

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**



Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Εργαστήριο γενικής χημείας

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**«Μελέτη αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων από τέπαλα κρόκου, φύλλα μελισσόχορτου και πρόπολη»**

**ΕΛΕΝΗ Γ. ΚΑΚΟΥΡΗ**

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσίου

**ΑΘΗΝΑ 2015**

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**



Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Εργαστήριο γενικής χημείας

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**«Μελέτη αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων από τέπαλα κρόκου, φύλλα μελισσόχορτου και πρόπολη»**

**ΕΛΕΝΗ Γ. ΚΑΚΟΥΡΗ**

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσίου

## **Μεταπτυχιακή διατριβή**

«Μελέτη αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων από τέπαλα κρόκου, φύλλα μελισσόχορτου και πρόπολη»

ΕΛΕΝΗ Γ. ΚΑΚΟΥΡΗ

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσιού

Εξεταστική επιτροπή

Μόσχος Πολυσιού Καθηγητής Γ.Π.Α

Ελευθέριος Δροσινός Αναπληρωτής καθηγητής Γ.Π.Α

Πέτρος Ταραντίλης Αναπληρωτής καθηγητής Γ.Π.Α

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας κ. Μόσχο Πολυσιού, εισηγητή του θέματος και επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου αυτή τη μελέτη καθώς και για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού. Οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις του καθόλη τη διάρκεια της μελέτης ήταν καθοριστικές. Ήταν τιμή μου να εργαστώ κάτω από την επίβλεψη του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα για τη βοήθεια, την υπομονή, την κατανόηση που έδειξε στη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος καθώς και για το γεγονός ότι ήταν πάντα δίπλα μου σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε. Η επιστημονική καθοδήγηση της και η άφογη συνεργασία που είχαμε συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ο άνθρωπος στον οποίο οφείλω τη δύναμη και τη θέληση μου προκειμένου να ολοκληρωθεί αυτή η πορεία των 2 χρόνων είναι ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Ελευθέριος Δροσινός, ο οποίος είναι πάντα διαθέσιμος να με συμβουλέψει και να με ενθαρρύνει να συνεχίζω. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και τη σωστή καθοδήγηση που μου έδωσε.

Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Κωνσταντίνα Ασπρακά για τη βοήθεια της στη υγρή χρωματογραφία και επίσης στον κ. Σπύρο Παραμυθιώτη για την πολύτιμη βοήθεια του στην ολοκλήρωση της αντιμικροβιακής μελέτης των εκχυλισμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση της παρούσας μελέτης καθώς και για τις συμβουλές τους, οι οποίες συνετέλεσαν στην ολοκλήρωσή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου με κάθε τρόπο καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Σας υπόσχομαι να συνεχίζω να σας κάνω περήφανους.

Ελένη Γ. Κακούρη

Αθήνα 2015

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της βιολογικής και αντιμικροβιακής δράσης αλκοολικών εκχυλισμάτων από τα φαρμακευτικά/ αρωματικά φυτά *Crocus sativus L.* και *Melissa officinalis* τα οποία βρίσκονται στην ελληνική χλωρίδα, καθώς και του μελισσοκομικού προϊόντος πρόπολη, επίσης προερχόμενο από την ελληνική φύση.

Η παραλαβή των εκχυλισμάτων έγινε για το κάθε δείγμα με διαφορετικό τρόπο.

Από τα τέπαλα του κρόκου, στόχος ήταν η απομόνωση και μελέτη των άγλυκων φλαβονοειδών τα οποία αυτά περιέχουν. Πραγματοποιήθηκε υδρόλυση με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης 5 N και στη συνέχεια εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή των άγλυκων φλαβονοειδών .

Από τα φύλλα της *Melissa officinalis* απομονώθηκαν οι φλαβονοειδείς ενώσεις και τα φαινολικά οξέα. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα με χρήση υπερήχων σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά και στους 25°C. Το στερεό υπόλειμμα στεγνώνεται με N<sub>2</sub> και σε αυτό προστίθεται μεθανόλη HPLC. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία στο λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά και στους 25°C.

Τέλος, όσον αφορά στην πρόπολη, έγινε παρασκευή δύο υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων, ένα μεθανολικό και ένα αιθανολικό. Και στα δύο έγινε εκχύλιση με υδροαλκοολικό διάλυμα 70% (v/v) σε αλκοόλη, υποβοηθούμενη από υπερήχους για 15 λεπτά και στους 25°C.

Στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin Ciocalteu, και επιπλέον εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους DPPH και ABTS.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και τέλος εκτιμήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (well diffusion assay), έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram παθογόνων και μη μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα παραπάνω εκχυλίσματα περιέχουν σημαντική ποσότητα φαινολικών συστατικών με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 39,1±0.8 και 5,52±0.09 mg καφεϊκού οξέος/gf φυτικού υλικού.

Επιπλέον, τα εκχυλίσματα, παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση η οποία εκτιμήθηκε καλύτερα με τη μέθοδο ABTS. Τα αποτελέσματα εκφρασμένα ως IC<sub>50</sub> (Inhibit concentration) κυμαίνονται από 64,24 έως 14,17 µg/mL για τη μέθοδο DPPH ενώ για την ABTS από 24,8 έως 10,15 µg/mL αντίστοιχα.

Και στις δύο μεθόδους η *Melissa officinalis* παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή IC<sub>50</sub> παρόλο που το ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι υψηλότερο στο αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως τα τέπαλα του κρόκου τα οποία παραμένουν ανεκμετάλλευτα, παρουσίασαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, συγκρίσιμη με αυτή της *Melissa officinalis*, όσον αφορά στη μέθοδο ABTS.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έδειξε πως η καμφερόλη είναι το κυρίαρχο φλαβονοειδές στα τέπαλα του *Crocus sativus L.* και το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί το κυριότερο φαινολικό οξύ στη *Melissa officinalis*.

Όσον αφορά και στα δύο εκχυλίσματα της πρόπολης, η κύρια κορυφή η οποία εμφανίζεται στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα δεν ανιχνεύτηκε με βάση της διαθέσιμες πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν. Πιθανώς όμως να πρόκειται για την πινοσεμπρίνη (pinocembrin), η οποία αποτελεί το φλαβονοειδές με τη μεγαλύτερη αναλογία σύμφωνα με τη μελέτη των Kalogeropoulos *et al.*, 2009, οι οποίοι ανέλυσαν δείγμα πρόπολης προερχόμενο από την ίδια γεωγραφική περιοχή. Από τις μικρότερες κορυφές που μπόρεσαν να ανιχνευτούν, σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται το καφεϊκό οξύ και για τα δύο εκχυλίσματα.

Τέλος, η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Επιπλέον των ήδη έτοιμων εκχυλισμάτων, έγινε παραλαβή τεπάλων *Crocus sativus L.*, νέας σοδιάς και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση.

Από τα βακτήρια που εξετάστηκαν, οι πιο ανθεκτικοί φαίνεται να είναι οι κατά Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί, ιδιαίτερα απέναντι στα εκχυλίσματα της πρόπολης και του μελισσόχορτου. Είναι εντυπωσιακή η δράση που παρουσίασαν τα τέπαλα του *Crocus sativus L* σοδιάς 2013, τα οποία παρεμπόδισαν όλους τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν με ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) 50 mg/mL για την πλειοψηφία των μικροοργανισμών και για στελέχη στα οποία η δράση των υπολοίπων εκχυλισμάτων ήταν ανενεργή. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει επίσης ότι αποθηκευμένα σε κατάλληλες συνθήκες, τα τέπαλα εκτός από το χρώμα, διατηρούν τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Όσον αφορά στο εκχύλισμα της *Melissa officinalis* η MIC για το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών ήταν 200 mg/mL, ενώ η δράση της στα στελέχη της *Salmonella* ήταν ανενεργή. Παρόμοια εικόνα εμφανίζεται και για τα δυο εκχυλίσματα της πρόπολης, με τα στελέχη της *Salmonella* να είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς.

Επιστημονικό πεδίο: Μελέτη Δευτερογενών μεταβολιτών φυσικών προϊόντων.  
Αντιοξειδωτική και Αντιμικροβιακή δράση.

Λέξεις κλειδιά: Αντιοξειδωτική δράση, Αντιμικροβιακή δράση, Πρόπολη, τέπαλα *Crocus sativus L.*, *Melissa officinalis*, Folin Ciocalteu, DPPH, ABTS, Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

## Abstract

The aim of this thesis was to study the biological and antimicrobial activity of alcoholic extracts of the following medicinal/ aromatic plants: *Crocus sativus* L. and *Melissa officinalis* which are found at the Mediterranean flora, as well as the activity of propolis, also derived from Greek nature.

The preparation of the extracts was done differently regarding the three samples.

From tepals of *Crocus sativus* L., the aim was to isolate and study the aglycon part of flavonoids which they contain. Tepals were hydrolysed with acid chloride 5N of concentration and then were extracted with ethyl ester in order to segregate the aglycone part of flavonoids.

From leaves of *Melissa officinalis* were segregated flavonoids and phenolic acids. Leaves, were first extracted with petroleum ether by using ultrasounds water bath for 15 minutes at 25°C. Then the solid residue became dry with nitrogen steam and then methanol (HPLC) was added. The sample was placed in ultrasounds water bath for 15 minutes at 25°C.

Finally as far as propolis is concerned, a hydromethanolic and a hydroethanolic extracts were prepared. Both were extracted with hydroalcoholic solution 70% (v/v) by using ultrasonic bath for 15 minutes at 25°C.

The content of total phenolic compounds in plant extracts was determined by Folin Ciocalteu method, while their antioxidant activity was estimated with DPPH and ABTS method.

Subsequently the qualitative analysis of the compounds of the extracts was defined by using high performance liquid chromatography technique (HPLC).

Finally, the antimicrobial activity of the extracts was determined using well diffusion assay method, (WDA), against Gram positive and Gram negative micro organisms.

The results of the study, indicate that all extracts are rich in phenolic compounds with their values ranging from  $39,1 \pm 0,8$  και  $5,52 \pm 0,09$  mg caffeic acid/ g extract.

Moreover it is noteworthy to mention that their antioxidant activity was better estimated with the ABTS method. The results expressed as IC<sub>50</sub> (Inhibit concentration) are ranging from 64.27 to 14.17 µg/mL as far as DPPH method is concerned while for the ABTS method ranges from 24.8 to 10.15 µg/mL.

Furthermore, *Melissa officinalis* has the lowest value of IC<sub>50</sub> in both methods, despite the fact that total phenolic content is higher at the methanolic extract of propolis. In addition it is noteworthy that tepals of *Crocus sativus* L. that still remain



unexploited, present a notable antioxidant activity comparable to that of *Melissa officinalis* as far as ABTS method is concerned.

The analysis of the extracts by using the HPLC method showed that kaempferol is the main flavonoid compound of *Crocus sativus L* tepals and rosmarinic acid the main phenolic acid of *Melissa officinalis*.

Regarding both propolis extracts, the major peak that appears at the chromatograph was not identified using the available standard solutions. However it is probably pinocembrin. According to Kalogeropoulos *et al.*, 2009, which also studied propolis from the same geographical region, pinocembrin is the flavonoid present in greater proportion.

From the smaller peaks that were identified, we can deduce that caffeic acid is in abundance in both propolis extracts.

Last but not least, the study of the antimicrobial activity of the extracts shows satisfactory results. In addition to the already prepared extracts, new crop of *Crocus sativus L*. tepals was received and it was tested for its antimicrobial activity.

Most resistant from the bacteria tested, appeared to be Gram negative micro organisms, particularly towards the extracts of propolis and *Melissa officinalis*.

It is remarkable however the inhibition produced by tepals, crop 2013, which inhibited all micro organisms tested with a minimum inhibition concentration (MIC) 50 mg/mL for the majority of micro organisms and stains in which the activity of the remaining extracts was inactive. This also demonstrates that stored under appropriate conditions, tepals except for their colour, retain their biological activities.

As to the extract of *Melissa officinalis* the MIC for the majority of the micro organisms was 200 mg/mL, while their activity on most strains of *Salmonella* was inactive. The same applies also for the two extracts of propolis with the strains of *Salmonella* being more resistant compared with other micro organisms.

Discipline: Study of secondary metabolites from natural products.

Antioxidant and antimicrobial activity.

Keywords: Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Propolis; tepals *Crocus sativus L.*; *Melissa officinalis*; Folin Ciocalteu; DPPH; ABTS; High-performance liquid chromatography (HPLC), Well Diffusion Assay.

## Περιεχόμενα

	Σελίδα
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	8
Περιεχόμενα	10
<b>Κεφάλαιο I: Θεωρητικό μέρος</b>	12
1.1 Εισαγωγή	12
1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες	12
1.3 Χημική σύσταση φλαβονοειδών	14
1.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών	16
1.5 Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά	17
1.6 Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών	19
1.7 Αντιοξειδωτικά ως πρόσθετα τροφίμων	21
1.8 Αντιμικροβιακή δράση φλαβονοειδών	22
1.9 Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά Η μέθοδος Folin Ciocalteu	23
1.10 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας	23
1.11 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC	26
1.12 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμικροβιακής ικανότητας	27
Σκοπός της μελέτης	28
<b>Κεφάλαιο II: Παρουσίαση φυσικών προϊόντων της ελληνικής χλωρίδας</b>	29
2.1 Κρόκος Κοζάνης - <i>Crocus sativus L.</i>	29
2.2 Μελισσόχορτο - <i>Melissa officinalis</i>	32
2.3 Πρόπολη	34
<b>Κεφάλαιο III: Πειραματικό μέρος</b>	38
3.1 Προμήθεια φυτικού υλικού και πρόπολης	38
3.2 Παραλαβή άγλυκων φλαβονοειδών από πέταλα <i>Crocus sativus L.</i>	38
3.3 Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος <i>Melissa officinalis</i>	39
3.4 Παραλαβή εκχυλίσματος πρόπολης	40
3.4.1 Παραλαβή αιθανολικού εκχυλίσματος	40
3.4.2 Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος	41
3.5 Ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες-Μέθοδος Folin Ciocalteu	41
3.6 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH	42
3.7 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS	43
3.8 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	44
3.9 Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων	45
3.9.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	45
3.9.2 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	48
<b>Κεφάλαιο IV: Αποτελέσματα και συζήτηση</b>	49
4.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου	49

4.2	Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων	50
4.2.1	Μέθοδος DPPH	50
4.2.2	Μέθοδος ABTS	55
4.3	Σύγκριση μεθόδων DPPH και ABTS	60
4.4	Σύγκριση Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS	62
4.5	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ((HPLC)	66
4.5.1	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης <i>Crocus sativus L. tepals</i>	67
4.5.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης <i>Melissa officinalis</i>	69
4.5.3	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πρόπολη-μεθανόλη	71
4.5.4	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πρόπολη-αιθανόλη	74
4.6	Σύγκριση χρωματογραφημάτων των δύο εκχυλισμάτων της πρόπολης	77
4.7	Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων	79
	<b>Συμπεράσματα</b>	86
	<b>Βιβλιογραφία</b>	88
	<b>Παράρτημα</b>	97

## **Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος**

### **1.1 Εισαγωγή**

Προϊόντα που προέρχονται από τη “Μητέρα φύση” χρησιμοποιούνται ήδη από την αρχαιότητα στην παραδοσιακή ιατρική. Οι ιδιότητες τους οφείλονται στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών. Στο παρελθόν, είχε διαμορφωθεί η αντίληψη ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν απόβλητα ή παραπροϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Σήμερα όμως, μελετώνται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μια και αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πηγή δραστικών ουσιών, στις οποίες αποδίδονται φαρμακολογικές, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

### **1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες**

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι χημικές ενώσεις που παράγονται από τα φυτά. Η ύπαρξή τους δεν συνδέεται άμεσα με την κανονική αύξηση και ανάπτυξη του φυτού και η σύνθεσή τους δεν ακολουθεί τους γνωστούς πρωτογενείς μεταβολικούς δρόμους, όμοιους για όλα τα φυτά. Η δράση τους σχετίζεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού και/ ή της αύξησης, την απόδοση του αρώματος και την προστασία του φυτού έναντι παθογόνων οργανισμών.

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις κύριες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Αποτελούνται από ενώσεις με μεγάλη ποικιλία όσον αφορά στη δομή και στη λειτουργικότητα τους. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου, με ένα ή περισσότερα υδροξύλια.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ δραστικές, λόγω του όξινου χαρακτήρα των φαινολικών υδροξυλικών ομάδων των δακτυλίων. Κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Ομάδες φαινολικών ενώσεων

Ομάδα φαινολικών	Σκελετός
Απλές φαινόλες	C6
Φαινολικά οξέα, Φαινολικές αλδεΐδες	C6-C1
Φαινυλοξικά οξέα	C6-C2
Κουμαρίνες, Χρωμόνες, Φαινυλοπροπένια	C6-C3
Ναφθοκινόνες	C6-C4
Ξανθόνες	C6-C1-C6
Ανθρακινόνες	C6-C2-C6
Φλαβονοειδή: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ανθοκυάνες, Φλαβανόλες	C6-C3-C6
Λιγνάνες	(C6-C3) <sub>2</sub>
Διφλαβονοειδή	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>
Λιγνίνες	(C6-C3) <sub>n</sub>
Πολυμερή φλαβονοειδή	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>

Τα φλαβονοειδή, αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φαινολικά συστατικά των φυτών. Στα φυτά, τα φλαβονοειδή μπορεί να βρίσκονται με τη μορφή Ο-γλυκοζίτη, άγλυκου και σπανιότερα C-γλυκοζίτη. Συχνότερο σάκχαρο είναι η γλυκόζη, αλλά μπορεί να υπάρχουν ακόμη γαλακτόζη, ραμνόζη, αραβινόζη.

Ως φυτοχημικές ουσίες δεν μπορούν να συντεθούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Αποτελούν τμήμα των αμυντικών μηχανισμών των φυτών καθώς τα προστατεύουν από μύκητες, έντομα επιβλαβείς οργανισμούς καθώς και από την ηλιακή ακτινοβολία (Harborne *et al.*, 1999).

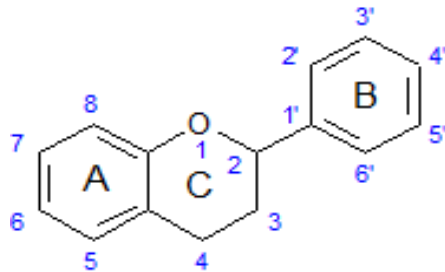
Επιπλέον, τα φλαβονοειδή, εμπλέκονται στη μεταφορά ενέργειας, στον έλεγχο της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης, όπως επίσης και στη μορφογένεση των φυτών (Harborne *et al.*, 1999).

Επίσης, είναι υπεύθυνα για το χρώμα των καρπών και των άνθων του φυτού.

Η βιοδιαθεσιμότητα, ο μεταβολισμός και η βιολογική δράση των φλαβονοειδών, εξαρτάται από το συνολικό αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που αποτελούνται, καθώς και από την αντικατάσταση ή προσθήκη λειτουργικών ομάδων στο μόριό τους.

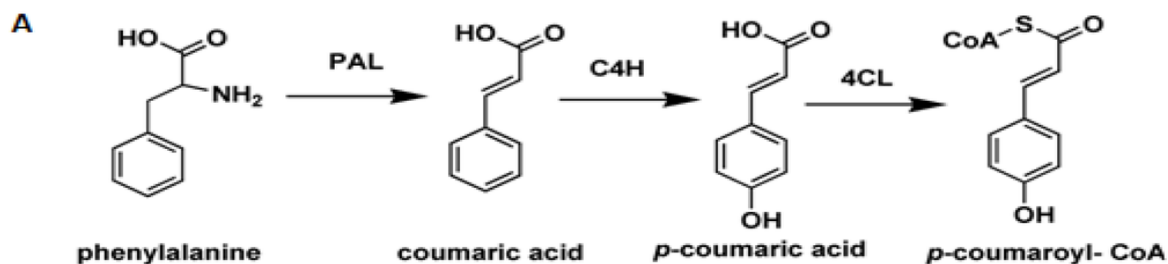
### 1.3 Χημική σύσταση φλαβονοειδών

Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα που συγκροτείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους και έναν μη αρωματικό, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου-οξυγόνου (εικ.1).

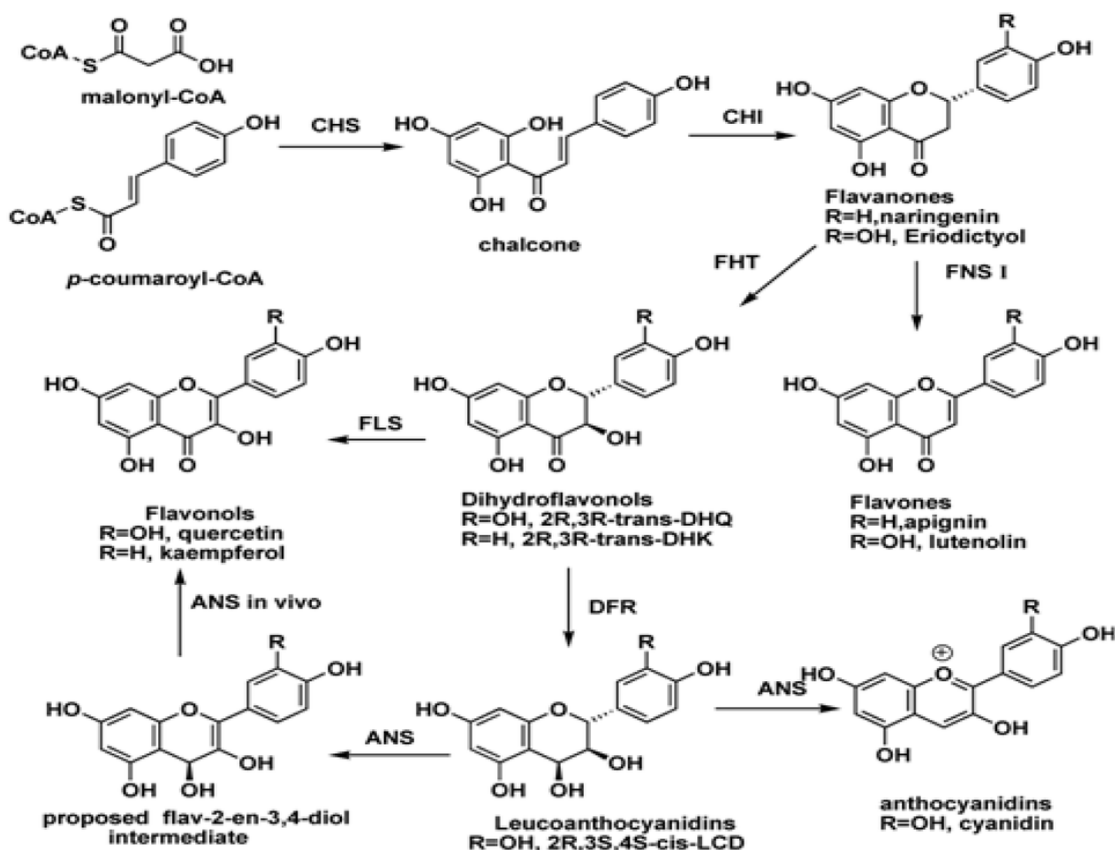


**Εικόνα 1:** Χημική δομή φλαβονοειδών

Η δομή αυτή είναι αποτέλεσμα δύο διαφορετικών βιοσυνθετικών μονοπατιών, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Cheng *et al.*, 2014). (εικ.2)



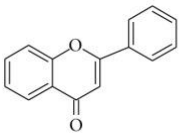
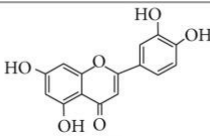
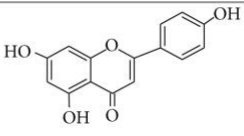
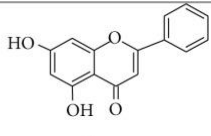
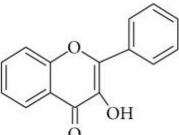
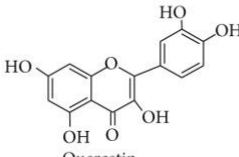
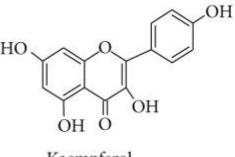
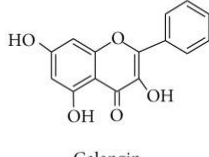
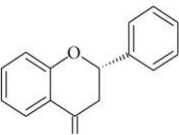
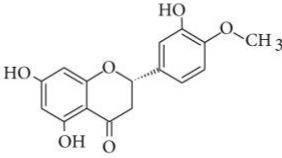
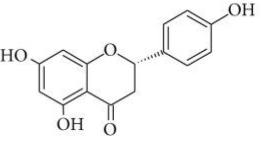
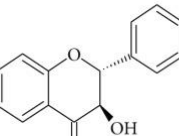
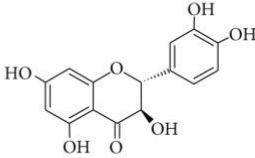
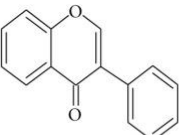
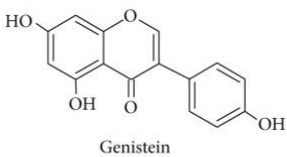
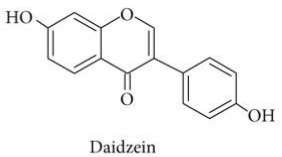
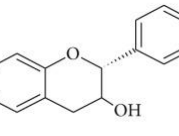
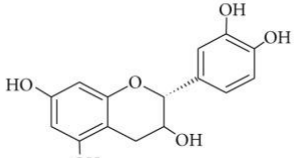
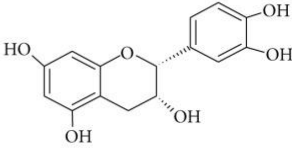
**B**



## Εικόνα 2:

Βιοσύνθεση φλαβονοειδών:(Α) Βιοσύνθεση *p*-κουμαρικό-CoA, (Β) Βιοσύνθεση διάφορων φλαβονοειδών από το *p*-κουμαρικό-CoA και το μαλονικό-CoA. PAL: Φαιτυλαλανίνη αμωνιάλυση, C4H: Κυναμικό οξύ 4-υδροξυλίωση, 4CL: 4-κουμαρικό-CoA λιγκάσης, CHS: Συνθάση χαλκόνης, CHI: Ισομεράση χαλκόνης, FHT: Φλαβανόνη 3-υδροξυλάση, FNS I: Συνθάση φλαβόνης I, FLS: Συνθάση φλαβονολών, DFR:Αναγωγή διυδροφλαβονολών, ANS: Συνθάση ανθοκυανιδίων

Τα φλαβονοειδή, ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου, χωρίζονται σε διάφορες ομάδες (Kumar *et al.*, 2013) όπως Φλαβόνες, Φλαβανόνες, Φλαβανόλες (3-φλαβανόλες ή κατεχίνες και 3,4-φλαβανόλες ή προανθοκυανιδίνες), Ισοφλαβόνες οι οποίες παρουσιάζονται στην εικ. 3.

Group of flavanoid	Structure backbone	Examples		
Flavones		 Luteolin	 Apigenin	 Chrysin
Flavonols		 Quercetin	 Kaempferol	 Galangin
Flavanones		 Hesperetin	 Naringenin	
Flavanonol		 Taxifolin		
Isoflavones		 Genistein	 Daidzein	
Flavan-3-ols		 Catechin	 Epicatechin	

**Εικόνα 3:** Δομή φλαβονοειδών-*The Scientific World Journal*

#### 1.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών

Η πρώτη αναφορά στη βιολογική δράση των φλαβονοειδών, έγινε από το Szent-Györgyi το 1936 (Bentsath, A., St. Rusznyak, and Albert Szent-Györgyi. "Vitamin Nature of Flavones." *Nature* 138, November 1936). Ο Szent-Györgyi, ανέφερε ότι τα φλαβονοειδή του φλοιού των κίτρων, εμποδίζουν την αιμορραγία και ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων. Από τότε, πολλές μελέτες που αφορούν τη φαρμακολογική δράση των ενώσεων αυτών έχουν διεξαχθεί. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, έδειξαν ότι η χρήση φλαβονοειδών αποτελεί αξιόπιστη πηγή στη θεραπευτική αντιμετώπιση πολλών παθήσεων.

Ειδικότερα τα φλαβονοειδή έχουν:



α. Ηπατοπροστατευτική δράση: Φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η απηγενίνη, η κατεχίνη, παρουσιάζουν ηπατοπροστατευτική δράση (Tapas *et al.*, 2008). Επιπλέον, οι ανθοκυάνες μειώνουν τα επίπεδα του ROS στο ήπαρ σε ασθενείς με υπεργλυκαιμία, λόγω αύξησης της γλουταμίνικο-κυστεΐνης λιγάσης (Gclc) (Zhu *et al.*, 2012).

β. Αντιβακτηριακή δράση: Μελέτες *in vitro*, έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή, αποτελούν αποτελεσματικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών όπως *Escherichia coli* (Ohemeng, *et al.*, 1993), *Streptococcus Mutans* (Borris, Moerman, 1996), *Staphylococcus aureus* (Havsteen, 1983). Η δράση τους αυτή, πιθανόν να οφείλεται στην ικανότητά τους να δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες, εμποδίζοντας έτσι ένζυμα, πρωτεΐνες μεταφορείς και βακτηριακές προσκολλητίνες (adhesions).

γ. Αντιφλεγμονώδης δράση: Φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η απηγενίνη, η λουτεολίνη, αναφέρεται να έχουν αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση. Ο μηχανισμός δράσης τους οφείλεται στην ικανότητά τους να επηρεάζουν τη δράση ενζυμικών συστημάτων, τα οποία εμπλέκονται στη γένεση και εξέλιξη της φλεγμονής (Nishizuka, 1998).

δ. Αντιική δράση: Λόγω συνεργιστικής δράσης τα φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά απέναντι σε διάφορους ιούς. Για παράδειγμα η καμφερόλη και η λουτεολίνη, είναι αποτελεσματικές ενάντια στον ιό του απλού έρπητα (HSV), ενώ η κερκετίνη φαίνεται να ενισχύει τη δράση της ακυκλοβίρης (Mucsi *et al.*, 1992). Επιπλέον, η ρουτίνη είναι αποτελεσματική ενάντια στον ιό της παραγρίπης (parainfluenza virus) καθώς και στον ιό της γρίπης (influenza virus) (Ghazal *et al.*, 1992).

δ. Αντιοξειδωτική δράση: Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, έγκειται στην ικανότητά τους να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και να τις εξουδετερώνουν. Δρουν επίσης και ως δεσμευτές μεταλλικών ιόντων. (Halliwell *et al.*, 1992).

### **1.5 Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά**

Η συχνή έκθεση του οργανισμού σε μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και στην υπεριώδη ακτινοβολία, σε συνδυασμό με την αυξημένη ανάγκη του οργανισμού για αποτοξίνωση, παραγωγή ενέργειας και παραγωγή στεροειδών, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελευθέρων ριζών.

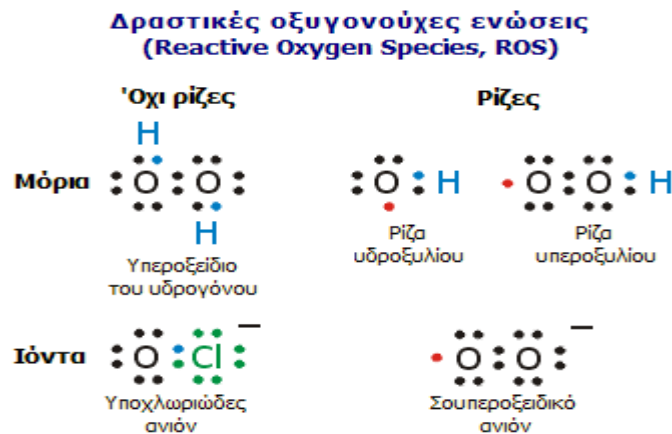
Οι ελεύθερες ρίζες, γνωστές ως προοξειδωτικά, αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια. Εφόσον σε ένα βιολογικό σύστημα η ισορροπία μεταξύ σχηματισμού και καταστροφής των ελευθέρων ριζών διατηρείται, μπορούμε να πούμε ότι η παρουσία τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι σημαντική για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού.

Όταν όμως η διαδικασία παραγωγής τους είναι εκτός ελέγχου, τότε ασκούν βλαπτική δράση στα βιομόρια, στις πρωτεΐνες, στα νουκλεϊκά οξέα και στα λιπίδια, προκαλώντας κυτταρική/ ιστική βλάβη. Στις περιπτώσεις αυτές μιλάμε για οξειδωτικό stress.

Πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος Alzheimer, συνδέονται με την αυξημένη παραγωγή τους. Επιπλέον στη δράση τους έχει αποδοθεί και η διαδικασία της γήρανσης.

Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν την σπουδαιότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς (Miller *et al.*, 1990). Υπάρχουν όμως και κάποιες ενώσεις του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το μοριακό οξυγόνο, οι οποίες, αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, συμπεριφέρονται όπως αυτές, επειδή χημικά είναι πολύ δραστικές και μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

Συνολικά τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) (Βαλαβανίδης, 2008).



Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών μπορεί να περιοριστεί από μια σειρά προστατευτικών ουσιών, γνωστές ως αντιοξειδωτικά.

Ως αντιοξειδωτικό, μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν και καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση των υποστρωμάτων αυτών. Ο φυσιολογικός λοιπόν ρόλος των αντιοξειδωτικών, είναι η αποφυγή της βλάβης των

κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες, και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Ανάλογα με την προέλευσή τους, τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε συνθετικά και φυσικά.

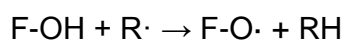
Τα τελευταία χρόνια η χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών έχει εντατικοποιηθεί λόγω της επικινδυνότητας των συνθετικών. Παρά το γεγονός ότι μπορεί να παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα όπως η πιθανότητα να επηρεάσουν το χρώμα και τη γεύση του τελικού προϊόντος, γίνονται όλο και περισσότερο αποδεκτά από τους καταναλωτές, αφού είναι φυσικές ουσίες άρα και περισσότερο ασφαλείς.

Στα φυσικά αντιοξειδωτικά, ανήκουν οι τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές ενώσεις (Κανονισμός ΕΕ αριθ.1129/2011).

Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή μελετώνται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μια και φαίνεται να αποτελούν πολλά υποσχόμενη πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών, ωφέλιμων για την υγεία.

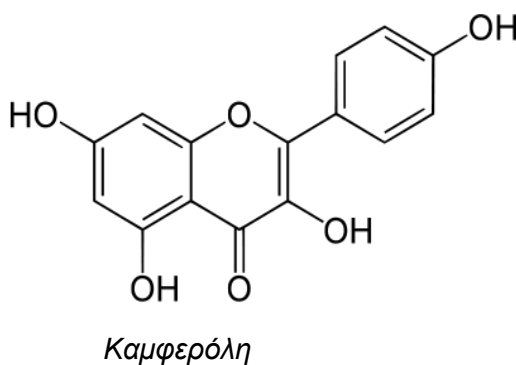
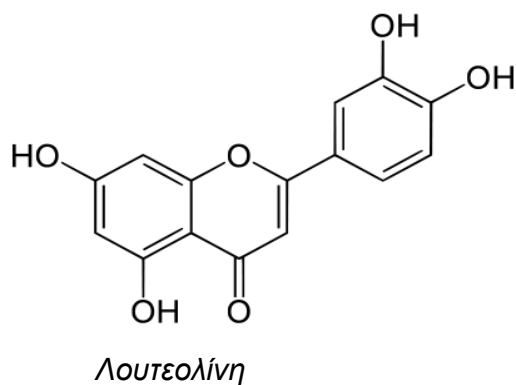
### **1.6 Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών**

Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών και των μεταβολιτών τους εξαρτάται από τη στερεοχημική διάταξη των λειτουργικών τους ομάδων (υδροξυλομάδες). Ο συνολικός αριθμός υδροξυλομάδων αλλά και η διάταξή τους στο χώρο, επηρεάζουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Η διαμόρφωση των υδροξυλίων στο Β-δακτύλιο, αποτελεί παράγοντα παρεμπόδισης των ενεργών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Οι υδροξυλομάδες στον Β-δακτύλιο είναι δότες υδρογόνου και ενός ηλεκτρονίου στην υδρόξυ- και υπερόξυ-ρίζα σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



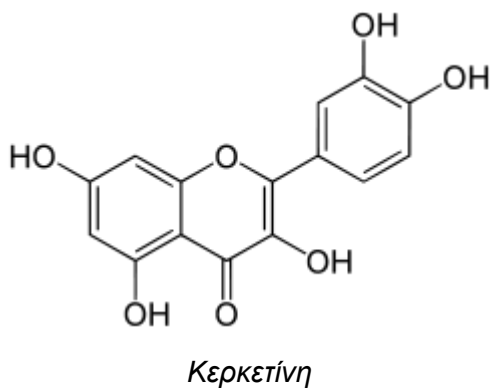
Οι ρίζες αυτές σταθεροποιούνται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας σχετικά σταθερής φλαβονοειδούς ρίζας.

Ειδικότερα, η ύπαρξη υδροξυλίων στις θέσεις 3' και 4' του Β δακτυλίου, ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση. Για παράδειγμα, η λουτεολίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα από την καμφερόλη, παρόλο που και οι δύο έχουν τον ίδιο αριθμό υδροξυλίων. (Heim *et al.*,2002).



Σε σύγκριση με τον Β δακτύλιο, ο δακτύλιος Α δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη συνολική αντιοξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά, η παρουσία υδροξυλίου στη θέση 5- και ακόμη περισσότερο η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 5- και 7-, αυξάνουν τη αντιοξειδωτική δράση. Εντούτοις η παρουσία υδροξυλίου στη θέση 6-, δε φαίνεται να επηρεάζει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου.

Όσον αφορά το δακτύλιο C, το υδροξύλιο στη θέση 3- αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Για παράδειγμα, η παρουσία υδροξυλικών ομάδων στις θέσεις 3-, 3'- και 4'- στο μόριο της κερκετίνης, διπλασιάζει την αντιοξειδωτική της δράση σε σχέση με αυτή της λουτεολίνης. Το γεγονός αυτό, αντικατοπτρίζει τη σημασία της υδροξυλικής ομάδας στη θέση 3 του C δακτυλίου.



Μεθυλίωση ή γλυκοσυλίωση του υδροξυλίου στην 3-θέση, αναστέλλει την αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου. (Heim *et al.*,2002).

### **1.7 Αντιοξειδωτικά ως πρόσθετα των τροφίμων**

Η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών στην συντήρηση τροφίμων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της παραγωγής αυτών. Μέχρι σήμερα, οι βιομηχανίες τροφίμων χρησιμοποιούν συνθετικά αντιοξειδωτικά προκειμένου να επιβραδύνουν την οξείδωση των συστατικών των τροφίμων η οποία προκαλείται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Σύμφωνα με το Άρθρο 33 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών ως «αντιοξειδωτικά», νοούνται οι ουσίες που παρατείνουν το χρόνο διατήρησης των τροφίμων προστατεύοντας τα από τις αλλοιώσεις που προκαλούνται από την οξείδωση, όπως το τάγγισμα των λιπών και οι μεταβολές χρώματος.

Η χρήση λοιπόν αντιοξειδωτικών στη βιομηχανία τροφίμων, στοχεύει στο να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής αυτών, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα διατροφικούς κινδύνους και οικονομικές απώλειες. Φυσικά, τα αντιοξειδωτικά δε δύναται να βελτιώσουν την ποιότητα ενός ήδη οξειδωμένου προϊόντος διατροφής.

Ένα ιδανικό αντιοξειδωτικό, θα πρέπει να υπόκεινται σε συγκεκριμένες προϋποθέσεις. (Corpen, 1983). Θα πρέπει δηλαδή να είναι ασφαλές, να μην προσδίδει χρώμα, οσμή και γεύση στο τρόφιμο, να είναι δραστικό σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να είναι εύκολο να ενσωματωθεί στη δομή του τροφίμου, να παραμένει αναλλοίωτο μετά την επεξεργασία του προϊόντος διατηρώντας τη σύνθεσή του στο τελικό προϊόν και τέλος να είναι διαθέσιμο σε χαμηλή τιμή.

Συνθετικά αντιοξειδωτικά που επιτρέπονται ως πρόσθετα τροφίμων είναι το BHT (Butylated Hydroxytoluene), το BHA (Butylated Hydroxyanisole), το Trolox, το PG (Propyl Gallate) το TBHQ (Tertiary Butylhydroquinone) (Κανονισμός ΕΕ αριθ.1129/2011).

Σήμερα, το σύγχρονο διατροφικό μοντέλο προτάσσει ποιοτικά και υγιεινά προϊόντα, οδηγώντας τους παραγωγούς τροφίμων στη χρησιμοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών ως συντηρητικών. Εκτός από το γεγονός ότι η δράση των φυσικών πρόσθετων στα τρόφιμα ανταγωνίζεται τη δράση των συνθετικών (Antolovic *et al.*, 2002), είναι σημαντικό για τους παραγωγούς τροφίμων να ικανοποιούν τις απαιτήσεις των καταναλωτών για ασφαλή και υγιεινά τρόφιμα.

## 1.8 Αντιμικροβιακή δράση φλαβονοειδών

Τα μικρόβια είναι διαδεδομένα παντού. Τα τρόφιμα όμως φέρουν κατά κανόνα μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο από ότι οι άλλες μορφές οργανικής και ανόργανης ύλης. Η μόλυνση ενός τροφίμου από ένα μικροοργανισμό, δε συνεπάγεται αναγκαστικά και την αλλοίωση του. Για να αλλοιωθεί ένα τρόφιμο θα πρέπει τα μικρόβια να πολλαπλασιαστούν. Επομένως, μέλημα της βιομηχανίας τροφίμων, είναι η παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των μικροβίων και η συμμόρφωση με την ισχύουσα Ευρωπαϊκή νομοθεσία περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα ΕΚ 2073/2005, η οποία ορίζει το κατώτερο και μέγιστο όριο των κυττάρων (cfu/mL) που μπορεί να υπάρχει σε ένα δείγμα.

Ένα τρόφιμο, μπορεί να αλλοιωθεί από βακτήρια, μούχλα, ιούς και παράσιτα, τα οποία προκαλούν δυσάρεστες αλλαγές στη γεύση, την οσμή και την υφή του. Τροφιμογενή βακτήρια, είναι δυνατό να προκαλέσουν ανεπιθύμητες δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίες εκδηλώνονται με ναυτία, έμετο, διάρροια ή/και πυρετό. Συνεπώς, η μικροβιακή μόλυνση των τροφίμων θέτει σημαντικά ζητήματα δημόσιας υγείας. Για το λόγω αυτό, πρόσθετα τροφίμων με αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι σκόπιμο να χρησιμοποιούνται, στοχεύοντας στην διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

Η τάση των σύγχρονων καταναλωτών είναι η αποφυγή τροφίμων που περιέχουν συνθετικά πρόσθετα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ανοχή που παρουσιάζει η χρήση των αντιβιοτικών, καθιστά τη χρήση φυσικών προϊόντων ελκυστική δίνοντας της σημαντικό ανταγωνιστικό πλεονέκτημα.

Όπως αναφέρθηκε, η άμυνα των φυτών ενάντια σε εξωτερικούς παράγοντες, εξαρτάται από την παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών. Η παρουσία των φλαβονοειδών, η απομόνωσή τους και η ταυτοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης τους, είναι καίριας σημασίας όχι μόνο για τη σύνθεση νέων αντιβιοτικών φαρμάκων αλλά επίσης και για την απόκτηση φυσικών προϊόντων, κατάλληλων ως πρόσθετα τροφίμων. Η χρήση τους αφορά τόσο στην αύξηση της διατηρησιμότητας των τροφίμων (self-life), όσο και στην ασφάλειά τους.

Φλαβονοειδή από διάφορα είδη φυτών έχουν απομονωθεί και υδατικά ή αλκοολικά εκχυλίσματα τους έχουν μελετηθεί ενάντια σε θετικά και αρνητικά κατά Gram μικροβιακά στελέχη, αποδεικνύοντας την αντιμικροβιακή τους ικανότητα.

## 1.9 Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά

### Η μέθοδος Folin Ciocalteu

Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξειδωση των φαινολικών ενώσεων των αλκοολικών εκχυλισμάτων από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφο-βολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξειδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα  $Na_2CO_3$ . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

## 1.10 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η πολυπλοκότητα στη σύνθεση ενός τροφίμου, καθιστά δύσκολο το διαχωρισμό και τη μεμονωμένη μελέτη του κάθε αντιοξειδωτικού που περιέχεται σε αυτό. Συνεπώς, η μελέτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος, φαίνεται να είναι περισσότερο επιθυμητή, λόγω της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων σε ένα μίγμα τροφίμου.

Επομένως, η ανάπτυξη μεθόδων με στόχο τη γρήγορη ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας των υπό εξέταση δειγμάτων κρίνεται αναγκαία. Η επιλογή μιας μεθόδου ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας, είναι αρκετά δύσκολη, δεδομένου του μεγάλου αριθμού των μεθόδων μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας *in vitro*.

Φυσικά, κρίσιμος παράγοντας κατά την επιλογή μιας μεθόδου, αποτελεί το γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά συμπεριφέρονται διαφορετικά στις διάφορες οξειδωτικές ουσίες. Για το λόγω αυτό δεν υπάρχει μόνο μια αποδεκτή μέθοδος η οποία μετράει με ακρίβεια την ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα (Prior *et al.*, 2005).

Οι αντιοξειδωτικές μέθοδοι ποσοτικοποιούν την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος με την τιμή  $IC_{50}$  (Inhibit Concentration), η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που πετυχαίνει την παρεμπόδιση στην οξειδωση ενός υποστρώματος κατά 50% *in vitro*.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας:

1. Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου [hydrogen atom transfer (HAT)-based assays], όπως η ORAC (oxygen radical absorbance capacity), η μέθοδος Inhibition of LDL oxidation, η μέθοδος Crocin bleaching assay.

2. Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου [single electron transfer (SET)-based assays] όπως η TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), η DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Στην παρούσα εργασία, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι SET DPPH, ABTS.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στις παραπάνω μεθόδους, έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος της οξειδωτικής ένωσης λόγω της πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου από το αντιοξειδωτικό. Ο βαθμός αλλαγής χρώματος, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Η αντιοξειδωτική δράση του φυτικού υλικού, είναι συνάρτηση της εκάστοτε συγκέντρωσης του και περιγράφεται από μια καμπύλη η οποία μπορεί να έχει τιμές παρεμπόδισης από 0 έως 100%. Η κλίση της καμπύλης, δείχνει την αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού, η οποία εκφράζεται ως ισοδύναμα του αντιοξειδωτικού Trolox (Trolox equivalent) ή του καφεϊκού οξέος (Caffeic acid equivalents).

### **Μέθοδος DPPH**

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων δειγμάτων (Perez-Jimenez *et al.*, 2008). Δεν προσδιορίζει την αντιοξειδωτική δράση ενός μόνο συστατικού αλλά μετράει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μείγματος

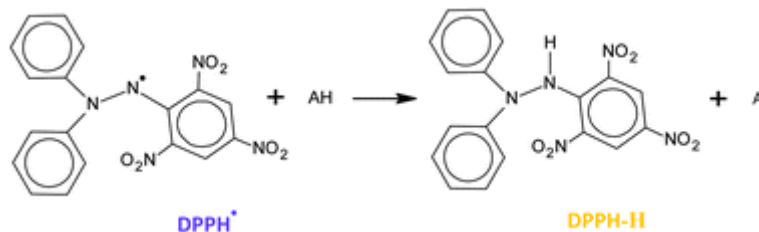
Βασίζεται στη φασματοφωτομετρική μέτρηση της μεταβολής της συγκέντρωσης του 2,2 διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH), που προκύπτει από την αντίδραση με ένα αντιοξειδωτικό στα 517 nm. Υπάρχουν αρκετά πρωτόκολλα που έχουν ακολουθηθεί για τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες, όπως διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης, διαλύτες, pH (Pyrzyńska, *et al.*, 2013).

Οι κατάλληλοι διαλύτες για την παρασκευή του διαλύματος DPPH είναι η μεθανόλη (Miller *et al.*, 2000) και η αιθανόλη (Pavlor *et al.*, 2002). Επιπλέον η βιβλιογραφία αναφέρει πως η μέθοδος έχει πραγματοποιηθεί σε διάφορους χρόνους αντίδρασης μεταξύ του DPPH και της αντιοξειδωτικής ουσίας. Η επικρατέστερη είναι αυτή των 30 min, όπου υπάρχουν 10 αναφορές (Marinova *et al.*, 2011).

Επίσης η αντιοξειδωτική ικανότητα έχει μετρηθεί σε διάφορα μήκη κύματος με τα πιο χρησιμοποιούμενα στα 517 nm (18 αναφορές) και 515 nm (13 αναφορές) (Marinova *et al.*, 2011).



Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα του DPPH χρώματος μωβ πορφυρού, ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη, η οποία έχει κίτρινο χρώμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.



**Εικόνα 4:** Αποχρωματισμός DPPH

Το κίτρινο χρώμα, υποδηλώνει ότι όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευθεί από τα αντιοξειδωτικά του εκχυλίσματος.

Η αντιοξειδωτική ενεργότητα, εκφράζεται με τη χρήση της  $IC_{50}$  και δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) * 100$$

Όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή του  $IC_{50}$  τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν το χαμηλό κόστος, η απλότητα και η ταχύτητα, όσον αφορά την αξιολόγηση του αποτελέσματος. Μειονεκτεί όμως στο γεγονός ότι η ταχύτητα της αντίδρασης μεταξύ του DPPH και μιας αντιοξειδωτικής ένωσης, εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που βρίσκονται στο μόριο της ένωσης (Brand-Williams *et al.*, 1995).

## Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος ABTS είναι μια τεχνική αποχρωματισμού η οποία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε λιπόφιλες όσο και σε υδρόφιλες (Re *et al.*, 1998) αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Το αντιοξειδωτικό ABTS (2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζόλινο-6-σουλφονικό οξύ) αντιδρά με υπερθεϊκά ιόντα και παράγει το κατιόν  $ABTS^{•+}$  (εικ.5).

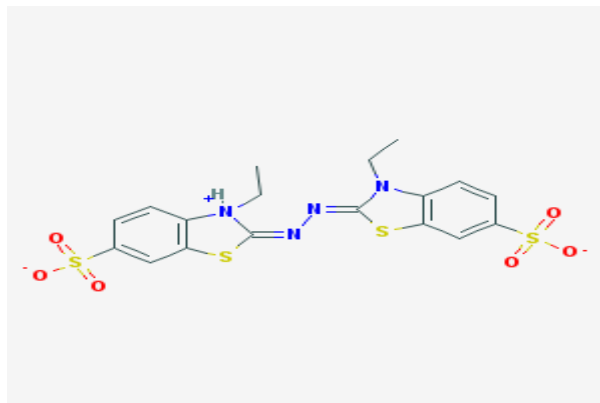
Το κατιόν της αντίδρασης ( $ABTS^{•+}$ ) χρώματος μπλε/πράσινο, παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 415 nm, 645 nm και 734 nm και 815 nm. Στην πλειοψηφία τους οι ερευνητές παρακολουθούν την αντίδραση της ρίζας  $ABTS^{•+}$  και της αντιοξειδωτικής ουσίας στα 415 και 734 nm (Cano *et al.*, 2000). Η προσθήκη αντιοξειδωτικών στο διάλυμα  $ABTS^{•+}$  έχει ως αποτέλεσμα το σταδιακό αποχρωματισμό του ο οποίος εξαρτάται από τη

συγκέντρωση της προστιθέμενης αντιοξειδωτικής ουσίας, την αντιοξειδωτική της ικανότητα και το χρόνο αντίδρασης. (Re *et al*, 1998).

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες καταναλώνουν το έγχρωμο κατιόν και τελικά το διάλυμα παίρνει κίτρινο χρώμα.

Η αντιοξειδωτική ενεργότητα, εκφράζεται και σε αυτή τη μέθοδο με τη χρήση της IC<sub>50</sub> και δίνεται από τον ίδιο τύπο:

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) * 100$$



**Εικόνα 5:** ABTS radical cation

### 1.11 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές χρωματογραφίας. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη διαχωριστική ικανότητα η οποία επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Το δείγμα προς ανάλυση αφού διαλυθεί σε κατάλληλο διαλύτη εισέρχεται (injected) στην αρχή της στήλης (column) και μεταφέρεται κατά μήκος αυτής με συνεχή ροή και με τη βοήθεια του διαλύτη (κινητή φάση-mobile phase) στον οποίο είχε αρχικά διαλυθεί.

Η στήλη κατασκευάζεται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα και περιέχει προσροφητικά σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου (3,5 ή 10 μm). Τα σωματίδια αυτά αναφέρονται ως ακίνητη φάση (stationary phase). Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνεται μέσα στη στήλη. Η επιλογή κατάλληλης κινητής φάσης και προσροφητικού υλικού έχει ως αποτέλεσμα τα συστατικά του μίγματος να αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση. Ο βαθμός αλληλεπίδρασης επηρεάζει το διαχωρισμό των συστατικών με αποτέλεσμα αυτά να εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους από τη στήλη. Όσο μεγαλύτερη η αλληλεπίδραση τόσο ισχυρότερα κατακρατούνται τα συστατικά με αποτέλεσμα να κινούνται με μικρότερη ταχύτητα μέσα στη στήλη.

Τα συστατικά αφού διέλθουν από τη στήλη, εισέρχονται στον ανιχνευτή. Στη συνέχεια καταγράφεται στον συνδεδεμένο υπολογιστή με την HPLC συσκευή το χρωματογράφημα. Το χρωματογράφημα αποτελεί το διάγραμμα του σήματος του ανιχνευτή ως συνάρτηση του χρόνου έκλουσης του συστατικού ή του όγκου έκλουσης της κινητής φάσης. Ο χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης ( $t_R$ ) είναι ο χρόνος μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της έκλουσης του συστατικού από τη στήλη (εμφάνιση μέγιστου χρωματογραφικής κορυφής).

Η πληροφορία η οποία λαμβάνεται από το χρωματογράφημα αφορά την πολυπλοκότητα του δείγματος (αριθμός κορυφών) και την ταυτότητα των συστατικών του με τον προσδιορισμό του χρόνου κατακράτησης της ουσίας, σε συνδυασμό με φασματοσκοπικά δεδομένα (φάσμα UV-VIS) και σε σύγκριση με αντίστοιχα δεδομένα σε χρωματογραφήματα γνωστού δείγματος (standard mixture) τα οποία μετρήθηκαν με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες.

Επιπλέον, είναι δυνατός και ο ποσοτικός προσδιορισμός μιας ουσίας, αρκεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη καμπύλη αναφοράς.

### **1.12 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμικροβιακής ικανότητας**

Υπάρχει μια ποικιλία μεθόδων προσδιορισμού της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των φυσικών συστατικών. Οι μέθοδοι αυτοί κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες:

- μέθοδοι διάχυσης
- μέθοδοι αραίωσης
- βιο-αυτογραφικές μέθοδοι

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων εντούτοις, επιδρά, διαφοροποιώντας τα αποτελέσματα που λαμβάνονται. Έτσι, προκειμένου να προσδιοριστεί η αντιμικροβιακή δράση, πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα (Cushnie *et al.*, 2005). Η μέθοδος που χρησιμοποιείται, ο όγκος και ο τύπος του θρεπτικού μέσου, το μέγεθος των οπών, το στέλεχος του μικροοργανισμού και ο χρόνος επώασης του, καθώς και ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των διαλυμάτων, είναι παράγοντες που διαφοροποιούν τα τελικά αποτελέσματα στη βιβλιογραφία.

Οι βιο-αυτογραφικές και οι μέθοδοι διάχυσης, είναι γνωστές ως ποιοτικές τεχνικές μια και ανιχνεύουν μόνο την παρουσία ή απουσία ουσιών με αντιμικροβιακή δράση. Αντιθέτως, οι μέθοδοι αραίωσης, θεωρούνται ποσοτικές μέθοδοι ανάλυσης, αφού μπορεί να προσδιοριστεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Vanden, *et al.*, 1991).

## Σκοπός της μελέτης

Αντικείμενο της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί ποιοτικά ή σύσταση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων από τα τέπαλα του *Crocus sativus L.* και τα φύλλα της *Melissa officinalis* καθώς και του μελισσοκομικού προϊόντος πρόπολη, με σκοπό τη δυνατότητα αξιοποίησης τους ως αντιοξειδωτικούς ή/και αντιμικροβιακούς παράγοντες στον τομέα των τροφίμων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως φαινολικών συστατικών, από τους φυτικούς ιστούς με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και κατόπιν προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Κατόπιν μελετήθηκε ποιοτικά η σύσταση αυτών με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Τέλος, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση τους *in vitro* με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μέσω οπών, σε θετικούς και αρνητικούς κατά Gram παθογόνους και μη μικροοργανισμούς.

Η μελέτη επικεντρώθηκε στην απομόνωση φαινολικών συστατικών λόγω του ότι σε αυτά αποδίδονται πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των άγλυκων φλαβονοεδών που απομονώθηκαν από τα τέπαλα του *Crocus sativus L.*, μια και στη βιβλιογραφία είναι ελάχιστες οι μελέτες που αναφέρονται στην αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση.

Η αντιοξειδωτική δράση της *Melissa officinalis* και ιδιαίτερα του αιθέριου ελαίου της έχει εκτεταμένα μελετηθεί. Εντούτοις, συνδυαστικές μελέτες αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης αλκοολικών εκχυλισμάτων της δρόγης του φυτού, είναι περιορισμένες.

Τέλος, όσον αφορά στην πρόπολη, οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές της ιδιότητες είναι γνωστές, παρόλα αυτά η χρησιμοποίηση της στον τομέα των τροφίμων έχει μελετηθεί μόνο για ένα μικρό εύρος μικροοργανισμών.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη, συμβάλλει στην ανάδειξη των ιδιοτήτων των ελληνικών προϊόντων, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικά οφέλη στην οικονομική ενίσχυση της πρωτογενούς παραγωγής και κατ' επέκταση στην Ελληνική βιομηχανία τροφίμων.

## 2. Παρουσίαση φυσικών προϊόντων της ελληνικής χλωρίδας

### 2.1 Κρόκος Κοζάνης - *Crocus sativus* L.



Ο κρόκος είναι γνωστός με την ονομασία ζαφορά ή σαφράν (ι). Το σαφράν (ι), προέρχεται από τον ύπερο του άνθους του φυτού κρόκος, η επιστημονική ονομασία του οποίου είναι κρόκος ο ήμερος (*Crocus sativus* L.). Ανήκει στην οικογένεια των Ιριδοειδών (*Iridaceae*).

#### **Μορφολογία του φυτού**

Ο κρόκος είναι ένα πολυετές φυτό, ύψους 20-25 cm. Τα φύλλα του είναι γραμμωτά, με μικρό πλάτος, σπαθωτά, χρώματος πράσινου σκούρου και είναι 6-8 ανά βολβό. Τα λουλούδια του σχηματίζουν μικρά ανορθωμένα χωνάκια, που με την παρέλευση ορισμένων ωρών ανοίγουν, χάνοντας το πρώτο τους σχήμα. Βγαίνουν από ένα έως τρία σε κάθε βολβό. Αποτελούνται από έξι μωβ τέπαλα (tepals ή petals), μήκους 4-5 cm και πλάτους 1 cm περίπου. Έχουν τρεις στήμονες χρώματος κίτρινου και μεγέθους 2 έως 4

cm και ένα στύλο που χωρίζεται με τρία στίγματα. Τα λουλούδια έχουν μία ωθήκη, τρίχωρη, στενή, η οποία περιέχει στρογγυλά σπέρματα χρώματος καστανού.

Τα στίγματα ειδικότερα είναι που αποτελούν τη δρόγη του φυτού. Είναι το μέρος του φυτού που έχει μελετηθεί και αξιοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς και σε γαληνικά σκευάσματα (tintur of orium-laudanum).

Το σαφράν χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για θεραπευτικούς σκοπούς. Εκτενείς βιοχημικές και φυτοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι το σαφράν αποτελείται από περισσότερες από 150 χημικές ενώσεις.

Ειδικότερα, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκονται αποκαροτενοειδή ή κροκίνες (crocines), πικροκροκίνη (picrocrocin), σαφρανάλη (safranal).

Η ομάδα των κροκινών είναι υπεύθυνη για το χρώμα, η πικροκροκίνη για την πικρή γεύση και η σαφρανάλη δίνει στο φυτό το χαρακτηριστικό του άρωμα.

Σε αυτές τις ενώσεις έχει αποδοθεί και η σημαντική θεραπευτική δράση του φυτού.

### **Ιστορική αναδρομή**

Η ιστορία του κρόκου ξεκινάει από την Ανατολή. Αναφορές χρήσης του φυτού βρίσκονται στη Μικρά Ασία καθώς και στην αρχαία Αίγυπτο. Η χρήση του Κρόκου απαντάται και στην Κλασική Ελλάδα, όπου χρησιμοποιούνταν ως χρωστική ουσία, αρωματικό φυτό, αλλά επίσης και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Ο Διοσκουρίδης καταγράφει τις φαρμακευτικές χρήσεις του κρόκου και τον θεωρεί κράτιστο των φυτικών ιαμάτων ως αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό και αντισηπτικό.

Σχετικά με τη προέλευση και την καλλιέργεια του φυτού, υπάρχουν διαφορετικές γνώμες. Ορισμένοι υποστηρίζουν πως ο κρόκος είναι ιθαγενές φυτό της Ανατολής, όπου έγινε και η πρώτη καλλιέργεια του. Από εκεί μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από τους σταυροφόρους. Υπάρχουν απόψεις που υποστηρίζουν πως κατάγεται από την Ελλάδα, στην οποία καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά κατά τη μεσομινωική περίοδο.

Το θετικότερο που γνωρίζουμε σχετικά με την ιστορία αυτού του φυτού, είναι ότι οι Άραβες, αφού συστηματοποίησαν την καλλιέργειά του και χρησιμοποίησαν τη δρόγη του όχι μόνο ως μπαχαρικό αλλά κυρίως ως φάρμακο, την έφεραν στην Ισπανία από όπου μεταδόθηκε και σε άλλα κράτη της Ευρώπης.

### **Βιολογικές ιδιότητες και χρήση του *Crocus sativus L.* στη θεραπευτική**

Πολυάριθμες μελέτες για τη βιολογική δράση του σαφράν έχουν διεξαχθεί, αποδεικνύοντας την πολύτιμη δράση του.

Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι το σαφράν είναι αποτελεσματικό ενάντια σε πολλά νευρολογικά νοσήματα. Συγκεκριμένα, το σαφράν είναι δραστικό έναντι σε συναισθηματικές και αγχώδεις διαταραχές (Pitsikas *et al*, 2009, Kamalipour *et al.*, 2010; Akhondzadeh *et al.*, 2005), σε παροξυσμικές και επεισοδιακές διαταραχές (επιληψία) (Hosseinzah *et al.*, 2005). Επιπλέον, σημαντική είναι η δράση του όσον αφορά εξωπυραμιδικές και κινητικές διαταραχές (Parkinson) (Ahmad, 2005), καθώς και εκφυλιστικά νοσήματα (Alzheimer) (Naghizadeh *et al*, 2013).

Πρόσφατα, μελετήθηκε και η δράση του απέναντι στον σακχαρώδη διαβήτη και τη δυσλιπιδαιμία. Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν την αποτελεσματική ικανότητα του σαφράν να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης του διαβήτη και των επακόλουθων επιπλοκών του (Farkhondeh *et al.*, 2014).

Επιπρόσθετα, αιθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα σαφράν, παρουσιάζουν καρδιοπροστατευτική δράση μειώνοντας την αρτηριακή πίεση (Imenshahidi *et al.*, 2010).

Στη δράση της κροκίνης οφείλονται οι αντικαρκινικές ιδιότητες του σαφράν. Η κροκίνη εμποδίζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Tarantilis *et al*, 1994). Έχει εκτιμηθεί ακόμη η δράση υδατικών εκχυλισμάτων του φυτού, ενάντια στα θηλώματα του δέρματος, σε ποντίκια. Το σαφράν βρέθηκε να μειώνει το μέγεθος των θηλωμάτων (Das *et al*, 2010).

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι και η αντιοξειδωτική δράση, ειδικότερα των αποκαροτενοειδών ενώσεων που περιέχονται στη χημική σύσταση του σαφράν. (Kanakakis *et al*, 2009). Στην ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση, έχει αποδοθεί η αντικαταθλιπτική και αντιδιαβητική του ικανότητα.

Οι παραπάνω φαρμακολογικές ιδιότητες αποδίδονται στις χημικές ενώσεις που περιέχονται στο σαφράν. Όπως φαίνεται, τα τέπαλα παραμένουν ένα λιγότερο αξιοποιήσιμο μέρος του φυτού. Δεν υπάρχουν αναφορές που να υποστηρίζουν τη δραστηριότητά τους, παρόλο που η αντιοξειδωτική τους δράση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. (Serrano-Diaz *et al*, 2012).

## 2.2 Μελισσόχορτο - *Melissa officinalis*



### Μορφολογία φυτού

Το μελισσόχορτο ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* (Χειλανθή). Είναι γνωστό και ως μελισσοβότανο, μελισσάκι, μέλισσα, κιτροβάλσαμο. Το όνομά του το οφείλει στο ότι προσελκύει τις μέλισσες.

Πρόκειται για ένα πολυετές φυτό 30-80 cm ψηλό, με φύλλα σχήματος ωειδούς, οδοντωτά και έμμισχα. Τα φύλλα του έχουν ήπιο άρωμα λεμονιού, γι' αυτό και η κοινή αγγλική ονομασία του είναι Lemon Balm. Τα φύλλα του φυτού αποτελούν και τη δρόγη του, η οποία έχει πολύπλοκη χημική σύσταση. Περιέχει πληθώρα χημικών ουσιών μεταξύ των οποίων και ένα αιθέριο έλαιο, το οποίο αποτελείται από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια. (WHO monographs). Τα σημαντικότερα τερπενοειδή αποτελούν η κιτράλη, η κιτρονελλάλη, η γερανιόλη, η νερόλη και η λιναλοόλη. Επιπλέον, η παρουσία αντιοξειδωτικών δευτερογενών μεταβολιτών είναι αξιοσημείωτη. Σε μεγάλη συγκέντρωση βρίσκονται γλυκοζίτες φλαβονοειδών (λουτεολίνης, απιγενίνης) (Mulken *et al.*, 1987), συριγγικό (Arceusz, *et al.*, 2013).



## Ιστορική αναδρομή

Το μελισσόχορτο καλλιεργήθηκε αρχικά στη Νότια Ευρώπη, σήμερα όμως είναι πλέον γνωστό σε όλο σχεδόν τον κόσμο. Στην αρχαία Ελλάδα και τη Ρώμη, το μελισσόχορτο εμβάπτιζόταν στο κρασί και μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από του στόματος και τοπικά για να θεραπεύσει τα τσιμπήματα, τα δαγκώματα και τις πληγές. Η Αγιουβερδική φαρμακοποιία αναφέρει ότι χρησιμοποιείται για την θεραπεία της δυσπεψίας που συνδέεται με την κατάθλιψη ή την ανησυχία.

## Βιολογικές ιδιότητες και χρήση της *Melissa officinalis* στη θεραπευτική

Στη δρόγη του φυτού έχουν αποδοθεί πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες. Ήδη από την αρχαιότητα, χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση νευρολογικών διαταραχών (Grieve, 1998).

Σήμερα, συστήνεται από διάφορους βοτανολόγους για την αντιμετώπιση της ημικρανίας, των στομαχικών διαταραχών, όπως επίσης και ως ενισχυτικό της μνήμης (Salah *et al.*, 2005; Ballard *et al.*, 2002; Akhondzadeh *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2002).

Επιπλέον αιθανολικά ή υδατικά εκχυλίσματα του φυτού, παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, οφειλόμενη κυρίως στα φαινολικά συστατικά του (Pereira *et al.*, 2009). Συγκεκριμένα, το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί το κύριο φαινολικό οξύ της οικογένειας των φυτών *Lamiaceae* (Lamaison *et al.*, 1991) και σε αυτό έχει αποδοθεί πλήθος βιολογικών δραστηριοτήτων. Εκτός από την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του παρουσιάζει επίσης αντιφλεγμονώδη, στυπτική και αντιβακτηριδιακή δράση (Parnham *et al.*, 1985).

Επίσης, μεθανολικά εκχυλίσματα της *Melissa officinalis*, παρουσίασαν παρεμποδιστική ικανότητα έναντι του ενζύμου MAO-O, το οποίο βρίσκεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και συνδέεται με το μεταβολισμό των κατεχολαμινών. Βρέθηκε ότι μεθανολικά εκχυλίσματα δρουν παρεμποδιστικά στη δράση του MAO-O, με αποτέλεσμα την ανακούφιση από τα συμπτώματα της κατάθλιψης (López *et al.*, 2009).

Τέλος, σημαντική είναι και η δράση του αιθέριου ελαίου της *Melissa officinalis*. Το αιθέριο έλαιο, πλούσιο σε αλδεΐδες και τερπενικές αλκοόλες (Jafer *et al.*, 2008), έχει σπασμολυτική και αντιμικροβιακή δράση (Wagner *et al.*, 1973).

## 2.3 Πρόπολη



Η ονομασία πρόπολη προέρχεται από τις Ελληνικές λέξεις «προ» και «πόλις» που σημαίνουν πριν από την πόλη, καθώς οι μέλισσες τη χρησιμοποιούσαν για να φράξουν την είσοδο του μελισσιού.

Η πρόπολη, είναι μια κολλώδης ουσία που παράγουν οι μέλισσες και η οποία προκύπτει από τη συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων από τους φλοιούς των φυτών. Οι μέλισσες, συλλέγουν τις ρητίνες, τις οποίες προσροφούν και αναμειγνύουν με τα ένζυμα της σιέλου τους. Αφού τη μεταφέρουν μέσα στην κυψέλη, με τις τρίχες των ποδιών τους, επικαλύπτουν τα εσωτερικά και εξωτερικά μέρη της κυψέλης με την πρόπολη, η οποία ισχυροποιεί την αποικία των μελισσών και της παρέχει ένα υγιέστερο περιβάλλον. Η πρόπολη εμπλουτίζεται μέσα στην κυψέλη με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες. Δεν αποτελεί τροφή για τις μέλισσες, αλλά χρησιμοποιείται από αυτές για την επάλειψη του εσωτερικού των κελιών στη γονοφωλιά, για την επισκευή και τον καθαρισμό των κηρυθρών, για το σφράγισμα ρωγμών στην κυψέλη, για το βαλσάμωμα νεκρών ζώων ή εντόμων, τα οποία είναι πολύ μεγάλα για να μεταφερθούν έξω από την κυψέλη. Ακόμη, η μέλισσα αλείφει το σώμα της με αυτή την ουσία, για να προστατέψει τον εαυτό της από φυσικούς εχθρούς (Χαριζάνης, 1992).

Το χρώμα της πρόπολης ποικίλει από κίτρινο-πράσινο, μέχρι καστανό και σκούρο καφέ. Εξαρτάται από το φυτό προέλευσής της, από τις προσμείξεις κεριού και γύρης, αλλά και από τον χρόνο παραμονής της στην κυψέλη.

### Ιστορική ανάδρομη

Είναι ένα φυσικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς από την αρχαιότητα. Οι Αιγύπτιοι γνώριζαν τις αντισηπτικές ιδιότητες της πρόπολης και τις αξιοποιούσαν στη διαδικασία μουμιοποίησης. Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι θεραπευτές, ο

Διοσκουρίδης, ο Πλίνιος και ο Γαληνός, γνώριζαν τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιμυκητιακές της ιδιότητες, και την χρησιμοποιούσαν ως αντισηπτικό, ως απολυμαντικό της στοματικής κοιλότητας και επουλωτικό των πληγών. Τον 17ο αιώνα η Φαρμακοποιία του Λονδίνου περιελάβανε την πρόπολη ως επίσημο φάρμακο. Μεταξύ του 17ου και του 20ου αιώνα, η φαρμακευτική δράση της πρόπολης έγινε πολύ δημοφιλής στην Ευρώπη για τις αντιβακτηριδιακές της ιδιότητες. Η πρόπολη χρησιμοποιούνταν επίσης από τους κατασκευαστές μουσικών οργάνων για να αναδεικνύουν τα νερά του ξύλου, όπως για παράδειγμα στο βερνίκι που εφαρμόζαν στα πασίγνωστα βιολιά Στραντιβάριους.

Σήμερα, χρησιμοποιείται ευρέως ως φάρμακο, είτε ως αυτούσιο σκεύασμα, είτε ως συστατικό άλλων σκευασμάτων.

### **Χημική σύσταση Πρόπολης**

Το χημικό προφίλ της πρόπολης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο. Συνδέεται άμεσα με τη χλωρίδα της περιοχής από την οποία συλλέγεται (Marcucci, 1995), καθώς επίσης και από την εποχή συλλογής της, ανεξάρτητα αν προέρχεται από την ίδια περιοχή (Bankova *et al.*, 1998).

Έως σήμερα περισσότερες από 300 ενώσεις έχουν ανιχνευτεί στην πρόπολη (Bankova, *et al.*, 2000). Η φαρμακευτική και βιολογική της δράση αποδίδεται κυρίως στο υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων και ιδιαίτερα στην παρουσία φαινολικών οξέων και εστέρων αυτών (Socha *et al.*, 2014).

Τα κυριότερα συστατικά της πρόπολης σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization) παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1: Χημική σύσταση πρόπολης**

Κατηγορία συστατικών	Ομάδα συστατικών	Αναφορές
Ρητίνες	45-55% Φλαβονοειδή  Φαινολικά οξέα και εστέρες	Pápay et al., 1987 Bankova et al., 1987 Nagy et al., 1989 Omar, 1989 Greenaway et al., 1990 Wang and Zhang, 1988 Mizuno et al., 1987 Nagy et al., 1985 Wollenweber et al., 1987 Bankova et al., 1992
Κηροί και λιπαρά οξέα	25-35%	Pápay et al., 1987
Αιθέριο έλαιο	10% πτητικές ουσίες	Petri et al., 1988
Γύρη	5% 6 κύρια αμινοξέα από τα οποία η αργινίνη και η προλίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό	Gabrys et al., 1986
Οργανικά και ανόργανα συστατικά	5% 14 ιχνοστοιχεία μεταξύ των οποίων Fe & Zn σε μεγαλύτερο ποσοστό Κετόνες Λακτόνες Κινόνες Στεροειδή Βενζοϊκά οξέα και εστέρες Βιταμίνες( μόνο Β <sub>3</sub> ) Σάκχαρα	Scheller et al., 1989 Bankova et al., 1987 Cuellar and Rojas, 1987 Cuellar and Rojas, 1987 Cuellar and Rojas, 1987  Greenaway et al., 1987 Greenaway et al., 1987 Greenaway et al., 1987

Πηγή FAO

## Βιολογική και Φαρμακολογική δράση της πρόπολης

Η πρόπολη έχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως δεν έχει τοξική δράση στα θηλαστικά, εφόσον δεν χορηγείται σε πολύ μεγάλες δόσεις (Ghisalberti, 1979).

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά οι θεραπευτικές ιδιότητές της.

**Πίνακας 2:** Βιολογικές-Φαρμακολογικές ιδιότητες πρόπολης

Εφαρμογές	Σχόλια	Βιβλιογραφική αναφορά
Προστασία από ερεθισμούς κατά την έκθεση σε ακτινοβολία	<ul style="list-style-type: none"><li>•Σε ποντίκια, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, αλκοολικού εκχυλίσματος</li><li>•Μέσω της δέσμευσης ελευθέρων ριζών</li></ul>	Scheller et al, 1989 Scheller et al, 1990
Αντικαρκινική δράση	<ul style="list-style-type: none"><li>•Κυτταροτοξική δράση διτερπένιου PMS-1, έναντι στο υπατοκυτταρικό καρκίνωμα και τον καρκίνο του δέρματος</li><li>•καρκίνωμα Ehrlich</li><li>•Υδατικά διαλύματα, ενισχύουν τη δράση της 5-FU</li></ul>	Matsuno 1995 Scheller et al, 1989 Suzuki et al, 1996 Takai et al, 1996
Αντιοξειδωτική δράση	<ul style="list-style-type: none"><li>•Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, μεγαλύτερη από αυτή της βιταμίνης C και της E,</li></ul>	Basnet et al 1997
Αντιμικροβιακή δράση	<ul style="list-style-type: none"><li>•Ισχυρή βακτηριοστατική δράση έναντι Staphylococcus aureus Escherichia Coli και Bacillus subtilis, κυρίως λόγω των φαινολικών ενώσεων</li></ul>	Bankova et al 1995 Serra and Escola 1995
Οδοντιατρική	<ul style="list-style-type: none"><li>•Αποτελεσματική δράση σε μικροοργανισμούς της στοματικής κοιλότητας</li><li>•Επικουρική θεραπεία για την καταπολέμηση της ουλίτιδας και της πλάκας</li><li>•Αντισηπτική δράση</li></ul>	Park et al 1998 Neumann et al 1986 Gafar et al 1986
Πεπτικό σύστημα	<ul style="list-style-type: none"><li>•Δραστικό ενάντια στο Helicobacter Pylori</li></ul>	Hashimoto et al 1998
Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"><li>• Υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα, καθώς και μεμονωμένα φαινολικές ενώσεις</li></ul>	Ivanovska et al 1995 Krol et al 1996 Mirzoeva & Calder 1996
Αντιυπεραλγητικές ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"><li>• Υδατικά διαλύματα Πρόπολης</li></ul>	Campos et al 1998

## Κεφάλαιο III: Πειραματικό μέρος

### 3.1 Προμήθεια φυτικού υλικού και πρόπολης

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία παρασκευής εκχυλισμάτων, ανήκουν στην οικογένεια των Ιριδοειδών, όσον αφορά τον *Crocus sativus L.* και στην οικογένεια των Χειλανθών όσον αφορά τη *Melissa officinalis*.

Από τον Αναγκαστικό συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης προμηθεύτηκαν τα αποξηραμένα άνθη του φυτού *Crocus sativus L.* ενώ το μελισσόχορτο μας το προμήθευσε ο αγροτικός συνεταιρισμός καλλιεργητών αρωματικών φαρμακευτικών και ενεργειακών φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ).

Το μελισσοκομικό προϊόν πρόπολη, προέρχεται από την Κρήτη. Χρησιμοποιήθηκε καθαρή, στερεή, ακατέργαστη πρόπολη.

### 3.2 Παραλαβή άγλυκων φλαβονοειδών από τέπαλα *Crocus sativus L.*

Από το φυτικό υλικό διαχωρίστηκαν με το χέρι τα τέπαλα του φυτού από το υπόλοιπο μέρος του άνθους. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν 2 g λειοτριβημένων τεπάλων, τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη και εμποτίστηκαν με 25 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων. Η θερμοκρασία του απιονισμένου νερού στο λουτρό ρυθμίστηκε στους 25°C και η διάρκεια εκχύλισης ήταν 15 λεπτά. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 75 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Το στερεό υπόλειμμα του δείγματος, στεγνώθηκε με ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια ακολούθησε όξινη υδρόλυση με διάλυμα HCl, 5N. Στο δείγμα, προστέθηκαν 75 mL από το διάλυμα HCl και ξανατοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων, στην ίδια θερμοκρασία και για τον ίδιο χρόνο. Στη συνέχεια, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος για 24 ώρες, προκειμένου να υδρολυθούν οι γλυκοζίτες του εκχυλίσματος.

Την επόμενη μέρα το διάλυμα διηθείται και το διήθημα εκχυλίζεται με 50 mL οξικού αιθυλεστέρα (εικ.7). Η διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε 3 φορές. Κάθε φορά, σε ξεχωριστό ποτήρι ζέσεως συγκεντρώνεται η υδατική φάση και η φάση του οξικού αιθυλεστέρα η οποία περιέχει τα άγλυκα φλαβονοειδή.

Στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή (εικ.6). Κατόπιν, προστίθεται μικρή ποσότητα μεθανόλης και ξαναγίνεται συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Η τελευταία διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου η μυρωδιά του δείγματος αποκτήσει το χαρακτηριστικό άρωμα των τεπάλων του κρόκου.

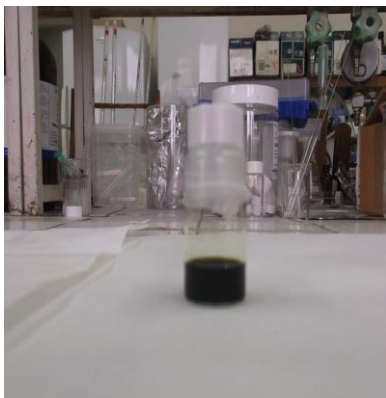
Στο τελικό ξηρό προϊόν, προστέθηκαν 5 mL μεθανόλης και το δείγμα συλλέγεται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, διηθείται με φίλτρο σύριγγας και αποθηκεύεται στην κατάψυξη (εικ.8).



**Εικόνα 6:** Περιστρεφόμενος συμπυκνωτής



**Εικόνα 7:** Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα



**Εικόνα 8:** Εκχύλισμα *terpals Crocus sativus L.*

### 3.3 Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος *Melissa officinalis*

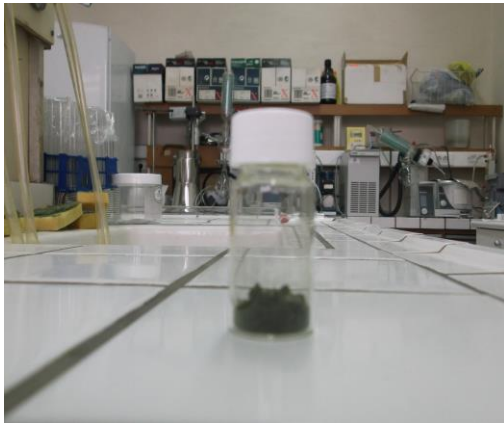
Το φυτικό υλικό διαχωρίστηκε με το χέρι και κατόπιν ζυγίστηκαν 5 g λειοτριβημένων φύλλων. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και εμποτίστηκε με 100 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25°C για 15 λεπτά. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές και ο συνολικός όγκος του πετρελαϊκού αιθέρα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 600 mL.

Το στερεό υπόλειμμα στεγνώνεται με άζωτο και κατόπιν προστίθενται 100 mL μεθανόλης. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία σε λουτρό υπερήχων 3 φορές, στην ίδια

θερμοκρασία και για τον ίδιο χρόνο. Το διάλυμα διηθείται και το διήθημα όγκου 300 mL διατηρείται στο ψυγείο.

Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκαν 150 mL μεθανόλης και το δείγμα αφέθηκε σε συσκευή μαγνητικού αναδευτήρα προστατευμένο από το φως για 20 ώρες. Την επόμενη μέρα το διάλυμα διηθείται και το νέο διήθημα προστέθηκε στο αρχικό εκχύλισμα *Melissa officinalis*-μεθανόλη.

Κατόπιν, γίνεται συμπύκνωση σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή υπό κενό στους 25°C μέχρι ξηρού (εικ.9). Το τελικό προϊόν, σε στερεή πλέον μορφή, αποθηκεύεται στην κατάψυξη, από το οποίο κάθε φορά ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα εργασίας.



**Εικόνα 9:** *Melissa officinalis*

### 3.4 Παραλαβή εκχυλίσματος πρόπολης

#### 3.4.1 Παραλαβή αιθανολικού εκχυλίσματος

Το δείγμα κόπηκε σε μικρά κομμάτια και σε κωνική φιάλη ζυγίστηκε 1 g. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 mL υδροαλκοολικού διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25°C για 15 λεπτά. Συνολικά η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές. Μετά το πέρας των 15 λεπτών το δείγμα διηθείται. Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκαν 10 mL από το διάλυμα αλκοόλης καθώς και τα 20 mL του διαλύματος της διήθησης. Κατόπιν, αφέθηκε υπό ανάδευση σε συσκευή μαγνητικού αναδευτήρα στο σκοτάδι για 20 ώρες. Την επόμενη μέρα, το δείγμα φιλτράρεται με φίλτρο πορώδους 0.2 μm και διαμέτρου 15 mm (Chromafil PET 20/15 MS), και αποθηκεύεται στην κατάψυξη (εικ.10).



### 3.4.2 Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραλαβή του μεθανολικού εκχυλίσματος ήταν όμοια με αυτή για το αιθανολικό εκχύλισμα, με τη διαφορά ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεθανόλη (HPLC).

Και αυτό το εκχύλισμα φιλτράρεται με φίλτρο ίδιου μεγέθους προκειμένου να απομακρυνθούν οι κηροί, πριν αποθηκευτεί στην κατάψυξη (εικ.10).



**Εικόνα 10:** Μεθανολικό και Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης

### 3.5 Ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες-Μέθοδος Folin Ciocalteu

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965).

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα Folin Ciocalteu 0.2N και ανθρακικού νατρίου (75 g/L).

Υπολογίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εις τριπλούν, καθώς και του καφεϊκού οξέος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ουσία.

Σε καθαρό περιέκτη, προστέθηκαν 450  $\mu$ L απιονισμένου νερού και 50  $\mu$ L δείγματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2.5 mL διαλύματος Folin Ciocalteu και μετά από 5 λεπτά κάθε περιέκτης εμβολιάστηκε με 2 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Ακολούθησε μηχανική ανάδευση των μιγμάτων για λίγα δευτερόλεπτα σε συσκευή ανάδευσης Vortex και στη συνέχεια τα δείγματα αφήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο σκοτάδι για 1<sup>1/2</sup> ώρες. Κάθε 30 λεπτά, επαναλαμβανόταν η ανάδευση τους στη συσκευή Vortex. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος  $\lambda=765$  nm.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για το πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Το εύρος των συγκεντρώσεων του καφεϊκού οξέος ήταν από 100  $\mu$ g/ mL έως 700  $\mu$ g/ mL.

Για το μηδενισμό του φωτόμετρου, παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία τυφλό διάλυμα, στο οποίο αντί για 50  $\mu\text{L}$  δείγματος, προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  μεθανόλης .

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα καταναλώνουν το αντιδραστήριο, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, εκφράζεται σε  $\text{mg}$  καφεϊκού οξέος ανά  $\text{g}$  ξηρού υλικού.

### 3.6 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

Σε όλα τα δείγματα που εκχυλίστηκαν μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων συγκεντρώσεων τους με τη μέθοδο DPPH.

Η μέθοδος DPPH των Brand-Williams *et al* (1995), τροποποιήθηκε για τις ανάγκες της μελέτης. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε το μεθανολικό διάλυμα εργασίας της σταθερής ρίζας DPPH, συγκέντρωσης  $60 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς με παρασκευή πρότυπων μεθανολικών διαλυμάτων 8 συγκεντρώσεων trolox και 8 καφεϊκού οξέος. Το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν από 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έως 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Ποσότητα 50  $\mu\text{L}$  από το κάθε εκχύλισμα και σε διάφορες συγκεντρώσεις αναμείχθηκαν με διάλυμα DPPH όγκου 5  $\text{mL}$ . Ακολούθησε μηχανική ανάδευση των μιγμάτων για λίγα δευτερόλεπτα σε συσκευή ανάδευσης Vortex και στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των δειγμάτων με φωτόμετρο σε μήκος κύματος 517  $\text{nm}$ . Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα στο οποίο προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  μεθανόλης αντί δείγματος.

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα, καταναλώνουν τη ρίζα DPPH, με αποτέλεσμα των αποχρωματισμό του διαλύματός της. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ισοδύναμα trolox (trolox equivalents) και καφεϊκού οξέος (caffeic acid equivalents). Τα αποτελέσματα, εκφράζονται ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που χρειάζεται για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξειδωση του υποστρώματος κατά 50% ( $\text{IC}_{50}$ ).

Η % παρεμπόδιση υπολογίστηκε από τον τύπο

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \cdot 100$$

Όπου  $A_{\text{control}}$  είναι η απορρόφηση του μάρτυρα (DPPH – μεθανόλη) και

$A_{\text{sample}}$  η απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος (DPPH).

### 3.7 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε και με τη μέθοδο ABTS. Το διάλυμα της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> παρασκευάστηκε με ανάμιξη αντιδραστήριου ABTS συγκέντρωσης 7 mM και υπερθειϊκού καλίου συγκέντρωσης 2.45 mM.

Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν 38,40 mg αμμωνιακού άλατος ABTS τα οποία διαλύθηκαν πλήρως σε απιονισμένο νερό. Κατόπιν, προστέθηκαν 6,62 mg υπερθειϊκού καλίου και με ανατάραξη παρελήφθη διαυγές διάλυμα. Στη συνέχεια το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένο από το φως για 12-16h, ώστε να προκύψει διάλυμα χρώματος βαθύ κυανού (Skotti E. *et al.*, 2013).

Την επόμενη μέρα με κατάλληλη αραίωση του αρχικού πυκνού μίγματος σε μεθανόλη, παρασκευάζεται το τελικό διάλυμα εργασίας, το οποίο έχει απορρόφηση περίπου 0.7 μονάδες στα 734 nm.

30 μL διαφόρων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων αναμίχθηκαν με 3 mL διαλύματος ABTS<sup>•+</sup>. Τα μίγματα αναδεύτηκαν μηχανικά για λίγα δευτερόλεπτα σε συσκευή ανάδευσης Vortex και στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστατευμένα από το φως για 6 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα στο οποίο προστέθηκαν 30 μL μεθανόλης αντί δείγματος.

Ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, μετρήθηκε και η αντιοξειδωτική ικανότητα των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών trolox και καφεϊκού οξέος. Το εύρος των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων ήταν από 1 μg/mL έως 8 μg/mL όσον αφορά το trolox και από 1 μg/ mL έως 6 μg/ mL όσον αφορά το καφεϊκό οξύ.

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα, καταναλώνουν τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, με αποτέλεσμα των αποχρωματισμό του διαλύματός της. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε μg/ mL ισοδύναμα trolox και καφεϊκού οξέος (trolox equivalents TEQ, caffeic acid equivalents CAE). Τα αποτελέσματα, εκφράζονται ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που χρειάζεται για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC<sub>50</sub>).

Η % παρεμπόδιση υπολογίστηκε από τον τύπο

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) * 100$$

Όπου  $A_{\text{control}}$  είναι η απορρόφηση του μάρτυρα (ABTS –μεθανόλη) και

$A_{\text{sample}}$  η απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος.

### 3.8 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος της εταιρίας Simatzu με ανιχνευτή SDP-M10A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με το χρωματογράφο και με το λογισμικό LC-MS solutions ver3.40.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε στήλη αντιστρόφου φάσεως τύπου Supelco Discovery HS C18 με μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4.6 mm και πορώδες 5 μm. Για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μείγμα διαλυτών.

Όσον αφορά τα τέπαλα του *Crocus.sativus L.* χρησιμοποιήθηκαν δυο διαλύτες:

A: απιονισμένο νερό HPLC οξινισμένο με 0.1% μυρμηκικό οξύ (pH 2.5 ) και

B: ακετονιτρίλιο HPLC οξινισμένο με 0.1% μυρμηκικό οξύ.

Για τα δείγματα της *Melissa officinalis* και της πρόπολης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες:

A: απιονισμένο νερό HPLC οξινισμένο με 0.25% μυρμηκικό οξύ (pH 2.5 ) και

B: μεθανόλη υψηλής καθαρότητας (99.9%) για HPLC

Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30°C για την *Melissa officinalis* και την πρόπολη και στους 35°C για τα τέπαλα.

Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη έγινε με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AD και ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μL για την πρόπολη και 10 μL για τα τέπαλα και την *Melissa officinalis*.

Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0.400 mL/min όσον αφορά τη μέθοδο για τα τέπαλα ώστε το πρόγραμμα έκλουσης να ξεκινήσει με αναλογία 5% μεθανόλη και 95% νερό. Για την *Melissa officinalis* και την πρόπολη η ροή της κινητής φάσης ήταν 0.500 mL/min και το πρόγραμμα έκλουσης ξεκίνησε με αναλογία 25% μεθανόλη και 75% νερό.

Για τον διαχωρισμό των ενώσεων εφαρμόστηκε το παρακάτω πρόγραμμα κινητής φάσεως (βαθμιδωτής έκλουσης):

### **Πρόγραμμα έκλουσης tepals *C.sativus L.***

<b>t (min)</b>	<b>Solvent B (Methanol) (%)</b>	<b>Solvent A (Aqua) (%)</b>
0	5	95
74	30	70
84	60	40
94	90	10

### **Πρόγραμμα έκλουσης πρόπολη - *Melissa officinalis***

<b>t (min)</b>	<b>Solvent B (Methanol) (%)</b>	<b>Solvent A (Aqua) (%)</b>
0	25	75
5	25	75
30	65	35
60	100	0
90	100	0

## **3.9 Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων**

### **3.9.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας**

Σε όλα τα δείγματα εκτιμήθηκε η ανασταλτική δράση ενάντια σε θετικά και αρνητικά κατά Gram μικροβιακά στελέχη, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν την ημέρα εκτέλεσης του πειράματος με κατάλληλη αραιώση σε μεθανόλη από το αρχικό πυκνό διάλυμα (*Crocus sativus L.*) ή με ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας από το στερεό υλικό (*Melissa officinalis*) και μετέπειτα αραιώση του σε καθαρή μεθανόλη. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε καθαρή μεθανόλη.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της πρόπολης παρασκευάστηκαν με αραιώση από το αρχικό εκχύλισμα, σε διάφορες αναλογίες (% v/v) ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν υδροαλκοολικά διαλύματα μεθανόλης και αιθανόλης 50% (v/v).

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, παρελήφθησαν τέππαλα *Crocus sativus L.* νέας σοδειάς. Στο νέο δείγμα εκτιμήθηκε μόνο η αντιμικροβιακή του δράση προκειμένου να συγκριθεί με αυτό παλαιάς σοδειάς (2013), ενώ η μέτρηση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας καθώς και ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών του με την τεχνική της

υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αποτελούν μελλοντικούς στόχους του πειράματος.

Καθαρίστηκαν με το χέρι 10 g φυτικού υλικού και κατόπιν η παραλαβή του τελικού εκχυλίσματος έγινε με ανάλογο τρόπο όπως στο εκχύλισμα της *Melissa officinalis* (παρ. 3.3), με τη διαφορά ότι το δείγμα εμποτίστηκε με 150 mL πετρελαϊκού αιθέρα και 150 mL μεθανόλης. Τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων στους 25°C για 15 λεπτά, 3 φορές για κάθε διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Το τελικό εκχύλισμα, ύστερα από συμπύκνωση του σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή υπό κενό, αποθηκεύτηκε σε στερεή μορφή στην κατάψυξη. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν την ημέρα εκτέλεσης του πειράματος με ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας από το στερεό υλικό.

Το εύρος των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τις ανάγκες της μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων στις οποίες μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση.**

Εκχυλίσματα	Τελικές Συγκεντρώσεις
Μεθανολικό εκχύλισμα τεπέλων <i>Crocus sativus</i> L. (άγλυκα φλαβονοειδή)	50 100 mg/mL 200
Μεθανολικό εκχύλισμα τεπέλων <i>Crocus sativus</i> L. (γλυκοζίτες φλαβονοειδών)	50 150 250 mg/mL 350 450
Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Melissa officinalis</i>	200 300 mg/mL 400
Μεθανολικό εκχύλισμα Propolis Αιθανολικό εκχύλισμα Propolis	10 20 30 % (v/v) 40 50

**Πίνακας 4 : Στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των υπο μελέτη εκχυλισμάτων.**

<b>LQC*</b>	<b>Species</b>	<b>Πηγή απομόνωσης</b>
20001	<i>Enterococcus faecium</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
20002	<i>Enterococcus faecium</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
20003	<i>Enterococcus faecium</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
20004	<i>Enterococcus faecium</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
20005	<i>Enterococcus faecium</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
15260	<i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπος 4b	φράουλες
15259	<i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπος 4b	φράουλες
15262	<i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπος 4b	φράουλες
15257	<i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπος 4b	φράουλες
15258	<i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπος 4b	φράουλες
15261	<i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπος 4b	φράουλες
15015	<i>Listeria monocytogenes</i> (5510)	Αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας
5001	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
5006	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
5015	<i>Staphylococcus simulans</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
5016	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
5018	<i>Staphylococcus simulans</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
5021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
15093	<i>Staphylococcus aureus</i>	Αλλαντικά ζύμωσης
15252	<i>Staphylococcus aureus</i> NCBF 1499	
15232	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Typhimurium	
15233	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Agona	Ζωοτροφές
15234	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Infantis	Ζωοτροφές
15237	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Senftenberg	Ζωοτροφές
15238	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Livingstone	Ζωοτροφές
15239	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Putten	Ζωοτροφές
15240	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Putten	Ζωοτροφές
15241	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Cubana	Ζωοτροφές
15243	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12079	Ανθρώπινα κόπρανα
15244	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 13125	
15247	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	

\*LQC: Laboratory Quality Control

### 3.9.2 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μέσω οπών (well diffusion assay). Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Brain Heart Infusion agar (BHI).

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως παθογόνα βακτήρια Gram (+) και Gram (-), τα οποία απαντώνται συχνά στα τρόφιμα. Για κάθε καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί ανανεώνονταν και επωάζονταν στους 37°C για 18-24 ώρες περίπου. 200 μL από κάθε καλλιέργεια ενσωματώνονταν στο θρεπτικό μέσο, υπό άσηπτες συνθήκες, όταν η θερμοκρασία αυτού ήταν περίπου 40-50°C. Σε τρυβλία Petri μεταφερόταν το εμβολιασμένο με τον μικροοργανισμό θρεπτικό μέσο και αφήνόταν περίπου 15 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί η σταθεροποίηση του. Στη συνέχεια έγινε διάνοιξη οπών στα τρυβλία με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur. Σε κάθε οπή τοποθετήθηκαν 25 μL από τα φυτικά εκχυλίσματα και 120 μL εκχυλίσματος πρόπολης. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία αφέθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να επιτευχθεί η διάχυση του δείγματος και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα παρατηρήθηκε η ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού που δημιουργήθηκε περιμετρικά των οπών.

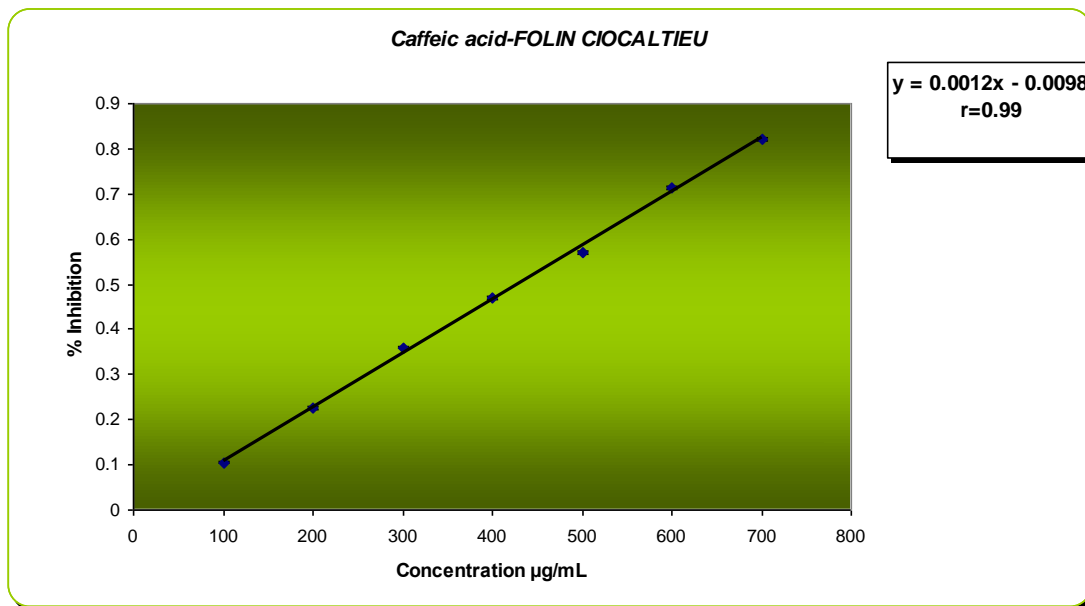


## Κεφάλαιο IV: Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκε ο αριθμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα, με βάση τη μέθοδο Folin Ciocalteu.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεθανόλη. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος/g ξηρού υλικού. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς καθώς και η εξίσωση σύμφωνα με την οποία έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών φαίνονται στην εικ.11.



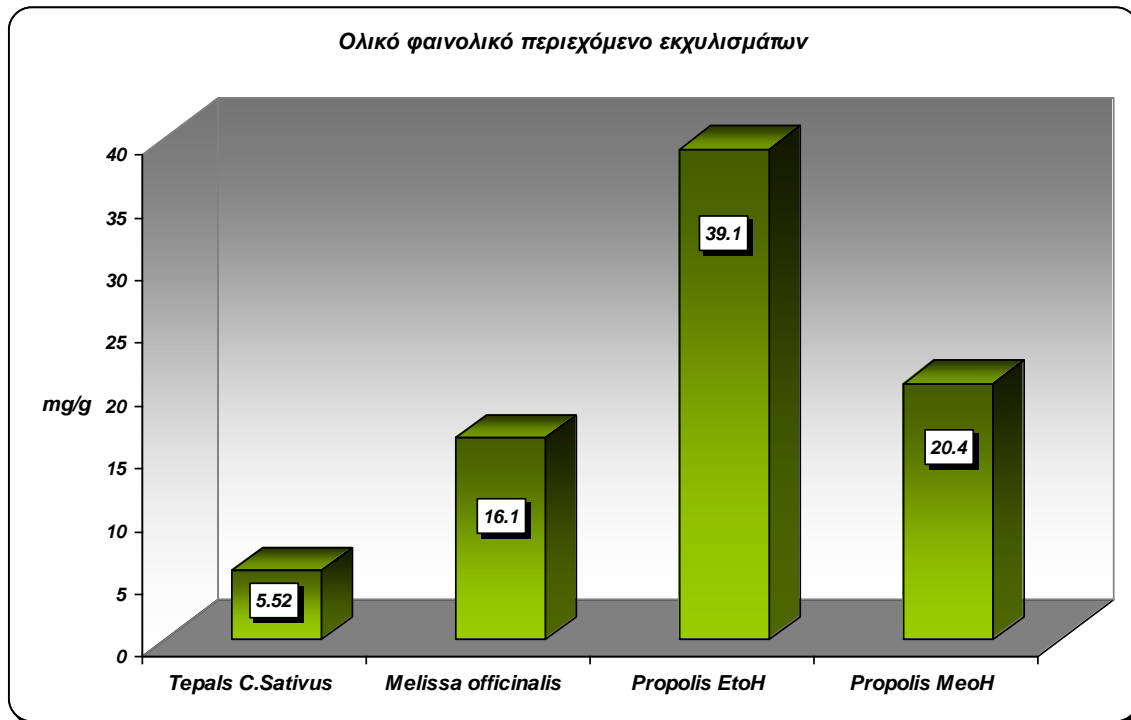
Εικόνα 11: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Caffeic acid

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων

Εκχύλισμα	Διαλύτης	1 <sup>η</sup> επανάληψη	2 <sup>η</sup> επανάληψη	3 <sup>η</sup> επανάληψη	M.O
Τέπαλα <i>C.Sativus L.</i>	Μεθανόλη	5.975	4.475	6.15	5.52±0.09 mg/g
<i>Melissa officinalis</i>	Μεθανόλη	16.944	18.6	12.67	16.1±0.1 mg/g
Πρόπολη	Μεθανόλη	0.91	0.885	0.86	0.886 ±0.006 mg/mL
Πρόπολη	Αιθανόλη	1.77	1.67	1.73	1.7±0.008 mg/mL

Προκειμένου να συγκριθούν μεταξύ τους γίνεται μετατροπή του αποτελέσματος των δυο εκχυλισμάτων της πρόπολης από mg/mL σε mg/g. Η αντιπαραβολή αυτών φαίνεται στο ραβδόγραμμα 1 και τα αποτελέσματα κυμαίνονται από  $39,1 \pm 0,8$  mg/g έως  $5,52 \pm 0,09$  mg/g.



**Ραβδόγραμμα 1:** Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων εκφρασμένο σε mg/g.

Σύμφωνα με το παραπάνω ραβδόγραμμα, η ποσότητα των ολικών φαινολικών υπερಿಸχέει στο αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης και μάλιστα με αρκετή διαφορά σε σχέση με τα άλλα εκχυλίσματα. Παρατηρούμε επίσης πως το αιθανολικό εκχύλισμα περιέχει σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα φλαβονοειδών σε σχέση με το μεθανολικό εκχύλισμα.

## 4.2 Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων

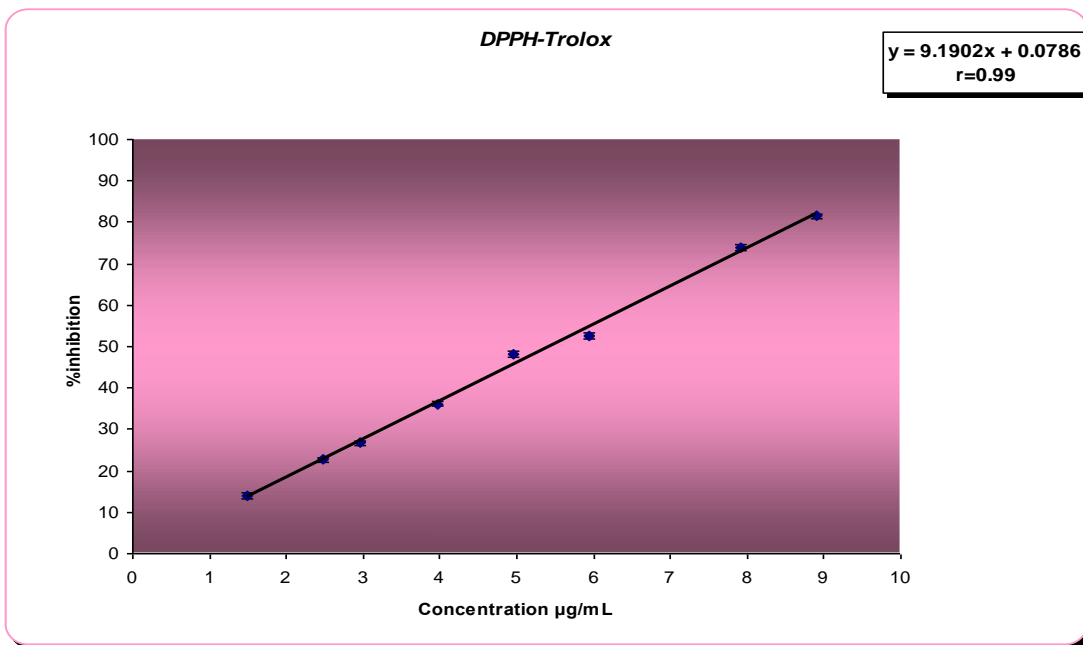
### 4.2.1 Μέθοδος DPPH

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Για κάθε εκχύλισμα δημιουργήθηκε γραφική παράσταση της % παρεμπόδισης συναρτήσει της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου δείγματος ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε γραφικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών trolox και καφεϊκού οξέος.

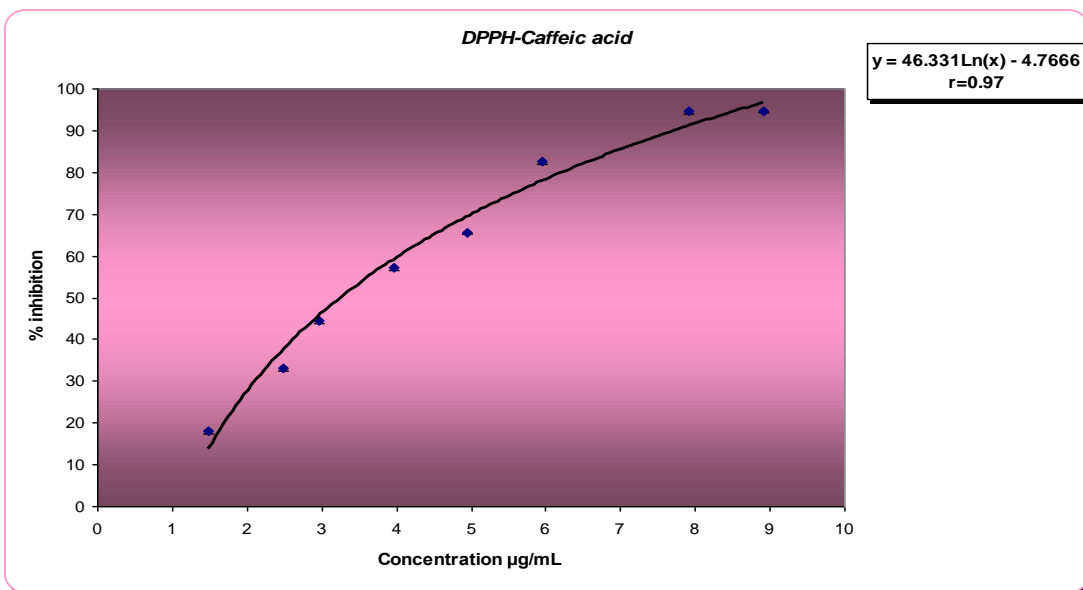
Από την εξίσωση της κάθε γραφικής παράστασης βρέθηκαν οι τιμές IC<sub>50</sub> τόσο για τα εκχυλίσματα όσο και για τις πρότυπες ουσίες.

Οι γραφικές παραστάσεις των πρότυπων ουσιών και των εκχυλισμάτων καθώς και οι εξισώσεις σύμφωνα με τις οποίες εκτιμήθηκε η τιμή IC<sub>50</sub> παρουσιάζονται στις εικ.12 α & β και στην εικ.13.

Στον πίνακα 6 φαίνονται τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης, ενώ στο ραβδόγραμμα 3 γίνεται σύγκριση αυτών.

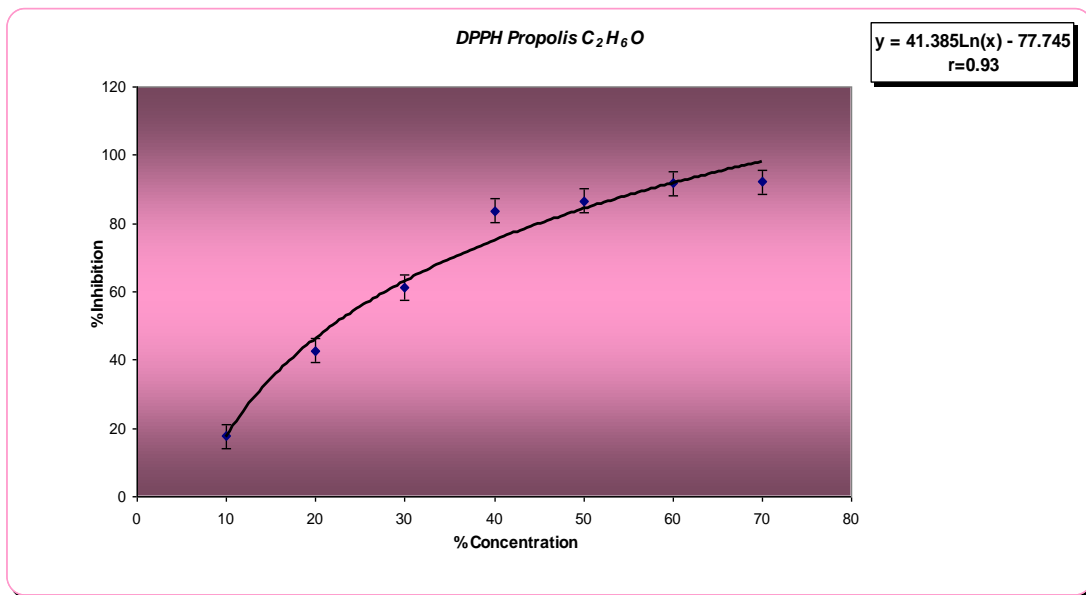


**Εικόνα 12α:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς trolox

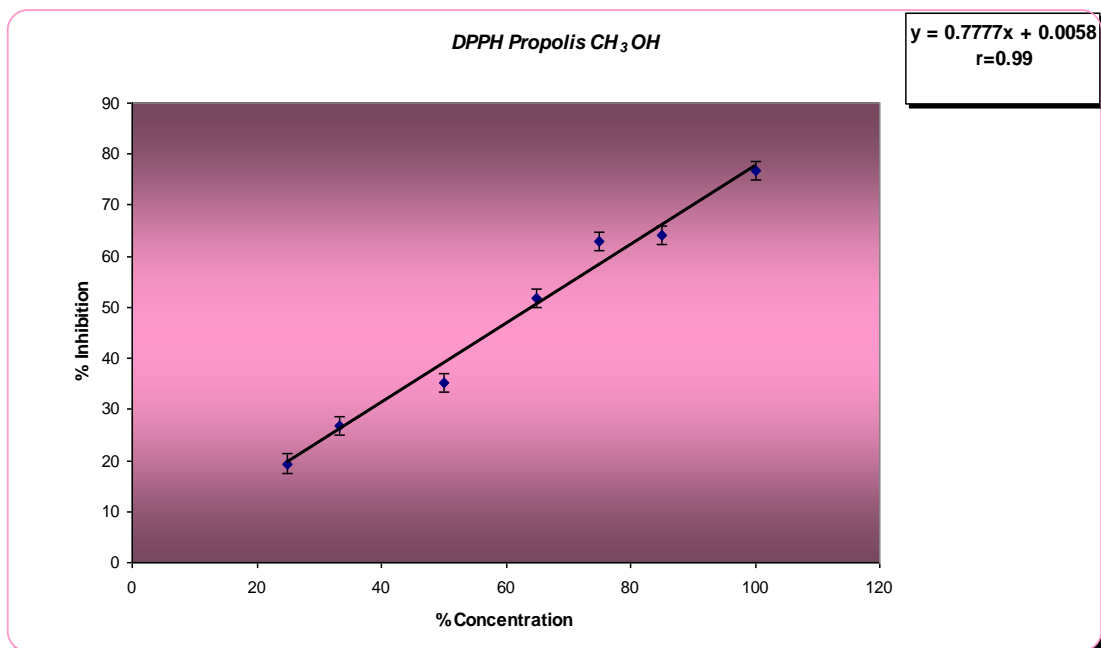


**Εικόνα 12β:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς caffeic acid

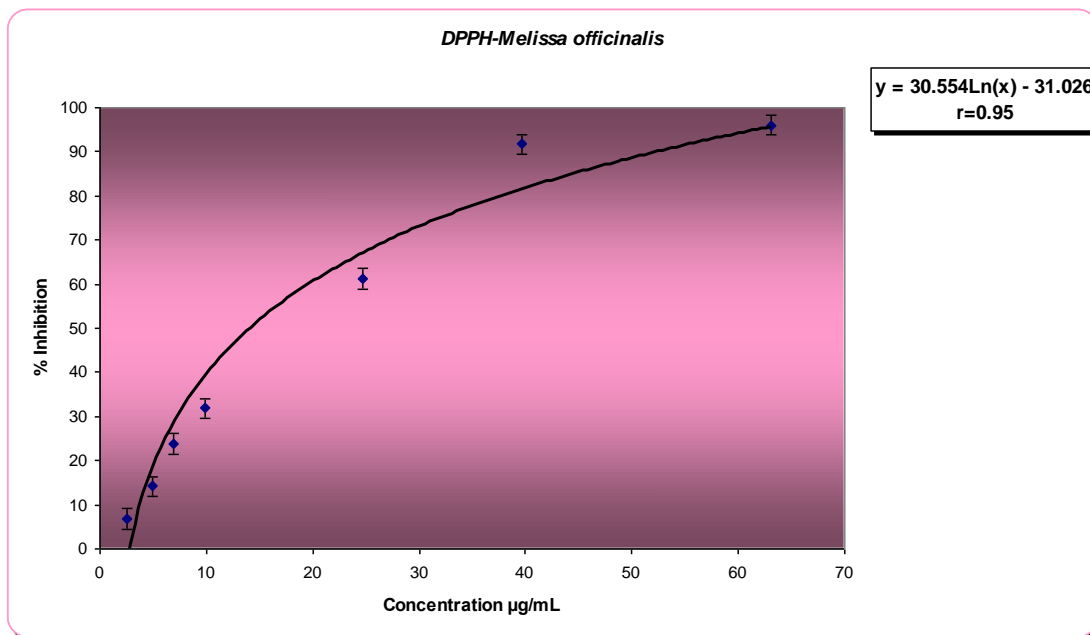
I. Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης



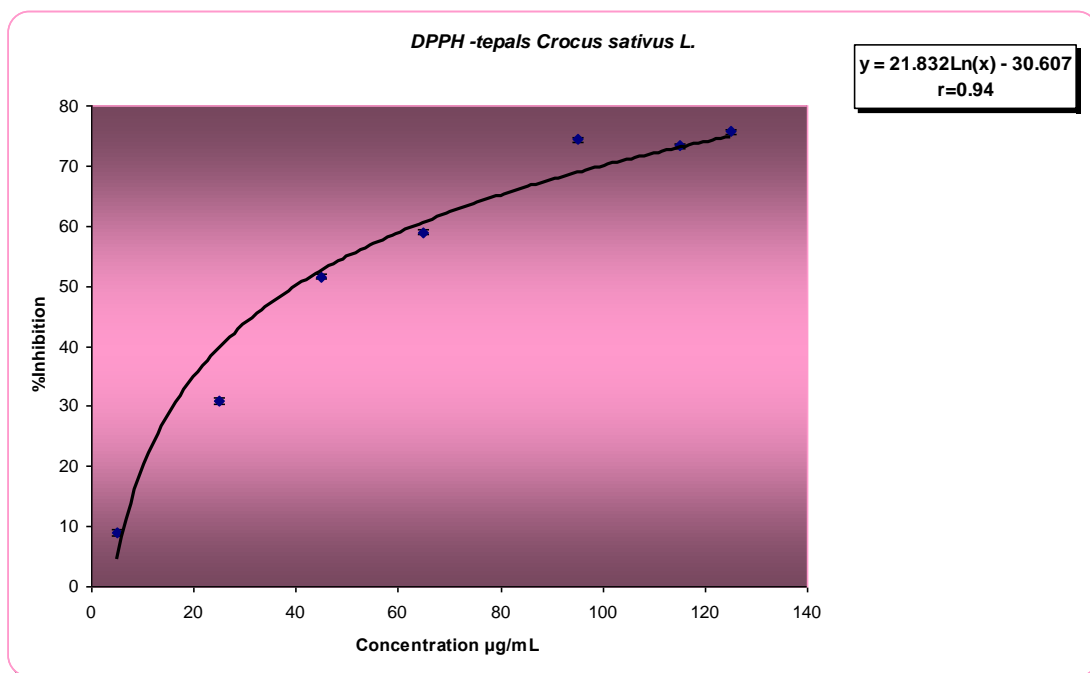
II. Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης



iii. Μεθανολικό εκχύλισμα *Melissa officinalis*



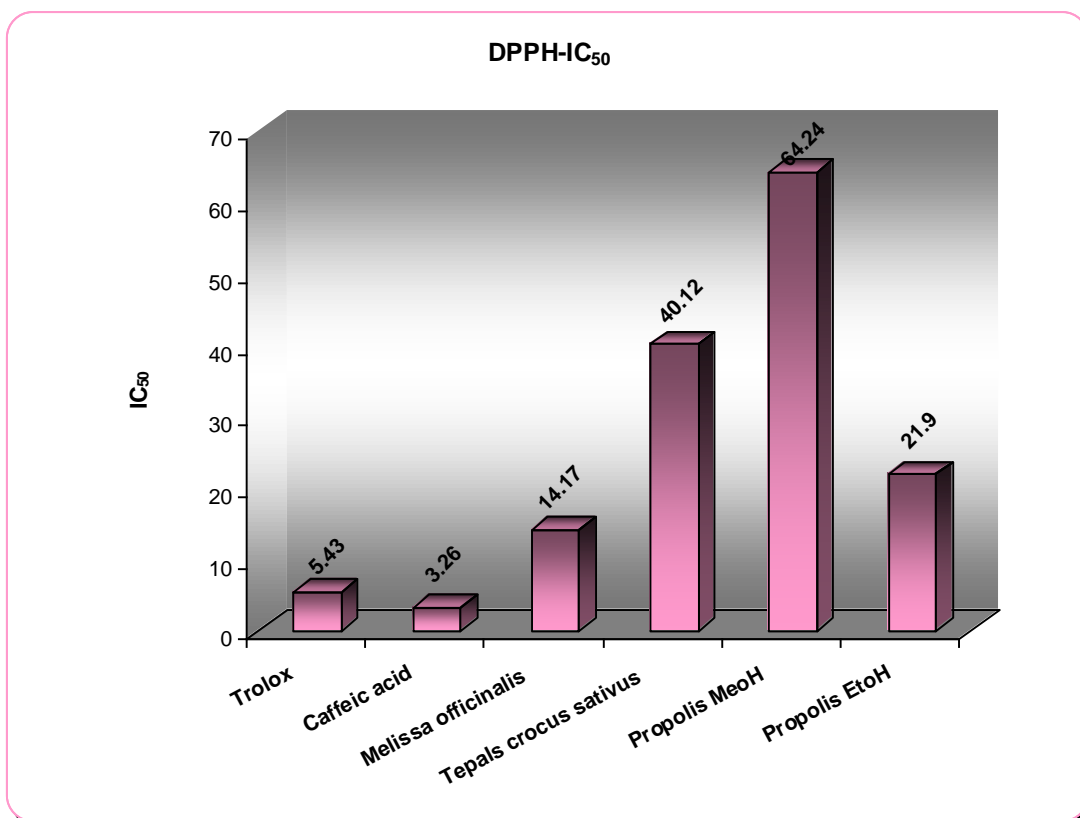
iv. Μεθανολικό εκχύλισμα tepals *Crocus sativus L.*



**Εικόνα 13 :** Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων

**Πίνακας 6:** Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων με βάση τη μέθοδο DPPH.

IC <sub>50</sub> πρότυπων διαλυμάτων μg/mL		IC <sub>50</sub> εκχυλισμάτων μg/mL			
Trolox	Caffeic acid	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Tepals C.Sativus L.</i>	Propolis MeoH	Propolis EtoH
5.43	3.26	14.17	40.12	64.24	21.9



**Ραβδόγραμμα 2:** Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι η *Melissa officinalis* καθώς έχει το μικρότερο IC<sub>50</sub> (14.17 μg/mL). Το λιγότερο δραστικό είναι το μεθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης του οποίου το IC<sub>50</sub> ισούται με 64.24 μg/mL. Παρατηρείται επίσης σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση των δυο εκχυλισμάτων της πρόπολης, με το αιθανολικό εκχύλισμα να είναι 3 φορές περίπου πιο δραστικό από το μεθανολικό. Τέλος, όσον αφορά τα τέπαλα του κρόκου, η αντιοξειδωτική δράση των άγλυκων φλαβονοειδών που περιέχουν είναι ικανοποιητική (40.12 μg/mL).

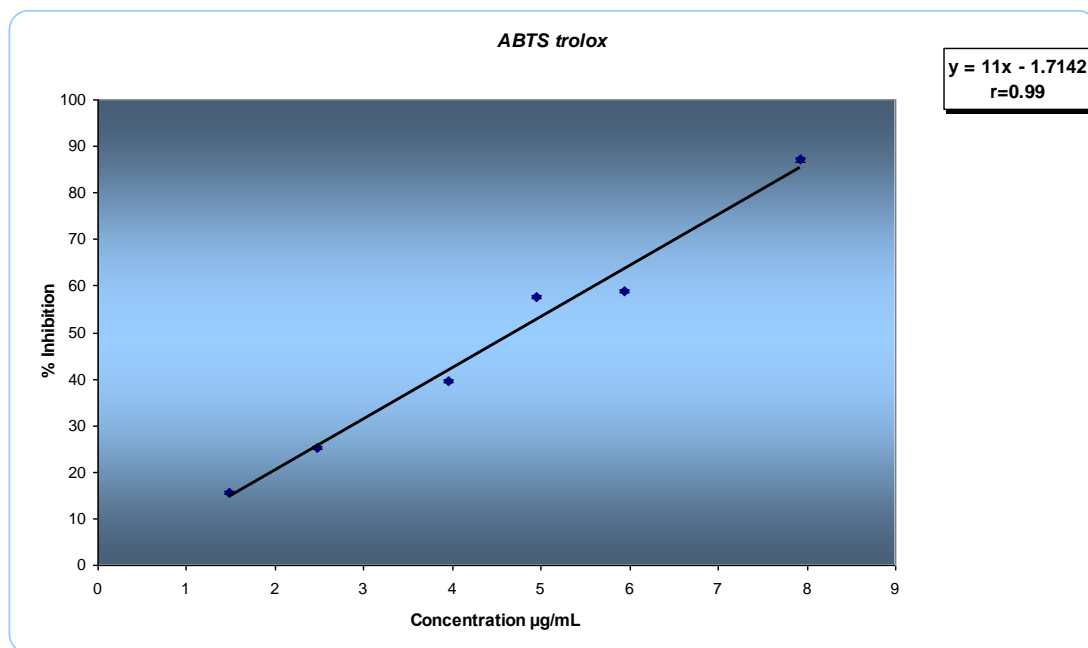
#### 4.2.2 Μέθοδος ABTS

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μετρήθηκε και με τη μέθοδο ABTS. Και σε αυτή την περίπτωση δημιουργήθηκε γραφική παράσταση της % παρεμπόδισης συναρτήσει της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου εκχυλίσματος καθώς και των προτύπων αντιοξειδωτικών ουσιών trolox και καφεϊκού οξέος.

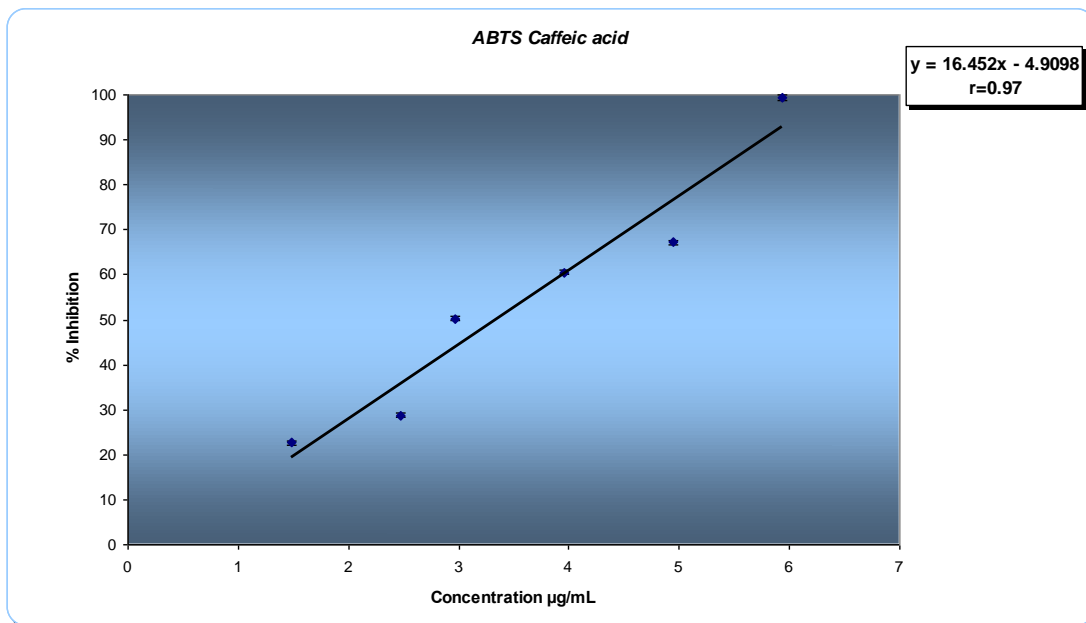
Τόσο για τις πρότυπες ουσίες όσο και για τα εξεταζόμενα δείγματα, προσδιορίστηκε η τιμή  $IC_{50}$  μέσω της εξίσωσης που προκύπτει από τη γραφική παράσταση.

Οι γραφικές παραστάσεις των πρότυπων ουσιών και των εκχυλισμάτων καθώς και οι εξισώσεις σύμφωνα με τις οποίες έγινε ο προσδιορισμός της τιμής  $IC_{50}$  παρουσιάζονται στις εικόνες 14 α & β και εικ.15.

Στον πίνακα 7 βρίσκονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης, ενώ στο ραβδόγραμμα 3 γίνεται σύγκριση αυτών.

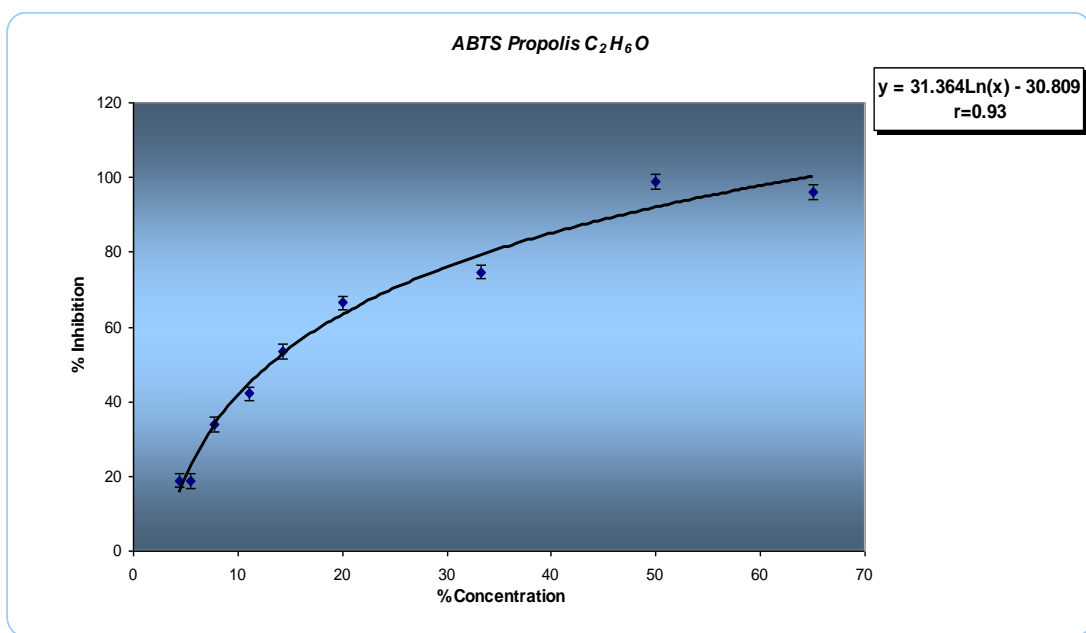


**Εικόνα 14α:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox



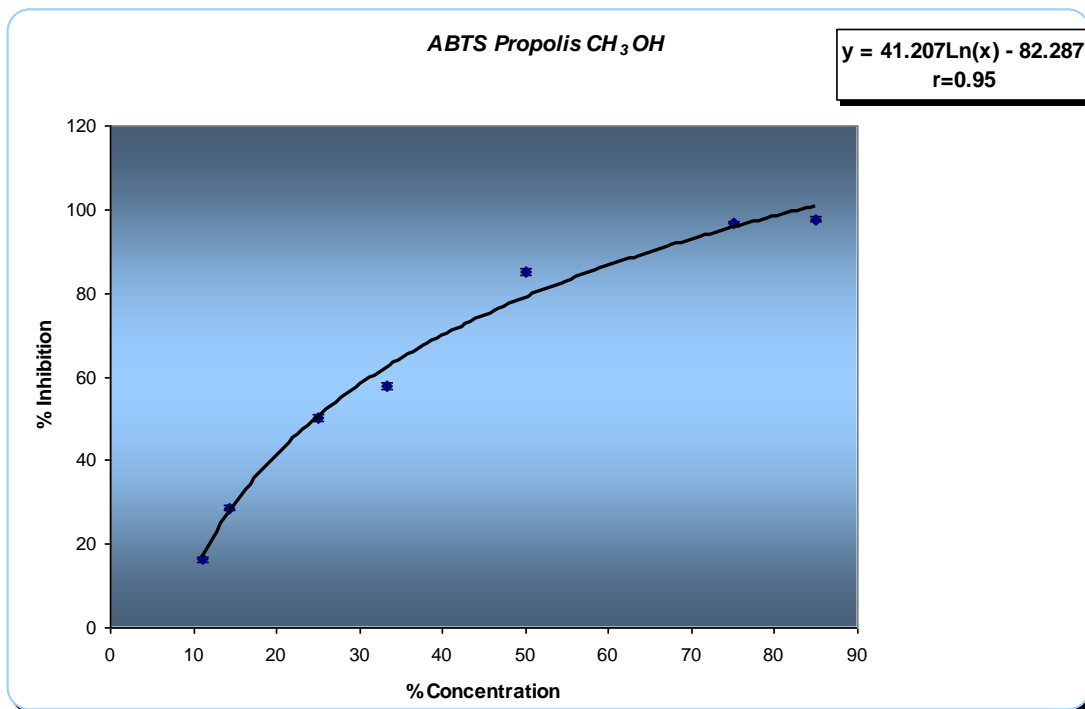
**Εικόνα 14β:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς *Caffeic acid*

**Ι. Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης**

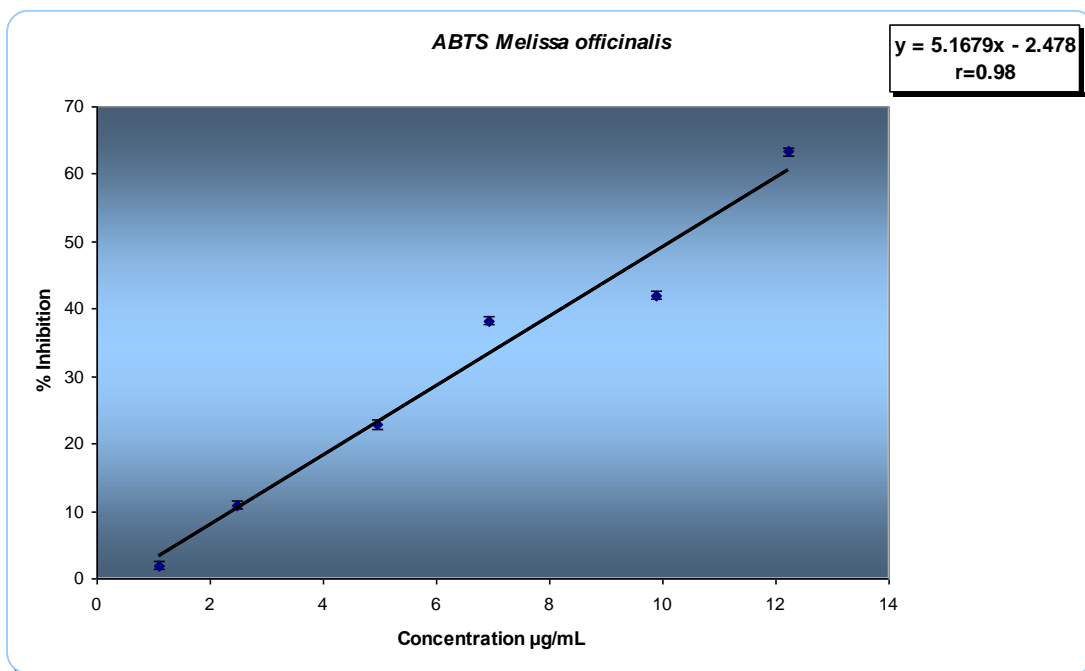




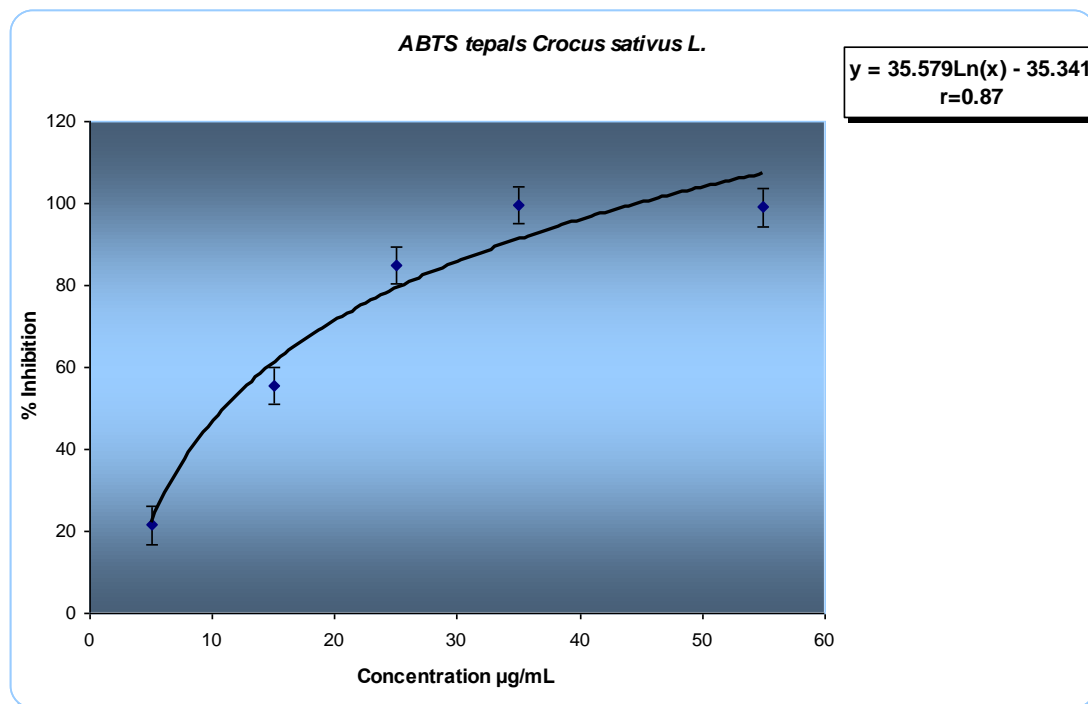
## ii. Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης



## iii. Μεθανολικό εκχύλισμα *Melissa officinalis*



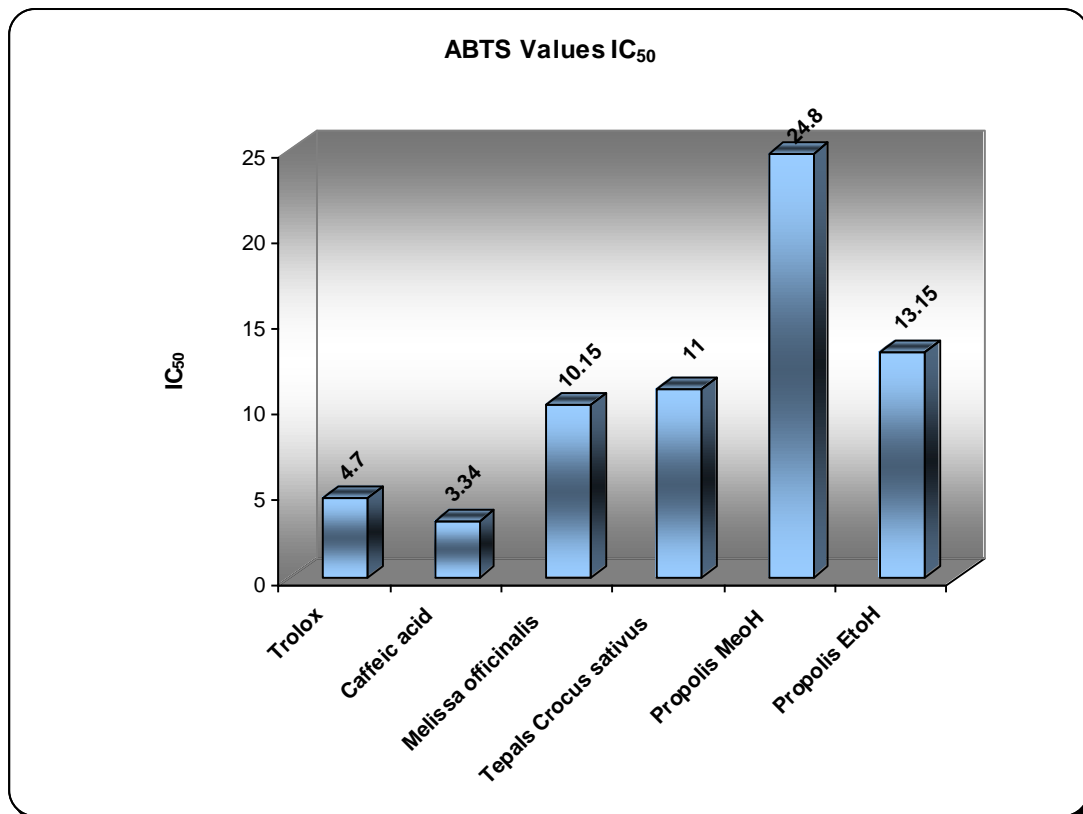
iv. Μεθανολικό εκχύλισμα tepals *Crocus sativus L.*



**Εικόνα 15 :** Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων

**Πίνακας 7:** Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων με βάση τη μέθοδο ABTS.

IC <sub>50</sub> πρότυπων διαλυμάτων µg/mL		IC <sub>50</sub> εκχυλισμάτων µg/mL			
Trolox	Caffeic acid	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Tepals C.sativus L.</i>	Propolis MeoH	Propolis EtoH
4.7	3.34	10.15	11	24.8	13.15



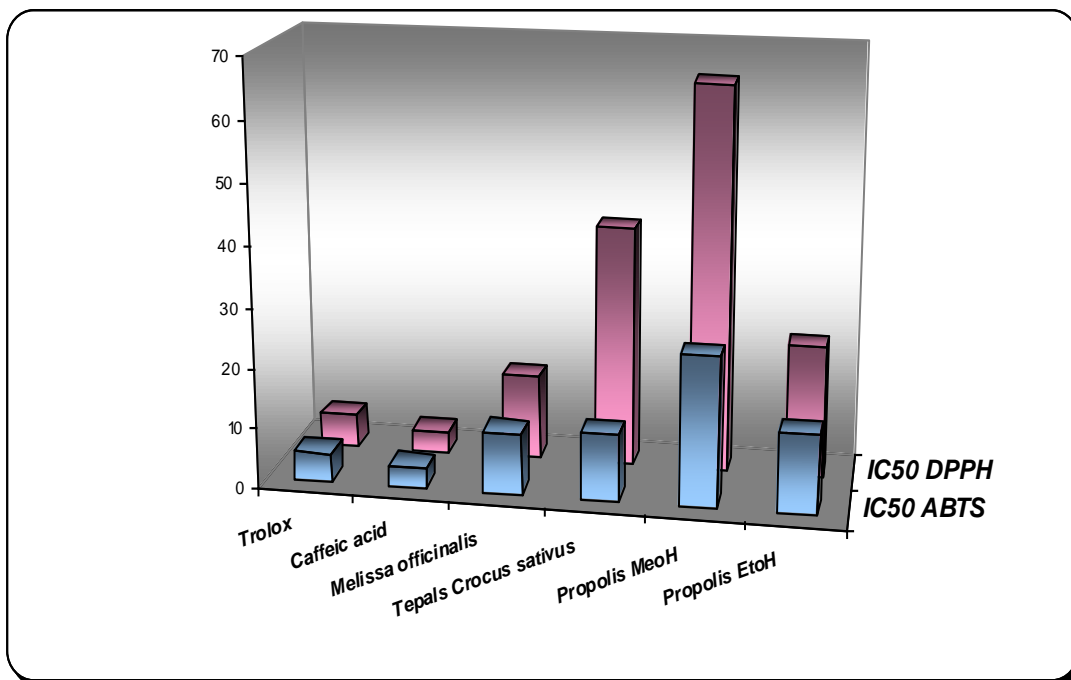
**Ραβδόγραμμα 3:** Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα και στη μέθοδο ABTS η *Melissa officinalis* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (10.15  $\mu\text{g/mL}$ ). Ακολουθεί το μεθανολικό εκχύλισμα των τεπέλων (11  $\mu\text{g/mL}$ ), στη συνέχεια το αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης (13.15  $\mu\text{g/mL}$ ) και τέλος το μεθανολικό εκχύλισμα αυτής (24.8  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 4.3 Σύγκριση μεθόδων DPPH και ABTS

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου ABTS με αυτά της DPPH, παρατηρούμε ότι στην μέθοδο ABTS :

- α. Όλα τα εκχυλίσματα πλησιάζουν περισσότερο τις τιμές  $IC_{50}$  των πρότυπων ουσιών
- β. Η αντιοξειδωτική δράση των τεπάλων παρουσιάζεται μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο DPPH και ανταγωνίζεται αυτή της *Melissa officinalis*
- γ. Η διαφορά της αντιοξειδωτικής δράσης των δυο εκχυλισμάτων της πρόπολης είναι μικρότερη. Και εδώ όμως το αιθανολικό εκχύλισμα υπερισχύει έναντι του μεθανολικού.



**Ραβδόγραμμα 4:** Συγκριτική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με βάση τις μεθόδους DPPH και ABTS.

Με βάση το παραπάνω ραβδόγραμμα συμπεραίνουμε πως οι τιμές  $IC_{50}$  στην μέθοδο DPPH παρουσιάζουν μεγαλύτερη διακύμανση σε σχέση με την ABTS.

Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα αντίδρασης του αντιοξειδωτικού DPPH<sup>•</sup> είναι πιο αργή από αυτή του ABTS<sup>•+</sup>.

Επιπλέον η αντιοξειδωτική ισχύς των εκχυλισμάτων είναι για όλα τα δείγματα μεγαλύτερη όσον αφορά στην ABTS.

Οι διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των δύο μεθόδων, μπορεί να οφείλονται στο γεγονός πως η μέθοδος ABTS μπορεί να εφαρμοστεί σε υδροφιλικά και λιποφιλικά

αντιοξειδωτικά συστήματα, ενώ αντιθέτως η μέθοδος DPPH εφαρμόζεται μόνο σε υδροφιλικά συστήματα (Kim *et al.*, 2002).

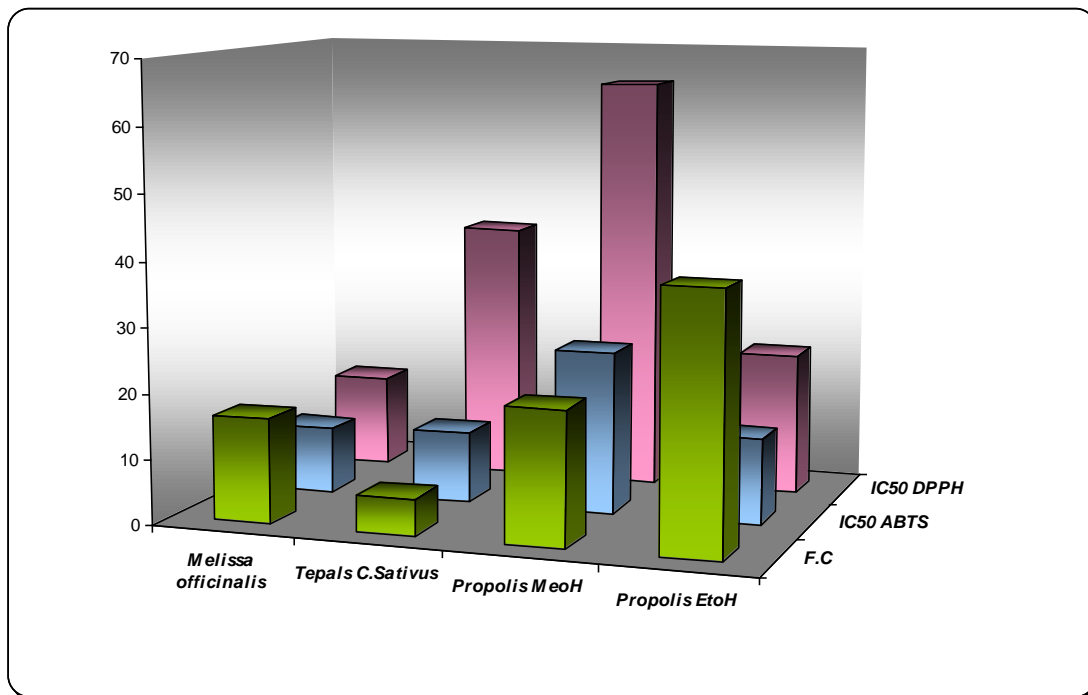
Φυσικά και οι δύο μέθοδοι είναι κατάλληλες για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όμως η ABTS χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ανιχνευσιμότητα και ευαισθησία.

Συγκρίνοντας τις τιμές IC<sub>50</sub> του κάθε εκχυλίσματος που προκύπτουν και από τις δύο μεθόδους, βλέπουμε πως μεγαλύτερη δράση παρουσιάζει η *Melissa officinalis*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, στην οποία ανήκει και το μελισσόχορτο, αποτελούν πλούσια πηγή φαινολικών οξέων και ιδιαίτερα ροσμαρινικού οξέος (Lamaison *et al.*, 1991). Το ροσμαρινικό οξύ απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Scarpat και Oriente το 1958 από το φυτό *Rosmarinus officinalis*. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδώσει πλήθος βιολογικών δραστηριοτήτων στη δράση του, με μία από τις κυριότερες, εκτός των άλλων, να είναι η αντιοξειδωτική.

Στα τέπαλα του *C.sativus L.* έχουν ανιχνευτεί σε μεγαλύτερη αναλογία τα φλαβονοειδή κερκετίνη και καμφερόλη (Montoro *et al.*, 2008). Λαμβάνοντας υπόψη πως τα δύο παραπάνω φλαβονοειδή έχουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση, όπως επίσης και τις τιμές IC<sub>50</sub> των τεπάλων που προκύπτουν από τις δύο αντιοξειδωτικές μεθόδους, μπορούμε να πούμε πως περαιτέρω μελέτη της χημικής σύστασης τους, μπορεί να δώσει μεγάλη αξία στη χρησιμοποίησή τους.

Τέλος, πολλές είναι οι μελέτες που έχουν προσδιορίσει τη χημική σύσταση δειγμάτων πρόπολης από διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Η παρουσία φαινολικών ενώσεων κυρίως κιναμικού οξέος και των εστέρων του καθώς και η παρουσία φλαβονοειδών, είναι που προσδίδουν στην πρόπολη αντιοξειδωτική δράση. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή τα οποία υπερισχύουν στη σύσταση της Ευρωπαϊκής πρόπολης, είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική της ικανότητα (Valente *et al.*, 2011, Cao *et al.*, 1997).

#### 4.4 Σύγκριση Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS



**Ραβδόγραμμα 5:** Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

	<b>F.C</b>	<b>IC<sub>50</sub> ABTS</b>	<b>IC<sub>50</sub> DPPH</b>
<b>Melissa officinalis</b>	16,1	10.15	14.17
<b>Tepals C.Sativus L.</b>	5,52	11	40.12
<b>Propolis MeoH</b>	20,4	24.8	64.24
<b>Propolis EtoH</b>	39,1	13.15	21.9

Όπως φαίνεται στο παραπάνω ραβδόγραμμα από όλα τα εκχυλίσματα, το αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης παρουσιάζει το υψηλότερο περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Εντούτοις, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει το εκχύλισμα της *Melissa officinalis*.

Παρόλο την πληθώρα των φαινολικών ενώσεων στην πρόπολη (παρ. 4.6.3, παρ 4.6.4), όπως διαπιστώνουμε από τα αποτελέσματα, η αντιοξειδωτική τους δράση δεν είναι μεγάλη. Η πινοσερμπίνη που αποτελεί το κυριότερο φλαβονοειδές της πρόπολης στη γεωγραφική περιοχή της Κρήτης (Kalogeropoulos *et al.*, 2009), παρουσιάζει μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχει. Αντίθετα, η παρουσία φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη και η καμφερόλη καθώς και

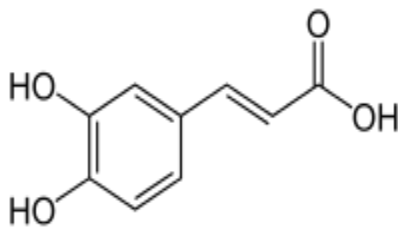
φαινολικών οξέων όπως το καφεϊκό οξύ, παρουσιάζουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα. (Ahn *et al.*, 2009).

Στο ροσμαρινικό οξύ έχει αποδοθεί μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η παρουσία 4 υδροξυλικών ομάδων στο μόριο του (εικ.16) του δίνει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Cai *et al.*, 2002).

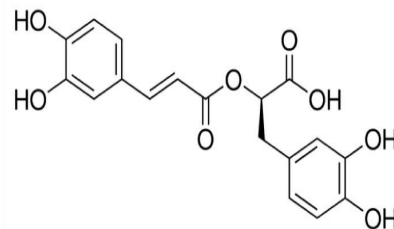
Σε αντίθεση, το καφεϊκό οξύ το οποίο βρίσκεται και στο εκχύλισμα της πρόπολης αλλά και της *Melissa officinalis*, αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο που φέρει 2 υδροξυλομάδες (εικ.16). Η διαφορά αυτή ανάμεσα στα δύο φαινολικά οξέα, καθώς επίσης και το γεγονός πιθανής συνεργιστικής δράσης τους, μπορεί να εξηγήσει το γεγονός ότι η *Melissa officinalis* παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την πρόπολη.

Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι το φαινολικό περιεχόμενο της πρόπολης υπεισχύει και αυτό των τεπάλων του κρόκου, παρατηρούμε πως η αντιοξειδωτική ικανότητα του δεύτερου είναι καλύτερη στη μέθοδο ABTS σε σχέση με αυτή της πρόπολης. Η παρουσία κερκετίνης και καμφερόλης σε μεγαλύτερη αναλογία στο δείγμα των τεπάλων σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης των δειγμάτων, μπορεί να δικαιολογήσει την ικαλύτερη αντιοξειδωτική δράση του.

Καφεϊκό οξύ



Ροσμαρινικό οξύ



**Εικόνα 16:** Σύγκριση δομής καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος

Τα αποτελέσματα των μεθόδων Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, συγκρίθηκαν με διάφορες μελέτες από τη βιβλιογραφία. Οι διαφορές που προκύπτουν μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική γεωγραφική περιοχή από την οποία προέρχεται το κάθε δείγμα, στην ημερομηνία και εποχή συλλογής του και επεξεργασίας του και τέλος στην διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραλαβή των φλαβονοειδών ενώσεων και των φαινολικών οξέων.

Αρχικά όσον αφορά τα τέπαλα του *C.Sativus L.* σοδιάς 2013, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά των Goli *et al.*, 2012, οι οποίοι μελέτησαν τέπαλα κρόκου

προερχόμενα από την περιοχή του Ιράν, σοδιάς 2011. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε και στις δύο μελέτες ήταν η μεθανόλη, με τη διαφορά ότι στην παρούσα εργασία έγινε όξινη υδρόλυση προκειμένου να απομονωθούν μόνο τα άγλυκα φλαβονοειδή των τεπάλων. Τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου της μεθόδου Folin-Ciocalteu ήταν για το δείγμα από το Ιράν  $3.45 \pm 0.2$  mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος έναντι  $5.52 \pm 0.45$  mg καφεϊκού οξέος /g ξηρού εκχυλίσματος του Ελληνικού δείγματος.

Όσον αφορά στις αντιοξειδωτικές μεθόδους DPPH και ABTS, στη βιβλιογραφία οι μελέτες οι οποίες να προσδιορίζουν και να εκφράζουν το  $IC_{50}$  των τεπάλων σε συγκεντρώσεις παραπλήσιες και με ανάλογο τρόπο όπως στην παρούσα μελέτη, είναι περιορισμένες.

Εντούτοις, οι λίγες μελέτες που υπάρχουν και αφορούν στην αντιοξειδωτική τους δράση, εμφανίζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα όσον αφορά στη μέθοδο DPPH οι Goli *et al.*, δοκιμάζοντας ένα εύρος συγκεντρώσεων από 50 έως 500 ppm βρήκαν την % παρεμπόδιση να κυμαίνεται από  $22.45 \pm 2.80$  έως  $74.23 \pm 1.82$ .

Όσον αφορά στη μέθοδο ABTS, στη μελέτη των Serrano *et al.*, 2012, το  $IC_{50}$  ισπανικού δείγματος συλλογής 2009, το οποίο μετρήθηκε στα 532 nm εκφρασμένο ως TEAC ήταν  $12.8 \pm 1.3$   $\mu$ M Trolox.

Βλέπουμε, πως το ολικό φαινολικό περιεχόμενο καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των τεπάλων δίνουν τιμές οι οποίες δεν είναι αμελητέες.

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως τα τέπαλα του Ελληνικού κρόκου αποτελούν πιο σημαντική πηγή φλαβονοειδών, στις συνθήκες στις οποίες έγινε η επεξεργασία τους. Συνεπώς με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως το εκμεταλλεύσιμο μέρος από τον *Crocus sativus L.* δεν πρέπει να επικεντρώνεται μόνο στα στίγματα. Φυσικά οι ιδιότητες που αποδίδονται σε αυτά είναι πολυάριθμες, όμως, όπως διαπιστώθηκε και τα τέπαλα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ωφέλιμη και αξιόπιστη για την υγεία πηγή αντιοξειδωτικών συστατικών.

Για το εκχύλισμα της *Melissa officinalis* τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρουσιάζουν μικρές αποκλίσεις σε σχέση με τις μελέτες που βρέθηκαν, οι οποίες πιθανώς οφείλονται τόσο στο ότι εδώ χρησιμοποιήθηκε κατά την επεξεργασία του φυτικού υλικού και πετρελαϊκός αιθέρας, ο οποίος απομακρύνει λιποειδής ενώσεις, όσο και στην αρχική ποσότητα ξηρού υλικού που χρησιμοποιήθηκε.

Για παράδειγμα οι Proestos *et al.*, 2013, βρήκαν ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μεθανολικό εκχυλίσματος μελισσόχορτου από 1 g φυτικού υλικού, ήταν  $15.01 \pm 0.1$  mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος.



Επιπλέον, οι τιμές  $IC_{50}$  είναι υψηλότερες. Συγκεκριμένα οι Albayrak *et al.*, 2013, μετρώντας την αντιοξειδωτική ικανότητα στα 517 nm βρήκαν την το  $IC_{50}$  20.16  $\mu$ g BHT/mL.

Όσον αφορά στη μέθοδο ABTS το  $IC_{50}$  μεθανολικού εκχυλίσματος μετρούμενο στα 734 nm μετά από 6 min βρέθηκε να είναι  $12.7 \pm 0.4$   $\mu$ g/mL (López *et al.*, 2009).

Τέλος σχετικά με το αλκοολικό εκχύλισμα της πρόπολης, οι περισσότερες αναφορές στη βιβλιογραφία εξετάζουν το υδατικό-αιθανολικό εκχύλισμα αυτής. Ο λόγος είναι πως η εκχύλιση με αιθανόλη είναι καταλληλότερη στο να απομακρύνει ικανοποιητικά τους κήρους από την ακατέργαστη πρόπολη και να δώσει τελικά ένα εκχύλισμα πλούσιο σε φαινολικά συστατικά στα οποία αποδίδονται περισσότερο οι θεραπευτικές ιδιότητές της (Pietta *et al.*, 2006).

Επιπλέον μόνο το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης χρησιμοποιείται για τη παρασκευή σκευασμάτων με φαρμακολογική δράση, ενώ το μεθανολικό χρησιμοποιείται μόνο για πειραματικό σκοπό.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η χημική σύσταση της πρόπολης εξαρτάται από γεωγραφικούς και κλιματολογικούς παράγοντες. Η ανασκόπηση στη βιβλιογραφία προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έγινε με βάση την μελέτη των Kalogeropoulos *et al.*, 2009, συγκρίνοντας μόνο το δείγμα από την περιοχή της Κρήτης. Η σύγκριση αφορά στη μέθοδο Folin-Ciocalteu και μόνο στο αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης.

Η συλλογή δείγματος στη μελέτη των παραπάνω έγινε από την άνοιξη έως το καλοκαίρι του 2007. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο ήταν 80.2 mg CAE/g ξηρού εκχυλίσματος, ενώ στην παρούσα μελέτη βρέθηκε 39.1 mg καφεϊκού οξέος/g. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στη μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε καθώς και στο χρόνο εκχύλισης του δείγματος με 70% (v/v) αιθανόλη, ο οποίος στη μελέτη των Kalogeropoulos *et al.*, διήρκησε 3 ημέρες.

Η αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης, συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα της μελέτης των Georgieva *et al.*, 2014, σε δείγμα προερχόμενο από τη Βουλγαρία. Η αντιοξειδωτική ικανότητα στο παραπάνω δείγμα βρέθηκε 35 mg AA/mL δείγματος έναντι 21.9  $\mu$ g/mL στο ελληνικό δείγμα.

#### 4.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έγινε ο ποιοτικός προσδιορισμός των εκχυλισμάτων τα χρωματογραφήματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω. Επίσης, για κάθε ένα από αυτά παρουσιάζονται σε πίνακες οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν, το μήκος κύματος και ο χρόνος συγκράτησης αυτών.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στη σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και του UV-VIS φάσματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος  $\lambda_{max}$ , όπου έχουμε τη μέγιστη απορρόφηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, με αυτά των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες.

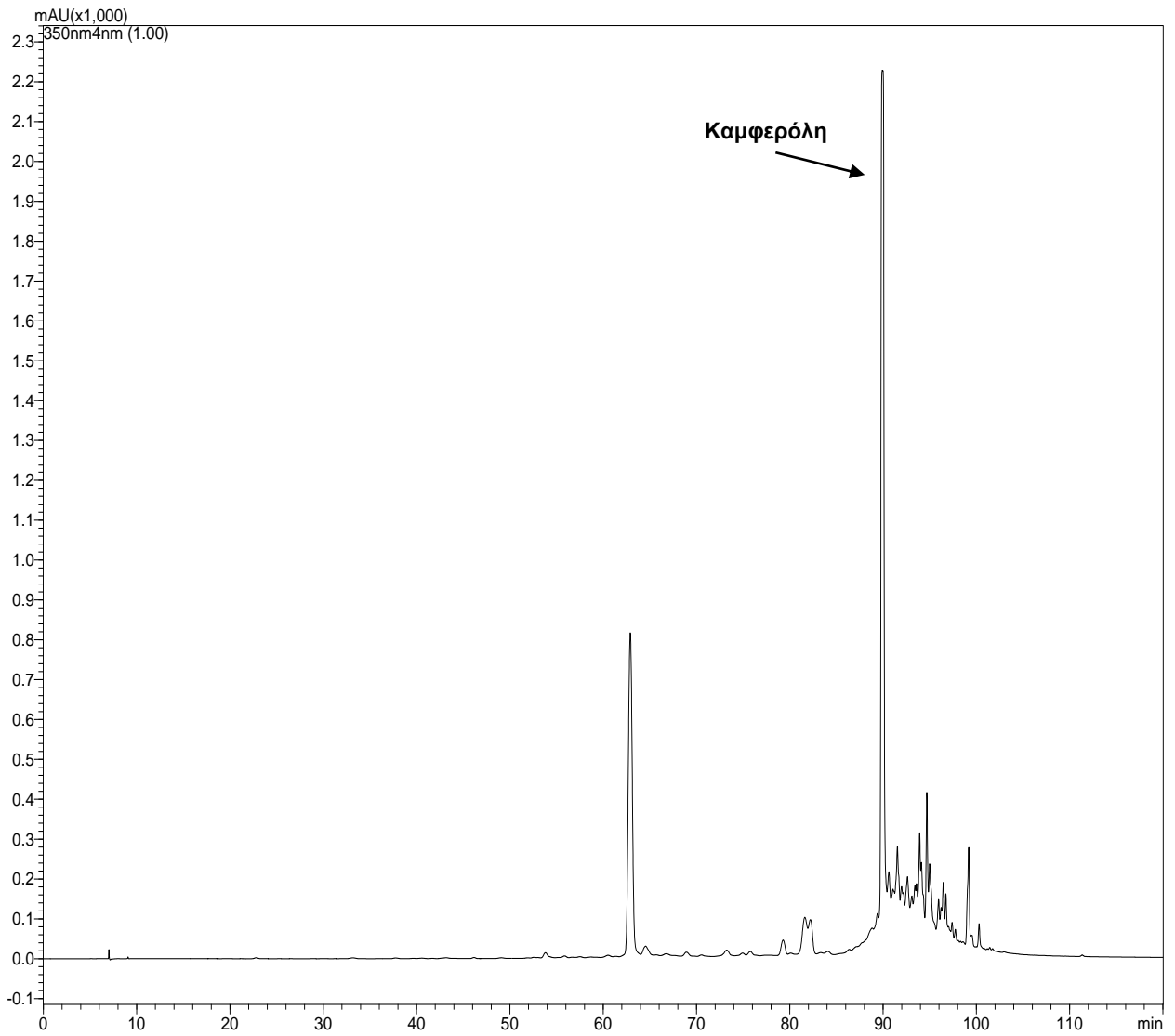
Τα φλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ενώσεις ήταν η επικατεχίνη, η μυρισετίνη, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η καμφερόλη, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και της απιγενίνης, η επικατεχίνη, η ναριγενίνη και η γενιστείνη, ενώ ως πρότυπα φαινολικά οξέα χρησιμοποιήθηκαν το καφεϊκό, το χλωρογενικό, το ροσμαρινικό και το συναπικό οξύ.

Σύμφωνα με τους Lee *et al.*, 1996, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 246-262 nm με μια ωμοπλάτη στα 290-315 nm, εκτός από το γαλλικό οξύ το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 271 nm. Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν δυο χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης. Η ζώνη II με μέγιστο στα 240-285 nm και η I με μέγιστο στα 300-550 nm (Merten *et al.*, 2000).

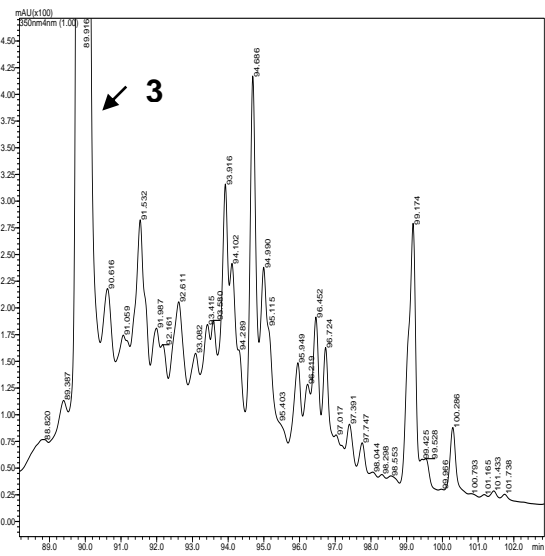
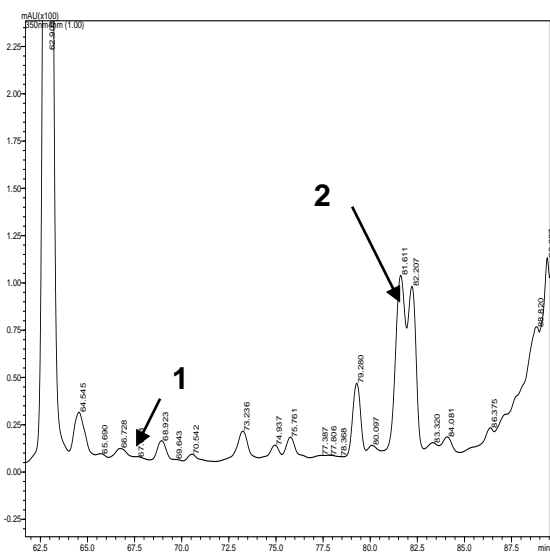
Το μήκος κύματος στο οποίο καταγράφηκαν τα χρωματογραφήματα ήταν 280, 370, 350 και 365 nm. Για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών χρησιμοποιείται πάντα σε συνδυασμό με τον χρόνο κατακράτησης της ουσίας, το μήκος κύματος 330, 325 και 280 nm, ενώ για τα φαινολικά οξέα το μήκος κύματος 330-350.

Τα φάσματα απορρόφησης των πρότυπων ουσιών παρουσιάζονται στο παράρτημα 1.1.

#### 4.5.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης *Crocus sativus* L. tepals



**Χρωματογράφημα 1:** *Crocus Sativus tepals* 12.6mg/mL in MeOH at 350nm



Στο χρωματογράφημα παρουσιάστηκαν δύο μέγιστες κορυφές (1,5), 11 μικρότερες και 7 πιο μικρές. Από αυτές 3 είναι που ταυτοποιήθηκαν με την υγρή χρωματογραφία και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

**Πίνακας 6:** Αποτελέσματα HPLC tepals *Crocus sativus L.*

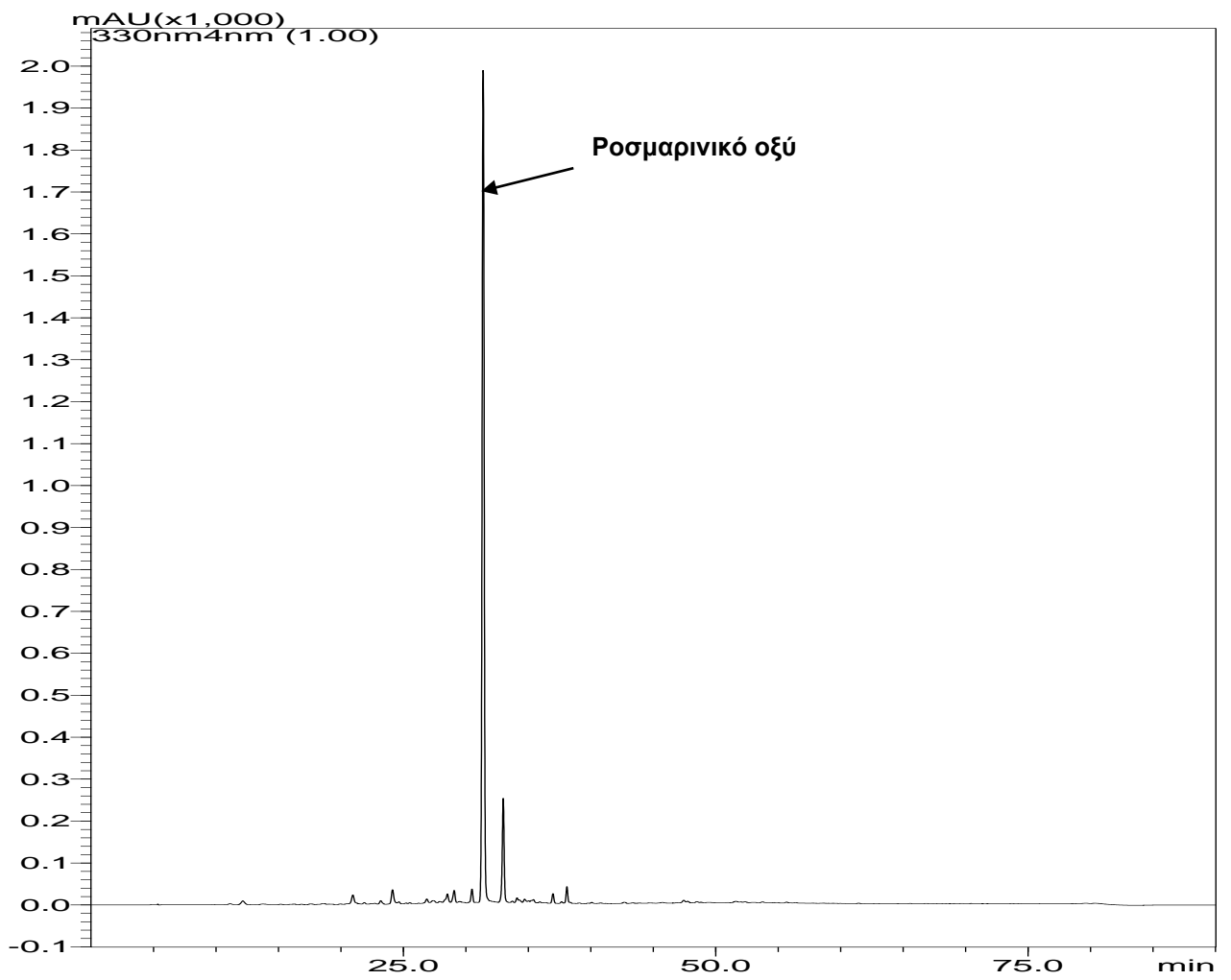
Αριθμός κορυφής	T <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub>	Προσδιορισμός
1	66.73	218	Γλυκοζίτης καμφερόλης
2	81.62	205	Κερκετίνη
3	89.916	241	Καμφερόλη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα φλαβονοειδή που περιέχονται στα τέπαλα είναι κυρίως γλυκοζίτες της μυρισετίνης, της κερκετίνης και της καμφερόλης. (Norbaek *et al.*, 2002). Σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκονται οι γλυκοζίτες της καμφερόλης (84%), (Goury *et al.*, 2012).

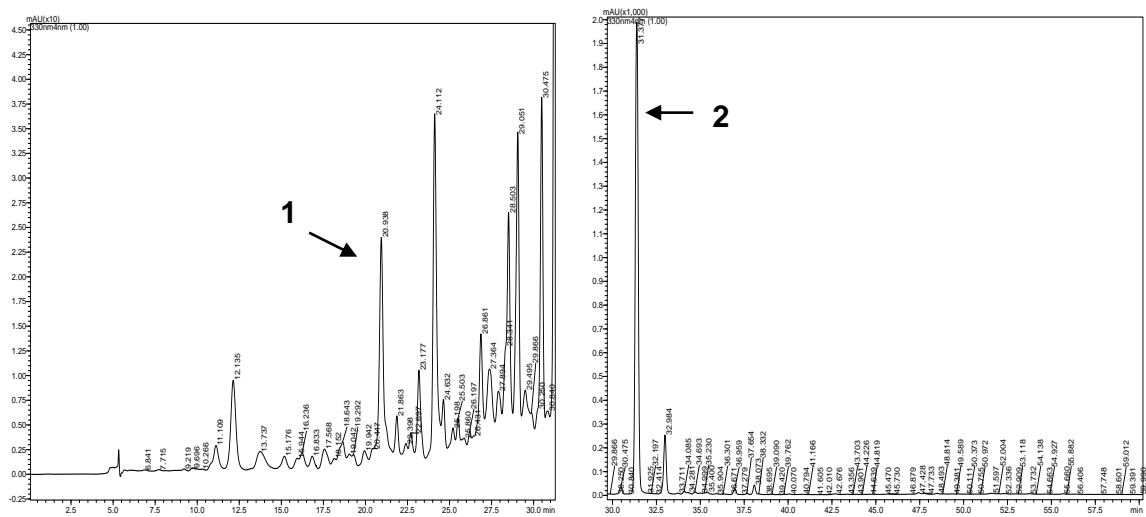
Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC, βλέπουμε πως και στο ελληνικό δείγμα, η καμφερόλη είναι η κυρίαρχη κορυφή που φαίνεται στο χρωματογράφημα. Στη μελέτη των Termentzi *et al.*, 2008, τα κυριότερα φλαβονοειδή που ανιχνεύτηκαν ήταν η καμφερόλη, η κερκετίνη και η ναριγενίνη.

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν και επιβεβαιώνονται και από τους προηγούμενους ερευνητές. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις λιγοστές υπάρχουσες μελέτες, αποτελεί επιπλέον έναυσμα για τη χρησιμοποίηση των τεπάλων του κρόκου που μέχρι τώρα θεωρούνται παραπροϊόν και πετάγονται, τόσο στη θεραπευτική όσο και στη βιομηχανία τροφίμων.

#### 4.5.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης *Melissa officinalis*



**Χρωματογράφημα 2:** *Melissa officinalis* 10mg/mL in MeOH inj. vol. 10UI



Στο χρωματογράφημα υπάρχει μια μέγιστη κορυφή (2), 6 μικρές και 34 μικρότερες. Από αυτές ταυτοποιήθηκαν οι 2 και παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Αποτελέσματα HPLC *Melissa officinalis*

Αριθμός κορυφής	T <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub>	Προσδιορισμός
1	20.938	324	Καφεϊκό οξύ
2	31.377	330-245	Ροσμαρινικό

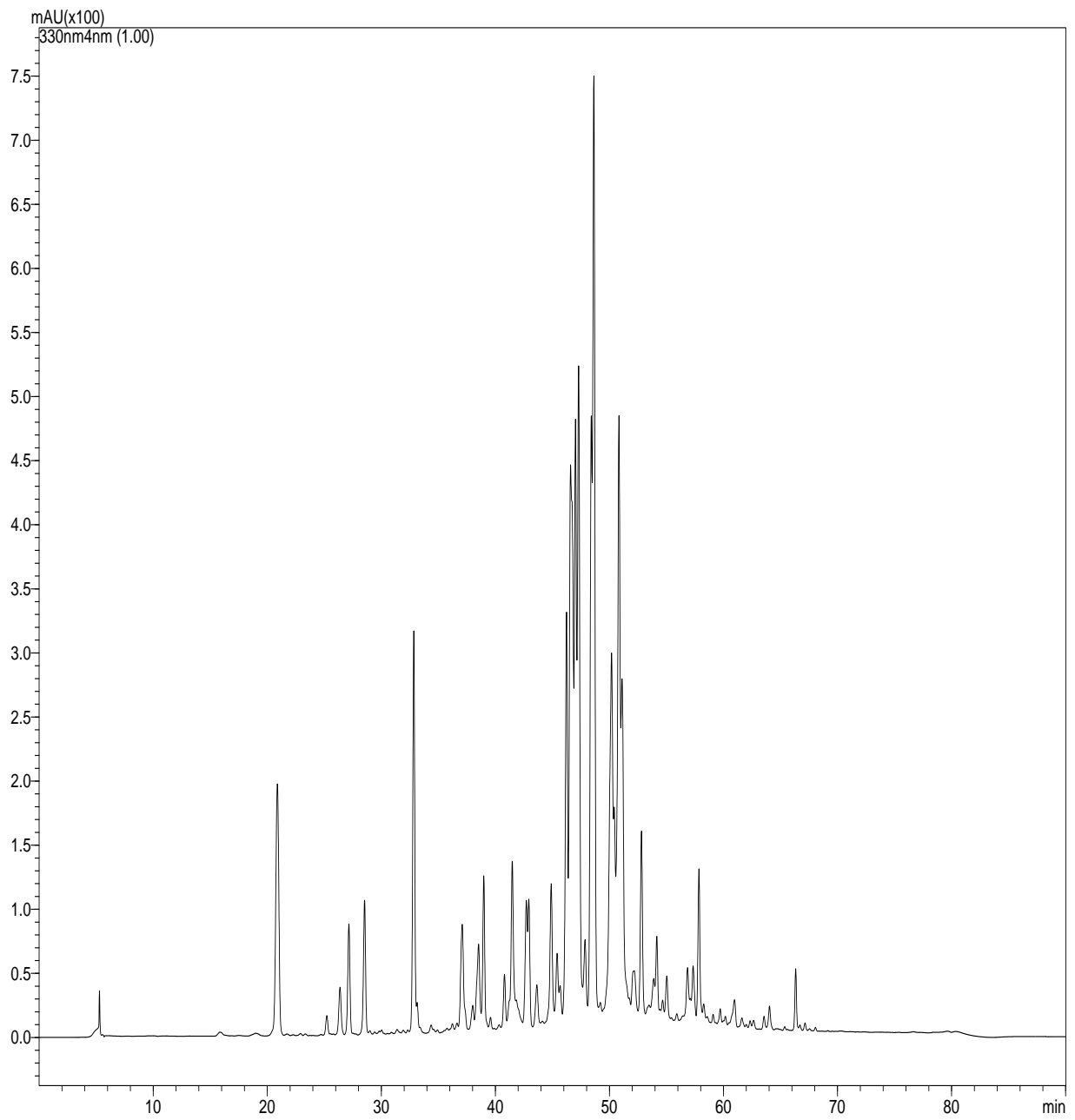
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα το εκχύλισμα του μελισσόχορτου χαρακτηρίζεται από την κυριαρχία του ροσμαρινικού οξέος. Σε πολύ μικρότερη ποσότητα βρίσκεται το καφεϊκό οξύ.

Για τη *Melissa officinalis* τα κύρια συστατικά τα οποία έχουν ανιχνευτεί στα φύλλα της είναι φαινολικά οξέα, флаβονοειδή και γλυκοζίτες αυτών.

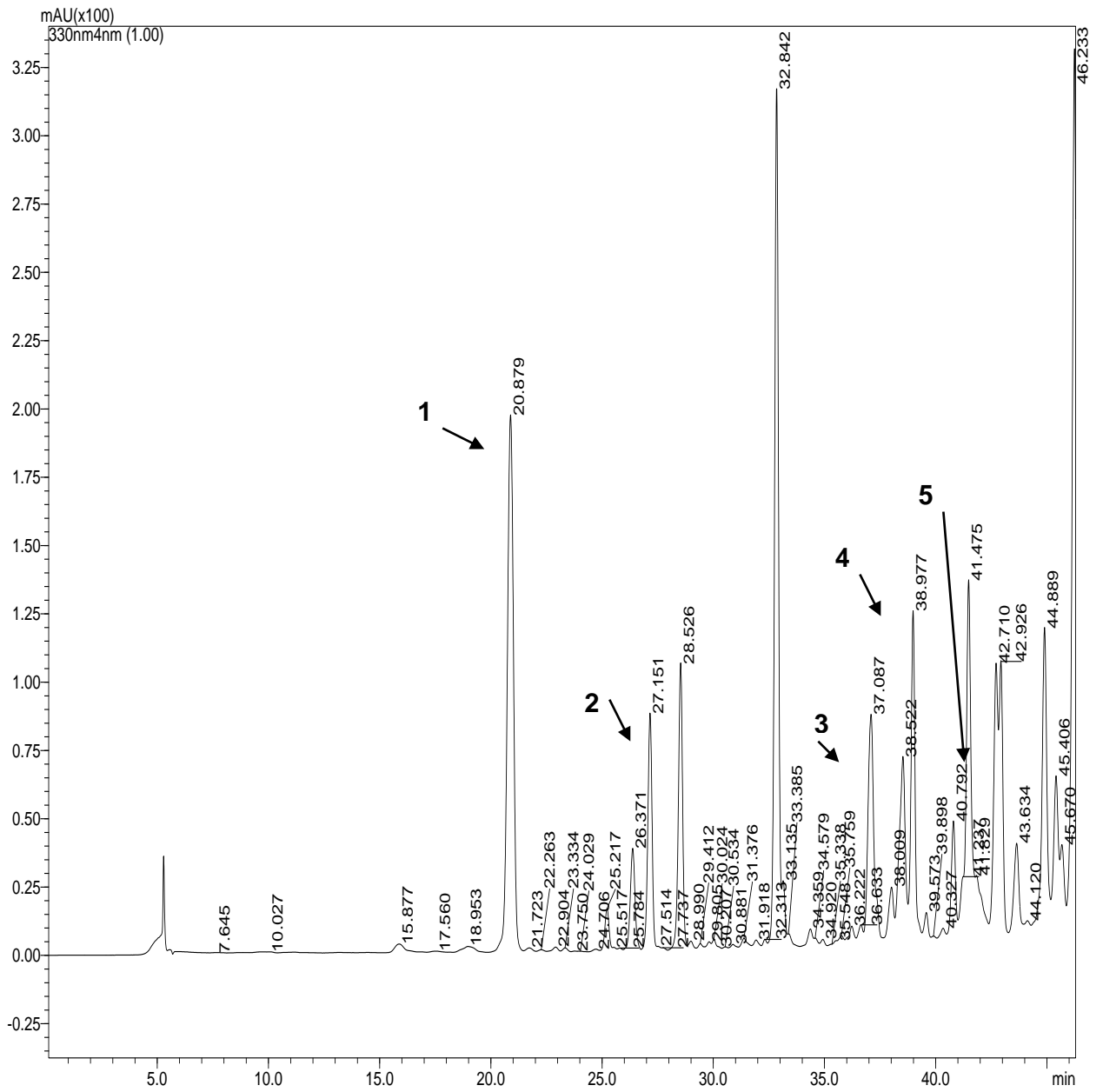
Συγκεκριμένα, από τα φαινολικά οξέα σε μεγαλύτερη αναλογία απαντάται το ροσμαρινικό οξύ. Σημαντικό όμως είναι και το ποσοστό του καφεϊκού και του χλωρογενικού οξέος (Arceusz *et al.*, 2013).

Όσον αφορά τα флаβονοειδή η παρουσία απιγενίνης και λουτεολίνης είναι αξιοσημείωτη (Hanganu *et al.*, 2008), ενώ οι κύριοι γλυκοζίτες που έχουν ανιχνευτεί σύμφωνα με την βιβλιογραφία, είναι οι 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης και της λουτεολίνης (Mulakens *et al.*, 1987).

#### 4.5.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πρόπολη-μεθανόλη



**Χρωματογράφημα 3: Propolis 65% in MeOH**



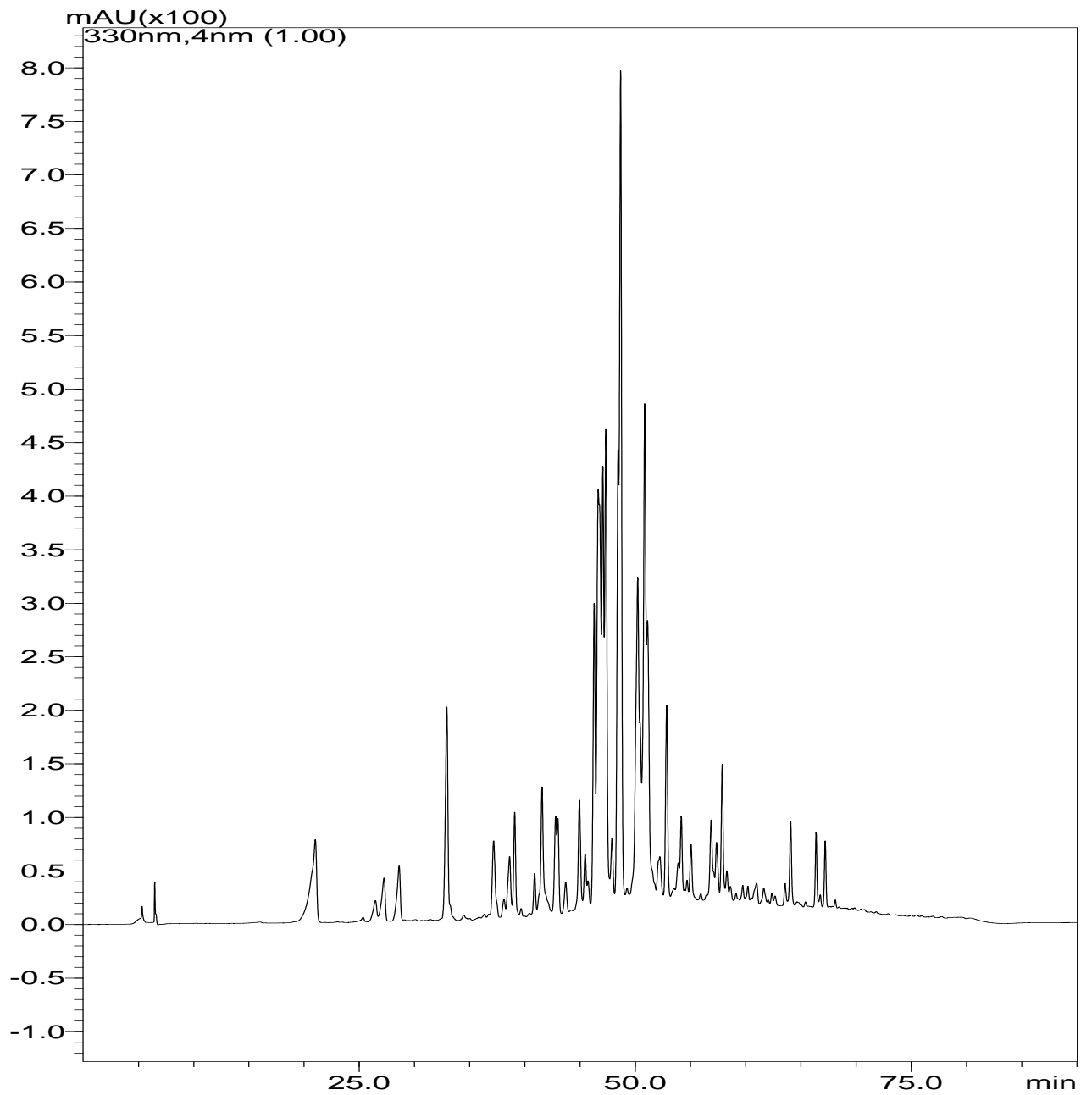


Στο μεθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης έχουμε μία μέγιστη κορυφή, 10 πιο μικρές και 14 ακόμα πιο μικρού μεγέθους. Η ταυτοποίηση έγινε με βάση τις ίδιες πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη *Melissa officinalis* και ταυτοποιήθηκαν συνολικά οι 5 από αυτές, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

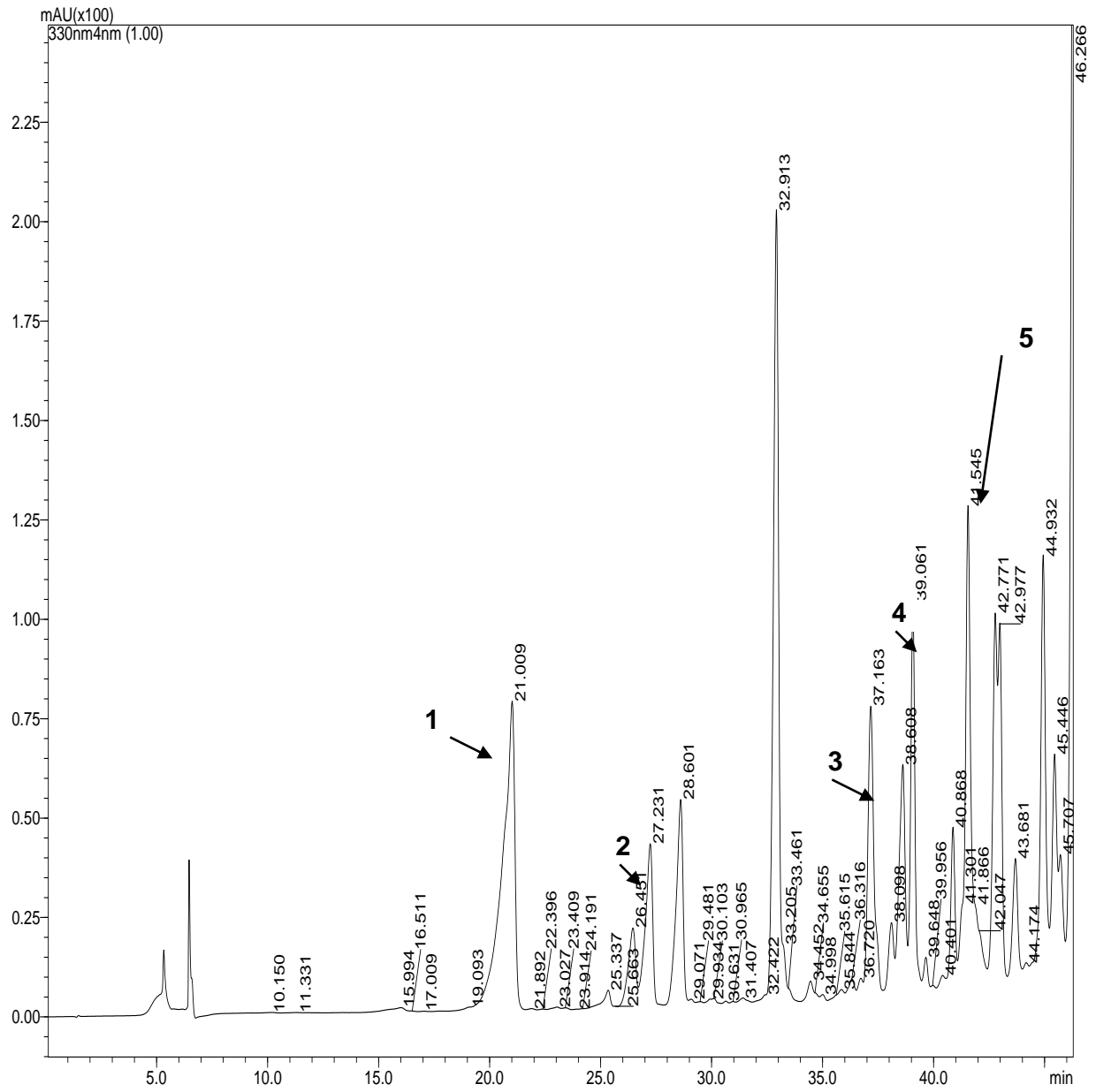
**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα HPLC μεθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης

Αριθμός κορυφής	T <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub>	Προσδιορισμός
1	20.879	324-242	Καφεϊκό οξύ
2	27.151	322-244	Συναπτικό οξύ
3	37.087	286-232	Ναριγενίνη
4	38.977	358-256	Κερκετίνη
5	40.792	365-265	Καμφερόλη

#### 4.5.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πρόπολη-αιθανόλη



**Χρωματογράφημα 4:** Propolis 30% in EtOH



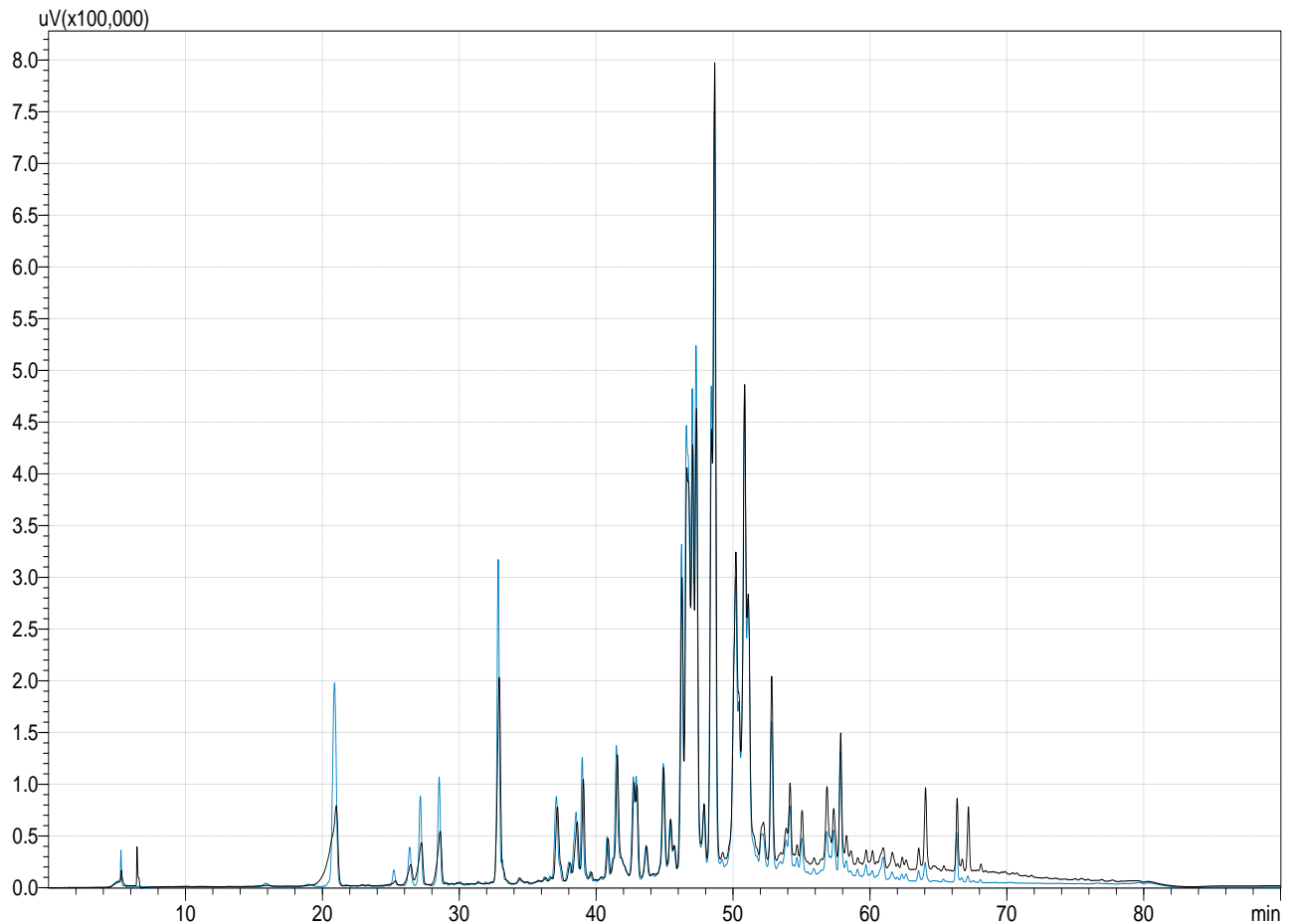
Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το χρωματογράφημα του αιθανολικού εκχυλίσματος της πρόπολης. Και εδώ υπάρχει μία μέγιστη κορυφή η οποία βγαίνει σε ίδιο χρόνο περίπου με αυτή του μεθανολικού εκχυλίσματος.

Εμφανίζονται ακόμη 12 μικρότερες κορυφές και 14 πιο μικρού μεγέθους. Ταυτοποιήθηκαν μόνο 5 από αυτές και παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Αποτελέσματα HPLC αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης

Αριθμός κορυφής	T <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub>	Προσδιορισμός
1	21.009	324-243	Καφεϊκό οξύ
2	27.231	322-246	Συναπτικό οξύ
3	37.163	287-236	Ναριγενίνη
4	39.061	358-256	Κερκετίνη
5	41.545	353-256	Καμφερόλη

#### 4.6: Σύγκριση χρωματογραφημάτων των δύο εκχυλισμάτων της πρόπολης



**MEL 55 Propolis 30% in EtOH**  
**MEL 56 Propolis 65% in MeOH**

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, το προφίλ των δύο εκχυλισμάτων δεν έχει μεγάλες διαφορές όσον αφορά στο χρόνο συγκράτησης.

Το μεθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης εμφανίζει υψηλότερες κορυφές στο χρωματογράφημα, λόγω του ότι η συγκέντρωση του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 65% (v/v) σε μεθανόλη, ενώ για το αιθανολικό εκχύλισμα ήταν 30% (v/v) σε αιθανόλη.

Σε κανένα από τα δύο δείγματα δεν ανιχνεύτηκε η μέγιστη κορυφή, πιθανόν όμως να ανήκει στην πινοσεμπρίνη. Η πινοσεμπρίνη, σύμφωνα με τους Kalogeropoulos *et al.*, 2009, αποτελεί το φλαβονοειδές με τη μεγαλύτερη αναλογία στην ελληνική πρόπολη προερχόμενη από την περιοχή της Κρήτης.

Όσον αφορά στην πρόπολη, η χημική της σύσταση σχετίζεται άμεσα με τις εκκρίσεις των φυτών και των δέντρων από τα οποία συλλέγεται. Συνεπώς, ανάλογα με την προέλευση,

τη γεωγραφική περιοχή αλλά και την εποχή συλλογής της, η πρόπολη παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ. Επιπλέον, είναι γενικά παραδεκτό ότι η πρόπολη προερχόμενη από ζεστά κλίματα όπως της Ευρώπης, είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και εστέρες αυτών (Bankova *et al.*, 2002).

Είναι εύκολο να αναγνωριστούν ορισμένα συστατικά όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους, τερπενοειδή και αμινοξέα. Στην παρούσα εργασία έγινε ανίχνευση φλαβονοειδών ενώσεων και φαινολικών οξέων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αιθανολικά εκχυλίσματα ελληνικής πρόπολης, περιέχουν σημαντική ποσότητα φλαβονοειδών όπως πινοβασκίνη, χρυσίνη, γαλανίνη, καμφερόλη, απιγενίνη, ναριγενίνη, μυρισετίνη, γενιστείνη και κερκετίνη, καθώς και φαινολικά οξέα όπως φερουλικό, καφεικό, π-κουμαρικό, συναπικό και γαλλικό οξύ (Kalogeropoulos *et al.*, 2009). Επιπλέον στη μελέτη των Velikova *et al.*, 2000, οι οποίοι εξέτασαν δείγμα πρόπολης από τη βόρεια Ελλάδα, βρέθηκε από την ανάλυση GC-MS πως το περιεχόμενο σε φλαβονοειδή αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης είναι αρκετά υψηλό. Μάλιστα, σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται η πινοσεμπρίνη και ακολουθεί ο οξικός εστέρας της πινομπαξίνης (pinobanksin-3-O-acetate).

#### 4.7: Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από τα φυτά ως απόκριση μικροβιακής μόλυνσης, επομένως δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι είναι αποτελεσματικές αντιμικροβιακές ουσίες έναντι ευρέως φάσματος βακτηρίων.

Εντούτοις, η αντιμικροβιακή δράση των φλαβονοειδών, συνδέεται άμεσα με τη χημική τους δομή και ιδιαίτερα με τον αριθμό και τη θέση που βρίσκονται οι μεθοξυλικές και υδροξυλικές ομάδες (Tsuchiya *et al.*, 1996; Alcaráz, 2000).

Για παράδειγμα οι Wu *et al.*, παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή δράση της κερκετίνης και της καμφερόλης έναντι του βακτηρίου *Escherichia coli* ήταν μεγαλύτερη από της λουτεολίνης και ιδιαίτερα πιο ισχυρή ήταν η δράση της κερκετίνης. Η διαφορά στη δομή των δυο τελευταίων φλαβονοειδών είναι η παρουσία ενός υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C στο μόριο της κερκετίνης.

Επιπλέον, υδροξυλίωση στη θέση 2', φαίνεται να αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση διαφόρων φλαβονοειδών έναντι στελεχών του στρεπτόκοκκου (Sato *et al.*, 1996).

Η αντιμικροβιακή δράση των αλκοολικών εκχυλισμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα 10.

**Πίνακας 10:** Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων έναντι Gram (+) παθογόνων και μη μικροοργανισμών των τροφίμων, με τη μέθοδο WDA\*.

	Στέλεχος μικροοργανισμού	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Crocus sativus L. aglycons</i>	<i>Crocus sativus L. glycosides</i>	Propolis EtOH	Propolis MeOH
<b>Gram (+)</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	+(*)	+	..(*)	+	+
	<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	-	+	+
	<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	-	-	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	-	+	+
	<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes serotype 4b</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes serotype 4b</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes serotype 4b</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes serotype 4b</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes serotype 4b</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes serotype 4b</i>	+	+	-	+	+
	<i>Listeria monocytogenes (5510) μπούτι ουγγαρίας</i>	+	+	-	-	-
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus simulans</i>	+	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus simulans</i>	+	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> NCBF 1499	+	+	-	+	+

(+) Στελέχη που παρεμποδίστηκαν (-)Στελέχη ανθεκτικά στη δράση των εκχυλισμάτων



**Πίνακας 11:** Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων έναντι Gram (-) παθογόνων και μη μικροοργανισμών των τροφίμων, με τη μέθοδο WDA\*.

	<b>Στέλεχος μικροοργανισμού</b>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Crocus sativus L. aglyons</i>	<i>Crocus sativus L. glycosides</i>	<b>Propolis EtOH</b>	<b>Propolis MeOH</b>
<b>Gram (-)</b>	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Typhimurium	-	+	-	-	-
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Agona	-	+	+	-	-
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Infantis	-	+	-	+	+
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Senftenberg	-	+	-	-	-
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Livingstone	-	+	-	+	+
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Putten	-	+	-	+	+
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Putten	-	+	-	-	-
	<i>Salmonella enterica</i> subspecies enterica serovar Cubana	-	+	-	+	+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12079	+	+	-	+	+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 13125	+	+	-	+	+
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	-	+	+

(+) Στελέχη που παρεμποδίστηκαν (-) Στελέχη ανθεκτικά στη δράση των εκχυλισμάτων

\*WDA: Well Diffusion Assay

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα τα οργανικά εκχυλίσματα παρεμπόδισαν τους περισσότερους από τους μικροοργανισμούς που δοκιμάστηκαν.

Η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) των άγλυκων φλαβονοειδών των τεπάλων, που προκάλεσε παρεμπόδιση των στελεχών του εντερόκοκκου και της *Salmonella* ήταν 50 mg/mL. Όσον αφορά στα στελέχη της *Listeria monocytogenes*, σε δύο από αυτά (15259 και 15258) η MIC ήταν 100 mg/mL.

Συγκριτικά με τα άγλυκα φλαβονοειδή, το εκχύλισμα των τεπάλων που περιέχει φλαβονοειδή, γλυκοζίτες αυτών καθώς και ανθοκυάνες, έχει ασθενή δράση. Η παρεμπόδιση εμφανίστηκε σε ένα στέλεχος του σταφυλόκοκκου (5015) και σε ένα στέλεχος της *Salmonella*.

Είναι γενικά παραδεκτό ότι οι γλυκοζίτες είναι καλύτερα διαλυτοί σε υδατικά διαλύματα. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε με ζύγιση ανάλογης ποσότητας για την εκάστοτε συγκέντρωση που δοκιμάστηκε και αραίωση αυτής σε μεθανόλη. Συνεπώς, η μικρότερη αντιμικροβιακή δράση του δείγματος, μπορεί να οφείλεται στο διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, είναι επίσης γνωστό, πως ως αντιμικροβιακά συστατικά δρουν τα άγλυκα τμήματα που προκύπτουν από την υδρόλυση των γλυκοζιτών.

Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι το νέο δείγμα τεπάλων παρεμπόδισε ένα αρνητικό κατά Gram στέλεχος είναι ενθαρρυντικό, αν αναλογιστούμε την ανθεκτικότητα του βακτηριακού τοιχώματος των παραπάνω μικροοργανισμών.

Για το εκχύλισμα του μελισσόχορτου, η MIC για τα στελέχη του εντερόκοκκου ήταν 200 mg/mL. Το ίδιο ισχύει και για τα στελέχη του σταφυλόκοκκου και της *Listeria monocytogenes*, με εξαίρεση το στέλεχος 15258 (LQC) όπου η MIC ήταν 400 mg/mL. Όσον αφορά τους Gram (-) μικροοργανισμούς, τα στελέχη της *Salmonella*, σε αντίθεση με αυτά της *Escherichia coli*, ήταν όλα ανθεκτικά στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν.

Συγκρίνοντας την παραπάνω απόδοση του εκχυλίσματος με αυτό τον άγλυκων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από τα τέπαλα του *Crocus sativus L.*, παρατηρούμε ότι το τελευταίο παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το εκχύλισμα του μελισσόχορτου. Επιπλέον, στελέχη της *Salmonella* τα οποία ήταν ανθεκτικά στο μελισσόχορτο, παρεμποδίστηκαν από τα άγλυκα φλαβονοειδή των τεπάλων.

Το γεγονός αυτό, μπορεί να συνδεθεί με την παρουσία κερκετίνης ή καμφερόλης στο εκχύλισμα των τεπάλων, ή επίσης με πιθανή συνεργιστική δράση των δυο αυτών φλαβονοειδών τα οποία είναι γνωστά για την ισχυρή αντιμικροβιακή τους δράση και απουσιάζουν από το εκχύλισμα της *Melissa officinalis*.

Για τα παραπάνω δείγματα, ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καθαρή μεθανόλη.

Όσον αφορά στα δύο εκχυλίσματα της πρόπολης, η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης ήταν 10% (v/v) ή 20% (v/v). Συγκεκριμένα, για τα Gram (+) βακτήρια όλα τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* ήταν ευαίσθητα και στο μεθανολικό και στο αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης συγκέντρωσης 10% (v/v), ενώ από τα στελέχη του εντερόκοκκου μόνο το στέλεχος 20005 παρεμποδίστηκε σε αυτή τη συγκέντρωση. Τα υπόλοιπα στελέχη του εντερόκοκκου ήταν ευαίσθητα σε συγκέντρωση 20% (v/v) ενώ το στέλεχος 20003 παρουσίασε ανθεκτικότητα σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Ανάλογη δράση είχαν τα δυο εκχυλίσματα της πρόπολης και για τα στελέχη του σταφυλόκοκκου. Για δύο από αυτά (*Staphylococcus simulans*-5015 και *Staphylococcus xylosus*-5015) η MIC ήταν 10% (v/v), ενώ για τα υπόλοιπα 20% (v/v).

Η εικόνα παρεμπόδισης για τα Gram (-) βακτήρια είναι διαφορετική. Για όλα τα στελέχη η MIC είναι 20% (v/v). Πρέπει να σημειωθεί ότι στα στελέχη της *Salmonella* 15232, 15237 και 15240, στο στέλεχος της *Escherichia coli* 15243 καθώς και στο στέλεχος 15015 *Listeria monocytogenes* δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε υδροαλκοολικό διάλυμα αιθανόλης και μεθανόλης 50%.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή δράση μεθανολικών, υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*. Οι De Britto *et al.*, 2012, μελέτησαν την αντιμικροβιακή δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων διαφόρων δειγμάτων έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η αντιμικροβιακή τους δράση ήταν θετική, με MIC να κυμαίνονται από 3.125 mg/mL έως 50 mg/mL. Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων αποδίδεται στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών όπως στεροειδών ενώσεων, αλκαλοειδών, φαινολικών ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παρ.4.6.2), η μεγαλύτερη κορυφή του χρωματογραφήματος ύστερα από τον ποιοτικό προσδιορισμό των συστατικών του δείγματος, ανήκει στο ροσμαρινικό οξύ. Σύμφωνα με τους Parnham *et al.*, 2001, το ροσμαρινικό οξύ είναι ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας, στον οποίο τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, μεταξύ των οποίων και η *Melissa officinalis*, οφείλουν κατά μείζονα λόγο τη δράση τους.

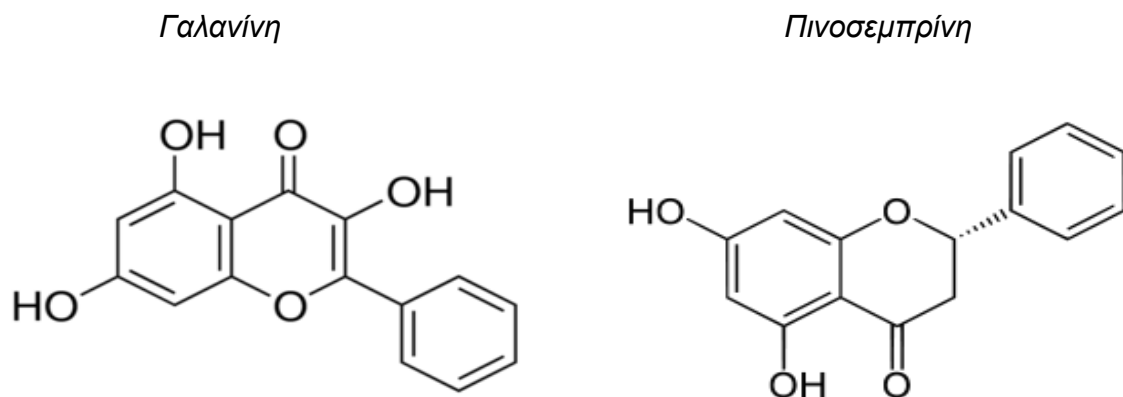
Όσον αφορά στο νέο δείγμα των τεπάλων, στη μελέτη των Asgarpanah *et al.*, 2013, οι οποίοι εξέτασαν μεθανολικό εκχύλισμα δείγματος σε Gram (-) βακτηρία, βρέθηκε πως σημαντική αντιμικροβιακή δράση παρουσιάζεται έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (PTCC 1247), *Salmonella typhi* (ATCC 19430), *Escherichia coli* (ATCC 25922) και *Shigella dysenteriae* (PTCC 1188). Η μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης παρουσιάστηκε σε συγκέντρωση 1000 mg/mL ενώ οι

MIC ήταν 31.2, 125, 62.5, 125 και 15.6 mg/mL.

Στην παρούσα μελέτη οι MIC ήταν της τάξεως των 15 mg/mL για το στέλεχος της *Salmonella* (15233) και 5 mg/mL για το στέλεχος του *Staphylococcus* (5015).

Για την αντιμικροβιακή δράση των άγλυκων флаβονοειδών στη βιβλιογραφία δε βρέθηκαν αναφορές. Ωστόσο παραβάλλοντας τα αποτελέσματα με αυτά της παραπάνω μελέτης, βλέπουμε πως η MIC είναι συγκρίσιμη.

Τέλος, η αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης έχει εκτενώς μελετηθεί και έχει αποδοθεί στην παρουσία флаβονοειδών και κυρίως στη συνέργεια γαλανίνης και πινοσεμπρίνης (Grange *et al.*, 1990, Bosio *et al.*, 2000, Pepeljnjak *et al.*, 1982). (εικ. 17).



**Εικόνα 17:** Δομή γαλανίνης και πινοσεμπρίνης

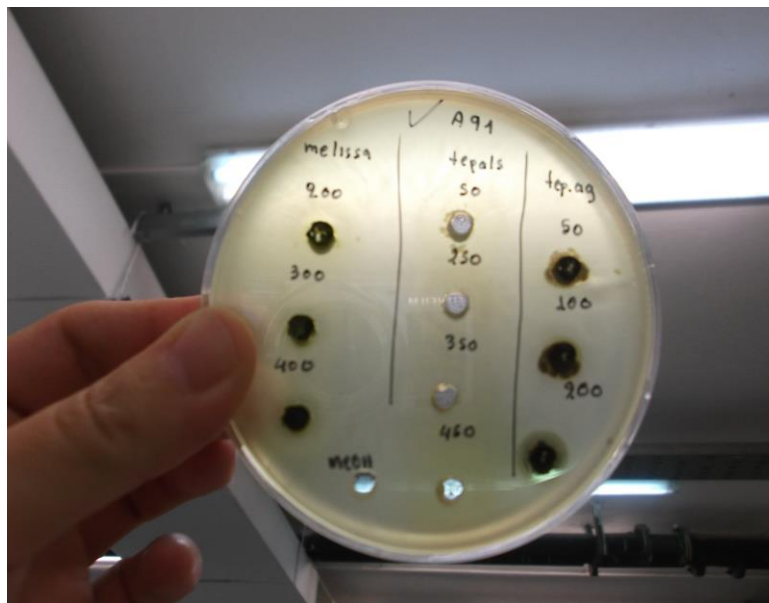
Επιπλέον εκτός των флаβονοειδών, η παρουσία οργανικών οξέων όπως βενζοϊκού και φερουλικού οξέος και ειδικότερα η παρουσία κινamikού οξέος, προσδίδει στην πρόπολη διακριτή αντιμικροβιακή δράση (Mearelli *et al.*, 1997).

Διάφοροι μικροοργανισμοί μεταξύ των οποίων στελέχη *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Saccharomyces* spp, έχουν μελετηθεί και έχει βρεθεί να είναι ευαίσθητοι σε οργανικά εκχυλίσματα πρόπολης.

Στις διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, είναι χαρακτηριστικό ότι δείγματα πρόπολης προερχόμενα από διάφορες γεωγραφικές περιοχές όπως Αργεντινή (Tosi *et al.*, 2007), Ιταλία (Tosi *et al.*, 1996), Βουλγαρία, Αργεντινή και Ελλάδα (Νιγρίτα Σερρών-σοδειάς 1997), (Velikova *et al.*, 2000), δεν παρεμπόδισαν στελέχη *Escherichia coli*. Σε αντίθεση, στο ελληνικό δείγμα πρόπολης προερχόμενο από την Κρήτη με ημερομηνία συλλογής 11/2014, μόνο το στέλεχος 15243 εμφάνισε ανθεκτικότητα.

Στην παρακάτω εικόνα (18), φαίνεται η παρεμπόδιση που προκλήθηκε από τα τέταλα

(άγλυκα φλαβονοειδή) και το μελισσόχορτο, σε στελέχη *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* και *Enterococcus*.



**Εικόνα 18:** Παρεμπόδιση στελεχών *Enterococcus faecium* (20003), *Listeria monocytogenes* serotype ab (A91), *Staphylococcus simulans* (5015) και *Staphylococcus xylosus* (5016).

## Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των φαινολικών συστατικών καθώς και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης αλκοολικών εκχυλισμάτων *Crocus sativus L.*, *Melissa officinalis* και πρόπολης, προερχόμενα από την ελληνική φύση.

Αρχικά εκτιμήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά εκφρασμένη σε mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος έχει το αιθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης. Ακολουθεί το μεθανολικό εκχύλισμα της, κατόπιν αυτό της *Melissa officinalis* και τέλος το εκχύλισμα των τεπέλων του κρόκου.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Τα αποτελέσματα ανάμεσα στις δύο μεθόδους παρουσιάζουν αξιοσημείωτη διακύμανση. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εμφανίζεται μικρότερη στη μέθοδο DPPH σε σχέση με την ABTS. Ειδικότερα η μικρότερη διαφορά εμφανίζεται στο μελισσόχορτο, ενώ μεγαλύτερη παρουσιάζεται στα τέπαλα ( $\approx 3$  φορές μικρότερη δράση). Παρόμοια απόκλιση υπάρχει και στο μεθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης ( $\approx 2$  φορές μικρότερη δράση). Το γεγονός αυτό οφείλεται στη χημική σύσταση των εκχυλισμάτων η οποία περιέχει υδρόφιλες και λιπόφιλες ενώσεις, οι οποίες όπως έχει αναφερθεί, δίνουν καλύτερα αποτελέσματα στη μέθοδο ABTS.

Κατόπιν, συσχετίζοντας το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με την αντιοξειδωτική ικανότητα, παρατηρούμε πως παρόλο που η πρόπολη (70% v/v σε αιθανόλη) έχει το μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών ενώσεων, εντούτοις την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και στη μέθοδο DPPH όσο και στην ABTS έχει η *Melissa officinalis*. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία του ροσμαρινικού οξέος στην οικογένεια των φυτών *Lamiaceae*. Το ροσμαρινικό οξύ έχει ευρέως μελετηθεί και συνάμα έχει βρεθεί να είναι ένα ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό. Επιπλέον η διαφορετική χημική σύσταση των εκχυλισμάτων πιθανώς να ευθύνεται για την αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η παρουσία διαφορετικών φλαβονοειδών μπορεί να ευνοεί ή όχι την μεταξύ τους συνεργιστική δράση.

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, έδειξε ότι όλα τα εκχυλίσματα περιέχουν μεγάλο αριθμό φαινολικών συστατικών. Τα αποτελέσματα του ποιοτικού προσδιορισμού συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τις κορυφές που μπόρεσαν να ανιχνευτούν.

Η μεγαλύτερη % περιοχή στα τέπαλα ανήκει στην καμφερόλη ενώ για τη *Melissa officinalis* τη μεγαλύτερη περιοχή καλύπτει το ροσμαρινικό οξύ. Τέλος, για την πρόπολη, πιθανότατα η μεγαλύτερη % περιοχή να ανήκει στη πινοσεμπρίνη.

Οι διαφορετικές φαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε κάθε εκχύλισμα, προσδίδει σε αυτά άλλοτε ισχυρή και άλλοτε πιο ασθενή αντιοξειδωτική δράση. Η διαφορετική χημική σύσταση επηρεάζει όπως είδαμε και την αντιμικροβιακή τους ικανότητα.

Συγκρίνοντας όλα τα εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν, μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσίασαν θετικά και αρνητικά κατά Gram μικροβιακά στελέχη στα τέπαλα του *Crocus sativus L.* που περιείχαν μόνο τα άγλυκα φλαβονοειδή. Προφανώς, η συνεργιστική ή μη δράση των άγλυκων φλαβονοειδών στο μόριο των οποίων οφείλονται οι βιολογικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, προσδίδει σε αυτά υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, διαπιστώνουμε ότι η ελληνική χλωρίδα διαθέτει φυσικά προϊόντα με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση *in vitro*. Οι ελληνικές εταιρείες παραγωγής τροφίμων, εκμεταλλευόμενες την εύκολη πρόσβαση που έχουν σε υψηλής ποιότητας πρώτες ύλες, έχουν την ευκαιρία να διαφοροποιηθούν από τους διεθνείς παραγωγούς τροφίμων. Χρησιμοποιώντας φυσικά πρόσθετα τροφίμων και παράγοντας έτσι προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, μπορούν να καθιερώσουν τη Μεσογειακή διατροφή ως κορυφαίο παράδειγμα υγιεινής, φυσικής διατροφής.

## Βιβλιογραφία

### Ξένη βιβλιογραφία

**Ahmad** AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F; Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model- Pharmacol. Biochem Behav 2005;81: 250-13.

**Ahn** MR, Kunimasa K, Kumazawa S, *et al.*; Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis- Mol. Nutr. Food Res 2009; 53(5): 643-651.

**Akhondzadeh** S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, Amini H, Fallah-Pour H, Jamshidi AH, Knani M; *Crocus sativus L.* in the treatment of mild to moderate depression: A double blind, randomized and placebo- controlled trial-Phytother. Res. 2005 Feb;19 (2 ):148-51.

**Akhondzadeh** S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. 2003; Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial-J Neurol. Neurosurg Psychiatry 74:863-866.

**Albayrak** Sevil, Ahmet Aksoy, Songul Albayrak and Osman Sagdic; In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species- Iranian Journal of Science & Technology: IJST (2013) A1: 1-9.

**Alcaráz** L.E, S.C Blanco, O.N Puig, F.Tomás, F.H Ferretti; Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains- J.Theor. Biol 205 231-240, 2000.

**Antolovic**, M, Prenzler, P.D, Patsalides, E, McDonald, S, Robards, K.; Methods for testing antioxidant activity- Analyst 2002, 127, 183–198.

**Arceusz** Agnieszka, Marek Wesolowski; Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis L.* commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids- Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis 2013.

**Asgarpanah** Jinous, Elahe Darabi-Mahboub, Arash Mahboubib,, Rezvan Mehrab , Mojdeh Hakemivala; In-Vitro Evaluation of *Crocus Sativus L.* Petals and Stamens as Natural Antibacterial Agents Against Food-Borne Bacterial Strains- Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences 2013: 9 (4): 69- 82

**Ballard** CG, O' Brien JT, Reichelt K, Perry EK; Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the



results of a double blind, placebo-controlled trial with Melissa.- J Clin Psychiatry 63, 553-558, 2002.

**Bankova V.**, Boudourova-Krasttva, G., Sforcin, J. M., Frete, X., Kujumgiu, A., Maimoni-Rodella, R., & Opoov, S; Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo State. Ztschrift für Naturforschung, 54c, 401–405. 1999.

**Bankova V.**, de Castro S.L and Marcucci, M.C; Propolis recent advances in chemistry and plant origin-Apidologie 31. 3-15.

**Bankova**, Popova, Bogdanov & Sabatini; Chemical composition of European propolis and unexpected results-Zeitschrift für Naturforschung, Teil C, 57, 530-533.

**Borris R.P**; Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company,-Journal of Ethnopharmacology, 1996; 51: 1–3, 29–38.

**Bosio K**, Avanzini C, D’Avolio A, Ozino O, Savoia D.; *In vitro* activity of propolis against streptococcus pyogenes- Lett Appl Microbiol; 31-174-7, 2000.

**Brand-Williams W.**, M.E Cuvelier and C. Berset; Use of a Free Radical method to evaluate Antioxidant Activity- Lebensm.-Wiss. U Technol.28, 25-30, 1995.

**Cai**, Y.Z, Sun M., Xing J., Luo Q, Corke H; Structure radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants- Life sciences 78:2872-2888, 2006.

**Cano**, A. Acosta, M. Arnao, M. B; A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins.- Redox Report 2000, 5, 365-370.

**Cao G**, Sofic E, Prior RL; Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure activity relationships- Free radic. Bib,Med 1997.

**Cheng Ai-Xia**, Xiao-Juan Han, Yi-Feng Wu and Hong-Xiang Lou.; The Function and Catalysis of 2-Oxoglutarate Dependent oxygenases Involved in Plant Flavonoid Biosynthesis-International journal of Molecular Sciences, 15, 1080-1095.

**Coppen P.P**- Use of antioxidants In J.C Allen and RJ Hamilton (Eds) Rancidity in foods, 1983.

**Cushnie T.P** Tim, Andrew J. Lamb; Antimicrobial activity of flavonoids- International Journal of Antimicrobial Agents 26, pp.343-356, 2005.

**Das** lia, Sukta Das, Tapas Saha; Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma: A histopathological study- *Acta histochemica* 112, 2010, 317-237.

**De Britto** A.John, Steena Roshan Sebastian and R. Mary Sujin; Antibacterial activity of selected species *Lamiaceae* against human pathogens- *Indian journal of Natural Products and Resources*. Vol 3(3), p.p 334-342, 2012.

**Farkhondeh** Tahereh, Saeed Samarghandian; The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients on the management of diabetes mellitus and dislipidemia- *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, April 2014.

**Georgieva** Silviya S., Valentina L. Christova-Bagdassarian, Maria S. Atanassova; Comparative evaluation of the polyphenol composition and antioxidant capacity of propolis and *Echinacea purpurea*- *J Exp Integr Med* 2014; 4(1):51-56.

**Ghazal**, S. A., Abuzarqa, M., and Mahasneh, A. M; Antimicrobial activity of *Polygonum equisetiforme* extracts and flavonoids.- *Phytother. Res.* 6, 265-269. 1992.

**Ghisalberti** E. L. (1979) Propolis: a review. *Bee World* 60, 59-84, 1979

**Goli** Sayed Amir Hossein, Fereshteh Mokhtari & Mehdi Rahimmalek; Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) *Petal-Journal of Agricultural Science*; Vol. 4, No. 10; 2012.

**Goupy** Pascale, Maryline Abert Vian, Farid Chemat, Catherine Caris-Veyrat; Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections- *Industrial Crops and Products* 44 (2013) 496– 510.

**Grange** JM, Davey RW; Antibacterial properties of propolis (bee glu)- *JR SOG Med*;83, 159-60, 1990.

**Grieve** M.1998-A modern Herbal Tiger Books International PLC: Twickenham.

**Hallwell** B and JMC Gutteridge 1992-Biological relevant metal ion dependent hydroxyl radical generation- An update, *FEBS Lett* 307:108-112

**Hanganu** Daniela, L. Vlase, Lorena Filip, Camelia Sand, Simona Mirel, L.L. Indrei; The study of some polyphenolic compounds from *Melissa officinalis* L.- *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iași*, 2008.

**Harborne** J.B, H.Baxter 1999-The handbook of natural flavonoids

**Havsteen B**; Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency- *Biochem Pharmacol* 1983 32 (7):1141-1148.

**Heim Kelly E., Anthony R.Tagliaferro, Dennis J.Bobilya**; Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships- *The journal of nutritional Biochemistry*, 2002.

**Hosseinnadeh Hossein, Vahid Khosravan**; Anticonvulsant Effects of Aqueous and Ethanolic extracts of *Crocus sativus L.* stigmas in Mice- *Arch Irn Med* 2002; 5 (1): 44-47

**Imenshahidi M, Hosseinzadeh H, Javadpour Y**; Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus L.*) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive cats- *Phytother Res* 2010; 24:990-4.

**Jafer Adinee, Khosro Piri and Omid Karami**; Essential oil Component in Flower of Lemon Balm (*Melissa officinalis L.*)-*American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4(3):227-278, 2008.

**Kalogeropoulos N, Spyros J. Konteles, Elena Troullidou, Ioannis Mourtzinou, Vaios T. Karathanos**; Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus- *Food Chemistry* 116 (2009) 452–461

**Kamalipour M, Jamshidi A.H, Akhondzadeh S**,-Antidepressant effect of *Crocus sativus*: an evidence based Review- *Journal of Medicinal Plants* 20 Feb. 2010 vol.9, Supplement No6.

**Kanakis CD, Tarantilis PA, Pappas C, Bariyang J, Tajmir Riahi HA, Polissiou M**; An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds; Models and antioxidant activity- *J. Photochem Photobiol B* 2009, 95:204-12

**Kennedy DO, Scholey AB, Tildesley NT, Perry EK, Wesnes KA**; Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm)- *Pharmacol Biochem. Behav* 72:953-964, 2002

**Kim, D.-O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y**; Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals- *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3713–3717, 2002.

**Kumar** Shashank and Abhay K.Pandey; Chemistry and biological activities of flavonoids-The Scientific World Journal Volume 2013, Article ID 162750.

**Lamaison** JL, C. Petitjean Freytet, A. Carnat; Medicinal *Lamiaceae*

with antioxidant properties potential source of rosmarinic acid- Pharm. Acta telt, 66, pp 185-188, 1991.

**Lee HS**, B.W. Widmer; Phenolic compounds-Handbook of food analysis:vol. 1 Marcel Dekker, New York, pp.821-894, 1996.

**López** Victor, Martín Sara, Gómez Maria-Pilar Seiranillos, Maria Emilia Carretero, Anna K. Jáger, Maria Isabel Calvo; Neuroprotective and Neurological Properties of *Melissa officinalis*, 2009.

**Marinova** G and Batchvarov; Evaluation methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH- Institute of Cryobiology and food Technologies, BG, 2011.

**Marcucci** MC; Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity-Apidologie (1995) 26, 83-89, 1995.

**Mearelli** F., A. Alì et Al; La propoli. Chimica, farmacologia e terapia- Planta Medica Ed. 1997

**Merken** H.M, GR Beecher; Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 p.p 557-559.

**Miller** DM, Buethner GR, Aust S.D; Transition metals as catalysts of autoxidation reactions- Free Rad Biol Med:8:95-108, 198 p, 1990

**Miller**, H., F. Rigelhof, L. Marquart, A. Prakash and M. Kanter; Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables- Journal of the American College of Nutrition, 19 (3): 312S-319S, 2000.

**Montoro**, P., Tuberoso, C.I.G., Maldini, M., Cabras, P., Pizza, C; Qualitative profile and quantitative determination of flavonoids from *Crocus sativus* L. Petals by LC–MS/MS- Nat. Prod. Commun. 3, 2013–2016, 2008.

**Moerman** D. E; An analysis of the food plants and drug plants of native North America- Journal of Ethnopharmacology, 1996; 52(1): 1–22.

**Mucsi** I, Gylai Z, Beladi I; Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpes viruses in cell cultures- Acta Microbiol Hung, 39 (1992) pp 137-147.

- Mulkens** A, Kapetanidis I; Flavonoids of the leaves of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) - Pharm Acta;62(1):19-22.1987.
- Naghizadeh** B, Mansouri MT, Ghorbanzadeh B, Farbood Y, Sarkaki A; Protective effects of oral crocin against intracerebro-ventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats- Phytomedicine, 20, 2013, 537-542.
- Nishizuka** Y; The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion-Nature 334, 661-665, 1998.
- Norbaek**, R., Brandt, K., Nielsen, J.K., Orggaard, M., Jacobsen, N; Flower pigment composition of Crocus species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. Biochem. Syst. Ecol.30, 763–791, 2002.
- Ohemeng** KA, Schwender CF, Fu KP and Barrett JF; DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones-Bioorgan Med Chem CeH 3:225-230, 1993
- Parnham** MJ, Kesselring K; Rosmarinic acid. Drugs of the future 10, 756-757, 1985
- Pavlov**, A., P. Kovatcheva, V. Georgiev and I. Koleva; Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains during the Cultivation of Red Beet (*Beta vulgaris*) Hairy Root Cultures- Zeitschrift für Naturforschung, 57:640-644, 2002.
- Pepeljnjak** S, Jalsenjak I, Maysinger D; Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts- Pharmazie 37:864-5, 1982.
- Pereira** Romaiana Picada, Roselei Fachinetto, Alessandro de Souza Prestes, Robson Luiz Puntel Gloria Narjara Santos da Silva, Berta Maria Heizmann, Ticiane Krapf Boschetti, Margareth Linde Athsyde, Marilise Escobar Burger, Ademir Farias Morel, Vera Maria Morsch, Joao Batista Teixeira Rocha; Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*- Neurochem Res 2009, 34:973-983
- Pérez-Jiménez**, J., S. Arranz., M. Taberner, M. E. Diaz-Rubio, J. Serrano., I. Goñi and F. Saura-Calixto; Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41 (3): 274-285, 2008.
- Pietta** P G, Gardana C, Pietta AM; Analytical methods for quality control of propolis- Fitoterapia, 73 (Suppl 1): S7–S20, 2002.

**Pitsikas** N, Boultsadakis A, Georgiada G, Tarantilis PA, Sakellaridis N; Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L. crocins in an animal model of anxiety, *Phytomedicine*, 15, 2009, 1135-1139.

**Prior** Ronald L, Xianti Wu, Karen Schaich; Standardized Methods for the determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements- *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005.

**Proestos** Charalampos , Konstantina Lytoudi , Olga Konstantina Mavromelanidou , Panagiotis Zoumpoulakis and Vassileia J. Sinanoglou; Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils- *Antioxidants* 2013.

**Pyrzynska** Krystyna, Anna Pekał; Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples -*Analytical Methods* 17, 2013.

**Roberta** Re, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Miniavang, Catherine Rice-Evans; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay- *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237, 1999.

**Salah** SM, Jager AK 2005; Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities- *J Ethnopharmacol* 97: 145-149

**Sato** M, Fujiwara S, Tsuchiya H, *et al.*; Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria- *J. Ethnopharmacol*:54;171-6, 1996.

**Serrano-Díaz** Jéssica, Ana M. Sánchez, Luana Maggi, Magdalena Martínez-Tomé, Luis García-Diz, M. Antonia Murcia and Conzalo L. Alonso; Increasing the Applications of *Crocus sativus* flowers as natural Antioxidants- *Journal of food science* vol 77, 11/2012.

**Singleton**, V. L., & Rossi, J. A. (1965); Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents- *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

**Skotti** Efstathia, Eirini Anastasaki, Georgia Kanellou, Moschos Polissiou, Petros Tarantilis; Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants- *Industrial Crops and Products*, 2014.

**Socha** Robert, Dorota Galkowska, Malgorzata Bugaj and Leslaw Juszezak; Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland- Natural Product Research, 2014

**Tapas** AR, DM Sakarkar and RB Kakde-Flavonoids as nutraceuticals; A review- Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Vol 7, No 3, 2008, pp 1089-1099.

**Tarantillis** PA, Polissiou M et al; Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelotic leucemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L.- Anticancer Res 14(5A): 1913-1918, 1994.

**Termentzi**, A., Kokkalou, E; LC–DAD–MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts- Planta Med. 74, 573–581, 2008.

**Tosi** Enzo A, Edmundo Rě, Marta E. Ortega, Ampelio F.Cazzol; Food preservative based on propolis polyphenols and flavonoids upon *E.coli*- Food chemistry 104, 1025-1029, 2007.

**Tosi** B, Donini, C. Romagnoli and A. Bruni; Antimicrobial Activity of some Commercial Extracts of propolis Prepared with Different solvents- Phytotherapy research, vol 10, 335-336, 1996.

**Tsuchiya** H., M.Sato, T.Miyazaki, S.Fujiwara, S. Tanigaki, N.Ohyama, T. Tanaka, M.linuma;Comparative Study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus- J.Ethnopharmacol 50, 27-34, 1996.

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

**Valente** MJ, Baltazar AF, Henrique R, Esterinh OL, Carralbo M; Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human venal renal cancer cell growth *in vitro*- Food Chem. Toxicol, 2011.

**Velikova** Milena, Vassya Bankova, Kadriye Sorkun, Saadi Houcine, Iva Tsvetkova, A. Kujungiev; Propolis from the Mediterranean Region:Chemical composition and antimicrobial activity- Z.Naturforsch. 55c 790-793-2000.

**Wagner** and Sprinkmeyer; über die pharmakologische Wirkung von Melissengeist.-Deut. Apoth. Z 1/13 (30):1159-1166, 1973.

**Wu** Ting, Mengying He, Xixi Zang, Ying Zhou, Tianfu Qiu, Siyi Pan, Xiaoyun Xu; A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect- Biochimica et Biophysica Acta, 2751-2756, 2013.

**Zhu** Wei, Qianju Jia, Yun Wang, Yuhua Zhang, Min Xia; The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP–PKA-dependent signaling pathway- Free Radical Biology & Medicine 52 (2012) 314–327.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

**Βαλαβανιδης Αθ:** Ελεύθερες ρίζες στην οργανική χημεία 2008

**Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1129/2011** της επιτροπής της 11ης Νοεμβρίου 2011

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005** της επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005

περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα

**Χαρισάνης Πασχάλης:** Η πρόπολη και πως την προετοιμάζουμε για προσωπική χρήση-Μελισσοκομική επιθεώρηση, 1992.



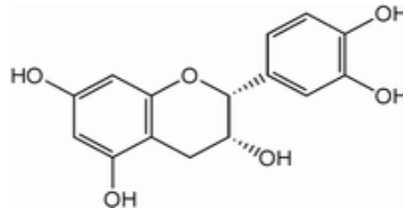
## Παράρτημα

**1.1 Χημική δομή και φάσματα προτύπων ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.**

### ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ

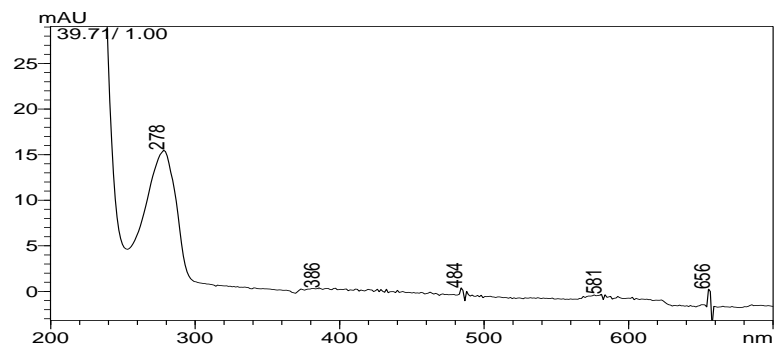
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{14}O_6$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

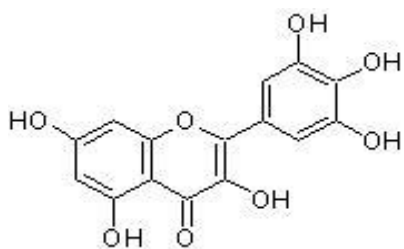
$\lambda_{max}$  278 nm



## ΜΥΡΙΣΕΤΙΝΗ

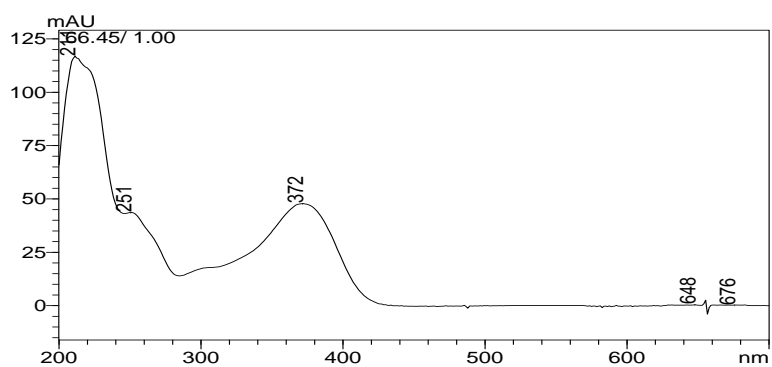
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{14}O_6$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

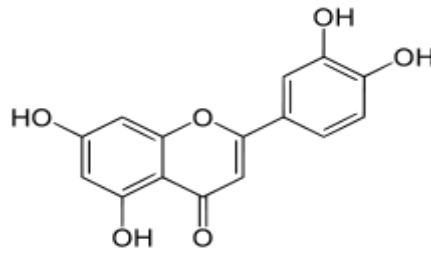
$\lambda_{max}$  372 & 211nm



## ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ

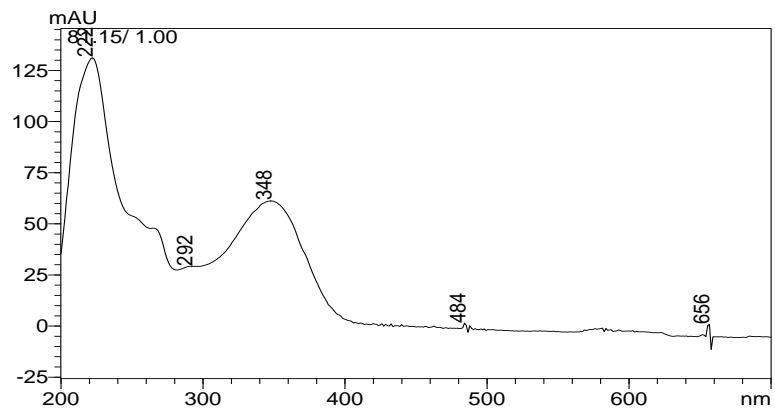
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{10}O_6$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

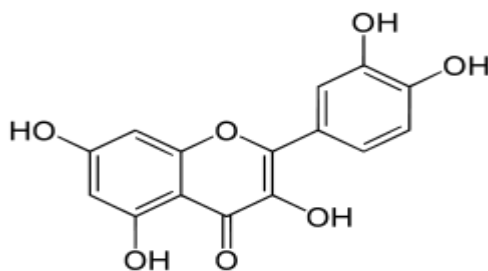
$\lambda_{max}$  348 & 222 nm



## ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ

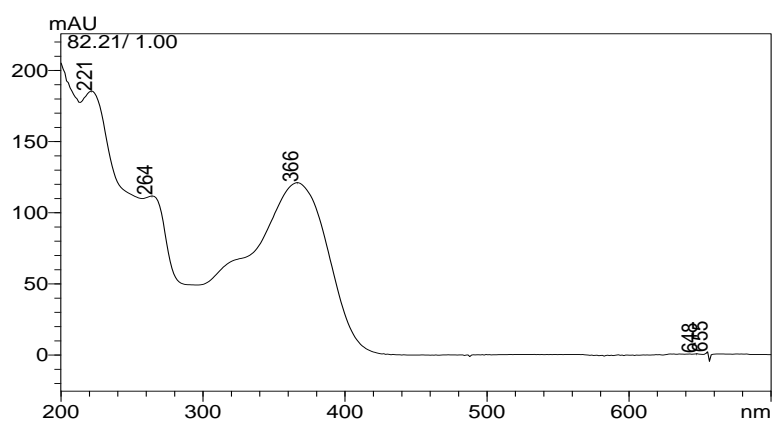
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{10}O_7$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

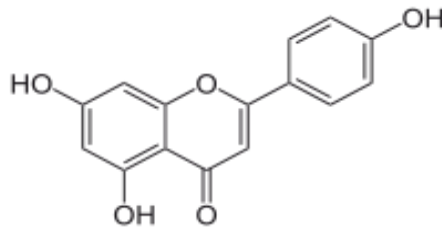
$\lambda_{max}$  366, & 221 nm



## ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ

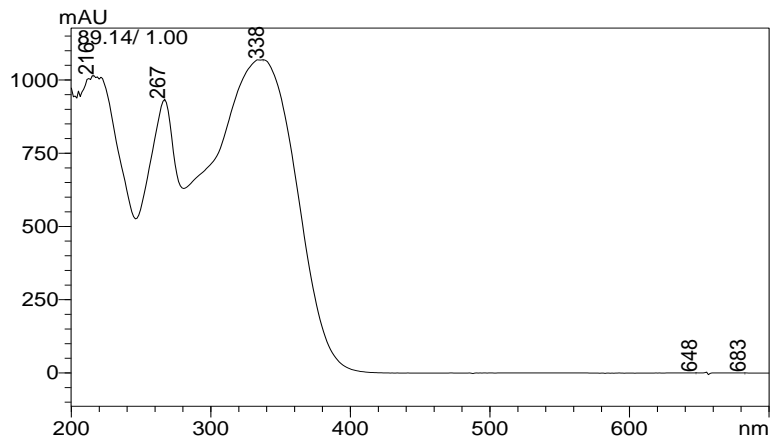
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{10}O_5$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

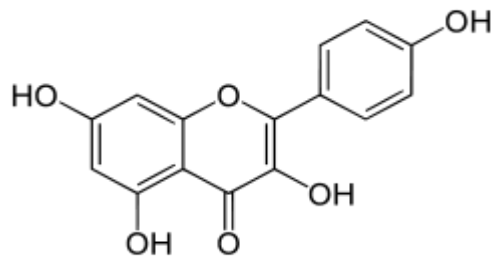
$\lambda_{max}$  338, 267 & 216 nm



## ΚΑΜΦΕΡΟΛΗ

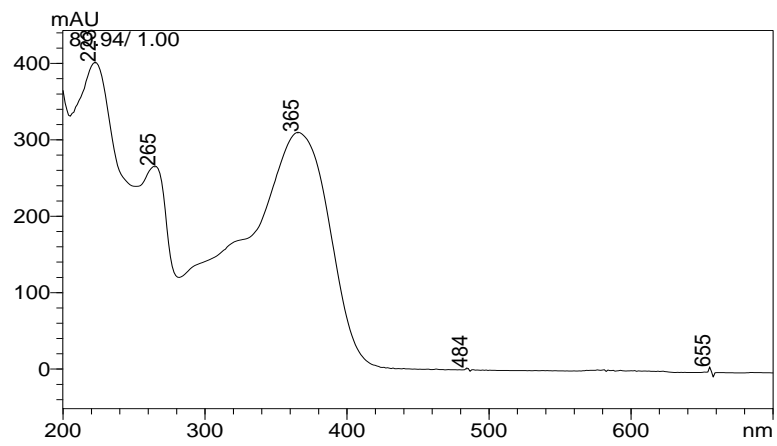
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{10}O_6$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

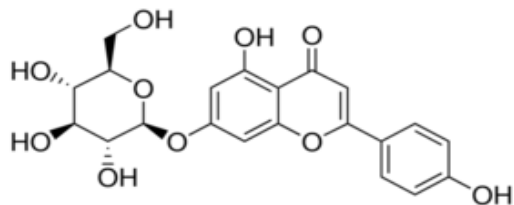
$\lambda_{max}$  365, 265 & 223 nm



## 7-Ο-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΑΠΙΓΕΝΙΝΗΣ

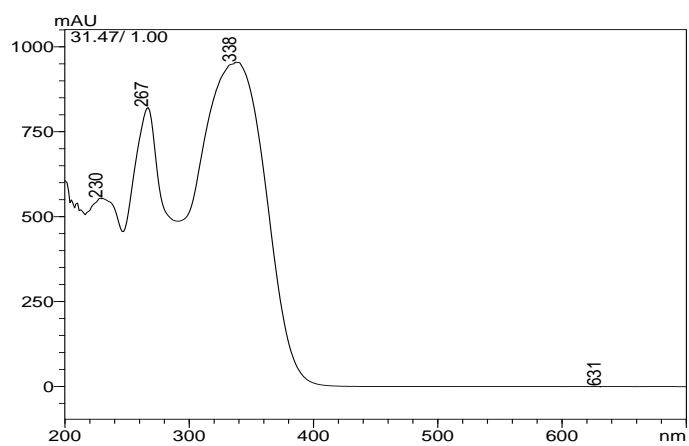
Μοριακός τύπος :  $C_{21}H_{20}O_{10}$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

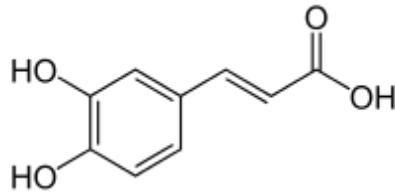
$\lambda_{max}$  338, 267 & 230 nm



## ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ

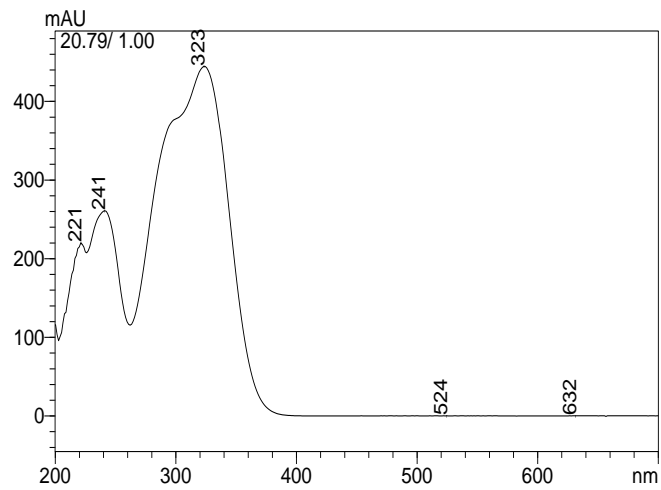
Μοριακός τύπος :  $C_9H_8O_4$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

$\lambda_{max}$  323, 241 & 221 nm

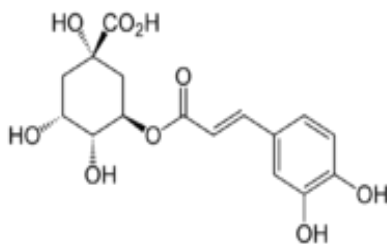




## ΧΛΩΡΟΓΕΝΙΚΟ ΟΞΥ

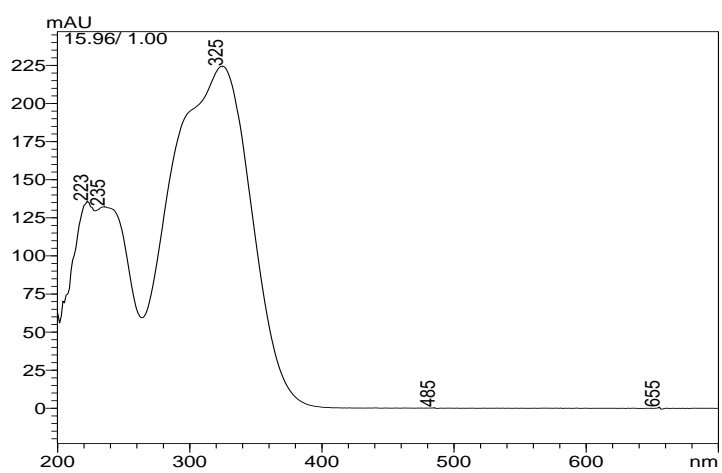
Μοριακός τύπος :  $C_{16}H_{18}O_9$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

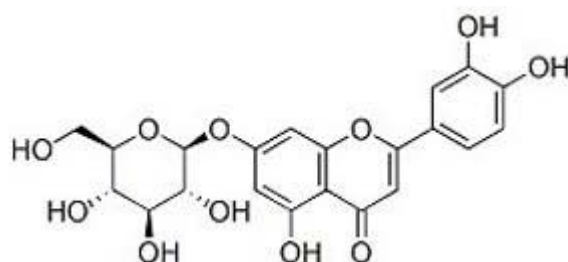
$\lambda_{max}$  325, 235 & 223 nm



## 7-Ο-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗΣ

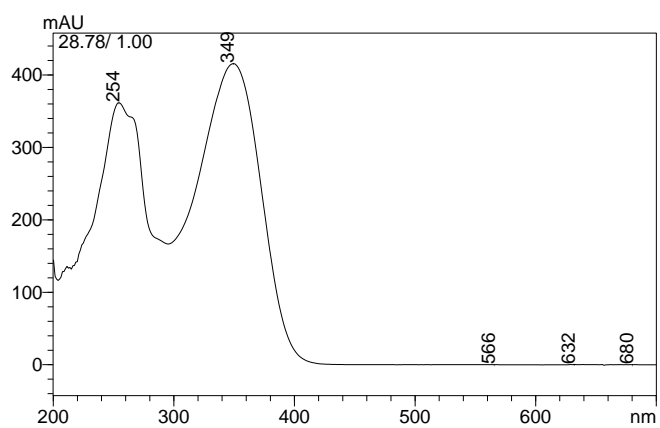
Μοριακός τύπος :  $C_{21}H_{20}O_{11}$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

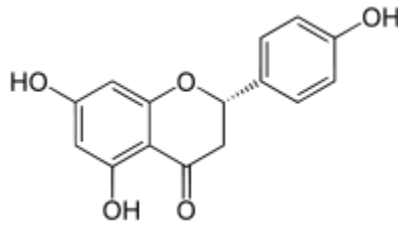
$\lambda_{max}$  349, & 254 nm



## ΝΑΡΙΓΕΝΙΝΗ

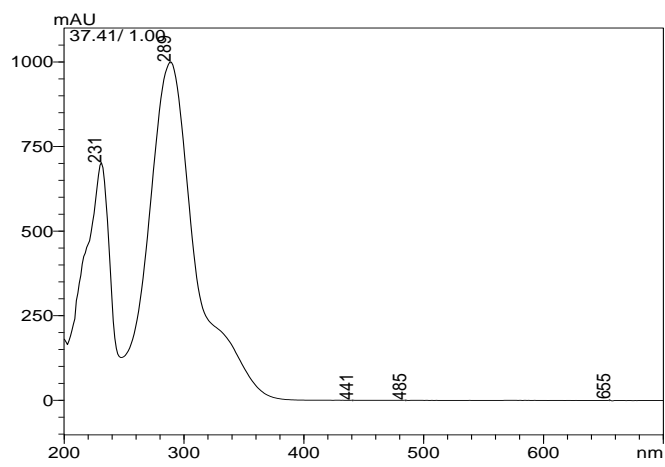
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{12}O_5$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

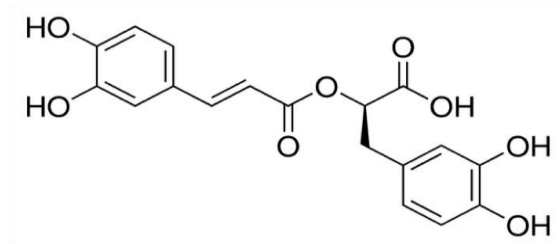
$\lambda_{max}$  289, & 231 nm



## ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

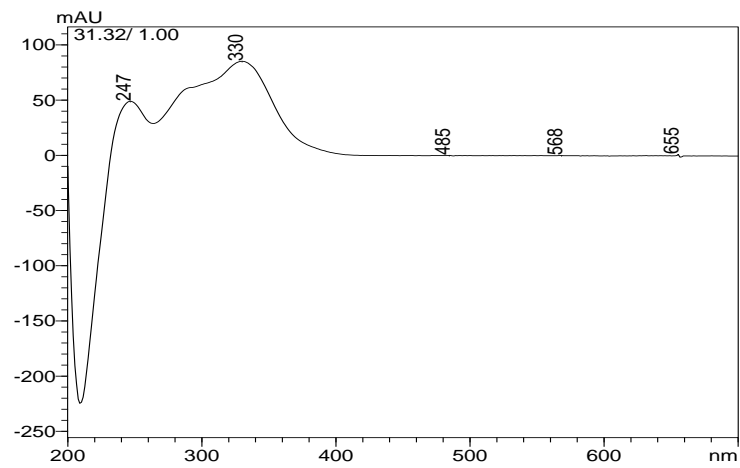
Μοριακός τύπος :  $C_{18}H_{16}O_8$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

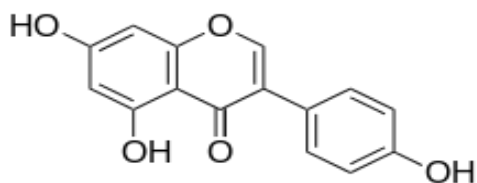
$\lambda_{max}$  330, & 247 nm



## ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ

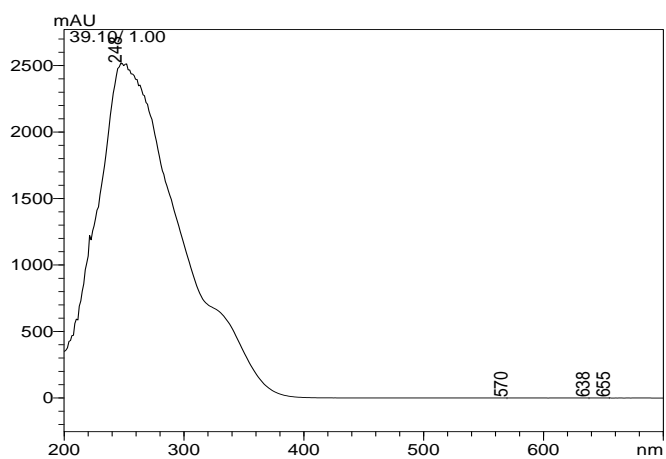
Μοριακός τύπος :  $C_{15}H_{10}O_5$

Χημική δομή



Φάσμα UV-Vis

$\lambda_{max}$  248 nm



## ΣΥΝΑΠΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός τύπος :  $C_{11}H_{12}O_5$

Χημική δομή

Φάσμα UV-Vis

$\lambda_{max}$  323, & 238 nm

