



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*Ενόργανη ανάλυση και βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων των φυτών
δίκταμο (*Origanum dictamnus*), δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)
και θρούμπι (*Satureja hortensis*)*



Επιβλέπων καθηγητής: Μόσχος Πολυσιού

Σπυρίδων Φ. Δαούσης

ΑΘΗΝΑ 2013



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*Ενόργανη ανάλυση και βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων των φυτών
δίκταμο (*Origanum dictamnus*), δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)
και θρούμπι (*Satureja hortensis*)*

Υπεύθυνος καθηγητής : Μόσχος Πολυσιού

Τριμελής επιτροπή : Μόσχος Πολυσιού

: Κωνσταντίνος Γεωργίου

: Χρήστος Παππάς

Σπυρίδων Φ. Δαούσης

ΑΘΗΝΑ 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων» και συγκεκριμένα στο Γενικό τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012.

Το αντικείμενό της αφορά στη διερεύνηση της βιολογικής δράσης των βοτάνων δίκταμου, δεντρολίβανου και θρουμπιού τα οποία πολύ συχνά καταναλώνονται είτε ως καρυκεύματα είτε ως αφεψήματα, κατά την οποία εργασία προσδιορίζονται τα πτητικά και τα φαινολικά συστατικά τους και επιπλέον εξετάζονται η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους ικανότητα.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας κ. Μόσχο Πολυσιού που με εμπιστεύθηκε αναθέτοντας μου αυτήν την μελέτη.

Επίσης εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην τριμελή Επιτροπή κ. Μόσχο Πολυσιού, κ. Χρήστο Παππά και κ. Κωνσταντίνο Γεωργίου που βαθμολόγησαν την παρούσα εργασία.

Επιπλέον εκφράζω ένα υπέρτατο ευχαριστώ στην κ. Ειρήνη Αναστασάκη, υποψήφια διδάκτορα για την υπερπολύτιμη και συνεχή βοήθειά της μέσω της επιστημονικής της εμπειρίας και καλής διάθεσης που σενετέλεσε καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση των εργαστηριακών αναλύσεων. Θέλω επίσης να την ευχαριστήσω τόσο για την συνεχή παροχή επιστημονικών γνώσεων και συμβουλών, όσο και για την βοήθειά της στην επιλογή της βιβλιογραφίας αλλά και διορθώσεων πάνω στην διατύπωση και μορφοποίηση του κειμένου.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την κ. Τσακαλίδου και το προσωπικό του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας στο χώρο του οποίου και κάτω από την δική της καθοδήγηση και των συνεργατών της πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα της αντιμικροβιακής δράσης.

Σπυρίδων Δαούσης,

Αθήνα, Φεβρουάριος 2013

Στη μητέρα μου, Αγγελική Πολέμη

για την ηθική στήριξή της σε όλα τα φοιτητικά μου χρόνια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1) Παρουσίαση των βοτάνων.....	12
1.1.1 Δίκταμος (<i>Origanum dictamnus</i>).....	12
1.1.2 Δεντρολίβανο (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	14
1.1.3 Θρούμπι (<i>Satureja hortensis</i>).....	15
1.2) Βιολογική δράση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.....	16
1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση των βοτάνων.....	17
1.2.2 Αντιμικροβιακή δράση των βοτάνων.....	22
1.2.3 Αντιοξειδωτικά.....	28
1.3) Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	29
1.3.1 Τερπένια.....	29
1.3.1.1 Δομή και βιοσύνθεση των τερπενίων.....	30
1.3.1.2 Τύποι τερπενίων.....	30
1.3.2 Φαινολικά συστατικά.....	32
1.4) Μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	39
1.4.1 Μέθοδος του DPPH.....	41
1.5) Μέθοδοι εκτίμησης της αντιμικροβιακής δράσης των φυσικών προϊόντων.....	43
1.5.1 Μέθοδος διάχυσης άγαρ-πηγαδιού.....	43
1.6) Μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών.....	43
1.7) Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	44
1.8) Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS).....	45
1.9) Σκοπός της εργασίας.....	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.1) Φυτικό υλικό.....	48
2.2) Κατεργασία δειγμάτων.....	48
2.3) Παραλαβή των εκχυλισμάτων.....	48
2.3.1 Διαδικασία εκχυλίσεων.....	49
2.3.2 Συμπύκνωση εκχυλισμάτων.....	49
2.4) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH).....	50
2.5) Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων.....	51
2.5.1 Μικροβιακά στελέχη.....	51
2.5.2 Μέθοδος διάχυσης άγαρ-πηγαδιών.....	52
2.6) Μέτρηση φαινολικών συστατικών.....	53
2.7) Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών.....	53
2.8) Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
3.1) Παραλαβή των εκχυλισμάτων και αποδόσεις.....	56
3.2) Ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων.....	56
3.3) Ανάλυση των φυτικών εκχυλισμάτων με LC-MS.....	66
3.4) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH.....	81
3.5) Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	85
3.6) Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης με την μέθοδο διάχυσης άγαρ-πηγαδιού.....	89
3.6.1 Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης κάθε φυτού.....	89
3.6.2 Αντιμικροβιακή δράση με βάση την συγκέντρωση των διαλυτών.....	100
3.6.3 Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης κάθε εκχυλίσματος.....	101
3.6.4 Γενικά συμπεράσματα.....	116
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	120
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	123
Διεθνής βιβλιογραφία.....	123
Ελληνική βιβλιογραφία.....	149
Διαδικτυακή βιβλιογραφία.....	149

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	150
I. Πίνακες με αποτελέσματα και οι καμπύλες αναφοράς τους.....	150
II. Φάσματα πρότυπων ουσιών για την ανάλυση με LC-MS.....	156

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την παρασκευή των εκχυλισμάτων, 5 g αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που είναι ευρέως διαδεδομένα στην μεσογειακή διατροφή και χλωρίδα (δίκταμο, δεντρολίβανο και θρούμπι) εκχυλίστηκαν διαδοχικά με 100 mL πετρελαϊκού αιθέρα, εξανίου και διαιθυλαιθέρα με την χρήση υπερήχων (MHz) σε υδατόλουτρο (20-21°C). Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με 800 mL μεθανόλη σε συνθήκες σκότους. Η απομάκρυνση των διαλυτών έγινε αρχικά με συμπυκνωτή κενού μέχρι τον όγκο των 20 mL και εν συνεχεία με ροή αζώτου.

Στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκαν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (εκφρασμένο σε mg καφεϊκού οξέος / g στερεού εκχυλίσματος και σε mg καφεϊκού οξέος / g ξηρού βάρους) με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και η αντιοξειδοτική ικανότητα (εκφρασμένη σε μM Trolox και σε IC_{50}) με την μέθοδο του DPPH. Επίσης υπολογίστηκε η γραμμικότητα της σχέσης των αποτελεσμάτων αυτών όπου δεν υπήρξε γραμμική συσχέτιση. Οι τιμές από την μέθοδο Folin-Ciocalteu κυμαίνονται μεταξύ 32 – 540 μg καφεϊκού οξέος / g στερεού εκχυλίσματος και από 1,14 – 51,66 mg καφεϊκού οξέος / g ξηρού βάρους, ενώ από την μέθοδο DPPH από 14,31 – 445,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και από 4,4 – 42,8 μM Trolox. Από τα παραπάνω βρέθηκε ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα είχε το δεντρολίβανο ενώ την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά την είχε συνολικά σε όλους τους διαλύτες το δίκταμο.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε % ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών που παρελήφθησαν με τους διαλύτες πετρελαϊκού αιθέρα και εξάνιο με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών και τα κυριότερα συστατικά που βρέθηκαν ήταν η καρβακρόλη στο δίκταμο και θρούμπι και η ευκαλυπτόλη στο δεντρολίβανο για το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα, ενώ στο εκχύλισμα εξανίου οι κύριες ουσίες ήταν καρβακρόλη για δίκταμο και θρούμπι και βερμπενόνη για το δεντρολίβανο.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε % ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα διαιθυλαιθέρα και μεθανόλης με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματόμετρο μάζας. Στο εκχύλισμα της μεθανόλης η κυριότερη φαινολική ένωση που βρέθηκε σε όλα τα φυτά ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ενώ στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα η κυριότερη

φαινολική ένωση ήταν η ναρινγενίνη για το θρούμπι, η κισσιμαριτίνη για το δίκταμο και μια μεθυλο φλαβόνη για το δεντρολίβανο.

Τέλος στα εκχυλίσματα εξετάστηκε η αντιμικροβιακή τους ικανότητα ενάντια σε μικροοργανισμούς επιλεγμένων κατηγοριών με την μέθοδο διάχυσης άγαρ-πηγαδιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειοψηφία των μικροοργανισμών ήταν περισσότερο ευαίσθητη στον πετρελαϊκό αιθέρα και μετά στον διαιθυλαιθέρα λόγω της αντιμικροβιακής ιδιότητας που παρουσιάζουν τα επιμέρους κυριότερα συστατικά αυτών των εκχυλισμάτων.

Επιστημονική περιοχή εργασίας: ενόργανη ανάλυση, αντιοξειδωτική δράση, αντιμικροβιακή δράση

Λέξεις κλειδιά: Δίκταμο, δεντρολίβανο, θρούμπι, πτητικά συστατικά, GC-MS, φαινολικά συστατικά, LC-MS, Folin-Ciocalteu, αντιοξειδωτική δράση με DPPH, αντιμικροβιακή δράση με διάχυση άγαρ-πηγαδιού

ABSTRACT

During the experimental processing, 5g of aromatic and medicinal herbs widely known in the Mediterranean flora and used in diet (dittany, rosemary and savory) were steeped sequentially in 100 mL petroleum ether, hexanium and diethylether with the use of ultra sound (35MHz). At the next stage the samples were steeped in 800 mL methanol in conditions of absence of light. The solvent removal was firstly performed by vacuum evaporator until the volume of 20 mL and secondly with nitrogen flow.

For the extracts it was determined the total phenolic content (in terms of mg caffeic / g solid extract and of mg caffeic acid / g dry weight) using a Folin-Ciocalteu assay and also the antioxidant activity (in term of μM Trolox and IC_{50}) by DPPH assays. Moreover it was estimated the linearity correlation of those results where no correlation was proved between those methods afterall. The total phenolic content was fluctuated between 0,03-0,54 mg caffeic acid / g solid extract and between 1,14-51,66 mg caffeic acid / g dry weight while antioxidant activity using the DPPH assay was fluctuated between 14,31-445,8 μg / mL and 4,4-42,8 μM Trolox. From the above was found that the highest antioxidant capacity was in rosemary, while the highest phenolic content was in dittany in all solvents totally.

Afterwards the % qualitative and quantitative assignment of volatile compound of infusions was found using gas chromatography with mass spectrometry detector (GC-MS), and the major volatile constituents were found, were carvacrol for dittany and savory and eucalyptol for rosemary for the infusions of petroleum ether and as for the hexanium infusions, carvacrol was also the major constituent for dittany and savory but in rosemary the major one was verbenone.

Additionally the % qualitative and quantitative assignment of phenolic compounds of diethylether and methanol infusions was found using liquid chromatography with mass spectrometry detector. The results showed that in methanol infusions the main phenolic compound in all plant samples was the rosmarinic acid, while in diethylether infusions the main phenolic compound was naringenin for savory, circimaritin for dittany and a methyl flavone for rosemary.

Finally the infusions were submitted in antibacterial activity test against selected microorganism categories with the agar-well infusion assay. The results showed that the majority of the microorganisms was more sensitive to petroleum ether infusions, followed by diethylether because of their individual components antibacterial activity.

Scientific field of this study: Instrumental analysis, antioxidant activity, antimicrobial activity

Keywords: Dittany, rosemary, savory, volatile compounds, GC-MS, phenolic compounds, LC-MS, Folin-Ciocalteu, DPPH assay antioxidant activity, agar-well infusion assay antimicrobial activity

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1) Παρουσίαση των βοτάνων

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία αυτής της μελέτης, ανήκουν στην οικογένεια Χειλανθών (*Lamiaceae*) και είναι το δίκταμο, το δενδρολίβανο και το θρούμπι.

1.1.1) Δίκταμος (*Origanum dictamnus*)



Το δίκταμο είναι ένα ενδημικό αυτοφυές φυτό της Κρήτης που αναπτύσσεται από 300 m της επιφάνειας της θάλασσας έως υψηλές κορυφές βουνών σε σκιερές, πετρώδεις και υγρές περιοχές. Συναντάται συνήθως σε ορεινές περιοχές και ευδοκμεί κυρίως στα απόκρημνα

βράχια του όρους Δίκτης απ' όπου οφείλει και το όνομά του, αλλά και των Λευκών Ορέων.

Το δίκταμο ήταν ευρύτερα γνωστό και στην αρχαιότητα το οποίο θεωρούνταν πολύτιμο φαρμακευτικό φυτό και χρησίμευε για διάφορες παθήσεις, αλλά και ως θεραπευτικό των τραυμάτων. Η θαυματουργή δύναμη του φυτού εκθειάζεται μέχρι και τον 4^ο αιώνα μ.Χ από πολλούς συγγραφείς. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε το δίκταμο στην νήσο Κω για θεραπεία παθήσεων της χολής, των πνευμόνων αλλά και ως κατάπλασμα στα πρηξίματα. Ο Διοσκουρίδης μεταχειριζόταν το φυτό για να γιατρέψει τα τραύματα από πολεμικά όπλα. Ενώ ο Αριστοτέλης αναφέρει ότι οι αϊγαγροι του Ψηλορείτη έτρωγαν δίκταμο, έγλυφαν με αυτό τις πληγές τους κι έτσι απέβαλλαν τα βέλη των κυνηγών, επουλώνοντας τις πληγές τους. Στον μεσαίωνα οι Βενεδικτίνοι και οι Τραπιστές και άλλοι καλόγεροι χρησιμοποιούσαν τον δίκταμο στα περίφημα λικέρ τους που θεωρούνταν σπουδαία ορεκτικά και χωνευτικά επιδόρπια. (Bauman, 1999)

Μορφολογικά το φυτό είναι θαμνώδες, ξηρόφυτο ύψους 30-40 cm και όλα τα υπέργεια τμήματα του καλύπτονται από χνούδι. Τα φύλλα είναι μικρά και παχιά και έχουν έντονη οσμή και στυφή ευχάριστη γεύση ενώ τα άνθη ξεπροβάλλουν μέσα από τα βράκτια φύλλα, έχουν βιολετί χρώμα και είναι λίαν αρωματικά. Είναι ποώδες αειθαλές, πολυετές φυτό και ανθίζει τον Ιούνιο- Ιούλιο. (Μπισμπίκης, 2007, Μπαζαίος, 1999, Εγκυκλοπαίδεια Φυτολογίας, 1983)

Τα χρήσιμα μέρη που αποτελούν το βότανο του δίκταμου είναι τα φύλλα και τα άνθη του τα οποία συλλέγονται κατά την πλήρη άνθηση του φυτού δηλαδή αρχές καλοκαιριού, είτε τέλη Μάιου, είτε δύο μήνες αργότερα όπου το φυτό είναι «πλήρες» στο αιθέριο έλαιο. Το δίκταμο αποτελεί ένα πολύτιμο είδος για το εξαγωγικό εμπόριο της Κρήτης, αλλά για να καλυφθούν οι ανάγκες του εμπορίου καλλιεργείται επίσης και σε άλλες χώρες όπως Αλγερία, και Γαλλία. Σήμερα η επάρκεια του φυτού έχει μειωθεί σημαντικά και έχει εκλείψει καθώς στο παρελθόν δεν καλλιεργούνταν συστηματικά, ενδεχομένως επειδή οι ανάγκες των ντόπιων πληθυσμών για την χρήση του φυτού καλύπτονταν μόνο με την συλλογή του φυτού από τις περιοχές που φύτρωνε. Έτσι εξαλείφτηκε σημαντική φυτική βλάστηση στο περιβάλλον.

Το δίκταμο έχει πολλαπλές ιδιότητες καθιστώντας το κατάλληλο για αντιμετώπιση πολλών ιατρικών παθήσεων. Οι στυπτικές του ιδιότητες το καθιστούν κατάλληλο φάρμακο για δερματικές παθήσεις (αποστήματα – δοθήνες) ως κατάπλασμα, οι επουλωτικές του ιδιότητες ενδείκνυνται για μικροτραυματισμούς, εγκαύματα και δήγματα εντόμων. Οι καταπραΰντικές του ιδιότητες βοηθούν στις στομαχικές διαταραχές καταπραΰνοντας τους πόνους αλλά και τους πόνους της κοιλιακής χώρας (αντιδυσεντερικό) παρέχοντας και χωνευτικές ιδιότητες, ενώ επιπλέον καθίσταται χρήσιμο ως μυοχαλαρωτικό-σπασμολυτικό με δράσεις ενάντια σε ισχυρούς μυϊκούς πόνους του αυχένα, μέσης κ.τ.λ. αλλά και ως αντιφλεγμονώδες ενάντια σε πόνους αρθρίτιδας και ρευματισμούς. Μια άλλη εξαιρετική χρήση του δίκταμου είναι η αντιγηραντική δράση του δέρματος κάτι που έχει ευρεία εφαρμογή σε καλλυντικά για αντιμετώπιση ακμής και σε κρέμες προσώπου για πρόληψη ερεθισμού της επιδερμίδας. Έπειτα το δίκταμο βοηθά σε καταστάσεις πονοκεφάλου, πονόδοντων και νευραλγιών. Επιπλέον οι τονωτικές του ιδιότητες βρίσκουν εφαρμογή στην παρασκευή διαλύματος αιθέριων ελαίων για αρωματοθεραπεία. Ακόμα λόγω των ανθελμινικών του ιδιοτήτων είναι κατάλληλο για παθήσεις της φαρυγγικής

κοιλότητας (καταπολέμηση βήχα, κρυολογήματος, πονόλαιμος, πνεύμονες, διαλείποντες πυρετοί) και σύμφωνα με την Griene, 1931 για ασθένειες σκορβούτου. Το δίκταμο φημίζεται επίσης και ως εμμηναγωγό και διουρητικό. Τέλος χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαφόρων αφεψημάτων και στην ποτοποιία παρασκευάζοντας λικέρ – ποτά αρωματισμένα με διάφορες αρωματικές ουσίες. (Μπαζαίος, 1999)

1.1.2) Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)



Ένα αιθαλές φυτό, τοπικό της Μεσογειακής χλωρίδας. Στην Ελλάδα είναι αυτοφυές σε περιοχές της Στερεάς Ελλάδας και σε ορισμένα νησιά του Ιονίου. Χρησιμοποιούνταν από τους αρχαίους χρόνους για ιατρικούς σκοπούς. Είναι θάμνος

ύψους 0,5-2m όρθιος πολύκλαδος και πυκνόφυλλος, αρωματικός. Έχει φύλλα βελονοειδή, δερματώδη, ακέραια που η περιφέρειά τους γυρίζει προς τα κάτω. Η κάτω επιφάνεια των φύλλων φέρει άφθονες τρίχες γι' αυτό έχει χρώμα λευκοπράσινο. Τα άνθη είναι κυανόλευκα, λευκωπά ή ανοικτά ιώδη και βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων ή στις άκρες των βλαστών. Τα φύλλα και τα άνθη του δενδρολίβανου έχουν έντονη αρωματική οσμή και πικρή καμφορούχο γεύση. Καλλιεργείται εύκολα σε κήπους ή γλάστρες και πολλαπλασιάζεται με παραφυάδες. Οι ανθισμένες κορυφές συλλέγονται από τον Μάιο έως τον Σεπτέμβριο, ενώ τα φύλλα κατά την διάρκεια ή μετά την πλήρη άνθιση. Πολύ συχνά καλλιεργείται ως καλλωπιστικό και χρησιμοποιείται ως άρτυμα εις την μαγειρική. Εξ' αιτίας του αιθέριου ελαίου που περιέχουν τα φύλλα και άνθη του, χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική και την αρωματοποιία. Η μεγαλύτερη ποσότητα του αιθέριου ελαίου προέρχεται από την Νότια Γαλλία, την Ισπανία, την Β. Αφρική και τις Δαλματικές ακτές.

Στην φαρμακευτική χρησιμοποιείται γιατί δρα ως χολαγωγό, διουρητικό, εμμηναγωγό και τονωτικό. Είναι επίσης γνωστό για τις αντισηπτικές (Bult et al., 1985, Rampart et al., 1986, αντιπρευματικές (Makino et al., 2000), αντιπλεγμονώδεις

(Juhas et al., 2009, Beninca et al., 2011 και αντισπασμωδικές ιδιότητες. Τα διάφορα εκχυλίσματα δενδρολίβανου έχουν μελετηθεί για ηπατοπροστατευτικές (Sotelo-Felix et al., 2002, Amin and Hamza, 2005), αντιδιαβητικές (Bakirel et al., 2008, Abu-Al-Basal, 2010), αντι-ελκογενείς (Dias et al., 2000) και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες (Machado et al., 2009).

Στην αρωματοποιία το αιθέριο έλαιο χρησιμοποιείται για την παρασκευή κολόνιας, σαπουνιών κ.α και για τον αρωματισμό φαρμάκων. Τέλος στην κτηνιατρική χρησιμοποιείται ως αντιπαρασιτικό για την θεραπεία της τριχόπτωσης. (Εγκυκλοπαίδεια Φυτολογίας, 1983)

1.1.3) Θρούμπι (*Satureja hortensis*)



Το θρούμπι είναι ένα αρωματικό ετήσιο ποώδες φυτό της οικογένειας των Χειλανθών το οποίο σπέρνεται κάθε χρόνο για καλλιέργεια και σπανιότερα απαντάται στην φύση, ιδίως στις κεντρικές-βόρειες περιοχές, σε λόφους και πεδιάδες. Το φυτό ευδοκίμει στην ανατολική Μεσόγειο και καλλιεργείται σε πολλές περιοχές, ιδιαίτερα στην Γαλλία και Ισπανία.

Το φυτό είναι θαμνώδες με μακριά ρίζα και πολύκλαδο στέλεχος (30 εκ.). Οι βλαστοί είναι ορθοφυείς, ορθογώνιοι και τα φύλλα είναι αντίθετα, βελονοειδή, ανοιχτοπράσινα και καλύπτονται από λεπτό χνούδι. Τα λευκά ή ρόδινα άνθη εμφανίζονται το καλοκαίρι κατά μασχαλιαίους σπονδύλους. Όταν ωριμάσουν μετατρέπονται σε σφαιρικό αχάινιο.

Καλλιεργείται εύκολα και αναπτύσσεται χωρίς καμιά δυσκολία σε οποιοδήποτε τύπο εδάφους ιδίως τα ξηρά και καλά ηλιαζόμενα. Ο πολλαπλασιασμός του γίνεται μέσω σποράς ή διαίρεσης των ριζών.

Τα φύλλα συλλέγονται λίγο πριν την ανθοφορία και οι ταξιανθίες όταν έχουν ανθίσει πλήρως. Τα ξηρά φύλλα είναι καστανοπράσινα με ευχάριστο άρωμα και ελαφριά οξεία γεύση και μαζί με τις αποξηραμένες ανθισμένες κορυφές των βλαστών τους,

φέρονται στο εμπόριο ως θρούμπι και χρησιμοποιούνται ως αρωματικά πολλών φαγητών ιδιαίτερα πουλερικών και γέμισης.

Στην Γερμανία το θρούμπι χρησιμοποιείται σε πολλά λαχανικά και σαλάτες ενώ είναι πολύ συνηθισμένο σε μπουκέτα αρωματικών βοτάνων. Οι αρχαίοι Έλληνες και Ρωμαίοι το χρησιμοποιούσαν μαζί με θυμάρι για να αρωματίσουν την γέμιση που χρησιμοποιούσαν σε διάφορα εδέσματα καθώς και στο κυνήγι. Την εποχή των καισάρων οι Ρωμαίοι έφεραν το Θρούμπι στην Αγγλία όπου είναι και σήμερα δημοφιλές. Σήμερα εκτιμάται πολύ ως καρύκευμα για τα λαχανικά και φαγητά.

Το θρούμπι επιπλέον χρησιμοποιείται και στην φαρμακευτική καταπολεμώντας τα σκουλήκια και τις φλεγμονές του εντέρου, τον μετεωρισμό, την κούραση και τις πεπτικές διαταραχές. Παλαιά θεωρείτο ότι διέθετε αφροδισιακές ιδιότητες και το χρησιμοποιούσαν στο λουτρό μαζί με δενδρολίβανο, φασκόμηλο και λουίζα. Επιπλέον διεγείρει τις φυσικές και εγκεφαλικές λειτουργίες. Τέλος το θρούμπι έχει εμφανίσει αντισπασμωδικές, αντιδιαρροϊκές, αντιοξειδωτικές, ηρεμιστικές καθώς και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Deans and Svoboda, 1989, Hajhashemi et al., 2000, Leung and Foster, 1996, Madsen et al., 1996, Zargari, 1990). (Franconeri, 2004, Beutner, 2004, Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάνικα, 1996)

1.2) Βιολογική δράση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά αποτελούν μια αξιόπιστη πηγή για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων (Hoareau and Da Silve, 1999). Έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική για την εξάντληση, αδυναμία, κατάθλιψη, ενίσχυση της μνήμης, βελτίωση της κυκλοφορίας, ενίσχυση των αιμοφόρων αγγείων (Wang et al., 2004), μόλυνση, φλεγμονή (Vieira, 2010), δυσπεψία και γαστρίτιδα (Hajimehdipoor et al., 2010). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι αυτά τα φυτά αποτελούν πηγή από συστατικά με αντιοξειδωτικές (Zheng and Wang, 2001), αντιμικροβιακές (Moreno et al., 2006), αντιφλεγμονώδεις (Al-Sereiti et al., 1999), αντι-αλλεργικές (Ito et al., 1998) και αντικαταθληπτικές (Takeda et al., 2002) ιδιότητες. (Shekarchi et al., 2012)

Τα συστατικά - δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν συσχετιστεί με τις παραπάνω ιδιότητες των παραπάνω είναι φαινολικά συστατικά και τερπενοειδείς ενώσεις. Τερπένια και φαινολικά συστατικά έχουν απομονωθεί από φυτά, φρούτα, λαχανικά καθώς και σε αρωματικά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*.

1.2.1) Αντιοξειδωτική δράση των βοτάνων

Στις μέρες μας, η έρευνα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως των τερπενίων και των φαινολικών συστατικών, έχει επικεντρωθεί, τόσο σε βιολογικό επίπεδο, όσο στον τομέα των τροφίμων.

Σε βιολογικό επίπεδο, το οξυγόνο συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπών, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Τα ενεργά ήδη οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) είναι ουσιώδη για τον εφοδιασμό του οργανισμού με ενέργεια, για αποτοξίνωση, για χημικά σήματα και για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράγονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό και ελέγχονται από ενδογενή ένζυμα. Παρ' όλα αυτά, το οξυγόνο είναι έντονα αντιδρών άτομο και είναι πιθανό να δημιουργήσει μόρια που ονομάζονται «ελεύθερες ρίζες». Μια ελεύθερη ρίζα είναι οποιαδήποτε ένωση υπάρχει ανεξάρτητα και η οποία περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell et al., 1994). Οι ρίζες αυτές έχουν την ικανότητα να επιτίθενται στα υγιή κύτταρα του σώματος, μπορούν να αντιδράσουν με κυτταρικά λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, οδηγώντας σε τοπική βλάβη και ενδεχόμενη δυσλειτουργία οργάνων. Έτσι λοιπόν όταν υπάρχει υπερπαραγωγή των ειδών αυτών, έκθεση σε ένα εξωτερικό οξειδωτικό μέσο ή ανεπάρκεια στον μηχανισμό άμυνας, μπορεί να προκληθούν σοβαρές αλλοιώσεις σε πολύτιμα βιομόρια όπως είναι το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες (Aguoma, 1998), ενώ επίσης οι ελεύθερες ρίζες έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη και εξέλιξη αρκετών φλεγμονωδών νόσων που σχετίζονται με την ηλικία (Roger et al., 2000) καθώς και με αυξανόμενο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνο και άλλες χρόνιες ασθένειες. Σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις παίζουν ένα σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην απόπτωση, αγγειακό τόνο, ρύθμιση ορμονών, ανοσολογική και προσαρμοστική ανταπόκριση στα ένζυμα (Kelly, 1997). Ωστόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι επιβλαβείς.

Πίνακας 1.2.1: ROS και οι πηγές τους που εμπλέκονται στην ανταπόκριση δευτερογενούς τραυματισμού ακολουθούμενου από βλάβη προκληθείσης από τραύμα

ROS	Σύμβολο	Πηγή
ανιόν υπεροξειδίου	$O_{2}^{\bullet-}$	μεταβολισμός αραχιδονικού οξέος δράση οξειδάσης της ξανθίνης, μιτοχονδριακή διαρροή
υπεροξειδίο υδρογόνου	H_2O_2	αποσύνθεση υπεροξειδίου καταλυόμενη από SOD
ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου	HO^{\bullet}	αντίδραση Fenton
νιτρικό οξείδιο	NO^{\bullet}	δραστηριότητα της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS)
υπεροξυνιτρικό ανιόν	$OONO^{\bullet}$	η αντίδραση του $\bullet NO$ με την $O_2^{\bullet-}$
υπεροξύλιο λιπιδίου	LOO^{\bullet}	η αντίδραση της ελεύθερης ρίζας (L^{\bullet}) με το οξυγόνο, αποσύνθεση του υδροϋπεροξειδίου του λιπιδίου (LOOH) από τον Fe^{3+}
αλκόξύλιο λιπιδίου	LO^{\bullet}	αποσύνθεση του (LOOH) από Fe^{2+}

Ευτυχώς ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να περιοριστεί με φυσικό τρόπο από ποικιλία ευεργετικών συστατικών που είναι γνωστά ως αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν και προλαμβάνουν τις αλλοιώσεις που προκύπτουν από την οξείδωση, ενώ η αυξημένη κατανάλωσή τους μέσω της διατροφής μειώνει τους κινδύνους των χρόνιων νοσημάτων (Stanner et al., 2004). Επιπλέον σύμφωνα με τους O'Donovan and Fernades, 2004 η έλλειψη αντιοξειδωτικού συστήματος και η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, σχετίζεται με ορισμένες ασθένειες νεογνών όπως βροχοπνευμονική δυσπλασία, ενδοκοιλιακή αιμορραγία και αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας. Αυτό εξηγεί τον μεγάλο όγκο των ερευνών και την προσπάθεια πολλών ερευνητών να συνδυάσουν την διατροφή που είναι πλούσια σε φυσικά αντιοξειδωτικά με εκφυλιστικές ασθένειες.

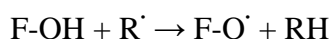
Τα βότανα και καρυκείματα χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα όχι μόνο για τις μαγειρικές ιδιότητες αλλά επίσης και ως συντηρητικά και φάρμακα (Dorman et al.,

2004). Τα σύγχρονα διατροφικά προγράμματα συχνά συνιστούν ορισμένα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά ως λειτουργικά τρόφιμα, π.χ τροφές που παρέχουν επιπρόσθετα φυσιολογικά οφέλη πέρα και πάνω από τις κανονικές θρεπτικές απαιτήσεις, όπως η πρόσληψη ή η καθυστέρηση της εμφάνισης χρόνιων ασθενειών (Nicoli et al., 2011). Πολλά λειτουργικά τρόφιμα είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά και ως εκ τούτου τουλάχιστον θεωρητικά, βοηθούν στην μείωση της επίδρασης των χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία (Krishnaih et al., 2007). Γι' αυτό τον λόγο υπάρχει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα πιθανά οφέλη της υγείας από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά που έχουν την μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης των ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS). Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι πιο ισχυρά και λιγότερο τοξικά από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στην βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων (Liscovitch and Lavie, 2002, Lizcano et al., 2010, Hossain and Rahman, 2011) και εμπεριέχονται στην διατροφή των ανθρώπων (Meunier et al., 1990, Ariga et al., 1989). (Goncalves et al., 2012)

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών έχει προαχθεί λόγω της ανησυχίας που προκύπτει από την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών (Iragashi et al., 1993, Kozłowska et al., 1990). Τα αντιοξειδωτικά αυτά μαζί με εναλλακτικά φυσικά συστατικά, όπως είναι οι φαινόλες των φυτών, παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα ή και ακόμα υψηλότερη από αυτή των συνθετικών αντιοξειδωτικών (Beutner et al., 2001, Williams et al., 1999). (Antolovich et al., 2001).

Τα φαινολικά συστατικά έχουν αντικαρκινικές, αντικαρκινογόνες/αντιμεταλλαξιογόνες, αντιμικροβιακές, αντικές και αντιφλεγμονώδης ιδιότητες σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό (Cassidy et al., 2000, Gao et al., 2000, Tapiero et al., 2002) : Οι φυσιολογικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες μπορεί να προέρχονται από την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται έντονα με τις δομές των φαινολικών συστατικών (Shahidi and Naczki, 1995, Rice-Evans et al., 1996, Heim et al., 2002). Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριοι τύποι των φαινολικών συστατικών και γι' αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα η σχέση της δομής τους και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που διαθέτουν σε υδατικά ή λιπόφιλα συστήματα (Rice-Evans et al., 1996, Cao et al., 1997, Arora et al., 1998, Lien et al., 1999, Natella et al., 1999, Burda et al., 2001, Nenadis et al., 2004).

Γενικά η αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τις θέσεις των υδροξυλομάδων και ορισμένων άλλων υποκαταστατών καθώς και από την γλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών. Η θέση των υποκαταστατών στο χώρο θεωρείται ότι είναι ο πιο σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την κύρια δομή της φλαβόνης. Σύμφωνα με τα περισσότερα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά, η διαμόρφωση αλλά και ο συνολικός αριθμός των υδροξυλομάδων επηρεάζουν πολλούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δράσης (Burda et al., 2001, Cao et al., 1997, Haenen et al., 1997). Η παρεμποδιστική ικανότητα των ελευθέρων ριζών αρχικά αποδίδεται στην υψηλή δραστηριότητα των υδροξυ υποκαταστατών που συμμετέχουν στην παρακάτω αντίδραση:



Η διαμόρφωση των υδροξυλίων στο Β-δακτύλιο είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας παρεμπόδισης των ενεργών ειδών οξυγόνου (Burda et al., 2001) και αζώτου (Kerry et al., 1999, Haenen et al., 1997). Οι υδροξυλομάδες στον Β-δακτύλιο είναι δότες υδρογόνου και ενός ηλεκτρονίου στην υδροξυ και υπεροξυ ρίζα, τις σταθεροποιούν και δίνουν την δυνατότητα δημιουργίας μιας σχετικά σταθερής φλαβονοειδής ρίζας. Μεταξύ δομικών ομόλογων φλαβονών και φλαβονονών, η παρεμπόδιση των υπεροξυ και υδροξυ ομάδων αυξάνονται γραμμικά και καμπυλόγραμμα, σύμφωνα με τον συνολικό αριθμό των υδροξυλίων.

Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των πολυυδροξυλιωμένων και πολυμεθοξυλιωμένων φλαβονοειδών είναι πιο πιθανές λόγω των διαφορών στην υδροφοβικότητα και στην μοριακή επιπεδότητα. Η κερκετίνη είναι πιθανώς παρεμποδιστής μιας υπεροξυ ρίζας, που ακολουθείται από Ο-μεθυλιωμένα και Ο-γλυκοσυλιωμένα παράγωγα (Dugas et al., 2000). Καταστολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας με Ο-μεθυλίωση (Burda et al., 2001, Dugas et al., 2000), Arora et al., 1998) μπορεί να επηρεάσει τον χώρο διαταράσσοντας την στερεοχημεία, αν και η αναλογία των μεθοξυ ομάδων προς υπεροξυ ομάδων δεν προβλέπει απαραίτητα την παρεμποδιστική ικανότητα ενός φλαβονοειδούς. Ο Β-δακτύλιος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην θέση της μεθοξυ ομάδας (Heim et al., 2002).

Η παρουσία συγκεκριμένων υδροξυλομάδων στα φλαβονοειδή εμπλουτίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Μοτίβα στον Α και Β δακτύλιο καθώς και ο 2,3 διπλός

δεσμός και η 4-οξο ομάδα στον Γ δακτύλιο επίσης επηρεάζουν την ικανότητα αυτή. Η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την ικανότητα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες αγλυκόνες (Gao et al., 1999, Ratty et al., 1988). Επιπλέον υπάρχουν ορισμένες μελέτες για την σχέση της δομής και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων κουμαρινών, λιγνίνης, ταννινών και κινονών και μερικών συνθετικών κουρκουμινοειδών και στιλβενίων (Cai et al., 2004b, Lu et al., 2002, Cassidy et al., 2000, Yokozawa et al., 1998, Foti et al., 1996, Κανέλλου, 2011).

Το ροσμαρινικό οξύ είναι ένα φαινολικό συστατικό που έχει ανεβρεθεί σε οργανικά και υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών. Είναι ένας εστέρας του καφεϊκού οξέος και του 3,4-διϋδροξυφαινυλλακτικού οξέος (Wang et al., 2004), το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα φύλλα του δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* L.) και αργότερα βρέθηκε σε άλλα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* και *Boraginaceae*. Το ροσμαρινικό οξύ έχει ενδιαφέρουσες ιδιότητες που το έχει οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, από συντηρητικά μέχρι σε καλλυντικά προϊόντα (Peterson and Simmonds, 2003). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση του ροσμαρινικού οξέος είναι περισσότερη από την βιταμίνη E (Lin et al., 2002) ή του Trolox (Lu and Foo, 2002).

Εκτός από το ροσμαρινικό οξύ, συστατικά με σπουδαία αντιοξειδωτική δράση είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη, δυο ισομερή τα οποία σε φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* πάντα αλληλοσυνοδεύονται (Tsimidou and Boskou, 1994). Έχει επίσης αποδειχτεί (Aeschbach et al., 1994) ότι η θυμόλη και η καρβακρόλη αναστέλλουν την υπεροξειδωση των φωσφολιπιδίων των λιποσωμάτων κατά ένα τρόπο εξαρτώμενο από την συγκέντρωση. Έτσι λοιπόν το ότι πολλά αιθέρια έλαια φυτών που είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αποδόθηκε στο ότι τα κυριότερα συστατικά τους ήταν η καρβακρόλη και η θυμόλη, όπως το αιθέριο έλαιο του *Thymus Serpyllus* έδειξε μια παρεμπόδιση ελευθέρων ριζών κοντινή σε αυτή του συνθετικού BHT σε ένα σύστημα β-καροτενίου-λινολεϊκού οξέος (Tere et al., 2005) κάτι που αποδόθηκε στο υψηλό περιεχόμενο θυμόλης και καρβακρόλης σε αντίστοιχα ποσοστά 20,5% και 58,1%. Επίσης το αιθέριο έλαιο του *Thymus Spathulifolius* κατείχε αντιοξειδωτική δράση επίσης εξαιτίας λόγω του υψηλού περιεχομένου καρβακρόλης, θυμόλης σε ποσοστά 29,8% και 36,5% αντίστοιχα (Sokmen et al., 2004), ενώ η αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης ήταν συγκρίσιμη με αυτήν της α-τοκοφερόλης και του

BHT αλλά λιγότερο αποτελεσματική από ότι στο ασκορβικό οξύ (Kulisic et al., 2004) κάτι που αποδόθηκε ξανά στο περιεχόμενο καρβακρόλης και θυμόλης (32% και 35% αντίστοιχα).

Στο αιθέριο έλαιο του *Thymus mastichina*, *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* έδειξε αντιοξειδωτική δράση που ήταν σε κάποιες περιπτώσεις ίσες με της α-τοκοφερόλης (Miguel et al., 2004) και τα τρία αυτά είδη απροσδόκητα χαρακτηρίστηκαν από υψηλό περιεχόμενο σε λιναλοόλη και ευκαλυπτόλη, ενώ η καρβακρόλη και θυμόλη ήταν σχεδόν απύσες. Το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου (*Mellissa officinalis*) δείχνει μια αντιοξειδωτική δράση και μια δράση παρεμπόδισης ελεύθερων ριζών (Mimica-Dukic et al., 2004) με τα πιο ισχυρά συστατικά παρεμπόδισης την νεράλη/γερανιάλη, κυκτρονελλάλη, ισομενθόνη και μενθόνη. Επίσης το έλαιο του *Melaleuca alternifolia* προτάθηκε για φυσικό αντιοξειδωτικό εναλλακτικό για το BHT (Kim et al., 2004) με την εγγενή αντιοξειδωτική δράση που αποδίδεται κυρίως στο περιεχόμενο του α-τερπινενίου, γ-τερπινενίου και α-τερπινολενίου, ενώ αιθέρια έλαια που απομονώθηκαν από *Mentha aquatica* L., *Mentha longifolia* L. και *Mentha piperita* L. ήταν σε θέση να μειώσουν τις ελεύθερες ρίζες του DPPH στην ουδέτερη μορφή DPPH-H (Mimica–Dukic et al., 2003) όπου τα πιο ισχυρά συστατικά της παρεμπόδισης ήταν η ευκαλυπτόλη για το *M.aquatica* και η μενθόνη και η ισομενθόνη ήταν οι δραστικές αρχές των *M. Longifolia* και *M. Piperita*. (Edris et al., 2007)

1.2.2) Αντιμικροβιακή δράση των βοτάνων

Η αύξηση στην αντοχή των αντιβιοτικών και το αναπτυσσόμενο ενδιαφέρον στα φυσικά προϊόντα έχουν κατατάξει τα φαρμακευτικά φυτά στην πρώτη γραμμή ως αξιόπιστη πηγή για την ανακάλυψη δραστικών αντιμικροβιακών παραγόντων και πιθανώς ακόμη και νέων κατηγοριών αντιβιοτικών (Saleem et al., 2010). Έχει διαπιστωθεί μακρά ότι οι φυσικές ουσίες που απαντούν στα φυτά, έχουν αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές δραστηριότητες. Η παρουσία ενός ευρέως φάσματος φυτοχημικών όπως τα φαινολικά συστατικά έχει προταθεί ότι ασκεί τόσο αντιβακτηριακές, αντι-ιικές και αντισηπτικές επιδράσεις (Romani et al., 2006), όσο

και εξίσου ότι προστατεύουν το ανθρώπινο σώμα ενάντια σε οξειδωτική βλάβη (Ksouri et al., 2008).

Η παρουσία και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση και να οδηγήσει σε μείωση της ποσότητας και της ποιότητας (Soliman and Badeaa, 2002). Ένας από τους δύο μηχανισμούς που καθορίζουν πως προκαλούνται κυρίως οι τροφιμογενείς ασθένειες, είναι μέσω της μόλυνσης ως συνέπεια της κατανάλωσης τροφίμων μολυσμένων με την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μούχλα, ιοί και παράσιτα (Vattem et al., 2004). Εκτός από την παθητική μεταφορά των παθογόνων στα τρόφιμα, η ενεργητική ανάπτυξη ενός παθογόνου μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε τρόφιμα, για παράδειγμα εξ αιτίας της ακατάλληλης αποθήκευσης η οποία οδηγεί σε σημαντικές αυξήσεις στο μικροβιακό φορτίο (Madigan et al., 1997). Γι' αυτούς τους λόγους η μικροβιακή μόλυνση των τροφίμων θέτει ακόμα σημαντικά ζητήματα δημόσιας υγείας και οικονομικά, για την ανθρώπινη κοινωνία.

Επιπλέον κάποια φαινοτικά (ταννίνες) έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν ορισμένους ιούς και βακτήρια από τον ιό της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV) και το *Helicobacter pylori* που προκαλεί έλκη (Funatogawa et al., 2004). (Falleh et al., 2012), (Edris, 2007), (Graca-Miguel, 2010).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών όπως τα αιθέρια έλαια και τα φυτικά εκχυλίσματα (Tere et al., 2004), μελετώνται για τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες και τα περισσότερα αιθέρια έλαια που προέρχονται από τα φυτά, είναι γνωστό ότι διαθέτουν εντομοκτόνες, αντιμυκητιακές, ακαρεοκτόνες, αντιβακτηριακές και κυτταροτοξικές δράσεις (Faleiro et al., 1999). Επομένως οι δευτερογενείς μεταβολίτες ελέγχονται εντατικά και εφαρμόζονται στους τομείς της φαρμακολογίας, φαρμακευτικής βοτανολογίας, ιατρικής και κλινικής μικροβιολογίας, φυτοπαθολογίας και συντήρησης τροφίμων (Daferera et al., 2000). (Celictas et al., 2007)

Έχει εκτιμηθεί ότι από τα 3000 αιθέρια έλαια που είναι γνωστά, τα 300 έχουν εμπορική σημασία και προορίζονται κυρίως για τις γεύσεις και τα αρώματα της αγοράς (Van de Braak and Leijten, 1999). Έχει αναγνωριστεί εδώ και καιρό ότι κάποια αιθέρια έλαια διαθέτουν και αντιβακτηριακές ιδιότητες (Deans and Ritchie, 1987, Carson et al., 1995a, Mourey and Canillac, 2002). Αυτές οι αντιβακτηριακές

ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους αξιοποιούνται σε διάφορες περιπτώσεις των εμπορικών προϊόντων όπως εμφρακτικό υλικό ριζικών σωλήνων των δοντιών (Manabe et al., 1987), αντισηπτικά (Baker and Garbe, 1985), Cox et al., 2000) και συμπληρώματα ζωοτροφών για θηλάζουσες χοιρομητέρες και απογαλακτισμένα χοιρίδια (Van Krimpen and Binnendijk, 2001, Llsley et al., 2002). Επίσης υπάρχουν και λίγα συντηρητικά τροφίμων που περιέχουν αιθέρια έλαια που είναι εμπορικά διαθέσιμα (Burt, 2004).

Μεταξύ όλων των ομάδων των φυτικών μεταβολιτών, τα διτερπένια θεωρούνται ότι παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης και της βακτηριακής δραστηριότητας (Kuzma et al., 2007, Almeida et al., 2008, Porto et al., 2009, Porto et al., 2009). Αναζητήσεις στην επιστημονική βιβλιογραφία με τις βάσεις δεδομένων PubMed και Scifinder έχουν αποδείξει ότι ορισμένες κατηγορίες διτερπενοειδών όπως η πιμαράνη, κλεροδάνη, καουράνη, ισοπιμαράνη, λαβδάνη, και άλλες μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανή πηγή αντιμικροβιακών παραγόντων. (Stavri et al., 2009, Habtemariam, 2003, Wiart et al., 2005, Radulovic et al., 2010, Woldemichael et al., 2003, Kalpoutzakis et al., 1998).

Προσφάτως μια ερευνητική ομάδα απέδειξε ότι ορισμένα διτερπένια πιμαράνης είναι ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη των κύριων μικροοργανισμών που ευθύνονται για ασθένειες περιοδοντίου με πολλές υποσχόμενες τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) (Carvalho et al., 2011). Αυτά τα αποτελέσματα επέτρεψαν να συνταχθεί το συμπέρασμα ότι αυτή η κατηγορία των φυσικών προϊόντων είναι μια σημαντική πηγή για την ανακάλυψη νέων αποτελεσματικών βιοδραστικών μεταβολιτών για τον έλεγχο της περιοδοντίτιδας (Souza et al., 2011).

Τα φαινορικά συστατικά καρβακρόλη και θυμόλη παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση και υπάρχουν πολλές αναφορές που τα αποδεικνύουν. Στην μελέτη των Penalver et al., 2005 βρέθηκε ότι η αναστολή που έδειξαν τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού ενάντια σε βακτηριακά στελέχη όπως *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuais* και *Salmonella typhimurium*, σχετίστηκε άμεσα με την καρβακρόλη και την θυμόλη. Η ίδια συσχέτιση επιβεβαιώθηκε για έλαια πλούσια μόνο σε καρβακρόλη (Santoyo et al., 2006).

Πράγματι εκτός από την ικανότητα ορισμένων αιθέριων ελαίων των φυτών να παρεμποδίζουν τις ελεύθερες ρίζες, υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι ορισμένα αιθέρια έλαια διαθέτουν αντιφλεγμονώδη δράση. Για παράδειγμα το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και αιώνες ως αντιφλεγμονώδες και επίσης για την ανακούφιση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με έκζεμα, δερματίτιδα και άλλων έντονων ερεθισμών (Kamatou and Viljoen, 2010). Επίσης οι στυπτικές δραστηριότητες που έχουν οι ταννίνες του φασκόμηλου ωφελούν στην αναστολή της φλεγμονής των ούλων (Willershausen et al., 1991). Ωστόσο υπάρχουν και άλλα παραδείγματα αιθέριων ελαίων (ευκαλύπτου, δεντρολίβανου, λεβάντας, *millefolia*) μαζί με άλλα φυτά (πεύκο, γαρύφαλλο και μύρο) που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μικτές συνθέσεις σαν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Darsham and Doreswamug, 2004).

Οι περισσότερες αγωγές χημειοθεραπείας του καρκίνου χρησιμοποιούν άκρως κυταροτοξικά φάρμακα που στοχεύουν τους πολλαπλασιαζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς. Όμως αυτή η «αμερόληπτη» φύση αυτών των φαρμάκων οδηγεί σε σοβαρές παρενέργειες στα φυσιολογικά κύτταρα με έναν υψηλό πολλαπλασιαστικό δείκτη όπως εκείνων της γαστρεντερικής οδού και του μυελού των οστών, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματική δόση του αντικαρκινικού φαρμάκου που μπορεί να χορηγηθεί. Η ποικιλόμορφη θεραπευτική δυνατότητα των αιθέριων ελαίων έχει τραβήξει την προσοχή των ερευνητών για να τα δοκιμάσουν για αντικαρκινική δραστηριότητα, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι ο μηχανισμός δράσης τους είναι ανόμοιος με αυτόν των κλασικών κυταροτοξικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Rajesh et al., 2003). Πρόωρες εκθέσεις ανέφεραν ότι βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου ιδίως τα μονοτερπένια, έχουν πολλαπλές φαρμακολογικές επιδράσεις στον μεταβολισμό του μεβαλονικού οξέος η οποία θα μπορούσε να ληφθεί υπόψη για την ογκοκατασταλτική δραστηριότητα των τερπενίων (Elson, 1995).

Τα αιθέρια έλαια των βοτάνων και τα μεμονωμένα αρωματικά συστατικά τους έδειξαν κατασταλτική ιδιότητα στον καρκίνο όταν δοκιμάστηκαν σε ένα αριθμό ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών γραμμών συμπεριλαμβανομένων του γλοιώματος (ενός από τους πιο κακοήθεις ανθρώπινους όγκους), καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνο του μαστού, της λευχαιμίας και άλλων (De Angelis, 2001). Η αμπισαμπολόλη μια κύρια σεσκιτερπενική αλκοόλη στο χαμομήλι μπορεί να θεωρηθεί ως ένας υποσχόμενος επαγωγέας της απόπτωσης σε ιδιαίτερα κακοήθη κύτταρα

γλοιώματος, ενώ παράλληλα δεν είναι ούτε τοξική για τα ζώα, ούτε μειώνει την βιωσιμότητα των κανονικών αστρογλοιακών κυττάρων (Cavalieri et al., 2004). Η γερανιόλη, μια μονοτερπενική αλκοόλη, προκάλεσε μια δραματική μείωση των ποσοτήτων στην έκφραση των ενζύμων θυμιδυλικής συνθάσης (TS) και κινάσης της θυμιδίνης (TK) σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Carnesecchia et al., 2004). Ενώ αγωγή σε κύτταρα ανθρώπινης λευχαιμίας HL-60 με ευκαλυπτόλη (1,8-κινεόλη που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις του 60% - 90% στο αιθέριο έλαιο του ευκαλύπτου (Juergens et al., 1998) και 59% στο κάρδαμο (Huang et al., 1999), έδειξε μορφολογικές μεταβολές (θρυμματισμούς του DNA) που υποδήλωναν μια επαγωγή απόπτωσης (Moteki et al., 2002).

Η αρτηριοσκλήρωση είναι μια διαδικασία στην οποία οι καταθέσεις της πλάκας συσσωρεύονται στο εσωτερικό στρώμα της αρτηρίας, τον εσωτερικό χιτώνα (Barter, 2005). Η πλάκα τελικά μπορεί να μειώσει σημαντικά την ροή του αίματος, με αποτέλεσμα να οδηγούν σε σοβαρά προβλήματα υγείας. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των οξειδωτικών χαμηλά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDLs) στην χοληστερόλη παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της νόσου (Barter, 2005, Valenzuela et al., 2004, Steinberg, 1997, Daugherty and Roselaar, 1995). Επομένως η αρτηριοσκλήρωση μπορεί να επιβραδυνθεί ή να ανασταλεί με την παρεμπόδιση της οξείδωσης των LDL χρησιμοποιώντας μια υψηλή ημερήσια πρόσληψη αντιοξειδωτικών. Τα αιθέρια έλαια και τα πτητικά συστατικά του αρώματός τους έχουν δείξει μια αντιοξειδωτική δραστηριότητα ένα έναντι στην οξείδωση των LDL. Το τερπινολένιο ένας μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας, μπορεί αποτελεσματικά να αναστείλει την οξείδωση του τμήματος του λιπιδίου, όσο και του τμήματος της πρωτεΐνης των LDL. Αυτή η αναστολή οφείλεται στην καθυστερημένη οξείδωση των ενδογενών καρποτενοειδών των LDL, και όχι όπως συμβαίνει στην περίπτωση κάποιων φλαβονοειδών, προς την προστασία της ενδογενούς ατοκοφερόλης (Grassmann et al., 2003, 2005). Αιθέρια έλαια πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως η ευγενόλη και η θυμόλη έχουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα έναντι της οξείδωσης των LDL (Naderi et al., 2004) και αυτά τα συστατικά μπορούν επίσης να αλλάξουν την χημική συγγένεια των LDL σωματιδίων για τον LDL υποδοχέα. Τα αιθέρια έλαια και μερικά από τα επιμέρους συστατικά τους μπορούν επίσης να μειώσουν την ολική χοληστερόλη πλάσματος και τα επίπεδα

τριγλυκεριδίων τα οποία συμβάλουν στον σχηματισμό πλάκας και συνεπώς αρτηριοσκλήρωσης. Το μαύρο κυμινέλαιο (*Nigella sativa* Linn) βρέθηκε να μειώνει σημαντικά τις συγκεντρώσεις του πλάσματος της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, εξ αιτίας του υψηλού περιεχομένου της θυμοκινόνης (Ali and Blunden, 2003). Το α-κουρκουμένιο, το κύριο συστατικό (περίπου 65%) του αιθέριου ελαίου της ιαβανέζικης κουρκούμης (*Curcuma xanthorrhiza*), ασκεί την μείωση της δράσης των τριγλυκεριδίων στον ορό καθώς και στα τριγλυκερίδια του ήπατος (Yashi et al., 1994). Το αιθέριο έλαιο του σκόρδου μείωσε σημαντικά την χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια του ορού, ενώ παράλληλα αύξησε τα επίπεδα της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς με στεφανιαία καρδιακή νόσο (Bordia, 1981). Ενώ ενδοφλέβια χορήγηση του αιθέριου ελαίου του βασιλικού (*ocimum gratissimum*) προκάλεσε την άμεση και σημαντική υπόταση και βραδυκαρδία (Lahlou et al., 2004).

Η θρόμβωση συνήθως συνδέεται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των εικοσανοειδών που συμβάλλουν στην έναρξη και επιδείνωση της θρόμβωσης (Fitzgerald, 2001). Οι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες σήμερα που χρησιμοποιούνται γι' αυτό τον σκοπό είναι αποτελεσματικοί στην πρόληψη της θρομβοεμβολικής νόσου, αλλά πολλά από αυτά έχουν παρενέργειες όπως γαστρική διάβρωση (π.χ ασπιρίνη), ακοκκιοκυττάρωση (π.χ τικλοπιδίνη), δείχνουν έναν φτωχό διαχωρισμό μεταξύ της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και αιμορραγικών επιπλοκών (Van De Graaf and Steinhubl, 2001). Γι αυτόν τον λόγο τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν δοκιμαστεί για την δυνατότητα αντιθρομβωτικής δράσης. Το αιθέριο έλαιο της λεβάντας έδειξε ένα ευρύ φάσμα αντιαιμοπεταλιακής δράσης και ήταν σε θέση να αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από το ADP, αραχιδονικό οξύ και κολλαγόνο χωρίς προαιμορραγικές ιδιότητες (Balladenia et al., 2004), κάτι που φάνηκε να οφείλονταν στον οξικό λιναλυλεστέρα (36% στο λεβαντέλαιο) ως τον κύριο ενεργό αντιαιμοπεταλιακό παράγοντα. Επίσης το κρεμμύδι (*Allium cepa*) είναι γνωστό για την προώθηση της καρδιαγγειακής υγείας, και πληθυσμοί με υψηλή κατανάλωση κρεμμυδιών σχετίζονται με μειωμένα ποσοστά αρτηριοσκλήρωσης ή θρομβωτικής ασθένειας (Kendler, 1987).

1.2.3) Αντιοξειδωτικά

Το αντιοξειδωτικό ορίζεται (Gutteridge, 1994) ως «οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με την συγκέντρωση του οξειδούμενου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού». Επίσης ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί μια ουσία η οποία παρεμποδίζει τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τον οργανισμό. Για ευκολία τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται παραδοσιακά σε δύο κατηγορίες. Τα βασικά αντιοξειδωτικά που διασπούν την ανθρακική αλυσίδα και τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Τα βασικά αντιοξειδωτικά AH, όταν βρίσκονται σε ίχνη, μπορούν να καθυστερήσουν ή να παρεμποδίσουν το αρχικό στάδιο της οξείδωσης αντιδρώντας με μία ρίζα λιπιδίου, ή με παρεμπόδιση του σταδίου της διάδοσης αντιδρώντας με υπερόξυ- ή αλκόξυ ρίζες. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα παρεμποδίζοντα φαινολικά αντιοξειδωτικά (π.χ γαλλικό οξύ). Τα βασικά αντιοξειδωτικά είναι αποτελεσματικά σε μικρές συγκεντρώσεις ενώ, σε υψηλότερα επίπεδα μπορεί να γίνουν προοξειδωτικά (Jadhav et al., 1996).

Τα αντιοξειδωτικά που διασπούν την ανθρακική αλυσίδα μπορεί να υπάρξουν είτε ως φυσικά είτε μπορούν να παραχθούν συνθετικά όπως στην περίπτωση των BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), TBHQ (tert-βουτιλο-υδροκινόνη) και του γαλλικού οξέος.

Επιπλέον το ροσμαρινικό οξύ έχει αναφερθεί να έχει κάποιες βιολογικές δράσεις in vitro όπως αντι-υικές ιδιότητες (Swarup et al., 2007) συμπεριλαμβανομένων των αντι-HIV-1 (Hooker et al., 2001), αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές (Huang and Zheng, 2006) και αντιαλλεργικές ιδιότητες (Parnham and Kesselring, 1985). Ενώ επίσης μελέτες in vivo έδειξαν ότι το ροσμαρινικό οξύ εκθέτει εξίσου αντιαλλεργικές (Makino et al., 2001, Sanbongi et al., 2004), αντιθρομβωτικές (Zou et al., 1993) και αντικαρκινογενείς ιδιότητες (Lee et al., 2007, Osakabe et al., 2004). Αυτό το συστατικό είναι επίσης αποτελεσματικό ενάντια στην υπεροξειδική βλάβη των βιομεμβρανών (Achamlale et al., 1992). Σήμερα πολλά προϊόντα έχουν παρασκευαστεί από Ροσμαρινικό οξύ σε φαρμακευτικές, καλλυντικές και βιομηχανίες τροφίμων. Το Ροσμαρινικό οξύ μπορεί να βρεθεί σε πολλά φυτά αλλά

συνήθως το φυτό δεντρολίβανο χρησιμοποιείται ως η κύρια πηγή. (Sekarchi et al., 2010)

1.3) Δευτερογενείς μεταβολίτες

1.3.1) Τερπένια

Τα τερπένια αποτελούν μια μεγάλη και ποικίλη κατηγορία οργανικών ενώσεων (υδρογονανθράκων), που παράγονται από μία ποικιλία φυτών, ιδιαίτερα από κωνοφόρα, αλλά επίσης παράγονται και από ορισμένα έντομα όπως τερμίτες ή πεταλούδες με ψαλιδωτή ουρά τα οποία εκπέμπουν τερπένια από τους οσμητήρες τους. Έχουν συχνά έντονη οσμή και ως εκ τούτου μπορεί να έχουν προστατευτική λειτουργία.

Τα τερπένια απελευθερώνονται από τα δένδρα πιο ενεργά σε θερμότερο καιρό (David, 2008), ενώ το άρωμα και η γεύση του λυκίσκου προέρχονται από τερπένια και συγκεκριμένα σε μεγαλύτερες ποσότητες περιέχονται το μυρκένιο, β-πινένιο, β-καρνοφυλλένιο και α-ομουλένιο. Τα τερπένια είναι τα κύρια συστατικά της ρητίνης και της τερεβινθίνης η οποία παράγεται από την ρητίνη (Gunata et al., 2001). Το όνομα «τερπένιο» προέρχεται από την λέξη «τερεβινθίνη». Εκτός από τους ρόλους τους ως τελικά προϊόντα σε πολλούς οργανισμούς, τα τερπένια είναι σημαντικές δομικές μονάδες μέσα σχεδόν σε κάθε ζωντανό πλάσμα. Τα στεροειδή για παράδειγμα είναι παράγωγα του τριτερπενίου σκουαλενίου. Όταν τα τερπένια τροποποιηθούν χημικά όπως με οξειδωση ή με αναδιάταξη του ανθρακικού σκελετού οι ενώσεις που προκύπτουν αναφέρονται γενικώς ως τερπενοειδή.

Τα τερπένια και τα τερπενοειδή είναι τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων πολλών τύπων φυτών και λουλουδιών. Συνθετικές παραλλαγές και παράγωγα φυσικών τερπενίων και τερπενοειδών επίσης επεκτείνουν σημαντικά την ποικιλία των αρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία αλλά και των γεύσεων που χρησιμοποιούνται σε προσθετικά τροφίμων. Η βιταμίνη Α είναι ένα παράδειγμα ενός τερπενίου. (Ιγνατιάδου Ραγκούση, 2009)

1.3.1.1) Δομή και βιοσύνθεση των τερπενίων

Τα τερπένια παράγονται βιοσυνθετικά από μονάδες του ισοπρενίου, το οποίο έχει μοριακό τύπο C_5H_8 . Ο βασικός τύπος των τερπενίων είναι τα πολλαπλάσια του $(C_5H_8)_n$ όπου n είναι ο αριθμός των συνδεδεμένων μονάδων ισοπρενίου. Οι μονάδες του ισοπρενίου μπορούν να συνδέονται μαζί ως «κεφαλή προς ουρά» για να σχηματίσουν γραμμικές αλυσίδες ή μπορούν να διαταχθούν για να σχηματίσουν δακτυλίους.

Το ισοπρένιο από μόνο του δεν υφίσταται την διαδικασία κατασκευής αλλά μάλλον οι ενεργοποιημένες μορφές πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), είναι συστατικά στο βιοσυνθετικό μονοπάτι.

Καθώς δημιουργούνται οι αλυσίδες των μονάδων ισοπρενίου, τα προκύπτοντα τερπένια κατατάσσονται διαδοχικά κατά μέγεθος ως μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, σεστερτερπένια και τετρατερπένια. (Ιγνατιάδου-Ραγκούση)

1.3.1.2) Τύποι τερπενίων

Τα τερπένια ταξινομούνται από τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου στο μόριο· ένα πρόθεμα στο όνομα δείχνει τον αριθμό των μονάδων τερπενίων που χρειάζονται για να συναρμολογήσουν το μόριο.

Μονοτερπένια : αποτελούνται από δύο μονάδες ισοπρενίου με τον μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}$ και τουλάχιστον με ένα διπλό δεσμό. Οι υδρογονάνθρακες τερπενίων είναι θερμικώς ασταθείς και οξειδώνονται εύκολα και γι' αυτό τα έλαια των εσπεριδοειδών τα οποία περιέχουν υψηλό επίπεδο τερπενίων, δεν διατηρούνται καλά. Κάποια από αυτά τα τερπένια πιστεύεται ότι έχουν αντιφλεγμονώδεις, αντισηπτικές, αντι-ιικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες, αλλά συνολικά η επίδραση του αιθέριου ελαίου είναι ο συνδυασμός της φυσιολογικής δραστηριότητας όλων των συστατικών του. Κάποια άλλα μονοτερπένια θεωρούνται να έχουν αναλγητικές ιδιότητες ή μπορούν να δρουν ως διεγερτικά. Άλλα λέγεται ότι τονώνουν την έκκριση βλέννας και είναι ως εκ τούτου αποτελεσματικά αποσυμφορητικά. Μερικά παραδείγματα μονοτερπενίων που περιέχονται στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* όπως στο δίκταμο είναι το α-πινένιο, η θυμοκινόνη, το κυμένιο και το γ-τερπινένιο (Ntalli et al., 2010).

Σεσκιτερπένια : είναι τερπένια που αποτελούνται από τρεις μονάδες ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}$ και μπορούν να έχουν μια ιδιαίτερα πολύπλοκη φαρμακολογική δράση. Ο όρος σεσκι σημαίνει ένα και μισό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το α-ελεμένιο και δ-καδινένιο που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου (Karioti et al., 2005), το β-μπισαμπολόνιο που περιέχεται στο έλαιο του θρουμπιού (Azaz et al., 2005) και το β-καρνοφυλλένιο που περιέχεται στο έλαιο του δεντρολίβανου (Zaouali et al., 2010).

Διτερπένια : συντίθενται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{20}H_{32}$. Παράγονται από το πυροφωσφορικό γερανυλογεράνυλο. Ο σημαντικότερος εκπρόσωπος από τα άκυκλα διτερπένια είναι η φυτόλη η οποία είναι τμήμα του μορίου της χλωροφύλλης, με την οποία συνδέεται υπό μορφή εστέρα. Άλλα παραδείγματα είναι το καρνοσικό οξύ, η επιροσμανόλη, η ισοροσμανόλη, η ροσμαριδιφαινόλη και η ροσμαροκινόνη που περιέχονται στο δεντρολίβανο (Razborsek et al., 2007) αλλά και η καρνοσόλη που συναντάται στο θρούμπι (Yanishlieva et al., 2006).

Σεστερτερπένια : είναι τερπένια που έχουν 25 άνθρακες και πέντε μονάδες ισοπρενίου και είναι σπάνια σε σχέση με τα άλλα μεγέθη. Ο όρος σεστερ σημαίνει μισό έως τρία π.χ δύο και μισό. Παραδείγματα αποτελούν η σκαλαρίνη που βρίσκεται σε θαλάσσιους σπόγγους (Rho et al., 2004) και οι οφιομπιολίνες που βρίσκονται σε φυτοπαθογόνους μύκητες (Leung et al., 1984).

Τριτερπένια : αποτελούνται από έξι μονάδες ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{30}H_{48}$. Το γραμμικό τριτερπένιο σκουαλένιο είναι το κύριο συστατικό του ελαίου του ήπατος καρχαρία, ενώ στα φυτά παραδείγματα αποτελούν το ολεανολικό οξύ, το ουρσολικό οξύ και η ουβαόλη που εμπεριέχονται στο δίκταμο (Liolios et al., 2010), καθώς και το μπετουλικό οξύ και μπετουλίνη που εμπεριέχονται στο δεντρολίβανο (Revinthi-Moraiti et al., 1985).

Σεσκατερπένια : συντίθενται από επτά μονάδες ισοπρενίου και έχουν τον μοριακό τύπο $C_{35}H_{56}$. Τα σεσκατερπένια είναι συνήθως μικροβιακής προέλευσης. Μερικά παραδείγματα είναι η φερρουγικαδιόλη και τετραφαινυλοκουρκουμένιο.

Τετρατερπένια : περιέχουν οχτώ μονάδες ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{40}H_{69}$. Βιολογικώς σημαντικά τετρατερπένια περιλαμβάνουν το άκυκλο λυκοπένιο, το μονοκυκλικό γ-καροτένιο και τα δικυκλικά α-και β-καροτένια.

Πολυτερπένια : αποτελούνται από μακριές αλυσίδες πολλών μονάδων ισοπρενίου (>40). Το φυσικό καουτσούκ αποτελείται από πολυϊσοπρένιο στο οποίο οι διπλοί δεσμοί είναι Cis. Μερικά φυτά παράγουν ένα πολυϊσοπρένιο με trans διπλούς δεσμούς, που είναι γνωστά ως γουταπέρκα (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009), Scott, 2005).

1.3.2) Φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά απαρτίζουν μία κύρια ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών που είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο. Τα φαινολικά των φυτών βιοσυντίθενται μέσω του σιμικικού οξέος/φαινυλοπροπανοειδούς μονοπατιού που οδηγεί σε διάφορες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 1.3.2. Μπορούν να εμφανιστούν στις φυσικές πηγές τους σε ελεύθερες μορφές όπως γλυκοσυλιωμένα ή ακυλιωμένα παράγωγα, και ως ολιγομερής και πολυμερισμένες δομές όπως υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες ταννίνες, φλοροταννίνες ή λιγνίνες.

Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα σπανίως απαντώνται ελευθέρως στο φυτό. Συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών στους οποίους αποτελούν το άγλυκο τμήμα της ένωσης. Οι περισσότερες απλές φαινόλες είναι μονομερή συστατικά των πολυμερών πολυφαινολών και οξέων τα οποία σχηματίζουν τους φυτικούς ιστούς μαζί με ουσίες όπως η λιγνίνη, η μελανίνη και οι ταννίνες (Kaufman et al., 1999). Μερικά παραδείγματα απλών φαινολών είναι οι φλορογλουκινόλη, κατεχόλη, ρεσορκινόλη, βανιλίνη, συρινγαλδεύδη (Πίνακας 1.3.2) ενώ σε πολλά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* συχνά απαντώνται η θυμόλη και η καρβακρόλη. Τα φαινολικά οξέα προκύπτουν βιογενετικά από αποικοδόμηση των φαινυλοπροπανοειδών, ενώ όπως όλα τα φαινολικά παράγωγα προέρχονται και από το σιμικικό οξύ το οποίο μέσω του πρεφαινιλικού οξέως είναι ο πρόδρομός τους. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν δομικές μονάδες της λιγνίνης. Γνωστά παραδείγματα φαινολικών οξέων που συναντώνται συχνά στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* είναι

το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και το π-κουμαρικό οξύ που έχουν βρεθεί στο δίκταμο (Proestos et al., 2006), ενώ στο δεντρολίβανο έχουν βρεθεί το συρινγικό οξύ, φερουλικό οξύ και βανιλικό οξύ (Proestos et al., 2005).

Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν στον φαινολικό δακτύλιο μια πλάγια αλυσίδα 3 ατόμων άνθρακα. Συντίθενται από τα φυτά μέσω του αμινοξέος φαινυλαλανίνη (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009). Τα σπουδαιότερα φαινυλοπροπανοειδή στα φυτά είναι:

α) Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα τα οποία είναι και τα πιο διαδεδομένα φαινυλοπροπανοειδή και επιδρούν στην ομαλή αύξηση και ενισχύουν την ανθεκτικότητα των φυτών στις ασθένειες. Μερικά παραδείγματα είναι το φερουλικό, σιναπικό, καφεϊκό και π-κουμαρικό οξύ τα οποία δεν βρίσκονται συνήθως ελευθέρως στην φύση αλλά υπό μορφή εστέρων.

β) Οι κουμαρίνες που είναι παράγωγα λακτονοποίησης των ο- υδροξυκινναμωμικών οξέων και βρίσκονται σε πολλά φυτά υπό μορφή γλυκοζιτικών παραγώγων. Επίσης διαθέτουν και άρωμα που δεν διακρίνεται πολλές φορές παρά μόνο μετά την υδρόλυση του γλυκοζίτη. Τέτοιες ενώσεις είναι οι ουμπελιφερόνη, εσκουλετίνη, και σκοπολετίνη η οποία αναφέρεται ως παράγοντας βλάστησης.

γ) Τα φαινυλοπροπένια τα οποία ανευρίσκονται μαζί με τα τερπένια ως συστατικά των αιθέριων ελαίων και συμμετέχουν στην οσμή των φυτών. Τα πιο γνωστά αιθέρια έλαια είναι η ευγενόλη, η μυριστικίνη και η σαφρόλη τα οποία παραλαμβάνονται από το αιθέριο έλαιο των φυτών και είναι υπεύθυνα για το άρωμά τους.

Οι φαινολικές κινόνες είναι οι φυσικές χρωστικές που περιέχουν στο μόριό τους κινουειδή δακτύλιο και αποτελούν μία τάξη ευρέως διαδεδομένων χρωστικών με μεγάλη ποικιλία δομών.

Τα φλαβονοειδή είναι η πολυπληθέστερη τάξη φυσικών πολυφαινολών και αντιπροσωπεύουν την πιο κοινή και ευρέως διαδεδομένη ομάδα φαινολικών των φυτών. Προέρχονται από την ίδια μητρική ένωση που είναι η φλαβόνη και υποκατηγορίες των φλαβονοειδών καθορίζονται από τις διαφορές που παρουσιάζουν στον ετεροκυκλικό δακτύλιο (Hollman et al., 1997). Τα φλαβονοειδή απαντούν συνήθως στα φυτά ενωμένα με σάκχαρα ως Ο-γλυκοζίτες, όπου μία ή περισσότερες

υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς αντιδρούν με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σχηματίζοντας ημιακεταλικούς δεσμούς. Ανευρίσκονται επίσης και ως C-γλυκοζιτικά παράγωγα, όπου το σάκχαρο ενώνεται απ' ευθείας με τον πυρήνα του φλαβονοειδούς με δεσμό C-C. Οι C-γλυκοζίτες είναι σπανιότεροι από τους O-γλυκοζίτες από τους οποίους και διακρίνονται λόγω της αντίστασής τους στην όξινη υδρόλυση. Τα φλαβονοειδή είναι υδατοδιαλυτά και εκτός από το έντονο χρώμα που διαθέτουν, προσδίδουν χαρακτηριστική γεύση και άρωμα σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Από άποψη δομής ανήκουν σε δύο μεγάλες ομάδες: τα παράγωγα της φλαβόνης και τις ανθοκυανίνες οι οποίες ομάδες παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς την δομή τους (Πίνακας 1.3.2), διότι είναι παράγωγα της ίδιας μητρικής ένωσης του χρωμανίου. Παραδείγματα φλαβονοειδών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* είναι η κερκετίνη, κατεχίνη και λουτεολίνη στο δεντρολίβανο (Proestos et al., 2005) ενώ η εριοδικτυόλη έχει βρεθεί και στο θρούμπι (Kosar et al., 2005).

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν σπουδαίες βιολογικές δράσεις. Είναι πολύ αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών σε πειράματα *in vitro* (Heijnen et al., 2001, Chun et al., 2003). Επιπλέον δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα όπως σίδηρος και χαλκός που καταλύουν αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, συνεισφέροντας έτσι στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών *in vitro* (Mira et al., 2002, Cheng and Breen, 2000). Επιπλέον τα φλαβονοειδή επιδρούν στα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων καθώς διατηρούν την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες των κυττάρων τις κινάσες ακόμα και αν η αντιοξειδωτική τους ικανότητα μειωθεί (Spencer et al., 2003, 2001). Παρόλο που αρχικώς είχε υποτεθεί ότι οι βιολογικές επιδράσεις των φλαβονοειδών σχετίζονται με την αντιοξειδωτική τους δράση, διαθέσιμα στοιχεία από πειράματα κυτταροκαλλιεργειών υποδεικνύουν ότι πολλές από τις βιολογικές επιδράσεις των φλαβονοειδών σχετίζονται με την ικανότητά τους να ρυθμίζουν κυτταροσηματοδοτικά μονοπάτια (Williams et al., 2004). Τα αποτελέσματα από πολυάριθμες μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες προτείνουν ότι τα φλαβονοειδή μπορεί να επηρεάσουν χρόνιες ασθένειες με εκλεκτική αναστολή των κινασών (Williams et al., 2004, Hou et al., 2004).

Πιο επιπλέον κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών που βρίσκονται στη φύση ως παράγωγα της φλαβόνης περιλαμβάνει δέκα περίπου διαφορετικές τάξεις εκ των

οποίων οι περισσότεροι διαδεδομένες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι χαλκόνες και ισοφλαβόνες.

Οι φλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ουσίας φλαβόνη συνήθως στις θέσεις 5 και 7 και σε μία ή περισσότερες από τις θέσεις 3',4' ή 5'. Τα υδροξύλια στις θέσεις 3' και 5' είναι συχνά μεθυλιωμένα. Ο βασικός σκελετός της φλαβόνης φαίνεται στον πίνακα 1.3.2 Οι περισσότερες φλαβόνες είναι κίτρινες στερεές ουσίες, διαλυτές στον νερό. Οι φλαβόνες συνοδεύουν σχεδόν πάντοτε τις ανθοκυανίνες ως συγχρωστικές, δίνοντας ιδιαίτερες αποχρώσεις στα πέταλλα των λουλουδιών. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φλαβονών στην οικογένεια *Lamiaceae* είναι η κισσιμαριτίνη, η λουτεολίνη, η ισοσκουτελλαρεΐνη και η γκενγκουανίνη οι οποίες εμφανίζονται στο δεντρολίβανο (Perez-Fons et al., 2010).

Οι φλαβονόλες προκύπτουν από τις φλαβόνες με την εισαγωγή ενός υδροξυλίου στην θέση C3 (Πίνακας 1.3.2). Οι φλαβονόλες είναι τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα και οι περισσότερες πηγές αυτών είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα και το κινέζικο λάχανο (Manach et al., 2004). Ο σπουδαιότερος εκπρόσωπος των φλαβονολών είναι η κερκετίνη, η οποία συναντάται υπό μορφή γλυκοζίτη στον φλοιό της αμερικάνικης βελανιδιάς *Quercus tinctoria* (Ferreira et al., 2004) και έχει χρησιμοποιηθεί για την χρώση του μεταξιού και του μαλλιού. Με μικρότερη συχνότητα συναντάται στα ανώτερα φυτά η κεμφερόλη. Παραδείγματα φλαβονολών για την οικογένεια *Lamiaceae* είναι η κατεχίνη και η επικατεχίνη που περιέχονται στο δεντρολίβανο (Proestos et al., 2005).

Οι φλαβανόνες προκύπτουν από τις αντίστοιχες φλαβόνες με ανόρθωση του διπλού δεσμού Δ^2 . Είναι οπτικώς ενεργά μόρια και οι περισσότερες απ' αυτές που συναντώνται στην φύση είναι αριστερόστροφες πλην ελαχίστων εξαιρέσεων. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι είναι η εσπερτίνη η οποία συναντάται ως γλυκοζίτης στα άγουρα εσπεριδοειδή (Patil et al., 2009) και η ναριγκενίνη, που βρίσκεται στο φλοιό της φράπας (Nogata et al., 1994).

Οι χαλκόνες είναι φλαβονοειδή με ανοικτή ανθρακική αλυσίδα, όπου οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώνονται μεταξύ τους με ένα ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα (Πίνακας 1.3.2). Η παρουσία τους σπανίζει, διότι πολύ εύκολα ισομερίζονται προς φλαβόνες. Έχουν μεγάλη σημασία στη βιοσύνθεση των

φλαβονοειδών, των οποίων θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις. Εμφανίζουν πολύ έντονο κίτρινο χρώμα και βρίσκονται κυρίως στα άνθη. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος είναι η βουτεΐνη που ανευρίσκεται ως γλυκοζίτης στα λουλούδια του φυτού *Butea Frondosa* (Gupta et al., 1970).


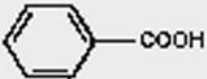
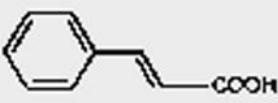
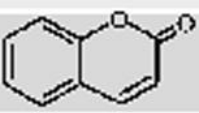
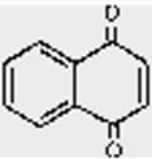
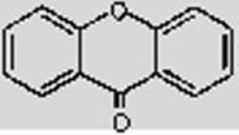
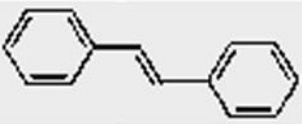
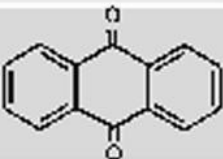
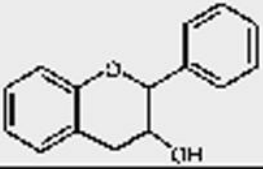
Οι ισοφλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ουσίας ισοφλαβόνη. Βρίσκονται στα φυτά είτε ελεύθερες είτε ενωμένες με σάκχαρα ως γλυκοζίτες. Συναντώνται συχνότερα στο είδος *Leguminosae* και πολλές από αυτές έχουν εντομοκτόνο και αντιμυκητιακή δράση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών ισοφλαβονών είναι η δαϊδζεΐνη και η γενιστεΐνη που βρίσκονται υπό μορφή γλυκοζίτη στον καρπό της σόγιας (Ghosh and Fenner, 1999).

Σημαντική ομάδα φαινολικών συστατικών που αποτελούν τις σημαντικότερες φυσικές χρωστικές είναι οι ανθοκυανίνες. Σ' αυτές οφείλονται οι διάφοροι έντονοι και ελκυστικοί χρωματισμοί των λουλουδιών, το κόκκινο χρώμα των μπουμπουκιών και των νεαρών βλαστών, το ιώδες χρώμα των φθινοπωρινών φύλλων καθώς και ανάλογα χρώματα των φρούτων και των ανωτέρων φυτών. Οι σημαντικότερες ανθοκυανιδίνες είναι η πελαργονιδίνη (πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα των γερανιών), η κυανιδίνη (βυσσινή ή μπλε χρώμα των λουλουδιών, του βύσσινου και του βατόμουρου) (Ding et al., 2006) και η δελφινιδίνη (μωβ, πορφυρά και ιώδη χρώματα στους πανσέδες και τα σταφύλια) (Roggero et al., 1986).

Τέλος στα φυτά απαντώνται πολύ συχνά πολυμερείς ενώσεις φαινολικού χαρακτήρα, η μελέτη των οποίων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πρόκειται για τις λιγνίνες, ταννίνες και μελανίνες.

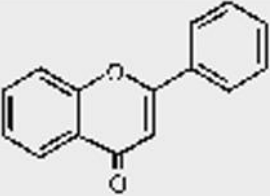
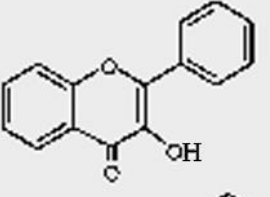
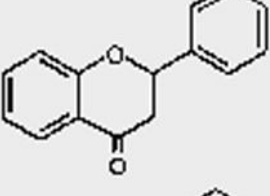
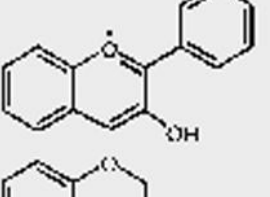
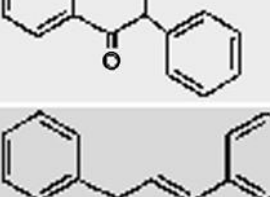
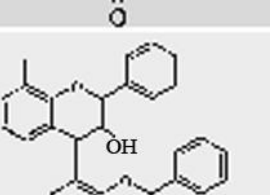
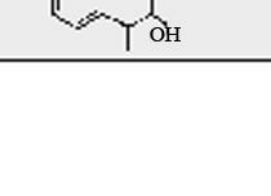
(Κανέλλου, 2011, Santos-Buelga et al., 2012, Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009, Linus Pauling Institute at Oregon State University, 2013)

Πίνακας 1.3.2 : Κυριότερες τάξεις φαινολικών συστατικών

Τάξη	Βασικός σκελετός	Παραδείγματα
Απλές Φαινόλες (C6)		Φλορογλουκινόλη, κατεχόλη, ρεσορκινόλη, βανιλίνη, συρινγαλδεΐδη
Φαινολικά οξέα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6-C1)		π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκτεχνικό οξύ, βανιλικό οξύ, συρινγγικό οξύ, γαλλικό οξύ, γκεντιστικό οξύ, σαλικυλικό οξύ
Υδροξυκινναμωμικά οξέα (C6-C3) και παράγωγα		Καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερούλικό οξύ, σιναπικό οξύ, χλωρογκενικό οξύ (5-καφεοϋλκινικό οξύ)
Κουμαρίνες (C6-C3)		Σκοπολετίνη, ουμπελλιφερόνη, αεσκουλετίνη
Ναφθοκινόνες (C6-C4)		Τζουγκλόνη, πουμπλαγκίνη
Ξανθόνες (C6-C1-C6)		Μανγκοστίνη, μανγκιφερίνη
Στιλμπένες (C6-C2-C6)		Ρεσβερατρόλη, πικεΐδη, ε-βινιφερίνες
Ανθρακινόνες (C6-C2-C6)		Εμοδίνη, φουσκίονη
Φλαβονοειδή (C6- C3-C6) Φλαβάν-3-όλες		(Επι)κατεχίνη, (επι)γαλλοκατεχίνη

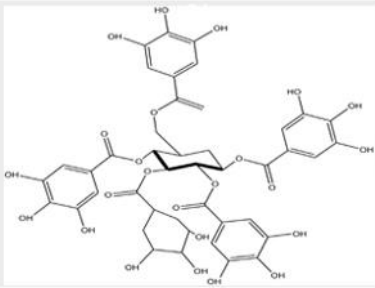
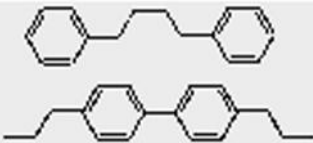
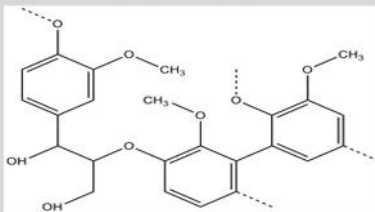
(συνεχίζεται)

Πίνακας 1.3.2 : Κυριότερες τάξεις φαινολικών συστατικών

Τάξη	Βασικός σκελετός	Παραδείγματα
Φλαβόνες		Απιγκενίνη, λουτεολίνη, χρυσίνη, σκουτελλαρεΐνη, διοσμετίνη, χρυσοερίολη
Φλαβονόλες		Κερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη, γκαλανγκίνη, φισετίνη, μορίνη
Φλαβανόνες		Εσπεριδίνη, ναρινγκενίνη, ταξιφολίνη, εριοδικτυόλη, ισοσακουρανετίνη
Ανθοκυανίνες		Κυανιδίνη, δελφινιδίνη, μαλβιδίνη, πελαργκονιδίνη, πετουνιδίνη, πεονιδίνη
Ισοφλαβόνες		Γκενιστεΐνη, δαϊδζείνη, γλυκίτεΐνη, φορμονονετίνη, βιοχανίνη Α, πουερανίνη
Χαλκόνες		Φλορετίνη, αμπουτίνη, μπουτεΐνη, χαλκόνη της ναρινγκενίνης
Συμπυκνωμένες ταννίνες (Προανθοκυανιδίνες) (C6-C3-C6) n		Προκυανιδίνες, προδελφιδίνες

(συνεχίζεται)

Πίνακας 1.3.2 : Κυριότερες τάξεις φαινολικών συστατικών

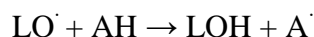
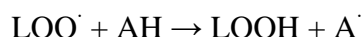
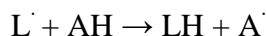
Τάξη	Βασικός σκελετός	Παραδείγματα
Υδρολυόμενες ταννίνες (γαλλοταννίνες, ελλαγκιταννίνες)		Πενταγαλλοϋλγλυκόζη, βεσκαλαγίνη, κασταλαγίνη
Λιγνάνες (C6-C2) 2		Σεκοΐσολαρκικρεσινόλη, ματαΐρεσινόλη, σεσαμίνη, πινορεσινόλη, συρινγκαρεσινόλη
Λιγνίνες (C6-C3) n		

1.4) Μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας

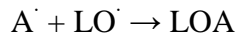
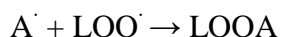
Αν κάποιος ανατρέξει στα επιστημονικά έγγραφα για τα αντιοξειδωτικά, μπορεί να βρει πολλούς όρους να χρησιμοποιούνται από διαφορετικούς ερευνητές, για να περιγράψουν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι όροι που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν ολική αντιοξειδωτική «ικανότητα» (ή αποτελεσματικότητα, ισχύς, παράμετρος, δυνατότητα, δραστηκότητα και δραστηριότητα)

Με βάση την εμπλεκόμενη χημική αντίδραση έχουμε δύο κύριες κατηγορίες προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας: προσδιορισμοί βασισμένοι σε αντίδραση μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (Hydrogen atom transfer, HAT) και βασισμένοι σε αντίδραση μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (Single electron transfer, ET). Οι προσδιορισμοί που βασίζονται στη ET περιλαμβάνουν μία αντίδραση οξειδοαναγωγής με το οξειδωτικό (γνωστό και ως ανιχνευτής για την παρακολούθηση της αντίδρασης) ως δείκτης του καταληκτικού σημείου της

αντίδρασης. Οι βασισμένες στη HAT μέθοδοι παρακολουθούν τις ανταγωνιστικές κινητικές της αντίδρασης και η ποσοτικοποίηση προκύπτει από τις καμπύλες της κινητικής. Οι βασισμένες στην HAT μέθοδοι αποτελούνται γενικώς από ένα συνθετικό παράγωγο ελευθέρων ριζών, ένα οξειδώσιμο μοριακό ανιχνευτή και ένα αντιοξειδωτικό. Οι HAT και ET μέθοδοι προορίζονται να μετρούν την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας (ή του οξειδωτικού) αντί για την προληπτική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος.



Η ελεύθερη ρίζα του αντιοξειδωτικού μπορεί να επεμβαίνει περισσότερο με παραγωγή αλυσιδωτών αντιδράσεων σχηματίζοντας υπεροξυ-αντιοξειδωτικά συστατικά (Antolovich et al., 2001):

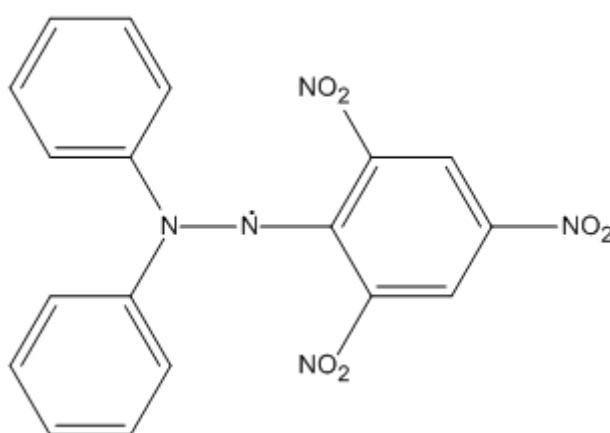


Μερικές μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι οι : μέθοδος παρεμποδιζόμενης πρόσληψης οξυγόνου (inhibited oxygen uptake, IOU) (Burton and Ingold, 1981), η αναστολή της επαγόμενης αυτοοξείδωσης λιπιδίου (inhibition of induced lipid autoxidation) (Pryor et al., 1993), μέθοδοι που χρησιμοποιούν μοριακούς ανιχνευτές όπως η δοκιμασία της ικανότητας απορρόφησης ελεύθερης ρίζας οξυγόνου (oxygen radical absorbance capacity assay, ORAC) (Cao et al., 1993), η δοκιμασία αποχρωματισμού της κροκίνης (Crocic bleaching assay) (Bors et al., 1984), η δοκιμασία της αντιοξειδωτικής παραμέτρου παγίδευσης των συνολικών ελευθέρων ριζών του υπεροξυλίου (Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay, TRAP) (Wayner et al., 1985), μέθοδοι που βασίζονται σε ET όπως η μέτρηση των συνολικών φαινολών με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu Reagent, FCR) (Folin and Ciocalteu 1927), η μέθοδος αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ισοδύναμο Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) (Miller et al., 1993), η μέθοδος αντιοξειδωτικής ισχύς της αναγωγής ιόντων σιδήρου (Ferric ion Reducing Power assay, FRAP) (Benzie and Strain 1996), η δοκιμασία της

ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με την χρήση Cu(II) ως οξειδωτικό (Oxisearch, Inc., 2002), η δοκιμασία της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών του 2,2 διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζιλίου (DPPH Radical Scavenging Capacity) (Abuja et al., 1997). Επιπλέον υπάρχουν και άλλες μέθοδοι οι οποίες μετρούν την ικανότητα δέσμευσης άλλων ενεργών ριζών οξυγόνου όπως η μέθοδος του $O_2^{\cdot -}$ (Quick et al., 2000) κ.α. Για τις ανάγκες αυτής της διατριβής θα αναλυθούν παρακάτω η μέθοδος του FCR και του DPPH. (Huang et al., 2005)

1.4.1) Μέθοδος του DPPH

Το DPPH (σχήμα 1.4.1) είναι μία μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στην μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολών αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να δίνει μετρήσεις της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών του δείγματος (Palejo et al., 2000). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα που έχουν τα διαλύματα που περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες να αποχρωματίζουν το διάλυμα του DPPH το οποίο είναι έντονο μωβ. Η ρίζα αυτή απορροφά στην περιοχή του ορατού και συγκεκριμένα στα 515-517 nm. (Brand-Williams et al., 1995)



Σχήμα 1.4.1: Χημική δομή του DPPH

1.5) Μέθοδοι εκτίμησης της αντιβακτηριακής δράσης των φυσικών προϊόντων

Εξαιτίας της αποτυχίας διαθέσιμων αντιμικροβιακών για την θεραπεία λοιμωδών νόσων, πολλοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στην έρευνα των φυσικών προϊόντων ως πηγή νέων βιοδραστικών μορίων (Recio and Rios, 1989, Silver and Bostian 1993). Γι' αυτό τον σκοπό έχει βρεθεί μία ποικιλία μεθόδων και δεδομένου ότι δεν βασίζονται όλοι τους στις ίδιες αρχές, τ' αποτελέσματα που λαμβάνονται θα επηρεάζονται επίσης βαθύτατα όχι μόνο από την επιλεγμένη μέθοδο αλλά επίσης και από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή της δοκιμής καθώς και τον βαθμό της διαλυτότητας κάθε συστατικού –δοκιμής (Vanden Berghe and Vlietinck 1991), Rios et al., 1988). Τα συστήματα δοκιμής θα πρέπει στην ιδανική περίπτωση να είναι απλά, ταχέα, επαναλήψιμα και ανέξοδα και να μεγιστοποιούν στην υψηλή απόδοση του δείγματος προκειμένου να αντιμετωπίσουν ένα ποικίλο αριθμό εκχυλισμάτων και κλασμάτων. (Hadacek and Greger, 2000, Hostettman and al., 1997)

Οι διαθέσιμες σήμερα διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των φυσικών προϊόντων εμπίπτουν σε τρεις ομάδες συμπεριλαμβανομένων των βιο-αυτογραφικών, διάχυσης και μεθόδων αραίωσης. Οι βιο-αυτογραφικές και οι μέθοδοι διάχυσης είναι γνωστές ως ποιοτικές τεχνικές δεδομένου ότι αυτές οι μέθοδοι θα δώσουν μόνο μια ιδέα της παρουσίας ή απουσίας ουσιών με αντιμικροβιακή δράση. Από την άλλη πλευρά οι μέθοδοι αραίωσης θεωρούνται ποσοτικές αναλύσεις μόλις προσδιοριστεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Vanden Berghe and Vlietinck, 1991). Οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία που έχουν αξιολογηθεί με διαφορετικά σύνολα των μεθοδολογιών, βαθμούς ευαισθησίας, ποσότητας των συστατικών – δοκιμής και μικροβιακά στελέχη, συχνά είναι δύσκολο να συγκριθούν.

Οι μέθοδοι εκτίμησης της αντιβακτηριακής δράσης των φυσικών προϊόντων είναι :

- α) Παραλλαγή της διάχυσης άγαρ-πηγαδιών (agar diffusion well-variant)
- β) Παραλλαγή της διάχυσης δίσκου
- γ) Παραλλαγή της άμεσης βιοαυτογραφικής μεθόδου (στρώμα χρωματογραφήματος)
- δ) Παραλλαγή της έμμεσης βιοαυτογραφικής μεθόδου (διάχυσης άγαρ)

ε) Μέθοδος μικροαραίωσης ζωμού.

Για τις ανάγκες αυτές της διατριβής στην παρακάτω ενότητα περιγράφεται λεπτομερώς η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σ' αυτήν την διατριβή και είναι η παραλλαγή της διάχυσης άγαρ-πηγαδιού. (Valgas et al., 2007)

1.5.1) Μέθοδος διάχυσης άγαρ-πηγαδιού

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το κατάλληλο θρεπτικό μέσο για κάθε μικροοργανισμό- στόχο με 1,5 % άγαρ και το οποίο εμβολιάστηκε με το καθένα από τον μικροοργανισμό- στόχο (εμβόλιο 1% v/v, από φρέσκια καλλιέργεια), όταν η θερμοκρασία του μέσου ήταν περίπου 40 °C. Ακολούθησε στρώσιμο τετράγωνων τρυβλίων Petri με 50 mL με το θρεπτικό μέσο και αναμονή μέχρι να σταθεροποιηθεί. Εν συνεχεία γίνεται η προσθήκη γνωστού όγκου των φυσικών προϊόντων σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια (διαμέτρου οπές 6-7 mm, κομμένα στο gel του άγαρ, με 20 mm χωριστά το ένα από το άλλο). Τα συστήματα επώάζονται για 24 ώρες υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Μετά την επώαση παρατηρείται η συρρέουσα βακτηριακή ανάπτυξη. Η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης μετρείται σε mm ζώνης παρεμπόδισης.

1.6) Μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών

Η μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών γίνεται με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό αρχικά είχε προταθεί για την ανάλυση πρωτεϊνών (Folin and Ciocalteu, 1927). Αρκετά χρόνια αργότερα ο Singleton και οι συνεργάτες του επέκτειναν την μέθοδο αυτή για την ανάλυση των ολικών φαινολικών στο κρασί και από τότε αυτή η μέθοδος αυτή απέκτησε πολλές εφαρμογές (Singleton et al., 1999). Πλέον είναι πολύ διαδεδομένη και είναι γνωστή ως «μέθοδος των ολικών φαινολικών» καθώς γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στην

πραγματικότητα μετρά την μείωση της δραστηριότητας του δείγματος κάτι που δεν σχετίζεται με την παραπάνω ονομασία.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί μίγμα μολυβδαινικού νατρίου (Na_2MoO_4) βολφραμικού νατρίου (Na_2WO_4) και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) και προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου χαρακτηριστικού μπλέ χρώματος που απορροφά στην περιοχή του ορατού (725nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 . (Huang et al., 2005)

1.7) Αέρια χρωματογραφία –φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι ένας τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται στη αναλυτική χημεία για τον διαχωρισμό και την ανάλυση συστατικών που μπορούν να εξατμιστούν χωρίς αποσύνθεση. Οι τυπικές χρήσεις της GC περιλαμβάνουν τον έλεγχο της καθαρότητας μιας συγκεκριμένης ουσίας, ή τον διαχωρισμό των διαφορετικών συστατικών ενός μείγματος (των οποίων οι σχετικές ποσότητες μπορούν επίσης να προσδιοριστούν).

Ο διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος γίνεται με φυσικό τρόπο, όπου τα συστατικά βρίσκονται πάνω στην χρωματογραφική στήλη. Η έκλυση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Η στατική φάση είναι μια τριχοειδής στήλη από αδρανές υλικό επικαλυμμένη με ειδικό πολυμερές. Ο διαχωρισμός γίνεται πάνω στην στατική φάση και οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα στην στήλη με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από τις διαφορετικές τάσεις ατμών και αλληλεπιδράσεις τους με την στατική φάση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι οι εξεταζόμενες ουσίες να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια. (Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008)

Όταν η αέρια χρωματογραφία συνδυαστεί με φασματομετρία μαζών (MS) τότε η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Το υπό εξέταση δείγμα αφού διαχωριστεί στα συστατικά του, εξέρχεται από τον

χρωματογράφο και εισέρχεται σε αέρια κατάσταση στο MS όπου βομβαρδίζεται από ηλεκτρόνια μεγάλης κινητικής ενέργειας. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται ιονισμός των μορίων που οδηγεί σε διάσπαση ώστε να δημιουργηθούν ιόντα μικρότερης μάζας. Μόλις αυτά δημιουργηθούν, επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και ακολούθως αποκλίνουν της αρχικής τους πορείας, ανάλογα με τον λόγο m/z (μάζα/φορτίο). Το ρεύμα το οποίο παράγεται μετράται με την βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή. Το διάγραμμα το οποίο θα προκύψει από την ένταση του μετρούμενου ρεύματος συναρτήσει του λόγου m/z αποτελεί το φάσμα μαζών.

Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας έναντι των άλλων τεχνικών διαχωρισμού είναι η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα και η απλότητα. Επίσης δίνει την δυνατότητα πραγματοποίησης δύσκολων διαχωρισμών που συνήθως είναι αδύνατον να γίνουν με άλλες τεχνικές. (Ταραντίλης και Πολυσίου 2008)

1.8) Υγρή χρωματογραφία –φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Η υγρή χρωματογραφία -φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού και ταυτοποίησης των πολικών μη πτητικών συστατικών ενός μίγματος. Η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα και η κινητή φάση είναι υγρό. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από την στατική φάση πετυχαίνεται με την χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης. Οι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (LC grade) και να έχουν εξεαρωθεί.

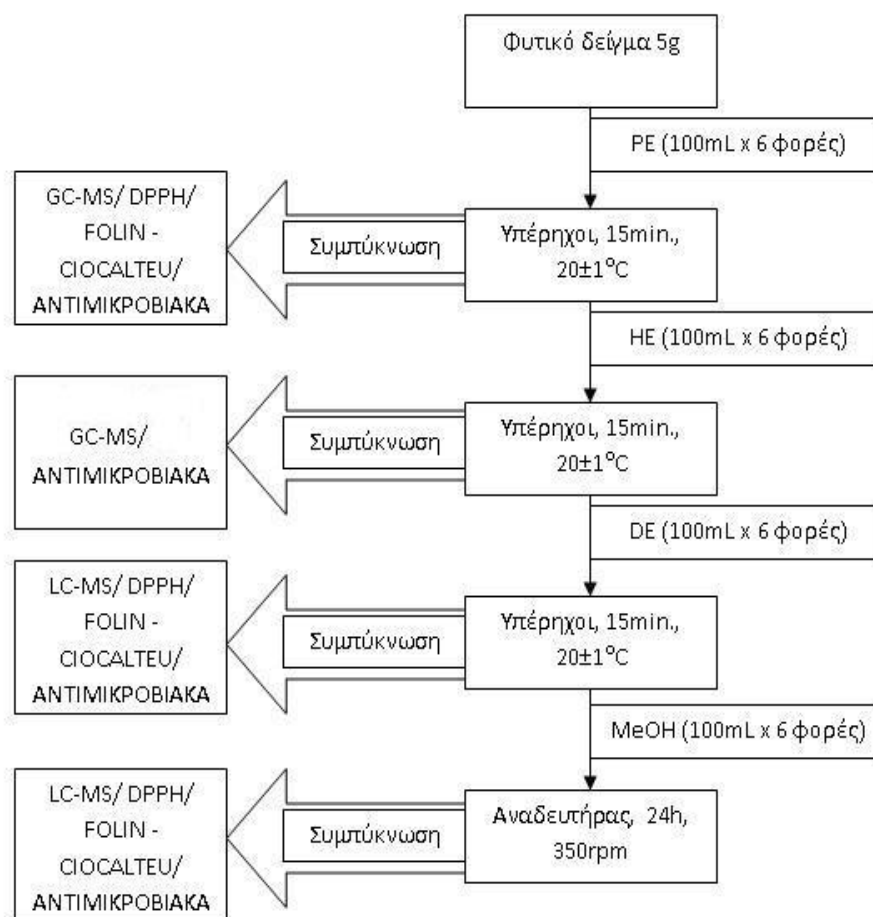
Για την επίτευξη ενός επιθυμητού διαχωρισμού πρέπει να γίνουν οι κατάλληλες επιλογές στην στήλη έτσι ώστε να επιλεγθεί μεγάλο μήκος ή μικρή διάμετρος του υλικού πλήρωσης και η πολικότητα του δείγματος να είναι ίδια με την πολικότητα της στατικής φάσης, αλλά και στην κινητή φάση (πολικότητα, ισοκρατική ή βαθμιδωτή έκλυση), όπου κατά προτίμηση η βαθμιδωτή έκλυση επιτυγχάνει καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος, επειδή μεταβάλλεται η σύσταση και συνεπώς η πολικότητα του διαλύτη κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου κατά την διάρκεια του διαχωρισμού. Η LC ανάλογα με την πολικότητα της

στατικής-κινητής φάσης διακρίνεται σε α) κανονικής φάσης (normal phase) κατά την οποία η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πολικών ουσιών οι οποίες εκλούνται τελευταίες από την στήλη (NP) και β) ανεστραμμένης φάσης (Reverse phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, και η κινητή φάση πολική. Για το διαχωρισμό των πολικών συστατικών χρησιμοποιείται η τελευταία.

Η υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας είναι μια τεχνική που συνδυάζει την ικανότητα διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας με τη δυνατότητα ταυτοποίησης της φασματομετρίας μάζας. Η LC-MS έχει εξελιχθεί σε μια πανίσχυρη τεχνική ενόργανης χημικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται για πολλές εφαρμογές. (Ταραντίλης, 2004)

1.9) Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η βιολογική δράση των συστατικών τριών διαδεδομένων φυτών της ελληνικής χλωρίδας, του δεντρολίβανου, του δίκταμου και του θρουμπιού. Στόχος ήταν ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών τα οποία παραλαμβάνονται από τα παραπάνω φυτά με οργανικούς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας καθώς και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της αντιμικροβιακής δράσης αυτών των εκχυλισμάτων.



Σχήμα 1.9 : Σχεδιάγραμμα πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη. Όπου PE: πετρελαϊκός αιθέρας, HE: εξάνιο, DE: διαιθυλαιθέρας και MeOH: μεθανόλη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1) Φυτικό υλικό

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία παρασκευής εκχυλισμάτων ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* και είναι το δεντρολίβανο, το θρούμπι που προέρχονται από φυτείες (2010) του ΑΣΚΑΦΕΦΑ (Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών φυτών Αιτωλοακαρνανίας) και ο δίκταμος που προέρχεται από την τοπική αγορά Κρήτης. (2009).

Το τμήμα του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα φύλλα, ενώ στον δίκταμο συμπεριλήφθηκαν και τα άνθη του. Όλα τα φυτικά τμήματα βρίσκονταν σε αποξηραμένη μορφή. Πριν την κατεργασία των φυτών, επιλέχτηκε προσεκτικά το προς ανάλυση φυτικό υλικό με το χέρι, διαχωρίζοντάς το από τους ξυλοποιημένους βλαστούς από όπου εκφύονταν.

2.2) Κατεργασία δειγμάτων

Από το φυτικό υλικό που συγκεντρώθηκε, ζυγίστηκαν 5 g τα οποία λειοτριβήθηκαν σε ιγδίο μέχρι την κονιορτοποίησή τους.

2.3) Παραλαβή των εκχυλισμάτων

Τα φυτικά δείγματα που ζυγίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 500 mL και υπέστησαν διαδοχική εκχύλιση 4 σταδίων με οργανικούς διαλύτες. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατά σειρά ο πετρελαϊκός αιθέρας, το εζάνιο, ο διαιθυλαιθέρας και η μεθανόλη.

2.3.1) Διαδικασία εκχύλισης

Η εκχύλιση με τους 3 πρώτους διαλύτες πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε λουτρό υπερήχων Bandelin Sonorex Super Rk 225H συχνότητας 35 KHz. Η θερμοκρασία του απιονισμένου νερού στο λουτρό ρυθμίστηκε στους 20-21°C και η διάρκεια κάθε εκχύλισης ήταν 15 min. Ο όγκος των 3 πρώτων διαλυτών που προστέθηκε για την εκχύλιση ήταν 100 mL και ο συνολικός αριθμός των εκχυλίσεων για κάθε διαλύτη ήταν έξι φορές.

Μετά την εκχύλιση με τους 3 πρώτους διαλύτες, ακολούθησε εκχύλιση με 800 ml μεθανόλης σε ποτήρι ζέσεως του 1 L πάνω σε συσκευή μαγνητικού αναδευτήρα και σε συνθήκες σκότους για 18 h.

Όλα τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν με φίλτρο σύριγγας Chromafil® Xtra Pet-45/25 με μέγεθος πόρου 0,45 μm, filter-Ø: 25 mm και αποθηκεύτηκαν στους -21 °C, μέχρι τη συμπύκνωσή τους.

2.3.2) Συμπύκνωση εκχυλισμάτων



Εικόνα 2.3.2 : Περιστροφικός συμπυκνωτής κενού

Μετά το πέρας των εκχυλίσεων τα δείγματα συμπυκνώθηκαν με περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού (RVO 400 SP OECO, Germany) ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία του νερού και του κενού για κάθε διαλύτη. Για τους 3 πρώτους διαλύτες η συμπύκνωση συνεχίστηκε έως

ότου το εκχύλισμα αποκτήσει κατάλληλο όγκο ώστε να τοποθετηθεί σε μπουκαλάκι των 20 ml και να συμπυκνωθεί εν συνεχεία με ροή αζώτου μέχρι το στέγνωμά του από τον διαλύτη του. Για το μεθανολικό εκχύλισμα η συμπύκνωσή του συνεχίστηκε μέχρι ξηρού στον περιστροφικό συμπυκνωτή υπό κενό.

Τέλος υπολογίστηκε το καθαρό βάρος των δειγμάτων, τα μεθανολικά εκχυλίσματα διατηρήθηκαν σε συνθήκες κενού αέρος, ενώ τα εκχυλίσματα των υπολοίπων

διαλυτών αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -21°C . Όλη η διαδικασία της παραλαβής επαναλήφθηκε εις διπλούν.

2.4) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH)

Σε όλα τα δείγματα που εκχυλίστηκε μετρήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με την χρήση του DPPH όπου οι ελεύθερες ρίζες του χρησιμοποιούνται στην αποτίμηση της παρεμποδιστικής ικανότητας και στην αντιοξειδωτική ικανότητα.

Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η παραδοσιακή μέθοδος του DPPH των (Brand-Williams et al., 1995) όπου οι ελεύθερες ρίζες του DPPH απορροφούν στα 515 nm και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας μπορεί να καθοριστεί με την παρακολούθηση της μείωσης της απορρόφησης (Brand-Williams et al., 1995).

Αναλυτικά παρασκευάστηκαν διαλύματα DPPH των 8 mg σε 200 ml μεθανόλης. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιείται κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς με παρασκευή προτύπων μεθανολικών διαλυμάτων 9 συγκεντρώσεων Trolox (0- 40 μM). Στη συνέχεια, σε φιαλίδιο προσθέτονται 3 mL διαλύματος DPPH και 30 μL δείγματος. Δείγματα διάφορων συγκεντρώσεων κάθε εκχυλίσματος αναμιγνύονται με διάλυμα DPPH μέχρις όγκου 3 mL. Ακολούθησε επώαση 30 λεπτών σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των δειγμάτων με φωτόμετρο σε μήκος κύματος 515 nm. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που χρειάζεται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50% (IC_{50}) και εκφράζεται ως ισοδύναμα του αντιοξειδωτικού Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E).

Τα αποτελέσματα των πρότυπων καμπύλων αναφοράς παρατίθενται στο παράρτημα I σελ. 139.

Η παρεμπόδιση δίνεται κάθε φορά από τον παρακάτω τύπο :

$$\% \text{ Παρεμπόδιση} = [(AC-AS)/AC] \times 100$$

Όπου AC : η απορρόφηση του μάρτυρα

Και AS: η απορρόφηση του δείγματος

2.5) Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων

Σε όλα τα δείγματα που εκχυλίστηκαν εκτιμήθηκε η ανασταλτική δράση τους ενάντια στους *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T, *Streptococcus mutans* LMG 14558^T, *Streptococcus oralis* LMG 14532^T, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068, *Streptococcus sobrinus* LMG 14641^T, *Staphylococcus aureus* DSM 21705, *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202, *Bacillus cereus* LMG 6923^T, *Listeria innocua* LMG 11387^T, *Listeria welschimeri* 15008, *Escherichia coli* C1845, *Salmonella typhimurium* SL1344, *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26, *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197.

2.5.1) Μικροβιακά στελέχη

Η αντιμικροβιακή δράση εξετάστηκε με την χρήση κάθε εκχυλίσματος από τα φυτά δίκταμο, δενδρολίβανο και θρούμπι ενάντια θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων των όπως φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 2.5.2).

Πίνακας 2.5.2 : Μικροοργανισμοί που επιλέχτηκαν για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης με την μέθοδο διάχυσης άγαρ-πηγαδιού. Όπου BHI: Brain Hard Infusion, TSB: Tryphon Soya Broth

Μικροοργανισμός	Χρώση κατά Gram	Συνθήκες Ανάπτυξης
		Μέσο, θερμοκρασία
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	+	BHI, 37 °C
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	+	BHI, 37 °C
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	+	BHI, 37 °C
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	+	BHI, 37 °C
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	+	BHI, 37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	+	BHI, 37 °C
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	+	BHI, 37 °C
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	+	TSB, 30 °C
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	+	BHI, 37 °C
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	+	BHI, 37 °C
<i>Escherichia coli</i> C1845	-	BHI, 37 °C
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	-	BHI, 37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	-	TSB, 30 °C
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	-	BHI, 37 °C

2.5.2) Μέθοδος διάχυσης άγαρ-πηγαδιών

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε τρυβλία (well diffusion assay-WDA). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το κατάλληλο θρεπτικό μέσο για κάθε μικροοργανισμό- στόχο όπως φαίνεται στον πίνακα 2.5.2 με 1,5 % άγαρ και το οποίο εμβολιάστηκε με το καθένα από τον μικροοργανισμό- στόχο (εμβόλιο 1% v/v, από φρέσκια καλλιέργεια), όταν η θερμοκρασία του μέσου ήταν περίπου 40 °C. Ακολούθησε στρώσιμο τετράγωνων τρυβλίων Petri με 50 mL με το θρεπτικό μέσο και αναμονή μέχρι να σταθεροποιηθεί. Στη συνέχεια έγινε διάνοιξη οπών διαμέτρου 6 mm στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur. Έγχυση σε κάθε οπή 50 μL δείγματος από το κάθε εκχύλισμα. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία παρέμειναν για 2 h στο ψυγείο, ώστε να επιτευχθεί και να ολοκληρωθεί η διάχυση του υγρού δείγματος στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολούθησε επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε μικροοργανισμό- στόχο (Πίνακας 2.5.2), παραμονή για 24 h και έγινε η μέτρηση της

διαμέτρου των ζωνών αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού-στόχου που δημιουργήθηκαν γύρω από τις οπές.

2.6 Μέτρηση φαινολικών συστατικών

Για την μέτρηση των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα διάφορα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Κατά την μέθοδο αυτή 1,5 ml απιονισμένο νερό, 25 μL από το εξεταζόμενο δείγμα και 125 μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu τοποθετούνται σε ειδικές θηκές αναλύσεων και αναδεύονται καλά. Μετά από 3 min προστίθενται 375 μL ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) και συμπληρώνεται νερό 475 μL . Ο τελικός όγκος φτάνει τα 2,5 mL. Μετά από διάστημα 2 h μετριέται η απορρόφηση με φωτόμετρο στα 725 nm.

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα καφεϊκού οξέος (1,2 mg/ ml) και ακολούθως με αραιώση παρασκευάζονται οι επιθυμητές συγκεντρώσεις και την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Οι τελικές συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων είναι : 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2 mg καφεϊκού οξέος/ ml. Στην συνέχεια ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως περιγράφεται ανωτέρω.

2.7) Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν πειραματικώς τα πτητικά συστατικά των οργανικών εκχυλισμάτων των φυτών εφαρμόστηκε η ανάλυση GC-MS. Συγκεκριμένα για την ανάλυση αυτών των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας χρωματογράφος Hewlett Packard 5890 Series II (Palo, Alto, CA, USA) εξοπλισμένος με έναν επιλεκτικό ανιχνευτή μάζας (MSD) 5972 Series στην λειτουργία της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (70eV) και με μια HP-5 ms τριχοειδή στήλη (30 m, 0,25 mm id., 0,25- μm πάχους film), με ήλιο ως φέρον αέριο σε ρυθμό 1 mL x min⁻¹. Η θερμοκρασία της στήλης κρατήθηκε αρχικά για 3 min στους 50° C, μετά σταδιακά αυξήθηκε στους 180° C με ρυθμό 3° C x min⁻¹ και τελικώς αυξήθηκε στους 250°C σε ρυθμό των 15° C x min⁻¹ και κρατήθηκε για 5 min. Οι θερμοκρασίες έγχυσης και του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν

στους 220 και 290°C αντίστοιχα. Ένα μικρόλιτρο κάθε οργανικού εκχυλίσματος φυτών εγχύθηκε χειροκίνητα, στην λειτουργία δίχως αραίωση.

2.8) Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων έγινε σε σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADvp, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20μL, ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA) SPD-M10Avp και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (MS-ESI, ElectroSpray Ionization, negative mode).

Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στη λειτουργία αρνητικού ιόντος ώστε να ευνοηθεί ο σχηματισμός [M-H] και ήταν οι εξής:

Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού CDL (Curved Dissolvation Line) 250 °C, ροή αερίου εκνέφωσης (N₂) 1,5Lmin⁻¹, πίεση αερίου ξήρανσης (N₂) 0,1 MPa (ροή 10L/min), θερμοκρασία heat block 300 °C, δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface) -3,5kV, τάση CDL-20V και τάση ανιχνευτή -1,48 kV.

Στα χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης (scan mode) καταγράφηκε η περιοχή από 100 έως 1000 amu (λόγος μάζας προς φορτίο, *m/z*) με χρόνο σάρωσης 6000 amu/s. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού Lab Solutions της εταιρείας Shimadzu, LC-MS Solutions Version 3.40.307.

Η στήλη ήταν Discovery SUPELCO Analytical (Sigma-Aldrich) C18 αναστραμμένης φάσης μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης (5 μm). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός των δύο διαλυτών. Ο διαλύτης A ήταν μεθανόλη μεγάλης καθαρότητας για MS και ο διαλύτης B ήταν δις απεσταγμένο νερό ρυθμισμένο σε pH 2,5 με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 0,4 ml/min και η πίεση κυμαινόταν από 140-160 bar. Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (Gradient elution), κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.8 : Πρόγραμμα έκλουσης που εφαρμόστηκε. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,4 mL/ min και ο χρόνος ανάλυσης ήταν 90 λεπτά

Χρόνος (min)	A	B
0	25	75
5	25	75
30	65	75
60	100	0
90	100	0

Η παρακολούθηση για τα φαινολικά συστατικά έγινε με τον ανιχνευτή πολλαπλού μήκους κύματος (diode array detector, DAD) στη φασματική περιοχή 280 και 330 nm όπου απορροφούν φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή.

Εκτός από τα εκχυλίσματα των φυτών, αναλύθηκαν επίσης με την μέθοδο LC-MS και διαλύματα πρότυπων ουσιών: γαλλικό οξύ, κερκετίνη-3-4-O-δι-γλυκοζίτης, πικουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, μυρισετίνη-3-O-ραμνοζίτης, λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίτης, ροσμαρινικό οξύ, απιγενίνη-7-O-γλυκοζίτης, κερκετίνη, καμφερόλη, απιγενίνη, λουτεολίνη, ακακετίνη, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη των οποίων τα χρωματογραφήματα αναλύθηκαν με τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης (πρόγραμμα έκλουσης). Τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων συγκρίθηκαν με εκείνα των προτύπων, με σκοπό τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση συστατικών τους με τις πρότυπες, βάσει του χρόνου συγκράτησης, του φάσματος υπεριώδους- ορατού και του φάσματος μάζας του κάθε συστατικού.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στο κεφάλαιο 3.3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1) Παραλαβή των εκχυλισμάτων και αποδόσεις

Όλη η διαδικασία των εκχυλίσεων κάθε φυτού για την παραλαβή κάθε οργανικού εκχυλίσματος έγινε εις διπλούν και στον παρακάτω πίνακα συγκεντρώνονται τα καθαρά βάρη των εκχυλισμάτων για κάθε διαλύτη, που προέκυψαν από αρχικό δείγμα των 5 g.

Πίνακας 3.1 : Βάρος (mg) των φυτικών δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με διάφορους διαλύτες

δείγμα/διαλύτες	πετρελαϊκός αιθέρας	εξάνιο	διαιθυλαιθέρας	μεθανόλη
δίκταμο	170±60	23±1	110±60	1040±110
δεντρολίβανο	140±40	35±1	330±30	480±220
θρούμπι	170±70	54±2	190±10	1060±130

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα την υψηλότερη απόδοση με το μεγαλύτερο καθαρό βάρος ανά 5 g δείγματος είχαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα με σειρά θρούμπι > δίκταμο > δεντρολίβανο, ενώ την μικρότερη απόδοση με το χαμηλότερο καθαρό βάρος είχαν τα εκχυλίσματα εξανίου με σειρά δίκταμο < δεντρολίβανο < θρούμπι.

3.2) Ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων

Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών που περιέχονται ως άρωμα στα διάφορα δείγματα που εξετάστηκαν έγινε με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από την φάση του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου. Με την τεχνική αυτή πιστοποιήθηκαν διάφορες ενώσεις χαρακτηριστικές για κάθε φυτό, και πραγματοποιήθηκε ο ποσοστιαίος προσδιορισμός.

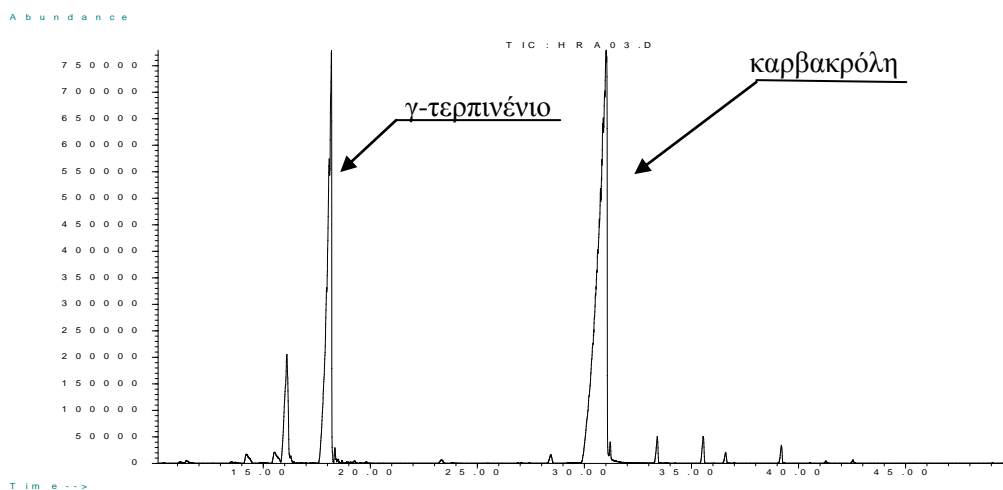
Στους παρακάτω Πίνακες (3.2.α i έως 3.2.γ ii) παρουσιάζονται οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν από τα αρωματικά φυτά με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης, των φασμάτων μάζων με τα δεδομένα των βιβλιοθηκών ADAMS 07, WILEY 275 και NIST 98 που διαθέτει το λογισμικό του οργάνου. Από τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων συμπεραίνεται ότι όλα τα πτητικά συστατικά των φυτών εμφανίζονται στην περιοχή του χρόνου συγκράτησης 14,21 – 42,69 min.

Τα περισσότερα πτητικά συστατικά εμφανίζονται στο εκχύλισμα πετρελαικού αιθέρα του δίκταμου και είναι 14, ενώ τα λιγότερα εμφανίζονται στο αντίστοιχο του εξανίου και είναι 4.

Το εξάνιο παραλαμβάνει μόνο τα υπολείμματα των πτητικών συστατικών λόγω ότι το μεγαλύτερο μέρος των συστατικών έχει ήδη περάσει στον πετρελαϊκό αιθέρα.

Πίνακας 3.2.α i: Ποιοτικά αποτελέσματα και εκατοστιαία σύσταση των πτητικών συστατικών του θρουμπιού στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα

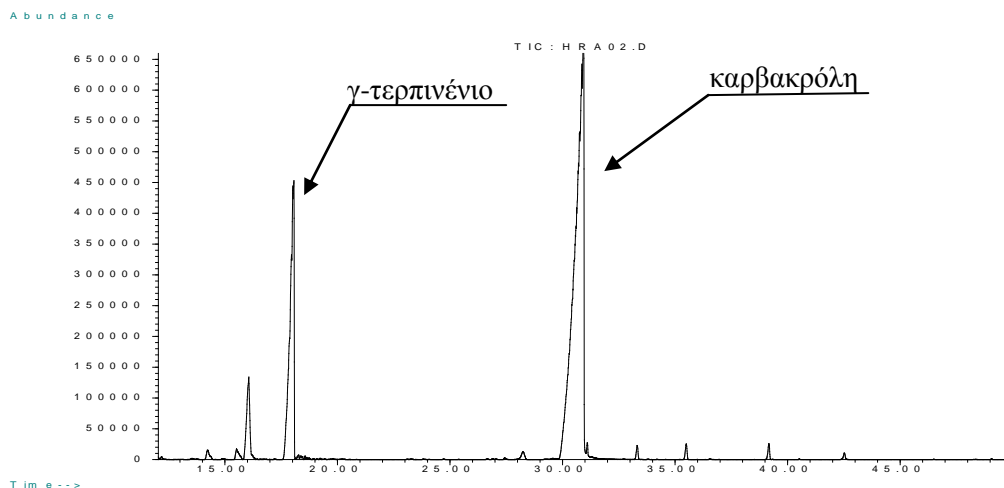
Συστατικά	ποσοστό	χρόνος συγκράτησης (min)
β-μυρκένιο	0,56%	14,23
α-τερπινένιο	0,68%	15,53
π-κυμένιο	5,01%	16,06
γ-τερπινένιο	21,64%	18,06
θυμοκινόνη	0,51%	28,24
καρβακρόλη	69,70%	30,93
αιθυλεστέρας της καρβακρόλης	0,45%	33,32
trans-καρνοφυλλένιο	0,52%	35,50
β-μπισαμπολένιο	0,52%	39,17



Σχήμα 3.2.α i : Αέριο χρωματογράφημα του θρουμπιού στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα

Πίνακας 3.2.α ii : Ποιοτικά αποτελέσματα και εκατοστιαία σύσταση των πτητικών συστατικών του θρουμπιού στο εκχύλισμα εξανίου

Συστατικά	ποσοστό	χρόνος συγκράτησης (min)
β-μυρκένιο	0,59%	14,21
α- τερπινένιο	0,80%	15,52
π- κυμένιο	6,24%	16,11
γ- τερπινένιο	28,11%	18,08
θυμοκινόνη	0,35%	28,44
καρβακρόλη	60,61%	31,02
αιθυλεστέρας της καρβακρόλης	0,77%	33,41
trans- καρνοφυλλένιο	0,81%	35,55
β- μπισαμπολένιο	0,50%	39,20

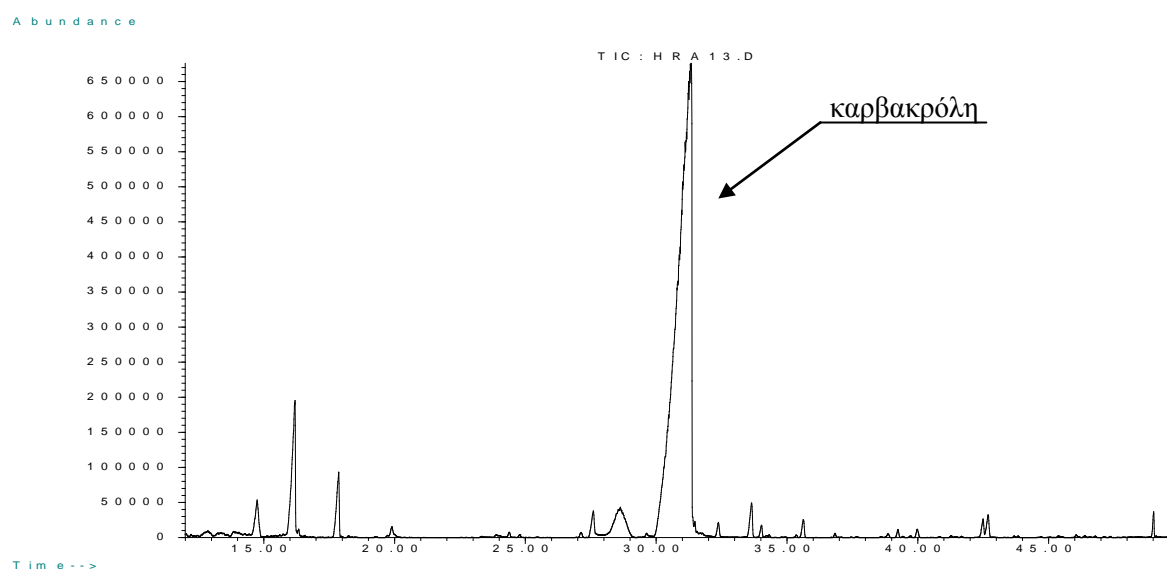


Σχήμα 3.2.α ii : Αέριο χρωματογράφημα του θρουμπιού εκχυλίσματος εξανίου

Στο θρούμπι τα συστατικά που εμφανίζονται και στα 2 εκχυλίσματα είναι κοινά και αποτελούνται: β-μυρκένιο, α-τερπινένιο, π-κυμένιο, γ-τερπινένιο, θυμοκινόνη, καρβακρόλη, αιθυλεστέρας της καρβακρόλης, trans-καρυοφυλλένιο και β-μπισαμπολένιο. Τα συστατικά τα οποία καταλαμβάνουν τα υψηλότερα ποσοστά των κορυφών στο χρωματογράφημα και εμφανίζονται με περισσότερη αφθονία στα εκχυλίσματα είναι η καρβακρόλη (69,7% στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα και 60,6% στου εξανίου), το γ-τερπινένιο (21,6% στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα και 28,1% στου εξανίου) και το π-κυμένιο (5,1% στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα και 6,2% στου εξανίου). Σε σύγκριση με άλλες μελέτες οι Alizadeh et al., 2010 βρήκαν στο αιθέριο έλαιο επιπλέον συστατικά (καμφένιο, α-θουγένιο, α-φαιλανδρένιο, δ-τερπινένιο, ένυδρο E-σαμπινένιο, τερπινολένιο, τερπινεν-4-όλη, μεθυλαιθέρα της θυμόλης, E-α-μπισαμπολένιο και βικυκλογερμακρένιο) εκ των οποίων το δ-τερπινένιο ήταν το δεύτερο κυριότερο συστατικό στο έλαιο μετά την καρβακρόλη. Οι Gulluce et al., 2003 βρήκαν επίσης στο έλαιο το β-οκιμένιο, την βορνεόλη, την πουλεγόνη, την ανηθόλη, το αρωμαδενδρένιο και ως κυριότερο συστατικό την θυμόλη η οποία είχε διαχωριστεί από το ισομερές της, την καρβακρόλη. Γενικά στις περισσότερες μελέτες τα κυριότερα συστατικά στο έλαιο του θρουμπιού είναι είτε η καρβακρόλη (Gursoy et al., 2009) είτε η θυμόλη (Azaz et al., 2005) ανάλογα με το χημειότυπο τους.

Πίνακας 3.2.β i: Ποιοτικά αποτελέσματα και εκατοστιαία σύσταση των πηκτικών συστατικών του δίκταμου στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα

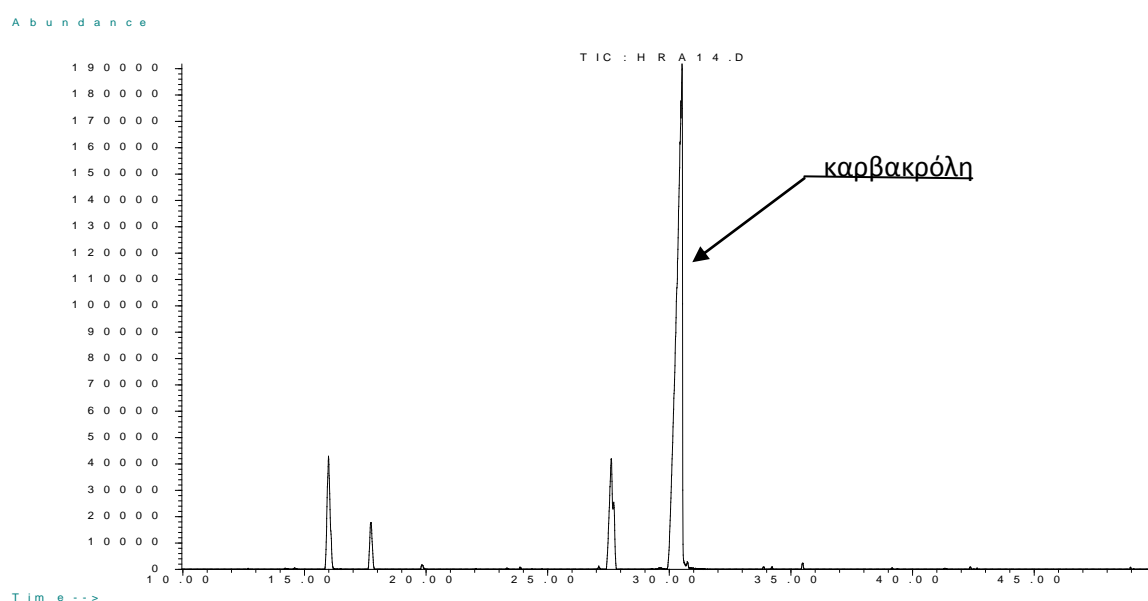
Συστατικά	ποσοστό	χρόνος συγκράτησης (min)
π- κυμένιο	5,82%	16,19
ο- κυμένιο	0,12%	16,33
γ- τερπινένιο	2,17%	17,87
λιναλοόλη	0,44%	19,91
μεθυλεστέρας της καρβακρόλης	0,14%	27,13
θυμοκινόνη	4,44%	27,60
καρβακρόλη	82,40%	30,88
α-κουμπενένιο	0,40%	32,38
α-κοπαένιο	1,09%	33,65
β-καρνοφυλλένιο	0,51%	35,63
β-μπισαμπολένιο	0,18%	39,24
δ- καδινένιο	0,22%	39,99
οξείδιο του καρνοφυλλενίου	0,70%	42,69



Σχήμα 3.2.β i: Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα δίκταμου

Πίνακας 3.2.β ii : Ποιοτικά αποτελέσματα και εκατοστιαία σύσταση των πτητικών συστατικών του δίκταμου στο εκχύλισμα εξανίου

Συστατικά	ποσοστό	χρόνος κατακράτησης (min)
π- κυμένιο	8,80%	15,997
γ- τερπινένιο	3,09%	17,729
θυμοκινόνη	11,54%	27,613
καρβακρόλη	76,56%	30,523



Σχήμα 3.2.β ii : Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου δίκταμου

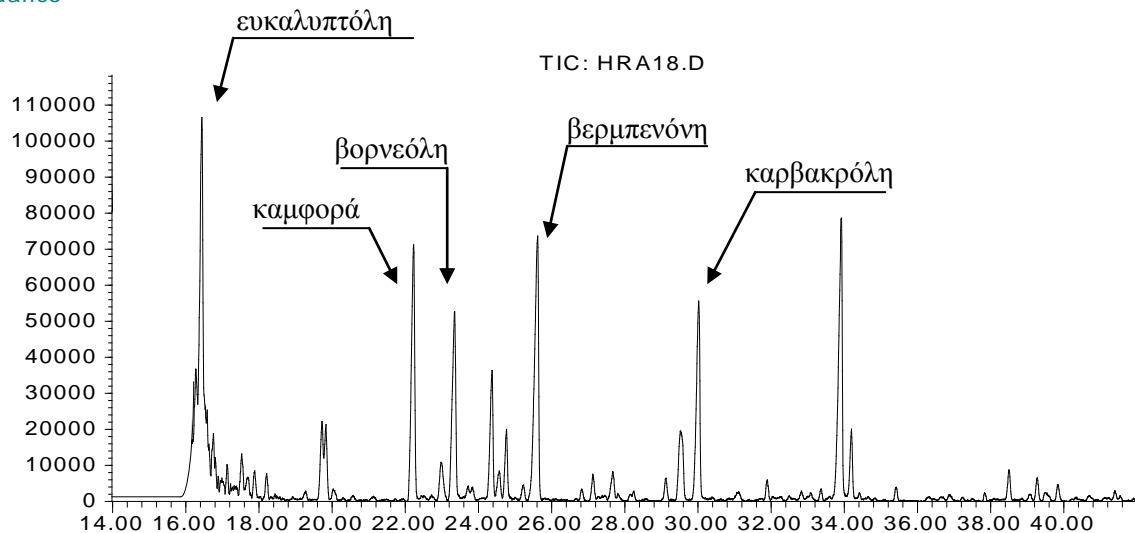
Στο δίκταμο τα συστατικά που εμφανίζονται στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα είναι π-κυμένιο, ο-κυμένιο, γ-τερπινένιο, λιναλοόλη, μεθυλεστέρας της καρβακρόλης, θυμοκινόνη, καρβακρόλη, α-κουμπενένιο, α-κοπαένιο, β-καρυοφυλλένιο, β-μπισαμπολένιο, δ-καδινένιο και οξείδιο του καρυοφυλλενίου, ενώ στο εκχύλισμα του εξανίου ανιχνεύτηκαν μόνο το π-κυμένιο, γ-τερπινένιο, θυμοκινόνη και καρβακρόλη. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι τα συστατικά που βρέθηκαν στο εκχύλισμα εξανίου είναι ταυτόχρονα και τα κυρίαρχα συστατικά στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα με ποσοστά π-κυμενίου 8,8% και 5,82% αντίστοιχα, γ-τερπινενίου 3,09% και 2,17% αντίστοιχα, καρβακρόλης 76,56% και 82,4% αντίστοιχα και θυμοκινόνης 11,54% και 4,44% αντίστοιχα. Σε σύγκριση με άλλες μελέτες οι Kouri et al., 2007 βρήκαν στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα τα επιπλέον συστατικά θυμόλη,

βορνεόλη, καλαμενένιο, και μεθυλ-1,4-βενζοκινόνη (ισομερές της θυμοκινόνης) με το τελευταίο να είναι το δεύτερο κυριότερο συστατικό μετά την καρβακρόλη. Οι Alexopoulos et al., 2011 βρήκαν στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου την ευκαλυπτόλη, την μενθόνη, την ισομενθόνη και μενθόλη (κυριότερη ουσία) μέσω σύγκρισης με τις καθαρές πρότυπες ουσίες. Επίσης οι Ntalli et al., 2010 βρήκαν επιπλέον στο έλαιο του δίκταμου κατά σειρά εκλουσης τα α-θουγένιο, α-πινένιο, σαμπινένιο, μυρκένιο, α-φελλανδρένιο, α-τερπινένιο, β-φελλανδρένιο, ένυδρο cis-σαμπινένιο, τερπινολένιο, τερπινεν-4-όλη και μεθυλαιθέρα της καρβακρόλης.

Πίνακας 3.2.γi : Ποιοτικά αποτελέσματα και εκατοστιαία σύσταση των πητικών συστατικών του δεντρολίβανου στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα

Συστατικά	ποσοστό	χρόνος κατακράτησης (min)
ευκαλυπτόλη	21,20%	16,44
λιναλοόλη	3,48%	19,83
καμφορά	15,60%	22,23
βορνεόλη	12,31%	23,35
τερπεν-4-όλη	3,39%	24,77
βερμπενόνη	19,66%	25,62
θυμόλη	5,81%	29,52
καρβακρόλη	12,67%	30,02

Abundance



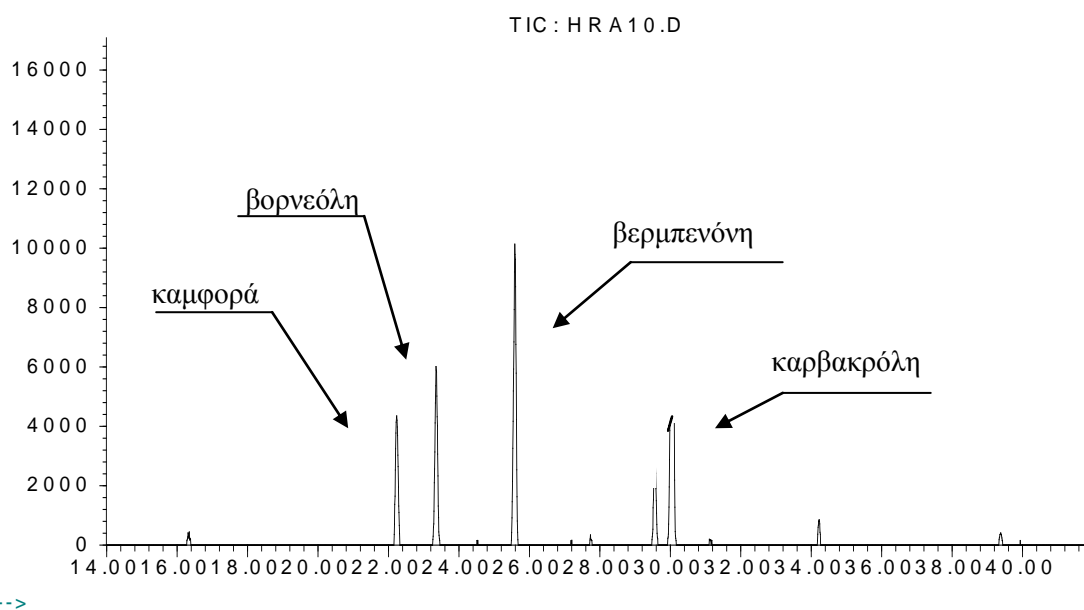
Time-->

Σχήμα 3.2.γ i : αέριο χρωματογράφημα εκχύλισματος πετρελαϊκού αιθέρα δεντρολίβανου

Πίνακας 3.2.γ ii : ποιοτικά αποτελέσματα και εκατοστιαία σύσταση των πτητικών συστατικών του δεντρολίβανου στο εκχύλισμα εξανίου

Συστατικά	ποσοστό	χρόνος κατακράτησης (min)
καμφορά	19,23%	22,23
βορνεόλη	21,01%	23,36
βερμπενόνη	33,76%	25,59
θυμόλη	7,54%	29,57
καρβακρόλη	16,45%	30,07

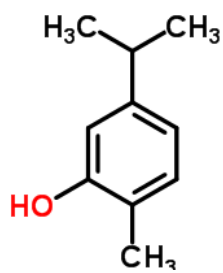
Abundance



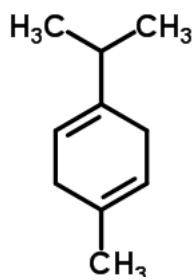
Σχήμα 3.2.γ ii : αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου δεντρολίβανου

Στο δεντρολίβανο τα συστατικά που εμφανίζονται στα εκχυλίσματα είναι καμφορά, βορνεόλη, βερμπενόνη, θυμόλη, καρβακρόλη ενώ οι ενώσεις ευκαλυπτόλη, λιναλοόλη και τερπεν-4-όλη ανιχνεύτηκαν μόνο στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα.

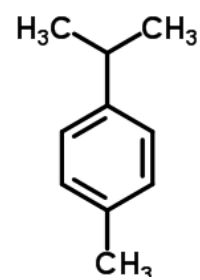
Οι κυριότερες ενώσεις στον πετρελαϊκό αιθέρα είναι ευκαλυπτόλη (21,2%) , βερμπενόνη (19,66%), καμφορά (15,6%), καρβακρόλη (12,67%) και βορνεόλη (12,31%), ενώ στο εξάνιο ήταν βερμπενόνη (33,8%), βορνεόλη (21%), καμφορά (19,23%), καρβακρόλη (16,45%), και θυμόλη (7,5%). Σε σύγκριση με άλλες μελέτες των (Zaouali et al., 2010) η ευκαλυπτόλη και η βορνεόλη ήταν τα κυριότερα συστατικά στο αιθέριο έλαιο, ενώ ταυτοποιήθηκαν επιπλέον σε μικρές ποσότητες τα α-θουγένιο, α-πινένιο, καμφένιο, β-πινένιο, μυρκένιο, α-τερπινένιο, λιμονένιο, οκιμένιο, γ-τερπινένιο, π-κυμένιο, α-τερπενεόλη, γερανιόλη, μεθυλο ευγενόλη, β-καρνοφυλλένιο και α-ομουλένιο. Οι (Zaouali et al., 2013) βρήκαν επιπλέον στο έλαιο σε μικρά ποσοστά τα α-φελλανδρένιο, τερπινολένιο, γ-μοουρολένιο, δ-καδινένιο, α-αμορφένιο, οξείδιο του καρνοφυλλενίου και την trans-καδινόλη και από όλες τις ουσίες πάλι η ευκαλυπτόλη ήταν η κυρίαρχη.



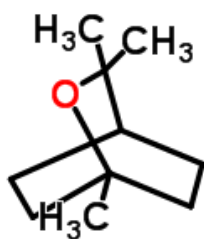
καρβακρόλη



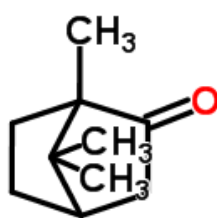
γ-τερπινένιο



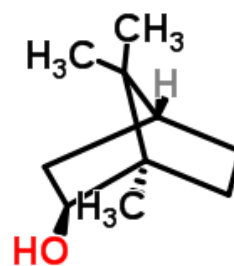
π-κυμένιο



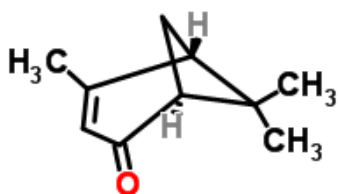
ευκαλυπτόλη



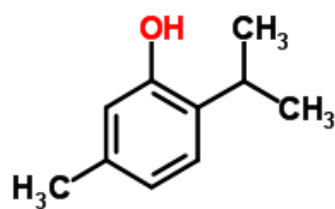
καμφορά



βορνεόλη



βερμπενόνη



θυμόλη

Σχήμα 3.2 : Σημαντικότερα πτητικά συστατικά των εκχυλισμάτων

3.3) Ανάλυση των φυτικών εκχυλισμάτων με LC-MS

Τα δείγματα των εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν ήταν του διαιθυλαιθέρα και της μεθανόλης καθώς αυτοί οι δύο οργανικοί διαλύτες απομονώνουν τις περισσότερες φαινολικές ενώσεις.

Οι δύο κύριες κατηγορίες που προσδιορίστηκαν είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Τα φαινολικά οξέα αναφέρονται συνήθως με τον όρο «φαινολικά» και έχουν ως βασική δομή την φαινόλη. Τα φλαβονοειδή αναφέρονται συνήθως ως «πολυφαινόλες» και περιέχουν τουλάχιστον δύο υπομονάδες φαινόλες.

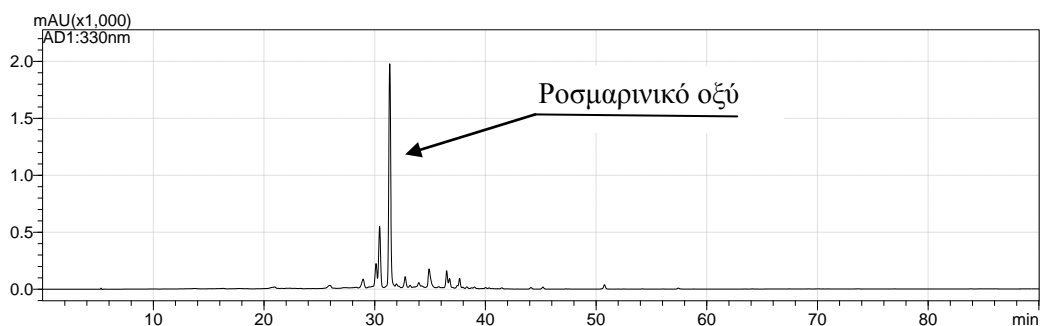
Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-MS). Η ταυτοποίηση LC-MS των φαινολικών συστατικών βασίστηκε στον συνδυασμό του μοριακού τους βάρους, του φάσματος μάζας, του χρόνου έκλουσης και του φάσματος υπεριώδους-ορατού και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των πρότυπων φαινολικών συστατικών που επιλέχθηκαν. Οι ταινίες απορρόφησης για τα φλαβονοειδή είναι η ταινία I με μέγιστη απορρόφηση από 300-380 nm προερχόμενη από τον Β δακτύλιο, ενώ η ταινία II με μέγιστη απορρόφηση από 240-290 nm προκύπτει από τον Α δακτύλιο (Merken and Beecher, 2000, Santos-Buelga et al., 2003).

Στους παρακάτω πίνακες καταγράφονται οι κορυφές του χρωματογραφήματος που διαχωρίστηκαν, όπου δίνονται οι αντίστοιχες προτεινόμενες δομές των συστατικών με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά, m/z των κύριων θραυσμάτων των ιόντων και των χρόνων έκλουσης και τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Πίνακας 3.3α : Χαρακτηριστικά της ανάλυσης των φαινολικών συστατικών στο μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου με την μέθοδο LC-MS

Κορυφή	Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	m/z	%	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	25.96	γλυκουρονίδιο της εριοδικτυόλης	463	1,53	-	343,289	Miron et al., 2011, Justesen et al., 2000
2	27.25	γλυκοζίτης της απιγενίνης	431	0,46	-	333, 367	Gouveia and Castilho, 2013
3	28.95	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	447	2,66	447,285	344,254	πρότυπη ένωση
4	30.11	γλυκουρονίδιο της κερκετίνης	477	5,81	477,301	345,275	Guimarães et al. 2013
5	30.44	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	359	13,22	359	324,286,233	
6	31.35	ροσμαρινικό οξύ	359	49,19	359	324,286,233	πρότυπη ένωση
7	32.75	γλυκοζίτης της μεθυλ απιγενίνης	461	2,42	461,285	338,268	Almela et al., 2006, Kontogianni et al., 2013
8	33.98	παράγωγο φαινολικού οξέος	639	1,38	δεν ανιχνεύτηκε	324, 285, 253	
9	34.91	γλυκοζίτης της μεθυλ απιγενίνης	461	5,42	461,285	338,268	Almela et al., 2006, Kontogianni et al., 2013
10	36.50	ακετυλο γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	503	3,48	503,285	339,268,246	Justesen et al., 2000, Ferreira et al., 2012
11	36.75	ακετυλο γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	503	1,85	503,399,285	339,268,246	Justesen et al., 2000, Ferreira et al., 2012
12	37.66	ακετυλο γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	503	1,89	503.399.285	339,268,246	Justesen et al., 2000, Ferreira et al., 2012
13	40.01	δεν ταυτοποιήθηκε	345	0,26	345, 301, 268	284	
14	45.19	δεν ταυτοποιήθηκε	363	0,49	δεν ανιχνεύτηκε	335, 283	
15	50.75	μεθυλ φλαβόνη	283	1,06	δεν ανιχνεύτηκε	332,275	
16	51.97	μεθοξυ καρνοσόλη	359	ίχνη	δεν ανιχνεύτηκε	282	Hossain et al., 2010
17	54.18	καρνοσόλη	329	ίχνη	329, 285	289	πρότυπη ένωση

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς 15 συστατικά. Τα κυριότερα συστατικά με βάση το εκατοστιαίο ποσοστό τους ήταν το ροσμαρινικό οξύ (49,19%) και ένα ισομερές του ροσμαρινικού οξέος (13,22%). Άλλα συστατικά με μικρότερο αλλά αξιοσημείωτο για αναφορά ποσοστό ήταν το γλυκουρονίδιο της κερκετίνης (5,81%), δύο γλυκοζίτες της μεθυλ απιγενίνης (5,42% και 2,42% αντίστοιχα), ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (2,66%) και τρία ακέτυλο γλυκουρονίδια της λουτεολίνης με αντίστοιχα ποσοστά 3,48%, 1,85% και 1,89%. Επίσης άλλες ενώσεις που ανιχνεύτηκαν σε μικρότερα ποσοστά ήταν το γλυκουρονίδιο της εριοδικτυόλης, ένα παράγωγο φαινολικού οξέος, μια μεθυλ φλαβόνη, και ένας γλυκοζίτης της απιγενίνης, ενώ βρέθηκαν σε ίχνη η μεθοξυ καρνοσόλη και η καρνοσόλη. Η κορυφή 15 στο δεντρολίβανο μπορεί να είναι μια μεθυλ φλαβόνη με ενδεχόμενο να είναι η γκενγκουανίνη διότι είναι μια μεθυλιωμένη απιγενίνη η οποία απομονώθηκε στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (Kontogianni et al., 2013, Almela et al., 2006) και αφού είναι λιγότερο πολική, εκλύεται αργότερα από την απιγενίνη.

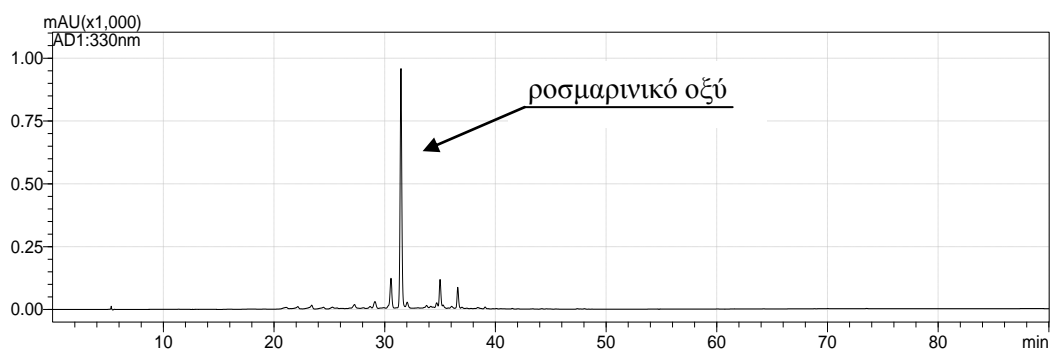


Σχήμα 3.3α : Υγρό χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου

Πίνακας 3.3β : Χαρακτηριστικά της ανάλυσης των φαινολικών συστατικών στο μεθανολικό εκχύλισμα δίκταμου με την μέθοδο LC-MS.

Κορυφή	Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	21.09	δεν ταυτοποιήθηκε	1,20	387	δεν ανιχνεύτηκε	357, 248	
2	22.14	δι γλυκοζίτης της απιγενίνης	1,22	593	593, 431	333, 271	Zimmermann et al., 2011
3	23.40	δεν ταυτοποιήθηκε	1,79		δεν ανιχνεύτηκε	342, 253	
4	24.47	δι γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	0,91	637	637, 293	342, 266	B.F. Zimmermann et al.2011
5	27.26	γλυκοζίτης της απιγενίνης	1,49	431	δεν ανιχνεύτηκε	333, 267	Guo et al., 2013
6	28.68	γλυκοζίτης της απιγενίνης	0,59	431	δεν ανιχνεύτηκε	333, 268	Guo et al., 2013
7	30.56	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	8,18	359	359	324,286,233	
8	31.46	ροσμαρινικό οξύ	58,40	359	359	324,286,234	πρότυπη ένωση
9	32.03	δεν ταυτοποιήθηκε	1,81		δεν ανιχνεύτηκε	331, 267	
10	33.78	δεν ταυτοποιήθηκε	0,99	535	δεν ανιχνεύτηκε	δεν απορρόφησε	
11	34.99	παράγωγο φαινολικού οξέος	6,55	493	δεν ανιχνεύτηκε	322,288,244	
12	35.27	δεν ταυτοποιήθηκε	0,80	573	573, 249	322, 255	
13	36.60	παράγωγο φαινολικού οξέος	4,54	519	519, 359, 267	321, 287,244	
14	38.40	λουτεολίνη	0,53	285	δεν ανιχνεύτηκε	350, 254	πρότυπη ένωση

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του δίκταμου ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς 9 συστατικά. Τα κυριότερα συστατικά με βάση το εκατοστιαίο ποσοστό τους ήταν το ροσμαρινικό οξύ (58,40%) και ένα ισομερές του ροσμαρινικού οξέος (8,18%). Άλλα συστατικά με μικρότερο αλλά αξιοσημείωτο για αναφορά ποσοστό ήταν δύο παράγωγα φαινολικού οξέος (6,55% και 4,54% αντίστοιχα), ενώ άλλα συστατικά με μικρότερα ποσοστά ήταν ο δι γλυκοζίτης της απιγενίνης, δύο δι γλυκοζίτες της απιγενίνης, το δι γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης και η λουτεολίνη.

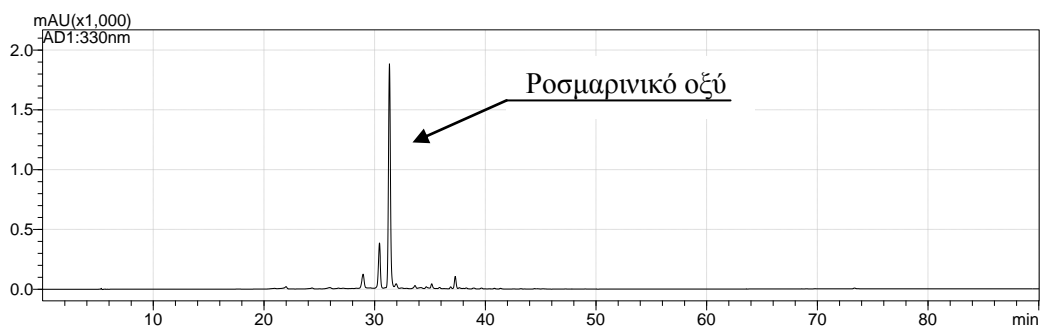


Σχήμα 3.3β : Υγρό χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος δίκταμου

Πίνακας 3.3γ : Χαρακτηριστικά της ανάλυσης των φαινολικών συστατικών στο μεθανολικό εκχύλισμα θρουμπιού με την μέθοδο LC-MS.

Κορυφή	Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	20.95	δεν ταυτοποιήθηκε	0,54	387	δεν ανιχνεύτηκε	357, 248	
2	21.99	δι γλυκοζίτης της απιγενίνης	1,37	593	δεν ανιχνεύτηκε	333, 272	Zimmermann et al. 2011
3	25.96	δεν ταυτοποιήθηκε	0,70		δεν ανιχνεύτηκε	340, 253	
4	28.95	γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	5,20	461	461,285	342,267,255	Zimmermann et al. 2011
5	30.43	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	12,99	359	359	324,288,235	
6	31.33	ροσμαρινικό οξύ	66,84	359	359	324,234	πρότυπη ένωση
7	31.94	δεν ταυτοποιήθηκε	1,48	301	δεν ανιχνεύτηκε	329, 269	
8	33.64	δεν ταυτοποιήθηκε	0,80	535	δεν ανιχνεύτηκε		
9	35.15	δεν ταυτοποιήθηκε	1,04	573	δεν ανιχνεύτηκε	322, 255	
10	37.28	δεν ταυτοποιήθηκε	3,07	283	δεν ανιχνεύτηκε	330,267	

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του θρουμπιού ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς 4 συστατικά. Τα κυριότερα συστατικά με βάση το εκατοστιαίο ποσοστό τους ήταν το ροσμαρινικό οξύ (66,84%) και ένα ισομερές του ροσμαρινικού οξέος (12,99%). Τα άλλα δύο συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (5,20%) και ο δι-γλυκοζίτης της απιγενίνης (1,37%).

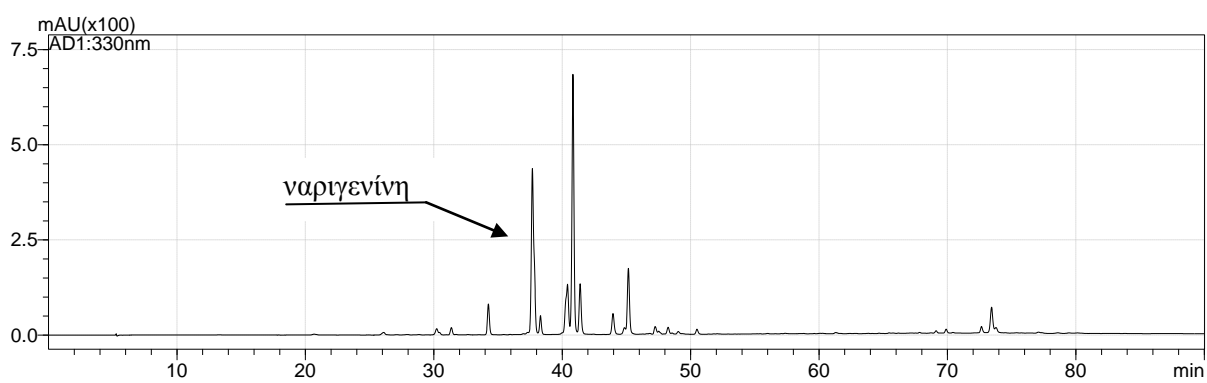


Σχήμα 3.3γ : Υγρό χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος θρουμπιού

Πίνακας 3.3δ : Χαρακτηριστικά της ανάλυσης των φαινολικών συστατικών στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα θρουμπιού με την μέθοδο LC-MS

Κορυφή	Χρόνος έκλυσης	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	26.09	ταξιφολίνη	0,51	303	303, 259	286	Tsimogiannis et al., 2006
2	30.22	δι υδροξυ φλαβονόλη	0,94	287	δεν ανιχνεύτηκε	290	Tsimogiannis et al., 2006
3	31.36	ροσμαρινικό οξύ	0,88	359	359, 179	330, 289	πρότυπη ένωση
4	34.25	εριοδικτυόλη	3,61	287	δεν ανιχνεύτηκε	289	Tsimogiannis et al., 2006, Miron et al., 2011
5	37.67		25,48	329	329, 299, 271	343, 284,236	
6	37.80	ναριγενίνη		271	δεν ανιχνεύτηκε	289	Miron et al., 2011
7	38.30	λουτεολίνη	2,17	285	δεν ανιχνεύτηκε	350, 255	πρότυπη ένωση
8	40.41	δεν ταυτοποιήθηκε	9,27	329	359, 329	345, 289, 255	
9	40.83	δεν ταυτοποιήθηκε	31,33	359	359, 285	342, 283, 244	
10	41.39	απιγενίνη	6,24	269	δεν ανιχνεύτηκε	339, 267	πρότυπη ένωση
11	44.84	δεν ταυτοποιήθηκε		349	349, 325	254	
12	45.15	δεν ταυτοποιήθηκε	0,89	-	δεν ανιχνεύτηκε	334, 284	
13	47.24	δεν ταυτοποιήθηκε	8,45	-	δεν ανιχνεύτηκε	-	
14	48.24	δεν ταυτοποιήθηκε	0,84	-	δεν ανιχνεύτηκε	-	
15	50.49	μεθυλ φλαβόνη	0,7	283	δεν ανιχνεύτηκε	335, 268	
16	62.40	καρνοσικό οξύ	ίχνη	331	δεν ανιχνεύτηκε	284	

Στα εκχυλίσματα διαιθυλαιθέρα τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο θρούμπι ήταν 9. Η κυρίαρχη ένωση είναι η ναριγενίνη η οποία συνεκλύεται με την ένωση της κορυφής 5 (χρόνοι έκλουσης 37,80 και 37,67 min αντίστοιχα) με ποσοστό 25,48%, ενώ δυστυχώς για την κορυφή 9 με το κυρίαρχο ποσοστό δεν βρέθηκαν αναφορές προς ταυτοποίηση. Άλλες ουσίες που βρέθηκαν ήταν η απιγενίνη (6,24%), η εριοδικτυόλη (3,61%) και η λουτεολίνη (2,17%), ενώ σε ακόμα μικρότερα ποσοστά ανιχνεύτηκαν μια δι υδροξυ φλαβονόλη, το ροσμαρινικό οξύ, η ταξιφολίνη, μια μεθυλ φλαβόνη και σε ίχνη το καρνοσικό οξύ.

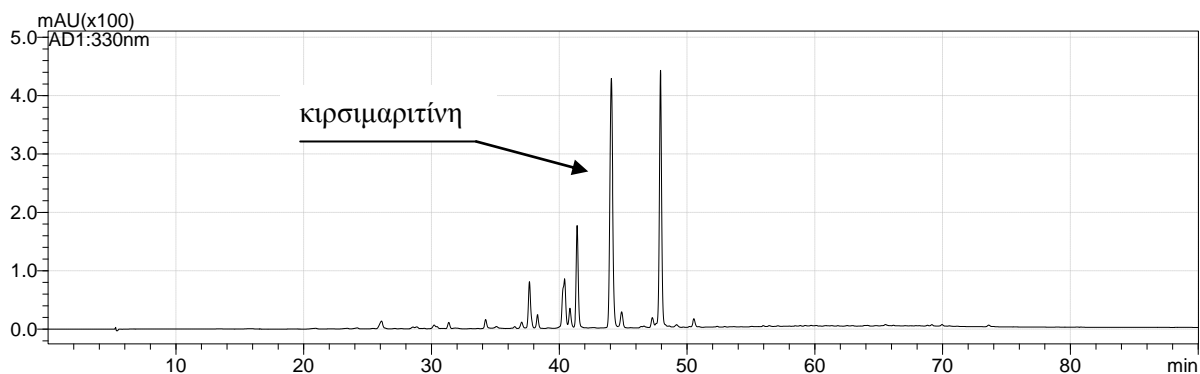


Σχήμα 3.3στ : Υγρό χρωματογράφημα του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα θρούμπιού

Πίνακας 3.3ε : Χαρακτηριστικά της ανάλυσης των φαινολικών συστατικών στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα δίκταμου με την μέθοδο LC-MS

Κορυφή	Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	26.08	ταξιφολίνη	1,21	303	303, 283	288	Tsimogiannis et al., 2006
2	31.35	ροσμαρινικό οξύ	0,61	359	359, 179	330, 289	πρότυπη ένωση
3	34.23	εριδικτυόλη	1,01	287	δεν ανιχνεύτηκε	289	Tsimogiannis et al. 2006, Miron et al. 2011
4	37.66		5,01	329	329, 299, 271	343, 284,236	
5	37,80	λουτεολίνη	1,3	285	δεν ανιχνεύτηκε	350, 255	πρότυπη ένωση
6	40.41	δεν ταυτοποιήθηκε	7,61	329	359, 329	345, 289, 255	
7	40.83	δεν ταυτοποιήθηκε	1,95	329	329	346, 257	
8	41.39	απιγενίνη	9,93	269	δεν ανιχνεύτηκε	339, 267	πρότυπη ένωση
9	44.07	κιρσιμαριτίνη	33,4	313	313, 283, 179	338, 274	Culevier et al., 1996, Almela et al. 2006
10	44.87	δεν ταυτοποιήθηκε	1,96	349	349, 325	254	
11	47.28	δεν ταυτοποιήθηκε	1,04	191	δεν ανιχνεύτηκε	318, 250	
12	47.92	δεν ταυτοποιήθηκε	27,3	343	343, 313	335, 280	
13	50.53	μεθυλ φλαβόνη	0,98	283	δεν ανιχνεύτηκε	334, 266	

Στα εκχυλίσματα διαιθυλαιθέρα τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο δίκταμο ήταν 7. Η κυρίαρχη ένωση ήταν η κισσιμαριτίνη με ποσοστό 33,4%, ενώ ακολούθησε η απιγενίνη με 9,93%. Επίσης ταυτοποιήθηκαν η ταξιφολίνη (1,21%), η εριοδικτυόλη (1,01%), η λουτεολίνη (5,01%) που συνεκλούθη με την κορυφή 4 (χρόνοι έκλουσης 37,8 και 37,66 min) και μια μεθυλ φλαβόνη (0,98%).

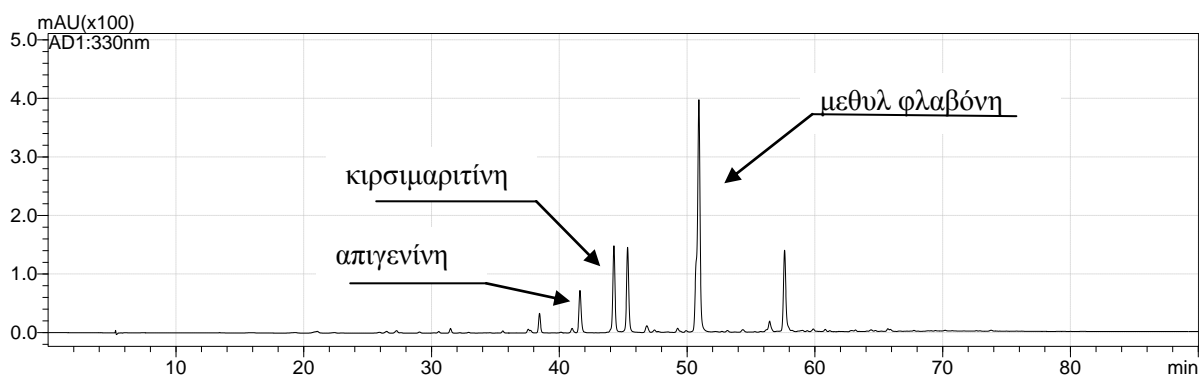


Σχήμα 3.3ε : Υγρό χρωματογράφημα του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα δίκταμου

Πίνακας 3.3στ : Χαρακτηριστικά της ανάλυσης των φαινολικών συστατικών στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα δεντρολίβανου με την μέθοδο LC-MS.

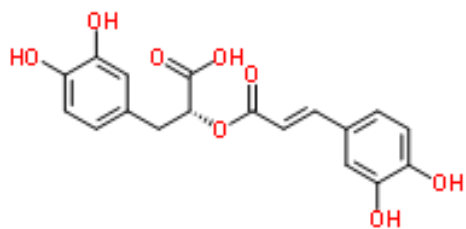
Κορυφή	Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	21.06	δεν ταυτοποιήθηκε	0,51	179	δεν ανιχνεύτηκε	260	
2	31.48	ροσμαρινικό οξύ	0,56	359	359, 197, 179	330, 289	πρότυπη ένωση
3	38.44	λουτεολίνη	2,38	285	δεν ανιχνεύτηκε	350, 255	πρότυπη ένωση
4	41.40	απιγενίνη	5,9101	269	δεν ανιχνεύτηκε	339, 267	πρότυπη ένωση
5	41.61	μεθυλ φλαβόνη		299	δεν ανιχνεύτηκε	339, 272	Kontogianni et al., 2013
6	44.27	κιρσιμαριτίνη	11,976	313	313, 283, 179	338, 274	Culevier et al., 1996, Almela et al. 2006
7	45.34	δεν ταυτοποιήθηκε	11,9	331	331, 327	334, 284	
8	46.84	δεν ταυτοποιήθηκε	1,16	299	δεν ανιχνεύτηκε	350, 269	
9	49.25	ακασετίνη	0,67	283	δεν ανιχνεύτηκε	335, 270	πρότυπη ένωση
10	50.92	μεθυλ φλαβόνη	40,769	283	δεν ανιχνεύτηκε	335, 267	
11	54.36	καρνοσόλη	0,45	329	329, 285	284	πρότυπη ένωση
12	57.62	παράγωγο φλαβόνης	12,53	373	373, 283	330, 268	
13	60.81	δεν ταυτοποιήθηκε		333	333, 301	277	
14	62.87	καρνοσικό οξύ	0,22	331	331, 287	284	πρότυπη ένωση

Στα εκχυλίσματα διαιθυλαιθέρα τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο δεντρολίβανο ήταν 7. Η κυρίαρχη φαινολική ένωση ήταν μια μεθυλ φλαβόνη με ποσοστό 40,77%, ενώ ακολούθησαν η κισσιμαριτίνη (11,98%), η λουτεολίνη (2,38%), ενώ οι κορυφές 4 και 5 με τις απιγενίνη και μεθυλ φλαβόνη αντιστοιχούν σε κοινό ποσοστό (5,91%) καθώς συνεκλούνται (χρόνοι έκλουσης 41,40 και 41,61 min αντίστοιχα), ενώ επίσης σε μικρά ποσοστά ταυτοποιήθηκαν η ακασετίνη, το ροσμαρινικό οξύ, η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ.

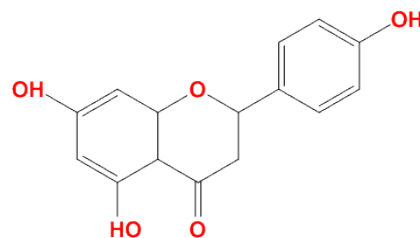


Σχήμα 3.3δ: Υγρό χρωματογράφημα του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα δεντρολίβανου

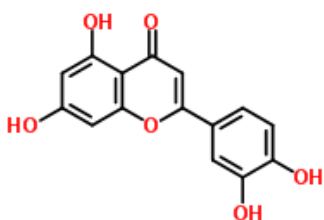
Σε σύγκριση με άλλες μελέτες οι Proestos et al., 2007 βρήκαν σε υδρο-μεθανολικό (40:60) εκχύλισμα δίκταμου το π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ και ένυδρη κατεχίνη, ενώ το 2006 βρήκαν επιπλέον τα φαινολικά οξέα γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και το φλαβονοειδές κερκετίνη. Οι Kouri et al., 2007 βρήκαν επιπλέον σε μικρές ποσότητες στα εκχυλίσματα διαιθυλαιθέρα του δίκταμου την καρνασόλη και ροσμαδιάλη, την λουτεολίνη, μια υδροξυ μεθυλ φλαβόνη, μια τρι-υδροξυ μεθυλ φλαβόνη ενώ ο αιθυλαιθέρας της επιροσμανόλης ήταν η κυρίαρχη ένωση. Οι Kivilompolo et al., 2007 βρήκαν σε εκχύλισμα δεντρολίβανο μείγματος αιθανόλης/νερού (60:40 v/v) κυρίαρχο συστατικό το ροσμαρινικό οξύ ενώ βρήκαν επιπλέον το βανιλλικό οξύ, γλωρογενικό οξύ, ενώ οι Kivilompolo and Hyotylainen, 2007 σε αιθανολικά εκχυλίσματα του ίδιου φυτού βρήκαν το συρινγικό οξύ. Τέλος οι Zgorka and Glowniac, 2001 ταυτοποίησαν σε μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου Πολωνίας το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γκετινστικό οξύ και πρωτοκατεχουϊκό οξύ, ενώ στο θρούμπι βρέθηκαν επιπλέον σε σχέση με την παρούσα μελέτη το φερουλικό οξύ, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γκετινστικό οξύ, γλωρογενικό οξύ, το συρινγικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το βανιλλικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ.



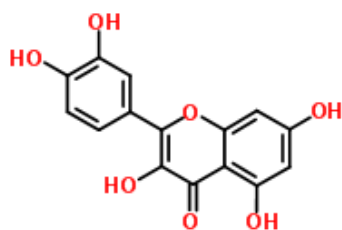
ροσμαρινικό οξύ



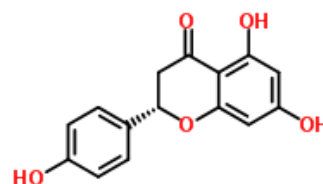
απιγενίνη



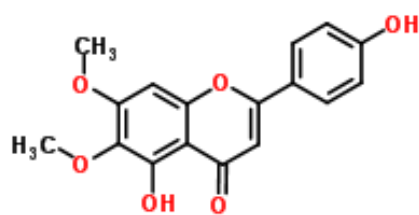
λουτεολίνη



κερκετίνη



ναριγενίνη



κιρσιμαριτίνη

Σχήμα 3.3ζ : Κυριότερα φαινολικά συστατικά που εντοπίστηκαν στα φυτικά δείγματα

3.4) Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH

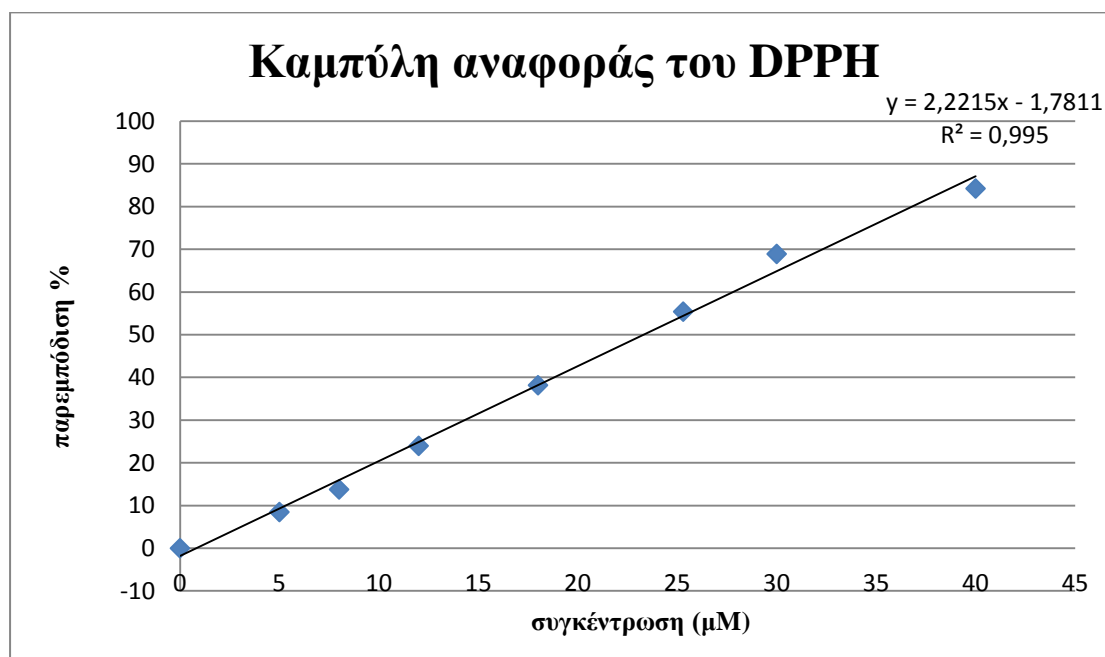


Σχήμα 3.4 : αποχρωματισμός του DPPH

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH εκφράζονται σε μM Trolox και με βάση το IC_{50} κάθε εκχυλίσματος. Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 3.4) σε περιοχές συγκεντρώσεων 5-40 μM Trolox η

εξίσωση της οποίας είναι η ακόλουθη :

$$y = 2,2215x - 1,7811$$



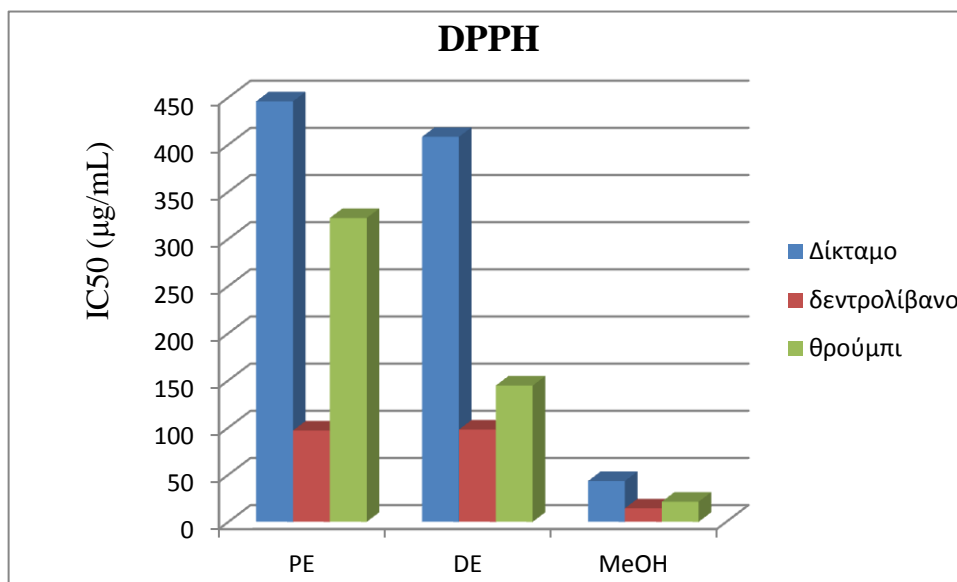
Σχήμα 3.4 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH)

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω ανάλυση κυμαίνονται μεταξύ 14,29 – 446,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ως IC_{50}

Πίνακας 3.4α : Αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH εκφρασμένη με βάση το IC₅₀ (μg/ mL)

φυτό /διαλύτης	IC50 (μg/mL)		
	πετρελαϊκός αιθέρας	διαιθυλαιθέρας	μεθανόλη
Δίκταμο	446,21±4,27	401,88±3,49	43,24±0,16
δεντρολίβανο	96,74±1,77	97,54±1,11	14,29±0,17
θρούμπι	322,2±0,22	144,5±2,36	21,33±0,29

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα τα πιο δραστικά εκχυλίσματα από άποψη διαλύτη είναι τα μεθανολικά καθώς έχουν πολύ μικρότερο IC₅₀ σε σχέση με τα αντίστοιχα υπόλοιπα οργανικά εκχυλίσματα και επιπλέον σύμφωνα με τον πίνακα 3.4δ αναλογικά για την συγκέντρωση που εφαρμόστηκε, εκφράζονται σε περισσότερα μM Trolox κάτι που οφείλεται στο ότι απομονώνουν τα φαινολικά συστατικά τα οποία προσδίδουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα στα φυτά.



Ραβδόγραμμα 3.4 : Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο του DPPH μεταξύ των φυτικών εκχυλισμάτων διαφόρων διαλυτών με βάση το IC₅₀

Μεταξύ των μεθανολικών εκχυλισμάτων το πιο δραστικό είναι του δεντρολίβανου. Επίσης συμπεραίνεται και σύμφωνα με το ραβδόγραμμα 3.4 ότι το φυτό με την

ισχυρότερη συνολική αντιοξειδωτική δράση είναι το δεντρολίβανο καθώς σε κάθε εκχύλισμα το IC₅₀ του είναι το μικρότερο από αυτό των άλλων φυτών που σημαίνει ότι απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος για να δεσμευτούν οι ελεύθερες ρίζες του DPPH και επιπλέον αντιστοιχεί σε περισσότερα μM του γνωστού αντιοξειδωτικού Trolox. Επομένως η σειρά αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι: δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο.

Τα φαινολικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος που προσδίδουν την αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου είναι καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ και ροσμανόλη (Bishon et al., 1977, Nakatani and Inataki, 1984, Gerhardt and Schroter, 1983) εκ των οποίων τα δύο πρώτα βρέθηκαν στο δείγμα της παρούσας μελέτης (Κεφ.3.3), του θρούμπιού είναι ροσμαρινικό οξύ και καρνοσόλη (Bertelsen et al., 1995, Skibsted et al., 1998) και του δίκταμου είναι το ροσμαρινικό οξύ (Chatzopoulou et al., 2010) όπως βρέθηκε στο LC-MS (Κεφ. 3.3)

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης αντιστοιχούν σε 12,40 – 22,40 μM Trolox για την μεθανόλη σε συγκέντρωση μεθανολικού φυτικού εκχυλίσματος 20 μg/mL, 4,40 – 12,60 μM Trolox σε συγκέντρωση εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα 50 μg/mL και από 14,70 – 42,80 μM Trolox σε συγκέντρωση φυτικού εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα 200 μg/mL.

Πίνακας 3.4β : Αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων πετρελαϊκού αιθέρα συγκέντρωσης 200 mg/mL με την μέθοδο DPPH εκφρασμένη σε μM Trolox

	μM Trolox
φυτό /διαλύτης	πετρελ.αιθέρας
Δίκταμο	15,80±0,04
δεντρολίβανο	42,80±0,50
θρούμπι	16,70±0,03

Συγκρίνοντας τους άλλους δυο διαλύτες χωριστά παρατηρούμε ότι η σειρά δραστηριότητας των αντίστοιχων εκχυλισμάτων είναι περίπου ίδια δεντρολίβανο> θρούμπι> δίκταμο, ώντας εκφρασμένα σε μM Trolox (Πίνακες 3.4.β και γ).

Παρόλο που στον πετρελαϊκό αιθέρα αριθμητικά τα εκχυλίσματα έχουν μεγαλύτερες τιμές, αυτό οφείλεται λόγω της εκατονταπλάσιας συγκέντρωσης φυτικού

εκχυλίσματος που εφαρμόστηκε, κάτι που σημαίνει ότι σε ανάλογη συγκέντρωση τα μεθανολικά εκχυλίσματα αντιστοιχούν σε περισσότερα μM Trolox.

Πίνακας 3.4γ : Αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων διαιθυλαιθέρα συγκέντρωσης 50 mg/ mL με την μέθοδο DPPH εκφρασμένη σε μM Trolox

	μM Trolox
φυτό /διαλύτης	διαιθυλαιθέρας
Δίκταμο	4,4 \pm 1,2
δεντρολίβανο	12,6 \pm 0,2
θρούμπι	8,4 \pm 0,4

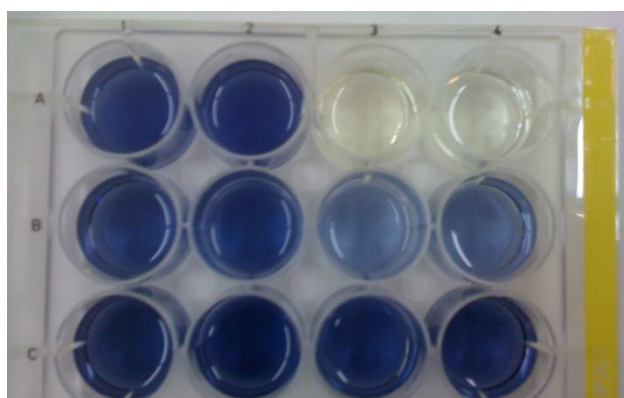
Πίνακας 3.4δ : Αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων μεθανόλης συγκέντρωσης 20 mg/ mL με την μέθοδο DPPH εκφρασμένη σε μM Trolox

	μM Trolox
φυτό /διαλύτης	μεθανόλη
Δίκταμο	12,4 \pm 1,2
δεντρολίβανο	31,4 \pm 0,3
θρούμπι	22,4 \pm 0,1

Στη μελέτη των Kouri et al., 2007 βρήκαν το εκχύλισμα του δίκταμου με πετρελ. αιθέρα ήταν αισθητά λιγότερο δραστικό από το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα, ενώ στην παρούσα μελέτη τα δυο συγκεκριμένα εκχυλίσματα είναι ισοδύναμα ως προς τη δραστικότητά τους. Οι Lagouri et al., 2009 μεταξύ πολικών και άπολων εκχυλισμάτων στο δίκταμο και δεντρολίβανο βρήκαν πιο δραστικό το μεθανολικό εκχύλισμα με το μικρότερο IC_{50} μεταξύ εξανίου και διχλωρομεθανίου και μεταξύ αυτών των φυτών που ανέλυσαν, το δεντρολίβανο ήταν πιο δραστικό από το δίκταμο έχοντας μικρότερο IC_{50} σε όλα τα εκχυλίσματα κάτι που συμφωνεί με την παρούσα εργασία. Οι Dorman et al., 2003 βρήκαν το IC_{50} του δεντρολίβανου σε υδατικά εκχυλίσματα ίσο με 236 $\mu\text{g}/\text{mL}$ που σε σχέση με τα δικά μας μεθανολικά εκχυλίσματα ήταν κατά πολύ λιγότερο δραστικά. Σε άλλη εργασία, οι Dorman and Hiltunen, 2004 μελέτησαν εκχυλίσματα από θρούμπι με διαλύτες νερό, βουτανόλη, εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα. Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό του οξικού αιθυλεστέρα με IC_{50} 138 $\mu\text{g}/\text{mL}$, τιμή που είναι αντίστοιχη με αυτή του αιθερικού εκχυλίσματος της παρούσας μελέτης και αισθητά μεγαλύτερη (λιγότερο δραστικό) με εκείνη του μεθανολικού εκχυλίσματος. Τέλος, και άλλοι ερευνητές αρκετά νωρίτερα

κατέληξαν (Chang et al., 1977) βρήκαν ότι τα μεθανολικά εκχύλισματα ήταν το πιο δραστικά σε σχέση με διαλύτες όπως εξάνιο, βενζόλιο, διαιθυλαιθέρας, χλωροφόρμιο, διχλωριομεθάνιο και διοξάνιο.

3.5) Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου



Σχήμα 3.5α : προσδιορισμός φαινολικών συστατικών με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκε ο αριθμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα που εκχυλίστηκαν με πετρελαιϊκό αιθέρα, διαιθυλαιθέρα και μεθανόλη. Το ολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε μg καφεϊκού οξέος/ g στερεού

εκχυλίσματος και σε mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους. Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος σε περιοχές συγκεντρώσεων 0-1,2 mg/mL . Η καμπύλη αναφοράς (σχήμα 3.5β) που χρησιμοποιήθηκε για τον παραπάνω ποσοτικό προσδιορισμό είναι η ακόλουθη :

$$y = 1,1391x - 0,0105$$

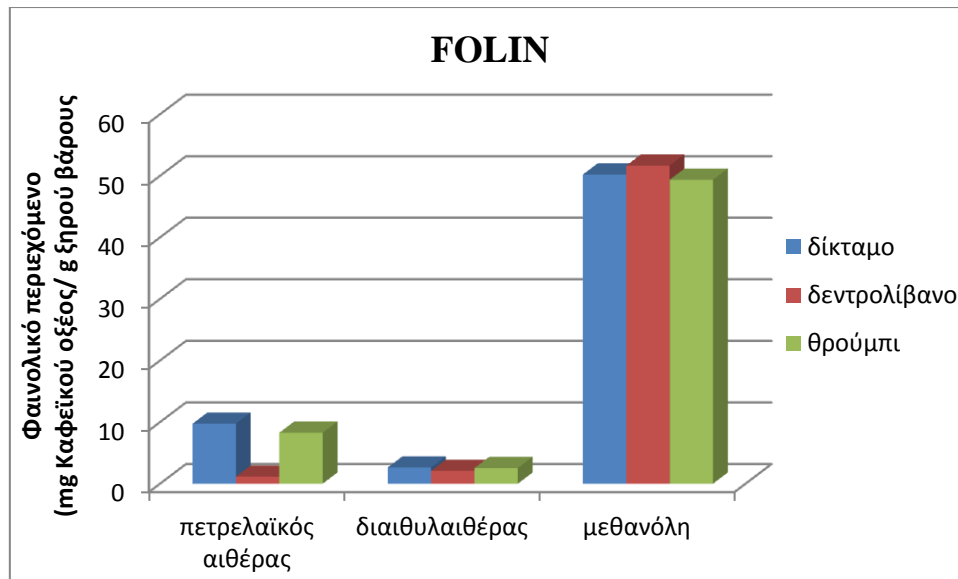


Σχήμα 3.5β : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών συστατικών

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των εκχυλισμάτων των φυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5α και κυμαίνονται από 32 – 540 μg καφεϊκού οξέος/ g στερεού εκχυλίσματος και στον Πίνακα 3.5β όπου κυμαίνονται από 1,14 – 51,66 mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους. Συγκεκριμένα στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα την περισσότερη ποσότητα φαινολικών κατείχε το δίκταμο και την μικρότερη το δεντρολίβανο, στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα το δίκταμο έχει την μεγαλύτερη ποσότητα και το δεντρολίβανο την μικρότερη και στο μεθανολικό εκχύλισμα την μεγαλύτερη ποσότητα έχει το δεντρολίβανο ενώ την μικρότερη το θρούμπι.

Πίνακας 3.5α: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (μg καφεϊκού οξέος/ g στερεού εκχυλίσματος) των φυτικών εκχυλισμάτων

δείγμα/διαλύτες	πετρελαϊκός αιθέρας	διαιθυλαιθέρας	μεθανόλη
δίκταμο	250±20	93±6	240±20
δεντρολίβανο	40±2	32±1	540±40
θρούμπι	250±20	66±2	230±20



Ραβδόγραμμα 3.5 : Σύγκριση φαινολικού περιεχομένου μεταξύ των φυτικών εκχυλισμάτων για τους διάφορους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν

Πίνακας 3.5β: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους) των φυτικών εκχυλισμάτων

δείγμα/διαλύτες	πετρελαϊκός αιθέρας	διδιαιθυλαιθέρας	μεθανόλη
δίκταμο	9,74±0,05	2,63±0,04	50,21±3,55
δεντρολίβανο	1,14±0,06	2,08±0,06	51,66±4,08
θρούμπι	8,27±0,70	2,54±0,09	49,35±3,92

Σύμφωνα και με το ραβδόγραμμα 3.5 τα μεθανολικά εκχυλίσματα είχαν συντριπτικά το υψηλότερο ποσό φαινολικών συστατικών κάτι απόλυτα λογικό καθώς ο διαλύτης μεθανόλη απομονώνει τα φαινολικά συστατικά (Sahin et al., 2004). Επίσης το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα εμφανίζει στο δίκταμο και στο θρούμπι μια αξιοσημείωτη ποσότητα φαινολικού περιεχομένου. Ο λόγος είναι ότι το κλάσμα του πετρελαϊκού αιθέρα απομόνωσε τα φαινολικά συστατικά καρβακρόλης και επομένως σύμφωνα με την ανάλυση του GC-MS (κεφ.3.2) το ποσοστό της καρβακρόλης στο δίκταμο (81%) και το ποσοστό καρβακρόλης και θυμόλης στο θρούμπι (69,5% συνολικά) δικαιολογούν τις τιμές φαινολικών 9,74 και 8,27 mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους αντίστοιχα που βρέθηκαν σε αυτά τα φυτά, σε σχέση με την χαμηλή συγκέντρωση των 1,14 mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους του δεντρολίβανου που

αποδίδεται στα πολύ μικρότερα ποσοστά καρβακρόλης και θυμόλης (12,67% και 5,81% αντίστοιχα).

Οι Lagouri et al., 2009 βρήκαν ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα μεθανολικά εκχυλίσματα δίκταμου και δεντρολίβανου ίσο με 129,52 και 129,51 mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους αντίστοιχα, όπου είχαν το μεγαλύτερο ποσό σε σχέση με τους άλλους διαλύτες που χρησιμοποίησαν. Η παραλαβή των εκχυλισμάτων τους έγινε με εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet και η απομάκρυνση του διαλύτη με συμπύκνωση σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού. Οι Proestos et al., 2005 από όλα τα φυτά που ανέλυσαν βρήκαν την μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών στο δεντρολίβανο (21 mg γαλλικού οξέος/ g ξηρού δείγματος). Οι συνθήκες παραλαβής ήταν εκχύλιση με μεθανόλη με BHT και υδρόλυση. Οι Zaouali et al., 2013 βρήκαν φαινολικό περιεχόμενο 37,4 mg γαλλικού οξέος/ g ξηρού δείγματος στα φύλλα δεντρολίβανου. Ο τρόπος παραλαβής έγινε με μαγνητική ανάδευση με ακετόνη / H₂O (80:20 v/v) και συμπύκνωση υπό κενό. Οι Alizadeh et al., 2010 εξετάζοντας την επίδραση λίπανσης πάνω στα φαινολικά συστατικά μεθανολικού εκχυλίσματος θρουμπιού βρήκαν τιμές από 23,58 – 24,52 mg γαλλικού οξέος/ g ξηρού δείγματος. Τέλος οι Bubonja- Sonje et al., 2011 εφαρμόζοντας διαδικασίες εκχύλισης και συμπύκνωσης βρήκαν στο δεντρολίβανο 450 mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού βάρους φαινολικά συστατικά που είναι εξωπραγματική τιμή.

Όσον αφορά τον συσχετισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του DPPH με τα φαινολικά συστατικά δημιουργήθηκε η καμπύλη αναφοράς FOLIN-DPPH όπου στην κατασκευή αυτής της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν τα IC₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα και οι αντίστοιχες ποσότητες των εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά εκφρασμένα ως g καφεϊκού οξέος/ g στερεού εκχυλίσματος. Κατόπιν υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών συστατικών. Ο αριθμός των δειγμάτων και το εύρος των τιμών των παραμέτρων που εξετάζονται μπορούν να επηρεάσουν τον συντελεστή αυτό (R²), γι'αυτό περισσότερα δείγματα μπορούν να δώσουν λογικές τιμές του R² και πιο αντιπροσωπευτική συσχέτιση. Σε αυτήν την μελέτη όμως δεν βρέθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η εξήγηση οφείλεται στο γεγονός η χημική σύσταση των εκχυλισμάτων με πετρελαιοειδή είναι εντελώς διαφορετική από εκείνη των

αιθερικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων. Στην πρώτη περίπτωση κυριαρχεί η καρβακρόλη και τερπενικά συστατικά και στις άλλες ροσμαρινικό οξύ και παράγωγα φλαβονοειδών.

3.6) Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο διάχυσης αγαρ-πηγαδιού

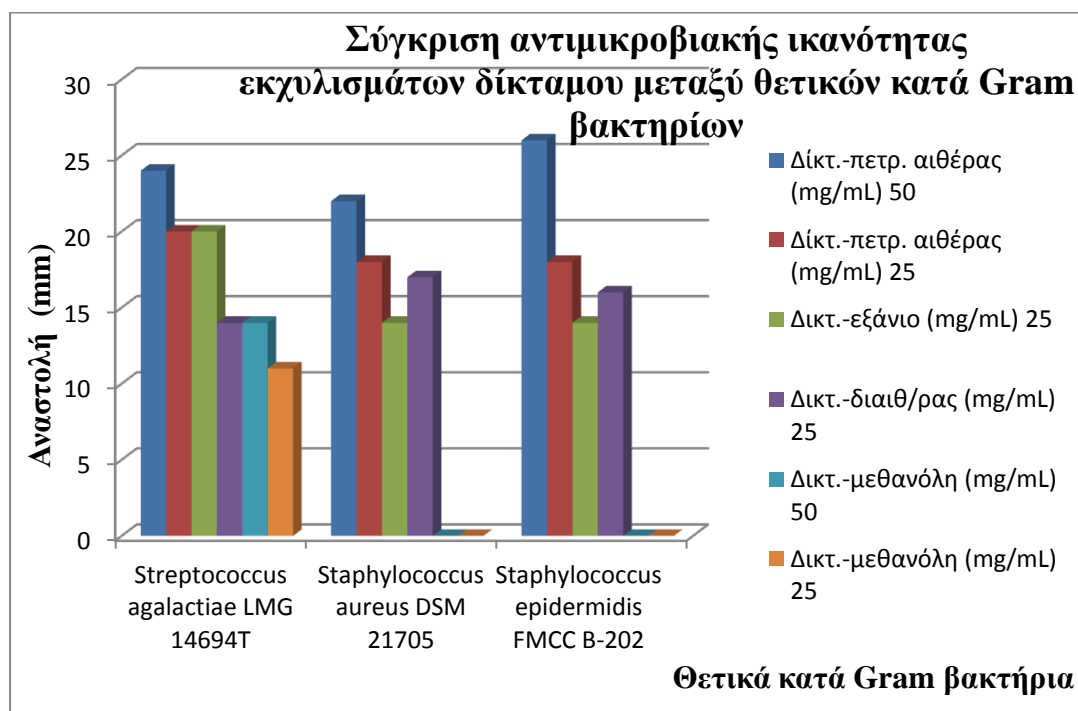
3.6.1) Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης κάθε φυτού

Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η αναστολή των οργανικών εκχυλισμάτων των φυτών ενάντια στους επιλεγμένους μικροοργανισμούς, με την καταγραφή της διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης αυτών των μικροοργανισμών στόχων που δημιουργήθηκε γύρω από τις οπές στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Πίνακας 3.6.1α : Διάμετροι αναστολής δράσης του εκχυλίσματος δίκταμου (mm) ενάντια στους επιλεγμένους μικροοργανισμούς

Μικροοργανισμός	Δίκτ.-πετρ. αιθέρας (mg/mL)		Δίκτ.-εξάνιο (mg/mL)	Δίκτ.-διαιθ/ρας (mg/mL)	Δίκτ.-μεθανόλη (mg/mL)	
	50	25	25	25	50	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	24	20	20	14	14	11
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	26	25	25	25	7	0
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	20	18	16	22	15	12
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	22	16	14	12	12	11
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	25	25	18	14	14	12
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	22	18	14	17	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	26	18	14	16	0	0
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	24	16	18	18	9	7
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	19	11	11	11	13	7
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	14	12	11	12	10	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	15	13	7	12	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	14	10	7	12	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	7	0	0	11	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	14	10	8	13	0	0

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : Το εύρος των διαμέτρων αναστολής κυμαίνεται από 0-24 mm. Σύμφωνα με το ραβδόγραμμα 3.6.1a η υψηλότερη δράση εντοπίζεται στον πετρελ. αιθέρα (50 mg/ mL) στον *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202 ενώ στα μεθαιολικά εκχύλισματά δύο σταφυλόκοκκων δεν υπήρξε παρεμπόδιση. Σε όλους τους μικροοργανισμούς η μεγαλύτερη δράση παρουσιάστηκε στον πετρελ. αιθέρα των 50 mg/ mL. Για την υπόλοιπη σειρά δραστηριότητας των διαλυτών, στους σταφυλόκοκκους είχαμε διαιθυλαιθέρας > εξάνιο ενώ στον στρεπτόκοκκο είχαμε εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL) = διαιθυλαιθέρας.

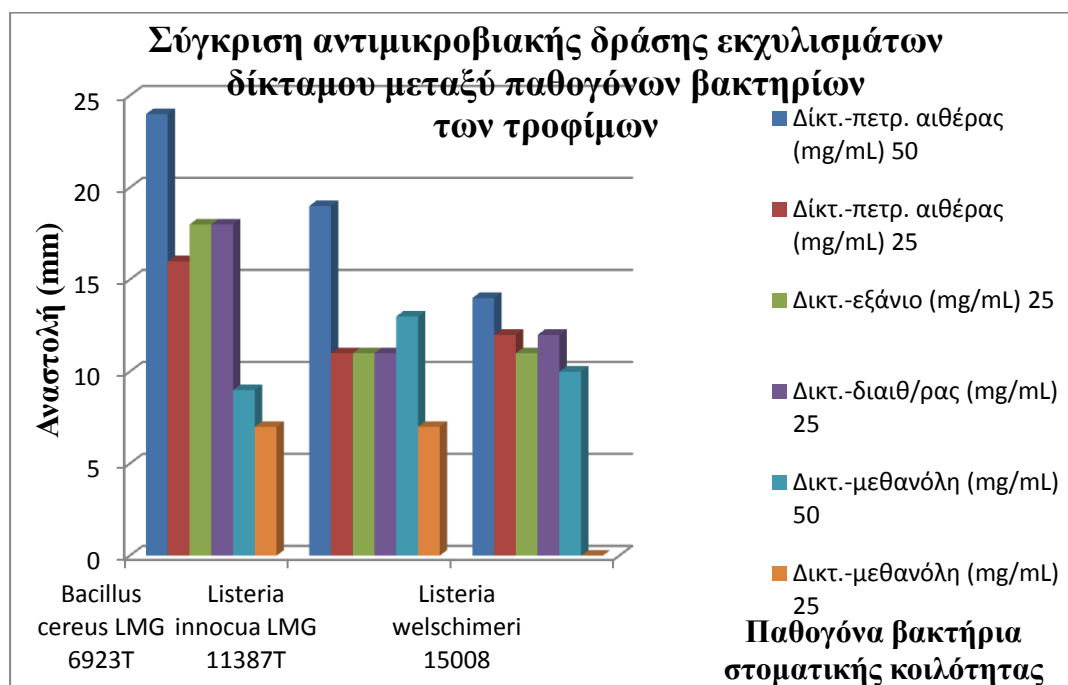


Ραβδόγραμμα 3.6.1a : Σύγκριση αντιμικροβιακής ικανότητας δίκταμου μεταξύ θετικών κατά Gram βακτηρίων

Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας : Οι διακυμάνσεις των διαμέτρων αναστολής ήταν από 0-26 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.1a η μεγαλύτερη παρεμπόδιση εντοπίστηκε στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα στον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T ενώ στον ίδιο μικροοργανισμό δεν εμφανίστηκε παρεμπόδιση στο μεθανολικό εκχύλισμα των 25 mg/ mL . Στους *S.mutans*, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641^T το κυρίαρχο εκχύλισμα από άποψη δραστηριότητας ήταν του πετρελαϊκού αιθέρα, ενώ στον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T ήταν του διαιθυλαιθέρα. Ενώ σε όλους τους μικροοργανισμούς το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν της μεθανόλης (25 mg/ mL). Ο *S. mutans* είχε

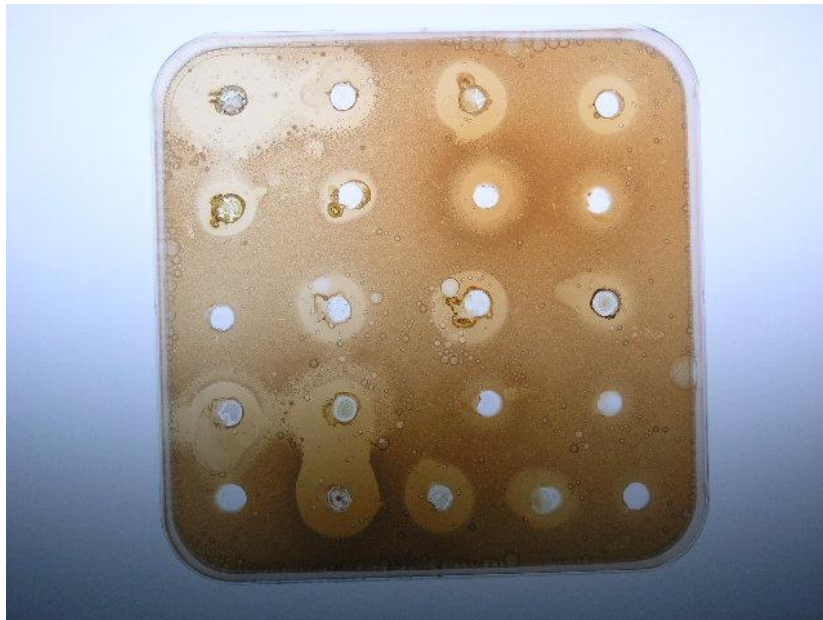
σειρά δραστηριότητας πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο = διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη (50 mg/ mL), ο *S. saguinis* πετρελ. αιθέρα (50 mg/ mL) > εξάνιο > διαιθυλαιθέρα = μεθανόλη (50 mg/ mL) και ο *S. sobrinus* πετρελαϊκό αιθέρα (50 και 25 mg/ mL) > εξάνιο > διαιθυλαιθέρα = μεθανόλη (50 mg/ mL).

Για τους παθογόνους τροφίμων : Οι διακυμάνσεις των διαμέτρων αναστολής ήταν από 0-24 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.1β η μεγαλύτερη παρεμπόδιση παρατηρείται στον *Bacillus cereus* LMG 6923^T του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) ενώ στον *Listeria welschimeri* 15008 το εκχύλισμα μεθανόλης (25 mg/ mL) δεν έδειξε παρεμπόδιση. Και σε αυτήν την κατηγορία μικροοργανισμών το δραστηκότερο εκχύλισμα είναι του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) όσο για την υπόλοιπη σειρά δραστηκότητας υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των οργανισμών με τον *B. Cereus* να έχει εξάνιο = διαιθυλαιθέρα > μεθανόλη (50 mg/ mL), τον *L. welschimeri* να έχει διαιθυλαιθέρα > εξάνιο > μεθανόλη, ενώ στην υπόλοιπη σειρά δραστηκότητας του *Listeria innocua* LMG11387^T με μεθανόλη > διαιθυλαιθέρα = εξάνιο αξιοσημείωτο είναι ότι το μεθανολικό εκχύλισμα ήταν δραστηκότερο του εξανίου.



Ραβδόγραμμα 3.6.1β : Σύγκριση αντιμικροβιακής ικανότητας δίκταμου μεταξύ παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : Οι διάμετροι αναστολής κυμαίνονται από 0-15 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.1α η μεγαλύτερη παρεμπόδιση παρατηρείται στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα των (50 mg/ mL) στο *Esherichia coli* C1845 ενώ χαρακτηριστικό είναι ότι το μεθανολικό εκχύλισμα ήταν ανενεργό σε όλους τους μικροοργανισμούς. Το *E. coli*, *Salmonella typhimurium* SL1344 και *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197 είχαν σειρά δραστηριότητας εκχυλισμάτων ως πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) > διαιθυλαιθέρα > εξανίου, ενώ στον *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26 τα μοναδικά κλάσματα που έδειξαν παρεμπόδιση ήταν ο διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL).



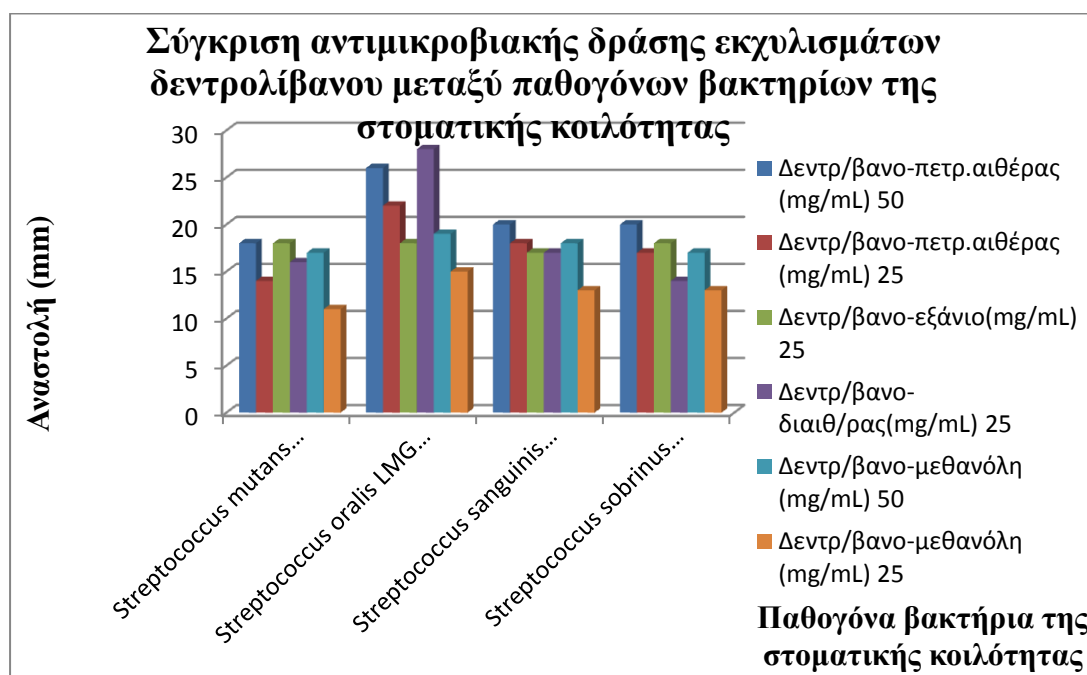
Εικόνα 3.6.1: Τρυβλίο όπου φαίνεται η διάμετρος αναστολής του *Staphylococcus aureus* DSM 21705 με την μέθοδο διάχυσης άγαρ-πηγαδιού

Πίνακας 3.6.1β : Διάμετροι αναστολής δράσης του εκχυλίσματος δεντρολίβανου (mm) ενάντια στους επιλεγμένους μικροοργανισμούς

Μικροοργανισμός	Δεντρ-πετρ.αιθέρας (mg/mL)		Δεντρ-εξάνιο(mg/mL)	Δεντρ-διαιθ/ρας(mg/mL)	Δεντρ-μεθανόλη (mg/mL)	
	50	25	25	25	50	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	18	16	18	20	18	12
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	18	14	18	16	17	11
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	26	22	18	28	19	15
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	20	18	17	17	18	13
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	20	17	18	14	17	13
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	16	13	16	10	14	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	16	14	15	12	14	11
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	20	18	19	17	14	12
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	17	14	14	18	11	10
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	15	13	14	18+3	11	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	15	13	12	13+5	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	14	10	8	15	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	7	0	0	11	8	7
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	14	10	8	17	7	0

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : Οι διάμετροι αναστολής είχαν εύρος 10-20 mm. Σύμφωνα με το Πίνακα 3.6.1β η μεγαλύτερη παρεμπόδιση εντοπίζεται στον *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα, ενώ η μικρότερη δράση εντοπίζεται στο μεθανολικό κλάσμα (25 mg/ mL) στο *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202. Οι σειρές δραστηριότητας στα εκχυλίσματα μεταξύ των μικροοργανισμών ποικίλουν. Συγκεκριμένα στον *Staphylococcus aureus* DSM 21705 η σειρά δραστηριότητας είναι πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) = εξάνιο > μεθανόλη > διαιθυλαιθέρα, ενώ στον *S. agalactiae* κυριαρχεί ο διαιθυλαιθέρας ενώ τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (πετρελαϊκός αιθέρας 50 mg/ mL, εξάνιο, μεθανόλη 50 mg/ mL) έχουν την ίδια δραστηριότητα.

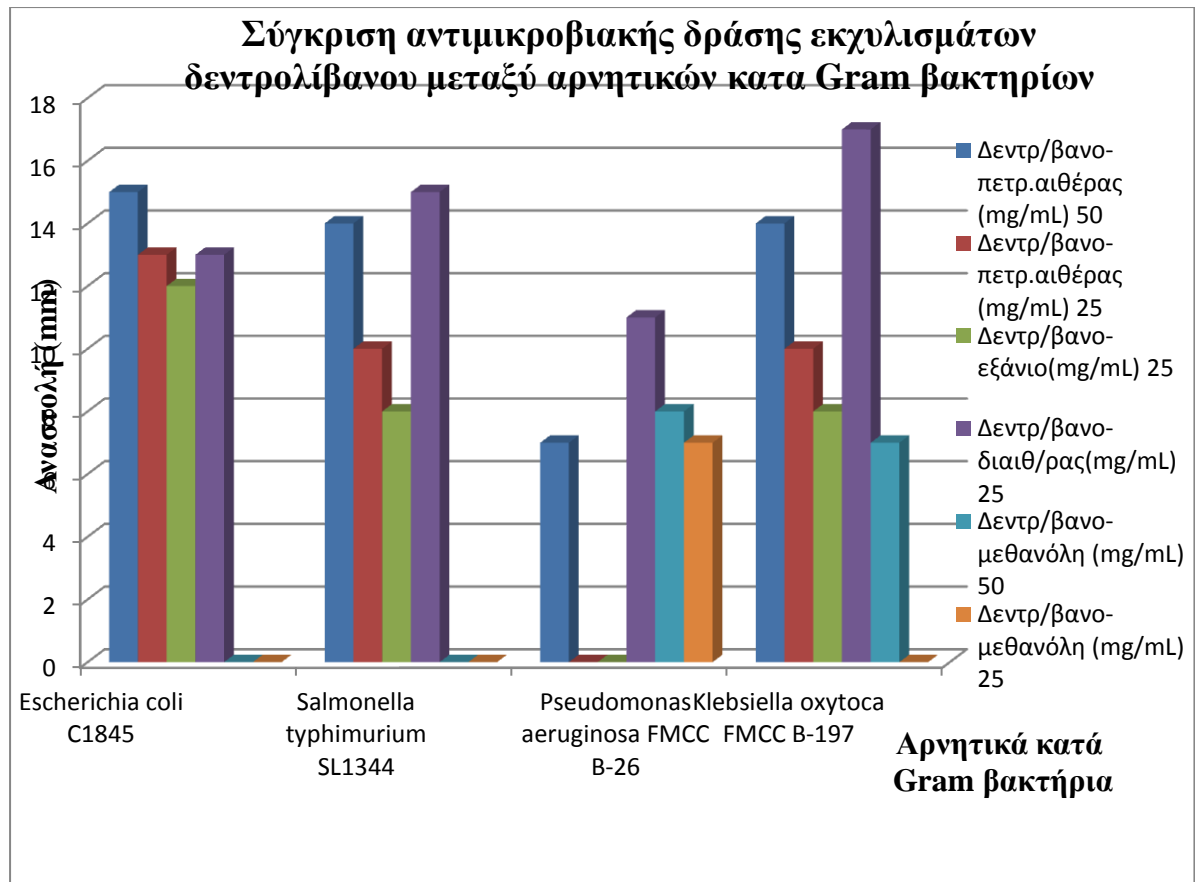
Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας : Η διακύμανση της διαμέτρου αναστολής ήταν από 11-26 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.1γ η μεγαλύτερη παρεμπόδιση παρατηρείται στον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα ενώ η μικρότερη παρεμπόδιση εντοπίζεται στο μεθανολικό εκχύλισμα (25 mg/ mL) στον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T. Και σε αυτήν την κατηγορία υπάρχουν κάποιες ομοιότητες για την σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων με τους *S. mutans*, *S. sanguinis* DSM 20068 και *sobrinus* LMG 14641^T. Συγκεκριμένα στον *S. mutans* ήταν πετρελαϊκός αιθέρας των (50 mg/ mL) = εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL) > διαιθυλαιθέρας, στον *S. oralis* διαιθυλαιθέρας > πετρελ. αιθέρας με (50 mg/ mL) > μεθανόλη > εξάνιο, στον *S. sanguinis* ήταν πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > μεθανόλη (50 mg/ mL) > εξάνιο = διαιθυλαιθέρας και στον *S. sobrinus* πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL) > διαιθυλαιθέρας.



Ραβδόγραμμα 3.6.1γ : Σύγκριση αντιμικροβιακής ικανότητας δεντρολίβανου μεταξύ παθογόνων βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας

Για τους παθογόνους τροφίμων : Το εύρος της διαμέτρου αναστολής κυμαίνεται από 0-20 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.1β η μεγαλύτερη παρεμπόδιση φαίνεται στον *Bacillus cereus* LMG 6923^T στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) ενώ στον *Listeria welschimeri* 15008 το μεθανολικό εκχύλισμα (25 mg/ mL) δεν εμφάνισε δράση αναστολής. Στα δύο *Listeria* η σειρά δραστηριότητας ήταν διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL), ενώ στον *B. Cereous* η σειρά ήταν πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο > διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη (50 mg/ mL).

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : Η διακύμανση της διαμέτρου αναστολής ήταν από 0-17 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.1δ η μεγαλύτερη παρεμπόδιση εντοπίζεται στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα στο *Klebsiella oxytoca* FMCC ενώ σε μερικά εκχυλίσματα δεν υπήρξε παρεμπόδιση και αυτά είναι τα μεθανολικά εκχυλίσματα στα *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* SL1344, το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα (25 mg/ mL) και εξανίου για την *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26 και το μεθανολικό εκχύλισμα των 25 mg/ mL του *K. oxytoca*. Σε αυτήν την κατηγορία βακτηρίων στα *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* και *K. oxytoca* το δραστηκότερο εκχύλισμα ήταν του διαιθυλαιθέρα και το λιγότερο έως καθόλου δραστικό ήταν το μεθανολικό, ενώ στο *E. coli* το δραστηκότερο ήταν του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL). Αξιοσημείωτο επίσης στο *P. aeruginosa* ήταν ότι το εκχύλισμα μεθανόλης ήταν δραστηκότερο από του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL).

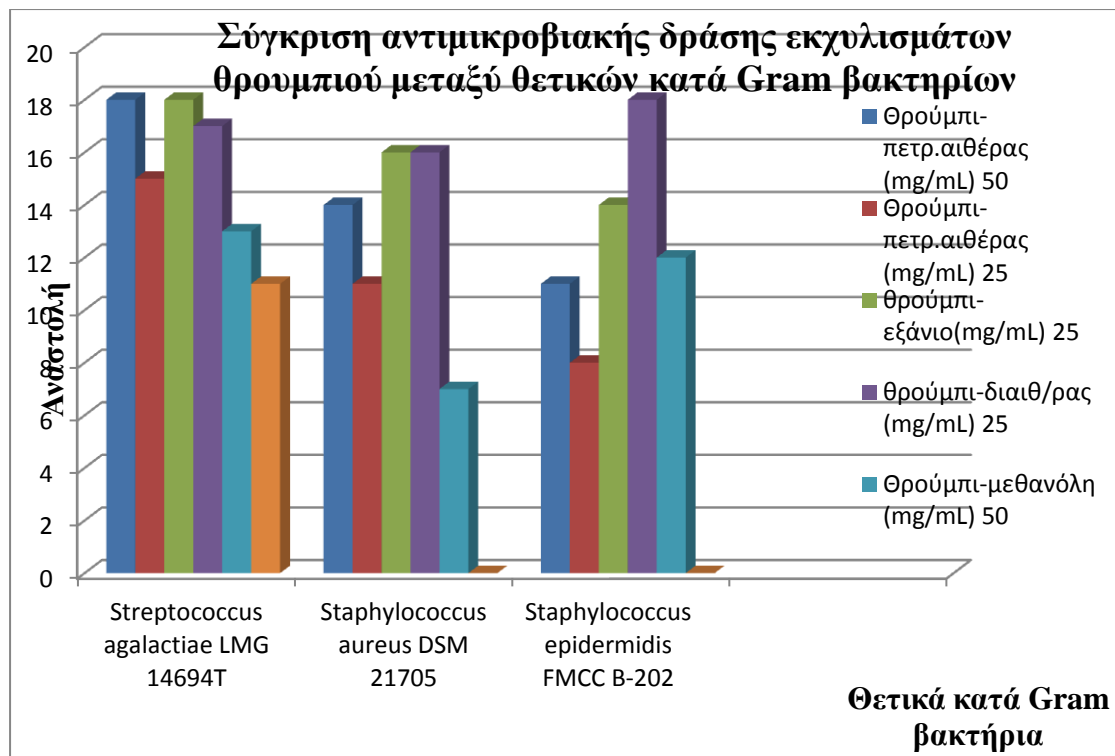


Ραβδόγραμμα 3.6.1δ : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων δεντρολίβανου μεταξύ αρνητικών κατά Gram βακτηρίων

Πίνακας 3.6.1γ : διάμετροι αναστολής δράσης του εκχυλίσματος θρουμπιού (mm) ενάντια στους επιλεγμένους μικροοργανισμούς

Μικροοργανισμός	Θρούμπι-πετρ.αιθέρας (mg/mL)		Θρούμπι-εξάνιο(mg/mL)	Θρούμπι-διαιθ/ρας (mg/mL)	Θρούμπι-μεθανόλη (mg/mL)	
	50	25	25	25	50	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	18	15	18	17	13	11
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	15	0+8	24	24	7	0
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	18	16	15	24	14	9
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	16+18	14	18	18	13	10
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	18	15	18	20	14	12
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	14	11	16	16	7	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	11	8	14	18	12	0
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	17	12	22	14	9	9
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	22	13	15	18	11	9
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	18+5	12	13+2	16+5	10	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	12	11	15	13+4	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	12	9	15	14	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	7	0	0	15	8	7
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	12	9	15	17	0	0

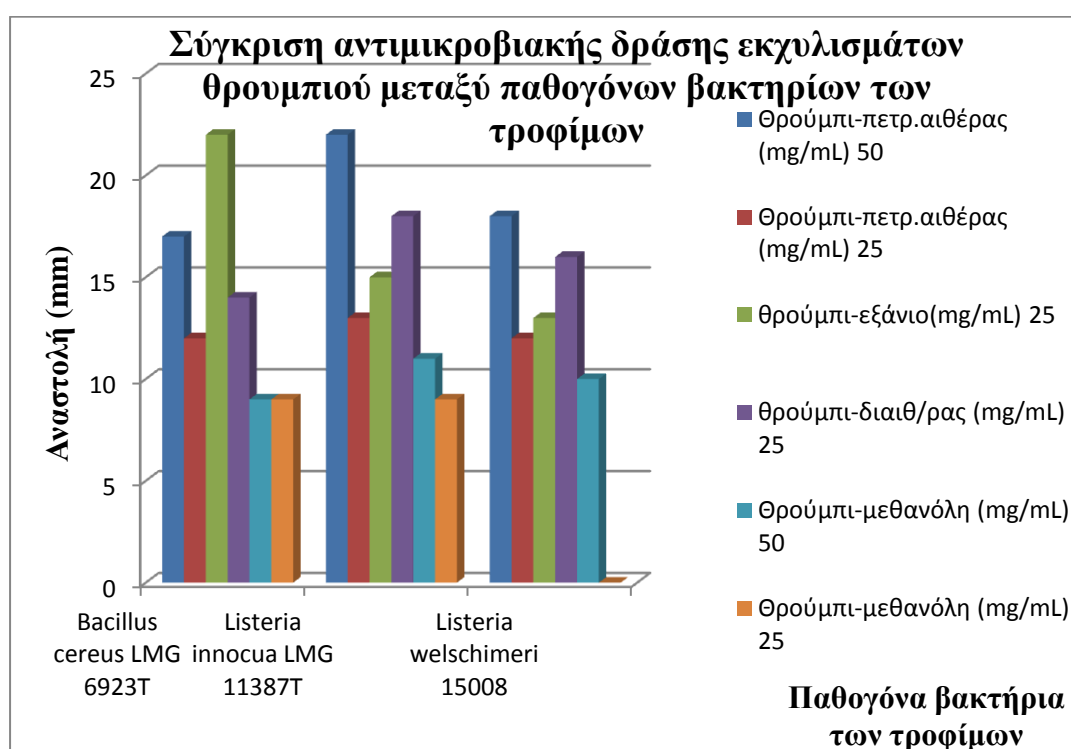
Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : Το εύρος της διαμέτρου αναστολής είναι από 0-18 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.1ε οι μεγαλύτερες παρεμποδίσεις εμφανίζονται στον *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T στα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) και εξάνιου και στον *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202 στα εκχυλίσματα εξάνιου και διαιθυλαιθέρα, ενώ τα μεθανολικά εκχυλίσματα των δύο σταφυλόκοκκων δεν εμφάνισαν παρεμπόδιση. Η σειρά δραστηριότητας ποικίλει και είναι αναλυτικά : πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) = εξάνιο > διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη (50 mg/ mL) για τον στρεπτόκοκκο, για τον *Staphylococcus aureus* DMS 21705 είναι εξάνιο = διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > μεθανόλη (50 mg/ mL) και για τον *S. epidermidis* είναι διαιθυλαιθέρας > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL) > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL)



Ραβδόγραμμα 3.6.1ε : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων θρουμπιού μεταξύ θετικών κατά Gram βακτηρίων

Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας : Οι διακυμάνσεις των διαμέτρων αναστολής είναι από 0-26 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.1γ η μεγαλύτερη παρεμπόδιση εντοπίζεται στα εκχυλίσματα εξανίου και διαιθυλαιθέρα για τον *Sterptococcus mutans* LMG 14558^T και στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα για τον *Sterptococcus sanguinis* DSM 20068, ενώ αντίθετα στον *S. mutans* δεν υπήρξε παρεμπόδιση στο εκχύλισμα μεθανόλης (25 mg/ mL). Το εκχύλισμα που επικρατεί από άποψη δραστηριότητας είναι του διαιθυλαιθέρα εκτός από τους *S. mutans* και *sanguinis* όπου ο διαιθυλαιθέρας συγκυριαρχεί με το εξάνιο. Σχετικά με τις δραστηριότητες των άλλων εκχυλισμάτων υπάρχουν διάφορες σειρές. Αναλυτικά έχουμε στον *S. mutans* εξάνιο = διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > μεθανόλη (50 mg/ mL), στον *S. oralis* διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL) στον *S. sanguinis* διαιθυλαιθέρας = εξάνιο > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > μεθανόλη (50 mg/ mL) και στον *S. sobrinus* διαιθυλαιθέρας > εξάνιο = πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > μεθανόλη (50 mg/ mL).

Για τους παθογόνους τροφίμων : Το εύρος των διαμέτρων αναστολής είναι από 0-22 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.1στ η μεγαλύτερη παρεμπόδιση διακρίνεται στο εκχύλισμα εξανίου για τον *Bacillus cereus* LMG 6923^T και στο εκχύλισμα πετρελ. αιθέρα (50 mg/ mL) για τον *Listeria innocua* CMG 11387^T, ενώ στο μεθανολικό εκχύλισμα (25 mg/ mL) στον *Listeria welschimeri* δεν υπήρξε παρεμπόδιση. Από άποψη δραστηριότητας εκχυλισμάτων στους *Listeria* η σειρά ήταν πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > διαιθυλαιθέρας > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL) ενώ στον *B. cereus* η σειρά ήταν εξάνιο > πετρελαϊκός αιθέρας > διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη (50 mg/ mL).



Ραβδόγραμμα 3.6.1στ : Σύγκριση αντιμικροβιακής ικανότητας θρουμπιού μεταξύ παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : Το εύρος των διαμέτρων αναστολής είναι 0-17 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.1γ η μεγαλύτερη παρεμπόδιση ποσοτικά εντοπίζεται στο εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα στον *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197 ενώ δεν είχαμε παρεμποδίσσεις στα μεθανολικά εκχυλίσματα στα *Escherichia coli* C1845, *Salmonella typhimurium* SL1344, *K. Oxytoca* και στα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα (25 mg/ mL) και εξανίου στον *P. aeruginosa*. Από άποψη δραστηριότητας στα *E. coli* και *S. typhimurium* η σειρά δραστηριότητας ήταν εξάνιο > διαιθυλαιθέρας >

πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL), στο *K. oxitoca* η σειρά ήταν διαιθυλαιθέρας > εξάνιο > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) και στο *P. aeruginosa* είχαμε διαιθυλαιθέρα > μεθανόλη (50 mg/ mL) > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL).

3.6.2) Αντιμικροβιακή δράση με βάση την συγκέντρωση των διαλυτών

Στα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και της μεθανόλης όπου εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (25 και 50 mg/mL) παρατηρείται σε όλα τα φυτά και για κάθε μικροοργανισμό όπου υπήρχε παρεμπόδιση, ότι τα εκχυλίσματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση 50 mg/mL ήταν δραστικότερα απ' αυτά των 25 mg/mL και αυτό γίνεται ιδιαίτερος αντιληπτό σε αρκετές περιπτώσεις όπου εκχυλίσματα με συγκεντρώσεις των 25 mg/mL ήταν ανενεργά χωρίς να εμφανίσουν παρεμπόδιση σε κάποιους μικροοργανισμούς από τις επιλεγμένες κατηγορίες, ενώ τα αντίστοιχα εκχυλίσματα με την συγκέντρωση των 50 mg/mL έδειξαν αντιμικροβιακή δράση στους αντίστοιχους μικροοργανισμούς η οποία διέφερε αισθητά από την δράση των 25 mg/mL λόγω της εμφανούς διαφοράς στις διαμέτρους αναστολής. Τέτοιες περιπτώσεις παρατηρούνται στο μεθανολικό εκχύλισμα του θρουμπιού ενάντια σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπου στον *Staphylococcus aureus* DSM 21705 και στον *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202 η συγκέντρωση των 25 mg/mL δεν ανέστειλε την ανάπτυξη τους, στους παθογόνους στοματικής κοιλότητας όπου δεν παρεμποδίστηκε ο *Streptococcus mutans* LMG 14558^T, στους παθογόνους τροφίμων όπου δεν παρεμποδίστηκε ο *Listeria welschimeri* 15008, στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια για τον *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26, ενώ στο δενδρολίβανο στο μεθανολικό εκχύλισμα για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια δεν παρουσιάστηκε παρεμπόδιση στον *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197, στο *Listeria welschimeri* 15008 εκ των παθογόνων των τροφίμων, στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα για το *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26, ενώ στο δίκταμο αυτό το χαρακτηριστικό παρατηρήθηκε στο μεθανολικό κλάσμα ενάντια στον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T, στον *Listeria welschimeri* 15008 και στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα για τον *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26.

Από όλα αυτά τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι η πυκνότερη συγκέντρωση των 50 mg/mL στα εκχυλίσματα που εφαρμόστηκε, δρα αποτελεσματικότερα από αυτή των 25 mg/mL, αλλά δεν μπορεί να ειπωθεί ότι υπάρχει μια συνάρτηση με γραμμική σχέση παρεμπόδισης μεταξύ της συγκέντρωσης και της αναστολής της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

3.6.3) Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης κάθε εκχυλίσματος

Στους παρακάτω πίνακες που ακολουθούν αναφέρονται οι διάμετροι της αναστολής της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε σχέση με κάθε ξεχωριστό διαλύτη για όλα τα φυτά σε όλες τις κατηγορίες των μικροοργανισμών που επιλέχτηκαν.

Πίνακας 3.6.3α : Διάμετροι αναστολής των μικροοργανισμών για τα φυτικά εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα

Μικροοργανισμός	Θρούμπι-πετρ.αιθέρας (mg/mL)		Δεντρ-πετρ.αιθέρας (mg/mL)		Δίκτ.-πετρ. αιθέρας (mg/mL)	
	50	25	50	25	50	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	18	15	18	16	24	20
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	15	0+8	18	14	26	25
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	18	16	26	22	20	18
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	16+18	14	20	18	22	16
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	18	15	20	17	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	14	11	16	13	22	18
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	11	8	16	14	26	18
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	17	12	20	18	24	16
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	22	13	17	14	19	11
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	18+5	12	15	13	14	12
<i>Escherichia coli</i> C1845	12	11	15	13	15	13
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	12	9	14	10	14	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	7	0	7	0	7	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	12	9	14	10	14	10

Στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα ο διαλύτης απομονώνει τα πτητικά συστατικά των φυτών τα οποία αποτελούν το μη πολικό κλάσμα.

Έτσι σύμφωνα και με την ανάλυση αυτού του εκχυλίσματος (Κεφ.3.2) η αντιμικροβιακή δράση του δίκταμου οφείλεται στο κυριότερο πτητικό συστατικό του που είναι το φαινολικό συστατικό καρβακρόλη (Sivropoulou et al., 1996, Panizzi et al., 1993, Gergis et al., 1990, Pellecuer et al., 1980). Όσο για το γ-τερπινένιο μπορεί ως υδρογονάνθρακας να είναι λιγότερο αποτελεσματικό συστατικό στα αιθέρια έλαια ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Lattaoui and Tantaoui-Elaraki, 1994), αλλά μπορεί σαν μείγμα ουσιών να είναι αποτελεσματικό, δρώντας συνεργιστικά στο εκχύλισμα.

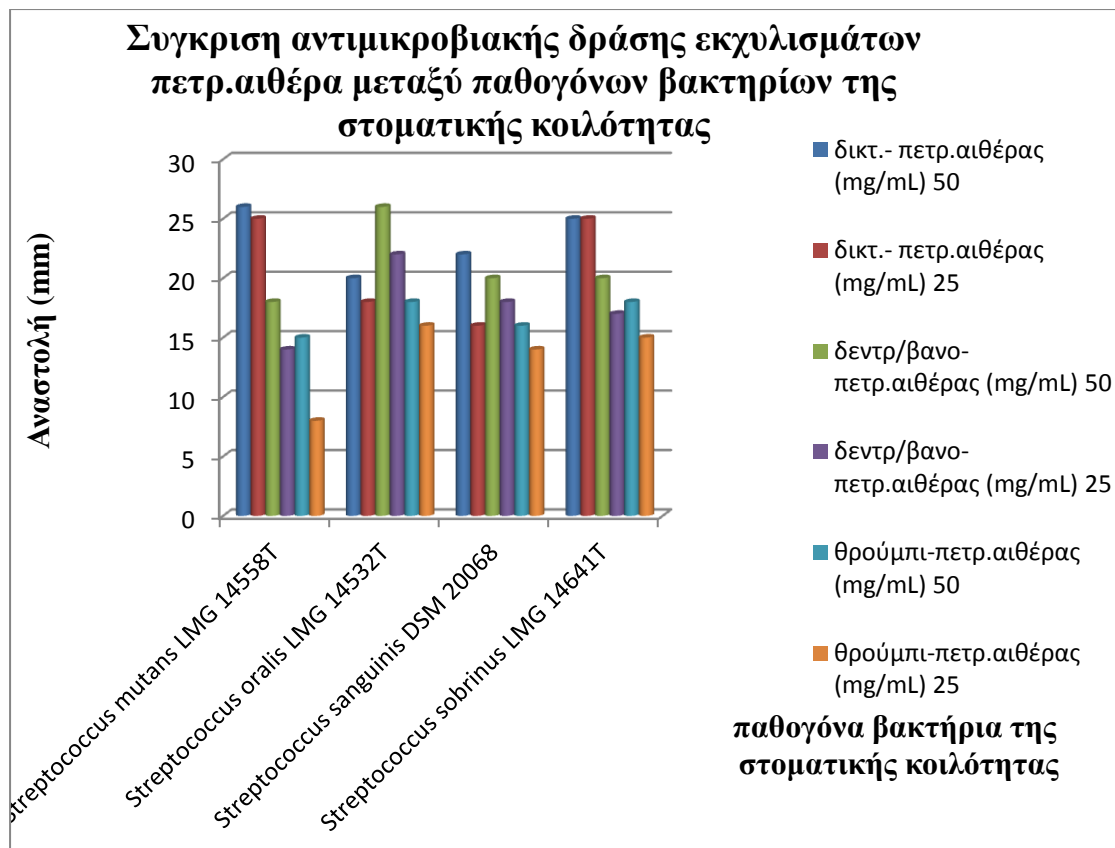
Για το δεντρολίβανο τα κυρίαρχα πτητικά συστατικά ήταν η ευκαλυπτόλη, η βερμπερόνη, η καμφορά, η καρβακρόλη και βορνεόλη. Σύμφωνα με τους Santoyo et al., 2005 τόσο η βερμπερόνη όσο και η βορνεόλη μαζί με ευκαλυπτόλη και καμφορά, προσδίδουν την αντιβακτηριακή δράση στο αιθέριο έλαιο η οποία ενισχύεται και από την καρβακρόλη.

Για το θρούμπι τα κυρίαρχα συστατικά σε αυτό το εκχύλισμα είναι η καρβακρόλη και το γ-τερπινένιο. Όπως ήδη αναφέρθηκε και στο δίκταμο η καρβακρόλη είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση που προσδίδει το θρούμπι (Penalver et al., 2005).

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : το εύρος διαμέτρων αναστολής ήταν από 8-26 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.3α την μεγαλύτερη παρεμπόδιση εμφανίζει το εκχύλισμα του δίκταμου στην συγκέντρωση των 50 mg/mL σε όλους τους μικροοργανισμούς, ενώ την μικρότερη παρεμπόδιση συγκριτικά εμφάνισε το εκχύλισμα του θρουμπιού των 25 mg/mL, επίσης σε όλους τους μικροοργανισμούς. Η μείωσα σειρά παρεμπόδισης στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα σε όλα τα φυτά για κάθε μικροοργανισμό ήταν δίκταμο (50 mg/mL) > δεντρολίβανο (50 mg/mL) > θρούμπι (50 mg/mL). Ο μικροοργανισμός στον οποίο εστιάζεται η μεγαλύτερη παρεμπόδιση είναι ο *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202 στο δίκταμο (50 mg/mL) ενώ η μικρότερη παρεμπόδιση εμφανίζεται στον ίδιο μικροοργανισμό στο θρούμπι (25 mg/mL). Στην μελέτη των Alexopoulos et al., 2011[] όπου εξετάστηκε το αιθέριο έλαιο ενάντια σε κλινικά στελέχη του *S. aureus* , το δίκταμο ήταν ιδιαίτερα δραστικό ενώ κατά πολύ λιγότερο του δεντρολίβανου, ενώ στην μελέτη των Liolios

et al., 2009 το αιθέριο έλαιο του δίκταμου έδειξε δράση σε όλα τα στελέχη του *S. aureus* και *S. epidermidis*. Οι Nedorostova et al., 2001 βρήκαν δράση του αιθέριου έλαιου του θρούμπιού ενάντια σε έξι στελέχη του *Staphylococcus aureus*.

Για τους παθογόνους της στοματικής κοιλότητας : Το εύρος των διαμέτρων αναστολής ήταν από 8-26 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.3β την μεγαλύτερη παρεμπόδιση εμφάνισαν τα εκχύλιματα του δικτάμου και του δεντρολίβανου σε συγκεντρώσεις των 50 mg/mL στον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T και στον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T, ενώ την μικρότερη παρεμπόδιση εμφανίζει επίσης το εκχύλιμα στο θρούμπι (25 mg/ mL) επίσης για τον *S. mutans*. Η μείωσα σειρά παρεμπόδισης ήταν δίκταμο (50 mg/mL) > δεντρολίβανο (50 mg/mL) > θρούμπι (50 mg/mL) για τους *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* LMG 14641^T και *Streptococcus sanguinis* DSM 20068, ενώ για τον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T η σειρά ήταν δεντρολίβανο (50 mg/mL) > δίκταμο (50 mg/mL) > θρούμπι (50 mg/mL). Σε αυτή την κατηγορία μικροοργανισμών υπήρξαν διαφορές στην δραστικότητα μεταξύ των συγκεντρώσεων με περιπτώσεις όπως στον *S. sanguinis* όπου το εκχύλιμα δεντρολίβανου (50 και 25 mg/ mL) και στον *S. sobrinus* όπου το εκχύλιμα θρούμπιού (50 mg/mL) ήταν δραστικότερο από του δεντρολίβανου των (25 mg/mL). Οι Liolios et al., 2009 βρήκαν δράση σε όλα τα στελέχη του *S. mutans* στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου.

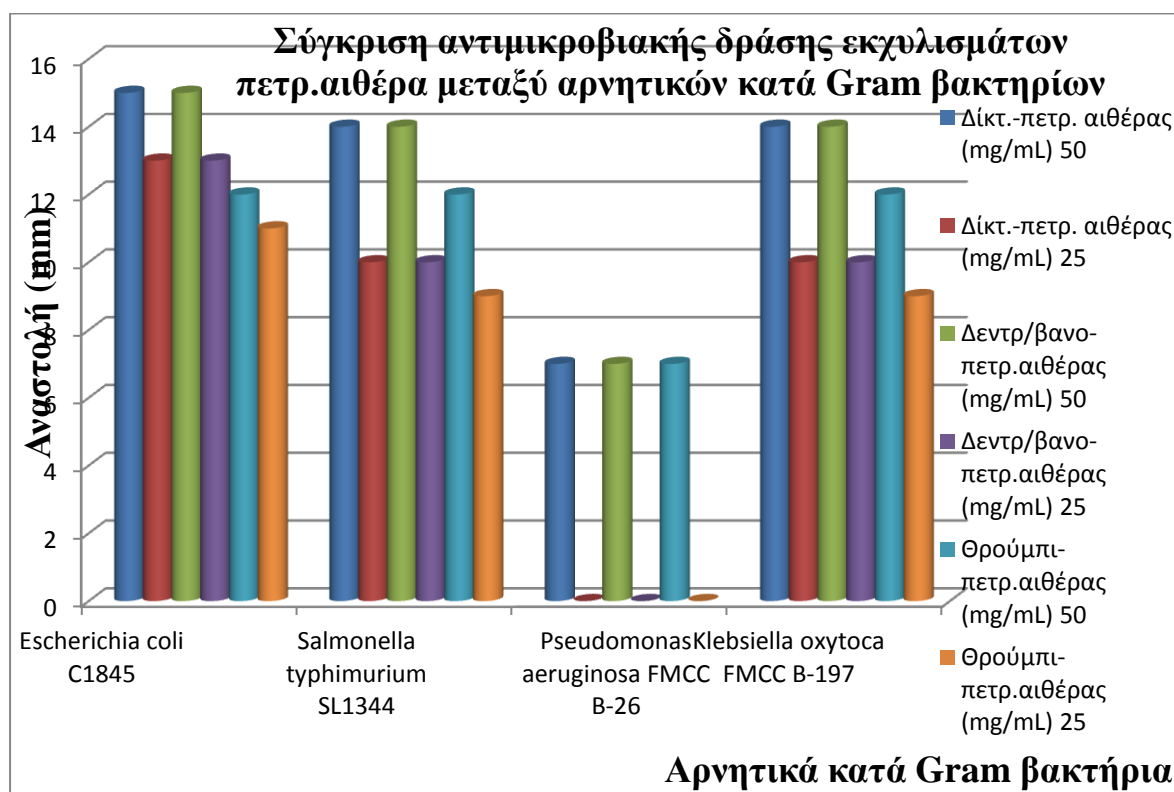


Ραβδόγραμμα 3.6.3β : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων πετρελαϊκού αιθέρα μεταξύ παθογόνων βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας

Για τους παθογόνους τροφίμων : Η διάμετρος αναστολής κυμαίνεται από 12-24 mm. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.6.3α την μεγαλύτερη παρεμπόδιση εμφάνισε το δίκταμο (50 mg/mL) στον *Bacillus cereus* LMG 6923^T ενώ η μικρότερη παρεμπόδιση εμφανίστηκε στο δίκταμο (25 mg/mL) στον ίδιο μικροοργανισμό. Η σειρά δραστηκότητας ήταν θρούμπι (50 mg/mL) > δίκταμο (50 mg/mL) > δεντρολίβανο (50 mg/mL) για τους *Listeria innocua* LMG 11387^T και *Listeria welschimeri* 15008, ενώ για τον *Bacillus cereus* LMG 6923^T ήταν δίκταμο (50 mg/mL) > δεντρολίβανο > θρούμπι.

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : η διάμετρος αναστολής είχε εύρος από 0-15 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.3γ η μεγαλύτερη παρεμπόδιση εντοπίστηκε στο δίκταμο (50 mg/mL) και η μικρότερη στο θρούμπι. Εξαίρεση αποτελεί ο

Pseudomonas aeruginosa FMCC B-26 όπου οι συγκεντρώσεις των 50 mg/mL είχαν την ίδια δράση σε όλα τα φυτικά εκχυλίσματα και παράλληλα οι συγκεντρώσεις των 25 mg/mL δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του βακτηρίου. Μεταξύ των εκπροσώπων των οργανισμών την μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσίασε το *Escherichia coli* C1845 στο δίκταμο και δεντρολίβανο των 50 mg/mL, ενώ δεν παρουσιάστηκε δράση στις συγκεντρώσεις των 25 mg/mL και των τριών φυτών. Επομένως η σειρά δραστηριότητας ήταν δίκταμο (50 mg/mL) = δεντρολίβανο (50 mg/mL) > θρούμπι (50 mg/mL) για τους *E. coli*, *Salmonella typhimurium* SL1344 και *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197, ενώ για το *P. Aeruginosa* ήταν δίκταμο (50 mg/mL) = δεντρολίβανο (50 mg/mL) = θρούμπι (50 mg/mL). Στην μελέτη των Mihajilov-Krstev et al., 2009 το αιθέριο έλαιο του θρουμπιού έδειξε μεγάλη παρεμπόδιση ενάντια στο *K. Oxytoca*, ενώ στο *P. Aeruginosa* είχε μικρή δράση. Οι Azaz et al., 2005 βρήκαν δράση του αιθέριου ελαίου του θρουμπιού ενάντια στο *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



Ραβδόγραμμα 3.6.3γ : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων πετρελαιικού αιθέρα μεταξύ αρνητικών κατά Gram βακτηρίων

Πίνακας 3.6.3β : Διάμετροι αναστολής των μικροοργανισμών για τα φυτικά εκχυλίσματα εξανίου

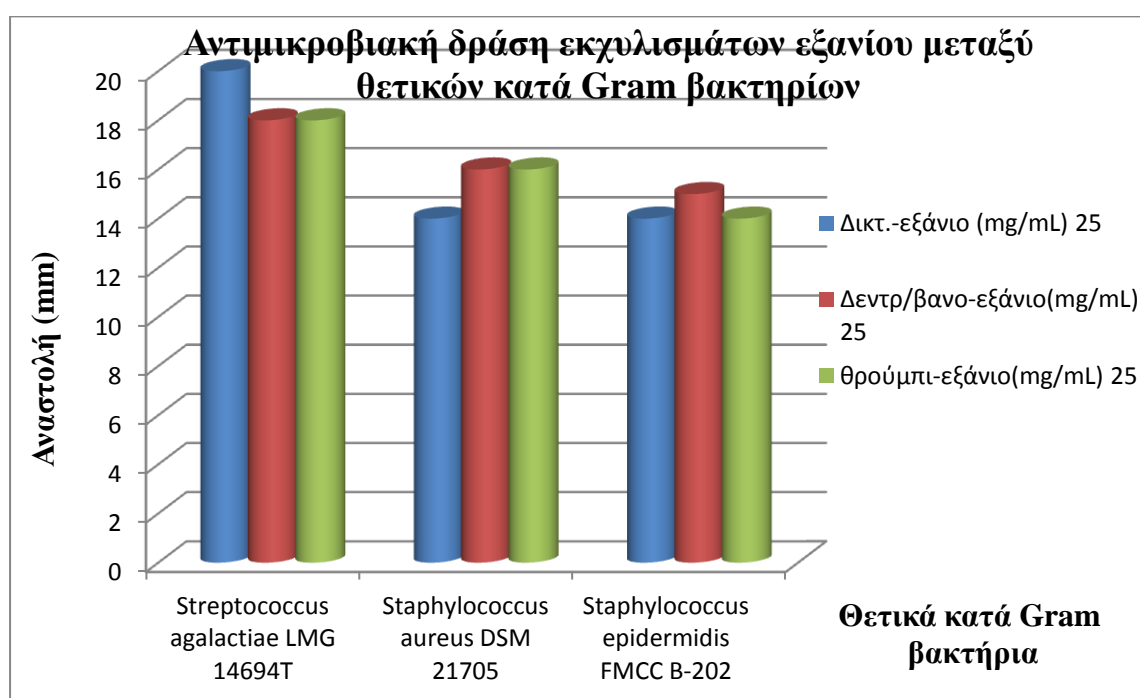
	Δικτ.-εξάνιο (mg/mL)	Δεντρ/βανο-εξάνιο(mg/mL)	θρούμπι-εξάνιο(mg/mL)
Μικροοργανισμός	25	25	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	20	18	18
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	25	18	24
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	16	18	15
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	14	17	18
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	18	18	18
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	14	16	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	14	15	14
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	18	19	22
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	11	14	15
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	11	14	13+2
<i>Escherichia coli</i> C1845	7	12	15
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	7	8	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	8	8	15

Τα εκχυλίσματα εξανίου τα οποία απομονώνουν επίσης πτητικά και άπολα συστατικά παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Σε πολλές περιπτώσεις οι μη πολικές φάσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη δράση από τις πολικές (Sokmen, 2001).

Στο θρούμπι έχουμε πάλι ως κυρίαρχα συστατικά την καρβακρόλη και το γ-τερπινένιο, οπότε τα εκχυλίσματα εμφανίζουν αντιμικροβιακές δράσεις. Αντίστοιχα στο δεντρολίβανο εμφανίζεται πάλι η βορνεόλη, βερμπενόνη αλλά και καμφορά, καρβακρόλη και θυμόλη οπότε αναμένεται αντιμικροβιακή δράση. Και τέλος στο δίκταμο υπάρχει συντριπτικό ποσοστό καρβακρόλης (76,6 %), αλλά επίσης υπάρχει και η θυμοκινόνη η οποία παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση (Chaieb et al., 2011).

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : οι διάμετροι αναστολής κυμαίνονται από 14-20 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.3δ η μεγαλύτερη δράση ποσοτικά εντοπίζεται στον *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T του εκχυλίσματος δίκταμου ενώ η μικρότερη δράση εμφανίζεται σε ισότητα με τα εκχυλίσματα δίκταμου στον

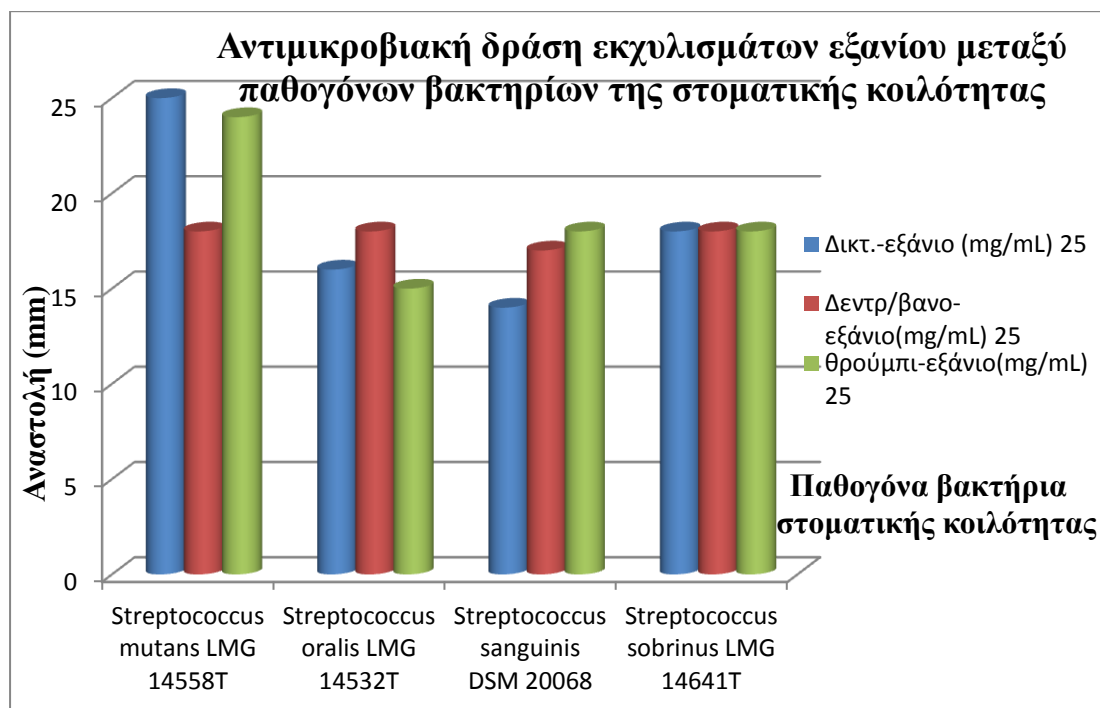
Staphylococcus aureus DSM 21705 και τα εκχυλίσματα δίκταμου και θρούμπιού στον *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202. Επιπλέον υπάρχουν αρκετές ομοιότητες στις δραστηριότητες κάθε φυτού σε κάθε μικροοργανισμό όπως ότι στον *S. agalactiae* τα εκχυλίσματα θρούμπιού και δεντρολίβανου έχουν ίδια δραστηριότητα μεταξύ τους, κάτι που παρατηρείται αντίστοιχα στον *S. epidermidis* για τα εκχυλίσματα δίκταμου και θρούμπιού. Σε αντίθεση με την μελέτη των Sahin et al., 2003 όπου τα εκχυλίσματα θρούμπιού δεν έδειξαν δράση ενάντια σε πέντε στελέχη του *S. aureus*, η παρούσα μελέτη έδειξε δράση στο στέλεχος DSM 21705.



Ραβδόγραμμα 3.6.3δ : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων εξανίου μεταξύ θετικών κατά Gram βακτηρίων

Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας : Οι διάμετροι κυμαίνονται από 15-25 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.3ε την μεγαλύτερη δράση ποσοτικά εμφάνισε το εκχύλισμα δίκταμο στον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T ενώ η μικρότερη δράση παρουσιάστηκε στο εκχύλισμα δίκταμου για τους *Streptococcus sanguinis* DSM 20068. Σε αυτήν την κατηγορία παρουσιάζονται πολλές διαφορές μεταξύ των μικροοργανισμών για την σειρά δραστηριότητας των φυτικών εκχυλισμάτων όπου στον *S. mutans* η σειρά ήταν δίκταμο > θρούμπι > δεντρολίβανο, στον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T δεντρολίβανο > δίκταμο > θρούμπι, στον *S.*

sanguinis DSM 20068 θρούμπι > δεντρολίβανο > εξάνιο, ενώ στον *Streptococcus sobrinus* LMG 14641 όλα τα εκχυλίσματα ήταν το ίδιο δραστικά.



Ραβδόγραμμα 3.6.3ε : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων εξανίου μεταξύ παθογόνων βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας

Για τους παθογόνους τροφίμων : Οι ανασταλτικές κυμαίνονται από 11-22 mm. Σύμφωνα με το Πίνακα 3.6.3β η μεγαλύτερη παρεμπόδιση παρατηρείται στο εκχύλισμα του θρούμπιού στον *Bacillus cereus* LMG 6923^T, ενώ η μικρότερη στους δικτάμου για τα *Listeria innocua* LMG 11387^T και *Listeria welschimeri* 15008. Στους *B. cereus* και *L. innocua* η σειρά δραστικότητας είναι θρούμπι > δεντρολίβανο > δίκταμο, ενώ στον *L. Welschimeri* είναι δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο. Σε αντίθεση με την μελέτη των Sahin et al., 2003 όπου το εκχύλισμα του εξανίου του θρούμπιού δεν παρεμπόδισε δύο κλινικά στελέχη του *B. Cereus*, η παρούσα μελέτη έδειξε δράση ενάντια στον *Bacillus cereus* LMG 6923^T.

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : Οι διάμετροι αναστολής κυμαίνονται από 0-15 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.3β η μεγαλύτερη παρεμπόδιση εμφανίζεται στο θρούμπι και είναι ίδια στα βακτήρια *Escherichia coli* B-197, *Salmonella typhimurium* SL1344 και *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197, ενώ ο *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26 ήταν ο πιο ανθεκτικός οργανισμός όπου δεν

παρεμποδίστηκε από κάποιο εκχύλισμα. Όσο για τους άλλους τρεις μικροοργανισμούς η σειρά δραστηριότητας ήταν θρούμπι > δεντρολίβανο > εξάνιο για τους *E. coli* και *S. typhimurium* και δεντρολίβανο > θρούμπι = δίκταμο για τον *K. Oxytoca*. Σε σύγκριση με την μελέτη των Sahin et al., 2003 όπου εξέτασαν την δράση επτά κλινικών στελεχών του *E. coli*, ενός στελέχους του *S. typhimurium* στο θρούμπι εκχυλίσματος εξανίου, δεν βρέθηκε κάποια δράση σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου το εξάνιο θρουμπιού εμφάνισε δράση ενάντια στο στέλεχος C1845 του *E. coli* και στο *S. typhimurium* SL1344.

Πίνακας 3.6.3γ : Διάμετροι αναστολής των μικροοργανισμών για τα φυτικά εκχυλίσματα διαιθυλαιθέρα

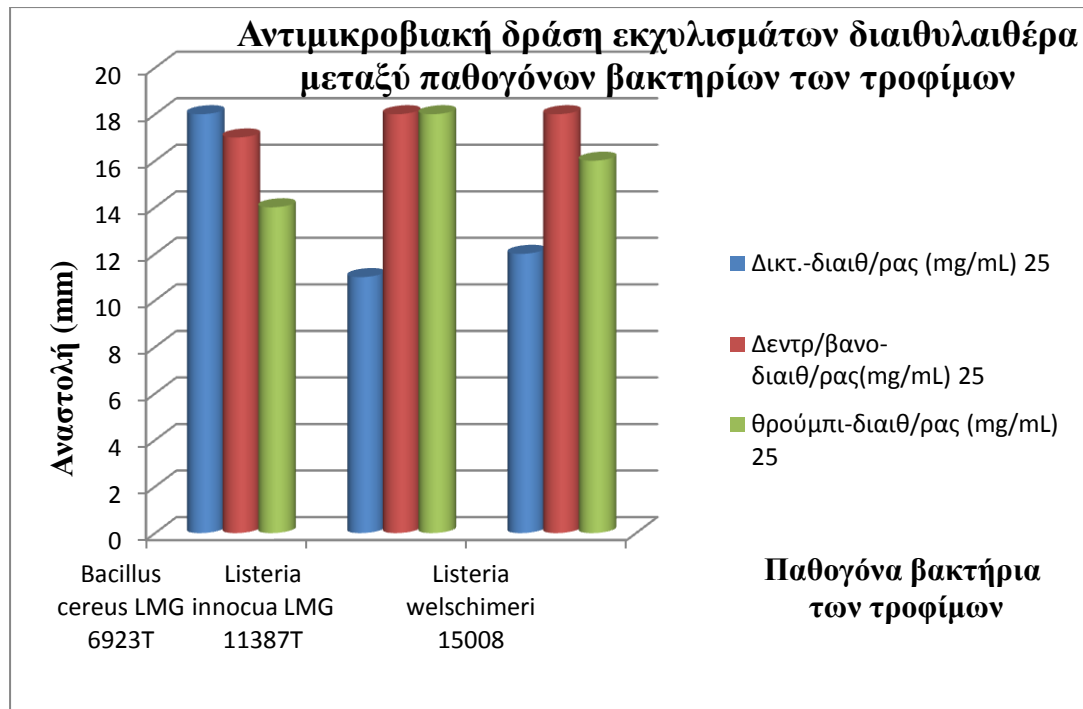
	Δικτ.-διαιθ/ρας (mg/mL)	Δεντρ/βανο-διαιθ/ρας(mg/mL)	θρούμπι-διαιθ/ρας (mg/mL)
Μικροοργανισμός	25	25	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	14	20	17
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	25	16	24
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	22	28	24
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	12	17	18
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	14	14	20
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	17	10	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	16	12	18
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	18	17	14
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	11	18	18
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	12	18+3	16+5
<i>Escherichia coli</i> C1845	12	13+5	13+4
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	12	15	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	11	11	15
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	13	17	17

Ο διαιθυλαιθέρας απομονώνει μη πτητικά συστατικά και αποτελεί το πολικό κλάσμα. Απομονώνει φαινολικά συστατικά και κυρίως τα άγλυκα τμήματα των φλαβονοειδών εκ των οποίων κάποια έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση.

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : οι διάμετροι αναστολής είχαν εύρος από 10-20 mm. σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.3γ η μεγαλύτερη ποσοτικά αναστολή διακρίνεται στο εκχύλισμα δεντρολίβανου στον *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T ενώ η μικρότερη αναστολή διακρίνεται στον *Staphylococcus aureus* DSM 21705. Σε αυτήν την κατηγορία δεν υπάρχει ομοιομορφία μεταξύ των μικροοργανισμών για το ποιο εκχύλισμα είναι το δραστικότερο και έτσι παρατηρείται ότι η σειρά δραστικότητας στον *S. agalactiae* ήταν δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο, στον *S. aureus* ήταν δίκταμο > θρούμπι > δεντρολίβανο και στον *S. epidermidis* ήταν θρούμπι > δίκταμο > δεντρολίβανο.

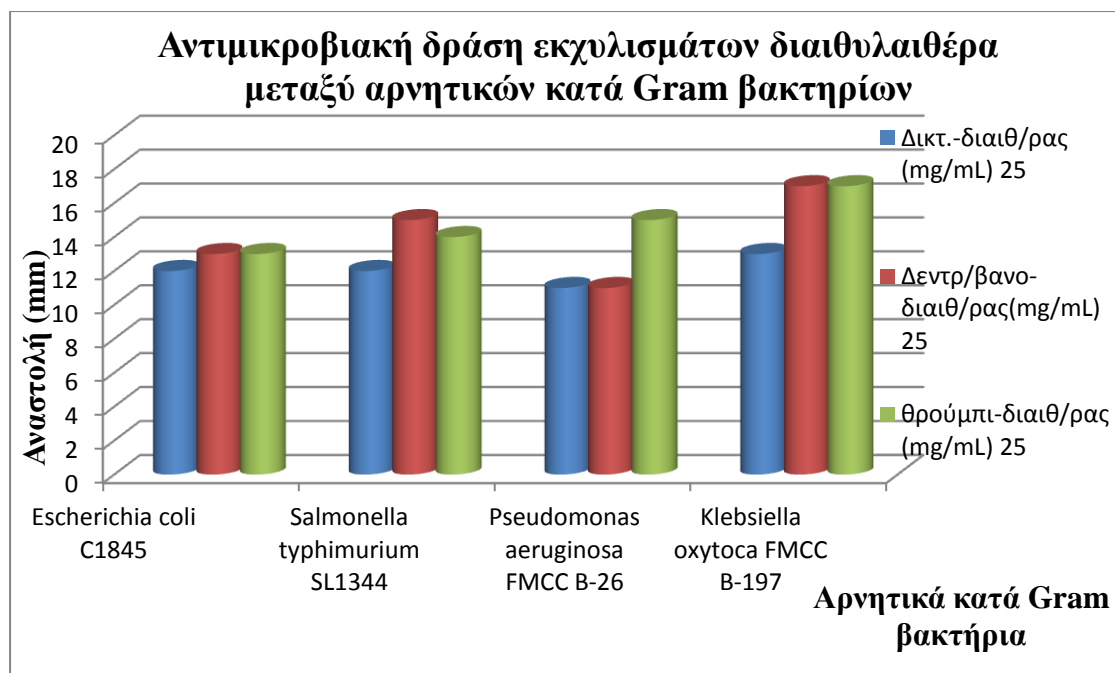
Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας : Οι διάμετροι αναστολής είχαν εύρος από 12-25 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.3γ η μεγαλύτερη ποσοτικά αναστολή παρατηρείται στο δεντρολίβανο για τον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T, ενώ η μικρότερη παρατηρείται στον δίκταμο για τον *Streptococcus sanguinis* DSM 20068. Και σε αυτό το ραβδόγραμμα υπάρχουν διαφορές στην δραστικότητα μεταξύ των φυτικών εκχυλισμάτων όπου η σειρά δραστικότητας είναι δίκταμο > θρούμπι > δεντρολίβανο για τον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T, δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο για τον *S. oralis*, θρούμπι > δεντρολίβανο > δίκταμο για τον *S. sanguinis* και θρούμπι > δίκταμο = δεντρολίβανο για τον *Streptococcus sobrinus* 14641^T.

Για τους παθογόνους τροφίμων : Οι διάμετροι αναστολής είχαν εύρος από 11-18 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.3.στ οι μεγαλύτερες ποσοτικά αναστολές βρίσκονται σε ισότητα μεταξύ τους και είναι στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου και θρουμπιού για τον *Listeria innocua* LMG 1138^T, στο εκχύλισμα δίκταμου για τον *Bacillus cereus* LMG 6923^T και στο εκχύλισμα δεντρολίβανου για τον *Listeria welschimeri* 15008, ενώ η μικρότερη παρατηρείται στο εκχύλισμα δίκταμου του *L. Innocua*. Για μια ακόμη φορά υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μικροοργανισμών όσον αφορά την σειρά δραστικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων όπου στον *B. cereus* η σειρά είναι δίκταμο > δεντρολίβανο > θρούμπι, στον *L. Innocua* είναι δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο και στο *L. Welschimeri* είναι δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο.



Ραβδόγραμμα 3.6.3στ : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων διαιθυλεθαίρα μεταξύ παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : Οι διακυμάνσεις μεταξύ των διαμέτρων αναστολής είναι από 11-17 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.7.3ζ η μεγαλύτερη ποσοτικά αναστολή φαίνεται στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου και θρούμπι για τον *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197, και η μικρότερη αναστολή φαίνεται στα εκχυλίσματα δίκταμου και δεντρολίβανου για τον *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26. Για τους *Escherichia coli* C1845, *K. oxytoca* και *P. aeruginosa* υπάρχουν ομοιότητες ως προς την δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων, με θρούμπι = δεντρολίβανο > δίκταμο για τα *E. coli* και θρούμπι > δεντρολίβανο = δίκταμο για το *K. Oxytoca*, ενώ εξαίρεση αποτελεί ο *S. typhimurium* όπου η σειρά είναι δεντρολίβανο > θρούμπι > δίκταμο.



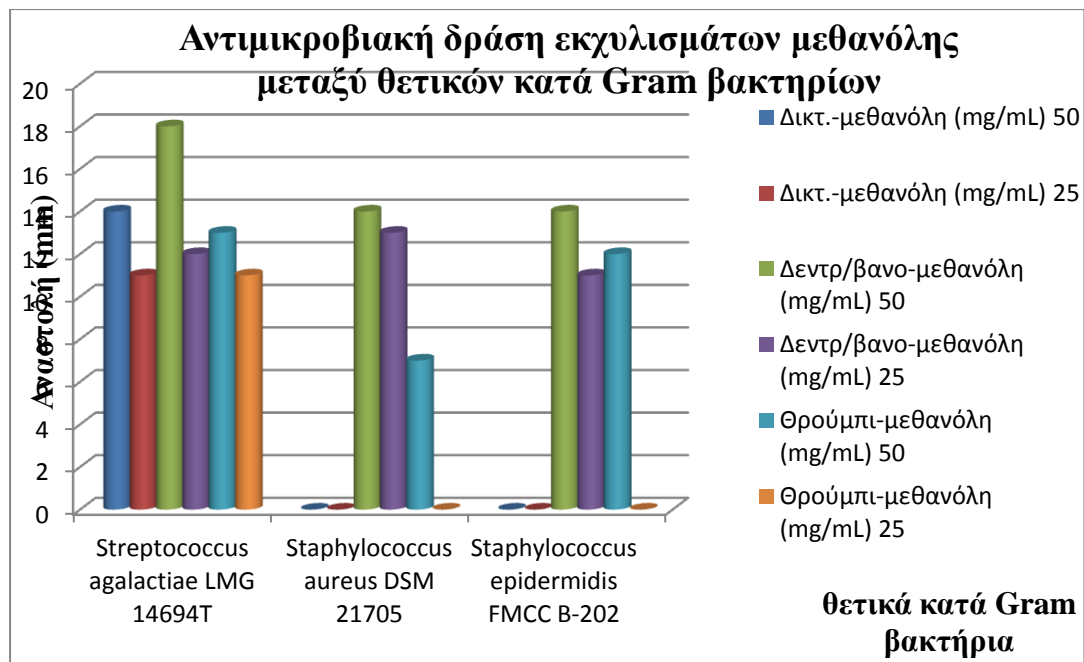
Ραβδόγραμμα 3.6.3ζ: Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων διαιθυλαιθέρα μεταξύ αρνητικών βακτηρίων κατά Gram

Πίνακας 3.6.3δ : Διάμετροι αναστολής των μικροοργανισμών για τα φυτικά εκχυλίσματα μεθανόλης

Μικροοργανισμός	Δικτ.-μεθανόλη (mg/mL)		Δεντρ/βανο-μεθανόλη (mg/mL)		Θρούμπι-μεθανόλη (mg/mL)	
	50	25	50	25	50	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	14	11	18	12	13	11
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	7	0	17	11	7	0
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	15	12	19	15	14	9
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	12	11	18	13	13	10
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	14	12	17	13	14	12
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	0	0	14	13	7	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	0	0	14	11	12	0
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	9	7	14	12	9	9
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	13	7	11	10	11	9
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	10	0	11	0	10	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	0	0	8	7	8	7
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	0	0	7	0	0	0

Το μεθανολικό εκχύλισμα απομονώνει τα πολικά συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα τα φαινολικά συστατικά σε γλυκοζιτική μορφή τα οποία ως λιγότερο δραστικά από ότι τα τερπενοειδή σε ένα αιθέριο έλαιο, έχουν ως αποτέλεσμα το μεθανολικό εκχύλισμα να είναι λιγότερο δραστικό από τα άλλα εκχυλίσματα.

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια : Το εύρος των διαμέτρων αναστολής κυμαίνεται από 0-18 mm. Κατά το Ραβδόγραμμα 3.6.3η η μεγαλύτερη ποσοτικά αναστολή εμφανίζεται στο εκχύλισμα δεντρολίβανου (50 mg/ mL) στον *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T ενώ στα εκχυλίσματα δίκταμου (50 και 25 mg/ mL) και θρούμπιού των 25 mg/ mL δεν υπήρξε παρεμπόδιση στους *Staphylococcus aureus* DSM 21705 και *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202. Αξιοσημείωτο είναι ότι από τις συγκεντρώσεις των 25 mg/ mL μόνο στο δεντρολίβανο υπήρξε παρεμπόδιση σε όλους τους μικροοργανισμούς, ενώ για τους δύο σταφυλόκοκκους το δίκταμο δεν παρεμπόδισε την ανάπτυξή τους. Το πιο δραστικό εκχύλισμα μεταξύ των μικροοργανισμών είναι μακράν του δεντρολίβανου (50 mg/ mL) και στην συνέχεια ακολουθεί το θρούμπι (50 mg/ mL) για τους σταφυλόκοκκους και το δίκταμο (50 mg/ mL) για τον στρεπτόκοκκο. Και τέλος λιγότερο δραστικό είναι το δίκταμο για τους σταφυλόκοκκους και το δίκταμο μαζί με το θρούμπι στις συγκεντρώσεις των 25 mg/ mL για τον στρεπτόκοκκο. Οι Proestos et al., 2006 βρήκαν μέτρια δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος δίκταμου ενάντια στον *S. aureus*, ενώ οι Celiktas et al., 2007 έδειξαν ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου είχαν μικρές αντιμικροβιακές ιδιότητες σε σχέση με του αιθέριου ελαίου για το στέλεχος του *S. epidermidis* που χρησιμοποιήθηκε. Οι Gulluce et al., 2003 δεν βρήκαν δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος θρούμπιού στο *S. aureus* ATCC - 29213, αλλά βρήκαν δράση ενάντια στο *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027, ενώ οι Proestos et al., 2005 βρήκαν μικρή δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου ενάντια στον *S. aureus* ATCC 6538.

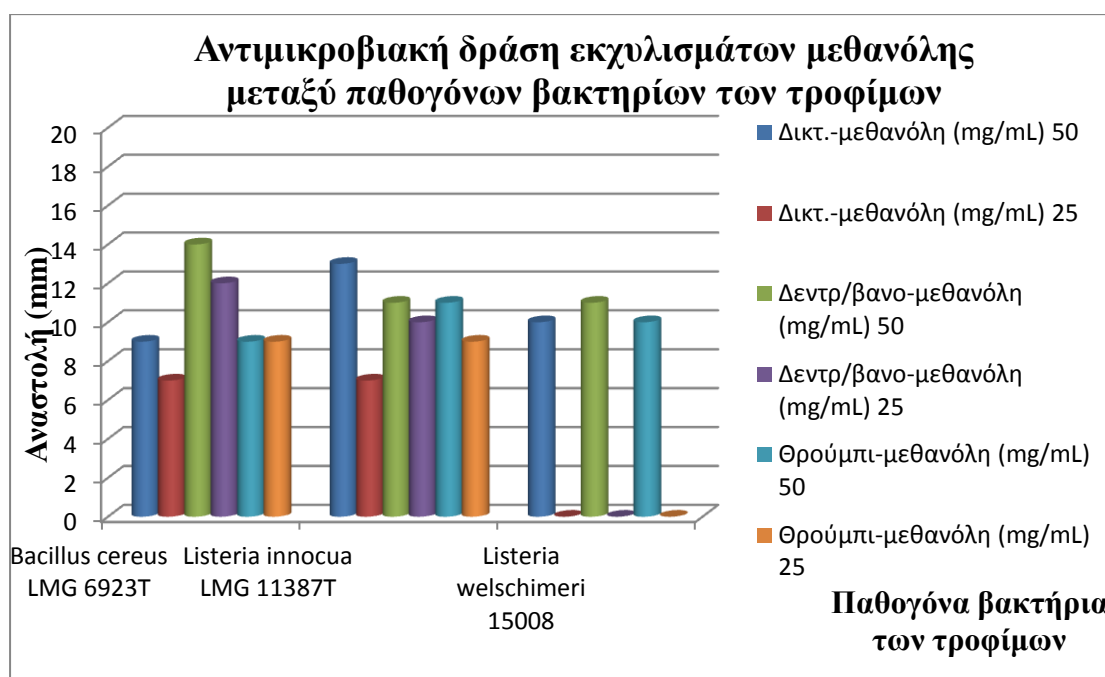


Ραβδόγραμμα 3.6.3η : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης μεθανολικών εκχυλισμάτων μεταξύ θετικών κατά Gram βακτηρίων

Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας : το εύρος των διαμέτρων, κυμαίνεται από 0-19 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.3δ η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρείται στο εκχύλισμα δεντρολίβανου (50 mg/ mL) για τον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T ενώ μηδενικές ήταν στον *Streptococcus mutans* LMG 14558^T για τα εκχυλίσματα δίκταμου και θρουμπιού σε συγκέντρωση 25 mg/ mL. Από άποψη δραστηρότητας το εκχύλισμα δεντρολίβανου έδειξε μακράν την μεγαλύτερη παρεμπόδιση σε όλους τους μικροοργανισμούς ενώ για τα υπόλοιπα φυτικά εκχυλίσματα υπάρχει μια ισορροπία με τους *S. mutans* και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641^T να έχουν σειρά δραστηρότητας το δίκταμο και το θρούμπι σε συγκεντρώσεις των 50 mg/ mL, ενώ στον *S. oralis* δεύτερο σε σειρά δραστηρότητας ήταν το εκχύλισμα του δίκταμου, ενώ στον *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 δεύτερο δραστηρότερο ήταν το εκχύλισμα θρουμπιού.

Για τους παθογόνους τροφίμων : Το εύρος των διαμέτρων αναστολής κυμαίνεται από 0-13 mm. Σύμφωνα με το Ραβδόγραμμα 3.6.3ι η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται στο εκχύλισμα δεντρολίβανου (50 mg/ mL) στον *Bacillus cereus* CMG 6923^T ενώ στον *Listeria welschimeri* 15008 οι συγκεντρώσεις των 25 mg/ mL δεν έδειξαν παρεμπόδιση σε κανένα φυτικό εκχύλισμα. Σχετικά με την σειρά δραστηρότητας υπάρχει ανομοιομορφία μεταξύ των μικροοργανισμών όπου στον *B.*

Cereus η σειρά δραστηριότητας είναι δεντρολίβανο (50 > 25 mg/ mL) > δίκταμο (50 mg/ mL) = θρούμπι (50 και 25 mg/ mL), στον *Listeria innocua* LMG 11387^T δίκταμο (50 mg/ mL) > δεντρολίβανο (50 mg/ mL) = θρούμπι (50 mg/ mL) και στον *L. welschimeri* δεντρολίβανο (50 mg/ mL) > δίκταμο (50 mg/ mL) = θρούμπι (50 mg/ mL). Στην μελέτη των Sahin et al., 2003 [] το μεθανολικό εκχύλισμα θρουμπιού δεν έδειξε δράση στα δύο κλινικά στελέχη του *B. Cereus*, ενώ για τον ίδιο μικροοργανισμό στην μελέτη των Proestos et al., 2005 το εκχύλισμα δεντρολίβανου έδειξε μικρή δράση, ενώ στην μελέτη των Bubonja-Sonje et al., 2011 το εκχύλισμα δεντρολίβανου σε αναλογία διαλυτών μεθανόλη- νερό- οξικό οξύ 90:9:1 έδειξε δράση ενάντια στον *L. Innocua*. Οι Gulluce et al., 2003 δεν βρήκαν δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος θρουμπιού στον *Bacillus cereus*- RK 75.



Ραβδόγραμμα 3.6.3ι : Σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων μεθανόλης μεταξύ παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων

Για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια : Εδώ έχουμε χαμηλές ποσοτικά διαμέτρους αναστολής με εύρος 0-8 mm. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6.3δ ένα εμφανές χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας μικροοργανισμών είναι ότι στα περισσότερα εκχυλίσματα δεν υπήρξε παρεμπόδιση και πιο χαρακτηριστική περίπτωση είναι του δίκταμου όπου δεν ανέστειλε την ανάπτυξη κανενός μικροοργανισμού. Ο οργανισμός με την μεγαλύτερη ευαισθησία ήταν ο *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26 με ίδια

σειρά δραστηριότητας δεντρολίβανου και θρουμπιού σε συγκέντρωση 50 mg/ mL. Ο *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197 αποδείχτηκε ευαίσθητος μόνο στο εκχύλισμα δεντρολίβανου (50 mg/ mL) ενώ οι *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* αποδείχτηκαν ανθεκτικοί σε όλα τα εκχυλίσματα.

Σε σύγκριση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα άλλων ερευνών οι Chatzopoulou et al., 2010 βρήκαν παρεμπόδιση ενάντια στον *P. aeruginosa* σε εκχύλισμα δίκταμου, οι Sahin et al., 2003 δεν βρήκαν δράση ενάντια στην *S. typhimurium* σε εκχύλισμα θρουμπιού αλλά το *E. coli* έδειξε παρεμπόδιση και στα επτά κλινικά στελέχη του. Όσο για το δεντρολίβανο, στην έρευνα των Celiktas et al., 2007 τα μεθανολικά εκχυλίσματα έδειξαν μικρές αντιμικροβιακές ιδιότητες σε σχέση με το αιθέριο έλαιο για το στέλεχος του *P. aeruginosa*, του *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν. Οι Gulluce et al., 2003 δεν βρήκαν δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του θρουμπιού ενάντια στο *Escherichia coli* Hak 59, ενώ οι Proestos et al., 2006 βρήκαν μικρή δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος δίκταμου ενάντια στο *E. coli* 0157 : H7 NCTC12900, ενώ σε άλλη μελέτη (2005) βρήκαν δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου ενάντια στο *E. coli* 0157.

3.6.4) Γενικά συμπεράσματα

Η συγκέντρωση των (50 mg/ mL) στα εκχυλίσματα πετρελ. αιθέρα και μεθανόλης είναι κατά πολύ δραστηριότερη από αυτή των (25 mg/ mL) χωρίς να μπορεί να ειπωθεί ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ συγκεντρώσεων και παρεμπόδισης.

Τα αρνητικά κατά gram βακτήρια παρεμποδίζονταν λιγότερο σε σχέση με τα θετικά κατά Gram βακτήρια που εξετάσαμε. Πιο συγκεκριμένα στα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και εξανίου η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στο ότι συνήθως η καρβακρόλη που κυριαρχεί στα εκχυλίσματα του δίκταμου και του θρουμπιού αναστέλλει περισσότερο τα θετικά κατά gram βακτήρια από ότι τα αρνητικά κατά Gram (Nevas et al., 2004)

Τα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα και εξανίου είναι γενικότερα πιο δραστηρικά από του διαιθυλαιθέρα και μεθανόλης λόγω συστατικών καρβακρόλης όπως στην περίπτωση του δίκταμου και του θρουμπιού, αλλά επίσης και λόγω της παρουσίας

ευκαλυπτόλης, βορνεόλης, βερμπενόνης, θυμοκινόνης, θυμόλης και καμφοράς στο δεντρολίβανο. Το ροσμαρινικό οξύ και τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά (Κεφ 3.3) είναι κατά πολύ λιγότερο δραστικά στην παρεμπόδιση των μικροοργανισμών που εξετάσαμε.

Για τα θετικά κατά Gram βακτήρια :

Ο πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) ήταν το πιο δραστικό εκχύλισμα δίκταμου για όλους τους μικροοργανισμούς ενώ στους περισσότερους μικροοργανισμούς (*Staphylococcus aureus* LMG 14694^T, *Staphylococcus epidermidis* FMCC B-202) τα μεθανολικά εκχυλίσματα ήταν ανενεργά.

Στο δεντρολίβανο οι δραστικότητες των εκχυλισμάτων ποικίλουν με την μεγαλύτερη παρεμπόδιση στον *S. aureus* να είναι στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) μαζί με το εξάνιο, στον *S. epidermidis* στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα, ενώ στον *Streptococcus agalactiae* LMG 14694^T κυριαρχεί το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα. Ενώ για τις μικρότερες παρεμποδίσεις είχαμε το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα στους *S. aureus* και *S. epidermidis* και το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (25 mg/ mL) για τον *S. agalactiae*.

Στο θρούμπι η σειρά δραστικότητας επίσης ποικίλει με τον *S. agalactiae* να έχει δραστικότερο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) μαζί με του εξανίου και λιγότερο δραστικό το μεθανολικό εκχύλισμα των (25 mg/ mL), ο *S. aureus* έχει δραστικότερο εκχύλισμα του εξανίου μαζί με διαιθυλαιθέρα ενώ το μεθανολικό (25 mg/ mL) ήταν ανενεργό, και ο *S. epidermidis* είχε δραστικότερο το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα και λιγότερο το μεθανολικό των (25 mg/ mL) που ήταν τελείως ανενεργό.

Για τους παθογόνους στοματικής κοιλότητας:

Στο δίκταμο η πλειοψηφία των μικροοργανισμών (*Streptococcus mutans* LMG 14558^T, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641^T) αποδείχτηκε περισσότερο ευαίσθητη στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) με εξαίρεση τον *Streptococcus oralis* LMG 14532^T ο οποίος παρεμποδίστηκε περισσότερο από τον διαιθυλαιθέρα.

Στο δεντρολίβανο υπάρχουν κάποιες ομοιότητες για την σειρά δραστηριότητας με τον *S. mutans* να είναι πιο ευαίσθητος στον πετρελαϊκό αιθέρα (50 mg/ mL) και ταυτόχρονα στο εξάνιο, ο *S. oralis* στον διαιθυλαιθέρα, ο *S. sanguinis* στον πετρελαϊκό αιθέρα (50 mg/ mL) και ο *S. sobrinus* στον πετρελαϊκό αιθέρα (50 και 25 mg/ mL).

Στο θρούμπι το δραστικότερο εκχύλισμα ήταν σε όλους τους μικροοργανισμούς του διαιθυλαιθέρα το οποίο στους *S. mutans* και *S. sanguinis* ήταν το ίδιο δραστικό με το εκχύλισμα του εξανίου.

Σαν γενική παρατήρηση σε όλα τα φυτά το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα για όλους τους μικροοργανισμούς ήταν το μεθανολικό των 25 mg/ mL.

Για τους παθογόνους τροφίμων :

Στο δίκταμο το δραστικότερο εκχύλισμα ήταν του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL).

Στο δενδρολίβανο στους *Listeria innocua* LMG11387^T και *Listeria welschimeri* 15008 η σειρά δραστηριότητας ήταν διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL), ενώ στον *Bacillus cereus* LMG 6923^T η σειρά ήταν πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > εξάνιο > διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη.

Στο θρούμπι οι δύο *Listeria* ακολουθούσαν την σειρά δραστηριότητας πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > διαιθυλαιθέρας > εξάνιο > μεθανόλη (50 mg/ mL), ενώ στον *B. Cereus* η σειρά ήταν εξάνιο > πετρελαϊκός αιθέρας > διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη (50 mg/ mL).

Σε όλα τα φυτά το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό των 25 mg/ mL.

Αρνητικά κατά Gram βακτήρια :

Στο δίκταμο το μεθανολικό εκχύλισμα ήταν ανενεργό σε όλους τους μικροοργανισμούς. Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών (*Escherichia coli* 1845, *Salmonella typhimurium* SL1344 και *Klebsiella oxytoca* FMCC B-197) είχαν ως σειρά δραστηριότητας πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) > διαιθυλαιθέρας > εξάνιο, ενώ στον *Pseudomonas aeruginosa* FMCC B-26 τα μοναδικά κλάσματα που έδειξαν παρεμπόδιση ήταν ο διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL).

Στο δεντρολίβανο μερικά εκχυλίσματα ήταν ανενεργά (μεθανολικά στα *E. coli* και *S. typhimurium*, πετρελαϊκού αιθέρα (25 mg/ mL) και εξανίου στο *P. Aeruginosa* και μεθανόλης των 25 mg/ mL στο *K. Oxytoca*). Στην πλειοψηφία των μικροοργανισμών (*S. typhimurium*, *P. Aeruginosa* και *K. Oxitoca*) το δραστικότερο εκχύλισμα ήταν του διαιθυλαιθέρα ενώ στο *E. coli* ήταν του πετρελαϊκού αιθέρα.

Στο θρούμπι δεν υπήρξαν παρεμποδίσεις στα μεθανολικά εκχυλίσματα της πλειοψηφίας των μικροοργανισμών (*E. coli*, *S. typhimurium*, *K. Oxytoca*) και στα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα (25 mg/ mL) και εξανίου για το *P. Aeruginosa*. Στα *E. coli* και *S. typhimurium* η σειρά δραστηριότητας ήταν εξάνιο > διαιθυλαιθέρας > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL), στο *K. Oxytoca* διαιθυλαιθέρας > εξάνιο > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL) και στο *P. Aeruginosa* διαιθυλαιθέρας > μεθανόλη (50 mg/ mL) > πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παραλαβή εκχυλισμάτων :

Στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα παραλάβαμε πτητικά συστατικά εκ των οποίων τα κυριότερα ήταν η καρβακρόλη στο θρούμπι και το δίκταμο και η ευκαλυπτόλη στο δεντρολίβανο, τα οποία ανευρίσκονται και ως κυρίαρχα συστατικά στα αιθέρια έλαια των αντίστοιχων φυτών (Gursoy et al., 2009, Ntalli et al., 2010, Zaouali et al., 2010).

Στο εκχύλισμα του εξανίου παραλάβαμε επίσης πτητικά συστατικά λόγω της φύσης του διαλύτη αλλά λιγότερα σε αριθμό και σε αφθονία σε σχέση με του πετρελαϊκού αιθέρα καθώς τα περισσότερα συστατικά είχαν ήδη εκχυλιστεί με τον πετρελαϊκό αιθέρα. Τα κυριότερα συστατικά που παραλήφθησαν ήταν η καρβακρόλη στο δίκταμο και θρούμπι, ενώ στο δεντρολίβανο ήταν βερμπενόνη, καμφορά και βορνεόλη.

Στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα παραλάβαμε φαινολικά συστατικά και κυρίως τα άγλυκα τμήματα των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα οι κυριότερες ενώσεις ήταν η κισιμαριτίνη στο δίκταμο, η ναρινγενίνη στο θρούμπι και μια μεθυλ φλαβόνη στο δεντρολίβανο.

Στο εκχύλισμα μεθανόλης παραλάβαμε κυρίως το ροσμαρινικό οξύ και γλυκοζίτες φλαβονοειδών.

Αντιοξειδωτική ικανότητα :

Σε όλα τα φυτά τα μεθανολικά εκχυλίσματα είχαν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση γιατί είχαν κυρίως ροσμαρινικό οξύ που αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό (Lin et al., 2002). Στην συνέχεια ακολούθησαν τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα και του πετρελαϊκού αιθέρα όπου η καρβακρόλη που βρέθηκε στα εκχυλίσματά του έχει επίσης αντιοξειδωτική δράση (Tere et al., 2005).

Αντιμικροβιακή δράση :

Στα θετικά κατά Gram βακτήρια το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν κυρίως αυτό του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) καθώς ανέστειλε την πλειοψηφία των μικροοργανισμών στα δύο από τα τρία φυτά, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό το οποίο μάλιστα στην περίπτωση του δίκταμου ήταν ανενεργό. Στους παθογόνους της στοματικής κοιλότητας κατά πλειοψηφία τα δραστικότερα εκχυλίσματα ήταν του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/ mL) και παρεμπόδισαν περισσότερο σχεδόν όλους τους μικροοργανισμούς στο δίκταμο και δεντρολίβανο, ενώ στο θρούμπι δραστικότερο εκχύλισμα ήταν του διαιθυλαιθέρα. Το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό. Στους παθογόνους τροφίμων στο δίκταμο και στο θρούμπι την μεγαλύτερη δραστικότητα είχε ο πετρελαϊκός αιθέρας (50 mg/ mL), ενώ στο δεντρολίβανο ο διαιθυλαιθέρας. Το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια περισσότερο δραστικό ήταν αυτό του διαιθυλαιθέρα για το θρούμπι και το δεντρολίβανο, ενώ για το δίκταμο είχαμε αυτό του πετρελαϊκού αιθέρα. Για μια ακόμα φορά τα λιγότερο δραστικά ήταν τα μεθανολικά εκχυλίσματα.

Επομένως κατά πλειοψηφία των μικροοργανισμών το δραστικότερο εκχύλισμα ήταν του πετρελαϊκού αιθέρα, με τον οποίο παραλαμβάνουμε τα συστατικά του αιθερίου ελαίου με κυρίαρχη ένωση την καρβακρόλη, στην περίπτωση του δίκταμου και του θρουμπιού, που έχει αποδεδειγμένα αντιμικροβιακή δράση (Penalver et al., 2005, Santoyo et al., 2006). Στην περίπτωση του δεντρολίβανου η κυρίαρχη ένωση είναι η ευκαλυπτόλη με αντίστοιχες αντιμικροβιακές ιδιότητες (Santoyo et al., 2005). Το εξάνιο δεν είναι τόσο δραστικό όσο του πετρελαϊκού αιθέρα. Αρκετά καλή αντιμικροβιακή δράση περιέχουν κυρίως τα άγλυκα φλαβονοειδή που έχουν περάσει στον διαιθυλαιθέρα όπως η κισιμαριτίνη (Miski et al., 1983), η απιγενίνη και κερκετίνη (Cushnie and Lamb, 2005), αλλά και φυσικά η ναρινγενίνη (Andrade et al., 2010) όπως και η λουτεολίνη (Tshikanlange et al., 2005).

Η παρουσία μιας φαινολικής υδροξυλομάδας ιδίως στην καρβακρόλη πιστώνεται για τη δραστικότητα ενάντια σε παθογόνους όπως *Bacillus cereus* (Ultee et al., 1999, 2002). Επιπλέον αιθέρια έλαια με υψηλές συγκεντρώσεις σε καρβακρόλη και θυμόλη

π.χ ρίγανη, θρούμπι και θυμάρι συνήθως αναστέλλουν θετικά κατά Gram περισσότερο από ότι αρνητικά κατά Gram παθογόνα βακτήρια (Nevas et al., 2004).

Τέλος οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν τα αιθέρια έλαια να αναστείλουν τους μικροοργανισμούς περιλαμβάνουν διαφορετικούς τρόπους δράσης, και εν μέρει μπορεί να οφείλεται στην υδροφοβικότητά τους. Ως αποτέλεσμα κατανέμονται μέσα στην λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, καθιστώντας το πιο διαπερατό, οδηγώντας το σε διαρροή των περιεχομένων των ζωτικών κυττάρων (Burt, 2004, Juven et al., 1994, Kim et al., 1995). Η απομείωση των βακτηριακών ενζυμικών συστημάτων μπορεί επίσης να είναι ένας πιθανός μηχανισμός της δράσης (Wendakoon and Sakagutchi, 1995).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής Βιβλιογραφία

Abuza , P.M., Albertini, R., Esterbauer, H.(1997). Simulation of the oxidation of oxidanion of low density lipoprotein by high copper concentrations: evidence for a non constant rate of initiation. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 644-651

Abu-Al-Basal, M.A., (2010). Healing potential of *Rosmarinus officinalis L.* on fullthickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *J. Ethnopharmacol.* 131, 443–450

Achamlale, S., Rezzonico, B., Grignon-Dubois, M.(2009). Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon. *Food Chem.*113:878-883

Aeschbach, R., LoÈ liger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halli well, B. and Aruoma, O. T. (1994) Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem.Toxicol.* 32, 31±36

Almeida, L.S.B., Murata, R.M., Yatsuda, R., Dos Santos, M.H., Nagem, T.J., Alencar, S.M., Koo, H., Rosalen, P.L.(2008). Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 15, 886-891

Al-Sereiti , M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P.(1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol.* 37:124-30

Alexopoulos, A., Kimbaris, A,C., Plessas,S., Mantzourani, I., Theodoridou, I., Stavropoulou, E., Polissiou, M.G., Bezirtzoglou (2011). Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe* xxx 1-4.

Ali, B., Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 17: 299–305

Alizadeh, A., Khoshkhui, M. Javidnia, K., Firuzi, O., Tafazoli, E., Khalighi, A. (2010). Effects of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. *Journal of Medicinal plants* vol. 4(1), pp.33-40

Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J.A., Roca, M.J., Rabe V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*. 120, 221-229

Amin, A., Hamza, A.A., (2005). Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sci*. 77, 266–278

Andrade, D.C.A., Carvahlo, L.D.S., Cunico, M.M., Lordello, A.L.L., Higashino, C.E.K., Almeida, S.C.D.C., Dias, J.D.F.G., Kerber, V.A.K., Miguel, M.D., Miguel, M.D., Miguel, O.G. (2010). Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flower of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn, ex G. Don. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 46, no 4, p: 715-721

Antolovich, M., Prenzler, P.D. Patsalides, E. MC Donald, S., Robards, K. (2001). Methods for testing antioxidant activity analyst, 127.183-198

Ariga, T., Koshiyama, I, & Fakushima, U.S (1989) patens 4, 797, 421

Arora, A.,Nair, M, Strasburg, GM. (1998). Structure activity relationships for antioxidant activities or a spries of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine* 24 (9), 1355-1363

Aruoma, I.O. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists Society*, 75, 199-212

Azaz, A.D.Kurkcuglu, M., Satil, F., Baser, K.H.C., Tunen, G.(2005). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils. *Flavor Fragr. J.*20: 587-591

Bauer, K., Garbe, D., (1985.) *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses.* VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 213

Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O.U., Ulgen, S.G., Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 116, 64–73

- Ballabenia, V.**, Tognolinia, M., Chiavarinia, M. et al. (2004). Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon 'grosso'. *Phytomedicine* 11: 596–601
- Barter, P.** (2005). The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis Suppl* 6(2): 15–20
- Baumann, H.** (1999). Η Ελληνική γλωρίδα στον μύθο, στη Τέχνη, στη Λογοτεχνία. Κεφ. Θεραπευτικά και μαγικά βότανα. Τα φάρμακα των γιατρών. Σελ. 119-121 «Εκδόσεις Ελλ. Εταιρεία προστασίας της φύσης».
- Beninca, J.P.** Dalmarco, J.B, Pizolatti, M.G., Frode, T.S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* Lin nice. *Food Chem* 124,468-475
- Benzie, I.F.F.**, Strain, J.J. (1996). The ferric reducing of plasma as a measure of “antioxidant power”, the FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239, 70-76
- Bertelsen, G.**, Christophersen, C., Nielsen, H.P., Madsen, H.L., Stadel, P.(1995). Chromatographic isolation of antioxidants guided by a methyl linoleate assay. *J Agric Food Chem.* 43, 1272–1275
- Beutner, B.** (2011). Μπαχαρικά από τον κήπο στην κουζίνα. Καλλιέργεια, Συγκομιδή, Χρήση και θεραπευτική αξία. Κεφ. Τα μπαχαρικά 37-38 Εκδόσεις ΨΥΧΑΛΟΥ.
- Bentner, S.**, Bloedorn, B. Frixel, S., Hernadez Blanco, I, Hoffmann, T., Marfin, H-D, Mayer, B., Noack, P., Ruck C., Schmidt, M., Schueke,I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahe, W., Walsh, R. (2001). *J. SCI. Food Agric.*, 81, 559
- Bishov, S. J.**, Masuoka, Y., Kapsalis, J.G.(1977) Antioxidant effect of spices, herbs and protein hydrolyzates in freeze-dried model systems: Synergistic action with synthetic phenolic antioxidants. *J Food Process Preserv.* 1, 153–166
- Bordia T,** Mohammed N, Thomson M, Ali M. (1996). An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids* 54: 183–186
- Bors, W.**, Michel, C., Saran, M. (1984). Inhibition of bleaching of the carotenoid crocin, a rapid test for quantity antioxidant activity *Biochem, Biophys. Acta.* 796, 312-319
- Brand-Williams, W.**, Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical

method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30

Bubonja-Souje, M., Giacometti, J., Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisteria activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food chemistry*. 127, 1821-1827

Bult, H., Herman, A.G., Rampart, M. (1985). Modification of endotoxin induced haemodynamic and hematological changes in the rabbit by methylpendnisome, F(ab) fragnants and rosmarinic acid. *Br. J. Pharmacol.* 84, 317-327

Burda, S., Oleszek, W. (2011). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 49 (6), 2774-2779

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in Food-a-review. *International journal of Food Microbiology* 94, 223-253

Burton, G.W., Ingold, K.U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. The autoxidation of vitamin E and related chainbreaking antioxidants in vitro. *J. An. Chem. Soc.* 103, 6472-6477

Cai, Y.Z., Sun, m., Ying, J., Corhe, H. (2004). Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 (26), 7884-7890

Cai, L., Wu, C.D. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. *Journal of Natural Products* 59 (10), pp 987-990

Cao, G.H., Alessio, H.M., Catler, R.G. (1993). Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants. *Free radical Biol. Med.* 14 (3) 303-311

Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D., Riley, T.V. (1995a). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35, 421–424

Cao, G., Sofie, E. Prior, R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free radical biology and Medicine*, 32 (5), 749-760

- Carneseccchia, S.**, Bras-Gonc, R., Bradaiac, A., et al. (2004). Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett* 215: 53–59
- Carvalho, T.C.**, Simao, M.R., Ambrosio, S.R., Furtado, N.A., Veneziani, R.C., Heleno, V.C., Da Costa, F.B., Gomes, B.P., Souza, M.G., Borges dos Reis, E. et al. (2011). Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. *Molecules*, 16, 543-51
- Cassidy, A.**, Hanley, B., Lamuela- Raventow, R M (2000) isoflavones lighans and Stilbenes Origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of Science of Food and Agriculture* 80 (7), 1044-1062
- Cavalieri, E.**, Mariotto, S., Fabrizi, C., et al. (2004.) *a*-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 589–594
- Celiktas, O.Y.**, Kocabas, H.E.E., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 100, 553-559
- Chaieb, K.**, Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., Bakhroof, A. (2011). Antibacterial lactivity of thymoquinone, an active principle of *Nigella Sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BNC complementary and Alternative Medicine* 11:29
- Chang, S.**, Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O.A.L., Huang, C.L. (1977). Natural antioxidants from rosemary and sage. *J. Food Sci.* 1977, 42, 1102–1106
- Chatzopoulou, A.**, Karioti, A., Gousiadou, C., Vivancos, V.L., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Skaltsa, H. (2010). Respides and Other polar constituents from *Origanum dictamus* L. and their in vitro Antimicrobial Activity in clinical Strains. *J. Agric Food Chem* 58, 6064-6068
- Cheng, I.F.**, Breen, K (2000). On the ability of four flavonoids, baicilein, lutrolin, karingenin and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex biometals. 13 (1). 77-83
- Chun, O.K.**, Kim, D.O., Lee, C.V. (2003). Superoxide radical scavenging activity of the Major polyphenols in presh plums. *J. Agric Food Chen.* 51 927): 8067-8072

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2000.) The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170–175

Croft, K.D. (1998.)The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids.*Ann NY Acad Sci* 1998; 854: 435–442

Cuvelier, M., et al., (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAOCS* vol. 73:5, pp. 645-650.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Volume 26, Issue 5, p 343-356

Daferrera, D. J., Basil, N., Ziogas, M., Polissiou, G.(2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2576-2581

Darsham, S., Doreswamug, R. (2004). Patented anti-inflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother. Res.* 18, 343-357

Daugherty, A., Roselaar, S. (1995). Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: insights from pharmacological studies. *Cardiovasc Res* 29: 297–231

De angelis, 2001. Brain tumors. *N. Engl J. Med* 344:114-123

Deans, S.G., Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5, 165– 180

Deans, S.G., Svoboda, K.P. (1989). Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *Journal of Horticulture Science* 64, 205–210

Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., Carvalho, J.E., (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Ethnopharmacol.* 69, 57–62

Ding, M., Feng, R., Wang, S.Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B.-H., Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, Exhibits

Chemopreventive and Chemotherapeutic activity. The journal of Biological Chemistry. Vol. 281, No 25, pp 17359-17368

Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R., (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J. Agric. Food Chem. 52, 762–770

Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2004). Fe III reductive and free radical-scavenging activity properties of summer savory (*Satureja hortensis*) extract and sub fractions. Food chemistry. Volume 88, issue, pp: 193-199

Dorman, H. J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen. (2003). Characterization of the antioxidant properties of de-oderised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. Food chemistry 83,255-262

Douglas Jr, A.J., Castaneda-Acosta , J., Banin, G.C., Price, K.L, Fischer, N.H., Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxyl radicals scavenging capacity of flavonoids: Structure – activity relationships. Journal of Natural Products, 63, 327-331

Edris, A.E.(2007). Pharmacentical and Therapentic Potentials of Essential oils and their invidual volatile Constituents: A Review. Phytother Res. 21, 308-323

Elson, C. (1995). Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J Nutr* 125: 1666S–1672S

Faleiro, L., Miguel, G.M., Guerrero, C.A.C., & Brito, J.M.C. (1999). Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L) L. ssp. *mastichina* and *Thymus albicans*. In: Proceedings of the II WOCMAP congress on medicinal and aromatic plants, Part 2: Pharmacognosy, pharmacology, phytomedicine, toxicology

Falleh, H., Trabelsi, N., Bonenfant-Magne, M., Le Floch, G., Abdelly, C., Magne, C., Ksouri, R., (2013). Polyphenol content and biological activities of Mesembryanthemum edule organs after fractionation. Industrial Crops and Products. 42, 145-152

Ferreira, E.S.B., Hulme, A.N., McNab, H., Quye, A. (2004), The natural constituents of historical textile dyes. Chem. Soc. Rev, 33, 329-336

Fitzgerald, D. (2001). Vascular biology of thrombosis. The role of platelet–vessel wall adhesion. *Neurology* 57: S1–S4

- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927).** Tyrosine and tryptophan determination proteins. *J. Biol. Chem.* 73,627
- Foti, M ., Piatelli, m., Baratta, M. Z., Ruberto, G. (1996).** Flavonoids, Coumarins, and cinhanic acids as antioxidants in a micellar system: structure activity relationship. *Journal of science of Food and Agriculture*, 44(2), 497-501
- Franconeri, S. (2000).** Αρωματικά φυτά. Είδη- Καλλιέργεια- Χρήση. Κεφ. Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, 66-67 Εκδόσεις ΨΥΧΑΛΟΥ
- Fanatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Irva, Y., (2004).** Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plant against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology* 48, 251–261
- Gao, X.M., XU, Z. M.Li, Z.W. (2000).** Traditional Chinese Medicines. People’s Health Publishing House, Beijing.
- Gao, Z. Huang, K., Yang, X., Xu, H. (1999).** Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 472, 643-650
- Gerhard, U., Schröter, A. (1983).** Rosmarinic acid – an antioxidant occurring naturally in herbs. *Fleischwirtschaft*. 63, 1628–1630
- Gergis, V., Spiliotis, V., Poulos, C. (1990).** Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. *Pharmazie* 45, 70
- Ghost, P., Fenner, G. (1999).** Improved method for Gas Chromatography Analysis of Genistein and Daidzein from Soybean (*Glycine max*) seeds. *J. Agric. Food Chem*, 47 (9), pp 3455-3456
- Goncalves , S., Gomes, D., Costa, P., Romano, A. (2012).** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 43, 465-471
- Graca-Miguel, M. (2010).** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review
- Grassmann, J., Hippeli, S., Vollmann, R., Elstner, E. (2003).** Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *J Agric Food Chem* 51: 7576–7582

Grassmann, J., Hippeli, S., Spitzenberger, R., Elstner, F. (2005). The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and beta-carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine* 12: 416–423

Gouveia, S.C., Castihlo, P.C. (2013). *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products* 45, 170-181

Grieve, M. (1931) A modern herbal. London. Chapter 6 page 85

Guimaraes, R., Barros, L., Duenas, M., Calhelha, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry* 136, 718-725

Gulluce, M., Sokmen, M., Daferrera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., Sahin, F. (2003). In vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric Food chem.* 51, 3958-3965

Gunota, Z., Wirth, J.L., Guo, W., Baumes, R.L. (2001). C-13 Norisoprenoid Aglycon Composition of Leaves and Grape Berries from Muscat of Alexandria and Shiraz Cultivars. Carotenoid-Derived Aroma compounds. *ACS Symposium series.* 802, PP. 255

Guo, X., Yue, Y., Tang, F., Wang, J., Yao, X., Sun, J. (2013). A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode. *International Journal of Mass Spectrometry* 333, 59-66

Gupta, S.R., Ravindranath, B., Seshadri, T.R., (1970). The glucosides of *Butea monosperma*. *Phytochemistry*, volume 9, Issue 10, p: 2231-2235

Gursoy, U.K., Gursoy, M., Gursoy, O.V. Cakmakci, L., Kononen, E., Uitto, V.J. (2009). Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe* 15,164-167

Gutteridge, J.M.C. Chem-Biol. Interact ,91,133

- Habtemariam, S.**(2003). *In vitro* antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperi* and *P. oligotricha*. BMC Pharmacol. 3, 1-6
- Hadacek, F., Greger, H.** (2000). Testing of antifungal natural product: methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem Anal., 11,137-147`
- Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E., Bast, A.** (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. Biochemical and Biophysical Research communications, 236, 591-593.
- Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A.R., Mohseni, M.** (2000). Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology 71, 187–192
- Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., Amri, M.** (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. Pharmacogn Mag, 6:154-8
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence. Lancet, 344: 721-724
- Heijnen, GG, Haenen G.R, Van Acher, F.A, Van der Vijgh, W.J.** (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. Toxicol in Vitro. 15 (1), 3-6
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bodilga, D.J.** (2002). Journal of Nutritional Biochemistry 13, 572-584
- Hoareau, L., Da Silve, E.J.** (1999). Medicinal plants: a re-emerging health aid. Journal of Biotechnology 2, 56–70
- Hollman, P.C.H., Van der Gaag, M., Mengelers, M.J.B, Van Trijp, J.M.P., de Vries, J.H., Katan, M.B.** (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. Free Radical Biology Medicine, 21,703-707
- Hooker, C.W., Lott, W.B., Harrich, D.**(2001) Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. J Virol, 75: 3095-104
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Rayan., C.** (2010). Characterization of Phenolic Composition in *Lamiaceae* Spices by LC-ESI-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 58, 10576–10581

- Hossain, M.A., Rahman, S.M.M.** (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Res. Int.* 44, 672–676
- Hostettman, K., Wolfender J.L., Rodriguez, S.** (1997). Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med.*, 63, 2-10
- Hou, Z., Lambert, L.D. Chin, U.V., Yang C.S** (2004). Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutat Res.* 555 (1-2) : 3-19
- Huang, Y., Fang, J., Hung, C., Wu, P., Tsai, Y.** (1999). Cyclic monoterpene extract from cardamom oil as a skin permeation enhancer for indomethacin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Biol Pharm Bull* 22: 642–646
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 1841-1856
- Huang, S.S., Zheng, R.L.** (2006). Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.* 239: 271-280
- Iragashi, k., Yoshida, T., & Suzuki, E.** (1993). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 40, 138
- Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H.** (1998). Antiallergic activities of Rabdosiin and its related compounds: Chemical and biochemical evaluations. *Bioorg Med Chem.* 6:1051-1056
- Jadhav, S. J., Ninbalkar, S. S., Kulkarni, A. D. Madhavi** (1996), *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health perspectives*, ed. .D.L. Madhavi, S.S. Deshpande and D. K. Salanke, Marcel Dekker, New York, PP.S-64
- Juergens, U., Stober, M., Vetter, H.** (1998). Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *Eur J Med Res* 3: 508–510
- Juhas, S., Bukovska, A., Cikos, S., Czikkova, S., Fabian, D., Koppel, J.** (2009). Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice. *Acta Vet Brno* 78, 121-127
- Juven, J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H.** (1994). Factors that

interact with antimicrobial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 76: 626–631

Kalpoutzakis, E., Chinou, I., Mitaku, S., Skaitsounis, A.L., Hervalá, C. (1998). Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin "Ladano" of *Cistus creticus* Subsp. *creticus*. *Nat. Prod. Lett.* 11, 173-179

Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M.(2010). A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1-7

Karioti, A., Skaltsa, B., Perdetzoglou, D. (2005). Effect of Solution Conductivity on the Volatile Constituents of *Origanum dictamnus* L. in Nutrient Film Culture. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1656-1660

Kaufman, B. P., (1999). Natural products from plants. PP 45-49. CRC. Press

Kaufman, B. P., Csehe, L.J., Warber, S., Dune, J. A., Brielmann, H. L. (1993). Natural products from plants. (pp 20-23). Crc. Press

Kelly, F.J. (1993). Free radical disorders of preterm infants *Br Med Dull.* 49: 668-678

Kendler, B. (1987). Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prevent Med* 16: 670–685

Kerry, N., Rice-Evans, C. (1999). Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *Journal of Neurochemistry*, 73, 247-253

Kim, J., Marshall, M., Wei, C. (1995). Antimicrobial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 43: 2839–2845

Kivilompolo, M., Hyotylainen, T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of *Lamiaceae* herbs. Characterization and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145. 155-164

Kivilompolo, M., Oburka, V., Hyotylainen, T. (2007). Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs *Anal Bioanal Chem*, 388: 881-887

Kontogianni, C.J., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S.,

- Stojanovic, I., Gerathanassis, I.P., Tzakos, A.G., (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry* 136, 120–129
- Kouri, G.**, Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8. 155-162
- Krishnaiah, D.**, Sarbatly, R., Bono, A., (2007). Phytochemical antioxidants for health and Medicine – a move towards nature. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1, 97–104
- Kosar, M.**, Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, volume 91, Issue 3, p: 525-533
- Kozłowska, H.**, Naczka, M. (1990). *Production Chemistry. Nutrition and Processing Technology* (F. Shahidi, Ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, P-193
- Ksouri, R.**, Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of *Tunisian halophytes*. *Comptes Rendus Biologies* 331, 865–873
- Kulicic, T.**, Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004). Analytical, nutritional and clinical methods use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 85: 633–640
- Kuzma, L.**, Rozalski, M., Walencka, E., Rozalska, B., Wysokinska, H. (2007). Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 2007, 14, 31-35
- Lagouri, V.**, Bantouna, A., Stathopoulos. (2009). A comparison of the antioxidant activity and phenolic content of Nonpolar and Polar extracts obtained from four endemic *Lamiaceae* species grown in Greece. *Journal of Food Processing and Preservation* 34, 872-886
- Lahlou, S.**, Leal-Cardoso, J., Duarte, G. (2003). Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 323–330

- Langseth, L.** (1993). From the Editor: antioxidants and diseases of the Brain. Antioxidant vitamin newsletter, 4,3
- Lattaoui, N., Tantaoui-Elaraki., A.**(1994). Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. Rivista Italiana Eppos, 13, 1319
- Lee, J., Kim, Y.S., Park, D.**(2007). Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signalling. Biochem Pharmacol, 74: 960-968
- Leung, A.Y., Foster, S.,** (1996). Encyclopaedia of Common Natural Ingredients used in Foods, Drugs, and Cosmetics, 2nd ed. Wiley, New York, pp. 465–466
- Leung, P.C., Tipton, C.L.** (1984). Ophiobolin A. A Natural Product inhibitor of calmodulin. The journal of biological chemistry, vol 259, No 5, pp 2442-2447
- Lien, E.J., Ren, S.J., Bui, H.H. Wang, R.** (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free Radical Biology and Medicine, 26 (3-4), 285-294
- Lin, Y.L. Chang, V., Kuo, Y. H., Shiao, M.S.** (2002). Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia Sarmentosa*. J. Nat Prod. 65: 745-747
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I.** (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum L.* and *in vitro* antimicrobial activity. Food chemistry 112, 77-83
- Liolios, C.C., Graikou, K., Skaltsa, E., Chinou, I.** (2010). Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review. Journal of Ethnopharmacology 131, 229-241
- Liscano, L.J., Bakkali, F., Ruiz-Larrea, M.B., Ruiz-Sanz, J.I.,** (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. Food Chem. 119, 1566–1570
- Liscovitch, M., Lavie, Y.,** 2002. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. IDrugs 5, 349–355
- Lu, Y., Foo, L.Y.** (2002). Polyphenolics of *Salvia*- A review. Phyto Chemistry. 75: 197-202
- Machado, G.D., Bettio, L.E.B., Cunha, M.P., Capra, J.C., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Rodrigues, A.L.S.** (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus*

officinalis in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuro-Psychoph.* 33, 642–650

Madigan, M.T., Martinko, J.M., & Parker, J. (1997). *Biology of microorganisms* (8th ed.). New Jersey: Prentice-Hall International Inc.. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 12th Informational Supplement, M100-S12

Madsen, H.L., Andersen, L., Christiansen, L., Brockhoff, P., Bertelsen, G., (1996). Antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in minced, cooked pork meat. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 203, 333–338

Makino T., Ono T., Muso E., Voshida H., Honda G., Sasayama S. (2000). Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial. Transplant.* 15, 1140-1145

Makino, T., Furuta, A., Fujii, H., Nakagawa, T., Wakushima, H., Saito, K., *et al* (2001). Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1206-9

Manabe, A., Nakayama, S., Sakamoto, K., (1987). Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *Japanese Journal of Pharmacology* 44, 77–84

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Jimenez, L., (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747

Merken, H.M., & Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599

Meunier, M.T., Daroux, E., Bastide, P. (1990). *Plantes Medicine phytotherapie*, 23 (4) 267

Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitosus*, *Thymus camphorates* and *Thymus mastichina*. *Food Chem* 86: 183–188

- Mihajilov-Krstev**, T., Raduovic, D., Kitic, D., Zlatkovic, B., Ristic, M., Brankovic, S. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of *satureja hortensis* L. Essential oil. *Cent. Eur. J. Biol.* 4 (3), 411-416
- Miller**, N.G., Rice-Evans, C.A., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A.(1993). A Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407-412
- Mimica-Dukic**, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med* **69**: 413–419
- Mimica-Dukic**, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *J Agric Food Chem* **52**: 2485–2489
- Mira**, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, H.M., Jennings, K.R (2002). Intetraction of flavonoids with iron and copper ions: a mechamism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* 36 (11): 1199-1208
- Moreno**, S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary exatracts linked to their polyphenol, composition. *Informa health Carc.* Vol 40, No 2, 223-231
- Miron**, T.L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibanez, E., Herrero, M. (2011). Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants
- Miski**, M., Ulubelen, a., Johanson D. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *Journal of Natural Products*, vol. 46, No 6, pp 874-875
- Moteki**, H., Hibasami, H., Yamada, Y., Katsuzaki, H., Imai, K., Komiya, T. (2002). Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. *Oncol Rep* 9: 757–760
- Mourey**, A., Canillac, N. (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13, 289– 292

Naderri, G., Asgary, S., Ani, M., Sarraf-Zadegan, N., Safari, M.. (2004). Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors. *Mol Cell Biochem* 267: 59–66

Nakatani, N., Inatani, R. (1984) Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). *Agric Biol Chem.* 1981, 45, 2385–2386

Natella, F., Nardini, M., Felice, M.D., Scaccini, C. (1999). Benzoic and Cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 47(4), 1453-1459.

Nedostorova, L., Kloucek, P., Urbanova, K., Kokoska, L., Smid, J., Urban, J., Valterova, I., Stolcova, M. (2011). Antibacterial effect of essential oil vapours against different strains of *staphylococcus aureus*, including MRSA. *Flavour Fragr. J.*26, 403-407

Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., Zhang, H.Y (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 52, (15), 4669-4674

Nevas, M., Korhonen, A., Lindstrom, M., Turkki, P., Korkeala, H. (2004). Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot* 67: 199–202

Nikoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M., 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 94–100

Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K., Berhow, M., Hasegawa, S. (1994). High-performance liquid chromatography determination of naturally occurring flavonoids in Citrus with photodiode-array detector. *Journal of Chromatography*, volume 687, Issues 1-2, p: 59-66

Ntalli, N.G., Ferrari, F., Giannakou, I., Menkissoglou-Spiroudi, U. (2010). Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek *Lamiaceae* Aromatic Plants and 13 Terpene Components *J. Agric. Food Chem.* 58, 7856-7863

O' Donovan, D.J., Fernandes, C.J (2004). Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxidant Redox Signal.* 6 (1): 169-176

Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Yoshikawa, T.(2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anti-carcinogenic effects of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin mode. *Carcinogenesis*, 25: 549-557

Oxisearch, Inc. (2004). Colorimetric, quantitative assay for total antioxidant potential (aqueous samples)

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*. *Journal Ethnopharmacology* 39, 167–170

Parnham, M.J, Kesselring, K.(1985). Rosmarinic acid. *Drugs Future*, 10: 756-757

Patil, J.R., Chidombara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K., Chetti, M.B., Patil, B.S. (2009). Bioactive compounds of Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*) Juice Induce Apoptosis in human Pancreatic cells. *J. Agric. Food. Chem*, 57 (22), pp: 10933-10942

Pellecuer, J., Jacob, M., Simeon de Buechberg, M., Allegrini, J., (1980). Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureja montana L.: Labiatae*). *Acta Horticulturae* 96,35–39

Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* 113: 1–6

Perez-Fons, L., Garzon, M.T., Micol, V. (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis. L.*) Polyphenols on membrane Phospholipid Order. *J. Agric. Food. Chem*, 58, 161-171

Peterson, M., Simmonds, M.S. (2002). Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 75: 197-202

Porto, T.S., Furtado, N.A.J.C., Heleno, V.C.G., Martins, C.H.G., da Costa, F.B., Severiano, M.E., Silva, A.N., Veneziani, R.C.S., Ambrosio, S.R.(2009). Antimicrobial *ent*-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. *Fitoterapia*, 80, 432-436

Porto, T.S., Rangel, R., Furtado, N., de Carvalho, T.C., Martins, C.H.G., Veneziani, R.C.S., Da Costa, F.B., Vinholis, A.H.C., Cunha, W.R., Heleno, V.C.G., et al (2009). Pimarane-type diterpenes: Antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules*, 14, 191-199.

Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.-J.E, Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity *Food Chemistry* 95, 664-671

- Proestos, C.,** Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M. (2005). RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of plant Extracts. Investigation of their Antioxidant Capacity and Antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1190-1195
- Proestos, C.,** Kapsokefalou, M., Komaitis M. (2007). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS after silylation. *Journal of Food Quality* 31, 402-414
- Pryor, W.A., A.,** Strickland, T., Church, D.F. (1988). Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidant in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 2224-2229
- Quik, K.L.,** Hardt, J.I., Dugan, L.L. (2000). Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *J. Neurosci. Methods* 97, 138-144
- Radulovic, N.,** Denic, M., Stojanovic-Radic, Z. (2010). Antimicrobial phenolic abietane diterpene from *Lycopus europaeus* L. (*Lamiaceae*). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 4988-4991
- Rajesh, D.,** Stenzel, R., Howard, S. (2003). Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma. *J Biol Chem* 278: 35968–35978
- Rampart, M.,** Beetens J.R., Bult, H., Herman, A.G, Parnhom, M. J., Winkelmonn, J. (1986). Complement dependent stimulation of prostacyclin biosynthesis: inhibition by rosmarinic acid. *Biochem pharmacol.* 35, 1397-1400.
- Ratty, A.K.,** Das, N.P. (1998). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 39, 69-79
- Razborsek, M.I.,** Voncina, D.B., Dolecek, V., Voncina, E. (2007). Determination of Major Phenolic Acids, Phenolic Diterpenes and Triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry
- Recio, M.C.,** Rios, J.L. (1989). Review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytoter. Res.*, 117-125
- Revinthi-Moraiti, K.,** Komaitis, M.E., Evangelatos, G., Kapoulas, V., (1985). Identification and quantitative determination of the lipids of dried *Origanum dictamnus* leaves. *Food Chemistry* 16, 15–24

- Rho**, G.R., Lee, H.S., Shin, H.J., Kim, J.Y., Sim, C.J., Shin, J. (2004). New sesterterpenes from the sponge *Smenospongia sp.* J. Nat. Prod, 67 (10): 1748-1751
- Rice-Evans**, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20 (7), 933-956
- Rigano**, D., Formisano, C., A., (2006). Antibacterial activity of flavonoids and phenyl propanoids from *Marrubium globosum* SPP. Libanoticum phytother RQ.
- Rios**, J.L., Recio, M. C., Villar, A. (1998). Screening methods for natural product with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Ethnopharmac., 23, 127-149
- Roggero**, J.P., Ragonnet, B., Coen, S. (1986). High performance Liquid Chromatography Servey on changes in Pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolishm. Am. J. Enol. Vitic, 37: 77-83
- Romani**, A., Vignolini, P., Isolani, L., Ieri, F., Heimler, D., (2006). HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops (*Brassica rapa L. Subsp. sylvestris L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 1342–1346
- Roger**, S., Witz, G., Anwar, M., Hiatt, M., Heggi, T. (2000). Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the pretern newborn. Arch pediate Adolesc Med. 154: 544-548
- Sahim**, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen M., Polissiou, M., Agar, G., Ozerg, H., (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum Vulgare spp. Vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. Food control. Volume 15, issue 7, P: 549-557
- Sahim**, F., Karaman, I., Gulluce, M., Ogutcn, H., Sengul, M., Adiguzel, A., Ozturk, S., Kotan. R. (2003). Evaluatiin of antimicrobial activities of *Satureja hortensis L.* Journal of Ethnopharmacology 87, 61-65
- Saleem**, M., Nazir, M., Shaiq Ali, M., Hussain, H., Sup Lee, Y., Riaz, N., Jabbar, A., (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. Natural Products Reports 27 (2), 238–254
- Sanbongi**, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagizawa, K., et al. (2004). Rosmarinic acid in *Perilla* extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. Clin Exp Allergy, 34: 971-977

Santos-Buelga, C., García-Viguera, C., & Tomàs-Barberà, F.A. (2003). Online Identification of Flavonoids by HPLC Coupled to Diode Array Detection. In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.). *Methods in Polyphenol Analysis* (pp. 92–127). Cambridge, U.K.: The Royal Society of Chemistry

Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzanos., Duenas, M., Gonzalez-Paramas, A.M. (2012). Natural Products Isolation, *Methods in Molecular Biology*, vol. 864. Chapter 17, pp: 427-463

Santoyo, C., Cavero, S., Jaime L., Ibanez E, Senorans, F.J., Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *rosmarinus Officinalis L*, essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68 (4), 790-795

Scott, R.P.W. (2005). *Essential oils* Great Sander House, Sedlecombe U.K. pp. 555-561

Shahidi, F, Nacz, M. (1991). Antioxidant behavior of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food chemistry Toxicology*, 29, 1-6

Shekarchi, M, Hajimehdipoor, H, Sapidnia, S, Gohari, A.R., Hamedani, M.P. (2012). Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy Magazine*. Volume 8, issue 29, 37-41

Silver, L. L., Bostian, K.A. (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents Chemother.*, 37, 377-383

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5), 1202–1205

Skibsted, H., Skibsted, A., Mikkelsen, G., Bertelsen. (1998). Lipid-derived off-flavours in meat. In: *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*. Ed. F. Shahidi, Blackie Academic & Professional, London (UK), pp. 217–256

Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other substrate and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178. *System , Free Radicical Biology & Medecine*, 24, 1355-1363

Sokmen, A. (2001). Antiviral and cytotoxic activities of extracts from the cell cultures and respective parts of some Turkish medicinal plants. *Turk. J. Biol.* 25, 343-350

- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, A. et al. (2004).** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 15: 627–634
- Soliman, K., M., & Badeaa, R.I. (2002).** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669–1675
- Sotelo-Felix J., Mantinez-Fong, D., De la Torre, P.M. (2002).** Protective effect of carnosol CCl₄-induced acute liver damage in rats. *Eur. J. Gastro enteral. Hepatol* 14, 1001-1006
- Spencer, J.P., Rice-Evans, C., Williams, R.J. (2003).** Modulation of pro-survival Ant/protein Kinase B and ERK ½ signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. *J.Biol Chem.* 278 (37): 34783-34793
- Spencer, J. P., Schroeter, H., Crosshwaite, A. J., Kuhnle, G., Williams, R. J., Rice- Evans, C. (2001).** Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic Biol. Med.* 31 (9). 1139-1146
- Souza, A.B., Martins, C.H.G., Souza, M.G.M., Furtado, N.A.J.C., Heleno, V.C.G., Sousa, J.P.B.D., Rocha, E.M.P., Bastos, J.K., Cunha, W.R., Veneziani, R.C.S., et al. (2011).** Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother. Res.* 25, 215-220
- Stavri, M., Paton, A., Skelton, B.W., Gibbons, S. (2009).** Antibacterial diterpenes from *Plectranthus ernstii*. *J. Nat. Prod.* 72, 1191-1194
- Stanner, S.A., Hughes, J., Kelly, C.N., & Buttrick, J. (2004).** A review of the epidemiological evidence for the “ antioxidant hypothesis” *Public Health Nutrition*, 7, 407-422
- Steinberg, D. (1997).** Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272: 20963–20966
- Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A., (2007),** Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 3367-3370

Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Kubo, M. (2002). Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae* Herba). *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 22: 15-22

Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, N., Mathe, G (2000). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56 (25), 200-207

Tepe, B. Sokmen, M., Akpulat, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus Sipyleus subsp. Sipyleus* Var. *thymus sipyleus subsp. Sipyleus var rosalani*. *J. Food Eng* bb: 447-454

Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., et al. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha (montbret et aucher ex benth.)* and *Salvia multicaulis (vahl)*. *Food Chemistry*, 84, 519–525

Tshikalange, T.E., Meyer, J.J.M., Hussein, A.A. (2005). Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to trap sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 96, Issue 3, pp 515-519

Tsimidou, M., Boskou, D. (1994) Antioxidant activity of essential oils from the plants of the *Lamiaceae* family. In *Spices, Herbs and Edible Fungi*, ed. G. Charalambous, pp. 273±284. Elsevier, Amsterdam

Tsimogiannis, D., Stavrakaki, M., Oreopoulou, V. (2006). Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (Supplement 1), 39–48

Ultee, A., Bennik, M., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1561–1568.

Ultee, A., Kets, W., Smid, E. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 65: 4606–4610

Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116

Van De Graaf, E., Steinhubl, S. (2001). Complications of oral antiplatelet medications. *Curr Cardiol Rep* 3: 371–379.

Van Krimpen, M.M., Binnendijk, G.P., (2001). RopadiarR as alternative for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs. Lelystad, Praktijkonderzoek Veehouderij, ISSN-252 S. 0169-3689, p. 14

Valgas, C., De Souza, S. M., Smania, E.F.A., Smania Jr, A.S. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbial.* Vol.38 No2, 369-380

Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J.(1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey P.M, Harbone, J. D. (eds). *Methods in plant biochemistry* Academic Press, London, P. 47-69

Vattem, D.A., Lin, Y.T., Labbe, R.G., & Shetty, K. (2004). Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity against select food-borne pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 81–91

Valezuela, A., Sanhueza, J., Alonso, P., Corbari, A., Nieto, S. (2004). Inhibitory action of conventional food-grade natural antioxidants and of natural antioxidants of new development on the thermal-induced oxidation of cholesterol. *Int J Food Sci Nutr* 55: 155–162

Vieira, A. (2010). A comparison of traditional anti-inflammation and anti-infection medicinal plants with current evidence from biomedical research: Results from a regional study. *Pharmacogn Res*, 2: 293-295

Velioglou, Y.S, Mazza G., Gao, L., Oomah, B.D (1998). *S. Agric. Food Chem*, 46, 4113

Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem*, 87: 307-311

- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S. (1985).** Quantitative measurement of the total peroxy radical trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.* 187 (1), 33-37
- Wendakoon, C., Sakaguchi, M. (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prot* 58: 280–283
- Wiant, C., Au, T.S., Mohd, Y., Hamimah, H., Sulaiman, M. (2005).** 16 Alpha hydroxy(-)-kauran-19-oic: An antibacterial diterpene from sweet apple (*Annona squamosa* L., Annonaceae). *Int. J. Pharmacol.* 1, 296-298
- Willershausen, B., Gruber, I., Hamm, G. (1991).** The influence of Herbal Ingredients on the Plaque Index and Bleeding Tendency of the Gingiva. *The Journal of Clinical Dendistry*, 2 (3), 75-78
- Williams, R.J., Spencer, J.P. Rice-Evans, C. (2004).** Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol. Med.* 36 (7): 838-839
- Woldemichael, G.M., Wächter, G., Singh, M.P., Maiese, W.M., Timmermann, B.N. (2003).** Antibacterial diterpenes from *Calceolaria pinifolia*. *J. Nat. Prod.* 66, 242-246
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E., Pokorny, J. (2006).** Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 776-793
- Yashi, S, Imaizumi, K., Sin, K., Sugano, M., Nonaka, G. (1994).** Identification of an active principle in essential oils and hexane-soluble fractions of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. showing triglyceride-lowering action in rats. *Food Chem Toxicol* 32: 273–278
- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nomaka, G.T., Nishioko, I. (1998).** Study on the inhibitory effects of danshi and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology*, 56 (2), 213-122
- Zaouali, Y., Bouzaine T., Boussaid, M. (2010).** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3144-3152
- Zaouali, Y., Hnia, C., Rim, T., Boussaid (2013).** Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity.

Zargari, A., (1990). Medicinal Plants, 4th ed. Tehran University Publications, Tehran, pp. 42–45

Zgorka, G., Glowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 26, 79-87

Zhao, J., Ding, H-Y., Zhao, D-G., Wang, C-M., Gao, K. (2012). Isolation, modification and cytotoxic evaluation of flavonoids from *Rhododendron hainanense* .Journal of Pharmacy and Pharmacology. 64, pp: 1785-1792

Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J Agric Food Chem. 49: 5165-5170

Zou, Z.W., Xu, L.N., Tian, J.Y. (1993). Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from radix *Salviae miltiorrhizae* (danshen). Yao Xue Xue Bao. 28: 241-245

Ελληνική βιβλιογραφία

Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Φυτολογίας. (1983). Σελ. 96, 100. Εκδοτική Αθηνών

Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάνικα. (1996). Τόμος 28, σελ. 297-298. Εκδοτικός Οργανισμός Πάπυρος

Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Β. (2009). Χημεία Φυσικών Προϊόντων. Σελ. 27-45, 63-106. Εκδόσεις Συμμετρία

Κανέλλου, Γ. (2011). Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Σελ. 5-11, 14-15

Μπαζαίος, Κ. (1999). Εκατό βότανα χίλιες θεραπείες. Μέρος 5^ο, σελ 156. Εκδόσεις διατροφή και υγεία

Μπισμπίκης, Β. (2007). Φυτολόγιο: Καλλωπιστικά φυτά για ελληνικούς κήπους. Κεφάλαιο αρωματικά φυτά, σελ. 412. Εκδόσεις Ψύχαλος

Ταραντίλης, Π. (2004). Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης, Παραλαβή, Διαχωρισμός, Απομόνωση, Καθαρισμός, Ταυτοποίηση Φυσικών προϊόντων. Αθήνα, 2004

Ταραντίλης, Π., Πολυσίου, Μ. (2008). Ενόργανη ανάλυση. Σελ. 6, 8, 23-85, 119-122

Διαδικτυακή βιβλιογραφία

David, A. (2008). Chemical released by trees can help cool planet scientists find. Scientists discover cloud-thickening chemicals in trees that could offer a new weapon in the fight against global warning. Guardian. CO.UK, 31 October 2008 16.46. www.guardian.co.uk/environment/2008/oct/31/forests-climatechange. (2 February 2013)

Higdon, J. (2005). Flavonoids. Linus Pauling Institute, Micronutrient Research for Optimum Health. Oregon State University. June 2008. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids> (2 February 2013)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

I. Πίνακες με αποτελέσματα για τις καμπύλες αναφοράς τους

Πίνακας 1 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα θρουμπιού

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. %παρεμπόδιση
60	94,76
48	92,92
40	83,68
36	83,45
32	73,75
24	57,74
20	48,04
16	37,49
13	29,71
10	25,79
0	0

Πίνακας 2 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα δίκταμου

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. %παρεμπόδιση
200	93,6
100	93,29
73,3	87,95
60	71,19
55	61,75
50	54,88
45	51,29
40	45,2
32	39,66
24	29,66
20	25,68
16	21,7
0	0

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου

Συγκέντρωση (μg/ml)	M.O. % παρεμπόδιση
40	94,61
30	93,09
24	81,36
20	67,93
16	55,59
13	44,37
12	42,76
10	36,52
8	30,46
6	25,26
0	0

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα δεντρολίβανου

Συγκέντρωση (μg/ml)	M.O. % παρεμπόδιση
300	94,89
200	93,37
160	85,06
120	60,9
100	50,99
50	28,58
20	16,31
0	0

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα δίκταμου

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. % παρεμπόδιση
800	81,86
600	63,35
500	56,15
400	47,49
300	34,55
200	33,27
100	22,88
50	13,86
20	8,29
0	0

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα θρουμπιού

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. % παρεμπόδιση
480	71,54
320	50,66
240	39,04
192	30,88
160	21,02
80	17,93
0	0

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα δίκταμου

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. % παρεμπόδιση
600	60,83
450	53,52
400	49,52
350	45,6
300	38,64
250	35,6
200	28,55
100	14,71
50	8,01
0	0

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα δεντρολίβανου

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. % παρεμπόδιση
200	95,13
160	79,98
120	61,36
100	52,31
80	40,64
50	26,11
45	23,15
40	21,15
20	11,4
0	0

Πίνακας 9 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα θρουμπιού

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μ.Ο. %παρεμπόδιση
350	89,56
300	92,27
200	74,78
150	54,49
125	40,39
100	33,33
80	28,31
60	22,22
50	16,91
30	12,27
0	0

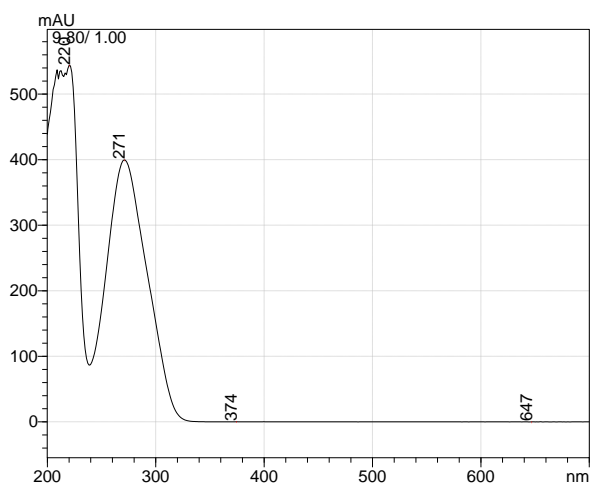
Πίνακας 10 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με Folin-Ciocalteu

Συγκέντρωση (mg καφεϊκού οξέος / mL)	Μ.Ο. Απορρόφηση
1,2	1,349
1	1,134
0,8	0,908
0,6	0,685
0,4	0,426
0,2	0,209
0	0

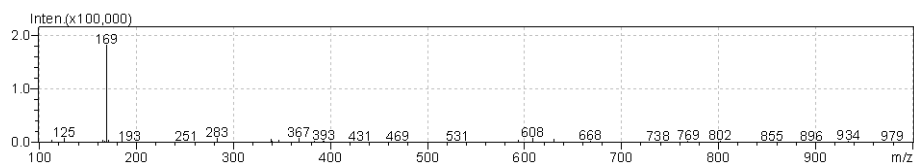
Πίνακας 11 : Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για το Trolox

συγκέντρωση (μM)	Μ.Ο % παρεμπόδιση
40	84,24
30	68,92
25,3	55,41
18	38,18
12	23,98
8	13,77
5	8,48
0	0

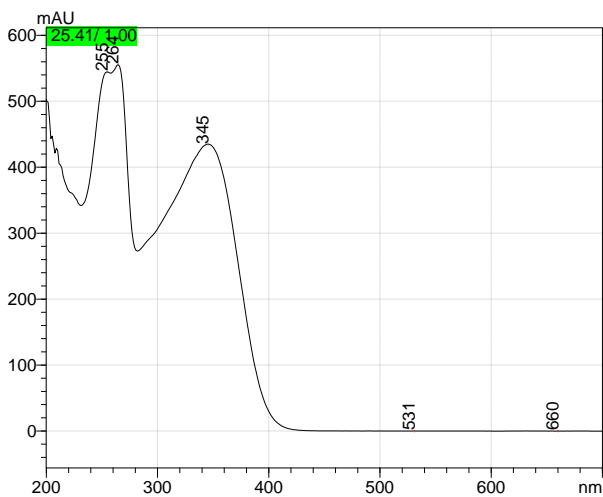
II. Φάσματα πρότυπων ουσιών για την ανάλυση με LC-MS



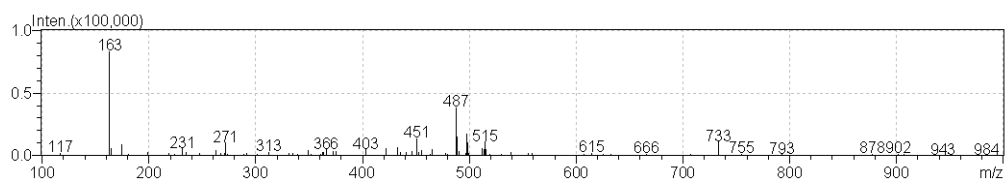
Σχήμα 1α : Φάσμα UV-Vis του γαλλικού οξέος



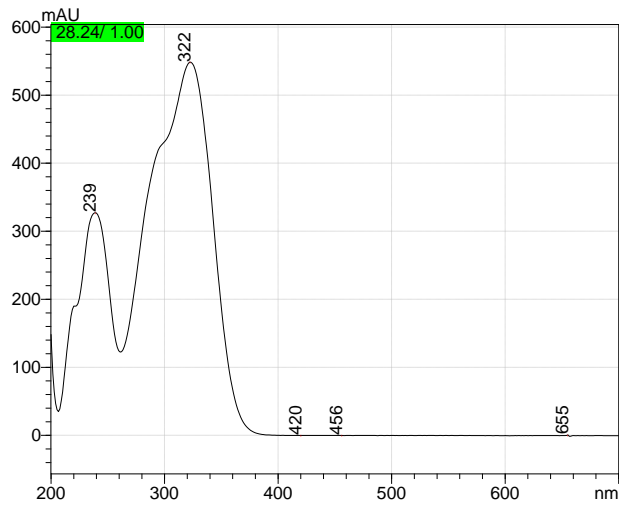
Σχήμα 1β : Φάσμα MS του γαλλικού οξέος



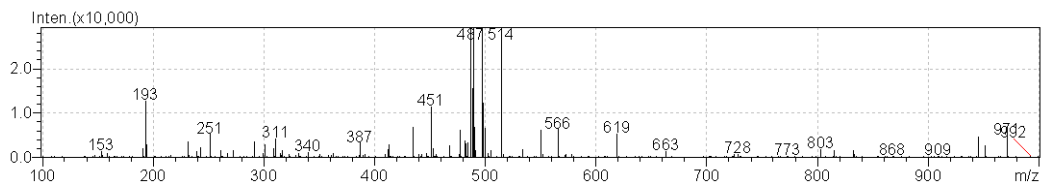
Σχήμα 2α : Φάσμα UV-Vis του α -3,4-δι-O-γαλλοκζίτη



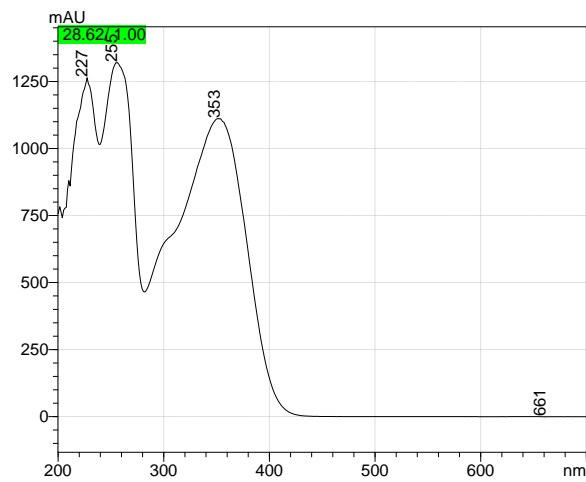
Σχήμα 2β : Φάσμα MS του α -3,4-δι-O-γαλλοκζίτη



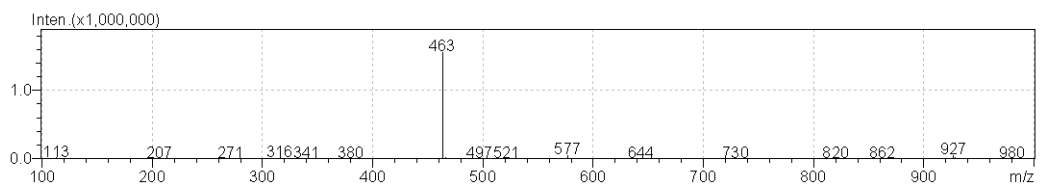
Σχήμα 3α : Φάσμα UV-Vis του φερουλικού οξέος



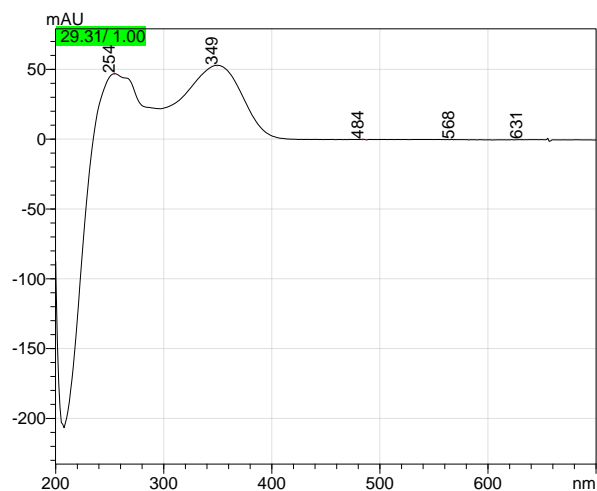
Σχήμα 3β : Φάσμα MS του φερουλικού οξέος



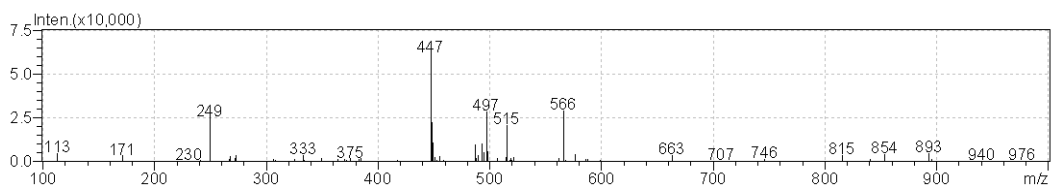
Σχήμα 4α : Φάσμα UV-Vis του μυρικετίνης-3-0-ραμνοσίτη



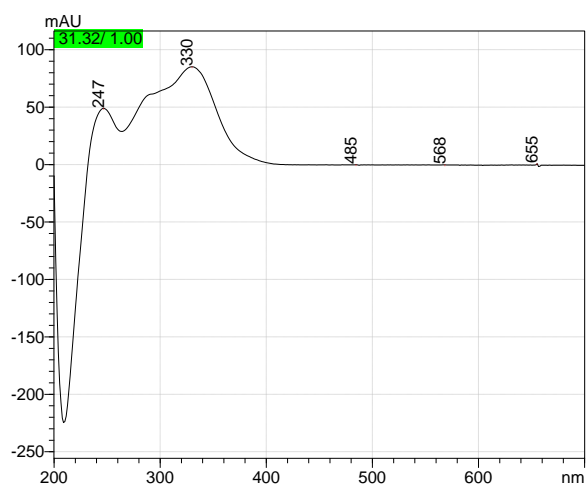
Σχήμα 4β : Φάσμα MS του μυρικετίνης-3-0-ραμνοσίτη



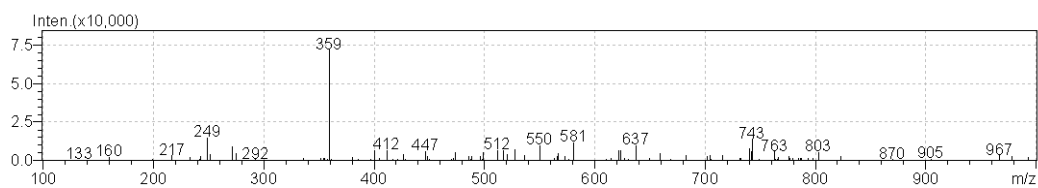
Σχήμα 5α : Φάσμα UV-Vis του λουτεολίνης-7-Ο-γλυκοζίτη



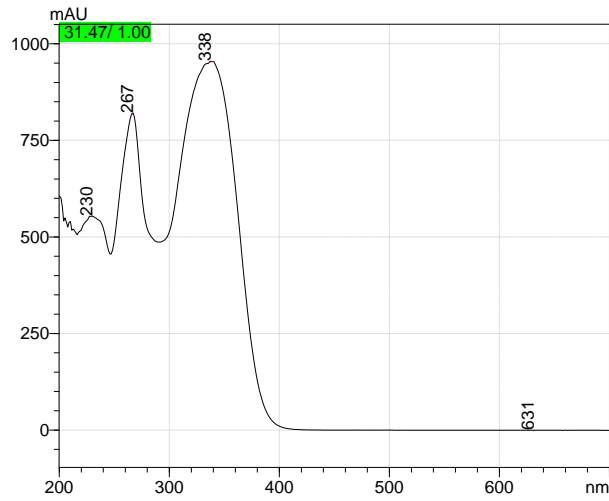
Σχήμα 5β : Φάσμα MS του λουτεολίνης-7-Ο-γλυκοζίτη



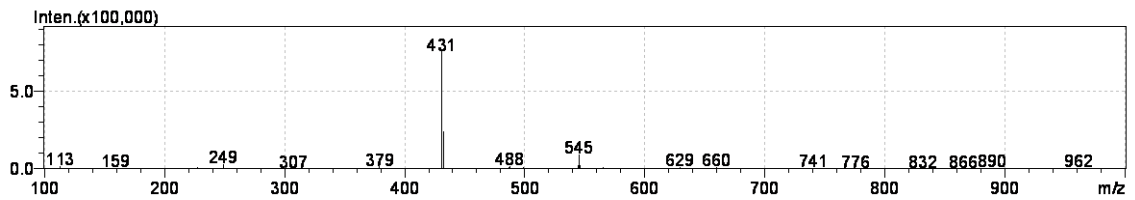
Σχήμα 6α : Φάσμα UV-Vis του ροσμαρινικού οξέος



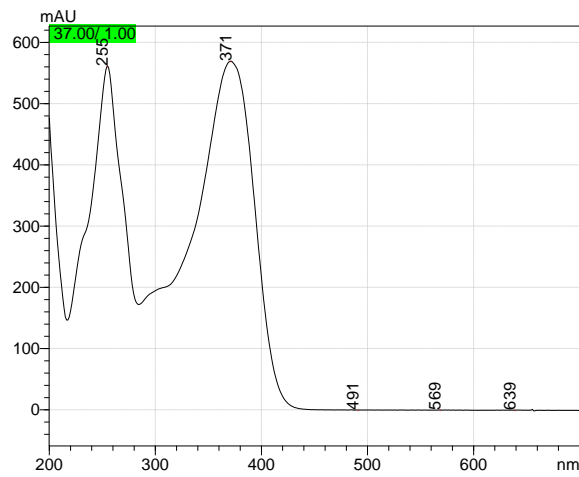
Σχήμα 6β : Φάσμα MS του ροσμαρινικού οξέος



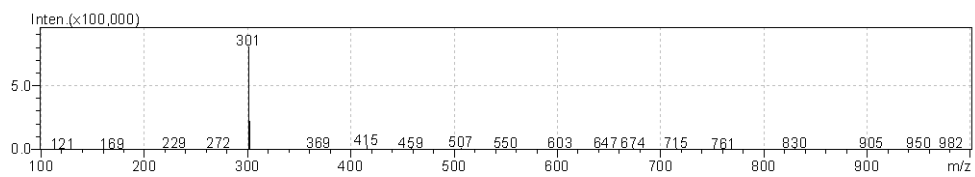
Σχήμα 7α : Φάσμα UV-Vis του απιγενίνης-7-Ο-γλυκοζίτη



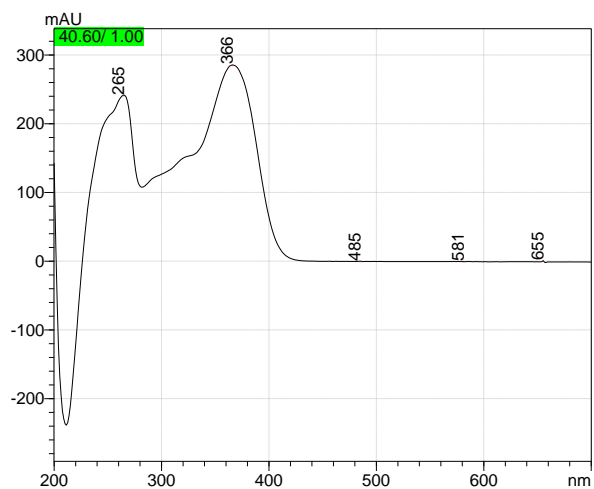
Σχήμα 7β : Φάσμα MS του απιγενίνης-7-Ο-γλυκοζίτη



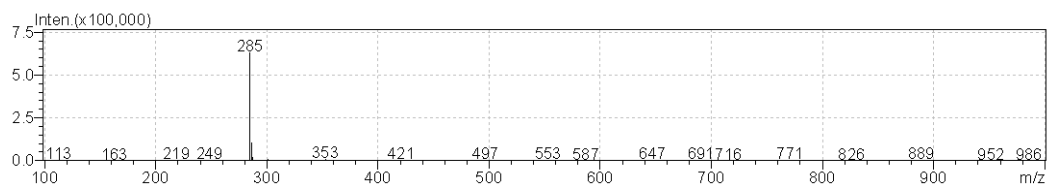
Σχήμα 8α : Φάσμα UV-Vis της κερκετίνης



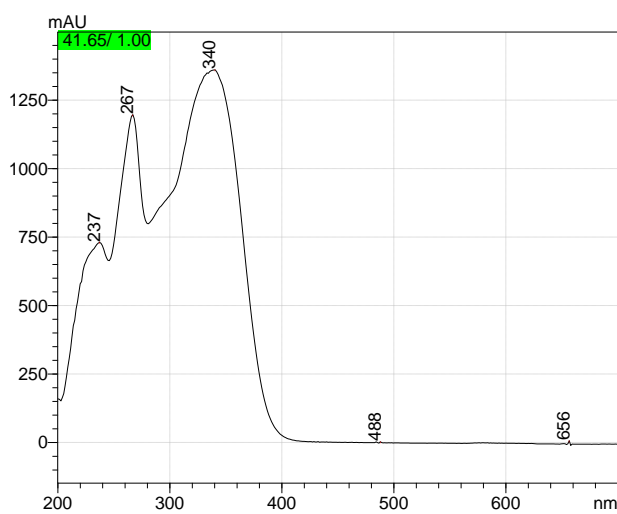
Σχήμα 8β : Φάσμα MS της κερκετίνης



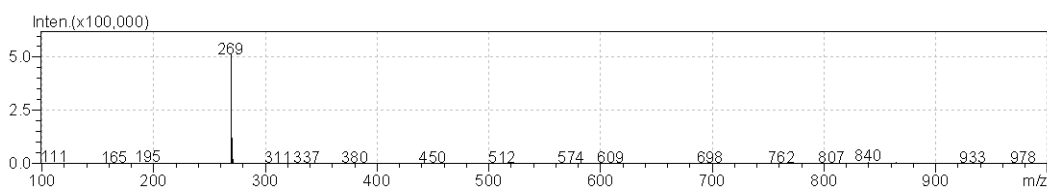
Σχήμα 9α : Φάσμα UV-Vis της καμφορόλης



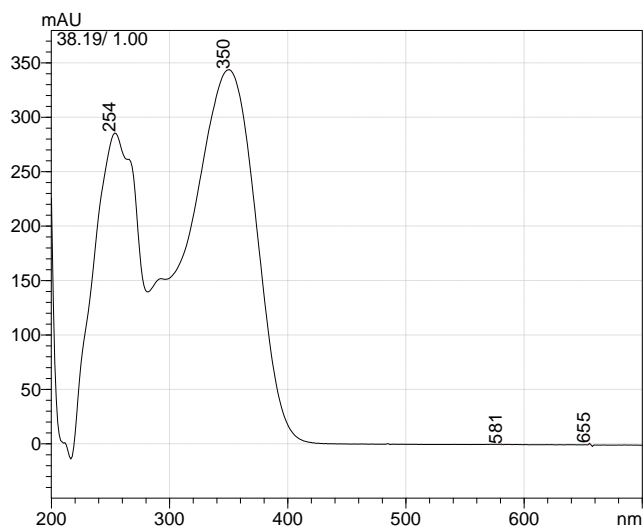
Σχήμα 9β : Φάσμα MS της καμφορόλης



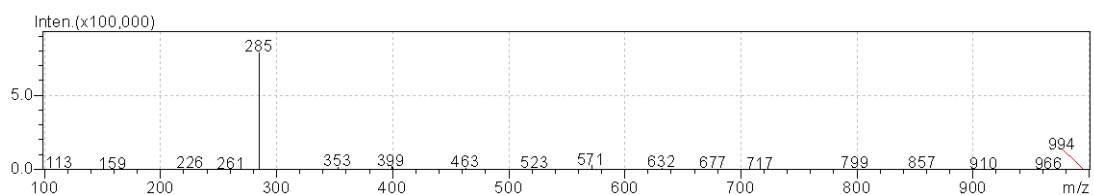
Σχήμα 10α : Φάσμα UV-Vis της απιγενίνης



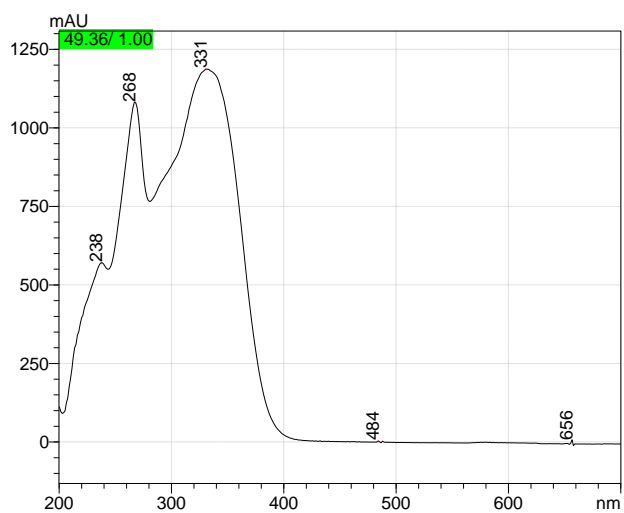
Σχήμα 10β : Φάσμα MS της απιγενίνης



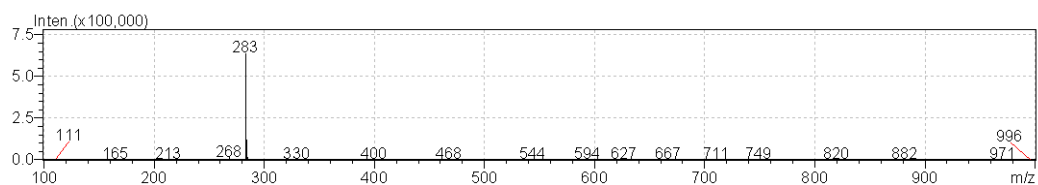
Σχήμα 11α : Φάσμα UV-Vis της λουτεολίνης



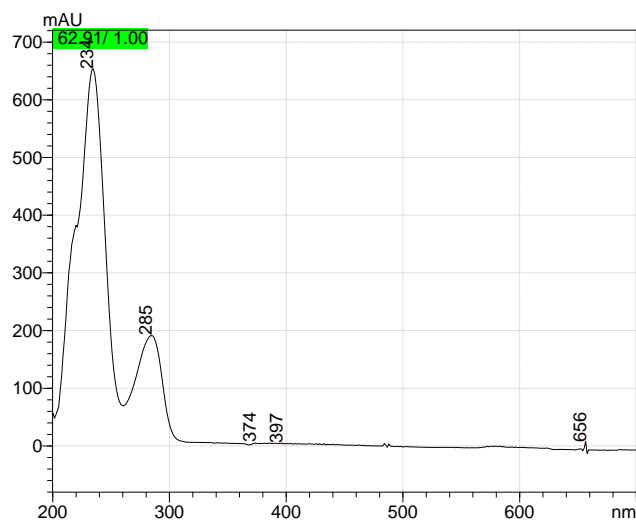
Σχήμα 11β : Φάσμα MS της λουτεολίνης



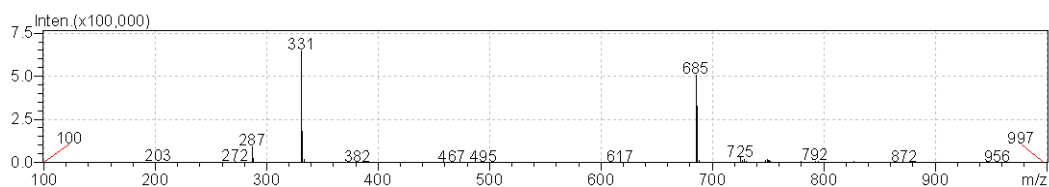
Σχήμα 12α : Φάσμα UV-Vis της ακακετίνης



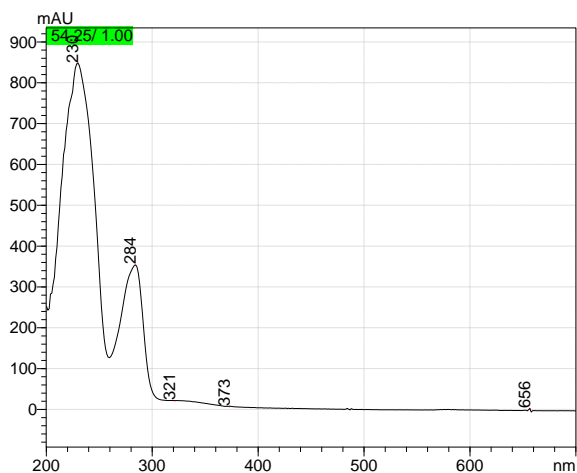
Σχήμα 12β : Φάσμα MS της ακακετίνης



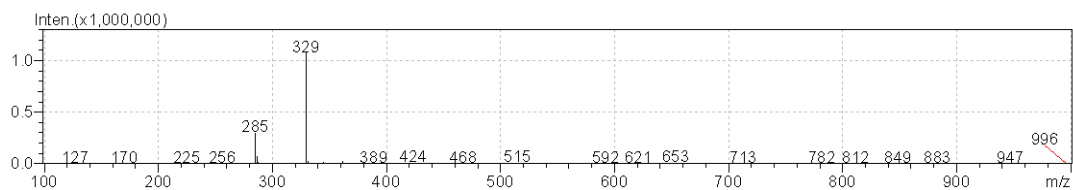
Σχήμα 13α : Φάσμα UV-Vis του καρνοσικού οξέος



Σχήμα 13β : Φάσμα MS του καρνοσικού οξέος



Σχήμα 14α : Φάσμα UV-Vis της καρνοσόλης



Σχήμα 14β : Φάσμα MS της καρνοσόλης