



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της επίδρασης βιοδραστικών συστατικών του εξαιρετικού παρθένου  
ελαιολάδου στον σχηματισμό  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων

**Δήμητρα Ι. Λιακούτσου**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ**

**2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της επίδρασης βιοδραστικών συστατικών του εξαιρετικού παρθένου  
ελαιολάδου στον σχηματισμό  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων

"Study of the effect of extra virgin olive oil bioactive compounds on the formation  
of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds"

**Δήμητρα Ι. Λιακούτσου**

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μαρία Καγοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Μελέτη της επίδρασης βιοδραστικών συστατικών του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου στον σχηματισμό α-δικαρβονυλικών ενώσεων**

*ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία*

*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου*

*Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων*

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) αποτελεί θεμέλιο λίθο της Μεσογειακής διατροφής. Η κατανάλωση του στα πλαίσια μιας ισορροπημένης διατροφής έχει συνδεθεί άρρηκτα με τη πρόληψη χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών. Οι ευεργετικές ιδιότητες του EVOO οφείλονται στη μοναδική χημική του σύσταση και ιδιαίτερα στα βιοδραστικά του συστατικά, όπως οι βιοφαινόλες και η βιταμίνη E. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται και στη μελέτη πτητικών συστατικών του ελαιόλαδου που παράγονται κατά τη διάρκεια θερμικών διεργασιών, όπως το μαγείρεμα. Οι ενώσεις αυτές εξετάζονται ως προς τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα αλλά και την τοξικότητα τους. Ανάμεσά τους, περιλαμβάνονται οι α-δικαρβονυλικές ενώσεις και πιο συγκεκριμένα η γλυοξάλη, η μεθυλογλυοξάλη και το διακετύλιο που έχουν συνδεθεί με υψηλά επίπεδα τοξικότητας στο αναπνευστικό σύστημα. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των α-δικαρβονυλικών ενώσεων (GO, MGO, DA) που σχηματίζονται στον υπερκείμενο χώρο εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου. Παράλληλα, προσδιορίστηκε μέσω της δοκιμής Folin-Ciocalteu το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των ελαιολάδων το οποίο εκφράστηκε ως mg GAE/Kg ελαιόλαδου με σκοπό να εξεταστεί η επίδρασή του στη δημιουργία των α-δικαρβονυλικών ενώσεων.

Είκοσι δείγματα μονοποικιλιακών EVOOs προερχόμενα από διαφορετικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές υποβλήθηκαν σε διαδικασία επιταχυνόμενης οξειδωσης και αναλύθηκαν ως προς την % περιεκτικότητα σε GO, MGO και DA. Το διακετύλιο ήταν η κυρίαρχη α-δικαρβονυλική ένωση σε όλα τα δείγματα έχοντας μέση τιμή επί τοις % περιεκτικότητας 87,23%, με τη μεθυλογλυοξάλη και τη γλυοξάλη να ακολουθούν σε ποσοστά 7,53% και 5,23%, αντίστοιχα. Στα υπό μελέτη δείγματα η υψηλότερη τιμή διακετυλίου ήταν 98,83% και αφορούσε δείγμα προερχόμενο από την Μεσσηνία, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό (0,40%) ανιχνεύτηκε σε δείγμα της ίδιας περιοχής και αφορούσε τη γλυοξάλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του ολικού πολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των EVOOs μέσω της δοκιμής Folin-Ciocalteu. Η αποθήκευση του ελαιολάδου 12 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκουρόχρωμους περιέκτες και απουσία οξυγόνου διαπιστώθηκε ότι επηρέασε το TPC των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές TPC συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες του προηγούμενου έτους, όπου και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση μεταξύ των μέσων τιμών τους παρά τις προσεκτικές συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση

του παράγοντα TPC στη δημιουργία  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε συνθήκες έντονης θερμικής επεξεργασίας (150 °C, 1h). Τα ευρήματα παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ των χαμηλών τιμών TPC και της παραγωγής των ενώσεων γλυοξάλη και μεθυλογλυοξάλη. Επομένως, όσο μικρότερο είναι το TPC στο εκάστοτε ελαιόλαδο, τόσο αυξάνεται ο σχηματισμός GO και MGO.

**Επιστημονική περιοχή:** Ανάλυση ελαιολάδου

**Λέξεις κλειδιά:** Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο (EVOO), Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (TPC), Folin-Ciocalteu, γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη, διακέτυλιο, GC-NPD

## **Study of the effect of extra virgin olive oil bioactive compounds on the formation of $\alpha$ -dicarbonyl compounds**

*MSc Food, Nutrition and Health*

*Department of Food Science and Human Nutrition*

*Laboratory of Chemistry and Food Analysis*

### **ABSTRACT**

Extra virgin olive oil (EVOO) is one of the most fundamental nutritional components of Mediterranean Diet (MED). The prevention of chronic and degenerate diseases has linked with the consumption of olive oil as a part of a healthy diet. These beneficial properties are attributed to its unique chemical composition and especially in the presence of phenolic compounds and Vitamin E. However, many recent studies have been conducted to evaluate the production of volatile compounds in olive oil, during thermal processes, like cooking, roasting and frying. These chemicals have been investigated from many different viewpoints, including flavor, taste, antioxidant properties, as well as from the perspective of toxicity associated with various diseases. Among these volatile compounds formed in cooked foods, low molecular weight carbonyl compounds such as glyoxal, methylglyoxal and diacetyl are accused of causing adverse effects to humans. In the present study, vapor phase glyoxal, methylglyoxal and diacetyl formed from heated EVOOs were analyzed by GC-NPD. Additionally, the total phenolic content of the samples was determined using Folin-Ciocalteu assay. Lastly, it has been evaluated the effect of TPC on the formation of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds.

Twenty different monovarietal EVOOs originated from three regions of Greece (Peloponnese, Crete, and Lesvos) were analyzed by GC-NPD after they were derivatized into a corresponding quinoxaline. Among the carbonyl compounds, diacetyl was formed from olive oil samples at the highest levels (87,23%) followed by methylglyoxal (7,53%) and glyoxal (5,23%). A Messinian sample produced the greatest amount of diacetyl (98,83%), while the same sample produced the lowest amount of glyoxal (0,40%). In addition, the total phenolic content (TPC) of the samples was determined using Folin-Ciocalteu assay and results are expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per Kg of olive oil. A significant reduction in TPC was reported after 12 months of storage under room temperature and lack of oxygen conditions. More specifically, the TPC values were compared with those of the previous year, where a statistically significant decrease was observed between their average values despite the careful storage conditions of the samples. Finally, it has been evaluated the effect of TPC on the formation of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds under simulated cooking conditions (150 °C, 1h). The results exhibited a negative correlation between the lowest TPC values and the production of glyoxal and methylglyoxal. Consequently, the lowest TPC in EVOOs samples, the highest the formation of GO and MGO in those samples.

**Scientific area:** Olive oil analysis

**Keywords:** Extra Virgin Olive Oil (EVOO), Total Phenolic Content (TPC), Folin-Ciocalteu, glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, GC-NPD

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω όλους όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωση της εν προκειμένω μελέτης, ενώ νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω και τους ανθρώπους εκείνους που με ενθάρρυναν και με υποστήριζαν ηθικά κατά τη διεξαγωγή της.

Καταρχάς, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα **Χρυσανγή Γαρδέλη**, για το ενδιαφέρον και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της στην επιμέλεια συγγραφής αυτής της μελέτης. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. **Αθανάσιο Μαλλούχο** για την παροχή των γνώσεων και συμβουλών του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και την Καθηγήτρια κα. **Μαρία Καψοκεφάλου**, η οποία ως μέλος της τριμελούς επιτροπής δέχτηκε να αξιολογήσει την παρούσα εργασία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την *υποψήφια Διδάκτορα Θεανώ Μικρού* για την αμέριστη βοήθειά της κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας τόσο για τις χρήσιμες οδηγίες της όσον αφορά το πειραματικό μέρος όσο και για την εν γένει άψογη συνεργασία μας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τη συνεργάτιδά μου Κωνσταντίνα Βαρδακά, όπως επίσης και την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - Το Ελαιόλαδο.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ποιοτικές Κατηγορίες Ελαιολάδου.....	1
1.2 Χημική Σύσταση Ελαιολάδου.....	3
1.2.1 Σαπωνοποιήσιμο Κλάσμα Ελαιολάδου .....	4
1.2.2 Ασαπωνοποίητο Κλάσμα Ελαιολάδου .....	6
1.3 Επίδραση του Ελαιολάδου στην Υγεία .....	10
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Η Οξειδωση των Λιπιδίων.....</b>	<b>11</b>
2.1 Κύριες Αλλοιώσεις του Ελαιολάδου .....	11
2.1.1 Οξειδωση Λιπιδίων.....	11
2.1.2 Μηχανισμός Αυτοοξειδωσης.....	12
2.1.3 Προϊόντα Διάσπασης των υπεροξειδίων .....	13
2.2 Σχηματισμός α-δικαρβονυλικών ενώσεων (α-DCs).....	15
2.2.1 Γλυοξάλη.....	15
2.2.2 Μεθυλολογλυοξάλη.....	17
2.2.3 Διακετύλιο .....	18
2.3 Προϊόντα Προηγμένης Γλυκοζυλίωσης (AGEs) & Λιποοξειδωσης (ALEs).....	20
2.4 Κατηγορίες Διάκρισης των AGEs/ALEs.....	21
2.5 AGEs στα Τρόφιμα .....	22
2.6 Επίδραση και ρόλος των ALEs στην εμφάνιση ασθενειών και γήρανσης.....	23
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Τεχνικές Ανάλυσης των α-δικαρβονυλικών ενώσεων.....</b>	<b>23</b>
3.1 Παραγωγή α-δικαρβονυλικών ενώσεων.....	23
3.2 Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης.....	25
3.3 Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	25
<b>ΣΚΟΠΟΣ .....</b>	<b>27</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>28</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Μεθοδολογία Πειραμάτων .....</b>	<b>28</b>
4.1 Υλικά και Μέθοδοι .....	28
4.1.1 Δείγματα Ελαιολάδου.....	28
4.2 Προσδιορισμός των α-δικαρβονυλικών ενώσεων (α-DCs).....	29
4.2.1 Υλικά και Αναλώσιμα .....	29



4.2.2	Αντιδραστήρια και πρώτες ύλες.....	29
4.2.3	Όργανα - Συσκευές.....	29
4.2.4	Προετοιμασία διαλυμάτων παρακαταθήκης και εργασίας.....	30
4.2.5	Θερμοξείδωση ελαιολάδων και σύνθεση παραγώγων κινοξαλίνης.....	31
4.2.6	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κινοξαλινών .....	33
4.2.7	Προσδιορισμός παραγώγων κινοξαλίνης με αέρια χρωματογραφία .....	34
4.2.8	Υπολογισμός της % περιεκτικότητας των α-DCs.....	35
4.3	Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu.....	35
4.3.1	Υλικά και Αναλώσιμα .....	36
4.3.2	Αντιδραστήρια.....	36
4.3.3	Όργανα - Συσκευές.....	36
4.3.4	Παρασκευή διαλυμάτων και προτύπων .....	37
4.3.5	Δοκιμή Folin-Ciocalteu.....	37
4.3.6	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.....	38
4.3.7	Υπολογισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	39
4.3.8	Στατιστική επεξεργασία.....	39
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - Αποτελέσματα και Συζήτηση .....</b>	<b>40</b>
5.1	Ποσοτικός προσδιορισμός των α-DCs σε EVOOs .....	40
5.1.1	Ποσοτικός προσδιορισμός των α-DCs σε EVOOs και γεωγραφική προέλευση .	42
5.2	Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε EVOOs .....	44
5.2.1	Στατιστικός έλεγχος υποθέσεων .....	47
5.3	Μελέτη της επίδρασης του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στη παραγωγή α-DCs εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων.....	49
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - Συμπεράσματα .....</b>	<b>56</b>
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 - Βιβλιογραφία .....</b>	<b>57</b>
	<b>Παράρτημα.....</b>	<b>64</b>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – Το Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο είναι το έλαιο που παράγεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς (*Olea europaea* L.). Στην πραγματικότητα, τα πρώτα καλλιεργημένα δέντρα ελιάς χρονολογούνται πριν 6000 χρόνια στις περιοχές της Μικράς Ασίας σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC) (Román et al., 2019). Οι μεσογειακές χώρες αποτελούν τους κύριους παραγωγούς ελιάς (70% της παγκόσμιας παραγωγής), με τις Ισπανία, Ιταλία και Ελλάδα να ηγούνται εξ αυτών, εξασφαλίζοντας ως εκ τούτου κοινωνικά και οικονομικά οφέλη. Ωστόσο, σήμερα η καλλιέργειά της έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως σε περιοχές όλων των ηπείρων, εκτός της Ανταρκτικής (Jimenez-Lopez et al., 2020).

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή λίπους στη Μεσογειακή κουζίνα, προσδίδοντας μοναδικά διατροφικά οφέλη (Conas et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, το EVOO έχει χαρακτηριστεί ως λειτουργικό τρόφιμο με πολλά από τα συστατικά του να συμβάλλουν στη βιολογική του δράση. Οι ευεργετικές ιδιότητές του αρχικά αποδόθηκαν στην υψηλή περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) αλλά πρόσφατα, το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου. Αυτό το κλάσμα, που αντιστοιχεί στο ~ 1% του ελαιολάδου, αποτελείται κυρίως από πολυφαινόλες, τοκοφερόλες, στερόλες, χρωστικές ουσίες και πτητικές ενώσεις (Conas et al., 2007; Jimenez-Lopez et al., 2020; Navajas-Porrás et al., 2020).

Το ελαιόλαδο, που έχει χαρακτηριστεί και από τον Όμηρο ως «υγρός χρυσός», σημείωσε αύξηση στη δημοτικότητά του λόγω των προστατευτικών ιδιοτήτων του έναντι μιας πληθώρας ασθενειών. Παράλληλα διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα εδώδιμα έλαια λόγω του μοναδικού αρώματος και της εκλεπτυσμένης γεύσης, χαρακτηριστικά που οφείλονται στις πτητικές και φαινολικές του ενώσεις (Navajas-Porrás et al., 2020). Επομένως, τα τελευταία χρόνια, η αυξανόμενη ζήτηση του EVOO δεν αποδίδεται μόνο στις βιολογικές του ιδιότητες, αλλά και στην οξειδωτική σταθερότητα και στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που διαθέτει.

#### 1.1 Ποιοτικές Κατηγορίες Ελαιολάδου

Το τυποποιημένο ελαιόλαδο, διατίθεται στο εμπόριο στις παρακάτω βασικές ποιοτικές κατηγορίες, οι οποίες σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC) και τον Κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης Νο 1234/2007 είναι οι εξής (Council of the European Union, 2007; Mariotti, 2014; Jimenez-Lopez et al., 2020):

## A) Παρθένο Ελαιόλαδο (Virgin Olive Oil):

Έλαιο που λαμβάνεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους και κάτω από συνθήκες, ιδίως θερμικές, που δεν προκαλούν αλλοιώσεις στην ποιότητα και τη φυσική σύνθεσή του. Το παρθένο ελαιόλαδο δεν έχει υποστεί άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης. Στην κατηγορία αυτή δεν περιλαμβάνονται τα έλαια που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης, ούτε τα μίγματα με έλαια άλλης φύσης. Τα ελαιόλαδα αυτά ανάλογα με την οξύτητα και τα άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες:

### 1) Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο (Extra Virgin Olive Oil):

Πρόκειται για το καλύτερο σε ποιότητα λάδι. Διακρίνεται για τις άριστες οργανοληπτικές του ιδιότητες, καθώς διαθέτει εξαιρετικό άρωμα, χρώμα και τη χαρακτηριστική φρουτώδη γεύση του, με το βαθμό οργανοληπτικής του αξιολόγησης να είναι ίσος ή ανώτερος του 6,5 (Román et al., 2019). Η κατά την ορολογία της ΕΕ, "διάμεση τιμή του ελαττώματος, Md" στην οργανοληπτική αξιολόγηση είναι μηδέν, ενώ η "διάμεση τιμή του φρουτώδους, Mf" είναι μεγαλύτερη του μηδενός. Επιπλέον, η περιεκτικότητα του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,8 g ανά 100 g ελαιολάδου (οξύτητα: 0-0,8%), ενώ τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή (<https://eur-lex.europa.eu/><sup>[1]</sup>).

### 2) Παρθένο Ελαιόλαδο (Virgin Olive Oil):

Διαφοροποιείται από το εξαιρετικό παρθένο, όχι μόνο ως προς τον βαθμό οξύτητας, αλλά και γευστικά, διατηρώντας ωστόσο καλή γεύση και οσμή, με τον βαθμό οργανοληπτικής αξιολόγησης να είναι ίσος ή ανώτερος του 5,5. Η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 2 g ανά 100 g ελαιολάδου (οξύτητα: 0,8–2%), ενώ τα λοιπά χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. Στο στάδιο της παραγωγής και του χονδρικού εμπορίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο όρος "εκλεκτό" ή "φίνο".

### 3) Ελαιόλαδο Λαμπαντέ (Virgin Olive Oil Lampante):

Παρθένο ελαιόλαδο ακατάλληλο για κατανάλωση με κακή γεύση και οσμή. Η περιεκτικότητά του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, υπερβαίνει τα 2,0 g ανά 100 g ελαιολάδου (2%) και τα λοιπά χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. Ο τύπος αυτός του ελαιολάδου προορίζεται μόνο για ραφινάρισμα ή βιομηχανική χρήση.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό της ΕΕ 1989/03, η παραπάνω ονομασία αποτελεί συγχώνευση των δύο παλαιότερων κατηγοριών "**κοινό παρθένο ελαιόλαδο**" και "**μειονεκτικό**

**παρθένο ελαιόλαδο"**, οι οποίες και καταργήθηκαν με ισχύ από 01.11.2003 (<https://eur-lex.europa.eu/><sup>[2]</sup>).

#### **B) Εξευγενισμένο ή Ραφιναρισμένο Ελαιόλαδο (Refined olive oil):**

Είναι το ελαιόλαδο που παραλαμβάνεται από παρθένα ελαιόλαδα με μεθόδους εξευγενισμού (ραφινάρισμα) χωρίς να προκληθούν αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων. Πρόκειται για ένα σχεδόν άγευστο λάδι, χωρίς οσμή και με διαυγές ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Η ελεύθερη οξύτητά του, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g (μέγιστη 0,3%) και τα λοιπά χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. Ο εξευγενισμός περιλαμβάνει αποχρωματισμό, απόσμιση, υδρογόνωση, εξουδετέρωση και λοιπές χημικές επεξεργασίες που οδηγούν σε υποβάθμιση των χαρακτηριστικών αυτού του ελαιολάδου σε σχέση με το παρθένο.

#### **Γ) Ελαιόλαδο αποτελούμενο από Εξευγενισμένα και Παρθένα Ελαιόλαδα:**

Είναι το ελαιόλαδο που προέρχεται από ανάμειξη παρθένου ελαιολάδου, κατάλληλου προς κατανάλωση, και εξευγενισμένου ελαιολάδου. Συνήθως χρησιμοποιούνται προσμίξεις σε διάφορες αναλογίες παρθένου και ραφιναρισμένου που δίνουν διάφορους τύπους ελαιολάδου αυτής της κατηγορίας. Έχει ευχάριστη γεύση και οσμή, μοναδικό διακριτικό άρωμα ώριμων φρούτων και φρέσκιας ελιάς, χρώμα ανοιχτό κιτρινοπράσινο. Η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1,0 g ανά 100 g (1%) και τα λοιπά χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

### **1.2 Χημική Σύσταση Ελαιολάδου**

Το ελαιόλαδο αποτελείται από κύρια και δευτερεύοντα συστατικά. Συγκεκριμένα, πρόκειται κυρίως για μίγμα τριακυλογλυκερολών, δηλαδή εστέρων της γλυκερόλης με τρία ανώτερα λιπαρά οξέα (ακόρεστα ή/και κορεσμένα, όπως το ελαϊκό, το παλμιτικό, το στεατικό και το λινελαϊκό οξύ), οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την λιπαρή αίσθηση. Εκτός από τα τριγλυκερίδια, το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο ή σχηματίζονται κατά την παραλαβή του στο ελαιοτριβείο. Σε αυτά τα συστατικά ανήκουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (προϊόντα υδρόλυσης των τριακυλογλυκερολών), οι μονο- και διακυλογλυκερόλες, τα φωσφολιπίδια, οι στερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, οι φαινόλες, οι τοκοφερόλες, οι χρωστικές, διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες καθώς και πτητικές οργανικές ενώσεις (Boskou et al., 2006).

Όπως συμβαίνει σε όλα τα φυτικά έλαια, έτσι και στο ελαιόλαδο, τα συστατικά του ταξινομούνται στο σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα κ.α) και το ασαπωνοποίητο κλάσμα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α). Το 98,0-99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο μη σαπωνοποιήσιμα (Servili et al., 2004). Αν και το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά μικρό, περιλαμβάνει περισσότερες από 230 χημικές ενώσεις που παρέχουν ανεκτίμητη συμβολή στη βιολογική και διατροφική αξία του ελαιολάδου. Επιπλέον, το ιδιαίτερο άρωμα και η γεύση του παρθένου ελαιολάδου οφείλονται στην παρουσία των πτητικών και άλλων δευτερευόντων συστατικών και όχι στην ύπαρξη των τριγλυκεριδίων, γεγονός που το διαφοροποιεί από όλα τα άλλα βρώσιμα έλαια και το κατατάσσει ως ένα από τα πιο διαδεδομένα προς κατανάλωση διεθνώς (Visioli & Galli, 1998; Mariotti, 2014; Jimenez-Lopez et al., 2020).

### **1.2.1 Σαπωνοποιήσιμο Κλάσμα Ελαιολάδου**

#### *Λιπαρά Οξέα*

Είναι οι απλούστερες μορφές λιπιδίων και χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή ενέργειας και την αποθήκευση λιπιδίων στους ιστούς. Διακρίνονται σε κορεσμένα και ακόρεστα, αναλόγως των απλών ή διπλών δεσμών που διαθέτουν στο μόριο τους. Τα λιπαρά οξέα που συναντώνται συνήθως στο παρθένο ελαιόλαδο, είτε ως ελεύθερα είτε ως δεσμευμένα στα τριγλυκερίδια, διαθέτουν αλυσίδες με 14 (μυριστικό οξύ) έως 24 (λιγνοκερικό οξύ) άτομα άνθρακα (Boskou et al., 2006). Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου συνίσταται από ακόρεστα οξέα, με το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) να απαντάται στη μεγαλύτερη αναλογία, αντιπροσωπεύοντας το 55% - 83% της συνολικής περιεκτικότητάς του σε λιπαρά οξέα (Alu'datt et al., 2017). Το δεύτερο κατά σειρά ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το λινελαϊκό (C 18:2), ενώ τα άλλα πολυακόρεστα οξέα που ακολουθούν σε αισθητά μικρότερες ποσότητες είναι το λινολενικό (C 18:3), το αραχιδονικό (C 20:4) και το παλμιτελαϊκό (C 16:1). Η σύνθεση των λιπαρών οξέων περιλαμβάνει και κορεσμένα, με το παλμιτικό (C 16:0) και το στεατικό (C 18:0) να απαντούν σε μεγαλύτερη αναλογία, ενώ σε ίχνη συναντώνται το μυριστικό (C 14:0), το εικοσανοϊκό (C 20:1) κ.α. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που συμπληρώνουν την εν λόγω σύνθεση παρουσιάζονται εκτενώς στον **Πίνακα 1**. Τα συνήθη όρια μέσα στα οποία κυμαίνεται η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε λιπαρά οξέα καθορίζονται από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC) και την επιτροπή του Codex Alimentarius.

**Πίνακας 1:** Εκατοστιαία διακύμανση της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα όπως προσδιορίζεται με αέρια χρωματογραφία σύμφωνα με το IOC και τον Codex Alimentarius.

Λιπαρό οξύ	Συντομογραφία	% (m/m μεθυλεστέρες) <sup>a</sup>	% (m/m μεθυλεστέρες) <sup>b</sup>
<b>Μυριστικό</b>	C14:0	≤ 0.03	<0.1
<b>Παλμιτικό</b>	C16:0	7.5-20.0	7.5-20.0
<b>Παλμιτελαϊκό</b>	C16:1	0.3-3.5	0.3-3.5
<b>Δεκαεπτανοϊκό</b>	C17:0	≤ 0.4	<0.5
<b>Δεκαεπτενοϊκό</b>	C17:1	≤ 0.6	<0.6
<b>Στεατικό</b>	C18:0	0.5-5.0	0.5-5.0
<b>Ελαϊκό</b>	C18:1	55.0-83.0	55.0-83.0
<b>Λινελαϊκό</b>	C18:2	2.5-21.0	3.5-21.0
<b>Λινολενικό</b>	C18:3	≤ 1.0	<1.5
<b>Αραχιδικό</b>	C20:0	≤ 0.6	<0.8
<b>Εικοσενοϊκό</b>	C20:1	≤ 0.5	-
<b>Βεχενικό</b>	C22:0	≤ 0.2	<0.3
<b>Λιγνοκηρικό</b>	C24:0	≤ 0.2	<1.0

a=IOC (2019), b=Codex Alimentarius (2003)

Το IOC εισάγει επίσης όρια για τα trans λιπαρά οξέα σε κάθε εμπορική κατηγορία. Όσον αφορά τα βρώσιμα παρθένα ελαιόλαδα, μπορεί να εμφανιστούν ίχνη γεωμετρικών ισομερών, όπως είναι το ελαϊκό (C 18:1 trans), το λινελαϊκό (C 18:2 trans) και το λινολενικό οξύ (C18:3 trans). Τα όρια για το C 18:1t καθώς και για το άθροισμα των C 18:2t και C 18:3t είναι εξαιρετικά χαμηλά (≤ 0,05% σε κάθε περίπτωση) (IOC, 2019).

Η σύνθεση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα διαφέρει από δείγμα σε δείγμα καθώς επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η ποικιλία της ελιάς, ο τόπος παραγωγής, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, ο βαθμός ωρίμανσης του ελαιοκάρπου, οι καλλιεργητικές πρακτικές και ο χρόνος συγκομιδής (Aparicio & Luna, 2002; Boskou et al., 2006). Παραδείγματος χάριν, έχει βρεθεί πως τα ελληνικά, ιταλικά και ισπανικά ελαιόλαδα εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και χαμηλή σε λινελαϊκό και παλμιτικό οξύ. Αντιθέτως, τα ελαιόλαδα της

Τυνησίας έχουν χαμηλό ποσοστό ελαϊκού οξέος και υψηλότερες ποσότητες λινελαϊκού και παλμιτικού οξέος (Boskou et al., 2006).

#### *Τριακυλογλυκερόλες (TAGs)*

Λόγω της ύπαρξης πληθώρας λιπαρών οξέων, οι δυνατοί συνδυασμοί που μπορεί να προκύψουν κατά την τυχαία ένωση αυτών με τα μόρια γλυκερόλης είναι πολυάριθμοι, με αποτέλεσμα και τα είδη των τριακυλογλυκερολών που υφίστανται να είναι εξαιρετικά πολλά. Ωστόσο, όσον αφορά το ελαιόλαδο, η κύρια τριακυλογλυκερόλη που ανιχνεύεται σε αυτό είναι η OOO και αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ του συνολικού κλάσματος τριακυλογλυκερολών (40-59 %). Άλλες TAGs που συναντώνται σε σημαντική ποσότητα στο ελαιόλαδο είναι οι POO (12-20 %), OOL (12,5-20 %), POL (5,5-7 %) και SOO (3-7 %), ενώ σε μικροποσότητες έχουν ανιχνευτεί και οι POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO and LLL (όπου O=ελαϊκό οξύ, P=παλμιτικό οξύ, S=στεατικό οξύ, L=λινελαϊκό οξύ, Ln=λινολενικό οξύ) (Aranda et al., 2004; Boskou et al., 2006).

#### *Μονο- και διακυλογλυκερόλες*

Μονοακυλογλυκερόλες και διακυλογλυκερόλες έχουν ανιχνευθεί σε παρθένο ελαιόλαδο σε συγκεντρώσεις 0,25 και 1–2,8%, αντίστοιχα (Alu'datt et al., 2017; Boskou et al., 2006). Η παρουσία των παραπάνω οφείλεται είτε σε ατελή βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών είτε σε υδρολυτικές αντιδράσεις κατά τη συλλογή του ελαιοκάρπου, την παραγωγή ή την αποθήκευση του ελαίου.

#### *Φωσφολιπίδια*

Το παρθένο ελαιόλαδο θεωρείται φτωχό σε φωσφολιπίδια, τα οποία προέρχονται κατά κύριο λόγο από τον πυρήνα του ελαιοκάρπου. Οι κυριότερες ενώσεις της κατηγορίας είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη), η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (κεφαλίνη), η φωσφατιδυλοϊνσιτόλη και η φωσφατιδυλοσερίνη. Σημαντική είναι η αντιοξειδωτική καθώς και η συνεργιστική δράση που εμφανίζουν με τις τοκοφερόλες και άλλες φαινόλες. Ωστόσο, η ακριβής συμβολή των φωσφολιπιδίων στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί και η πιθανή ανάπτυξη αφρισμού και σκούρας χρώσης του ελαίου κατά το τηγάνισμα, όταν τα φωσφολιπίδια απαντώνται σε υψηλά επίπεδα (Pokorny et al., 2001; Boskou et al., 2006; Román et al., 2019).

### **1.2.2 Ασαπωνοποίητο Κλάσμα Ελαιολάδου**

Η ποσότητα και η σύσταση του κλάσματος των ασαπωνοποίητων συστατικών του ελαιολάδου εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τον τρόπο με τον οποίο έχει γίνει η παραλαβή του.

### *Υδρογονάνθρακες*

Οι υδρογονάνθρακες που περιέχονται ως επί το πλείστον στο ασαπωνοποίητο κλάσμα είναι το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Όσον αφορά το σκουαλένιο (2,6,10,15,19,23-εξαμεθυλοεικοσιτετρα-2,6,10,14,18,22-εξαένιο) πρόκειται για έναν πολυακόρεστο τριτερπενικό υδρογονάνθρακα με τριάντα άτομα άνθρακα (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>) που αποτελεί το 90% του κλάσματος των υδρογονανθράκων (Lanzon et al., 1994). Επιπλέον, είναι η πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση της χοληστρερόλης αλλά και γενικά όλων των στεροειδών και των τερπενοειδών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σκουαλένιο φαίνεται να εμφανίζει σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις (Rao et al., 1998). Ωστόσο, το υπόλοιπο κλάσμα υδρογονανθράκων στο παρθένο ελαιόλαδο συντίθεται από διτερπενικούς και τριτερπενικούς υδρογονάνθρακες, ισοπρενοειδείς πολυολεφίνες και ν-παραφίνες (Lanzon et al., 1994).

### *Τοκοφερόλες*

Η βιταμίνη Ε αποτελείται από τοκοφερόλες ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - και  $\delta$ -) μαζί με τοκοτριενόλες ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - και  $\delta$ -). Η λιποδιαλυτή  $\alpha$ -τοκοφερόλη, αποτελεί την κύρια μορφή της βιταμίνης Ε που ανευρίσκεται στο ελαιόλαδο και καταλαμβάνει σχεδόν το 95% των συνολικών τοκοφερολών. Οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά που διαδραματίζουν σπουδαίο βιολογικό ρόλο στο ελαιόλαδο, συνεισφέροντας εν μέρει στην οξειδωτική σταθερότητά του. Εκτός από αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία αυξάνεται από το  $\alpha$ - προς το  $\delta$ - ομόλογο, εμφανίζουν και βιταμινική δράση που αυξάνεται κατά την αντίθετη φορά. Στα παρθένα ελαιόλαδα καλής ποιότητας, η  $\alpha$ -τοκοφερόλη απαντάται σε σημαντικές συγκεντρώσεις (100-300 mg/kg) (Grigoriadou et al., 2007), ενώ γενικότερα τα διάφορα στάδια επεξεργασίας των ελαίων συντελούν στη μείωση της συγκέντρωσης των τοκοφερολών (Boskou et al, 2006).

### *Στερόλες*

Οι στερόλες είναι ευρύτατα διαδεδομένες στη φύση και σε πολλά λίπη και έλαια πρωταγωνιστούν στο ασαπωνοποίητο μέρος. Τέσσερις κατηγορίες στερολών εντοπίζονται στο ελαιόλαδο και χρησιμοποιούνται συνήθως για τον έλεγχο της αυθεντικότητάς του καθώς η παρουσία τους συνδέεται με την ποιότητα αυτού. Στις κατηγορίες αυτές ανήκουν οι: κοινές στερόλες (4 $\alpha$ - απομεθυλοστερόλες), 4 $\alpha$ -μεθυλοστερόλες, τριτερπενικές αλκοόλες (4,4-διμεθυλοστερόλες) και τριτερπενικές διαλκοόλες (Boskou et al, 2006). Η  $\beta$ -σιτοστερόλη (75-90% των συνολικών στερολών), η  $\Delta^5$ -αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη αποτελούν τις κυριότερες στερόλες στο ελαιόλαδο (Román et al., 2019). Στο σύνολό τους απαντώνται τόσο σε ελεύθερες όσο και σε εστεροποιημένες μορφές με λιπαρά οξέα, ενώ σύμφωνα με την επιτροπή της ΕΕ, το ολικό στερολικό περιεχόμενο σε παρθένα ελαιόλαδα κυμαίνεται μεταξύ 1000-2000 mg/kg (Aparicio & Luna, 2002; Boskou et al., 2006).



### *Χρωστικές*

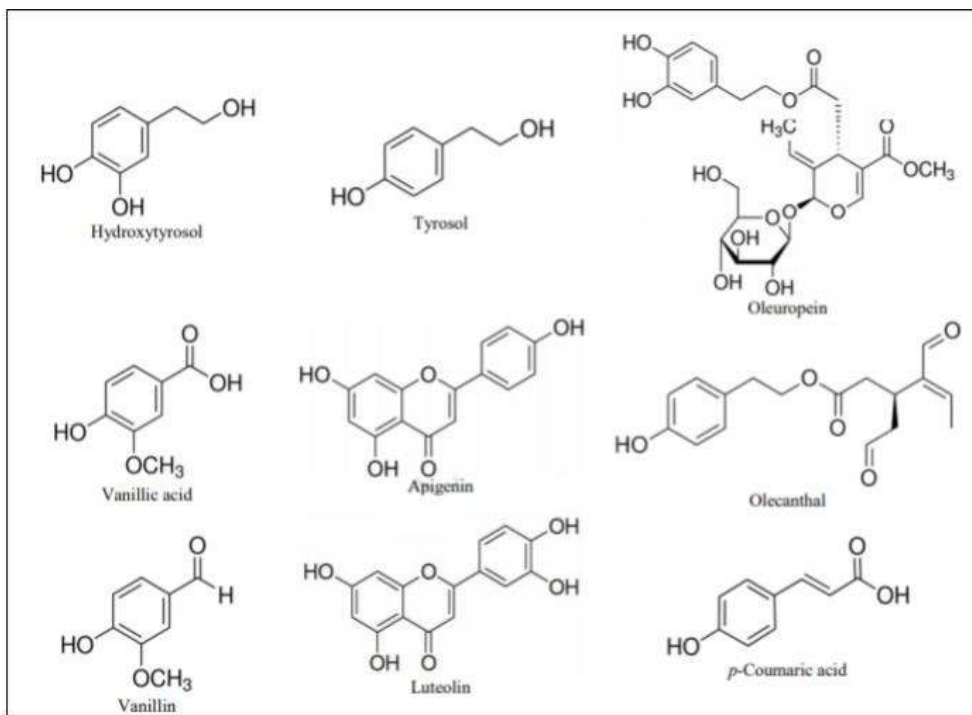
Το χαρακτηριστικό χρώμα του ελαιολάδου είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης καροτενοειδών και χλωροφυλλών σε αυτό. Στις τελευταίες περιλαμβάνονται και οι φαιφυτίνες. Οι χρωστικές που κυριαρχούν στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είναι η λουτεΐνη, το β-καροτένιο και η φαιοφυτίνη α, ενώ οι χλωροφύλλες α και β απαντώνται σε ίχνη μόνο στα φρέσκα λάδια. Η παρουσία των παραπάνω λιπόφιλων χρωστικών εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία της ελιάς και τις συνθήκες επεξεργασίας, αποθήκευσης και τελικής συσκευασίας, ενώ κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του ελαιόκαρπου λαμβάνει χώρα μια σημαντική μείωση των χλωροφυλλών (Lazzerini et al., 2016; Jimenez-Lopez et al., 2020).

### *Πτητικές και Αρωματικές ενώσεις*

Στο ελαιόλαδο, μέσω της αέριας χρωματογραφίας, έχει ταυτοποιηθεί πλήθος πτητικών συστατικών που αποτελούνται από 5 έως 20 άτομα άνθρακα και είναι κυρίως υδρογονάνθρακες, αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, εστέρες, φαινόλες, λακτόνες, και ορισμένα παράγωγα του φουρανίου. Ωστόσο, δε συμβάλλουν όλες στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου. Συγκεκριμένα, οι πτητικές ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα είναι αυτές που συνεισφέρουν στο χαρακτηριστικό «πράσινο» άρωμα και στην ποιοτική αναβάθμιση του ελαιολάδου, με την (E)-2-εξενάλη να κυριαρχεί και να συνδέεται με την οσμή «πρασίνου» και «πικραμύγδαλου». Οι (Z)-3-εξενάλη και η εξανάλη που ακολουθούν, χαρακτηρίζονται από νότες «πρασίνου μήλου» και «κομμένου χόρτου», αντίστοιχα (Angerosa et al., 2004; Boskou et al., 2006).

### *Φαινόλες*

Φαινόλες είναι οι ουσίες που διαθέτουν τουλάχιστον ένα βενζολικό δακτύλιο και ένα ή περισσότερα μόρια υδροξυλίου πάνω σε αυτόν. Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και ως πολικές ενώσεις είναι κατά κύριο λόγο υδατοδιαλυτές και ελάχιστα λιποδιαλυτές (Servili et al., 2004). Αν και στο ελαιόλαδο απαντώνται σε μικρό ποσοστό, εδώ και πολλές δεκαετίες ελκύουν την προσοχή των ερευνητών χάρη στην υψηλή βιολογική τους αξία και την επίδρασή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαίου. Πρόκειται για ενώσεις με αποδεδειγμένα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, διαδραματίζοντας παράλληλα σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου κατά την αποθήκευση (self-life), καθώς υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες αποτελεί ένδειξη καλού συσχετισμού σταθερότητάς στην οξείδωση (Tsimidou et al., 1992).



**Εικόνα 1:** Φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο (Wani et al., 2018).

Στο παρθένο ελαιόλαδο έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί περισσότερα από 30 είδη ελεύθερων ή εστεροποιημένων πολυφαινολών από τις διάφορες ποικιλίες ελιάς (**Εικόνα 1**). Η ταξινόμησή τους πραγματοποιείται σε 5 κλάσεις ανάλογα με τη χημική δομή τους: φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή, σεκοϊριδοειδή και λιγνάνες (Servili et al., 2004; Angelis et al., 2018). Οι δύο τελευταίες κατηγορίες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου. Πιο συγκεκριμένα, τα σεκοϊριδοειδή εντοπίζονται ως επί το πλείστον στα φρέσκα ελαιόλαδα, ενώ προέρχονται κυρίως από τον καρπό της ελιάς και λιγότερο από τα φύλλα της. Αξίζει να αναφερθεί πως πρόκειται για ενώσεις που περιέχονται αποκλειστικά στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae*, στην οποία περιλαμβάνεται και η *Olea europaea* (Jimenez-Lopez et al., 2020). Τα πιο κοινά σεκοϊριδοειδή είναι η ελευρωπαϊνή, η διμεθυλελευρωπαϊνή και το άγλυκο του λιγκστροσιδίου, ενώ η ελαιοκανθάλη (διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσιδίου χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα, p-HPEA-EDA) και η ελαιασίνη (διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνής χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα, 3,4-DHPEA-EDA) σχετίζονται κυρίως με την πικρή γεύση του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου (Servili et al., 2004; Angelis et al., 2018; Jimenez-Lopez et al., 2020).

Εξίσου χαρακτηριστικές φαινολικές ενώσεις του παρθένου ελαιολάδου είναι το καφεϊκό, βανιλικό και π-κουμαρικό οξύ, καθώς και η τυροσόλη και η υδρόξυτυροσόλη (Wani et al.,

2018). Η συγκέντρωση των δύο τελευταίων αυξάνεται κατά τη διαδικασία της μάλαξης, λόγω της δράσης των β-γλυκοσιδασών στην υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών, καθώς και κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου (Gómez-Alonso et al., 2002, Wani et al., 2018). Οι φαινολικές αυτές αλκοόλες είναι ευρέως διαδεδομένες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που προσδίδουν στο ελαιόλαδο. Σύμφωνα με *in vivo* και *in vitro* πειράματα, πρόκειται για τις φαινόλες που απορροφώνται καλύτερα μετά από κατανάλωση ελαιολάδου, αυξάνοντας έτσι την αντίσταση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) στην οξειδωση (Sun et al., 2018; Rodríguez-Morató et al., 2016). Ακόμη, η EFSA αναγνώρισε μέσω ισχυρισμού υγείας, πως οι παραπάνω ουσίες πάνω από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες (κατανάλωση 5 mg HT/ημέρα και των παραγώγων της ανά 20 g ελαιολάδου) (European Food Safety Authority, 2011). Παράλληλα, η υδρόξυτυροσολη έχει αποδειχθεί ότι δρα προστατευτικά σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και τον καρκίνο (Sun et al., 2018; Rodríguez-Morató et al., 2016).

Τα επίπεδα συγκέντρωσης όλων των προαναφερόμενων ενώσεων ποικίλλουν μεταξύ ελαιολάδων και σχετίζονται με διάφορους παράγοντες όπως είναι η ποικιλία, ο βαθμός ωρίμανσης του ελαιοκάρπου, η γεωγραφική προέλευση, η καλλιεργητική πρακτική και διάφοροι τεχνολογικοί παράγοντες (πχ άλεση, θερμοκρασία και χρόνος μάλαξης κ.α). Για παράδειγμα, παρθένα ελαιόλαδα που παραλήφθηκαν με χρήση διαφασικού συστήματος φυγοκέντρησης παρουσιάζουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, σε αντίθεση με τη χρήση αντίστοιχου τριφασικού, στο οποίο προστίθεται νερό απομακρύνοντας τις φαινόλες (Gimeno et al., 2002).

### **1.3 Επίδραση του Ελαιόλαδου στην Υγεία**

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τα μοναδικά οφέλη που χαρίζει στην ανθρώπινη υγεία. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις καρδιοπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, καθώς και σε άλλες αξιοσημείωτες ιδιότητες. Ως προς την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων (CVD) μια πληθώρα ερευνών παρουσιάζει στοιχεία που τη συσχετίζουν άμεσα με μια διατροφή πλούσια σε EVOOs (Covas et al., 2007). Ενδεικτικά, κατανάλωση 10 g EVOO/ημέρα οδηγεί σε μείωση εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων έως και 10%, ενώ 10-50 mL/ημέρα μείωσαν συστηματικά τη διαστολική πίεση κατά 0,73 mm Hg. Σε άλλη μελέτη, ασθενείς που κατανάλωναν 25-75 mL/ημέρα ελαιόλαδου με υψηλό φαινολικό περιεχόμενο φαίνεται να εμφάνισαν χαμηλά ποσοστά CVD-δεικτών, όπως μαλονδιαλδεϋδη (MDA) και λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Yubero-Serrano et al., 2018). Υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικά VOOs και EVOOs εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με μειωμένη οξειδωτική βλάβη. Μάλιστα, φαινολικές ενώσεις όπως η πινορεσινόλη και η ακετοξυπινορεσινόλη βρέθηκε να κατέχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά και με την βιταμίνη E.

Ικανοποιητικά εμφανίζονται και τα αποτελέσματα σχετικά με τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του ΕVOO. Κατανάλωσή του για χρονικό διάστημα 3 μηνών φαίνεται να οδήγησε σε μείωση των προφλεγμονοδών κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α). Πολλά υποσχόμενα εμφανίζονται και τα αποτελέσματα έναντι των νευρεκφυλιστικών νόσων. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν συνδέσει την κατανάλωσή του με προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης της νόσου Alzheimer και της άνοιας (Román et al., 2019). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί μειωμένα ποσοστά καρκίνου του μαστού, του ενδομητρίου, του προστάτη και του ορθοκολικού στις Μεσογειακές χώρες συγκριτικά με άλλες Ευρωπαϊκές. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση ΕVOO και συγκεκριμένα στην παρουσία ελαϊκού οξέος και φαινολικών συστατικών που αναστέλλουν την οξειδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων καθώς και την οξειδωτική βλάβη του DNA (Alu'datt et al., 2017). Τέλος, αξίζει να αναφερθούν οι σημαντικές ιδιότητες και συγκεκριμένων συστατικών όπως η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη. Στις ενώσεις αυτές έχει αποδοθεί αντιμικροβιακή δράση αφού έχουν βρεθεί αποτελεσματικές ενάντια σε μύκητες, στελέχη βακτηρίων, παράσιτα και ιούς συμπεριλαμβανομένου και του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) (Jimenez-Lopez et al., 2020).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Η Οξείδωση των Λιπιδίων**

### **2.1 Κύριες Αλλοιώσεις του Ελαιολάδου**

Οι σημαντικότερες αλλοιώσεις που υφίσταται το ελαιόλαδο και οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητάς του, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

**α. Υδρόλυση ή υδρολυτικό τάγγισμα:** Οφείλεται στην απελευθέρωση λιπαρών οξέων από τα τριγλυκερίδια και πραγματοποιείται κατά το χρόνο πριν από την εξαγωγή του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο. Διακρίνεται σε μικροβιακή και ενζυμική λιπόλυση.

**β. Οξείδωση ή οξειδωτικό τάγγισμα:** Λαμβάνει χώρα κυρίως μετά την παραλαβή του ελαιολάδου και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του σε ακατάλληλες συνθήκες.

#### **2.1.1 Οξείδωση Λιπιδίων**

Μια από τις κυριότερες αντιδράσεις των λιπαρών οξέων είναι η οξείδωση. Η αντίδραση αυτή των λιπιδίων θεωρείται το βασικότερο πρόβλημα που επηρεάζει τα βρώσιμα έλαια, καθώς προκαλεί ανεπιθύμητες μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (δυσάρεστη οσμή και γεύση), στη διατροφική αξία, αλλά και στις φυσικές ιδιότητες όπως είναι το ιξώδες, η πυκνότητα και η διαλυτότητα (Matthäus, 2010). Το ελαιόλαδο όπως και όλες οι άλλες λιπαρές ύλες που περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, οξειδώνονται σε συνθήκες απουσίας φωτός (*αυτοξείδωση*) ή παρουσίας φωτός με τη συμμετοχή χρωστικών ουσιών όπως είναι η

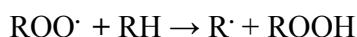
χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη (*φωτοοξειδωση*) (Μπόσκου, 2004). Εκτός από την παρουσία οξυγόνου και φωτός, άλλοι παράγοντες που καταλύουν την οξειδωση των λιπιδίων είναι η επιμόλυνση από μέταλλα, η σύσταση σε λιπαρά οξέα, η θερμοκρασία και οι συνθήκες εξαγωγής και διακίνησης του ελαιόλαδου (Velasco & Dobarganes, 2002). Όσον αφορά την τελευταία, η οξειδωση επιταχύνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία είτε κατά την αποθήκευση του ή κατά την έντονη θερμική του επεξεργασία.

### 2.1.2 Μηχανισμός Αυτοοξειδωσης

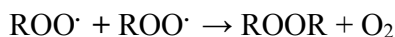
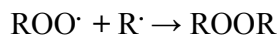
Ο μηχανισμός της αυτοοξειδωσης, είναι ένας από τους πολυπλοκότερους μηχανισμούς στον οποίο κύριο ρόλο παίζουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η αυτοοξειδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που λαμβάνει χώρα με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών και με την πάροδο του χρόνου παρουσιάζει αυξανόμενο ρυθμό (Μπόσκου, 2004; Matthäus, 2010; Wang et al., 2020). Ο εν λόγω μηχανισμός περιλαμβάνει τρία στάδια: την εισαγωγή, τη διάδοση και τον τερματισμό.

Έναρξη (initiation):  $RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$

Διάδοση (propagation):  $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$



Τερματισμός (termination):  $R\cdot + R\cdot \rightarrow R - R$



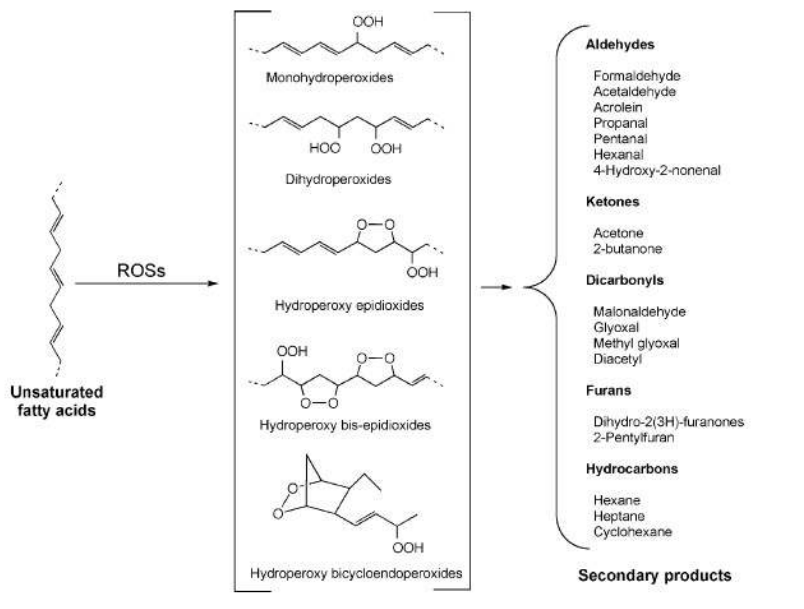
Εισαγωγή ή έναρξη : Στο στάδιο αυτό, όπου η οξειδωση προχωράει με αργό ρυθμό, σχηματίζονται οι πρώτες ελεύθερες ρίζες ( $R\cdot$ ) λόγω απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από ένα μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος (RH). Η θερμοκρασία, το φως και ορισμένα βαρέα μέταλλα θεωρούνται εκκινητές της παραπάνω αντίδρασης παρέχοντας την απαιτούμενη ενέργεια.

Διάδοση: Πλέον, η οξειδωση προχωράει με ταχύτατο ρυθμό και το έλαιο αποκτά ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση και οσμή ταγγισμένου προϊόντος). Κάθε σχηματιζόμενη ρίζα αντιδρά με ένα ουδέτερο μόριο οξυγόνου και δημιουργείται μια ρίζα υπεροξειδίου ( $ROO\cdot$ ). Στη συνέχεια, αυτή αντιδρά με άλλο μόριο λιπαρού οξέος (RH) που δεν έχει οξειδωθεί μέχρι εκείνη τη στιγμή, οδηγώντας στη δημιουργία υπεροξειδίων ( $ROOH$ ) και νέων ελεύθερων ριζών. Τα υπεροξειδία, με κυριότερα τα υδροξυ-υπεροξειδία, είναι ασταθείς ενώσεις που διασπώνται προς σχηματισμό ελευθέρων ριζών, οι οποίες συμμετέχουν σε νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στο στάδιο αυτό, τα α-υδρογόνα ως προς τον διπλό δεσμό των λιπαρών οξέων είναι πιο ευπαθή λόγω της ηλεκτρονιακής κατανομής και αφαιρούνται ευκολότερα κατά το σχηματισμό των δευτερογενών προϊόντων (Μπόσκου, 2004; Wang et al., 2020).

**Τερματισμός:** Στο στάδιο αυτό, η διάδοση τερματίζεται, καθώς οι δυο ρίζες λιπαρών οξέων αντιδρούν μεταξύ τους και προκύπτουν αδρανή προϊόντα. Ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, όπως είναι οι τοκοφερόλες και οι φαινολικές ενώσεις, υποβοηθούν τον τερματισμό της οξειδωσης, καθώς δρουν σαν δότες ενός ατόμου υδρογόνου δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, παρεμποδίζοντας έτσι περαιτέρω αλυσιδωτές αντιδράσεις.

### 2.1.3 Προϊόντα Διάσπασης των υπεροξειδίων

Τα προϊόντα της οξειδωσης υποβαθμίζουν την ποιότητα των λιπαρών υλών, ενώ σε προχωρημένο βαθμό και σε μεγάλες ποσότητες θεωρούνται τοξικά. Συγκεκριμένα, κατά την οξειδωση του ελαιολάδου, σχηματίζονται υπεροξειδία (πρωτογενή προϊόντα οξειδωσης) τα οποία υπόκεινται σε περαιτέρω οξειδωση ή αποδόμηση προς διάφορες ενώσεις, όπως είναι οι κετόνες, οι αλδεΐδες, τα οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και οι αλκοόλες (δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης). Οι παραπάνω ενώσεις, και ειδικότερα οι κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες, φέρεται να είναι υπεύθυνες για τις αλλοιώσεις των εδάδιμων ελαίων σε γεύση και άρωμα, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Παράλληλα, στα δευτερογενή προϊόντα αποδίδονται και οι αρνητικές επιπτώσεις στη θρεπτική αξία, αλλά και στη συνολική ποιότητα του ελαιολάδου (Matthäus, 2010; Wang et al., 2020).



**Εικόνα 2:** Προτεινόμενα ενδιάμεσα και δευτερογενή προϊόντα που σχηματίζονται από λιπίδια μέσω της οξειδωσης (Shibamoto, 2006).

Μέσω της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, παράγεται μια τεράστια ποικιλία δευτερογενών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των πολύ δραστικών καρβονυλικών ενώσεων (**Reactive Carbonyl Compounds, RCCs**) που περιέχουν μία ή περισσότερες καρβονυλομάδες με ηλεκτρονιοφιλα κέντρα, αλλά και πιο σταθερών προϊόντων, όπως κετόνες και αλκάνια (**Εικόνα 2**) (Negre-Salvayre et al., 2008; Shibamoto, 2006). Από χημικής άποψης, τα RCCs, μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες (Vistoli et al., 2013):

- 1) *α, β-ακόρεστες αλδεΐδες*, με κυριότερες τις 4-υδροξυ-2-nonenal (4-HNE), 4-υδροξυ-2-εξανάλη (4-HHE) και ακρολεΐνη (ACR)
- 2) *δι-αλδεΐδες*, συμπεριλαμβανομένης της γλυοξάλης (GO) και της μαλονδιαλδεΐδης (MDA)
- 3) *κετο- και οξο- αλδεΐδες*, με πιο χαρακτηριστική τη μεθυλογλυοξάλη (MGO).

Η παραγωγή τους μπορεί να οφείλεται και στην παρουσία UV ακτινοβολίας, ενώ ορισμένες από τις παραπάνω καρβονυλικές ενώσεις είναι δυνατόν να σχηματίζονται ενδογενώς κατά τη διάρκεια ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων, όπως είναι η γλυκόλυση και η γλυκοξειδωση (μη ενζυματική γλυκοζυλίωση και οξειδωση) των υδατανθράκων (Shibamoto, 2006; Vidal et al., 2014; Semchyshyn, 2014).

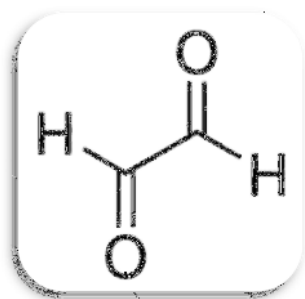
Εκτός όμως από τις ενδογενείς πορείες που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα RCCs παράγονται και εξωγενώς. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται διατροφικές και περιβαλλοντικές πηγές (Vistoli et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, όλα τα τρόφιμα, τα οποία υπόκεινται σε επεξεργασίες όπως η ζύμωση, το ψήσιμο ή το τηγάνισμα, αποτελούν πηγές πλούσιες σε δραστικές καρβονυλικές ενώσεις (Degen et al., 2012). Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι η απελευθέρωση αυτών των χημικών ουσιών από τρόφιμα κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αξιολογήσεις των καταναλωτών για την αποδοχή του εκάστοτε προϊόντος, εξαιτίας της πιθανής τοξικότητάς τους όταν αυτές εισπνέονται, προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο (Jiang et al., 2013). Επιπλέον, ορισμένα καρβονύλια (π.χ., ακρολεΐνη, γλυοξάλη, ακετόνη και φορμαλδεΐδη) αποτελούν βιομηχανικούς ρύπους, ενώ άλλες εξωγενείς πηγές των RCCs θεωρούνται ο καπνός του τσιγάρου, οι εξατμίσεις των αυτοκινήτων, καθώς και ορισμένα πρόσθετα των τροφίμων και φαρμακευτικά προϊόντα (Fu et al., 2008; Colombo et al., 2010; Semchyshyn, 2014).

Τα RCCs, θεωρούνται υπεύθυνα για το λεγόμενο «καρβονυλικό στρες». Το φαινόμενο αυτό, προκαλεί σταδιακά μείωση των πρωτεϊνικών λειτουργιών και βλάβες σε όλους τους ιστούς, με παθολογικές συνέπειες, όπως η δυσλειτουργία των κυττάρων, η φλεγμονώδης απόκριση και η απόπτωση, συμβάλλοντας στην εξέλιξη πολλών ασθενειών που θα αναφερθούν παρακάτω (Negre-Salvayre et al., 2008; Vidal et al., 2014; Semchyshyn, 2014).

## 2.2 Σχηματισμός $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων ( $\alpha$ -DCs)

Τις τελευταίες δεκαετίες, τόσο στον κλάδο της χημείας τροφίμων όσο και σε αυτόν της ιατρικής, η έρευνα που αφορά τις  $\alpha$ -δικαρβονυλικές ενώσεις συναντά όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, κυρίως λόγω των επιπτώσεων που φέρεται να έχουν στη δημόσια υγεία (Arribas-Lorenzo & Morales, 2010). Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί σε περίπου 18 είδη  $\alpha$ -DCs τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα τρόφιμα, με πιο αντιπροσωπευτικά τη γλυοξάλη (GO), τη μεθυλογλυοξάλη (MGO) και το διακετύλιο (DA) (Cha et al., 2019).

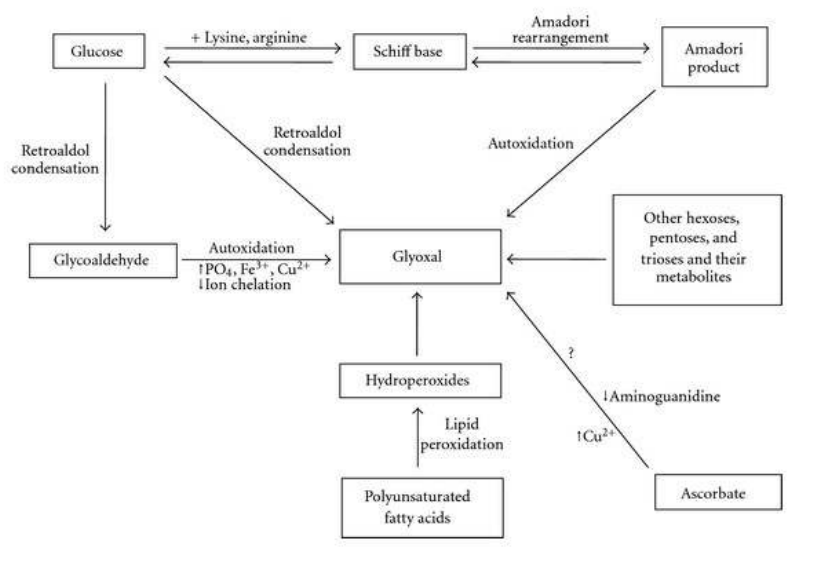
### 2.2.1 Γλυοξάλη



**Εικόνα 3:** Χημική δομή γλυοξάλης (Vistoli et al., 2013).

Η γλυοξάλη (GO), οργανική ένωση με μοριακό τύπο  $C_2H_2O_2$ , αποτελεί τη μικρότερη διαλδεύδη (**Εικόνα 3**). Εμφανίζεται ως κίτρινο υγρό και σχηματίζει άλατα σε υδατικό διάλυμα, τα οποία τείνουν να συμπυκνωθούν δίνοντας ολιγομερή είδη, οι ακριβείς δομές των οποίων παραμένουν ασαφείς (Vistoli et al., 2013). Τόσο εξωγενείς όσο και ενδογενείς οδοί αποτελούν πηγές γλυοξάλης. Η ένωση αυτή έχει μελετηθεί ως προς τις τοξικές και ερεθιστικές της επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα, τα μάτια και το γαστρεντερικό σωλήνα (Cha et al., 2019). Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται περιβαλλοντικές και διατροφικές πηγές, όπως είναι ο καπνός των τσιγάρων καθώς και όλα τα τρόφιμα που υπόκεινται σε ζύμωση και θερμικές επεξεργασίες (μαγείρεμα, ψήσιμο ή τηγάνισμα), αντίστοιχα (Degen et al., 2012). Όσον αφορά τους ενδογενείς μηχανισμούς παραγωγής, η γλυοξάλη δύναται να σχηματιστεί εν γένει από σάκχαρα και λιπίδια. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να προκύψει από υπεροξειδωση λιπιδίων, ενώ η υδρόλυση του ασκορβικού οξέος θεωρείται υπεύθυνη για το σχηματισμό της μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού (Vistoli et al., 2013).





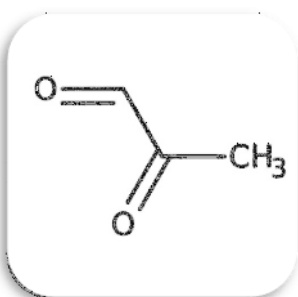
**Εικόνα 4:** Κυριότερες πορείες σχηματισμού γλυοξάλης (Lange et al., 2012)

Τα σάκχαρα αποτελούν την επικρατέστερη πηγή παραγωγής γλυοξάλης, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω δύο κύριων οδών. Η πρώτη εξ αυτών περιλαμβάνει άμεσες αντιδράσεις αυτοξειδωσης, οι οποίες προωθούνται από την παρουσία φωσφορικών αλάτων και μεταλλικών ιόντων, ενώ έχει παρατηρηθεί πως η άμεση μετατροπή των σακχάρων, μέσω αποικοδόμησης της ρετροαλδόλης, οδηγεί σε επιτυχή σχηματισμό της ουσίας (**Εικόνα 4**). Εν συνεχεία, η δεύτερη διαδρομή αφορά τη μη ενζυμική αντίδραση γλυκοζυλίωσης που πραγματοποιείται μεταξύ της καρβονυλομάδας ενός ανάγοντος σακχάρου (γλυκόζη, φρουκτόζη) και της ελεύθερης αμινομάδας πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, πεπτιδίων και αμινοξέων (Ashraf et al., 2015; Ahmad et al., 2018).

Η παραπάνω αντίδραση είναι ευρύτερα διαδεδομένη και ως αντίδραση Maillard, καθώς πήρε το όνομά της από τον Γάλλο χημικό Louis-Camille Maillard, ο οποίος την περιέγραψε πρώτος το 1912. Αν και το ενδιαφέρον των ερευνητών στρέφεται κυρίως στο ρόλο και την εμπλοκή της αντίδρασης στα συστήματα τροφίμων, τις τελευταίες τρεις δεκαετίες αυξανόμενη προσοχή έχει μετατοπιστεί σε *in vivo* μελέτες λόγω των επιζήμιων συνεπειών που φέρεται να έχουν τα τελικά προϊόντα στην υγεία (Vistoli et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μια σειρά διαδοχικών και αλληλοσυνδεδεμένων διεργασιών που *in vivo* λαμβάνουν χώρα στους ιστούς των κυττάρων, ενώ προκειμένου να περιγραφούν φαίνεται να διαχωρίζονται σε τρία βασικά στάδια (αρχικό, ενδιάμεσο και τελικό). Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται συμπύκνωση της καρβονυλομάδας του σακχάρου με τις ελεύθερες αμινομάδες που ανήκουν είτε στη πλευρική αλυσίδα αμινοξέων (Lys, Arg) είτε στο N-τερματικό άκρο πρωτεϊνών, σχηματίζοντας βάσεις Schiff (π.χ γλυκοσυλαμίνη). Η βάση Schiff, ένα εξαιρετικά ασταθές

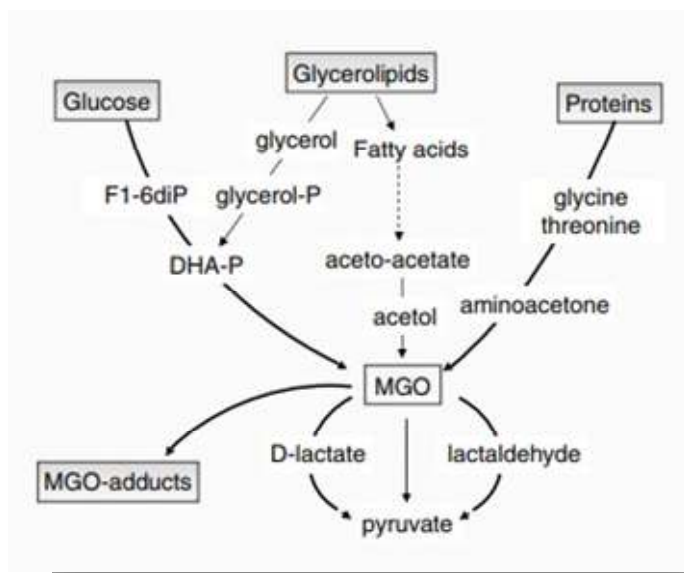
προϊόν, υφίσταται αναδιατάξεις με αποτέλεσμα το σχηματισμό του προϊόντος Amadori (αμινοκετόζη). Ακολούθως, το προϊόν Amadori μπορεί να υποστεί ενολοποίηση, αφυδάτωση και περαιτέρω αναδιάταξη, κατά τη διάρκεια των οποίων σχηματίζεται η γλυοξάλη (Negre □ Salvayre et al., 2008; Vistoli et al., 2013; Ashraf et al., 2015).

### 2.2.2 Μεθυλογλυοξάλη



**Εικόνα 5:** Χημική δομή μεθυλογλυοξάλης (Vistoli et al., 2013).

Μέσω των παραπάνω διεργασιών και αναδιατάξεων των προϊόντων Amadori, σχηματίζονται ως ενδιάμεσα και άλλες δικαρβονυλικές ενώσεις, στις οποίες περιλαμβάνεται και η μεθυλογλυοξάλη (MGO). Η τελευταία, γνωστή και ως 2-όξοπροπανάλη κατά IUPAC ( $C_3H_4O_2$ ), συναντάται ως κίτρινο υγρό με χαρακτηριστική πικάντικη μυρωδιά (**Εικόνα 5**). Πρόκειται για μια εξαιρετικά αντιδραστική  $\alpha$ -οξοαλδεΐδη που σχηματίζεται στα κύτταρα κυρίως κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης (Ramasamy et al., 2006).

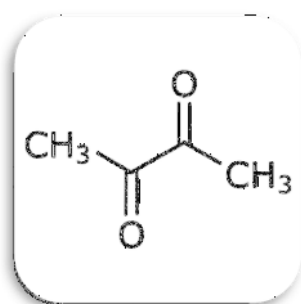


**Εικόνα 6:** Μεταβολικές πορείες σχηματισμού μεθυλογλυοξάλης (Negre & Salvayre et al., 2008)

Αναλυτικότερα, η κυρίαρχη οδός που οδηγεί στην παραγωγή μεθυλογλυοξάλης περιλαμβάνει την ενζυμική ή μη ενζυμική αποικοδόμηση των ενδιάμεσων φωσφορικών τριοζών, δηλαδή της φωσφορικής διυδροξυακετόνης (DHAP) και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAP) που προέρχονται από τη γλυκολυτική πορεία. Οι ενώσεις αυτές, βρίσκονται σε ισορροπία λόγω της εν δυνάμει αλληλομετατροπής τους που καταλύεται από την ισομεράση των φωσφορικών τριοζών. Επομένως, ο σχηματισμός της MGO από τα παραπάνω ενδιάμεσα μπορεί να επιτευχθεί μέσω αυθόρμητης αποφωσφορυλίωσης καθώς και μέσω της επίδρασης του ενζύμου συνθάση της μεθυλογλυοξάλης (Richard 1993; Vistoli et al., 2013). Συμπληρωτικά, ο σχηματισμός της μπορεί να προκληθεί είτε μέσω της οξείδωσης των λιπιδίων (Li et al., 2014) ή μέσω του μεταβολισμού της ακετόνης στον οποίο και συμμετέχουν (**Εικόνα 6**).

Όπως και στην περίπτωση της γλυοξάλης, εξέχουσα σημασία στην παραγωγή MGO έχουν και ορισμένες εξωγενείς πηγές, με κυριότερες τα τρόφιμα και τα ποτά (καφές, μπίρα, μέλι) λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σακχάρων και λιπιδίων σε αυτά. Διαδικασίες όπως η θέρμανση, η ζύμωση και η παρατεταμένη αποθήκευση, ευνοούν την ανάπτυξη της εν λόγω α-δικαρβονυλικής ένωσης (Vistoli et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κατά τη θερμική επεξεργασία στα συστήματα τροφίμων λαμβάνει χώρα η αντίδραση Maillard, τα προϊόντα της οποίας είναι είτε επιθυμητά λόγω των βελτιωμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που προσδίδουν, είτε ανεπιθύμητα εμφανίζοντας τοξική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό υπό συνθήκες έντονης θέρμανσης (Brands et al., 2001; Cha et al., 2019). Χαρακτηριστικά, αξίζει να αναφερθεί πως η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται ταχύτερα κατά την επεξεργασία του τροφίμου σε υψηλές θερμοκρασίες (τηγάνισμα, ψήσιμο), με αποτέλεσμα την επακόλουθη αύξηση σχηματισμού της MGO (Nie, et al., 2013). Τέλος, υπό συνθήκες ζύμωσης πολλοί μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για την απελευθέρωση μεθυλογλυοξάλης σε αλκοολούχα ποτά και αντίστοιχα τρόφιμα, ενώ όσον αφορά τις περιβαλλοντικές πηγές, διαδικασίες καύσης έχει βρεθεί πως οδηγούν στο σχηματισμό της, συμβάλλοντας σημαντικά στην μόλυνση του αέρα (Vistoli et al., 2013).

### 2.2.3 Διακετύλιο

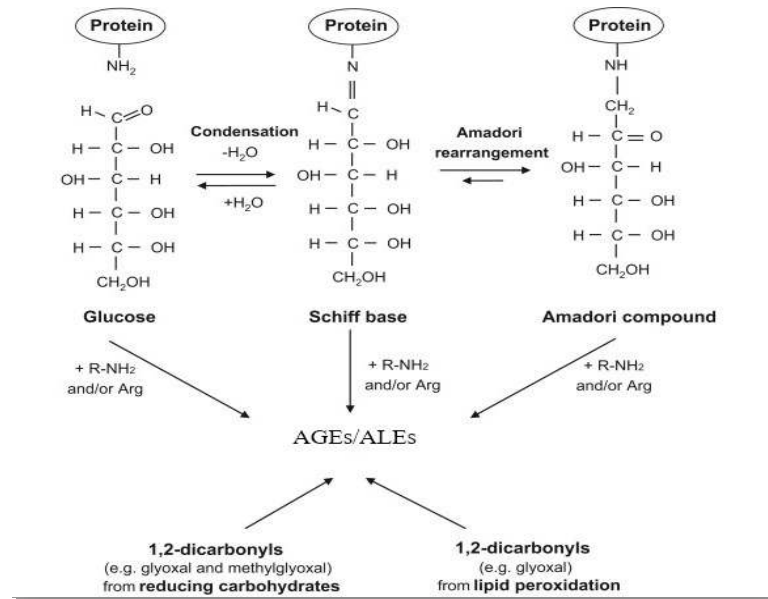


**Εικόνα 7:** Χημική δομή διακετυλίου (Vistoli et al., 2013).

Το διακετύλιο (ή βουτανοδιόνη κατά IUPAC), είναι μια 1,2-δικετόνη με μοριακό τύπο  $C_4H_6O_2$  (Εικόνα 7). Συναντάται ως κίτρινο ή πράσινο υγρό με έντονα βουτυρώδη γεύση, χάριν της οποίας χρησιμοποιείται συχνά ως πρόσθετο σε ορισμένα τρόφιμα, όπως είναι το ποπ κόρν. Παράλληλα, μπορεί να εμφανιστεί φυσικά σε γαλακτοκομικά προϊόντα και αλκοολούχα ποτά λόγω της δράσης των μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση, ενώ μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι διακετύλιο σχηματίζεται και από τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων. Όπως συμβαίνει και στις υπόλοιπες  $\alpha$ -δικαρβονυλικές ενώσεις, ο σχηματισμός του δύναται να επέλθει μέσω της αποικοδόμησης των σακχάρων και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Ένα ακόμα μονοπάτι παραγωγής του διακετυλίου στα τρόφιμα είναι η αντίδραση Maillard, κατά την οποία η μαλτόζη φέρεται να αποικοδομείται προς διακετύλιο μέσω της αντίδρασης ενός ενδιάμεσου προϊόντος Amadori με ένα κατάλοιπο λυσίνης (Shibamoto, 2014).

Αν και περιλαμβάνεται στη λίστα GRAS του FDA (Generally Regarded As Safe) με τη χρήση του να είναι ευρεία στην παρασκευή βουτύρου και παρόμοιων προϊόντων διατροφής, σε επίπεδα 6–9  $\mu\text{g/g}$ , ορισμένες μελέτες στρέφονται στις πιθανές τοξικές επιδράσεις του διακετυλίου, κυρίως όταν αυτό βρίσκεται στη φάση ατμών σε υπερκείμενο χώρο (Jiang et al., 2013). Πρόσφατα ευρήματα απέδωσαν την εμφάνιση αναπνευστικών ασθενειών, όπως είναι η βρογχιολίτιδα, σε εργαζόμενους εργοστασίου παραγωγής ποπ κορν λόγω της έκθεσης τους στο πτητικό διακετύλιο (Konacic & Cooksy, 2009). Μετά από διερεύνηση της παραπάνω συσχέτισης από το NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), η απαίτηση για εφαρμογή περιορισμένου επιπέδου ασφάλειας της ουσίας στη φάση ατμών από τους επιστήμονες ήταν άμεση. Επομένως, ο ακριβής προσδιορισμός του διακετυλίου κρίνεται απαραίτητος τόσο για την ποιοτική αξιολόγηση της γεύσης του βουτύρου και των συναφών προϊόντων όσο και για την αξιολόγηση της τοξικότητάς του κατά την εισπνοή (Shibamoto, 2014).

## 2.3 Προϊόντα Προηγμένης Γλυκοζυλίωσης (AGEs) και Λιποξείδωσης (ALEs)



**Εικόνα 8:** Διαφορετικές πορείες σχηματισμού των AGEs/ALEs (Ahmed et al., 2005).

Οι προαναφερθείσες καρβονυλικές ενώσεις (RCCs) είναι ηλεκτρόφιλες και συνεπώς εξαιρετικά δραστικές έναντι διάφορων κυτταρικών συστατικών. Ως επί το πλείστον, συνδέονται ομοιοπολικά με πυρηνόφιλες ομάδες (ελεύθερες αμινομάδες) βιολογικών μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα φωσφολιπίδια και το DNA, με αποτέλεσμα τη μη αναστρέψιμη τροποποίησή τους και τον σχηματισμό μιας πληθώρας προϊόντων προσθήκης και σταυροδεσμών (ή δεσμών διασταύρωσης, cross-links) μεταξύ πρωτεϊνών. Επομένως, τόσο η μη ενζυμική γλυκοζυλίωση όσο και η υπεροξειδωση λιπιδίων που λαμβάνουν χώρα οδηγούν στα χαρακτηριστικά τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs, Advanced Glycation End products) και στα τελικά προϊόντα προηγμένης λιποξείδωσης (ALEs, Advanced Lipoxidation End Products), αντίστοιχα (Shibamoto, 2006; Vistoli et al., 2013; Semchyshyn, 2014). Η διαφορά στις εμπλεκόμενες πορείες σχηματισμού, έγκειται στο γεγονός ότι τα AGEs προέρχονται από οξειδωτικά και μη οξειδωτικά μονοπάτια, που περιλαμβάνουν σάκχαρα ή προϊόντα αποδόμησης τους, ενώ τα ALEs παράγονται αποκλειστικά από αντιδράσεις οξείδωσης των απαραίτητων λιπιδίων (Hidalgo et al., 2005; Vistoli et al., 2013).

Ο *in vivo* σχηματισμός των AGEs λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες ως συνέπεια του μεταβολισμού, αλλά επιταχύνεται στην περίπτωση υπεργλυκαιμίας (Sadowska-Bartosz et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι σταθερές και μη αναστρέψιμες τελικές ενώσεις, προκύπτουν όταν τα προϊόντα Amadori υποβληθούν σε αναδιατάξεις ακολουθούμενες από άλλες αντιδράσεις όπως κυκλοποίηση, οξείδωση και αφυδάτωση, καθώς και όταν ενώσεις

όπως τα δραστικά καρβονύλια αλληλεπιδράσουν με αμινομάδες πρωτεϊνών και πεπτιδίων, ειδικά με κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης (Vistoli et al., 2013; Ashraf et al., 2015). Τα AGEs ανιχνεύονται ως επί το πλείστον σε ιστούς, στο πλάσμα και σε σωματικά υγρά (Han et al., 2013; Ahmad et al., 2018), ενώ προκαλείται συσσώρευσή τους αυξανόμενης της ηλικίας. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως η επιταχυνόμενη παραγωγή τους υπό συνθήκες υπεργλυκαιμίας, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε επικείμενες παθοφυσιολογικές καταστάσεις τις οποίες ο ανθρώπινος οργανισμός καλείται να αντιμετωπίσει, όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης και η νόσος Αλτσχάιμερ (Vistoli et al., 2013).

Αντιστοίχως, τα ALEs που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα, είναι αυτά που προκύπτουν κατά την αντίδραση, των προερχόμενων RCCs από την υπεροξειδωση λιπιδίων, με τα πυρηνόφιλα κατάλοιπα αμινοξέων των πρωτεϊνών. Τα κατάλοιπα λυσίνης, ιστιδίνης, αργινίνης και κυστεΐνης μιας πρωτεΐνης είναι αυτά που συμμετέχουν κατά κύριο λόγο στην παραπάνω αντίδραση και οδηγούν αρχικά στον σχηματισμό προϊόντων προσθήκης βάσεων Michael και Schiff, οδηγώντας εν τέλει στα ALEs (Vistoli et al., 2013, Negre-Salvayre et al., 2008). Ανάλογες ενώσεις είναι δυνατόν να παραχθούν και με άλλες πυρηνόφιλες ομάδες πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των πλευρικών αλυσίδων ιστιδίνης, σερίνης, θρεονίνης, τρυπτοφάνης ή τυροσίνης (Hidalgo et al., 2005). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως στην παραπάνω ομάδα τελικών προϊόντων, οδηγούν και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (phospholipid-based RCCs) που περιέχουν ηλεκτρόφιλα τμήματα ικανά να αντιδράσουν ομοιοπολικά με τις πυρηνόφιλες θέσεις πρωτεϊνών (Vistoli et al., 2013).

## 2.4 Κατηγορίες Διάκρισης των AGEs/ALEs

Τα AGEs/ALEs ταξινομούνται κυρίως στις ακόλουθες τρεις κατηγορίες (Ashraf et al., 2015):

- (i) Προϊόντα διασταύρωσης ή σταυροδεσμών (cross-linking AGEs/ALEs) που δύνανται να διαθέτουν ιδιότητες φθορισμού, με πιο χαρακτηριστική την πεντοσιδίνη, η οποία παράγεται μέσω της αντίδρασης πεντόζης με κατάλοιπα λυσίνης (Lys) και αργινίνης (Arg) πρωτεϊνών.
- (ii) Μη διασταυρούμενα προϊόντα πρωτεϊνών (non-cross-linking AGEs) δίχως ιδιότητες φθορισμού, όπως είναι η *N*-καρβοξυμεθυλ-λυσίνη (CML) και η *N*-καρβοξυαιθυλ-λυσίνη (CEL), οι οποίες προέρχονται από τις γλυοξάλη και μεθυλογλυοξάλη, αντίστοιχα. Στην κατηγορία αυτή εντάσσεται και η πυραλίνη, της οποίας πρόδρομη ένωση αποτελεί η 3-δεοξυγλυκόζη.
- (iii) Προϊόντα διασταύρωσης (cross-linking AGEs/ALEs) δίχως φθορίζουσες ιδιότητες, με κυριότερα τα GOLD (διμερές λυσίνης προερχόμενο από γλυοξάλη), MOLD (διμερές λυσίνης προερχόμενο από μεθυλογλυοξάλη) και DOLD (διμερές λυσίνης προερχόμενο από 3-δεοξυγλυκόζη).

Η δομή των AGEs/ALEs είναι υπεύθυνη για τις διάφορες χημικές ιδιότητες, που διαφοροποιούν τους τρόπους ανάλυσης και ποσοτικοποίησής τους. Όπως διαπιστώνεται, η

ετεροκυκλική δομή που διαθέτουν ορισμένες εξ αυτών, σχετίζεται άμεσα με τις ιδιότητες φθορισμού που εμφανίζουν, δίνοντάς τους παράλληλα τη δυνατότητα ευκολότερης ανίχνευσης μέσω της φθοριομετρικής φασματοσκοπίας (Wei, et al., 2018).

Πιο συγκεκριμένα, η CML αντιπροσωπεύει το πιο διαδεδομένο AGE/ALE *in vivo*, ενώ παράλληλα συναντάται ευρέως στη διατροφή του ανθρώπου, με υψηλά ποσοστά αυτής να ανιχνεύονται σε λιπαρές τροφές (Sadowska-Bartosz et al., 2015; Han et al., 2013). Σημαντικός καθίσταται ο ρόλος της ως βιοδείκτης σε συνθήκες που σχετίζονται με το διαβήτη, την αθηροσκλήρωση καθώς και το οξειδωτικό στρες. Ο σχηματισμός της έχει βρεθεί ότι μπορεί να προέλθει μέσω ενός αριθμού διαφορετικών μονοπατιών. Πρωτίστως, η αλληλεπίδραση της γλυκόζης με την  $\epsilon$ -αμινομάδα της λυσίνης οδηγεί στη δημιουργία της  $N^{\epsilon}$ -φρουκτοζυλ-λυσίνη (FL), ενός προϊόντος Amadori, το οποίο οξειδώνεται για να σχηματιστεί εν τέλει η CML. Εναλλακτική οδός παραγωγής, αποτελεί η αντίδραση μεταξύ γλυοξάλης (GO) και λυσίνης, όπως περιγράφηκε ενδελεχώς παραπάνω. Επιπροσθέτως, η CEL, το ανάλογο της CML, σχηματίζεται κυρίως από την αντίδραση καταλοίπων λυσίνης με μεθυλογλυοξάλη (MGO) ακολουθώντας τον ίδιο μηχανισμό (Srey et al., 2010; Lima et al., 2010).

## 2.5 AGEs στα Τρόφιμα

Η περιεκτικότητα σε AGEs εξαρτάται από τη σύσταση ενός τροφίμου σε πρωτεΐνες, λίπος και υδατάνθρακες με τις πρωτεΐνες και το λίπος (κυρίως ζωικής προέλευσης) να εμφανίζουν μια θετική συσχέτιση στο σχηματισμό των AGEs. Υπάρχουν διαθέσιμες δύο μεγάλες βάσεις δεδομένων που αφορούν την περιεκτικότητα της *N*-(καρβοξυμεθυλ)λυσίνη, ένα κοινώς προσδιοριζόμενο AGE, σε >500 τρόφιμα. Στόχος η εκτίμηση της ημερήσιας κατανάλωσης διατροφικών AGEs (dAGEs) και η δημιουργία ενός διατροφικού πλάνου με χαμηλή περιεκτικότητα στις ενώσεις αυτές. Όπως έχει προκύψει, τρόφιμα πλούσια σε υγρασία όπως τα μήλα και διάφορα είδη ζύμης έχουν χαμηλό περιεχόμενο σε AGEs. Από την άλλη πλευρά, τρόφιμα με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης όπως το γάλα, η σκόνη γάλακτος και το κοτόπουλο, εμφάνισαν υψηλό περιεχόμενο. Αντιστοίχως, οι σοκολάτες, τα μπισκότα και τα ποπ-κορν με περιεκτικότητα σε λίπος > 20%, εμφανίζουν υψηλά ποσοστά. Σε διαφορετικά είδη κρέατος (βόειο, χοιρινό και κοτόπουλο) τα επίπεδα AGEs διαφέρουν λόγω διαφορετικής σύστασης σε λίπος, πρωτεΐνες και υγρασία. Εκτός από τη χημική σύσταση και την υγρασία ενός τροφίμου, παράγοντες όπως τα ιχνοστοιχεία, ο χρόνος αντίδρασης, η θερμοκρασία και το pH μπορούν επίσης να επιδράσουν στο σχηματισμό τους. Συστατικά των επεξεργασμένων τροφίμων που περιέχουν μπαχαρικά και πρόσθετα, όπως κέτσαπ, σόγια σώς, ζάχαρη, αλάτι και ξύδι, φαίνεται να επηρεάζουν επίσης την δημιουργία των ενώσεων αυτών (Uribarri et al., 2015; Wei et al., 2018).

## 2.6 Επίδραση και ρόλος των ALEs στην εμφάνιση ασθενειών και γήρανσης

Τα τελευταία χρόνια, έχει εδραιωθεί μέσα από πλήθος μελετών πως η υπερβολικά μεγάλη συσσώρευση των RCCs, επομένως και των ALEs/AGEs, σε ιστούς και σωματικά υγρά, μπορεί να σχετίζεται με προδιάθεση για εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη, να οδηγεί σε παθολογικές διαταραχές και να επιταχύνει τη γήρανση (Ramasamy et al., 2006; Semchyshyn 2014). Οι επιβλαβείς βιολογικές επιδράσεις των AGEs στους διάφορους ιστούς ασκούνται τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Αποδίδεται λοιπόν στην ικανότητά τους να σχηματίζουν διασταυρούμενους δεσμούς (cross-links) μεταβάλλοντας τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, κυρίως αυτών με μεγάλο χρόνο ημιζωής, όπως είναι το κολλαγόνο, αλλά και στην ικανότητά τους να συνδέονται με τους υποδοχείς τους (RAGEs), τροποποιώντας εν τέλει τις ιδιότητες του κυττάρου. Οι εν λόγω υποδοχείς, ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και εντοπίζονται στην επιφάνεια μιας ποικιλίας κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα αγγειακά λεία μυϊκά και τα πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα (Luenano-Contreras et al., 2010; Ashraf et al., 2015). Από την πρώτη πορεία, η επιτάχυνση του σχηματισμού AGEs με διασύνδεση πρωτεϊνών μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εξέλιξης του διαβήτη. Αντιθέτως, η δεύτερη διαδρομή, ενεργοποιεί τον υποδοχέα RAGE προκαλώντας χρόνια φλεγμονώδη απόκριση (Ramasamy et al., 2006; Ahmad et al., 2018; Wei et al., 2018).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συσσώρευση των AGEs/ALEs αυξάνεται με την ηλικία συμβάλλοντας στη γήρανση, ενώ η παρουσία τους σχετίζεται με ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών που προκαλούνται συνήθως στον ανθρώπινο οργανισμό από το οξειδωτικό στρες. Παραδείγματος χάριν, έχει αποδειχθεί ότι οι παραπάνω ενώσεις εμπλέκονται παθογενετικά στην ανάπτυξη και εξέλιξη χρόνιων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης, η νόσος του Alzheimer και του Parkinson, το εγκεφαλικό επεισόδιο, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ο καρκίνος, ο καταρράκτης και άλλες εκφυλιστικές νόσοι του οφθαλμού (Negre-Salvayre et al., 2008; Vistoli et al., 2013; Ashraf et al., 2015; Wei et al., 2018 ; Ahmad et al., 2018). Καθίσταται σαφές, πως ο κίνδυνος ανάπτυξης χρόνιων ασθενειών παρουσιάζει επιταχυνόμενη πορεία, όταν τα ενδογενή AGEs/ALEs πλαισιωθούν από την υπερβολική κατανάλωση και απορρόφηση των αντίστοιχων διατροφικών μορφών. Κλείνοντας, τα AGEs/ALEs, σχετίζονται με τα περισσότερα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, συμπεριλαμβανομένης της υπεργλυκαιμίας, της κοιλιακής παχυσαρκίας, της αυξημένης αρτηριακής πίεσης, και της νεφρικής βλάβης (Voziyan et al., 2014).

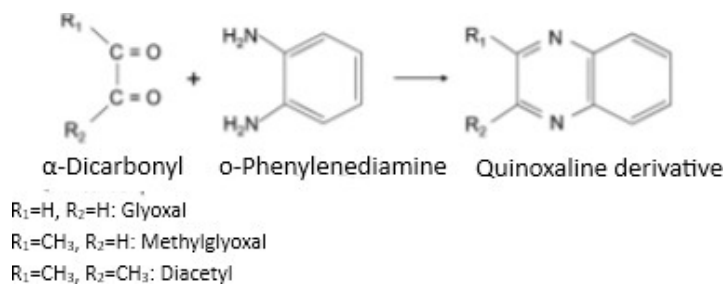
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - Τεχνικές Ανάλυσης των α-δικαρβονυλικών ενώσεων

### 3.1 Παραγωγή α-δικαρβονυλικών ενώσεων

Η ανάλυση των α-δικαρβονυλικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, συμπεριλαμβανομένων των γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη και διακετύλιο, θεωρείται εξαιρετικά



απαιτητική διαδικασία. Η δυσκολία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι οι προαναφερθείσες ουσίες είναι πολύ πτητικές, δραστικές και εξαιρετικά υδατοδιαλυτές. Επιπλέον, η απευθείας απομόνωσή τους από λιπίδια ή τρόφιμα πλούσια σε λιπαρά είναι σχεδόν αδύνατη. Προκειμένου να καταστεί εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός τους μέσω χρωματογραφικών τεχνικών ανάλυσης κρίνεται απαραίτητη η μετατροπή τους σε παράγωγα κινολαλινών μέσω αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης (Shibamoto, 2014).



**Εικόνα 9:** Αντίδραση σχηματισμού των παραγώγων κινολαλίνης μεταξύ γλυοξάλης (GO), μεθυλογλυοξάλης (MGO) ή διακετυλίου (DA) και ο-φαινυλενοδιαμίνης (OPD) (Shibamoto, 2014).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παγίδευση των ενώσεων σε υπερκείμενο χώρο, πραγματοποιείται μέσω κατάλληλων αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, όπως η κυστεαμίνη, η Ν-μεθυλδραζίνη και η ο-φαινυλενοδιαμίνη (OPD) (Shibamoto, 2006). Η τελευταία, αποτέλεσε σύμφωνα με πολλές μελέτες, το καταλληλότερο αντιδραστήριο για την παρασκευή των σταθερών, UV-ενεργών παραγώγων ο-φαινυλενοδιαμίνης (κινολαλίνες) από  $\alpha$ -δικαρβονυλικές ενώσεις όπως η γλυοξάλη, η μεθυλογλυοξάλη και το διακετύλιο (**Εικόνα 9**) (Arribas-Lorenzo & Morales, 2010; Degen et al., 2012; Wang et al., 2019). Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για την ανίχνευση και ανάλυση των παραπάνω ενώσεων που σχηματίζονται σε θερμικά οξειδωμένα διατροφικά έλαια (Fujioka & Shibamoto, 2004; Jiang et al., 2013).

Η προαναφερθείσα μέθοδος παραγωγοποίησης των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων στοχεύει στον τερματισμό της αντίδρασης Maillard καθώς και στην αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων που θα οδηγούσαν σε αναξιόπιστη ποσοτικοποίηση των τελικών προϊόντων (Cha et al., 2019). Επιπλέον, πρόκειται για μια αντίδραση που δύναται να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφρώς βασικές συνθήκες και επιτρέπει την ανίχνευση των ενώσεων χρησιμοποιώντας διάφορες αναλυτικές μεθόδους. Σε αυτές εντάσσονται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με UV ανίχνευση (HPLC-UV), η αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μαζών (GC-MS), η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD) και με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (GC-NPD). Μάλιστα, η τελευταία φαίνεται να

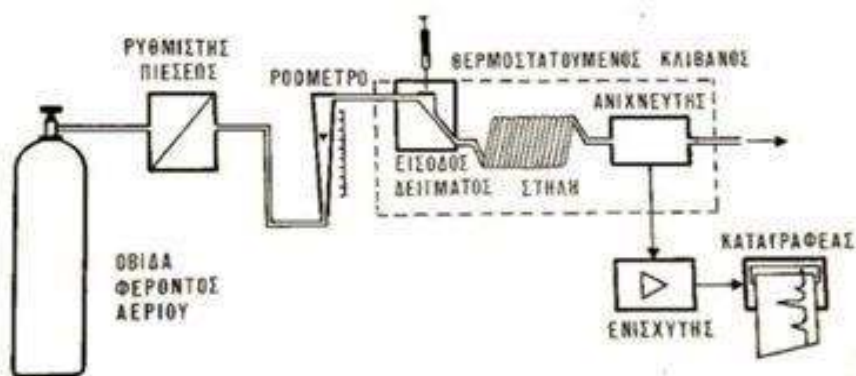
κερδίζει έδαφος έναντι των υπολοίπων, όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω (Shibamoto, 2014; Arribas-Lorenzo & Morales, 2010).

### 3.2 Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης

Η χρωματογραφία είναι μια ισχυρή τεχνική διαχωρισμού, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε ποικίλους κλάδους της επιστήμης. Εφευρέθηκε στις αρχές του εικοστού αιώνα από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett (1903). Συγκεκριμένα, ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μια σημαντική ομάδα ποικίλων μεθόδων, κατά τις οποίες διαχωρίζονται ουσίες με παρόμοιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα (Skoog, Holler & Crouch, 2007).

#### 3.2.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Στην αέρια-υγρή χρωματογραφία ή απλώς αέρια χρωματογραφία, ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή σε τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός αυτός αποδίδεται στις διαφορετικές ταχύτητες με τις οποίες κινούνται τα συστατικά μέσα στην στήλη, οι οποίες εξαρτώνται από την τάση ατμών των συστατικών αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Η τεχνική αυτή προσφέρει μια πλειάδα πλεονεκτημάτων όπως μεγάλη ευαισθησία, ταχύτητα, απλότητα, επίτευξη κάθε είδους διαχωρισμού ανεξάρτητα της δυσκολίας του, μη αλλοίωση των διαχωριζόμενων συστατικών καθώς επίσης και επιτυχή εφαρμογή τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση. Ως εκ τούτου, μετά την εισαγωγή της ως αναλυτική τεχνική από τους Martin & James το 1952, αναπτύχθηκε ραγδαίως και έγινε από τις πιο αποτελεσματικές και συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για αναλύσεις και διαχωρισμούς (Χατζηϊωάννου & Κούππαρη, 2010). Οι βασικές μονάδες ενός τυπικού αεριοχρωματογράφου παρουσιάζονται στην **Εικόνα 10**.



**Εικόνα 10:** Σχηματικό διάγραμμα αεριοχρωματογράφου (Πηγή: Χατζηϊωάννου & Κούππαρη, 2010).

Σημαντική προϋπόθεση για την εφαρμογή της τεχνικής είναι η πτητικότητα της χρωματογραφούμενης ουσίας (αναλύτης) στη θερμοκρασία της στήλης. Σε περιπτώσεις μη πτητικών ουσιών, αυτές θα πρέπει να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με τη βοήθεια των κατάλληλων αντιδραστηρίων (Χατζηϊωάννου & Κούππαρη, 2010). Παράλληλα με την απαιτούμενη πτητικότητα, οι αναλύτες οφείλουν να εμφανίζουν καλή θερμική σταθερότητα, προκειμένου να μην αποσυντίθεται στις υψηλές θερμοκρασίες που εντοπίζονται συχνά σε συστήματα GC (Hage, 2019). Επομένως, η ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγώγων κινόξαλίνης με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας εφαρμόζεται τακτικά λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας που εμφανίζει, ενώ η επιλογή του ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) επικρατεί έναντι των άλλων ανιχνευτών, όπως τονίζεται από πολλούς ερευνητές (Fujioka & Shibamoto, 2004; Jiang et al., 2013; Wang et al., 2019).

Ο NPD, όπως δηλώνει και το όνομά του, πρόκειται για έναν εκλεκτικό ανιχνευτή που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την ανάλυση ενώσεων που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο. Εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με τον ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID) με τη διαφορά ότι αντί για φλόγα, χρησιμοποιεί ηλεκτρική θέρμανση για την παραγωγή των ιόντων. Τα ιόντα αυτά σχηματίζονται κοντά ή πάνω σε μια θερμαινόμενη επιφάνεια σφαιριδίου, η οποία αποτελείται από ρουβίδιο. Το ισχυρότερο πλεονέκτημα που παρουσιάζει ο NPD είναι η εκλεκτικότητά του καθώς και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης ως προς τις ενώσεις που περιέχουν άζωτο και φωσφόρο. Επιπλέον, σε αντίθεση με τον FID, δεν ανιχνεύει πολλά κοινά αέρια ή προσμίξεις (Hage, 2019). Η ικανότητά του να περιορίζει τον ανεπιθύμητο θόρυβο που προκαλούν άλλες πτητικές ενώσεις οδηγεί σε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα και ενισχύει την καταλληλότητά του, υπό αυτές τις συνθήκες, έναντι άλλων ανιχνευτών, όπως είναι και ο MS (Zhu et al., 2020).

## ΣΚΟΠΟΣ

---

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων (γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη, διακετύλιο) σε δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιόλαδων. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα αρχικά υποβλήθηκαν σε θερμοξείδωση (150 °C/1h). Ακολούθησε ποσοτική ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (GC-NPD), αφού προηγήθηκε η παραγωγοποίησή τους μέσω του αντιδραστηρίου OPD. Συμπληρωματικά, προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων δειγμάτων μέσω της δοκιμής Folin-Ciocalteu, με απώτερο στόχο να μελετηθεί η επίδρασή του στο σχηματισμό των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- Μεθοδολογία Πειραμάτων

### 4.1 Υλικά και Μέθοδοι

#### 4.1.1 Δείγματα Ελαιολάδου

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εξετάστηκαν 20 δείγματα εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου (EVOO), τα οποία προέρχονται από διαφορετικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**. Τα ελαιόλαδα προέρχονται από ελαιόδεντρα της ποικιλίας Κορωνέικη, πρόκειται για εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα (EVOO) και επιλέχθηκαν με βάση τη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά συστατικά (TPC). Αξίζει να αναφερθεί πως τα εν λόγω δείγματα συλλέχθηκαν στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Οι Δρόμοι της Ελιάς», αρωγός του οποίου αποτέλεσε το Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του ΓΠΑ.

**Πίνακας 2:** Ταξινόμηση των εξεταζόμενων ελαιολάδων ως προς την ποικιλία και την περιοχή τους.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ
KOR_HER_OO_01	Ηράκλειο
KOR_HER_OO_02	Ηράκλειο
KOR_HER_OO_09	Ηράκλειο
KOR_HER_OO_10	Ηράκλειο
KOR_RET_OO_03	Ρέθυμνο
KOR_RET_OO_05	Ρέθυμνο
KOR_CHA_OO_04	Χανιά
KOR_CHA_OO_05	Χανιά
KOR_LAS_OO_06	Λασιθί
KOR_LAS_OO_07	Λασιθί
KOR_LES_OO_01	Λέσβος
KOR_LES_OO_08	Λέσβος
KOR_LES_OO_09	Λέσβος
KOR_LES_OO_14	Λέσβος
KOR_LES_OO_16	Λέσβος
KOR_MES_OO_02	Μεσσηνία
KOR_MES_OO_05	Μεσσηνία
KOR_MES_OO_08	Μεσσηνία
KOR_MES_OO_09	Μεσσηνία

## 4.2 Προσδιορισμός των $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων

### 4.2.1 Υλικά και Αναλώσιμα

- Ποτήρια ζέσεως των 25, 50, 250 και 1000 mL
- Ογκομετρικές φιάλες των 10, 25 και 50 mL
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL
- Σφαιρικές φιάλες των 25 και 50 mL
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur
- Μηχανικές πιπέτες μεταβλητού όγκου 2-20 και 100-1000  $\mu$ L και τιπς
- Γυάλινη ράβδος
- Μαγνήτες
- Υδροβολέας
- Φιαλίδια αυτόματου δειγματολείπτη (2 mL)

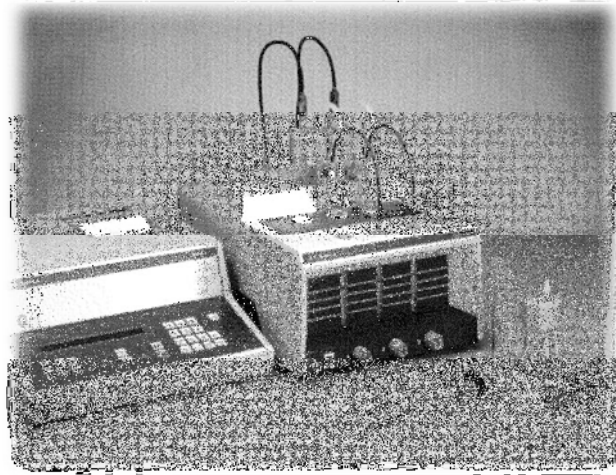
### 4.2.2 Αντιδραστήρια και πρώτες ύλες

- Διάλυμα 2-μεθυλογλυοξάλης 40% σε νερό, (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany)
- Κινοξαλίνη (QX), 98% (Alfa Aesar, Kandel, Germany)
- 2-μεθυλοκινοξαλίνη (2-MQX), 97% (Acros Organics, Geel, Belgium)
- 2,3-διμεθυλοκινοξαλίνη (2,3-DMQX), 97% (Acros Organics, Geel, Belgium)
- Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης: ο-φαινυλοδιαμίνη (OPD) flaked 99,5%, (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany)
- Εσωτερικό πρότυπο (ISTD): Βενζοθειαζόλη, 97% (Acros Organics, Geel Belgium)
- Οξικός αιθυλεστέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας  $\geq 99,8\%$  (Labscan International Ltd., Dublin, Ireland)
- Διάλυμα καυστικού νατρίου NaOH 1% w/v
- Σαπούνι RBS 50 solution, (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O

### 4.2.3 Όργανα – Συσκευές

- Rancimat (679, Metrohn, Herisau, Switzerland (**Εικόνα 11**))
- Orbital shaker OS 10, Boeco, Germany
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Rotary evaporator), IKA RV 05 (Staufen, Germany)
- Αναλυτικός ζυγός, Mettler AE 200
- Υδατόλουτρο, Lauda Alpha A6
- Φούρνος, Memmert UNB
- Μαγνητικός αναδευτήρας (για καθαρισμό), (VELP Scientifica, Usmate, Italy)

- Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου, Fisons Instruments GC 8000 series (NPD 800), (Fisons Instruments, Glasgow, UK)



**Εικόνα 11:** Η συσκευή Rancimat 679 και το καταγραφικό της.

#### **4.2.4 Προετοιμασία διαλυμάτων παρακαταθήκης και διαλυμάτων εργασίας**

##### Διάλυμα παρακαταθήκης αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (*o*-Phenylenediamine, OPD)

Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 0,01 g (με ακρίβεια 0,1 mg) *o*-φαινυλοδιαμίνης (OPD) και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Αφού προστεθεί μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα με σκοπό την πλήρη διαλυτοποίηση της ουσίας, ακολουθεί πλήρωση της φιάλης με τον διαλύτη μέχρι την χαραγή. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1 g/L. Είναι απαραίτητο για τη μετατροπή των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε πτητικά παράγωγα κινοξαλινών (Jiang et al., 2013; Wang et al., 2019).

##### Διάλυμα εργασίας αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (*o*-Phenylenediamine, OPD)

Σε δύο ογκομετρικές φιάλες των 25 mL μεταφέρονται ισόποσα 5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης που παρασκευάστηκε προηγουμένως. Οι φιάλες συμπληρώνονται με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι την χαραγή, ενώ η τελική συγκέντρωση των δύο νέων διαλυμάτων είναι 0,2 g/L.

##### Πρωτογενές Διάλυμα εσωτερικού προτύπου, ISTD (*benzothiazole*)

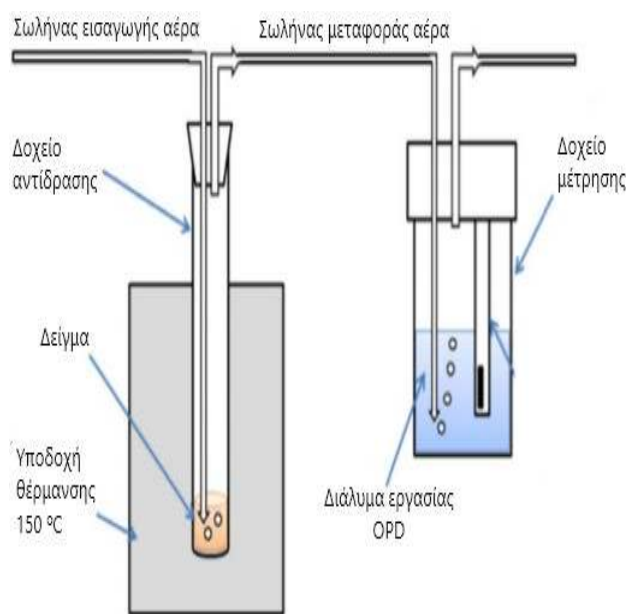
Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL ζυγίζονται 0,1 g (με ακρίβεια 0,1 mg) εσωτερικού προτύπου (βενζοθειαζόλη) και στη συνέχεια προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας ως διαλύτης για συμπλήρωση της φιάλης μέχρι τη χαραγή. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10 g/L. Η βενζοθειαζόλη έχει επιλεγεί καθώς παρέχει σήμα με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των αναλυτών και προστίθεται πριν την ανάλυση σε όλα τα δείγματα και διαλύματα βαθμονόμησης

σε σταθερή ποσότητα προκειμένου να αντισταθμίσει τυχαία και συστηματικά σφάλματα. Αποθηκεύεται στη κατάψυξη και προτείνεται η συχνή ανανέωσή του.

#### 4.2.5 Θερμοοξείδωση ελαιολάδων και σύνθεση παραγώγων κινολίνης

Η συσκευή Rancimat αποτελεί την επίσημη μέθοδο προσδιορισμού της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπαρών υλών και επομένως συμβάλλει στην αξιολόγηση και την ενδεχόμενη αλλοίωση της ποιότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους.

Η μέθοδος στηρίζεται στην επιταχυνόμενη οξείδωση λιπαρών υλών μέσω της έκθεσής τους σε υψηλή θερμοκρασία και σταθερή παροχή αέρα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, αρχίζουν να λαμβάνουν χώρα οξειδωτικές αντιδράσεις. Τα πτητικά δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης που σχηματίζονται, διοχετεύονται σε δοχείο αντίδρασης που περιέχει απιονισμένο νερό, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ηλεκτρική του αγωγιμότητα η οποία μετράται και καταγράφεται.



**Εικόνα 12:** Συσκευή Rancimat όπως τροποποιήθηκε για την παραγωγή  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων και την παραγωγοποίησή τους σε κινολίνες κατά τη θέρμανση ελαιολάδων (αριστερά) και σχηματική αναπαράσταση της συνδεσμολογίας της (δεξιά).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η απομόνωση και ανάλυση των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων παρουσιάζει πολλές δυσκολίες λόγω της φύσης των ενώσεων αυτών. Είναι πολύ πτητικές, ιδιαίτερα δραστικές καθώς και πολυμερίζονται πολύ εύκολα. Για αυτόν τον λόγο πολλοί ερευνητές (Jiang et al., 2013; Wang et al., 2019) έχουν αναπτύξει μεθόδους που βασίζονται στον σχηματισμό ατμών στον υπερκείμενο χώρο (headspace) λιπαρών υλών. Στην



παρούσα εργασία, η συσκευή Rancimat χρησιμοποιήθηκε με ορισμένες τροποποιήσεις στην συνδεσμολογία (**Εικόνα 12**) ώστε να επιτευχθεί η επιταχυνόμενη οξείδωση των δειγμάτων ελαιολάδων καθώς και η διοχέτευση των πτητικών  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων στο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης. Τα δείγματα τοποθετούνται σε σταθερή θερμοκρασία στους 150 °C για μία ώρα (Wang et. al., 2019) και παράλληλα τροφοδοτούνται με σταθερή ροή αέρα (1,8 L/hr). Η θερμοκρασία αυτή (150 °C) επιλέχθηκε καθώς σε θερμοκρασίες  $\geq 150$  °C τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης (ROOH) μετατρέπονται ταχέως σε δευτερογενή, συμπεριλαμβανομένων και των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων (Velasco & DeBarganes, 2002). Η αέρια φάση διοχετεύεται μέσω λεπτού σωλήνα (σωλήνας μεταφοράς αέρα) στο διάλυμα ο-φαινυλοδιαμίνης όπου ακολουθεί η παραγωγοποίηση.

Συνοπτικά τα βήματα παραγωγής  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων και παραγωγοποίησής τους σε παράγωγα κινολαίνης (20 δείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με υψηλό και χαμηλό φαινολικό περιεχόμενο) παρουσιάζονται ακολούθως:

- 1) Ζυγίζονται περίπου 10 g (με ακρίβεια 0,1 mg) από κάθε δείγμα ελαιολάδου και τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία αντίδρασης (reaction vessel).
- 2) Ακολουθεί ρύθμιση των παραμέτρων στη συσκευή Rancimat και αναμονή έως ότου η θερμοκρασία φτάσει στους 150 °C .
- 3) Το δοχείο αντίδρασης κλείνει προσεκτικά με το καπάκι ώστε ο γυάλινος σωλήνας εισροής του αέρα να είναι βυθισμένος μέσα στο δείγμα.
- 4) Παρομοίως, συνδέονται και τα γυάλινα δοχεία μέτρησης-υποδοχής (measuring vessel) προσαρμόζοντας κατάλληλο φίλτρο που προκαλεί ανατάραξη του δείγματος. Τα δοχεία αυτά, όπου εισάγεται το διάλυμα εργασίας ο-φαινυλοδιαμίνης, τοποθετούνται σε πάγο με σκοπό την καλύτερη διαλυτοποίηση των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων από την αέρια στην υγρή φάση.
- 5) Μόλις η θερμοκρασία φτάσει τους 150 °C τα γυάλινα δοχεία αντίδρασης εισέρχονται στις ειδικές οπές και συνδέονται με τον σωλήνα εισαγωγής αέρα. Ρυθμίζεται η ροή του αέρα που διαβιβάζεται στα δείγματα, ενώ παράλληλα μεταξύ των δοχείων αντίδρασης και μέτρησης τοποθετείται ελαστικός σωλήνας μεταφοράς αερίων.
- 6) Ακολουθεί η θερμοοξείδωση των δειγμάτων, η οποία λαμβάνει χώρα για 1 hr. Τα παραγόμενα πτητικά προϊόντα της οξείδωσης μεταφέρονται από το ρεύμα αέρα και παγιδεύονται στα δοχεία υποδοχής.
- 7) Έπειτα, το διάλυμα εργασίας ο-φαινυλοδιαμίνης μεταφέρεται σε σφαιρικές φιάλες. Οι σφαιρικές φιάλες τοποθετούνται σε orbital shaker στις 250 rpm για 40 min. Η εν λόγω ανάδευση αποτελεί απαραίτητη διαδικασία, καθώς δίνεται η δυνατότητα στις πτητικές ενώσεις να διαλυτοποιηθούν εξ ολοκλήρου και σε θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα την καλύτερη παγίδευσή τους από το διάλυμα OPD.

- 8) Το διάλυμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού στους 40 °C, με σκοπό τη συμπύκνωσή του και την απομάκρυνση του οξικού αιθυλεστέρα (διαλύτης παραγωγοποίησης).
- 9) Η τελική ποσότητα του συμπυκνωμένου δείγματος αντιστοιχεί περίπου σε 0,5 mL και μεταφέρεται σε φιαλίδια (vials) με μηχανική πιπέτα. Στο φιαλίδιο προστίθενται 20 µL διαλύματος εσωτερικού προτύπου και ο όγκος συμπληρώνεται με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι το 1 mL.
- 10) Το συμπυκνωμένο δείγμα οδηγείται για ανάλυση και προσδιορισμό των GO, MGO και DA ως αντίστοιχα παράγωγα κινοξαλίνης μέσω του GC-NPD.
- 11) Ακολουθεί σχολαστικό πλύσιμο των γυάλινων τμημάτων και σκευών της συσκευής Rancimat. Αρχικά, αφαιρούνται τα υπολείμματα ελαιολάδου με ακετόνη και στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο παρουσία σαπουνιού Fluka και απιονισμένου νερού στους 70 °C για 2h. Έπειτα, μεταφέρονται σε φούρνο στους 100 °C για 1h.
- 12) Αντιθέτως, τα πλαστικά μέρη και σωληνάκια πλένονται με ζεστό απιονισμένο νερό και σαπουνί Fluka για περίπου 1h. Αφού πραγματοποιηθεί απομάκρυνση του σαπουνιού με απιονισμένο νερό, τα σωληνάκια τοποθετούνται σε φούρνο στους 90 °C, ενώ τα καπάκια στεγνώνουν σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **4.2.6 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κινοξαλινών**

##### Πρωτογενές πρότυπο διάλυμα κινοξαλινών για ποσοτικό προσδιορισμό

Για την παρασκευή του πρωτογενούς πρότυπου διαλύματος (stock solution) ζυγίζονται περίπου 0,01 g (με ακρίβεια 0,1 mg) από τις εξής πρότυπες ουσίες: κινοξαλίνη, 2-μεθυλοκινοξαλίνη, 2,3-διμεθυλοκινοξαλίνη σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Αφού προστεθεί μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα με σκοπό την πλήρη διαλυτοποίηση των ουσιών, ακολουθεί συμπλήρωση της φιάλης με τον διαλύτη μέχρι την χαραγή. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1 g/L. Αποθηκεύεται στη κατάψυξη και προτείνεται η συχνή ανανέωσή του.

##### Πρότυπα Διαλύματα (εργασίας) βαθμονόμησης παραγώγων κινοξαλινών

Προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα οξικού αιθυλεστέρα των τριών παραγώγων κινοξαλίνης. Πιο συγκεκριμένα, εκτελείται κατάλληλη αραιώση του μητρικού διαλύματος ( $C=1000 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) με οξικό αιθυλεστέρα ούτως ώστε να προκύψουν διαλύματα εργασίας με συγκεντρώσεις που ποικίλλουν από 0,2 έως 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (0.2, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

Παραδείγματος χάριν, για το πρότυπο διάλυμα εργασίας με  $C=50 \mu\text{g} / \text{mL}$  (ή αλλιώς 50 ppm), σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 500  $\mu\text{L}$  από το πρωτογενές πρότυπο διάλυμα κινόξαλινών. Στη συνέχεια, προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου. Εν τέλει, η φιάλη συμπληρώνεται με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι την χαραγή. Η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα εκ νέου κάθε ημέρα ανάλυσης των δειγμάτων και επαναλαμβάνεται για κάθε πρότυπο διάλυμα αναφοράς οποιασδήποτε συγκέντρωσης. Αξίζει ωστόσο να αναφέρουμε πως για τη διεξαγωγή του πειράματος και μετά από πολλαπλές δοκιμές, οι συγκεντρώσεις των προτύπων που θεωρήθηκαν καταλληλότερες ήταν οι 0,2-100 ppm.

#### 4.2.7 Προσδιορισμός παραγώγων κινόξαλίνης με αέρια χρωματογραφία

Ο προσδιορισμός των παραγώγων κινόξαλίνης έγινε με αέρια χρωματογραφία., προκειμένου στη συνέχεια τα αποτελέσματα να μετατραπούν σε συγκεντρώσεις γλυοξάλης, μεθυλογλυοξάλης και διακετυλίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD), Shimadzu GC-2010 Plus και με τη στήλη Agilent CP-Wax 52CB (30 m X 0,32 mm i.d., d.f. 0,25 $\mu\text{m}$ ). Ως φέρον αέριο, χρησιμοποιήθηκε το He, ενώ ο λόγος διαμοιρασμού ισούται με 1:10 (split ratio). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στους 250 και 300 °C, αντίστοιχα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα φαίνεται στον **Πίνακα 3**. Η έγχυση των δειγμάτων (1  $\mu\text{L}$ ) γινόταν στη στήλη με τη βοήθεια μικροσύριγγας. Τέλος, το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων ήταν το GCMS Solution Version 4.30 (Shimadzu).

**Πίνακας 3:** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθείται κατά τη διάρκεια ανάλυσης των δειγμάτων ελαιολάδου.

Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός ανόδου (°C/min)
1	80,0	-
2	200,0	8
15	240,0	20

#### 4.2.8 Υπολογισμός της επί τοις % περιεκτικότητας των $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων

Μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης που προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα αναφοράς των παραγώγων κινοξαλίνης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση κινοξαλίνης, 2-μεθυλοκίνοξαλίνης και 2,3-διμεθυλοκίνοξαλίνης σε ppm. Η μετατροπή των παραπάνω παραγώγων σε GO, MGO και DA, αντίστοιχα, βασίζεται στην εξίσωση:

$$C_{GO(\mu\text{g/g})} = \frac{\text{Κινοξαλίνη } (\mu\text{g})}{\text{Mr Κινοξαλίνης } (\frac{\text{g}}{\text{mol}})} \cdot \text{GO}(\text{g/mol}) * \text{Mr}$$

*Ελαιόλαδο(g)*

$\text{Mr}_{\text{κίνοξαλίνης}} = 130,15 \text{ g/mol}$  και  $\text{Mr}_{\text{γλυοξάλης}} = 58,04 \text{ g/mol}$

Ομοίως, υπολογίζεται η συγκέντρωση της MGO και του DA.

Η τελική επί τοις % περιεκτικότητα των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων προκύπτει ως εξής:

$$\% \text{ GO} = \frac{C_{\text{go}}(\mu\text{g/g})}{\text{SUM}(\mu\text{g/g})} * 100 \% \quad (2), \text{ όπου:}$$

SUM το άθροισμα των τριών συγκεντρώσεων των παραπάνω ενώσεων σε  $\mu\text{g/g}$ .

Ομοίως, υπολογίζεται η επί τοις % περιεκτικότητα των MGO και του DA. Για κάθε δείγμα ελαιολάδου ελήφθησαν δυο μετρήσεις της εκάστοτε ένωσης και επομένως στα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητα αυτών.

### 4.3 Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

#### Σκοπός

Η ποσοτική εκτίμηση των ολικών φαινολικών συστατικών των υπό μελέτη δειγμάτων.

#### Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) αποτελεί μία φασματοφωτομετρική διαδικασία που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πολυφαινολών στο πολικό μέρος τροφίμων, όπως είναι το παρθένο ελαιόλαδο, το κρασί, οι χυμοί φρούτων κ.α. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το ομόλογο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το οποίο πρόκειται για ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ) και φωσφοβολφραμικά ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, παρουσία διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , τα φαινολικά συστατικά οξειδώνονται, ενώ παράλληλα τα ετεροπολυμερή οξέα (αντιδραστήριο FC) υφίστανται αναγωγή προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). Η χαρακτηριστική κυανή χρώση παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 765 nm. Η ένταση

της απορρόφησης του φωτός σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα καφεϊκού ή γαλλικού οξέος. Με αναγωγή στην ποσότητα του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή του πολικού κλάσματος, υπολογίζεται η περιεκτικότητα του ελαίου σε ολικά φαινολικά συστατικά. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg ισοδυνάμων καφεϊκού ή γαλλικού οξέος / kg ελαίου, αντίστοιχα.

Με τη διαδικασία αυτή, εκτιμάται η παρουσία όλων των ενώσεων που είναι οξειδώσιμες κάτω από τις συνθήκες της αντίδρασης. Η μέθοδος δεν είναι εξειδικευμένη, αφού συνπροσδιορίζονται εκτός από τις φαινόλες, και άλλα συστατικά του εκχυλίσματος που έχουν αναγωγική δράση, όπως είναι οι αμίνες και οι νιτροενώσεις.

#### **4.3.1 Υλικά και Αναλώσιμα**

- Πλαστικές πιπέτες Pasteur
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου 100-1000  $\mu\text{L}$  και τιπς
- Ογκομετρικός κύλινδρος (100 mL)
- Ογκομετρικές φιάλες των 10, 50 και 100 mL
- Πλαστικοί σωλήνες (FALCON) των 15 mL
- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου των 50 mL με βιδωτό πώμα
- Σιφόνια πλήρωσεως των 2, 5 και 10 mL
- Eppendorf των 2 mL
- Πλαστικές κυψελίδες
- Στατώ

#### **4.3.2 Αντιδραστήρια**

- Μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας,  $\geq 99,8\%$  (Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Εξάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας,  $\geq 97\%$  (Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% w/v
- Διάλυμα γαλλικού οξέως ως πρότυπο (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ)
- Υδατικό διάλυμα Folin-Ciocalteu 1:10 v/v
- Απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$

#### **4.3.3 Όργανα-Συσκευές**

- Κυκλοαναδευτήρας (Votrex), VELP Scientifica, Usmate, Italy
- Φυγόκεντρος, Hermle Z 326 K
- Αναλυτικός ζυγός, Kern Pfb( $\pm 0,00$  g)

- Φαρμακευτικός ζυγός, Mettler AE 200 ( $\pm 0,0000$  g)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους (UV-VIS), JASCO V-530, Tokyo, Japan

#### **4.3.4 Παρασκευή διαλυμάτων και προτύπων**

##### Παρασκευή διαλύματος $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 7,5% w/v

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Στη συνέχεια, ακολουθεί αραίωση με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Η προσθήκη του νερού γίνεται αργά και με συνεχή ανάδευση για πλήρη διαλυτοποίηση της ουσίας.

##### Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος (μητρικό)

Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος  $1000 \mu\text{g/mL}$  ζυγίζονται περίπου 0,05 g γαλλικού οξέος (με ακρίβεια 0,1 mg) και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, η οποία περιέχει περίπου 30 mL μίγματος Μεθανόλη:Νερό (60/40 v/v). Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύεται προκειμένου να διαλυτοποιηθεί πλήρως το γαλλικό οξύ και στη συνέχεια η φιάλη συμπληρώνεται με το ίδιο μίγμα μέχρι τη χαραγή.

##### Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων βαθμονόμησης, με σκοπό την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, πραγματοποιείται κατάλληλη αραίωση του μητρικού διαλύματος γαλλικού οξέος ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ). Συγκεκριμένα, από το μητρικό διάλυμα μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 100, 200, 400, 600 και 800  $\mu\text{L}$  σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Η τελική συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων βαθμονόμησης ποικίλλει από 10 έως 80  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.3.5 Δοκιμή Folin-Ciocalteu**

Για την εφαρμογή της δοκιμής απαιτείται η εκχύλιση του πολικού φαινολικού κλάσματος των ελαιολάδων και ακολουθεί η εφαρμογή της δοκιμής Folin-Ciocalteu στα εκχυλίσματα. Πιο αναλυτικά:

##### *A) Εκχύλιση φαινολικών συστατικών*

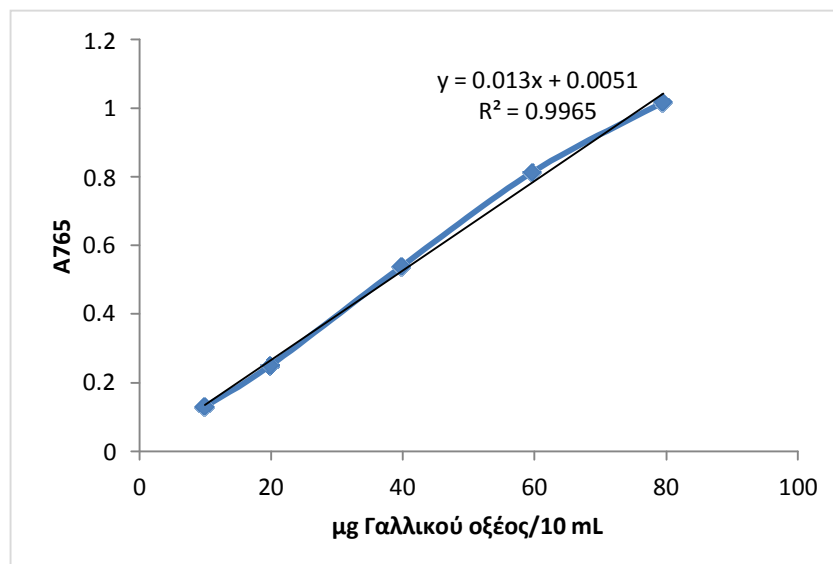
1. Ζυγίζεται 1 g ελαιολάδου (με ακρίβεια 0,1 mg) και μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρου των 50 mL.
2. Προστίθενται 2 mL εξανίου με σιφόνιο και το περιεχόμενο αναδεύεται για περίπου 30 sec σε κυκλοαναδευτήρα.

3. Προστίθενται 2 mL μίγματος MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) με σιφόνιο και το περιεχόμενο αναδεύεται για 2 min σε κυκλοαναδευτήρα.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 2500 rpm.
5. Αφαιρείται η άνω στοιβάδα του εξανίου (μη πολικό κλάσμα) με τη χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur και απορρίπτεται.
6. Τελικά, συλλέγεται μέρος της κατώτερης στοιβάδας, η οποία περιέχει το σύνολο των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (υδατομεθανολική φάση) και μεταφέρεται σε erpendorfs.

#### B) Δοκιμή Folin-Ciocalteu

1. Σε πλαστικό σωλήνα των 15 mL μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 0,5 mL υδατομεθανολικού εκχυλίσματος και 0,5 mL απιονισμένου νερού.
2. Σε ένα δεύτερο πλαστικό σωλήνα των 15 mL μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 1,0 mL του κάθε διαλύματος βαθμονόμησης. Σε έναν τρίτο μεταφέρεται 1,0 mL απιονισμένο νερό για τον λευκό προσδιορισμό.
3. Έπειτα, σε κάθε σωλήνα προστίθενται με σιφόνιο 5 mL αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu 1:10 v/v και αφήνονται σε ηρεμία για 3 min.
4. Στη συνέχεια, προστίθενται 4,0 mL διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% w/v.
5. Ακολούθως, τα διαλύματα παραμένουν σε σκοτεινό μέρος για 2h και κατόπιν μεταφέρονται σε πλαστικές κυψελίδες για μέτρηση της απορρόφησής τους στα 765 nm.

#### 4.3.6 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων



**Διάγραμμα 1:** Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος.

Προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα αναφοράς με συγκεντρώσεις που ποικίλλουν από 10 έως 80  $\mu\text{g GA/mL}$ , μέσω κατάλληλης αραιώσης του μητρικού διαλύματος γαλλικού οξέος ( $C=1000 \mu\text{g/mL}$ ). Για κάθε διάλυμα βαθμονόμησης, μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 765nm. Η παραπάνω γραφική παράσταση είναι γραμμική στο εύρος ανίχνευσης 10-80  $\mu\text{g GA/mL}$  με  $R^2=0,9965$  και εξίσωση ευθείας  $y = 0.013x + 0.0051$ .

#### **4.3.7 Υπολογισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου**

Μέσω της παραπάνω εξίσωσης της ευθείας προκύπτει ότι το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά Kg εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου. Συγκεκριμένα, οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{mg GAE / kg EVOO} = (4 * k) / m \quad \text{(3)}, \text{ όπου:}$$

k τα  $\mu\text{g GAE}$  τα οποία περιέχονται σε 0,5 mL υδατομεθανολικού εκχυλίσματος και m η μάζα του εκάστοτε δείγματος ελαιόλαδου (g).

#### **4.3.8 Στατιστική επεξεργασία**

Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (One-Way ANOVA) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Statgraphics Centurion 16.1.11.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων (GO, MGO, DA) που σχηματίζονται στον υπερκείμενο χώρο των θερμαινόμενων ελαιολάδων, λαμβάνει χώρα η ανάλυση των σχηματιζόμενων, έπειτα από παραγωγοποίηση με OPD, σταθερών παραγώγων κιννοξαλίνης. Μετά την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση τους, ακολουθεί η μετατροπή τους στις αντίστοιχες  $\alpha$ -δικαρβονυλικές ενώσεις από τις οποίες προέρχονται. Στον ακόλουθο **Πίνακα 4**, παρουσιάζονται οι τιμές που αφορούν τη μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε 13 δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων (EVOOs), όπως προέκυψαν από τις σχέσεις (1) και (2) που περιγράφηκαν στο πειραματικό μέρος. Τα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν λόγω των επαναλήψιμων τιμών που απέδωσαν, γεγονός που συνάδει και με τις χαμηλές τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD).

**Πίνακας 4:** Η μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας  $\pm$  SD των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων (GO, MGO, DA) σε 13 δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων (EVOOs).

Κωδικός Δείγματος	n	Μέση τιμή GO (%)	Μέση τιμή MGO (%)	Μέση τιμή DA (%)
KOR_HER_OO_09	2	3.43 $\pm$ 0.44	7.61 $\pm$ 2.74	88.96 $\pm$ 3.18
KOR_HER_OO_10	2	10.09 $\pm$ 2.14	12.52 $\pm$ 0.94	<b>77.39 <math>\pm</math> 1.20</b>
KOR_RET_OO_03	2	5.20 $\pm$ 1.77	7.29 $\pm$ 0.99	87.50 $\pm$ 0.78
KOR_RET_OO_05	2	5.05 $\pm$ 1.56	10.32 $\pm$ 2.61	84.62 $\pm$ 1.04
KOR_CHA_OO_04	2	6.70 $\pm$ 3.22	9.29 $\pm$ 0.20	84.00 $\pm$ 3.42
KOR_CHA_OO_05	2	4.75 $\pm$ 2.07	8.96 $\pm$ 1.47	86.29 $\pm$ 3.54
KOR_LES_OO_01	2	0.58 $\pm$ 0.15	0.98 $\pm$ 0.26	98.44 $\pm$ 0.41
KOR_LES_OO_09	3	<b>12.63 <math>\pm</math> 1.37</b>	9.80 $\pm$ 2.88	77.57 $\pm$ 4.16
KOR_LES_OO_14	2	4.29 $\pm$ 0.92	<b>13.62 <math>\pm</math> 5.03</b>	82.09 $\pm$ 5.03
KOR_MES_OO_02	2	4.75 $\pm$ 0.06	6.09 $\pm$ 1.46	89.17 $\pm$ 1.53
KOR_MES_OO_05	2	<b>0.40 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>0.77 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>98.83 <math>\pm</math> 0.09</b>
KOR_MES_OO_08	2	9.53 $\pm$ 3.71	9.89 $\pm$ 3.02	80.68 $\pm$ 6.87
KOR_MES_OO_12	2	0.58 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.11	<b>98.60 <math>\pm</math> 0.11</b>

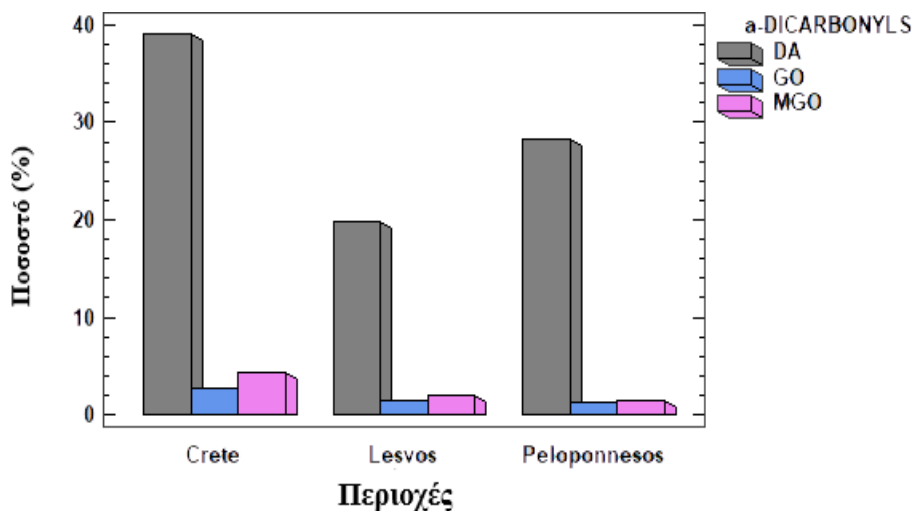
Από τον παραπάνω **Πίνακα 4**, παρατηρούμε πως το διακετύλιο είναι η ένωση με το υψηλότερο ποσοστό επί του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων (87.23  $\pm$  7.49 %). Πιο συγκεκριμένα, η εκατοστιαία περιεκτικότητα των δειγμάτων σε διακετύλιο κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών από 98.83 έως 77.39 %, με τα υψηλότερα ποσοστά να αφορούν τα ελαιόλαδα με κωδικό δείγματος KOR\_MES\_OO\_05 και KOR\_MES\_OO\_12. Από την άλλη πλευρά, οι παραγόμενες μεθυλογλυοξάλη και γλυοξάλη που ακολουθούν, εμφανίζουν μεγάλη ανομοιογένεια στις επί τοις % περιεκτικότητές τους (RSD% > 10%), με εύρος τιμών από 0.77

έως 13.62 % και από 0.40 έως 12.63 %, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω Πίνακα, στα ελαιόλαδα KOR\_MES\_OO\_05 και KOR\_MES\_OO\_12 συναντώνται τα χαμηλότερα ποσοστά που αντιστοιχούν στις MGO και GO. Αξίζει να αναφερθεί πως έπειτα από κατάλληλους υπολογισμούς, η μέση συγκέντρωση γλυοξάλης και μεθυλογλυοξάλης των παραπάνω EVOOs σε  $\mu\text{g/g}$ , βρέθηκε ίση με  $36.36 \pm 24.21 \mu\text{g/g}$  και  $54.64 \pm 31.23 \mu\text{g/g}$ , αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, η μέση συγκέντρωση του διακετυλίου επί όλων των δειγμάτων δίνει εξαιρετικά υψηλή τιμή ( $3448.3 \pm 5950.01 \mu\text{g/g}$ ) που δεν καθίσταται έγκυρη με βάση την επί τοις % σχετική τυπική απόκλιση ( $\text{RSD \%} = 172.55 \%$ ). Ενδεικτικά λοιπόν, όσον αφορά το ελαιόλαδο με κωδικό δείγματος KOR\_HER\_OO\_10, αυτό εμφανίζει μέση συγκέντρωση DA ίση με  $339.28 \pm 49.82 \mu\text{g/g}$  ( $n=2$ ,  $\text{RSD \%} = 14.68 \%$ ), μία τιμή που φαίνεται να παρίσταται και σε άλλα δείγματα ελαιολάδου.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν καταγραφεί αρκετές  $\alpha$ -δικαρβονυλικές ενώσεις που σχηματίζονται τόσο κατά την επεξεργασία (όπως ζύμωση) όσο και κατά τη θέρμανση διάφορων τροφίμων και ποτών. Μια πρόσφατη έρευνα των Maasen et al., το 2020, υπογράμμισε πως οι συγκεντρώσεις των δικαρβονυλίων GO και MGO καθίστανται υψηλές στο μέλι Manuka ( $C_{\text{MGO}}=25-736 \text{ mg/kg}$ ), στα αποξηραμένα φρούτα και στις καραμέλες ( $> 200 \text{ mg / kg}$ ), ενώ είναι χαμηλές στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στο λευκό ξύδι καθώς και στο ελαιόλαδο ( $<10 \text{ mg / kg}$ ), τονίζοντας πως η θερμική επεξεργασία οδηγεί στην αύξηση των συγκεντρώσεων των ενώσεων αυτών (Maasen et al., 2020; Degen et al., 2012). Στο ίδιο συμπέρασμα, έχουν καταλήξει πολλοί ερευνητές (Fujioka & Shibamoto, 2004; Jiang et al., 2013), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη. Οι τελευταίοι, κάνουν λόγο για σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των παραγόμενων GO, MGO και DA στον υπερκείμενο χώρο, σε τροφές όπως το βούτυρο και η μαργαρίνη, όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 100 στους 200 °C.

Όσον αφορά την παραγωγή GO και MGO κατά τη θερμική επεξεργασία δειγμάτων διατροφικών ελαίων (έλαιο τόνου, σολομού, σόγιας, ελαιόλαδο και αραβοσιτέλαιο), έχει αποδειχθεί πως αυτές συναντώνται σε μικρό βαθμό στα ελαιόλαδα. Σύμφωνα με μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2004 από τους Fujioka & Shibamoto, οι συγκεντρώσεις GO και MGO βρέθηκαν ίσες με 0,8-1 ppm (200°C, 1h) και 0,4-0,6 ppm (200°C, 1h), αντίστοιχα. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι πολύ μικρότερες από αυτές που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη με αποτέλεσμα να μην έρχονται σε συμφωνία μεταξύ τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιβλιογραφία σχετικά με το σχηματισμό του διακετυλίου κατά τη θέρμανση εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων είναι περιορισμένη (Wang et al., 2019). Παρόλα αυτά, μια πρόσφατη μελέτη εξέτασε την παραγωγή  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων που εκλύονται στη φάση ατμών κατά τη θέρμανση εδώδιμων ελαίων, σπορελαίων και ελαιολάδων, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός DA στα ελαιόλαδα (150 °C, 1h) είναι μικρότερος από το σχηματισμό GO και MGO, γεγονός που δεν αποδεικνύεται από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης (Wang et al., 2019). Αντιθέτως, σύμφωνα με τους Jiang et al., το DA βρέθηκε στις υψηλότερες ποσότητες μεταξύ όλων των δειγμάτων διάφορων τροφίμων που εξετάστηκαν, με την MGO να ακολουθεί και την GO να παρουσιάζει τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Jiang et al., 2013).

### 5.1.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε EVOOs και γεωγραφική προέλευση



**Διάγραμμα 2:** Ραβδόγραμμα που αναπαριστά το ποσοστό της μέσης τιμής περιεκτικότητας  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε 13 δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (Κρήτη, Λέσβος, Πελοπόννησος).

Για την αξιολόγηση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων ως προς την παραγωγή  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης αξιοποιήθηκαν συνολικά 13 δείγματα EVOOs που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (**Πίνακας 4**). Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δείγματα ελαιολάδου από τις περιοχές Κρήτη ( $n=6$ ), Πελοπόννησος ( $n=4$ ) και Λέσβος ( $n=3$ ). Από τη σύγκρισή τους ως προς το ποσοστό  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων που παράχθηκε κατά τη διάρκεια της θερμοοξειδώσεώς τους, βρέθηκε πως σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα των 3 περιοχών κυριαρχεί το διακετύλιο (DA), το οποίο αποτελεί το 87.23% επί του συνόλου των παρατηρήσεων ( $SD=7.49\%$  και  $RSD \% = 8.59 \% < 10 \%$ , συνεπώς δεν εμφανίζεται μεταβλητότητα γύρω από τη μέση τιμή). Ακολουθούν με σημαντική διαφορά η μεθυλογλυοξάλη (MGO) και η γλυοξάλη (GO), σε ποσοστά  $7.53 \pm 4.29\%$  και  $5.23 \pm 3.76\%$ , αντίστοιχα. Οι τιμές αυτών των ποσοστών προέκυψαν με βάση τις σχέσεις **(1)** και **(2)** που περιγράφηκαν στο πειραματικό μέρος και αποτελούν την επί τοις % μέση τιμή περιεκτικότητας επί του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων.

**Πίνακας 5 :** Πίνακας Συχνοτήτων, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα Statgraphics (μετά από στρογγυλοποίηση), που αναπαριστά το ποσοστό της μέσης τιμής περιεκτικότητας  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων σε 13 δείγματα EVOOs διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, καθώς και τα ποσοστά κατανομής κάθε ένωσης ξεχωριστά επί του συνόλου αυτών.

	DA	GO	MGO	Row Total
Κρήτη	<b>39.06%</b>	<b>2.69%</b>	<b>4.30%</b>	<b>46.05%</b>
	84.83%	5.83%	<b>9.33%</b>	
Λέσβος	19.80%	1.38%	1.92%	23.10%
	85.71%	<b>5.98%</b>	8.31%	
Πελοπόννησος	28.24%	1.23%	1.38%	30.85%
	<b>91.54%</b>	3.98%	4.48%	
Column Total	<b>87.11%</b>	5.30%	7.60%	<b>100.00%</b>

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 2** και τον αντίστοιχο πίνακα συχνοτήτων (**Πίνακας 5**) όπως αυτά προέκυψαν από το πρόγραμμα Statgraphics, παρατηρείται πως η Κρήτη αποτελεί την περιοχή στην οποία αντιστοιχεί το 46,05% του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων που παρίστανται στα εξεταζόμενα EVOOs, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων που της αναλογούν. Επιπλέον, παρουσιάζεται η κυριαρχία του DA των Κρητικών ελαιολάδων έναντι του DA που ανευρίσκεται στα ελαιόλαδα των δυο άλλων περιοχών, καθώς αυτό αναλογεί στο 39.06% επί του συνολικού διακετυλίου (87,11%) των υπό μελέτη δειγμάτων. Ομοίως, με βάση το παραπάνω διάγραμμα, η μεγαλύτερη επί τοις % μέση τιμή περιεκτικότητας σε GO και MGO συναντάται και πάλι στα EVOOs της Κρήτης με αυτά της Λέσβου και της Πελοποννήσου να ακολουθούν.

Περαιτέρω δεδομένα, αναφορικά με τη σύγκριση της κατανομής των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων εντός των EVOOs της εκάστοτε περιοχής ξεχωριστά, μπορούν να εξαχθούν από τον πίνακα συχνοτήτων (**Πίνακας 5**). Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι στα δείγματα ελαιολάδου της Πελοποννήσου, το 91.54% των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων αφορά το διακετύλιο, τιμή που αποτελεί παράλληλα το υψηλότερο ποσοστό DA ανάμεσα στα EVOOs των 3 περιοχών ξεχωριστά. Επιπλέον, η υψηλότερη επί τοις % μέση τιμή περιεκτικότητας μεθυλογλυοξάλης εμφανίζεται στα EVOOs της Κρήτης (9.33% επί του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων στα δείγματα Κρητικών ελαιολάδων), ενώ η υψηλότερη επί τοις % μέση τιμή περιεκτικότητας γλυοξάλης, συναντάται στα ελαιόλαδα της Λέσβου (5.98% επί του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων στα δείγματα ελαιολάδων της Λέσβου), χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές από αυτά της Κρήτης (5.83% επί του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων στα δείγματα ελαιολάδων της Πελοποννήσου).

## 5.2 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων

Το ολικό φαινολικό περιεχομένου (TPC) σε 18 εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα (EVOOs), παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Η πρώτη στήλη του Πίνακα αφορά τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου όπως προσδιορίστηκαν το έτος 2019 (δεδομένα ΕΦΕΤ), ενώ η δεύτερη αφορά την αντίστοιχη τιμή που προσδιορίστηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ένα χρόνο μετά (2020).

**Πίνακας 6:** Μεταβολή του ολικού φαινολικού περιεχομένου TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου), μετά από 1 έτος αποθήκευσης εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων.

Κωδικός Δείγματος	TPC <sup>a</sup> (mg GAE/Kg ελαιόλαδου) (2019)	TPC <sup>b</sup> (mg GAE/Kg ελαιόλαδου) (2020)	Διαφορά TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου)	Ποσοστό μείωσης TPC (%)
KOR_HER_OO_01	575.22	304.54	270.68	-47.06
KOR_HER_OO_02	522.00	269.74	252.26	-48.33
KOR_HER_OO_09	667.33	379.09	288.23	-43.19
KOR_HER_OO_10	653.99	431.50	222.49	-34.02
KOR_RET_OO_03	636.73	259.57	377.16	-59.23
KOR_RET_OO_05	470.41	201.87	268.54	-57.09
KOR_CHA_OO_04	549.24	329.46	219.78	-40.02
KOR_CHA_OO_05	488.38	222.61	265.77	-54.42
KOR_LAS_OO_06	540.24	270.93	269.30	-49.85
KOR_LAS_OO_07	541.96	282.44	259.52	-47.89
KOR_LES_OO_01	147.17	140.40	6.78	-4.60
KOR_LES_OO_14	131.28	102.49	28.79	-21.93
KOR_LES_OO_16	77.04	88.48	-11.44	14.85
KOR_MES_OO_02	141.39	107.85	33.54	-23.72
KOR_MES_OO_05	157.91	111.70	46.21	-29.26
KOR_MES_OO_08	83.05	96.83	-13.78	16.59
KOR_MES_OO_09	110.26	102.86	7.40	-6.71
KOR_MES_OO_12	88.14	80.93	7.20	-8.17

a=Οι τιμές περιεκτικότητας σε TPC (δεδομένα ΕΦΕΤ 2019), b= Οι τιμές περιεκτικότητας σε TPC (2020).

Ως πληθυσμός (ή στατιστικός πληθυσμός) ορίζεται η κατανομή των τιμών μιας τυχαίας μεταβλητής, η οποία εκφράζει ένα κοινό χαρακτηριστικό μιας ομάδας υποκειμένων. Το χαρακτηριστικό αυτό δύναται να είναι διαφορετικό σε κάθε υποκείμενο ακολουθώντας μια τυχαία διαδικασία. Στο συγκεκριμένο πείραμα, εξετάστηκε η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά (2020) εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, η οποία αποτελεί την τυχαία μεταβλητή μας. Αντιστοίχως, ο πληθυσμός που μελετήθηκε είναι η κατανομή αυτών των τιμών. Ως δειγματοληπτική μονάδα ορίζεται το κάθε υποκείμενο επί του οποίου μετράται η τιμή ενός

κοινού χαρακτηριστικού. Τα 18 EVOOs που επιλέχθηκαν τυχαία αφορούν τις 18 δειγματοληπτικές μονάδες, από τις οποίες παίρνουμε τις 18 τιμές της τυχαίας μεταβλητής. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.

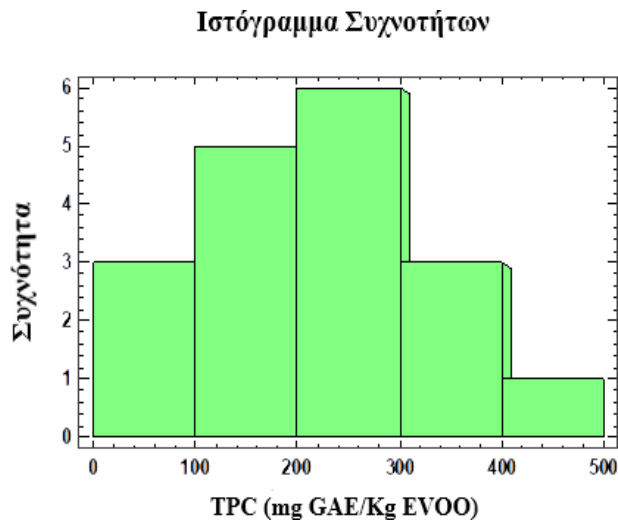
Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Statgraphics, μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για τη θέση της κατανομής του δείγματος πάνω στον άξονα. Στο πείραμά μας, η ελάχιστη ( $x_{\min}$ ) και η μέγιστη ( $x_{\max}$ ) τιμή είναι ίση με 80.93 και 431.50 mg GAE/Kg EVOO, αντίστοιχα. Επομένως, το εύρος ( $R=x_{\max} - x_{\min}$ ) εντός του οποίου συναντάμε όλη την κατανομή και αποτελεί μέτρο μεταβλητότητας ισούται με 350.57 mg GAE/Kg EVOO. Επιπλέον, η μέση τιμή (ή αλλιώς δειγματικός μέσος) ισούται με 210.18 mg GAE/Kg EVOO και εκφράζει την τιμή γύρω από την οποία κατανέμονται όλες οι τιμές του δείγματος. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως η τυπική απόκλιση ( $S$ ) ισούται με 110.69 mg GAE/Kg EVOO. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως κατά μέσο όρο οι 18 παρατηρήσεις απέχουν από το μέσο τους  $S=110.69$  mg GAE/Kg EVOO. Γενικά, ισχύει πως όσο υψηλότερη είναι η τυπική απόκλιση και όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος, τόσο αυξάνεται η μεταβλητότητα των τιμών γύρω από τον μέσο τους, κάτι που φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωσή μας.

Όσον αφορά τον συντελεστή μεταβλητότητας ( $CV$ ), αυτός αποτελεί ένα μέτρο σχετικής μεταβλητότητας, καθώς για να οριστεί γίνεται χρήση ενός μέτρου θέσης (του μέσου) και ενός μέτρου μεταβλητότητας (της  $S$ ). Πιο συγκεκριμένα, ο  $CV$  προκύπτει ως εξής:

$$CV = S \times 100\% \quad (4)$$

Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε πως  $CV=52.66\%$ . Επιπλέον, έχει θεωρηθεί πως αν  $CV>10\%$ , τότε το δείγμα είναι ανομοιογενές και έχει μεγάλη μεταβλητότητα γύρω από τη μέση τιμή. Επομένως, συμπεραίνουμε πως στο δείγμα των τιμών, οι τιμές της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά από ελαιόλαδο σε ελαιόλαδο παρουσιάζουν μια πολύ μεγάλη μεταβλητότητα γύρω από τον μέσο τους. Το γεγονός αυτό, φαίνεται να επιβεβαιώνει μέσω της περιγραφικής στατιστικής πως οι τιμές της εν λόγω κατανομής αφορούν ελαιόλαδα με υψηλό και με χαμηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Τέλος, σε ότι αφορά τη μορφή της κατανομής, αυτή φαίνεται να παρουσιάζει συμμετρία, συμπέρασμα που επιβεβαιώνεται από τον τυποποιημένο συντελεστή λοξότητας, ο οποίος έχει τιμή ίση με 0.75 (όπου  $0,75<2,0$ ). Το γεγονός αυτό, δηλαδή ότι η τιμή του συντελεστή λοξότητας είναι εντός των ορίων του -2 έως του 2, καθιστά την κατανομή του δείγματός μας συμμετρική.



**Διάγραμμα 3:** Ιστόγραμμα συχνοτήτων των τιμών του δείγματος από τη μεταβλητή «περιεκτικότητα ολικών φαινολικών συστατικών σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα».

Το ιστόγραμμα συχνοτήτων αποτελεί το γραφικό τρόπο αναπαράστασης της κατανομής του δείγματος, καθώς παρουσιάζει σε μορφή διαγράμματος τα στοιχεία που μας παρέχει ο πίνακας συχνοτήτων μέσω του προγράμματος Statgraphics. Στον άξονα x'x παρουσιάζονται οι τιμές της περιεκτικότητας ολικών φαινολικών συστατικών στα 18 EVOOs, ενώ στον γ'γ ανήκουν οι τιμές των συχνοτήτων. Πιο αναλυτικά, παρατηρούμε ότι το παραπάνω διάγραμμα διαθέτει 5 κλάσεις, οι οποίες προέκυψαν έπειτα από ομαδοποίηση των δεδομένων. Σε κάθε κλάση αντιστοιχεί και ένα ορθογώνιο, με το ύψος κάθε ορθογωνίου να εκφράζει τη συχνότητα. Εντός αυτών, ταξινομούνται οι παρατηρήσεις της κατανομής, ενώ ο κατάλληλος αριθμός των κλάσεων προκύπτει συνήθως με βασικό κριτήριο τον τύπο του Sturges:

$$k = 1 + 3,32 \log_{10} (n) \quad (5)$$

όπου k ο αριθμός των κλάσεων και n το μέγεθος του δείγματος

Παρόλα αυτά, από την εξίσωση (5) προκύπτει ότι ο k είναι περίπου ίσος με την τετραγωνική ρίζα του n. Έτσι λοιπόν, στην περίπτωση αυτή που το μέγεθος του δείγματός μας αποτελείται από 18 τιμές, ο αριθμός των κλάσεων προκύπτει περίπου ίσος με 4. Η επιλογή όμως του αριθμού αυτού βασίζεται και στη μορφή της κατανομής, για αυτό θεωρήθηκε καλύτερο η ομαδοποίηση των παρατηρήσεων να πραγματοποιηθεί σε 5 κλάσεις, προκειμένου να μην χαθεί μεγάλος όγκος πληροφοριών και οδηγηθούμε σε λάθος αποτελέσματα. Σημαντικό ρόλο στις κλάσεις παίζει και το πλάτος τους, το οποίο (όπως φαίνεται και στο ιστόγραμμα συχνοτήτων) είναι το ίδιο στη καθεμία (=100).

Πιο συγκεκριμένα, η κατανομή του δείγματος εμφανίζει πολύ μεγάλη συγκέντρωση τιμών στις 3 πρώτες από τις 5 κλάσεις (αριστερά), καθώς εκεί περιλαμβάνονται οι 14 από τις 18 παρατηρήσεις. Δηλαδή, το 78% των τιμών της περιεκτικότητας σε TPC εμφανίζει τιμές μεταξύ

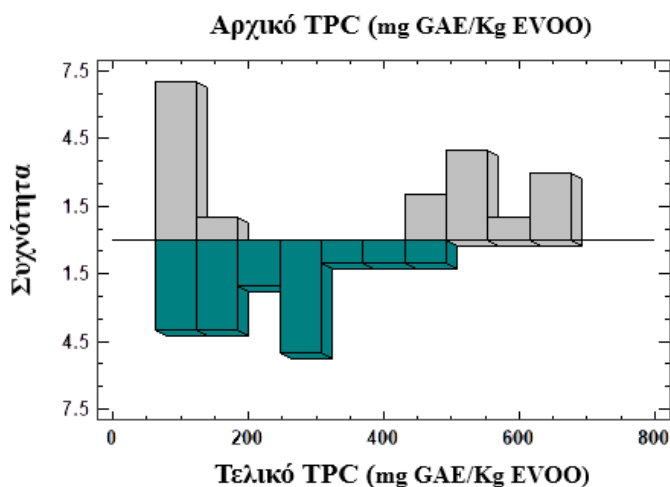
200 και 300 mg GAE/Kg EVOO ενώ μόνο ένα δείγμα ελαιόλαδου εμφανίζει TPC υψηλότερο από 400 mg GAE/Kg EVOO.

### **5.2.1 Στατιστικός έλεγχος υποθέσεων**

Στη συνέχεια, θα παρουσιαστεί η σύγκριση δύο πληθυσμών, ως προς τη διαφορά των μέσων τιμών τους. Ως πρώτο πληθυσμό, έστω  $A$ , ορίζουμε την κατανομή των τιμών της περιεκτικότητας σε Αρχικό TPC (2019), ενώ ως δεύτερο πληθυσμό του πειράματος, έστω  $T$ , ορίζουμε την κατανομή των τιμών της περιεκτικότητας σε Τελικό TPC (2020). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί στατιστικός έλεγχος υποθέσεων, συμβολίζουμε ως  $\mu_A$  την άγνωστη μέση τιμή του πληθυσμού  $A$ , ενώ ως  $\mu_T$  ορίζουμε την άγνωστη μέση τιμή του πληθυσμού  $T$ . Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα δυο ανεξάρτητα και τυχαία δείγματα τιμών των δύο τυχαίων μεταβλητών ( $x_A$  και  $x_T$ ) αποτελούνται το καθένα από 18 τιμές.

Ωστόσο, σχηματίζουμε μια νέα μεταβλητή ( $\Delta = x_A - x_T$ ), η οποία εκφράζει τη διαφορά των δύο παραπάνω τυχαίων μεταβλητών και η μέση τιμή της ορίζεται ως  $\mu_\Delta$ . Επομένως, η στατιστική ανάλυση γίνεται με βάση ένα δείγμα. Το t-τεστ υπολόγισε ότι  $P\text{-value} = 0,0001$ . Αυτό σημαίνει πως για οποιοδήποτε  $\alpha > 0,0001$ , άρα και για  $\alpha = 0,05$ , τα δεδομένα δίνουν στατιστικά σημαντικές αποδείξεις ότι απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση ( $H_0: \mu_\Delta = 0$ ), άρα υπάρχει διαφορά στη μέση τιμή περιεκτικότητας Αρχικού και Τελικού TPC (σε 95% επίπεδο εμπιστοσύνης). Ακόμα και σε  $\alpha = 1\%$ , το συμπέρασμα αυτό ευσταθεί, καθώς το  $P\text{-value}$  παραμένει σταθερό και μικρότερο του 0,01.





**Διάγραμμα 4:** Ιστόγραμμα συχνοτήτων των τιμών των δύο δειγμάτων από τις μεταβλητές «περιεκτικότητα Αρχικού και Τελικού TPC σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα».

Η διαφορά των μέσων τιμών περιεκτικότητας Αρχικού και Τελικού TPC, επιβεβαιώνεται και γραφικά μέσω του **Διαγράμματος 4**, όπου αναπαριστάται η κατανομή των εξεταζόμενων τιμών σε κλάσεις. Επιπλέον, σύμφωνα με τον **Πίνακα 6**, παρατηρείται πως το δείγμα ελαιολάδου με κωδικό KOR\_HER\_OO\_10, είναι αυτό που εμφανίζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε TPC (431,50 mg GAE/Kg ελαιόλαδου). Ταυτόχρονα, παρουσιάζονται και τα ποσοστά μείωσης του TPC σε κάθε δείγμα ελαιόλαδου. Αυτά κυμαίνονται από -59,23 έως -4,60 % και αναφέρονται στα KOR\_RET\_OO\_03 και KOR\_LES\_OO\_16, αντίστοιχα.

Σε πολλά δείγματα, κυρίως αυτών με το υψηλότερο αρχικό TPC, το ποσοστό μείωσης είναι περίπου της τάξης του -50%, τιμή που πιθανότητα σχετίζεται τόσο με την αρχική σύσταση και ποικιλία του εκάστοτε ελαιολάδου, όσο και με τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα με το πέρασμα του χρόνου. Έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι η αποδόμηση των φαινολικών συστατικών οφείλεται είτε σε οξειδωτικούς είτε σε υδρολυτικούς μηχανισμούς και αποτελεί μία διαδικασία με πολλές μεταβλητές. Αρκετές πρόσφατες μελέτες, έχουν αξιολογήσει την υποβάθμιση των φαινολικών ενώσεων των VOOs, υπό διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης ή διαφορετικές συνθήκες μαγειρέματος και επιταχυνόμενης θέρμανσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα υπό μελέτη EVOOs βρίσκονταν σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια πληρωμένα με αέριο N<sub>2</sub>, με σκοπό την αποφυγή της UV-ακτινοβολίας και της οξείδωσής τους, αντίστοιχα. Επιπλέον, αποθηκεύονταν σε δροσερό και σκιερό μέρος (20-25°C), προκειμένου να μην οδηγηθούν σε επιταχυνόμενη αποδόμηση των φαινολικών συστατικών τους. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με μελέτες που εξετάζουν τη συμπεριφορά των φαινολών κατά τις συνθήκες αποθήκευσης διαφορετικών δειγμάτων EVOOs, μετά το πέρας 12 μηνών αποθήκευσης σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, τα συστατικά ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη παρουσίασαν 40 και 51% μείωση, έκαστο

(Τσολάκου, 2017). Στην ίδια μελέτη, το ποσοστό μείωσης των συνολικών φαινολικών συστατικών αγγίζει το 48,5%, τιμή παραπλήσια με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Σε αντίστοιχη έρευνα, όπου μελετήθηκε η σταθερότητα των φαινολών σε μονοποικιλιακά VOOs κατά τη διάρκεια αποθήκευσης (18 μήνες) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (5-50°C), παρατηρήθηκε ισχυρή αποικοδόμηση των σεκοϊριδοειδών που αποδίδεται στην αρχική σύσταση των ελαιολάδων, τόσο σε φαινολικές όσο και σε λιπαρές ουσίες. Οι ερευνητές διαπίστωσαν επιταχυνόμενη αποικοδόμηση που φαίνεται να προκλήθηκε μόλις η θερμοκρασία ξεπέρασε τους 25°C, ενώ τα παράγωγα τυροσόλης επέδειξαν ισχυρότερη σταθερότητα σε σχέση με αυτά της υδροξυτυροσόλης (Krichene et al., 2015). Κλείνοντας, η σπουδαιότητα της χρήσης αδρανούς αερίου N<sub>2</sub> κατά το σφράγισμα των μπουκαλιών αποδεικνύεται και από τους Smeriglio et al., οι οποίοι το 2019 παρατήρησαν πως η μείωση των φαινολικών συστατικών Ιταλικών EVOOs επέρχεται μετά από 6 μήνες αποθήκευσης, βελτιώνοντας έτσι τη διατήρηση των ελαιολάδων (Smeriglio et al., 2019).

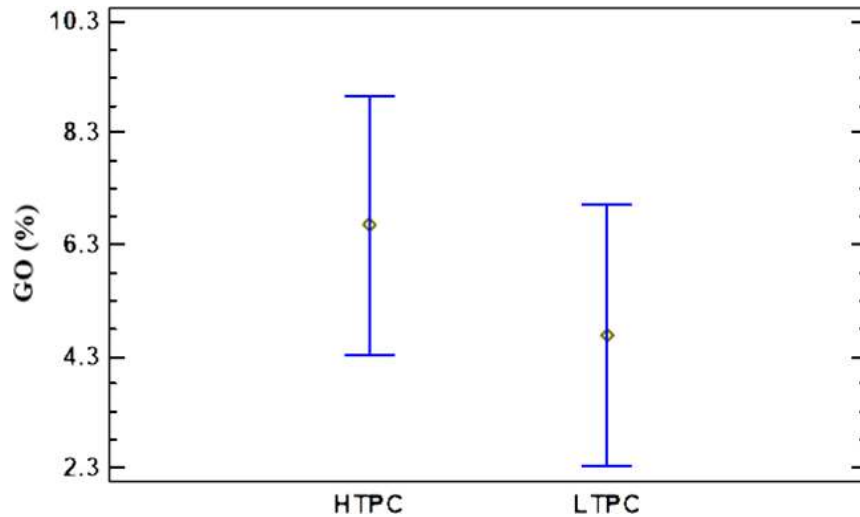
Ωστόσο, στον **Πίνακα 6** παρατηρούνται και ποσοστά αύξησης του TPC σε δύο δείγματα EVOOs (14,85 και 16,59 %). Το γεγονός αυτό, πιθανότατα οφείλεται στο σχηματισμό απλών φαινολών, όπως είναι η υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, που πραγματοποιείται κατά την αποθήκευση λόγω αποδόμησης των σύνθετων παραγώγων τους (Morelló et al., 2004; Gómez-Alonso et al., 2007; Krichene et al., 2015). Μάλιστα, τα ελαιόλαδα KOR\_LES\_OO\_16 και KOR\_MES\_OO\_08 στα οποία παρατηρήθηκε η εν λόγω αύξηση, είναι αυτά που στην αρχή εμφάνιζαν το χαμηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (2019) συγκρινόμενα με τα υπόλοιπα δείγματα.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στην παρούσα μελέτη, τα ποσοστά μείωσης είναι σημαντικότερα (-48%) στα ελαιόλαδα που το 2019 διέθεταν μεγαλύτερο TPC. Αντιθέτως, τα δείγματα με το χαμηλότερο TPC της ίδιας χρονιάς εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό μείωσης ίσο με -15% (μέση τιμή των ποσοστών τους), μετά το πέρας 12 μηνών αποθήκευσης. Σε παρόμοια συμπεράσματα, κατέληξαν και οι Gómez-Alonso et al., το 2007, καθώς η μείωση στο συνολικό άθροισμα φαινολικών συστατικών EVOOs της Ισπανίας, κυμάνθηκε από 43 έως 73%, παρατηρώντας πως τα μεγαλύτερα ποσοστά απωλειών εμφανίζονται σε δείγματα που ξεκίνησαν στη μελέτη ως τα πιο πλούσια σε φαινόλες (Gómez-Alonso et al., 2007).

### **5.3 Μελέτη της επίδρασης του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στη παραγωγή $\alpha$ -δικαρθονυλικών ενώσεων εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων**

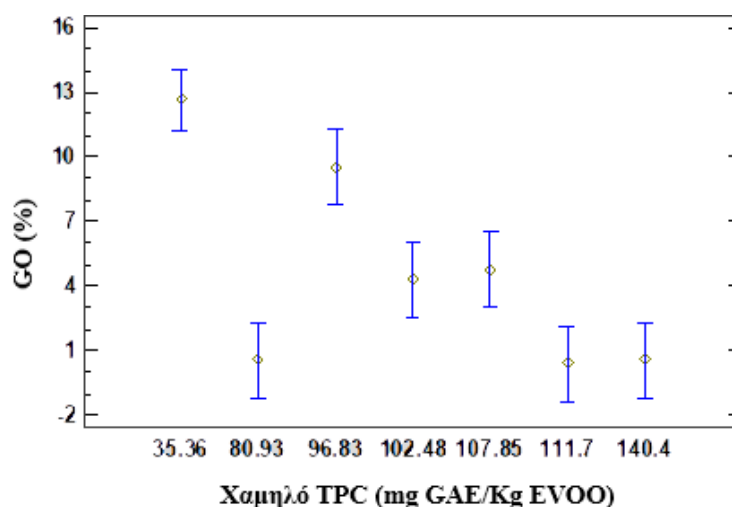
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τόσο του υψηλού όσο και του χαμηλού ολικού φαινολικού περιεχομένου στο σχηματισμό των  $\alpha$ -δικαρθονυλικών ενώσεων αξιοποιήθηκαν τα δείγματα ελαιόλαδου που παρουσιάζονται στους πίνακες του Παραρτήματος. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέση συγκέντρωση των GO, MGO, DA εκφρασμένη ως ποσοστιαία περιεκτικότητα επί του συνόλου των  $\alpha$ -δικαρθονυλικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (One-Way ANOVA) στο πρόγραμμα Statgraphics. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε επί του παράγοντα ολικό φαινολικό

περιεχόμενο (TPC), ο οποίος εξετάστηκε σε δύο επίπεδα Υψηλό και Χαμηλό TPC. Οι μέσες τιμές συγκρίθηκαν με τη μέθοδο LSD (με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%).



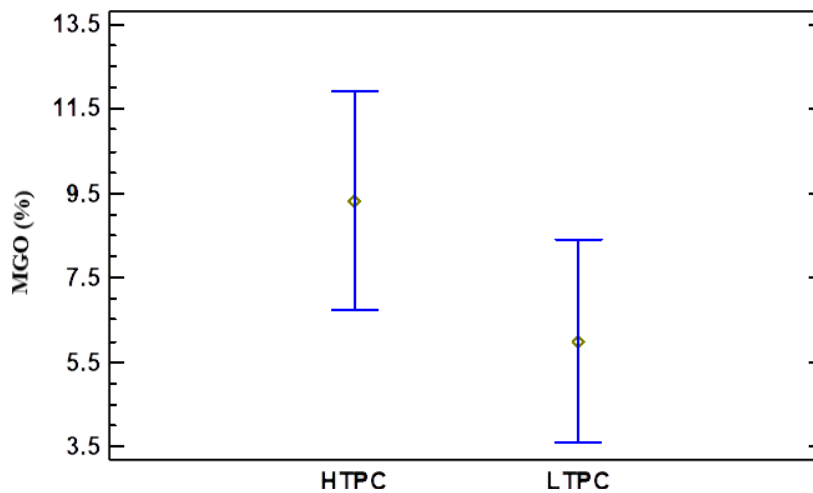
**Διάγραμμα 5:** Μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας γλυοξάλης σε δείγματα ελαιόλαδων με Υψηλό (HTPC) και Χαμηλό TPC (LTPC).

Όσον αφορά την μελέτη επίδρασης του TPC στην παραγωγή γλυοξάλης, έγινε χρήση 14 δειγμάτων EVOOs, εκ των οποίων τα μισά παρουσιάζουν υψηλές τιμές TPC (**Παράρτημα 1**). Η μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας γλυοξάλης στα δύο παραπάνω επίπεδα, Υψηλό και Χαμηλό TPC, βρέθηκε ίση με  $6,65 \pm 2,9$  % και  $4,67 \pm 4,8$  %, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το F-test, προκύπτει  $P\text{-value}=0.3731$  ( $>0.05$ ), επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών της επί τοις % περιεκτικότητας γλυοξάλης των δυο επιπέδων TPC (σε ένα 95% διάστημα εμπιστοσύνης) (**Διάγραμμα 5**). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και η διεξαγωγή της μη παραμετρικής δοκιμής Kruskal-Wallis ( $P\text{-value}=0.1797$ ). Επομένως, ο παράγοντας TPC φαίνεται να μην επιδρά στην παραγωγή γλυοξάλης στο ελαιόλαδο.



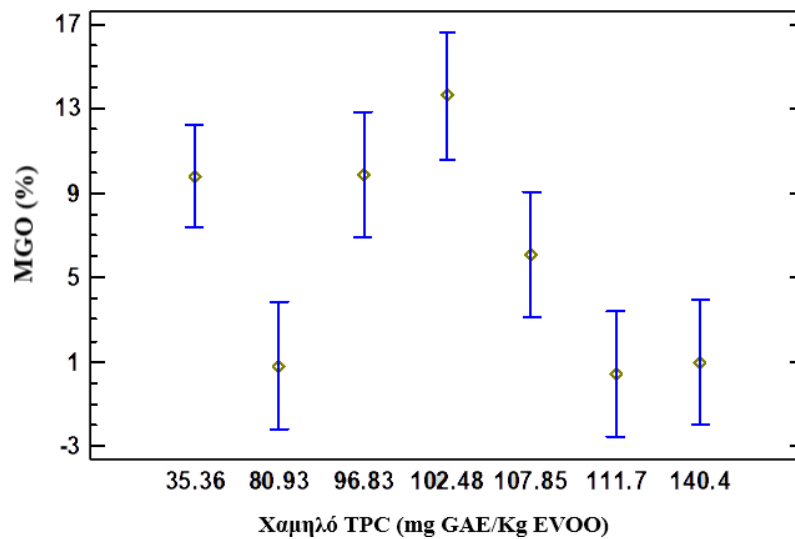
**Διάγραμμα 6:** Μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας γλυκοζάλης σε δείγματα ελαιόλαδων με Χαμηλό TPC.

Παρόλα αυτά, με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκε μόνο η επίδραση του παράγοντα Χαμηλό TPC σε 7 δείγματα ελαιολάδου. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε πως τα ελαιόλαδα με εύρος τιμών TPC από 35,36 έως 140,40 mg GAE/Kg EVOO εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών της επί τοις % περιεκτικότητας σε γλυκοζάλη (**Διάγραμμα 6**). Πιο συγκεκριμένα, σε επίπεδο σημαντικότητας 5% το F-test έδωσε P-value=0.001 (<0.05) και το Kruskal-Wallis test P-value=0.041. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την επίδραση του παράγοντα Χαμηλό TPC στην παραγωγή γλυκοζάλης των εξεταζόμενων δειγμάτων ελαιολάδου. Παράλληλα, υπολογίστηκε και ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson (r), ο οποίος βρέθηκε ίσος με -0,71, χαρακτηρίζοντας την προκειμένη συσχέτιση πολύ ισχυρή. Δηλαδή, όπως φαίνεται και στο παραπάνω Διάγραμμα, λόγω της αρνητικής συσχέτισης, όσο μικρότερο είναι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο στο εκάστοτε ελαιόλαδο, τόσο αυξάνεται ο σχηματισμός γλυκοζάλης στις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος (150 °C, 1h). Ωστόσο, εξαίρεση στο παραπάνω συμπέρασμα αποτελεί το δείγμα ελαιολάδου με TPC=80,93 mg GAE/Kg EVOO, γεγονός που πιθανότητα οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.



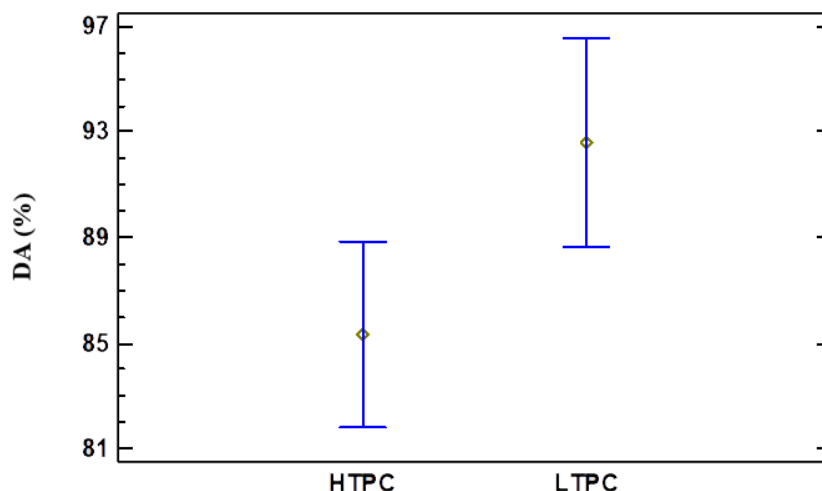
**Διάγραμμα 7:** Μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας μεθυλογλυοξάλης σε δείγματα ελαιόλαδων με Υψηλό (HTPC) και Χαμηλό TPC (LTPC).

Αντιστοίχως, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του TPC στην παραγωγή μεθυλογλυοξάλης, έγινε χρήση 13 δειγμάτων EVOOs, εκ των οποίων τα 6 παρουσιάζουν υψηλές τιμές TPC (**Παράρτημα 2**). Η μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας σε μεθυλογλυοξάλη στα δύο παραπάνω επίπεδα, Υψηλό και Χαμηλό TPC, βρέθηκε ίση με  $9,33 \pm 1,9$  % και  $5,99 \pm 5,3$  %, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το F-test, προκύπτει P-value= 0.1723 ( $>0.05$ ), επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών της επί τοις % περιεκτικότητας μεθυλογλυοξάλης των δυο επιπέδων TPC (σε ένα 95% διάστημα εμπιστοσύνης) (**Διάγραμμα 7**). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και η διεξαγωγή του μη παραμετρικού τεστ Kruskal-Wallis (P-value= 0.3173). Επομένως, ο παράγοντας TPC φαίνεται να μην επιδρά ούτε στην παραγωγή μεθυλογλυοξάλης στο ελαιόλαδο.



**Διάγραμμα 8:** Μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας μεθυλογλυοξάλης σε δείγματα ελαιόλαδων με Χαμηλό TPC.

Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση προχωράμε σε περαιτέρω μελέτη της επίδρασης τόσο του παράγοντα Υψηλό TPC όσο και του παράγοντα Χαμηλό TPC. Η επίδραση εξετάζεται ξεχωριστά στα 6 και στα 7 δείγματα ελαιολάδου που τους αναλογούν αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα, παρατηρήθηκε πως μόνο τα ελαιόλαδα με εύρος τιμών TPC από 35,36 έως 140,40 mg GAE/Kg EVOO εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών της επί τοις % περιεκτικότητας σε MGO (**Διάγραμμα 8**). Πιο συγκεκριμένα, σε επίπεδο σημαντικότητας 5% το F-test έδωσε P-value=0.035 (<0.05), ενώ το Kruskal-Wallis test P-value=0.058. Παράλληλα, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson (r) ισούται με -0,39. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως ο παράγοντας Χαμηλό TPC εμφανίζει επίδραση στην παραγωγή MGO των υπό μελέτη δειγμάτων ελαιολάδου, ενώ η υπάρχουσα συσχέτιση μεταξύ τους θεωρείται χαμηλή. Όπως αναπαριστάται και στο παραπάνω διάγραμμα, όσο μικρότερο είναι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο στο εκάστοτε ελαιόλαδο, τόσο αυξάνεται ο σχηματισμός μεθυλογλυοξάλης στις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος (150 °C, 1h), γεγονός που οφείλεται στην αρνητική συσχέτιση.



**Διάγραμμα 9:** Μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας διακετυλίου σε δείγματα ελαιόλαδων με Υψηλό (HTPC) και Χαμηλό TPC (LTPC).

Ομοίως, όσον αφορά την μελέτη επίδρασης του TPC στην παραγωγή διακετυλίου, έγινε χρήση 18 δειγμάτων EVOOs, εκ των οποίων τα δέκα παρουσιάζουν υψηλές τιμές TPC (**Παράρτημα 3**). Η μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας σε διακετύλιο στα δύο παραπάνω επίπεδα, Υψηλό και Χαμηλό TPC, βρέθηκε ίση με  $85,36 \pm 7,4$  % και  $92,61 \pm 7,5$  %, αντίστοιχα. Με βάση το F-test που έλαβε χώρα, προκύπτει  $P\text{-value}=0.057$  ( $>0.05$ ), γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών της επί τοις % περιεκτικότητας σε διακετύλιο των δυο επιπέδων TPC (σε ένα 95% διάστημα εμπιστοσύνης) (**Διάγραμμα 9**). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και η διεξαγωγή της μη παραμετρικής δοκιμής Kruskal-Wallis ( $P\text{-value}=0.062$ ). Επομένως, ο παράγοντας TPC φαίνεται να μην ασκεί επίδραση ούτε στο σχηματισμό διακετυλίου. Ωστόσο, αξίζει να αναφέρουμε πως η  $P\text{-value}$  δεν είναι πολύ μεγαλύτερη του  $\alpha=0.05$ , ενώ παράλληλα στο **Διάγραμμα 9** φαίνεται πως στα ελαιόλαδα με υψηλές τιμές TPC η παραγωγή διακετυλίου αποτυπώνεται σε μικρότερη μέση τιμή της επί τοις % περιεκτικότητας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων ( $n<30$ ) που εξεταστήκαν και έτσι τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει και για τις περιπτώσεις της GO και MGO.

Μετά από εκ νέου μελέτη της επίδρασης τόσο του παράγοντα Υψηλό TPC όσο και του παράγοντα Χαμηλό TPC, δεν βρέθηκε κανένας εκ των δύο να σχετίζεται με την παραγωγή διακετυλίου στα εξεταζόμενα δείγματα. Παράλληλα, ούτε ο συντελεστής  $r$  αποδεικνύει συσχέτιση, καθώς και για τους δύο παράγοντες έχει τιμή  $< (\pm) 0,3$ .

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως τα φαινολικά συστατικά επιδρούν ανασταλτικά στην δημιουργία  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2002 από τους Brenes et al., εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία που προσομοίαζε την κοινή οικιακή επεξεργασία (όπως τηγάνισμα,

θέρμανση με φούρνο μικροκυμάτων και βρασμό με νερό σε χύτρα πίεσης) προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των συνθηκών αυτών επί των πολυφαινολών. Διαπιστώθηκε ότι η θερμική οξείδωση των ελαίων στους 180 °C προκάλεσε σημαντική μείωση της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης καθώς και των ουσιών που τις διαθέτουν στο μόριό τους. Παράλληλα, οδήγησε σε ταχεία αποδόμηση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης και του γλυκεριδικού κλάσματος των ελαίων (Brenes et al., 2002). Αντιστοίχως, παρόμοιες αντιδράσεις είναι πιθανό να πραγματοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματός μας με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση των ελαιολάδων σε φαινολικά συστατικά, γεγονός που δε συνέβαλε σημαντικά στην παρεμπόδιση σχηματισμού των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων.

Ωστόσο, έως και σήμερα πολλοί ερευνητές έχουν κάνει λόγο για την ενδεχόμενη επίδραση των πολυφαινολών επί των  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων με απώτερο σκοπό την αναστολή σχηματισμού των τοξικών στην υγεία AGEs/ALEs. Συγκεκριμένα, η υδροξυτυροσόλη (HT) έχει συνδεθεί με την ανασταλτική δράση έναντι της μεθυλογλυοξάλης (MGO) που παράγεται κατά τη διάρκεια της γλυκοζυλίωσης. Παράλληλα, λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της HT στα πρώτα στάδια της αντίδρασης Maillard, καθίσταται δυνατή η αποτροπή σχηματισμού των προηγμένων προϊόντων, όπως η N<sup>ε</sup>-(καρβοξυμεθυλ)λυσίνη (CML) (Khan et al., 2020; Navarro et al., 2015). Παρόμοιες ιδιότητες εμφανίζουν και άλλες κατηγορίες φαινολικών συστατικών όπως η ρεσβερατρόλη του κρασιού, οι κατεχίνες του τσαγιού και οι προανθοκυανιδίνες, οι οποίες φαίνεται να αντιδρούν κυρίως με τις GO και MGO, παρεμποδίζοντας τη δημιουργία των AGEs (Lo et al., 2006; Shen et al., 2017). Κλείνοντας, τόσο τα φαινολικά οξέα όσο και οι φλαβονοειδείς ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί από πολλούς ερευνητές ως σπουδαίοι ανασταλτικοί παράγοντες των προηγμένων προϊόντων γλυκοζυλίωσης ή λιποξείδωσης, γεγονός που τα καθιστά απαραίτητα στη διατροφή του ανθρώπου (Srey et al., 2010; Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz et al., 2015).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο ποσοτικός προσδιορισμός τριών  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων και συγκριμένα της GO, MGO και DA. Τα υπό μελέτη δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιόλαδων υποβλήθηκαν σε θερμοξείδωση σε συσκευή Rancimat με τη χρήση μιας τροποποιημένης συνδεσμολογίας. Η νέα αυτή διάταξη οδήγησε σε απομάκρυνση των πτητικών  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων από τη λιπαρή ύλη. Οι ουσίες τελικά μετέβησαν από την αέρια φάση του υπερείμενου χώρου στο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (OPD) όπου πραγματοποιήθηκε η διαλυτοποίησή τους. Επομένως, πρόκειται για μια νέα πρόταση παραγωγοποίησης μέσω της συσκευής Rancimat.

Στα εξεταζόμενα δείγματα EVOO, το διακετύλιο ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 87,23%, με την μεθυλογλυοξάλη και τη γλυοξάλη να ακολουθούν με σημαντική διαφορά, σε ποσοστά 7,53% και 5,23%, αντίστοιχα. Η υψηλότερη επί τοις % περιεκτικότητα σε DA που βρέθηκε ισούται με 98,83% και αφορά δείγμα προερχόμενο από τη Μεσσηνία ενώ στο ίδιο δείγμα η GO βρέθηκε σε ποσοστό 0,40%.

Ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), οι τιμές κυμάνθηκαν από 80,93 έως 431,50 mg GAE/Kg EVOO. Οι τιμές αυτές συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες του προηγούμενου έτους, όπου και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών τους παρά τις προσεκτικές συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων. Μάλιστα, τα ποσοστά μείωσης βρέθηκαν από 4,60 έως 59,23%, ενώ σε μερικά δείγματα παρατηρήθηκε αύξηση του TPC γεγονός που πιθανότητα να οφείλεται σε αποδόμηση σύνθετων φαινολών προς παραγωγή απλούστερων μορίων της κατηγορίας αυτής.

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση του TPC στη δημιουργία  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων. Η στατιστική μελέτη έδειξε ότι μόνο τα ελαιόλαδα με χαμηλή περιεκτικότητα σε TPC εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση στη παραγωγή των ενώσεων GO και MGO. Επομένως, όσο μικρότερο είναι το TPC στο εκάστοτε ελαιόλαδο, τόσο αυξάνεται ο σχηματισμός GO και MGO στις συνθήκες παραγωγοποίησης του πειράματος (150 °C, 1h). Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση του παράγοντα TPC στο σύνολο των παραγόμενων  $\alpha$ -δικαρβονυλικών ενώσεων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν ( $n < 30$ ) οδηγώντας σε ασαφή αποτελέσματα.

Όσον αφορά μελλοντικές έρευνες, προτείνεται η πολύπλευρη και εκτενέστερη μελέτη των εξαιρετικών παρθένων ελαιόλαδων ελληνικής και μεσογειακής προέλευσης. Τα EVOOs θα πρέπει να εξεταστούν και ως προς τη δημιουργία των AGEs μιας και το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό της μεσογειακής δίαιτας, ενώ επιπλέον μπορεί να μελετηθεί και ο ρόλος των βιοδραστικών συστατικών του EVOO στην ανάσχεση των AGEs. Συνιστάται επίσης, η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων προκειμένου τα αποτελέσματα να εμφανίζουν αξιοπιστία. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί και στη μελέτη της τοξικότητας των ενώσεων αυτών μιας και υστερούν προς το παρόν οι κλινικές μελέτες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 - Βιβλιογραφία

### Αναφορές σε επιστημονικά άρθρα:

- ❖ Ahmad, S., Khan, M. Y., Rafi, Z., Khan, H., Siddiqui, Z., Rehman, S., Shahab, U., Khan, M.S., Saeed, M., Alouffi, S. & Khan, M. S. (2018). Oxidation, glycation and glycoxidation—The vicious cycle and lung cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 49, 29–36.
- ❖ Ahmed, N., Lüthen, R., Häussinger, D., Šebeková, K., Schinzel, R., Voelker, W., Heidland, A. & Thornalley, P. J. (2005). Increased protein glycation in cirrhosis and therapeutic strategies to prevent it. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), 718-724.
- ❖ Angelis, A., Antoniadis, L., Stathopoulos, P., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2018). Oleocanthalic and Oleaceinic acids: New compounds from Extra Virgin Olive Oil (EVOO). *Phytochemistry Letters*, 26, 190–194.
- ❖ Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17–31.
- ❖ Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Gammoh, S., Ereifej, K., Al-Mahasneh, M. A., Al-u'datt, D., Naimi, O., Hussein, N. & Kubow, S. (2017). Application of Olive Oil as Nutraceutical and Pharmaceutical Food: Composition and Biofunctional Constituents and Their Roles in Functionality, Therapeutic, and Nutraceutical Properties. *Soft Chemistry and Food Fermentation*, 265–298.
- ❖ Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 614-627.
- ❖ Aranda, F., Gomez-Alonso, S., Del Álamo, R. R., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2004). Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chemistry*, 86(4), 485-492.
- ❖ Arribas-Lorenzo, G., & Morales, F. J. (2010). Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2966–2972.
- ❖ Ashraf, J. M., Ahmad, S., Choi, I., Ahmad, N., Farhan, M., Tatyana, G., & Shahab, U. (2015). Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB life*, 67(12), 897-913.
- ❖ Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In *Olive Oil*. AOCS press. 41-72.
- ❖ Brands, C. M., & van Boekel, M. A. (2001). Reactions of monosaccharides during heating of sugar– casein systems: Building of a reaction network model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4667-4675.

- ❖ Brenes, M., García, A., Dobarganes, M. C., Velasco, J., & Romero, C. (2002). Influence of Thermal Treatments Simulating Cooking Processes on the Polyphenol Content in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5962–5967.
- ❖ Cha, J., Debnath, T., & Lee, K.-G. (2019). Analysis of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds and volatiles formed in Maillard reaction model systems. *Scientific Reports*, 9(1).
- ❖ Codex Alimentarius Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils, CODEX STAN 33-33-1981 (Rev.2-2003).
- ❖ Colombo, G., Aldini, G., Orioli, M., Giustarini, D., Gornati, R., Rossi, R., Colombo, R., Carini, M., Milzani, A. & Dalle-Donne, I. (2010). Water-soluble  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes of cigarette smoke induce carbonylation of human serum albumin. *Antioxidants & redox signaling*, 12(3), 349-364.
- ❖ Covas, M. I., Nyyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J. F., Kiesewetter, H., Gaddi, A., Torre, R., Mursu, J., Baumler, H., Nascetti, S., Salonen, J., Fito, M., Virtanen, J. & Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, 145(5), 333-341.
- ❖ Council of the European Union. Council Regulation (EC) No 1234/2007 of 22 October 2007 establishing a common organisation of agricultural markets and on specific provisions for certain agricultural products (Single CMO Regulation). O. J. Eur. Union 2007, 299, 1–149.
- ❖ Degen, J., Hellwig, M., & Henle, T. (2012). 1, 2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(28), 7071-7079.
- ❖ European Food Safety Authority, (EFSA), 2011. Scientific opinion. EFSA J. 9, 2033–2058.
- ❖ Fu, T. M., Jacob, D. J., Wittrock, F., Burrows, J. P., Vrekoussis, M., & Henze, D. K. (2008). Global budgets of atmospheric glyoxal and methylglyoxal, and implications for formation of secondary organic aerosols. *Journal of geophysical research: atmospheres*, 113 (D15).
- ❖ Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2004). Formation of genotoxic dicarbonyl compounds in dietary oils upon oxidation. *Lipids*. 39(5), 481–486.
- ❖ Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*. 78(2), 207–211.
- ❖ Gómez-Alonso, S., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2002). Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6812-6817.
- ❖ Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100(1), 36-42.

- ❖ Grigoriadou, D., Androulaki, A., Psomiadou, E., & Tsimidou, M. Z. (2007). Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chemistry*, 105(2), 675-680.
- ❖ Hage, D. S. (2019). Chromatography and electrophoresis. Contemporary Practice in Clinical Chemistry. Academic Press. 135–157.
- ❖ Han, L., Li, L., Li, B., Zhao, D., Li, Y., Xu, Z., & Liu, G. (2013). Hydroxyl radical induced by lipid in Maillard reaction model system promotes diet-derived N $\epsilon$ -carboxymethyllysine formation. *Food and chemical toxicology*, 60, 536-541.
- ❖ Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2005). Interplay between the Maillard Reaction and Lipid Peroxidation in Biochemical Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), 319–326.
- ❖ Jiang, Y., Hengel, M., Pan, C., Seiber, J. N., & Shibamoto, T. (2013). Determination of toxic  $\alpha$ -dicarbonyl compounds, glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl, released to the headspace of lipid commodities upon heat treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(5), 1067-1071.
- ❖ Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A. & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*, 9(8), 1014.
- ❖ International Olive oil Council (2019). “Trade standards applying to olive oils and olive pomace oils”. COI/T.15/NC, No 3/Rev.1./5.November 2019.International Olive Oil Council, Madrid, Spain.
- ❖ Khan, M., Liu, H., Wang, J., & Sun, B. (2020). Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International*, 130, 108933.
- ❖ Kovacic, P., & Cooksy, A. L. (2009). Electron Transfer as a Potential Cause of Diacetyl Toxicity in Popcorn Lung Disease. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*. Volume 204, 133–148.
- ❖ Krichene, D., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2015). Stability of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds during Long-Term Storage (18 Months) at Temperatures of 5–50 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30), 6779–6786.
- ❖ Lange, J. N., Wood, K. D., Knight, J., Assimios, D. G., & Holmes, R. P. (2012). Glyoxal formation and its role in endogenous oxalate synthesis. *Advances in urology*, 2012.
- ❖ Lanzón, A., Albi, T., Cert, A., & Gracián, J. (1994). The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 71(3), 285-291.
- ❖ Lazzerini, C., Cifelli, M., & Domenici, V. (2016). Pigments in extra-virgin olive oil: Authenticity and quality. *Products from olive tree*, 99-114.
- ❖ Lima, M., Assar, S. H., & Ames, J. M. (2010). Formation of N  $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine and loss of lysine in casein glucose– fatty acid model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(3), 1954-1958.

- ❖ Lo, C. Y., Li, S., Tan, D., Pan, M. H., Sang, S., & Ho, C. T. (2006). Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Molecular nutrition & food research*, 50(12), 1118-1128.
- ❖ Luevano-Contreras, C., & Chapman-Novakofski, K. (2010). Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*, 2(12), 1247-1265.
- ❖ Maasen, K., Scheijen, J. L. J. M., Opperhuizen, A., Stehouwer, C. D. A., Van Greevenbroek, M. M., & Schalkwijk, C. G. (2020). Quantification of dicarbonyl compounds in commonly consumed foods and drinks; presentation of a food composition database for dicarbonyls. *Food Chemistry*. 128063.
- ❖ Mariotti, M. (2014). Virgin olive oil: definition and standards. *The extra-virgin olive oil handbook*. Chichester: Wiley, 11-9.
- ❖ Matthäus, B. (2010). Oxidation of edible oils. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*, 183–238.
- ❖ Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- ❖ Navajas-Porras, B., Pérez-Burillo, S., Morales-Pérez, J., Rufián-Henares, J. A., & Pastoriza, S. (2020). Relationship of quality parameters, antioxidant capacity and total phenolic content of EVOO with ripening state and olive variety. *Food Chemistry*. 126926.
- ❖ Navarro, M., Fiore, A., Fogliano, V., & Morales, F. J. (2015). Carbonyl trapping and antiglycative activities of olive oil mill wastewater. *Food & function*, 6(2), 574-583.
- ❖ Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., & Salvayre, R. (2008). Advanced lipidperoxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British journal of pharmacology*, 153(1), 6-20.
- ❖ Nie, S., Huang, J., Hu, J., Zhang, Y., Wang, S., Li, C., Marcone, M. & Xie, M. (2013). Effect of pH, temperature and heating time on the formation of furan in sugar–glycine model systems. *Food Science and Human Wellness*, 2(2), 87-92.
- ❖ Pokorny J., Korczak, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). Antioxidants in food: practical applications. Boca Raton: CRC press. 311-330.
- ❖ Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2006). Methylglyoxal Comes of AGE. *Cell*, 124(2), 258–260.
- ❖ Rao, C. V., Newmark, H. L., & Reddy, B. S. (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 19(2), 287-290.
- ❖ Richard, J. P. (1993). Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society Transactions*, 21(2), 549–553.
- ❖ Rodríguez-Morató J, Boronat A, Kotronoulas A, Pujadas M, Pastor A, Olesti E, Pérez-Mañá C, Khymenets O, Fitó M, Farré M, & de la Torre, R. (2016). Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug metabolism reviews*, 48(2), 218-236.

- ❖ Román, G. C., Jackson, R. E., Reis, J., Román, A. N., Toledo, J. B., & Toledo, E. (2019). Extra-virgin olive oil for potential prevention of Alzheimer disease. *Revue neurologique*, 175(10), 705-723.
- ❖ Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2015). Prevention of protein glycation by natural compounds. *Molecules*, 20(2), 3309-3334.
- ❖ Semchyshyn, H. M. (2014). Reactive Carbonyl Species In Vivo: Generation and Dual Biological Effects. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10.
- ❖ Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 113–127.
- ❖ Shen, Y., Xu, Z., & Sheng, Z. (2017). Ability of resveratrol to inhibit advanced glycation end product formation and carbohydrate-hydrolyzing enzyme activity, and to conjugate methylglyoxal. *Food chemistry*, 216, 153-160.
- ❖ Shibamoto, T. (2006). Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(1), 12-25.
- ❖ Shibamoto, T. (2014). Diacetyl: Occurrence, Analysis, and Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4048–4053.
- ❖ Smeriglio, A., Toscano, G., Denaro, M., De Francesco, C., Agozzino, S., & Trombetta, D. (2019). Nitrogen Headspace Improves the Extra Virgin Olive Oil Shelf-Life, Preserving Its Functional Properties. *Antioxidants*, 8(9), 331.
- ❖ Srey, C., Hull, G. L., Connolly, L., Elliott, C. T., del Castillo, M. D., & Ames, J. M. (2010). Effect of inhibitor compounds on N ε-(carboxymethyl) lysine (CML) and N ε-(carboxyethyl) lysine (CEL) formation in model foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 12036-12041.
- ❖ Sun, Y., Zhou, D., & Shahidi, F. (2018). Antioxidant properties of tyrosol and hydroxytyrosol saturated fatty acid esters. *Food Chemistry*, 245, 1262–1268.
- ❖ Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. *Food Chemistry*, 45(2), 141–144.
- ❖ Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., Yong, A., Striker, G. & Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911-916.
- ❖ Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661–676.
- ❖ Vidal, N., Cavaille, J. P., Graziani, F., Robin, M., Ouari, O., Pietri, S., & Stocker, P. (2014). High throughput assay for evaluation of reactive carbonyl scavenging capacity. *Redox Biology*, 2, 590–598.

- ❖ Visioli, F., & Galli, C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition reviews*, 56(5), 142-147.
- ❖ Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., & Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*, 47(sup1), 3-27.
- ❖ Voziyan, P., Brown, K. L., Chetyrkin, S., & Hudson, B. (2014). Site-specific AGE modifications in the extracellular matrix: a role for glyoxal in protein damage in diabetes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52(1), 39-45.
- ❖ Wang, Q., Hengel, M., & Shibamoto, T. (2019). Formation of toxic glyoxal, methylglyoxal and diacetyl formed in the headspace of heated edible oils. *Global Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1(1), 1-8.
- ❖ Wang, X., Ho, C., & Shahidi, F. (2020). Flavor Components of Fats and Oils. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 1–25.
- ❖ Wani, T. A., Masoodi, F. A., Gani, A., Baba, W. N., Rahmanian, N., Akhter, R., Wani, I. A., & Ahmad, M. (2018). Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 77–90.
- ❖ Wei, Q., Liu, T., & Sun, D. W. (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 32-45.
- ❖ Yubero-Serrano, E. M., Lopez-Moreno, J., Gomez-Delgado, F., & Lopez-Miranda, J. (2018). Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *European Journal of Clinical Nutrition*.
- ❖ Zhu, J., Niu, Y., & Xiao, Z. (2020). Characterization of important sulfur and nitrogen compounds in Lang Baijiu by application of gas chromatography-olfactometry, flame photometric detection, nitrogen phosphorus detector and odor activity value. *Food Research International*, 131, 109001.
- ❖ Τσολάκου Α. (2017). Μελέτη και πρόβλεψη σταθερότητας φαινολικών συστατικών ελαιολάδου-ελαιοκανθολικό οξύ: νέο προϊόν οξείδωσης ελαιολάδου, Μεταπτυχιακή μελέτη, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

#### **Ελληνική και ξενόγλωσση βιβλιογραφία**

- ❖ Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6<sup>η</sup> Έκδοση, *Εκδόσεις Κωσταράκη*, 873.
- ❖ Μπόσκου Δ. (2004). Χημεία τροφίμων, 5<sup>η</sup> Έκδοση, *Εκδόσεις Γαρταγάνη*, Θεσσαλονίκη, 155.
- ❖ Χατζηϊωάννου, Θ. Π., & Κούππαρη Μ. Α. (2010). Ενόργανη Ανάλυση, 7<sup>η</sup> Έκδοση, *Πανεπιστήμιο Αθηνών*, Αθήνα, 403, 439-441, 453.

### *Πηγές διαδικτύου*

- ❖ [https://eur-lex.europa.eu/<sup>\[1\]</sup>legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R1830&from=EL](https://eur-lex.europa.eu/<sup>[1]</sup>legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R1830&from=EL)
- ❖ [https://eur-lex.europa.eu/<sup>\[2\]</sup>LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:295:0057:0077:EL:PDF](https://eur-lex.europa.eu/<sup>[2]</sup>LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:295:0057:0077:EL:PDF)



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Παράρτημα 1:** Πίνακας που περιλαμβάνει τα δείγματα ελαιολάδου με τις βέλτιστες επαναλήψιμες τιμές γλυκοζάλης (%) και τη μέση τιμή TPC που αντιστοιχεί στο καθένα.

Κωδικός Δείγματος	n	Μέση τιμή GO (%)	Μέση τιμή TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου)
KOR_HER_OO_01	2	11.35 ± 2.39	304.54
KOR_HER_OO_09	2	3.43 ± 0.44	379.09
KOR_HER_OO_10	2	10.09 ± 2.14	431.50
KOR_RET_OO_03	2	5.20 ± 1.77	259.57
KOR_RET_OO_05	2	5.05 ± 1.56	201.87
KOR_CHA_OO_04	2	6.70 ± 3.22	329.46
KOR_CHA_OO_05	2	4.75 ± 2.07	222.61
KOR_LES_OO_01	2	0.58 ± 0.15	140.40
KOR_LES_OO_09	3	12.63 ± 1.37	35.36
KOR_LES_OO_14	2	4.29 ± 0.92	102.49
KOR_MES_OO_02	2	4.75 ± 0.06	107.85
KOR_MES_OO_05	2	0.40 ± 0.03	111.70
KOR_MES_OO_08	2	9.53 ± 3.71	96.83
KOR_MES_OO_12	2	0.58 ± 0.01	80.93

Mean=5.66 %, SD=3.97 %, 14 τιμές με εύρος από 0.4 έως 12.63 %

**Παράρτημα 2:** Πίνακας που περιλαμβάνει τα δείγματα ελαιολάδου με τις βέλτιστες επαναλήψιμες τιμές μεθυλογλυκοζάλης (%) και τη μέση τιμή TPC που αντιστοιχεί στο καθένα.

Κωδικός Δείγματος	n	Μέση τιμή MGO (%)	Μέση τιμή TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου)
KOR_HER_OO_09	2	7.61 ± 2.74	379.09
KOR_HER_OO_10	2	12.52 ± 0.94	431.50
KOR_RET_OO_03	2	7.29 ± 0.99	259.57
KOR_RET_OO_05	2	10.32 ± 2.61	201.87
KOR_CHA_OO_04	2	9.29 ± 0.20	329.46
KOR_CHA_OO_05	2	8.96 ± 1.47	222.61
KOR_LES_OO_01	2	0.98 ± 0.26	140.40
KOR_LES_OO_09	3	9.80 ± 2.88	35.36
KOR_LES_OO_14	2	13.62 ± 5.03	102.49
KOR_MES_OO_02	2	6.09 ± 1.46	107.85
KOR_MES_OO_05	2	0.77 ± 0.06	111.70
KOR_MES_OO_08	2	9.89 ± 3.02	96.83
KOR_MES_OO_12	2	0.83 ± 0.11	80.93

Mean=7.53 %, SD=4.29 %, 13 τιμές με εύρος από 0.77 έως 13.62 %

**Παράρτημα 3:** Πίνακας που περιλαμβάνει τα δείγματα ελαιολάδου με τις βέλτιστες επαναλήψιμες τιμές διακετυλίου (%) και τη μέση τιμή TPC που αντιστοιχεί στο καθένα.

Κωδικός Δείγματος	n	Μέση τιμή DA (%)	Μέση τιμή TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου)
KOR_HER_OO_01	2	69.92 ± 8.91	304.54
KOR_HER_OO_02	2	91.53 ± 2.82	269.74
KOR_HER_OO_09	2	88.96 ± 3.18	379.09
KOR_HER_OO_10	2	77.39 ± 1.20	431.50
KOR_RET_OO_03	2	87.50 ± 0.78	259.57
KOR_RET_OO_05	2	84.62 ± 1.04	201.87
KOR_CHA_OO_04	2	84.00 ± 3.42	329.46
KOR_CHA_OO_05	2	86.29 ± 3.54	222.61
KOR_LAS_OO_06	2	86.77 ± 17.61	270.93
KOR_LAS_OO_07	2	96.63 ± 3.46	282.44
KOR_LES_OO_01	2	98.44 ± 0.41	140.40
KOR_LES_OO_14	2	82.09 ± 5.03	102.49
KOR_LES_OO_16	2	97.61 ± 2.07	88.48
KOR_MES_OO_02	2	89.17 ± 1.53	107.85
KOR_MES_OO_05	2	98.83 ± 0.09	111.70
KOR_MES_OO_08	2	80.68 ± 6.87	96.83
KOR_MES_OO_09	2	86.96 ± 15.76	102.86
KOR_MES_OO_12	2	98.60 ± 0.11	80.93

Mean=88.58 %, SD=8.11%, 18 τιμές με εύρος από 69.92 έως 98.83 %