



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

«ΜΕΛΕΤΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ: «ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ. Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΑΜΟΜΗΛΙΟΥ, ΤΗΣ ΑΧΙΛΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ»



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΜΟΣΧΟΣ ΠΟΛΥΣΙΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΕΛΗ: ΒΙΟΛΕΤΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΕΤΑΛΛΗΝΟΥ ΜΑΡΙΑΛΕΝΑ

ΑΘΗΝΑ, 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου διατριβής κ. Μόσχο Πολυσίου, για την καθοδήγησή του και την βοήθειά του σε κάθε φάση της δημιουργίας της. Επίσης, την κ. Βιολέττα Κωνσταντίνου, πρόεδρο του Γενικού Τμήματος και τον κ. Πέτρο Ταραντίλη, αναπληρωτή καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου για το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση αυτής της εργασίας αλλά και τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχαν μέσω των μαθημάτων του μεταπτυχιακού.

Οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα κ. Ειρήνη Αναστασάκη για τη συνεχή της παρουσία καθόλη την διάρκεια του πειράματος και τη συγγραφή της διατριβής αλλά και για το ότι με βοήθησε να μάθω να εργάζομαι μεθοδικά και αποτελεσματικά.

Σημαντική ήταν η άδεια χρήσης οργάνων του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας από την καθηγήτρια κ. Ευθυμία Τσακαλίδου.

Η αρμονική συνύπαρξη και το ευχάριστο περιβάλλον που προσέφεραν τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας, αλλά και ο συμφοιτητής μου κ. Σπυρίδων Δαούσης έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αγαπημένα μου πρόσωπα, δηλαδή, την μητέρα μου, τον πατέρα μου, την γιαγιά μου αλλά και τον Νικόλα Μεταλληνό και τη Μαριλένα Σεϊρλή γιατί χωρίς την έμπρακτη υποστήριξή τους δεν θα είχα συνεχίσει στις σπουδές του μεταπτυχιακού.

Στον Νικόλα και τη Μαριλένα,

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
1. Εισαγωγή	11
1.1. Αρωματικά φυτά.....	11
1.1.1. Χαμομήλι (<i>Matricaria recutita</i> L., Asteraceae).....	11
1.1.2. Αχίλλεια (<i>Achillea millefolium</i> L., Asteraceae).....	13
1.1.3. Φασκόμηλο (<i>Salvia officinalis</i> L., Lamiaceae).....	14
1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες	16
1.2.1. Φαινολικές ενώσεις.....	17
➤ Φαινόλες και φαινολικά οξέα	17
➤ Φαιλυλπροπανοειδή	18
➤ Φλαβονοειδή.....	18
➤ Πολυμερείς φαινολικές ενώσεις	21
1.2.2. Τερπένια	22
1.3. Βιοδραστικότητα των αρωματικών φυτών	24
1.4. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα	27
1.4.1. Ελεύθερες ρίζες και τι προκαλούν	27
1.4.2. Αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτική ικανότητα	28
1.4.3. Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων	29
1.5. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα.....	31
1.5.1. Αντιμικροβιακή δράση φαινολικών ενώσεων.....	31
1.6. Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών (GC/MS)	33
1.7. Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών (LC/MS).....	35
1.8. Σκοπός της εργασίας.....	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
2.1. Φυτικό υλικό	38
2.2. Προετοιμασία φυτικού υλικού για παραλαβή εκχυλισμάτων	38
2.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης	41
2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	43
2.5. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης	44
2.6. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC/MS)	46
2.6.1. Συνθήκες ανάλυσης.....	46
2.7. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC/MS).....	47

2.7.1. Συνθήκες ανάλυσης.....	47
3. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	49
3.1. Παραλαβή εκχυλισμάτων και αποδόσεις.....	49
3.2. Ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC/MS).....	50
3.3. Ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC/MS).....	60
3.4. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης	67
3.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης	78
3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	82
4. Συμπεράσματα	87
Βιβλιογραφία.....	89
Παραρτήματα	95
Πίνακες LC/MS.....	95
Φάσματα UV και MS πρότυπων ουσιών.....	100

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτά της οικογένειας Asteraceae και πιο συγκεκριμένα, η αχίλλεια (*Achillea millefolium* L.) και το χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.) και ένα φυτό της οικογένειας Lamiaceae, το φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.).

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη των εκχυλισμάτων αυτών φυτών που παραλήφθησαν με οργανικούς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη). Στη συνέχεια, στα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH και αντιμικροβιακής τους δράσης με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ σε 11 Gram+ και 3 Gram- μικροοργανισμούς-στόχους. Τέλος, ακολούθησε ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων που συνδέονται άμεσα με τις παραπάνω δράσεις με αέρια και υγρή χρωματογραφία συνδυασμένες με φασματομέτρο μαζών.

Τα καθαρά βάρη, δηλαδή, οι αποδόσεις των φυτικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκαν μεταξύ $0,0126 \pm 0,004$ g/ 5g φυτικού υλικού (0,52%) (εξανικό εκχύλισμα αχίλλειας) και $1,040 \pm 0,042$ g/ 5g φυτικού υλικού (20,8%) (μεθανολικό εκχύλισμα φασκόμηλου).

Τα κυριότερα πτητικά συστατικά, τόσο στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα όσο και στο εξανικό εκχύλισμα, για την αχίλλεια, ήταν το καρυοφυλλένιο και η τερπινεν-4-όλη, για το χαμομήλι, ήταν τα οξείδια της βισαβολόλης (βισαβολολοξείδιο Α, βισαβολολοξείδιο Β) ενώ, για το φασκόμηλο ήταν η καμφορά, η *cis*-θουγιόνη και η ευκαλυπτόλη. Στα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα ταυτοποιήθηκαν φαινολικά συστατικά και κυρίως άγλυκα τμήματα φλαβονοειδών. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα, από την άλλη, προσδιορίστηκαν περισσότερο γλυκοζίτες φλαβονοειδών.

Στην αχίλλεια η ζώνη παρεμπόδισης κυμάνθηκε μεταξύ 0 mm και 22 mm (εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα), στο χαμομήλι μεταξύ 0 mm και 23 mm (εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα), ενώ στο φασκόμηλο, μεταξύ 0 mm και 25 mm (εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα).

Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε μέσω του IC_{50} το οποίο κυμάνθηκε από $5,0 \pm 0,8$ μg εκχυλίσματος/mL μέχρι $1060,0 \pm 2,0$ μg εκχυλίσματος/mL. Στα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα αχίλλειας και χαμομηλιού η αντιοξειδωτική δράση ήταν ελάχιστη και δεν προσδιορίστηκε IC_{50} .

Το ολικό φαιολικό περιεχόμενο των διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων εκφράστηκε σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος και κυμάνθηκε μεταξύ $13,0 \pm 0,5$ mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος (εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα χαμομηλιού) και $249,0 \pm 4,0$ mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος (εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα φασκόμηλου).

ABSTRACT

In this study, they were used two plants of Asteraceae family, yarrow (*Achillea millefolium* L.) and chamomile (*Matricaria recutita* L.) and one plant of Lamiaceae family, sage (*Salvia officinalis* L.).

The aim of this work was to study the extracts of these plants, received with organic solvents of different polarity (petroleum ether, hexane, diethyl-ether and methanol). Then, the total phenolic content of these extracts was determined with the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity of the extracts was determined using the DPPH method while, the antimicrobial activity was determined using the WDA (Wall Diffusion Assay) method in 11 Gram+ and 3 Gram- microorganisms. Finally, a qualitative determination of the components of the extracts which are directly linked to these activities was carried out through GC/MS and LC/MS.

The net weights of plant extracts ranged between $0,0126 \pm 0,004$ g/ 5g plant material (0,52%) (hexane extract of yarrow) and $1,040 \pm 0,042$ g/ 5g plant material (20,8%) (methanol extract of sage).

The main volatile components, both in petroleum ether extracts and in hexane extracts, were caryophyllene and terpinen-4-ol for yarrow, bisabolol oxides (bisabolol oxide A and bisabolol oxide B) for chamomile, and camphor, cis-thujone and eucalyptol for sage. Phenolic compounds and flavonoid aglycones were identified in the diethyl-ether extracts. On the other hand, more flavonoid glycosides were identified in the methanol extracts.

The inhibition zone diameter ranged between 0 mm and 22 mm (diethyl-ether extract) in yarrow, between 0 mm and 23 mm (diethyl-ether extract) in chamomile while, this zone ranged between 0 mm and 25 mm (petroleum ether) in sage.

The antioxidant activity was determined through IC_{50} which ranged between $5,0 \pm 0,8$ μ g extract/mL and $1060,0 \pm 2,0$ μ g extract/mL, while the antioxidant activity was very low in petroleum ether extracts in yarrow and chamomile.

The total phenolic content of different plant extracts were expressed as caffeic acid equivalents and ranged between $13,0 \pm 0,5$ mg caffeic acid/g extract (petroleum ether extract of chamomile) and $249,0 \pm 4,0$ mg caffeic acid/g extract (diethyl-ether extract of sage).

1.Εισαγωγή

1.1. Αρωματικά φυτά

Αρωματικά θεωρούνται όλα εκείνα τα φυτά, τα οποία αναδύουν μια χαρακτηριστική οσμή οφειλόμενη στα αιθέρια έλαια που περιέχουν κάποια φυτικά μέρη τους, όπως φύλλα, άνθη, βλαστοί. Τα αρωματικά φυτά χαρακτηρίζονται και ως φαρμακευτικά ή φυτοθεραπευτικά. Τα φυτοθεραπευτικά προϊόντα έχουν αναμφισβήτητη αξία και η διάθεσή τους είναι παγκοσμίως αποδεκτή, εφ' όσον είναι διαθέσιμη η βιβλιογραφική τεκμηρίωση της θεραπευτικής τους αξίας και παρέχονται εγγυήσεις για την ταυτότητά τους και την περιεκτικότητά τους σε δραστικό συστατικό. Κατά κύριο λόγο αυτές οι δραστικές ενώσεις έχουν άμεση σχέση με τα συστατικά του αιθέριου ελαίου, καθώς και με τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών [1].

Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, διάρκεια ημέρας, υψόμετρο, φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους) στην Ελλάδα είναι τέτοιες όπου ευνοούν στο έπακρο την καλλιέργεια των περισσότερων ειδών αρωματικών φυτών εξασφαλίζοντας μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις τη μέγιστη απόδοση και την καλύτερη ποιότητα. Επιπροσθέτως, στη χώρα μας, πολλά από αυτά τα φυτά (π.χ. ρίγανη, φασκόμηλο, χαμομήλι, αχίλλεια, δίκταμος και πολλά ακόμη) αυτοφύονται και μπορούν να εντοπιστούν και σε μη καλλιεργούμενες εκτάσεις [1,2].

Η οικογένεια που περιλαμβάνει τα περισσότερα αρωματικά φυτά στην Ελλάδα είναι η Lamiaceae. Υπάρχουν όμως και άλλες σημαντικές οικογένειες αρωματικών φυτών όπως οι: Apiaceae, Asteraceae και Lauraceae. Η παρούσα μελέτη αναφέρεται σε 2 φυτά, χαμομήλι και αχίλλεια, της οικογένειας Asteraceae και ένα φυτό, φασκόμηλο, της οικογένειας Lamiaceae [3].

1.1.1. Χαμομήλι (*Matricaria recutita* L., Asteraceae)

Το χαμομήλι (εικ. 1) είναι γνωστό με την επιστημονική ονομασία *Matricaria recutita* L. ή με το συνώνυμο *Matricaria chamomilla* L. και ανήκει στην οικογένεια Asteraceae. Λέγεται επίσης και γερμανικό χαμαίμηλο. Προέρχεται από τη Νότιο Ευρώπη και καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου. Σε όλη σχεδόν την Ελλάδα αυτοφύεται σε χέρσα και καλλιεργούμενα μέρη.



Εικόνα 1. Χαμομήλι (*Matricaria chamomilla* L.)

Είναι μονοετές φυτό και μπορεί να φτάσει μέχρι και 60 εκατοστά ύψος. Οι βλαστοί είναι όρθια διακλαδισμένοι, συνήθως ανοιχτού πράσινου χρώματος, λείοι και κυκλικής διατομής. Τα φύλλα του είναι εναλλασσόμενα, λεία, πράσινου έως σκούρου πράσινου χρώματος, δίπτερα ή τρίπτερα, βελονοειδή, εντελώς άμισχα ή με κοντούς μίσχους. Το ανώτερο τμήμα του βλαστού καταλήγει συνήθως σε 1-2 ανθοκεφαλές [4,5].

Οι ανθοκεφαλές έχουν διάμετρο από 10 έως 17 mm και αποτελούνται από μια ανθοδόχη με δώδεκα έως είκοσι επάκρια άνθη σχήματος επιμήκους-ωοειδούς και πολυάριθμα επιδίσκια σωληνοειδή ανθίδια. Τα επάκρια άνθη σταδιακά, αναλόγως της ωριμότητας του φυτού, γέρνουν προς τα κάτω. Το σχήμα της ανθοδόχης, όσο ωριμάζει το φυτό από κοίλο γίνεται κωνικό. Το κοίλο σχήμα της ανθοδόχης είναι ιδιότητα όπου χαρακτηρίζει το γερμανικό χαμαίμηλο έναντι του *Matricaria inodora* L. (άοσμο χαμαίμηλο), το οποίο φέρει συμπαγείς κεφαλίδες και χρησιμοποιείται ως παράγων νοθεύσεως της δρόγης [1,5]. Οι ανθοκεφαλές όταν συνθλίβονται έχουν ένα φρουτώδες άρωμα το οποίο θυμίζει το άρωμα του μήλου εξ' ου και το όνομά του (έδαφος ("χαμαι" + μήλο). Μερικές φορές και τα φύλλα που συνθλίβονται είναι το ίδιο αρωματικά με τις ανθοκεφαλές. Το ριζικό του σύστημα είναι ινώδες [5].

Το γερμανικό χαμαίμηλο χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φυτοθεραπεία για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων [1]. Για αιώνες χρησιμοποιούνταν ως αντιφλεγμονώδες, αντιοξειδωτικό, ήπιο στυπτικό και γενικότερα ως ίαμα [6]. Πρώτος ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της ιατρικής ήταν αυτός που ανέφερε τις ευεργετικές του ιδιότητες [7]. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πληγών, ελκών, εκζεμάτων, ουρικής αρθρίτιδας (ποδάγρας), διάφορων ερεθισμών του δέρματος, μολώπων, εγκαυμάτων, νευραλγίας, ισχιαλγίας, ρευματικών πόνων, αιμορροΐδων,

μαστίτιδας και άλλων ασθενειών. Εξωτερικά, έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία παρατρίμματος (ερεθιστική δερματίτιδα από την πάνα), ανεμοβλογιάς, μολύνσεων οφθαλμών και αυτιών και ρινικών φλεγμονών. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρύτατα στη θεραπεία φλεγμονών του δέρματος και των βλεννογόνων, και για διάφορες βακτηριακές λοιμώξεις του δέρματος, της στοματικής κοιλότητας, των ούλων και της αναπνευστικής οδού [1,6].

Το χαμομήλι υπό μορφή υδατικού εκχυλίσματος έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ήπιο καταπραϋντικό οπου ηρεμεί τα νεύρα και μειώνει το άγχος. Βοηθά στη θεραπεία της υστερίας και σε προβλήματα ύπνου όπως οι εφιάλτες και η αϋπνία. Επίσης, εκτιμάται ότι το χαμομήλι λειτουργεί ως χαλαρωτικό του πεπτικού συστήματος και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων γαστρεντερικών διαταραχών, όπως ο μετεωρισμός (τυμπανισμός), η δυσπεψία, η διάρροια, η ναυτία και η τάση προς έμετο [6]. Όταν καταναλώνεται μαζί με γεύματα συμβάλλει στην πρόληψη της αύξησης της υπεργλυκαιμίας και των διαβητικών επιπλοκών [8]. Για τα παιδιά έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία κωλικών, λαρυγγίτιδας και πυρετού και θεωρείται πολύ καλό βοηθητικό ύπνου [6,8]. Για τις γυναίκες λειτουργεί ως εμμηναγωγό και τονωτικό για τη μήτρα. Τέλος, είναι αποτελεσματικό στην ανακούφιση των πόνων της αρθρίτιδας, της οσφυαλγίας, των κατακλίσεων και των κραμπών του στομάχου [6].

1.1.2. Αχίλλεια (*Achillea millefolium* L., Asteraceae)

Το φυτό Αχίλλεια, όπως και το χαμομήλι ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και είναι γνωστό με τη λατινική ονομασία *Achillea millefolium* L. Πήρε το όνομά της από την ελληνική μυθολογία και συγκεκριμένα από τον αρχαίο πολεμιστή Αχιλλέα, ο οποίος την προόριζε ως πανάκεια για τη θεραπεία των πληγών του πολέμου, τις ιδιότητές της οποίας τις είχε διδαχθεί από τον κένταυρο, Χείρων. Είναι γνωστή και ως το βότανο των στρατιωτών [9,10].



Εικόνα 2. Αχίλλεια (*Achillea millefolium* L.)

Είναι ένα πολυετές, πολύ ανθεκτικό φυτό, πόα, με ευχάριστο άρωμα, ιθαγενές στην Ευρασία. Τα φύλλα έχουν χρώμα γκριζωπό πράσινο και είναι πτεροειδή σύνθετα. Το στέλεχος κυμαίνεται από 30-90 εκατοστά ενώ οι ανθοκεφαλές έχουν χρώμα συνήθως υπόλευκο και σε μερικές περιπτώσεις ροζ [9].

Η αχίλλεια χρησιμοποιείται για την καταστολή του πόνου της έμμηνου ρύσης. Επιπροσθέτως, εκτός από καλό επουλωτικό, θεωρείται ως στυπτικό, σταματώντας την αιμορραγία, αντισηπτικό, αναστέλλοντας την ανάπτυξη και δράση βακτηρίων, αντιφλεγμονώδες και ενδεχομένως αναισθητικό. Είναι καλό εφιδρωτικό, πικρό τονωτικό που διεγείρει την πέψη, αντισπασμωδικό, αναλγητικό, τονωτικό του καρδιαγγειακού συστήματος, μειώνει την αρτηριακή πίεση και επιβραδύνει την αρρυθμία. Εξωτερικά, το φυτικό υλικό είτε νωπό είτε αποξηραμένο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κατάπλασμα ή ως έγχυμα που προορίζεται για κομπρέσες ή πλύσεις. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε αλοιφές [11].

1.1.3. Φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae)

Το φασκόμηλο ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και είναι γνωστό με τη λατινική ονομασία *Salvia officinalis* L. Εντοπίζεται σε πολλές περιοχές της Μεσογείου και της Μ. Ασίας. Είναι πολυετής, αειθαλής θάμνος και φτάνει έως 60 εκατοστά ύψος. Τα φύλλα του είναι χνουδωτά, έντονα αρωματικά φτάνουν έως 7,5 εκατοστά μήκος και έχουν χρώμα γκρι-πράσινο. Το στέλεχος είναι πράσινο ενώ, από

το δεύτερο έτος ξυλοποιείται. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, χρώματος μπλε, λιλά ή λευκό με δύο “χείλη” [12].

Το φασκόμηλο όπως και όλα τα αρωματικά φυτά έχουν ευρεία χρήση σε πολλούς τομείς. Πρώτα από όλα χρησιμοποιείται ευρέως στην κουζίνα γιατί προσδίδει εξαιρετικό και μοναδικό άρωμα στα φαγητά. Ειδικά, στη δυτική κουζίνα είναι από τα πιο δημοφιλή μαγειρικά βότανα. Επίσης, χρησιμοποιείται ως συστατικό σε καλλυντικά, σαπούνια και αρώματα. Με την επάλειψη στο δέρμα αποτελεί χρήσιμο εντομοαπωθητικό. Αποξηραμένα φύλλα στη ντουλάπα μεταξύ των ρούχων αποθαρρύνουν τον σκόρο [12].



Εικόνα 3. Φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae)



Εικόνα 4. Φύλλα του *Salvia officinalis* L.

Στο φασκόμηλο αποδίδονται και πολλές θεραπευτικές ιδιότητες. Σύγχρονες έρευνες έχουν επιβεβαιώσει την αντισηπτική, οιστρογόνο, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση του. Χρησιμοποιείται με τη μορφή εγχύματος ή αφεψήματος

σε γαργάρες για τη θεραπεία του πονόλαιμου από φλεγμονές του λάρυγγα, βρογχίτιδα κ.α. Θεωρείται καλό χωνευτικό τονωτικό και βοηθά στην πέψη των λιπαρών κρεάτων. Η οιστρογονική του δράση το καθιστά χρήσιμο φάρμακο για την ακανόνιστη έμμηνο ρύση και μειώνει τις εξάψεις και την εφίδρωση. Μεγάλη είναι η κατανάλωση φασκόμηλου και από τα διαβητικά άτομα καθώς μειώνει το σάκχαρο. Επίσης, καθιστά δυνατή τη μείωση των μυϊκών σπασμών [13].

1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Για να κατανοηθούν όμως οι χρήσεις των φαρμακευτικών φυτών και οι τρόποι που ενεργούν είναι αναγκαίο να αναφερθούν τα ενεργά τους συστατικά, δηλαδή, οι δευτερογενείς μεταβολίτες και η αποτελεσματικότητά τους. Λέγοντας δευτερογενείς μεταβολίτες εννοούνται οι οργανικές ενώσεις που παράγονται από τα φυτά χωρίς όμως να φαίνεται ότι σχετίζονται άμεσα με την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Πολλές από τις λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών παραμένουν άγνωστες, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν διευκρινιστεί αρκετές από αυτές τις λειτουργίες [14].

Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι γνωστά και ως φυσικά προϊόντα. Αυτά τα προϊόντα ωστόσο δεν άρχισαν να εξετάζονται από καθαρά ακαδημαϊκό ενδιαφέρον αλλά από την χρησιμότητά τους ως χρωστικές ουσίες, ίνες, πολυμερή, κόλλες, έλαια, κήροι, αρωματικοί παράγοντες, αρώματα και φάρμακα. Η διαρκώς αυξανόμενη εκτίμηση των πολυποίκιλων βιολογικών επιδράσεων ώθησε μια επαναξιολόγηση των πιθανών ρόλων που παίζουν αυτές οι ενώσεις στα φυτά ιδίως στο πλαίσιο των οικολογικών αλληλεπιδράσεων [14].

Πολλές από αυτές τις ενώσεις προσφέρουν σημαντικό ρόλο για την επιβίωση των φυτών. Παρέχουν προστασία από την φυτοφαγία αλλά και τις μικροβιακές μολύνσεις, λειτουργούν ως προσελκυστικά για τους επικονιαστές και για διάφορα ζώα όπου μέσω της τροφής τους συμβάλλουν και στην διασπορά σπόρων των φυτών και αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση αλληλοπάθειας [14,15].

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να διακριθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες, τις φαινολικές ενώσεις, τα τερπενοειδή και τα αλκαλοειδή. Στην παρούσα μελέτη θα γίνει λόγος για τις φαινολικές ενώσεις και τα τερπενοειδή [14].

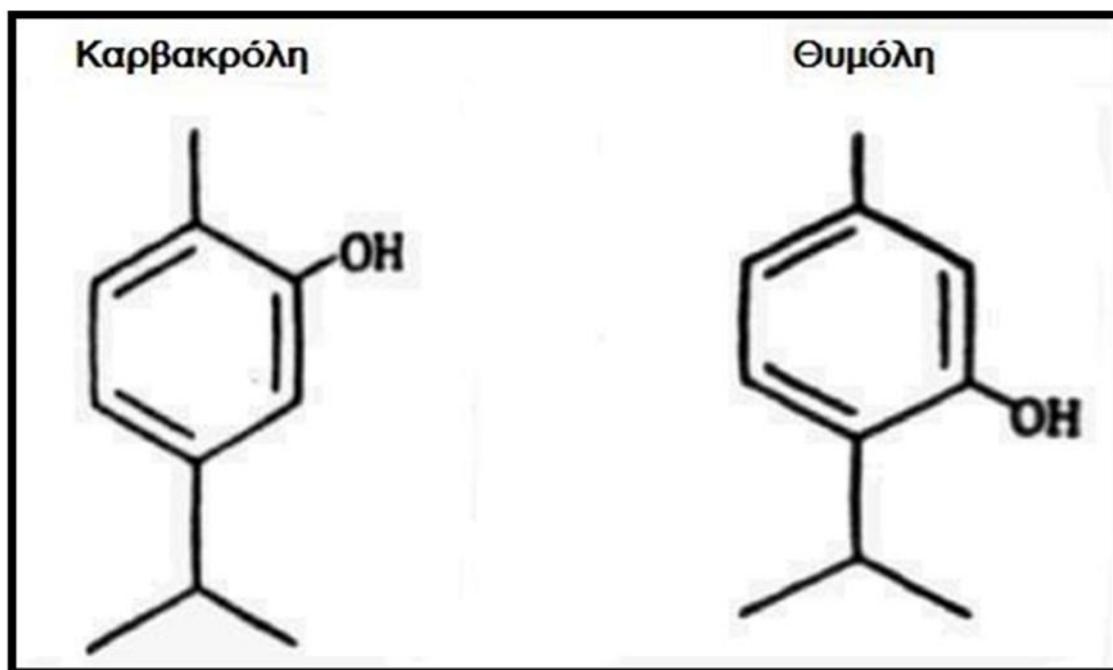
1.2.1. Φαινολικές ενώσεις

Ο όρος πολυφαινόλες περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό κυρίως φυτικών ουσιών και αναφέρεται σε υδροξυβενζολικά παράγωγα, με το υδροξύλιο ενωμένο με τον αρωματικό δακτύλιο. Πολλές φαινόλες έχουν έως και έξι υδροξύλια [16,17]. Επιπλέον, αποτελούν τους πιο ευρέως διαδεδομένους δευτερογενείς μεταβολίτες και βρίσκονται σε κάθε οικογένεια και σχεδόν σε κάθε είδος ενώ, μπορούν να περιγραφούν ως οι πιο σταθεροί βιοχημικοί χαρακτήρες [18]. Παρακάτω αναλύονται ομάδες φαινολικών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά.

➤ Φαινόλες και φαινολικά οξέα

Οι απλές φαινόλες αποτελούνται από ένα φαινολικό δακτύλιο υποκατεστημένο με αλκοολική ή αλδεϋδική ή ομάδα καρβοξυλικού οξέως. Η υδροκινόνη είναι η πιο διαδεδομένη φαινόλη ενώ, οι υπόλοιπες (π.χ. κατεχόλη, φλορογλουκινόλη, πυρογαλλόλη) συναντώνται σε πιο μικρή συχνότητα. Τα απλά φαινολικά παράγωγα χρησιμοποιούνται ευρέως και ως αντισηπτικά. Η αρμπουτίνη για παράδειγμα, η οποία εμφανίζεται στα φύλλα της κουμαριάς παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση και αποβάλλεται ταχέως από τα νεφρά [16]. Δύο γνωστές φαινόλες οι οποίες διαθέτουν έντονη βιολογική δράση είναι η θυμόλη και η καρβακρόλη οι οποίες εντοπίζονται σε πολλά αρωματικά φυτά μεταξύ αυτών και η αχίλλεια (σχήμα 1).

Τα φαινολικά οξέα συναντώνται συχνά, κυρίως σε αγγειόσπερμα φυτά. Στις δομές των επιμέρους υδροξυβενζοϊκών παρουσιάζονται παραλλαγές οι οποίες οφείλονται στον τρόπο υδροξυλίωσης και μεθυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου. Τα τέσσερα πιο κοινά είναι το π-υδροξυβενζοϊκό, βανιλινικό, συριγγικό και πρωτοκατεχικό οξύ [18]. Η ύπαρξη των φαινολικών οξέων προκύπτει βιογενετικά, από την αποικοδόμηση των φαινυλπροπανοειδών, ενώ αξίζει να σημειωθεί η φυσιολογική τους δράση η οποία είναι υπεύθυνη για το φαινόμενο της αλληλοπάθειας. Δηλαδή, φαινολικά φυτικά παράγωγα διαφεύγουν στο περιβάλλοντα χώρο του φυτού που τα εκκρίνει, εμποδίζοντας την ανάπτυξη αλλά και τη βλάστηση άλλων φυτών [16].



Σχήμα 1. Καρβακρόλη και θυμόλη

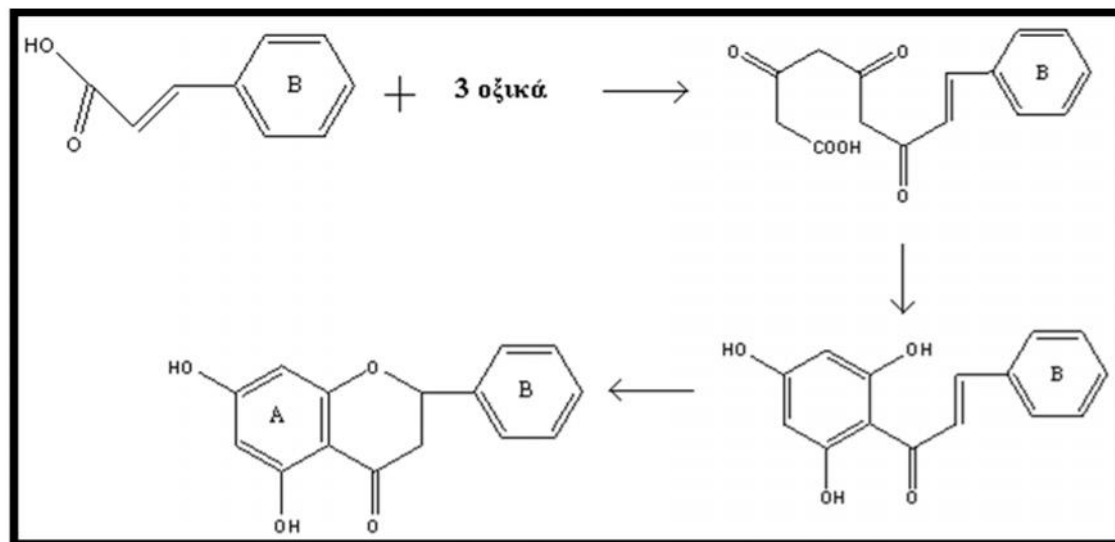
➤ **Φαινυλπροπανοειδή**

Τα φαινυλπροπανοειδή είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα στον αρωματικό τους δακτύλιο. Τα πιο διαδεδομένα είναι τα υδροξυκιναμικά οξέα, τα κυριότερα των οποίων είναι το π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναιπικό οξύ [18]. Τα συγκεκριμένα επιδρούν στην ομαλή αύξηση και ενισχύουν την ανθεκτικότητα των φυτών στις ασθένειες. Άλλα φαινυλπροπανοειδή αποτελούν οι κουμαρίνες και τα φαινυλπροπένια. Οι κουμαρίνες, όπως ουμπελιφερόνη, βρίσκονται συνήθως στα φυτά υπό μορφή γλυκοζιτικών παραγώγων. Η ουμπελιφερόνη χρησιμοποιείται σε αντηλιακά σκευάσματα ως παράγοντας απορρόφησης υπεριώδων ακτίνων. Τέλος, τα φαινυλπροπένια απαντώνται συνήθως, μαζί με τερπένια ως συστατικά αιθέριων ελαίων και συμβάλλουν στην οσμή των φυτών. Τα πιο γνωστά φαινυλπροπένια είναι η ευγενόλη (γαρυφαλέλαιο), μυριστικήνη (μοσχοκάρυδο) και σαφρόλη [16].

➤ **Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι η πολυπληθέστερη τάξη φυσικών πολυφαινολών, με περισσότερες από 3000 δομές [18]. Εκτός του χρώματος, προσδίδουν και ιδιαίτερο άρωμα αλλά και χαρακτηριστική γεύση σε τρόφιμα και ποτά φυσικής προέλευσης [16]. Υπάρχουν σε μορφή αγλυκόνων και γλυκοζιτών και αποτελούν μεγάλη οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών όπου συναντώνται συνήθως στα φυτά [19,20].

Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών χωρεί μέσω ενός συνδυασμού των οδών του σικιμικού και του ακυλοπολυμηλονικού. Κατ' αυτήν, ένα παράγωγο του κινναμωμικού οξέος το οποίο συντίθεται από το σικιμικό οξύ, αποτελεί την αρχική ένωση σε μια πολυκετιδική σύνθεση, κατά την οποία προστίθενται άλλες τρεις μονάδες οξικού. Ακολουθεί σχηματισμός δακτυλίου [16].



Σχήμα 2. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

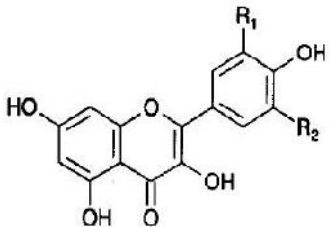
Συνεπώς, στα φλαβονοειδή ο δακτύλιος A σχηματίζεται από τα οξικά, ενώ ο δακτύλιος B προέρχεται από το σικιμικό οξύ και τα 3 άτομα άνθρακα τα οποία συνδέουν τους δακτυλίους A και B από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Διαδοχικές υδροξυλιώσεις και αναγωγές οδηγούν στα διάφορα φλαβονοειδή. Η γλυκοζιδίωση (σχηματισμός γλυκοζίτου) είναι πιθανότατα μια από τις τελευταίες αντιδράσεις κατά τη βιοσύνθεση των διάφορων φυτικών χρωστικών [1].

Τα φλαβονοειδή επομένως, μπορούν να διακριθούν σε παράγωγα της φλαβόνης και ανθοκυανίνες. Τα παράγωγα της φλαβόνης όπου απαντώνται πιο συχνά είναι οι φλαβανόλες, φλαβόνες, ισοφλαβονοειδή, φλαβανόνες και χαλκόνες [18]. Σπάνια απαντώνται μόνο τους στο φυτικό ιστό καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις είναι συνδεδεμένα με σάκχαρα, ως O-γλυκοζίτες, δηλαδή, μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς αντιδρούν με ένα ή περισσότερα σάκχαρα, σχηματίζοντας ημιακεταλικούς δεσμούς. Υπάρχει το ενδεχόμενο δημιουργίας και C- γλυκοζιτών, δηλαδή, το σάκχαρο να ενώνεται με δεσμό C-C, με τον πυρήνα του φλαβονοειδούς [16].

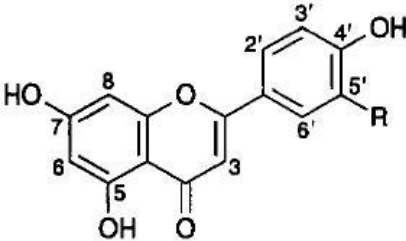
Οι φλαβόνες διαφέρουν από τις φλαβονόλες, αποκλειστικά και μόνο στην έλλειψη ενός υδροξυλίου στον C₃. Αυτή η έλλειψη όμως, είναι που επηρεάζει την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας, τη χρωματογραφική κινητικότητα και τη

χρωστική αντίδραση. Συνήθως, οι φλαβόνες βρίσκονται στα φυτά, στη θέση των φλαβονολών και ενώ, οι φλαβονόλες είναι άφθονες σε ξυλώδη αγγειόσπερμα, οι φλαβόνες είναι στις πόες. Οι συχνότερα απαντώμενες φλαβόνες (πιν. 2) είναι η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η χρυσίνη. Ενώ, οι πιο δημοφιλείς φλαβονόλες (πιν. 1) είναι οι κερκετίνη και η καμπφερόλη. Αυτές οι δύο ενώσεις, απαντώνται στα περισσότερα φυτά [18].

Πίνακας 1. Δομή των περισσότερο κοινών φλαβονολών.

Φλαβονόλες	R ₁	R ₂	Ονομασία
	OH	H	Κερκετίνη
	H	H	Καμπφερόλη
	OH	OH	Μυρισετίνη
	OCH ₃	H	Ισοραμνετίνη

Πίνακας 2. Δομή των περισσότερο κοινών φλαβονών.

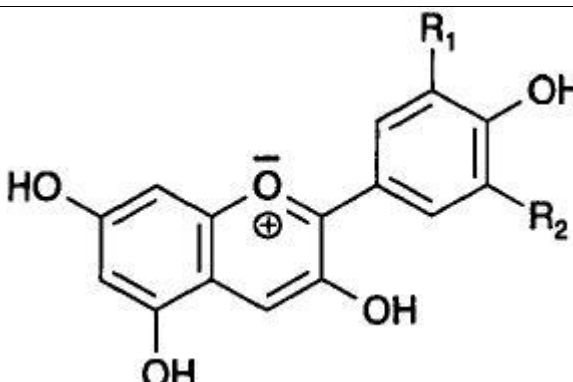
Φλαβόνες	R	Ονομασία
	H	Απιγενίνη
	OH	Λουτεολίνη

Οι φλαβανόνες προκύπτουν από τις αντίστοιχες φλαβόνες με ανόρθωση του διπλού δεσμού Δ². Είναι οπτικώς ενεργά μόρια και οι περισσότερες αριστερόστροφες (π.χ. εσπεριτίνη σε πράσινα εσπεριδοειδή, ναριγκενίνη στο φλοιό της φράπας). Οι χαλκόνες είναι φλαβονοειδή με ανοικτή ανθρακική αλυσίδα όπου δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώνονται μεταξύ τους με ένα ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα. Δεν απαντώνται συχνά. Τέλος, οι ισοφλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της ισοφλαβόνης η οποία τυγχάνει να είναι και μερικώς αλκυλιωμένη και βρίσκονται είτε ελεύθερες είτε ενωμένες ως γλυκοζίτες. Συχνότερα απαντώνται στο γένος Leguminosae και η δράση τους χαρακτηρίζεται ως εντομοκτόνο και αντιμυκητιακή [16].

Οι ανθοκυανίνες, είναι η σημαντικότερη και πιο διαδεδομένη ομάδα των χρωστικών ουσιών. Είναι υπεύθυνες και προσδίδουν το ροζ, το κόκκινο, το μοβ, το

βιολετί και το μπλε χρώμα στα αγγειόσπερμα και ο ρόλος τους από οικολογικής πλευράς είναι συνδεδεμένος με την προσέλκυση των επικονιαστών και την διασπορά σπόρων από τα φρούτοφάγα ζώα. Οι ανθοκυανίνες χημικώς βασίζονται σε μια ενιαία αρωματική δομή, αυτή της κυανιδίνης και σχετίζονται περισσότερο σε δομή με τις φλαβόνες. Οι πιο γνωστές είναι η πελαργονιδίνη, υπεύθυνη για το πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα των γερανιών, η κυανιδίνη, η οποία προσδίδει το βυσσινί ή το μπλε χρώμα στο βύσσινο και στο βατόμουρο, ενώ, η δελφινιδίνη είναι υπεύθυνη για τα χρώματα σους πανσέδες κ.α. (πιν. 3) [18].

Πίνακας 3. Δομή των περισσότερο κοινών ανθοκυανινών.

Ανθοκυανίνες	R ₁	R ₂	Ονομασία
	H	H	Πελαργονιδίνη
	H	OCH ₃	Πεονιδίνη
	H	OH	Κυανιδίνη
	OCH ₃	OCH ₃	Μαλβιδίνη
	OH	OCH ₃	Πετουνιδίνη
	OH	OH	Δελφινιδίνη

Γενικά, τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον σε ότι έχει να κάνει με τα φλαβονοειδή καθώς έχουν γίνει αντιληπτές οι ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία όπως αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οιστρογονική δράση και ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών και φαρμακολογικών δραστηριοτήτων [19,21]. Τα φλαβονοειδή δεν συντίθενται βιολογικά στο ανθρώπινο σώμα και όπως είναι φυσικό, η διατροφή μας (λαχανικά, φρούτα και αφεψήματα) λειτουργεί ως κύριος προμηθευτής φλαβονοειδών για εμάς, αν και η συνολική κατανάλωση φλαβονοειδών ανά άτομο κυμαίνεται αισθητά ανά τον κόσμο [19,22].

➤ Πολυμερείς φαινολικές ενώσεις

Οι πολυμερείς φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από τρεις ομάδες, τις λιγνίνες, τις μελανίνες και τις ταννίνες. Η λιγνίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία πολυμερές μετά από την κυτταρίνη και συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη στεγανότητα, την αντοχή και την αντίσταση στην ενζυματική αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων του ξυλώδους ιστού. Τα σημαντικότερα μονομερή που

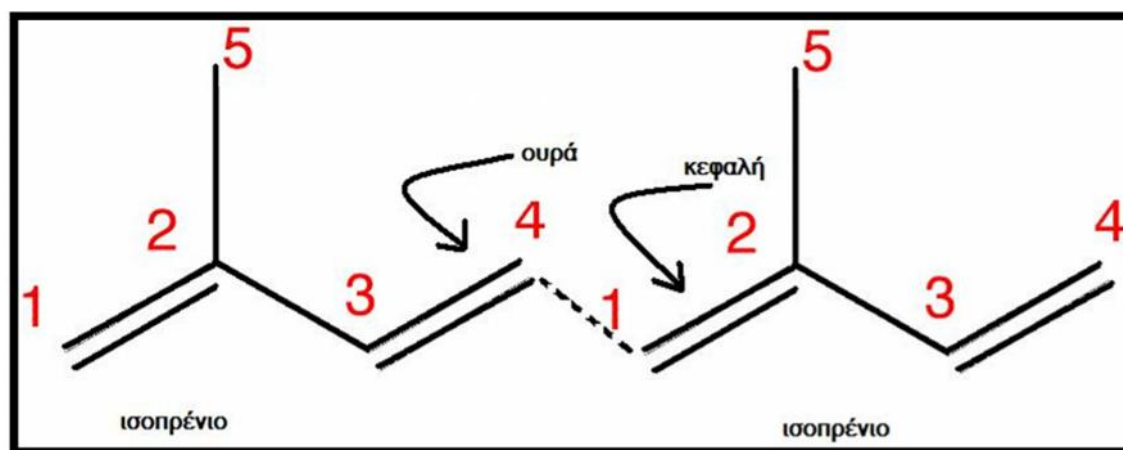
λαμβάνουν μέρος στον πολυμερισμό της είναι η παρα-κουμαρυλική αλκοόλη, η κωνυφερυλική αλκοόλη και η σιναιπυλική αλκοόλη [16,18].

Οι μελανίνες μπορούν να διακριθούν σε φυτικές και ζωικές. Οι φυτικές είναι υπεύθυνες για το μαύρο χρώμα στο φλοιό των σπόρων κάποιων φυτών ενώ, οι ζωικές είναι υπεύθυνες για το χρώμα του δέρματος των διαφόρων φυλών του ανθρώπου. Επίσης, μπορούν να εντοπιστούν σε φτερά πουλιών, τρίχωμα ζώων ακόμη και στο μελάνι των κεφαλόποδων [18].

Οι ταννίνες χωρίζονται συνήθως σε δύο ομάδες, τις υδρολυόμενες ταννίνες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες. Πρόκειται για ολιγομερείς ενώσεις με πολλαπλές δομικές μονάδες με ελεύθερες φαινολικές ομάδες. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 500 έως 20.000 και είναι διαλυτές στο νερό με εξαίρεση μερικές δομές υψηλού μοριακού βάρους. Έχουν την ικανότητα να ενώνονται με πρωτεΐνες και να σχηματίζουν αδιάλυτα ή διαλύτα σύμπλοκα ταννινών-πρωτεϊνών [18].

1.2.2. Τερπένια

Στα τερπένια εντάσσονται ενώσεις, οι δομικές μονάδες των οποίων έχουν 5 άτομα άνθρακα και οι οποίες με κατάλληλο συνδυασμό οδηγούν στον σχηματισμό σκελετών με C_5 , C_{10} , C_{15} , ... , C_{40} . Στην ουσία, είναι ισοπρενικές ομάδες ενωμένες μεταξύ τους κεφαλή με ουρά «head to tail» (σχήμα 3). Καθώς η χρήση των τερπενίων είναι ευρεία, αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές πολύ περισσότερο με εμπειρικά ονόματα παρά με την χημική τους ονομασία [14].



Σχήμα 3. Σχηματισμός τερπενίων

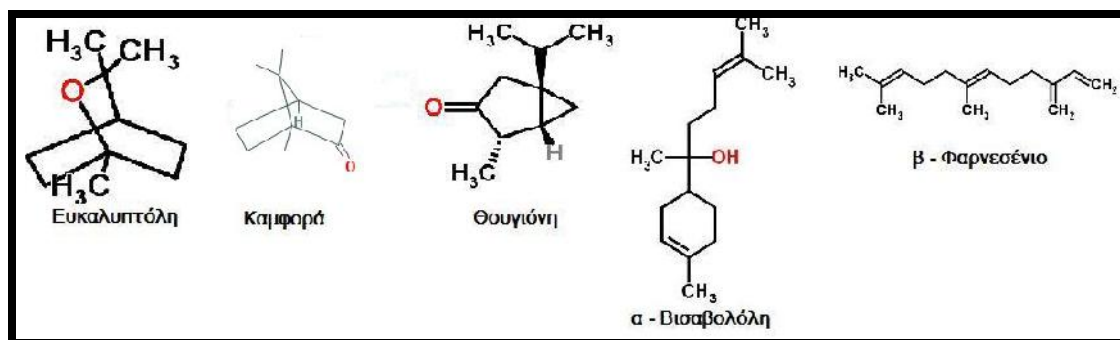
Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζεται η ταξινόμηση των τερπενίων ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα και με τις ισοπρενικές μονάδες.

Πίνακας 4. Ταξινόμηση τερπενίων

Αριθμός ατόμων C	Ισοπρενικές μονάδες	Κατηγορία
C ₁₀	2	Μονοτερπένια
C ₁₅	3	Σεσκιτερπένια
C ₂₀	4	Διτερπένια
C ₂₅	5	Σεστερτερπένια
C ₃₀	6	Τριτερπένια
C ₄₀	8	Πολυτερπένια

Στα φυτά απαντώνται κυρίως τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια, τα υψηλότερης τάξης τερπένια απαντώνται στα φυτά και τα ζώα ενώ, πολλά παρουσιάζουν σημαντική βιοδραστικότητα [16,18]. Η ευκαλυπτόλη (1,8-κινεόλη) είναι μονοτερπένιο και συναντάται, εκτός του ευκάλυπτου, σε αρωματικά φυτά όπως η αχίλλεια και το φασκόμηλο. Είναι υγρή σε θερμοκρασία δωματίου ενώ, κάτω από τους 0°C στερεοποιείται. Η καμφορά αντίθετα, η οποία και αυτή βρίσκεται στο φασκόμηλο, σε θερμοκρασία δωματίου είναι στερεή. Ένα άλλο μονοτερπένιο, η θουγιόνη, η οποία απομονώνεται κυρίως από τις πευκοβελόνες του γένους *Thuja* εντοπίζεται επίσης, στο φασκόμηλο και προκαλεί ζάλη, σπασμούς και παραλήρημα επιδρώντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα [1].

Κάποια δημοφιλή σεσκιτερπένια απαντώνται κυρίως στο χαμομήλι και η αναφορά γίνεται για την βισαβολόλη και τα οξειδιά της αλλά και το β-φαρνεσένιο, συστατικό πολλών αρωματικών φυτών εκτός του χαμομηλιού, ενώ είναι και φερομόνη συναγερμού των αφίδων, σοβαρού εχθρού πολλών καλλιεργειών. Στα αρωματικά φυτά όπου περιέχεται δρα ως αντιτροφική ουσία αποτρέποντας τα έντομα αυτά να βλάψουν τις καλλιέργειες [1].



Σχήμα 4. Δομή μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων με πλούσια βιοδραστικότητα

1.3. Βιοδραστικότητα των αρωματικών φυτών

Το χαμομήλι έχει αντιπηκτική δράση λόγω της περιεκτικότητας του σε κουμαρίνες (ουμπελιφερόνη και μεθυλικός αιθέρας της ουμπελιφερόνης). Αντιαλλεργική δράση λόγω των αζουλενίων που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο και παρεμποδίζουν την απελευθέρωση της ισταμίνης καθώς και τις αλλεργικές κρίσεις στα πειραματόζωα. Αντιφλεγμονώδης δράση λόγω της περιεκτικότητας του χαμομηλιού σε ματρικίνη, σεσκιτερπενικά παράγωγα της βισαβολόλης, *cis* – σπιροαιθέρα και φλαβονοειδή [7].

Ηρεμιστική δράση λόγω της απιγενίνης η οποία φαίνεται να ανταγωνίζεται τη φλουνιτραζεπάμη καθώς συνδέεται στον κεντρικό βενζοδιαζεπινικό υποδοχέα αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την δράση της [7]. Δράση κατά του έλκους λόγω της περιεκτικότητας σε (-) - α- βισαβολόλη η οποία φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη ελκών προκαλώντας μείωση στην παραγωγή οξέος και αύξηση στην έκκριση βλεννίνης. Επίσης, παρατηρείται αύξηση της προσταγλαδίνης E_2 (ρυθμίζει έκκριση οξέος στον στόμαχο) καθώς και μείωση λευκοτριενίων (ρυθμιστές αλλεργικών και φλεγμονωδών αντιδράσεων) [7,23].

Το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού έχει αντιμικροβιακή δράση, είναι δραστικό εναντίον τριών στελεχών του *Staphylococcus aureus* και του *Candida sp.* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της οξείας εξωτερικής ωτίτιδας (ή νόσος του κολυμβητή). Επίσης, το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού είναι ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για τη θεραπεία του έρπη των γεννητικών οργάνων λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας που παρουσιάζει [23].

Το υδατικό εκχύλισμα του χαμομηλιού (120 mg/kg/ημέρα), σε συνδυασμό με την αυξημένη περιεκτικότητα σε υδροξυπρολίνη, παρουσίασε αυξημένο ποσοστό

συρρίκνωσης του τραύματος. Το ίδιο εκχύλισμα, σε μορφή λαδιού για εντριβή, βοήθησε στην επιτάχυνση της επούλωσης πληγών που προκλήθηκαν από εγκαύματα σε πειραματόζωα. Επίσης, η τοπική χορήγησή του παρουσίασε επουλωτική ικανότητα σε πληγές από τομές. Τα πειραματόζωα όπου η θεραπεία τους περιλάμβανε χαμομήλι παρουσίασαν πολύ γρηγορότερη επούλωση των πληγών σε σχέση με τα άλλα των οποίων η θεραπεία περιλάμβανε κορτικοστεροειδή [23,24].

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί η αντικαρκινική δράση που προβάλλει το χαμομήλι. Η απιγενίνη φαίνεται να παρουσιάζει αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη όγκων. Μελέτες που χρησιμοποιούν προκλινικά μοντέλα καρκίνου του δέρματος, του προστάτη, του μαστού και των ωοθηκών έχουν δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε σχέση με την αναστολή της ανάπτυξής του [24]. Σε πρόσφατη έρευνα, εκχυλίσματα του χαμομηλιού φάνηκε ότι ελάχιστα επιδρούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη υγιών, φυσιολογικών κυττάρων ενώ, μειώνουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας τους απόπτωση [23,24].

Η αχίλλεια ανήκοντας στην ίδια οικογένεια με το χαμομήλι κάποιες κύριες ουσίες τόσο στο αιθέριο έλαιο όσο και στα φλαβονοειδή είναι κοινές και στα δύο φυτά, αυτό που διαφέρει είναι οι συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών. Στην αχίλλεια, σε εξανικά, αιθερικά και μεθανολικά εκχυλίσματα έχει εμφανιστεί αντιμικροβιακή δράση εναντίον πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Ενδεικτικά αναφέρονται οι *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, και *Salmonella enteritidis*. Το αιθέριο έλαιο της αχίλλειας παρουσιάζει επίσης αντιμικροβιακή δράση σε κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως τους *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Acetivobacter lwoffii*, και *Mycobacterium smegmatis*. Δεδομένου, ότι η αχίλλεια χρησιμοποιείται για γαστρεντερικές διαταραχές, είναι αξιοσημείωτο ότι το μεθανολικό της εκχύλισμα δρα εναντίον του *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι υπεύθυνο για το έλκος στομάχου και την γαστρίτιδα σε ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) 50 mg/mL, η οποία θα μπορούσε να ληφθεί στο στομάχι δια του στόματος [25].

Λόγω της πλούσιας περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή, σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, η αχίλλεια έχει παρουσιάσει σε απομονωμένη νήστιδα αρουραίων και σε απομονωμένο ειλεό ινδικών χοιριδίων αντισπασμωδική δράση. Αρκετές αγλυκόνες, όπως κερκετίνη, λουτεολίνη και απιγενίνη είναι υπεύθυνες κατά κύριο λόγο για την συγκεκριμένη δράση. Ο μηχανισμός αυτής της δράσης οφείλεται εν μέρει στην αναστολή δράσης των διαύλων ασβεστίου και εν μέρει στις ενδιάμεσες ανταγωνιστικές επιδράσεις [25].

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, επιστήμονες εξετάζοντας εκτός της *Achillea millefolium* και άλλα 14 είδη του ίδιου γένους χρησιμοποιώντας αρκετές διαφορετικές *in vitro* μετρήσεις σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα και λευκοκύτταρα βρήκαν ότι όλα είναι ενεργά παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική δράση [25].

Το φασκόμηλο, όπως και άλλα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, είναι γνωστό από την αρχαιότητα ότι κατέχουν σημαντική βιολογική δράση και ιδίως αντιοξειδωτική δράση. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα του φασκόμηλου εντοπίζεται κυρίως ροσμαρινικό οξύ το οποίο θεωρείται πολύ καλό αντιοξειδωτικό. Τα μονοτερπένια και τα σесκιτερπένια που εμφανίζονται στο αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου, όπως, καρβακρόλη, θυμόλη, θουγιόνη, παρουσιάζουν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση [26].

Η ευκαλυπτόλη που εντοπίζεται στο φασκόμηλο σε εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα αλλά και σε εξανικά, χρησιμοποιείται τόσο σε παστίλιες όσο και σε εισπνεόμενα σκευάσματα για την ανακούφιση των ενοχλήσεων του κρυολογήματος. Η καμφορά καταπραΰνει ρευματικούς πόνους και ανακουφίζει τον κνησμό [1]. Οι στυπτικές δραστηριότητες που έχουν οι ταννίνες του φασκόμηλου ωφελούν στην αναστολή της φλεγμονής των ούλων [27].

1.4. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα

1.4.1. Ελεύθερες ρίζες και τι προκαλούν

Η σπουδαιότητα της οξείδωσης στο σώμα και τα τρόφιμα έχει αναγνωριστεί ευρέως. Ο οξειδωτικός μεταβολισμός είναι απαραίτητος για την επιβίωση των κυττάρων. Αυτή η εξάρτηση όμως επιφέρει την παραγωγή νέων ριζών και άλλων δραστικών οξυγονούχων ενώσεων που προκαλούν οξειδωτικές μεταβολές. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για την εμπλοκή τέτοιων ενώσεων σε μια ποικιλία φυσιολογικών – *in vivo* – ρυθμιστικών συστημάτων. Όταν σχηματίζεται περίσσεια ελεύθερων ριζών μπορούν να διαπεράσουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η περοξειδάση τα οποία συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων, και διαπερνώντας τα, προκαλούν καταστροφικές και θανατηφόρες κυτταρικές αντιδράσεις (π.χ. απόπτωση) οξειδώνοντας μεμβρανικά λιπίδια, κυτταρικές πρωτεΐνες, DNA και ένζυμα οπότε έτσι, σταματά η κυτταρική αναπνοή. Επιπλέον, το τελευταίο διάστημα έχει αρχίσει να διαλευκαίνεται με ποιους τρόπους οι δραστικές οξυγονούχες ενώσεις επηρεάζουν κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς. Επίσης, η οξείδωση μπορεί να επηρεάσει τα τρόφιμα αποτελώντας μια από τις κυριότερες αιτίες χημικής αλλοίωσης με αποτέλεσμα την τάγγιση ή/και την χειροτέρευση της διατροφικής ποιότητας, του χρώματος, της γεύσης, της υφής και της ασφάλειας των τροφίμων. Οι ενέργειες αυτές μπορούν να περιοριστούν ή να καθυστερήσουν με την δράση αντιοξειδωτικών [28].

Ο μηχανισμός οξείδωσης λιποειδών από ελεύθερες ρίζες παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί (σχήμα 5). Αρχικά, η ελεύθερη ρίζα $R\cdot$ αντιδρά με το λιποειδές LH και με αυτό τον τρόπο αποσπάται ένα άτομο υδρογόνου επομένως, σχηματίζεται η ρίζα του λιποειδούς $L\cdot$ ενώ, η ίδια πλέον δεν υφίσταται (αντίδραση 1). Στη συνέχεια, η συγκεκριμένη ρίζα $L\cdot$ αντιδρά με μόρια οξυγόνου σχηματίζοντας υπεροξυ-ρίζα του λιποειδούς $LOO\cdot$ (αντίδραση 2). Η υπεροξυ-ρίζα με τη σειρά της αντιδρά με νέο μόριο λιποειδούς LH δίνοντας υπεροξυ-παράγωγο του λιποειδούς ($LOOH$). Την ίδια ώρα ξανασχηματίζεται η ρίζα του λιποειδούς $L\cdot$ (αντίδραση 3) η οποία επανέρχεται στον κύκλο και συνεχίζεται η καταστροφική οξείδωση. Η αντίδραση 4 δεν είναι τίποτα άλλο από συνδυασμός των αντιδράσεων 2 και 3 ώστε να φανεί η καταστροφή του λιποειδούς από το οξυγόνο. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται έως ότου βρεθεί κάποιο αντιοξειδωτικό (π.χ. Trolox, τοκοφερόλη κ.α.) το οποίο θα δεσμεύσει την υπεροξυ-ρίζα του λιποειδούς $LOO\cdot$ και θα σχηματίσει

αντίστοιχη ρίζα η οποία είναι σταθερή δηλαδή, δεν δύναται να δράσει όπως τη ρίζα L· ή θα μετασχηματιστεί σε μια σταθερή οξειδωμένη μορφή του αντιοξειδωτικού [28,29].

Έναρξη	$\text{LH} + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{L}\cdot + \text{RH}$	(1)
Διάδοση	$\text{L}\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{LOO}\cdot$	(2)
	$\text{LOO}\cdot + \text{LH} \longrightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$	(3)
Συνολική αντίδραση	$\text{LH} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{LOOH}$	(4)
Τερματισμός	$\text{LOO}\cdot + \text{TOH} \longrightarrow \text{LOOH} + \text{TO}\cdot$	(5)

Σχήμα 5. Μηχανισμός οξείδωσης λιποειδών από ελεύθερες ρίζες

1.4.2. Αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτική ικανότητα

Η λέξη «αντιοξειδωτικό» έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής κυρίως, την τελευταία δεκαετία λόγω, της έντονης προβολής του και όχι άδικα, από τα Μέσα Μαζικής Ενημέρωσης, και αυτό λόγω των πολλών οφελών που παρουσιάζει σε θέματα υγείας. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί μια ουσία συνθετική ή φυσική, η οποία προστίθεται ή βρίσκεται σε προϊόντα με σκοπό την παρεμπόδιση ή την καθυστέρηση της αλλοίωσής τους λόγω οξείδωσης. Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις οι οποίες εντοπίζονται στα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες με κύριο σκοπό τους την προστασία των φυτών από αβιοτικό στρες. Ωστόσο, είναι ικανά να βελτιώσουν και την γενική υγεία ενός ατόμου καταναλώνοντάς τα τακτικά [15].

Συχνά, σε λίπη και τρόφιμα που περιέχουν λιπαρές ύλες προσθέτονται αντιοξειδωτικά με κύριο σκοπό τους την επιβράδυνση της οξειδωσης ώστε να παραμείνουν τα τρόφιμα γευστικά για μεγαλύτερο χρόνο. Δεδομένου όμως, ότι οι περισσότερες τροφές φυτικής προέλευσης καταναλώνονται έπειτα από τη μηχανική επεξεργασία τους (π.χ. ξήρανση, κατάψυξη και αποθήκευση), η αντιοξειδωτική ικανότητα που εμφανίζεται ίσως διαφέρει από αυτήν στο αρχικό φυτό. Εκτός της συντήρησης των τροφίμων τα αντιοξειδωτικά κυριαρχούν και στην ανθρώπινη διατροφή λόγω των οφελών που παρουσιάζουν. Προστατεύουν τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες, που υπό διαφορετικές συνθήκες, θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη. Καρδιακές παθήσεις, καρκίνος και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Parkinson και Alzheimer) αποτελούν μόνο μερικά παραδείγματα ασθενειών οι οποίες μπορούν να προληφθούν (ή τουλάχιστον να καθυστερήσει η εμφάνισή τους) μέσω τακτικής και ισορροπημένης πρόσληψης αντιοξειδωτικών [15].

Αρκετά ανώτερα φυτά, τόσο στα φύλλα τους όσο και στους καρπούς τους περιέχουν υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η αρχική φυσιολογική λειτουργία τους είναι να παρέχουν στο φυτό προστασία από τις επιβλαβείς δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS) που σχηματίζονται π.χ. κατά την διάρκεια της φωτοσύνθεσης ή της αναπνοής. Αυτές οι ενώσεις, εκτός της ζημίας που προκαλούν στα φυτά, αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες που επιφέρουν βλάβες και γήρανση στους ζωικούς οργανισμούς. Σε αυτές τις ενώσεις εντάσσονται διάφορες ρίζες και μόρια, π.χ. υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), ρίζα του υπεροξυλίου ($\cdot OOH$), ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$), ανιονική ρίζα υπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$) [29].

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι περιβαλλοντικές θερμοκρασίες που επικρατούν κατά την διάρκεια ανάπτυξης του φυτού επηρεάζουν την φαινολική περιεκτικότητα και την αντίστοιχη αντιοξειδωτική ικανότητα διάφορων φυτών. Για να αντιμετωπιστεί το θερμικό στρες, τα φυτά καταφεύγουν σε διάφορους εναλλακτικούς μηχανισμούς, όπως, η διατήρηση της σταθερότητας των μεμβρανών.

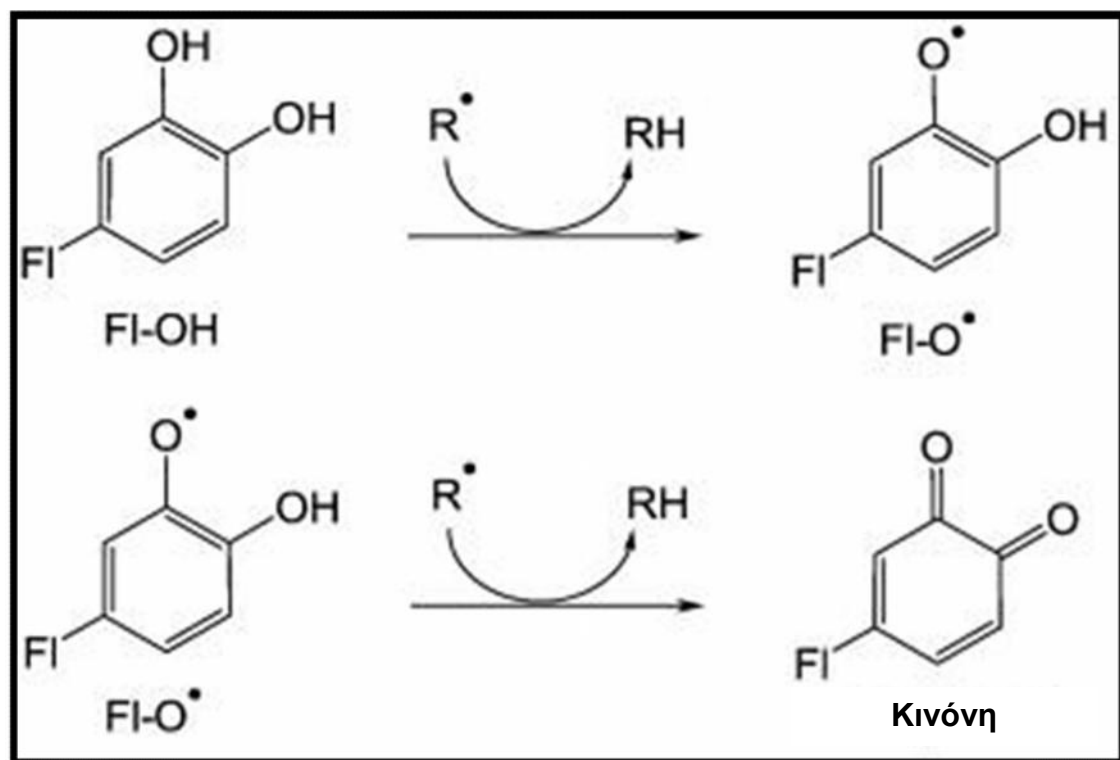
Ο ενεργός ρόλος πολλών αφεψημάτων στην πρόληψη ή τον έλεγχο ασθενειών έχει αποδοθεί τουλάχιστον εν μέρει, σε αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά λιποδιαλυτών συστατικών, όπως, οι βιταμίνες A και E, υδατοδιαλυτών συστατικών, όπως η βιταμίνη C και αρκετών φαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα, η βιταμίνη E αποτελεί τυπική αντιοξειδωτική ουσία φαινολικού χαρακτήρα. Οι φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες αδρανοποιούν τις οξυγονούχες ρίζες προσφέροντάς τους το υδρογόνο της ομάδας του φαινολικού υδροξυλίου ($-OH$), έτσι στην περίπτωση της βιταμίνης E (π.χ. TOH) σχηματίζεται μια ρίζα της βιταμίνης E ($TO\cdot$). Η ρίζα της βιταμίνης E σταθεροποιείται παρέχοντας μια κινόνη ή επανασχηματίζει την τοκοφερόλη με τη βοήθεια άλλων αναγωγικών ουσιών. Η δέσμευση των ριζών από την τοκοφερόλη τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση και προστατεύει τα γειτνιάζοντα λιποειδή από την οξείδωση [15,29].

1.4.3. Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων

Όπως έχει προαναφερθεί, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση δυσμενών συνθηκών που οδηγούν στο οξειδωτικό στρες [15].

Τα φλαβονοειδή, αλλά και άλλες φαινολικές ενώσεις, μπορούν να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες άμεσα μέσω της δωρεάς ατόμου υδρογόνου. Οι ελεύθερες ρίζες καθίστανται ανενεργές και αυτό φαίνεται στο επόμενο σχήμα (σχ. 6), όπου το $R\cdot$

είναι μια ελεύθερη ρίζα, ενώ, το FI-O $\cdot$ είναι μια φλαβονοειδή ρίζα. Η ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με μια δεύτερη ρίζα σχηματίζοντας και αποκτώντας μια σταθερή δομή κινόνης [30].



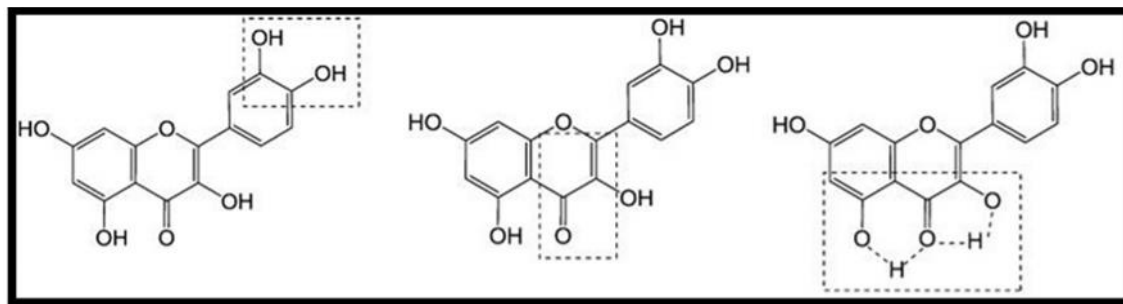
Σχήμα 6. Δέσμευση ελεύθερων ριζών από φλαβονοειδή

Στις φαινολικές ενώσεις η δέσμευση των ελεύθερων ριζών και η αντιοξειδωτική τους δράση έχει να κάνει άμεσα με τις λειτουργικές τους ομάδες και την πυρηνική τους δομή. Τόσο η διαμόρφωση όσο και ο αριθμός υδροξυλομάδων επηρεάζουν ουσιαστικά το μηχανισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Η διαμόρφωση των υδροξυλίων στον B- δακτύλιο είναι ο σημαντικότερος καθοριστικός παράγοντας της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών ενώ, η υποκατάσταση των A- και C- δακτυλίων έχει μικρή επίδραση στον ρυθμό δέσμευσης (σχήμα 7) [30, 31].

Η “in vitro” αντιοξειδωτική δράση θα μπορούσε να αυξηθεί με πολυμερισμό των μονομερών φλαβονοειδών, π.χ. προανθοκυανιδίνες, τα πολυμερή των κατεχινών είναι πολύ καλά αντιοξειδωτικά λόγω των πολλών υδροξυλομάδων στα μόριά τους. Επιπλέον, η απουσία της 3-OH ομάδας από το μόριο του φλαβονοειδούς ή το μπλοκάρισμα αυτής από ένα γλυκοζίτη μειώνει την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες [30].

Τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που απαιτούνται για την αποτελεσματική δέσμευση των ελεύθερων ριζών μπορούν να συνοψιστούν σε τρεις

ενώσεις (σχήμα 7). Στην πρώτη ένωση του σχήματος 7 στον Β- δακτύλιο βρίσκονται δυο υδροξυλομάδες σε “ορθο” θέση, για απεντοπισμό ηλεκτρονίων. Στην δεύτερη ένωση, στον C- δακτύλιο υπάρχει ένας διπλός δεσμός (2,3) καθώς και το γειτονικό οξυγόνο στην 4 θέση οπου παρέχουν απεντοπισμό ηλεκτρονίων από τον Β- δακτύλιο. Τέλος, στην τρίτη ένωση, οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 5 παρέχουν δεσμό υδρογόνου στην οξο-ομάδα [30].



Σχήμα 7. Κύρια δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών για αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών

1.5. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα

Η εξέλιξη και η εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά καθώς και η εξέλιξη νέων στελεχών παραγόντων που προκαλούν ασθένειες αποτελούν ένα αυξανόμενο πρόβλημα για πολλά χρόνια. Τα φυτά περιέχουν πολλαπλά συστατικά με αντιμικροβιακή δράση, όπως φαινόλες, κινόνες, φλαβόνες, ταννίνες, τερπενοειδή και αλκαλοειδή. Ορισμένα μάλιστα αρωματικά φυτά περιέχουν ουσίες οι οποίες εμποδίζουν την προσκόλληση του μικροβίου στον ιστό ξενιστή αποτρέποντας έτσι, το αρχικό σημείο της μόλυνσης. Επίσης, ορισμένα είναι δυνατόν να ενισχύουν την ανοσοποιητική δράση των κυττάρων. Γενικά, όλα τα αρωματικά φυτά παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση, άλλα σε υψηλότερο άλλα σε χαμηλότερο βαθμό [32].

1.5.1. Αντιμικροβιακή δράση φαινολικών ενώσεων

Η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων εντοπίζεται σε τρεις κατευθύνσεις. Στην επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα, την αύξηση της διαπερατότητάς της, είτε στην αδρανοποίηση ενζύμων, είτε στην καταστροφή του γενετικού υλικού. Ο πιο συνήθης τρόπος δραστηριότητάς τους όμως είναι η επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη και μετά ακολουθούν οι άλλοι δυο τρόποι [33].

Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν ότι η υδροξυλομάδα των φαινολικών ενώσεων ευθύνεται για αυτήν την δράση. Η παρεμποδιστική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων οφείλεται στις επιπλοκές που προκαλούνται σε ένα εύρος ενζυμικών συστημάτων τα οποία εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό και στα μονοπάτια βιοσύνθεσης των δομικών υλικών της κυτταρικής μεμβράνης. Τα σποριογόνα βακτήρια θεωρούνται πιο ευαίσθητα από τα μη σποριογόνα καθώς και τα Gram θετικά από τα αρνητικά. Παρόλα αυτά, οι αντιμικροβιακές φαινόλες παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και έτσι, παρεμποδίζεται η διάχυσή τους στο κυτταρόπλασμα προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο το εσωτερικό των κυττάρων. Επίσης, το κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών συμβάλλει δραστικά στην άμυνά τους απέναντι στη λυσιγόνο δράση των φαινολικών αντιμικροβιακών σε μικρές συγκεντρώσεις. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιμικροβιακών και των κυτταρικών μεμβρανών αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την έκταση της δραστικότητας των πρώτων. Αυτό αποτελεί καθοριστικό παράγοντα όχι μόνο για τα φυτικά εκχυλίσματα και τις φαινολικές ενώσεις αλλά και για τις βακτηριοσίνες και τα κατιονικά μικροβιακά. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεν είναι τυχαίο ότι τα φυτικά εκχυλίσματα είναι δραστικά εναντίον και των Gram αρνητικών βακτηρίων σε αντίθεση με τις βακτηριοσίνες, τα αντιβιοτικά και τα ιοντικά βακτηριοκτόνα. Τα τελευταία τα οποία είναι φορτισμένα, δυσκολεύονται να διαπεράσουν την εξώτερη μεμβράνη των Gram αρνητικών ή/και τη λιπιδιακή φάση της κυτταρικής μεμβράνης, αν είναι δε, θετικά φορτισμένα απωθούνται από την αρνητική κυτταρική μεμβράνη και είναι η δυνατότητά τους να προσανατολιστούν κατάλληλα προς και μέσα στη μεμβράνη που θα τους επιτρέψει την δημιουργία πόρου διόδου στο κυτταρόπλασμα [33].

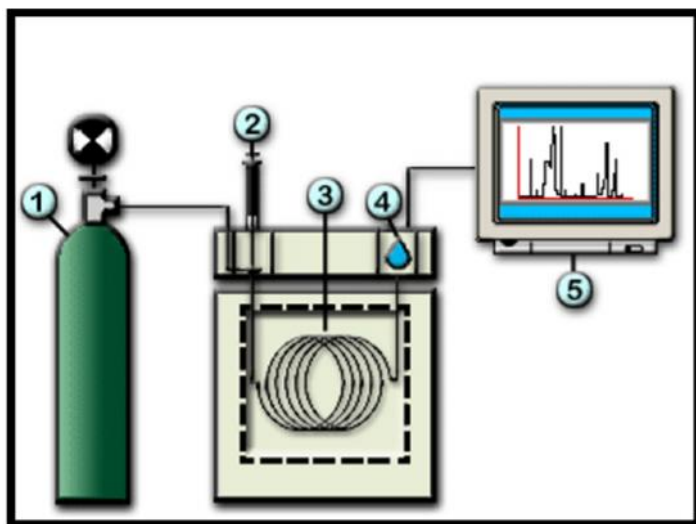
Οι φαινόλες, αντιθέτως, προκαλούν εξασθένιση ή τοπική καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την απώλεια ενδοκυτταρικού υλικού. Ειδικότερες αναφορές στην δράση των φαινολικών ουσιών επί των κυτταρικών μεμβρανών αποδίδουν την αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων στην αντίδρασή τους με τα δομικά χαρακτηριστικά των μεμβρανών και ιδιαίτερα με τις στιβάδες των λιπιδίων. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και η διόγκωση του *Pseudomonas aeruginosa*, εξαιτίας της επίδρασης φαινολικών ουσιών στα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα της μεμβράνης του. Έχει γίνει γνωστό ότι τα BHA, BHT, το p-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ όχι μόνο επιτίθενται στις κυτταρικές μεμβράνες προκαλώντας διαρροή ενδοκυτταρικού υλικού αλλά προκαλούν επιπλέον δυσλειτουργία της μεμβράνης κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, την αφομοίωση θρεπτικών υλικών από το περιβάλλον, τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και την δράση της ATPάσης. Επιστήμονες έχουν διαπιστώσει ότι

τα parabens παρεμποδίζουν την πρόσληψη σερίνης και αναστέλλουν την οξείδωση της α- φωσφορογλυκερόλης και του NADH στους ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης του *B. subtilis*. Τέλος, αναφέρεται ότι οι φαινολικές ουσίες παρεμποδίζουν την παραγωγή εντεροτοξίνης B (SEB) και αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, εμποδίζοντας την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την αφομοίωση γλυκόζης από το υλικό ανάπτυξης [33].

1.6. Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών (GC/MS)

Γενικά, η αρχή της χρωματογραφίας βασίζεται στην κατανομή των ουσιών του μίγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας κινητής και μιας στατικής, που πρακτικά δεν αναμειγνύονται. Ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στην κινητή φάση διαχωρίζονται διαδοχικά από ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στην στατική φάση. Ο διαχωρισμός τους βασίζεται κυρίως στις διαφορές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι η πολικότητα, το σημείο ζέσεως, το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού ως προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης (κινητής και στατικής) [34].

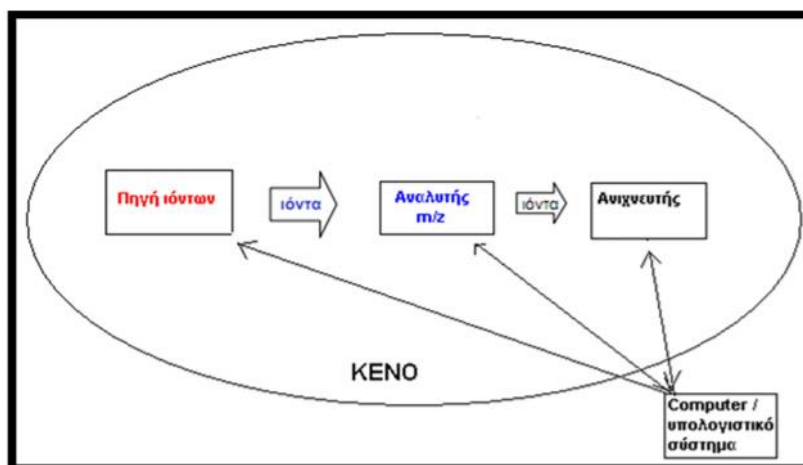
Συγκεκριμένα, η αέρια χρωματογραφία (GC) αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία πενήντα χρόνια, πρωτοπόρος στη χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (MS) ήταν ο Lipsky (1960). Η τεχνική της χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.α [34]. Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου δίνεται στην εικόνα 5:



Εικόνα 5. Διάταξη αέριου χρωματογράφου (GC)

Το φέρον αέριο όπου είναι συνήθως N, He ή Ar από τη φιάλη υψηλής πίεσης (1) μέσω ρυθμιστών παροχής οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης (2). Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης (3) και διαχωρίζονται. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Στη συνέχεια, τα κλάσματα ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή (4) και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό(5) [34].

Ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών και μπορεί να συνδεθεί άμεσα με φασματόμετρο μαζών ώστε να γίνεται και η ταυτοποίηση των συστατικών. Η αρχή λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο m/z (όπου m η μάζα και z το φορτίο του ιόντος) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται το μοριακό βάρος της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διάφορων ομάδων μεταξύ τους. Ένα φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τον θάλαμο ιοντισμού (οπού μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου), τον αναλυτή μαζών (οπού γίνεται ο διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z) και τον ανιχνευτή (Σχήμα 8) [34].



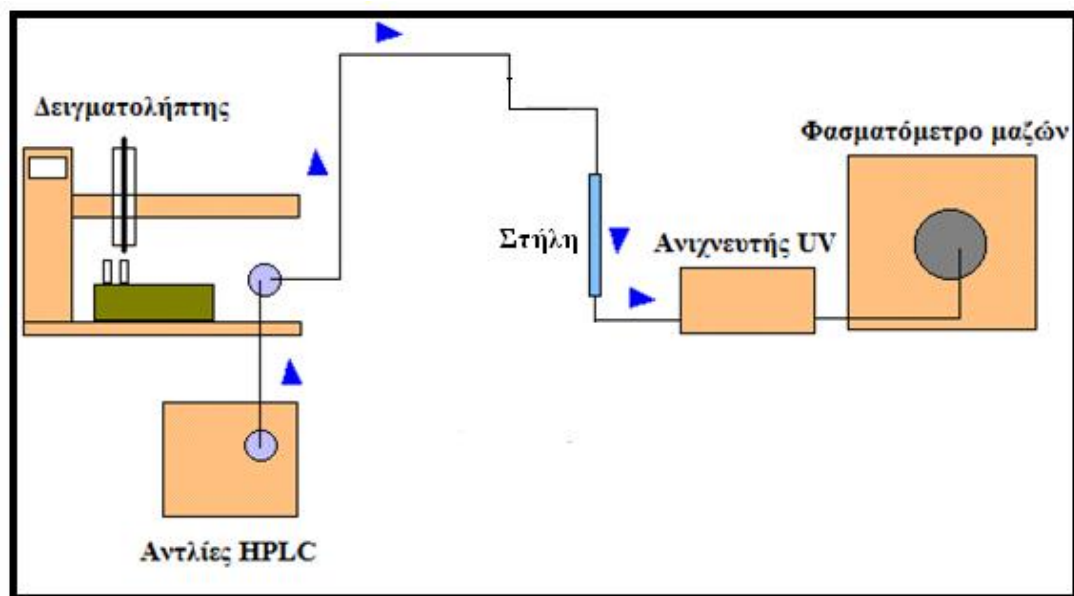
Σχήμα 8. Μέρη φασματομέτρου μαζών

1.7. Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία μαζών (LC/MS)

Γενικώς, στην υγρή χρωματογραφία η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα ενώ η κινητή φάση είναι υγρό (Εργαστηριακές Σημειώσεις). Με την υγρή χρωματογραφία είναι δυνατός ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών, μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ενώσεων οι οποίες δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας με την αέρια χρωματογραφία. Η υγρή χρωματογραφία εμφανίζει ιδιαίτερη χρησιμότητα σε δείγματα με μεγάλα μόρια είτε σε ιονισμένα σωματίδια με χαμηλή τάση ατμών είτε σε θερμικά ασταθείς ενώσεις που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν [34].

Η σύζευξη με υγρή χρωματογραφία απαιτεί τη χρήση διάταξης σύζευξης, αφού ουσιαστικά πρόκειται για σύζευξη δυο ασύμβατων τεχνικών. Υπάρχουν αρκετές διατάξεις σύζευξης, των οποίων οι αρχές παρουσιάζουν διαφορές η μία από την άλλη. Η πιο δημοφιλής διάταξη σύζευξης είναι ο ψεκασμός σε δυναμικό (electrospray). Μέσω αυτής της διάταξης, είναι δυνατή η ανάλυση μεγάλου αριθμού μοριακών ενώσεων έως και 200.000 dalton. Για την πραγματοποίηση της υγρής χρωματογραφίας το δείγμα εισάγεται μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, όπου εκεί λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών του, καθώς αυτά κινούνται στη χρωματογραφική στήλη. Στη συνέχεια, μέσω της γραμμής μεταφοράς οι ουσίες του δείγματος εισέρχονται στο φασματομέτρο μαζών όπου πραγματοποιείται η ανάλυσή τους. Μέσω της τεχνικής MS παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος, τη δομή ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση

μιγμάτων, την δομή και τη σύσταση επιφανειών αλλά και την αναλογία ισοτόπων στοιχείων [34].



Εικόνα 6. Διάταξη ενός συστήματος LC/MS

1.8. Σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια και καθώς το επίπεδο ζωής ανεβαίνει, ο κόσμος, μέσω του διαδικτύου, των βιβλίων αλλά και των Μέσων Μαζικής Ενημέρωσης, επικεντρώνεται και μαθαίνει όλο και περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με την υγεία και την διατροφή του και πώς αυτά τα δύο αλληλοσυμπληρώνονται. Οι περισσότεροι άνθρωποι στις αναπτυγμένες χώρες, πλέον, δεν τρέφονται μόνο για να εκπληρώσουν την ημερήσια ανάγκη τους σε θερμίδες αλλά ελέγχουν τις ευεργετικές δράσεις των τροφίμων, δηλαδή, αν είναι αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά κ.α.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη εκχυλισμάτων του χαμομηλιού, της αχίλλειας και του φασκόμηλου που παραλήφθηκαν με οργανικούς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας.

Ειδικότερα ο σκοπός επικεντρώθηκε:

- ✓ Στη διαδοχική εκχύλιση του φυτικού υλικού με πετρελαϊκό αιθέρα, εξάνιο, διαυθυλαιθέρα και μεθανόλη.
- ✓ Στον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu .
- ✓ Στον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών με τη μέθοδο DPPH και της αντιμικροβιακής τους δράσης με τη μέθοδο wall diffusion assay ~ WDA (μέθοδος διάχυσης σε αгар)
- ✓ Στον ποιοτικό προσδιορισμό των συστατικών των εκχυλισμάτων που συνδέονται άμεσα με τις παραπάνω δράσεις με άερια και υγρή χρωματογραφία συνδυασμένες με φασματομέτρο μάζας.

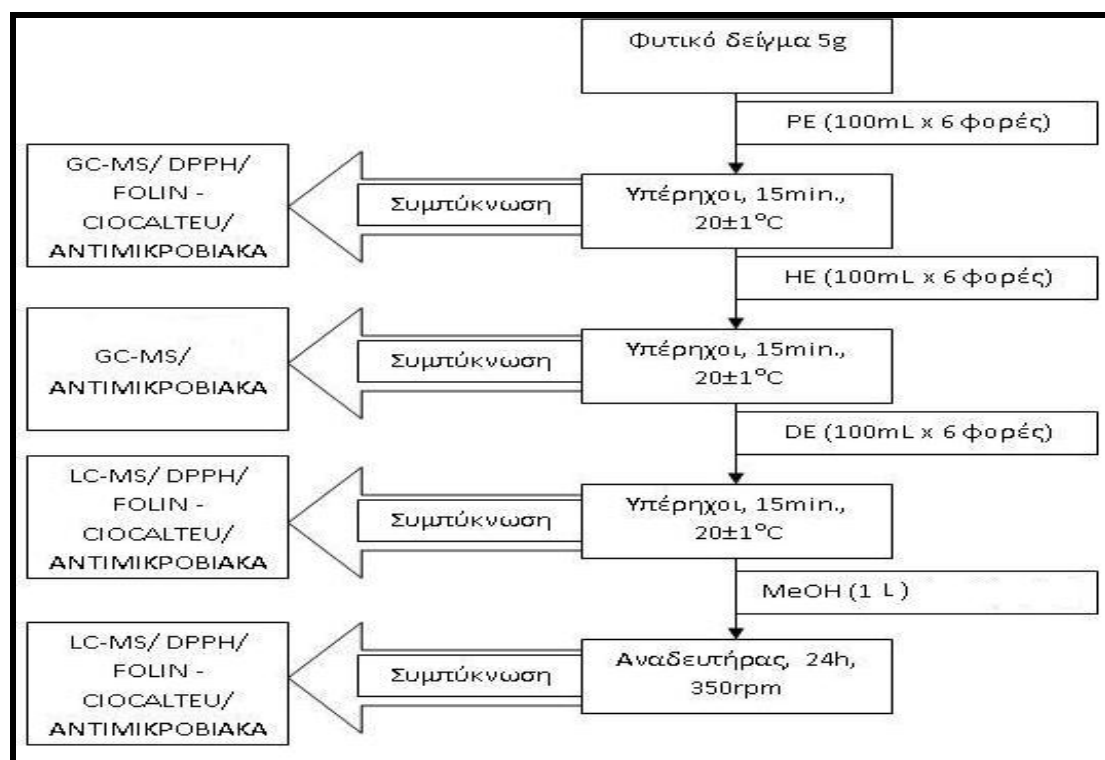
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Φυτικό υλικό

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτά της οικογένειας Asteraceae και πιο συγκεκριμένα, η αχίλλεια (*Achillea millefolium* L.) και το χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.) και ένα φυτό της οικογένειας Lamiaceae (*Salvia officinalis* L.). Όλα τα φυτά προήλθαν από φυτείες του ΑΣΚΑΦΕΦΑ (Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας). Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αποξηραμένα τμήματα των φυτών και πιο συγκεκριμένα τα φύλλα τους, εκτός της περίπτωσης του χαμομηλιού που περιλαμβάνονταν και οι ανθοκεφαλές.

2.2. Προετοιμασία φυτικού υλικού για παραλαβή εκχυλισμάτων

Στο επόμενο σχήμα (σχήμα 9) παρουσιάζεται ολόκληρη η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 9. Πειραματική διαδικασία

Σε κάθε ένα από τα τρία δείγματα πραγματοποιείται ζύγιση 5 g φυτικού υλικού αφού, έχει προηγηθεί, μέσω ιγδίου, η κονιοποίηση του. Το ζυγισμένο δείγμα τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 500 mL και ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσσεις με τέσσερις διαλύτες. Οι διαλύτες που λαμβάνουν χώρα στην πειραματική διαδικασία με σειρά χρησιμοποίησής τους είναι, πετρελαϊκός αιθέρας (Petroleum Benzine 40-60 °C, Emsure Merck), εξάνιο (n-Hexane, BDH), διαιθυλαιθέρας (Diethyl ether, χωρίς BHT, Carlo Erba) και μεθανόλη (Methanol HPLC - PLUS – Gradient, Carlo Erba). Σε κάθε εκχύλιση ογκομετρούνται 100 mL διαλύτη, μέσω ογκομετρικού κυλίνδρου, τοποθετείται πώμα στη σφαιρική φιάλη, και ακολουθεί εμβάπτιση της έως τη μέση, σε λουτρό υπερήχων (Bandelin SONOREX SUPER RK255H) σε θερμοκρασία $20 \pm 1^\circ\text{C}$ για 15 λεπτά. Με το πέρας των 15 λεπτών η υγρή φάση μεταφέρεται μέσω φίλτρου (Chromafil Xtra PET- 45/25) σε άλλη φιάλη και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται 5 φορές για τον καθένα από τους διαλύτες εκτός της μεθανόλης. Το κάθε εκχύλισμα μεταφέρεται στην κατάψυξη στους -21°C . Στη συνέχεια, το κάθε φυτικό δείγμα μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και προσθέτονται 1000 mL μεθανόλη. Το ποτήρι ζέσεως, αφού καλυφθεί για να μείνει το περιεχόμενό του ανεπηρέαστο από το φως, τοποθετείται σε αναδευτήρα, Heidolph MR Hei-Standard, και η διαδικασία τερματίζεται στις 24 ώρες όπου το μεθανολικό εκχύλισμα μπαίνει και αυτό στην κατάψυξη.

Η συμπύκνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται με την βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα (BOECO ROTARY EVAPORATOR RVO 400 SD, εικ. 7) και της αντλίας κενού. Η θερμοκρασία του απεσταγμένου νερού παίρνει ένα εύρος τιμών από 25°C έως 36°C ανάλογα με τους διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται. Το κάθε δείγμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη 500 mL και συνδέεται με τον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η περιστροφή (rotation) ρυθμίζεται κατάλληλα και το κενό (vacuum) κατεβαίνει σταδιακά αναλόγως των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, οπότε και ξεκινά η διαδικασία της συμπύκνωσης.



Εικόνα 7. Περιστροφικός εξατμιστήρας

Με την πάροδο της ώρας και τη μείωση του κενού παρατηρείται ότι στη φιάλη το δείγμα ελαττώνεται (εικ. 8) και μόλις μείνουν μερικά mL σταματά η συμπύκνωση στο συγκεκριμένο όργανο. Από τη σφαιρική φιάλη ό, τι απέμεινε μεταφέρεται σε φιαλίδιο και ο διαλύτης απομακρύνεται εντελώς με τη βοήθεια ρεύματος καθαρού αζώτου (N_2). Αρχικά, το κάθε φιαλίδιο μετριέται άδειο σε ζυγό ακριβείας και μετά το στέγνωμα του δείγματος μετριέται μαζί με το δείγμα. Οπότε, στην κάθε περίπτωση γνωστοποιείται το ακριβές βάρος του δείγματος. Πρέπει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος η συμπύκνωση συνεχίζεται έως ξηρού.

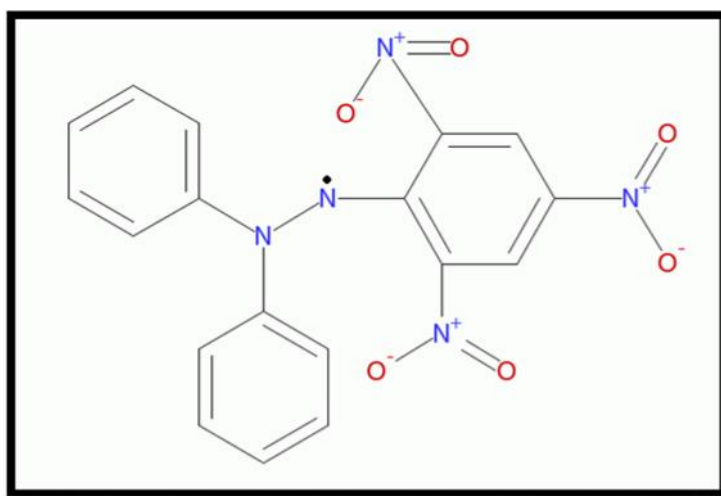


Εικόνα 8. Διαδικασία συμπύκνωσης

Η διαδικασία τόσο των εκχυλίσεων όσο και των συμπυκνώσεων στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επαναλαμβάνεται 2 φορές για κάθε φυτικό δείγμα και για τους τέσσερις διαλύτες.

2.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Το 2,2 διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (σχήμα 10) είναι μια δημοφιλής, σταθερή ελεύθερη ρίζα. Στην μορφή του είναι κρυσταλλικό, σκούρου πορφυρού χρώματος και υπό συγκεκριμένες συνθήκες (ψυγείο, χωρίς φως, αέρα και υγρασία) παραμένει σταθερό για χρόνια. Η σταθερότητά του αποδίδεται στις πολλαπλές δομές συντονισμού αλλά και στην παρουσία νιτροομάδων που έλκουν ηλεκτρόνια. Εκτός της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό της παρεμποδιστικής ικανότητας.



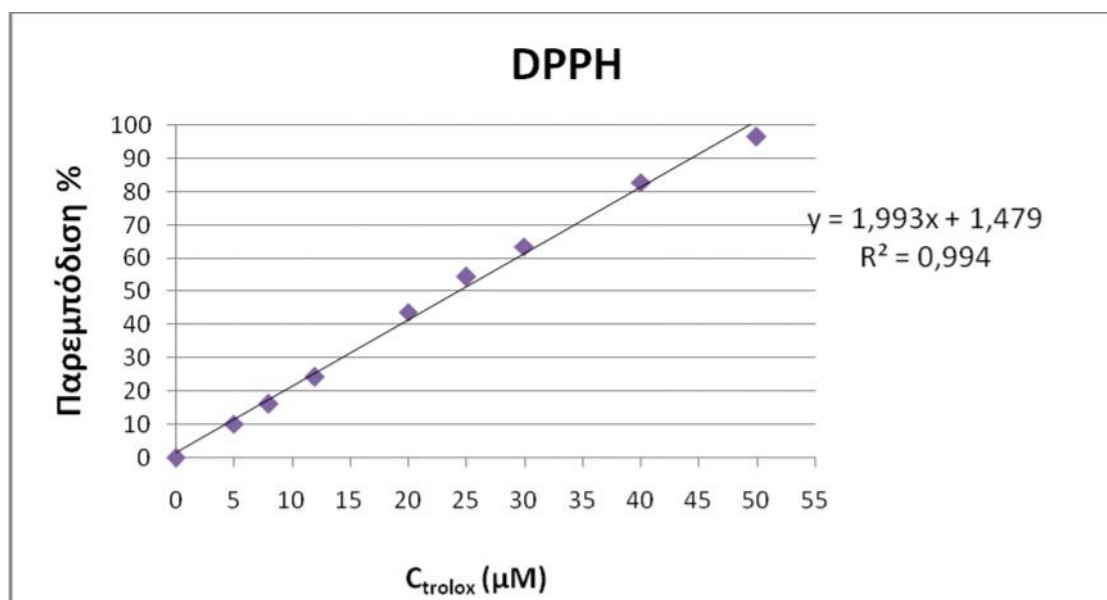
Σχήμα 10. Δομή του DPPH

Η κατανάλωσή του DPPH από τα αντιοξειδωτικά έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του χρώματος του διαλύματος. Η εξασθένηση του χρώματος παρατηρείται μέσω φωτόμετρου Hack DR./2010 και συγκεκριμένα, σε μήκος κύματος 515 nm. Αυτό το μήκος κύματος επιλέγεται διότι παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας.



Εικόνα 9. Αποχρωματισμός DPPH λόγω διαφορετικών συγκεντρώσεων Trolox

Κατά την πειραματική διαδικασία ζυγίζονται 8 mg DPPH και προσθέτονται σε 200 mL μεθανόλη. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιείται κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς με παρασκευή προτύπων μεθανολικών διαλυμάτων 9 συγκεντρώσεων Trolox (0-50 μM). Στη συνέχεια, σε φιαλίδιο προσθέτονται 3 mL διαλύματος DPPH και 30 μL δείγματος. Δείγματα αυξανόμενου όγκου κάθε εκχυλίσματος αναμιγνύονται με διάλυμα DPPH μέχρις όγκου 3 mL. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου μετράται η απορρόφηση στα 515 nm.



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox για την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH)

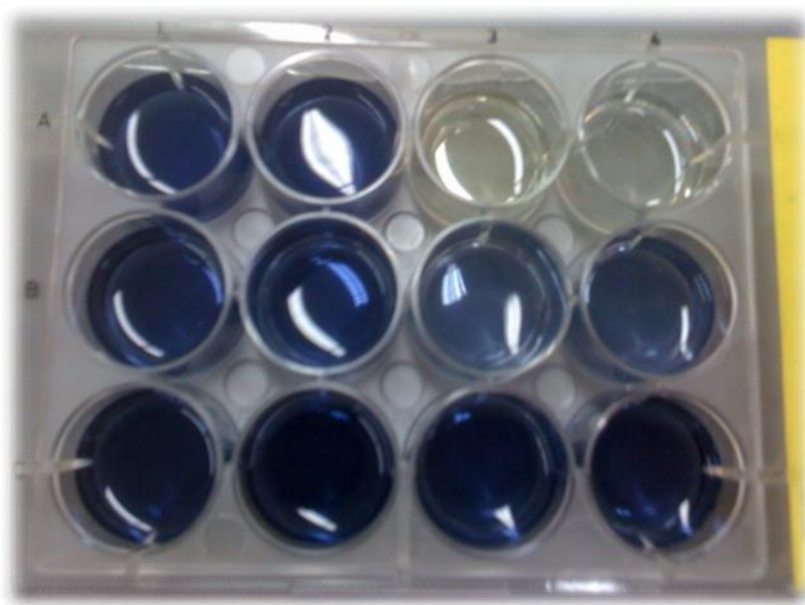
Η παρεμπόδιση σε κάθε περίπτωση δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{Παρεμπόδιση} = [A_{c(o)} - A_{s(t)} / A_{c(o)}] \times 100$$

$A_{c(o)}$ είναι η απορρόφηση του μάρτυρα την χρονική στιγμή 0 και $A_{s(t)}$ είναι η απορρόφηση του εκχυλίσματος σε χρόνο $t = 30 \text{ min}$.

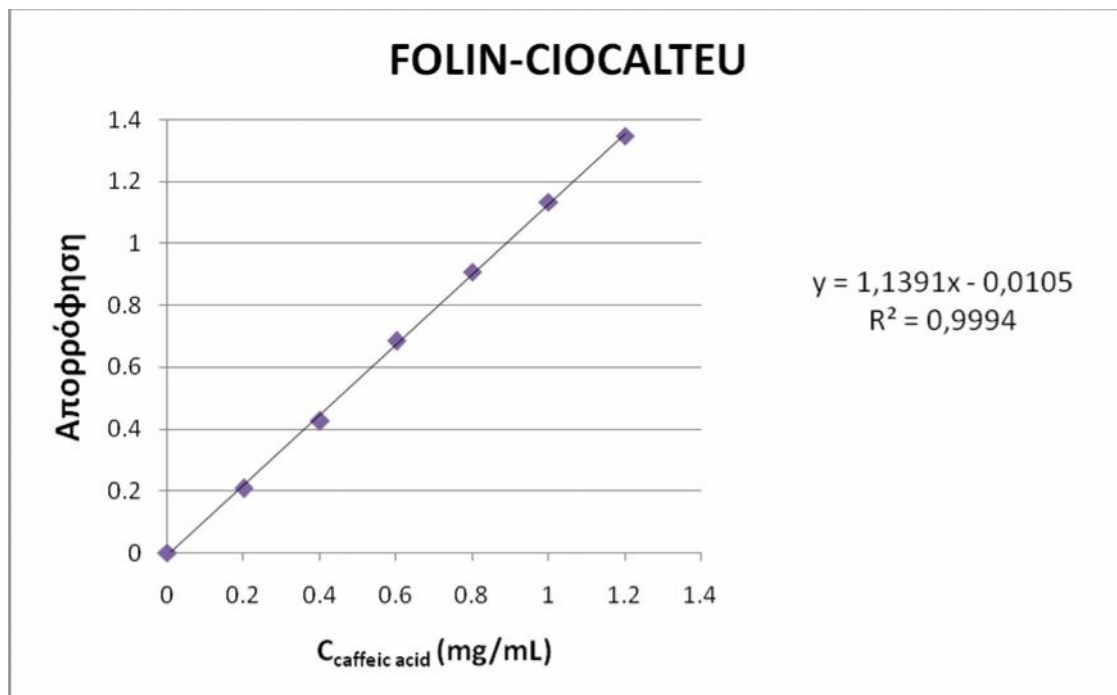
2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Σύμφωνα με την οποία, προσθέτονται σε πλακίδια 1,5 mL απιονισμένο νερό, 25 μL δείγματος και 125 μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και αναδεύονται καλά. Μετά την πάροδο 3 λεπτών προσθέτονται 375 μL Na_2CO_3 και 475 μL απιονισμένο νερό. Έπειτα από επώαση δύο ωρών σε συνθήκες σκότους μετريέται η απορρόφηση μέσω του φωτόμετρου ρυθμισμένο στα 725 nm.



Εικόνα 10. Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Για τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιείται κατασκευή πρότυπης καμπύλης καφεϊκού οξέος συγκεντρώσεων 0-1,2 mg/mL.



Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu)

2.5. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δραστηριότητας χρησιμοποιούνται τα φυτικά εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα σε συγκεντρώσεις 25 και 50 mg/mL, του εξανίου και του διαιθυλαιθέρα σε συγκέντρωση 25 mg/mL και της μεθανόλης σε συγκεντρώσεις 25 και 50 mg/mL.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι γνωστή ως “wall diffusion assay ~ WDA” (μέθοδος διάχυσης σε άγαρ). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν είτε με Brain Heart Infusion BHI είτε με TSB Tryptic Soy Broth με 1,5% άγαρ, ανάλογα με τον κάθε μικροοργανισμό-στόχο, όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Το θρεπτικό μέσο εμβολιάζεται με τον κάθε μικροοργανισμό-στόχο (εμβόλιο 1,0% v/v, από φρέσκια καλλιέργεια), όταν η θερμοκρασία του μέσου βρίσκεται περίπου στους 40°C. Σε τετράγωνα τρυβλία petri προσθέτονται 50 mL θρεπτικού μέσου και έπειτα από λίγη ώρα αυτό σταθεροποιείται.

Πίνακας 5. Μικροοργανισμοί στόχοι και συνθήκες ανάπτυξής τους κατά την πειραματική διαδικασία

Μικροοργανισμός	Χρώση κατά Gram	Θρεπτικό μέσο	Θερμοκρασία °C
<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	+	BHI,	37
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	+	BHI,	37
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	+	BHI,	37
<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	+	BHI,	37
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	+	BHI,	37
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	+	BHI,	37
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	+	BHI,	37
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	+	TSB,	30
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	+	TSB,	37
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	+	BHI,	30
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	+	BHI,	30
<i>Escherichia coli</i> C1845	-	BHI,	37
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	-	BHI,	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	-	TSB,	30

Σε κάθε ένα από τα τρυβλία σχηματίζονται οπές διαμέτρου 6mm στο στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur και εκεί εμβολιάζονται 50μL φυτικού εκχυλίσματος. Ακολουθεί η παραμονή των ενοφθαλμισμένων τρυβλίων στο ψυγείο για δύο ώρες ώστε να επιτευχθεί η διάχυση του υγρού δείγματος στο στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια, η επώασή τους σε επωαστικό θάλαμο στην κατάλληλη θερμοκρασία για 24 ώρες. Μετά τις 24 ώρες πραγματοποιούνται παρατηρήσεις και συγκεκριμένα μετράται η διάμετρος των ζωνών αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού-στόχου που δημιουργήθηκαν περιμετρικά των οπών.



Εικόνα 11. Αντιμικροβιακή δράση των *Streptococcus aureus* και *Listeria welschimeri*

2.6. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC/MS)

Για την ανάλυση αλλά και την ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των δειγμάτων χρησιμοποιούνται τα φυτικά εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου. Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιείται αέριος χρωματογράφος Hewlett Packard 5890 II με μια HP – 5MS τριχοειδή στήλη μήκους 30 m, διαμέτρου 0,25 mm και πάχους 0,25μm και ένας επιλεκτικός ανιχνευτής μάζας, Hewlett Packard 5972 συνδεδεμένο με τον αέριο χρωματογράφο.

2.6.1. Συνθήκες ανάλυσης

Η θερμοκρασία θαλάμου εισαγωγής του δείγματος είναι στους 220°C ενώ, η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς του ανιχνευτή είναι στους 290°C. Η θερμοκρασία κλιβάνου-στήλης είναι μεταβαλλόμενη κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Ξεκινά από τους 50°C για 3 λεπτά και σταδιακά φθάνει τους 180 °C ενώ, αυξάνεται ανά 3°C το λεπτό. Στη συνέχεια, από τους 180°C φθάνει τους 250 °C και αυξάνεται με ρυθμό 15°C ανά λεπτό. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He) όπου η ταχύτητα ροής του είναι 1 mL / min. Τα δείγματα, όγκου 1μL, τοποθετούνται με μικροσύριγγες στο θάλαμο εξαέρωσης. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίζεται στη σύγκριση τους με ενώσεις οπου έχουν καταχωρηθεί σε βάσεις δεδομένων ή διαφορετικά, βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, που περιέχουν το “αποτύπωμα” κάθε ένωσης. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι Adams 07, NIST 98, και Wiley 275, επίσης, ό,τι δεδομένα και πληροφορίες είναι καταχωρημένα στον χρωματογράφο καθώς και σχετική

βιβλιογραφία. Τα ποσοστά επί τοις εκατό (%) των ενώσεων λαμβάνονται ηλεκτρονικώς από το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και την αναγωγή του σε ποσοστό.

2.7. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC/MS)

Για την πραγματοποίηση της χρωματογραφίας χρησιμοποιείται σύστημα Shimatzu 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).

2.7.1. Συνθήκες ανάλυσης

Η στήλη ήταν Discovery SUPELCO Analytical (Sigma-Aldrich) C₁₈ αναστραμμένης φάσης μήκους 250 nm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης (5μm). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός των δύο διαλυτών. Ο διαλύτης Α ήταν μεθανόλη μεγάλης καθαρότητας για MS και ο διαλύτης Β 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, ενώ η θερμοκρασία στήλης βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πιν. 6).

Πίνακας 6. Συνθήκες ανάλυσης LC/MS

Χρόνος (min)	Μεθανόλη (%)	Νερό + HCOOH (%)
0	25	75
5	25	75
30	65	35
60	100	0

Η παρακολούθηση για τα φαινορικά συστατικά έγινε με τον ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA) στη φασματική περιοχή 280 και 330 nm όπου απορροφούν φαινορικά οξέα και τα φλαβονοειδή.

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 (N_2) $1,5Lmin^{-1}$, πίεση αερίου ξήρανσης (N_2) 0,1MPa (ροή 10L/min), θερμοκρασία heat block 300 °C, δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface) -3,5kV, τάση CDL-20V και τάση ανιχνευτή -1,48kV.

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.

Εκτός από τα εκχυλίσματα των φυτών, αναλύθηκαν επίσης με την παραπάνω μέθοδο και διαλύματα πρότυπων ουσιών: γαλλικό οξύ, κερκετίνη-3-4-O-δι-γλυκοζίτης, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, μυρισετίνη-3-ο-ραμνοζίτης, λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίτης, ροσμαρινικό οξύ, απιγενίνη-7-O-γλυκοζίτης, κερκετίνη, καμφερόλη, απιγενίνη, λουτεολίνη, ακασετίνη, 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, ενώ όπου δεν υπήρχαν πρότυπα, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων.

3.Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1. Παραλαβή εκχυλισμάτων και αποδόσεις

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα φυτικά εκχυλίσματα και οι αποδόσεις που είχαν μετά την διαδικασία παραλαβής τους. Το καθαρό βάρος κάθε φυτικού εκχυλίσματος προήλθε από αρχικό αποξηραμένο φυτικό υλικό 5 g.

Πίνακας 7. Αποδόσεις φυτικών εκχυλισμάτων

Φυτά	Διαλύτες	Καθαρό βάρος φυτικών εκχυλισμάτων (g)	Σύσταση (%) στο φυτικό υλικό
Αχίλλεια	PE*	0,150±0,007	3,00
	HE	0,0126±0,004	0,52
	DE	0,092±0,006	1,84
	MeOH	0,750±0,020	15,00
Χαμομήλι	PE	0,154±0,002	3,08
	HE	0,0272±0,008	0,54
	DE	0,077±0,010	1,54
	MeOH	1,024±0,070	20,48
Φασκόμηλο	PE	0,291±0,003	5,82
	HE	0,0401±0,004	0,80
	DE	0,111±0,003	2,22
	MeOH	1,040±0,042	20,80

*Όπου PE, HE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

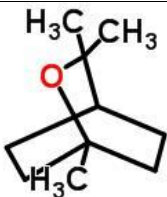
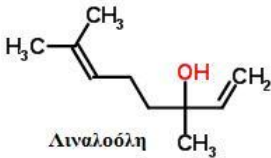
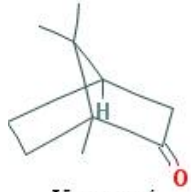
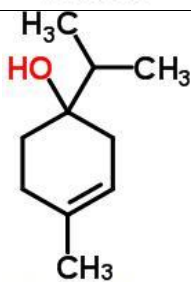
Όπως φαίνεται και στον πίνακα 7, υψηλότερες αποδόσεις έχουν τα μεθανολικά εκχυλίσματα (φασκόμηλο, χαμομήλι, αχίλλεια), ακολουθούν τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα (φασκόμηλο, χαμομήλι, αχίλλεια), έπονται τα

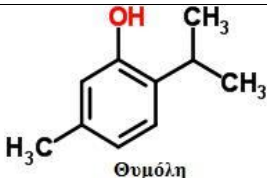
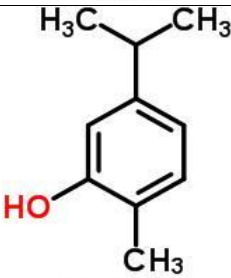
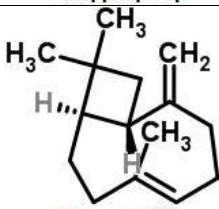
αιθερικά εκχυλίσματα (φασκόμηλο, αχίλλεια, χαμομήλι), ενώ, χαμηλότερες αποδόσεις εμφανίζουν τα εξανικά εκχυλίσματα (φασκόμηλο, χαμομήλι, αχίλλεια).

3.2. Ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (GC/MS)

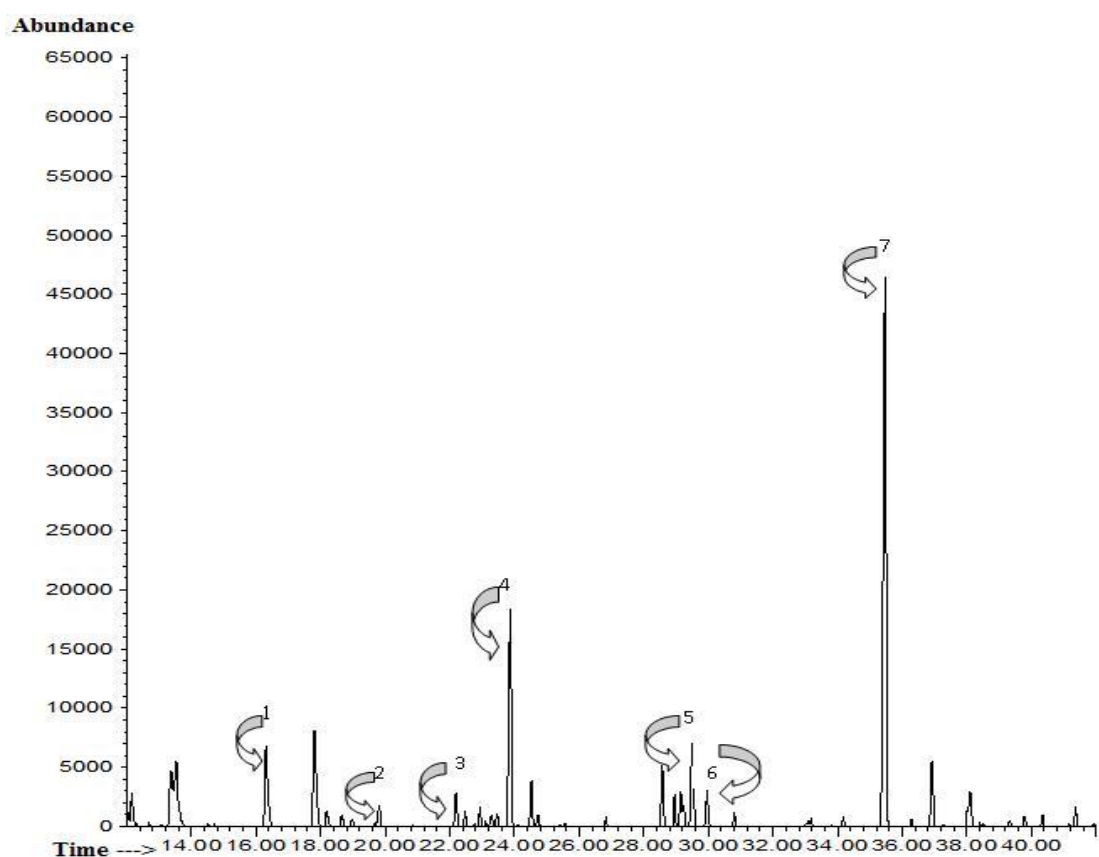
Για τα φυτικά εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου πραγματοποιείται ανάλυση με αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών. Οι ουσίες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μέσω του GC/MS παρουσιάζονται στους επόμενους πίνακες και τα χρωματογραφήματα.

Πίνακας 8. Κυριότερα πτητικά συστατικά για τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου της αχίλλειας

Ουσία	R _t (min)		%	
	PE*	HE	PE	HE
 Ευκαλυπτόλη	16,32	-	6,77	-
 Λιναλοόλη	19,80	-	1,42	-
 Καμφορά	22,19	-	2,13	-
 Τερπινεν-4-όλη	23,87	23,84	14,92	20,66

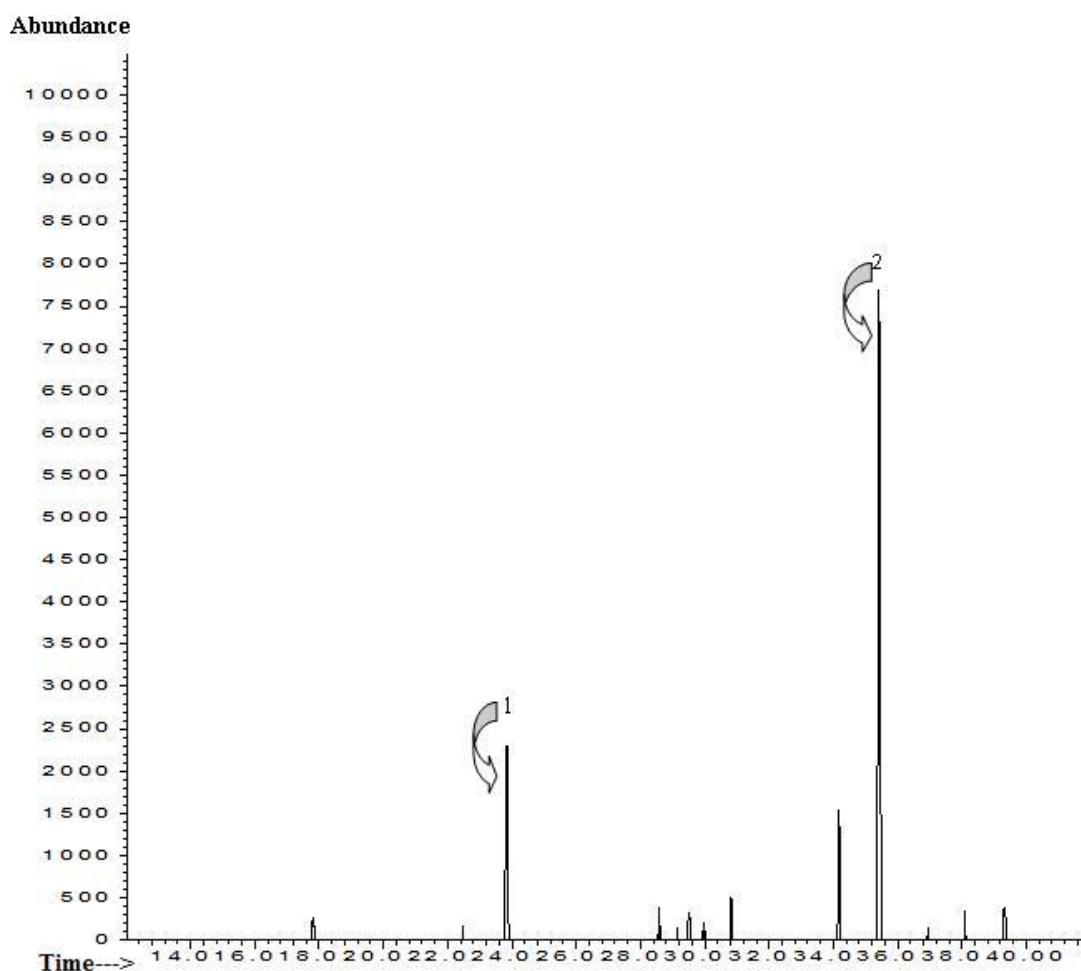
 Θυμόλη	29,50	-	6,08	-
 Καρβακρόλη	29,96	-	2,19	-
 Καρνοφυλλένιο	35,47	35,42	42,56	79,34

*Όπου ΡΕ και ΗΕ οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας και εξάνιο αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα αχύλλειας. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 οι κορυφές των ουσιών: ευκαλυπτόλη, λιναλοόλη, καμφορά, τερπινεν-4-όλη, θυμόλη, καρβακρόλη και καρνοφυλλένιο, αντίστοιχα.

Στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα (πιν. 8) της αχίλλειας ταυτοποιήθηκαν 7 ουσίες ωστόσο, υπήρχαν κι άλλες σε μικρότερα ποσοστά, οι οποίες δεν στάθηκε δυνατό να προσδιοριστούν. Η ουσία η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο εκχύλισμα είναι το σεσκιτερπένιο, καρυοφυλλένιο (42,56%), ακολουθεί η τερπινεν-4-όλη (14,92%) και στη συνέχεια έπονται η ευκαλυπτόλη (6,77%), η θυμόλη (6,08%), η καρβακρόλη (2,19%), η καμφορά (2,13%) και η λιναλοόλη (1,42%).



Διάγραμμα 4. Χρωματογράφημα εξανικού εκχυλίσματος αχίλλειας. Όπου: 1 και 2 οι κορυφές των ουσιών: τερπινεν-4-όλη και καρυοφυλλένιο, αντίστοιχα.

Από την άλλη, το εξανικό εκχύλισμα της αχίλλειας είναι φτωχότερο τόσο σε συστατικά όσο και σε αφθονία, αφού βρέθηκαν μόνο οι δύο από τις 7 ουσίες που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα, ο λόγος, για το καρυοφυλλένιο (79,34%) και την τερπινεν-4-όλη (20,66%).

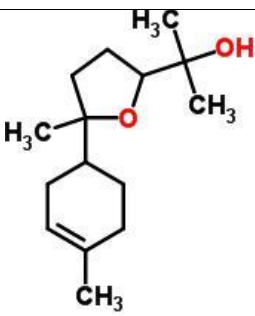
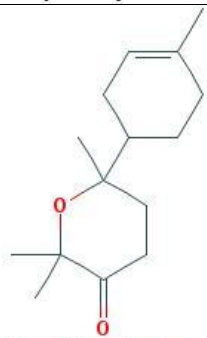
Οι Candan et al., σε μελέτη που πραγματοποίησαν το 2003 στο αιθέριο έλαιο της αχίλλειας βρήκαν ότι τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου της είναι η ευκαλυπτόλη (24,6%), η καμφορά (16,7%), η <α>-τερπινεόλη (10,2%), το <β>-

πινένιο (4,2%) και η βορνεόλη (4%). Σε πιο μικρά ποσοστά βρίσκονται η τερπινεν-4-όλη (2,8%) και το καρυφυλλένιο (0,4%). Μπορεί να παρατηρηθεί, ότι ο πετρελαϊκός αιθέρας και το εξάνιο ως διαλύτες (πίνακας 8) εκχυλίζουν κάποια πτητικά συστατικά που έχει το αιθέριο έλαιο [35].

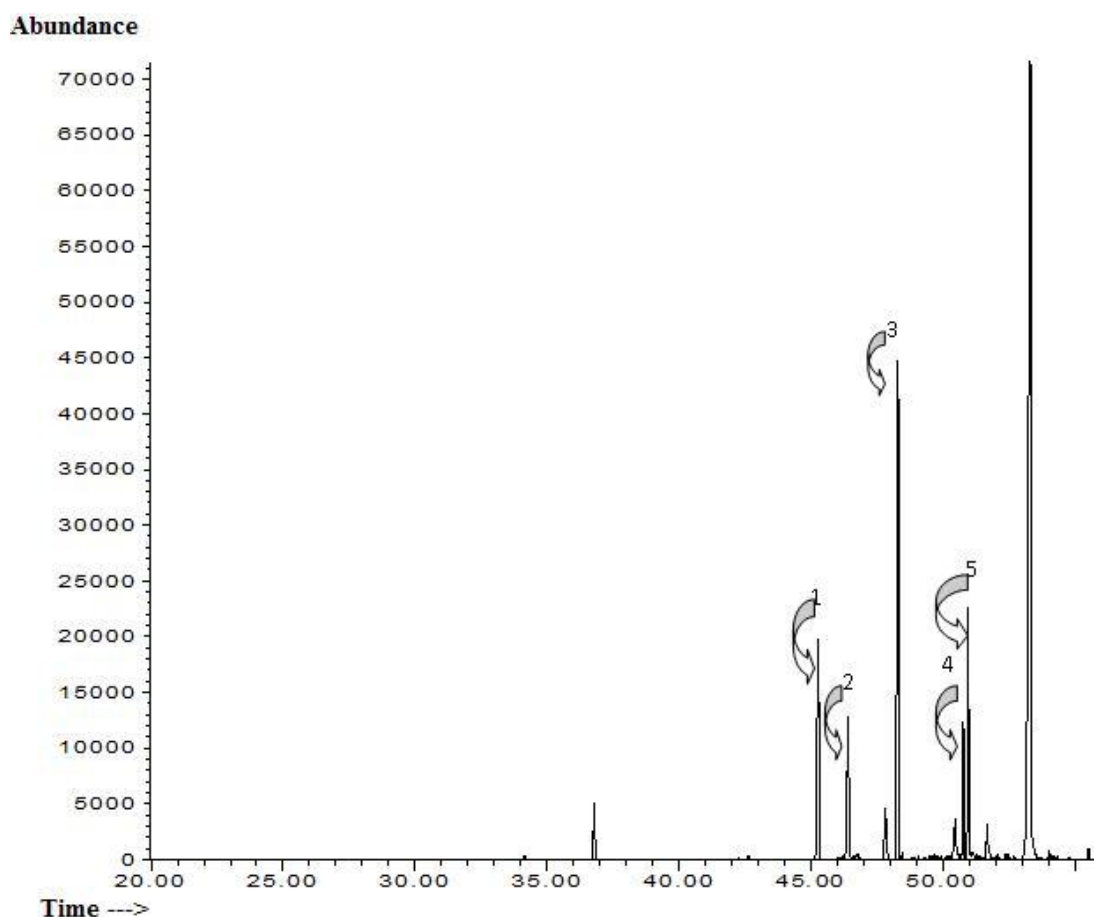
Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2010 παρουσίασε ότι μεταξύ των κυριότερων πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου της αχίλλειας είναι η καμφορά σε ποσοστό 17,8%, η ευκαλυπτόλη σε ποσοστό 12,9%, η <α>-θουγιόνη σε ποσοστό 10,27%, το καρυφυλλένιο σε ποσοστό 7,99% και το καμφένιο σε ποσοστό 6,71%. Σε μικρότερο ποσοστό βρίσκεται η τερπινεν-4-όλη και συγκεκριμένα στο 2,93% [36].

Αυτές οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των εκχυλισμάτων αλλά και των αιθέριων ελαίων οφείλονται τόσο στις συνθήκες ανάλυσης όσο και στις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς η σύσταση των στοιχείων του κάθε φυτού επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από περιοχή σε περιοχή [36].

Πίνακας 9. Κυριότερα πτητικά συστατικά για τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου του χαμομηλιού

Ουσία	R _t (min)		%	
	PE*	HE	PE	HE
 Βισαβολολοξειδίο Β	45,53	45,28	19,03	19,76
 Βισαβολονοξειδίο	46,59	46,41	9,61	12,33

Από τον πίνακα 9 φαίνεται ότι στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα του χαμομηλιού, κυριαρχούν τα οξείδια της βισαβολόλης, <α>-βισαβολολοξείδιο Α και <α>-βισαβολολοξείδιο Β σε ποσοστά 37,53% και 19,03%, αντίστοιχα ενώ, το βισαβολονοξείδιο βρίσκεται σε χαμηλότερο ποσοστό (9,61%). Εκτός αυτών όμως, στο εκχύλισμα υπάρχουν σπιροαιθέρες και πιο συγκεκριμένα ο <Z>-σπιροαιθέρας σε ποσοστό 13,22% και ο <E>-σπιροαιθέρας σε ποσοστό 6,11%.



Διάγραμμα 6. Χρωματογράφημα εξανικού εκχυλίσματος χαμομηλιού. Όπου: 1, 2, 3, 4 και 5 οι κορυφές των ουσιών: βισαβολολοξείδιο Β, βισαβολονοξείδιο, βισαβολολοξείδιο Α, Z-σπιροαιθέρας και E-σπιροαιθέρας, αντίστοιχα.

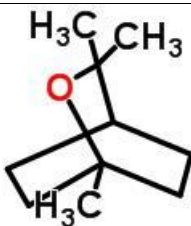
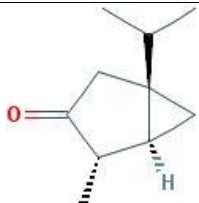
Όσον αφορά το εξανικό εκχύλισμα του χαμομηλιού και αυτό φαίνεται να είναι αρκετά πιο φτωχό σε αφθονία σε σχέση με αυτό του πετρελαϊκού αιθέρα. Σε αντίθεση όμως με την αχίλλεια, δεν φαίνεται το εξανικό εκχύλισμα να είναι φτωχότερο σε συστατικά από αυτό του πετρελαϊκού αιθέρα. Πιο συγκεκριμένα, το συστατικό το οποίο βρίσκεται στο υψηλότερο ποσοστό είναι το <α>-βισαβολολοξείδιο Α (35,97%), ακολουθεί το Β (19,76%) και στη συνέχεια έπονται ο

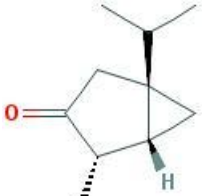
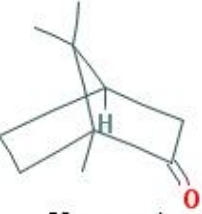
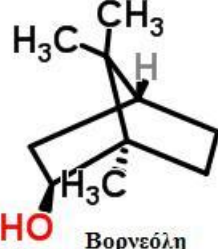
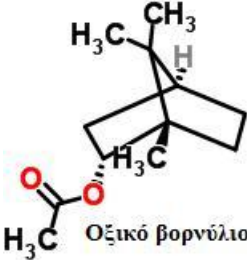
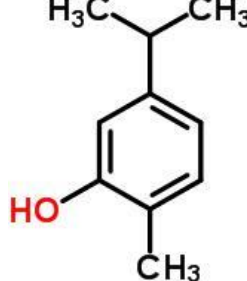
<E>-σπιροαιθέρας, το βισαβολονοξείδιο, και ο <Z>-σπιροαιθέρας σε ποσοστά 13,12%, 12,33% και 6,82%, αντίστοιχα.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Szöke et al., το 2004, βρέθηκε ότι τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου ενός άγριου πληθυσμού χαμομηλιού είναι η <α>-βισαβολόλη σε ποσοστό 24%, τα οξείδιά της <α> και <β> σε ποσοστά 11,24% και 20,42%, αντίστοιχα, το <trans>-φαρνεσένιο σε ποσοστό 11,07% και το χαμαζουλένιο σε ποσοστό 9,31%. Σε μικρότερα ποσοστά βρέθηκαν το βισαβολονοξείδιο και οι <cis> και <trans> σπιροαιθέρες, 2,51%, 4,28% και 1,87%, αντίστοιχα [37].

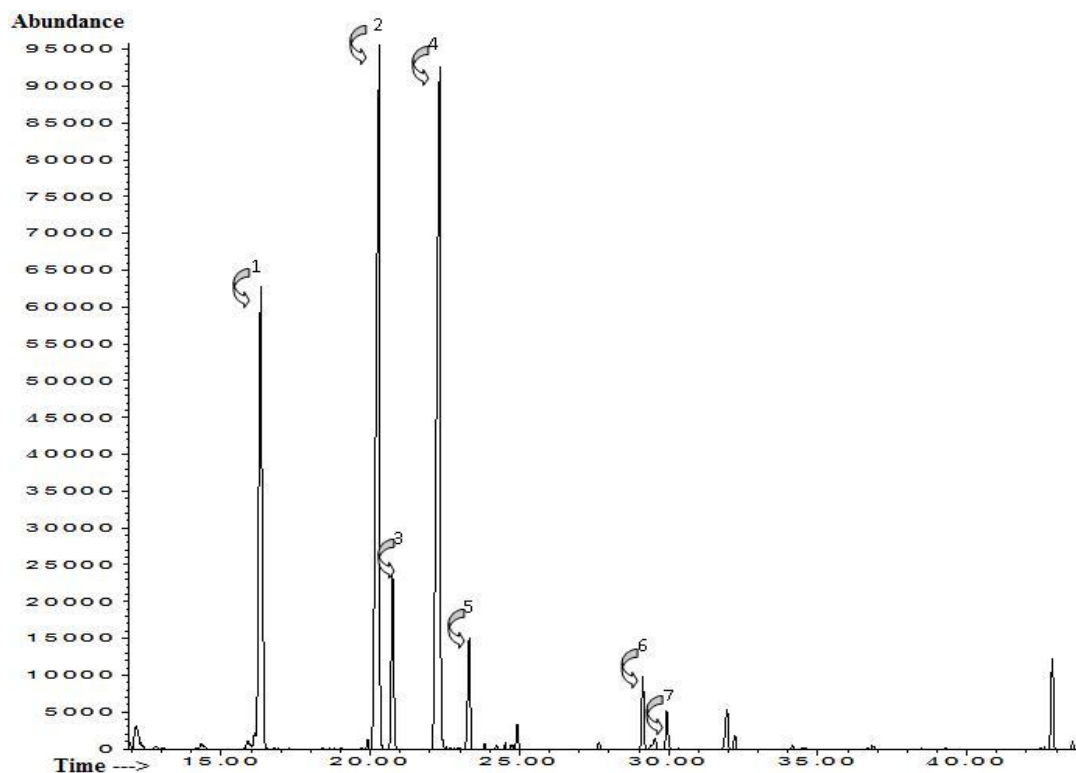
Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Raal et al., το 2011 σε δείγματα χαμομηλιού προερχόμενου από διάφορες χώρες βρέθηκε ότι τα συστατικά τα οποία υπερτερούσαν στο αιθέριο έλαιο είναι αυτά ακριβώς τα οποία αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο. Ωστόσο, καθώς άλλαζε ο τόπος προέλευσης άλλαζε και η σύνθεση των συστατικών του αιθέριου ελαίου. Έτσι για παράδειγμα, η βισαβολόλη κυμαίνεται από 0% (χώρες προέλευσης Πολωνία και Λετονία) έως και 8,6% (Εσθονία) ενώ, το βισαβολοξείδιο Α κυμαίνεται από το να βρίσκεται σε ίχνη (Λετονία) έως και 55,9% (Λιθουανία). Τέτοιες διακυμάνσεις αφορούν όλα τα πτητικά συστατικά τα οποία αναπτύχθηκαν ανωτέρω [8].

Πίνακας 10. Κυριότερα πτητικά συστατικά για τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου του φασκόμηλου

Ουσία	R _t (min)		%	
	PE*	HE	PE	HE
 Ευκαλυπτόλη	16,32	16,40	20,05	20,76
 cis-Θουγιόνη	20,29	20,39	31,20	31,18

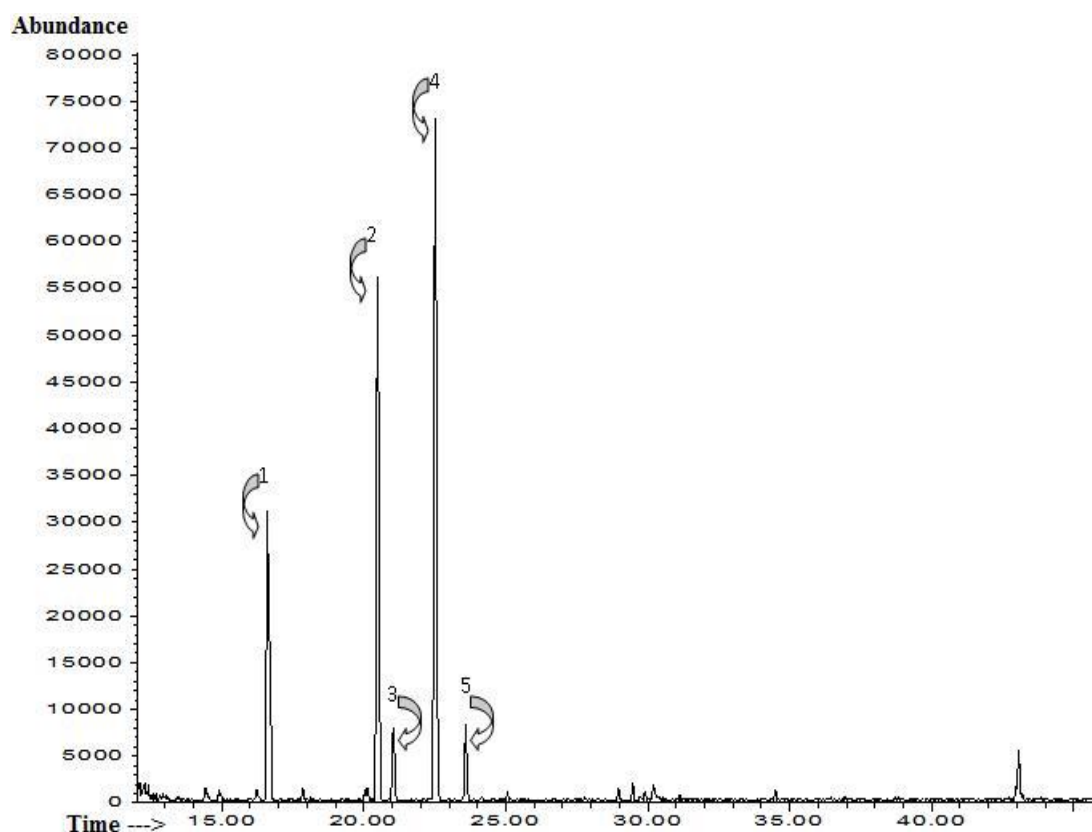
 trans-Θουγιόνη	20,75	20,88	5,76	4,07
 Καμφορά	22,33	22,42	32,89	38,60
 Βορνεόλη	23,32	23,49	3,83	3,96
 Οξικό βορνύλιο	29,13	-	2,03	-
 Καρβακρόλη	29,94	-	0,98	-

*Όπου ΡΕ και ΗΕ οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας και εξάνιο αντίστοιχα.



Διάγραμμα 7. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα φασκόμηλου. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 οι κορυφές των ουσιών: ευκαλυπτόλη, *cis*-θουγιόνη, *trans*-θουγιόνη, καμφορά, βορνεόλη, οξικό βορνύλιο και καρβακρόλη, αντίστοιχα.

Από τον πίνακα 10 φαίνεται ότι, τα εκχυλίσματα του φασκόμηλου είναι πλουσιότερα σε συστατικά από ότι της αχίλλειας και του χαμομηλιού. Πιο συγκεκριμένα, στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν 7 κύριες ενώσεις. Η ουσία με το υψηλότερο ποσοστό στο εκχύλισμα είναι η <L>-καμφορά σε ποσοστό 32,89% και ακολουθούν η <*cis*>-θουγιόνη, η ευκαλυπτόλη, η <*trans*>-θουγιόνη, η βορνεόλη, το οξικό βορνύλιο και η καρβακρόλη σε ποσοστά, 31,20%, 20,05%, 5,76%, 3,83%, 2,03% και 0,98%, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 8. Χρωματογράφημα εξανικού εκχυλίσματος φασκόμηλου. Όπου: 1, 2, 3, 4, και 5 οι κορυφές των ουσιών: ευκαλυπτόλη, *cis*-θουγιόνη, *trans*-θουγιόνη, καμφορά, και βορνεόλη, αντίστοιχα.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Longaray-Delamare et al., το 2007, βρέθηκε ότι τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου είναι η <α>-θουγιόνη, η ευκαλυπτόλη, η βορνεόλη, η καμφορά και το <β>-πινένιο σε ποσοστά 24,8%, 14,8%, 11,1%, 10,9% και 9,87%, αντίστοιχα [38]. Ενώ, τα αντίστοιχα πτητικά συστατικά σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Sellami et al., το 2011, βρέθηκαν να είναι σε ποσοστά 10,15%, 36,39%, 2,96%, 33,10% και 0,35% αντιστοίχως [39].

Οι Ntalli et al., το 2010, σε φασκόμηλο ελληνικής προέλευσης βρήκαν ότι στο αιθέριο έλαιο τα συστατικά τα οποία κυριαρχούσαν είναι η ευκαλυπτόλη σε ποσοστό 25,5% και την ακολουθούν η καμφορά, η θουγιόνη, το καμφένιο και το <β>-πινένιο σε ποσοστά 16,8%, 6%, 4,9% και 4,6% αντίστοιχα [40]. Στο φασκόμηλο όπως και στα άλλα φυτά της παρούσας μελέτης, υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις στις διάφορες έρευνες τόσο στα ποσοστά όσο και στα συστατικά τα οποία αποτελούν το αιθέριο έλαιο ή το εκχύλισμα.

3.3. Ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC/MS)

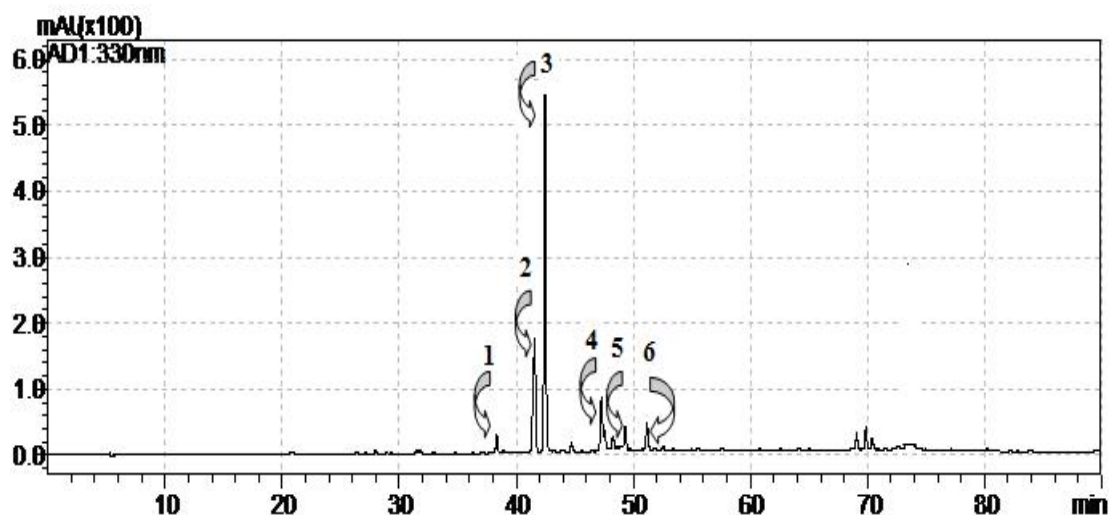
Όπως φάνηκε και σχηματικά στην πορεία του πειράματος (σχήμα 9), με την υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών αναλύθηκαν τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα και τα μεθανολικά εκχυλίσματα των τριών φυτών. Στους πίνακες και τα χρωματογραφήματα που ακολουθούν θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Πίνακας 11. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας

R_t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ_{max}	Αναφορά
38,33	λουτεολίνη	2,21	285	285	350, 267	πρότυπη ένωση
41,56	απιγενίνη	18,95	269	269	340, 270	πρότυπη ένωση
42,45	μεθυλ-φλαβονόλη (τριμεθυλο υδροξυ- κερκετίνη)	43,05	359		350, 256	*
47,27	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	7,43	305		320	*
49,30	ακασετίνη	2,91			334, 273	πρότυπη ένωση
51,16	μεθυλ-φλαβόνη	3,98	343		341, 270	*

*Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Mulinacci et al., (2000) [41]

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 11 και το διάγραμμα 9, η ένωση που βρίσκεται σε περισσότερη αφθονία στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας, είναι η μεθυλ-φλαβονόλη, τριμεθυλο-υδροξυ-κερκετίνη σε ποσοστό 43,05% και ακολουθούν η απιγενίνη (18,95%), κάποιο παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος (7,43%), μια μεθυλ-φλαβόνη (3,98%), η ακασετίνη (2,91%) και η λουτεολίνη (2,21%). Σε μικρότερο ποσοστό ταυτοποιήθηκαν και άλλες ενώσεις, αναλυτικά οι πίνακες με όλες τις ενώσεις παρουσιάζονται στα παραρτήματα.



Διάγραμμα 9. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα αχίλλειας. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5 και 6 οι κορυφές των ενώσεων: λουτεολίνη, απιγενίνη, μεθυλ-φλαβονόλη, παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος, ακασετίνη και μεθυλ-φλαβόνη, αντίστοιχα.

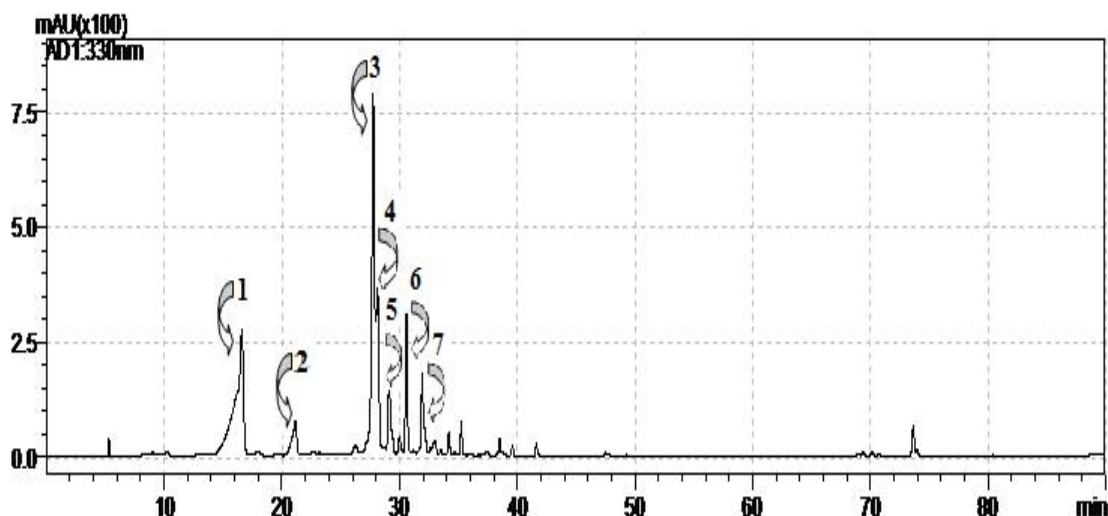
Πίνακας 12. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του μεθανολικού εκχυλίσματος της αχίλλειας

R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
16,60	εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	27,02	353	353, 191	326, 235	*
21,20	εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	4,25	353	353, 191, 179	320, 243	*
27,76	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	25,11	515	515, 353, 191	328, 243, 222	*
28,15	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	12,08	515	515, 353, 191	328, 243	*
29,11	7-O-γλυκοζίτης λουτεολίνης	5,12	447	447, 285	350, 254	πρότυπη ένωση
30,58	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	7,15	515	515, 353, 191	328, 245	*
31,92	7-O- γλυκοζίτης απιγενίνης	5,65	431	431, 269	335, 268	πρότυπη ένωση

*Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Gouveia και Castilho (2011)[42]), 2) Zimmermann et al., (2011)[43] 3) Guimarães et al., (2013)[44], 4) Gouveia και Castilho (2013)[45] και 5) Lin και Harnly (2010)[46]

Για το μεθανολικό εκχύλισμα της αχίλλειας η ένωση η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι κάποιος εστέρας του καφεϊκού-κινναμικού οξέος (27,02%) ακολουθεί κάποιος δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος (25,11%) και στη συνέχεια έπονται κάποιος άλλος δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος (12,08%), επίσης, ένας δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος (7,15%), ένας 7-O-

γλυκοζίτης της απιγενίνης (5,65%), ένας 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (5,12%) και ένας εστέρας του καφεϊκού-κινναμικού οξέος (4,25%).



Διάγραμμα 10. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος αχίλλειας. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 οι κορυφές των ενώσεων: εστέρας του καφεϊκού-κινναμικού οξέος, εστέρας του καφεϊκού-κινναμικού οξέος, δι-εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος, δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος και 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, αντίστοιχα.

Πίνακας 13. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού

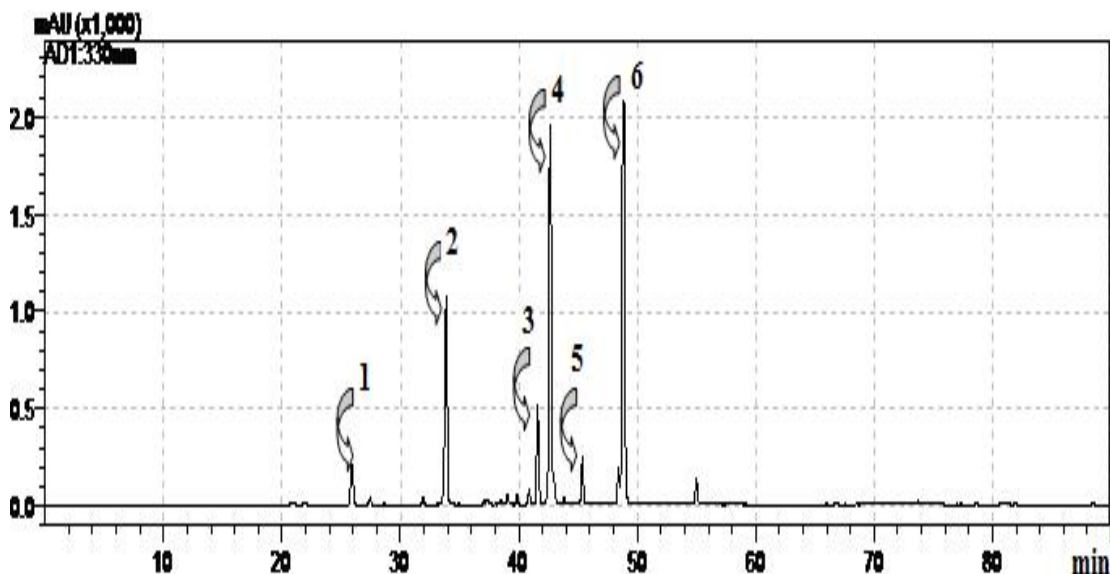
R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
25,91	-*	3,38		161	324, 243	
33,87	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	14,76		193	323, 241	**
41,59	απιγενίνη	6,16	269	269	340, 270	πρότυπη ένωση
42,65	μεθυλ-φλαβονόλη (τριμεθυλ- υδροξυ-κερκετίνη)	27,71	359		350, 256	**
45,36	μεθυλ-φλαβονόλη (τετραμεθυλο-υδροξυ- κερκετίνη)	2,81	373		351, 257	**
48,85	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	34,69	633	373, 325	320, 239	**

*Όπου (-) αποτελεί μη ταυτοποιημένη ένωση

**Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Mulinacci et al., (2000)[41]

Η ένωση η οποία βρίσκεται σε περισσότερη αφθονία στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού είναι κάποιο παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος (34,69%) και ακολουθούν η μεθυλ-φλαβονόλη, τριμέθυλο-υδροξυ-κερκετίνη

(27,71%), επίσης, ένα παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος (14,76%), η απιγενίνη (6,16%), κάποια άγνωστη ένωση (3,38%) και η μεθυλ-φλαβονόλη, τετρα-μεθυλο-υδροξυ-κερκετίνη (2,81%).



Διάγραμμα 11. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα χαμομηλιού. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5 και 6 οι κορυφές των ενώσεων: μη ταυτοποιημένη ένωση, παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος, απιγενίνη, τριμεθυλο υδροξυ κερκετίνη, τετραμεθυλο υδροξυ κερκετίνη και παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος, αντίστοιχα.

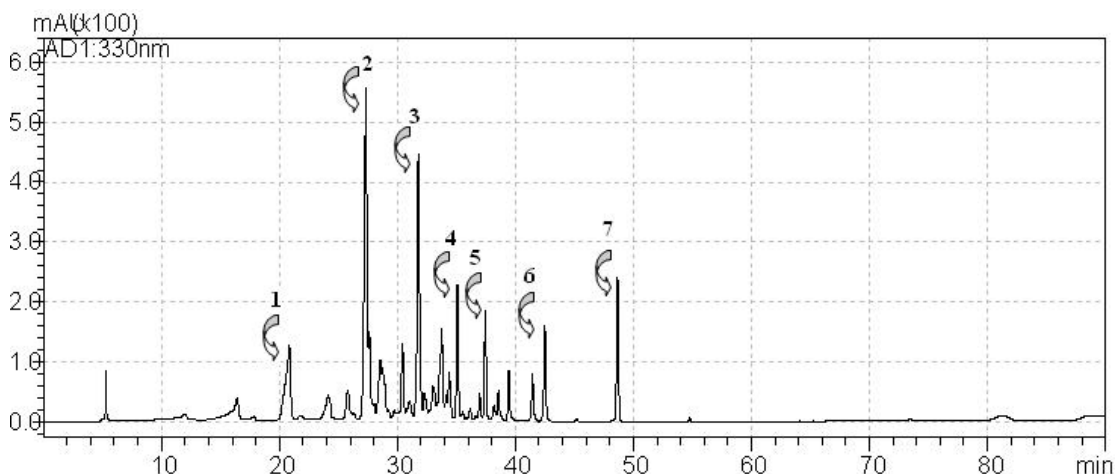
Πίνακας 14. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του μεθανολικού εκχυλίσματος του χαμομηλιού

R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
16,41	εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	3,97	353	353, 173	326, 234	*
20,84	εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	8,03	353	353	325, 234	*
27,62	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	23,28	515	515, 353, 173	320, 238	*
28,54	γλυκοζίτης φλαβονόλης	3,41	493		367, 257	*
28,75	7-O- γλυκοζίτης λουτεολίνης	3,23	447	447, 285, 167	350, 254	πρότυπη ένωση
30,44	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	2,97	515	515, 353	328, 247	*
31,77	7-O γλυκοζίτης απιγενίνης	11,99	431		338, 267	πρότυπη ένωση
33,75	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	3,03		537, 353	323, 251	*
35,09	παράγωγο απιγενίνης (ακέτυλο-γλυκοζίτης)	4,86	473		338, 266	*
37,45	παράγωγο απιγενίνης	3,82	515	515, 269	338, 267	*
42,49	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	3,88			312, 242	*
48,65	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	5,74			316, 241	*

*Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Lin και Harnly (2010) [46], 2)Gouveia και Castilho (2013)[42] και 3) Guimaraes et al., (2013)[44]

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού, 12 είναι οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις όπως φαίνεται και στον πίνακα 14. Η ένωση με το μεγαλύτερο ποσοστό είναι

ένας δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμμικού οξέος (23,28%) και ακολουθούν ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης (11,99%) κάποιος εστέρας του καφεϊκού-κινναμμικού οξέος (8,03%), κάποιο παράγωγο υδροξυ-κινναμμικού οξέος (5,74%), ένας ακετυλο-γλυκοζίτης (4,86%), ένας εστέρας του καφεϊκού-κινναμμικού οξέος (3,97%), ένα παράγωγο υδροξυ-κινναμμικού οξέος (3,88%), κάποιο παράγωγο της απιγενίνης (3,82%), ένας γλυκοζίτης φλαβονόλης (3,41%), ο 7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης (3,23%), ένα παράγωγο υδροξυ-κινναμμικού οξέος (3,03%) και ένας δι-εστέρας καφεϊκού- κινναμμικού οξέος (2,97%).



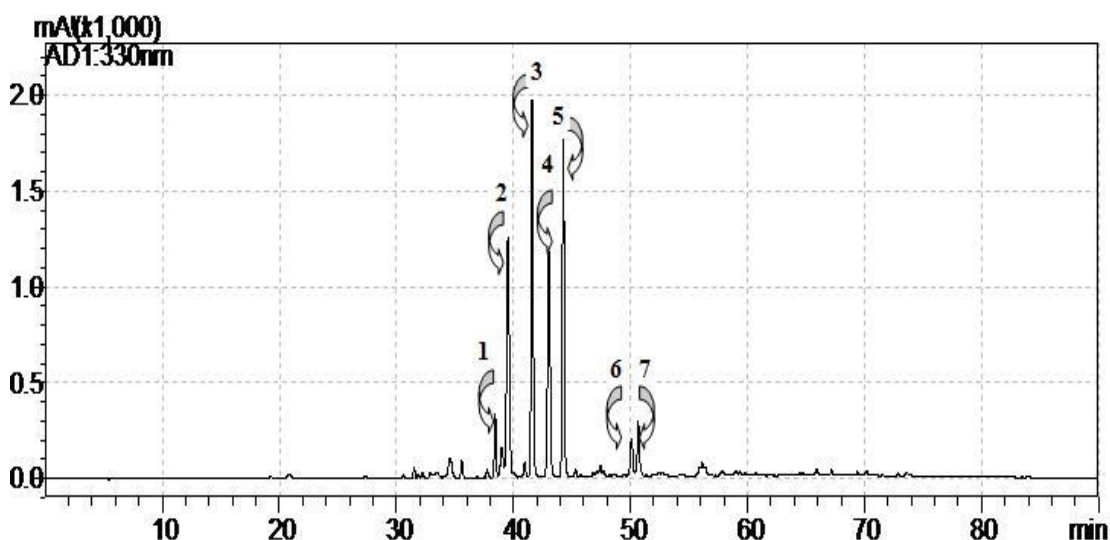
Διάγραμμα 12. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος χαμομηλιού. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 οι κορυφές των ενώσεων: εστέρας του καφεϊκού-κινναμμικού οξέος, δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμμικού οξέος, 7-O- γλυκοζίτης της απιγενίνης, ακετυλο-γλυκοζίτης, παράγωγο της απιγενίνης, παράγωγο υδροξυ-κινναμμικού οξέος, παράγωγο υδροξυ-κινναμμικού οξέος, αντίστοιχα.

Πίνακας 15. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα του φασκόμηλου

R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
38,44	λουτεολίνη	2,82	285		348, 254	πρότυπη ένωση
39,53	μεθυλ-φλαβόνη	17,96	299		335, 273	
41,59	απιγενίνη	21,41	269		340, 271	πρότυπη ένωση
	μεθυλ-φλαβόνη		299		338,273	1*
43,04	μεθυλ-φλαβόνη	16,26	313	313, 283, 197	335, 274	2, 3
44,26	μεθυλ-φλαβόνη (κιρσιμαριτίνη)	18,44	313	313, 283	335, 274	2, 3
50,09	μεθυλ-φλαβόνη	2,55	283		339, 267	1
50,67	μεθυλ-φλαβόνη	3,44	283		339, 267	1

*Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Kontogianni et al., (2013)[47], 2) Cuvelier, (1996)[48] 3) Almela et al., (2006)[49] και 4) Hossain et al., (2010)[50]

Στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του φασκόμηλου οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις σύμφωνα με τον πίνακα 15 είναι 8. Σε μεγαλύτερη αφθονία φαίνεται να είναι η απιγενίνη και μια μεθυλ-φλαβόνη, οι οποίες συνεκλούνται και είναι σε ποσοστό 21,41%. Ακολουθούν η κισμαριτίνη με ποσοστό 18,44%, κάποιες άλλες μεθυλ φλαβόνες με ποσοστά 17,96%, 16,26%, 3,44% 2,55% και η λουτεολίνη με ποσοστό 2,82%.



Διάγραμμα 13. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα φασκόμηλου. Όπου: 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 οι κορυφές των ενώσεων: λουτεολίνη, μεθυλ-φλαβόνη, απιγενίνη και μεθυλ-φλαβόνη, μεθυλ-φλαβόνη, κισμαριτίνη, μεθυλ-φλαβόνη και μεθυλ-φλαβόνη, αντίστοιχα.

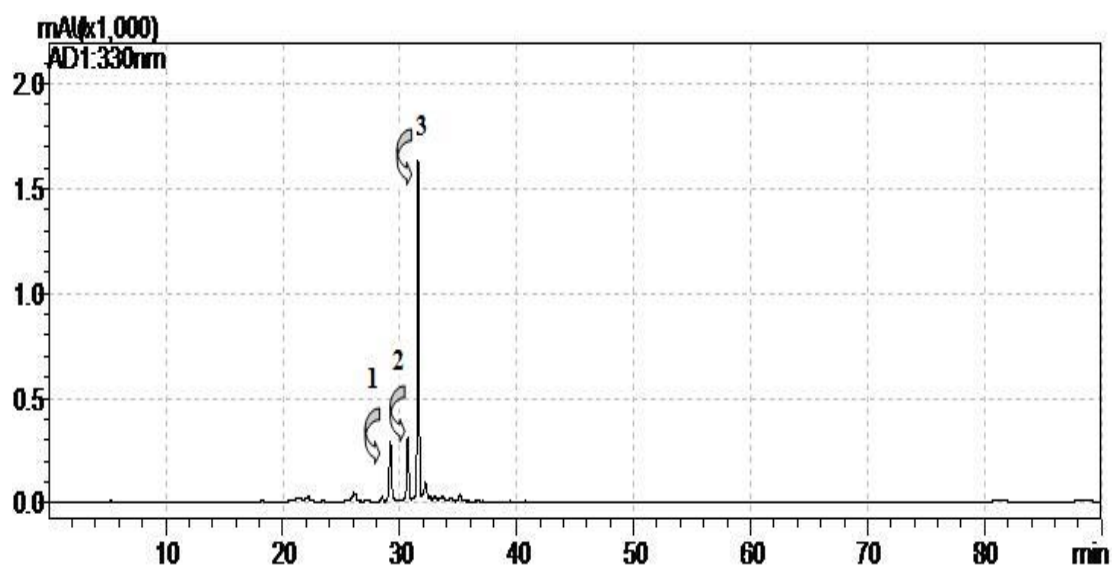
Πίνακας 16. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του μεθανολικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου

R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
26.08	γλυκοζίτης φλαβόνης	2,96	463	463, 285	340, 251	
29.20	7-O- γλυκοζίτης λουτεολίνης	12,94	447	447, 285	348, 254	πρότυπη ένωση
	γλυκουρινίδιο λουτεολίνης		461	461, 285	348, 254	
30.69	ισομερές ροσμαρινικού οξέος	11,82	359	359	324, 288, 235	
31.57	ροσμαρινικό οξύ	52,39	359	359	324, 234	πρότυπη ένωση
32.18	7-O- γλυκοζίτης απιγενίνης	3,33	431	431, 269	335, 268	πρότυπη ένωση

*Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Zimmermann et al., (2011)[43], 2) Lin και Harnly (2010)[46] και 3) Kontogianni et al., (2013)[47]

Τέλος, στο μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου το ροσμαρινικό οξύ φαίνεται να έχει την υψηλότερη συγκέντρωση, σε ποσοστό 52,39% και ακολουθούν ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης ο οποίος συνεκλύεται με κάποιο γλυκουρινίδιο της

λουτεολίνης (12,94%), ένα ισομερές ροσμαρινικού οξέος (11,82%), ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης (3,33%) και κάποιος γλυκοζίτης φλαβόνης (2,96%).



Διάγραμμα 14. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος χαμομηλιού. Όπου 1,2 και 3 οι κορυφές των ενώσεων: 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης, ισομερές ροσμαρινικού οξέος και ροσμαρινικό οξύ, αντίστοιχα.

3.4. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης

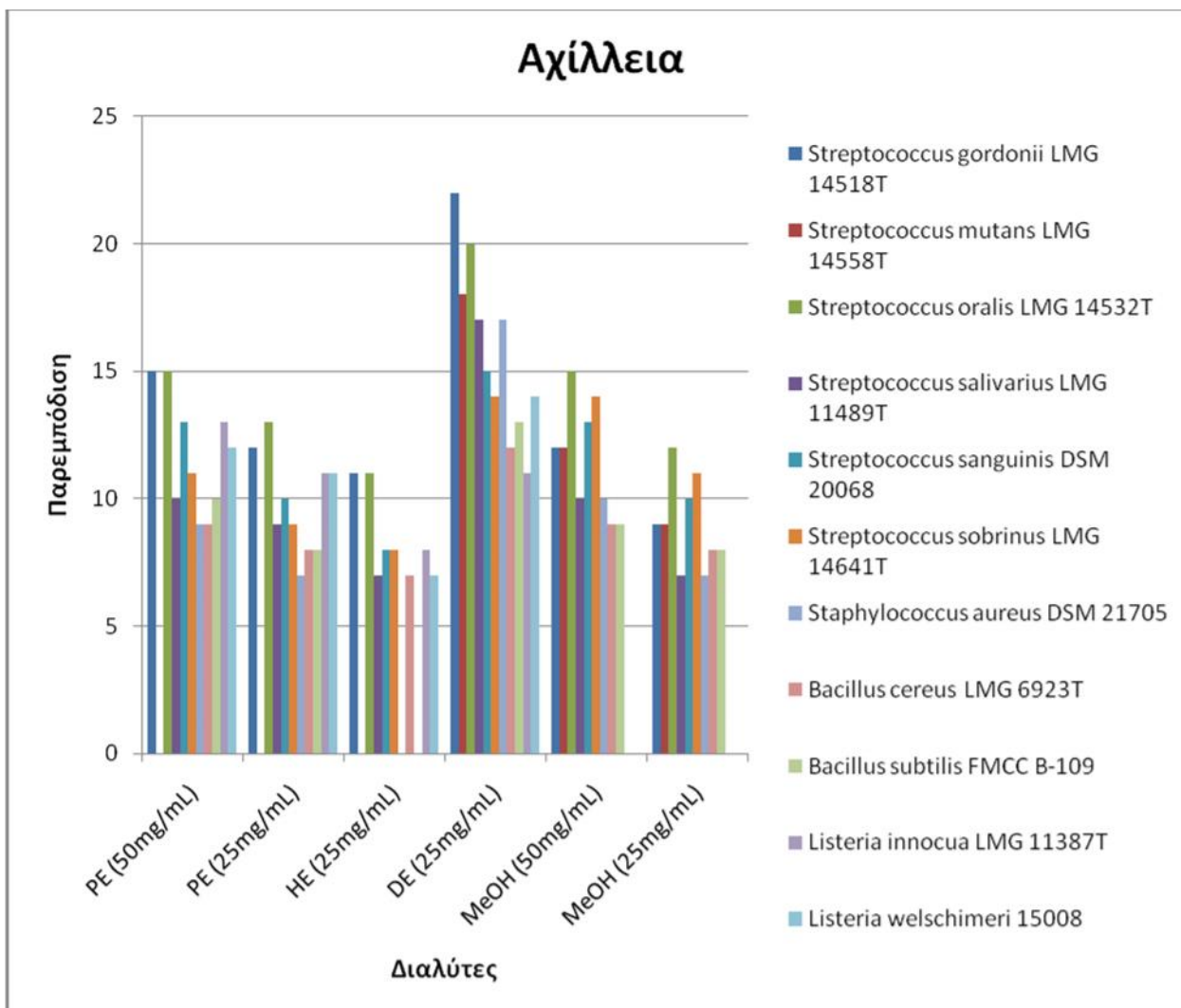
Στον επόμενο πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης σε σχέση με τα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα και τους διαλύτες.

Πίνακας 17. Παρεμπόδιση των φυτικών εκχυλισμάτων της αχίλλειας εναντίον των μικροοργανισμών - στόχων

Μικροοργανισμός	1 ^ο στάδιο		2 ^ο στάδιο	3 ^ο στάδιο	4 ^ο στάδιο	
	PE*		HE	DE	MeOH	
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
	50	25	25	25	50	25
<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	15**	12	11	22	12	9
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	0	0	0	18	12	9
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	15	13	11	20	15	12
<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	10	9	7	17	10	7
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	13	10	8	15	13	10
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	11	9	8	14	14	11
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	9	7	0	17	10	7
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	9	8	7	12	9	8
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	10	8	0	13	9	8
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	13	11	8	11+3	0	0
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	12	11	7	14+5	0	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	10	8	0	14+5	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	10	8	0	12	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	0	0	0	9	0	0

*Όπου PE, HE, DE, MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο δυαιθυλαιθέρας και μεθανόλη αντίστοιχα.

**Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης σε mm.



Διάγραμμα 15. Απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλίσμάτων της αχίλλειας εναντίον των κατά Gram+ μικροοργανισμών.

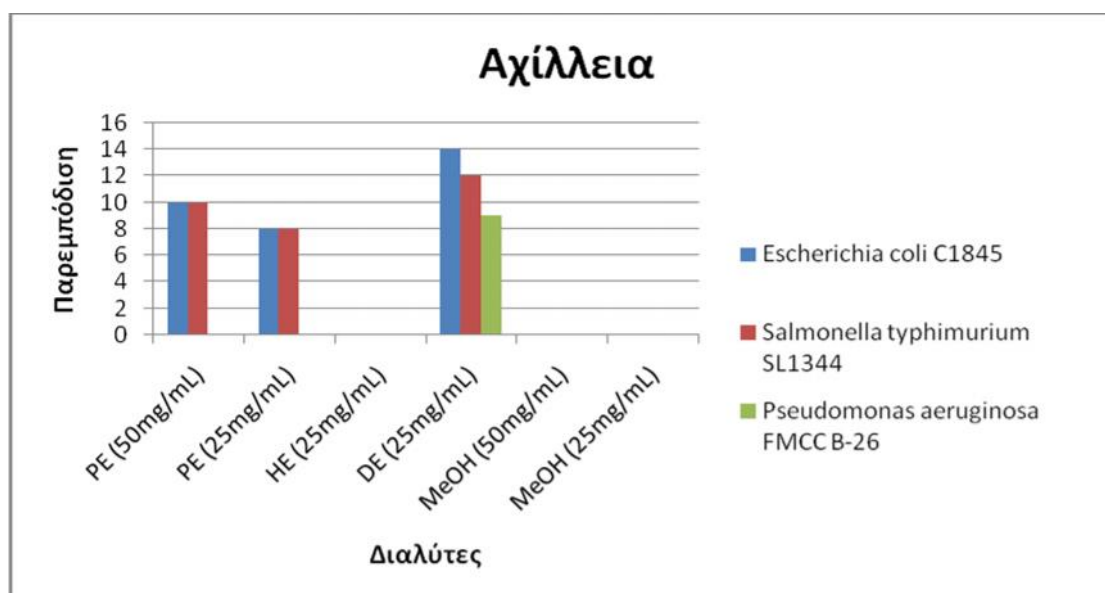
Σύμφωνα με τον πίνακα 17 και το διάγραμμα 15 μπορεί να παρατηρηθεί ότι το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενώ, το εκχύλισμα του εξανίου την μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τους υπόλοιπους διαλύτες στους κατά Gram+ μικροοργανισμούς. Αυτό γιατί, το αιθερικό εκχύλισμα περιλαμβάνει κυρίως φλαβονοειδή στην άγλυκη μορφή τους που είναι αντιμικροβιακοί παράγοντες ισχυρότεροι από ότι τα συστατικά που ανιχνεύονται στα άλλα εκχυλίσματα.

Πιο συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα σε συγκέντρωση 50 mg/mL παρουσιάζεται μηδενική παρεμπόδιση στον *Str. mutans* ενώ, στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς παρουσιάζεται εύρος παρεμπόδισης από 9 έως 15 mm με υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση στους μικροοργανισμούς *Str. gordonii* και *Str. oralis*. Το εκχύλισμα του πετρελαϊκού στην χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζει και χαμηλότερη αντιμικροβιακή δράση, ενώ, εντελώς μηδενική παρεμπόδιση

παρουσίασε στον ίδιο μικροοργανισμό (*Str. mutans*). Το εύρος παρεμπόδισής του κυμαίνεται μεταξύ 7 mm (*St. aureus*) και 13 mm (*Str. oralis*).

Το εξανικό εκχύλισμα δεν παρεμποδίζει καθόλου τους μικροοργανισμούς *Str. mutans*, *St. aureus* και *B. subtilis*. Η παρεμπόδιση που προκαλεί στους άλλους μικροοργανισμούς είναι μεταξύ 7 και 11 mm (*Str. gordonii* και *Str. oralis*). Το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα παρεμποδίζει τη δράση όλων των κατά Gram + μικροοργανισμών σε εύρος 11 με 22 mm (*Str. gordonii*).

Μηδενική παρεμπόδιση φαίνεται να παρουσιάζεται στους μικροοργανισμούς *L. inppocua* και *L. welschimeri* και στα δύο μεθανολικά εκχυλίσματα διαφορετικής συγκέντρωσης. Στο μεθανολικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αναλόγως των μικροοργανισμών η παρεμπόδιση κυμαίνεται μεταξύ 9 mm και 15 mm (*Str. oralis*) ενώ, με τη μικρότερη συγκέντρωση μεταξύ 7 και 12 (*Str. oralis*).



Διάγραμμα 16. Απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων της αχίλλειας εναντίον των κατά Gram- μικροοργανισμών.

Σύμφωνα με τον πίνακα 17 και το διάγραμμα 16, φαίνεται ότι τα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα δεν κατάφεραν να αναστείλουν την δράση των κατά Gram- μικροοργανισμών στο επίπεδο που ανέστειλαν την δράση των κατά Gram+ μικροοργανισμών.

Πιο συγκεκριμένα, τόσο το εξανικό όσο και τα μεθανολικά εκχυλίσματα δεν ανέστειλαν την δράση κανενός από τους 3 μικροοργανισμούς (*E. coli*, *S. typhimurium* και *Ps. aeruginosa*). Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και στις 2 συγκεντρώσεις δεν κατάφεραν να αναστείλουν την δράση του *Ps. aeruginosa*

ενώ, για τους άλλους 2 μικροοργανισμούς η παρεμπόδιση κυμάνθηκε στο ίδιο επίπεδο και για τους 2 τόσο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 mm) όσο και στη μικρότερη συγκέντρωση (8 mm). Το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα παρουσίασε την μεγαλύτερη παρεμπόδιση και στους 3 κατά Gram- μικροοργανισμούς μεταξύ 9 mm (*Ps. aeruginosa*) και 14 mm (*E. coli*).

Σύμφωνα με μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Candan et al., 2003, βρέθηκε μηδενική παρεμπόδιση μεθανολικών εκχυλισμάτων σε τέσσερις από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς της παρούσας μελέτης (*St. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* και *Ps. aeruginosa*). Στην ίδια μελέτη, το αιθέριο έλαιο της αχίλλειας, όπως ακριβώς και τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα της παρούσας εργασίας, βρέθηκε να παρεμποδίζει τους μικροοργανισμούς *St. aureus* και *B. cereus* ενώ, μηδενική σημειώθηκε η παρεμπόδιση στους άλλους δύο, *E. coli* και *Ps. aeruginosa*. Η παρεμπόδιση που προκαλεί το αιθέριο έλαιο της αχίλλειας μπορεί να συγκριθεί με το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα καθώς, με την ανάλυση στον αέριο φασματογράφο GC/MS πολλές ουσίες του εκχυλίσματος με αντιμικροβιακή δράση είναι ίδιες με αυτές του αιθέριου ελαίου [35].

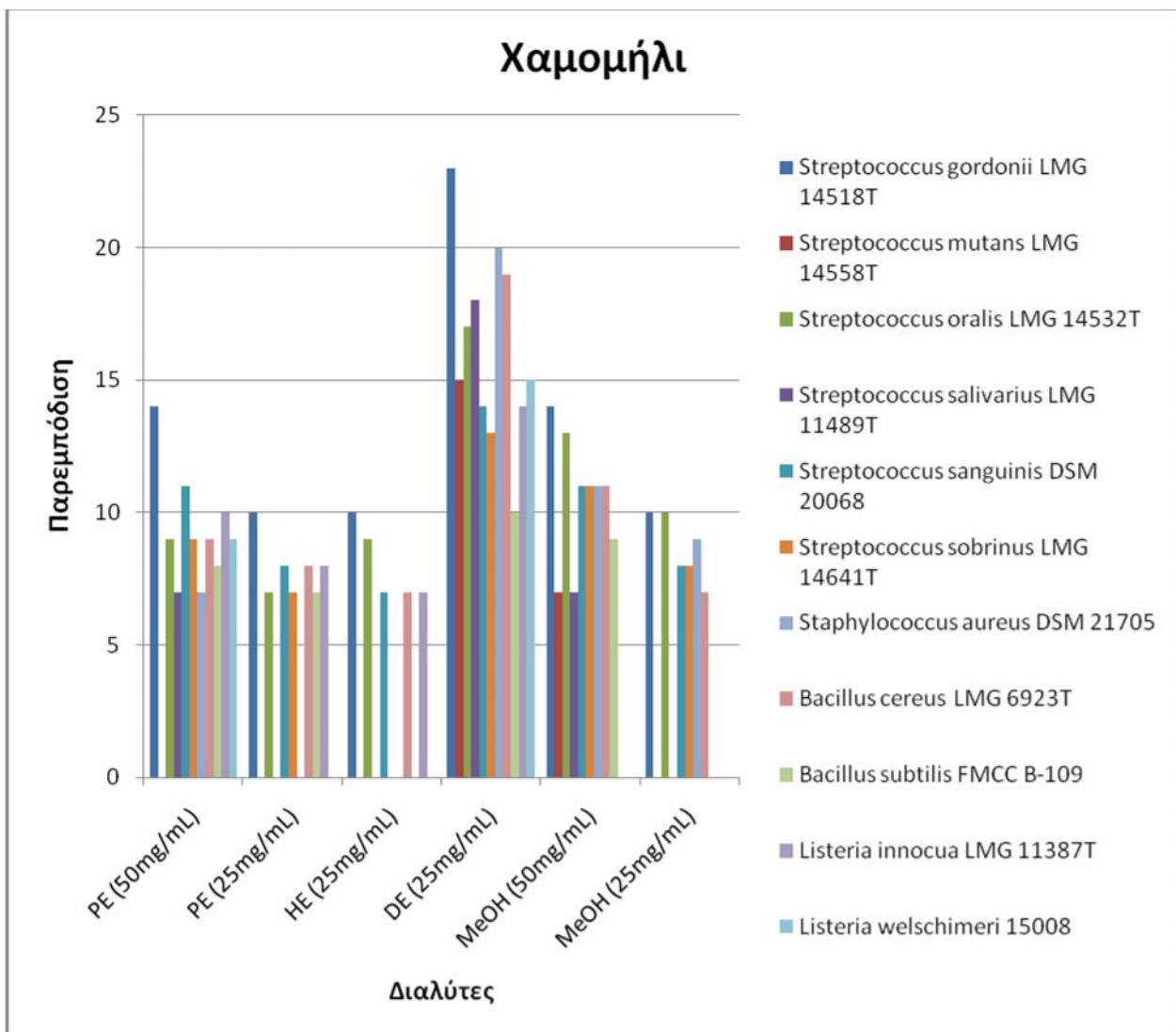
Σε άλλη μελέτη από τους Kumar et al., 2006 σε μεθανολικά εκχυλίσματα δεν βρέθηκε να αναστέλλεται η δράση πολλών μικροοργανισμών μερικών εκ των οποίων μελετήθηκαν και στην παρούσα μελέτη π.χ. *B. cereus*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* [51].

Πίνακας 18. Παρεμπόδιση των φυτικών εκχυλισμάτων του χαμομηλιού εναντίον των μικροοργανισμών - στόχων

Μικροοργανισμός	1 ^ο στάδιο		2 ^ο στάδιο	3 ^ο στάδιο	4 ^ο στάδιο	
	PE*		HE	DE	MeOH	
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
	50	25	25	25	50	25
<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	14**	10	10	23	14	10
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	0	0	0	15	7	0
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	9	7	9	17	13	10
<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	7	0	0	18	7	0
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	11	8	7	14	11	8
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	9	7	0	13	11	8
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	7	0	0	20	11	9
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	9	8	7	19	11	7
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	8	7	0	10	9	0+7
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	10	8	7	14+2	0	0
<i>Listeria welshimeri</i> 15008	9	0	0	15	0	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	12	10	0	14+5	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	12	10	0	14	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	0	0	0	14	0	0

*Όπου PE, HE, DE, MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο δυαιθυλαιθέρας και μεθανόλη αντίστοιχα.

**Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης σε mm.



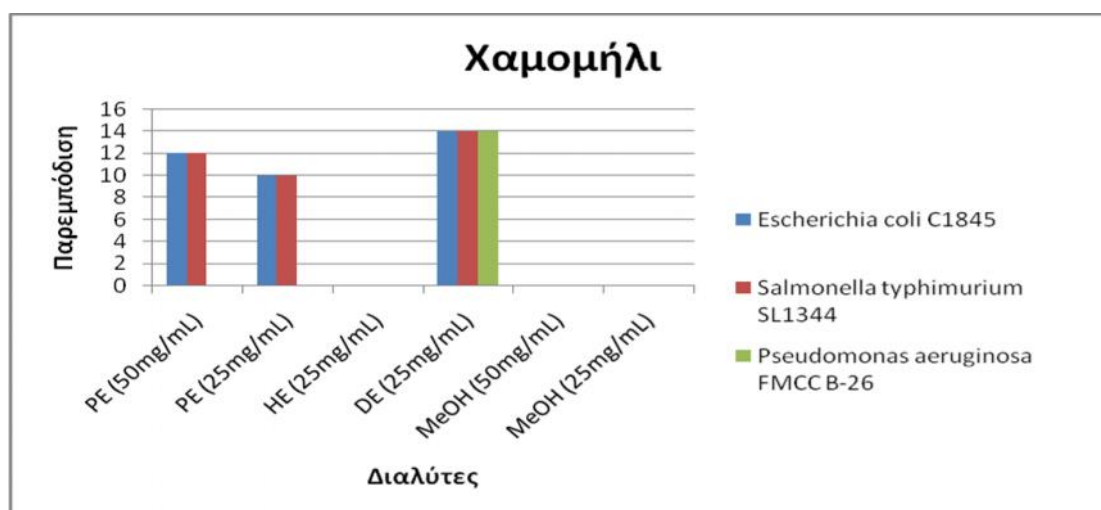
Διάγραμμα 17. Απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων του χαμομηλιού εναντίον των κατά Gram+ μικροοργανισμών.

Στο χαμομήλι (πίνακας 18, διάγραμμα 17) όπως και στην αχίλλεια παρατηρείται το ίδιο πράγμα, ότι, το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενώ, το εκχύλισμα του εξανίου την μικρότερη δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα στους κατά Gram+ μικροοργανισμούς.

Πιο συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα σε συγκέντρωση 50 mg/mL παρουσιάζεται μηδενική παρεμπόδιση στον *Str. mutans* ενώ, στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς παρουσιάζεται εύρος παρεμπόδισης από 7 έως 14 mm με υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση στον *Str. gordonii*. Το εκχύλισμα του πετρελαϊκού στην χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζει και χαμηλότερη αντιμικροβιακή δράση, ενώ, εντελώς μηδενική παρεμπόδιση παρουσίασε στον ίδιο μικροοργανισμό, *Str. mutans* αλλά και σε άλλους 2, *St. aureus* και *L. welschimeri*. Το εύρος παρεμπόδισής του κυμαίνεται μεταξύ 7 και 10 mm (*Str. gordonii*).

Το εξανικό εκχύλισμα δεν προκαλεί καθόλου παρεμπόδιση στους περισσότερους μικροοργανισμούς (*Str. mutans*, *St. aureus*, *B. subtilis*, *Str. sobrinus*, *Str. salivarius* και *L. welschimeri*). Το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα παρεμποδίζει τη δράση όλων των κατά Gram + μικροοργανισμών σε εύρος 10 mm (*B. subtilis*) με 23 mm (*Str. gordonii*).

Μηδενική παρεμπόδιση φαίνεται να παρουσιάζεται στους μικροοργανισμούς *L. innocua* και *L. welschimeri* και στα δύο μεθανολικά εκχυλίσματα διαφορετικής συγκέντρωσης. Στο μεθανολικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αναλόγως των μικροοργανισμών η παρεμπόδιση κυμαίνεται μεταξύ 9 και 14 mm (*Str. gordonii*) ενώ, με τη μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζονται κι άλλες μηδενικές παρεμποδίσεις (*Str. mutans*, *Str. salivarius* και *B. subtilis*). Η μεγαλύτερη παρεμπόδιση αφορά τους μικροοργανισμούς *Str. oralis* και *Str. gordonii*.



Διάγραμμα 18. Απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων του χαμομηλιού εναντίον των κατά Gram- μικροοργανισμών.

Σύμφωνα με τον πίνακα 18 και το διάγραμμα 18, αλλά όπως παρατηρήθηκε και στην αχίλλεια, φαίνεται ότι τα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα δεν κατάφεραν να αναστείλουν την δράση των κατά Gram- μικροοργανισμών στο επίπεδο που ανέστειλαν την δράση των κατά Gram+ μικροοργανισμών.

Πιο συγκεκριμένα, τόσο το εξανικό όσο και τα μεθανολικά εκχυλίσματα δεν ανέστειλαν την δράση κανενός από τους 3 μικροοργανισμούς (*E. coli*, *S. typhimurium* και *Ps. aeruginosa*). Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και στις 2 συγκεντρώσεις δεν κατάφεραν να αναστείλουν την δράση του *Ps. aeruginosa* ενώ, για τους άλλους 2 μικροοργανισμούς η παρεμπόδιση κυμάνθηκε στο ίδιο επίπεδο και για τους 2 τόσο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (12 mm) όσο και στη

μικρότερη συγκέντρωση (10 mm). Το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα παρουσίασε την μεγαλύτερη παρεμπόδιση (14 mm) και στους 3 κατά Gram- μικροοργανισμούς.

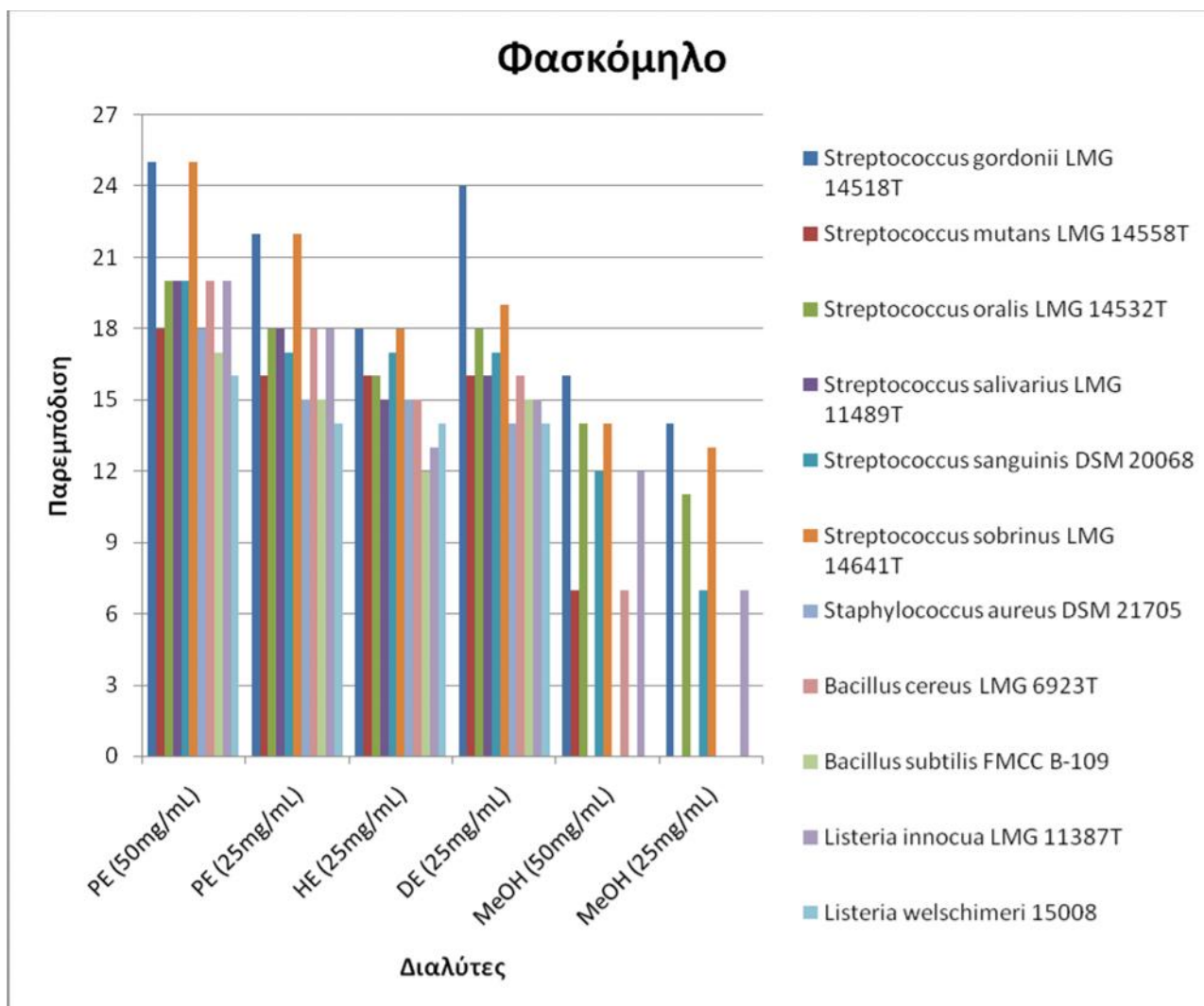
Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Sokoníć et al., 2010, σε αιθέριο έλαιο χαμομηλιού η ζώνη παρεμπόδισης που προκλήθηκε σε 11 μικροοργανισμούς-στόχους κυμάνθηκε μεταξύ 0 και 13 mm. Μεταξύ των 11 μικροοργανισμών ήταν και οι *B. subtilis*, *St. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* και *Ps. aeruginosa* και οι ζώνες παρεμπόδισης ήταν 12, 10, 9, 8 και 0 mm, αντίστοιχα [53].

Πίνακας 19. Παρεμπόδιση των φυτικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου εναντίον των μικροοργανισμών - στόχων

Μικροοργανισμός	1 ^ο στάδιο		2 ^ο στάδιο	3 ^ο στάδιο	4 ^ο στάδιο	
	PE*		HE	DE	MeOH	
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
	50	25	25	25	50	25
<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	25**	22	18	24	16	14
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	18	16	16	16	7	0
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	20	18	16	18	14	11
<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	20	18	15	16	0	0
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	20	17	17	17	12	7
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	25	22	18	19	14	13
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	18	15	15	14	0	0
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	20	18	15	16	7	0
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	17	15	12	15	0	0
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	20	18	13	15	12	7
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	16	14	14	14	0	0
<i>Escherichia coli</i> C1845	0	0	0	7	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	0	0	0	7	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	0	0	0	0+10	0	0

*Όπου PE, HE, DE, MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο δυαιθυλαιθέρας και μεθανόλη αντίστοιχα.

**Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης σε mm.



Διάγραμμα 19. Απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλίσμάτων του φασκόμηλου εναντίον των κατά Gram+ μικροοργανισμών.

Τα εκχυλίσματα του φασκόμηλου όπως φαίνεται στα διαγράμματα 19 και 20, λειτουργούν διαφορετικά από τα εκχυλίσματα των δυο φυτών της οικογένειας Asteraceae (αχίλλεια, χαμομήλι) όπου εκεί παρατηρήθηκε σε γενικές γραμμές μια ομοιομορφία με μόνη διαφορά στις εντάσεις όσον αφορά την παρεμπόδιση.

Σύμφωνα με τον πίνακα 19 και το διάγραμμα 19 μπορεί να παρατηρηθεί ότι το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα (50 mg/mL) του φασκόμηλου παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενώ, το εκχύλισμα της μεθανόλης (25 mg/mL) την μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτικά εκχυλίσματα στους κατά Gram+ μικροοργανισμούς. Γενικώς, τα εκχυλίσματα του φασκόμηλου φαίνεται να είναι ισχυρότερα από αυτά της αχίλλειας και του χαμομηλιού για όλους τους διαλύτες. Αυτό γιατί, η σύσταση τους είναι διαφορετική όπως είδαμε από τα κεφάλαια του GC και του LC. Το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα του

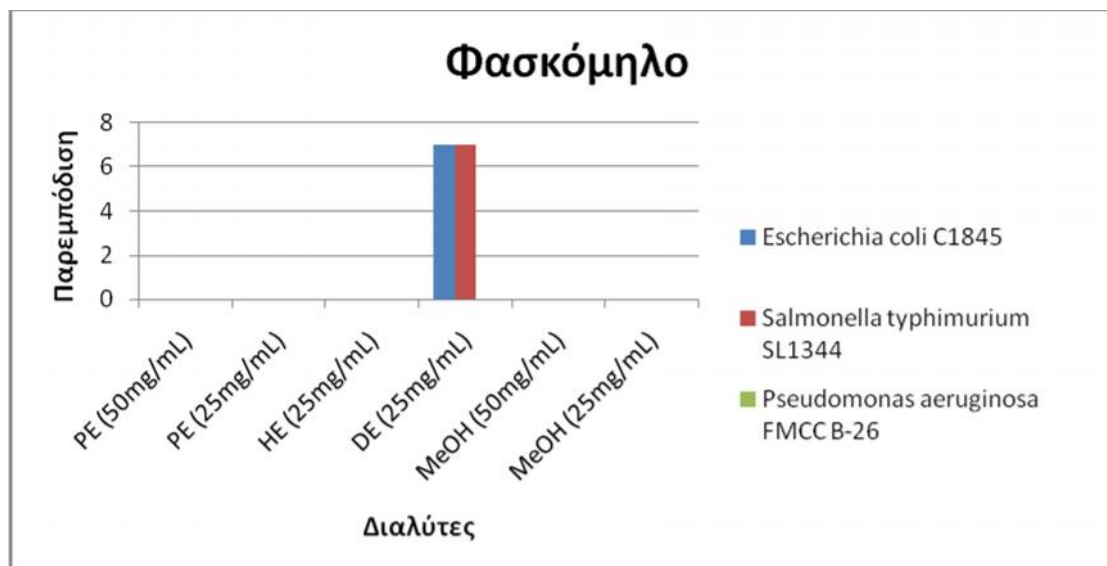
φασκόμηλου περιέχει ουσίες με πιο έντονη αντιμικροβιακή δράση από ότι αυτές των αντίστοιχων εκχυλίσμάτων της αχίλλειας και του χαμομηλιού.

Πιο συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα σε συγκέντρωση 50 mg/mL παρουσιάζεται εύρος παρεμπόδισης από 16 έως 25 mm με υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση στους *Str. gordonii* και *Str. sobrinus*. Το εκχύλισμα του πετρελαϊκού στην χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζει και χαμηλότερη αντιμικροβιακή δράση, ενώ, το εύρος παρεμπόδισής του κυμαίνεται μεταξύ 14 και 22 mm με υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση στους ίδιους μικροοργανισμούς με το εκχύλισμα του πετρελαϊκού υψηλότερης συγκέντρωσης.

Το εξανικό εκχύλισμα του φασκόμηλου προκαλεί παρεμπόδιση σε όλους τους μικροοργανισμούς με εύρος που κυμαίνεται μεταξύ 12 και 18 mm. Την μεγαλύτερη παρεμπόδιση την προκάλεσε στους ίδιους μικροοργανισμούς με τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα (*Str. gordonii* και *Str. sobrinus*). Το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα προκάλεσε και αυτό, μετά τον πετρελαϊκό (50 mg/mL), μεγάλη παρεμπόδιση με εύρος μεταξύ 14 και 24 mm (*Str. gordonii*).

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα στο φασκόμηλο ήταν τα μόνο που δεν προκάλεσαν παρεμπόδιση σε κάποιους μικροοργανισμούς. Ο λόγος είναι ότι το κυρίαρχο συστατικό στο μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου είναι το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από γλυκοζίτες φλαβονοειδών που δεν θεωρούνται τόσο ισχυρά αντιμικροβιακά.

Το μεθανολικό εκχύλισμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση προκάλεσε μηδενική παρεμπόδιση στους *St. aureus*, *B. subtilis*, *Str. salivarius* και *L. welschimeri* ενώ, η υψηλότερη παρεμπόδιση ήταν στον *Str. gordonii*. Το μεθανολικό εκχύλισμα στη μικρότερη συγκέντρωση παρουσίασε μηδενική παρεμπόδιση στους ίδιους μικροοργανισμούς που προκάλεσε και το άλλο μεθανολικό και σε δύο επιπλέον, τους *Str. mutans* και *B. cereus*. Υψηλότερη παρεμπόδιση και αυτό όπως και όλα τα άλλα εκχυλίσματα του φασκόμηλου προκάλεσε στον *Str. Gordonii*.



Διάγραμμα 20. Απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου εναντίον των κατά Gram- μικροοργανισμών.

Η δράση των κατά Gram- μικροοργανισμών σύμφωνα με το διάγραμμα 20, φαίνεται ότι δεν παρεμποδίζεται καθόλου εκτός της περίπτωσης του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα, όπου κι εκεί παρεμποδίζει την δράση δύο εκ των τριών μικροοργανισμών, *E. coli*, και *S. typhimurium*.

Σύμφωνα με τον Bonjar, 2003, σε μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου βρέθηκε ότι δεν επηρεάζονται καθόλου οι μικροοργανισμοί *E. coli*, και *Ps. aeruginosa* όπως ακριβώς και στην παρούσα μελέτη, ενώ παρεμπόδιση σημειώθηκε για τους μικροοργανισμούς *St. aureus* με διάμετρο ζώνης παρεμπόδισης 16mm και *B. cereus* με διάμετρο ζώνης παρεμπόδισης 12mm [53]. Αντίθετα, σε άλλη έρευνα που πραγματοποίησαν οι Stagos et al., 2012 βρέθηκε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου δεν έχει καθόλου αντιμικροβιακή δράση στον *St. aureus* ενώ, ζώνη παρεμπόδισης προκάλεσε το υδατικό εκχύλισμα και συγκεκριμένα $12,67 \pm 1,52$ mm [54].

3.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιείται με τη μέθοδο DPPH, τα αποτελέσματα της δράσης των εκχυλισμάτων εκφράζονται με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος αφορά τον υπολογισμό του IC₅₀ κάθε φυτικού εκχυλίσματος ενώ, ο δεύτερος εκφράζει τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων σε μM Trolox σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς του διαγράμματος 1. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα το εύρος συγκεντρώσεων είναι μεταξύ 5 και 50 μM Trolox ενώ, η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι η:

$$y = 1,993x + 1,479$$

Στον πίνακα 20 παρουσιάζεται το IC₅₀ για κάθε φυτικό εκχύλισμα. Για αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα, του διαιθυλαιθέρα και της μεθανόλης και των τριών φυτών. Τα εξανικά εκχυλίσματα δεν εξετάστηκαν γιατί μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των φυτικών εκχυλισμάτων στο GC/MS παρατηρήθηκε ότι ο πετρελαϊκός αιθέρας συμπαρασύρει περισσότερες ουσίες από ότι το εξάνιο.

Πίνακας 20. IC₅₀ φυτικών εκχυλισμάτων

Φυτά	Διαλύτες	IC ₅₀ (μg εκχυλίσματος/mL)
Αχίλλεια	PE*	-
	DE	1060,0 $\pm$ 2,0
	MeOH	50,0 $\pm$ 1,0
Χαμομήλι	PE	-
	DE	590,0 $\pm$ 0,8
	MeOH	101,0 $\pm$ 1,0
Φασκόμηλο	PE	44,0 $\pm$ 1,0
	DE	5,0 $\pm$ 0,8
	MeOH	25,0 $\pm$ 0,9

*Όπου PE, DE, MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, δυαιθυλαιθέρας και μεθανόλη αντίστοιχα.

Το IC₅₀ εκφράζει την συγκέντρωση του φυτικού εκχυλίσματος που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική ένταση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά 50%. Όσο πιο μικρό είναι το IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το φυτικό εκχύλισμα. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 19, τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα τόσο της αχίλλειας όσο και του χαμομηλιού δεν παρουσιάζουν IC₅₀ και η αντιοξειδωτική δράση που προβάλλουν είναι σχεδόν ανύπαρκτη.

Το φυτό με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το φασκόμηλο και πιο συγκεκριμένα το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα με το IC₅₀ να είναι 5,0±0,8 μg/mL, στη συνέχεια, στη σειρά της αντιοξειδωτικής δράσης ακολουθεί το μεθανολικό εκχύλισμα (25,0±0,9 μg/mL) και έπειτα από αυτό, το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα (44,0±1,0 μg/mL). Το μεθανολικό εκχύλισμα της αχίλλειας (50,0±1,0 μg/mL) παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού (101,0±1,0 μg/mL) ενώ, αντίθετα, το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού (590±0,8 μg/mL) παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας (1060,0±2,0 μg/mL).

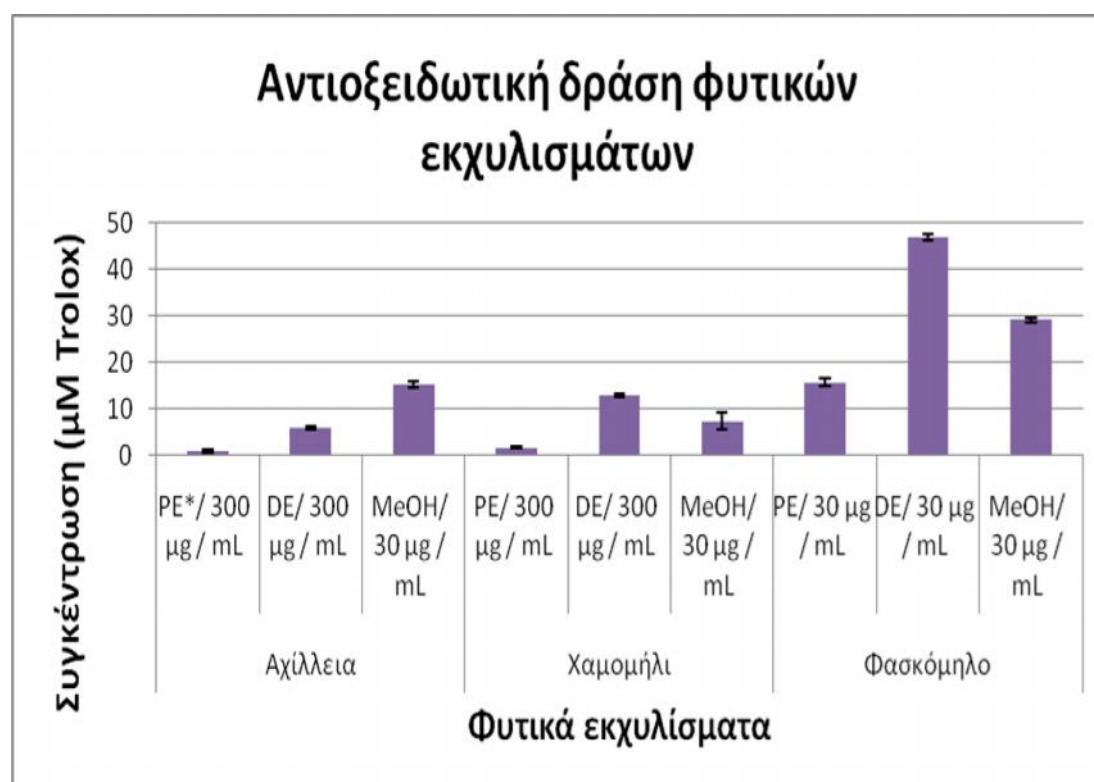
Ένας άλλος τρόπος προσέγγισης της αντιοξειδωτικής δράσης παρουσιάζεται στον πίνακα 21 και το διάγραμμα 21, όπου εκεί παρουσιάζονται τα φυτικά εκχυλίσματα ως ισοδύναμα Trolox ώστε να είναι εύκολη η σύγκριση μεταξύ των εκχυλισμάτων. Για τα μεθανολικά εκχυλίσματα και των τριών φυτών και τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα και του πετρελαϊκού αιθέρα του φασκόμηλου η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που μελετήθηκε ήταν 30 μg εκχυλίσματος/mL και η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 7,3±2,0 και 47,0±0,7 μM Trolox για το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού και το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του φασκόμηλου, αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, επειδή τα εκχυλίσματα της αχίλλειας και του χαμομηλιού του πετρελαϊκού αιθέρα και του διαιθυλαιθέρα παρουσιάζουν πολύ μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα η αντιστοιχία έγινε με βάση τη συγκέντρωση 300 μg εκχυλίσματος / mL. Σε αυτά τα εκχυλίσματα, η συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 0,8±0,2 και 12,8±0,4 μM Trolox για το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα της αχίλλειας και το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού, αντίστοιχα. Γενικώς όμως, μπορεί να παρατηρηθεί ότι τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα τόσο της αχίλλειας όσο και του χαμομηλιού παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική αντιοξειδωτική δράση.

Πίνακας 21. Αντιοξειδωτική δράση φυτικών εκχυλισμάτων εκφρασμένες σε μM Trolox

Φυτά	Διαλύτες/ Συγκέντρωση (μg / mL)	Συγκέντρωση (μM Trolox)
Αχίλλεια	PE*/ 300	$0,8 \pm 0,2$
	DE/ 300	$5,8 \pm 0,3$
	MeOH/ 30	$15,1 \pm 0,6$
Χαμομήλι	PE/ 300	$1,6 \pm 0,1$
	DE/ 300	$12,8 \pm 0,4$
	MeOH/ 30	$7,3 \pm 2,0$
Φασκόμηλο	PE/ 30	$16,0 \pm 0,8$
	DE/ 30	$47,0 \pm 0,7$
	MeOH/ 30	$29,0 \pm 0,5$

*Όπου PE, DE, MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, δυαιθυλαιθέρας και μεθανόλη αντίστοιχα.



Διάγραμμα 21. Αντιοξειδωτική δράση φυτικών εκχυλισμάτων μM Trolox

Οι McCune και Johns το 2007, μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση και πόσο αυτή διαφοροποιείται αναλόγως των διαφορετικών φυτικών μερών και της ανάπτυξης 35 φυτών, μεταξύ αυτών και η αχίλλεια. Η πειραματική διαδικασία

αφορούσε μεθανολικά εκχυλίσματα ρίζας, ανθέων και φύλλων της αχίλλειας και βρέθηκε ότι το IC₅₀ για κάθε φυτικό μέρος είναι 67,64 ppm, 41,23 ppm και 35,86 ppm, αντίστοιχα, δηλαδή, η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζεται στα φύλλα της αχίλλειας [55].

Οι Benedek et al., βρήκαν σε μελέτη που πραγματοποίησαν το 2007, ότι το μεθανολικό εκχύλισμα της αχίλλειας έχει IC₅₀ 23 µg/mL, τα φλαβονοειδή που περιέχονται σε αυτό έχουν 20 µg/mL, ενώ, κάποιες ουσίες που περιέχονται στο εκχύλισμα σε υψηλές συγκεντρώσεις όπως λουτεολίνη, κερκετίνη, 7-O-γλυκοζιτης της απιγενίνης και 7-O-γλυκοζιτης της λουτεολίνης εξετάστηκαν και βρέθηκε ότι παρουσιάζουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση με IC₅₀ 100 µg/mL, 75 µg/mL, >200 µg/mL, >200 µg/mL, αντίστοιχα. Από τα παραπάνω φαίνεται ξεκάθαρα ότι υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των συστατικών γιατί ενώ, από μόνα τους παρουσιάζουν μικρή αντιοξειδωτική δράση, στο εκχύλισμα που δρουν από κοινού παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση [56].

Οι Guimarães et al., σε μελέτη που πραγματοποίησαν το 2013 σύγκριναν την αντιοξειδωτική δράση μεθανολικού εκχυλίσματος χαμομηλιού και αφεψήματος χαμομηλιού μέσω των τιμών IC₅₀ και ενώ, το IC₅₀ του μεθανολικού εκχυλίσματος ήταν 800,36±49,09 µg/mL το αφέψημα παρουσίασε μεγαλύτερη δράση με το EC₅₀ να είναι 344,02±18,65 µg/mL [44].

Οι Roby et al., το 2012 ερεύνησαν τις αυξομειώσεις της αντιοξειδωτικής δράσης, εκφρασμένη σε EC₅₀, μεταξύ των διαφορετικών εκχυλισμάτων χαμομηλιού. Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και το ακολουθούν, το αιθανολικό, το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα και τέλος, το εξανικό εκχύλισμα, αποτέλεσμα που έρχεται να συμφωνήσει με την παρούσα μελέτη [57].

Οι Albano και Miguel σε μελέτη που πραγματοποίησαν το 2012 ασχολήθηκαν με τις βιολογικές δραστηριότητες διάφορων αρωματικών φυτών τα οποία αναπτύσσονται στην Πορτογαλία, μεταξύ των φυτών αυτών ήταν και το φασκόμηλο. Πιο συγκεκριμένα, για την αντιοξειδωτική δράση των φυτών δοκιμάστηκαν εκχυλίσματα φασκόμηλου τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα, n-βουτανόλης και υδατικό εκχύλισμα τα οποία είχαν IC₅₀ 29,6 µg/mL, 41,0 µg/mL, 39,3 µg/mL και 27,6 µg/mL, αντίστοιχα. Φαίνεται ότι, ενώ το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα εμφανίζει υπολογίσιμη αντιοξειδωτική δράση, το υδατικό εκχύλισμα το ξεπερνά [31].

Οι Wojdyło et al., το 2007 σύγκριναν την αντιοξειδωτική δράση και τα φαινολικά συστατικά 32 αρωματικών φυτών, μεταξύ αυτών το φασκόμηλο και η αχίλλεια. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτών εκφράστηκαν σε $\mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$ ξηρού βάρους και σύμφωνα με αυτά, το φασκόμηλο υπερέχει στην αντιοξειδωτική δράση έναντι της αχίλλειας με $41,2 \pm 1,11 \mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$ ξηρού βάρους έναντι $200 \pm 3,33 \mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$ ξηρού βάρους [58].

3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών των διάφορων φυτικών εκχυλίσμάτων εκφράζονται σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος και υπολογίζονται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς που απεικονίζεται στο διάγραμμα 2 και σύμφωνα με την εξίσωση:

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

Στον πίνακα 22 παρουσιάζονται τα φυτικά εκχυλίσματα, οι συγκεντρώσεις τους εκφρασμένες σε mg καφεϊκού οξέος/ g εκχυλίσματος και σε mg καφεϊκού οξέος/ g φυτικού υλικού καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές τους αποκλίσεις.

Πίνακας 22. Συγκεντρώσεις φυτικών εκχυλίσμάτων εκφρασμένες σε mg Καφεϊκού οξέος/ g εκχυλίσματος και mg Καφεϊκού οξέος/ g φυτικού υλικού

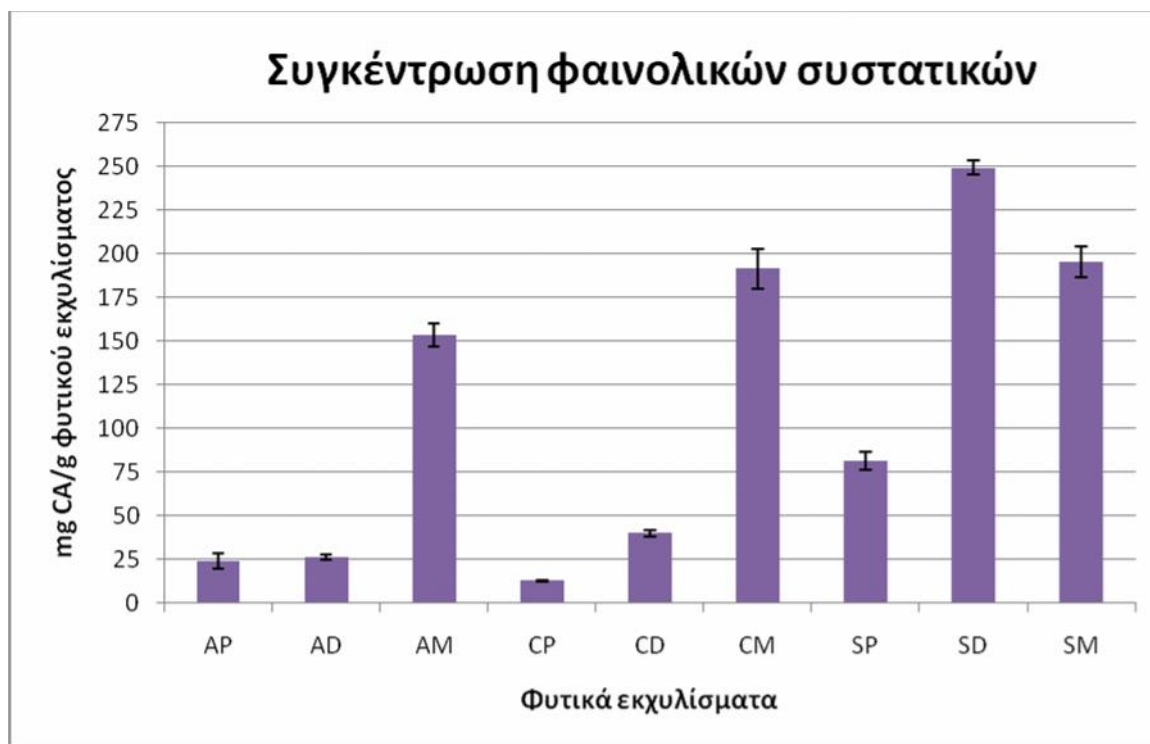
Φυτά	Διαλύτες	Συγκέντρωση (mg Καφεϊκού οξέος/ g εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση (mg Καφεϊκού οξέος/ g φυτικού υλικού)
Αχίλλεια	PE*	$24,0 \pm 4,0^{**}$	$0,70 \pm 0,10$
	DE	$26,0 \pm 1,0$	$0,48 \pm 0,03$
	MeOH	$154,0 \pm 6,0$	$23,00 \pm 1,00$
Χαμομήλι	PE	$13,0 \pm 0,5$	$0,40 \pm 0,02$
	DE	$40,0 \pm 2,0$	$0,62 \pm 0,03$
	MeOH	$192,0 \pm 11,0$	$39,00 \pm 2,00$

	PE	82,0±5,0	5,00±0,30
Φασκόμηλο	DE	249,0±4,0	5,60±0,10
	MeOH	196,0±9,0	41,00±2,00

*Όπου PE, DE, MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, δυαιθυλαιθέρας και μεθανόλη αντίστοιχα.

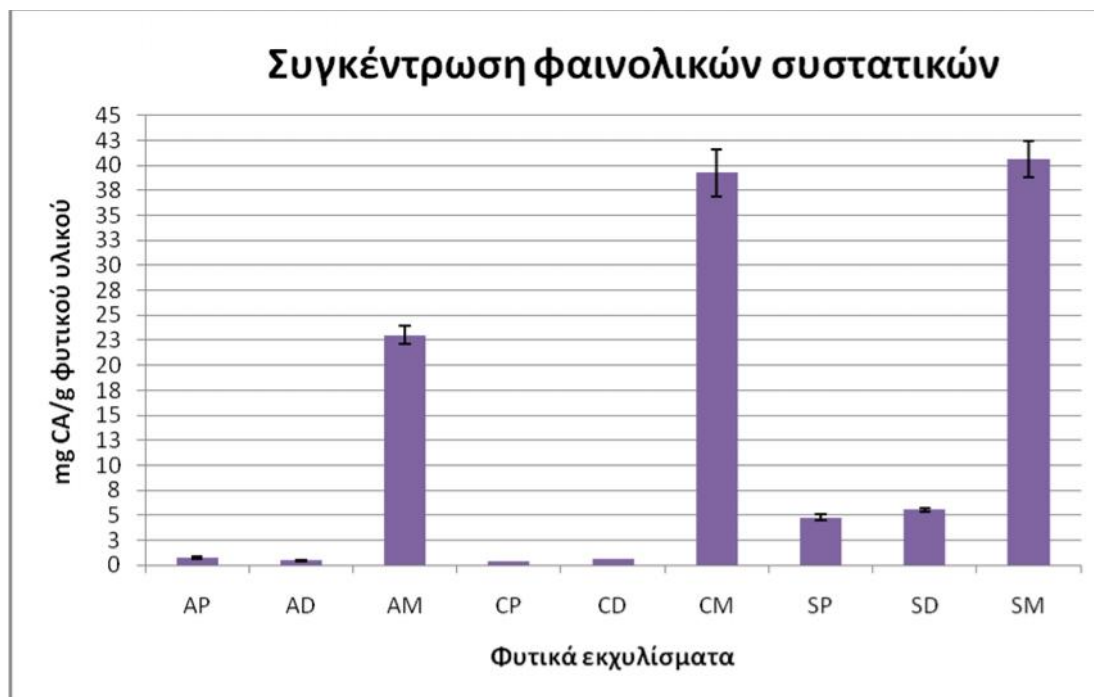
**Τυπική απόκλιση

Σύμφωνα με τον πίνακα 22 μπορεί να παρατηρηθεί ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων έκφρασης της συγκεντρώσεως των φαινολικών συστατικών. Έτσι, το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του φασκόμηλου φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (249,0±4,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος), το ακολουθούν τα μεθανολικά εκχυλίσματα του φασκόμηλου (196,0±9,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος), του χαμομηλιού (192,0±11,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος) και της αχίλλειας (154,0±6,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος) και στη συνέχεια, φαίνεται να έπονται τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού (40,0±2,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος) και της αχίλλειας (26,0±1,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος) ενώ, με τη μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζονται τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα της αχίλλειας (24,0±4,0 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος) και του χαμομηλιού (13,0±0,5 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος).



Διάγραμμα 22. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών εκφρασμένων σε mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού εκχυλίσματος.

Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών που αναλογούν στο ξηρό βάρος του φυτικού υλικού ακολουθούν διαφορετική σειρά. Έτσι, πρώτο σε περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών φαίνεται να είναι το μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου ($41,00 \pm 2,00$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού), ακολουθούν τα άλλα δύο μεθανολικά εκχυλίσματα, του χαμομηλιού ($39,00 \pm 2,00$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού) και της αχίλλειας ($23,00 \pm 1,00$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού), τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα ($5,60 \pm 0,10$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού) και του πετρελαϊκού αιθέρα ($5,00 \pm 0,30$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού) του φασκόμηλου, το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα της αχίλλειας ($0,70 \pm 0,10$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού), το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού ($0,62 \pm 0,03$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού) και χαμηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά φαίνεται να έχουν τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας ($0,48 \pm 0,03$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού) και του πετρελαϊκού αιθέρα του χαμομηλιού ($0,40 \pm 0,02$ mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού).



Διάγραμμα 23. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών εκφρασμένων σε mg καφεϊκού οξέος/g ξηρού βάρους φυτικού υλικού

Οι Roby et al., το 2012, μελέτησαν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σε διάφορα εκχυλίσματα χαμομηλιού μέσω ποσοτικού προσδιορισμού τους και απέδωσαν τα αποτελέσματα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών ($3,7 \pm 2,0$ mg γαλλικού οξέος/g ξηρού βάρους), το ίδιο εξάλλου εμφανίζεται και στην παρούσα μελέτη, και ακολουθούσαν το αιθανολικό ($3,5 \pm 1,7$ mg γαλλικού οξέος/g ξηρού βάρους), του διαιθυλαιθέρα ($3,3 \pm 1,0$ mg γαλλικού οξέος/g ξηρού βάρους) και το εξανικό ($2,4 \pm 2,6$ mg γαλλικού οξέος/g ξηρού βάρους)[57].

Σε άλλη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Barros et al., το 2010 ερευνήσαν την *in vitro* αντιοξειδωτική δράση, τα θρεπτικά συστατικά και τις φυτοχημικές ουσίες έξι φαρμακευτικών φυτών της Πορτογαλίας, μεταξύ αυτών και το χαμομήλι. Συγκεκριμένα, για το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού βρήκαν ότι η συγκέντρωσή του σε φαινολικά συστατικά, η οποία εκφράστηκε σε ισοδύναμο γαλλικού οξέος ήταν $139,62 \pm 3,02$ mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος [59].

Οι Albano και Miguel (2011) μελετώντας την βιοδραστητικότητα ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων και βρήκαν ότι στο φασκόμηλο την υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά την είχε το εκχύλισμα της n-βουτανόλης ($23,89$ mg γαλλικού οξέος/mL) και ακολουθούσαν το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα ($9,26$ mg γαλλικού

οξέος/mL), του οξικού αιθυλεστέρα (7,01 mg γαλλικού οξέος/mL) και το υδατικό εκχύλισμα (3,27 mg γαλλικού οξέος/mL) [31].

Οι Wojdyło et al., το 2007 σύγκριναν την αντιοξειδωτική δράση και τα φαινολικά συστατικά 32 αρωματικών φυτών, μεταξύ αυτών το φασκόμηλο και η αχίλλεια. Σε ότι είχε να κάνει με τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών, συγκεκριμένα για το φασκόμηλο και την αχίλλεια, κατέληξαν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου ($8,25 \pm 0,09$ mg γαλλικού οξέος/100 g ξηρού βάρους) είχε χαμηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά από ότι το εκχύλισμα της αχίλλειας ($9,55 \pm 0,11$ mg γαλλικού οξέος/100 g ξηρού βάρους), αποτέλεσμα αντίθετο από την παρούσα μελέτη που το φασκόμηλο φαίνεται να είναι πλουσιότερο σε φαινολικά συστατικά από την αχίλλεια [58].

4. Συμπεράσματα

✓ Πτητικά συστατικά

Στην αχίλλεια τα κυριότερα πτητικά συστατικά είναι το καρυοφυλλένιο και η τερπινεν-4-όλη. Στο χαμομήλι τα κυριότερα πτητικά συστατικά είναι τα οξείδια της βισαβολόλης (βισαβολολοξείδιο Α, βισαβολολοξείδιο Β) και στο φασκόμηλο είναι η καμφορά, η *cis*-θουγιόνη και η ευκαλυπτόλη.

Τα συγκεκριμένα συστατικά είναι τα κυριότερα τόσο για τα εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα όσο και για τα εξανικά εκχυλίσματα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι στα εξανικά εκχυλίσματα, γενικώς, παραλήφθηκαν λιγότερα συστατικά σε αριθμό και σε αφθονία καθότι, τα περισσότερα συστατικά είχαν εκχυλιστεί από τον πετρελαϊκό αιθέρα.

✓ Φαινολικά συστατικά

Στα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα ταυτοποιήθηκαν φαινολικά συστατικά και κυρίως άγλυκα τμήματα φλαβονοειδών. Για την αχίλλεια, τα κυριότερα φαινολικά συστατικά αποτελούν η απιγενίνη και μια μεθυλ-φλαβονόλη, η οποία κατά πάσα πιθανότητα είναι η τριμεθυλο-υδροξυ-κερκετίνη. Για το χαμομήλι, κυριότερα φαινολικά συστατικά φαίνεται να είναι ένα παράγωγο υδροξυ-κιναμικού οξέος και μια μεθυλ-φλαβονόλη κατά πάσα πιθανότητα η ίδια που εμφανίζεται ως κυριότερη και στην αχίλλεια, ο λόγος για την τριμεθυλο-υδροξυ-κερκετίνη. Για το φασκόμηλο τα κυριότερα φαινολικά συστατικά αποτελούν η απιγενίνη και μια μεθυλ-φλαβονόλη που κατά πάσα πιθανότητα είναι η κισιματίνη.

Στα μεθανολικά εκχυλίσματα εμφανίζονται ως κυριότερα φαινολικά συστατικά ένας εστέρας και ένας δι-εστέρας καφεϊκού-κιναμικού οξέος για την αχίλλεια, ένας εστέρας καφεϊκού-κιναμικού οξέος και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης για το χαμομήλι, ενώ για το φασκόμηλο, το ροσμαρινικό οξύ και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης συνεκλουόμενος με ένα γλυκουρινίδιο λουτεολίνης.

Ενώ, το μεθανολικό εκχύλισμα στο φυτικό υλικό φαίνεται να είναι πλουσιότερο σε σύγκριση με το εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα, ο διαιθυλαιθέρας είναι ο διαλύτης που παραλαμβάνει δραστικότερα συστατικά με αποτέλεσμα τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών-στόχων.

✓ Αντιμικροβιακή δράση

Στην αντιμικροβιακή δράση η αχίλλεια και το χαμομήλι ανήκοντας στην ίδια οικογένεια (Asteraceae) παρουσιάζουν κοινή δράση αποτελώντας τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα το καλύτερο “όπλο” για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών-στόχων, ενώ στο φασκόμηλο (Lamiaceae), το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα ήταν αυτό που παρεμπόδισε περισσότερο σε σχέση με τα άλλα εκχυλίσματα, την ανάπτυξη των μικροοργανισμών-στόχων. Τα μεθανολικά και τα εξανικά εκχυλίσματα παρουσίασαν την μικρότερη παρεμπόδιση.

Από άποψη μικροοργανισμών ο κατά Gram+ μικροοργανισμός, *Str. Gordonii* ο οποίος είναι παθογόνος στόματος είναι ο πιο ευάλωτος στην αντιμικροβιακή δράση όλων σχεδόν των φυτικών εκχυλισμάτων εκτός των μεθανολικών της αχίλλειας, ενώ ο πιο ανθεκτικός μικροοργανισμός είναι ο κατά Gram-, *Ps. aeruginosa*, ο οποίος αποτελεί την πιο συχνή αιτία λοιμώξεων από ψευδομονάδα στον άνθρωπο, οπου σε όλα τα εκχυλίσματα δεν παρατηρήθηκε καμιά απολύτως ζώνη παρεμπόδισης εκτός των εκχυλισμάτων διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας και του χαμομηλιού.

✓ Αντιοξειδωτική δράση

Την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν τα εκχυλίσματα του φασκόμηλου. Άλλωστε στο μεθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου εμφανίστηκε μεγάλη αφθονία σε ροσμαρινικό οξύ το οποίο είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό. Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα τόσο της αχίλλειας όσο και του χαμομηλιού εμφάνισαν σχεδόν μηδενική δράση.

Βιβλιογραφία

- [1]Gunar S. (1996), “Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως”, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Κρήτη.
- [2]Τσιγαρίδα Ε. (2007), “Φαρμακευτικά φυτά και τοπική και περιφερειακή ανάπτυξη: η περίπτωση ενός μοντέλου τοπικής και περιφερειακής ανάπτυξης στο πλαίσιο της συμβολαιακής γεωργίας στην Ελλάδα”,
<<http://estia.hua.gr:8080/dspace/handle/123456789/421>>.
- [3]Τρίγκας Π. (2012), “Κλείδες προσδιορισμού σπερματοφύτων” Πανεπιστημιακές Σημειώσεις.
- [4]Flück H. (1990), “Τα φαρμακευτικά βότανα και οι χρήσεις τους”, Εκδόσεις Μπίμπης, Θεσσαλονίκη.
- [5]<http://www.illinoiswildflowers.info/weeds/plants/ger_chamomile.htm>
- [6]Srivastava J. K., Shankar E. & Gupta S. (2010), “Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review)”, Molecular Medicine Reports, 3, 895-901.
- [7]Πάντου Α. (2008), “Δρόγες: βιταμίνες-ιχνοστοιχεία”,
<<http://estia.hua.gr:8080/dspace/bitstream/123456789/523/1/pantou.pdf>>.
- [8]Raal A., Kaur H., Orav A., Arak E., Kailas T. & Müürisepp M. (2011), “Content and composition of essential oils in some Asteraceae species”, Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, 60(1), 55–63.
- [9]<<http://ecoethnical.gr/2012/01/09/%CE%B1%CF%87%CE%AF%CE%BB%CE%BB%CE%B5%CE%B9%CE%B1-achillea-millefolium/>>.
- [10]<<http://www.silversatin.gr/201206241282/botana/axillia-i-votano-ton-stratioton.html>>.
- [11]<<http://www.kingdomplantae.net/yarrow.php>>.
- [12]<http://www.floridata.com/ref/s/salv_off.cfm>.
- [13]<<http://aromaticplantkilkis.blogspot.gr/2010/03/lamiaceae-salvia-salvia-officinalis-15.html>>.
- [14] Buchanan B., Gruissem W. & Jones R. (2000), “Biochemistry & Molecular Biology of Plants”, American Society of Plant Physiologists.

- [15]Gião M. S., Pereira C.I., Pintado E. M. & Malcata X. F., (2012), “Effect of technological processing upon the antioxidant capacity of aromatic and medicinal plant infusions: From harvest to packaging”, LWT - Food Science and Technology, xxx, 1-6.
- [16]Ιγνατιάδου – Παγκούση Β. (2009), “Χημεία Φυσικών Προϊόντων”, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.
- [17]Αλεξάνδρου Ν. Ε. & Βάρβογλης Α.Γ., (1996), “Οργανική Χημεία”, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- [18]<<http://vcampus.uom.ac.mu/upload/public/2003122103325.pdf>>.
- [19]Luo C., Zou X., Li Y., Sun C., Jiang Y. & Wu Z. (2011), “Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection”, Food Chemistry, 127, 314–320.
- [20]Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2003), “Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis”, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 51(6), 740–742.
- [21]Stobiecki, M. (2000), “Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides”, Phytochemistry, 54(3), 237–256.
- [22]Beecher, G. R. (2003), “Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake”, Journal of Nutrition, 133(10), 3248S–3254S.
- [23]Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S. & Kaushik D. (2010), “Pharmacological Potential of *Matricaria recutita* – A Review”, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 2(1), 12-16.
- [24]Srivastava J. K., Shankar E. & Gupta S. (2010), “Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review)”, Molecular Medicine Reports, 3, 895-901.
- [25]Applequist W. L. & Moerman D.E., (2011), “Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research”, Economic Botany, 65(2), 209-225.
- [26]Kamatou G. P., Viljoen A. M., Gono-Bwalya A. B., van Zyl R. L., van Vuuren S. F., Lourens A. C., Başer K. H., Demirci B., Lindsey K. L., van Staden J. & Steenkamp

- P., (2005), "The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species", Journal of Ethnopharmacology, 102, 382-390.
- [27]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 Dentistry, 2(3), 75-78.
- [28]Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. & Robards K., (2002), "Critical Review: Methods for Testing Antioxidant Activity", The Analyst 127, 183-198.
- [29]Βαλαβανίδης Α.Π., (2006) "Ελεύθερες Ρίζες στην Οργανική Χημεία" , Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- [30]Procházková D., Boušová I. & N. Wilhelmová, (2011), "Review: Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids", Fitoterapia, 82, 513-523.
- [31]Albano S. M. & Miguel M. G., (2011), "Biological activities of extracts of plants grown in Portugal", Industrial Crops and Products, 33, 338-343.
- [32]Dog T., (2006), "A Reason to Season: The Therapeutic Benefits of Spices and Culinary Herbs", Diet and Nutrition, 2(5), 446-449.
- [33]Σκανδάμης Π., (2001), "Διδακτορική Διατριβή: Μελέτη της επίδρασης αιθερίων ελαίων σε αλλοιογόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων"
- [34]Ταραντίλης Π. & Πολυσίου Μ, (2008) "Εργαστηριακές Σημειώσεις"
- [35]Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. & Akpulat H. A., (2003) "Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)", Journal of Ethnopharmacology 87, 215–220.
- [36]Sivoza N.V., (2012), "Composition and Antioxidant activity of Essential Oils Containing Azulene Derivatives", Pharmaceutical Chemistry Journal 46(6), 369-371.
- [37]Szöke É., Máday E., Tyihák E., Kuzovkina I. N. & Lemberkovics É. (2004), "New terpenoids in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro)", Journal of Chromatography B, 800, 231-238.
- [38]Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I.T., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S., (2007), "Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil", Food Chemistry 100(2), 603–608.
- [39]Sellami H.I., Rebey I. B., Sriti J., Rahali F. Z., LimaM F. & Marzouk B., (2012), "Drying Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants and Its Effects on Content, Chemical

- Composition, and Radical Scavenging Activity of the Essential Oil”, Food Bioprocess Technol, 5, 2978-2989.
- [40]Ntalli N. G., Ferrari F., Giannakou I. & Menkssoglu-Spiroudi U., (2010), “Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 7856-7863.
- [41]Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Vincieri F. F., & Prucher D., (2000), “Characterization of Matricaria recutita L-flower extracts by HPLC–MS and HPLC–DAD analysis”. Chromatographia, 51(5–6), 301–307.
- [42]Gouveia S.C. & P. C. Castilho (2013), “Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD-(–)-ESI-MSⁿ method”, Food Chemistry, 129, 333-344.
- [43]Zimmermann B. F., Walch S. G., Tinzoh L. N., Stöhlinger W. & Lachenmeier D. W., (2011), “Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea)”, Journal of Chromatography B, 879, 2459-2464.
- [44]Guimarães R., Barros L., Dueñas M., Calhella 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.
- [45]Gouveia S.C. & P. C. Castilho (2013), “*Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity”, Industrial Crops and Products, 45, 170-181.
- [46]Lin L.-Z., Harnly J.M, (2010), “Identification of the phenolic components of Chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)” Food Chemistry, 120, 319-326.
- [47]Kontogianni V.G., Tomic G., Nikolic I., Nerantzaki A. A., Sayyad N., Stosic-Grujicic S., Stojanovic I., Gerothanassis I. P. & A. G. Tzakos., (2013), “Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity”, Food Chemistry, 136, 120-129.
- [48]Cuvelier M. E., (1996) “Antioxidative Activity and Phenolic Composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary”, JAOCS, 73(5), 645-650

- [49]Almela L., Sánchez-Muñoz B., Fernández-López 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” 1120, 221-229
- [50]Hossain M. B., Rai D.K., Brunton N.P., Martin-Diana A. B. & Barry-Ryan C., (2010), “Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS”, 58, 10576-10581.
- [51]Kumar V. P., Chauhan N. S., Padh H. & Rajani M., (2006), “Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants”, Journal of Ethnopharmacology, 107, 182-188.
- [52]Soković M., Glamočlija J., Marin P. D., Brkić D.& van Griensven L. J. L. D., (2010), “Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model”, Molecules, 15, 7532-7546.
- [53]Bonjar G. H. S., (2004), “Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine”, Fitoterapia, 75, 231- 235.
- [54]Stagos D, Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A. M. & Kouretas D., (2012), “Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species”, Food and Chemical Toxicology, 50, 4115-4124.
- [55]McCune L. M. & Johns T, (2007), “Antioxidant activity relates to plant part, life form and growing condition in some diabetes remedies” Journal of Ethnopharmacology 112, 461–469.
- [56]Benedek B., Kopp B. & Melzig M. F., (2007), “*Achillea millefolium* L. s.l. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition?”, Journal of Ethnopharmacology, 113, 312–317.
- [57]Roby M. H. H., Sarhana M. A., Selima K. A. & K. I. Khalela, (2012) “Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.)”, Industrial Crops and Products, XX, XXX-XXX.
- [58]Wojdyło A., Oszmiański J. & Czemerys R., (2007), “Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs”, Food Chemistry, 105, 940–949.

- [59]Barros L, Oliveira S., Carvalho A. M. & Ferreira I. C.F.R., (2010), “In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine”, *Industrial Crops and Products*, 32, 572-579.

Παραρτήματα

Πίνακες LC/MS

Πίνακας I. Φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα της αχίλλειας

Κορυφή	R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
1	20,96	_*	0,81			322, 289, 244	
2	28,00	-	0,61			324, 250	
3	31,51	-	0,61			320, 242	
4	31,77	7-O- γλυκοζίτης απιγενίνης	0,57	431		330, 267	πρότυπη ένωση
5	38,33	λουτεολίνη	2,21	285	285	350, 267	πρότυπη ένωση
6	41,56	απιγενίνη	18,95	269	269	340, 270	πρότυπη ένωση
7	42,45	μεθυλ-φλαβονόλη (τριμεθυλο- υδροξυ-κερκετίνη)	43,05	359		350, 256	**
8	44,72	μεθυλ-φλαβονόλη	1,30	359		350, 257	**
9	47,27	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	7,43	305		320	**
10	47,54	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	2,59	329	327, 305	320	**
11	48,25	φλαβόνη	1,94			335, 268, 258	**
12	49,30	ακασετίνη	2,91			334, 273	πρότυπη ένωση
13	51,16	μεθυλ-φλαβόνη	3,98	343		341, 270	**
14	51,80	-	0,58			341, 254	**

*Όπου (–) αποτελεί μη ταυτοποιημένη ουσία

**Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Mulinacci et al., (2000) και 2) Yang et al., (2012)

Πίνακας II. Φαινολικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος της αχίλλειας

Κορυφή	R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
1	16,60	εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος	27,02	353	353, 191	326, 235	*
2	18,02	εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος	0,78	353	353, 191	325, 240	*
3	21,20	εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος	4,25	353	353, 191, 179	320, 243	*
4	26,20	γλυκοζίτης φλαβόνης	0,84	463	463, 285	334, 250	*
5	27,76	δι-εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος	25,11	515	515, 353, 191	328, 243, 222	*
6	28,15	δι-εστέρας καφεϊκού-	12,08	515	515, 353, 191	328, 243	*

κινναμικού οξέος							
7	29,11	7-O-γλυκοζίτης λουτεολίνης	5,12	447	447, 285	350, 254	πρότυπη ένωση
8	29,99	ρουτίνη	1,10	609	609, 300	353, 256	*
9	30,58	δι-εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος	7,15	515	515, 353, 191	328, 245	*
10	31,92	7-O-γλυκοζίτης απιγενίνης	5,65	431	431, 269	335, 268	πρότυπη ένωση
11	33,01	γλυκοζίτης φλαβόνης	1,21	447	447, 285	335, 268	*
12	34,18	δι-εστέρας καφεϊκού- κινναμικού οξέος	1,04	515	515, 353	327, 249	*
13	35,24	παράγωγο απιγενίνης	1,54	461	461, 269	335, 267	*
14	38,49	λουτεολίνη	0,90	285		350, 266	πρότυπη ένωση
15	41,61	απιγενίνη	0,70	269		339, 267	πρότυπη ένωση
16	49,27	ακασετίνη	ίχνη	283	283,179	330, 269	πρότυπη ένωση

*Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Gouveia και Castilho (2011), 2) Zimmermann et al., (2011) 3) Guimarães et al., (2013), 4) Gouveia και Castilho (2013) και 5) Lin και Harnly (2010)

Πίνακας III. Φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα του χαμομηλιού

Κορυφή	R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
1	25,91	-*	3,38		161	324, 243	
2	27,44	-	0,55			319, 293, 244	
3	31,91	7-O- γλυκοζίτης απιγενίνης	0,48	431	431, 269	335, 268	πρότυπη ένωση
4	33,87	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	14,76		193	323, 241	**
5	37,11	κερκετίνη	0,28	301		373, 255	πρότυπη ένωση
6	38,48	λουτεολίνη	0,51	285	285	350, 267	πρότυπη ένωση
7	39,04	μεθυλ-φλαβονόλη	0,50	345	345, 315	354, 257	**
8	39,86	μεθυλ-φλαβονόλη (μεθυλ-κερκετίνη)	0,53	315		373, 250	**
9	40,87	μεθυλ-φλαβονόλη	0,91	315		363, 260	**
10	41,59	απιγενίνη	6,16	269	269	340, 270	πρότυπη ένωση
11	42,65	μεθυλ-φλαβονόλη (τριμεθυλο- υδροξυ κερκετίνη)	27,71	359		350, 256	**
12	42,88	μεθυλ-φλαβονόλη	1,72	359		350, 255	**
13	43,83	φλαβονόλη	0,33	329		373, 265	**
14	45,36	μεθυλ-φλαβονόλη (τετραμεθυλο- υδροξυ-κερκετίνη)	2,81	373		351, 257	**

15	48,40	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	2,11			310, 241	**
16	48,85	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	34,69	633	373, 325	320, 239	**
17	54,99	-	1,56			320, 240	

*Όπου (–) αποτελεί μη ταυτοποιημένη ουσία

**Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Mulinacci et al., (2000)

Πίνακας IV. Φαινολικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος του χαμομηλιού

Κορυφή	R _t (min)	Ουσία	%	m/z	Κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
1	16,41	εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	3,97	353	353, 173	326, 234	**
2	20,84	εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	8,03	353	353	325, 234	**
3	24,13	δι-γλυκοζίτης απιγενίνης	2,54	577	577, 431	346, 259	**
4	25,79	-*	2,09	595	595, 317	324, 253	
5	27,62	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	23,28	515	515, 353, 173	320, 238	**
6	28,54	γλυκοζίτης φλαβονόλης	3,41	493		367, 257	
7	28,75	7-O-γλυκοζίτης λουτεολίνης	3,23	447	447, 285, 167	350, 254	πρότυπη ένωση
8	30,44	δι-εστέρας καφεϊκού-κινναμικού οξέος	2,97	515	515, 353	328, 247	**
9	31,77	7-O-γλυκοζίτης απιγενίνης	11,99	431		338, 267	πρότυπη ένωση
10	32,28	γλυκοζίτης φλαβονόλης	0,63	507		369, 257	**
11	33,02	γλυκοζίτης φλαβόνης	0,72	477	477, 447	335, 268	**
12	33,63	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	1,11	193		326, 247	**
13	33,75	παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος	3,03		537, 353	323, 251	**
14	34,39	παράγωγο απιγενίνης (ακέτυλο-γλυκοζίτης)	1,76	473	473, 431, 269	335, 266	**
15	35,09	παράγωγο απιγενίνης (ακέτυλο-γλυκοζίτης)	4,86	473		338, 266	**
16	36,97	-	0,94	593	593, 315, 301	340, 255	**
17	37,45	παράγωγο απιγενίνης	3,82	515	515, 269	338, 267	**
18	38,57	παράγωγο απιγενίνης (ακέτυλο-γλυκοζίτης)	0,86	473	473, 431, 269	335, 266	**

γλυκοζίτης)							
19	39,44	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	1,65	785	593, 301	310	**
20	41,45	απιγενίνη	2,04	269		338, 267	**
21	42,49	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	3,88			312, 242	**
22	48,65	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	5,74			316, 241	**

*Όπου (–) αποτελεί μη ταυτοποιημένη ουσία

**Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Lin και Harnly (2010), 2)Gouveia και Castilho (2013) και 3) Guimarães et al., (2013)

Πίνακας V. Φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα του φασκόμηλου

Κορυφή	R _t (min)	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ _{max}	Αναφορά
1	31,51	ισομερές ροσμανόλης	0,53	345	345, 301	286	**
2	33,44	–*	0,53	285	345, 301	348, 254	**
3	34,60	–	1,90	315		349, 254	**
4	35,59	–	0,80	285		338, 282	**
5	37,76	ισομερές ροσμανόλης	0,42	345	345, 299	289	**
6	38,44	λουτεολίνη	2,82	285		348, 254	πρότυπη ένωση
7	39,01	μεθυλ-φλαβόνη	2,12	329	331, 329, 269	341, 267	**
8	39,53	μεθυλ-φλαβόνη	17,96	299		335, 273	**
9	40,97	μεθυλ-φλαβόνη	0,78	329	329, 315	340, 271, 254	**
10	41,59	απιγενίνη	21,41	269		340, 271	πρότυπη ένωση
		μεθυλ-φλαβόνη		299		338, 273	**
11	43,04	μεθυλ-φλαβόνη	16,26	313	313, 283, 197	335, 274	**
12	44,26	μεθυλ-φλαβόνη (κιρσιμαριτίνη)	18,44	313	313, 283	335, 274	**
13	47,44	–	0,74	345		317, 291, 246	
14	50,09	μεθυλ-φλαβόνη	2,55	283		339, 267	**
15	50,67	μεθυλ-φλαβόνη	3,44	283		339, 267	**
16	54,24	καρνοσόλη	0,18	329	329, 285	284	**
17	55,90	μεθυλ- καρνοσόλη	0,47	359		284	**
18	56,14	ισομερές ροσμαδιάλης	0,92	343		289	**
19	56,38	–	0,47	329	329, 285	426	

*Όπου (–) αποτελεί μη ταυτοποιημένη ουσία

**Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Kontogianni et al., (2013), 2) Cuvelier et al., (1996) 3) Almela et al., (2006) και 4) Hossain et al., (2010)

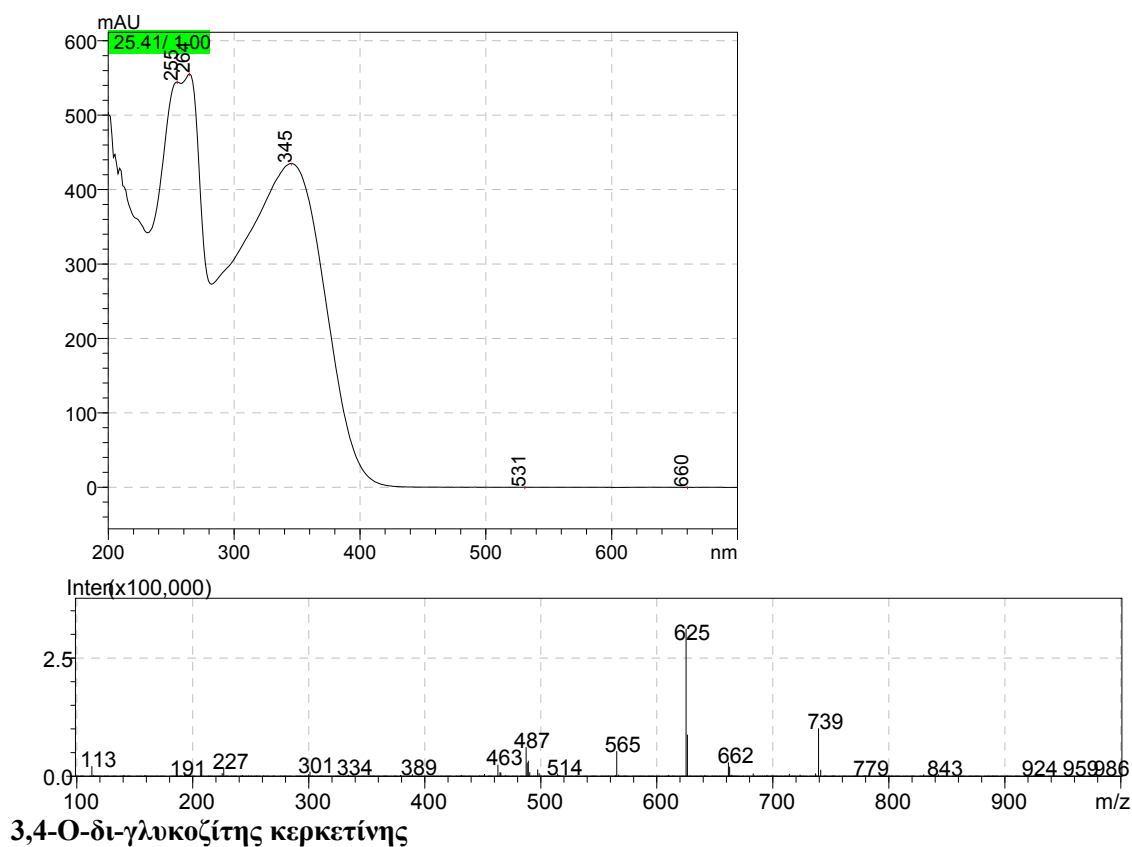
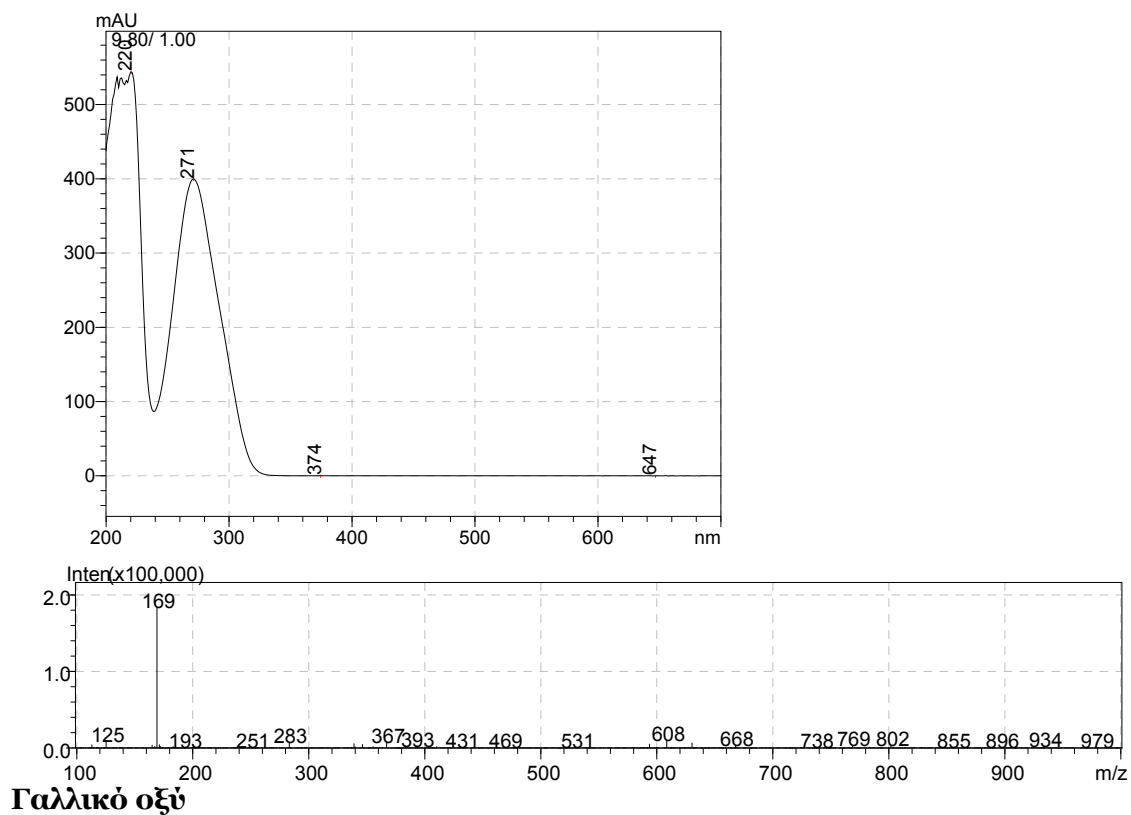
Πίνακας VI. Φαινολικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου

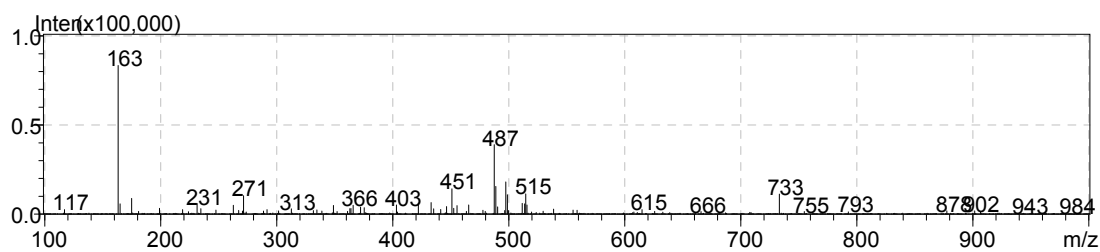
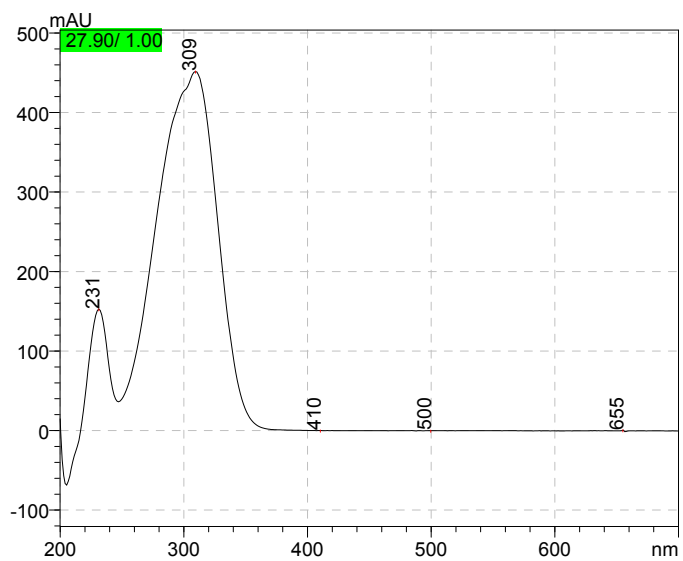
Κορυφή	R _t (min)	Όνομα ουσίας	%	m/z	κύρια θραύσματα	λ max	Αναφορά
1	18.27	παράγωγο υδροξυ- κινναμικού οξέος	0,82	487	487, 437, 193, 175	324, 240	**
2	22.22	γλυκοζίτης λουτεολίνης	1,03	593	593, 285	344, 267, 255	**
3	26.08	γλυκοζίτης φλαβόνης	2,96	463	463, 285	340, 251	**
4	28.49	-*	1,02	573		323, 248	
5	29.20	7-O- γλυκοζίτης λουτεολίνης	12,94	447	447,285	348,254	πρότυπη ένωση
		γλυκουρινίδιο λουτεολίνης		461	461, 285	348,254	**
6	30.69	ισομερές ροσμαρινικού οξέος	11,82	359	359	324,288, 235	**
7	31.57	ροσμαρινικό οξύ	52,39	359	359	324,234	πρότυπη ένωση
8	32.18	7-O- γλυκοζίτης απιγενίνης	3,33	431	431,269	335,268	πρότυπη ένωση
9	32.98	παράγωγο ροσμαρινικού οξέος	1,01		359	323, 288, 252	**
10	33.67	-	0,98	461		324,251	
11	34.34	-	0,87	463		330, 270, 252	
12	35.14	παράγωγο ροσμαρινικού οξέος	1,74		359	323, 288	**

*Όπου (–) αποτελεί μη ταυτοποιημένη ουσία

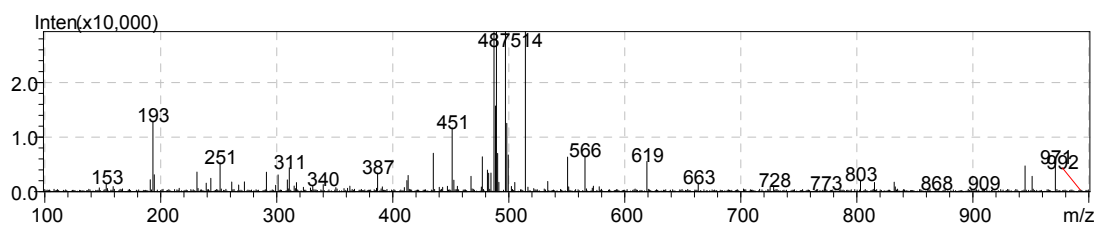
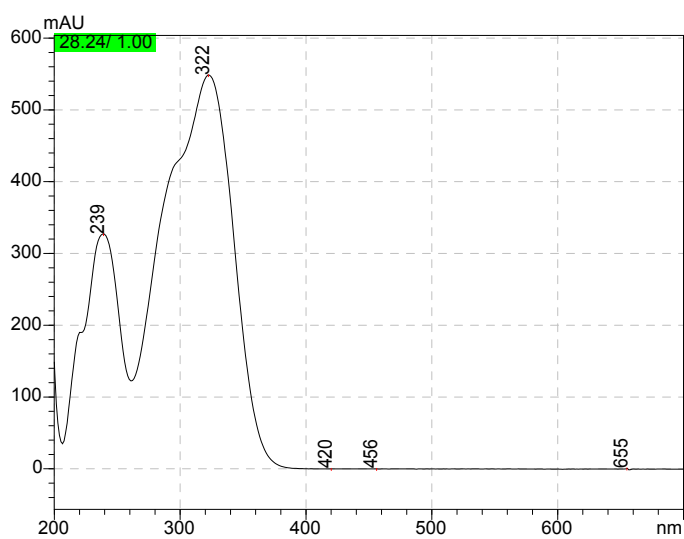
**Βιβλιογραφικές αναφορές: 1) Zimmermann et al., (2011), 2) Lin και Harnly (2010) και 3) Kontogianni et al., (2013)

Φάσματα UV και MS πρότυπων ουσιών

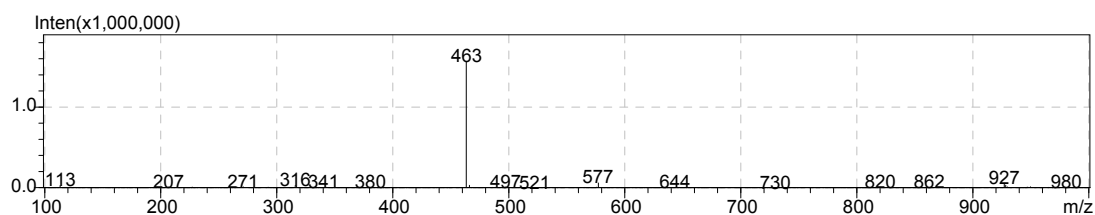
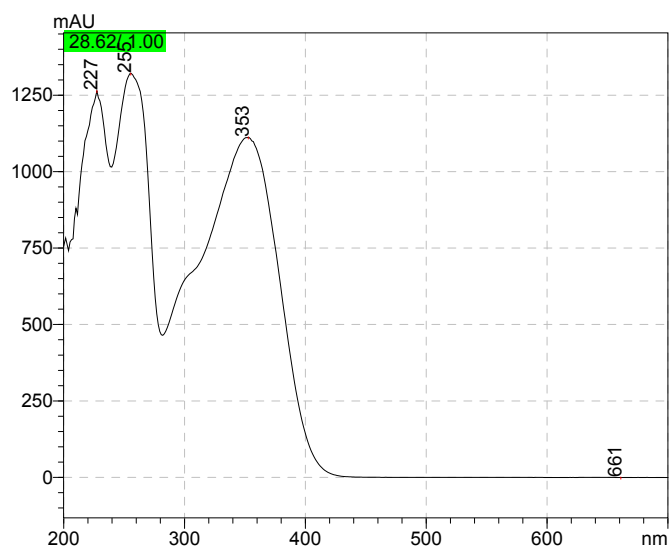




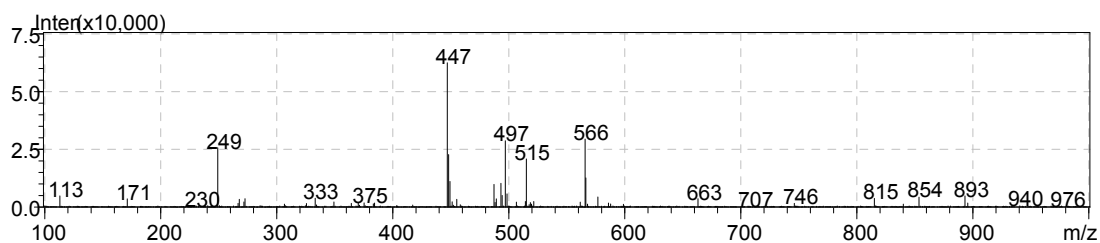
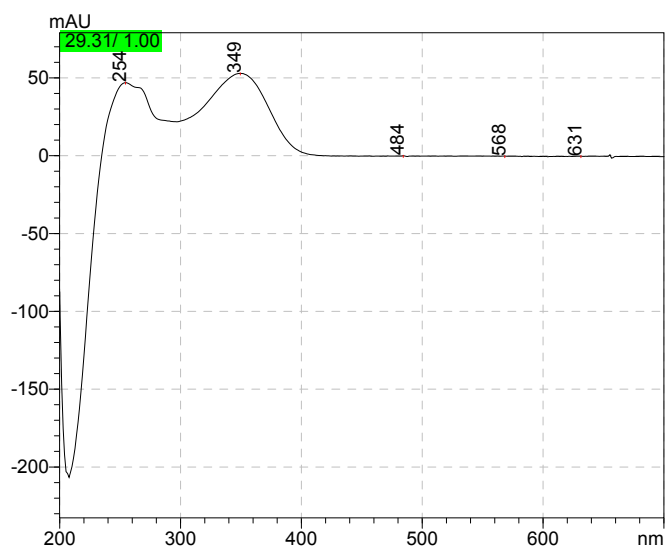
ρ-κουμαρικό οξύ



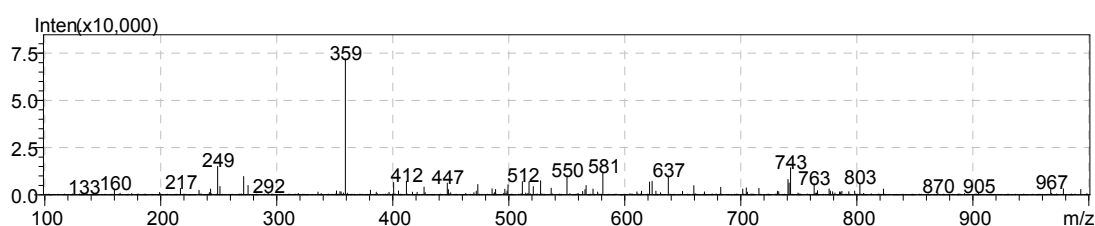
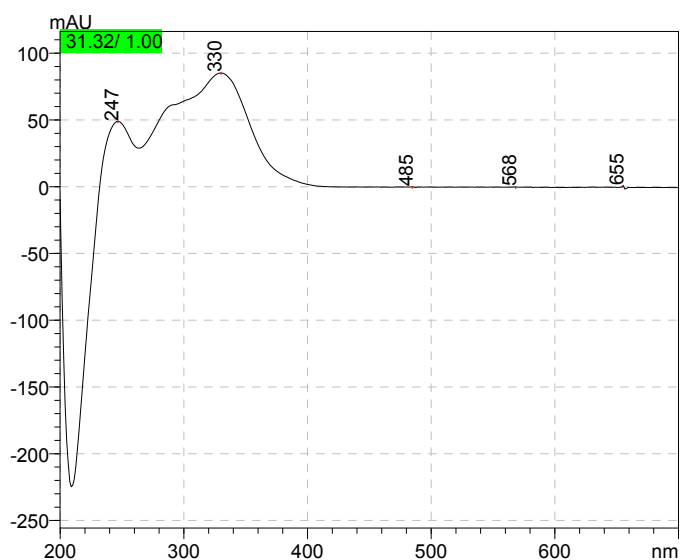
Φερουλικό οξύ



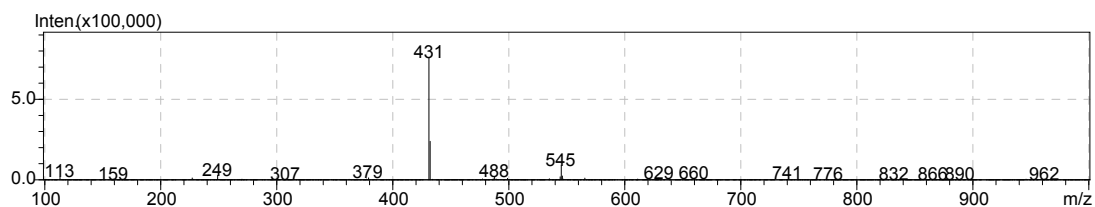
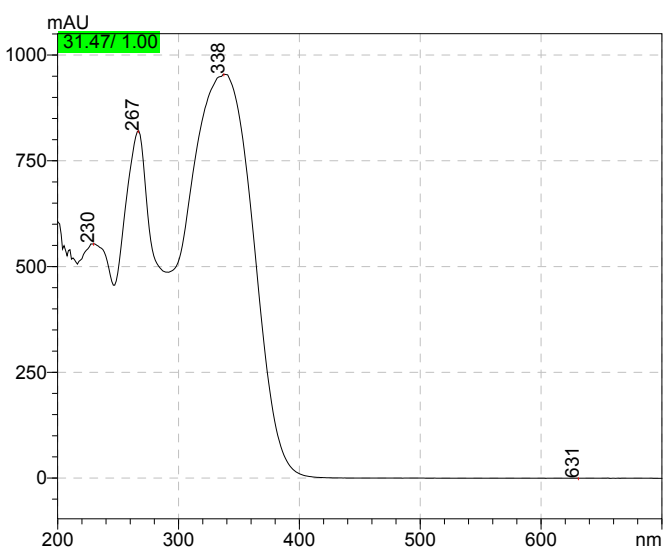
3-O-ραμνοζίτης μυρισετίνης



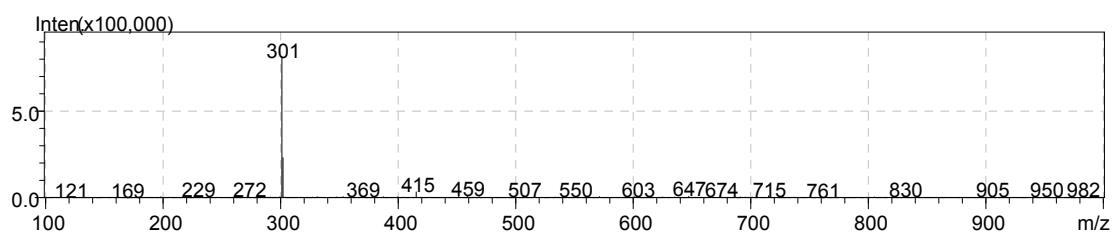
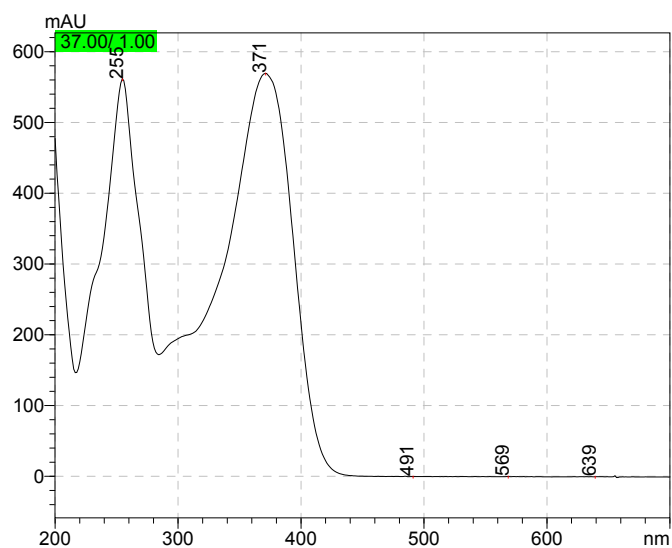
7-O-γλυκοζίτης λουτεολίνης



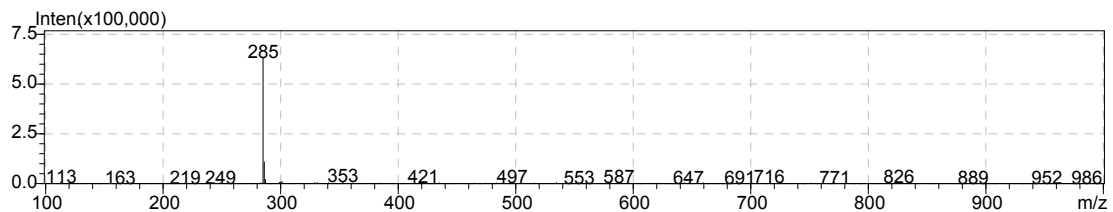
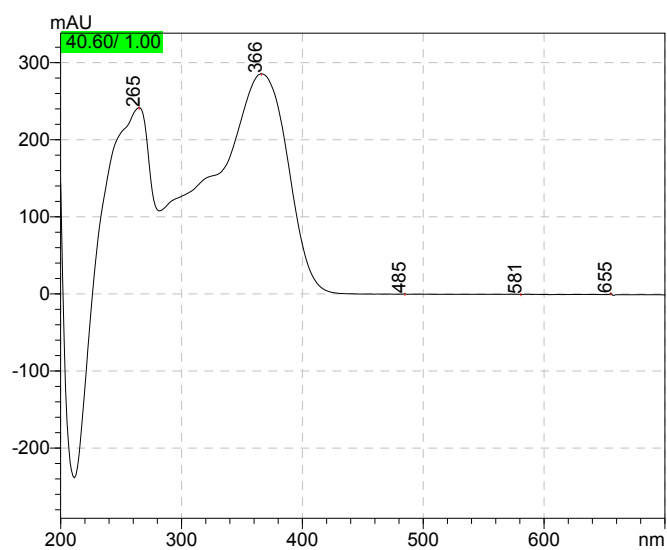
Ροσμαρινικό οξύ



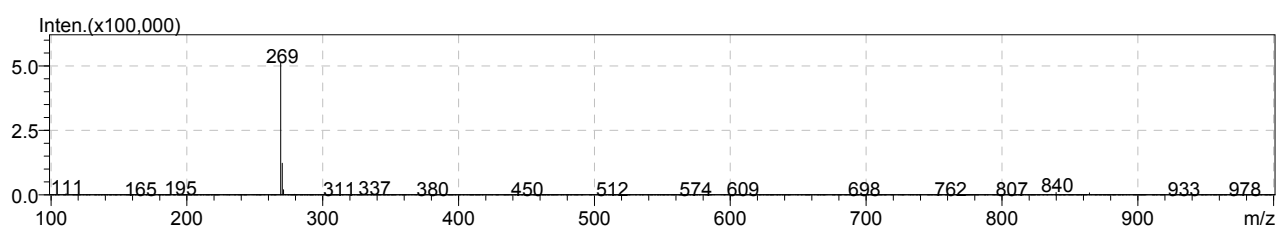
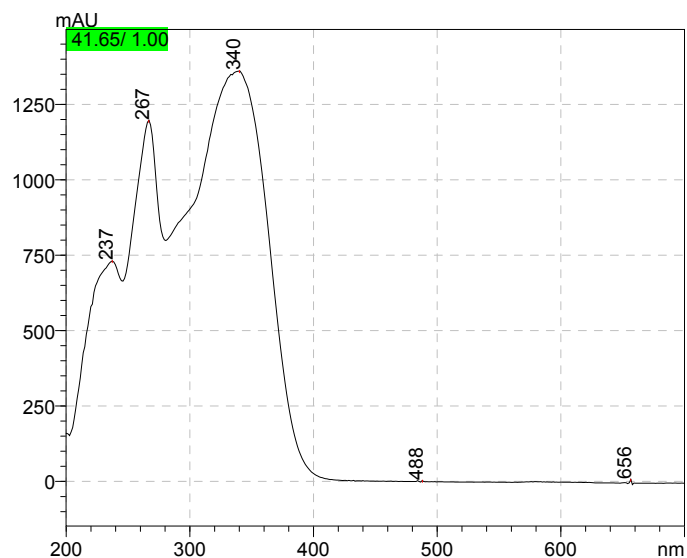
7-O-γλυνκοζίτης απιγενίνης



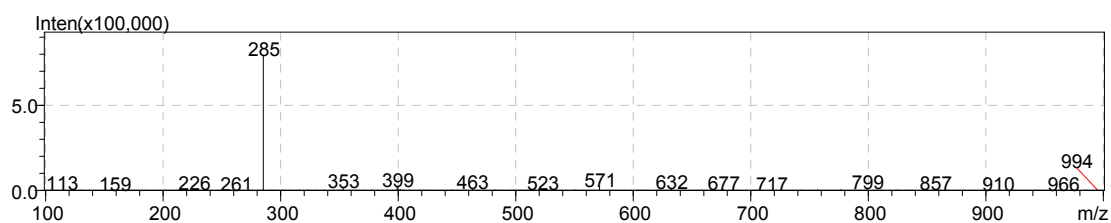
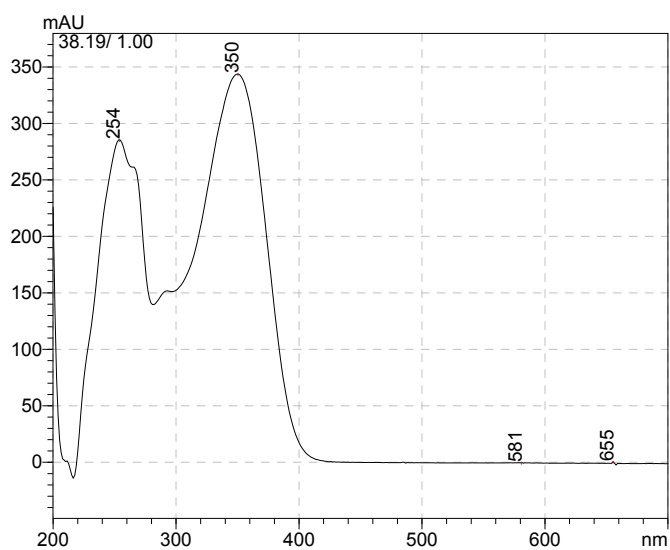
Κερκετίνη



Καμπφερόλη



Απιγενίνη



Λουτεολίνη

