



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ  
(FOOD, NUTRITION & HEALTH)

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη των συστατικών και έλεγχος της βιοδραστικότητας βοτάνων που έχουν καλλιεργηθεί με διαφορετικές συνθήκες λίπανσης και άρδευσης: η περίπτωση του Ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)



Χαριτίνη Γεωργία Γ. Μπαμπάτσικου

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής, ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη των συστατικών και έλεγχος της βιοδραστικότητας βοτάνων που έχουν καλλιεργηθεί με διαφορετικές συνθήκες λίπανσης και άρδευσης: η περίπτωση του Ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)

Study of the components and control of bioactivity of herbs grown under different fertilization and irrigation conditions: the case of the Greek sage (*Salvia fruticosa*)

Χαριτίνη Γεωργία Γ. Μπαμπάτσικου

Εξεταστική Επιτροπή:

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Οικονόμου Αντώνια Γαρυφαλλιά, Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Μελέτη των συστατικών και έλεγχος της βιοδραστηκότητας βοτάνων που έχουν καλλιεργηθεί με διαφορετικές συνθήκες λίπανσης και άρδευσης: η περίπτωση του Ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)**

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική, στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Ωστόσο, η ποιότητα και η ποσότητα τους επηρεάζονται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες καλλιέργειας των φυτών, όπως το διαθέσιμο άζωτο (N) και η συχνότητα ποτίσματος. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση του αζώτου και η συχνότητα άρδευσης στην περιεκτικότητα και τη σύνθεση των εκχυλισμάτων του ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*). Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων αζωτούχου λιπάσματος (0, 5, 10, 15 kg ha<sup>-1</sup>) καθώς και η άρδευση στην απόδοση και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά εγχυμάτων και υδροαλκολικών εκχυλισμάτων.

Η απόδοση σε δευτερογενείς μεταβολίτες βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα σε σύγκριση με τα εγχύματα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην απόδοση μεταξύ των αρδευόμενων και μη δειγμάτων, αλλά υπήρξε μία τάση ελάττωσης της απόδοσης υπό συνθήκες μειωμένης λίπανσης.

Τα αρδευόμενα φασκόμηλα είχαν μεγαλύτερο ποσοστό ολικών φαινολικών σε σχέση με τα μη αρδευόμενα και η αύξηση της λίπανσης βελτίωσε το φαινολικό τους περιεχόμενο. Επιπλέον, τα εγχύματα παρουσίασαν μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

Οι συνθήκες έλλειψης νερού βελτίωσαν την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φλαβονοειδή. Στα υδατικά εκχυλίσματα, η μειωμένη λίπανση βελτίωσε την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, ενώ στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, τα καλύτερα αποτελέσματα προήλθαν από δείγματα με αυξημένη λίπανση. Συγκριτικά φάνηκε ότι τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονοειδών σε σχέση με τα υδατικά εκχυλίσματα.

Η αντιοξειδωτική δράση βρέθηκε να είναι υψηλότερη στα μη λυοφυλιωμένα εγχύματα των μη αρδευόμενων δειγμάτων και αυξήθηκε με την αύξηση της λίπανσης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα λυοφυλιωμένα δείγματα χωρίς σημαντική διαφορά στο IC<sub>50</sub>. Τα εγχύματα είχαν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

Η ευκαλυπτόλη ήταν το κύριο πτητικό συστατικό όλων των δειγμάτων. Τα αιθερικά εκχυλίσματα φασκόμηλου με άρδευση και μηδενική έως μέτρια λίπανση είχαν αυξημένη συγκέντρωση ευκαλυπτόλης και άλλων συστατικών. Η χαμηλή λίπανση και η έλλειψη άρδευσης αύξησαν τη συγκέντρωση άλλων ενώσεων, όπως το β-πινένιο και η βορνεόλη. Στα εγχύματα, η ευκαλυπτόλη και άλλες ενώσεις αυξήθηκαν υπό συνθήκες άρδευσης και μηδενικής λίπανσης, ενώ η καμφορά αυξήθηκε με την αύξηση της λίπανσης και της άρδευσης.

Τέλος, τα μη λυοφιλιωμένα εγχύματα βρέθηκαν να έχουν περισσότερα συστατικά, με κύριο το ροσμαρινικό οξύ σε όλες τις επεμβάσεις. Το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος ήταν υψηλότερο στα μη αρδευόμενα δείγματα και μεγαλύτερο στα υδατικά εκχυλίσματα.

**Επιστημονική Περιοχή:** Επιστήμη τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** Ελληνικό φασκόμηλο, Λίπανση, Άρδευση, Εγχύματα, Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, Ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές περιεχόμενο, Πτητικά συστατικά, Αντιοξειδωτικά συστατικά

## Study of the components and control of bioactivity of herbs grown under different fertilization and irrigation conditions: the case of the Greek sage (*Salvia fruticosa*)

MSc Food, Nutrition & Health  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of General Chemistry

### ABSTRACT

The extracts of aromatic and medicinal plants are widely used in traditional medicine, as well as in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. However, their quality and quantity are affected by the environmental factors of plant cultivation, such as available nitrogen (N) and irrigation frequency. In this study, the effect of nitrogen and irrigation frequency on the content and composition of Greek sage (*Salvia fruticosa*) extracts was investigated. Specifically, the impact of different amounts of nitrogen fertilizer (0, 5, 10, 15 kg/ha) and irrigation on the yield and qualitative characteristics of infusions and hydroalcoholic extracts was examined.

The yield of secondary metabolites was found to be higher in the hydro-methanolic extracts compared to the infusions. No difference in yield was observed between irrigated and non-irrigated samples, but there was a trend of reduced yield under conditions of reduced fertilization. The irrigated sage plants had a higher percentage of total phenolics compared to non-irrigated plants, and increased fertilization improved their phenolic content. Additionally, the infusions presented a higher amount of phenolic components compared to the hydro-methanolic extracts.

Water deficit conditions improved the flavonoid content of the samples. In the aqueous extracts, reduced fertilization improved the flavonoid content, while in the hydro-methanolic extracts, the best results came from samples with increased fertilization. Comparatively, the hydro-methanolic extracts had higher quantities of flavonoids than the aqueous extracts.

The antioxidant activity was found to be higher in the non-lyophilized infusions of the non-irrigated samples and increased with higher fertilization. Similar results were observed in the lyophilized samples without significant differences in IC<sub>50</sub>. The infusions had lower antioxidant activity compared to the hydro-methanolic extracts.

Eucalyptol was the main volatile component in all samples. The sage essential oil extracts with irrigation and zero to moderate fertilization had increased concentrations of eucalyptol and other components. Low fertilization and lack of irrigation increased the concentration of other compounds, such as  $\beta$ -pinene and borneol. In the infusions, eucalyptol and other compounds

increased under conditions of irrigation and zero fertilization, while camphor increased with higher fertilization and irrigation.

Finally, the non-lyophilized infusions were found to have more components, with rosmarinic acid being the main one in all treatments. The percentage of rosmarinic acid was higher in the non-irrigated samples and greater in the aqueous extracts.

**Scientific area:** Food Science

**Key words:** Salvia fruticose (Greek sage), Fertilization (Nitrogen), Irrigation, Infusions, Hydromethanolic extracts, Total phenolic and flavonoid content, Volatile components, Antioxidant components

*Στη Δημητρούλα μου...*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διεξάχθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία (Food, Nutrition and Health)»

Με το πέρας αυτής της μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στη διεξαγωγή της.

Η μελέτη αυτή δε θα ολοκληρωνόταν χωρίς τη συμβολή του επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή κ. Πέτρο Ταραντίλη στην ανάθεση, επίβλεψη και διόρθωση της. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη και την καθοδήγηση του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Παππά, για την προσφορά οποιασδήποτε βοήθειας κι αν χρειάστηκα και στην Καθηγήτρια κ. Οικονόμου Αντώνικα Γαρυφαλλιά, για τη συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και στους δύο ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο τους.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού, την κ. Δήμητρα Δαφερέρα, τον κ. Χάρη Κανάκη και την κ. Νάντια Ασπρακά για τη βοήθειά τους και την έμπρακτη συμβολή τους στη διεκπεραίωση του πειράματος.

Ευχαριστώ επίσης θερμά το Εργαστήριο Γεωργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και των υποψήφιο Διδάκτορα Αλέξανδρο Ασσαριωτάκη για τη χορήγηση του φυτικού υλικού, το οποίο ανέλυσα.

Ευχαριστώ πάρα πολύ τις υποψήφιες Διδάκτορες του Εργαστηρίου Χημείας, Νεφέλη Σοφία Σωτηροπούλου και Ελένη Κακούρη για τη στήριξη και τη βοήθεια τους σε ότι και αν τις χρειάστηκα, καθώς και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την αγάπη, την κατανόηση και την υπομονή την οποία έδειξαν.

Με την άδεια μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	iii
ABSTRACT .....	v
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	viii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	9
Πίνακας Εικόνων .....	12
Πίνακας Διαγραμμάτων .....	13
Πίνακας Γραφημάτων .....	xiv
Πίνακας Πινάκων.....	xvi
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	17
1.1 Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά.....	17
1.2 Βοτανικά Χαρακτηριστικά του ελληνικού φασκόμηλου ( <i>Salvia fruticosa</i> ).....	18
1.3 Καλλιεργητικές συνθήκες του ελληνικού φασκόμηλου ( <i>Salvia fruticosa</i> ).....	19
1.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα-Αντιμικροβιακή δράση.....	21
1.4.1 Μηχανισμός δράσης .....	23
1.4.2 Δοκιμές προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	24
1.4.2.1 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή του διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (DPPH) .....	26
1.4.2.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή του 2,2'- αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS).....	27
1.4.2.3 Σύγκριση των δύο προαναφερθέντων δοκιμών .....	28
1.5 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μαζών (GC-MS) .....	29
1.5.1 Ποσοτική ανάλυση .....	31
1.5.2 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου .....	31
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	32
Υλικά και μέθοδοι – Αποτελέσματα - Συμπεράσματα.....	32
2.1 Η Διαδικασία .....	32

2.2 Φυτικό υλικό .....	33
2.3 Καλλιέργεια φασκόμηλου και μετεωρολογικά δεδομένα.....	33
2.4 Απόδοση.....	34
2.5 Παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών .....	34
2.5.1 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων – Εκχύλιση υποβοηθούμενη με λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz (USAE) .....	34
2.5.2 Παραλαβή αφεψημάτων – Εκχύλιση με ανάδευση σε θερμοκρασία 70°C.....	35
2.5.3 Λυοφιλίωση.....	35
2.5.4 Παραλαβή πτητικών συστατικών.....	36
2.5.5 Παραλαβή πτητικών συστατικών των αφεψημάτων με Εκχύλιση Υγρού-Υγρού ..	36
2.6 Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	37
2.6.1 Δοκιμή DPPH.....	37
2.6.1.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης.....	38
2.6.2 Δοκιμή ABTS .....	38
2.6.2.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης.....	39
2.7 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	40
2.7.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης.....	40
2.8 Εκτίμηση του ολικού Φλαβονοειδούς περιεχομένου με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου.....	41
2.8.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης.....	41
2.9 Μελέτη Χημικής Σύστασης.....	42
2.9.1 Χρωματογραφική μελέτη με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μαζών (GC-MS).....	42
2.9.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	42
2.9.1.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων φασκόμηλου.....	43
2.9.2 Χρωματογραφική μελέτη με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD) και φασματόμετρο μαζών (LC-DAD & LC-DAD-MS).....	44
3. Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	45
3.1 Απόδοση.....	45

3.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου .....	47
3.3 Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο.....	51
3.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα.....	55
3.4.1 Μέθοδος DPPH.....	56
3.4.2 Μέθοδος ABTS.....	59
3.5 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών αιθερικών εκχυλισμάτων και των εγχυμάτων του φασκόμηλου .....	62
3.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών των εγχυμάτων και υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου .....	68
4. Συμπεράσματα .....	72
Βιβλιογραφία .....	74

## Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Ανθισμένη κορυφή του φυτού <i>Salvia fruticosa</i> .....	18
Εικόνα 2: Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών (Leopoldini et al., 2011) .....	25
Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης DPPH .....	27
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης ABTS .....	28
Εικόνα 5: Δομή TROLOX .....	28
Εικόνα 6: Οργανολογία Αέριου χρωματογράφου .....	30
Εικόνα 7: Φάσμα μάζας ευκαλυπτόλης (Nist Chemistry WebBook) .....	30
Εικόνα 8: Δομή κυκλοεξανόνης.....	31
Εικόνα 9: Φυτικό υλικό .....	33
Εικόνα 10: Λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz .....	35
Εικόνα 11: Συσκευή λυοφιλίωσης.....	36
Εικόνα 12: Δομή Trolox .....	39
Εικόνα 13: Το φωτόμετρο UV που χρησιμοποιήθηκε.....	40
Εικόνα 14: Δομή Γαλλικού οξέος.....	41
Εικόνα 15: Δομή Κερκετίνης.....	42
Εικόνα 16: Προς ανάλυση δείγματα πτητικών συστατικών φασκόμηλου .....	43
Εικόνα 17: Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματοόμετρο μαζών (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε .....	43
Εικόνα 18: μαύρο: έγχυμα λυοφιλωμένο, μπλε: υδραλκοολικό εκχύλισμα .....	70
Εικόνα 19: μαύρο: έγχυμα λυοφιλωμένο, κόκκινο: έγχυμα μη λυοφιλωμένο .....	71

## Πίνακας Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας.....	32
Διάγραμμα 2 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.....	47
Διάγραμμα 3 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κερκετίνης .....	51
Διάγραμμα 4 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.....	55

## Πίνακας Γραφημάτων

Γράφημα 1: Σύγκριση απόδοσης εκχυμάτων - υδραλκολικών εκχυλισμάτων .....	45
Γράφημα 2: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο λυοφιλιωμένων εγχυμάτων .....	49
Γράφημα 3: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο λυοφιλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων.	49
Γράφημα 4: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων .....	50
Γράφημα 5: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου λυοφιλιωμένων εκχυμάτων - υδραλκολικών εκχυλισμάτων .....	50
Γράφημα 6: Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο λυοφιλιωμένων εγχυμάτων.....	53
Γράφημα 7: Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο λυοφιλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων .....	53
Γράφημα 8: Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων .....	54
Γράφημα 9: Σύγκριση ολικού φλαβονοειδούς περιεχομένου λυοφιλιωμένων εκχυμάτων - υδραλκολικών εκχυλισμάτων .....	54
Γράφημα 10: Αντιοξειδωτική ικανότητα μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH .....	57
Γράφημα 11: Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH	57
Γράφημα 12: Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH.....	58
Γράφημα 13: Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας λυοφιλιωμένων εκχυμάτων και υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH.....	58
Γράφημα 14: Αντιοξειδωτική ικανότητα μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH .....	60
Γράφημα 15: Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH	60
Γράφημα 16: Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH.....	61
Γράφημα 17: Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων και υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH.....	61
Γράφημα 18: Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των οργανικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0W), 5 μονάδες (5W), 10 μονάδες (10W), 15 μονάδες.....	63
Γράφημα 19: Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των οργανικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές	

επεξεργασίες λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0D), 5 μονάδες (5D), 10 μονάδες (10D), 15 μονάδες (15D)] ..... 63

Γράφημα 20: Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των εγχυμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0D), 5 μονάδες (5D), 10 μονάδες(10D), 15 μονάδες (15D)] 64

Γράφημα 21: Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των εγχυμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες(0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες (10D), 15 μονάδες (15D)] ..... 64

Γράφημα 22: Ποσοστό του κύριου συστατικού των εγχυμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη και αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεξεργασίες αζωτούχου λίπανσης [0 μονάδες (0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες (10D), 15 μονάδες (15D)] ..... 69

Γράφημα 23: Ποσοστό του κύριου συστατικού των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη και αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεξεργασίες αζωτούχου λίπανσης [0 μονάδες(0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες (10D), 15 μονάδες (15D)] ..... 69

## Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1: Ταξινομική περιγραφή του ελληνικού φασκόμηλου.....	18
Πίνακας 2: In Vitro δοκιμές προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Huang et al., 2005, Sharma et al., 2009, Dudonne et al., 2009).....	25
Πίνακας 3: Πρόγραμμα ανάλυσης εκχυλισμάτων φασκόμηλου .....	44
Πίνακας 4: Απόδοση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου (INF: εγχύματα, USE : υδρομεθανολικά εκχυλίσματα) .....	45
Πίνακας 5: Αποτελέσματα λυοφιλιωμένων και μη λυοφιλιωμένων δειγμάτων (D:dry, W:water, un:unlyophilized, numbers: quantity of N) .....	48



# 1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

## 1.1 Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά

Τα φυτά με αρωματικές και θεραπευτικές ιδιότητες δεν συγκαταλέγονται απαραίτητα σε μια συγκεκριμένη ταξινομική ομάδα, αλλά χαρακτηρίζονται με βάση τη χρήση που τους. Τα αρωματικά φυτά, συγκεκριμένα, περιέχουν πτητικά συστατικά, γνωστά ως αιθέρια έλαια, τα οποία προσδίδουν το χαρακτηριστικό τους άρωμα. Ωστόσο, οποιοδήποτε φυτό που χρησιμοποιείται στην ιατρική μπορεί να χαρακτηριστεί ως φαρμακευτικό. Παρ' όλα αυτά, δεν είναι κάθε αρωματικό φυτό και φαρμακευτικό (Bhattarai, 2004).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organisation, WHO), καταγράφονται περίπου 20.000 φαρμακευτικά φυτά παγκοσμίως (Bhattarai, 2004). Η οικογένεια Lamiaceae ξεχωρίζει για την πληθώρα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που περιέχει. Εντός αυτής, το γένος *Salvia* L. είναι το μεγαλύτερο, περιλαμβάνοντας περίπου 900 είδη φυτών, θάμνων και βοτάνων σε ολόκληρο τον κόσμο. Είναι σχεδόν καθολικά διαδεδομένο, με κύριο κέντρο εξάπλωσης τη Νοτιοδυτική και Κεντρική Ασία. Στην Ελλάδα, καταγράφονται 23 είδη *Salvia* αυτοφυή, με τρία εκ των οποίων να είναι ενδημικά (*Salvia eichleriana* Halácsy, *Salvia pomifera* L. subsp. *Pomifera* και *Salvia teddii* Turrill), ενώ η πλειονότητα τους ανθίζει σε βραχώδεις πλαγιές, ξηρούς βοσκότοπους και καλλιεργούμενες περιοχές. Πολλά εκ των μη ευρωπαϊκών ειδών καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά φυτά (Karousou et al., 2000). Στην Ελλάδα, τα κύρια αρωματικά φυτικά είδη του γένους *Salvia* περιλαμβάνουν τα εξής: *Salvia fruticosa*, *Salvia tomentosa*, *Salvia pomifera* L. και *Salvia sclarea* L. (Kokkini, 2003).

## 1.2 Βοτανικά Χαρακτηριστικά του ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)

Πίνακας 1 : Ταξινομική περιγραφή του ελληνικού φασκόμηλου



Εικόνα 1 : Ανθισμένη κορυφή του φυτού *Salvia fruticosa*

<b><u>Βασίλειο:</u></b>	<u>Φυτά</u> ( <i>Plantae</i> )
<b><u>Συνομοταξία:</u></b>	<u>Τραχειόφυτα</u> ( <i>Tracheophytes</i> )
<b><u>Συνομοταξία:</u></b>	<u>Αγγειόσπερμα</u> ( <i>Angiosperms</i> )
<b><u>Ομοταξία ή κλάση:</u></b>	<u>Ευδικότυλα</u> ( <i>Eudicots</i> )
<b><u>Υφομοταξία ή υποκλάση:</u></b>	<u>Αστερίδες</u> ( <i>Asterids</i> )
<b><u>Τάξη:</u></b>	<u>Λαμιώδη</u> ( <i>Lamiales</i> )
<b><u>Οικογένεια:</u></b>	<u>Χειλανθή</u> ( <i>Lamiaceae</i> )
<b><u>Γένος:</u></b>	<u>Φασκόμηλο</u> ( <i>Salvia</i> )
<b><u>Είδος:</u></b>	<i>S. fruticosa</i>

Το ελληνικό φασκόμηλο (*Salvia fruticosa* Mill. (συν. *S. triloba* L.)) είναι ένας θάμνος που ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και είναι ενδημικό στην Ελλάδα και την Ανατολική Μεσόγειο (Εικόνα 1) (Hedge, 1982). Αυτό το φυτό αναπτύσσεται και αυτοφύεται κυρίως στις παράκτιες περιοχές σε ολόκληρη την Ελλάδα, ενώ είναι λιγότερο συνηθισμένο στα βορειοανατολικά τμήματα και απουσιάζει από το βόρειο τμήμα της Ελλάδας. Είναι το πιο εξαπλωμένο είδος του γένους *Salvia* στην Ελλάδα και συναντάται σε περιοχές μακκί και φρύγανα, έως και σε ύψος 700 μέτρων (Hedge 1982).

Το φασκόμηλο εξαπλώνεται επίσης από την Ιταλία και τη Σικελία έως την Κύπρο και τη Δυτική Συρία (Peggy Leontaritou et al., 2020). Αποτελεί ένα από τα πιο εκτιμημένα αρωματικά-φαρμακευτικά είδη του γένους *Salvia* και έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική.

Είναι γνωστό και με τα ονόματα *Salvia libanotica* Boiss. and Gail, *Salvia lobryana* Aznav., *Salvia thomasii* Lacaïta, *Salvia triloba* L. fil. (Karousou et al., 2000).

Πρόκειται για έναν αειθαλή θάμνο με πυκνό ριζικό σύστημα και ημιξυλώδεις βλαστούς, οι οποίοι φέρουν γκριζο-πράσινα, χνουδωτά φύλλα με λευκό χνούδι, με έντονη διακλάδωση και ύψος έως 80 εκατοστά. Τα άνθη του είναι ιώδη ή ερυθρόχρωμα και σπανίως λευκά (2-6 ανά σπόνδυλο), σχηματίζοντας ταξιανθία βότρου και ανθίζει από Μάιο έως Ιούνιο.

Το ελληνικό φασκόμηλο (*Salvia fruticosa* Mill.) είναι ένα φυτό πλούσιο σε βιοενεργά συστατικά και έχει μεγάλη ζήτηση από τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών και

αγροτικών προϊόντων (Peggy Leontaritou et al., 2020). Πλήρης ταξινομική περιγραφή δίνεται στον Πίνακα 1.

### 1.3 Καλλιεργητικές συνθήκες του ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)

Το φασκόμηλο είναι ένα φυτό που μπορεί να αναπτυχθεί σε διάφορα εδάφη, αλλά προτιμά τα μέτρια σε σύσταση εδάφη που έχουν καλή αποστράγγιση. Ιδανικό pH θεωρείται ότι είναι μεταξύ 6,2 και 6,4. Τα εδάφη που είναι πολύ αμμώδη ή πολύ συνεκτικά και συγκρατούν υγρασία θεωρούνται ακατάλληλα. Το φασκόμηλο ανθίζει εξίσου καλά σε θερμές και σε ψυχρές περιοχές, και μπορεί να αντέξει θερμοκρασίες ως και -25°C. Είναι γρήγορο στην ανάπτυξη, ανθεκτικό και προσαρμόσιμο. Προτιμά τις ηλιόλουστες θέσεις και τα εδάφη με καλή αποστράγγιση. Είναι ένα φυτό που αντέχει στις ακραίες θερμοκρασίες και την έλλειψη νερού τα καλοκαίρια. Το κλάδεμα μετά το τέλος της άνθισης προωθεί την πλούσια ανθοφορία την επόμενη χρονιά. Η αναπαραγωγή γίνεται κυρίως με μοσχεύματα, και η καλλιέργειά του μπορεί να διαρκέσει έως και 7 χρόνια με κατάλληλη φροντίδα και τακτικά κλαδέματα για να διατηρηθεί η υγεία του. Το φασκόμηλο απαιτεί λίγο νερό και λίγα λιπάσματα, κυρίως μόνο κατά περιόδους ξηρασίας.

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και το αβιοτικό στρες όπως η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα του εδάφους, η ψύξη, η αποψίλωση των δασών, η αστικοποίηση, η κλιματική αλλαγή και η κακή γεωργική πρακτική είναι υπεύθυνοι για τη μείωση της φυτικής κάλυψης και τη διάβρωση των εδαφών (Boyer, 1982). Παράλληλα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών μπορούν να αλλοιωθούν από περιβαλλοντικούς παράγοντες και η έλλειψη νερού επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογία και τη βιοχημεία των φυτών. Σε φυτά με αρωματικές ιδιότητες, όπως το φασκόμηλο, η ξηρασία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την παραγωγή και τη σύνθεση των μεταβολιτών τους (Petropoulos et al., 2008).

Οι ερευνητές έχουν δείξει ότι η σύνθεση του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με πολλούς παράγοντες, όπως η λίπανση του εδάφους, η ένταση του φωτός, η ηλικία των φυτών, οι κλιματικές συνθήκες, η εποχή και η γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας (Piccaglia and Marotti, 1993, Li et al., 1996, Mathe et al., 1992, Grella and Picci, 1988, Santos-Gomes and Fernandes Ferreira, 2001). Ως αποτέλεσμα, η σύνθεση του αιθέριου ελαίου φασκόμηλου μερικές φορές δεν συμπίπτει με το προκαθορισμένο προφίλ που ορίζεται από τα πρότυπα, όπως το ISO 9909, το οποίο, σύμφωνα με τον Bruneton (1999), είναι cis-thujone (18–43%), trans-thujone (3–8,5%), καμφορά (4,5–24,5%), 1,8-κινεόλη (5,5–13%), α-χουμουλένιο (0–12%), α-πινένιο (1–6,5%), καμφένιο (1,5 – 7%), λιμονένιο (0,5–3%), λιναλοόλη και οξικό βορνύλιο (το πολύ 2,5%). Αυτό οφείλεται στην ποικιλία των φυσικών

παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεση του ελαίου, κάτι που καθιστά την ανάλυση και την παραγωγή ελαίου φασκόμηλου μια πρόκληση.

Για τις σύγχρονες γεωργικές πρακτικές, η απόδοση και η ποιότητα των καλλιεργειών είναι καθοριστικές. Η ισορροπημένη λίπανση και η αποτελεσματική άρδευση αποτελούν βασικούς παράγοντες για τα συστήματα εντατικής γεωργικής παραγωγής για παραγωγή υψηλής απόδοσης και βέλτιστης ποιότητας. Το άζωτο και ο φώσφορος αποτελούν κλειδί για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα, επηρεάζοντας ταυτόχρονα την παραγωγή πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών (Bernstein et al., 2005, Marschner, 2002, Koeduka et al., 2006, Sharafzadehet al., 2011).

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην περιεκτικότητα και τη σύσταση ορισμένων αρωματικών φυτών (Arabaci and Bayram, 2004, Hendawy and Khalid, 2011, Sharma and Kumar, 2012; Zheljzakov et al., 2012) άλλοι δεν ανέφεραν σημαντικές επιπτώσεις (Arabaci και Bayram, 2004; Barreyro et al., 2005).

Το επίπεδο υγρασίας στο έδαφος των φυτών επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργία και τις χημικές διεργασίες τους (Letchamo and Gosselin, 1995). Η ποσότητα και η διάρκεια της έλλειψης νερού συχνά επηρεάζουν την απόδοση και την ποιότητα των εκχυλισμάτων των φυτών, καθώς και τη σύνθεση τους. Συγκεκριμένα, η έλλειψη νερού έχει δείξει ότι μειώνει την παραγωγή αιθέριων ελαίων, την παραγωγή μεταβολιτών και την απόδοση αιθέριου ελαίου σε πολλά αρωματικά φυτά (Letchamo and Gosselin, 1995; Putievsky et al. , 1990, Rajeswara Rao et al., 1996). Επιπλέον, η συχνότητα της άρδευσης έχει επίσης αναφερθεί ότι επηρεάζει τη σύνθεση των χημικών ενώσεων σε διάφορα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά. (Bettaieb et al., 2009, Corell et al., 2009, Petropoulos et al., 2008).

Οι πληροφορίες που διαθέτουμε σχετικά με το πώς η κατάσταση του νερού και η λίπανση επηρεάζουν το φασκόμηλο είναι περιορισμένες και αντιφατικές. Μερικές μελέτες δεν έχουν αναφέρει κάποια επίπτωση στην παραγωγή αιθέριου ελαίου ανά μονάδα βιομάζας με μειωμένη άρδευση, ενώ άλλες έχουν δείξει βελτίωση της παραγωγής αιθέριου ελαίου σε συνθήκες έλλειψης νερού. Για παράδειγμα, οι Corell et al. το 2009 δεν ανέφεραν επιπτώσεις στην παραγωγή αιθέριου ελαίου ανά μονάδα βιομάζας υπό μειωμένη άρδευση, με μείωση της συνολικής παραγωγής αιθέριων ελαίων λόγω του ελλείμματος νερού, ενώ οι Bettaieb et al. το 2009 διαπίστωσαν ότι τόσο η μέτρια όσο και η πλήρης έλλειψη νερού βελτίωσαν την απόδοση αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου. Αυτή η αντίφαση μπορεί να υποδείξει ότι οι επιπτώσεις της κατάστασης του νερού μπορεί να εξαρτώνται από άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των αιθέριων ελαίων, όπως η λίπανση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ άρδευσης και λίπανσης έχει επιβεβαιωθεί και σε άλλες μελέτες (El-Hendawy et al., 2008),

ενώ υπάρχουν ενδείξεις για αντίστοιχες επιδράσεις στην παραγωγή και τη σύνθεση αιθέριων ελαίων σε άλλα αρωματικά φυτά (Vahidipour et al., 2013).

#### 1.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα-Αντιμικροβιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικές συνθέσεις καθώς είναι ένα ευρέως φάσματος αντιμυκητιακό, με δράση εναντίον των δερματοφυτών, *Candida* spp. και μυκήτων (Pinto et al., 2007). Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων 1,8-κινεόλης, θουγιόνης, καμφόρας και μονοτερπενίων στην *Salvia officinalis* (L.), της προσδίδει αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε gram αρνητικά και θετικά βακτήρια (Pereira et al., 2004; Delamare et al., 2007). Το ολεανολικό οξύ, ένα συστατικό του εκχυλίσματος της *Salvia officinalis*(L.), έδειξε αντιβακτηριακή δραστηριότητα ενάντια στο *Staphylococcus aureus* (Horiuchi et al., 2007). Τα флаβονοειδή (ισοφλαβόνες, флаβανόνες και флаβόνες), συστατικά των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου, είναι πολυφαινολικές δομές που δρουν ως αντιμικροβιακά (αντιμυκητιασικά, αντιβακτηριακά και αντιικά), κάποια από τα οποία είναι παράγοντες που δημιουργούνται ως φυτοαλεξίνες λόγω μικροβιακής επίθεσης (Silva, 2006). Σύμφωνα με τον Rocha (1994), καλλυντικά που περιέχουν 1% флаβονοειδή έχουν ήδη μικροβική δραστηριότητα, αλλά δεν προκαλούν ερεθισμό του δέρματος (Rocha, 1994). Επομένως, οι συνθέσεις με υδροαλκοολικό εκχύλισμα της *Salvia officinalis* (L.) μπορεί να έχουν συστατικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, παρέχοντας προστασία στο δέρμα που είναι ευαίσθητο στα βακτήρια.

Οι σαπωνίνες μειώνουν την επιφανειακή τάση του νερού και δρουν ως απολυμαντικά, γαλακτωματοποιητές και αντιβακτηριακά συστατικά (Costa, 2001, Verdi et al., 2005). Οι ταννίνες είναι φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε μικροοργανισμούς (Pinho et al., 2012).

Οξειδωση ορίζεται ως η απώλεια ηλεκτρονίων από ένα άτομο, μόριο ή ιόν. Σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση η αναγωγική ένωση προσφέρει τα ηλεκτρόνια της και έτσι η ίδια οξειδώνεται. Κατά την αυτοοξειδωση των λιπών, η λιπαρή ύλη απορροφά οξυγόνο από την ατμόσφαιρα με αποτέλεσμα το προϊόν να οξειδώνεται (Σφλώμος, 2011). Το οξυγόνο συμμετέχει σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του οργανισμού, εξαιτίας της ικανότητας του να δέχεται μονήρη ηλεκτρόνια και να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

Ο οξειδωτικός μεταβολισμός των κυττάρων των φυτικών και ζωικών οργανισμών είναι απαραίτητος για την επιβίωσή τους και γίνεται μέσω του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών με σκοπό την παραγωγή ενέργειας.

Ωστόσο το οξυγόνο μπορεί να αποτελέσει σοβαρό εχθρό των κυττάρων καταστρέφοντας πολύτιμα στοιχεία του. Στα κύτταρα κατά την διάρκεια αναερόβιων συνθηκών μπορούν να δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες και άλλες οξυγονούχες δραστικές ουσίες (Reactive Oxygen Species) που περιλαμβάνουν ιόντα οξυγόνου, οργανικά και ανόργανα υπεροξειδία όπως το υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^-$ ), η υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $HO_2^*$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $-OH^*$ ), το οξειδίο του αζώτου (NO), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες ανιόν ( $ClO^-$ ) και άλλα. Επιπλέον από την αντίδραση του οξειδίου του αζώτου με οξυγόνο μπορούν να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species), ενώ από την αντίδραση των οξυγονούχων δραστικών ουσιών με θειόλες μπορούν να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες θείου (Reactive Sulfur Species) (Lü et al., 2010). Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που έχουν τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα τροχιακό τους. Οι ρίζες αυτές αντιδρούν εύκολα με τα γειτονικά τους μόρια παίρνοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο (και μετατρέποντας αυτά στην συνέχεια σε ελεύθερες ρίζες) αρχίζοντας έτσι μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αναζητώντας το ηλεκτρόνιο που τους λείπει, μπορούν να προκαλέσουν πολλές ζημιές, όπως καταστροφή του DNA και των λιπιδίων καθώς και προβλήματα στην πρωτεϊνοσύνθεση και στις λειτουργικές μεμβράνες. (Aruoma, 1998, Lopez-Reveuetla et al., 2006).

Σε φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό υπάρχει ισορροπία καθώς μόρια όπως ένζυμα και αντιοξειδωτικά μόρια όπως είναι η βιταμίνη C προσφέρουν προστασία έναντι των ελευθέρων ριζών. (Aruoma, 2003, Huang et al., 2005). Ωστόσο όταν αυτή η ισορροπία διαταραχτεί, δηλαδή όταν υπάρξει υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών, τότε αυτές μπορούν να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα στον οργανισμό (Rice-Evans et al., 1996 Aruoma, 2003, Lopez-Reveuetla et al., 2006). Συσχετίζονται με την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης (Kojoda et Harrison, 1999), της νόσου Alzheimer, με το Parkinson, το εγκεφαλικό, την ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον καρκίνο (Pisoschi et Negulescu, 2011), αλλά και την επιτάχυνση της γήρανσης, λοιμώξεις καθώς και τραυματισμούς.

Στην σύγχρονη εποχή δυστυχώς λόγω των συνθηκών υψηλής ατμοσφαιρικής ρύπανσης, ακτινοβολίας αλλά και κακών συνηθειών των ανθρώπων όπως είναι το κάπνισμα και το στρες λόγω του αυξημένου ρυθμού ζωής όλο και περισσότερο αυξάνεται η περιεκτικότητα των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό του ανθρώπου με αποτέλεσμα η ενδογενής άμυνα να μην είναι ικανή να τις αντιμετωπίσει. Οπότε το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά στοιχεία τα οποία θα μπορέσουν συνεργιστικά με την ανθρώπινη άμυνα να εξουδετερώσουν το πρόβλημα των ελευθέρων ριζών.

### 1.4.1 Μηχανισμός δράσης

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που αναστέλλουν ή καθυστερούν τις διεργασίες οξείδωσης προστατεύοντας τους ιστούς με διάφορους τρόπους. Χωρίζονται σε ενδογενή, δηλαδή αυτά που υπάρχουν στον οργανισμό και σε εξωγενή, τα οποία με την σειρά τους διαχωρίζονται ανάλογα με την προέλευση τους σε φυσικά και συνθετικά (Pisoschi et Negulescu, 2011). Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης που χρησιμοποιούν τα αντιοξειδωτικά, κατατάσσονται στα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά ή σε αυτά τα οποία παρεμποδίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση, τα οποία διακόπτουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών και στα δευτερεύοντα ή προστατευτικά αντιοξειδωτικά που έχουν προληπτική δράση και διασπούν τα υδροϋπεροξειδία επιβραδύνοντας έτσι τον ρυθμό εκκίνησης της αλυσιδωτής αντίδρασης που οδηγεί στον πολυμερισμό. (Frankel and Meyer, 2000, Antolovich et al, 2002, Koleva et al, 2002).

Τα αντιοξειδωτικά στον οργανισμό ή στα τρόφιμα λειτουργούν ως αποσβέστες ηλεκτρονίων. Η δράση τους δηλαδή είναι η δέσμευση των ελεύθερων ριζών ή η αναστολή της παραγωγής τους. Δρουν επομένως μετατρέπόμενα προσωρινά σε ελεύθερες ρίζες, προσφέροντας τα ηλεκτρόνια τους σε αυτές και έτσι αυτές εξουδετερώνονται, ενώ το αντιοξειδωτικό μετατρέπεται προσωρινά σε ελεύθερη ρίζα αφού έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Όμως αυτά έχουν την ικανότητα να αποβάλουν το ασύζευκτο αυτό ηλεκτρόνιο χωρίς να δημιουργούν βλάβες στα κύτταρα-οργανισμό λόγω των συστημάτων των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Οξείδωση μπορεί να προκληθεί λόγω ποικίλων φυσικών και χημικών φαινομένων τα οποία θα προχωρήσουν πάνω σε ένα κατάλληλο υπόστρωμα μέχρι ένας μηχανισμός άμυνας να σταματήσει την διαδικασία. Υποστρώματα που ευνοούν αυτά τα φαινόμενα είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, το DNA, τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη. Η οξείδωση των λιπαρών υλών λαμβάνει χώρα με την μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης η οποία συνίσταται από τρία στάδια, την έναρξη, την διάδοση και τον τερματισμό. Κατά την έναρξη σχηματίζονται οι ελεύθερες ρίζες με την παρακάτω αντίδραση.

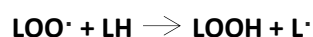


όπου LH το λιπαρό υπόστρωμα, R<sup>•</sup> Ο οξειδωτικός παράγοντας και L<sup>•</sup> η ελεύθερη ρίζα.

Κατά την διάδοση οι ελεύθερες ρίζες ενώνονται με οξυγόνο και προκύπτουν υπεροξειδικές ρίζες οι οποίες παίρνουν ένα μόριο υδρογόνου από ένα άλλο λιπαρό υπόστρωμα με αποτέλεσμα την δημιουργία υπεροξειδίου και μιας νέας ελεύθερης ρίζας, η οποία μπορεί να αντιδράσει εκ νέου με οξυγόνο και να δώσει επιπλέον ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδία κατά τις παρακάτω αντιδράσεις.



όπου LOO<sup>•</sup> οι υπεροξειδικές ρίζες



όπου LOOH το υπεροξειδίο

Τα υπεροξειδία είναι άοσμα αλλά διασπώνται σε αλκοόλες, αλδεΐδες ή κετόνες, προσδίδοντας έτσι στα οξειδωμένα τρόφιμα χαρακτηριστική οσμή. Χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, πολυμερών και πετροχημικών προϊόντων (Pisoschi et Negulescu, 2011). Στα τρόφιμα τα αντιοξειδωτικά ορίζονται ως οι προστιθέμενες οργανικές ουσίες που επιβραδύνουν ή αναστέλλουν τις οξειδωτικές αλλοιώσεις, όπως είναι το τάγγισμα των λιπών και οι μεταβολές στο χρώμα των τροφίμων (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009). Πρόκειται για οργανικές ενώσεις που στο μόριο τους έχουν μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλουν την αντιοξειδωτική δράση που έχουν στα τρόφιμα (Σφλώμος, 2011). Είναι ετερογενής κατηγορία μορίων, όπου η δράση τους εξαρτάται από τα χημικά χαρακτηριστικά τους και την θέση που έχουν μέσα στο τρόφιμο (Oroian et Escriche, 2015).

#### 1.4.2 Δοκιμές προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας

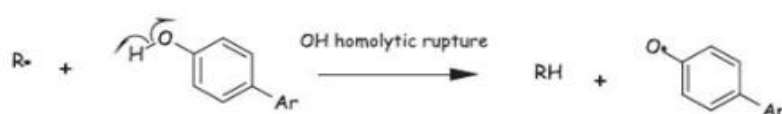
Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενός ξεχωριστού συστατικού του φυτικού εκχυλίσματος είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασης του εκχυλίσματος, καθώς και της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των συστατικών (Huang *et al.*, 2005). Υπάρχει πλήθος δοκιμών για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης αλλά καμία από αυτές δεν αποτελεί επίσημη δοκιμή προσδιορισμού, με συνέπεια τα αποτελέσματα να μην μπορούν να συγκριθούν κατ' απόλυτο τρόπο. Έτσι, η πολυπλοκότητα των συστημάτων και των υποστρωμάτων της αντιοξειδωτικής δράσης επιβάλλει τη χρήση πολλών διαφορετικών δοκιμών μέτρησης της (Frankel and Meyer, 2000, *Aruoma*, 2003, Huang *et al.*, 2005).

Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών επηρεάζεται από τη δοκιμή προσδιορισμού, το χημικό τους τύπο, τους τρόπους εκχύλισης και τις συνθήκες με τις οποίες έγιναν καθώς και τη συγκέντρωση του δείγματος. Υπάρχουν πολλές δοκιμές, οι οποίες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, αυτές που παγιδεύουν τις υπάρχουσες ρίζες (free radical – trapping methods), και αυτές που προσδιορίζουν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν την οξείδωση των λιπιδίων (lipid oxidation) (Frankel and Meyer, 2000).

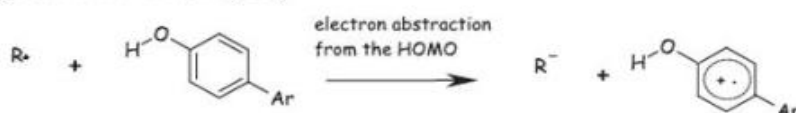


Σχετικά με τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι δοκιμές διακρίνονται σε αυτές που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer based assays – SET), όπου μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αλλάζει χρώμα ,καθώς αυτό ανάγεται όταν αντιδρά με το οξειδωτικό, και σε αυτές που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays – HAT), όπου εξετάζουν την κινητική των αντιδράσεων και οι συγκεντρώσεις απορρέουν από τις κινητικές καμπύλες (Huang et al.,2005).

#### 1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



#### 2. Single Electron Transfer (SET)



Εικόνα 2 : Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών (Leopoldini et al., 2011)

Πίνακας 2 : In Vitro δοκιμές προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Huang et al., 2005, Sharma et al., 2009, Dudonne et al., 2009)

### Μέθοδοι HAT

- Ολικές ρίζες υπεροξυλίου(Trapping Antioxidant Parameter Assay)(TRAP)
- Θειβαρβουτουρικά παράγωγα(Thiobarbutyric Acid Reactive Substances)(TBARS)
- Δοκιμή λεύκανσης των κροκινών
- Β-καροτένιο/λινολεϊκό οξύ
- Παρεμπόδιση της αυτοοξειδωσης της LDL

---

## Μέθοδοι SET

---

- Μέθοδος της ικανότητας αναγωγής ιόντων σιδήρου  $Fe^{+3}$  (Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter)(FRAP)
  - Μέθοδος του διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)(DPPH)
  - Μέθοδος του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος)[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)](ABTS)
  - Μέθοδος μέτρησης ικανότητα απορρόφησης ρίζας οξυγόνου(Oxygen Radical Absorbance Capacity)(ORAC)
  - Μέθοδος της ικανότητας αναγωγής ιόντων χαλκού  $Cu^{+2}$  Total Antioxidant Potential Assay Using Cu (II)
- 

Επειδή τα φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά συστατικά, τα αποτελέσματα της κάθε μεθόδου θα διαφέρουν καθώς κάποιες μέθοδοι είναι περισσότερο ευαίσθητες στα λιπόφιλα συστατικά όπως αυτές που χρησιμοποιούν λιπιδικά υποστρώματα, για παράδειγμα η μέθοδος TBARs, ενώ άλλες στα υδρόφιλα όπως οι μέθοδοι DPPH, TEAC, FRAP.(Chun et al, 2005).

### 1.4.2.1 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή του διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (DPPH)

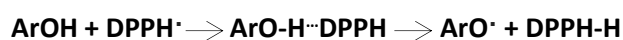
Η δοκιμή αυτή είναι η πιο χρησιμοποιούμενη δοκιμή προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας. Το DPPH συνιστά μια από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες ρίζες αζώτου, με απορροφήσεις σε ορατό και υπεριώδες, με μέγιστο μήκος κύματος τα 515nm (Huang et al.,2005). Το οργανικό διάλυμα του παρουσιάζει έντονο ιώδες χρώμα. Η προσθήκη συστατικού που δρα ως αντιοξειδωτικό, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση στην απορρόφηση με συνέπεια τον αποχρωματισμό του DPPH, η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα της αντιοξειδωτικής ουσίας που προστίθεται (Villano et al., 2007). Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στους οίνους ή τα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Είναι υδρόφοβο και έτσι όλες οι αντιδράσεις πρέπει να γίνουν σε οργανικούς διαλύτες. Από την βιβλιογραφία αναφέρετε ότι οι αντιδράσεις του οφείλονται ως επί των πλείστων σε HAT μηχανισμούς, ενώ οι αντιδράσεις του με διαλύτες που είναι ισχυρά δεσμευτικοί στο υδρογόνο όπως είναι η μεθανόλη, παρεμποδίζουν την απελευθέρωση ατόμων υδρογόνου και έτσι ενισχύονται οι SET αντιδράσεις. Μελέτες έδειξαν ότι στις αντιδράσεις των κινναμικών οξέων και των εστέρων τους με το DPPH σε μεθανόλη και αιθανόλη υπερτερεί ο μηχανισμός ET-αντίδρασης που γίνεται αρκετά γρήγορα, ενώ η HAT αντίδραση γίνεται πολύ αργά. Σε πολικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη και το νερό, τα μόρια των φαινολικών ενώσεων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μπορούν να

αντιδράσουν αυτές με το μηχανισμό μεταφοράς H στην ελεύθερη ρίζα (Foti et al., 2004; Huang et al., 2005).

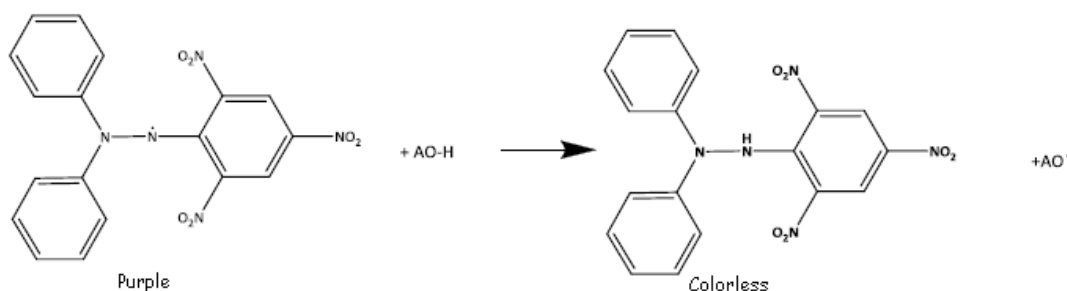
Οι αντιδράσεις του DPPH είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στις συνθήκες του συστήματος όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση, δηλαδή στην ύπαρξη νερού και διαλύτη, στο pH, στο οξυγόνο και στην έκθεση στο φως. Η ύπαρξη και των δύο μηχανισμών αντιδράσεων (SET και HAT) είναι ιδιαίτερα εμφανής στην μεταβλητότητα των αντιδράσεων που παρουσιάζει το DPPH με διαλύτη (Schaich et al., 2015).

Σύμφωνα με τους Foti et al. το 2004, αντιδρά με τις φαινολικές ενώσεις (ArOH) με δύο διαφορετικούς τρόπους:

- Με απόσπαση ενός φαινολικού H από τη ρίζα του DPPH. (HAT-αντίδραση)



- Με μεταφορά ηλεκτρονίου από τη φαινολική ένωση ή από το φαινολικό ανιόν προς την ελεύθερη ρίζα. (ET-Αντίδραση)

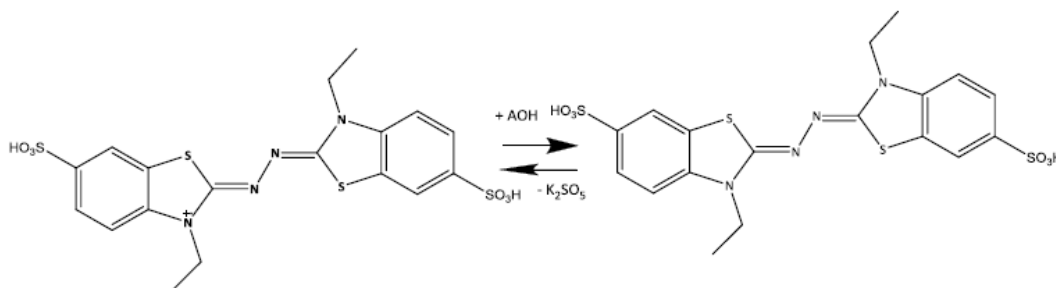


Εικόνα 3 : Μηχανισμός δράσης DPPH

#### 1.4.2.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS)

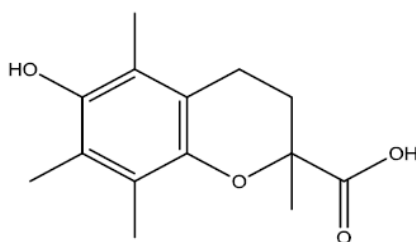
Είναι μία νέα δοκιμή που αναπτύχθηκε αρχικά το 1993 από τους Miller και Rice-Evans και εξελίχθηκε το 1999 από τους Re et al. Αναφέρεται ως μια δοκιμασία αποχρωματισμού που εφαρμόζεται σε λιπόφιλες και υδρόφιλες αντιοξειδωτικές ουσίες. Το αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου είναι το 2,2'-αζινοβις-(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ή αλλιώς ABTS. Στη βελτιωμένη έκδοσή της, το ριζικό κατιόν  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  παράγεται από την οξείδωση του  $\text{ABTS}^{2-}$  με υπερθειικά ιόντα (κάλιο) και μειώνεται με την παρουσία τέτοιων αντιοξειδωτικών που δίνουν υδρογόνο. Η ρίζα του κατιόντος  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα, η οποία αποχρωματίζεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών σύμφωνα με την εικόνα 7.

Οι ικανότητες συλλογής ριζών ABTS των ελαίων σταφυλιών προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται από τους Zuleata, Esteve και Frgogola (2009), με βάση την ικανότητα ενός δείγματος να αναστέλλει αυτή τη ρίζα (ABTS<sup>•+</sup>) σε σύγκριση με ένα πρότυπο αντιοξειδωτικής αναφοράς.



Εικόνα 4 : Μηχανισμός δράσης ABTS

Τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων μεθόδων εκφράζονται ως ισοδύναμα TROLOX(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) το οποίο είναι υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E και ισχυρό αντιοξειδωτικό.



Εικόνα 5 : Δομή TROLOX

#### 1.4.2.3 Σύγκριση των δύο προαναφερθέντων δοκιμών

Η δοκιμή DPPH είναι απλή και γρήγορη και χρειάζεται μόνο μια φασματοφωτομετρική μέτρηση υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) για να εκτελεστεί. Ωστόσο, μπορεί να γίνει περίπλοκη όταν υπάρχουν ενώσεις των οποίων τα φάσματα επικαλύπτονται στα 515nm. Τα καρτενοειδή, ειδικότερα, παρεμποδίζουν τις άλλες ενώσεις. Μικρά μόρια, τα οποία έχουν καλύτερη πρόσβαση στη ρίζα έχουν μεγαλύτερη φαινομενική αντιοξειδωτική ικανότητα (AOC). Πολλά αντιοξειδωτικά που αντιδρούν γρήγορα με ρίζες υπεροξυλίου μπορεί να αντιδράσουν αργά ή μπορεί ακόμη και να παραμείνουν αδρανή λόγω του στερεοχημικού απρόσιτου με το DPPH, καθώς δεν έχει καμία ομοιότητα με τις ρίζες υπεροξυλίου, οι οποίες εμπλέκονται στην υπεροξείδωση των λιπιδίων. Το DPPH επίσης, αποχρωματίζεται με αναγωγικά μέσα. Έτσι, η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν βαθμολογείται σωστά από την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αντιδρούν με DPPH.

Η δοκιμή ABTS αντιδρά γρήγορα με αντιοξειδωτικά, συνήθως εντός 30min. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία ευρεία περιοχή pH καθώς και για την μελέτη της επίδρασης του pH στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Επίσης, είναι διαλυτό σε υδατικούς και οργανικούς διαλύτες και δεν επηρεάζεται από την ιοντική ισχύ, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλαπλά μέσα και να εκτιμήσει, τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων εκχυλισμάτων, την αντιοξειδωτική ικανότητα. Θερμοδυναμικά, μια ένωση μπορεί να μειώσει το ABTS αν έχει οξειδοαναγωγικό δυναμικό χαμηλότερο από εκείνο του ABTS (0,68 V). Πολλές φαινολικές ενώσεις έχουν χαμηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής και μπορούν έτσι να αντιδράσει με ABTS. (A.V.Badarinath, K. Mallikarjuna Rao et al., 2010).

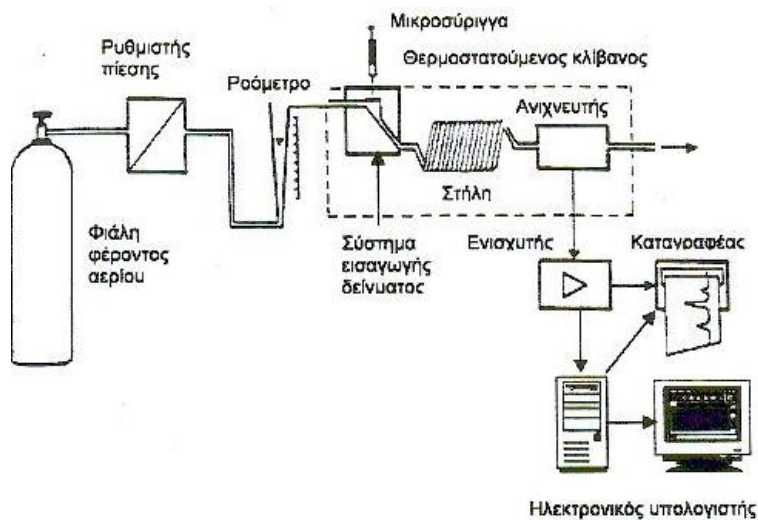
### 1.5 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μαζών (GC-MS)

Μετά τη συλλογή του ελαίου φασκόμηλου, είναι δυνατή η ανάλυση των συστατικών του μέσω διαφόρων αναλυτικών τεχνικών. Ένας τρόπος είναι η διάσπαση και η απομόνωση των συστατικών χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης, ακολουθούμενες από φασματοσκοπικές μεθόδους.

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια από αυτές τις μεθόδους και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη λόγω της υψηλής ευαισθησίας, της απλότητάς της και της ταχύτητάς της στην εκτέλεση. Με αυτήν την τεχνική, επιτυγχάνονται διαχωρισμοί που είναι δύσκολοι, και μερικές φορές αδύνατοι, με άλλες μεθόδους.

Η αέρια χρωματογραφία χωρίζεται σε αέρια-στερεή (GSC), όταν η στατική φάση είναι στερεή, και αέρια-υγρή (GLC), όταν η στατική φάση είναι υγρή σε στερεό φορέα. Στη GLC, ή απλώς αέρια χρωματογραφία (GC), τα συστατικά διαχωρίζονται με βάση την κατανομή τους μεταξύ μιας κινητής φάσης (π.χ. αέριο) και μιας στατικής φάσης στην κολόνα χρωματογραφίας. Κατά τη διέλευσή τους μέσω της στήλης, τα συστατικά εξατμίζονται και αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση. Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις και οι διαφορετικές τάσεις ατμών επιφέρουν διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης για κάθε συστατικό. Αυτός ο χρόνος κατακράτησης χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των συστατικών.

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό, την αναγνώριση και τον προσδιορισμό των συστατικών σε πολύπλοκα δείγματα. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να εξασφαλιστεί ότι τα εξεταζόμενα υλικά είναι πτητικά ή μετατρέψιμα σε πτητικά παράγωγα, όπως στην περίπτωση των λιπαρών ουσιών όπου τα γλυκερίδια μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες (FAME).

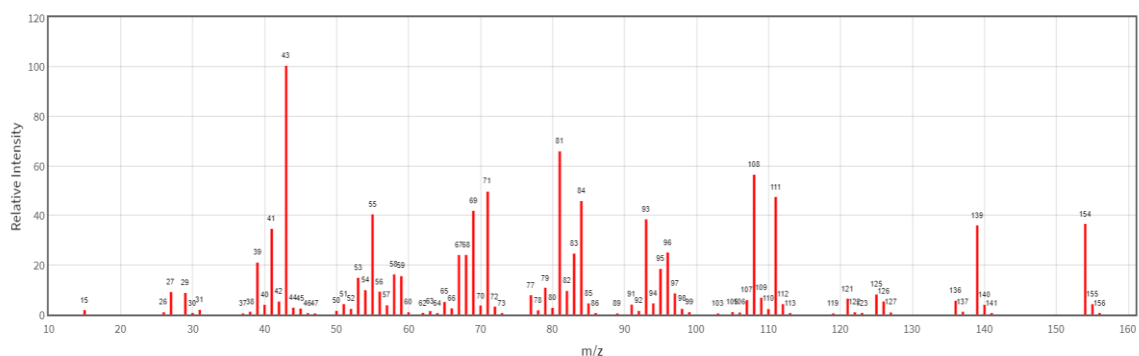


Εικόνα 6 :Οργανολογία Αέριου χρωματογράφου

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, αλλά δεν παρέχει πλήρεις πληροφορίες για την ταυτοποίησή τους. Όταν συνδυαστεί με τη φασματομετρία μάζας (MS), γίνεται δυνατή η πιο αξιόπιστη ταυτοποίηση πολύπλοκων δειγμάτων.

Μετά το διαχωρισμό των συστατικών από τον αέριο χρωματογράφο, το δείγμα εισέρχεται στο φασματόμετρο μάζας σε μορφή αέριας. Εκεί, τα μόρια εκτίθενται σε υψηλή ενέργεια ηλεκτρονίων, προκαλώντας τη δημιουργία ιόντων μικρότερης μάζας. Αυτά τα ιόντα επιταχύνονται υπό την επίδραση ενός μαγνητικού πεδίου και καταγράφονται ανάλογα με το λόγο μάζας/φορτίου ( $m/e$ ). Το ρεύμα που παράγεται καταγράφεται με έναν ανιχνευτή, δημιουργώντας ένα φάσμα μαζών.

Το συνδυασμένο GC-MS είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές, καθώς επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση, την ποσοτική ανάλυση της σύστασης των δειγμάτων και την μέτρηση των συγκεντρώσεων των συστατικών είτε με εσωτερικά είτε με εξωτερικά πρότυπα. Τα βασικά μέρη ενός φασματόμετρου μάζας περιλαμβάνουν το σύστημα εισαγωγής δείγματος, τον θάλαμο παραγωγής ιόντων, τον αναλυτή μαζών, τον ανιχνευτή-συλλέκτη ιόντων και τον ενισχυτή-καταγραφέα-ηλεκτρονικό υπολογιστή.



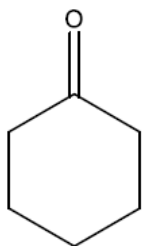
Εικόνα 7 : Φάσμα μάζας ευκαλυπτόλης (Nist Chemistry WebBook)

### 1.5.1 Ποσοτική ανάλυση

Η περιοχή από την κορυφή του χρωματογραφήματος μέχρι την βασική γραμμή αντιστοιχεί στο εμβαδόν της κορυφής το οποίο σχετίζεται με την ποσότητα του αντίστοιχου συστατικού μέσα στα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση γίνεται συνήθως με βάση το % εμβαδόν μιας κορυφής (percentage of total), με την μέθοδο του εξωτερικού προτύπου (external standard) και με την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου (internal standard).

### 1.5.2 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια χημική ουσία που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα στα δείγματα προς ανάλυση. Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι ουσία παρόμοια όχι ταυτόσημη, χημικά με την ουσία ή τις ουσίες που ενδιαφέρουν να προσδιοριστούν. Επίσης η κορυφή η οποία θα εμφανίζει το εσωτερικό πρότυπο δεν πρέπει να εμφανίζεται στον χρόνο που εμφανίζεται κάποια άλλη ουσία ώστε να είναι διακριτή η κορυφή της. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η κυκλοεξανόνη (Εικ. 8) που πληρεί τα παραπάνω κριτήρια ως εσωτερικό πρότυπο, ως προς την δομή με τα μετρούμενα πτητικά συστατικά και επίσης δεν συνεκλύεται με κάποιο άλλο συστατικό των δειγμάτων.



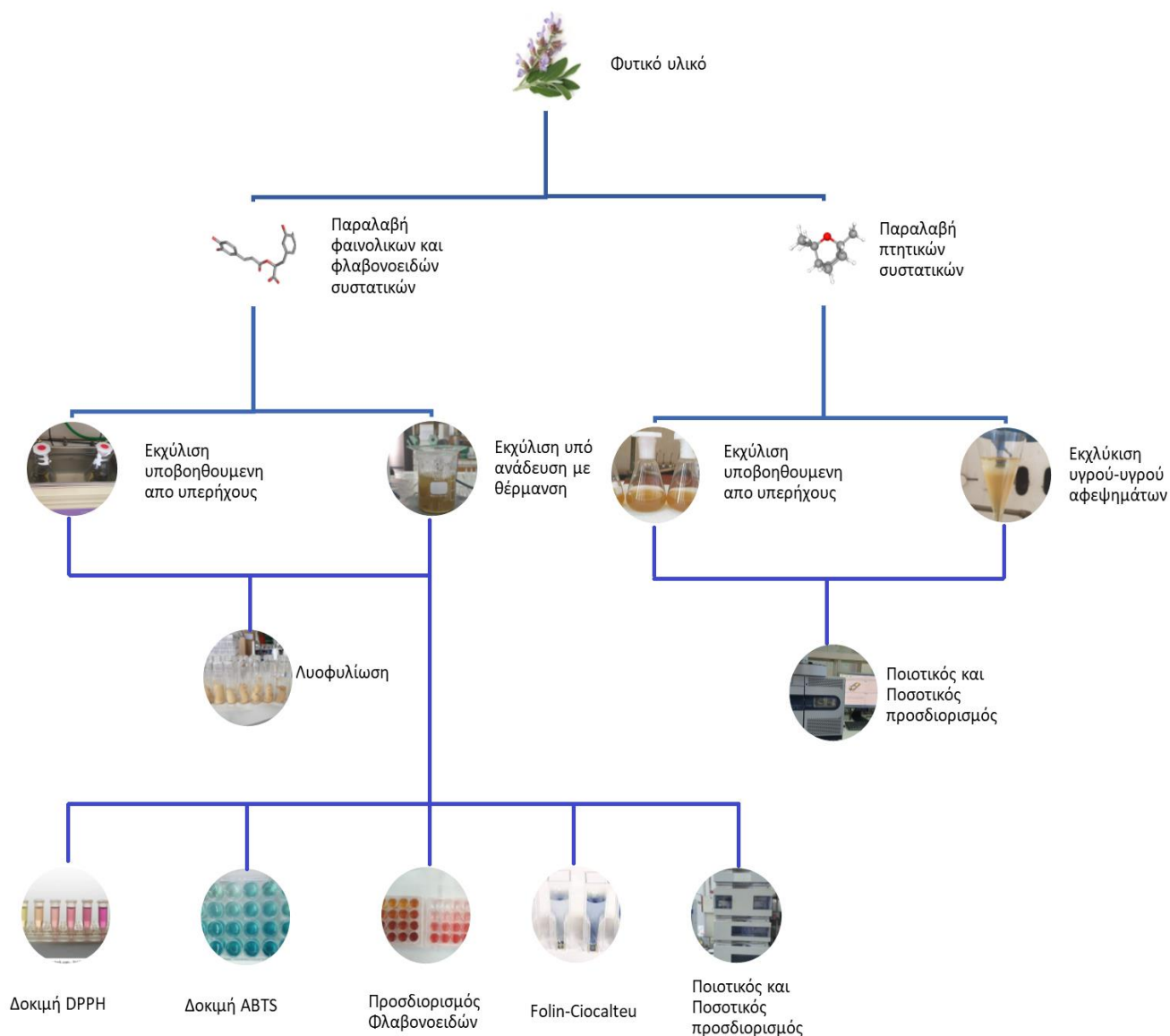
Εικόνα 8 : Δομή κυκλοεξανόνης

## 2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-

### Υλικά και μέθοδοι – Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

#### 2.1 Η Διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την διεκπαιρέωση του πειράματος φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας



## 2.2 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το ελληνικό φασκόμηλο το είδος του οποίου είναι το *Salvia fruticosa*, το οποίο προμηθευτήκαμε από το εργαστήριο Γεωργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συγκεκριμένα τον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Ασσαριωτάκη.

Το φυτικό υλικό αποτελούταν από αποξηραμένα μέρη φασκόμηλου (άνθη, φύλλα και στέλεχος), το οποία κονιορτοποιήθηκαν με mίxer και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος μέχρι να αναλυθούν.

Τα δείγματα αναλύθηκαν ως προς το λάδι τους, τα υδρομεθανολικά και υδατικά (αφεψήματα) τους εκχυλίσματα, άλλα και ως προς τα πτητικά συστατικά που περιέχονται στα αφεψήματα.



Εικόνα 9 : Φυτικό υλικό

## 2.3 Καλλιέργεια φασκόμηλου και μετεωρολογικά δεδομένα

Η καλλιέργεια του προς ανάλυση φασκόμηλου πραγματοποιήθηκε στην περιοχή των Σπάτων το έτος 2019. Το φυτικό υλικό συλλέχτηκε τον Μάιο του ίδιου έτους, ενώ τα φυτά κατά την συλλογή τους βρισκόντουσαν στο στάδιο της πλήρους άνθισης. Τον μήνα της συγκομιδής η μέγιστη θερμοκρασία ήταν 37.0°C, η ελάχιστη θερμοκρασία -18.0 °C, ενώ το μέγιστο ύψος βροχής ήταν 1.40mm (ασθενής <2mm). Τον Απρίλιο η θερμοκρασία κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με τον Μάιο, το μέγιστο ύψος βροχής ήταν 43.61mm στις 06/04/19, ενώ τον υπόλοιπο μήνα ήταν μικρότερο από 0.2 mm (<https://meteosearch.meteo.gr/>).

Η καλλιέργεια έγινε κάτω από διαφορετικές συνθήκες άρδευσης και λίπανσης. Συγκεκριμένα, τα δείγματα φασκόμηλου ήταν 8. Τα 4 εξ' αυτών ήταν αρδευόμενα, ενώ τα άλλα 4 μη αρδευόμενα. Στο καθένα δείγμα από τα 4 της κάθε ομάδας έγινε διαφορετική επέμβαση με λίπανση. Στο πρώτο δεν υπήρξε καμία επέμβαση, στο δεύτερο προστέθηκαν 5

μονάδες αζώτου, στο τρίτο προστέθηκαν 10 μονάδες αζώτου ενώ στο τέταρτο προστέθηκαν 15 μονάδες αζώτου.

## 2.4 Απόδοση

Η απόδοση των υδρομεθανολικών δειγμάτων φασκόμηλου καθώς και των εγχυμάτων σε φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά υπολογίζεται ως η διαφορά του βάρους των περιεκτών των δειγμάτων μετά την λυοφιλίωση πλην το αρχικό τους βάρος ως άδειοι.

## 2.5 Παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών

### 2.5.1 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων – Εκχύλιση υποβοηθούμενη με λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz (USAΕ)

Σε κωνική φιάλη των 100mL προστίθενται 0,5 g κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού καθώς και διάλυμα μεθανόλης / νερού (70 / 30). Στην συνέχεια, γεμίζεται το λουτρό υπερήχων (Grant) με απιονισμένο νερό και ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$  και ο χρόνος εκχύλισης στα 15min. Μετά το πέρας των 15min συλλέγεται το εκχύλισμα και προστίθεται εκ νέου διαλύτης (μεθανόλη / νερό : 70 / 30) για να επαναληφθεί η εκχύλιση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές και χρησιμοποιείται συνολικά 50 ml διαλύτης. Αυτό γίνεται διότι ο διαλύτης έρχεται σε επαφή με το δείγμα και καθίσταται κορεσμένος, ενώ με τις τρεις επαναλήψεις θεωρείται πως παραλαμβάνονται ποσοτικά τα συστατικά τα οποία περιέχονται στο φυτικό υλικό. Εν συνεχεία τα τρία εκχυλίσματα ενώνονται και ακολουθεί διήθηση υπό κενό με φιάλη Büchner με διηθητικό χαρτί Whatman No 1. Στην συνέχεια γίνεται συμπύκνωση με περιστρεφόμενο συμπυκνωτήρα (Rotary evaporator), ώστε να απομακρυνθεί η φάση της μεθανόλης και τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), ούτως ώστε να παγώσουν, αφού θα ακολουθήσει η διαδικασία της λυοφιλίωσης.

Η διαδικασία της εκχύλισης με λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz επαναλαμβάνεται τρεις φορές για το κάθε δείγμα. Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων ήταν της εταιρείας Fisher Chemical και καθαρότητας HPLC grade (99,8%) και το νερό απιονισμένο.



Εικόνα 10 : Λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz

### 2.5.2 Παραλαβή αφεψημάτων – Εκχύλιση με ανάδευση σε θερμοκρασία 70°C

Σε ποτήρι ζέσεως (Pyrex) τοποθετούνται 50ml απιονισμένου νερού με ογκομετρικό κύλινδρο. Το ποτήρι ζέσεως με το νερό τοποθετείται σε μηχανικό αναδευτήρα με θέρμανση και αφήνεται έως ότου το νερό φτάσει σε θερμοκρασία 70°C. Προστίθεται 0,5 g κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού και παραμένει για 10 min. Το αφέψημα υπόκειται ανάδευση για 1 min στην αρχή της εκχύλισης, 1 min μετά από 5 min και 1 min πριν το τέλος της εκχύλισης. Στην συνέχεια το εκχύλισμα αφήνεται σε φυσική διήθηση. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές για το κάθε δείγμα. Το εκχύλισμα συλλέγεται και αφού κρυώσει αποθηκεύεται στην κατάψυξη (-20 °C), ούτως ώστε να παγώσει, αφού θα ακολουθήσει η διαδικασία της λυοφιλίωσης.

### 2.5.3 Λυοφιλίωση

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα και τα αφεψήματα, τοποθετούνται στις ειδικές φιάλες της λυοφιλίωσης (Virtis Freemobile 25EL) οι οποίες πρέπει να διατηρηθούν για λίγες ώρες στην ψύξη, ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας μέσα από τα δείγματα και εν συνέχεια αποθηκεύονται για ένα 24ωρο στην κατάψυξη ώστε να παγώσουν και να είναι έτοιμα για την διαδικασία. Αφού τα δείγματα είναι έτοιμα, ξεκινάει η διαδικασία της λυοφιλίωσης, η οποία διαρκεί δύο 24ωρα. Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, παραλαμβάνονται τα δείγματα αφυδατωμένα και αποθηκεύονται στην κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν.

Τα δείγματα ζυγίζονται πριν και μετά την λυοφιλίωση ώστε να μετρηθεί η απόδοση σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 2.3.



Εικόνα 11 : Συσκευή λυοφιλίωσης

#### 2.5.4 Παραλαβή πτητικών συστατικών

Σε κωνική φιάλη των 100mL προστίθενται 2,5 g κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού καθώς και οργανικός διαλύτης (διαιθυλαιθέρας). Στην συνέχεια, γεμίζεται το λουτρό υπερήχων (Grant) με απιονισμένο νερό και ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  και ο χρόνος εκχύλισης στα 15 min. Μετά το πέρας των 15 min συλλέγεται το εκχύλισμα και διηθείται, ενώ προστίθεται εκ νέου διαλύτης για να επαναληφθεί η εκχύλιση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές και χρησιμοποιείται συνολικά 50 ml διαλύτης. Το κάθε εκχύλισμα, όπως αναφέρεται παραπάνω διηθείται υπό κενό με φιάλη Büchner με διηθητικό χαρτί Whatman No 1. Το διήθημα συλλέγεται και ακολουθεί συμπύκνωση με αέριο άζωτο μέχρι τα 5 ml. Τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν.

Η διαδικασία της εκχύλισης με λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz επαναλαμβάνεται τρεις φορές για το κάθε δείγμα. Η διαιθυλαιθέρας που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των πτητικών συστατικών ήταν της εταιρείας VMR και καθαρότητας HPLC grade (99,9%) και περιεκτικότητα σε BHT (5 ppm).

#### 2.5.5 Παραλαβή πτητικών συστατικών των αφεψημάτων με Εκχύλιση Υγρού-Υγρού

Η παραλαβή των αφεψημάτων γίνεται όπως έχει περιγραφθεί στην ενότητα 2.4.2. Τα εκχυλίσματα αντί να λυοφιλιωποιηθούν, εκχυλίζονται εκ νέου με οργανικό διαλύτη ούτως ώστε να παραληφθούν τα πτητικά συστατικά που περιέχονται σε αυτά. Αυτό γίνεται με την διεξαγωγή της εκχύλιση υγρού-υγρού. Σε μία διαχωριστική χοάνη προστίθενται τα 50 ml αφεψήματος και ο διαλύτης, καθώς και 10mL κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου για την αποφυγή σχηματισμού γαλακτώματος. Το μείγμα αναδεύεται και αφού διαχωριστούν οι φάσεις μαζεύεται η οργανική φάση και η υδατική φάση. Η υδατική φάση εκχυλίζεται εκ νέου. Συνολικά χρησιμοποιείται συνολικά 50 ml διαλύτης, ο οποίος χωρίζεται σε τρία μέρη και η εκχύλιση πραγματοποιείται τρεις φορές έτσι ώστε να εκχυλιστεί όσο το

δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα πτητικών συστατικών. Μετά τον διαχωρισμό η οργανική φάση μεταφέρεται σε μια κωνική φιάλη, όπου ακολουθεί συμπύκνωση με αέριο άζωτο μέχρι τα 5 ml. Τέλος, τα έλαια αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε γυάλινο φιαλίδιο έως ότου αναλυθούν.

Ο διαιθυλαιθέρας που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των πτητικών συστατικών ήταν της εταιρείας VMR και καθαρότητας HPLC grade (99,9%) και περιεκτικότητα σε BHT (5 ppm).

## 2.6 Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης

Η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων των φασκόμηλων μελετήθηκε με τις παρακάτω 2 δοκιμές οι οποίες έχουν αναλυθεί εκτενέστερα στα κεφάλαια 2.5.1 και 2.5.2.

### 2.6.1 Δοκιμή DPPH

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα DPPH 0.1mM. Ζυγίζονται 4mg DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ALDRICH Chemistry) και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100mL προσθέτοντας μέχρι την χαραγή μεθανόλη.

Στην συνέχεια παρασκευάζονται τα προς μέτρηση διαλύματα καθώς και το τυφλό διάλυμα. Για τα λυοφιλιωποιημένα δείγματα παρασκευάζεται ένα stock διάλυμα 3.0mg/ml, από το οποίο παρασκευάζονται διαδοχικά άλλες 5 συγκεντρώσεις (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/ml), ενώ στα μη λυοφιλιωποιημένα δείγματα πραγματοποιείται αραιώση ¼. Στα μεν υδρομεθανολικά δείγματα ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70:30 (v/v), ενώ στα εγχύματα χρησιμοποιείται σκέτο νερό. Χρησιμοποιούνται 30 μL από τα δείγματα καθώς και 3ml διαλύματος DPPH. Στο τυφλό διάλυμα αντί δείγματος προστίθεται διαλύτης. Εν συνεχεία, αφού γίνει ανάδευση με Vortex, τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 30min ώστε να δράσει το DPPH και τέλος φωτομετρούνται. Το όργανο φωτομέτρησης μηδενίζεται με τον αντίστοιχο διαλυτή που χρησιμοποιήθηκε και η μέτρηση γίνεται στα 517nm. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis VMR V-1200. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν.

Χρησιμοποιήθηκε σκόνη DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) της Sigma-Aldrich. Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Fischer chemicals, καθαρότητας HPLC grade (99,8%).

#### 2.6.1.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης

Τα αποτελέσματα των λυοφιλιωμένων δειγμάτων εκφράζονται με ποσοστό IC50, δηλαδή πόση συγκεκριμένη ανασταλτική ουσία χρειάζεται για να ανασταλεί, in vitro, η οξειδωση του DPPH κατά 50%.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μη λυοφιλιωμένων δειγμάτων υπολογίζεται με μία τυποποιημένη καμπύλη η οποία κατασκευάζεται μετρώντας τις απορροφήσεις διαλυμάτων Trolox διάφορων συγκεντρώσεων. Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάζονται διαλύματα Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) γνωστών συγκεντρώσεων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.2mM έως 1.8mM. Στα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων Trolox ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mM ισοδύναμων Trolox ανά mL δείγματος, για αυτόν τον λόγο χρειάζεται η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\% DA = (A_0 - A/A_0) * 100$$

όπου % DA = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας DPPH,  $A_0$  = η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος και A= η απορρόφηση του δείγματος μετά από 30min δράσης του DPPH.

#### 2.6.2 Δοκιμή ABTS

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα ABTS 7mM. Ζυγίζονται 38.4mg ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt, Sigma Life Science, καθαρότητας  $\geq 98\%$ ] και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL, συμπληρώνοντας μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Στην συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα υπερθειϊκού καλίου 2.45mM. Ζυγίζονται 6.62mg υπερθειϊκό κάλιο (Potassium peroxodisulfate GR for analysis, Merck) και διαλύονται σε 10mL απιονισμένο νερό. Εν συνεχεία, προστίθενται 440μL υπερθειϊκού καλίου στο διάλυμα του ABTS και προκύπτει το κατιόν  $ABTS^+$ . Η οξειδωση του ABTS αρχίζει αμέσως, αλλά σταθεροποιείται μετά από 12h, έτσι αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και διατηρείται για 18h. Την επόμενη μέρα το διάλυμα αραιώνεται με αιθανόλη μέχρις ότου η απορρόφηση λάβει τη τιμή 0,700 ( $\pm 0,20$ ) στα 734nm.

Έπειτα, παρασκευάζονται τα προς μέτρηση διαλύματα καθώς και το τυφλό διάλυμα. Για τα λυοφιλιωποιημένα δείγματα παρασκευάζεται ένα stock διάλυμα 2.0mg/ml, από το οποίο παρασκευάζονται διαδοχικά άλλες 5 συγκεντρώσεις (0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 mg/ml), ενώ στα μη λυοφιλιωποιημένα δείγματα πραγματοποιείται αραιώση ¼. Στα μεν υδρομεθανολικά

δείγματα ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70:30 (v/v), ενώ στα εγχύματα χρησιμοποιείται σκέτο νερό. Χρησιμοποιήθηκαν 30 mL από τα δείγματα καθώς και 3ml διαλύματος ABTS<sup>+</sup>. Στο τυφλό διάλυμα το δείγματος τα αντικαθίστουνται με διαλύτη των αντίστοιχο διαλύτη. Εν συνεχεία, αφού γίνει ανάδευση με Vortex, αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 6min ώστε να δράσει το ABTS και τέλος φωτομετρούνται. Το όργανο φωτομέτρησης (Εικ. 13) μηδενίζεται με τον διαλυτή που χρησιμοποιήθηκε και η μέτρηση γίνεται στα 734nm.

Χρησιμοποιήθηκε σκόνη ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, diammonium salt) καθαρότητας 98%, από την εταιρεία Alfa Aesar και Trolox ((S)-6-Methoxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid). Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Fischer chemicals, καθαρότητας HPLC grade (99,8%).

#### 2.6.2.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης

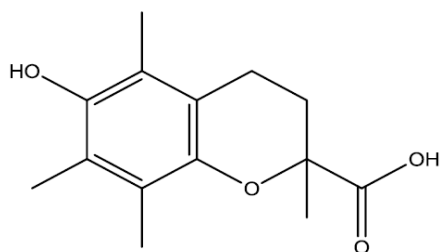
Τα αποτελέσματα των λυοφιλιωμένων δειγμάτων εκφράζονται με ποσοστό IC50, δηλαδή πόση συγκεκριμένη ανασταλτική ουσία χρειάζεται για να ανασταλεί, in vitro, η οξείδωση του ABTS<sup>+</sup> κατά 50%.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μη λυοφιλιωμένων δειγμάτων υπολογίζεται με μία τυποποιημένη καμπύλη η οποία κατασκευάστηκε μετρώντας τις απορροφήσεις διαλυμάτων Trolox διάφορων συγκεντρώσεων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο...

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mM ισοδύναμων Trolox ανά mL δείγματος, για αυτόν τον λόγο χρειάζεται η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\% DA = (A_0 - A / A_0) * 100$$

όπου % DA = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας ABTS<sup>+</sup>, A<sub>0</sub> = η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος και A= η απορρόφηση του δείγματος μετά από 30min δράσης του DPPH.



Εικόνα 12 : Δομή Trolox





Εικόνα 13 : Το φωτόμετρο UV που χρησιμοποιήθηκε

## 2.7 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχικά, για την ανάλυση παρασκευάζονται τα προς ανάλυση δείγματα, όπου για τα μεν λυοφιλοποιημένα παρασκευάζονται διαλύματα 2mg/ml στον αντίστοιχο διαλύτη τον οποίο έχουν εκχυλισθεί, ενώ για τα μη λυοφιλοποιημένα γίνεται αραιώση  $\frac{1}{4}$ . Στην συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20% (w/v). Σε μία φιάλη των 100 mL προστίθενται 20g ανθρακικού νατρίου σε νερό. Κατά την διαδικασία, αρχικά αναμιγνύονται 1.5 ml απεσταγμένο νερό, 25  $\mu\text{L}$  δείγματος, 125  $\mu\text{L}$  Folin και αναδεύονται στο vortex. Αφού αφήθούν για 3 λεπτά προσθέτονται 375  $\mu\text{L}$  ανθρακικού νατρίου και 475  $\mu\text{L}$  απεσταγμένο, ενώ αναδεύονται ξανά στο vortex. Αφήνονται να επωαστούν σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Για το τυφλό ακολουθείται η ίδια διαδικασία αλλά αντί για 25  $\mu\text{L}$  δείγματος, βάζουμε 25  $\mu\text{L}$  διαλύτη. Η απορρόφηση μετρείται σε φασματοφωτόμετρο στα 725 nm. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis VMR V-1200. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν.

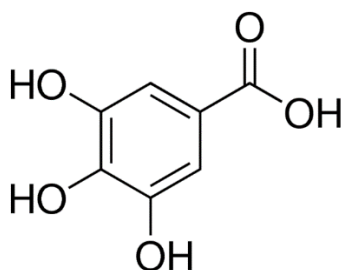
Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu, γαλλικό οξύ και ανθρακικό νάτριο καθαρότητας  $\geq 99,0\%$  από την Sigma-Aldrich και μεθανόλη της εταιρείας Fischer chemicals, καθαρότητας HPLC grade (99,8%).

### 2.7.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων υπολογίζεται με μία τυποποιημένη καμπύλη η οποία κατασκευάζεται μετρώντας τις απορροφήσεις διαλυμάτων γαλλικού οξέος διάφορων συγκεντρώσεων. Το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.1mg/ml έως 0.7mg/ml. Στα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα.



Η περιεκτικότητα του κάθε δείγματος σε ολικές φαινολικές ενώσεις εκφράζεται ως ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE).



Εικόνα 14 : Δομή Γαλλικού οξέος

## 2.8 Εκτίμηση του ολικού Φλαβονοειδούς περιεχομένου με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου

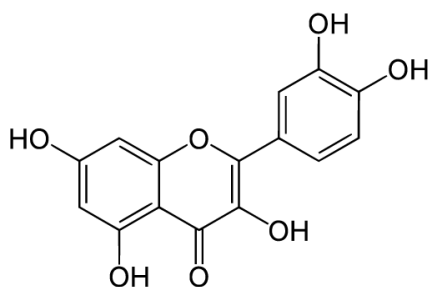
Αρχικά, για την ανάλυση παρασκευάζονται τα προς ανάλυση δείγματα, όπου για τα μεν λυοφιλοποιημένα παρασκευάζονται διαλύματα 1mg/ml στον αντίστοιχο διαλύτη τον οποίο έχουν εκχυλισθεί, ενώ για τα μη λυοφιλοποιημένα γίνεται αραίωση ¼. Συνολικά 250 ml του κατάλληλα αραιωμένου δείγματος αναμιγνύονται με 75ml ενός διαλύματος 5% NaNO<sub>2</sub> (νιτρώδες νάτριο). Μετά από 6 λεπτά αναμονής, 150ml ενός διαλύματος 10% χλωριούχου αργιλίου (AlCl<sub>3</sub>) και 500ml NaOH (1M) προστίθενται στο μίγμα. Τέλος, ρυθμίζεται ο τελικός όγκος του μίγματος σε 2,5ml με απεσταγμένο νερό. Το τυφλό διάλυμα παρασκευάζεται όπως τα δείγματά αλλά αντί για δείγμα προστίθεται διαλύτης. Η απορρόφηση έναντι του τυφλού διαβάζεται στα 510nm. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis VMR V-1200. Ελήφθησαν τριπλές μετρήσεις για όλα τα δείγματα.

Χρησιμοποιήθηκαν AlCl<sub>3</sub> της εταιρείας Merck, NaNO<sub>2</sub> της εταιρείας Panreac, NaOH από την BHD και μεθανόλη της εταιρείας Fischer chemicals, καθαρότητας HPLC grade (99,8%).

### 2.8.1 Έκφραση αποτελεσμάτων - Κατασκευή καμπύλης

Το συνολικά περιεχόμενο φλαβονοειδών συστατικών των δειγμάτων φασκόμηλου υπολογίζεται με μία τυποποιημένη καμπύλη η οποία κατασκευάζεται μετρώντας τις απορροφήσεις διαλυμάτων κερκετίνης διάφορων συγκεντρώσεων. Το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 1mg/ml έως 5mg/ml. Στα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων κερκετίνης ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα.

Η περιεκτικότητα του κάθε δείγματος σε ολικές φλαβονοειδείς ενώσεις εκφράζεται ως χλιοστόγραμμα ισοδυνάμων κερκετίνης ανά γραμμάριο ξηράς ουσίας (mg QE/g DM) μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης.



Εικόνα 15 :Δομή Κερκετίνης

## 2.9 Μελέτη Χημικής Σύστασης

2.9.1 Χρωματογραφική μελέτη με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματοόμετρο μαζών (GC-MS)

2.9.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων

- Παρασκευή πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης

Η κυκλοεξανόνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτική ανάλυση των συστατικών των παρασκευασθέντων εκχυλισμάτων.

Παρασκευάστηκε stock διάλυμα κυκλοεξανόνης 1000ppm (0,947mg/ml), το οποίο περιείχε 5μL κυκλοεξανόνης και 5mL διαιθυλεθέρα (καθαρότητας 99,9 %, της εταιρείας VMR).

- Παρασκευή δειγμάτων αιθερικών εκχυλισμάτων

Επειδή τα δείγματα είναι πυκνά ακολουθεί αραιώση (δείγμα : διαιθυλαιθέρα 1:10 (v/v)). Σε φιαλίδιο προστίθενται 900μL διαιθυλαιθέρα (καθαρότητας 99,9 %), 100μL δείγματος καθώς και 10μL πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης.

Από την κάθε επανάληψη της κάθε εκχύλισης λαμβάνονται 100μL έτσι ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα το οποίο θα αναλυθεί στην αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών.

- Παρασκευή δειγμάτων πτητικών συστατικών αφεψήματος

Σε vial προστίθενται 1000μL δείγματος καθώς και 10μL πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης.

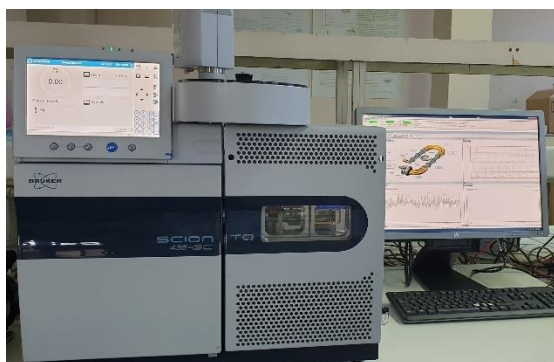
Από την κάθε επανάληψη της κάθε εκχύλισης λαμβάνονται 1000μL έτσι ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα το οποίο θα αναλυθεί στην αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών.



Εικόνα 16 : Προς ανάλυση δείγματα πτητικών συστατικών φασκόμηλου

#### 2.9.1.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων φασκόμηλου

Για τον διαχωρισμό των συστατικών των παραληφθέντων πτητικών συστατικών των δειγμάτων φασκόμηλου εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, ενώ για την ταυτοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία μαζών. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (SCION) συζευγμένος με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών και αυτόματο δειγματολήπτη (CP-8400), της εταιρείας Brucker. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Rxi – 5Sil ms cap (30m x 0,25 mm, ID, πάχος φιλμ 0,25 μm), ενώ το φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1mL/min σε σταθερή πίεση. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 220°C και στη γραμμή διαβίβασης του ανιχνευτή (MS transfer line)-πηγή ιονισμού ήταν 230°C. Η πηγή λειτούργησε με ηλεκτρική τάση 70 eV. Το πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο είχε διάρκεια 73,33 min, περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία αρχικά ήταν στους 60°C και τελικά αυξανόταν βαθμιαία μέχρι τους 250°C με ρυθμό 3°C/min. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ήταν 1μL. Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών έγινε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μαζών με αυτών των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών NIST που υπάρχουν στο λογισμικό του οργάνου, με δεδομένα της βιβλιογραφίας καθώς και με σύγκριση με την βιβλιοθήκη Adams, 4th Edition. Στην συγκεκριμένη μελέτη ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με σύγκριση του εμβαδού της πρότυπης ουσίας που προστέθηκε στο προς ανάλυση διάλυμα, με το εμβαδό των προσδιορισθέντων συστατικών.



Εικόνα 17 : Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματόμετρο μαζών (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε

## 2.9.2 Χρωματογραφική μελέτη με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD) και φασματόμετρο μαζών (LC-DAD & LC-DAD-MS)

Για την ποιοτική και η ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου, χρησιμοποιήθηκε ένα προηγμένο σύστημα ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων, συνδυασμένο με φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS) από την εταιρεία SHIMADZU. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε επαρκή ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωση να ήταν 1 mg/mL, και εισήχθησαν στο σύστημα με όγκο ένεσης 20μL. Το σύστημα περιελάμβανε αντλία LC-10ADnr, απαερωτή DGU-14A, βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών FCV-10ALnr, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr, φούρνο στήλης CTO-10Anr, ανιχνευτή SPD-M10Anr, ανιχνευτή Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (DAD), καθώς και φασματογράφο μάζας LC-MS 2010A και λογισμικό LCMS solution 3.40.307. Το μήκος κύματος λειτουργίας ήταν 330nm. Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στη λειτουργία αρνητικού ιονισμού.

Ως στατική φάση, χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης, Supelco Discovery HS C18, μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και με μεγέθους σωματιδίων 5 μm. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις σε μεθανόλη για HPLC, αφού προηγήθηκε διήθηση με φίλτρα. Ποσότητα 20 μL εισήχθη στον αυτόματο δειγματολήπτη. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,4 mL/λεπτό ενώ η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30°C. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανεστραμμένης φάσης και γι' αυτόν τον λόγο συνδυάστηκαν δύο διαλύτες. Πιο συγκεκριμένα, οι διαλύτες που αποτέλεσαν την κινητή φάση ήταν Α το νερό οξινισμένο με φορμικό οξύ (0,25%) και Β η μεθανόλη. Η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ήταν 350°C. Το εύρος για το κλάσμα m/z ορίστηκε μεταξύ 50-1000 για τον αρνητικό ιονισμό. Πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλυση διαλυτών προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των προς ανάλυση συστατικών, με πρόγραμμα ανάλυσης το παρακάτω.

Πίνακας 3 : Πρόγραμμα ανάλυσης εκχυλισμάτων φασκόμηλου

T (min)	% B	% C
0	25	75
2	25	75
40	90	10
75	90	10
80	25	75
90	25	75

### 3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

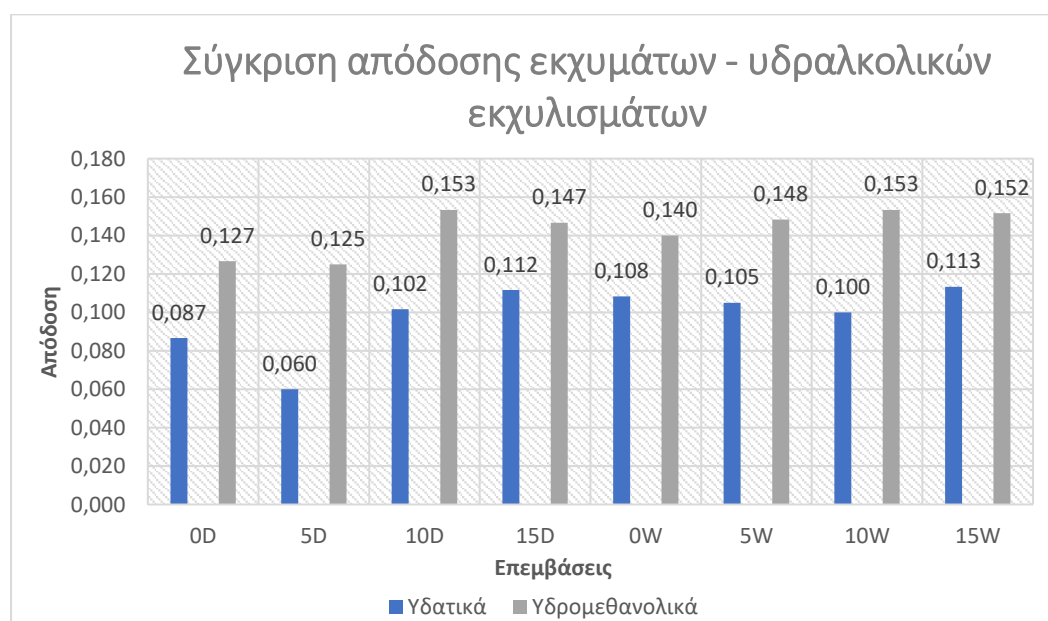
#### 3.1 Απόδοση

Όπως αναφέρθηκε μετρήθηκε η απόδοση σε δευτερογενείς μεταβολίτες στα υδατικά και υδρομεθανολικά εκχυλίσματα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε πίνακα.

Πίνακας 4 : Απόδοση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου (INF: εγχύματα, USE : υδρομεθανολικά εκχυλίσματα)

Επέμβαση	Απόδοση (gr)/0.5gr φυτικού υλικού	
0D-INF	0.087	± 0.006
5D-INF	0.060	± 0.008
10D-INF	0.102	± 0.002
15D-INF	0.112	± 0.006
0W-INF	0.108	± 0.006
5W-INF	0.105	± 0.005
10W-INF	0.100	± 0.011
15W-INF	0.113	± 0.009
0D-USE	0.127	± 0.015
5D-USE	0.125	± 0.032
10D-USE	0.153	± 0.005
15D-USE	0.147	± 0.005
0W-USE	0.140	± 0.008
5W-USE	0.148	± 0.008
10W-USE	0.153	± 0.005
15W-USE	0.152	± 0.002

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε το παρακάτω ραβδόγραμμα.



Γράφημα 1 : Σύγκριση απόδοσης εκχυμάτων - υδραλκολικών εκχυλισμάτων

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η απόδοση δευτερογενών μεταβολιτών σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα εκχύματα. Επιπλέον, φαίνεται ότι η απόδοση μεταξύ των αρδευόμενων και μη δειγμάτων δεν αλλάζει όταν εφαρμόζεται υψηλή ποσότητα λίπανσης, ενώ υπάρχει μια τάση ελάττωσης της απόδοσης σε συνθήκες μειωμένης λίπανσης και λειψανδρίας.

Σύμφωνα με τους Filiz et al., 2023, η λίπανση αύξησε την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο κατά 6,9% έως 17,1% σε σύγκριση με το τυφλό δείγμα. Η διαθεσιμότητα μεταλλικών στοιχείων κατά της διάρκειας της καλλιέργειας των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών φαίνεται να βελτιώνει πολλές μεταβολικές διαδικασίες κατά τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Janmohammadi et al., 2014). Καθώς τα αιθέρια έλαια είναι τερπένια, η βιοσύνθεση τους απαιτεί την ύπαρξη ATP και NADPH. Στοιχεία όπως το άζωτο και ο φωσφόρος είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των παραπάνω, οπότε τα καθιστούν διαθέσιμα στο φυτό ούτως ώστε να αυξήσουν το περιεχόμενο τους σε αιθέρια ελαία (Esmailpour et al., 2017). Ο Khalid και ο Hussein (2012) ανέφεραν ότι τα οργανικά λιπάσματα αυξάνουν το περιεχόμενο των αιθερίων ελαίων του φυτού, βελτιώνοντας τις μεταβολικές και ενζυμικές αντιδράσεις.

Σύμφωνα με τους Vieira et al., το 2020, το ποσοστό εξαγωγής ελαίου της *Salvia officinalis* ήταν σημαντικά υψηλότερο χρησιμοποιώντας ως διαλύτη υδροαιθανολικό διάλυμα ( $24.2 \pm 5.3\%$ ), σε σχέση με το νερό ( $15.3 \pm 0.3\%$ ).

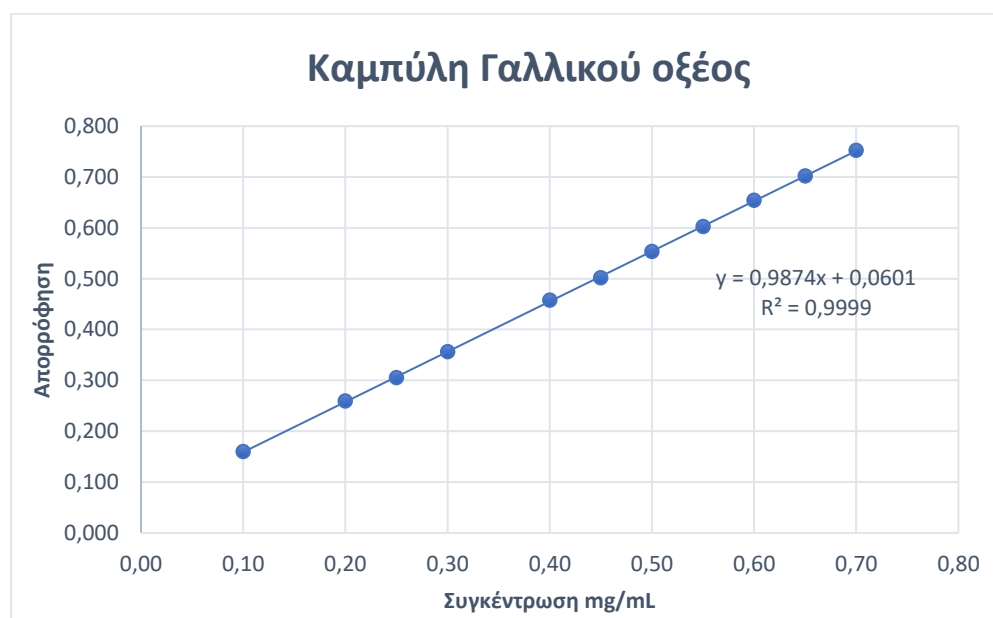
Σύμφωνα με τους Najmeh Vosoughi et al., το 2018, η φυλλική εφαρμογή χιτοζάνης μείωσε τις αρνητικές επιπτώσεις της μειωμένης άρδευσης στην απόδοση του αιθέριου ελαίου και βελτίωσε το περιεχόμενο του αιθέριου ελαίου. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς βλέπουμε πως σε μηδενικά έως χαμηλά επίπεδα λίπανσης η απόδοση είναι μικρότερη σε μη αρδευόμενες καλλιέργειες, με αύξηση της λίπανσης η απόδοση είναι σχεδόν ίδια σε αρδευόμενες και μη καλλιέργειες.

Οι Govahi et al., το 2015, παρατήρησαν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα αιθέριου ελαίου εξάχθηκε από φυτά που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες μέτριας ξηρασίας. Η αύξηση της συγκέντρωσης αιθερίων ελαίων υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι τα φυτά παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις τερπενίων κάτω από αυτές τις συνθήκες λόγω της χαμηλής κατανομής άνθρακα στην ανάπτυξη, υποδηλώνοντας μια αντιστάθμιση μεταξύ ανάπτυξης και άμυνας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου επηρεάστηκε σημαντικά από τα συστήματα λίπανσης. Έτσι, το vermicompost, παρέχοντας περισσότερο διαθέσιμα τα φώσφορο και άζωτο, αύξησε την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο. Οι N.B. Rioba et al., το

2015 παρατήρησαν ότι η συχνότητα άρδευσης δεν επηρέασε την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο στο φασκόμηλο. Επιπλέον, οι Baghalian et al., το 2011 έδειξαν ότι το στρες λόγω ξηρασίας δεν είχε σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο σε γερμανικό χαμομήλι.

### 3.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του ολικών φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων φασκόμηλου έγινε με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu και εκφράστηκε ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος/mg ξηρού φυτικού υλικού (GAE mg<sup>-1</sup>). Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 2 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

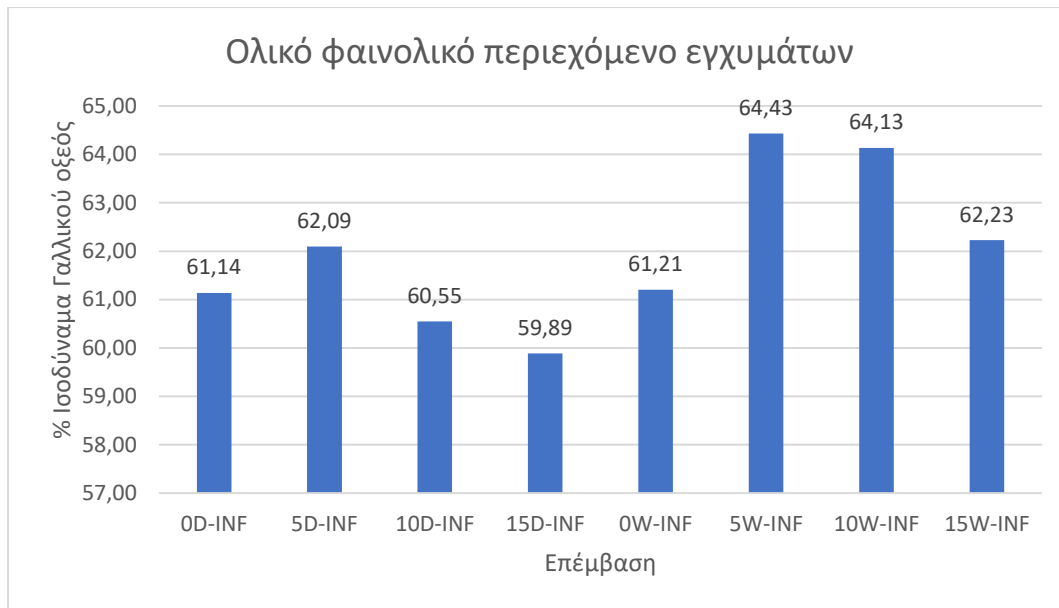
Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα λυοφιλιωμένων και μη λυοφιλιωμένων δειγμάτων (D:dry, W:water, un:unlyophilized, numbers: quantity of N)

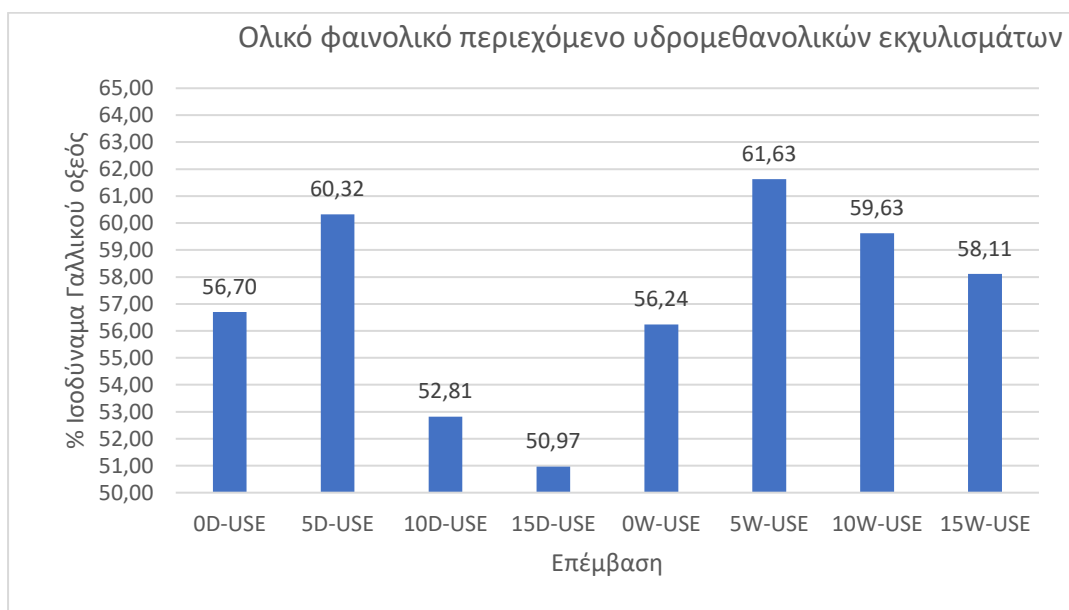
Επέμβαση	Μ.Ο. Απορρόφησης (765 nm)		% Ισοδύναμα γαλλικού οξέος
<b>0D-INF</b>	0,558	± 0,02	61,14
<b>5D-INF</b>	0,568	± 0,04	62,09
<b>10D-INF</b>	0,552	± 0,03	60,55
<b>15D-INF</b>	0,546	± 0,05	59,89
<b>0W-INF</b>	0,559	± 0,03	61,21
<b>5W-INF</b>	0,592	± 0,03	64,43
<b>10W-INF</b>	0,589	± 0,04	64,13
<b>15W-INF</b>	0,569	± 0,06	62,23
<b>0D-USE</b>	0,513	± 0,06	56,70
<b>5D-USE</b>	0,474	± 0,02	60,32
<b>10D-USE</b>	0,563	± 0,02	52,81
<b>15D-USE</b>	0,455	± 0,02	50,97
<b>0W-USE</b>	0,509	± 0,04	56,24
<b>5W-USE</b>	0,550	± 0,03	61,63
<b>10W-USE</b>	0,543	± 0,02	59,63
<b>15W-USE</b>	0,528	± 0,05	58,11
<b>0D-INF_un</b>	0,170	± 0,02	91,18
<b>5D-INF_un</b>	0,177	± 0,01	94,08
<b>10D-INF_un</b>	0,184	± 0,01	96,84
<b>15D-INF_un</b>	0,178	± 0,00	94,47
<b>0W-INF_un</b>	0,189	± 0,00	98,49
<b>5W-INF_un</b>	0,193	± 0,01	100,14
<b>10W-INF_un</b>	0,180	± 0,00	95,13
<b>15W-INF_un</b>	0,176	± 0,00	93,68

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν τα παρακάτω γραφήματα σύμφωνα με τα επί τις εκατό ποσοστά των ισοδύναμων γαλλικού οξέος.

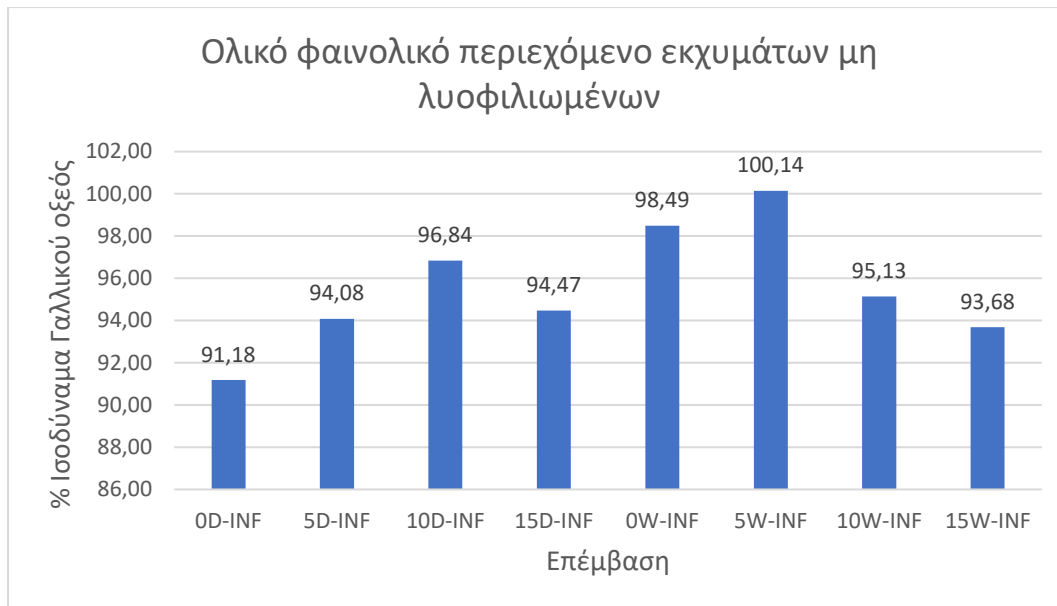




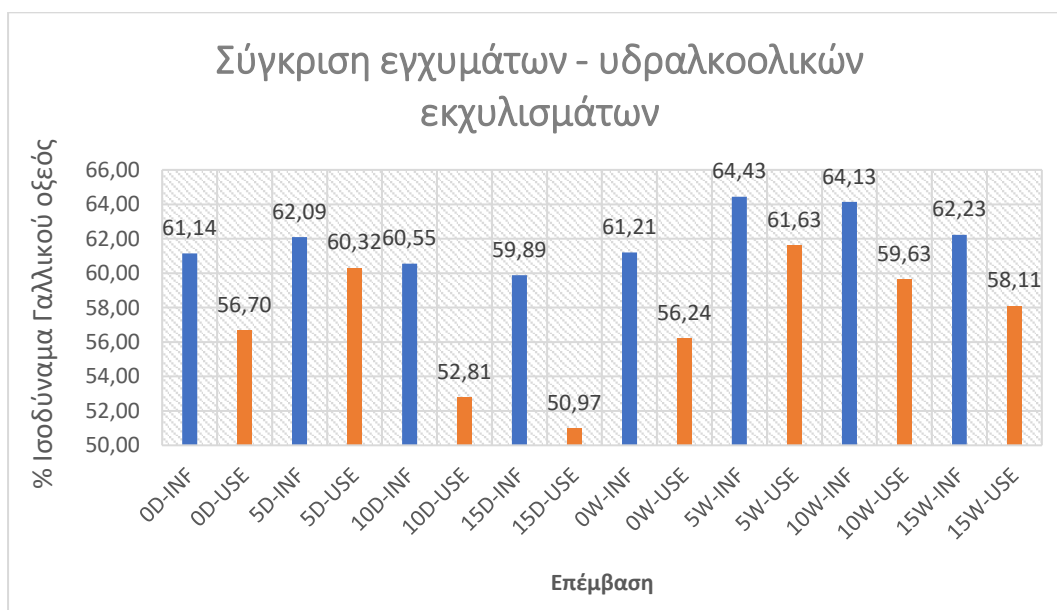
Γράφημα 2 : Ολικό φαινολικό περιεχόμενο λυοφιλιωμένων εγχυμάτων



Γράφημα 3 : Ολικό φαινολικό περιεχόμενο λυοφιλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων



Γράφημα 4 : Ολικό φαινολικό περιεχόμενο μη λυοφιλιωμένων εκχυμάτων



Γράφημα 5 : Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου λυοφιλιωμένων εκχυμάτων - υδραλκοολικών εκχυλισμάτων

Από τα ραβδογράμματα συμπεραίνουμε ότι τα φασκόμηλα τα οποία κατά την καλλιέργειά τους αρδευόντουσαν έχουν μεγαλύτερο ποσοστό σε ολικά φαινολικά σε σχέση με τα μη αρδευόμενα. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι μικρή αύξηση στην ποσότητα λίπανσης δίνει καλύτερα αποτελέσματα ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

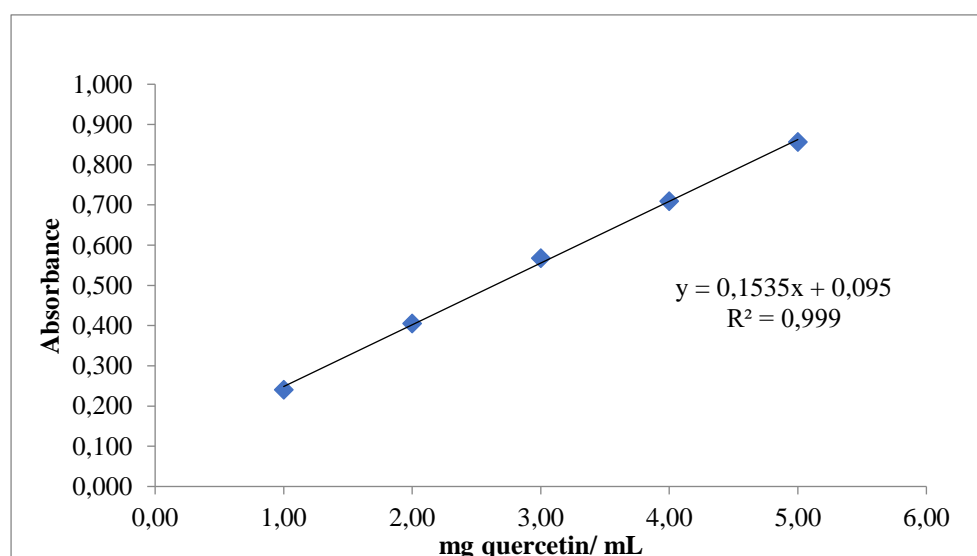
Τέλος, τα εκχύματα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα αντίστοιχα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα. Οι Natália Martins et al., το 2015

παρατήρησαν ότι τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή), σε σχέση με τα εκχυλίσματα μεθανόλης/νερού.

Οι Mohammadi-Cheraghabadi et al., το 2021 συμπέραναν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά (TPC) αυξήθηκε σημαντικά υπό το καθεστώς άρδευσης με εφαρμογή απεσταγμένου νερού την άνοιξη. Η TPC παρουσίασε αυξητική τάση με αυξήσεις στη συγκέντρωση λίπανσης σε όλα τα καθεστώτα άρδευσης τόσο την άνοιξη όσο και το καλοκαίρι.

### 3.3 Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο

Ο προσδιορισμός του ολικού φλαβονοειδούς περιεχομένου των δειγμάτων φασκόμηλου έγινε με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου και εκφράστηκε ως ισοδύναμα κερκετίνης/mg ξηρού φυτικού υλικού. Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω.



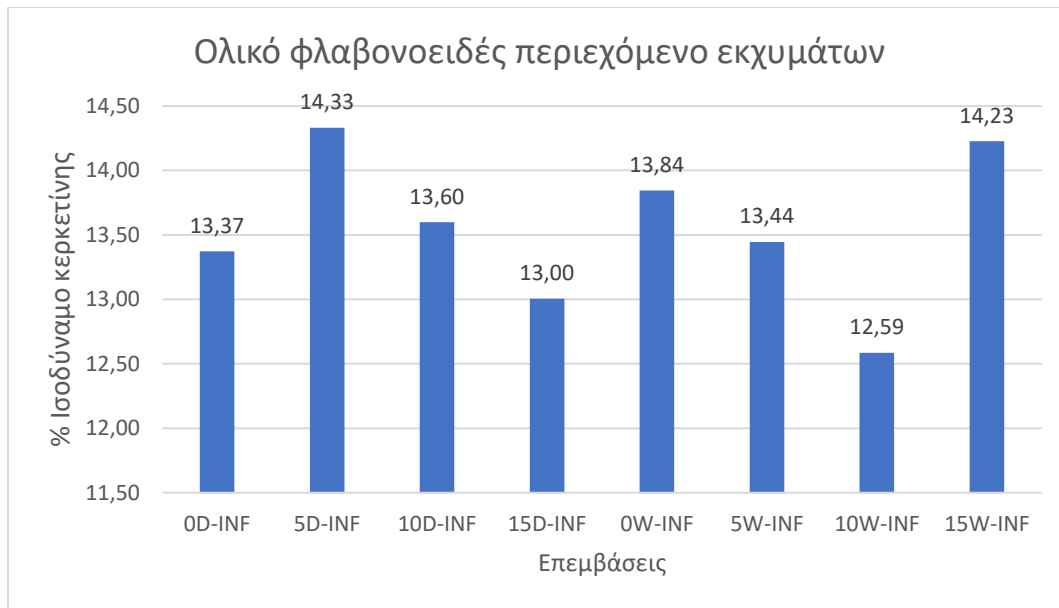
Διάγραμμα 3 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κερκετίνης

Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

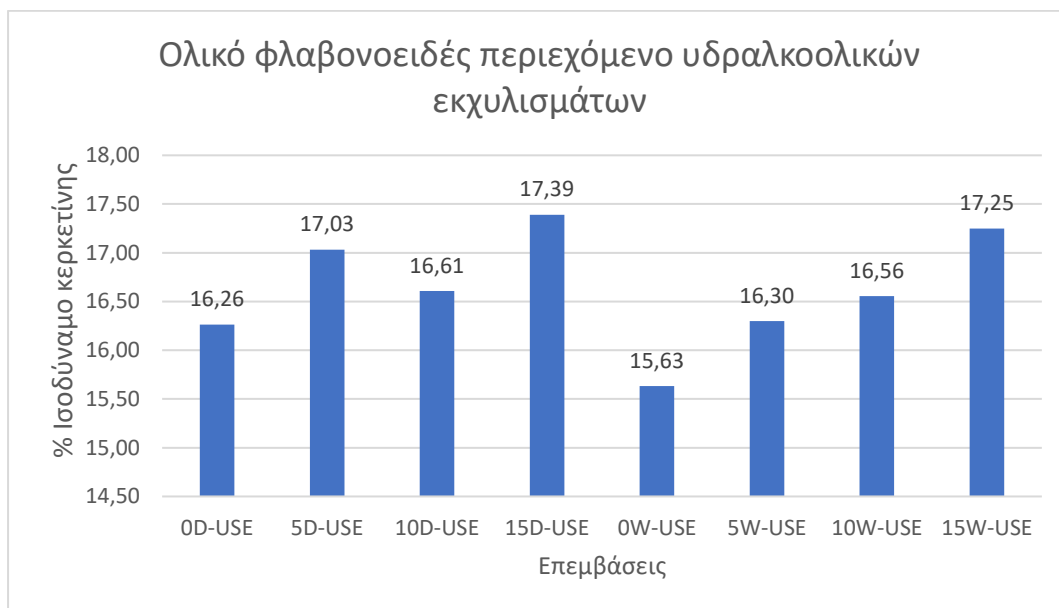
Πίνακας 6 : Αποτελέσματα λυοφιλωμένων και μη λυοφιλωμένων δειγμάτων (D:dry, W:water, un:unlyophilized, numbers: quantity of N)

Επέμβαση	Μ.Ο. Απορρόφησης (510 nm)		% Ισοδύναμα κερκετίνης
0D-INF	0,252	± 0,02	13,37
5D-INF	0,257	± 0,06	14,33
10D-INF	0,267	± 0,03	13,60
15D-INF	0,228	± 0,07	13,00
0W-INF	0,283	± 0,05	13,84
5W-INF	0,257	± 0,06	13,44
10W-INF	0,201	± 0,06	12,59
15W-INF	0,308	± 0,02	14,23
0D-USE	0,441	± 0,00	16,26
5D-USE	0,491	± 0,03	17,03
10D-USE	0,463	± 0,01	16,61
15D-USE	0,514	± 0,01	17,39
0W-USE	0,400	± 0,02	15,63
5W-USE	0,443	± 0,03	16,30
10W-USE	0,460	± 0,05	16,56
15W-USE	0,505	± 0,02	17,25
0D-INF_un	0,309	± 0,03	59,09
5D-INF_un	0,314	± 0,02	55,89
10D-INF_un	0,318	± 0,04	54,27
15D-INF_un	0,335	± 0,02	54,24
0W-INF_un	0,344	± 0,08	56,99
5W-INF_un	0,291	± 0,04	57,28
10W-INF_un	0,265	± 0,02	57,50
15W-INF_un	0,265	± 0,02	58,55

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν τα παρακάτω γραφήματα σύμφωνα με τα επί τις εκατό ποσοστά των ισοδύναμων κερκετίνης.



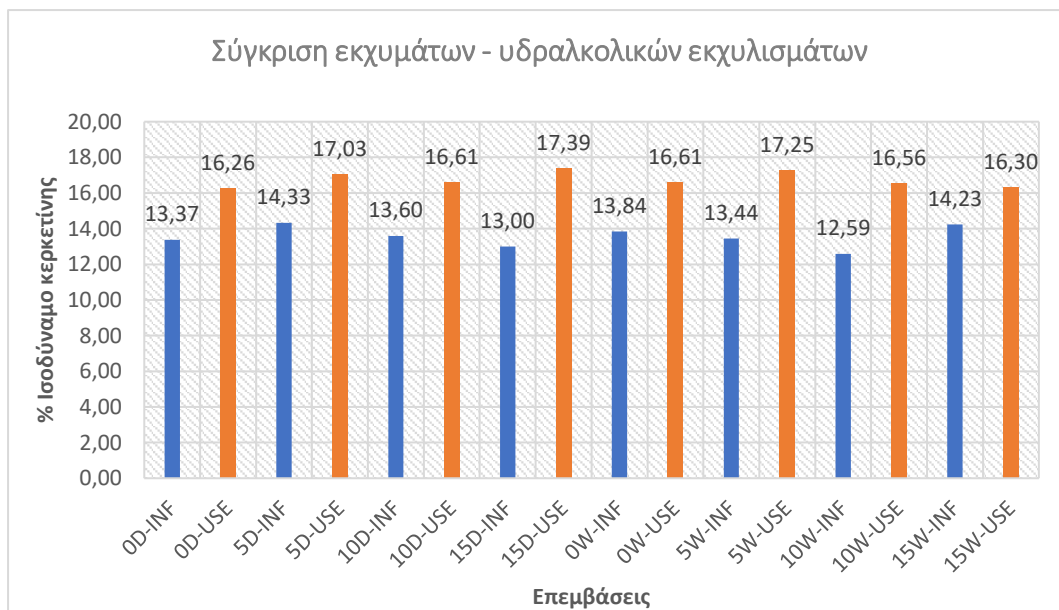
Γράφημα 6 : Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο λυοφιλιωμένων εκχυμάτων



Γράφημα 7 : Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο λυοφιλιωμένων υδραλκοολικών εκχυλισμάτων



Γράφημα 8 : Ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο μη λυοφιλιωμένων εκχυμάτων



Γράφημα 9: Σύγκριση ολικού φλαβονοειδούς περιεχομένου λυοφιλιωμένων εκχυμάτων - υδραλκολικών εκχυλισμάτων

Όπως φαίνεται από τα γραφήματα οι συνθήκες έλλειψης νερού βελτίωσαν την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φλαβονοειδή συστατικά. Για τα μεν υδατικά εκχυλίσματα φαίνεται ότι η μειωμένη λίπανση βελτίωσε την περιεκτικότητά τους σε φλοβονοειδή συστατικά, για τα δε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα καλύτερα αποτελέσματα πήραμε από τα δείγματα όπου είχαν δεχθεί μεγαλύτερη ποσότητα λιπάσματος.

Συγκριτικά φαίνεται εδώ ότι τα υδρομεθανολικά έχουν μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονοειδών σε σχέση με τα υδατικά εκχυλίσματα. Σύμφωνα με τους Vieira et al., 2020, τα

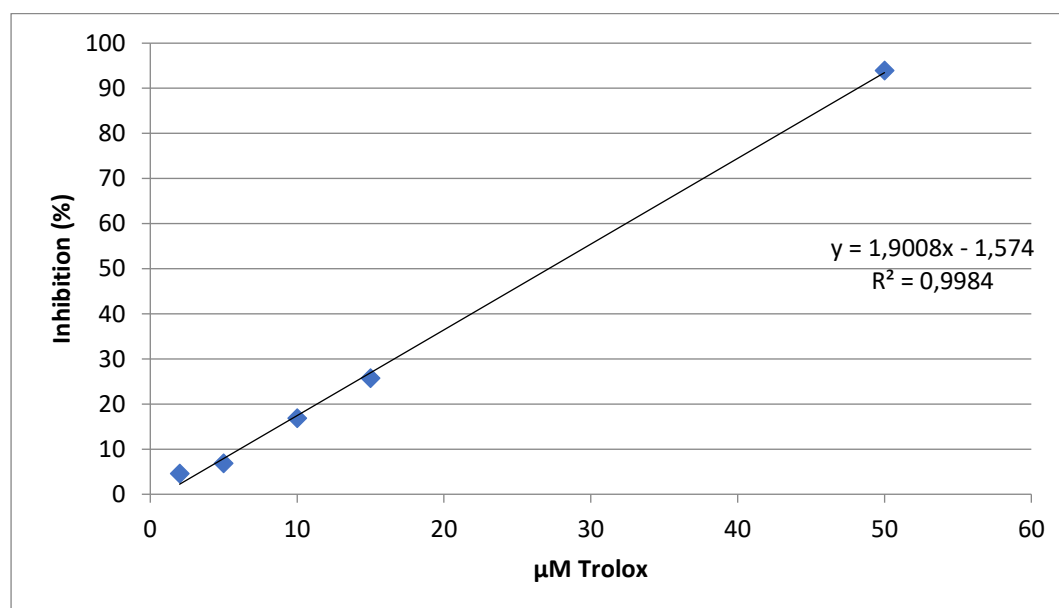
υδρομεθανολικά εκχυλίσματα ανέκτησαν σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα φλαβονοειδών ( $342.0 \pm 57.7$  mg GA/g δείγματος) σε σύγκριση με τα υδατικά εκχυλίσματα ( $251.6 \pm 40.1$  mg GA/g δείγματος).

Οι Cinkmanis et al., το 2017 ερεύνησαν την περιεκτικότηρα σε φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά σε νοπή και λυοφιλωμένη γύρη και βρήκαν ότι το υψηλότερο συνολικό φλαβονοειδές ( $196$  mg QE/100 g<sup>-1</sup>) και φαινολικό περιεχόμενο ( $62$  mg GAE/100 g<sup>-1</sup>) βρέθηκε στην φρέσκια γύρη. Την ίδια παρατήρηση είχαμε και στην παρούσα μελέτη, όπου το ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές περιεχόμενο είναι μεγαλύτερο στα μη λυοφιλωμένα δείγματα. Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή συστατικά (TFC) παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή της μεγαλύτερης δόσης λιπάσματος σε συνδυασμό με την χαμηλότερη εφαρμογή άρδευσης (Mohammadi-Cheraghabadi et al., 2021).

### 3.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων φασκόμηλου έγινε με δύο μεθόδους, την μέθοδο DPPH και την μέθοδο ABTS. Τα αποτελέσματα των λυοφιλωμένων δειγμάτων εκφράζονται με ποσοστό IC50, δηλαδή πόση συγκεκριμένη ανασταλτική ουσία χρειάζεται για να ανασταλεί, in vitro, η οξείδωση του DPPH και του ABTS κατά 50%.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μη λυοφιλοποιημένων δειγμάτων εκφράστηκε ως μΜ ισοδύναμων Trolox ανά mL δείγματος. Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς του Trolox, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 4 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox

### 3.4.1 Μέθοδος DPPH

Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων

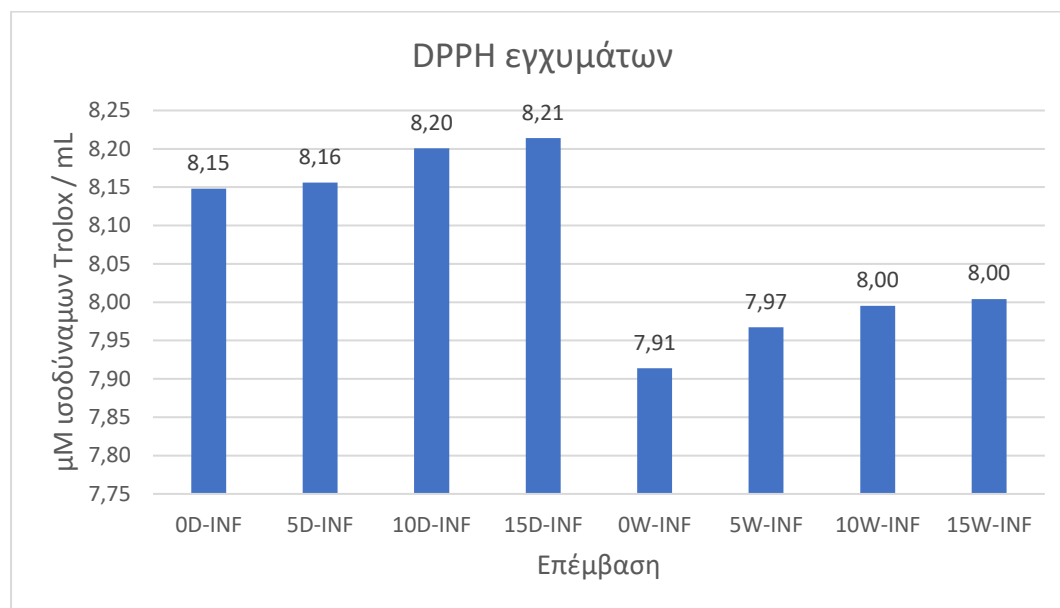
Επέμβαση	Μ.Ο. Απορρόφησης (517 nm)		μM ισοδύναμων Trolox/ mL δείγματος
0D-INF	0,859	± 0,00	8,15
5D-INF	0,857	± 0,02	8,16
10D-INF	0,851	± 0,03	8,20
15D-INF	0,849	± 0,01	8,21
0W-INF	0,894	± 0,02	7,91
5W-INF	0,886	± 0,00	7,97
10W-INF	0,880	± 0,01	8,00
15W-INF	0,881	± 0,01	8,00

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα λυοφιλιωμένων δειγμάτων

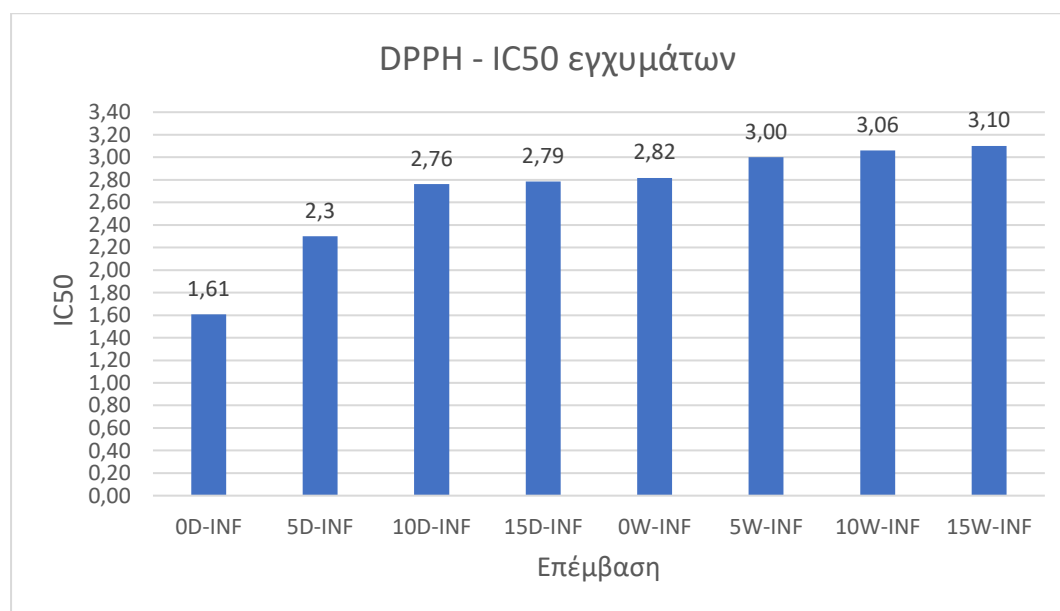
Επέμβαση	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
0D-INF	1,61
5D-INF	2,30
10D-INF	2,76
15D-INF	2,79
0W-INF	2,82
5W-INF	3,00
10W-INF	3,06
15W-INF	3,10
0D-USE	2,51
5D-USE	2,73
10D-USE	2,15
15D-USE	2,09
0W-USE	2,66
5W-USE	2,83
10W-USE	3,06
15W-USE	2,82



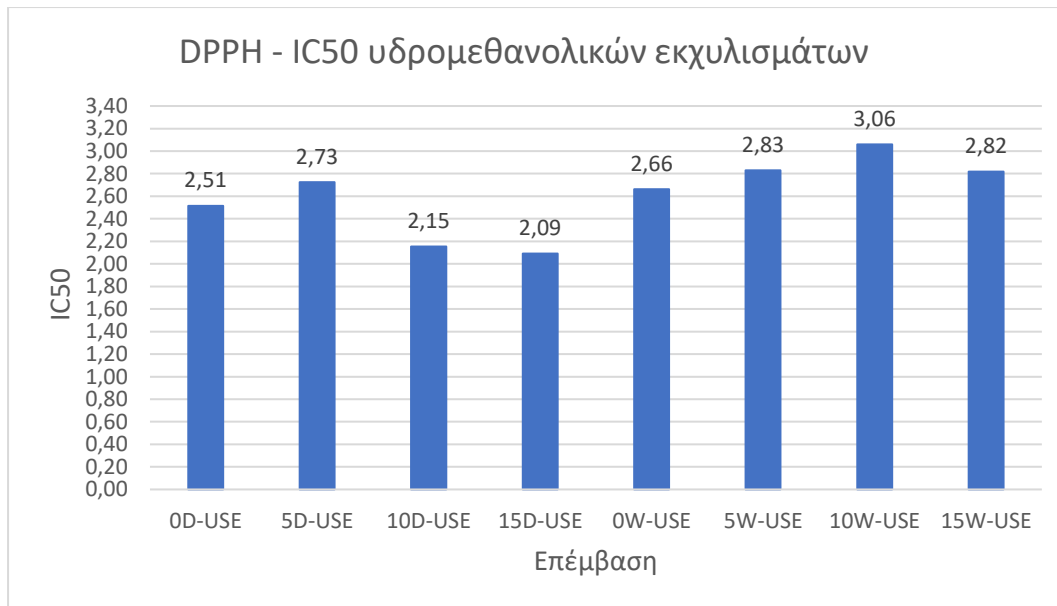
Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν τα παρακάτω γραφήματα



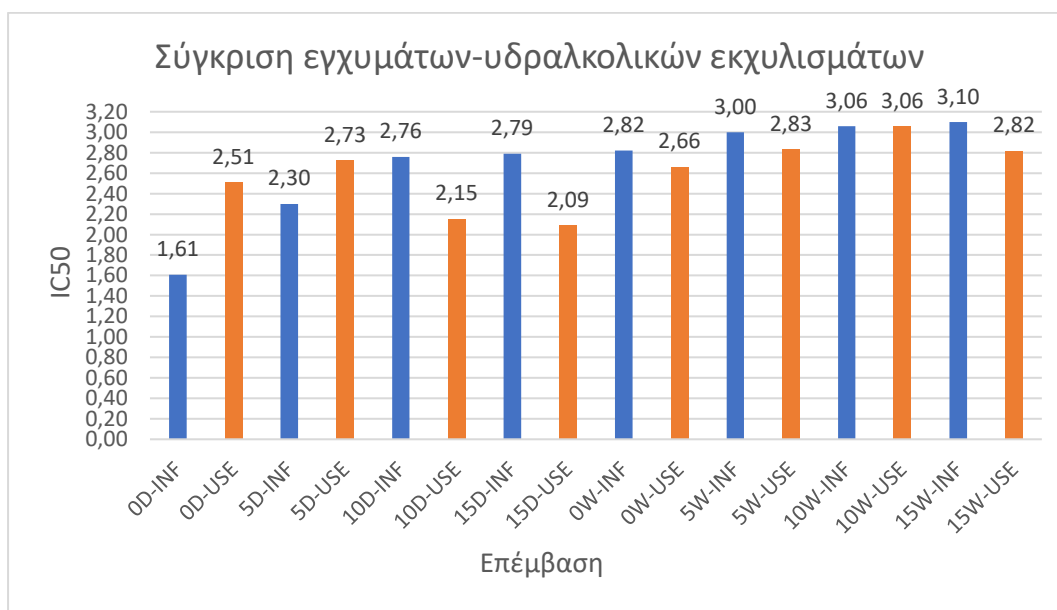
Γράφημα 10 : Αντιοξειδωτική ικανότητα μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH



Γράφημα 11 : Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH



Γράφημα 12 : Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφυλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH



Γράφημα 13 : Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας λυοφυλιωμένων εκχυμάτων και υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH

Από τα γραφήματα παρατηρούμε ότι στα μη λυοφυλιωμένα εγχύματα η αντιοξειδωτική δράση είναι υψηλότερη στα δείγματα τα οποία δεν ποτιζόντουσαν, ενώ υπάρχει μια τάση να αυξάνεται η δράση με αύξηση της λίπανσης. Ίδια αποτελέσματα φαίνεται να έχουμε και στα λυοφυλιωμένα δείγματα χωρίς όμως να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων ως προς το IC<sub>50</sub>. Ωστόσο, τα εγχύματα φαίνεται να έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

### 3.4.2 Μέθοδος ABTS

Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

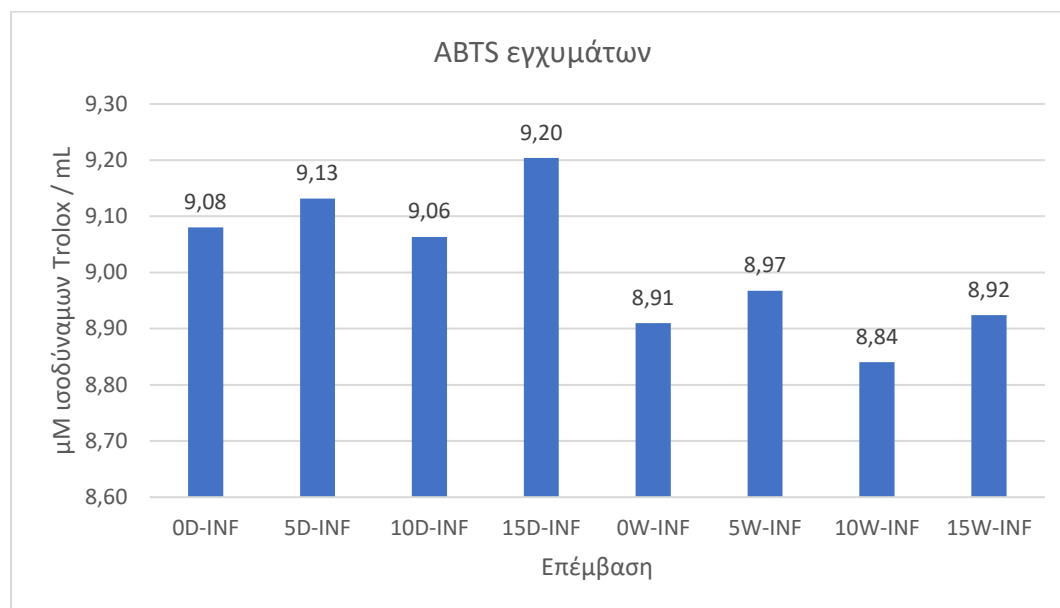
Πίνακας 9 : Αποτελέσματα μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων

Επέμβαση	Μ.Ο. Απορρόφησης (517 nm)		μM ισοδύναμων Trolox/ mL δείγματος
0D-INF	0,366	± 0,02	9,08
5D-INF	0,373	± 0,03	9,13
10D-INF	0,364	± 0,02	9,06
15D-INF	0,382	± 0,03	9,20
0W-INF	0,343	± 0,03	8,91
5W-INF	0,351	± 0,03	8,97
10W-INF	0,335	± 0,03	8,84
15W-INF	0,346	± 0,01	8,92

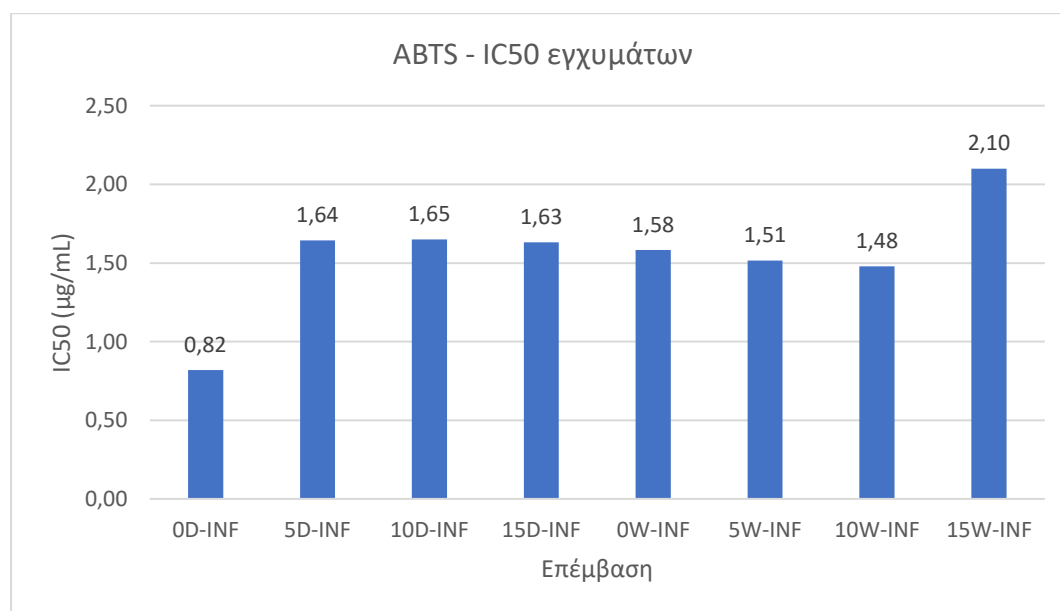
Πίνακας 10 : Αποτελέσματα λυοφιλιωμένων δειγμάτων

Επέμβαση	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
0D-INF	0,82
5D-INF	1,64
10D-INF	1,65
15D-INF	1,63
0W-INF	1,58
5W-INF	1,51
10W-INF	1,48
15W-INF	2,10
0D-USE	1,38
5D-USE	1,30
10D-USE	1,45
15D-USE	1,52
0W-USE	1,47
5W-USE	1,50
10W-USE	1,50
15W-USE	1,53

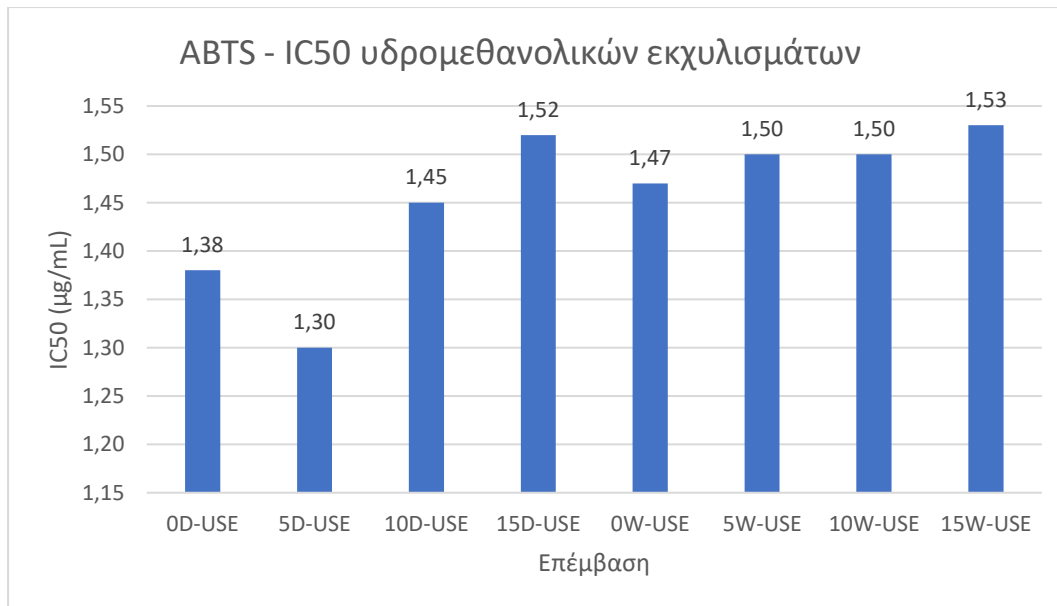
Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν τα παρακάτω γραφήματα



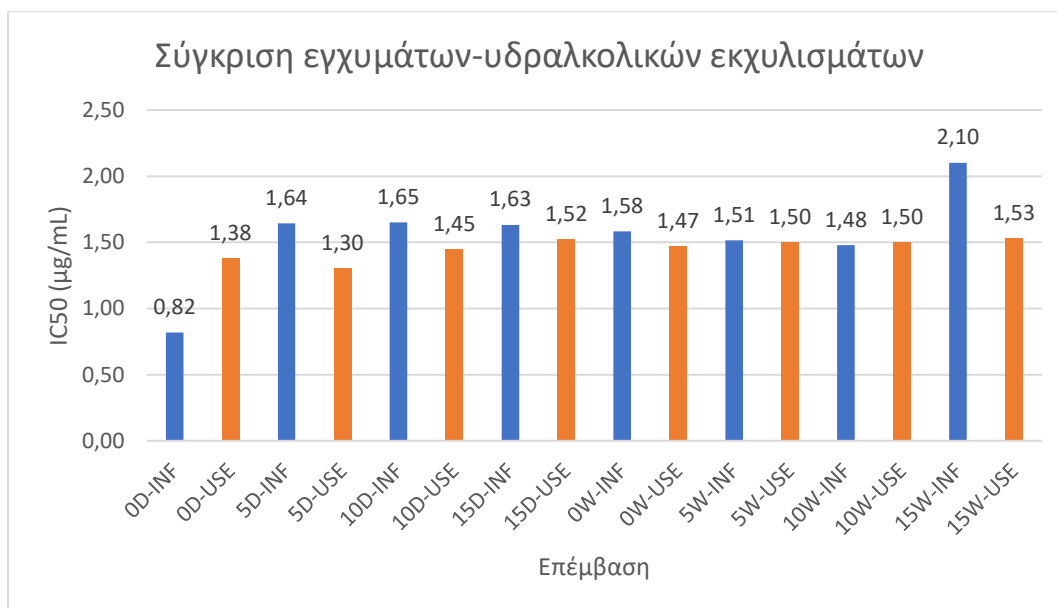
Γράφημα 14 : Αντιοξειδωτική ικανότητα μη λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH



Γράφημα 15 : Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων εγχυμάτων με την μέθοδο DPPH



Γράφημα 16 : Αντιοξειδωτική ικανότητα λυοφιλιωμένων υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH



Γράφημα 17 : Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων και υδραλκολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH

Από τα γραφήματα παρατηρούμε ότι στα μη λυοφιλιωμένα εγχύματα η αντιοξειδωτική δράση είναι υψηλότερη στα δείγματα τα οποία δεν ποτιζόντουσαν, όπως παρατηρήθηκε και στην μέθοδο DPPH ενώ υπάρχει μια τάση να αυξάνεται η δράση με αύξηση της λίπανσης. Ίδια αποτελέσματα φαίνεται να έχουμε και στα λυοφιλιωμένα δείγματα χωρίς όμως να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων ως προς το IC<sub>50</sub>. Ωστόσο, τα εγχύματα φαίνεται να έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

Ο Sengul Uysal το 2018 μελετώντας την δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών με τις μεθόδους DPPH και ABTS για το *Salvia absconditiflora*, βρήκε ότι η ξήρανση υπό σκιά (198,26 και 223,63 mgTE/g για DPPH και ABTS, αντίστοιχα) παρουσίασε την υψηλότερη δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, ακολουθούμενη από την ξήρανση στο φούρνο και την λυοφιλίωση.

Σύμφωνα με τους Sonmez C. et al. το 2017, η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν επηρεάστηκε σημαντικά με τις δόσεις αζώτου και τις επεξεργασίες άρδευσης. Η υψηλότερη τιμή λήφθηκε από 20 ημέρες περιόδου ξηρασίας πριν από τη συγκομιδή με 60 kg/ha<sup>-1</sup> αζωτούχου λιπάσματος.

Το φυτά της *Salvia officinalis* L. περιέχει σημαντικές πολυφαινόλες, όπου η βιοσύνθεση αυξάνεται υπό συνθήκες έλλειψης νερού και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή των φυτών (Bettaieb et al. 2011, Pellegrini et al. 2015).

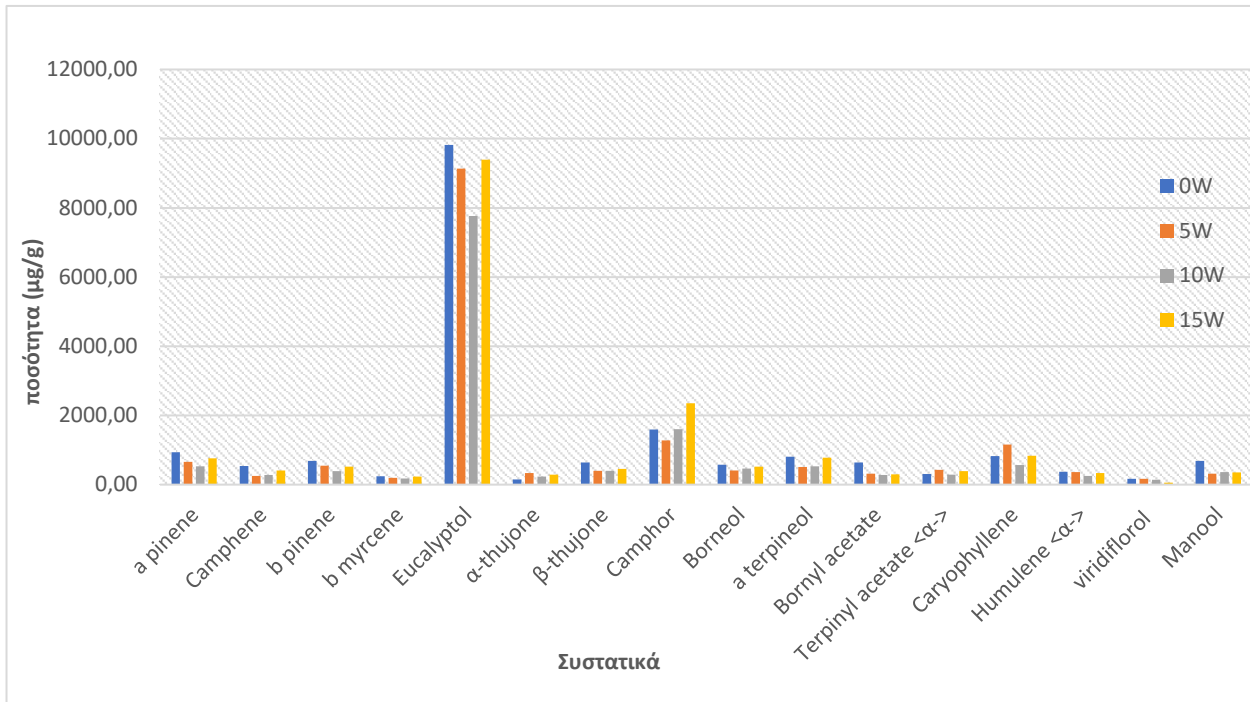
Οι Munne-Bosch et al., το 2001 ανέφεραν ότι τα αντιοξειδωτικά μόρια είναι υπεύθυνα για την αποφυγή ζημιών από την ξηρασία στα φυτά. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα τείνει να αυξάνεται στα φυτά του φασκόμηλου λόγω έλλειψης βροχοπτώσεων κατά τη καλοκαιρινή περίοδο σε μεσογειακές συνθήκες.

Σύμφωνα με τους Natália Martins, et al., το 2014, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση είχαν τα εκχυλίσματα με την ακόλουθη σειρά : εκχύλισμα μεθανόλης/νερού, υδατικό εκχύλισμα που λαμβάνεται με την μορφή αφεψήματος, υδατικό εκχύλισμα που λαμβάνεται με έγχυση. Έτσι, οι ενώσεις με ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να είναι περισσότερο διαλυτές σε μείγματα μεθανόλης/νερού παρά μόνο στο νερό.

### 3.5 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών αιθερικών εκχυλισμάτων και των εγχυμάτων του φασκόμηλου

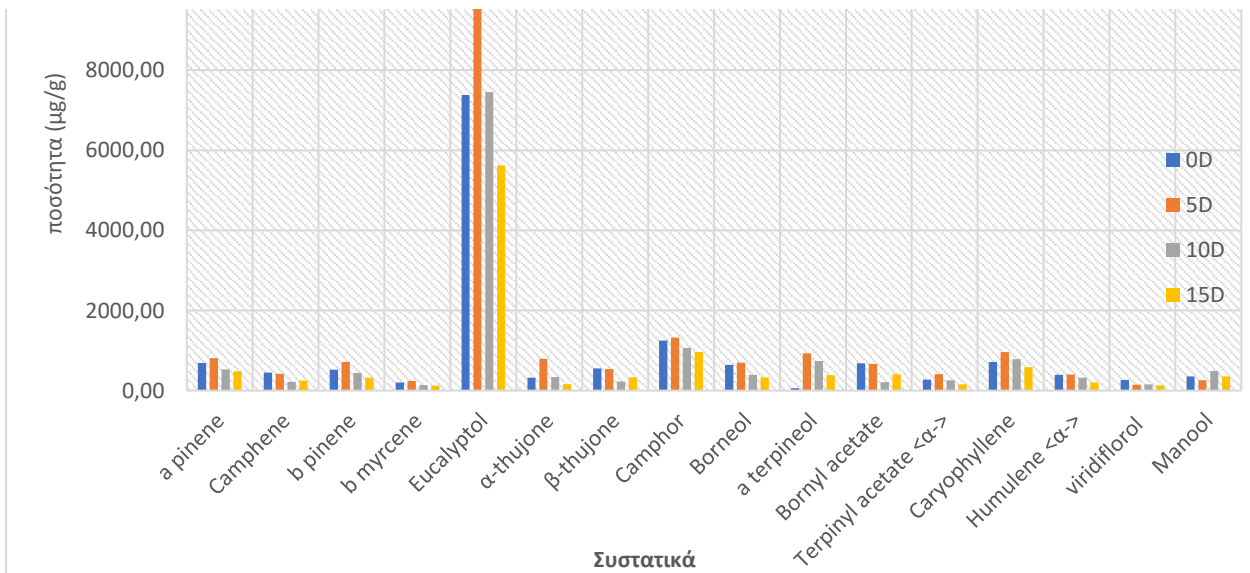
Η περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά των εκχυλισμάτων και των διαιθυλαιθερικών εγχυμάτων φασκόμηλου αναλύθηκε με GC-MS και προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, με την ένωση κυκλοεξανόνη.

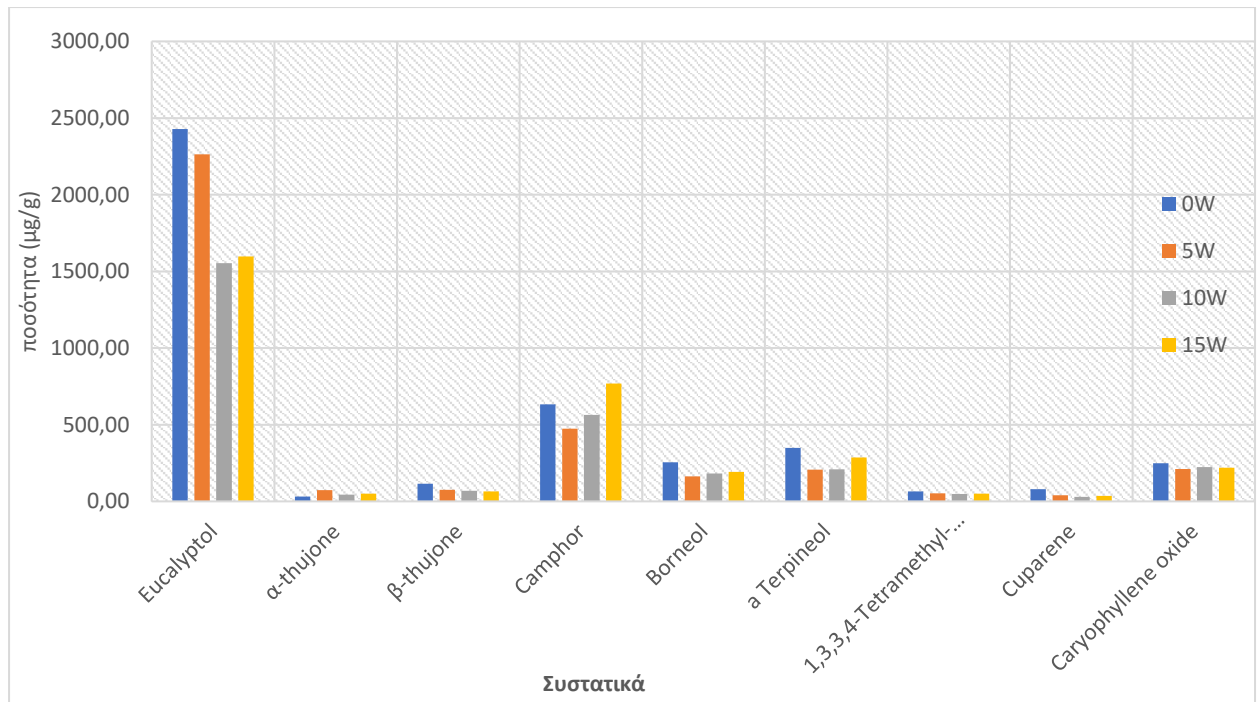
Το αιθέριο έλαιο αποτελεί το πιο σημαντικό δευτερογενή μεταβολίτη των φαρμακευτικών φυτών. Παράγοντες, όπως ο γενότυπος του φυτού, η περίοδος συγκομιδής, οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, ένταση φωτός, υγρασία), οι ιδιότητες του εδάφους, οι πρακτικές ποτίσματος και λίπανσης επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο στο φυτό. Ειδικά, η λίπανση μπορεί να επηρεάσει γρήγορα το μεταβολισμό του φυτού και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Esmailpour et al., 2017).



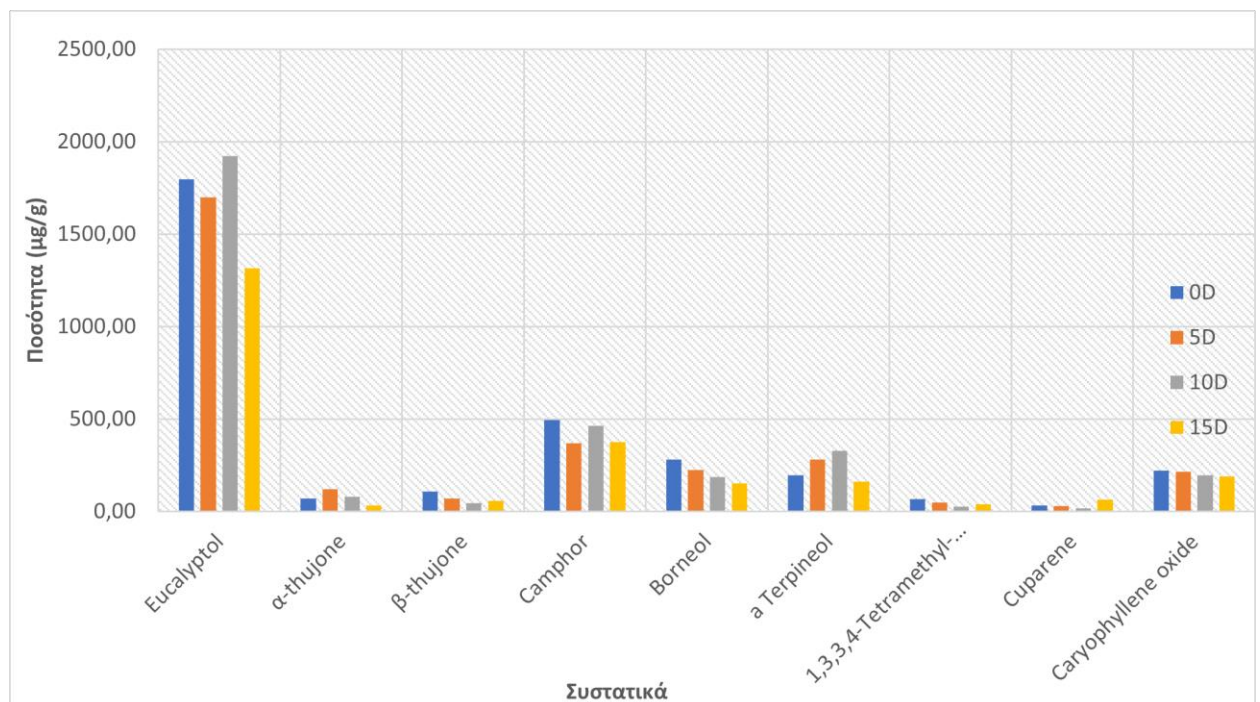
Γράφημα 18 : Συγκέντρωση (µg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των οργανικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0W), 5 μονάδες (5W), 10 μονάδες (10W), 15 μονάδες (15W)]

Γράφημα 19 : Συγκέντρωση (µg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των οργανικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεξεργασίες λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0D), 5 μονάδες (5D), 10 μονάδες (10D), 15 μονάδες (15D)]





Γράφημα 20 : Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των εγχυμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες(0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες(10D), 15 μονάδες(15D)]



Γράφημα 21 : Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των εγχυμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες(0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες(10D), 15 μονάδες(15D)]



Πίνακας 11 : Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των οργανικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη (W) και μη (D) καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0), 5 μονάδες (5), 10 μονάδες (10), 15 μονάδες (15)]

	0D	5D	10D	15D	0W	5W	10W	15W
<b>a pinene</b>	690,27	811,48	532,43	479,05	937,71	655,20	530,92	759,74
<b>Camphene</b>	448,92	422,14	219,74	250,29	536,60	250,22	276,39	410,08
<b>b pinene</b>	520,68	716,33	443,00	321,27	688,89	545,87	386,51	522,35
<b>b myrcene</b>	199,42	242,14	143,09	122,79	244,62	192,48	179,12	230,54
<b>Eucalyptol</b>	7382,64	9676,37	7451,44	5621,45	9814,75	9135,09	7768,83	9397,15
<b>Thujone cis</b>	322,89	790,85	340,79	161,14	151,09	338,38	229,25	290,10
<b>Thujone trans</b>	553,29	539,77	227,09	331,37	643,32	402,28	400,23	456,36
<b>Camphor</b>	1253,35	1320,76	1066,77	960,79	1597,22	1281,91	1602,62	2348,22
<b>Borneol</b>	643,45	700,50	395,73	332,38	572,58	409,98	467,50	516,35
<b>a terpineol</b>	60,80	933,24	734,92	385,86	802,81	512,00	525,35	783,31
<b>Bornyl acetate</b>	682,59	667,49	209,20	412,44	637,33	316,44	281,10	294,38
<b>Terpinyl acetate &lt;α-&gt;</b>	276,76	415,03	259,03	157,10	305,77	428,46	283,67	386,51
<b>Caryophyllene</b>	714,27	965,34	786,66	588,38	821,99	1160,27	569,91	836,45
<b>Humulene &lt;α-&gt;</b>	397,20	399,44	323,23	203,87	370,53	359,55	247,25	338,95
<b>viridiflorol</b>	269,54	146,06	151,71	130,86	169,85	170,54	142,22	52,45
<b>Manool</b>	353,41	258,65	494,74	355,92	690,69	317,59	362,95	357,37

Πίνακας 12 : Συγκέντρωση (μg ουσία/g φυτικό υλικό) των κύριων συστατικών των εγχυμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη (W) και μη (D) καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0), 5 μονάδες (5), 10 μονάδες (10), 15 μονάδες (15)]

	0D	5D	10D	15D	0W	5W	10W	15W
<b>Eucalyptol</b>	1796,74	1697,69	1921,99	1314,32	2427,41	2264,38	1553,67	1598,40
<b>Thujone &lt;cis-&gt; / α-thujone</b>	71,02	121,36	80,04	31,36	32,08	72,61	43,88	49,61
<b>Thujone &lt;trans-&gt; / β-thujone</b>	106,78	70,97	44,27	57,27	114,74	75,53	70,12	65,35
<b>Camphor</b>	494,62	369,31	462,67	376,36	631,77	475,07	564,67	768,55
<b>Borneol</b>	280,14	225,27	187,65	152,14	254,64	163,73	182,62	193,30
<b>alpha Terpineol</b>	196,86	280,91	328,50	161,00	349,26	206,77	208,80	285,68
<b>1,3,3,4-Tetramethyl-2-oxabicyclo[2.2.0]hexane</b>	67,29	48,78	26,37	38,55	65,22	51,83	47,42	49,83
<b>Cuparene</b>	31,89	29,42	16,84	62,49	79,52	40,15	30,33	36,54
<b>Caryophyllene oxide</b>	219,59	215,77	197,23	189,93	249,45	210,61	222,80	218,89

Όπως βλέπουμε από τα παραπάνω ραβδογράμματα (Γράφημα 18 – 21), ταυτοποιήθηκαν 16 ενώσεις στα οργανικά εκχυλίσματα της *Salvia fruticosa*, ενώ 9 ήταν αυτά που αναγνωρίστηκαν στα εκχύματα του φυτού. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι τα κύρια πτητικά συστατικά του ελαίου ήταν τα μονοτερπένια. Το κύριο συστατικό όλων των δειγμάτων βρέθηκε να είναι η ευκαλυπτόλη, ενώ ακολουθεί με αρκετά μικρότερο ποσοστό η καμφορά. Στα αιθερικά εκχυλίσματα φασκόμηλου (Γράφημα 18, 19 και πίνακας 6), μηδενική έως μέτρια λίπανση σε συνδυασμό με άρδευση φαίνεται να αυξάνει τη συγκέντρωση ευκαλυπτόλης (9814 μg/g), α - πινενίου (937 μg/g), β - μυρκενίου (244 μg/g), καμφενίου (536 μg / g), β - θουγιόνης (643 μg/g) και μανσόλης (690 μg/g). Ο συνδυασμός άρδευσης και λίπανσης είχε θετική επίδραση στην ποσότητα καμφοράς (2348 μg/g), ενώ το καρυοφυλλένιο και το Terpinyl acetate <α-> επηρεάστηκαν θετικά υπό συνθήκες μέτριας λίπανσης(1160 μg/g και 428 μg/g αντίστοιχα). Επιπλέον, η χαμηλή λίπανση και η έλλειψη άρδευσης αύξησαν τη συγκέντρωση του β - πινενίου (716 μg/g), της α - θουγιόνης (790 μg/g), της βορνεόλης (700 μg/g) της α - τερπινεόλης (933 μg/g) και του χουμουλενίου (399 μg/g). Τέλος, μηδενική λίπανση και έλλειψη άρδευσης επηρέασαν θετικά τις ποσότητες των Bornyl acetate (683 μg/g) και viridiflorol (270 μg/g).

Σύμφωνα με τους Duran Katar et al., 2021, τα κύρια συστατικά του αιθερικού ελαίου του ελληνικού φασκόμηλου βρέθηκαν να είναι η 1,8-κινεόλη (συνώνυμο: ευκαλύπτολη) και η καμφορά. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε 1,8-κινεόλη (48.39%) βρέθηκε υπό συνθήκες μέτριας λίπανσης με 100 kg ha<sup>-1</sup> αζώτου, η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε καμφορά (6.88%) βρέθηκε υπό συνθήκες μηδενικής λίπανσης αζώτου. Η καμφορά έχει τοξική επίδραση στο ανθρώπινο σώμα όταν καταναλώνεται συνεχώς και σε μεγάλες ποσότητες. Το φασκόμηλο θα πρέπει να είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε καμφόρας ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μπαχαρικό ή τσάι (Aydin et al., 2019). Οι Govahi et al., το 2015 βρήκαν ότι η 1,8-κινεόλη, η α-θουγιόνη και η καμφορά ήταν οι κύριες ενώσεις του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου που υπέστησαν αύξηση στην ποσότητα τους κάτω από συνθήκες λίπανσης και μέτριας έλλειψης νερού.

Το β-πινένιο είναι ένα από τα δύο ισομερή του πινενίου, το οποίο διαθέτει πολλές ιδιότητες όπως αντιβακτηριακές, αντιμικροβιακές, αντικαταθλιπτικές και κυτταροτοξικές. Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια που περιέχουν πινένιο χρησιμοποιούνται στην αρωματοθεραπεία με σκοπό την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, την αποκατάσταση του μεταβολισμού και την κυκλοφορία του αίματος, καθώς και για την επούλωση πληγών (Filiz et al., 2023).

Το β-καρσοφυλλένιο είναι ένα φυσικό δικυκλικό σεσκιτερπένιο το οποίο αποτελεί συστατικό πολλών αιθέριων ελαίων. Περιέχει ενεργά συστατικά που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική και την φαρμακογνωσία για διάφορους σκοπούς, ως αντιφλεγμονώδη, ως αντιβιοτικά και φάρμακα για τοπική αναισθησία. Η *Salvia fruticosa* χρησιμοποιείται στην Τουρκία ως βότανο για τσάι και μπαχαρικό. Επομένως, είναι επιθυμητό να υπάρχει όσο το δυνατόν λιγότερο β-καρσοφυλλένιο (Aydin et al., 2019). Σύμφωνα με τους Filiz et al., 2023, το περιεχόμενο β-καρσοφυλλενίου αυξήθηκε με τη χημική λίπανση και τα κατάλοιπα των οργανικών λιπασμάτων.

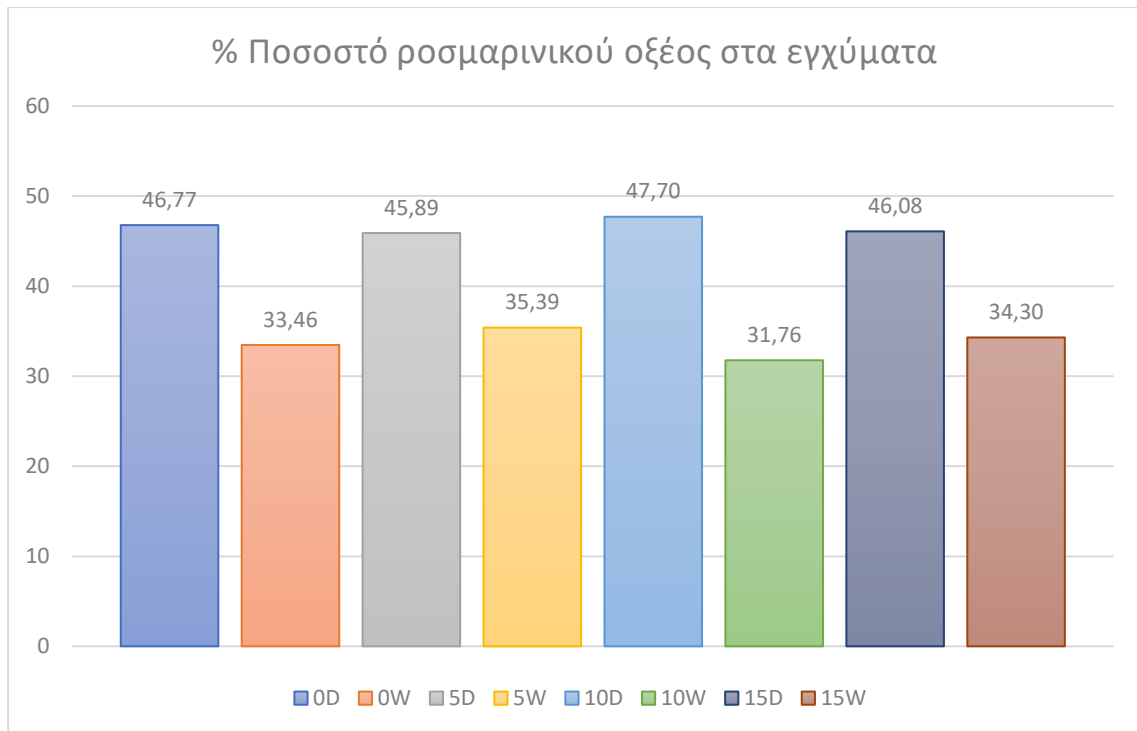
Στην περίπτωση των εγχυμάτων (Γράφημα 20, 21 και πίνακας 7), η ευκαλυπτόλη (2427 μg/g), η β θουγιόνη (114 μg/g), η α - τερπινεόλη (349 μg/g), το κουπαρένιο (79 μg/g) και το οξείδιο του καρσοφυλλενίου (249 μg/g) αυξήθηκαν υπό συνθήκες άρδευσης και μηδενικής λίπανσης. Επιπλέον, η ποσότητα καμφοράς (768 μg/g) αυξήθηκε με την αύξηση της λίπανσης και της άρδευσης. Τέλος, η θουγιόνη (121 μg/g) και η βορνεόλη (280 μg/g) είχαν καλύτερα αποτελέσματα σε συνθήκες ξήρανσης.

Οι Duran Katar et al. το 2021, λαμβάνοντας υπόψη διαφορετικές εφαρμογές αζώτου των πειραματικών εκτάσεων που μελέτησαν, κατέληξαν στο ότι συνθήκες μέτριας λίπανσης με άζωτο (100 kg/ha<sup>-1</sup>), είναι οι πιο κατάλληλες για την παραγωγή και την σύνθεση αιθέριου ελαίου φασκόμηλου.

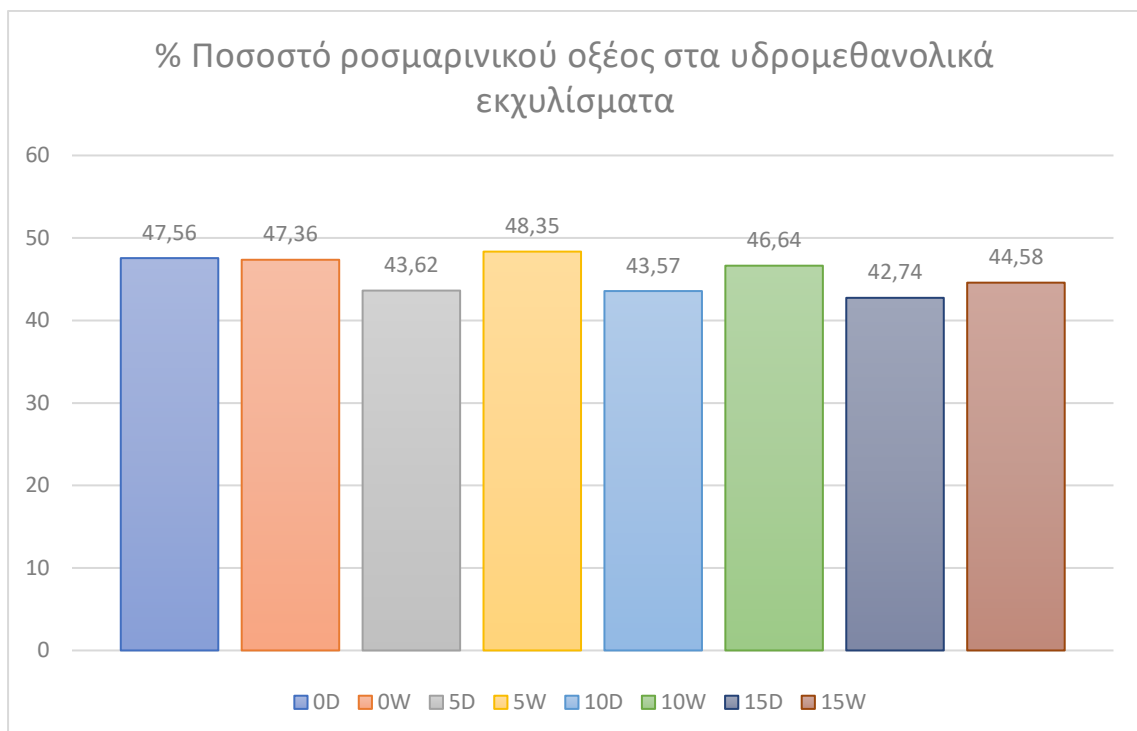
### 3.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών των εγχυμάτων και υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου

Ελέγχθηκε το φαινολικό προφίλ των εγχυμάτων και υδραλκολικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου στα 330 nm. Ανιχνεύτηκαν 19-27 συστατικά. Τα μη λυοφιλιωμένα εγχύματα είχαν περισσότερα συστατικά. Ταυτοποιήθηκαν ωστόσο 9 συστατικά με βάση τον χρόνο έκλουσής τους, το φάσμα μάζας καθώς και το φάσμα UV-Vis τους συγκρινόμενα με πρότυπες βιβλιοθήκες, εκ των οποίων τα 4 ήταν φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, πικουμαρικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ), ενώ τα 5 ήταν φλαβονοειδή συστατικά (7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, kaempferide, 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, κερκετίνη, 3-O-γλυκοζίτης της ισορχαμενίνης). Το κύριο συστατικό σε όλες τις επεμβάσεις ήταν το ροσμαρινικό οξύ. Με αυτό συμφωνεί ο Uysal, το 2018, όπου το βρήκε σαν κύριο συστατικό στην *Salvia absconditiflora*. Το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ έχουν αναφερθεί εκτενώς στο *S. Officinalis* (Martins et al., 2014, Zimmermann et al., 2011, Uysal, 2018). Οι ενώσεις 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησής τους, τα φάσματα μάζας και τα χαρακτηριστικά φάσματα UV-vi. Ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης είχε προηγουμένως ταυτοποιηθεί στο φασκόμηλο, ενώ έχει βρεθεί σε φακελάκια και εγχύματα φασκόμηλου από τον Zimmermann et al. (2011). Η παρουσία και των δύο ενώσεων έχει αναφερθεί σε φύλλα και εναέρια μέρη του φασκόμηλου (*S. officinalis*) από διάφορους συγγραφείς (Martins et al., 2014).

Στα μεν εγχύματα η ποσότητά του ροσμαρινικού οξέος κυμάνθηκε 33-46 % με μεγαλύτερο ποσοστό να υπάρχει στα δείγματα τα οποία δεν ποτιζόντουσαν. Αν και στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος είναι αυξημένο σε σχέση με τα υδατικά (42-48%), η ποσότητα του όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα στην εικόνα 22 και στον πίνακα 13 είναι μεγαλύτερο στα υδατικά εκχυλίσματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όπως προαναφέρθηκε τα εγχύματα έχουν περισσότερες ουσίες (κορυφές), οπότε το ποσοστό εμφανίζεται μειωμένο. Σε αντίστοιχο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Martins et al., 2014. Αυτό οφείλεται στην πολική φύση του ροσμαρινικού οξέος, οπότε και εκχυλίζεται περισσότερη ποσότητα στο νερό που είναι πιο πολικός διαλύτης.



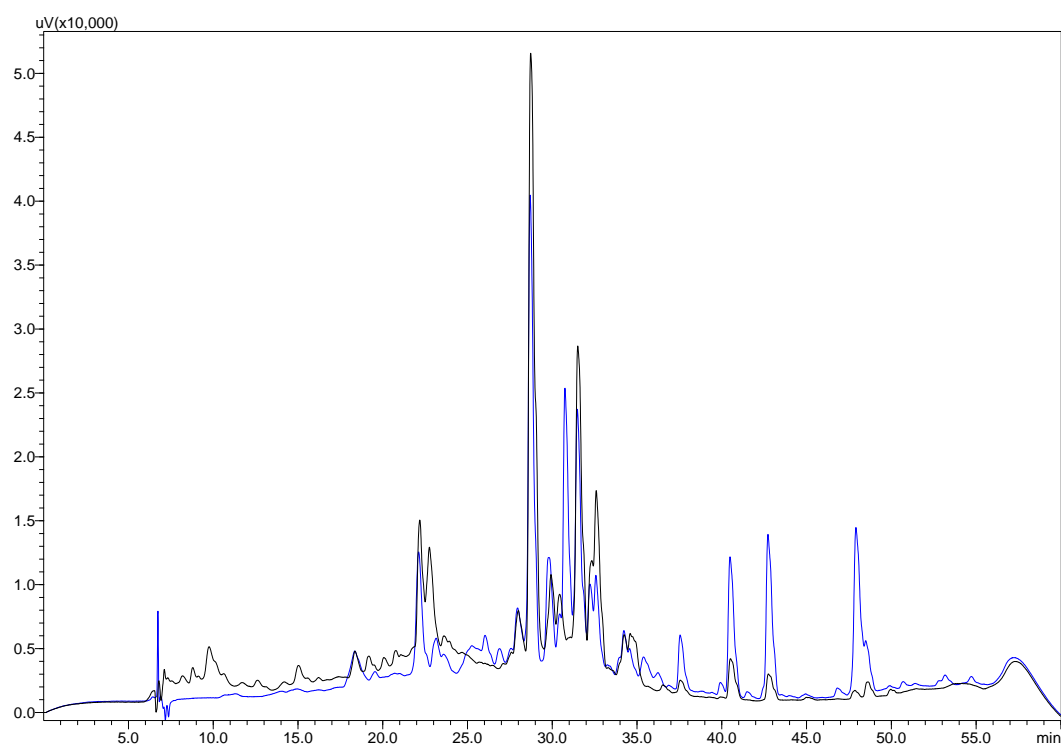
Γράφημα 22 Γράφημα 21 : Ποσοστό του κύριου συστατικού των εγχυμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη και αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεξεργασίες αζωτούχου λίπανσης [0 μονάδες(0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες(10D), 15 μονάδες(15D)]



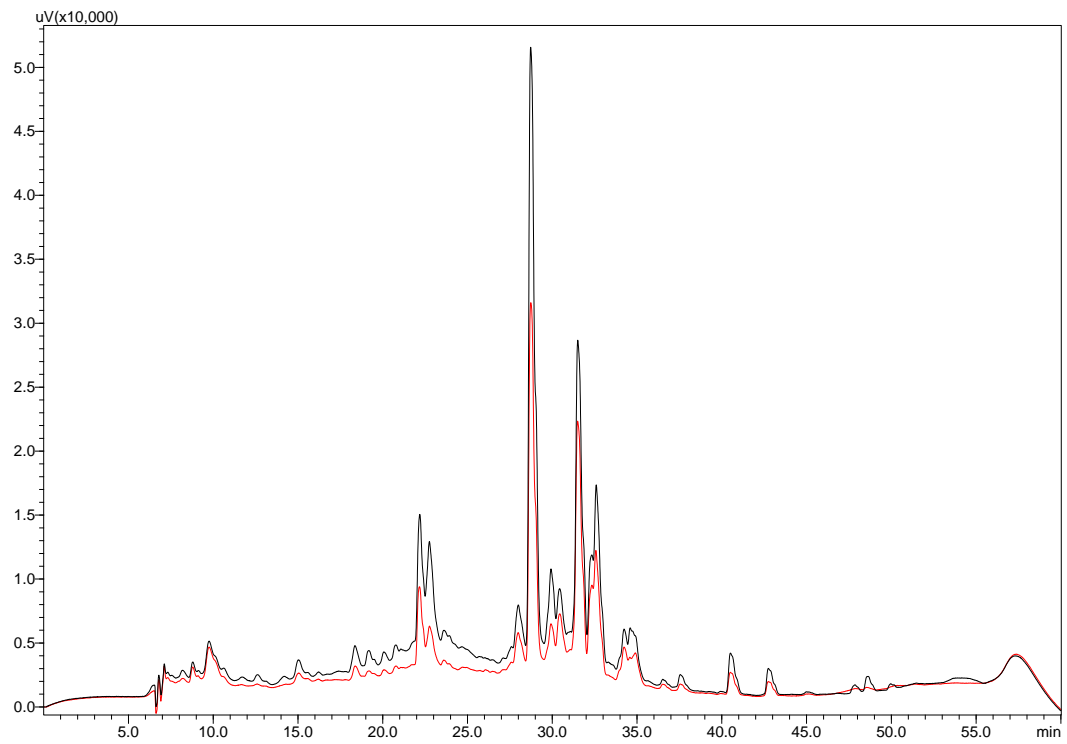
Γράφημα 23 : Ποσοστό του κύριου συστατικού των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε μη αρδευόμενη και αρδευόμενη καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεξεργασίες αζωτούχου λίπανσης [0 μονάδες(0D), 5 μονάδες(5D), 10 μονάδες(10D), 15 μονάδες(15D)]

Πίνακας 13 : Ποσότητα (Area εκφρασμένη ως προς mAU\*s και % με κανονικοποίηση) του κύριου συστατικού των εγχυμάτων και υδραλκολικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου σε αρδευόμενη (W) και μη (D) καλλιέργεια φασκόμηλου με διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης με άζωτο [0 μονάδες (0), 5 μονάδες (5), 10 μονάδες (10), 15 μονάδες (15)]

	Εγχύματα		Υδραλκολικά εκχυλίσματα		Εγχύματα Λυοφιλωμένα	
Ροσμαρινικό οξύ						
Area						
	[mAU*s]	%	[mAU*s]	%	[mAU*s]	%
<b>0D</b>	12817,30	46,77	9170,87	47,56	8759,71	52,06
<b>0W</b>	5897,67	33,46	9512,34	47,36	6712,86	32,73
<b>5D</b>	9792,75	45,89	8995,24	43,62	10871,00	47,38
<b>5W</b>	7331,96	35,39	7807,49	48,35	7583,57	33,02
<b>10D</b>	11063,55	47,70	7874,41	43,57	10548,89	50,22
<b>10W</b>	6320,43	31,76	7954,19	46,64	7022,09	26,32
<b>15D</b>	9553,71	46,08	5941,93	42,74	7022,09	26,32
<b>15W</b>	6994,46	34,30	6449,74	44,58	7256,25	30,99



Εικόνα 18 : μαύρο: έγχυμα λυοφιλωμένο, μπλε: υδραλκολικό εκχύλισμα



Εικόνα 19 : μαύρο: έγχυμα λυοφιλιωμένο, κόκκινο: έγχυμα μη λυοφιλιωμένο

## 4. Συμπεράσματα

Η άρδευση και τα επίπεδα λίπανσης είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την παραγωγή αιθέριων ελαίων σε πολλά αρωματικά φυτά (Dudai, 2005). Οι επιδράσεις αυτών των παραμέτρων στο μεταβολισμό των φυτών, και συνεπώς στην παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών, εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τη διαθεσιμότητα ορυκτών στοιχείων στο έδαφος, τον τύπο εδάφους, τις κλιματικές συνθήκες, καθώς και τον τύπο του φυτού. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα επίπεδα λίπανσης και άρδευσης προκαλούν μια σειρά από επιδράσεις στην παραγωγή εκχυλισμάτων φυτών υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Τα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae έχουν πλούσιο περιεχόμενο δευτερογενών μεταβολιτών. Η ποσότητα και η σύνθεση τους ποικίλλουν ανάλογα με τα γενετικά χαρακτηριστικά, τις κλιματολογικές συνθήκες, τις τεχνικές καλλιέργειας και τεχνικές μετασυλλεκτικής (Soltanbeigi et al., 2021).

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες εκχύλισης του φασκόμηλου είναι το νερό, η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το εξάνιο και το αιθυλικό οξύ, από τους οποίους προκύπτει εμπλουτισμένο εκχύλισμα σε φαινόλες (καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ, ροσμανόλη, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ), флаβονοειδή (απιγενίνη, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, λουτεολίνη, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης) και πτητικά συστατικά αιθερίων ελαίων (1,8-κινεόλη, α/β-θουγιόνη, καμφορά, καμφένη, βορνεόλη, ασετικό νάτριο της βορνεόλης, β-πινένιο, μανόλη).

Η απόδοση δευτερογενών μεταβολιτών είναι υψηλότερη στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα σε σύγκριση με τα εγχύματα. Επιπλέον, η απόδοση δεν διαφέρει μεταξύ των αρδευόμενων και μη αρδευόμενων δειγμάτων, αν και παρατηρείται μια τάση μείωσης της απόδοσης σε συνθήκες μειωμένης λίπανσης.

Τα αρδευόμενα φασκόμηλα έχουν μεγαλύτερο ποσοστό ολικών φαινολικών σε σχέση με τα μη αρδευόμενα. Μια μικρή αύξηση στη λίπανση βελτιώνει το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον, τα εγχύματα περιέχουν περισσότερα φαινολικά συστατικά από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

Οι συνθήκες έλλειψης νερού βελτίωσαν την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε флаβονοειδή. Για τα υδατικά εκχυλίσματα, η μειωμένη λίπανση βελτίωσε την περιεκτικότητα σε флаβονοειδή, ενώ για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, τα καλύτερα αποτελέσματα προήλθαν από δείγματα με αυξημένη λίπανση. Συγκριτικά, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα έχουν μεγαλύτερες ποσότητες флаβονοειδών από τα υδατικά εκχυλίσματα.

Η αντιοξειδωτική δράση είναι υψηλότερη στα μη λυοφιλιωμένα εγχύματα των μη αρδευόμενων δειγμάτων και αυξάνεται με την αύξηση της λίπανσης. Παρόμοια



αποτελέσματα παρατηρούνται και στα λυοφιλωμένα δείγματα χωρίς σημαντικές διαφορές στο IC<sub>50</sub>. Το ίδιο ίσχυσε και στις δύο μεθόδους μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης. Τα εγχύματα παρουσιάζουν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

Η ευκαλυπτόλη είναι το κύριο πτητικό συστατικό σε όλες τις επεμβάσεις, ενώ ακολουθεί με μικρότερο ποσοστό η καμφορά. Στα αιθερικά εκχυλίσματα φασκόμηλου, η άρδευση και η μηδενική έως μέτρια λίπανση αυξάνουν τη συγκέντρωση ευκαλυπτόλης (9814 μg/g), α-πινενίου (937 μg/g), β-μυρκενίου (244 μg/g), καμφενίου (536 μg/g), β-θουγιόνης (643 μg/g) και μαννόλης (690 μg/g). Το καρυοφυλλένιο και το Terpinyl acetate επηρεάζονται θετικά υπό συνθήκες μέτριας λίπανσης (1160 μg/g και 428 μg/g, αντίστοιχα). Η χαμηλή λίπανση και η έλλειψη άρδευσης αυξάνουν τη συγκέντρωση του β-πινενίου (716 μg/g), της α-θουγιόνης (790 μg/g), της βορνεόλης (700 μg/g), της α-τερπινεόλης (933 μg/g) και του χουμουλενίου (399 μg/g). Μηδενική λίπανση και έλλειψη άρδευσης επηρεάζουν θετικά τις ποσότητες των Bornyl acetate (683 μg/g) και viridiflorol (270 μg/g). Ο συνδυασμός άρδευσης και λίπανσης αυξάνει την ποσότητα καμφοράς (2348 μg/g), η οποία είναι ανεπιθύμητη λόγω της τοξικότητάς της. Συμπερασματικά, μια μετρίως αρδευόμενη καλλιέργεια σε συνδυασμό με χαμηλά επίπεδα αζωτούχου λίπανσης είναι κατάλληλη για την παραγωγή ποιοτικού αιθέριου ελαίου που συμμορφώνεται με τα συνιστώμενα πρότυπα σχετικά με την καμφορά (ISO 9909 : 1997). Στα εγχύματα, η ευκαλυπτόλη (2427 μg/g), η β-θουγιόνη (114 μg/g), η α-τερπινεόλη (349 μg/g), το κουπαρένιο (79 μg/g) και το οξειδίο του καρυοφυλλενίου (249 μg/g) αυξάνονται υπό συνθήκες άρδευσης και μηδενικής λίπανσης. Η ποσότητα καμφοράς (768 μg/g) αυξάνεται με την αύξηση της λίπανσης και της άρδευσης. Η θουγιόνη (121 μg/g) και η βορνεόλη (280 μg/g) έχουν καλύτερα αποτελέσματα σε συνθήκες ξήρανσης.

Τέλος, ως προς τα φαινολικά και флаβονοειδή συστατικά, στα υδατικά εκχυλίσματα έχουν εκχυλισθεί περισσότερα συστατικά σε σχέση με τα υδρομεθανολικά. Το κύριο συστατικό σε όλες τις επεμβάσεις ήταν το ροσμαρινικό οξύ. Στα μεν εγχύματα η ποσότητά του ήταν πιο αυξημένη από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα και κυμάνθηκε από 5897,67 έως 12817,30 mAU\*s, με μεγαλύτερο ποσοστό να υπάρχει στα δείγματα τα οποία δεν ποτιζόντουσαν. Στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα η ποσότητα του ροσμαρινικού κυμάνθηκε από 5941,93 έως 9512,34 mAU\*s

## Βιβλιογραφία

1. Bhattarai N., Karki M., (2004). MEDICINAL, FOOD AND AROMATIC PLANTS | Medicinal and Aromatic Plants: Ethnobotany and Conservation Status, Encyclopedia of Forest Sciences (Pages 523-532)
2. Karousou R., Hanlidou E. & Kokkini, S. (2000). The sage plants of Greece: distribution and intraspecific variation in SAGE: The Genus *Salvia* (ed. Kintzios S. E.) Harwood Academic Publishers (Pages 27–46)
3. Kokkini, S., Karousou, R., & Hanlidou, E. (2003). HERBS | Herbs of the Labiatae. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Pages 3082–3090). Elsevier.
4. Hedge IC (1982) *Salvia* Linnaeus, In: Davis PH (ed), Flora of Turkey and the East Aegean islands, vol. 7. Edinburgh University Press, Edinburgh, (Pages 188-192).
5. Leontaritou P., Lamari F. N., Papatotiropoulos V., Iatrou G. (2020). Morphological, genetic and essential oil variation of Greek sage (*Salvia fruticosa* Mill.) populations from Greece Industrial Crops and Products
6. Boyer, J.S. (1982) Plant Productivity and Environment. Science, 218, 443-448.
7. Petropoulos, S. A., Daferera, D., Polissiou, M. G., & Passam, H. C. (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, 115(4), 393-397. doi: <http://10.1016/j.scienta.2007.10.008>.
8. Grella GE, Picci V (1988). Variation stragionali dell'olio essen-ziale di *Salvia officinalis*. *Fitoterapia* 59:97-102.
9. Santos-Gomes PC, Fernandes-Ferreira M (2001). Organ and season dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated in two different sites. *J Agric Food Chem* 49:2908-2916
10. R. Piccaglia, M. Marotti (1993). Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. *Flavour and fragrance journal* (Pages 115-122)
11. Li Yan Li, Craker L. E., Potter T. (1996). Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Horticulturae* 426: 419-426
12. Mathé I, Olah L, Mathé A, Miklossy V, Bernath J, Bluden G, Patel AV, Mathé I (1992). Changes in the essential oil pro-duction of *Salvia officinalis* under climatic conditions of the temperature belt. *Planta Med* 58: Suppl A 680.
13. Bernstein, N., M. Ioffe, M. Bruner, Y. Nishri, G.Luria, I. Dori, E. Matan, S. Philosoph-Hadas, N. Umiel, and A. Hagiladi. 2005. Effects of supplied nitrogen form and quantity on growth and postharvest quality of *Ranunculus asiaticus* flowers. *HortScience* 40:1879–1886

14. Koeduka T, Fridman E, Gang DR, et al. (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of coniferyl alcohol esters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:10128–10133.
15. Sharafzadeh, S., Khosh-Khui M., Javidnia K., (2011). Effect of nutrients on essential oil components, pigments and total phenol content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Advances in Environmental Biology*, 5(4): 639-646.
16. Arabaci O., Bayram E. (2004). The Effect of Nitrogen Fertilization and Different Plant Densities on Some Agronomic and Technologic Characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil). *Journal of Agronomy* (Pages: 255-262)
17. Hendawy S.F., Khalid K.A. (2011). Effect of chemical and organic fertilizers on yield and essential oil of chamomile flower heads. *Med. Aromatic Plant Sci. Biotechnol.* 5(1), 43–48.
18. Zheljzkov, V.D., Astatkie T., Schlegel V. (2012). Distillation Time Changes Oregano Essential Oil Yields and Composition but Not the Antioxidant or Antimicrobial Activities. *HORTSCIENCE* 47(6):777–784.
19. Barreyro, R., Ringuelet, J., and Agrícola, S. (2005). Nitrogen fertilization and yield in oregan (*Origanum x applii*). *Cienc. Invest. Agrar.* 32, 34–38. doi: 10.7764/rcia.v32i1.305
20. W. Letchamo and A. Gosselin (1995). Effects of HPS supplemental lighting and soil water levels on growth, essential oil content and composition of two thyme (*Thymus vulgaris* L.) clonal selections. *Canadian Journal of Plant Science* Volume 75
21. Putievsky, E., Ravid, U., Diwan-Rinzler, N., and Zohary, D. (1990). Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* and their hybrids. *Flavour Fragrance J.* 5 (2), 121–123  
<https://doi.org/10.1002/ffj.2730050213>.
22. Rajeswara Rao, B.R., Kaul, P.N., Mallavarapu, G.R. & Ramesh, S. 1996 Effect of seasonal changes on biomass yield and terpenoid composition of rose-scent geranium (*Pelargonium* species) *Biochem. Syst. Ecol.* 24 627 635
23. Bettaieb I, Zakhama N, Wannas WA, Kchouk ME, Marzouk B. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2009; 120: 271–275.
24. Corell M., Garcia C. M., Cermeno P. (2009). Effect of the deficit watering in the production and quality of the essential oil in the cultivation of *Salvia officinalis* L. *Acta Horticulturae*. 826:281-288
25. Pinto E, Salgueiro LR, Cavaleiro C, Palmeira A, Gonçalves MJ (2007). In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industr Crops Products*. 26(2):135-41

26. Delamare APL, Pistorello ITM, Artico L, Serafini LA, Echeverrigaray S (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 100(2):603-8.
27. Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsushiya T (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull.* 30(6):1147-49
28. Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M (2004). Atividade bacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Rev Saúde Pública* 38(2):326-8.
29. Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Cienc Rural.* 2012;42(2):326-31.
30. Σφλώμος Κ. «Χημεία Τροφίμων με Στοιχεία Διατροφής.», 2011: Κεφ. 4 Σελ. 267-276, Κεφ. 7 Σελ. 505-515.
31. Δημόπουλος Κ. και Αντωνοπούλου Σ. «Βασική Βιοχημεία.», Εκδ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, 2009:217-218, 63-69 (παράρτημα).
32. Δημόπουλος Κ. και Αντωνοπούλου Σ. «Βασική Βιοχημεία.», Εκδ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, 2009:217-218, 63-69 (παράρτημα).
33. Petropoulos S.A., Daferera D., Polissiou M.G., Passam H.C. (2008). The effect of water stress on the growth, yield and composition of essential oil of parsley *Scientia Horticulturae*. Volume 115, Issue 4, 21: Pages 393-397
34. Marschner H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Book • Second Edition
35. FILIZ ÖKTÜREN ASRI, MEMİŞ ENSAR ERTÜRK, MURAT ŞİMŞEK, FATİH ALPAY VURAN, FATMA UYSAL BAYAR (2023). Conventional and organic fertilization improve the growth responses and essential oil content of *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, (Pages 761-771)
36. Janmohammadi M, Sufi-Mahmoudi Z, Ahadnezhad A, Yousefzadeh S, Sabaghnia N (2014). Influence of chemical and organic fertilizer on growth, yield and essential oil of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 103 (1): (Pages 73-81)
37. Esmailpour B, Rahmanian M, Heidarpour O, Shahriari MH (2017). Effect of vermicompost and spent mushroom compost on the nutrient and essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 20 (5): 1283-1292.
38. Khalid KA, Hussein MS (2012). Effect of cattle and liquid manures on essential oil and antioxidant activities of celery (*Apium graveolens* L.) fruits. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 15: 97-107.

39. Duran Katar, Nimet Katar, Mustafa Can (2021). Agricultural and quality characteristics of sage (*Salvia fruticosa* Mill.) depending on nitrogen applications Journal of Plant Nutrition (Pages 1441-1449)
40. Aydın D, Katar N, Katar D, Olgun M (2019). Determination of the effect of different drying temperatures on the content and chemical composition of essential oil of sage (*Salvia fruticosa* Mill. = *Salvia tribola* L.). International Journal of Agricultural and Wildlife Sciences 5 (1): (Pages 103-109)
41. Soltanbeigi A, Yıldız M, Diraman H, Terzi H, Sakartepe E et al. (2021). Growth responses and essential oil profile of *Salvia officinalis* L. influenced by water deficit and various nutrient sources in the greenhouse. Saudi Journal of Biological Sciences 28 (12): 7327-7335.
42. Sara F. Vieira, Helena Ferreira, Nuno M. Neves (2020). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Cytocompatible *Salvia officinalis* Extracts: A Comparison between Traditional and Soxhlet Extraction. Antioxidants, 9(11), 1157; <https://doi.org/10.3390/antiox9111157>
43. Ingmars Cinkmanis, Fredijs Dimins, Velga Mikelsona (2017). Influence of lyophilization and convective type drying on antioxidant properties, total phenols and flavonoids in pollens. Foodbalt 2017 (Pages 201-203)
44. Uysal S. (2018). A comparative study of three drying methods on the phenolic profile and biological activities of *Salvia absconditiflora*. Journal of Food Measurement and Characterization
45. Charlene Silvestin Celi Garcia, Mariana Roesch Ely, Ronaldo Adelfo Wasum, Bárbara Catarina de Antoni Zoppa, Cláudia Wollheim, Gilda Ângela Neves, Valéria Weiss Angeli, Kellen Cristhinia (2012). Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. Borges de Souza Rev Ciênc Farm Básica Apl., 33(4):509-514
46. Sonmez C., Bayram E. (2017). The Influence of Different Water And Nitrogen Applications On Some Yield Parameters And Antioxidant Activity In Sage (*Salvia officinalis* L.). Volume 22, Issue 1, 96 - 103
47. Munne-Bosch S., Jubany-Mari T., Alegre R., (2001). Droughtinduced senescence is characterized by a loss of antioxidant defenses in chloroplasts. Plant. Cell and Environment. 24:1319-1327.
48. Pellegrini, E., A. Francini, G. Lorenzini, C. Nali, (2015). Ecophysiological and antioxidant traits of *Salvia officinalis* under ozone stress. Environ. Sci. Pollut. Res. 22:13083–13093
49. Bettaieb, I., N. Zakhama, W.A. Wannes, M. E. Kchouk, B. Marzouk, (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Scientia Horticulturae 120(2): 271-275
50. Najmeh Vosoughi, Masoud Gomarian, Abdollah Ghasemi Pirbaloutic, Shahab Khaghani, Fatemeh Malekpoor (2018). Essential oil composition and total phenolic,

flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Industrial Crops & Products* 117 (pages 336-374)

51. Natália Martins, Lillian Barros, Celestino Santos-Buelga, Mariana Henriques, Sónia Silva, Isabel C.F.R. Ferreira (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.096>
52. Zimmermann, B.F., Walch, S.G., Tinzoh, L.N., Stühlinger, W., & Lachenmeier, D.W. (2011). Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Journal of Chromatography. B*, 879, 2459-2464.
53. Govahi, M., Ghalavand, A., Nadjafi, F., & Sorooshzadeh, A. (2015). Comparing different soil fertility systems in Sage (*Salvia officinalis*) under water deficiency. *Industrial Crops and Products*, 74, 20–27. doi:10.1016/j.indcrop.2015.04.053
54. Maryam Mohammadi-Cheraghabadi, Seyed Ali Mohammad Modarres-Sanavy, Fatemeh Sefidkon, Ali Mokhtassi-Bidgoli, Saeid Hazrati (2021). Phytochemical and physiological changes in *Salvia officinalis* L. under different irrigation regimes by exogenous applications of putrescine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 28, Pages 7227-7240
55. Rioba, N. B., Itulya, F. M., Saidi, M., Dudai, N., & Bernstein, N. (2015). Effects of nitrogen, phosphorus and irrigation frequency on essential oil content and composition of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 21–29. doi:10.1016/j.jarmap.2015.01.003
56. Dudai N, 2005. Factors affecting content and composition of essential oils in aromatic plants. In: Dris R (Ed.), *Crops Growth, Quality and Biotechnology. Part III: Quality Management of Food Crops for Processing Technology*. WFL Publisher, Helsinki, Finland, pp. 77–90.
57. ISO 9909, 1997. Oil of Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.). American National Standards Institute (ANSI), New York.
58. Baghalian K, Abdoshah S, Khalighi-Sigaroodi F, Paknejad F, 2011. Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 201–207.