμή της. Στη συνέχεια, από 500μL έως 800μL μειώθηκε η συγκέντρωση του φαινολικού φορτίου μέχρι και έφτασε στη μικρότερη τιμή της στα 800 μL. Στο διάστημα 900 μL μέχρι 1200 μL αυξήθηκε μέχρι τιμή συγκέντρωσης 23,63 mg/g ξ.β. στα 1200. Τέλος, στο διάστημα 1200 έως 1500 η τιμή της συγκέντρωσης του συνολικού φαινολικού φορτίου ήταν 38,14 mg/g ξ.β. στα 1300 μL, 34,56 mg/g ξ.β. στα 1400 μL και 33,90 mg/g ξ.β. στα 1600 μL.





**Γράφημα 32 :** Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με το θειικό οξύ σε συνθήκες αραιώσης 250ml αποσταγμένου νερού

Σε συνθήκες αραιώσης 300ml αποσταγμένου νερού , το **Γράφημα 32** της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών φορτίων και ποσότητας θειικού οξέος παρουσιάζει και αυτό αυξομειώσεις. Στα 100 μl θειικού οξέος η συγκέντρωση του συνολικού φαινολικού φορτίου ήταν 24,29 mg/g ξ.β. και στη συνέχεια αυξήθηκε μέχρι να φτάσει στη μέγιστη συγκέντρωση 40,96 mg/g ξ.β. στα 400 μl θειικού οξέος. Στα 500 μl η συγκέντρωση μειώθηκε απότομα στα 22,96 mg/g ξ.β. που είναι και η μικρότερη συγκέντρωση από όλες και εμφανίζεται και σε ποσότητα θειικού οξέος 800 μl. Στο διάστημα 600 μl έως 1500 μl (32,35 mg/g ξ.β. και 32,54 mg/g ξ.β. αντίστοιχα) η συγκέντρωση του συνολικού φαινολικού φορτίου κυμαίνεται μεταξύ 22,66 mg/g ξ.β. έως 35,34 mg/g ξ.β. σε 800μl και 1300 μl θειικού οξέος αντίστοιχα.



**Γράφημα 33** : Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με το θειικό οξύ σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού

- **Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC**

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Στο **Πίνακα 14** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών σε mg/g ξ.β. με μεταβλητή τη ποσότητα του θειικού οξέος και σε συνθήκες αραίωσης 250ml αποσταγμένου νερού με θερμοκρασία εκχύλισης 30°C. Από το **Πίνακα 14** προκύπτει ότι :

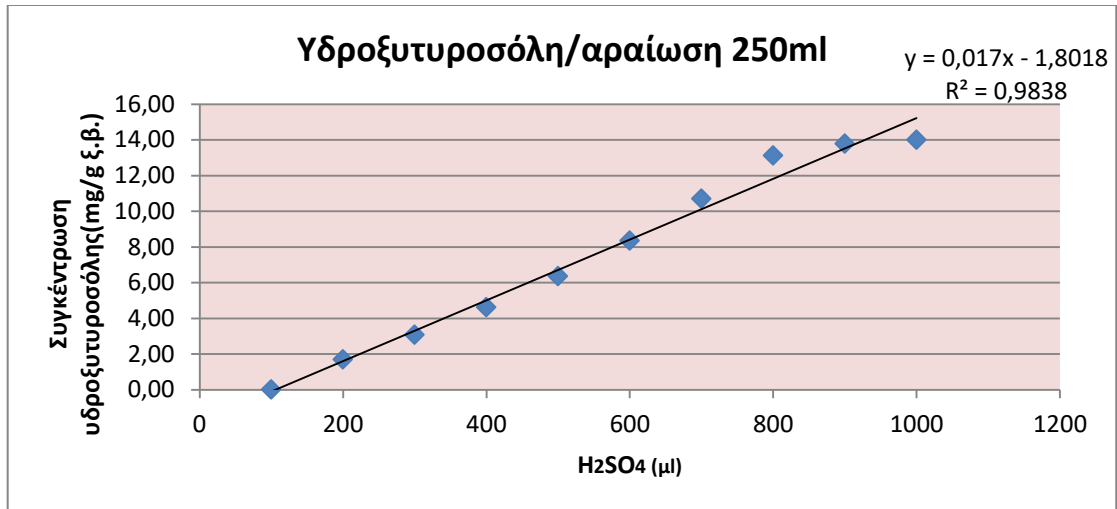
- Η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύτηκε στα φύλλα που η εκχύλιση τους πραγματοποιήθηκε με ποσότητα θειικού οξέος στο εύρος 200 έως 1000μl. Η σχέση της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης με τη ποσότητα του θειικού οξέος ήταν γραμμική σε αυτό το διάστημα όπως φαίνεται στο **Γράφημα 34** και η εξίσωση ήταν ίση με  $y=0,017x-1,8018$  με συνετελεστή προσαρμοστικότητας  $R^2=0,9838$ .
- Η φαινολική ουσία τυροσόλη ανιχνεύτηκε στα φύλλα ελιάς που η εκχύλιση τους έγινε με ποσότητα θειικού οξέος από 500 έως 800 μl και από 1100 έως 1400 μl. Η υψηλότερη συγκέντρωση τυροσόλης ανιχνεύτηκε στα φύλλα ελιάς που η εκχύλιση τους πραγματοποιήθηκε με ποσότητα θειικού οξέος 1100μl και ήταν 4,42 mg/g ξ.β.
- Η συγκέντρωση του συριγγικού οξύ είχε εύρος από 0,00 έως 5,15 mg/g ξ.β. Η συγκέντρωση του συριγγικού οξέος ήταν μηδέν όταν η ποσότητα του θειικού οξέος

ήταν 200 , 300, 500, 900 και 1000μl. Από το **Γράφημα 35** προκύπτει ότι η συνάρτηση της συγκέντρωση του συριγγικού οξέος με τη ποσότητα του θεικού οξέος στο εύρος 1100 έως 1500μl θεικού οξέος είναι γραμμική και ίση με  $y=0,0097x-91767$  με συνετελεστή προσαρμοστικότητας  $R^2=0,9399$ .

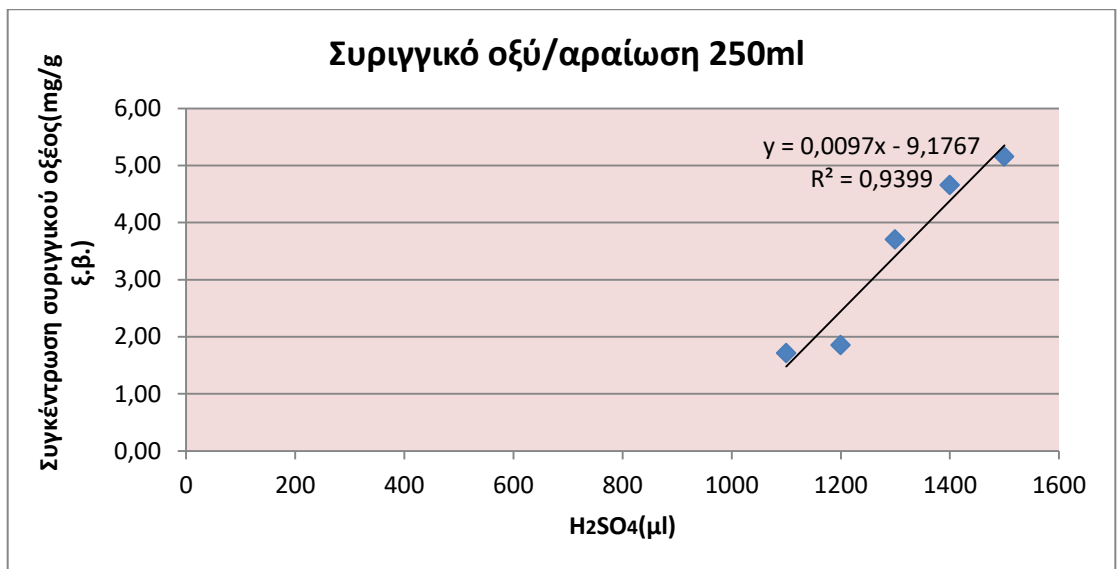
- Η φαινολική ουσία σιναπικό οξύ ανιχνεύτηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις όταν η ποσότητα του θεικού οξέος ήταν 500 μl, 900 μl ,1100 μl, 1300 μl, 1400 μl και 1500 μl. Η μέγιστη συγκέντρωση σιναπικού οξέος ήταν 2,72 mg/g ξ.β. σε 1500μl θεικού οξέος.
- Η φαινολική ουσία ελαιοευρωπαϊνή δεν ανιχνεύτηκε σε καμία περίπτωση.
- Η φαινολική ουσία ελαιοκανθάλη εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση από όλες τις φαινολικές ουσίες και ίση με 22,65 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα του θεικού οξέος ήταν 1500μl. Στο **Γράφημα 36** φαίνεται ότι στο εύρος από 100 έως 900μl θεικού οξέος η συγκέντρωση της ήταν μηδενική.

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε συνθήκες αραιώσης 250ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή τη ποσότητα του θεικού οξέος.

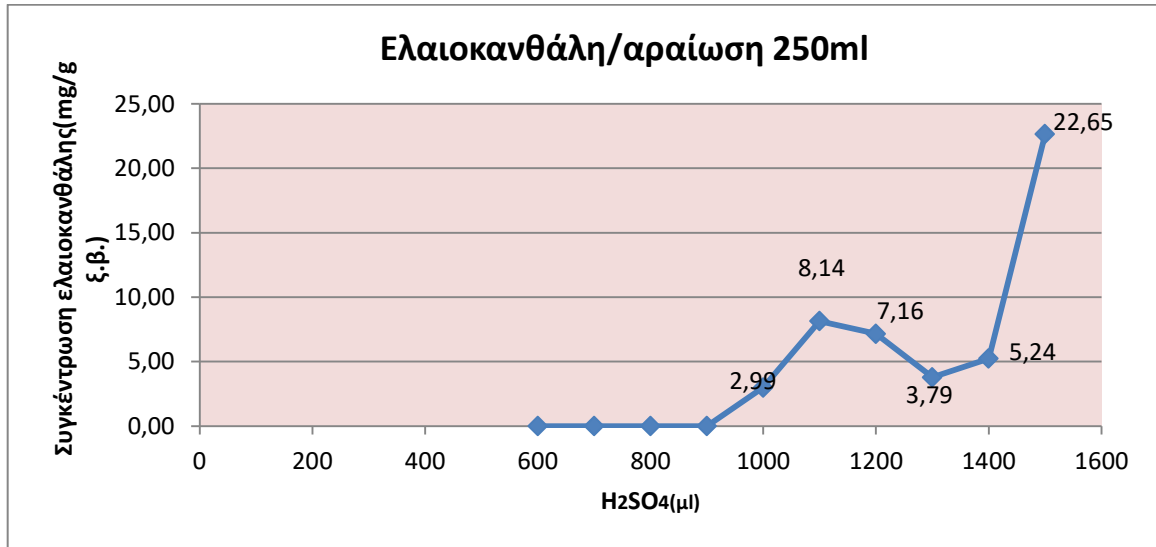
Ποσότητα Νερού (ml)	Ποσότητα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μl)	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Syringic	Synapic	Oleuropein	Oleocanthal
250	100	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
250	200	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
250	300	3,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
250	400	4,61	0,00	2,85	0,00	0,00	0,00
250	500	6,36	0,11	0,00	0,94	0,00	0,00
250	600	8,34	0,28	0,88	0,00	0,00	0,00
250	700	10,70	0,42	0,05	0,00	0,00	0,00
250	800	13,11	0,13	0,03	0,00	0,00	0,00
250	900	13,78	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00
250	1000	14,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,99
250	1100	0,00	4,42	1,71	0,24	0,00	8,14
250	1200	0,00	1,02	1,85	0,00	0,00	7,16
250	1300	0,00	0,31	3,70	0,76	0,00	3,79
250	1400	0,00	1,40	4,65	1,16	0,00	5,24
250	1500	0,00	0,00	5,15	2,72	0,00	22,65



**Γράφημα 34:** Συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα θειικού οξέος(μl) σε συνθήκες αραίωσης 250ml αποσταγμένου νερού.



**Γράφημα 35:** Συγκέντρωση συριγγικού οξέος εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα θειικού οξέος(μl) σε συνθήκες αραίωσης 250ml αποσταγμένου νερού.



**Γράφημα 36:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα θειικού οξέος(μl) σε συνθήκες αραίωσης 250ml αποσταγμένου νερού.

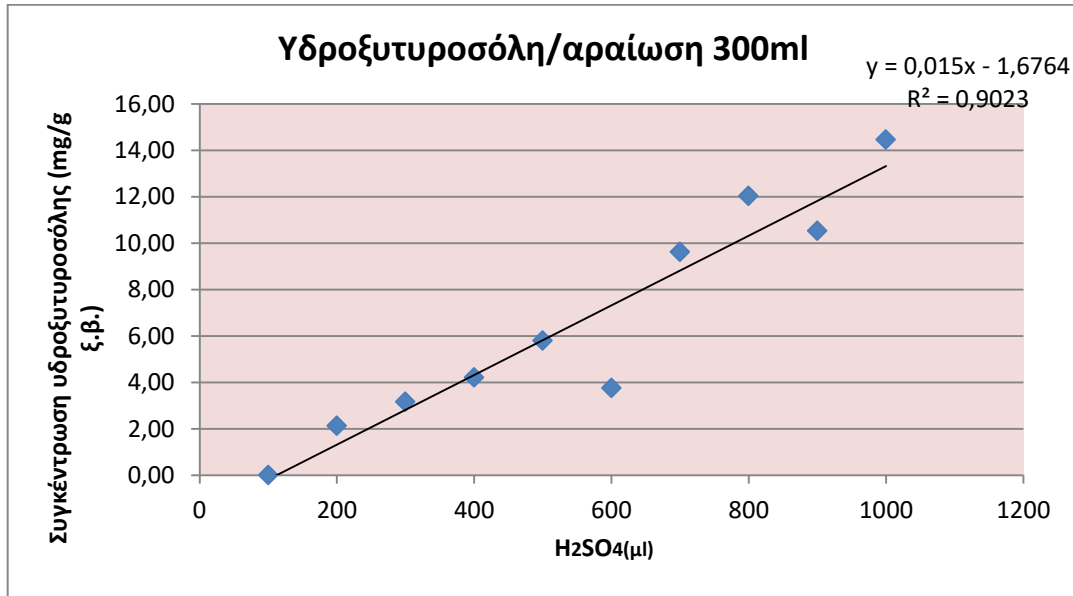
Στο **Πίνακα 15** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών σε mg/g ξ.β. με μεταβλητή τη ποσότητα του θειικού οξέος και σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού με θερμοκρασία εκχύλισης 30°C. Από το **Πίνακα 15** προκύπτει ότι :

- Η φαινολική ουσία υδροξυτυροσόλη παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση 14,47 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα του θειικού οξέος ήταν 1000μl.
- Η φαινολική ουσία τυροσόλη παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση 6,66 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα του θειικού οξέος ήταν 1500μl.
- Η φαινολική ουσία συριγγιζό οξύ παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση 2,67 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα του θειικού οξέος ήταν 1300μl.
- Το σιναπικό οξύ παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση 1,15 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα θειικού οξέος ήταν 1500 μl.
- Η φαινολική ουσία ελευρωπαΐνη δεν ανιχνεύτηκε σε καμία περίπτωση.
- Η φαινολική ουσία ελαιοκανθάλη εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση από όλες τις φαινολικές ουσίες και ίση με 19,41 mg/g ξ.β. όταν η ποσότητα του θειικού οξέος ήταν και σε αυτή τη περίπτωση 1500μl.

**Πίνακας 15:** Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού με μεταβλητή τη ποσότητα του θειικού οξέος.

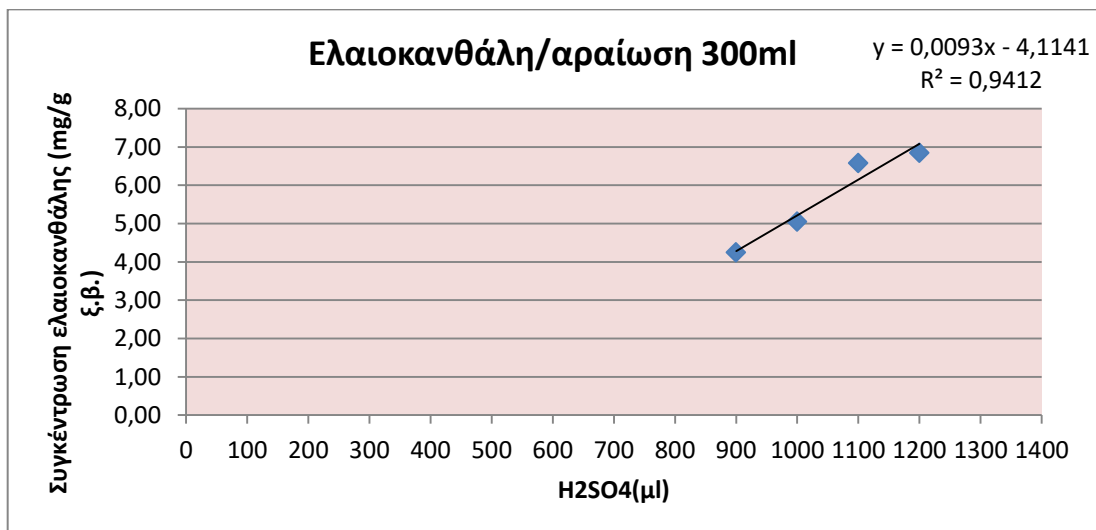
Ποσότητα Νερού (ml)	Ποσότητα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μl)	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Syringic	Synapic	Oleuropein	Oleocanthal
300	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
300	200	2,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
300	300	3,16	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00
300	400	4,22	0,00	2,42	1,66	0,00	0,00
300	500	5,80	0,00	0,00	0,72	0,00	0,00
300	600	3,76	0,50	0,38	0,00	0,00	0,00
300	700	9,61	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
300	800	12,04	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
300	900	10,53	0,10	0,00	0,00	0,00	4,24
300	1000	14,47	2,85	0,91	0,00	0,00	5,05
300	1100	0,00	2,57	1,51	0,06	0,00	6,58
300	1200	0,00	0,83	0,96	0,35	0,00	6,84
300	1300	0,00	0,00	2,67	0,30	0,00	3,42
300	1400	0,00	0,46	2,06	0,84	0,00	10,38
300	1500	0,00	6,66	0,00	1,15	0,00	19,41

Στο **Γράφημα 37** απεικονίζεται η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης σε mg/g ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα του θειικού οξέος στο εύρος 100 έως 1000μl ποσότητα θειικού οξέος. Η συνάρτηση που προκύπτει είναι γραμμική και ίση με  $y=0,015x-1,6764$  με συντελεστή προσαρμοστικότητας  $R^2=0,9023$ . Η υδροξυτυροσόλη είχε συγκέντρωση μηδέν όταν η ποσότητα θειικού οξέος ήταν στο εύρος 1100 έως 1500μl.



**Γράφημα 37:** Συγκέντρωση υδροξυτυροσώλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα θεικού οξέος(μl) σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού.

Στο **Γράφημα 38** απεικονίζεται η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης σε mg/g ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα του θεικού οξέος στο εύρος 900 έως 1200μl ποσότητα θεικού οξέος. Η συνάρτηση που προκύπτει είναι γραμμική και ίση με  $y=0,0093x-4,1141$  με συντελεστή προσαρμοστικότητας  $R^2=0,9412$ .



**Γράφημα 38:** Συγκέντρωση ελαιοκανθάλης εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξ.β. σε συνάρτηση με τη ποσότητα θεικού οξέος(μl) σε συνθήκες αραίωσης 300ml αποσταγμένου νερού.

# Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## 1.1 1<sup>ο</sup> πείραμα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των συνολικών φορτίων διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών , των συνθηκών εκχύλισης , την ηλικία του δέντρου και το χρόνο συγκομιδής. Συγκεκριμένα :

- Στις ποικιλίες του Κωστελένου που τα φύλλα τους συλλέχθηκαν τους μήνες Ιούλιο και Οκτώβριο παρατηρήθηκε ότι η ίδια ποικιλία σε διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης παρουσίαζε διαφορά στη συγκέντρωση του συνολικού φαινολικού φορτίου.
- Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών των «ώριμων» δέντρων ήταν υψηλότερη από τη συγκέντρωση των «νεαρών» και στις δύο συνθήκες εκχύλισης. Με αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η ηλικία του δέντρου επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενο του δέντρου και ότι τα ώριμα δέντρα έχουν μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό φορτίο σε σχέση με τα νεαρά δέντρα.
- Στη ποικιλία Κορωνέικη του Πολυτεχνίου που τα φύλλα της συλλέχθηκαν σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους (Οκτώβριο, Νοέμβριο, Δεκέμβριο ) και στις δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης η υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών βρέθηκε στα φύλλα του Νοεμβρίου. Αυτό το συμπέρασμα είναι λογικό γιατί είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά δεν είναι σταθερά και μεταβάλλονται με το χρόνο.
- Οι ποικιλίες «Θιάκη» , «Κορωνέικη» , «Κουτσουρέλια» , «Λευκοελιές Σερρών» , «Μαστοειδής», «Μαυροελιά Μεσσηνία» και «Τραγολιά» που τα φύλλα τους συλλέχθηκαν σε δύο διαφορετικού μήνες Ιούλιο και Οκτώβριο βρέθηκε ότι σε συνθήκες TPCmax, οι ποικιλίες «Θιάκη» , «Μαυροελιά Μεσσηνίας» και «Τραγολιά» παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών το μήνα Ιούλιο ενώ οι ποικιλίες «Κορωνέικη» , «Κουτσουρέλια» και «Λευκοελιές Σερρών» είχαν υψηλότερη συγκέντρωση το μήνα Οκτώβριο. Σε συνθήκες OLEmax η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών των φύλλων ελιάς που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο ήταν υψηλότερη από τη συγκέντρωση των φύλλων του Ιουλίου για τη πλειοψηφία των ποικιλιών

Το φαινολικό προφίλ των ποικιλιών διέφερε μεταξύ των ποικιλιών , των συνθηκών εκχύλισης , την ηλικία του δέντρου και το χρόνο συγκομιδής.

- Οι ποικιλίες από το φυτώριο του Κωστελένου του Οκτωβρίου παρουσίασαν παρόμοιο φαινολικό προφίλ με μικρές διαφορές και στις δύο συνθήκες εκχύλισης. Η φαινολική ουσία που παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση ήταν η τυροσόλη που κυμάνθηκε από 0,00 έως 5,97 mg/g ξ.β. ( «Τραγολιά» και «Καλοκαιρίδα» αντίστοιχα) σε συνθήκες TPCmax και σε συνθήκες OLEmax κυμάνθηκε από 0,00 έως



4,25 mg/g ξ.β. ( «Κοθρέικη Μανάκι» και «Καλοκαιρίδα» αντίστοιχα). Οι φαινολικές ουσίες υδροξυτυροσόλη , σιναπικό οξύ ,συρριγγικό οξύ, ελαιοευρωπαϊνή και ελαιοκανθάλη δεν ανιχνεύτηκαν σε καμία από αυτές τις ποικιλίες και στις δύο συνθήκες εκχύλισης. Εξαιρέση αποτελούν οι ποικιλίες «Βαλανολιά» , «Καλοκαιρίδα» και «Κοθρέικη Μανάκι» όπου σε συνθήκες TPCmax εμφάνισαν ποσότητα συρριγγικού οξέος με συγκέντρωση 0,05 , 0,01 και 0,20 mg/g ξ.β. αντίστοιχα.

- Στη ποικιλία Κορωνέικη από το αγρόκτημα του Πολυτεχνίου που συλλέχθηκαν φύλλα σε τρεις διαφορετικούς μήνες Οκτώβριο , Νοέμβριο, Δεκέμβριο ανιχνεύτηκαν οι φαινολικές ενώσεις τυροσόλη , συριγγικό οξύ, σιναπικό οξύ , ελαιοευρωπαϊνή και ελαιοκανθάλη και δεν ανιχνεύτηκε καθόλου η υδροξυτυροσόλη. Μέγιστη ποσότητα τυροσόλης σε συνθήκες TPCmax εμφάνισαν τα φύλλα του Δεκεμβρίου 10,22 mg/g ξ.β. ενώ σε συνθήκες OLEmax τα φύλλα του Νοεμβρίου με συγκέντρωση 4,95 mg/g ξ.β. Η ελαιοευρωπαϊνή ανιχνεύτηκε μόνο σε συνθήκες OLEmax με μέγιστη συγκέντρωση 30,01 mg/g ξ.β. στα φύλλα Δεκεμβρίου. Μέγιστη ποσότητα ελαιοκανθάλης σε συνθήκες TPCmax εμφάνισαν τα φύλλα του Νοεμβρίου 9,53 mg/g ξ.β. ενώ σε συνθήκες OLEmax τα φύλλα του Δεκεμβρίου με συγκέντρωση 8,77 mg/g ξ.β.
- Στις ποικιλίες «Θιάκη» , «Κορωνέικη» , «Κουτσοурέλια» , «Λευκοελιές Σερρών» , «Μαστοειδής», «Μαυροελιά Μεσσηνίας» και «Τραγολιά» που τα φύλλα τους συλλέχθηκαν σε δύο διαφορετικού μήνες Ιούλιο και Οκτώβριο η μοναδική φαινολική ουσία που εμφανίστηκε ήταν η τυροσόλη σε συνθήκες TPCmax και τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στα φύλλα που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο με μέγιστη συγκέντρωση 2,93 mg/g ξ.β. στη ποικιλία «Θιάκη». Σε συνθήκες OLEmax, οι φαινολικές ουσίες που ανιχνεύτηκαν ήταν η τυροσόλη και η ελαιοκανθάλη. Σε αυτές τις συνθήκες εκχύλισης , τα υψηλότερα επίπεδα τυροσόλης βρέθηκαν στις ποικιλίες που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο με όλες τις ποικιλίες να έχουν παρόμοια συγκέντρωση και φαινολική ουσία ελαιοκανθάλη ανιχνεύτηκε μόνο στις ποικιλίες «Κορωνέικη» και «Μαυροελιά Μεσσηνίας» που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο με συγκέντρωση 1,27 και 1,37 mg/g ξ.β. αντίστοιχα.
- Σε συνθήκες TPCmax η τυροσόλη ήταν η μοναδική ουσία που ανιχνεύτηκε στα «νεαρά» φύλλα ενώ στα «ώριμα» φύλλα ανιχνεύτηκαν οι φαινολικές ουσίες: υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, σιναπικό οξύ, ελαιοευρωπαϊνή και ελαιοκανθάλη. Σε συνθήκες OLEmax η τυροσόλη ήταν ξανά η μοναδική ουσία που ανιχνεύτηκε στα «νεαρά» φύλλα ενώ στα «ώριμα» φύλλα ανιχνεύτηκαν μόνο οι φαινολικές ουσίες ελαιοκανθάλη και υδροξυτυροσόλη.

## 1.2 2<sup>ο</sup> πείραμα

Στα πλαίσια του πρώτου πειράματος διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένα δείγματα ανιχνεύτηκε ποσότητα ελαιοκανθάλης. Έτσι πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης του πρώτου πειράματος για εξαγωγή μέγιστου συνολικού φαινολικού περιεχομένου και μέγιστης συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης αλλάζοντας κάθε φορά έναν από τους δύο βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία και κρατώντας τον άλλον σταθερό.

Διαπιστώθηκε ότι στους 30°C ήταν η καλύτερη απόδοση του συνολικού φαινολικού φορτίου και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης αφού σε συνθήκες αραίωσης με 250ml απιονισμένου νερού το συνολικό φαινολικό φορτίο ήταν 20,58 mg/g ξ.β. και η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης ήταν 7,01 mg/g ξ.β. και σε συνθήκες αραίωσης με 300ml απιονισμένου νερού η συγκέντρωση συνολικού φαινολικού φορτίου ήταν 14,31 mg/g ξ.β. και η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης 1,02 mg/g ξ.β..

Στη συνέχεια , διατηρώντας της θερμοκρασία 30°C και μεταβάλλοντας της ποσότητα του θεικού οξέος από 100μl έως 1500 μl παρατηρήθηκε ότι :

- Από μία ποσότητα και πάνω του θεικού οξέος υπάρχει αύξηση της ελαιοκανθάλης. Σε συνθήκες αραίωσης με 250ml απιονισμένο νερό , εμφανίστηκε ποσότητα ελαιοκανθάλης όταν η ποσότητα θεικού οξέος ήταν από 1000μl έως 1500 μl ( 2,99 mg/g ξ.β και 22,65 mg/g ξ.β αντίστοιχα) και σε συνθήκες αραίωσης 300ml απιονισμένου νερού όταν η ποσότητα του θεικού οξέος ήταν από 900 μl έως 1500μl ( 4,24 mg/g ξ.β και 19,41 mg/g ξ.β αντίστοιχα ).
- Η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης αυξάνεται γραμμικά σε συνάρτηση με το θεικό οξύ στο εύρος από 100 μl έως 1000μl θεικού οξέος και σε συνθήκες αραίωσης 250ml απιονισμένου νερού αφού το  $R^2=0,938$ . Σε συνθήκες αραίωσης 300ml παρατηρήθηκε επίσης γραμμική συσχέτιση της υδροξυτυροσόλης με το θεικό οξύ στο εύρος 100 μl έως 1000μl θεικού οξέος με  $R^2=0,9023$ .

## Ε. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΜΕΛΛΟΝ

Σαν συνέχιση της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας θα προτείνουμε τα εξής:

- Μελέτη και ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού φαινολικών συστατικών με σκοπό τη παραλαβή καθαρών ουσιων.

- Μελέτη σχετικά με τη περαιτέρω αξιοποίηση των μελετηθέντων φαινολικών συστατικών.
- Τα εκχυλίσματα που έχουμε παραλάβει να χρησιμοποιηθούν σε διάφορα προϊόντα, καλλυντικά, τροφίμα καθώς και σε συμπληρώματα διατροφής, καθώς έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής των προϊόντων λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης.
- Ολοκλήρωση της μελέτης βελτιστοποίησης της εκχύλισης για μέγιστη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης μελετώντας και το παράγοντα αναλογία όγκου-νερού προς ξηρό βάρος πρώτης ύλης.

## Z.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbasi H., Rezaei K., Rashidi L. (2008a). Extraction of essential oil from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 83-89.)

Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V.; Gangia, S., D'Orazio, N., Abraham, N.G., Vanella, L., (2012). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int. J. Oncol.*, 41, 31–38.

Ahmad-Qasem, M. H., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Mulet, A., Garcia-Perez, J. V. (2013). Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, 50, 189-196.

Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition and Metabolism*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>

Alexandri, M., Papapostolou, H., Vlysidis, A., Gardeli, C., Komaitis, M., Papanikolaou, S., & Koutinas, A. A. (2016). Extraction of phenolic compounds and succinic acid production from spent sulphite liquor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(January), 2751–2760.

Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C.-H., Smith, A. B., Breslin, P. A. S., (2005). *Nature*, 437, 45–46.

Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. (1991) Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35 (2), 123-

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Río, J. A., (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chem*, 68(4): 457-62.

Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P. G., & Ferguson, L. R. (2016). Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients*, 8(8).

Bouaziz, M., Feki, I., Ayadi, M., Jemai, H., & Sayadi, S. (2010). Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 894–905.

Brahmi, Mechri, B. , Dhibi, M. ., Hammami ,M. (2014). Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 ,169-178

Cayuela, J.A., Rada, M., Rios, J.J., Albi, T., & Guinda, A. (2006). Changes in phenolic composition induced by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* infection in olive tree : presence of large amounts of verbascoside in nodules of tuberculosis disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5363–5368.

Charalambous, M. P., Lightfoot, T., Speirs, V., Horgan, K., Gooderham, N. J. Br. J. ,(2009). *Cancer*, 101, 106–115.

Delgado-Pertíñez ,M., Gómez-Cabrera, A., Garrido ,A., (2000). Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Anim Feed Sci Technol*, 87(3-4): 187-201. .

Di Giovacchino L (2000) In: Hardwood J, Aparicio R (eds) *Technological aspects. Handbook of olive oil. Analysis and properties*. Aspen Publications, pp 17–59

Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S. E., & Abdel-Massih, R. M. (2011). The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 58-63.

Goldsmith, C.D., Vuong, Q.V., Sadeqzadeh, E., Stathopoulos, C.E., Roach, P.D., Scarlett, C.J. ,(2015). Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells. *Molecules*, 20, 12992–3004.

Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A. N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., et al., (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 600-608.

Grigonis, D., Venskutonis, P., Sivik, B., Sandahl, M., & Eskilsson, C.(2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass. *The Journal of Supercritical Fluids*, 33, 223-233.

Ilarioni, L., Proietti, P.,(2014). Olive tree cultivars. In *The Extra Virgin Olive Oil Handbook*, Peri, C., Ed.; Wiley:Hoboken, NJ, USA,

International Olive Council (IOC). *World Catalogue of Olive Varieties*; IOC: Madrid, Spain, 2000.

Islam, M. N., Jo, Y. T., Jung, S. K., & Park, J. H. (2013). Thermodynamic and kinetic study for subcritical water extraction of PAHs. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(1), 129–136.

Japon-Lujan R, Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD(2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *J Chromatogr A*. 1108: 76–82.

Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., & Crowther, J. C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(1), 1–26.

Khalatbary AR, Zarrinjoei GR., (2012)Anti-Inflammatory Effect of Oleuropein in Experimental Rat Spinal Cord Trauma. *Iran Red Crescent Med J* ,14(4): 229-34

Kiritsakis P (1998) Olive oil. From the Tree to the Table, 2<sup>nd</sup>

Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., & Nakamura, M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9159–9164. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9159>

Kontogianni ,VG, Charisiadis ,P., Margianni, E., Lamari ,F.N., Gerothanassis ,IP., Tzakos ,AG.,(2013). Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. *J Med Food*,16 (9): 817–22.

Kostelenos, G.(2011). Elements of Olive Cultivation: History, Description, Distribution of Olive Cultivars in Greece,Embryo Publications: Athens, Greece

Lamprou, G. K., Vlysidis, A., Tzathas, K., & Vlyssides, A. G. (2020). Statistical optimization and kinetic analysis of the extraction of phenolic compounds from olive leaves. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(2), 457–465.

Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A., Valcárcel, M., (1998).Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves.*Talanta*, 46, 1123-1130.

Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., & Karabourniotis, G. (2006). Trichome layers versus dehaired lamina of *Olea europaea* leaves: differences in flavonoid distribution, UVabsorbing capacity, and wax yield. *Environmental and Experimental Botany*, 55,294–304.

Loukas M, Krimbas CM (1983) History of olive cultivars based on their genetic distances. *J Hort Sci* 58:121

Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E., (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369, 1-10

Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383–2389.

Markakis, E.A. , Tjamos, S.E. , Antoniou, P.P. , Roussos, P.A, Paplomatas, E.J. , Tjamos E.C. (2010). Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. *The American Phytopathology Society*, 94 , 1156-1162

Markham, K.R. ,Ryan, K.G., Gould, K.S., Rickards, G.K. (2000a). Cell wall sited flavonoids in *Lisianthus* flower colouration. *Phytochemistry*, 55:327-336.

Martinez, J. L., (2007).Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. CRC Pres.

Martín-García AI, Molina-Alcaide E.,(2008) Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Anim Feed Sci Technol*, 29,142-317.

Medina, E., de Castro, A., Romero, C., Brenes, M. J., (2006).*Agric. Food Chem.*, 54, 4954–4961.

Mira, L. , Ferandez , M.T. , Santos , M. ,Rocha , R. , Florencio , M.H. , Jennings , K.R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical Research*, 36,1199-1208.

Natella, F.,Nardini , M. , di Felice , M. , Scaccini , C. , (1999). Benzoic and Cinnamic acid derivates as antioxidants : structure-activity relation. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* , 47,1453-1459.

Nekooeian ,AA, Khalili ,A., Khosravi ,MB,(2014). Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. *Indian J Pharmacol*,46(4),398-403..

Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., (2004). Introduction in Olive-Mill waste management. Literature Review and Patent SurveyAthens: Typothito

Qosa, H., Batarseh, Y. S., Mohyeldin, M. M., El Sayed, K. A., Keller, J. N., Kaddoumi, A., (2015).*ACS Chem. Neurosci*, 6, 1849–1859.

Ortega-García, F., & Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase,polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv.Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1565–1573.

Papoti, V.T., Tsimidou, M.Z. (2009a). Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3470–3477

Parkinson, L., & Keast, R. (2014). Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12323–12334. <https://doi.org/10.3390/ijms150712323>

Perez-Serradilla, J. A., Luque de Castro, M. D. (2011). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124, 1652-1659.

Petridis, A., Therios, I., & Samouris, G. (2012). Genotypic variation of total phenol and Oleuropein concentration and antioxidant activity of 11 Greek olive cultivars (*Olea Europaea* L.). *HortScience*, 47(3), 339–342.

Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., & Tananaki, C. (2012). Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany*, 79, 37–43.

Prior L.,Cao G. (1999). In vivo total capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. 27:,1173-1181.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich,K.(2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53(10),4290-4309.

Rahioui, B., Zine El Aabidine, A., Baissac, Y., El Boustani, E., Khadari, B., Jay-Allemand, C., & El Modafar, C. (2009). Phenolic compounds of olive tree leaves and their relationship with the resistance to the leaf-spot disease caused by *Spillocaea oleaginea*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5, 204–214.

Rahmanian Neda.,Jafari, S.M., Wani T.A., (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 42, 150-172

Ranalli, S. Contento, L. Lucera, M. Di Febo, D. Marchegiani, V. Di Fonzo (2006) Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 434-440

Robbin,R.J. (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,51,2866-2887

Ryan, D. , Robards , K., Lavee , S. , (1999). Changes in the phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology* , 34: 265-274.

Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. (2003) Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar. *Hardy's Mammoth. J. Agric. Food Chem.*,51, 2532-2538.

Santiago-Mora R, Casado-Diaz A, De Castro MD, Quesa-da-Gomez JM. , (2011).Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int.*; 22(2), 675–84.

Sharif, K. M., Rahman, M. M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M. H. A., Sahena, F., et al. (2014). Experimental design of supercritical fluid extraction e a review. *Journal of Food Engineering*, 124, 105-116.

Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R., (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiationsda review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-3.

Souilem S., Fki I, Kobayashi I, Khalid N, NevesMA, IsodaH et al., (2017). Emerging technologies for Recovery of value-added components from olive leaves and their applications in food/feed industries. *Food Bioprocess Technol* 10,229–248



Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Moccetti, T., et al., (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18: 251-8.

Tabera, J., Guinda, A., Ruiz-Rodríguez, A., Senorans, F. J., Ibanez, E., Albi, T., et al., (2004). Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4774-4779.

Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92–108.

Tubeileh, A., Bruggeman, A., Turkelboom, F., (2008). Effect of water harvesting on growth of young olive trees in degraded Syrian dryland. *Environment, Development and Sustainability*, 11, 1073-1090.

Urquiaga, I. & Leighton, F. (2000) Plant Polyphenol Antioxidant and Oxidative Stress. *Biological Research*, 33(2), 55-64

Vlyssides, A., Mai, S., Barabouti, M. E. (2016) Industrial pollution

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. L. (2014). Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 122, 323–330