



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

Αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων ρίγανης και η επίδρασή τους στην
αντιοξειδωτική δράση- οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου



Μαριάνθη Δημητρίου

Χημικός

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Ευχαριστίες

Η πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας έγινε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Χημείας, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με κατεύθυνση την «Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων».

Η ανάθεση του θέματος και επίβλεψη της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας έγινε από τον καθηγητή Ιωάννη Ρούσση. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ρούσση, για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών αλλά και, για την συμβολή του στις γνώσεις που αποκόμισα μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του προσωπικού των φοιτητικών εργαστηρίων Αναλυτικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων, την Πιπερίδη Χριστίνα και τον Καλλιμάνη Αριστείδη, αντίστοιχα, για την συμμετοχή τους στην οργανοληπτική αξιολόγηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, όλες και ανεξαιρέτως, τις συναδέλφους μου στο ερευνητικό εργαστήριο για την πολύτιμη βοήθεια, την στήριξη, τις αξέχαστες στιγμές, τις εξαιρετικές ώρες εργασίας και την υπέροχη συνεργασία όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Κλείνοντας, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για την υποστήριξη, την κατανόηση, την υπομονή τους και που ήταν πάντα δίπλα μου σε όλη την διάρκεια αυτού του ακαδημαϊκού ταξιδιού το οποίο, χωρίς αυτούς δεν θα ήταν εφικτό.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «Ανάπτυξη ερευνητικών υποδομών για τον σχεδιασμό, την παραγωγή και την ανάδειξη των χαρακτηριστικών ποιότητας και ασφάλειας αγροδιατροφικών και βιολειτουργικών προϊόντων» (ΕΥ-ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ)» (MIS 5047235) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

Περιεχόμενα

Συντομογραφίες	- 1 -
Περίληψη	- 2 -
Abstract	- 3 -
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	- 4 -
1.1. Ιστορικά στοιχεία	- 4 -
1.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης	- 6 -
1.2.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης- Αρωματικό φυτό	- 6 -
1.2.2. Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου ρίγανης	- 7 -
1.2.3. Αντιοξειδωτική δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης	- 8 -
1.3. Ελαιόλαδο	- 10 -
1.3.1. Κατηγορίες Ελαιολάδου	- 10 -
1.3.2. Χημική σύσταση ελαιολάδου	- 12 -
1.3.2.1. Σαπωνοποιήσιμο κλάσμα	- 13 -
1.3.2.2. Ασαπωνοποίητο κλάσμα	- 14 -
1.3.3. Οξείδωση ελαιολάδου	- 22 -
1.3.4. Αποθήκευση και θερμική επεξεργασία ελαιολάδου	- 26 -
1.3.5. Αντιοξειδωτική δράση ελαιολάδου	- 28 -
1.3.6. Ελαιόλαδο και υγεία	- 29 -
1.3.7. Εμπλουτισμός ελαιολάδου με αιθέριο έλαιο ρίγανης	- 30 -
1.3.8. Οργανοληπτικός έλεγχος ελαιολάδου	- 31 -
1.4. Αρχές μεθόδων ανάλυσης	- 33 -
1.4.1. Αριθμός σαπωνοποίησης	- 33 -
1.4.2. Αριθμός ιωδίου	- 33 -
1.4.3. Χλωροφύλλες- Καροτενοειδή	- 34 -
1.4.4. Προσδιορισμός οξύτητας	- 34 -
1.4.5. Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων	- 35 -
1.4.6. Μέτρηση απορρόφησης στο UV (234 και 270 nm)	- 35 -
1.4.7. Προσδιορισμός συντελεστών Km και ΔK	- 36 -
1.4.8. Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH	- 36 -
1.4.9. Μέθοδοι όπου χρησιμοποιείται το πολικό εκχύλισμα ελαιολάδου	- 37 -
1.4.9.1. Πικρότητα	- 37 -
1.4.9.2. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin)	- 37 -
1.4.9.3. Όρθο-διφαινόλες	- 38 -
1.4.9.4. Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP)	- 39 -
1.5. Σκοπός	- 39 -

2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 40 -
2.1.	Αιθέρια έλαια ρίγανης και ελαιόλαδο μελέτης	- 40 -
2.2.	Αντιδραστήρια- σκεύη- όργανα	- 40 -
2.2.1.	Αντιδραστήρια	- 40 -
2.2.2.	Σκεύη	- 41 -
2.2.3.	Όργανα, συσκευές	- 41 -
2.3.	Μέθοδοι ανάλυσης αιθέριων ελαίων ρίγανης	- 42 -
2.3.1.	Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH	- 42 -
2.3.2.	Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin)	- 43 -
2.3.3.	Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP).....	- 44 -
2.4.	Μέθοδοι ανάλυσης ελαιολάδου	- 46 -
2.4.1.	Αριθμός σαπωνοποίησης.....	- 46 -
2.4.2.	Αριθμός ιωδίου	- 47 -
2.4.3.	Πυκνότητα	- 48 -
2.4.4.	Χλωροφύλλες- Καροτενοειδή	- 49 -
2.4.5.	Προσδιορισμός οξύτητας	- 49 -
2.4.6.	Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων	- 51 -
2.4.7.	Μέτρηση απορρόφησης στο UV (234 και 270 nm)	- 52 -
2.4.8.	Προσδιορισμός συντελεστών Km και ΔΚ.....	- 53 -
2.4.9.	Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH	- 53 -
2.4.10.	Μέθοδοι όπου χρησιμοποιείται το πολικό εκχύλισμα ελαιολάδου	- 54 -
2.4.10.1.	Λήψη πολικού εκχυλίσματος.....	- 54 -
2.4.10.2.	Πικρότητα	- 55 -
2.4.10.3.	Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin).....	- 56 -
2.4.10.4.	Όρθο-διφαινόλες.....	- 58 -
2.4.10.5.	Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP).....	- 59 -
2.4.10.6.	Λήψη φάσματος στο UV	- 61 -
2.5.	Διαδικασία εμπλουτισμού ελαιολάδου με αιθέρια έλαια ρίγανης	- 62 -
2.6.	Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	- 63 -
2.7.	Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων ελαιολάδου	- 63 -
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 64 -
3.1.	Αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων ρίγανης	- 64 -
3.1.1.	Αντιοξειδωτική δράση- Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin).....	- 64 -
3.1.2.	Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP).....	- 65 -
3.1.3.	Δέσμευση της ρίζας DPPH.....	- 66 -
3.1.4.	Ρίζα DPPH- Δείκτης IC ₅₀ των αιθέριων ελαίων ρίγανης	- 68 -

3.2. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξείδωση και στην ποιότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου.....	- 69 -
3.2.1. Χαρακτηριστικά ποιότητας έξτρα παρθένου ελαιολάδου	- 69 -
3.2.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά ποιότητας ελαιολάδου μελέτης	- 69 -
3.2.1.2. Κατηγοριοποίηση ελαιολάδου μελέτης	- 70 -
3.2.2. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξύτητα και αντιοξειδωτική δράση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν.....	- 71 -
3.2.2.1. Οξύτητα	- 71 -
3.2.2.2. Αντιοξειδωτικά- Αντιοξειδωτική δράση στο πολικό εκχύλισμα έξτρα παρθένου ελαιολάδου και των εμπλουτισμένων δειγμάτων με τα αιθέρια έλαια ρίγανης	- 72 -
3.2.3. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξειδωτική σταθερότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου	- 80 -
3.2.4. Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων ελαιολάδου.....	- 84 -
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	- 85 -
4.1. Αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων ρίγανης	- 85 -
4.2. Εμπλουτισμός έξτρα παρθένου ελαιολάδου με αιθέριο έλαιο ρίγανης.....	- 85 -
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 86 -

Συντομογραφίες

ΕΜ: Ελαιόλαδο Μάρτυρας- έξτρα παρθένο ελαιόλαδο

ΕΡ_{Η1}: Ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με Ριγανέλαιο Ηπείρου (Πρέβεζα)

ΕΡ_{Η2}: Ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με Ριγανέλαιο Ηπείρου (Ιωάννινα)

ΕΡ_Κ: Ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με Ριγανέλαιο Κρήτης

ΕΡ_Μ: Ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με Ριγανέλαιο Μακεδονίας

ΕΡ_Π: Ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με Ριγανέλαιο Πελοποννήσου

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε, α) η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης αιθέριων ελαίων ρίγανης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, δηλαδή, Ήπειρο, Κρήτη, Μακεδονία και Πελοπόννησο, και β) εμπλουτισμός έξτρα παρθένου ελαιολάδου από την Πρέβεζα (ποικιλίας Λιανολιά) με τα αιθέρια έλαια ρίγανης από τις διάφορες περιοχές και μελέτη της επίδρασής τους στην οξύτητα, όπως και στην αντιοξειδωτική δράση- οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου.

Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων ρίγανης μελετήθηκε με τις μεθόδους Folin, Frap και DPPH. Όλα τα αιθέρια έλαια παρουσίαζαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Τα αιθέρια έλαια ρίγανης παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, με βάση τον τόπο, κατά την σειρά: Κρήτη $\geq$ Μακεδονία > Πελοπόννησος > Ήπειρος (Ιωάννινα) $\geq$ Ήπειρος (Πρέβεζα).

Το ελαιόλαδο που μελετήθηκε κατηγοριοποιήθηκε σύμφωνα με τον πίνακα κατάταξης του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου ως «εξαιρετικά παρθένο». Τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου δεν παρουσίασαν διαφορές ως προς την οξύτητα σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Η αντιοξειδωτική δράση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου και των εμπλουτισμένων δειγμάτων ελαιολάδου αποτιμήθηκε με τις μεθόδους Folin, Frap και DPPH. Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, όπως μετρήθηκε με την μέθοδο της Frap. Μεταξύ των εμπλουτισμένων δειγμάτων και με βάση την αναγωγική ισχύς τους (μέθοδος Frap) παρατηρήθηκε η παραπάνω σειρά: Κρήτη $\geq$ Μακεδονία = Πελοπόννησος = Ήπειρος (Ιωάννινα) $\geq$ Ήπειρος (Πρέβεζα).

Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα διατηρήθηκαν στους 50 °C και επεξεργάστηκαν στους 180 °C, και η οξειδωτική τους κατάσταση αποτιμήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 234 και 270 nm (πρωτογενής και δευτερογενής οξείδωση, αντίστοιχα). Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα παρουσίασαν μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα τόσο στους 50 °C όσο και στους 180 °C σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, όπως προέκυψε από τις τιμές των απορροφήσεων στα 234 nm (πρωτογενής οξείδωση). Η μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα στους 50 °C παρατηρήθηκε κατά την σειρά: Μακεδονία $\geq$ Πελοπόννησος $\geq$ Κρήτη $\geq$ Ήπειρος (Ιωάννινα) = Ήπειρος (Πρέβεζα). Στους 180 °C δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην οξειδωτική σταθερότητα μεταξύ των εμπλουτισμένων δειγμάτων.

Abstract

The aim of the present thesis was, a) the evaluation of the antioxidant activity of oregano essential oils from different regions of Greece, namely, Epirus, Crete, Macedonia and the Peloponnese, and b) the flavouring of extra virgin olive oil from Preveza (Lianolia variety) with the respective oregano essential oils and the evaluation of their effect on the acidity, as well as on the antioxidant activity - oxidative stability of the olive oil.

The antioxidant activity of the oregano essential oils was assessed using the following methods: Folin, Frap and DPPH. All oregano essential oils exhibited significant antioxidant activities. Oregano essential oils exhibited antioxidant activity, based on their region of origin, in the order: Crete $\geq$ Macedonia > Peloponnese > Epirus (Ioannina) $\geq$ Epirus (Preveza).

According to the classification table of the International Olive Oil Council, the studied olive oil was classified in the "extra virgin" category. The flavoured olive oil samples showed no differences in the acidity of the oils in comparison to the extra virgin olive oil. The antioxidant activity of extra virgin olive oil and the flavoured olive oil samples was evaluated using the Folin, Frap and DPPH assays. The flavoured olive oils showed greater antioxidant activity, as measured by the Frap method. Among the flavoured olive oil samples and based on their reducing power (Frap method) the following order was observed: Crete $\geq$ Macedonia = Peloponnese = Epirus (Ioannina) $\geq$ Epirus (Preveza).

The extra virgin olive oil and the flavoured olive oil samples were kept at 50 °C and processed at 180 °C, and their oxidative stability was assessed by measuring the absorbances at 234 and 270 nm (primary and secondary oxidation, respectively). The flavoured olive oil samples exhibited greater oxidative stability both at 50 °C and 180 °C compared to the extra virgin olive oil, as indicated by the absorbance values at 234 nm (primary oxidation). The highest oxidative stability at 50 °C was observed according to the order: Macedonia $\geq$ Peloponnese $\geq$ Crete $\geq$ Epirus (Ioannina) = Epirus (Preveza). No difference in the oxidative stability between the flavoured olive oil samples was observed at the 180 °C process.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Ιστορικά στοιχεία

Από την πολύ μακρινή αρχαιότητα (~10000 π.Χ.) τα αρωματικά φυτά που περιέχουν αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνταν ως μπαχαρικά και φάρμακα για την θεραπεία ασθενειών αλλά και σε θρησκευτικές τελετές λόγω των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων και των ευχάριστων οσμών τους. Κατά των 14^ο έως τον 16^ο αιώνα γράφτηκαν πολλές συνταγές που αφορούσαν αλοιφές, φάρμακα και βότανα και οι οποίες περιλάμβαναν και την παρασκευή και τον τρόπο χρήσης αιθέριων ελαίων. Η δημιουργία των μεθόδων απόσταξης αποδίδεται στην περίοδο των Αράβων Αλχημιστών με τον Αβίκεννα (980-1037) κατά την οποία περιγράφεται η διαδικασία της απόσταξης με ατμό, στην οποία αναγράφεται η επινόηση ενός σπειροειδούς σωλήνα ψύξης για την παρασκευή αιθέριων ελαίων και αρωματικών νερών (1). Μέχρι τον Μεσαίωνα, η απόσταξη χρησιμοποιούνταν, κυρίως, για την παραγωγή αρωματικών νερών ενώ, το αιθέριο έλαιο που σχηματιζόταν στην επιφάνεια του απεσταγμένου νερού θεωρούνταν ανεπιθύμητο παραπροϊόν (1,2). Γενικά, τα στοιχεία που αφορούν τις μεθόδους, τους στόχους και τα αποτελέσματα της απόσταξης στην αρχαιότητα είναι σπάνια και εξαιρετικά ασαφή (2). Το αρχαιότερο έλαιο εικάζεται πως είναι το τερεβινθέλαιο. Το 1592 η δεύτερη επίσημη έκθεση της Νυρεμβούργης του "Dispensatorium Valerii Cordi", απαριθμεί τουλάχιστον 61 αποσταγμένα αιθέρια έλαια, γεγονός που δείχνει την ραγδαία ανάπτυξη της γνώσης των αιθέριων ελαίων καθώς και την επίσημη αποδοχή τους από το κοινό (2).

Η ελιά, είναι ένα από τα παλαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στον κόσμο. Η βρώσιμη ελιά φαίνεται να συνυπάρχει με τον άνθρωπο για περίπου 5000 έως 6000 χρόνια από τα πρώτα κιόλας χρόνια της εποχής του Χαλκού (3). Όπως είναι γνωστό, παλαιότερα ήταν το σύμβολο της φιλίας και της ειρήνης μεταξύ των εθνών (4). Επίσης, πολλές πληροφορίες για την χρήση της τόσο για κοινωνικούς όσο και για θρησκευτικούς σκοπούς αναγράφονται στην Ελληνική Μυθολογία αλλά και στην Παλαιά Διαθήκη (4). Αναμφίβολα, η ελιά έχει παίξει σημαντικό ρόλο στους αρχαίους πολιτισμούς (3). Η ελιά ανήκει στην οικογένεια, *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει περίπου 30 γένη και 600 είδη δέντρων ελιάς. Το γένος *Olea* L. αποτελείται από περισσότερα από 30 είδη, τα οποία διανέμονται σε όλη την Ευρώπη, την Ασία, την Ωκεανία και Αφρική, με μοναδικό καλλιεργούμενο είδος το *Olea europaea* L. (3).

Σύμφωνα με έρευνες πιστεύεται ότι πιθανότητα η ελιά, όπως την γνωρίζουμε σήμερα, να πρωτοεμφανίστηκε πριν από περίπου 5000 χρόνια στην περιοχή που αντιστοιχούσε στην τότε αρχαία Περσία και Μεσοποταμία και από εκεί να εξαπλώθηκε στη Συρία και την Παλαιστίνη.

Οι κάτοικοι αυτών των περιοχών ανέπτυξαν την καλλιέργεια της ελιάς και έπειτα την έφεραν μέσω στεριάς ή θάλασσας στην Βόρεια Αφρική. Βέβαια, υπάρχει και η αντίληψη πως το δέντρο της ελιάς προήλθε από την Αφρική, αφού οι αρχαίοι Αιγύπτιοι καλλιεργούσαν τους ελαιόκαρπους (4). Αργότερα, και γύρω στον 28^ο αιώνα π.Χ. η ελιά έφτασε και στα Ελληνικά νησιά, την Λιβύη και την Καρχηδόνα. Με την σειρά τους οι Έλληνες, λόγω αποικιών που σχημάτισαν σε άλλες χώρες της Μεσογείου εισήγαγαν την καλλιέργεια της ελιάς και σε χώρες όπως είναι η Ισπανία. Με τον ίδιο τρόπο, και οι Ρωμαίοι «γνώρισαν» την ελιά από τις ελληνικές αποικίες που είχαν δημιουργηθεί στην Ιταλία. Τον 15^ο αιώνα μ.Χ. η ελιά έφτασε στην Αμερική ωστόσο, η καλλιέργεια της επιτρεπόταν μόνο σε περιοχές παρόμοιου κλίματος με αυτό των Μεσογειακών περιοχών (π.χ. Αργεντινή, Καλιφόρνια) (4).

Γενικά, τα ελαιόδεντρα έχουν μια εκπληκτική ικανότητα να επιβιώνουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες όμως, προκειμένου να ανθίσει το δέντρο και να αποδώσει καρπούς χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επομένως, πρέπει να υπάρχει το κατάλληλο περιβάλλον αλλά και η κατάλληλη πολιτιστική φροντίδα έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι σταθερές συνθήκες παραγωγής του ελαιόδεντρου. Σήμερα, η καλλιέργεια της ελιάς πραγματοποιείται σε πολλές χώρες συμπεριλαμβανομένης της Ισπανίας, της Ιταλίας και της Ελλάδας (3).

Η παραγωγή του ελαιολάδου είχε ξεκινήσει από το 5000 π.Χ. κατά την εποχή του Χαλκού όπου οι αρχαίοι μάζευαν και συνέθλιβαν τις ελιές σε πέτρινα γουδιά. Έπειτα, η πάστα ελιάς μεταφερόταν σε ένα μικρό δοχείο και μετά την προσθήκη ζεστού νερού το ελαιόλαδο μαζευόταν από την επιφάνεια ως πιο ελαφρύ από το νερό και τοποθετούνταν σε πήλινα δοχεία. Η παραγωγή του όμως, περιοριζόταν μόνο μέσα σε κάθε νοικοκυριό ξεχωριστά από τα μέλη της οικογένειας (4). Μέχρι και την Ελληνιστική περίοδο χρησιμοποιούνταν παρόμοιες πρακτικές παραγωγής ελαιολάδου με κάποιες μόνο διαφορές. Ύστερα, οι Ρωμαίοι συνέβαλαν στην τεχνολογική ανάπτυξη επεξεργασίας της ελιάς με την προσθήκη θραυστήρων μυελόπετρας και πιεστηρίων (4). Κατά τον Μεσαίωνα, η παραγωγή και η σημασία του ελαιολάδου συνέχισε να αυξάνεται, κυρίως, στις χώρες της Ισπανίας, της Ιταλίας και της Ελλάδας (3). Τον 20^ο αιώνα μ.Χ. παρατηρήθηκαν πολλές τεχνολογικές βελτιώσεις και καινοτομίες (4).

1.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

1.2.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης- Αρωματικό φυτό

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν φυσικά προϊόντα αρωματικών φυτών και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των βιολογικών δράσεών τους και του έντονου αρώματός τους (5). Είναι υγρά μείγματα πτητικών ενώσεων που παράγονται ύστερα από απόσταξη των εκάστοτε αρωματικών φυτών. Η πιο συνήθης διαδικασία απόσταξης για την λήψη τους είναι η απόσταξη με ατμούς. Αποτελούν αυτό που ονομάζεται «ουσία» ενός φυτού και συνήθως έχουν, πέρα από έντονο, και ευχάριστο άρωμα. Σύμφωνα με την αρχαία βιβλιογραφία, τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιετίες χάρης στα οφέλη που παρουσιάζουν στην υγεία του ανθρώπου με μερικές από τις ευεργετικές τους ιδιότητες να περιλαμβάνουν αντισηπτικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Ακόμα, η αντιοξειδωτική δράση που διαθέτουν αρκετά αιθέρια έλαια θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την προστασία άλλων υλικών όπως, τροφίμων από την οξείδωση (6).

Η ρίγανη είναι ένα αρωματικό φαρμακευτικό φυτό πολύ διαδεδομένο στην Ελλάδα το οποίο ανευρίσκεται σε διάφορες περιοχές της. Είναι ένα υψίστης σημασίας φυτικό είδος καθώς περιέχει βιοδραστικά συστατικά με πολλά οφέλη για τον άνθρωπο. Η ρίγανη που συναντάται, κυρίως, στην Ελλάδα είναι του είδους *Origanum vulgare*. Λόγω ύπαρξης σημαντικών φαινοτυπικών και χημειοτυπικών διαφορών μεταξύ των φυτών ρίγανης αυτού του είδους έχει γίνει διαχωρισμός του σε τρία υποείδη και συγκεκριμένα, τα *Origanum vulgare ssp. hirtum* ή *heracleoticum*, *Origanum vulgare ssp. viridulum* και *Origanum vulgare ssp. vulgare*. Το φυτό της ρίγανης αναπτύσσεται σε ξηρές και ηλιόλουστες περιοχές σε θαλάσσιο επίπεδο μέχρι και τα 1500 μέτρα (7). Στην Ελλάδα, το υποείδος που είναι γνωστό ως «Ελληνική ρίγανη» και παρουσιάζει την μεγαλύτερη εξάπλωση είναι το *Origanum vulgare ssp. hirtum*. Παρά την ποικιλομορφία που το χαρακτηρίζει, ο διαχωρισμός του από τα άλλα υποείδη γίνεται από τους τριχωτούς μίσχους του, τις συμπαγείς ταξιανθίες, τα πυκνά αδενώδη φύλλα και τους κάλυκες, τα πράσινα βράκτια, που είναι συνήθως όσο οι κάλυκες, και τα λευκά άνθη (8). Γενικότερα, τα εναέρια όργανα της ρίγανης δηλαδή, αυτά που βρίσκονται πάνω από το έδαφος, καλύπτονται σε μεγάλο ποσοστό από μη αδενικά και αδενικά τριχώματα. Τα μη αδενικά τριχώματα είναι υπεύθυνα, κυρίως, για την μηχανική άμυνα του φυτού ενάντια στα παράσιτα ενώ, τα αδενικά τριχώματα λειτουργούν ως όργανα τα οποία εκκρίνουν αιθέριο έλαιο που με την σειρά του δρα ως ένας ενεργός προστατευτικός μηχανισμός κατά των θηρευτών, των παθογόνων και των ανταγωνιστών. Ωστόσο, πέρα από την παραπάνω λειτουργία που

παρουσιάζει, το αιθέριο έλαιο ρίγανης είναι υπεύθυνο και για τη γεύση καθώς και, για την αντιμικροβιακή και αντισηπτική δράση του φυτού (9). Ακόμα, αυτή η μεγάλη πυκνότητα σε αδενικά τριχώματα που χαρακτηρίζει αυτό το υποείδος ρίγανης ισοδυναμεί με μεγαλύτερη περιεκτικότητα αιθέριου ελαίου σε σχέση με τα άλλα υποείδη (7).



Εικόνα 1. «Ελληνική ρίγανη» του υποείδους *Origanum vulgare ssp. hirtum*.

Να σημειωθεί, πως η παραγωγή και η σύνθεση του αιθέριου ελαίου επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε βιοχημικές και φυσιολογικές διαφοροποιήσεις στο φυτό. Με άλλα λόγια, μελέτες αναφέρουν ότι η συγκέντρωση σε αιθέριο έλαιο αλλά και η σύνθεση των φυτών *Origanum* επηρεάζονται από την φυτική γενετική και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι το υψόμετρο στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό, η ένταση του φωτός, η ξηρασία, η διαθεσιμότητα των μετάλλων στην φύση, ο χρόνος συγκομιδής και ο χειρισμός μετά την συγκομιδή (9).

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να παραχθούν με δυο τρόπους. Είτε μέσω της βιοσύνθεσής τους σε εξειδικευμένα φυτικά κύτταρα είτε μέσω απόσταξης από πρόδρομες χημικές ουσίες που υπάρχουν στα φυτά. Κατά την παραγωγή με απόσταξη, τα αιθέρια έλαια περιέχουν συστατικά τα οποία δεν υπάρχουν φυσικά μέσα στα φυτά. Ουσιαστικά, τα αιθέρια έλαια βρίσκονται φυσικά μέσα στο φυτό αλλά η συγκέντρωσή τους αυξάνεται λόγω της μετατροπής των ήδη παρόντων χημικών προδρόμων. Ως εκ τούτου, τα αιθέρια έλαια παρασκευάζονται από φυσικά συστατικά, αλλά δεν είναι όλα τα συστατικά των αιθέριων ελαίων φυσικά από μόνα τους (10).

1.2.2. Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου ρίγανης

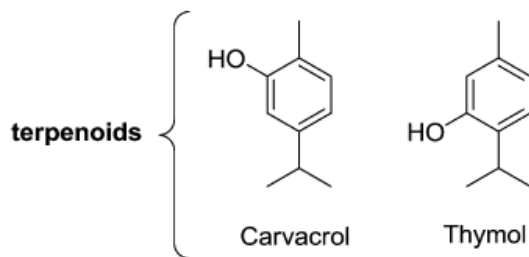
Όπως είναι γνωστό, τα αιθέρια έλαια ανευρίσκονται στην φύση και αποτελούνται από πολύπλοκα μείγματα χημικών ουσιών. Αυτές οι χημικές ουσίες μπορεί να είναι πτητικές και μη. Πιο αναλυτικά, εφόσον είναι δυνατή η παραλαβή των αιθέριων ελαίων με απόσταξη και συγκεκριμένα, με απόσταξη με ατμούς (ατμοσφαιρικής πίεσης), τα χημικά συστατικά αυτών

θα πρέπει να έχουν χαμηλά σημεία βρασμού δηλαδή, να έχουν μοριακό βάρος κάτω από 300 Dalton (μοριακή μάζα σε σχέση με το υδρογόνο = 1). Τα χημικά συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι, συνήθως, αρκετά υδρόφοβα (5) και σε αριθμό υπερβαίνουν τα 70 (11). Περιλαμβάνουν, κυρίως, πολυφαινόλες, τερπένια, μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, μερικά από τα οποία μπορεί να αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 85 % του συνολικού περιεχομένου (11). Τα κύρια φυσικά μονοτερπένια του αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη και αποτελούν το 78-85 % αυτού. Οι δυο αυτές ενώσεις είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Βέβαια, η καρβακρόλη και η θυμόλη προσδίδουν στο έλαιο και την χαρακτηριστική οσμή και γεύση του (12). Συγκεκριμένα, η καρβακρόλη είναι υπεύθυνη για το άρωμα ρίγανης ενώ, η θυμόλη για το άρωμα θυμαριού. Ακόμα, το αιθέριο έλαιο ρίγανης περιέχει και τις πρόδρομες ουσίες των καρβακρόλης και θυμόλης οι οποίες είναι το π- κυμένιο και το γ- τερπινένιο (13). Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι ισομερείς ενώσεις και αποτελούν παράγωγα του π- κυμενίου.

Ωστόσο, πέρα από τις πτητικές ενώσεις στο αιθέριο έλαιο ρίγανης περιέχονται και ενώσεις με μη πτητικό χαρακτήρα. Οι ενώσεις αυτές είναι φαινολικές και περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Στην «Ελληνική ρίγανη» τα φαινολικά οξέα που ανευρίσκονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι το ροσμαρινικό και το λιθοσπερμικό οξύ ενώ, τα κύρια φλαβονοειδή είναι παράγωγα της λουτεολίνης και της απιγενίνης (13).

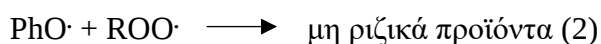
1.2.3. Αντιοξειδωτική δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης

Η καρβακρόλη και η θυμόλη του αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι κατά βάση υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική του δράση η οποία είναι αποτέλεσμα διάφορων πιθανών μηχανισμών όπως είναι αυτοί της δέσμευσης ελεύθερων ριζών, της χηλίωσης μετάλλων μεταπτώσεως και της ικανότητας σβέσης του μονήρους οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα, η καρβακρόλη και η θυμόλη έχουν την ικανότητα να σταθεροποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες μετατρέποντάς τις σε μη ριζικά προϊόντα, δίνοντάς τους άτομα υδρογόνου. Αναλυτικότερα, οι κύριες αντιοξειδωτικές ενώσεις που έχουν την δυνατότητα να δίνουν υδρογόνο είναι οι μονοϋδροξυ ή πολυϋδροξυ φαινολικές ενώσεις με ποικίλους υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο και των οποίων, το δυναμικό αναγωγής είναι χαμηλότερο από αυτό μιας ελεύθερης ρίζας και ως εκ τούτου μπορούν να δώσουν ένα υδρογόνο σε αυτή τη ρίζα, εκτός εάν η αντίδραση δεν ευνοείται κινητικά (12). Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι στην αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης συνεισφέρουν, ως ένα βαθμό, το ροσμαρινικό οξύ και τα παράγωγά του που υπάγονται στο μη πτητικό κλάσμα του (14).



Εικόνα 2. Οι τερπενοειδής χημικές ενώσεις καρβακρόλη και θυμόλη (6).

Γενικότερα, οι φαινολικές ενώσεις (PhOH), φυσικές ή σύνθετες, δρουν ως αντιοξειδωτικά λόγω της υψηλής τους δραστηριότητας έναντι των ριζών υπεροξειδίου (ROO·) (αντίδραση 1). Συνεπώς, λόγω της σταθερότητας της ρίζας φαινοξυλίου (PhO·) που παράγεται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης δεν διαδίδονται και η σταθερή αυτή ρίζα αναμένει την εμφάνιση μιας δεύτερης ρίζας υπεροξειδίου για να την μετατρέψει, γρήγορα, σε μη ριζικό προϊόν (αντίδραση 2). Βέβαια, και άλλα τερπενοειδή συστατικά των αιθέριων ελαίων μπορούν να αντιδράσουν γρήγορα με τις υπεροξειδικές ρίζες, ωστόσο, η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας δραστηκής ρίζας αλκυλίου, η οποία, παρουσία οξυγόνου, σχηματίζει μια ρίζα υπεροξειδίου που προκαλεί διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης. Με άλλα λόγια, τα μη φαινολικά τερπενοειδή, και συγκεκριμένα, τα ακόρεστα, αυτο-οξειδώνονται παρόμοια με τα ακόρεστα λιπίδια (6). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρουσία των φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι οι παρακάτω:



Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο ρίγανης πέρα από αντιοξειδωτική έχει και αντιμικροβιακή δράση. Αυτή οφείλεται στον λιπόφιλο χαρακτήρα της καρβακρόλης και της θυμόλης που το καθιστά πιο ελκυστικά για τις δομές της κυτταρικής μεμβράνης. Συνεπώς, η παρουσία τους προκαλεί διαστολή της μεμβράνης, αυξάνει τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα, διαταράσσει τις ενσωματωμένες πρωτεΐνες, αναστέλλει την αναπνοή, και μεταβάλλει τις διαδικασίες μεταφοράς ιόντων (12).

1.3. Ελαιόλαδο

1.3.1. Κατηγορίες Ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι το έλαιο που προέρχεται από τον καρπό της ελιάς, αποτελεί βασικό κομμάτι της διατροφής μας εδώ και πάρα πολλά χρόνια και ξεχωρίζει λόγω του πλούσιου αρώματος, της πλούσιας γεύσης και της θρεπτικής του αξίας.

Παρθένο ελαιόλαδο είναι το λάδι που λαμβάνεται από τους καρπούς του δέντρου της ελιάς *Olea europaea* L. αποκλειστικά και μόνο με μηχανικά ή άλλα φυσικά μέσα, υπό ειδικά θερμικές συνθήκες οι οποίες, δεν έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση του ελαιολάδου και δεν έχουν υποστεί καμία άλλη κατεργασία πέρα από το πλύσιμο, τη μετάγγιση, τη φυγοκέντρηση και τη διήθηση (15).

Τα παρθένα ελαιόλαδα ταξινομούνται και χαρακτηρίζονται ως εξής:

- 1) Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο: είναι το παρθένο ελαιόλαδο που έχει ελεύθερη οξύτητα, εκφρασμένη ως % ελαϊκό οξύ, μικρότερη ή ίση από 0,8, ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος ως meq O₂/kg ελαιολάδου να μην υπερβαίνει το 20, η διακύμανση ΔΚ να είναι μικρότερη ή ίση από 0,01 και οι σταθερές K₂₆₈ και K₂₃₂ να είναι μικρότερες ή ίσες από 0,22 και 2,50, αντίστοιχα (15). Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί το υψηλότερης ποιότητας ελαιόλαδο. Πρέπει να έχει καθαρά γευστικά χαρακτηριστικά που να αντικατοπτρίζουν τον καρπό από τον οποίο παρασκευάστηκε. Σε σχέση με τον μεγάλο αριθμό και το σύνθετο της ποικιλίας, την ωριμότητα των καρπών, την περιοχή ανάπτυξης και την τεχνική εκχύλισης, τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ τους (16).
- 2) Παρθένο ελαιόλαδο: είναι το παρθένο ελαιόλαδο που έχει ελεύθερη οξύτητα, εκφρασμένη ως % ελαϊκό οξύ, μικρότερο ή ίση από 2,0, ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος ως meq O₂/kg ελαιολάδου να μην υπερβαίνει το 20, η διακύμανση ΔΚ να είναι μικρότερη ή ίση από 0,01 και οι σταθερές K₂₆₈ και K₂₃₂ να είναι μικρότερες ή ίσες από 0,25 και 2,60, αντίστοιχα (15).
- 3) Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο (Lampante): είναι το παρθένο ελαιόλαδο που έχει ελεύθερη οξύτητα, εκφρασμένη ως % ελαϊκό οξύ, μεγαλύτερη από 3,3 και ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος ως meq O₂/kg ελαιολάδου δεν διαθέτει κάποιο όριο. Μετά την παραγωγή του απαιτείται ραφινάρισμα ή διατίθεται για τεχνική χρήση (15). Αυτή η

κατηγορία ελαιολάδου αποτελεί προϊόν κακών φρούτων ή ακατάλληλου χειρισμού και επεξεργασίας. Επιπλέον, αυτή η κατηγορία ελαιολάδου χαρακτηρίζεται ως ακατάλληλη για ανθρώπινη κατανάλωση (16).

- 4) Εξευγενισμένο (ραφινारισμένο) ελαιόλαδο: είναι το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από παρθένα ελαιόλαδα με μεθόδους εξευγενισμού (επεξεργασία με υδροξείδιο του νατρίου για την εξουδετέρωση της ελεύθερης οξύτητας, πλύσιμο, στέγνωμα, απόσπηση, αποχρωματισμός, διήθηση (16)) οι οποίες δεν μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα αλλοιώσεις στην αρχική γλυκεριδική δομή. Έχει ελεύθερη οξύτητα, εκφρασμένη ως % ελαϊκό οξύ, μικρότερη ή ίση από 0,3 και ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος ως meq O₂/kg ελαιολάδου να μην υπερβαίνει το 5,0, η διακύμανση ΔK να είναι μικρότερη ή ίση από 0,16 και η σταθερά K₂₆₈ να είναι μικρότερη ή ίση από 1,25 (15). Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο είναι άοσμο, άγευστο, άχρωμο και χαρακτηρίζεται ως ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση (16).
- 5) Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα: είναι το ελαιόλαδο που προέρχεται από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένων ελαιολάδων. Αυτή η κατηγορία ελαιολάδου είναι κατάλληλη για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση. Έχει ελεύθερη οξύτητα, εκφρασμένη ως % ελαϊκό οξύ, μικρότερη ή ίση από 1,0, ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος ως meq O₂/kg ελαιολάδου να μην υπερβαίνει το 15, η διακύμανση ΔK να είναι μικρότερη ή ίση από 0,15 και η σταθερά K₂₆₈ να είναι μικρότερη ή ίση από 1,15 (15).

Πίνακας 1. Κατάταξη των ελαιολάδων με βάση τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά σύμφωνα με το IOC (15).

	Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο	Παρθένο ελαιόλαδο	Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο (Lampante)	Εξευγενισμένο (ραφιναρισμένο) ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα
Οξύτητα- % ελαϊκό οξύ	≤0,8	≤2,0	>3,3	≤0,30	≤1,00
Αριθμός Υπεροξειδίων- meqO ₂ /kg ελαιολάδου	≤20,0	≤20,0	Χωρίς όριο	≤5,0	≤15,0
ΔΚ	≤0,01	≤0,01	-	≤0,16	≤0,15
K ₂₆₈ - διαλύτης ισοοκτάνιο	≤0,22	≤0,25	-	≤1,25	≤1,15
K ₂₃₂ - διαλύτης ισοοκτάνιο	≤2,50	≤2,60	-	-	-

1.3.2. Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται, κυρίως, από τριγλυκερίδια (τριακυλογλυκερόλες) σε ποσοστό 98-99 % και περιέχει και μικρότερες ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης, φωσφατιδίων, χρωστικών, αρωματικών ενώσεων, στερολών καθώς και, μικροσκοπικών κομματιών ελιάς (17). Όλες οι παραπάνω, αλλά και άλλες κατηγορίες ενώσεων που δεν αναφέρθηκαν, περιλαμβάνονται στα δυο κλάσματα στα οποία διακρίνεται η χημική σύσταση του ελαιολάδου. Αυτά είναι το σαπωνοποίησιμο (~99 %) και το ασαπωνοποίητο (~1 %) κλάσμα.

Η χημική σύσταση του ελαιολάδου ποικίλλει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (έδαφος, θερμοκρασία, κλίμα), οι αγρονομικές πρακτικές (άρδευση, λίπανση), οι χειρισμοί κατά την συγκομιδή (στάδιο ωρίμανσης καρπών, αποθήκευση μετά τη συγκομιδή) και οι τεχνολογικοί παράγοντες των συστημάτων εκχύλισης του ελαιολάδου (τα χαρακτηριστικά του θραυστήρα, οι συνθήκες μάλαξης) (18).

1.3.2.1. Σαπωνοποιήσιμο κλάσμα

Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα, δηλαδή, οι ουσίες που σχηματίζουν σάπωνες, αντιπροσωπεύει το 98–99 % του συνολικού βάρους (17). Οι ουσίες αυτές είναι, κατά κύριο λόγο, τα τριγλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το ελαιόλαδο σχηματίζεται από τριγλυκερίδια. Με άλλα λόγια, τρία μόρια λιπαρών οξέων εστεροποιούν ένα μόριο γλυκερίνης και δίνουν το τριγλυκερίδιο. Επιπλέον, συνήθως, υπάρχουν και ελάχιστες ποσότητες διγλυκεριδίων και μονογλυκεριδίων. Η παρουσία μονο- (<0,25 %) και διγλυκεριδίων (1-2,8 %) οφείλεται σε ατελή σύνθεση και/ή μερική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων (17).

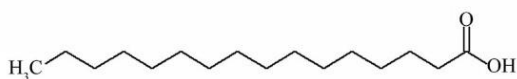
Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο ελαιόλαδο διακρίνονται σε ακόρεστα (75-85 % της συνολικής ποσότητας των λιπαρών οξέων) και κορεσμένα (15-23 %) λιπαρά οξέα. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι, κυρίως, τα μονοακόρεστα (72 %) ενώ, το ποσοστό σε πολυακόρεστα χαρακτηρίζεται χαμηλό (14 %) (19,20). Το ελαϊκό οξύ είναι το κύριο λιπαρό οξύ στο ελαιόλαδο. Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC), η συγκέντρωσή του πρέπει να κυμαίνεται από 55 έως 83 % των συνολικών λιπαρών οξέων. Επίσης, το λινελαϊκό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στο ελαιόλαδο και είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ που δεν μπορεί να συντεθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό (17,19). Κατά τον κανονισμό του IOC η συγκέντρωσή του πρέπει να ποικίλλει μεταξύ 2,5 και 21 %. Ωστόσο, λόγω του βαθμού ακορεστότητας (2 διπλοί δεσμοί, ω-6 λιπαρό οξύ) οξειδώνεται ευκολότερα. Ένα ακόμα λιπαρό οξύ με πιθανώς μεγάλη θρεπτική αξία αφού αποτελεί ένα ω-3 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, είναι το α-λινολενικό οξύ. Όμως, λόγω των τριών διπλών δεσμών είναι αρκετά ευοξειδωτο και υπεύθυνο για το λεγόμενο τάγγισμα του ελαιολάδου (17).

Επιπλέον, το ελαιόλαδο απαρτίζεται από δυο κύρια κορεσμένα λιπαρά οξέα. Το παλμιτικό σε ποσοστό 7,5–20 % και το στεατικό σε ποσοστό 0,5-5 %, με το τελευταίο να αποτελεί το κύριο κορεσμένο λιπαρό οξύ. Σε ίχνη, μπορούν να εντοπιστούν τα μυριστικό, επταδεκανοϊκό, αραχιδικό, βεχενικό, και λιγνοκερικά οξέα (17).

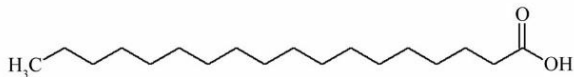
Γενικά, η αναλογία των λιπαρών οξέων δεν είναι σταθερή και εξαρτάται από την έκταση της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Επίσης, η σύσταση των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες και την τοποθεσία παραγωγής του (20).

Palmitic acid (16:0)



α

Stearic acid (18:0)



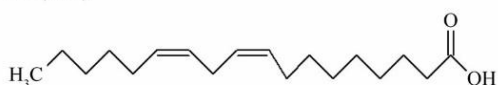
β

Oleic acid (18:1)



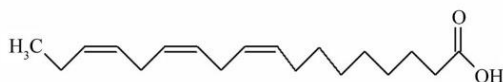
γ

Linoleic acid (18:2)



δ

Linolenic acid (18:3)



ε

Εικόνα 3. Δομές ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων ελαιολάδου: α) παλμιτικό οξύ β) στεατικό οξύ γ) ελαϊκό οξύ δ) λινελαϊκό οξύ ε) λινολενικό οξύ.

1.3.2.2. Ασαπωνοποίητο κλάσμα

Το ασαπωνοίητο κλάσμα του ελαιολάδου αποτελείται από συστατικά τα οποία αδυνατούν να σχηματίσουν σάπωνες όταν αναμειγνύονται με υδροξείδιο του νατρίου. Οι ενώσεις που απαρτίζουν το κλάσμα αυτό, αν και βρίσκονται σε μικρό ποσοστό (1-2 %), συμβάλλουν σημαντικά στην μεγάλη θρεπτική αξία του ελαιολάδου και στο οργανοληπτικό του προφίλ. Είναι δηλαδή, ενώσεις με βιολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες (20). Τέτοιες ενώσεις είναι το σκουαλένιο, οι τοκοφερόλες, οι γραμμικές αλκοόλες, οι τριτερπενικές ενώσεις, οι χρωστικές, οι υδρογονάνθρακες, οι κηροί και οι πολυφαινόλες (21). Ειδικότερα, οι ενώσεις του κλάσματος αυτού χωρίζονται σε δυο κλάσματα, στο μη πολικό και στο πολικό κλάσμα. Το πρώτο, δεν είναι υδατοδιαλυτό και μπορεί να ληφθεί μετά την σαπωνοποίηση του ελαιολάδου με ειδικούς διαλύτες. Οι ενώσεις του μη πολικού κλάσματος είναι: το σκουαλένιο, οι τοκοφερόλες, οι χρωστικές, οι τριτερπενικές ενώσεις και οι στερόλες. Το δεύτερο, είναι το υδατοδιαλυτό κλάσμα και περιλαμβάνει τις φαινολικές ενώσεις (17). Αξίζει να αναφερθεί, πως οι πολικές φαινολικές ενώσεις δεν είναι μη σαπωνοποιήσιμες καθώς δεν είναι λιπίδια.

Σκουαλένιο (υδρογονάνθρακες)

Το σκουαλένιο (2,6,10,15,19,23-εξαμεθυλ-2,6,10,14,18,22-τετρακοζανεξάνιο ή $C_{30}H_{50}$) είναι ένα ακόρεστο τερπένιο ευρέως διαδεδομένο στη φύση. Χημικά, είναι ένα trans ισοπρενοειδές που περιέχει έξι μονάδες ισοπρενίου. Είναι το κύριο συστατικό των μη σαπωνοποιησίμων ενώσεων του ελαιολάδου (21). Ακόμα, λόγω της ισχυρής υδρόφοβης φύσης του και της ακόρεστης δομής του, το σκουαλένιο δεν είναι πολύ σταθερό και οξειδώνεται εύκολα (22). Δεν παίζει πρωταρχικό ρόλο στην σταθερότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου όμως, η ικανότητά του να διασπά αλυσίδες είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης από τη ρίζα τοκοφεροξυλίου (18). Επιπλέον, προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από την αυτό-οξείδωση. Έρευνες έδειξαν ότι στο παρθένο ελαιόλαδο η περιεκτικότητα σε σκουαλένιο είναι πολύ υψηλή (έως 0,1 %- 0,8 % w/w) ωστόσο, αποσυντίθεται κατά 26-47 % μετά από 6 μήνες αποθήκευσης στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (22). Έρευνες έδειξαν ότι στο ελαιόλαδο το σκουαλένιο χαρακτηρίζεται από ασθενή αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα γεγονός, που μπορεί να εξηγηθεί από την ανταγωνιστική οξείδωση των διαφόρων λιπιδίων που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, φαινόμενο που οδηγεί σε μείωση του ρυθμού οξείδωσης (23). Επίσης, το σκουαλένιο δεν μπορεί να βρεθεί σε ελαιόλαδα που υπόκεινται ραφινάρισμα καθώς κατά την διαδικασία αυτή υπάρχει πιθανότητα να χαθεί και έτσι, ανευρίσκεται σε παρθένα και έξτρα παρθένα ελαιόλαδα και γενικά, σε έλαια που δεν υποβάλλονται σε τέτοιες διαδικασίες (24).

Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι λιπόφιλες φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση αλλά και δράση Βιταμίνης Ε. Στο ελαιόλαδο, η κύρια τοκοφερόλη είναι η α-τοκοφερόλη που αποτελεί το 90-95 % της συνολικής συγκέντρωσής του σε τοκοφερόλη (25). Βέβαια, σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν οι β- και γ- τοκοφερόλες (26). Μελέτες που αφορούσαν ελαιόλαδα της Ελλάδας έδειξαν ότι η ποσότητα της α-τοκοφερόλης είναι μεγάλη και κυμαίνεται από 98-370 mg/kg (21).

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των τοκοφερολών αυτές, και μαζί με τα φαινολικά συστατικά, ευθύνονται για την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου σε συνθήκες αποθήκευσης στο σκοτάδι (αυτό-οξείδωση) αλλά και στο φως (φωτο-οξείδωση) (26). Ειδικότερα, η δράση τους περιλαμβάνει δέσμευση ελεύθερων λιπιδικών ριζών αναστέλλοντας έτσι τη φωτο-οξείδωση που προκαλείται από το μονήρες οξυγόνο και συνεπώς, αυξάνει την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου παρουσία φωτός (18). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί

ότι ορισμένες φαινολικές ενώσεις έχουν συνεργιστική δράση με την α-τοκοφερόλη, που συμβάλλει στην περαιτέρω σταθεροποίηση του ελαιολάδου. Για παράδειγμα, μια ομάδα ερευνητών ανέφερε ότι ορισμένες πολυφαινόλες είναι αποτελεσματικοί σταθεροποιητές της α-τοκοφερόλης κατά τη θέρμανση του ελαιολάδου (26). Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι οι τοκοφερόλες εμποδίζουν την οξείδωση, όμως, οι ίδιες οξειδώνονται και μάλιστα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 250 $\mu\text{g/g}$. Επίσης, οι τοκοφερόλες καταστρέφονται με την θέρμανση και τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία του εξευγενισμού. Για το λόγο αυτό, έχει βρεθεί πως η συγκέντρωση των τοκοφερολών στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο είναι μικρότερη από αυτή στο παρθένο και στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (24,27).

Στερόλες

Η σύνθεση της στερόλης και η συνολική περιεκτικότητα σε στερόλη επηρεάζονται από την ποικιλία, το έτος καλλιέργειας, τον βαθμό ωρίμανσης των καρπών, τον χρόνο αποθήκευσης των καρπών πριν από την εκχύλιση του ελαιολάδου και τους γεωγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε στερόλες επηρεάζεται και από τις γεωργικές πρακτικές και επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, η συνολική περιεκτικότητα σε στερόλη και η σύνθεση του στερολικού κλάσματος είναι σημαντικοί δείκτες για τον έλεγχο της γνησιότητας του ελαιολάδου (21). Η περιεκτικότητα ολικής στερόλης στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1000 και 2000 mg/kg (24). Στο ελαιόλαδο διακρίνονται 4 κατηγορίες στερολών:

- 1) Οι κοινές στερόλες (4α-δεσμεθυλοστερόλες). Ανευρίσκονται είτε ελεύθερες είτε εστεροποιημένες. Οι κύριες κοινές στερόλες που μπορούν να βρεθούν στο ελαιόλαδο είναι η β-σιτοστερόλη σε ποσοστό 75-90 %, η Δ5-αβεναστερόλη σε ποσοστό 5-20 %, η καμπεστερόλη σε ποσοστό 4 % ενώ, σε μικρότερη ποσότητα ή ακόμα και σε ίχνη μπορεί να βρεθεί και η στιγμαστερόλη (17).
- 2) Οι 4-μεθυλστερόλες, τριτερπενικές αλκοόλες (4,4-διμεθυλστερόλες). Ανευρίσκονται και ελεύθερες και εστεροποιημένες αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις από ότι οι κοινές στερόλες και οι τριτερπενικές αλκοόλες. Οι κύριες 4-μεθυλστερόλες είναι οι ομπτουσιφολιόλη, κυκλοευκαλενόλη, κιτροσταδιενόλη, και γραμιστερόλη και η συγκέντρωσή τους στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 50 και 360 mg/kg ελαίου (17,24).
- 3) Οι τριτερπενικές διαλκοόλες. Οι κύριες τριτερπενικές διαλκοόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη. Η ερυθροδιόλη υπάρχει τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εστεροποιημένη μορφή. Στο παρθένο ελαιόλαδο η συγκέντρωσή της κυμαίνεται

από 19-69 mg/kg (17). Ακόμα, στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο η συγκέντρωση ολικών τριτερπενικών αλκοολών κυμαίνεται μεταξύ 350 και 1500 mg/kg (24).

Τριτερπενικές ενώσεις

Οι τριτερπενικές ενώσεις που μπορούν να βρεθούν στο ελαιόλαδο διακρίνονται σε τριτερπενικά οξέα και τριτερπενικές αλκοόλες. Είναι βιοδραστικές ενώσεις (21). Οι βιοδράσεις τους περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές, κι άλλες (28). Τα κύρια τριτερπενικά οξέα του ελαιολάδου είναι τα ολεανολικό (3β-υδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ) και μασλινικό οξύ (2α,3β-διυδροξυολικό οξύ-12-εν-28-οϊκό οξύ) (21). Επίσης, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο των στερολών, τις κύριες τριτερπενικές αλκοόλες του ελαιολάδου αποτελούν οι ερυθροδιόλη και ουβαόλη. Αυτά τα δύο υδροξυπεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα και αυτές οι δύο διαλκοόλες παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σχετικά με τη λειτουργία που υπάρχει στη θέση C-17. Πιο ειδικά, το μασλινικό οξύ έχει δύο γειτονικές υδροξυλομάδες στις θέσεις C-2 και C-3, δίπλα από τη ρίζα καρβοξυλίου. Η ουβαόλη και η ερυθροδιόλη έχουν δύο υδροξυλομάδες σε απομακρυσμένες θέσεις και διαφέρουν ως προς τη θέση της ομάδας μεθυλίου (28).

Η συγκέντρωση των τριτερπενικών ενώσεων ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της καλλιέργειας και τον χειρισμό του ελαιολάδου. Μάλιστα, τα τριτερπένια ανευρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα πυρηνέλαια παρά στα παρθένα ελαιόλαδα (28).

Καροτενοειδή

Το κύριο καροτενοειδή του ελαιολάδου είναι το β-καροτένιο (υδρογονάνθρακας) και η λουτεΐνη. Η τελική συγκέντρωση καροτενιδίων στο ελαιόλαδο εξαρτάται από τις μεθόδους εκχύλισης, τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση και την αλληλουχία της εκχύλισης. Σε πολύ μικρές ποσότητες μπορεί να υπάρχουν και άλλες ξανθοφύλλες όπως, η βιολαξανθίνη, η νεοξανθίνη (21). Επιπρόσθετα, το β-καροτένιο είναι μια μη πολική ένωση η οποία παρουσιάζει στο ελαιόλαδο δυο ρόλους. Ο πρώτος είναι αυτός της χρωστικής λόγω του έντονου κόκκινου-πορτοκαλί χρώματος και ο δεύτερος ως αντιοξειδωτικού που προστατεύει το ελαιόλαδο από την οξείδωση κατά την αποθήκευση (17).

Κηροί

Οι κηροί είναι εστέρες που σχηματίζονται από την αιθεροποίηση υψηλού μοριακού βάρους αλκοολών με λιπαρά οξέα (29). Με άλλα λόγια, αποτελούν ένα μείγμα μακριάς γραμμικής ή διακλαδισμένης αλυσίδας λιπαρών αλκοολών εστεροποιημένων με μακριάς αλυσίδας λιπαρά

οξέα (30). Οι κηροί ανευρίσκονται στα εναέρια τμήματα του φυτού της ελιάς καθώς και, στην επιδερμίδα του καρπού (30). Πιο αναλυτικά, τα επιδερμικά κύτταρα των φρούτων και άλλων εναέριων τμημάτων, παράγουν και εκκρίνουν κηρούς, οι οποίοι με την σειρά τους περιβάλλουν τον καρπό και κατ' επέκταση τον προστατεύουν (31). Κατά την παραγωγή του ελαιολάδου μπορεί να γίνει μεταφορά των κηρών από τον καρπό στο τελικό προϊόν. Η ποσότητα που θα μεταφερθεί εξαρτάται από τον τρόπο παραγωγής του ελαιολάδου. Στην περίπτωση μηχανικής εκχύλισης του ελαιολάδου η ποσότητα που, συνήθως, μεταφέρεται είναι μικρή, ωστόσο, αν η εκχύλιση περιλαμβάνει χρήση κάποιου διαλύτη (π.χ. εξάνιο) η ποσότητα των κηρών είναι μεγάλη (30). Ακόμα, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των κηρών στο ελαιόλαδο είναι το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η περίοδος συγκομιδής, οι διαδικασίες φυγοκέντρισης κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου αλλά και η ακεραιότητα του καρπού (31). Στο ελαιόλαδο, ο προσδιορισμός των κηρών αποτελεί κριτήριο ποιότητας του προϊόντος αφού αυτή η παράμετρος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πιθανών νοθειών στο παρθένο ελαιόλαδο με άλλα έλαια των οποίων η παραλαβή γίνεται με χρήση οργανικών διαλυτών από ολόκληρες ελιές ή σπόρους ελιών (29). Οι κηροί που εντοπίζονται πιο συχνά στο ελαιόλαδο είναι οι C₄₀, C₄₂, C₄₄ και C₄₆ (29).

Τα πυρηνέλαια περιέχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κηρούς σε σχέση με το παρθένο και έξτρα παρθένο ελαιόλαδο αφού ο πυρήνας του καρπού της ελιάς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη αναλογία φλοιού από όπου προέρχονται και οι περισσότεροι κηροί (16). Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η συνολική περιεκτικότητα σε κερί πρέπει να είναι κάτω από 150 mg/kg ενώ, στο πυρηνέλαιο μπορεί να υπερβαίνει τα 350 mg/kg (30,31).

Φαινολικά συστατικά

Η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων προκύπτει όταν τα ένζυμα και τα υποστρώματα έρχονται σε επαφή κατά την σύνθλιψη των ελαιόκαρπων (21). Στο ελαιόλαδο έχουν αναγνωρισθεί τουλάχιστον 36 φαινολικές ενώσεις (19). Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου απαρτίζονται τα φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκό, υδροξυφαινυλοξικό, υδροξυκινναμικό οξύ), οι φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), τα σεκοϊριδοειδή (ελευρωπαΐνη) και οι λιγνάνες. Η σύσταση σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες όπως είναι, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι αγρονομικές συνθήκες, τα συστήματα επεξεργασίας και ο γονότυπος της εκάστοτε ποικιλίας ελιάς (19). Γενικά, η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά κυμαίνεται από 196-500 mg/kg ενώ, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο παρουσιάζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα η οποία ανέρχεται στα 250,77-925,75 mg/kg. Αυτό οφείλεται στο

γεγονός της ελάχιστης μηχανικής επεξεργασίας που υπόκειται αυτού του τύπου το ελαιόλαδο (19). Οι βιοδραστικές ιδιότητες του ελαιολάδου οφείλονται, κατά ένα μεγάλο βαθμό, στις φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι ενώσεις με σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Αποτελούν δότες υδρογόνου και είναι σε θέση να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, η ύπαρξη ομάδων δοτών ηλεκτρονίων ενισχύουν τη αντιοξειδωτική τους δράση η οποία με την σειρά της, περιλαμβάνει καταστροφή ή αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών καθώς και, σε μερικές περιπτώσεις, δράση στις ρίζες υπεροξειδίου (27).

- **Φαινολικά οξέα**

Τα φαινολικά οξέα είναι ενώσεις που περιέχουν μια καρβοξυλική ομάδα στο μόριο φαινόλης τους και χωρίζονται σε δυο υποομάδες: τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, με δομή C6–C1 (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγικό οξύ) τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, με δομή C6–C3 (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ) τα οποία είναι παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων αλλά και των παράγωγων τους εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων που συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο (27).

- **Λιγνάνες**

Οι λιγνάνες μπορούν να βρεθούν στον πολτό της ελιάς κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου αλλά και στο ξυλώδες τμήμα του σπόρου. Μεταφέρονται στο ελαιόλαδο κατά την διαδικασία της εκχύλισης χωρίς να υποστούν καμία βιοχημική τροποποίηση (32). Φυσικά, μέσα στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο (παρθένο ελαιόλαδο σε συγκέντρωση 100 mg/kg (33)) μπορούν να βρεθούν οι (+)–πινореζινόλη ($C_{20}H_{22}O_6$) και 1-ακετοξυπινореζινόλη ($C_{22}H_{24}O_8$). Να σημειωθεί ότι, η 1-ακετοξυπινореζινόλη έχει βρεθεί μόνο στην ελιά ενώ, η (+)–πινореζινόλη έχει βρεθεί και σε άλλα φυτά (32). Στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο η συνολική περιεκτικότητα σε λιγνάνες ((+)–πινореζινόλη, 1-ακετοξυπινореζινόλη) ανέρχεται από 1 έως 100 mg/kg (24).

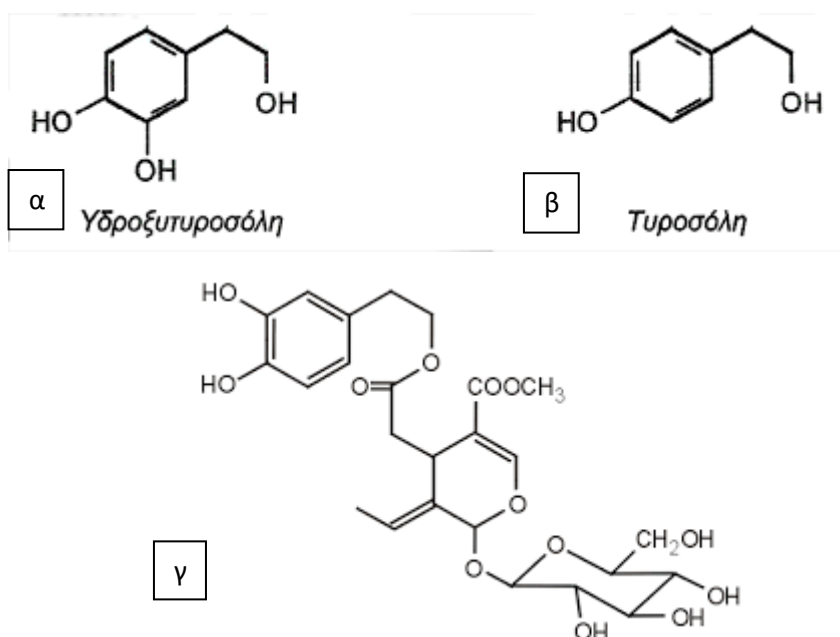
Όσον αφορά την δομή τους, οι (+)–πινореζινόλη και 1-ακετοξυπινореζινόλη είναι φαινολικές ενώσεις που σχηματίζουν ένα διμερές, γεγονός που σημαίνει ότι διαθέτουν δύο ομάδες φαινόλης στη χημική τους δομή. Κάθε μια από αυτές τις ομάδες φαινόλης αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο (φαινυλίου ή βενζολίου) συνδεδεμένο με μια υδροξυλική ομάδα (-OH). Γενικότερα, όπως γίνεται αντιληπτό η δομή αυτών των δυο ενώσεων παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με μοναδική διαφορά την ύπαρξη μιας ομάδας -COOCH₃ στην 1-ακετοξυπινореζινόλη η οποία δεν υπάρχει στην πινореζινόλη. Τόσο η φαινόλη όσο και ο

βενζολικός δακτύλιος που απαρτίζουν την δομή των λιγνάνων σχετίζονται με πολλά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής και της αντιφλεγμονώδους δράσης (33). Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι οι λιγνάνες αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του δέρματος, του μαστού, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα και ασκούν αντι-οιστρογόνα δράση (32).

- **Σεκοϊριδοειδή**

Τα σεκοϊριδοειδή είναι ενώσεις που, συνήθως, συνδέονται με γλυκοσίδες και παράγονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων. Αναλυτικότερα, τα σεκοϊριδοειδή του παρθένου ελαιολάδου αγλυκονικής μορφής προκύπτουν από γλυκοσίδες των καρπών της ελιάς με υδρόλυση από την δράση ενδογενών β-γλυκοσιδασών κατά την διαδικασία της σύνθλιψης και της μάλαξης. Οι ενώσεις αυτές έχουν αμφίφιλο χαρακτήρα και έτσι κατανέμονται μεταξύ της ελαιώδους και της υδατικής φάσης με μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρατηρείται στην τελευταία λόγω των πολικών λειτουργικών τους ομάδων (34). Τα σεκοϊριδοειδή που υπάρχουν σε μεγαλύτερη αφθονία στο παρθένο ελαιόλαδο είναι η διαλδεϋδική μορφή ελενολικού οξέος που συνδέεται με υδροξυτυροσόλη ή τυροσόλη (3,4-DHPEA-EDA ή p-HPEA-EDA, αντίστοιχα) και ένα ισομερές της αγλυκόνης της ελευρωπαΐνης (3,4-DHPEA-EA) (34). Μελέτη που έγινε σε παρθένο ελαιόλαδο έδειξε ότι ελαιόλαδο με υψηλά επίπεδα σεκοϊριδοειδών ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση υποδηλώνοντας έτσι, πιθανή προστασία της υγείας του ανθρώπου που συνάδει και με χαμηλό βαθμό οξείδωσης της LDL (34).

Η ελευρωπαΐνη έχει σεκοϊριδοειδής φαινολική δομή και είναι προϊόν συνδυασμού δυο ενώσεων: της υδροξυτυροσόλης και του ολεοσιδ-11-μεθυλεστέρα. Αυτή η χαρακτηριστική δομή της, της προσδίδει ικανότητες κασάνωσης και έντονη πικρή γεύση (22). Εντοπίζεται στο ελαιόλαδο σε ίχνη ενώ, υπάρχει σε αφθονία στους ελαιόκαρπους καθώς και, στα φύλλα αυτών (35). Από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης παράγονται η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη. Συγκεκριμένα, η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο και παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (27). Η δράση της περιλαμβάνει εξάλειψη των ανιόντων υπεροξειδίου, δέσμευση ριζών υδροξυλίου και ρόλο αναστολέα των ριζών των παραγώγων υποχλωριώδους οξέος (36).



Εικόνα 4. Οι χημικές ενώσεις α) υδροξυτυροσόλη β) τυροσόλη γ) ελευρωπαΐνη.

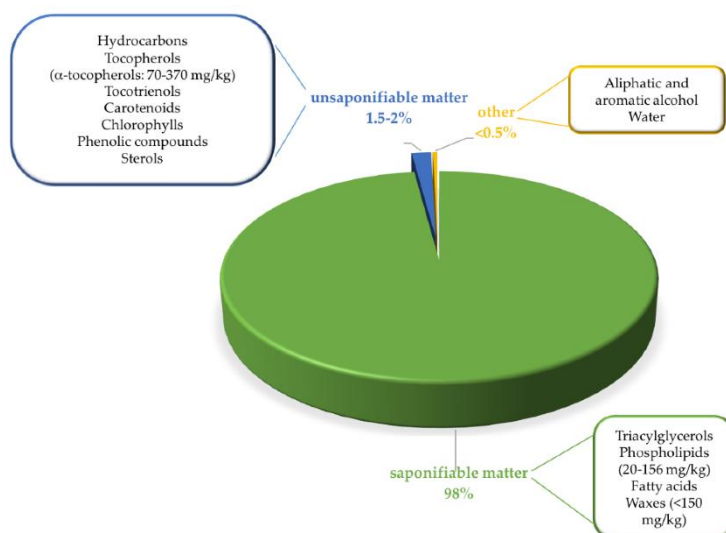
Χρωστικές ουσίες

Στο ελαιόλαδο συναντώνται τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες που είναι λιπόφιλες χρωστικές και είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό χρώμα του (24). Το μοναδικό αυτό χρώμα του ποικίλλει από ανοιχτό χρυσό μέχρι πλούσιο πράσινο και εξαρτάται από τον ακριβή συνδυασμό και την αναλογία αυτών των χρωστικών στο ελαιόλαδο. Ειδικότερα, οι πράσινες ελιές παράγουν ένα πιο πράσινο λάδι λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη ενώ, οι ώριμες ελιές παράγουν ένα πιο κίτρινο λάδι λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε καροτενοειδή (37). Η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ελαιόκαρπου, η γεωγραφική προέλευση, το κλίμα και οι συνθήκες άρδευσης, τα μηχανικά μέσα εξαγωγής του ελαίου που χρησιμοποιούνται, οι συνθήκες αποθήκευσης και το είδος της συσκευασίας του προϊόντος (24).

Δομικά, οι χλωροφύλλες αποτελούνται από έναν μακρόκυκλο τετραπυρρόλης ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με ένα ιόν Mg^{2+} . Λόγω της δομής τους είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση στο φάσμα του ορατού των ελαιολάδων και διακρίνονται στην χλωροφύλλη α (μπλε-πράσινο χρώμα) και β (κίτρινοπράσινο χρώμα) (37). Το στάδιο της μάλαξης κατά την παραγωγή του ελαιολάδου αλλά και ο χρόνος αποθήκευσής του προκαλούν την μετατροπή των χλωροφυλλών (α και β) σε φαιοφυτίνες (α και β). Ουσιαστικά, αυτό το φαινόμενο

αποτελεί την αποικοδόμηση των χλωροφυλλών και είναι μια αργή αλλά μη αναστρέψιμη διαδικασία. Το ιόν Mg^{2+} του δακτυλίου πορφυρίνης αντικαθίσταται από δυο άτομα υδρογόνου μετατρέποντας έτσι τα μόρια σε πιο σταθερά (24). Στην περίπτωση του ελαιολάδου την θέση των δυο ατόμων υδρογόνου παίρνουν δυο όξινα πρωτόνια (37). Τελικά, τα μόρια αυτά μετατρέπονται σε πυροφαιοφυτίνες ύστερα από απομάκρυνση της καρβοξυμεθυλομάδας. Οι πυροφαιοφυτίνες αποτελούν τα τελικά προϊόντα αποικοδόμησης των χλωροφυλλών (24). Στο ελαιόλαδο, η κύρια φαιοφυτίνη είναι η α (37).

Τα καροτενοειδή (κίτρινο-κόκκινο χρώμα), είναι ισοπρενοειδείς ενώσεις με δομή υδρογονάνθρακα η οποία περιέχει διπλούς δεσμούς μεταξύ ανθράκων. Διακρίνονται σε καροτένια και ξανθοφύλλες. Στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο αλλά και γενικά στο ελαιόλαδο, τα κύρια καροτενοειδή είναι το β-καροτένιο και η λουτεΐνη (37).



Εικόνα 5. Αναπαράσταση σαπωνοποιήσιμου και ασαπωνοποιήτου κλάσματος (38).

1.3.3. Οξείδωση ελαιολάδου

Οι αντιδράσεις οξείδωσης είναι υπεύθυνες για τις ταγγές οσμές και γεύσεις που χαρακτηρίζουν τα οξειδωμένα λίπη και έλαια με αποτέλεσμα την μείωση της διατροφικής αξίας του τροφίμου (39). Μπορούν να λάβουν χώρα τόσο χημικά όσο και ενζυμικά (40). Η οξείδωση συνηθίζει να προχωρά αργά στο αρχικό στάδιο και στη συνέχεια, εμφανίζεται μια ξαφνική αύξηση του ρυθμού της. Η χρονική περίοδος που σηματοδοτεί αυτή την αλλαγή στο ρυθμό οξείδωσης ονομάζεται περίοδος επαγωγής ή χρόνος επαγωγής (41). Το παρθένο ελαιόλαδο θεωρείται ότι είναι ανθεκτικό στην οξειδωτική αποικοδόμηση λόγω δυο παραγόντων. Πρώτο παράγοντα αποτελεί η χαμηλή περιεκτικότητά του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η παρουσία λινελαϊκού οξέος και μικρών ποσοτήτων λινολενικών οξέων καθιστά το ελαιόλαδο ευαίσθητο στην

οξειδωση (40). Ο δεύτερος παράγοντας σχετίζεται με την παρουσία, σε μικρή συγκέντρωση, ενώσεων με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, κυρίως, πολυφαινόλων (41). Αξίζει να σημειωθεί, πως η παρουσία οξυγόνου στον αέρα είναι ο κύριος παράγοντας που προκαλεί αλλοίωση της ποιότητας του ελαιολάδου (40). Οι αντιδράσεις οξειδωσης που μπορούν να λάβουν χώρα στα λίπη και στα έλαια είναι:

- η αυτό-οξειδωση
- η φωτο-οξειδωση
- η ενζυμική οξειδωση

1) Αυτό-οξειδωση λιπών

Η αυτό-οξειδωση είναι ο πιο κοινός τύπος οξειδωσης κατά την αποθήκευση των εδωδιμων ελαίων. Αποτελεί αντίδραση μεταξύ οξυγόνου και ακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω μιας αυτοκαταλυτικής διαδικασίας που αποτελείται από έναν μηχανισμό αλυσίδας ελεύθερων ριζών. Η αυτό-οξειδωση διακρίνεται από την έναρξη, την διάδοση και τον τερματισμό (39):

Έναρξη : $RH \rightarrow R^{\bullet}$ (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση : $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$

$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$

Τερματισμός : $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R - R$

$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$

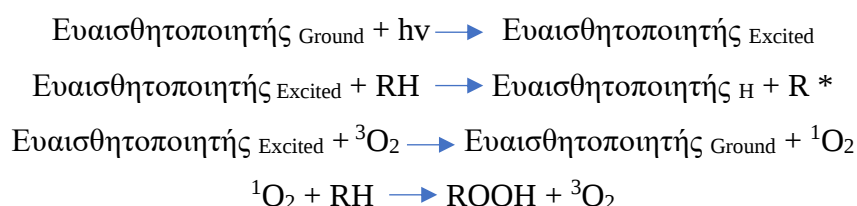
$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow$ μη ριζικά προϊόντα (39)

Κατά το στάδιο της έναρξης παράγονται ελεύθερες ρίζες από το υπόστρωμα (39). Προϊόντα αυτών των αντιδράσεων είναι οι ελεύθερες ρίζες ή δραστικές μορφές οξυγόνου όπως για παράδειγμα, το μονήρες οξυγόνο. Κύρια υποστρώματα αυτών των αντιδράσεων είναι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και το οξυγόνο (40). Η οξειδωση των λιπιδίων επιταχύνεται από την παρουσία πολλών καταλυτών ή εκκινητών. Σε αυτούς περιλαμβάνονται το φως, η θερμοκρασία, τα ένζυμα, τα μέταλλα, οι μεταλλοπρωτεΐνες, οι χρωστικές και οι μικροοργανισμοί (40). Πιο αναλυτικά, στο στάδιο της έναρξης σχηματίζονται απευθείας ελεύθερες ρίζες από τα λιπαρά οξέα με τη βοήθεια των εκκινητών. Κατά το στάδιο της διάδοσης, οι λιπιδικές ρίζες αντιδρούν με το οξυγόνο για να σχηματίσουν ρίζες υπεροξειδίου. Οι ρίζες υπεροξειδίου αντιδρούν με ένα άλλο λιπιδικό μόριο, σχηματίζοντας μια λιπιδική ρίζα

και ένα υδροϋπεροξειδίο. Τα σχηματιζόμενα υδροϋπεροξειδία δεν είναι σταθερά και αποσυντίθενται εύκολα για να παραγάγουν ένα ευρύ φάσμα μη πτητικών και πτητικών προϊόντων. Τέλος, στο στάδιο του τερματισμού οι ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας μη ριζικά προϊόντα. Οποιαδήποτε αντίδραση εμποδίζει τη διάδοση της υπεροξειδωσής ή απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες από το σύστημα παίζει βασικό ρόλο στον μηχανισμό τερματισμού (40).

2) Φωτο-οξειδωση

Τα περισσότερα φυτικά λάδια περιέχουν φυσικούς φωτοευαισθητοποιητές (π.χ. η χλωροφύλλη και προϊόντα αποικοδόμησής της, κι άλλες χρωστικές) που ενεργοποιούνται όταν τα λάδια εκτίθενται στο φως κατά την επεξεργασία και διανομή τους. Με άλλα λόγια, η έκθεση των ελαίων στο φως μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υδρο-υπεροξειδίων όταν είναι παρόντα το οξυγόνο και οι φωτοευαισθητοποιητές (40). Συνεπώς, λόγω της παρουσίας των φωτοευαισθητοποιητών το ελαιόλαδο δεν πρέπει να εκτίθεται στο φως (42). Κατά την φωτο-οξειδωση, ενέργεια ($h\nu$) μεταφέρεται από το φως στον ευαισθητοποιητή και στο οξυγόνο ως εξής (43):



Μετά την διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή το διεγερμένο αυτό μόριο είναι ικανό να μεταφέρει την περίσσεια ενέργειά του σε ένα μόριο οξυγόνου, οδηγώντας στην δημιουργία μονήρους οξυγόνου (41). Έχει δειχθεί ότι το μονήρες οξυγόνο αντιδρά περίπου 1000–10000 φορές πιο γρήγορα από το κανονικό οξυγόνο σε τριπλή βασική κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (41). Επομένως, το μονήρες οξυγόνο αποτελεί τον πιο βασικό εκκινητή της αυτό-οξειδωσης των φυτικών ελαίων με ελεύθερες ρίζες και για αυτό η προστασία από την φωτο-οξειδωση κατά την αποθήκευση τους είναι πολύ σημαντική για την εξασφάλιση υψηλής οξειδωτικής σταθερότητας.

Βέβαια, να σημειωθεί πως η οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων που προκαλείται από την δραστηριότητα του μονήρους οξυγόνου μπορεί να ανασταλεί από ενώσεις που αντιδρούν γρηγορότερα με αυτόν τον εκκινητή ή με ενώσεις δεσμευτές που με την δράση τους το επαναφέρουν στην μορφή βασικής κατάστασης. Μερικοί από τους πιο αποτελεσματικούς φυσικούς δεσμευτές αποτελούν οι α-τοκοφερόλη και β-καροτένιο (43).

3) Ενζυμική οξείδωση

Η αποικοδόμηση των λιπιδίων στους φυτικούς ιστούς πραγματοποιείται με μια διαδικασία γνωστή ως αλληλουχία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (43). Διαφορετικά ένζυμα εμπλέκονται στην οξειδωτική αποσύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (40). Με άλλα λόγια, η αλληλουχία ξεκινά με την υδρόλυση διαφόρων γλυκεριδίων από τα ένζυμα λιπάσες, λιπολυτικές ακυλ υδρολάσες και φωσφολιπάσες κατά την διάρκεια της οποίας τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ελευθερώνονται. Στη συνέχεια, οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα σε υδροϋπεροξειδία, κυρίως, τα ισομερή 9 και 13, τα οποία έχουν μικρή σταθερότητα (43). Στο τελευταίο στάδιο της αλληλουχίας των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα ένζυμα λυάσες, ισομεράσες και αφυδρογονάσες αποικοδομούν τα υδροϋπεροξειδία σε μια ποικιλία πτητικών και μη πτητικών προϊόντων. Οι ενώσεις flavor (αλληλεπίδραση γεύσης οσμής, υφής), που σχηματίζονται όπως για παράδειγμα οι αλδεΐδες, οι κετόνες και οι αλκοόλες είναι, συνήθως, άμεσα υπεύθυνες για τα off-flavors (αρνητική αίσθηση flavor) στα έλαια (40). Στο παρθένο ελαιόλαδο οι ίδιες ενζυμικές διαδικασίες είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό της χαρακτηριστικής του γεύσης και πιο συγκεκριμένα, των ενώσεων C₆ αλδεϋδών και αλκοολών που είναι οι κύριοι συντελεστές των αισθητηρίων χαρακτηριστικών του παρθένου ελαιολάδου. Οι ενώσεις αυτές είναι αποτέλεσμα ενζυμικών διαδικασιών που συμβαίνουν στον ελαιόκαρπο και έχουν ως υπόστρωμα το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ (40).

Για αποτελεσματική και υψηλού ρυθμού οξείδωση, τα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωτική αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων απαιτούν τη συνεχή παρουσία οξυγόνου. Ωστόσο, η έλλειψη οξυγόνου δεν τερματίζει την οξειδωτική αποικοδόμηση καθώς, ορισμένες λιποξυγενάσες και άλλα ένζυμα που εμπλέκονται μπορούν να οξειδώσουν τα λιπαρά οξέα απουσία οξυγόνου, σχηματίζοντας έτσι ελεύθερες ρίζες αντί για υδροϋπεροξειδία. Τα ένζυμα που καταλύουν την αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι πολύ ενεργά κατά την ωρίμανση της ελιάς. Κατά τη συγκομιδή, την αποθήκευση και την επεξεργασία της ελιάς, προκαλείται συχνά ζημιά στον καρπό και τα περιεχόμενα των σπασμένων κυττάρων εκτίθενται σε οξυγονοδιεργετική ενζυμική δραστηριότητα. Κατά την παραγωγή του παρθένου ελαιολάδου αυτές οι οδοί ενεργοποιούνται με σχετικά υψηλό ρυθμό, σχηματίζοντας επιθυμητές πτητικές ενώσεις κατά την σύνθλιψη των ελιών και την συμπίεση του ελαιολάδου (40).

1.3.4. Αποθήκευση και θερμική επεξεργασία ελαιολάδου

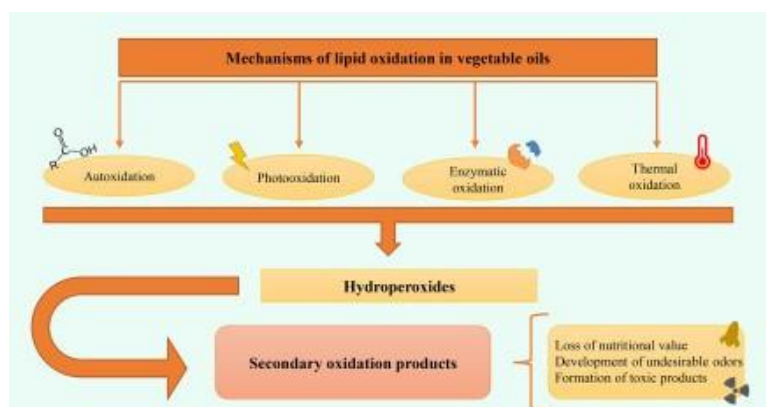
Είναι γνωστό, ότι κατά την αποθήκευση η περιεκτικότητα του πολικού φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου μεταβάλλεται λόγω υδρολυτικών και οξειδωτικών αντιδράσεων. Ωστόσο, η μείωση αυτή θα μπορούσε να επιβραδυνθεί με αποθήκευση του τροφίμου σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου. Η υδρόλυση είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται όταν το ελαιόλαδο αποθηκεύεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα ενώ, η οξείδωση ευνοείται όταν αυτό εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες και φως προκαλώντας καταστροφή των πολικών φαινολών και της ποιότητας του προϊόντος (42). Κατά τις θερμικές επεξεργασίες του ελαιολάδου, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και της απορρόφησης του οξυγόνου και του νερού που συμβαίνει, οι τριακυλογλυκερόλες του υφίστανται υδρόλυση, οξείδωση, ισομερισμό και πολυμερισμό (44). Γενικότερα, οι ιδανικές θερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης του ελαιολάδου είναι μικρότερες των 22 °C (στο σκοτάδι), ανεξάρτητα από το είδος της συσκευασίας (45). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η αποθήκευση του ελαιολάδου για μεγάλα χρονικά διαστήματα αλλά και οι κύκλοι κατάψυξης/ απόψυξης του διατηρούν το πολικό κλάσμα του παρθένου ελαιολάδου σχετικά σταθερό (42). Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από μέγιστη περίοδο αποθήκευσης τους 12-18 μήνες με την συγκέντρωση του φαινολικού του κλάσματος να παραμένει σχετικά σταθερή στο σύνολο της χρονικής αυτής περιόδου όταν, οι συνθήκες παραμονής του είναι οι κατάλληλες (46).

Η οξείδωση λόγω θερμότητας παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του ελαιολάδου καθώς επηρεάζει άμεσα την θρεπτική αξία του τροφίμου. Η θερμική σταθερότητα των ελαίων βασίζεται στη σύνθεσή τους, που σχετίζεται, κυρίως, με την ποσότητα μονοακόρεστων και πολυακόρεστων αλυσίδων στα τριγλυκερίδια. Όσο μεγαλύτερος ο βαθμός ακορεστότητας τόσο μικρότερη η θερμική του σταθερότητα. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε πολυφαινόλες παίζει βασικό ρόλο στην πρόληψη της οξείδωσης λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (47).

Το τηγάνισμα (180 °C) αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες οικιακές θερμικές κατεργασίες που υπόκεινται το ελαιόλαδο. Κατά την διάρκεια αυτού και λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και της απορρόφησης οξυγόνου και νερού οι τριακυλογλυκερόλες του ελαιολάδου υπόκεινται μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την υδρόλυση, την οξείδωση, τον ισομερισμό και τον πολυμερισμό. Οι Gomez-Alonso et al. (2003), πραγματοποίησαν μελέτη που αφορούσε το τηγάνισμα παρθένου ελαιολάδου και παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης και των παραγώγων της μειώθηκε σημαντικά όσο αυξάνονταν οι κύκλοι τηγανίσματος. Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο δικαιολογείται λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής

δράσης αυτών των ενώσεων. Ουσιαστικά, αφού η δράση τους περιλαμβάνει την ταχεία αντίδρασή τους με τις ελεύθερες ρίζες των λιπών τα ίδια τελικά καταναλώνονται. Συμπληρωματικά, ως λιγότερο δραστικά αντιοξειδωτικά από την υδροξυτυροσόλη, η συγκέντρωση της τυροσόλης και των παραγώγων της δεν παρουσίασε τόσο σημαντική μείωση (48). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο είναι ένα κατάλληλο και συνιστώμενο λάδι για χρήση του στο τηγάνισμα των τροφίμων. Αυτό οφείλεται στην καλή ισορροπία πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων που διαθέτει η οποία με την σειρά της, του προσφέρει ιδιότητες οξειδωτικής σταθερότητας απέναντι στην θερμική αποικοδόμηση. Οι ιδιότητες αυτές σχετίζονται με τον σχηματισμό πτητικών αλδεϋδών (24).

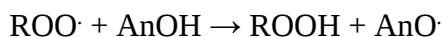
Ακόμα, πολλές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι όταν το παρθένο ελαιόλαδο θερμαίνεται αρκετές φορές σε θερμοκρασίες τηγανίσματος και φούρνου ή άλλες εργασίες που απαιτούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. σοτάρισμα 120 °C), η περιεκτικότητα του πολικού φαινολικού του κλάσματος και άρα, η αντιοξειδωτική του δράση μειώνεται σημαντικά (42). Ωστόσο, μια τέτοιου είδους οξείδωση δεν δημιουργεί αισθητό οργανοληπτικό μειονέκτημα στο ελαιόλαδο παρά μόνο μείωση των αντιοξειδωτικών του (42). Επομένως, όσον αφορά την θερμική επεξεργασία του ελαιολάδου προκειμένου αυτό να διατηρήσει τις θετικές επιδράσεις του στην υγεία του ανθρώπου ο αριθμός των κύκλων θέρμανσης θα πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό (42).



Εικόνα 6. Πιθανές πορείες οξείδωσης λιπιδίων φυτικών ελαίων και του ελαιολάδου (91).

1.3.5. Αντιοξειδωτική δράση ελαιολάδου

Όπως προαναφέρθηκε το ελαιόλαδο παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή στην οξείδωση σε σχέση με τα άλλα έλαια λόγω ύπαρξης φαινολικών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση. Τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στο ελαιόλαδο είναι οι τοκοφερόλες, το β-καροτένιο, η λουτεΐνη, το σκουαλένιο, οι λιπόφιλες και υδρόφιλες φαινόλες (49). Αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται ως αντιοξειδωτικά και η ύπαρξή τους στο ελαιόλαδο είναι υπεύθυνη για τις βιοδραστικές λειτουργίες του και για την προστασία της εξαιρετικής του ποιότητας. Δηλαδή, τα αντιοξειδωτικά είναι συστατικά που προστατεύουν από τις δραστικές μορφές οξυγόνου και εμποδίζουν την αυτο-οξείδωση των ελαίων και των λιπών (39). Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών είναι καλύτερα αισθητή κατά την περίοδο έναρξης της οξείδωσης. Έστερα, η οξείδωση κινείται γρήγορα επειδή η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού μειώνεται και είναι παρούσες περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Η περιεκτικότητα σε υδροϋπεροξειδίο αυξάνεται σταδιακά και το αντιοξειδωτικό που απομένει καταστρέφεται πολύ γρήγορα. Μια μεγαλύτερη περίοδος έναρξης, παρουσιάζει μια ισχυρότερη δράση αντιοξειδωτικών η οποία περιλαμβάνει φαινολικές ενώσεις που είναι ικανές να επιβραδύνουν ή να εμποδίζουν την οξείδωση λιπαρών ουσιών, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης (27):



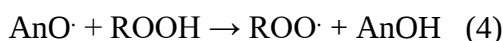
όπου, AnOH: φαινολικό αντιοξειδωτικό

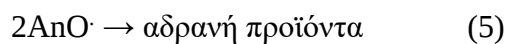
ROOH: υδροϋπεροξειδία

AnO·: αντιοξειδωτική ρίζα

ROO·: ρίζα υπεροξειδίου

Στην παραπάνω αντίδραση, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν ένα άτομο υδρογόνου, και τα υδροϋπεροξειδία, που παράγονται, διασπώνται αργότερα. Η επίδραση των αντιοξειδωτικών στην αναστολή της διάσπασης του υδροϋπεροξειδίου μπορεί να είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ποιότητας του ελαίου μειώνοντας την ταγγή αίσθηση που δημιουργείται από τον σχηματισμό αλδεϋδης αλλά και άλλων καρβονυλικών ενώσεων. Η αντιοξειδωτική ρίζα μπορεί να λάβει μέρος σε αντιδράσεις, όπως (27):





Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση των φαινολών (π.χ. ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και καφεϊκό οξύ) είναι εντονότερη στις αντιδράσεις (3) και (5) και λιγότερο στις αντιδράσεις (4) και (6). Ως αποτέλεσμα, οι ελεύθερες ρίζες δεσμεύονται και οι αλυσιδωτές αντιδράσεις σταματούν. Ακόμα, η τυροσόλη ευνοεί τις αντιδράσεις (4) και (6). Σε αυτές τις αντιδράσεις παράγονται ελεύθερες ρίζες που ευνοούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Αυτό εξηγεί την περιορισμένη δράση της τυροσόλης ως αντιοξειδωτικό. Γενικά, τα αντιοξειδωτικά, αποτρέπουν την οξείδωση είτε με τη δέσμευση ελεύθερων ριζών είτε με τη χηλικοποίηση μεταλλικών ιόντων είτε με την απενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου (27).

Τα αντιοξειδωτικά προλαμβάνουν τη βλάβη των κυττάρων και των βιολογικών στόχων που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό ριζών, δεσμευόντάς τις, ή προωθώντας την αποσύνθεσή τους. Υπάρχουν δυο κατηγορίες αντιοξειδωτικών: τα φυσικά και τα συνθετικά. Στις περισσότερες χώρες, το επίπεδο χρήσης των συνθετικών αντιοξειδωτικών ρυθμίζεται και η ασφάλεια των εμπλεκόμενων ενώσεων έχει δοκιμαστεί με βάση διάφορες μελέτες πάνω στη μακροπρόθεσμη τοξικότητα. Μεγάλο ενδιαφέρον αναπτύσσεται για τη φυσική εμφάνιση αντιοξειδωτικών λόγω της τάσης που υπάρχει για ελαχιστοποίηση ή αποφυγή της χρήσης συνθετικών προσθέτων στα τρόφιμα (39).

1.3.6. Ελαιόλαδο και υγεία

Το ελαιόλαδο, και συγκεκριμένα το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, εκτιμάται ιδιαίτερα από τους καταναλωτές λόγω της θρεπτικής του αξίας, τα οφέλη του στην υγεία του ανθρώπου καθώς και, τις ηδονικές (γεύση, άρωμα, υφή) του ιδιότητες (50). Τα οφέλη του ελαιολάδου στην υγεία του ανθρώπου είναι ευρέως γνωστά και αυτό, χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες λόγω των θεραπευτικών αλλά και προληπτικών του χαρακτηριστικών (49). Ως γνωστόν, τα θεραπευτικά αυτά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου αποδίδονται τόσο στην μεγάλη περιεκτικότητά του σε ελαϊκό οξύ όσο και στο φαινολικό κλάσμα του (ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και παράγωγα), το οποίο διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (51). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ιδιότητες που αφορούν την γεύση και την οσμή σχετίζονται άμεσα με τις ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι οι πτητικές ενώσεις του ελαιολάδου προέρχονται από τις πολυφαινόλες οι οποίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι βιοδραστικές ενώσεις (50).

Το ελαιόλαδο συμβάλλει στην πρόληψη ή/ και βελτίωση σοβαρών παθήσεων όπως είναι η αθηροσκλήρωση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις (π.χ. αρτηριακή πίεση και μείωση χοληστερόλης), τα επίπεδα του λιποπρωτεϊνού ορού, το οξειδωτικό στρες, η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, η φλεγμονή, ο καρκίνος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψυχολογία και η μνήμη (π.χ. νόσος Alzheimer) (49,50). Ο τρόπος δράσης του ως προστάτης της ανθρώπινης υγείας σχετίζεται με την πρόκληση αλλαγών σε επιγενετικούς, μεταβολικούς και φυσιολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού (49). Επίσης, μελέτη έδειξε ότι, συγκριτικά με τους μη καταναλωτές ελαιολάδου, η κατανάλωση ελαιολάδου μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου κατά 14 % και για τις στεφανιαίες παθήσεις κατά 18 % (50). Όπως αναφέρεται παραπάνω, οι πολυφαινόλες διαθέτουν ιδιότητες βιοδράσεων και συγκεκριμένα, συμβάλλουν στην προστασία από την οξείδωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Ως εκ τούτου η EFSA εξέδωσε έναν ισχυρισμό υγείας σχετικά με την κατανάλωση ελαιολάδου. Ο ισχυρισμός αυτός, ορίζει ότι 20 gr ελαιολάδου πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον 5 mg υδροξυτυροσόλης και των παραγώγων της (π.χ. ελευρωπαΐνη και τυροσόλη). Όσον αφορά το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, αυτό, λόγω του ότι το επίπεδο των φυσικών πολυφαινολών που περιέχει είναι >250 mg/kg έρχεται σε συμφωνία με τον παραπάνω ισχυρισμό υγείας και άρα, μπορεί να χαρακτηριστεί ως «Υγιεινό Έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο» (52).

1.3.7. Εμπλουτισμός ελαιολάδου με αιθέριο έλαιο ρίγανης

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής. Χαρακτηρίζεται ως λειτουργικό τρόφιμο λόγω των φαρμακολογικών του ιδιοτήτων όπως είναι οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, καρδιο-προστατευτικές, κι άλλες ιδιότητες (53). Η Ελλάδα είναι τρίτη κατά σειρά στην λίστα των πιο κορυφαίων ελαιοπαραγωγικών χωρών με τις πρώτες θέσεις να έχουν καταλάβει η Ισπανία και η Ιταλία (25).

Το ελαιόλαδο είναι ένα προϊόν που πρέπει να καταναλώνεται φρέσκο αλλά, λόγω των συνθηκών αποθήκευσής του είναι ευαίσθητο στην οξείδωση (54). Ακόμα, το ελαιόλαδο είναι ένα προϊόν που εκτιμάται ιδιαίτερα για την πλούσια γεύση και το φρουτώδες άρωμά του επομένως, η ταγγή αίσθηση που δημιουργείται ως αποτέλεσμα της οξείδωσης το καθιστά ακατάλληλο για κατανάλωση (54). Στις βιομηχανίες τροφίμων, ο εμπλουτισμός των ελαιολάδων με βότανα, φαρμακευτικά φυτά και μπαχαρικά, πέρα από την ενίσχυση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών, έχει σκοπό την προστασία του από την οξείδωση και την βελτίωση της θρεπτικής του αξίας (55). Συνήθως παράγονται με δυο τρόπους: (α) έγχυση ή διαβροχή του μπαχαρικού στο λάδι και (β) ανάμιξη της πάστας ελιάς και των μπαχαρικών

κατά το στάδιο της μάλαξης. Ωστόσο, και οι δύο μέθοδοι είναι χρονοβόρες και παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα όπως είναι η θολερότητα και η εξαγωγή ανεπιθύμητων συστατικών τροποποιώντας έτσι, τον οργανοληπτικό χαρακτήρα και την σταθερότητα του αρωματισμένου ελαίου. Για να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα, τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετα για την παραγωγή εμπλουτισμένων ελαιολάδων (53). Επιπλέον, πιστεύεται ότι τα αιθέρια έλαια είναι δυνατόν να αντικαταστήσουν τα τεχνητά αντιοξειδωτικά BHT και BHA τα οποία θεωρούνται προωθητές της καρκινογένεσης (56). Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει τραβήξει την προσοχή των ερευνητών ως φυσικό αντιοξειδωτικό λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης και γενικά λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων του. Ειδικότερα, οι Asensio et al (2011) έδειξαν ότι ένα ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με αιθέριο έλαιο ρίγανης μπορεί να αποθηκευτεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και πιθανόν, αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης επιβραδύνει τη διαδικασία οξείδωσης των λιπιδίων στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο βελτιώνοντας τη σταθερότητα του προϊόντος (56). Μια ακόμα μελέτη των Barreca et al (2021) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, γενικά, η προσθήκη αιθέριων ελαίων φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών, συμπεριλαμβανομένης και της ρίγανης, στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο επιτρέπει τη διατήρηση των βιολογικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου και την πρόληψη οποιασδήποτε διαδικασίας οξείδωσης που μπορεί να συμβεί λόγω του φωτός και του οξυγόνου. Επιπλέον, με δεδομένα όλα τα παραπάνω η προσθήκη αιθέριου ελαίου οδηγεί στην βελτίωση της διάρκειας ζωής του τροφίμου (55).

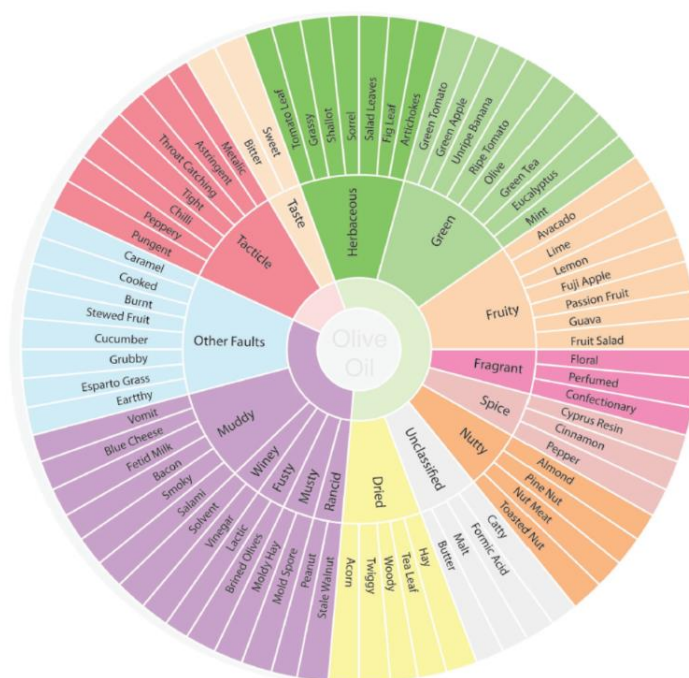
1.3.8. Οργανοληπτικός έλεγχος ελαιολάδου

Ο οργανοληπτικός έλεγχος του ελαιολάδου αποτελεί μια σημαντική παράμετρος ταξινόμησης και αξιολόγησής του καθώς, σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, τα χαρακτηριστικά αυτά συγκαταλέγονται στα κριτήρια ποιότητας (χρώμα και γεύση). Ειδικότερα, ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιείται από πιστοποιημένη επιτροπή γευσιγνωσίας και έχει στόχο την αναγνώριση των θετικών και αρνητικών χαρακτηριστικών σε ένα ελαιόλαδο. Στις βασικές θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες περιλαμβάνονται το **φρουτώδες**, το **πικρό** και το **πικάντικο** οι οποίες εξαρτώνται από τον βαθμό ωρίμανσης της ελιάς και της σύνθεσής της (22). Να σημειωθεί, πως οι τρεις αυτές ιδιότητες πρέπει να συνυπάρχουν στο ελαιόλαδο και πως στην περίπτωση που δεν ανιχνευθεί το φρουτώδες τότε αυτό δεν μπορεί να καταταχθεί στις κατηγορίες εξαιρετικό ή παρθένο.

Όσον αφορά τα αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός αυτών που περιλαμβάνουν:

- 1) Την **έντονη οσμή** λόγω μακράς περιόδου αποθήκευσης πριν από την εκχύλιση.
- 2) Την **οσμή μούχλας** που είναι αποτέλεσμα αποθήκευσης σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και χαμηλής θερμοκρασίας αλλά και, από αερόβια ζύμωση που μπορεί να συμβεί στις ελιές από ζυμομύκητες.
- 3) Την **οσμή λάσπης** λόγω της παρατεταμένης επαφής της ελιάς με το ίζημα.
- 4) Την **οσμή κρασώδους- ξιδάτου** που είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας ζύμωσης στις ελιές, που οδηγεί στον σχηματισμό οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα και αιθανόλης.
- 5) Την **οσμή μετάλλου** λόγω παρατεταμένης επαφής με μεταλλικές επιφάνειες κατά τη διάρκεια της σύνθλιψης, ανάμειξης, συμπίεσης ή αποθήκευσης.
- 6) Την **ταγγή οσμή** που προκύπτει από την οξείδωση του ελαιολάδου από το οξυγόνο του αέρα (22).

Επίσης, άλλα αρνητικά χαρακτηριστικά είναι το **ατροχάδο** (προχωρημένο στάδιο αναερόβιας ζύμωσης των ελιών), η αίσθηση **ψημένου ή καμένου** (υπερβολική ή παρατεταμένη θέρμανση κατά την παραγωγή του ελαιολάδου), η **οσμή άχυρου- ξύλου**, κι άλλα.



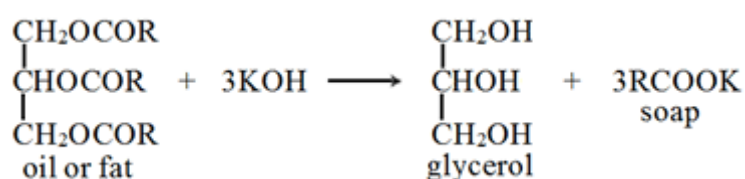
Εικόνα 7. Τάξεις του περίπλοκου αρώματος και της περίπλοκης γεύσης του ελαιολάδου (92).

1.4. Αρχές μεθόδων ανάλυσης

1.4.1. Αριθμός σαπωνοποίησης

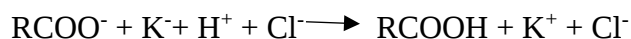
Αρχή μεθόδου:

Ο αριθμός σαπωνοποίησης είναι ένα μέτρο του περιεχομένου των εστερικών δεσμών. Ο αριθμός σαπωνοποίησης εκφράζεται ως τα mg υδροξειδίου του καλίου που απαιτούνται για την σαπωνοποίηση ενός γραμμαρίου λίπους. Με τον προσδιορισμό του αριθμού σαπωνοποίησης μπορεί να ληφθεί το μέσο μοριακό βάρος. Ο αριθμός σαπωνοποίησης είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη μέση μοριακή μάζα (57).



Εικόνα 8. Αντίδραση σαπωνοποίησης.

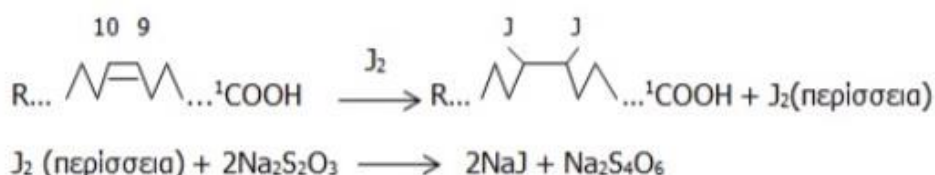
Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά την ογκομέτρηση είναι (58):



1.4.2. Αριθμός ιωδίου

Αρχή μεθόδου:

Ο αριθμός ιωδίου αποτελεί το % αλογόνου που απαιτείται για να κορεστούν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μιας λιπαρής ύλης. Ο αριθμός ιωδίου είναι ανάλογος του αριθμού των διπλών δεσμών που έχουν τα λιπαρά οξέα. Η μέθοδος που προτιμάται, συνήθως, για τον προσδιορισμό του αριθμού ιωδίου είναι η Hanus. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι μια προσθήκη και πιο συγκεκριμένα μια αλογόνωση όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 9. Ιωδίωση διπλού δεσμού και ιωδομετρία της περίσσειας του Ιωδίου (59).

Η αλογόνωση περιλαμβάνει την προσθήκη μορίων I_2 στους διπλούς δεσμούς με το αντιδραστήριο KF (ή KBr)/ I_2 . Η περίσσεια του ιωδίου μετά τον κορεσμό των διπλών δεσμών προσδιορίζεται με $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και έτσι υπολογίζεται τελικά, ο αριθμός των διπλών δεσμών των

λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων σε ένα μόριο ελαίου. Με άλλα λόγια, ο αριθμός ιωδίου είναι μια χημική σταθερά που μας δείχνει τον βαθμό ακορεστότητας του δείγματος (59).

1.4.3. Χλωροφύλλες- Καροτενοειδή

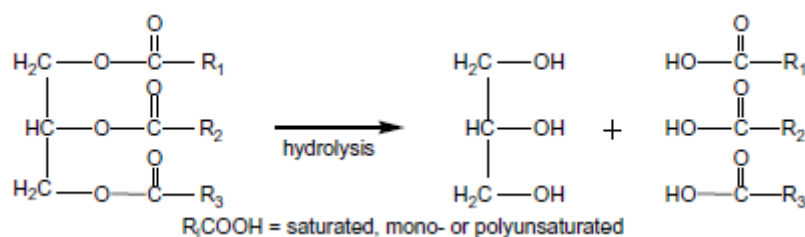
Αρχή μεθόδου:

Το χρώμα του ελαιολάδου οφείλεται σε δύο ξεχωριστές οικογένειες ενώσεων, συγκεκριμένα τις χλωροφυλλικές και καροτενοειδείς χρωστικές. Είναι γνωστό ότι η κύρια χρωστική ουσία μεταξύ των χλωροφυλλών είναι η φαιοφυτίνη α ενώ, οι κύριες καροτενοειδείς χρωστικές είναι είτε το β-καροτένιο είτε η λουτεΐνη, με την περιεκτικότητά τους να είναι αρκετές φορές μεγαλύτερη σε σχέση με άλλες χρωστικές. Αυτά τα χαρακτηριστικά, δίνουν τη δυνατότητα να γίνεται προσδιορισμός των ολικών χρωστικών του ελαιολάδου φασματοφωτομετρικά. Τα πλεονεκτήματα των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων είναι ότι έχουν μεγάλη χρησιμότητα για διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών τους όπως, η ταχύτητα, η μη καταστροφικότητα, η δυνατότητα αυτοματοποίησης και ευελιξίας κ.λπ. Εν συντομία, η ποσοτική εκτίμηση του κλάσματος χλωροφύλλης πραγματοποιείται μετρώντας την απορρόφηση των φασμάτων ελαιολάδου στα 670 nm, καθώς η απορρόφηση στο σημείο αυτό οφείλεται αποκλειστικά σε αυτό το κλάσμα. Η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή εκφράζεται ως λουτεΐνη, η κύρια χρωστική ουσία σε αυτό το κλάσμα, με μέτρηση της απορρόφησης στα 470 nm επειδή η φαιοφυτίνη α δεν απορροφά σε αυτήν τη ζώνη του φάσματος (60).

1.4.4. Προσδιορισμός οξύτητας

Αρχή μεθόδου:

Η αποικοδόμηση των ελαίων οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων τα οποία δύναται να αυξηθούν με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της θερμοκρασίας. Επομένως, ο προσδιορισμός του επιπέδου των ελεύθερων λιπαρών οξέων είναι σημαντική παράμετρος ελέγχου της ποιότητας και εγκυρότητας των προϊόντων (61). Στον καρπό της ελιάς με δράση της λιπάσης παράγονται ελεύθερα λιπαρά οξέα (αντίδραση υδρόλυσης).



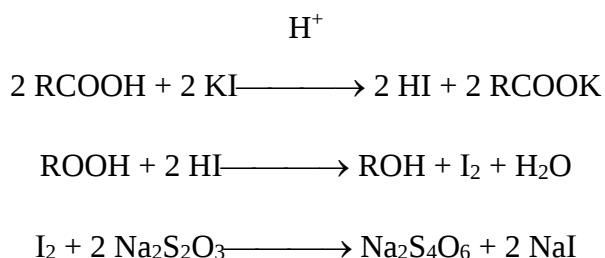
Εικόνα 10. Αντίδραση υδρόλυσης τριγλυκεριδίων (61).

Κατά τον προσδιορισμό η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι μια αντίδραση εξουδετέρωσης μεταξύ των ελεύθερων λιπαρών οξέων και του NaOH.

1.4.5. Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων

Αρχή μεθόδου:

Προϊόντα της πρωτογενούς οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων (προσλαμβάνουν O_2) είναι τα υδροϋπεροξειδία. Σχηματίζονται κατά τα πρώτα στάδια της οξείδωσης της λιπαρής ύλης και μπορούν να αποτελέσουν συστατικά μεταγενέστερων αντιδράσεων οξείδωσης όπου παράγονται δευτερογενή, πτητικά και μη, προϊόντα (62). Ο αριθμός υπεροξειδίων αντανακλά στις ενώσεις του ελαίου, που οξειδώνουν το KI (meqO_2/Kg). Κατά τον προσδιορισμό λαμβάνουν χώρα οι εξής αντιδράσεις:



Το οξικό οξύ που χρησιμοποιείται στην μέθοδο αποτελεί το όξινο μέσο αντίδρασης, απαραίτητο για την οξειδοαναγωγική αντίδραση.

1.4.6. Μέτρηση απορρόφησης στο UV (234 και 270 nm)

Αρχή μεθόδου:

Στις αντιδράσεις οξείδωσης (αυτό-οξείδωσης) του ελαιολάδου μετέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, είτε ελεύθερα είτε εστεροποιημένα. Ο σχηματισμός των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (υδροϋπεροξειδία) από την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων αποτιμάται

με μέτρηση της απορρόφησης στα 234 nm. Επίσης, ο σχηματισμός των υδροϋπεροξειδίων, συνήθως, συνοδεύεται και από τον σχηματισμό συζυγών διενίων τα οποία προκύπτουν από την αναδιάταξη των διπλών δεσμών και τα οποία απορροφούν στο UV στα 230-235 nm (62). Με άλλα λόγια, είναι δυνατή η παρακολούθηση των αρχικών σταδίων της οξείδωσης των λιπαρών κατά τη διάρκεια των οποίων τα υπεροξείδια δεν αποικοδομούνται ή αποικοδομούνται λίγο.

Τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης (αλδεΐδες, κετόνες) είναι προϊόντα διάσπασης των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης τα οποία είναι ασταθή (πτητικές οργανικές ενώσεις με μικρότερο αριθμό άνθρακα). Η δευτερογενής οξείδωση αποτιμάται με μέτρηση της απορρόφησης στα 270 nm. Επιπλέον, στα 268-270 nm απορροφούν και τα συζυγή τριένια (62).

1.4.7. Προσδιορισμός συντελεστών Km και ΔK

Αρχή μεθόδου:

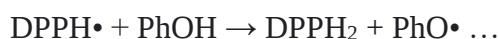
Ο συντελεστής K αποτελεί συντελεστή ειδικής απορρόφησης. Δηλώνει, την απορρόφηση διαλύματος 1 % (w/v) του ελαίου σε ειδικό διαλύτη, σε κυψελίδα 10 mm (62).

Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι το ισοοκτάνιο μετράται η απορρόφηση στα 232 και 268 nm και άρα υπολογίζονται οι συντελεστές K_{232} και K_{268} .

1.4.8. Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Αρχή μεθόδου:

Το DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζίδιο) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα σε θερμοκρασία δωματίου, η οποία παράγει ένα βιολετί διάλυμα σε μεθανόλη. Όταν η ελεύθερη ρίζα αντιδρά με ένα αντιοξειδωτικό, η ιδιότητα της ελεύθερης ρίζας του χάνεται λόγω θραύσης της αλυσίδας και το χρώμα του αλλάζει σε ανοιχτό κίτρινο (63). Η αντίδραση με DPPH προσαρμόστηκε για την κινητική μέτρηση της ριζικής απόσβεσης, και από τότε πολλές παραλλαγές στις μεθόδους και το χρόνο για την παρακολούθηση της αντίδρασης καθώς και, για τον υπολογισμό της σχετικής αντιοξειδωτικής δράσης με βάση την στοιχειομετρία της αντίδρασης έχουν εξελιχθεί. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι (64):



όπου, $\text{DPPH}\cdot$ είναι μια σταθερή ρίζα χρωμογόνου με $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$.

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιήθηκε επειδή είναι μια πολύ απλή, ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος, η οποία ήταν πολύ βολική για τον έλεγχο πολλών δειγμάτων διαφορετικής πολικότητας (63).

Παράλληλα, μπορεί να προσδιοριστεί και ο δείκτης IC_{50} ο οποίος δείχνει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης του διαλύματος ρίζας DPPH στο 50 %. Η τιμή IC_{50} είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αντιοξειδωτική δράση (65).

1.4.9. Μέθοδοι όπου χρησιμοποιείται το πολικό εκχύλισμα ελαιολάδου

1.4.9.1. Πικρότητα

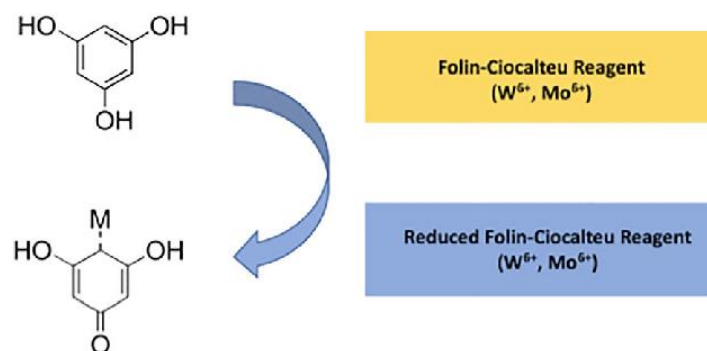
Αρχή μεθόδου:

Η πικρότητα θεωρείται θετικό αισθητήριο χαρακτηριστικό του ελαίου και ενισχύει την συνολική γεύση με νότες που σχετίζονται με άγουρα φρούτα ελιάς. Τα σεκοριδοειδή (ελευρωπαΐνη, συγγενείς ενώσεις) είναι οι κύριες ενώσεις υπεύθυνες για την πικρή γεύση (66).

1.4.9.2. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin)

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος Folin βασίζεται στην οξείδωση των ενώσεων φαινόλης σε αλκαλικό (ανθρακικό) διάλυμα με το αντιδραστήριο $3H_2O-P_2O_5-13WO_3-5MoO_3-10H_2O$ αποδίδοντας ένα έγχρωμο προϊόν με ευρεία ζώνη με μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) μεταξύ 750 και 765 nm (64). Ούτε η ακριβής χημική φύση ούτε το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του αντιδραστηρίου Folin είναι με ακρίβεια γνωστά. Επίσης, είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και μπορεί μη ειδικά να οξειδώσει μη φαινολικές αναγωγικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων, ασθενών αναγωγικών μαζί με φαινολικά (64). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι είναι απλή, γρήγορη, εξαιρετικά αναπαραγώγιμη (με χαμηλότερο συντελεστή διακύμανσης). Ωστόσο, η μέθοδος Folin έχει έναν περιορισμό. Τα αντιδραστήρια για αυτήν τη μέθοδο δεν αντιδρούν ειδικά μόνο με φαινολικά αλλά αντιδρούν και με οξειδώσιμες ενώσεις όπως το ασκορβικό οξύ, αρωματικές αμίνες, αναγωγικά σάκχαρα και αρωματικά αμινοξέα (63).



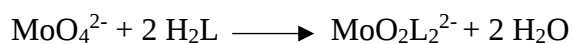
Εικόνα 11. Αντίδραση αναγωγής του αντιδραστηρίου Folin από τις φαινολικές ενώσεις (93).

1.4.9.3. *Όρθο-διφαινόλες*

Αρχή μεθόδου:

Τα φαινολικά συστατικά των παρθένων ελαιόλαδων αναστέλλουν την οξείδωση των γλυκεριδίων ως αποτέλεσμα πολλών δυνητικά συνεργιστικών μηχανισμών καθώς και, δέσμευση ριζών, μεταφορά H και δραστηριότητες χηλικοποίησης μετάλλων. Η μεταφορά H συμβαίνει μέσω ομάδας -OH φαινολικού μορίου και η ρίζα που σχηματίζεται σταθεροποιείται μέσω συντονισμού εναποθέτησης στη δομή του φαινολικού δακτυλίου. Η παρουσία μιας δεύτερης ομάδας -OH, ειδικότερα στην ορθο- θέση σταθεροποιεί την ρίζα φαινοξυλίου μέσω ενδομοριακού δεσμού H. Επομένως, οι φαινόλες με χαρακτηριστική ομάδα κατεχόλης, γνωστές ως ο-διφαινόλες, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά. Επίσης, οι δομές των ο-διφαινολών έχουν την ικανότητα να συνδέουν μέταλλα (π.χ. Fe, Cu) που υπάρχουν σε ίχνη στο παρθένο ελαιόλαδο (67).

Το μολυβδαινικό δίνει ένα κίτρινο διάλυμα παρουσία ο-διφαινολών σε ασθενώς όξινα ή ουδέτερα μέσα. Ο μηχανισμός για την περιγραφή της αντίδρασης του μολυβδαινικού με κατεχόλη (H_2L) αλλά και με ο-διφαινόλες σε ουδέτερα μέσα φαίνεται με την παρακάτω αντίδραση (68):



Επίσης, φαίνεται και από την αντίδραση ότι οι ο-διφαινόλες σχηματίζουν σύμπλοκα με το μολυβδαίνιο (VI) (69).

1.4.9.4. Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP)

Αρχή μεθόδου:

Ο μηχανισμός αντιοξειδωτικής ισχύος αναγωγής σιδήρου (FRAP) βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και όχι στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου. Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην ικανότητα των φαινολών (αντιοξειδωτικών) να μειώσουν το Fe^{3+} σε Fe^{2+} . Η αντίδραση FRAP διεξάγεται σε όξινο pH 3,6 για να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου, έτσι η αντίδραση σε χαμηλό pH μειώνει το δυναμικό ιονισμού που οδηγεί στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου και αυξάνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής, που είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός της αντίδρασης. Όταν η αναγωγή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} συμβαίνει παρουσία 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνης (TPTZ), η αντίδραση συνοδεύεται από το σχηματισμό επίσης χρωματισμένου συμπλόκου με Fe^{2+} (απορρόφηση στα 593 nm) (70). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι:



Η αναγωγική ισχύς φαίνεται να σχετίζεται με τον βαθμό υδροξυλίωσης και την έκταση σύζευξης των φαινολών. Η μέθοδος FRAP δεν μπορεί να ανιχνεύσει ενώσεις που δρουν με ριζική απόσβεση (μεταφορά υδρογόνου), ιδιαίτερα θειόλες (π.χ. γλουταθειόνη) και πρωτεΐνες. Ωστόσο, η FRAP είναι απλή, γρήγορη, φθηνή και μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ημιαυτόματα ή αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα (70).

1.5. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν: α) η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης αιθέριων ελαίων ρίγανης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Ηπειρος, Κρήτη, Μακεδονία, Πελοπόννησος) και β) ο εμπλουτισμός ελαιολάδου με τα παραπάνω αιθέρια έλαια ρίγανης και η μελέτη της επίδρασής τους στην οξύτητα και αντιοξειδωτική δράση- οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αιθέρια έλαια ρίγανης και ελαιόλαδο μελέτης

Αναλύθηκαν πειραματικά 5 αιθέρια έλαια ρίγανης διαφορετικών περιοχών. Τα 2 ήταν από τις περιοχές της Ηπείρου (Παραγωγός Γιαννούλα Βασιλική- Νέο Σφηνωτό, περιοχή Λούρου / Αποστακτήριο Νίκος Κότσης- Δεσποτικά Πρέβεζας και Κίτσος- Πλατανούσα, Ιωάννινα, KITSOS ESSENTIAL OILS- 7 mL) και τα άλλα 3 ήταν από την Κρήτη (Άγιος Νικόλαος, BIOAROMA CRETE- 5 mL), την Πελοπόννησο (Ταΰγετος, Aroma Farms- 5 mL) και την Μακεδονία (Όλυμπος, αιθέρια έλαια- βότανα Όλυμπος- 5 mL). Το ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε ήταν έξτρα παρθένο ελαιόλαδο του παραγωγού Σπύρου Αλέξη (Eperion) από την Πρέβεζα, της ποικιλίας Λιανολιά εσοδείας 2021.

2.2. Αντιδραστήρια- σκεύη- όργανα

2.2.1. Αντιδραστήρια

Sodium Hydroxide Pellets (Mallinckrodt, USA, St. Louis) 1 kg, Phenolphthalein (Ferak Berlin, Berlin, Germany) 100 gr, Aceton > 99,5 % (Honeywell, Seelze, Germany) 2,5 L, N-Hexane (Merck, Darmstadt, Germany) 2,5 L, n-Hexane (CARLO ERBA, Val-de-Reuil, France) 2,5 L, Potassium Iodide (POChS.A. Gliwice, Gliwice, Slaskie, Poland), Starch soluble (Riedel-de Haen, Seelze, Germany) 100 gr, Sodium thiosulfate, anhydrous 99 % (Alfa Aesar. Karlsruhe, Germany) 500 gr, Isooctane SPECTROSOL- For optical spectroscopy (CARLO ERBA, Val-de-Reuil, France) 2,5 L, Acetic Acid glacial (CARLO ERBA, Val-de-Reuil, France) 2,5L, Ethyl Acetate >99,8 % (Fisher Chemical, Belgium) 2,5 L , Methanol for analysis (Merck, Darmstadt, Germany) 2,5 L, Ethanol denatured with MEK, IPA and Bitrex ≥ 98 % (Honeywell, Seelze, Germany) 2,5 L, Potassium Hydroxide U.S.P. Pellets (Mallinckrodt, USA, St. Louis) 1 kg, Hydrochloric acid puriss (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 2,5 L, Potassium dihydrogen orthophosphate (Anala R, Oxford, England), di- Potassium hydrogen phosphate 3-hydrate (Merck, Darmstadt, Germany) 250 gr, TPTZ for analysis reagent for iron (II) (Merck, Darmstadt, Germany) 5 gr, DPPH (ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA), Folin Ciocalteu's Reagent (Merck, Darmstadt, Germany) 500 mL, Sodium Carbonate >99,8 % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 1 kg, Sodium Molybdenum oxide dihydrate 98 % (Alfa Aesar, Massachusetts, USA) 100 gr, Ferric Chloride 97 % (Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 100 gr, Sodium acetate anhydrous (Merck, Darmstadt, Germany) 1 kg, Diethyl Ether (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 2,5 L, Chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) 2,5 L,

Dimethylsulphoxide, Analytical Reagent A.R. (Lab-Scan Analytical Sciences, Gliwice, Poland) 1 L, Caffeic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Gallic acid (Merck, Darmstadt, Germany), Διάλυμα βρωμίου, Iodine crude QP (Panreac Quimica SAU, Barcelona, Spain), Νερό απιονισμένο, Δις αποσταγμένο νερό.

2.2.2. Σκεύη

Πυκνόμετρο με θερμόμετρο, πλαστικές κυψελίδες, γυάλινες κυψελίδες (1 cm και 4 mm), κυψελίδες χαλαζία (4 mm), γυάλινες πιπέτες παστερ, πλαστικά σταγονόμετρα, φούσκα και πουαρ, μαγνητάκια, erppendorf (1,5 και 2 mL), αυτόματες πιπέτες (100-1000 μ L, 50-200 μ L, 20-200 μ L, 2-20 μ L), σιφόνια (5, 10 και 25 mL), προχοΐδα των 25 mL με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου, ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες διαφόρων μεγεθών, γυάλινοι φυγοκεντρικοί σωλήνες, ογκομετρικές φιάλες (5, 10, 20, 25 και 50 mL), κωνικές φιάλες των 100 mL, εσφυρισμένες κωνικές φιάλες των 250 mL με πόμα, ποτήρια ζέσης, ψυκτήρες, γυάλινα φιαλίδια διαφόρων όγκων με πλαστικό πόμα, πέτρες βρασμού, θερμόμετρα.

Για τον εμπλουτισμό του ελαιολάδου χρησιμοποιήθηκαν σκουρόχρωμες γυάλινες φιάλες των 180 mL με πόμα και ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Για την αποθήκευση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μικρά σκουρόχρωμα φιαλίδια των 5 και 10 mL με βιδωτό πόμα.

2.2.3. Όργανα, συσκευές

Αναλυτικός ζυγός Kernabs (Balingen, Germany), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ζυγός Kerneg (Balingen, Germany), ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων, φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV – 1280 (Duisburg, F.R. Germany), φασματοφωτόμετρο Jenway 6505 UV/Vis (Felsted, Dunmow, Essex, U.K.), φυγόκεντρος Centromix J.P. Selecta (Abrera, Barcelona), υδατόλουτρο- 37 °C, θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας, vortex Genie 2 (Bohemia, N.Y., USA), θερμοστατούμενος θάλαμος VELP (Usmate Velate MB, Italy)- 20 °C, επωαστικός θάλαμος Ecocell Medcenter (Stadlern, Germany)- 50 °C, πυριαντήριο Memmert (Buechenbach, Germany)- 20 °C, 180 °C, συσκευή υπερήχων Trade, Ultrasonic Cleaner (Barcelona, Spain), πυκνόμετρο με θερμόμετρο, στήλη απιονισμού, πεχάμετρο Consort C831, Multi- Parameter Analyzer (Turnhout, Belgium), λάμπα UV, θερμαντικοί μανδύες.

2.3. Μέθοδοι ανάλυσης αιθέριων ελαίων ρίγανης

Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων περιλαμβάνει τις μεθόδους Folin, FRAP, όπως και τη δέσμευση της ρίζας DPPH. Και στις τρεις μεθόδους ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία που εφαρμόζεται στις μεθόδους ανάλυσης του ελαιολάδου καθώς και, η χρήση ίδιων αντιδραστηρίων. Μόνη εξαίρεση είναι ότι στις μεθόδους Folin και FRAP χρησιμοποιήθηκε διαλύτης DMSO αντί για διάλυμα μεθανόλης:νερού (σε αναλογία 60:40).

2.3.1. Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Πειραματική πορεία:

Παρασκευάζεται φρέσκο διάλυμα DPPH σε οξικό αιθυλεστέρα συγκέντρωσης 80 μM . Μελετήθηκαν 3 διαφορετικές αραιώσεις αιθέριου ελαίου (1/100, 1/200, 1/500). Για την προετοιμασία του δείγματος αραιώσεως 1/100 γίνεται προσθήκη 20 μL αιθέριου ελαίου σε 1,98 mL οξικό αιθυλεστέρα σε μικρό γυάλινο περιέκτη με πώμα. Η προετοιμασία των δειγμάτων των άλλων δυο αραιώσεων έγινε με χρήση της αραιώσεως 1/100 ως αρχικό δείγμα.

Σε γυάλινη κυψελίδα διαστάσεων 10 mm εισάγονται με αυτόματη πιπέτα 2 mL διαλύματος DPPH. Η κυψελίδα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο, το οποίο έχει ρυθμιστεί στα 515 nm και έχει μηδενιστεί με τον διαλύτη της ρίζας. Στη συνέχεια, με αυτόματη πιπέτα προσθέτουμε 0,5 mL δείγματος στην κυψελίδα και ξεκινάνε οι μετρήσεις. Αυτό γίνεται για να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος από την στιγμή που θα γίνει η προσθήκη, μέχρι την στιγμή που θα καταγραφεί η πρώτη μέτρηση. Για το control γίνεται προσθήκη στην κυψελίδα 2 mL DPPH και 0,5 mL οξικού αιθυλεστέρα αντί για δείγμα (71).

Η % δέσμευση της ρίζας DPPH υπολογίζεται από την σχέση:

$$\% \text{ δέσμευση της ρίζας} = (A_0 - A_t : A_0) \times 100,$$

όπου, A_0 η απορρόφηση τυφλού σε χρόνο 0 και A_t η απορρόφηση του δείγματος σε χρόνο t (72).

Παράλληλα, στην ανάλυση των αιθέριων ελαίων εκτός από την % δέσμευση, υπολογίστηκε και ο δείκτης IC_{50} (Inhibition Concentration) (65). Ο δείκτης IC_{50} υπολογίζεται ύστερα από κατασκευή καμπύλης με την ως % δέσμευση των 3 αραιώσεων ως προς την % v/v συγκέντρωση (0,2, 0,5, 1).

2.3.2. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin)

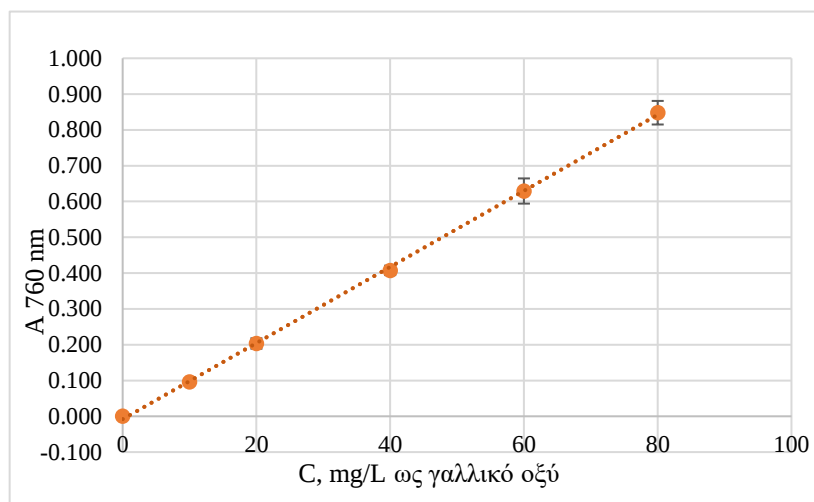
Πειραματική πορεία:

Τα δείγματα αραιώθηκαν διαδοχικά με διαλύτη DMSO σε τελική αραιώση 1/5000. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 0,5 mL αραιωμένου δείγματος αιθέριου ελαίου με 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin (αραιωμένο 1:10 σε απιονισμένο νερό) και πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex. Μετά από παραμονή 5 min στο σκοτάδι γίνεται προσθήκη 2 mL Na_2CO_3 7,5 % σε απιονισμένο νερό, ανάδευση στο vortex και το διάλυμα παραμένει στο σκοτάδι για ακόμα 2 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάζεται και τυφλό το οποίο περιέχει διαλύτη DMSO αντί για δείγμα αιθέριου ελαίου. Μετά το πέρας των 2 ωρών γίνεται φωτομέτρηση στα 760 nm (μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό) (73).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Πρότυπη καμπύλη:

Αρχικά παρασκευάζεται ένα πυκνό διάλυμα 100 mg/L διαλύοντας 5 mg γαλλικού οξέος με διαλύτη DMSO σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 10, 20, 40, 60, 80 mg/L σε τελικό όγκο 1,2 mL. Στην συνέχεια, εφαρμόζεται η μέθοδος της Folin-Ciocalteu. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 0,5 mL από κάθε διάλυμα που παρασκευάστηκε με 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin (αραιωμένο 1:10 σε απιονισμένο νερό) και πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex. Μετά από παραμονή 5 min στο σκοτάδι γίνεται προσθήκη 2 mL Na_2CO_3 7,5 % σε απιονισμένο νερό, ανάδευση στο vortex και το διάλυμα παραμένει στο σκοτάδι για ακόμα 2 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάζεται και τυφλό το οποίο περιέχει διάλυμα DMSO αντί για δείγμα (σημείο 0 mg/L). Μετά το πέρας των 2 ωρών γίνεται φωτομέτρηση στα 760 nm (μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό). Συνεπώς, με βάση τις τιμές απορρόφησης και τη συγκέντρωση (mg γαλλικού οξέος ανά 100 mL μίγματος αντιδραστηρίου) κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για την μέθοδο Folin (διαλύτης DMSO) με εξίσωση ευθείας $C = (A + 0,008) / 0,0106$, $R^2 = 0,9996$.



Εικόνα 12. Εξέλιξη κυανού χρώματος μετά το πέρας των 2 ωρών (διαλύτης DMSO).

2.3.3. Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP)

Πειραματική πορεία:

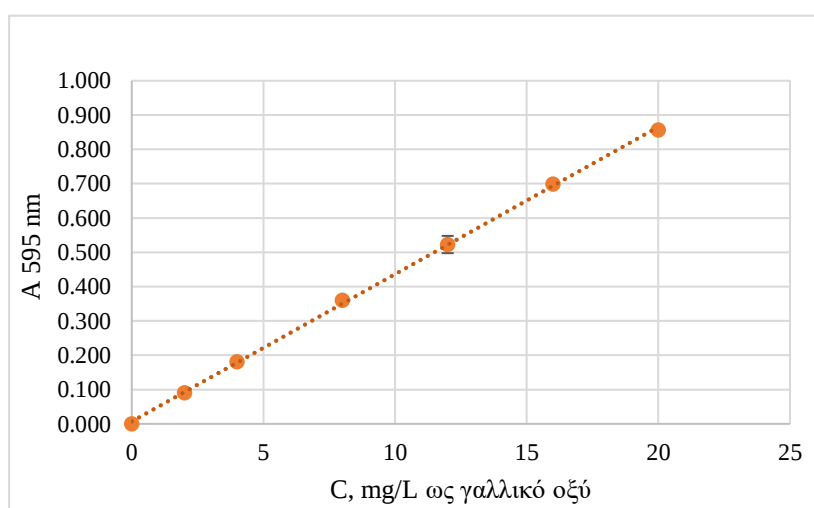
Αρχικά παρασκευάζεται το αντιδραστήριο Frap το οποίο περιέχει τα διαλύματα TPTZ, FeCl_3 και το buffer σε αναλογία 1:1:10 (πχ 2,5 mL TPTZ+ 2,5 mL FeCl_3 + 25 mL buffer). Τα δείγματα αραιώθηκαν διαδοχικά με διαλύτη DMSO σε τελική αραιώση 1/7000.

Σε eppendorf των 2 mL και με αυτόματη πιπέτα αναμιγνύονται 1400 μL αντιδραστηρίου Frap με 100 μL αραιωμένου δείγματος αιθέριου ελαίου. Παράλληλα παρασκευάζεται και το τυφλό στο οποίο αντί για δείγμα αιθέριου ελαίου προστίθεται διαλύτης DMSO. Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση στο vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min στο σκοτάδι. Τέλος πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm. Μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό (74).

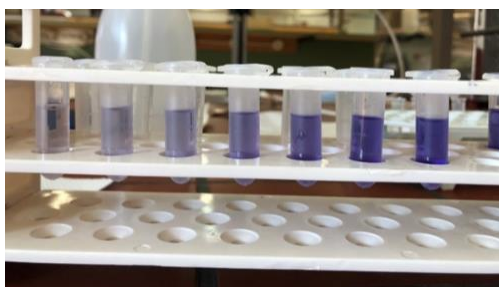
Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Πρότυπη καμπύλη:

Αρχικά παρασκευάζεται ένα πυκνό διάλυμα 100 mg/L διαλύοντας 5 mg γαλλικού οξέος με διαλύτη DMSO σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 2, 4, 8, 12, 16, 20 mg/L σε τελικό όγκο 0,5 mL. Στην συνέχεια, εφαρμόζεται η μέθοδος της Frap με χρήση eppendorf των 2 mL. Αρχικά παρασκευάζεται το αντιδραστήριο Frap το οποίο περιέχει τα διαλύματα TPTZ, FeCl_3 και το buffer σε αναλογία 1:1:10 (π.χ. 2,5 mL TPTZ+ 2,5 mL FeCl_3 + 25 mL buffer). Με αυτόματη πιπέτα αναμιγνύονται 1400 μL αντιδραστηρίου Frap με 100 μL από κάθε διάλυμα που παρασκευάστηκε σε DMSO. Παράλληλα, παρασκευάζεται και το τυφλό στο οποίο αντί για δείγμα προστίθεται DMSO (σημείο 0 mg/L). Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση στο vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min στο σκοτάδι. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm. Μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό.



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για την μέθοδο FRAP (διαλύτης DMSO) με εξίσωση ευθείας $C = (A - 0,0068) / 0,0429$, $R^2 = 0,9996$.



Εικόνα 13. Χρωματική εξέλιξη μετά την επώαση στους 37 °C (διαλύτης DMSO).

2.4. Μέθοδοι ανάλυσης ελαιολάδου

2.4.1. Αριθμός σαπωνοποίησης

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή διαλύματος KOH 0,5 N σε αιθανόλη:

Αντιστοιχούν 28 gr KOH για 1 L διαλύματος. Χρησιμοποιείται αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$ αλλά το KOH δεν διαλύεται πλήρως σε αυτή. Πρώτα διαλύουμε το ζυγισμένο KOH σε ελάχιστο απιονισμένο νερό και μετά προσθέτουμε την αιθανόλη. Σε ογκομετρική φιάλη ζυγίζονται τα gr του KOH. Πρώτα διαλύεται σε ελάχιστο απιονισμένο νερό (πρέπει να διαλυθεί πλήρως το KOH), μετά προστίθεται η EtOH και γίνεται συμπλήρωση του όγκου μέχρι την χαραγή. Ανάδευση στο vortex, μετά μεταφορά σε κατάλληλο περιέκτη και παραμονή στο ψυγείο για να φύγει το θόλωμα. Το διάλυμα παρασκευάζεται ένα 24ωρο πριν την χρήση του διότι χρειάζεται να παραμείνει κάποιο χρόνο για να εξαφανιστεί το θόλωμα που αρχικά δημιουργείται.

β) Παρασκευή διαλύματος 0,5 N HCl:

Αντιστοιχούν 10,41 mL πυκνού HCl για 250 mL διαλύματος.

Πειραματική πορεία:

Σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 250 mL ζυγίζονται 1-2 gr λιπαρής ύλης. Με σιφόνιο των 25 mL προτίθενται 25 mL αλκοολικού διαλύματος KOH 0,5 N και πέτρες βρασμού. Ακολουθεί σαπωνοποίηση του δείγματος με θέρμανση της φιάλης επί 1 ώρα με κάθετο ψυκτήρα σε υδατόλουτρο που βράζει. Κατά την διάρκεια της σαπωνοποίησης η φιάλη ανακινείται αρκετές φορές. Στην συνέχεια, και όσο είναι ακόμα ζεστό, ογκομετρείται η περίσσεια KOH με 0,5 N HCl και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη (εξάλειψη του ροζ χρώματος). Συγχρόνως, γίνεται και λευκός προσδιορισμός ο οποίος περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το δείγμα και για το οποία ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία (75).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Ο αριθμός σαπωνοποίησης Α.Σ. (mg KOH/g ελαιολάδου) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Α.Σ.} = [28,05 (\alpha - \beta)] / \text{βάρος δείγματος (g)}$$

όπου, α και β ο αριθμός των mL του HCl 0.5N που καταναλώθηκαν στον λευκό προσδιορισμό και στον προσδιορισμό του δείγματος, αντίστοιχα.

Οι ποσότητες μπορούν να μειωθούν και στο $\frac{1}{4}$.

2.4.2. Αριθμός ιωδίου

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή διαλύματος KI 10 %:

Σε 100 mL απιονισμένο νερό διαλύονται 10 gr KI

10 mL διαλύονται x; $\rightarrow x=1$ gr KI

Άρα σε ποτήρι ζέσης ζυγίζεται 1 gr KI, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και ακολουθεί ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση του KI.

β) Παρασκευή διαλύματος 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$:

$C=n/V \rightarrow n=0,1\text{N} / 1\text{ L} \rightarrow n=0,1\text{ mol}$ άρα, $n=m/M_r \rightarrow m=n \cdot M_r \rightarrow m=0,1 \cdot 158,10 \rightarrow m=15,81\text{ gr}$

Άρα σε ογκομετρική φιάλη του 1 L φέρονται με την βοήθεια φύλλου αλουμινίου 15,81 gr αντιδραστήριου και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

γ) Παρασκευή ειδικού διαλύματος ιωδίου Hanus:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 13 gr στερεού ιωδίου. Στην συνέχεια, το στερεό ιώδιο μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L και προστίθενται κάποια mL οξικού οξέος (η μεταφορά του οξικού οξέος στην ογκομετρική φιάλη γίνεται από το ποτήρι ζέσεως που περιείχε το στερεό ιώδιο έτσι ώστε να γίνει και έκπλυση αυτού). Έπειτα, με σιφόνιο προστίθενται 2,6 ml διαλύματος βρωμίου. Τέλος, γίνεται συμπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης μέχρι την χαραγή με οξικό οξύ και ακολουθεί παραμονή (4-5 μέρες περίπου) στο σκοτάδι με ανάδευση της φιάλης ανά κάποια χρονικά διαστήματα.

Πειραματική πορεία:

Σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 250 mL με πώμα ζυγίζονται 0,2-0,25 gr λιπαρής ύλης και προστίθενται 10 mL χλωροφορμίου. Ακολούθως, με την βοήθεια προχοϊδας όγκου 25 mL, διαβάθμισης 0, 1, (η οποία βρίσκεται στον απαγωγό) προστίθενται 25 mL ειδικού διαλύματος ιωδίου, η φιάλη πωματίζεται με κατάλληλο πώμα και αφήνεται στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Κατά την παραμονή γίνεται ανακίνηση της φιάλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε ~10 min). Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη με σιφόνιο 15 mL διαλύματος KI 10 %, και η περίσσεια

του ιωδίου ογκομετρείται με διάλυμα 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Αρχικά, γίνεται προσθήκη του διαλύματος 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ μέχρι να ατονήσει το χρώμα του ιωδίου και μετά πραγματοποιείται προσθήκη δείκτη αμύλου και συνέχιση της ογκομέτρησης μέχρι να εξαφανιστεί το κυανό χρώμα. Παράλληλα, γίνεται και λευκός προσδιορισμός ο οποίος περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το δείγμα και για το οποίο ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία (76).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Ο αριθμός ιωδίου (A.I.) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$A. I. = [(\alpha - \beta) \times N \times 12,69] / (\text{βάρος δείγματος (g)})$$

όπου,

α = τα mL του 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που καταναλώθηκαν στο λευκό προσδιορισμό

β = τα mL του 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που καταναλώθηκαν στο δείγμα

N = ο τίτλος του $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (εδώ 0,1)

2.4.3. Πυκνότητα

Πειραματική πορεία:

Χρησιμοποιείται ειδικό πυκνόμετρο. Αρχικά, ζυγίζεται το πυκνόμετρο μαζί με το θερμόμετρο. Στη συνέχεια, γεμίζεται με ελαιόλαδο μέχρι πάνω έτσι ώστε, να μην υπάρχει αέρας στο πυκνόμετρο, επανατοποθετείται το θερμόμετρο και το πυκνόμετρο καθαρίζεται καλά με ακετόνη. Ακολουθεί καταγραφή της θερμοκρασίας και ζύγιση (77).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Γνωρίζουμε ότι το πυκνόμετρο χωράει ακριβώς 24,496 mL ελαιολάδου άρα η πυκνότητα υπολογίζεται από τον τύπο (77):

$$d = \frac{m}{V} = \frac{m_1 - m_0}{24,496}$$

όπου,

m_0 = η μάζα, σε gr, του άδειου πυκνομέτρου

m_1 = η μάζα, σε gr, του γεμάτου πυκνομέτρου

Το αποτέλεσμα εκφράζεται με τέσσερα δεκαδικά ψηφία. Η θερμοκρασία μετρήθηκε $19,3 \pm 0,3$ °C.

2.4.4. Χλωροφύλλες- Καροτενοειδή

Πειραματική πορεία:

Η αποτίμηση του χρώματος του ελαιολάδου γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 470 (καροτενοειδή) και 670 (χλωροφύλλες) nm με χρήση γυάλινης κυψελίδας. Για τη μέτρηση η γυάλινη κυψελίδα γεμίζεται με ελαιολάδο και ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται το εξάνιο (μηδενισμός φωτομέτρου) (60).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις (σε mg/kg) υπολογίζονται από τους τύπους (60):

$$C_{\text{χλωροφυλλών}} = \frac{A_{670} \times 10^6}{613 \times 100 \times \text{density}}$$

$$C_{\text{καροτενοειδών}} = \frac{A_{470} \times 10^6}{2000 \times 100 \times \text{density}}$$

2.4.5. Προσδιορισμός οξύτητας

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή δείκτη φαινολφθαλεΐνης 10 g/L σε αιθανόλη:

Για 50 mL διαλύματος ζυγίζεται 0,5 gr δείκτη φαινολφθαλεΐνης σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL. Στη συνέχεια, προστίθενται περίπου 40 mL EtOH και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή.

β) Παρασκευή διαλύματος NaOH 0,1 M:

Για την ογκομέτρηση χρειάζεται να παρασκευαστεί διάλυμα 0,1 M NaOH σε απιονισμένο νερό. Παρασκευάστηκε διάλυμα τελικού όγκου 250 mL.

$$C = n/V \rightarrow n = 0,1 \times 250 \times 10^{-3} \rightarrow n = 25 \times 10^{-3} \text{ mol άρα, } n = m/M_r \text{ (} M_r = 40 \text{ gr/mol) } \rightarrow m = 1 \text{ gr NaOH.}$$

Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL ζυγίζεται 1 gr NaOH, προστίθενται περίπου 150 mL απιονισμένου νερού και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού

αναδευτήρα μέχρι να διαλυθεί πλήρως το NaOH. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Γίνονται 2-3 εκπλύσεις του ποτηριού ζέσεως με απιονισμένο νερό, ώστε να υπάρξει ποσοτική μεταφορά και τέλος η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Πειραματική πορεία:

Σε κωνική φιάλη των 100 mL ζυγίζονται, σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, περίπου 5 gr ελαιολάδου. Στη συνέχεια, με σιφόνιο προστίθενται 10 mL αιθανόλης, 10 mL διαιθυλαιθέρα για να διαλυθεί το δείγμα. Ακολουθεί ογκομέτρηση (προχοΐδα των 25 mL, διαβάθμισης 0,1) με διάλυμα NaOH 0,1 M και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη (3-4 σταγόνες) έως ότου το χρώμα γίνει γαλακτερό ροζ (78).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Η οξύτητα, ως % ελαιϊκό οξύ, προκύπτει από τη σχέση:

$$\% \text{ ελαιϊκό οξύ} = V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m} = \frac{0,0282 \times V \times 100}{m}$$

όπου,

V = ο όγκος σε mL του διαλύματος NaOH,

c = η ακριβής συγκέντρωση (moles/L) του διαλύματος NaOH,

M = 282 g/mol, το MB σε g/mole του ελαιικού οξέος,

m = το βάρος του δείγματος σε gr.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται με δύο δεκαδικά για τιμές από 0 μέχρι και 1, και με ένα δεκαδικό για τιμές από 1 μέχρι και 100 (78).

2.4.6. Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή κορεσμένου ιωδιούχου καλίου KI:

Η διαλυτότητα του KI στο νερό σε θερμοκρασία δωματίου είναι 144 gr/100 ml συνεπώς,

Σε 100 ml απιονισμένο νερό διαλύονται 144 gr KI

10 ml διαλύονται x; $\rightarrow x=14,4$ gr KI

Άρα, σε ποτήρι ζέσης ζυγίζονται 14,4 gr KI και προστίθενται 10 mL απιονισμένο νερό και ακολουθεί ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση του KI. Παρατήρηση: σε θερμοκρασία δωματίου χαμηλότερη των 20 βαθμών πιθανόν το διάλυμα θα κρυσταλλώσει γιατί θα είναι υπέρκορο, συνεπώς, για να αποφευχθεί αυτό μπορεί να ζυγιστεί λίγο λιγότερη ποσότητα KI, ~14 gr.

β) Παρασκευή δείκτη αμύλου 1 %:

Το διάλυμα χαλάει σε μία εβδομάδα συνεπώς, δεν φτιάχνονται μεγάλες ποσότητες. Σε ποτήρι ζέσης ζυγίζονται 0,2 gr αμύλου και προστίθενται 20 mL απιονισμένο νερό (έντονο θόλωμα). Το ζέσεως καλύπτεται με αλουμινόχαρτο στο οποίο κάνουμε μερικές τρύπες ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και βρασμός μέχρι να εξαφανιστεί το θόλωμα.

γ) Παρασκευή 0,002 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$:

$C=n/V \rightarrow n=0,002\text{N} / 1\text{ L} \rightarrow n=0,002\text{ mol}$ άρα, $n=m/M_r \rightarrow m=n \cdot M_r \rightarrow m=0,002 \cdot 158,10 \rightarrow m=0,3162\text{ gr}$.

Άρα σε ογκομετρική φιάλη του 1 L φέρονται με την βοήθεια φύλλου αλουμινίου 0,3162 gr αντιδραστηρίου και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Σημείωση: Αρχικά γίνεται παρασκευή διαλύματος 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και αραιώσή του στα 0,002 N πριν την πραγματοποίηση της ογκομέτρησης καθώς το 0,002 N είναι ασταθές.

Πειραματική πορεία:

Σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη με πώμα ζυγίζονται 1-2 gr λιπαρής ύλης με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων. Προστίθενται με σιφόνιο 10 mL χλωροφορμίου, 15 mL οξικού οξέος, 1 mL κορεσμένου KI, η φιάλη πωματίζεται αμέσως και ακολουθεί ανάδευση για 1 min. Έπειτα, η κωνική φιάλη τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος για 5 min. Ακολουθεί προσθήκη 75 mL

απιονισμένου νερού με ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL και δείκτης άμυλο (3-4 σταγόνες). Τέλος γίνεται ογκομέτρηση (προχοΐδα των 25 mL, διαβάθμισης 0,1) με 0,002 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ μέχρι να εξαλειφθεί το μαύρο χρώμα του δείκτη. Παράλληλα, λαμβάνει χώρα και λευκός προσδιορισμός ο οποίος περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός της λιπαρής ύλης (79).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Ο A.Y. (meqO_2/Kg ελαιολάδου) υπολογίζεται από τον τύπο (79):

$$A.Y = 1000 \cdot A \cdot N / B$$

όπου,

A= τα mL του διαλύματος θειοθειϊκού νατρίου που καταναλώθηκαν για το δείγμα μείον τα mL του διαλύματος θειοθειϊκού νατρίου που καταναλώθηκαν για τον λευκό προσδιορισμό,

B = το βάρος του δείγματος σε gr και

N: η κανονικότητα του διαλύματος θειοθειϊκού νατρίου (0,002 N)

Το αποτέλεσμα εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με μείωση όλων των όγκων στο μισό.

2.4.7. Μέτρηση απορρόφησης στο UV (234 και 270 nm)

Πειραματική πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγονται 5 mL ισοοκτάνιο και 5 μL λιπαρής ύλης. Η παραλαβή της λιπαρής ύλης γίνεται με αυτόματη πιπέτα, προσεκτικά, από την επιφάνεια του λαδιού καθώς η ποσότητα του απαιτούμενου δείγματος είναι πολύ μικρή και έτσι είναι πολύ εύκολο να έχουμε σφάλμα. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και με κυψελίδες χαλαζία του 1 cm μετράται η απορρόφηση στα 234 και 270 nm. Σαν τυφλό (μηδενισμός φωτομέτρου) χρησιμοποιείται ισοοκτάνιο (80).

2.4.8. Προσδιορισμός συντελεστών Km και ΔK

Πειραματική πορεία:

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό 4 δεκαδικών ψηφίων 0,1 gr λιπαρής ύλης και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με ισοοκτάνιο. Ακολουθεί καλή ανάδευση στο vortex. Έπειτα, γίνεται φωτομέτρηση στα 232, 268, 264 (λ_{max}-4) και 272 (λ_{max}+4) nm. Για την μέτρηση της απορρόφησης στα 232 nm απαιτείται, συνήθως, αραιώση του δείγματος 1:10 λόγω λήψης υψηλών τιμών απορρόφησης (>0,8). Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ισοοκτάνιο (81).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Ο υπολογισμός των συντελεστών γίνεται με τους παρακάτω τύπους (81):

$$K_m = \frac{E \lambda}{c \times s}$$

όπου,

Eλ: η τιμή της απορρόφησης σε κάθε μήκος κύματος

c: η συγκέντρωση του διαλύματος σε g/100 mL διαλύτη

s: το πάχος της κυψελίδας χαλαζία (1 cm).

Για τον προσδιορισμό του συντελεστή ΔK γίνεται χρήση του τύπου:

$$\Delta K = K_m - \left(\frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \right)$$

όπου,

$$K_m = K_{268}$$

$$K_{m-4} = K_{264}$$

$$K_{m+4} = K_{272}$$

Το αποτέλεσμα εκφράζεται με δύο δεκαδικά ψηφία.

2.4.9. Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή διαλύματος DPPH (Mr=394,32):

Η επιθυμητή συγκέντρωση είναι 80 μM. Το αρχικό πυκνό διάλυμα που παρασκευάζεται είναι 8000 μM ή αλλιώς 8 mM. Για την παρασκευή 20 mL πυκνού διαλύματος έχουμε ως εξής:

$m = C \cdot V \cdot M_r \Rightarrow 8 \text{ mM} \cdot 20 \text{ mL} \cdot 394,32 = 63,0912 \text{ gr DPPH}$ ζυγίζονται και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL με τον αντίστοιχο διαλύτη. Έπειτα, πραγματοποιείται αραιώση 1/100 του πυκνού και αυτό το αραιωμένο διάλυμα έχει συγκέντρωση 80 μM .

Πειραματική πορεία:

Ολικό εκχύλισμα:

Παρασκευάζεται φρέσκο διάλυμα DPPH σε οξικό αιθυλεστέρα συγκέντρωσης 80 μM . Για την προετοιμασία του δείγματος γίνεται προσθήκη 0,1 mL ελαιολάδου σε 0,9 mL οξικό αιθυλεστέρα σε erpendorf των 1,5 mL.

Σε γυάλινη κυψελίδα διαστάσεων 10 mm εισάγονται με αυτόματη πιπέτα 2 mL διαλύματος DPPH. Η κυψελίδα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο, το οποίο έχει ρυθμιστεί στα 515 nm και έχει μηδενιστεί με τον διαλύτη της ρίζας. Στη συνέχεια, με αυτόματη πιπέτα προσθέτουμε το 0,5 mL δείγματος στην κυψελίδα και ξεκινάνε οι μετρήσεις. Αυτό γίνεται για να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος από την στιγμή που θα γίνει η προσθήκη, μέχρι την στιγμή που θα καταγραφεί η πρώτη μέτρηση. Για το control γίνεται προσθήκη στην κυψελίδα 2 mL DPPH και 0,5 mL οξικού αιθυλεστέρα αντί για δείγμα (71).

Η % δέσμευση της ρίζας DPPH υπολογίζεται από την σχέση:

$$\% \text{ δέσμευση της ρίζας} = (A_0 - A_t : A_0) \times 100,$$

όπου, A_0 η απορρόφηση τυφλού σε χρόνο 0 και A_t η απορρόφηση του δείγματος σε χρόνο t (72).

2.4.10. Μέθοδοι όπου χρησιμοποιείται το πολικό εκχύλισμα ελαιολάδου

2.4.10.1. Λήψη πολικού εκχυλίσματος

Σε φυγοκεντρικό σωλήνα ζυγίζεται 1 gr λιπαρής ύλης. Στην συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη (73):

- 2 mL εξανίου
- 2 mL μεθανόλης:νερό (σε αναλογία 60:40)

Γίνεται ανάδευση στο vortex για 2 min και φυγοκέντριση για 5 min στα 7000 rpm. Ακολουθεί λήψη της πολικής (κάτω) φάσης με χρήση γυάλινης πιπέτας Paster. *Παρατήρηση:* Για την

αποφυγή λήψης της μη πολικής (πάνω) φάσης κατά την είσοδο με την πιπέτα σε αυτή πιέζουμε ελαφρώς το πουάρ.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές με προσθήκη κάθε φορά στην μη πολική φάση που απομένει επιπλέον 2 mL διαλύματος μεθανόλης:νερό.

2.4.10.2. Πικρότητα

Πειραματική πορεία:

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστίθενται με αυτόματη πιπέτα 5 mL εκχυλίσματος και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με διάλυμα μεθανόλης 60 % → διάλυμα C₀.

1,25 mL από το C₀ μεταφέρονται με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με διάλυμα μεθανόλης 60 % → διάλυμα C₁.

Τέλος γίνεται φωτομέτρηση του C₁ στα 225 nm (μηδενισμός οργάνου με μεθανόλη 60 %) (82).

Η μέθοδος μπορεί να πραγματοποιηθεί με παρασκευή διαλύματος C₀ ως εξής, 2 mL εκχυλίσματος και 2 mL μεθανόλης 60 %.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Υπολογισμός δείκτη K₂₂₅: $K_{225} = \frac{A_{225}}{C}$, όπου C= gr λαδιού/ 100 mL

Υπολογισμός δείκτη πικρότητας (Intensity of Bitterness) IB: $IB = 13,33 \times K_{225} - 0,837$

- 1) Για την παρασκευή του διαλύματος C₀ παίρνουμε: 2 mL εκχυλίσματος και 2 mL MeOH/H₂O. Άρα βρίσκουμε πόσα γραμμάρια λαδιού αντιστοιχούν σε αυτά τα 2 mL εκχυλίσματος.

1 gr λαδιού → περίπου 6 mL εκχυλίσματος

X; =0,33 gr → 2 mL εκχυλίσματος

Επομένως, στο C₀ έχουμε 0,33 gr λαδιού/ 4 mL.

- 2) Για το C₁ παίρνουμε 1,25 mL από το C₀ και συμπληρώνουμε μέχρι τα 5 mL με MeOH/H₂O. Βρίσκω πόσα γραμμάρια λαδιού αντιστοιχούν στο 1,25 mL C₀.

0,33 gr λαδιού → 4 mL

y; =0,1031 gr → 1,25 mL

Άρα με βάση τα παραπάνω υπολογίζεται ο δείκτης K_{225} και ο δείκτης πικρότητας IB.

Δηλαδή, έχω 0,1031 gr λαδιού/ 5 mL άρα 2,062 gr λαδιού/ 100 mL.

2.4.10.3. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin)

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή διαλύτη MeOH/H₂O 60:40:

Σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL φέρονται 40 mL απιονισμένου νερού και 60 mL μεθανόλης.

β) Αντιδραστήριο Folin αραιωμένο 1:10 με απιονισμένο νερό:

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL μεταφέρονται με σιφόνιο 5 mL πυκνού διαλύματος Folin και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Αναδεύουμε και μεταφέρουμε το διάλυμα σε γυάλινο περιέκτη τον οποίο καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύουμε σε σκοτεινό μέρος.

γ) Παρασκευή διαλύματος 7,5 % w/v ανθρακικού νατρίου σε απιονισμένο νερό:

Σε 100 mL διαλύματος, περιέχονται 7,5 gr Na₂CO₃. Σε ποτήρι ζέσης ζυγίζεται η παραπάνω ποσότητα ανθρακικού νατρίου και προστίθενται περίπου 50 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα και φέρεται με την βοήθεια γυάλινου χωνιού σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Το ποτήρι ζέσεως εκπλένεται 2-3 φορές και συμπληρώνεται ο όγκος της ογκομετρικής φιάλης μέχρι την χαραγή. Ακολουθεί έντονη ανάδευση ώστε να διαλυθεί πλήρως το ανθρακικό νάτριο. Αφού ετοιμαστεί το διάλυμα, μεταφέρεται σε γυάλινο περιέκτη των 100 mL και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

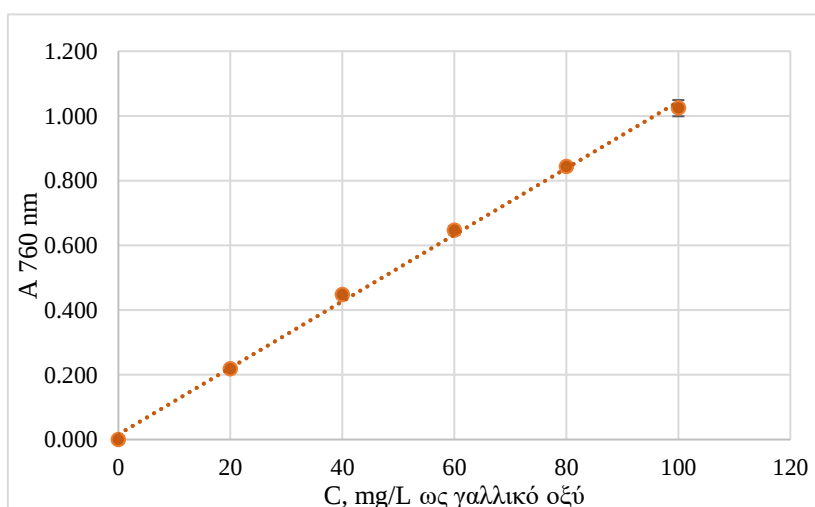
Πειραματική πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 0,5 mL εκχυλίσματος με 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin (αραιωμένο 1:10 σε απιονισμένο νερό) και πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex. Μετά από παραμονή 5 min στο σκοτάδι γίνεται προσθήκη 2 mL Na₂CO₃ 7,5 % σε απιονισμένο νερό, ανάδευση στο vortex και το διάλυμα παραμένει στο σκοτάδι για ακόμα 2 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάζεται και τυφλό το οποίο περιέχει διάλυμα μεθανόλης 60 % αντί για εκχύλισμα. Μετά το πέρας των 2 ωρών γίνεται φωτομέτρηση στα 760 nm (μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό) (73).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Πρότυπη καμπύλη:

Αρχικά παρασκευάζεται ένα πυκνό διάλυμα 100 mg/L διαλύοντας 5 mg γαλλικού οξέος με διαλύτη μεθανόλη:νερό 60:40 v/v σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 20, 40, 60, 80, 100 mg/L σε τελικό όγκο 1,2 mL. Στην συνέχεια, εφαρμόζεται η μέθοδος της Folin-Ciocalteu. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 0,5 mL από κάθε διάλυμα που παρασκευάστηκε με 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin (αραιωμένο 1:10 σε απιονισμένο νερό) και πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex. Μετά από παραμονή 5 min στο σκοτάδι γίνεται προσθήκη 2 mL Na_2CO_3 7,5 % σε απιονισμένο νερό, ανάδευση στο vortex και το διάλυμα παραμένει στο σκοτάδι για ακόμα 2 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάζεται και τυφλό το οποίο περιέχει διάλυμα μεθανόλης 60 % αντί για δείγμα (σημείο 0 mg/L). Μετά το πέρας των 2 ωρών γίνεται φωτομέτρηση στα 760 nm (μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό). Συνεπώς, με βάση τις τιμές απορρόφησης και τη συγκέντρωση (mg γαλλικού οξέος ανά L δείγματος) κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 3. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για την μέθοδο Folin με εξίσωση ευθείας $C = (A - 0,0159) / 0,0103$ και $R^2 = 0,9983$.



Εικόνα 14. Εξέλιξη μπλε χρώματος μετά το πέρας των 2 ωρών.

2.4.10.4. Όρθο-διφαινόλες

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή διαλύματος μολυβδαινικού νατρίου 5 %:

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα αιθανόλης:νερού σε αναλογία 1:1 (25 mL αιθανόλη + 25 mL απιονισμένο νερό). Για την παρασκευή 50 mL διαλύματος ζυγίζονται 2,5 gr μολυβδαινικού νατρίου και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Συμπληρώνεται διάλυμα αιθανόλης:νερού μέχρι την χαραγή. Για την πλήρη διάλυση του μολυβδαινικού νατρίου η φιάλη τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων.

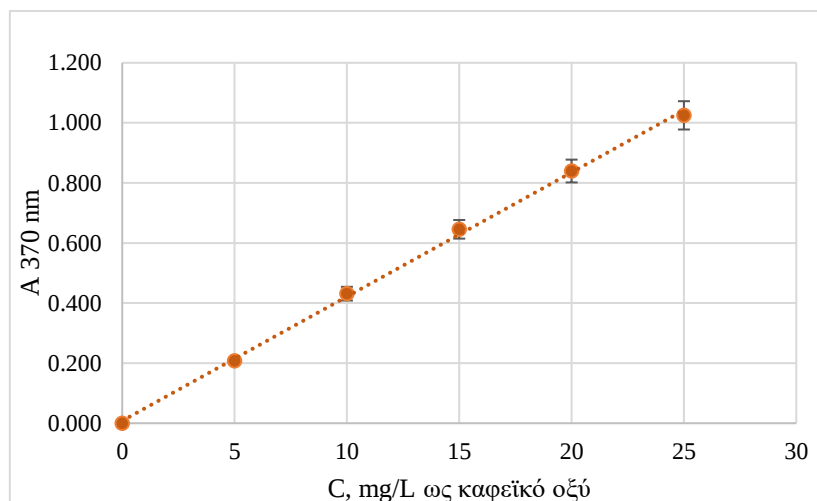
Πειραματική πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγονται με αυτόματη πιπέτα 2 mL εκχυλίσματος και 0,5 mL διαλύματος μολυβδαινικού νατρίου 5 % (5 % σε αιθανόλη:νερό 1:1 v/v). Το μείγμα αναδεύεται ελαφρώς σε vortex και ακολουθεί παραμονή για 15 min (στο σκοτάδι). Παράλληλα, παρασκευάζεται και τυφλό το οποίο περιέχει 2 mL μεθανόλης:νερό αντί για εκχύλισμα. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση στα 370 nm (μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό) (83,84).

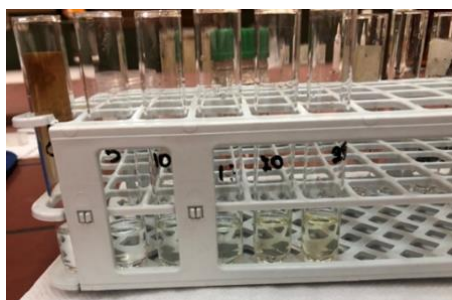
Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Πρότυπη καμπύλη:

Αρχικά παρασκευάζεται ένα πυκνό διάλυμα 100 mg/L διαλύοντας 5 mg καφεϊκού οξέος με διαλύτη μεθανόλη:νερό 60:40 v/v σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20, 25 mg/L σε τελικό όγκο 3 mL. Στην συνέχεια, εφαρμόζεται η μέθοδος των ορθο- διφαινολών. Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγονται με αυτόματη πιπέτα 2 mL από κάθε διάλυμα που παρασκευάστηκε και 0,5 mL διαλύματος μολυβδαινικού νατρίου 5 % (5 % σε αιθανόλη:νερό 1:1 v/v). Το μείγμα αναδεύεται ελαφρώς σε vortex και ακολουθεί παραμονή για 15 min (στο σκοτάδι). Παράλληλα, παρασκευάζεται και τυφλό το οποίο περιέχει 2 mL μεθανόλης:νερό αντί για δείγμα (σημείο 0 mg/L). Έπειτα, μετράται η απορρόφηση στα 370 nm (μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό). Συνεπώς, με βάση τις τιμές απορρόφησης και τη συγκέντρωση (mg καφεϊκού οξέος ανά 1 L δείγματος) κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος για την μέθοδο των ο-διφαινολών με εξίσωση ευθείας $C = (A - 0,0081) / 0,0413$, $R^2 = 0,9989$.



Εικόνα 15. Χρωματική εξέλιξη μετά την παραμονή 15 λεπτών.

2.4.10.5. Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP)

Αντιδραστήρια:

α) Παρασκευή διαλύματος HCl 0,05 M σε απιονισμένο νερό:

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL φέρεται ποσότητα απιονισμένου νερού και προστίθενται 0,42 mL πυκνού HCl 12 N. Γίνεται ανάδευση και η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

β) TPTZ 9 mM σε HCl 0,05 M:

Για 20 mL διαλύματος έχουμε:

$m = C \cdot V \cdot Mr = 0,009M \cdot 0,02L \cdot 312,3 \text{ g/mol} = 0,056 \text{ gr}$ άρα, 0,056 gr TPTZ φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με HCl 0,05 M.

Γ) FeCl₃ 20 mM σε HCl 0,05 M:

Για 20 mL διαλύματος έχουμε: $m=C \cdot V \cdot Mr = 0,02M \cdot 0,02L \cdot 162,2 \text{ g/mol} = 0,065 \text{ gr}$

άρα, 0,065 gr FeCl₃ φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή με HCl 0,05 M.

Δ) Παρασκευή Acetate buffer 0,3 M pH 3,6:

Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται 3,1 gr οξικού νατρίου, 16 mL οξικού οξέος και 900 mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί ανάδευση και ρύθμιση του pH στο 3,6. Μετά την ρύθμιση του pH το διάλυμα φέρεται σε ογκομετρικό φιάλη και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 L.

Πειραματική πορεία:

Αρχικά παρασκευάζεται το αντιδραστήριο Frap το οποίο περιέχει τα διαλύματα TPTZ, FeCl₃ και το buffer σε αναλογία 1:1:10 (πχ 2,5 mL TPTZ+ 2,5 mL FeCl₃+ 25 mL buffer).

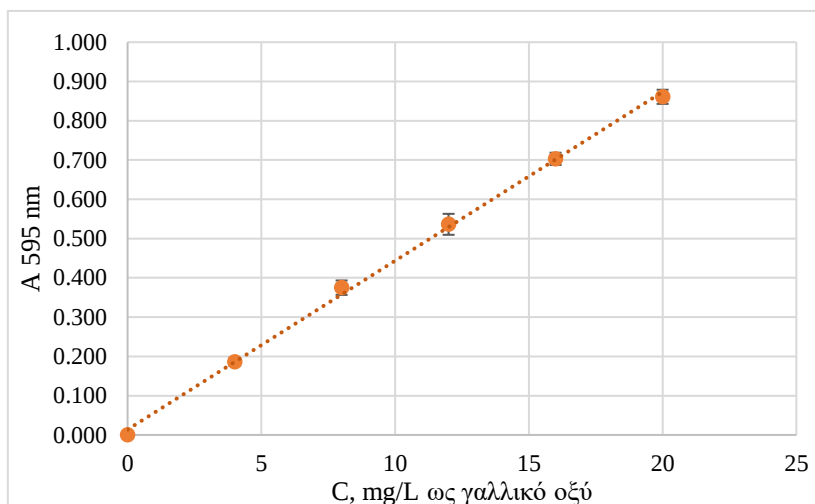
Σε erppendorf των 2 mL και με αυτόματη πιπέτα αναμιγνύονται 1400 μL αντιδραστηρίου Frap με 100 μL πολικού εκχυλίσματος. Παράλληλα παρασκευάζεται και το τυφλό στο οποίο αντί για εκχύλισμα προστίθεται μεθανόλη 60 %. Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση στο vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min στο σκοτάδι. Τέλος πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm. Μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό (74).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

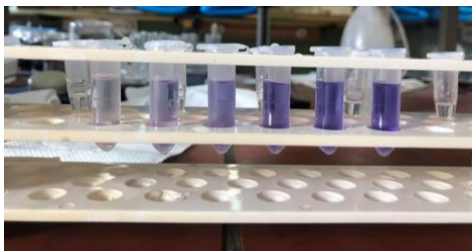
Πρότυπη καμπύλη:

Αρχικά παρασκευάζεται ένα πυκνό διάλυμα 100 mg/L διαλύοντας 5 mg γαλλικού οξέος με διαλύτη μεθανόλη:νερό 60:40 v/v σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 4, 8, 12, 16, 20 mg/L σε τελικό όγκο 0,5 mL. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος της Frap σε erppendorf των 2 mL. Αρχικά παρασκευάζεται το αντιδραστήριο Frap το οποίο περιέχει τα διαλύματα TPTZ, FeCl₃ και το buffer σε αναλογία 1:1:10 (π.χ. 2,5 mL TPTZ+ 2,5 mL FeCl₃+ 25 mL buffer). Με αυτόματη πιπέτα αναμιγνύονται 1400 μL αντιδραστηρίου Frap με 100 μL από κάθε διάλυμα που παρασκευάστηκε. Παράλληλα, παρασκευάζεται και το τυφλό στο οποίο αντί για δείγμα προστίθεται μεθανόλη 60 % (σημείο 0 mg/L). Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση στο vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min στο σκοτάδι. Τέλος, πραγματοποιείται

φωτομέτρηση στα 595 nm. Μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό. Συνεπώς, με βάση τις τιμές απορρόφησης και τη συγκέντρωση (mg γαλλικού οξέος ανά L δείγματος) κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 5. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για την μέθοδο FRAP με εξίσωση ευθείας $C = (A - 0,0137) / 0,043$, $R^2 = 0,9987$.



Εικόνα 16. Χρωματική εξέλιξη μετά την επώαση στους 37 °C. για 30 λεπτά.

2.4.10.6. Λήψη φάσματος στο UV

Σε eppendorf των 1,5 mL εισάγονται με αυτόματη πιπέτα 900 μ L μεθανόλης 60 % και 100 μ L εκχυλίσματος (αραίωση 1:10). Έπειτα, γίνεται παραλαβή του φάσματος UV (στα 200-400 nm) με φασματοφωτόμετρο (μηδενισμός του οργάνου με μεθανόλη 60 %).

2.5. Διαδικασία εμπλουτισμού ελαιολάδου με αιθέρια έλαια ρίγανης

Το αρχικό ελαιόλαδο ήταν συσκευασμένο σε μεταλλικό τενεκέ χωρητικότητας 5 λίτρων. Αυτό, μεταγγίστηκε σε διαφανείς γυάλινες φιάλες των 750 mL αφού πρώτα απομακρύνθηκε το οξυγόνο με αέριο άζωτο.

Σε σκουρόχρωμες γυάλινες φιάλες των 180 mL μεταφέρθηκαν 100 mL ελαιολάδου προκειμένου να παρασκευαστούν εμπλουτισμένα ελαιόλαδα με την επιθυμητή συγκέντρωση σε αιθέρια έλαια ρίγανης. Παρασκευάστηκαν 5 εμπλουτισμένα ελαιόλαδα με 5 αιθέρια έλαια ρίγανης διαφορετικών περιοχών της Ελλάδας σε συγκέντρωση 0,5 ‰. Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης πραγματοποιήθηκε με χρήση αυτόματων πιπετών. Πιο αναλυτικά, 50 µL αιθέριου ελαίου ρίγανης προστέθηκαν στα 100 mL ελαιολάδου με αυτόματη πιπέτα. Η προσθήκη έγινε απευθείας μέσα στο ελαιόλαδο. Η φιάλη πωματίζεται και ακολουθεί ομογενοποίηση με ήρεμη ανακίνηση της φιάλης για 1 min. Το περιεχόμενο της φιάλης μοιράστηκε σε μικρότερα σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια των 10 mL με βιδωτό πώμα και των 5 mL χωρίς πώμα. Στα φιαλίδια των 10 mL μεταφέρθηκε ποσότητα 5 mL ελαιολάδου ενώ, στα φιαλίδια των 5 mL μεταφέρθηκε ποσότητα 2 mL ελαιολάδου. Τα φιαλίδια των 10 mL τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ρυθμισμένο στους 50 °C και η πρόοδος της οξείδωσης ελέγχθηκε σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές (1, 2 και 4 εβδομάδες) με μέτρηση της απορρόφησης στο UV στα 234 και 270 nm. Ποσότητα των δειγμάτων φυλάχθηκε έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν αναλύσεις σε χρόνο $t=0$.

Τα φιαλίδια των 5 mL τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο στους 180 °C. Έπειτα, στους 180 °C ελέγχθηκε η πρόοδος της οξείδωσης σε 4 χρόνους, 0, 1, 2, και 3 ώρες. Η μελέτη της οξείδωσης στους 180 °C πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στο UV στα 234 και 270 nm.

Όλες οι παραπάνω πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν έλαβαν χώρα και σε δείγμα μάρτυρα.



Εικόνα 17. α) Προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ελαιόλαδο με αυτόματη πιπέτα β) Αποθήκευση δειγμάτων στους 50 °C γ) Θερμική επεξεργασία δειγμάτων στους 180 °C.

2.6. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα που αναφέρονται είναι οι μέσοι όροι μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics- V28. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων όρων εξετάστηκαν με τη μέθοδο ANOVA με τη βοήθεια του τεστ Duncan σε επίπεδο σημαντικότητας 95 % ($P < 0,05$). Όπου αναγράφονται και κεφαλαίοι και πεζοί δείκτες ισχύει ότι οι δείκτες a, b, c, d δείχνουν την οριζόντια σύγκριση και συγκεκριμένα, την στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ενώ, οι δείκτες A, B, C, D δείχνουν κάθετη σύγκριση και συγκεκριμένα, την στατιστική διαφορά του κάθε δείγματος με τον χρόνο. Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά.

2.7. Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων ελαιολάδου

Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο όπως και τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου, αποτιμήθηκαν οργανοληπτικά ως προς το άρωμα-οσμή τους από δυο δοκιμαστές. Ποσότητα 5 mL από τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μικρά πλαστικά άσπρα ποτηράκια των 80 mL και αφού ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου μοιράστηκαν στους δοκιμαστικές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων ρίγανης

3.1.1. Αντιοξειδωτική δράση- Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin)

Με την μέθοδο της Folin προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων ρίγανης με την οποία πολλές φορές προσδίδονται τα ολικά φαινολικά.

Πίνακας 2. Αντιοξειδωτική δράση- Ολικά φαινολικά (Folin) των αιθέριων ελαίων ρίγανης.

	C (mg/L) στο έλαιο
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Πρέβεζα	$(20,9 \cdot 10^4)^a \pm 2,6 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Ιωάννινα	$(20,2 \cdot 10^4)^a \pm 1,0 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Κρήτης	$(27 \cdot 10^4)^c \pm 8 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Μακεδονίας	$(24 \cdot 10^4)^b \pm 4 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Πελοποννήσου	$(23,4 \cdot 10^4)^b \pm 2,3 \cdot 10^3$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/ L αιθέριου ελαίου μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Με βάση την περιοχή προέλευσης τα δείγματα των αιθέριων ελαίων ρίγανης παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές και ως προς την ποσότητα των ολικών φαινολικών που οφείλεται κυρίως στην καρβακρόλη, στην θυμόλη, στο ροσμαρινικό οξύ και στα παράγωγά του. Η ποσότητα των ολικών φαινολικών είναι υψηλότερη στο αιθέριο έλαιο της Κρήτης το οποίο παρουσιάζει σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια. Ακολουθούν τα αιθέρια έλαια από την Μακεδονία και την Πελοπόννησο τα οποία, ταυτόχρονα, δεν παρουσιάζουν και στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Έπειτα, την μικρότερη ποσότητα ολικών φαινολικών διαπιστώνεται πως περιέχουν τα δυο αιθέρια έλαια της Ηπείρου. Μια υψηλή συγκέντρωση ολικών φαινολικών αιθέριου ελαίου ρίγανης βρέθηκε και από τους Teixeira et al. 2013 (85). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι οι Dambolena et al. 2010 (86) δήλωσαν ότι η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων ρίγανης μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη και άλλων ενώσεων πέρα από των φαινολών.

3.1.2. Αναγωγική ισχύς (μέθοδος FRAP)

Με την μέθοδο της FRAP προσδιορίστηκε η αναγωγική ισχύς των φαινολών των αιθέριων ελαίων ρίγανης που αποδίδεται στην ικανότητά τους να μειώνουν το ηλεκτρικό φορτίο του σιδήρου.

Πίνακας 3. Αναγωγική ισχύς (FRAP) των αιθέριων ελαίων ρίγανης.

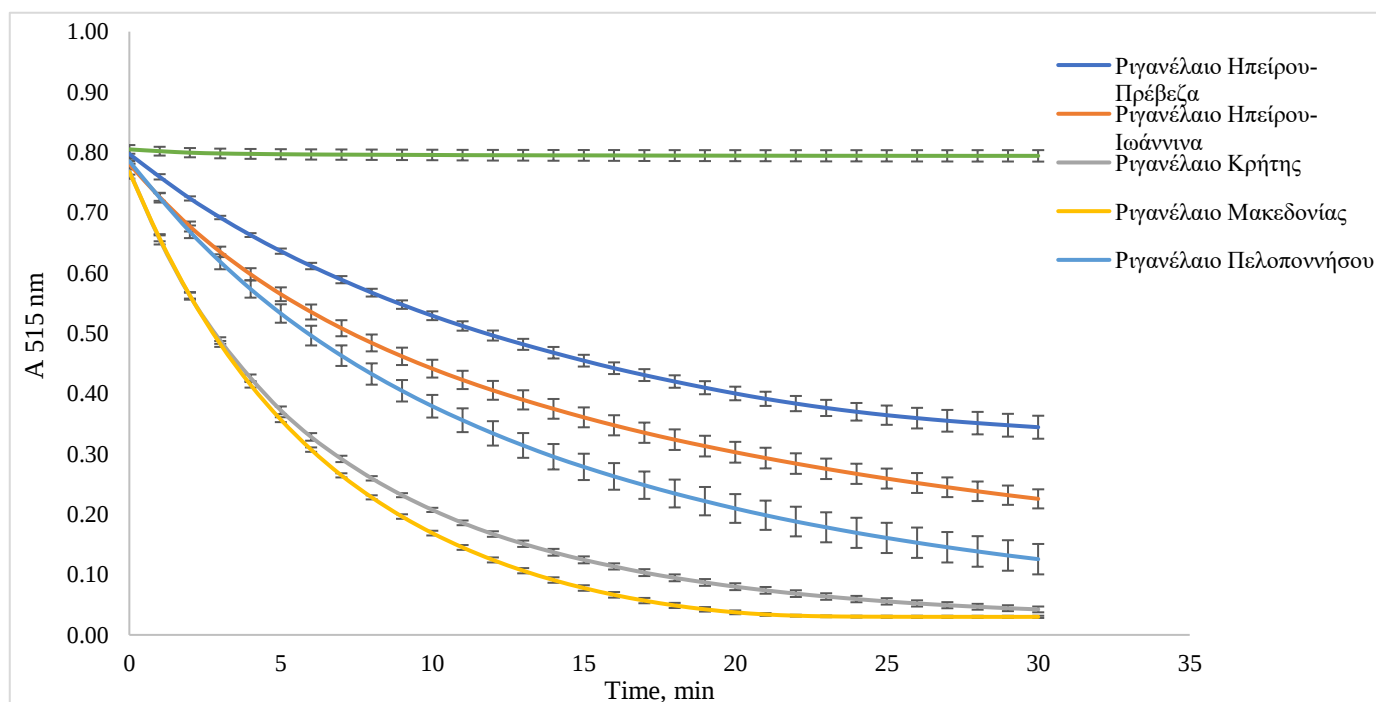
	C (mg/L) στο έλαιο
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Πρέβεζα	$(6,9 \cdot 10^4)^a \pm 0,8 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Ιωάννινα	$(7,4 \cdot 10^4)^a \pm 0,7 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Κρήτης	$(10 \cdot 10^4)^d \pm 6 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Μακεδονίας	$(9,1 \cdot 10^4)^c \pm 0,4 \cdot 10^3$
Ριγανέλαιο Πελοποννήσου	$(8,3 \cdot 10^4)^b \pm 0,8 \cdot 10^3$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/ L αιθέριου ελαίου μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Με βάση την περιοχή προέλευσης τα δείγματα των αιθέριων ελαίων ρίγανης παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων ρίγανης οφείλεται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις (καρβακρόλη, θυμόλη, ροσμαρινικό οξύ) και άρα η αναγωγική ισχύς αντανακλά σε αυτή την κατηγορία ενώσεων. Τα δυο αιθέρια έλαια της Ηπείρου δεν έχουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους ενώ, το αιθέριο έλαιο με την μεγαλύτερη ποσότητα φαινολών και άρα μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ είναι αυτό από την περιοχή της Κρήτης. Αμέσως επόμενο είναι της Μακεδονίας και έπειτα της Πελοποννήσου. Οι Teixeira et al. 2013 (85), επίσης, έδειξαν την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης μετά από ανάλυσή του με την μέθοδο FRAP. Οι Viuda-Martos et al. 2010 (11) μελέτησαν την αναγωγική ισχύ 5 διαφορετικών αιθέριων ελαίων και ανέφεραν ότι, μετά το αιθέριο έλαιο γαρυφάλλου, το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασε την υψηλότερη αναγωγική ικανότητα.

3.1.3. Δέσμευση της ρίζας DPPH

Με την μέθοδο της δέσμευσης της ρίζας DPPH ελέγχθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των του ολικού εκχυλίσματος των αιθέριων ελαίων ρίγανης.



Διάγραμμα 1. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από το ολικό εκχύλισμα αιθέριων ελαίων ρίγανης (αραίωση 1/100). Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).

Από το διάγραμμα της κινητικής φαίνεται ότι τα δυο πιο δραστικά αιθέρια έλαια ρίγανης προέρχονται από τις περιοχές της Κρήτης και της Μακεδονίας ενώ, το λιγότερο δραστικό από την περιοχή της Ηλείου και συγκεκριμένα από την περιοχή της Πρέβεζας.

Πίνακας 4. Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH σε χρόνο $t=2$ min και $t=30$ min από τα αιθέρια έλαια ρίγανης.

	Αρχική ταχύτητα δέσμευσης, $t=2$ min (ως % δέσμευση)
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Πρέβεζα	10,1 ^a $\pm 0,5$
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Ιωάννινα	15,7 ^b $\pm 1,5$
Ριγανέλαιο Κρήτης	30,8 ^c $\pm 1,5$
Ριγανέλαιο Μακεδονίας	29,7 ^c $\pm 0,5$
Ριγανέλαιο Πελοποννήσου	16,8 ^b $\pm 1,4$
	Ολική δέσμευση, $t=30$ min (ως % δέσμευση)
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Πρέβεζα	50,5 ^a $\pm 12,5$
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Ιωάννινα	65,6 ^{ab} $\pm 9,0$
Ριγανέλαιο Κρήτης	88,9 ^c $\pm 10,6$
Ριγανέλαιο Μακεδονίας	89,7 ^c $\pm 11,3$
Ριγανέλαιο Πελοποννήσου	78,0 ^{bc} $\pm 8,6$

Τα αιθέρια έλαια ρίγανης χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα 1/100 σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι μαζί με την τυπική απόκλιση ($n=3$). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά ($P<0,05$).

Υπολογίστηκαν οι % δεσμεύσεις αραιωμένων αιθέριων ελαίων ρίγανης 1/100 σε δυο χρόνους. Έναν αρχικό χρόνο (2 min) και ένα μεταγενέστερο χρόνο (30 min). Από τις τιμές των % δεσμεύσεων στα 2 min συμπεραίνεται ότι πιο δραστικά έναντι της ρίζας DPPH είναι τα αιθέρια έλαια της Κρήτης και της Μακεδονίας τα οποία και δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά όμως, έχουν στατιστική διαφορά με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια. Το αιθέριο έλαιο της Πρέβεζας (Ηπειρος) είναι το λιγότερο δραστικό έναντι της ρίζας, σε αρχικό χρόνο, σε σχέση με τα άλλα αιθέρια έλαια ενώ, ενδιάμεση αντιοξειδωτική δράση ως προς την ρίζα DPPH έχουν τα αιθέρια έλαια της Πελοποννήσου και των Ιωαννίνων (Ηπειρος). Όσον αφορά την δέσμευση της ρίζας στα 30 min, πάλι τα αιθέρια έλαια της Κρήτης και της Μακεδονίας εμφανίζουν την μεγαλύτερη δέσμευση χωρίς να έχουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους αλλά και με αυτό της Πελοποννήσου. Λιγότερο δραστικό έναντι της ρίζας DPPH είναι πάλι το αιθέριο έλαιο της Πρέβεζας (Ηπειρος) ενώ, ελαφρώς δραστικότερο είναι το αιθέριο έλαιο των Ιωαννίνων (Ηπειρος) το οποίο όμως, δεν παρουσιάζει σημαντικές στατιστικές διαφορές με τα αιθέρια έλαια της Πελοποννήσου και της Πρέβεζας (Ηπειρος).

3.1.4. Ρίζα DPPH- Δείκτης IC₅₀ των αιθέριων ελαίων ρίγανης

Ο υπολογισμός της τιμής του δείκτη IC₅₀ των αιθέριων ελαίων ρίγανης παρουσιάζεται παρακάτω. Τα αιθέρια έλαια ρίγανης χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα 1/100, 1/200, 1/500 σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα.

Πίνακας 5. Τιμές IC₅₀ αρχικής ταχύτητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH σε χρόνο t= 2 min από τα αιθέρια έλαια ρίγανης.

	IC ₅₀
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Πρέβεζα	4,66 ^d ±0,09
Ριγανέλαιο Ηπείρου- Ιωάννινα	3,35 ^c ±0,26
Ριγανέλαιο Κρήτης	1,70 ^a ±0,10
Ριγανέλαιο Μακεδονίας	1,68 ^a ±0,07
Ριγανέλαιο Πελοποννήσου	2,93 ^b ±0,24

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως % v/v (επί 100) των αιθέριων ελαίων ρίγανης και εκφράζονται ως μέσοι όροι μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Ο δείκτης IC₅₀ για κάθε αιθέριο έλαιο ρίγανης υπολογίστηκε σε αρχικό χρόνο αντίδρασης (2 min). Όπως είναι γνωστό, όσο χαμηλότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης. Τα αιθέρια έλαια της Κρήτης και της Μακεδονίας δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά αλλά ταυτόχρονα έχουν, και τις χαμηλότερες τιμές IC₅₀ σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια ρίγανης. Συνεπώς, με βάση τις τιμές αυτές τα αιθέρια έλαια ρίγανης της Κρήτης και της Μακεδονίας είναι αυτά που φαίνεται να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τους Asensio et al. 2013 (54) η χημική σύσταση κάθε αιθέριου ελαίου ρίγανης θα μπορούσε να σχετίζεται με αυτήν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Ακόμα, το Ριγανέλαιο Ηπείρου- Πρέβεζα παρουσίασε την υψηλότερη τιμή IC₅₀ και επομένως, φαίνεται να είναι το λιγότερο δραστικό σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια ρίγανης. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις υπολογισθείσες τιμές IC₅₀ έρχονται σε αντιστοιχία με τις % δεσμεύσεις της ρίζας DPPH που υπολογίστηκαν σε χρόνο 2 min για όλα τα αιθέρια έλαια. Ακόμα, οι Proestos et al. 2013 (87) έδειξαν ότι τα αιθέρια έλαια του είδους *Origanum vulgare* είχαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με άλλα αιθέρια έλαια διαφορετικών φυτών.

3.2. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξείδωση και στην ποιότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου

3.2.1. Χαρακτηριστικά ποιότητας έξτρα παρθένου ελαιολάδου

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των χαρακτηριστικών ποιότητας του ελαιολάδου μελέτης τα οποία είχαν στόχο την κατηγοριοποίηση, τον προσδιορισμό της σύστασης και τον έλεγχο νοθείας του.

3.2.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά ποιότητας ελαιολάδου μελέτης

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά ελαιολάδου μελέτης που αφορούν την σύσταση αλλά και την νοθεία.

Πυκνότητα, gr/mL	0,9120±0,0003
Χρωστικές, χλωροφύλλες, mg/ kg	14,1±0,04
Χρωστικές, καροτενοειδή, mg/ kg	9,311±0,001
Αριθμός Ιωδίου, % I ₂	76,6±4,8
Αριθμός Σαπωνοποίησης, mg KOH/ g ελαιολάδου	196±14
Πικρότητα, K ₂₂₅	0,363±0,017
Πικρότητα, IB (δείκτης πικρότητας)	4,00±0,23

Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).

Οι αριθμοί ιωδίου και σαπωνοποίησης βρίσκονται εντός των ορίων (94) που αφορούν το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (75-94 % I₂ και 184-196 mg KOH/g ελαιολάδου, αντίστοιχα) με τον δεύτερο να εμπίπτει στο ανώτατο όριο. Όσον αφορά τις χρωστικές ουσίες, η συγκέντρωση των χλωροφυλλών είναι μεγαλύτερη από την συγκέντρωση των καροτενοειδών οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από περισσότερο πράσινο χρώμα παρά κίτρινο. Αναφορικά στην πικρότητα του ελαιολάδου, οι Gutierrez- Rosales et al. 1992 (88) συμπέραναν ότι για τιμές $K_{225} \leq 0,140$ το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από $IB \leq 1$ δηλαδή, σε μη πικρά ή σχεδόν αμυδρώς πικρά λάδια ενώ, για τιμές $K_{225} \geq 0,360$ το ελαιόλαδο είναι αρκετά πικρό και υψηλών ή εξαιρετικά υψηλών εντάσεων. Επομένως, σύμφωνα με τις τιμές K_{225} και IB που προσδιορίστηκαν το ελαιόλαδο μελέτης μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα αρκετά πικρό έλαιο.

3.2.1.2. Κατηγοριοποίηση ελαιολάδου μελέτης

Πίνακας 7. Ποιοτικά χαρακτηριστικά για την κατάταξη του ελαιολάδου μελέτης στην κατηγορία «εξαιρετικά παρθένο».

Οξύτητα, % w/w ως ελαϊκό οξύ	0,45±0
Αριθμός Υπεροξειδίων, meqO₂/ Kg ελαιολάδου	7,3±0,6
K₂₃₂	1,16±0,065
K₂₆₈	0,14±0,002
ΔK	-0,01±0,003

Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).

Επομένως, σύμφωνα με τον πίνακα κατάταξης του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου το ελαιόλαδο κατατάσσεται στην κατηγορία «εξαιρετικά παρθένο». Ο παραπάνω ισχυρισμός προκύπτει από το γεγονός, ότι η οξύτητα είναι μικρότερη από 0,8, ο αριθμός υπεροξειδίων μικρότερος από 20 και οι δείκτες K₂₃₂, K₂₆₈ και ΔK είναι κάτω από 2,50, 0,22 και 0,01, αντίστοιχα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση στην λάμπα UV αλλά και από τον οργανοληπτικό έλεγχο όπου δεν παρατηρήθηκε κανένα μειονέκτημα στον μάρτυρα από τους δοκιμαστές.

Με την παρατήρηση στην λάμπα UV μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ παρθένου ή ραφινέ ελαιολάδου ή αναμιγμένου με πυρηνέλαια ή σπορέλαια. Παρατηρήθηκε ακάθαρτος κίτρινος δακτύλιος ο οποίος γινόταν πορτοκαλόχρωμος σε όλη τη μάζα του γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι το ελαιόλαδο είναι εξαιρετικά παρθένο.



Εικόνα 18. Παρατήρηση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου στην λάμπα UV.

3.2.2. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξύτητα και αντιοξειδωτική δράση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν

Μετά τον εμπλουτισμό του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με τα αιθέρια έλαια ρίγανης μελετήθηκε η επίδραση τους σε χαρακτηριστικά ποιότητας αυτού (οξύτητα, αντιοξειδωτική δράση).

3.2.2.1. Οξύτητα

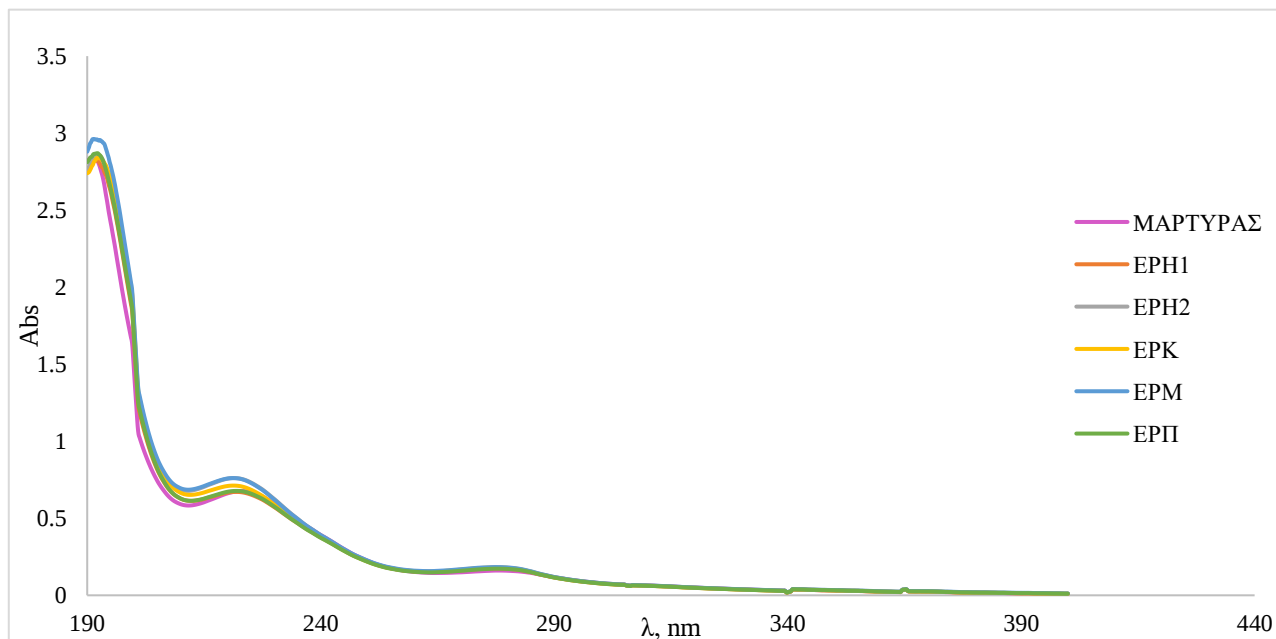
Πίνακας 8. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξύτητα του ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν (αποτελέσματα εκφρασμένα ως % ελαϊκό οξύ).

	% w/w ως ελαϊκό οξύ
Ε_Μ	0,45±0
ΕΡ_{H1}	0,45±0
ΕΡ_{H2}	0,45±0
ΕΡ_Κ	0,45±0
ΕΡ_Μ	0,45±0
ΕΡ_Π	0,45±0

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα ως % ελαϊκό οξύ μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3).

Μετά την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην οξύτητα του αρχικού ελαιολάδου. Οι Barreca et al. 2021 (55) μελέτησαν την επίδραση αιθέριων ελαίων, συμπεριλαμβανομένου και της ρίγανης, στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο κάτω από φωτο-οξειδωτικές συνθήκες. Έδειξαν ότι μετά από 32 ώρες ακτινοβολήσης των εμπλουτισμένων δειγμάτων το ποσοστό του ελαϊκού οξέος δεν μεταβλήθηκε. Δήλωσαν ότι αυτό το αποτέλεσμα αναδεικνύει την παρουσία αντιοξειδωτικής δράσης των αιθέριων ελαίων στο ελαιόλαδο η οποία είναι απόρροια μιας συνεργιστικής επίδρασης όλων των συστατικών των αιθέριων ελαίων και όχι μόνο των φαινολικών ενώσεων.

3.2.2.2. Αντιοξειδωτικά- Αντιοξειδωτική δράση στο πολικό εκχύλισμα έξτρα παρθένου ελαιολάδου και των εμπλουτισμένων δειγμάτων με τα αιθέρια έλαια ρίγανης



Σχήμα 6. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στο φάσμα UV του πολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).

Μεταξύ των φασμάτων του μάρτυρα και των εμπλουτισμένων δειγμάτων δεν παρατηρείται σημαντική οπτική διαφορά. Ωστόσο, στην περιοχή κάτω των 240 nm το φάσμα του μάρτυρα (ροζ γραμμή) εμφανίζεται ελαφρώς χαμηλότερα σε σχέση με τα φάσματα των εμπλουτισμένων δειγμάτων υποδηλώνοντας αύξηση της απορρόφησης στο UV μετά την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης.

Πίνακας 9. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στις ο-διφαινόλες του ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν.

	mg καφεϊκού οξέος/ kg ελαιολάδου
Ε_Μ	23,8 ^a ±1,8
ΕΡ_{H1}	21,2 ^a ±2,1
ΕΡ_{H2}	21,5 ^a ±2,5
ΕΡ_Κ	21,4 ^a ±2,5
ΕΡ_Μ	23,0 ^a ±3,4
ΕΡ_Π	20,6 ^a ±2,7

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/ kg ελαιολάδου μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Σε χρόνο μηδέν μελετήθηκε και η επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στις ο-διφαινόλες του ελαιολάδου. Με βάση τις τιμές των συγκεντρώσεων, η προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης δεν φαίνεται να προκάλεσε μεταβολή στις ο-διφαινόλες του έξτρα παρθένου ελαιολάδου. Όπως, έγινε αντιληπτό, η ύπαρξη του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του στο ελαιολάδο από τα αιθέρια έλαια ρίγανης δεν επέφερε αλλαγές στην συγκέντρωση των ο-διφαινολών του ελαιολάδου (ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη). Οι Soufi et al. 2018 (89) προσδιόρισαν τις ο-διφαινόλες 3 διαφορετικών ποικιλιών ελαιολάδου και οι τιμές των συγκεντρώσεων κυμαίνονταν από 13,02 μέχρι 31,1 mg καφεϊκού οξέος /kg ελαίου. Μεταξύ αυτών των τιμών βρέθηκε και η περιεκτικότητα σε ο-διφαινόλες του μάρτυρα και των εμπλουτισμένων δειγμάτων. Ομοίως, και οι Bouarroudj et al. 2016 (90) σε μελέτη προσδιόρισαν την συγκέντρωση των ο-διφαινολών έξτρα παρθένου ελαιολάδου σε τιμή της τάξης των 25 mg καφεϊκού οξέος /kg ελαίου.

Πίνακας 10. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στη αντιοξειδωτικά δράση- ολικά φαινολικά του ελαιολάδου, με την μέθοδο Folin, την χρονική στιγμή μηδέν.

	mg γαλλικού οξέος/ kg ελαιολάδου
Ε_Μ	265,6 ^a ±19,6
ΕΡ_{Η1}	294,0 ^{ab} ±18,2
ΕΡ_{Η2}	298,2 ^{ab} ±14,1
ΕΡ_Κ	310,6 ^b ±18,0
ΕΡ_Μ	303,8 ^b ±19,9
ΕΡ_Π	293,6 ^{ab} ±18,6

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/ kg ελαιολάδου μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης παρατηρείται αύξηση των ολικών φαινολικών ήδη από την χρονική στιγμή μηδέν. Όμως, δεν παρουσιάζουν όλα τα δείγματα σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο είναι ένα έλαιο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά (φαινόλες, φαινολικά οξέα, σεκοϊριδοειδή και λιγνάνες) ωστόσο, με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης σε αυτό γίνεται συμπροσδιορισμός των φαινολικών του ελαιολάδου και των προσθέτων του (καρβακρόλη, θυμόλη, ροσμαρινικό οξύ και παράγωγά του). Τα εμπλουτισμένα δείγματα με αιθέρια έλαια από την Κρήτη (**ΕΡ_Κ**) και την Μακεδονία (**ΕΡ_Μ**) είναι αυτά που εμφανίζουν σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Με βάση την περιοχή προέλευσης των αιθέριων ελαίων ρίγανης πάλι παρατηρείται ότι τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου με αιθέρια έλαια ρίγανης από τις περιοχές της Κρήτης και της Μακεδονίας υπερτερούν σε ολικά φαινολικά γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την προσδιοριζόμενη συγκέντρωσή τους στα αντίστοιχα αιθέρια έλαια.

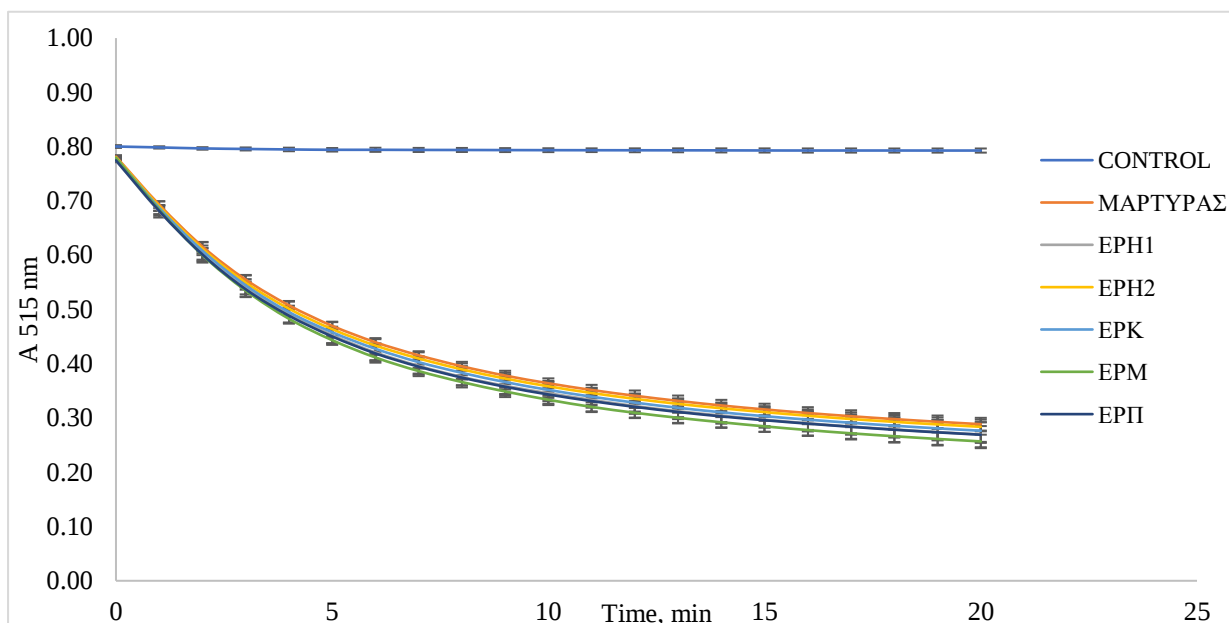
Το όριο σε πολυφαινόλες είναι μεγαλύτερο από 250 mg/kg ελαιολάδου σύμφωνα με τον εγκεκριμένο ισχυρισμό υγείας της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.). Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στον μάρτυρα υπολογίστηκε στα 265,6 mg γαλλικού οξέος /kg ελαιολάδου τιμή, υψηλότερη από 250 mg γαλλικού οξέος /kg. Το ίδιο ισχύει και για όλα τα εμπλουτισμένα δείγματα. Επομένως, ο μάρτυρας αλλά και τα εμπλουτισμένα δείγματα συμμορφώνονται με τον ισχυρισμό υγείας της Ε.Ε. και άρα, φαίνεται πως πιθανόν να ενισχύθηκε η ευεργετική δράση του ελαιολάδου με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης.

Πίνακας 11. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην αναγωγική ισχύ του ελαιολάδου, με την μέθοδο FRAP, την χρονική στιγμή μηδέν.

	mg γαλλικού οξέος/ kg ελαιολάδου
Ε_Μ	61,0 ^a ±3,3
ΕΡ_{Η1}	69,4 ^b ±3,0
ΕΡ_{Η2}	72,0 ^{bc} ±2,2
ΕΡ_Κ	76,0 ^c ±3,0
ΕΡ_Μ	74,6 ^{bc} ±2,8
ΕΡ_Π	72,0 ^{bc} ±3,0

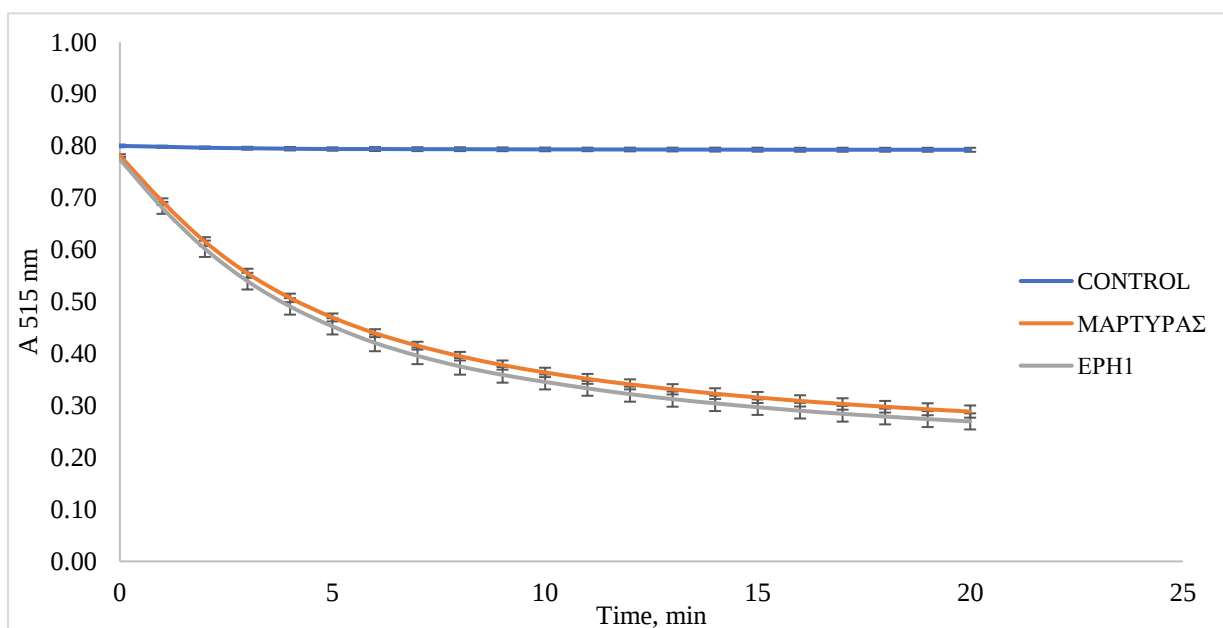
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/ kg ελαιολάδου μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Σε χρόνο μηδέν μελετήθηκε η αναγωγική ισχύς των αντιοξειδωτικών των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα που περιέχουν αιθέριο έλαιο ρίγανης εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών με ικανότητα αναγωγικής ισχύος. Αυτό γιατί, οι τιμές αυτές παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με του μάρτυρα με το εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο από την Κρήτη (**ΕΡ_Κ**), να διαθέτει την μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ. Με βάση την περιοχή προέλευσης των αιθέριων ελαίων ρίγανης παρατηρείται ότι τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου με αιθέρια έλαια ρίγανης από τις περιοχές της Κρήτης και της Μακεδονίας (**ΕΡ_Μ**) διαθέτουν την μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ όπως αυτό έγινε αντιληπτό και κατά την ανάλυση των αιθέριων ελαίων ρίγανης. Ακολουθούν τα εμπλουτισμένα δείγματα με αιθέρια έλαια ρίγανης από την Πελοπόννησο (**ΕΡ_Π**) και την Ήπειρο (**ΕΡ_{Η1}** και **ΕΡ_{Η2}**). Στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο πέρα από τα φαινολικά συστατικά υπάρχουν και άλλες ενώσεις υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση του (τοκοφερόλες, σκουαλένιο, β-καροτένιο, λουτεΐνη). Με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης η αναγωγική ισχύς του ελαιολάδου αυξήθηκε λόγω της ύπαρξης των αντιοξειδωτικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων (π.χ. καρβακρόλη, θυμόλη, κ.α.).

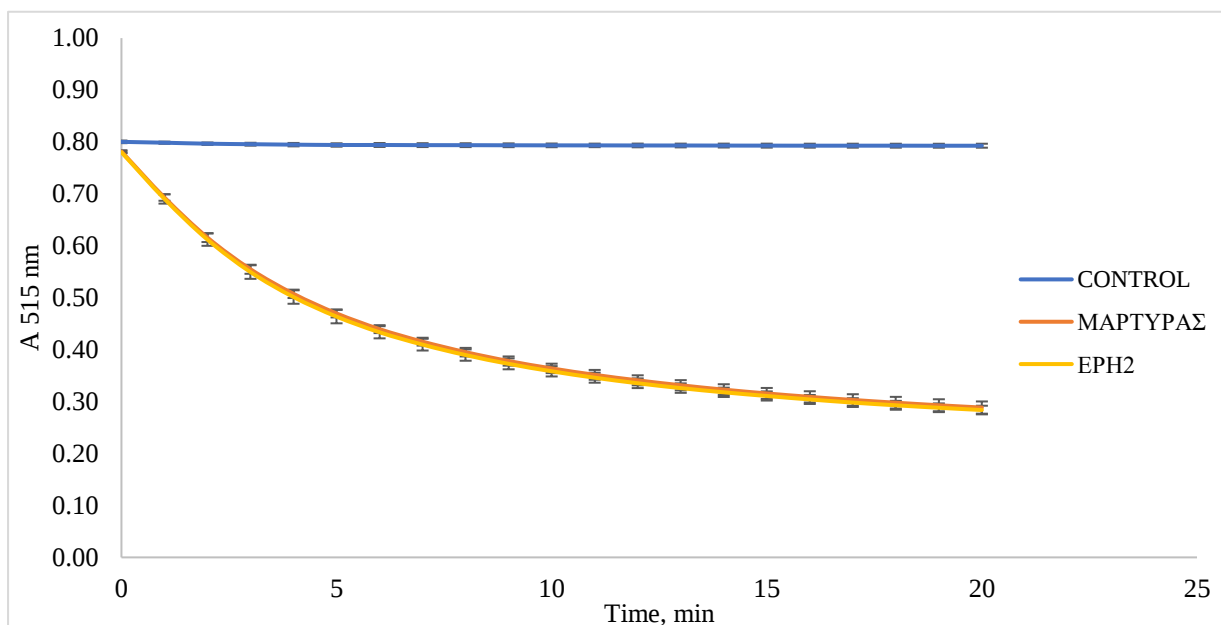


Διάγραμμα 2. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από ολικό εκχύλισμα ελαιολάδου και ολικά εκχυλίσματα εμπλουτισμένων ελαιολάδων με αιθέρια έλαια ρίγανης (αραίωση 1/10) την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).

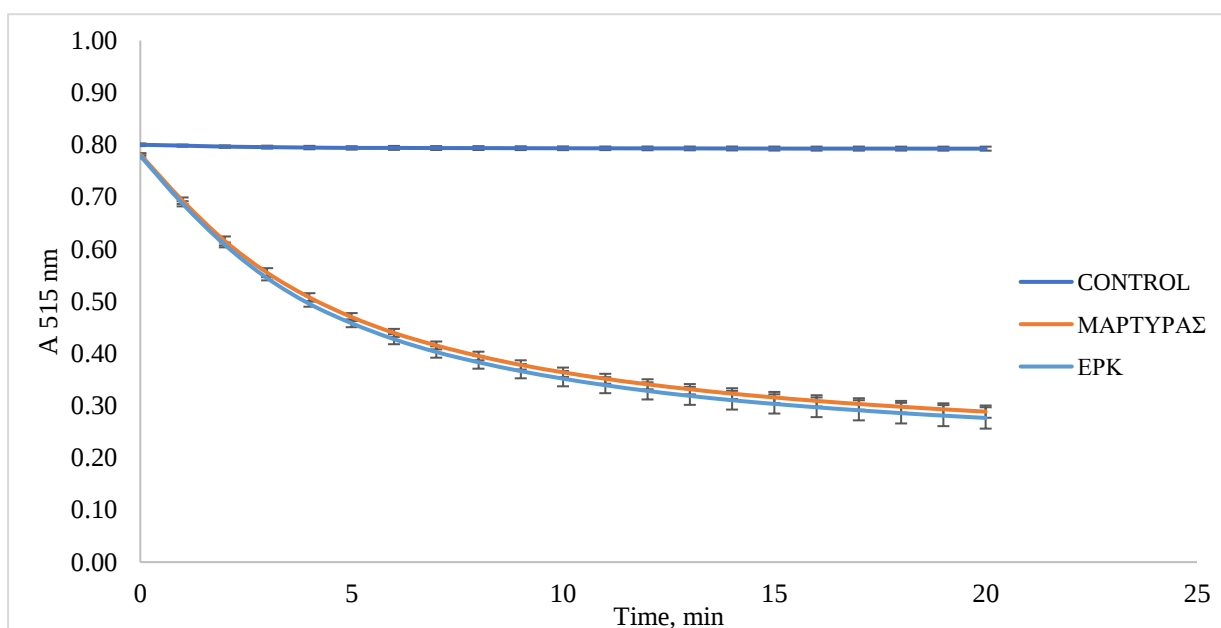
Από το διάγραμμα της κινητικής φαίνεται ότι πιο δραστικό έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH είναι το εμπλουτισμένο δείγμα ελαιολάδου με αιθέριο έλαιο από την περιοχή της Μακεδονίας (EPM).



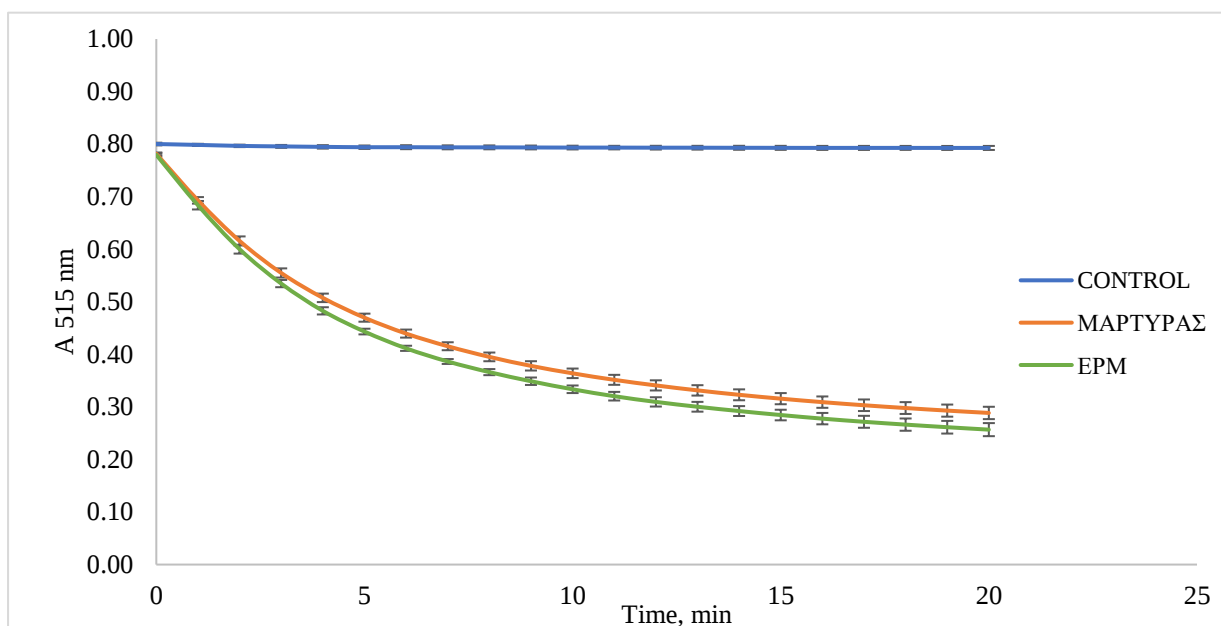
Διάγραμμα 3. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από ελαιολάδο και εμπλουτισμένο ελαιολάδο με αιθέριο έλαιο ρίγανης από την περιοχή της Πρέβεζας (EPH1) την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).



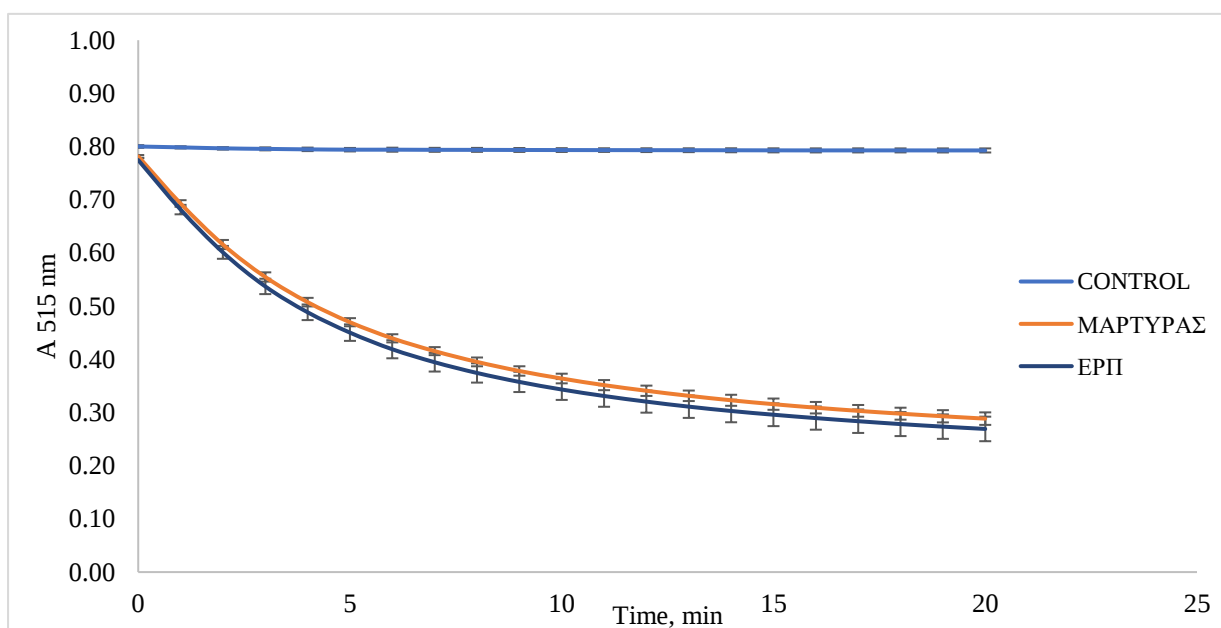
Διάγραμμα 4. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από ελαιόλαδο και εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο ρίγανης από τα Ιωάννινα (EP_{H2}) την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).



Διάγραμμα 5. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από ελαιόλαδο και εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο ρίγανης από την Κρήτη (EP_K) την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).



Διάγραμμα 6. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από ελαιόλαδο και εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο ρίγανης από την Μακεδονία (EP_M) την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).



Διάγραμμα 7. Κινητική της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από ελαιόλαδο και εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο ρίγανης από την Πελοπόννησο (EP_Π) την χρονική στιγμή μηδέν. Οι τιμές που παρατίθενται είναι οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (n=3).

Πίνακας 12. Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH σε χρόνο t=2 min και σε χρόνο t=20 min από τα εμπλουτισμένα με αιθέρια έλαια ρίγανης δείγματα την χρονική στιγμή μηδέν.

	Αρχική ταχύτητα δέσμευσης, t=2 min (ως % δέσμευση)
E_M	23,0 ^a ±1,3
EP_{H1}	24,8 ^a ±1,9
EP_{H2}	23,5 ^a ±1,6
EP_K	24,0 ^a ±0,8
EP_M	25,0 ^a ±1,2
EP_Π	24,9 ^a ±1,3
	Ολική δέσμευση, t=20 min (ως % δέσμευση)
E_M	63,9 ^a ±1,5
EP_{H1}	66,3 ^{ab} ±1,8
EP_{H2}	64,5 ^{ab} ±1,1
EP_K	65,5 ^{ab} ±2,6
EP_M	67,9 ^b ±1,6
EP_Π	66,4 ^{ab} ±2,8

Τα εμπλουτισμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα 1/10 σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Μετά την προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Υπολογίστηκαν οι % δεσμεύσεις της ρίζας από τα δείγματα σε αρχικό χρόνο (2 min) και σε μεταγενέστερο χρόνο (20 min). Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα μέχρι τα 20 min η αντίδραση δεν έχει πιάσει πλατό.

Σε αρχικό χρόνο της αντίδρασης δεν παρουσιάζεται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ της δέσμευσης της ρίζας από τον μάρτυρα και των δεσμεύσεων της ρίζας από τα δείγματα που περιέχουν τα αιθέρια έλαια ρίγανης. Παρόλο που οι αρχικές ταχύτητες δέσμευσης των εμπλουτισμένων δειγμάτων είναι ελαφρώς αυξημένες σε σχέση με αυτή του μάρτυρα δεν μπορούν να θεωρηθούν στατιστικά σημαντικές και άρα δεν παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα ως προς την ελεύθερη ρίζα DPPH.

Σε μεταγενέστερο χρόνο οι ολικές δεσμεύσεις της ρίζας των δειγμάτων με τα πρόσθετα είναι μεγαλύτερες από του μάρτυρα όμως, σημαντική στατιστική διαφορά παρουσιάζει μόνο το ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο από την Μακεδονία (EP_M) ενώ, στα άλλα δείγματα δεν παρατηρείται τέτοια διαφορά. Επομένως, μόνο στο δείγμα με αιθέριο έλαιο ρίγανης από την περιοχή της Μακεδονίας (EP_M) φαίνεται να έχει ενισχυθεί ως ένα βαθμό η αντιοξειδωτική

δράση έναντι της ρίζας DPPH. Παρόλα αυτά, οι τιμές των % δεσμεύσεων της ρίζας μεταξύ των εμπλουτισμένων δειγμάτων ελαιολάδου δεν παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις γεγονός που πιθανόν να υποδηλώνει ότι η κάθε περιοχή προέλευσης των αιθέριων ελαίων ρίγανης προσέδωσε παρόμοια αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας DPPH.

3.2.3. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξειδωτική σταθερότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου

Με αποθήκευση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου όπως και των εμπλουτισμένων δειγμάτων ελαιολάδου στους 50 και 180 °C αποτιμήθηκε η επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στην οξειδωτική σταθερότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

Πίνακας 13. Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στους δείκτες οξείδωσης (UV 234, 270 nm) του έξτρα παρθένου ελαιολάδου κατά την αποθήκευσή του στους 50 °C.

234 nm						
	E _M	EP _{H1}	EP _{H2}	EP _K	EP _M	EP _Π
0 ημέρες	0,084 ^{aA} ±0,005	0,084 ^{aA} ±0,007	0,081 ^{aA} ±0,008	0,085 ^{aA} ±0,004	0,088 ^{aA} ±0,004	0,087 ^{aA} ±0,008
7 ημέρες	0,145 ^{bB} ±0,003	0,138 ^{abB} ±0,006	0,132 ^{aB} ±0,005	0,128 ^{aB} ±0,002	0,133 ^{aB} ±0,008	0,130 ^{aB} ±0,010
14 ημέρες	0,200 ^{bcC} ±0,008	0,187 ^{abC} ±0,005	0,203 ^{cC} ±0,010	0,174 ^{aC} ±0,007	0,175 ^{aC} ±0,004	0,176 ^{aC} ±0,013
28 ημέρες	0,301 ^{dD} ±0,011	0,268 ^{cD} ±0,004	0,268 ^{cD} ±0,025	0,250 ^{bcD} ±0,004	0,225 ^{aD} ±0,017	0,235 ^{abD} ±0,007
270 nm						
	E _M	EP _{H1}	EP _{H2}	EP _K	EP _M	EP _Π
0 ημέρες	0,007 ^{aA} ±0,001	0,011 ^{bA} ±0,001	0,009 ^{abA} ±0,002	0,011 ^{bA} ±0	0,010 ^{bA} ±0,001	0,011 ^{bA} ±0,002
7 ημέρες	0,013 ^{aB} ±0,001	0,015 ^{aB} ±0,002	0,015 ^{aB} ±0,001	0,014 ^{aA} ±0,001	0,014 ^{aB} ±0,001	0,014 ^{aB} ±0,002
14 ημέρες	0,015 ^{aC} ±0	0,016 ^{abB} ±0,001	0,017 ^{bB} ±0,002	0,018 ^{bbB} ±0,001	0,017 ^{abC} ±0,001	0,016 ^{abB} ±0,001
28 ημέρες	0,025 ^{abD} ±0,001	0,023 ^{abC} ±0,001	0,027 ^{bcC} ±0,005	0,023 ^{abC} ±0,003	0,023 ^{abD} ±0,002	0,021 ^{aC} ±0,001

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Οι εκθέτες a, b, c, d δείχνουν την οριζόντια σύγκριση και οι εκθέτες A, B, C, D δείχνουν κάθετη σύγκριση. Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 50 °C και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της οξείδωσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα με μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες στα 234 και 270 nm. Όσον αφορά την οριζόντια σύγκριση δηλαδή, μεταξύ των δειγμάτων, με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm δηλαδή, της πρωτογενούς

οξειδωσης, σε όλα τα δείγματα ενώ, η δευτερογενής οξείδωση (270 nm) δεν φαίνεται να αυξάνεται με τόσο γρήγορους ρυθμούς. Όσον αφορά την πρωτογενή οξείδωση (234 nm), από την πρώτη εβδομάδα παραμονής στους 50 °C παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά, σε σχέση με τον μάρτυρα, σε όλα τα δείγματα εκτός από το δείγμα με αιθέριο έλαιο από την περιοχή της Πρέβεζας (**EP_{H1}**). Ωστόσο, στις 14 ημέρες παραμονής και καθώς προχωράει η οξείδωση σημαντική επιβράδυνσή της εμφανίζουν τα δείγματα με αιθέρια έλαια από την Κρήτη (**EP_K**), την Μακεδονία (**EP_M**) και την Πελοπόννησο (**EP_Π**) ενώ, πλέον και το δείγμα με αιθέριο έλαιο από την περιοχή των Ιωαννίνων (**EP_{H2}**) που πριν παρουσίαζε σημαντική στατιστική διαφορά με τον μάρτυρα τώρα δεν έχει και η τιμή της απορρόφησης είναι ουσιαστικά ίδια με αυτή του μάρτυρα γεγονός, που υποδηλώνει μειωμένη σταθερότητα στην πρωτογενή οξείδωση. Τέλος, μετά το πέρας των 28 ημερών όλα τα εμπλουτισμένα δείγματα εμφανίζουν σημαντική στατιστική διαφορά συγκριτικά με τον μάρτυρα με τα δείγματα **EP_M** και **EP_Π** να έχουν την μεγαλύτερη σταθερότητα στην πρωτογενή οξείδωση. Ακόμα, και οι Asensio et al. 2011 (56) έδειξαν ότι μετά από ένα μήνα διατήρησης του εμπλουτισμένου έξτρα παρθένου ελαιολάδου, σε θερμοκρασία κοντά στους 50 °C, το αιθέριο έλαιο ρίγανης το προστάτεψε από την πρωτογενή οξείδωση λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης. Όσον αφορά την δευτερογενή οξείδωση (270 nm) τα εμπλουτισμένα δείγματα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα και άρα, η προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης δεν φαίνεται να επιβραδύνει την εξέλιξή της το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα της μελέτης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα 270 nm οι τιμές των απορροφήσεων σε όλα τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου, εκτός του δείγματος **EP_{H2}**, την χρονική στιγμή μηδέν δεν είναι στατιστικά ίδιες με του μάρτυρα και συνδυαστικά, με τις τιμές απορροφήσεων στις 28 ημέρες αποτελεί ένδειξη ότι η προσθήκη τους στο ελαιόλαδο ενίσχυσε την αντοχή του απέναντι στην οξείδωση. Επίσης, οι αυξημένες τιμές των απορροφήσεων στα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν πιθανόν οφείλεται σε ενώσεις των αιθέριων ελαίων ρίγανης που απορροφούν κοντά σε εκείνο το μήκος κύματος όπως είναι ο φαινολικός δακτύλιος.

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις στα 234 nm έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μεθόδων Folin, Frap και της ρίζας DPPH. Με άλλα λόγια, το αιθέριο έλαιο που ενίσχυσε περισσότερο την αντιοξειδωτική δράση και κατ' επέκταση την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου είναι αυτό της Μακεδονίας ακολουθούμενο, από της Πελοποννήσου και της Κρήτης με τελευταία της Ηπείρου.

Όσον αφορά την κάθετη σύγκριση, δηλαδή κάθε δείγματος με τον χρόνο, όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των τιμών των απορροφήσεων στα 234 nm (πρωτογενή οξείδωση) και των χρόνων ελέγχου της πορείας της οξείδωσης κατά την αποθήκευση για 28 ημέρες. Ωστόσο, η οξείδωση του μάρτυρα φαίνεται να προχωράει με ταχύτερους ρυθμούς τις τελευταίες 14 ημέρες σε σχέση με τα εμπλουτισμένα δείγματα κάτι το οποίο δηλώνει μικρότερη αντοχή έναντι της οξείδωσης. Κατά την εξέλιξη της δευτερογενούς οξείδωσης, τα δείγματα που παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των τιμών των απορροφήσεων στα 270 nm και των χρόνων αποθήκευσής τους είναι ο μάρτυρας και το ΕΡ_Μ. Τα υπόλοιπα δείγματα μέχρι τις 14 ημέρες αποθήκευσης στους 50 °C εμφανίζουν μια πιο αργή εξέλιξη της οξείδωσης η οποία επιταχύνεται τις τελευταίες 14 ημέρες.

Πίνακας 14. Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης στους δείκτες οξείδωσης (UV 234, 270 nm) μετά από θέρμανση στους 180 °C.

234 nm						
	Ε _Μ	ΕΡ _{Η1}	ΕΡ _{Η2}	ΕΡ _Κ	ΕΡ _Μ	ΕΡ _Π
t=0	0,0986 ^{aA} ±0,0012	0,0965 ^{aA} ±0,0059	0,0946 ^{aA} ±0,0027	0,0933 ^{aA} ±0,0041	0,0962 ^{aA} ±0,0026	0,0949 ^{aA} ±0,0051
1 ώρα	0,1317 ^{bB} ±0,0050	0,1230 ^{abB} ±0,0005	0,1181 ^{aB} ±0,0063	0,1174 ^{aA} ±0,0074	0,1202 ^{aB} ±0,0026	0,1159 ^{aB} ±0,0060
2 ώρες	0,1828 ^{bC} ±0,0125	0,1538 ^{aC} ±0,0096	0,1520 ^{aC} ±0,0070	0,1513 ^{aB} ±0,0067	0,1552 ^{aC} ±0,0084	0,1742 ^{bC} ±0,0014
3 ώρες	0,2490 ^{bD} ±0,0026	0,2143 ^{aD} ±0,0241	0,2166 ^{aD} ±0,0100	0,2118 ^{aC} ±0,0263	0,1973 ^{aD} ±0,0170	0,2000 ^{aD} ±0,0177
270 nm						
	Ε _Μ	ΕΡ _{Η1}	ΕΡ _{Η2}	ΕΡ _Κ	ΕΡ _Μ	ΕΡ _Π
t=0	0,0097 ^{aA} ±0,0003	0,0107 ^{abA} ±0,0021	0,0113 ^{abA} ±0,0012	0,0128 ^{bA} ±0,0010	0,0122 ^{bA} ±0,0002	0,0113 ^{abA} ±0,0012
1 ώρα	0,0370 ^{aB} ±0,0058	0,0335 ^{aB} ±0,0063	0,0314 ^{aB} ±0,0031	0,0343 ^{aB} ±0,0077	0,0352 ^{aB} ±0,0079	0,0373 ^{aB} ±0,0089
2 ώρες	0,0581 ^{bC} ±0,0052	0,0489 ^{aC} ±0,0038	0,0473 ^{aC} ±0,0027	0,0492 ^{aC} ±0,0016	0,0510 ^{aC} ±0,0040	0,0589 ^{bC} ±0,0026
3 ώρες	0,0829 ^{bD} ±0,0029	0,0745 ^{abD} ±0,0046	0,0721 ^{abD} ±0,0061	0,0717 ^{abD} ±0,0085	0,0652 ^{aD} ±0,0061	0,0645 ^{aC} ±0,0056

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι εκφρασμένα μαζί με την τυπική απόκλιση (n=3). Οι εκθέτες a, b, c, d δείχνουν την οριζόντια σύγκριση και οι εκθέτες A, B, C, D δείχνουν κάθετη σύγκριση. Μέσοι όροι οι οποίοι δεν έχουν κοινό δείκτη διαφέρουν στατιστικά (P<0,05).

Μελετήθηκε η οξείδωση των δειγμάτων ύστερα από παραμονή τους στους 180 °C για 3 ώρες. Όσον αφορά την οριζόντια σύγκριση, κατά τον έλεγχο της πρωτογενούς οξείδωσης, σε χρόνο μηδέν τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Μετά από παραμονή για 1 ώρα όλα τα εμπλουτισμένα δείγματα εκτός από το ελαιόλαδο με αιθέριο έλαιο από την Πρέβεζα (ΕΡ_{Η1}), παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα και

άρα υψηλότερη αντοχή στη οξείδωση. Στις 2 ώρες θέρμανσης η πρωτογενής οξείδωση είχε προχωρήσει αρκετά και μόνο το δείγμα με αιθέριο έλαιο από την Πελοπόννησο (**ΕΡΠ**) φαίνεται να μην παρουσιάζει στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Στις 3 ώρες, όλα τα εμπλουτισμένα δείγματα εμφανίζουν υψηλότερη αντοχή στην πρωτογενή οξείδωση συγκριτικά με τον μάρτυρα και άρα η προσθήκη τους φαίνεται να ενίσχυσε την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου. Όσον αφορά την δευτερογενή οξείδωση, μετά την 1 ώρα παραμονής στους 180 °C παρόλο που η οξείδωση είχε προχωρήσει αρκετά κανένα εμπλουτισμένο δείγμα δεν παρουσιάζει σημαντική στατιστική σε σχέση με τον μάρτυρα. Όμως, στις 2 ώρες θέρμανσης μόνο το δείγμα **ΕΡΠ** φαίνεται να μην παρουσιάζει στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 3 ωρών θέρμανσης την υψηλότερη αντοχή στην οξείδωση, που παρατηρείται από την στατιστική διαφορά των τιμών σε σχέση με τον μάρτυρα, παρουσιάζουν μόνο τα δείγματα με αιθέρια έλαια από την Μακεδονία (**ΕΡΜ**) και την Πελοπόννησο (**ΕΡΠ**). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι σε χρόνο μηδέν οι τιμές απορρόφησης στα 270 nm δεν είναι στατιστικά ίδιες με του μάρτυρα και μάλιστα, εμφανίζονται μεγαλύτερες ενώ, μετά το πέρας των 3 ωρών είναι μικρότερες από αυτές του μάρτυρα γεγονός, που υποδηλώνει ότι όλα τα εμπλουτισμένα δείγματα με αιθέρια έλαια ρίγανης προσδίδουν οξειδωτική σταθερότητα στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Πάλι, οι αυξημένες τιμές των απορροφήσεων στα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου την χρονική στιγμή μηδέν πιθανόν οφείλεται σε ενώσεις των αιθέριων ελαίων ρίγανης που απορροφούν κοντά σε εκείνο το μήκος κύματος (π.χ. φαινολικός δακτύλιος). Συνεπώς, η προσθήκη τους στο ελαιόλαδο πιθανόν να ευνόησε το αρχικό προϊόν ως προς την αντοχή του απέναντι στην οξείδωση.

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις στα 234 και 270 nm έρχονται ξανά σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα των μεθόδων Folin, Frap και της ρίζας DPPH. Το αιθέριο έλαιο που ενίσχυσε περισσότερο την αντιοξειδωτική δράση και κατ' επέκταση την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου είναι αυτό της Μακεδονίας ακολουθούμενο, από της Πελοποννήσου και της Κρήτης με τελευταία της Ηπείρου. Να σημειωθεί, ότι τα συμπεράσματα από τις δυο θερμικές κατεργασίες (50 και 180 °C) είναι ανάλογα μεταξύ τους, δηλαδή, και στις δυο περιπτώσεις το αιθέριο έλαιο από την Μακεδονία παρουσιάζεται ως το πιο δραστικό και αυτά από την Ήπειρο τα λιγότερο δραστικά.

Με βάση την κάθετη σύγκριση δηλαδή, του κάθε δείγματος ως προς το χρόνο θέρμανσης όλα τα δείγματα (μάρτυρας και εμπλουτισμένα) εκτός από το εμπλουτισμένο δείγμα με αιθέριο έλαιο από την Κρήτη (**ΕΡΚ**) παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των

απορροφήσεων στα 234 nm και των χρόνων ελέγχου της πορείας της πρωτογενούς οξείδωσης κατά την θερμική επεξεργασία. Το δείγμα **ΕΡκ** μέχρι την πρώτη 1 ώρα δεν εμφανίζει σημαντικές αλλαγές στη τιμή της απορρόφησης από την χρονική στιγμή μηδέν γεγονός που μπορεί να δηλώνει μια σταθερότητα και πιο αργή εξέλιξη της πρωτογενούς οξείδωσης εκείνο το χρονικό διάστημα. Επιπλέον, αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και κατά την εξέλιξη της δευτερογενούς οξείδωσης με την διαφορά ότι το εμπλουτισμένο δείγμα που δεν εμφανίζει σημαντικές αλλαγές στη τιμή της απορρόφησης στα 270 nm την τελευταία 1 ώρα της θέρμανσης να είναι το **ΕΡΠ**.

3.2.4. Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων ελαιολάδου

Τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου, συμπεριλαμβανομένου και του έξτρα παρθένου ελαιολάδου (μάρτυρας) αποτιμήθηκαν οργανοληπτικά ως προς το άρωμα-οσμή τους από δυο δοκιμαστές.

Από τους δοκιμαστικές το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, χαρακτηρίστηκε ως ένα ελαιόλαδο με έντονο φρουτώδες άρωμα. Και στα 5 εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου οι δοκιμαστές αισθάνθηκαν το άρωμα της ρίγανης με τα δείγματα με αιθέρια έλαια από την Πρέβεζα (**ΕΡΗ1**), τα Ιωάννινα (**ΕΡΗ2**) και την Πελοπόννησο (**ΕΡΠ**) να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ένταση. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα **ΕΡΗ1** χαρακτηρίστηκε ως ευχάριστο με το άρωμα της ρίγανης να μην επισκιάζει το φρουτώδες του αρχικού ελαιολάδου, ενώ, το δείγμα **ΕΡΗ2** ήταν το πιο δυσάρεστο από όλα, με το άρωμα της ρίγανης να επισκιάζει το φρουτώδες του ελαιολάδου. Επίσης, τα δείγματα με αιθέρια έλαια από την Μακεδονία (**ΕΡΜ**) και την Κρήτη (**ΕΡκ**) αποτέλεσαν τα δείγματα όπου το άρωμα της ρίγανης ήταν το λιγότερο έντονο και στο **ΕΡΜ** ήταν εμφανές και το φρουτώδες του ελαιολάδου. Ακόμα, και τα δυο δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως ευχάριστα. Στο δείγμα **ΕΡΠ** η ρίγανη ήταν εντονότερη από ότι στα δείγματα **ΕΡκ** και **ΕΡΜ**. Συνολικά, παρουσιάστηκε μια προτίμηση ως προς το άρωμα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου σε σχέση με τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων ρίγανης

- ✓ Όλα τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση όπως προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin, FRAP και DPPH.
- ✓ Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων ρίγανης αποτιμήθηκε, με βάση τον τόπο, κατά την σειρά: Κρήτη $\geq$ Μακεδονία > Πελοπόννησος > Ήπειρος (Ιωάννινα) $\geq$ Ήπειρος (Πρέβεζα).

4.2. Εμπλουτισμός έξτρα παρθένου ελαιολάδου με αιθέριο έλαιο ρίγανης

Μελετήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης μετά την προσθήκη του στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο σε συγκέντρωση 0,5 %.

- ✓ Τα εμπλουτισμένα δείγματα ελαιολάδου δεν παρουσίασαν διαφορές στην οξύτητα σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.
- ✓ Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα παρουσίασαν μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (αντιοξειδωτική δράση με μέθοδο Frap). Μεταξύ των εμπλουτισμένων δειγμάτων παρατηρήθηκε η παραπάνω σειρά: Κρήτη $\geq$ Μακεδονία = Πελοπόννησος = Ήπειρος (Ιωάννινα) $\geq$ Ήπειρος (Πρέβεζα). Επίσης, τα δείγματα **ΕΡ_Κ** και **ΕΡ_Μ** παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο όπως προσδιορίστηκε και με την μέθοδο Folin. Ακόμα, το δείγμα **ΕΡ_Μ** παρουσίασε και μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι της DPPH σε χρόνο αντίδρασης 20 min.
- ✓ Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα παρουσίασαν μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα στους 50 °C σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, όπως προέκυψε από τις τιμές των απορροφήσεων στα 234 nm (πρωτογενής οξείδωση). Η μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα παρατηρήθηκε κατά την σειρά: Μακεδονία $\geq$ Πελοπόννησος $\geq$ Κρήτη $\geq$ Ήπειρος (Ιωάννινα) = Ήπειρος (Πρέβεζα).
- ✓ Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα παρουσίασαν μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα στους 180 °C σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, όπως προέκυψε από τις τιμές των απορροφήσεων στα 234 nm (πρωτογενής οξείδωση). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην οξειδωτική σταθερότητα μεταξύ των εμπλουτισμένων δειγμάτων. Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα με αιθέρια έλαια από την Μακεδονία (**ΕΡ_Μ**) και την Πελοπόννησο (**ΕΡ_Π**) παρουσίασαν μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα στους 180 °C σε σχέση με το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, όπως προέκυψε από τις τιμές των απορροφήσεων στα 270 nm (δευτερογενής οξείδωση).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kubeczka K.-H. History and Sources of Essential Oil Research. In: Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Chapter 2, Second Edition. Taylor & Francis Group, 2015.
2. Guenther E. HISTORY-ORIGIN IN PLANTS PRODUCTION-ANALYSIS. In: The Essential Oils, Third Edition, Fritzsche Brothers, New York, 1995.
3. Uylaşer V., Yildiz G. The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54(8), 1092–1101, 2014, doi:10.1080/10408398.2011.626874.
4. Kapellakis I. E., Tsagarakis K. P., Crowther J. C. Olive oil history, production and by-product management. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 7(1), 1–26, 2008, doi:10.1007/s11157-007-9120-9.
5. Husnu Can Baser K., Buchbauer G. (editors). Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Taylor & Francis Group, New York, 2010.
6. Amorati R., Foti M. C., Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(46), 10835–10847, 2013, doi:10.1021/jf403496k.
7. Sarrou E., Tsivelika N., Chatzopoulou P., Tsakalidis G., Menexes G., Mavromatis A. Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. Euphytica, 213(5), 1–6, 2017, doi:10.1007/s10681-017-1889-1.
8. Vokou D., Kokkini S., Bessiere J.-M. Geographic Variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Essential Oils. Biochemical Systematics and Ecology, 21(2), 287–295, 1993.
9. Shafiee-Hajiabad M., Hardt M., Honermeier B. Comparative investigation about the trichome morphology of Common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) and Greek oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*). Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 1(2), 50–58, 2014, doi:10.1016/j.jarmap.2014.04.001.

10. Sadgrove N. J., Padilla-González G. F., Phumthum M. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants*, 11(6), 1–34, 2022, doi:10.3390/plants11060789.
11. Viuda-Martos M., Navajas Y. R., Zapata E. S., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1), 13–19, 2010, doi:10.1002/ffj.
12. Rodriguez-Garcia I., Silva-Espinoza B. A., Ortega-Ramirez L. A., Leyva J. M., Siddiqui M. W., Cruz-Valenzuela M. R., Gonzalez-Aguilar G. A., Ayala-Zavala J. F. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717–1727, 2016, doi:10.1080/10408398.2013.800832.
13. Węglarz Z., Kosakowska O., Przybył J. L., Pióro-Jabrucka E., Baczek K. The Quality of Greek Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*) Cultivated in the Temperate Climate of Central Europe. *Foods*, 9(11), 1–14, 2020, doi:10.3390/foods9111671.
14. Kosakowska O., Węglarz Z., Pióro-Jabrucka E., Przybył J. L., Kraśniewska K., Gniewosz M., Bączek K. Antioxidant and antibacterial activity of essential oils and hydroethanolic extracts of Greek oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (link) ietswaart) and common oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). *Molecules*, 26(4), 1–15, 2021, doi:10.3390/molecules26040988.
15. International Olive Oil Council (IOC). TRADE STANDARD APPLYING TO OLIVE OILS AND OLIVE POMACE OILS, COI/T.15/NC No 3/Rev.17, 2021.
16. Vossen P. INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL (IOC) and CALIFORNIA TRADE STANDARDS for OLIVE OIL, 2007.
17. Capurso A., Crepaldi G., Capurso C. Extra-Virgin Olive Oil (EVOO): History and Chemical Composition, Chapter 2, 11-21, Springer International Publishing AG, 2018.
18. Ambra R., Natella F., Lucchetti S., Forte V., Pastore G. α -Tocopherol, β -carotene, lutein, squalene and secoiridoids in seven monocultivar Italian extra-virgin olive oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(5), 538–545, 2017, doi:10.1080/09637486.2016.1265099.

19. Guo Z., Jia X., Zheng Z., Lu X., Zheng Y., Zheng B., Xiao J. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1091–1110, 2018, doi:10.1007/s11101-017-9526-0.
20. Barjol J. L. Introduction. In: *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, Chapter 1, 1-17, Springer US, New York, 2013, doi:10.1007/978-1-4614-7777-8_1.
21. Boskou D. Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents. In: *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, 1-30, Elsevier Inc., 2015.
22. Seçmeler Ö., Galanakis C. M. Olive Fruit and Olive Oil. In: *Innovations in Traditional Foods*, Chapter 8, 193-220, Elsevier Inc., 2019, doi:10.1016/B978-0-12-814887-7.00008-3.
23. Amarowicz R. Squalene: A natural antioxidant? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(5), 411–412, 2009, doi:10.1002/ejlt.200900102.
24. Jimenez-Lopez C., Carpena M., Lourenço-Lopes C., Gallardo-Gomez M., Lorenzo M. J., Barba F. J., Prieto M. A., Simal-Gandara J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*, 9(8), 1–31, 2020, doi:10.3390/foods9081014.
25. Kalogeropoulos N., Tsimidou M. Z. Antioxidants in greek virgin olive oils. *Antioxidants*, 3(2), 387–413, 2014, doi:10.3390/antiox3020387.
26. Yalcin S., Schreiner M. Stabilities of tocopherols and phenolic compounds in virgin olive oil during thermal oxidation. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 244–251, 2018, doi:10.1007/s13197-017-2929-5.
27. Kiritsakis A., Shahidi F., Anousakis C. Antioxidants of olive oil, olive leaves, and their bioactivity. In: *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*, First Edition, John Wiley & Sons, 2017.
28. Sánchez-Quesada C., López-Biedma A., Warleta F., Campos M., Beltrán G., Gaforio J. J. Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *olea europaea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12173–12182, 2013, doi:10.1021/jf403154e.
29. Samaniego-Sánchez C., Quesada-Granados J. J., de la Serrana H. L. G., López-Martínez M. C. β -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual

- extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 671–676, 2010, doi:10.1016/j.jfca.2010.03.010.
30. Giuffrè A. M. Influence of harvest year and cultivar on wax composition of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(5), 549–555, 2013, doi:10.1002/ejlt.201200235.
 31. Diarte C., Romero A., Romero M. P., Graell J., Lara I. Chemical and sensory characterization of nine spanish monovarietal olive oils: An emphasis on wax esters. *Agriculture*, 11(2), 170, 2021, doi:10.3390/agriculture11020170.
 32. de Torres A., Espínola F., Moya M., Alcalá S., Vidal A. M., Castro E. Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *LWT- Food Science and Technology*, 90, 22–30, 2018, doi:10.1016/j.lwt.2017.12.003.
 33. López-Biedma A., Sánchez-Quesada C., Delgado-Rodríguez M., Gaforio J. J. The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: A review. *Journal of Functional Foods*, 26, 36–47, 2016, doi:10.1016/j.jff.2016.07.005.
 34. Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Maria Gómez-Caravaca A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Lercker G. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12, 1679–1719, 2007.
 35. Tsimidou M., Blekas G., Boskou D. *OLIVE OIL*, 4252-4260, Elsevier Science Ltd., 2003.
 36. Morales J. C., Lucas R. Structure-Activity Relationship of Phenolic Antioxidants and Olive Components. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Section II, Chapter 97, 905-914, Elsevier Inc., 2010.
 37. Lazzerini C., Cifelli M., Domenici V. Pigments in Extra-Virgin Olive Oil: Authenticity and Quality. In: *Products from Olive Tree*, Chapter 6, 99-114, InTech, 2016, doi:10.5772/64736.
 38. Cinelli G., Cofelice M., Venditti F. Veiled extra virgin olive oils: Role of emulsion, water and antioxidants. *Colloids and Interfaces*, 4(3), 1–20, 2020, doi:10.3390/colloids4030038.

39. Taghvaei M., Jafari S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1272–1282, 2015, doi:10.1007/s13197-013-1080-1.
40. Morales M. T., Przybylski R. Olive oil oxidation. In: *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, Chapter 13, 479-522, Springer US, New York, 2013, doi:10.1007/978-1-4614-7777-8_13.
41. Velasco J., Dobarganes C. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 661–676, 2002, doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-D.
42. Koidis A., Boskou D. Virgin Olive Oil: Losses of Antioxidant Polar Phenolic Compounds due to Storage, Packaging, and Culinary Uses. In: *Processing and Impact on Active Components in Food*, Chapter 32, 267-274, Elsevier Inc., 2014, doi:10.1016/B978-0-12-404699-3.00032-9.
43. Morales M. T., Przybylski R. Olive Oil Oxidation. In: *Handbook of Olive Oil*, Chapter 13, 459-490, Springer Science+Business Media, New York, 2000.
44. Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Lercker G., Fernández-Gutiérrez A. Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4771–4780, 2007, doi:10.1021/jf070186m.
45. Sanmartin C., Venturi F., Sgherri C., Nari A., Macaluso M., Flamini G., Frank Quartacci M., Taglieri I., Andrich G., Zinnai A. The effects of packaging and storage temperature on the shelf-life of extra virgin olive oil. *Heliyon*, 4, 1–18, 2018, doi:10.1016/j.heliyon.2018.
46. Cicerale S., Lucas L. J., Keast R. S. J. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 129–135, 2012, doi:10.1016/j.copbio.2011.09.006.
47. Rotich V., al Riza D. F., Giametta F., Suzuki T., Ogawa Y., Kondo N. Thermal oxidation assessment of Italian extra virgin olive oil using an UltraViolet (UV) induced fluorescence imaging system. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 237, 1–18, 2020, doi:10.1016/j.saa.2020.118373.

48. Gómez-Alonso S., Fregapane G., Desamparados Salvador M., Gordon M. H. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 667–672, 2003, doi:10.1021/jf025932w.
49. Kabaran S. Olive Oil: Antioxidant Compounds and Their Potential Effects over Health. In: *Functional Foods*, IntechOpen, 2-19, 2019, doi:10.5772/intechopen.80993.
50. Persurić A. S. I., Damijanić A. T. Connections between healthy behaviour, perception of olive oil health benefits, and olive oil consumption motives. *Sustainability*, 13(14), 1–12, 2021, doi:10.3390/su13147630.
51. Martín-Peláez S., Covas M. I., Fitó M., Kušar A., Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 760–771, 2013, doi:10.1002/mnfr.201200421.
52. Pedan V., Popp M., Rohn S., Nyfeler M., Bongartz A. Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil. *Molecules*, 24(11), 1–19, 2019, doi:10.3390/molecules24112041.
53. Benkhoud H., M'Rabet Y., Gara ali M., Mezni M., Hosni K. Essential oils as flavoring and preservative agents: Impact on volatile profile, sensory attributes, and the oxidative stability of flavored extra virgin olive oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(5), 1–13, 2022, doi:10.1111/jfpp.15379.
54. Asensio C. M., Nepote V., Grosso N. R. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(11), 2417–2428, 2013, doi:10.1111/ijfs.12233.
55. Barreca S., la Bella S., Maggio A., Licata M., Buscemi S., Leto C., Pace A., Tuttolomondo T. Flavouring extra-virgin olive oil with aromatic and medicinal plants essential oils stabilizes oleic acid composition during photo-oxidative stress. *Agriculture*, 11(3), 1–14, 2021, doi:10.3390/agriculture11030266.
56. Asensio C. M., Nepote V., Grosso N. R. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*, 76(7), S445–S450, 2011, doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02332.x.

57. Fat and Oil Saponification value of Fat and Oil Acid-base titration (non aqueous) by Automatic Potentiometric Titrator. KEM Application Note. JIS ASTM ISO, Standard Test Method for Fat and Oil, TIB-99307 Ver.01, 1-4.
58. Rieman W. Determination of the Saponification Number of Fats and Oils- Elimination of the Blank. In: INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY, Analytical Edition, 15(5), 325-326, 1943, doi:10.1021/i560117a010.
59. Χημικός Ομότιμος Καθηγητής Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Τροφογνώσια Περιγραφική Χημεία Δ., Τροφίμων Τ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ.
60. Moyano M. J., Meléndez-Martínez A. J., Alba J., Heredia F. J. A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (I): CIEXYZ non-uniform colour space. Food Research International, 41(5), 505–512, 2008, doi:10.1016/j.foodres.2008.03.007.
61. de Oliveira M. A. L., Balesteros M. R., Faria A. F., Vaz F. A. S. Determination of Olive Oil Acidity. In: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, Section I, Chapter 59, 545-552, Elsevier Inc., 2010.
62. Yang X., Boyle R. A. Sensory Evaluation of Oils/Fats and Oil/Fat-Based Foods. In: Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats, Chapter 3, 157-185, Elsevier Inc., 2016, doi: 10.1016/B978-1-63067-056-6.00003-3.
63. Malta L. G., Liu R. H. Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. In: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 1, 305-314, Elsevier Inc., 2014.
64. Apak R., Özyürek M., Güçlü K., Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(5), 997–1027, 2016, doi:10.1021/acs.jafc.5b04739.
65. Martinez-Morales F., Alonso-Castro A. J., Zapata-Morales J. R., Carranza-Álvarez C., Aragon-Martinez O. H. Use of standardized units for a correct interpretation of IC50 values obtained from the inhibition of the DPPH radical by natural antioxidants. Chemical Papers, 74(10), 3325–3334, 2020, doi:10.1007/s11696-020-01161-x.

66. Favati F., Condelli N., Galgano F., Caruso M. C. Extra virgin olive oil bitterness evaluation by sensory and chemical analyses. *Food Chemistry*, 139(1–4), 949–954, 2013, doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.098.
67. Cerretani L., Toschi T. G., Bendini A. Phenolic Fraction of Virgin Olive Oil: An Overview on Identified Compounds and Analytical Methods for their Determination. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 69–80, 2009.
68. Soni R. N., Bartusek M. MOLYBDATE COMPLEXES WITH o-DIPHENOLS. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 33, 2557–2563, 1971, doi:10.1016/0022-1902(71)80230-0.
69. Del Carlo M., Amine A., Haddam M., della Pelle F., Fusella G. C., Compagnone D. Selective Voltammetric Analysis of o-Diphenols from Olive Oil Using Na₂MoO₄ as Electrochemical Mediator. *Electroanalysis*, 24(4), 889–896, 2012, doi:10.1002/elan.201100603.
70. Cerretani L., Bendini A. Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Section I, Chapter 67, 625-635, Elsevier Inc., 2010.
71. Minioti K. S., Georgiou C. A. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas y Aceites*, 61(1), 45–51, 2010, doi:10.3989/gya.010508.
72. del Monaco G., Officioso A., D'Angelo S., la Cara F., Ionata E., Marcolongo L., Squillaci G., Maurelli L., Morana A. Characterization of extra virgin olive oils produced with typical Italian varieties by their phenolic profile. *Food Chemistry*, 184, 220–228, 2015, doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.071.
73. Ballus C. A., Meinhart A. D., de Souza Campos F. A., Godoy H. T. Total phenolics of virgin olive oils highly correlate with the hydrogen atom transfer mechanism of antioxidant capacity. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(6), 843–851, 2015, doi:10.1007/s11746-015-2629-0.
74. Seiquer I., Rueda A., Olalla M., Cabrera-Vique C. Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion

- and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 188, 496–503, 2015, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.006.
75. Afolayan M., Fausat A., Idowu D. Extraction and physicochemical analysis of some selected seed oils. *International Journal of Advanced Chemistry*, 2(2), 70–73, 2014, doi:10.14419/ijac.v2i2.2203.
 76. Firestone D., Yurawecz M. P. AOAC Official Methods of Analysis, Oils and Fats, Chapter 41, 6-7, In: US Food and Drug Administration, AOAC International, 2000.
 77. Paquot C. Determination of the Density. In: *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 20-22, Elsevier Inc., 1979, doi:10.1016/b978-0-08-022379-7.50014-0.
 78. International Olive Council (IOC), METHOD DETERMINATION OF FREE FATTY ACIDS, COLD METHOD, COI-T.20-Doc.-No-34-Rev-1-2017, 2017.
 79. International Olive Council (IOC), METHOD DETERMINATION OF PEROXIDE VALUE 1. SCOPE AND FIELD OF APPLICATION, COI/T.20/Doc. No 35/Rev. 1, 2017.
 80. Papadopoulou D., Roussis I. G. Inhibition of corn oil oxidation by N-acetyl-cysteine and glutathione. *Food Chemistry*, 109(3), 624–629, 2008, doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.082.
 81. International Olive Council (IOC), METHOD OF ANALYSIS SPECTROPHOTOMETRIC INVESTIGATION IN THE ULTRAVIOLET, COI/T.20/Doc. No 19/Rev. 5, 2019.
 82. Inarejos-Garcia A. M., Androulaki A., Salvador M. D., Fregapane G., Tsimidou M. Z. Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. *Food Research International*, 42(2), 279–284, 2009, doi:10.1016/j.foodres.2008.11.009.
 83. Arranz S., Cert R., Pérez-Jiménez J., Cert A., Saura-Calixto F. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*, 110(4), 985–990, 2008, doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.021.
 84. Garcia B., Coelho J., Costa M., Pinto J., Paiva-Martins F. A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1727–1732, 2013, doi:10.1002/jsfa.5958.

85. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Serrano C., Matos O., Neng N. R., Nogueira J. M. F., Saraiva J. A., Nunes M. L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707–2714, 2013, doi:10.1002/jsfa.6089.
86. Dambolena J. S., Zunino M. P., Lucini E. I., Olmedo R., Banchio E., Bima P. J., Zygadlo J. A. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1115–1120, 2010, doi:10.1021/jf903203n.
87. Proestos C., Lytoudi K., Mavromelanidou O. K., Zoumpoulakis P., Sinanoglou V. J. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, 2(1), 11–22, 2013, doi:10.3390/antiox2010011.
88. Rosales F. G., Perdiguero S., Gutierrez R., Olías J. M. Evaluation of the Bitter Taste in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(4), 394–395, 1992, doi:10.1007/bf02636076.
89. Soufi O., Romero C., Hadid M., Hamoumraoui K., Louaileche H. Characterization of phenolic profile and antioxidant potential of some Algerian olive oils cultivars. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 5(2), 49–53, 2018, doi:10.29252/jfqhc.5.2.4.
90. Bouarroudj K., Tamendjari A., Lariat R. Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*) oil. *Industrial Crops and Products*, 83, 484–491, 2016, doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.081.
91. Εικόνα. Πιθανές πορείες οξείδωσης λιπιδίων φυτικών ελαίων και του ελαιολάδου.
92. <https://www.oliveoilandbeyond.com/sensory-olive-oil-tasting-s/1864.htm>
93. https://www.researchgate.net/figure/Diagram-showing-the-reduction-of-the-Folin-Ciocalteu-reagent-caused-by-the-oxidation-of_fig1_334084142/actions#reference
94. <http://www.opengov.gr/epy/?p=6067>