

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών  
και φαρμακευτικών φυτών της Μεσογειακής χλωρίδας.  
Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηρότητας»*

**ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΑΝΑΣΤΑΣΑΚΗ**

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσιού

**ΑΘΗΝΑ 2014**

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών  
και φαρμακευτικών φυτών της Μεσογειακής χλωρίδας.  
Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηρότητας»*

**ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΑΝΑΣΤΑΣΑΚΗ**

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσιού

**ΑΘΗΝΑ 2014**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

***«Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της Μεσογειακής χλωρίδας. Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηρότητας»***

**ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΑΝΑΣΤΑΣΑΚΗ**

**Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσίου**

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

Μόσχος Πολυσίου, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α. (μέλος)

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (μέλος)

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

Μόσχος Πολυσίου, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ευθυμία Τσακαλίδου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθανάσιος Κυμπάρης, Επίκουρος Καθηγητής Δ.Π.Θ.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

*Σε αυτούς που έφυγαν,*

*Σε αυτούς που με αγαπούν και με στηρίζουν,*



## Ευχαριστίες

Η διδακτορική αυτή διατριβή ουσιαστικά κλείνει ένα μεγάλο κεφάλαιο της ζωής μου που άρχισε πριν από 15 χρόνια. Ήταν χρόνια αέναης αναζήτησης για το καλύτερο και για το δημιουργικό. Ήταν χρόνια σκληρής δουλειάς, αλλά και ευκαιριών. Ήταν χρόνια νέων γνωριμιών που μετατράπηκαν σε δυνατές φιλίες. Ήταν χρόνια μεγάλων αναπροσαρμογών και μεγάλων απωλειών.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Μόσχο Πολυσίου υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα διατριβή. Τον ευχαριστώ πολύ για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου παρείχε όλα τα χρόνια της ερευνητικής και εργασιακής μου σταδιοδρομίας στο εργαστήριο Χημείας. Τον ευχαριστώ πολύ για τις ευκαιρίες που μου έδωσε μέσα από τα ερευνητικά προγράμματα που συμμετείχα να γνωρίσω άλλους ερευνητές και πολλά νέα μέρη. Τον ευχαριστώ για την κατανόησή του σε δύσκολες στιγμές της ζωής μου που δε μπορούσα να ανταπεξέλθω στα καθήκοντά μου. Η καθοδήγησή και η ενθάρρυνσή του όλους τους μήνες της συγγραφής και διόρθωσης της διατριβής ήταν καθοριστική και συγκινητική.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής την Καθηγήτρια Γ.Π.Α. κα. Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε όλα τα χρόνια και ένα θερμό ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Πέτρο Ταραντίλη, ο οποίος με βοήθησε ιδιαίτερως στην αρχή της διατριβής. Ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να με ενθαρρύνει στις δύσκολες στιγμές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, για την τιμή που μου κάνανε να συμμετέχουν στην κρίση της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ πολύ την Καθηγήτρια Γ.Π.Α. Κα. Έφη Τσακαλίδου, Διευθύντρια του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για τη δυνατότητα να δουλέψω στο χώρο του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και να πραγματοποιήσω τα πειράματα της αντιμικροβιακής δράσης, την ευχαριστώ πολύ για το ενδιαφέρον της και τις συμβουλές της. Ευχαριστώ τον Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, που μου έδωσε τις βασικές γνώσεις της

μικροβιολογίας. Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Χρήστο Παππά για την καλή συνεργασία όλα τα χρόνια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Τα ευχαριστώ προς τον Επίκουρο Καθηγητή Δ.Π.Θ. κ. Αθανάσιο Κυμπάρη είναι ξεχωριστά. Η μεταλαμπάδευση των γνώσεων του σε θέματα χημείας και η παρουσία του στον εργαστηριακό χώρο ήταν καθοριστική. Τον ευχαριστώ πολύ για τις συζητήσεις μας και τη ρεαλιστική αντιμετώπιση των καταστάσεων.

Στο εργαστήριο Χημείας είχα την τύχη να συνεργαστώ με ανθρώπους που έγιναν και καλοί φίλοι και συγγενείς. Οι ώρες της εργαστηριακής ζωής κύλησαν τόσο ευχάριστα μαζί τους, τους ευχαριστώ όλους πάρα πολύ. Δεν υπάρχουν λόγια για το Δρ. Χάρη Κανάκη, ήταν ο πρώτος άνθρωπος με τον οποίο συνεργάστηκα στο εργαστήριο. Η φιλία και η κουμπαριά μας είναι πολύ σημαντικά για μένα. Ένα ευχαριστώ για τις όμορφες στιγμές εντός και εκτός εργαστηρίου και την άριστη συνεργασία που είχαμε με τον υποψήφιο διδάκτορα Λευτέρη Πετράκη, τη Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα, τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. Νάντια Ασπρακά και Γιώργο Κόσσυφα. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη Νάντια για τη βοήθεια της στις αναλύσεις με LC-DAD/MS.

Η ζωή τα φέρνει έτσι που τα τελικά πειράματα της διδακτορικής διατριβής ολοκληρώθηκαν στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Ένας χώρος από τον οποίο άρχισε η ενασχόληση μου με την έρευνα, το 2003, με την καθοδήγηση ενός ανθρώπου που δεν είναι πια στη ζωή, του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Κανδαράκη. Σε αυτόν ουσιαστικά οφείλω την ερευνητική πορεία μου, μιας και με εμπιστεύθηκε να συμμετάσχω σε ερευνητικό πρόγραμμα του εργαστηρίου. Δε θα ξεχάσω τις συζητήσεις μας στο γραφείο του για όλα τα θέματα που τον απασχολούσαν και πάντα μέσα από αυτές έβγαινε η αγάπη του για τα παιδιά του.

Ήταν μεγάλη ικανοποίηση και ευχαρίστηση να συνεργαστώ και να δουλέψω ξανά στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου, και ιδιαίτερα τη Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη, για τις πρωινές τις ανανεώσεις, τη Δρ. Ράνια Αναστασίου, το Δρ. Κώστα Παπαδημητρίου που με τις εύστοχες παρατηρήσεις του άνοιξε μια νέα συνεργασία για την περαιτέρω αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της διατριβής, τη κα. Δήμητρα Κυτίνου, τη κα. Βαγγελιώ Ζωίδου, την κα. Ευγενία Μανωλοπούλου και τη Δρ. Κάτια Γεωργάλα για όλη τη συνεργασία τους αυτά τα χρόνια.



Το ευχαριστώ προς Δρ. Γεωργία Ζουμποπούλου είναι τόσο εγκάρδιο. Υπήρξε ο άνθρωπος που με βοήθησε στο σχεδιασμό και στην εκτέλεση των αντιμικροβιακών πειραμάτων, σε μια δύσκολη χρονικά καμπή της διατριβής. Την ευχαριστώ πολύ για την ενθάρρυνση της και την πίστη της ότι θα τα καταφέρουμε.

Ευχαριστώ τη Γεωργία Κανέλλου, τη Μαριαλένα Μεταλληνού και το Σπύρο Δαούση που κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών τους στο ΠΜΣ «Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία» εκπόνησαν τη μεταπτυχιακή τους διατριβή στο εργαστήριο Χημείας. Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου εντός και εκτός εργαστηρίου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που όλα αυτά τα χρόνια με στήριξε, ιδιαίτερα τη μητέρα μου, Ελένη, για την υπομονή της και την κατανόηση της και την αδερφή μου, Δήμητρα. Ελπίζω ο πατέρας μου, Γιώργος, να με βλέπει από εκεί ψηλά και να είναι περήφανος για μένα. Ένα ευχαριστώ στο Νίκο μου και την οικογένεια του, για την αγάπη του, τη συμπαράσταση του και την κατανόηση σε όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας.

Αθήνα, Μάρτιος 2014

Ειρήνη Γ. Αναστασάκη

## Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της μεσογειακής χλωρίδας. Ο στόχος ήταν η ταυτοποίηση των κύριων συστατικών τους και η αξιολόγηση της εν δυνάμει βιολογική τους δράσης.

Μελετήθηκαν τα φυτά: δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.), δίκταμο (*Origanum dictamnus* L.), κρόκος Κοζάνης (*Crocus sativus* L.), μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.), φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.) και χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.). Η παραλαβή των υδατικών εκχυλισμάτων προσομοιάστηκε με τη συνήθη χρήση αυτών σε μορφή αφεψήματος (2 g σε 1 κούπα τσαγιού-200mL νερού θερμοκρασίας 85 °C), ενώ επιπλέον μελετήθηκε και η εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ή χωρίς τη βοήθεια λουτρό υπερήχων. Στη συνέχεια, έγινε εκχύλιση των παραπάνω εκχυλισμάτων με οργανικό διαλύτη προκειμένου να παραλάβουμε τα συστατικά εκείνα που προσδίδουν το άρωμα των αφεψημάτων και των υδατικών εκχυλισμάτων.

Στα παραπάνω εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ η εκτίμηση της αντιοξειδωτική δράσης έγινε με τις μεθόδους ABTS και DPPH. Η αντιβακτηριακή δράση αυτών εκτιμήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA) έναντι 19 θετικών κατά Gram και 5 αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ακολούθως, η οργανική φάση αναλύθηκε με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC/MS), ενώ έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (LC/MS) και ανιχνευτή φωτοδιόδων (DAD).

Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι τα παραπάνω εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 8,1 και 195,2 mg καφεϊκού οξέος/200 mL. Παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και με τις δυο μεθόδους, η οποία είχε θετική γραμμική συσχέτιση με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο ( $r_{\text{FOLIN-ABTS}}=0.979$ ;  $r_{\text{FOLIN-DPPH}}=0.971$ ,  $p<0.01$ ). Το μελισσόχορτο ήταν αυτό που παρουσίασε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά (195.2 mg καφεϊκού οξέος/200mL) και την αντιοξειδωτική ικανότητα (1321,7  $\mu\text{mol Trolox/mL}$

για ABTS and 1206,3  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  για DPPH) σε σχέση με τα άλλα φυτά και με όλους τους τρόπους παραλαβής. Η εκχύλιση με ζεστό νερό υπερείχε τόσο έναντι της εκχύλισης με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όσο και όταν η τελευταία υποβοηθήθηκε με υπερήχους. Μόνο τα υδατικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου παρουσίασαν, και με τους τρεις τρόπους παρασκευής, αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους *Clostridium sporogenes* LMG 8421<sup>T</sup>, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του στελέχους *Clostridium sporogenes* LMG 14743.

Επειδή, η αντιοξειδωτική δράση των αφεψημάτων έχει συσχετιστεί με την περιεκτικότητα αυτών σε φαινολικά συστατικά, αυτά μελετήθηκαν με υγρή χρωματογραφία. Τα αφεψήματα ήταν πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Το ροσμαρινικό οξύ ήταν το συστατικό που βρέθηκε σε όλα τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae. Την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ την κατέχει το μελισσόχορτο (14.923,9  $\mu\text{g/g}$  φ.υ.) και τη χαμηλότερη το δεντρολίβανο (86,2  $\mu\text{g/g}$  φ.υ.). Η χρωματογραφική ανάλυση της οργανικής φάσης των αφεψημάτων αποτυπώνει ένα διαφορετικό προφίλ ουσιών σε σχέση με αυτό του αντίστοιχου αιθέριου ελαίου, όπου παρατηρείται μια απώλεια ή απουσία των πιο πτητικών ενώσεων και ιδιαίτερα των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων, ενώ ενισχύεται η περιεκτικότητά τους σε οξυγονούχα τερπένια και πολικά συστατικά.

Για την παραλαβή των οργανικών εκχυλισμάτων, έγινε διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας κατά σειρά: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη. Στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ικανότητα. Ακολούθως έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των κύριων συστατικών.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, όπου η κατάταξη με φθίνουσα σειρά είναι μελισσόχορτο (64,3  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/ $\text{g}$  φ.υ.), δεντρολίβανο (55,2  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/ $\text{g}$  φ.υ.), δίκταμο (51,5  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/ $\text{g}$  φ.υ.), φασκόμηλο (43,2  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/ $\text{g}$  φ.υ.), χαμομήλι (49,9  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/ $\text{g}$  φ.υ.) και κρόκος (26,9  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/ $\text{g}$  φ.υ.). Αντίστοιχη σειρά κατάταξης παρατηρείται και στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Στα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα παραλαμβάνονται πτητικά συστατικά, τα οποία αποτελούν τα κύρια συστατικά του αντίστοιχου αιθέριου

ελαίου. Στα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα ταυτοποιήθηκαν φαινολικά συστατικά, κυρίως άγλυκα μέρη των φλαβονοειδών και τερπενικά παράγωγα. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας Lamiaceae, το ροσμαρινικό οξύ ήταν η κύρια ένωση. Ταυτοποιήθηκαν επίσης παράγωγα αυτού, κυρίως ισομερή σαλβιανολικού οξέος καθώς και φλαβονοειδή κυρίως σε μορφή γλυκοζιτών.

Σε αντίθεση με τα υδατικά εκχυλίσματα, τα οργανικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών που εξετάστηκαν. Σε όλες τις περιπτώσεις μικροοργανισμών-στόχων, τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα παρουσίασαν την πιο αξιοσημείωτη δράση. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα, αυτά του δίκταμου και του δεντρολίβανου, ακολουθούμενο από αυτό του φασκόμηλου παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των θετικά κατά Gram βακτηρίων παθογόνων της στοματικής κοιλότητας και παθογόνων τροφίμων. Τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, του χαμομηλιού και του κρόκου εμφάνισαν αρκετά μικρότερη δράση, ενώ σε κάποια στελέχη ήταν ανενεργά. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα συγκριτικά με τα άλλα δυο οργανικά εκχυλίσματα εμφανίζουν μικρότερη παρεμποδιστική δράση. Τα αρνητικά κατά Gram βακτηρία ήταν πιο ανθεκτικά.

Από την αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, έγινε επιλογή ζευγών μικροοργανισμών-στόχων και εκχυλισμάτων και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση με τη μέθοδο έλεγχου της βακτηριοκτόνου δράσης (Killing assay-KA). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία FT-IR για την ανίχνευση των αλλαγών στα δομικά συστατικά των κυττάρων των μικροοργανισμών-στόχων. Μελετώντας τις χαρακτηριστικές περιοχές του φάσματος καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μεγαλύτερη διαφοροποίηση έγκειται σε μεταβολές της δομικής διευθέτησης των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, στους πολυσακχαρίτες και στα φωσφορολιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές Επιστήμες

Άλλες επιστήμες

Λέξεις- Κλειδιά: Αρωματικά Φυτά; Αφεψήματα; Αντιοξειδωτική Δράση; Αντιμικροβιακή Δράση; Φασματοσκοπία FT-IR

## Abstract

The aim of this thesis was to study aqueous and organic extracts of aromatic and medicinal plants of the Mediterranean flora. The main goal was to identify the major components and to evaluate their potential biological activity.

The plants studied were rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), dittany (*Origanum dictamnus* L.), saffron (*Crocus sativus* L.), lemon balm (*Melissa officianalis* L.), sage (*Salvia officianlis* L.) and chamomile (*Matricaria recutita* L.). Aqueous extracts were prepared in beverage form (2 g in 1 cup tea-200mL of water at 85 °C), additionally extractions with water in ambient temperature with or without the use of ultrasounds water bath, were studied. Then the above extracts were further extracted with organic solvent in order to receive those components responsible for the aroma of herbal extracts.

The content of total phenolic compounds in plant extracts was determined by Folin–Ciocalteu method, while the antioxidant activity was estimated with ABTS and DPPH assay. Well diffusion assay (WDA) was used for the antimicrobial screening against 19 Gram positive and 5 Gram negative bacterial strains. GC-MS and LC-DAD/MS analyses were carried out in order to indentify the major components.

The results indicate that the aqueous extracts were rich in phenolic compounds, values ranging from 8,1 to 195,2 mg caffeic acid/200mL, possessing also a remarkable antioxidant activity. A linear positive correlation was achieved between total phenolic content and antioxidant activity ( $r_{\text{FOLIN-ABTS}}=0.979$ ;  $r_{\text{FOLIN-DPPH}}=0.971$ ,  $p<0.01$ ). Lemon balm showed the highest values in total phenolic content (195,2 mg caffeicacid/200mL) and antioxidant activity (1321,7  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  for ABTS and 1206,3  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  for DPPH) independently of the extraction process. Aqueous extracts exhibited no antimicrobial activity; expect the case of lemon balm aqueous extracts against *Clostridium sporogenes* LMG 8421<sup>T</sup>.

The infusions were rich in phenolic acids and flavonoids. Rosmarinic acid was the compound found in all plants of the family *Lamiaceae*. The highest content posses lemon balm (14.923,9  $\mu\text{g/g plant}$ ) and the lowest rosemary (86,2  $\mu\text{g/g plant}$ ). The chromatographic analysis of the organic phase of herbal shows a different profile than that of the corresponding essential oil. The loss or absence of the most volatile

compounds and particularly monoterpene hydrocarbons and the enhancement in content of oxygenated terpenes and polar components is observed.

Plants were subjected to sequential extraction with petroleum ether, diethyl ether and methanol. The total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity were determined in the organic extracts as above. Then the qualitative and quantitative determination of major components was followed. The higher content of total phenolic compounds was observed, as expected, in the methanolic extracts of plants, wherein the ranking in decreasing order is lemon balm (64,3 mg gallic acid/g plant), rosemary (55,2 mg gallic acid /g plant), dittany (51,5 mg gallic acid/g plant), sage (43,2 mg gallic acid/g plant), chamomile (49,9 mg gallic acid/g plant) and saffron (26,9 mg gallic acid/g plant). A similar ranking was observed in the determination of antioxidant activity.

In petroleum ether extracts volatile constituents, which are the main components of the corresponding essential oil, were identified. The diethyl ether extracts were abundant in phenolic compounds, mainly aglycone flavonoids and terpene derivatives. In methanolic extracts of plants of the family Lamiaceae, the rosmarinic acid was the major component. Also its derivatives, mainly isomers of salvianolic acid were identified and flavonoids predominantly in glycoside form.

In contrast to the aqueous extracts, organic ones showed strong antimicrobial activity against the strains tested. In all cases, diethyl ether extracts showed the most remarkable effect. As to the petroleum ether extracts, dittany, rosemary and sage, show greater antimicrobial activity against Gram positive pathogenic bacteria of the oral cavity and food pathogens. The relevant extracts of lemon balm, chamomile and saffron showed much smaller effect, while in some strains were inactive. The methanol extracts compared with the other two organic extracts exhibit less inhibition. Gram negative bacteria were more resistant. The antimicrobial activity of the above extracts was found to be due to the phenolic compounds.

From the evaluation of these results, pairs of microorganisms-targets and extracts were selected and were then studied in killing assay studies. Further, the FT-IR spectroscopy was used in order to reveal changes in the structural components of the cells. Studying the functional regions of the spectrum, we concluded that the

greater changes was achieved regarding in the structural arrangement of the cell membrane lipids, polysaccharides and the phospholipids in the cell wall.

Discipline: Agricultural Sciences

Other Agricultural Sciences

Keywords: Aromatic plants; Infusions; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; FT-IR spectroscopy

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	iv
Abstract .....	vii
Περιεχόμενα .....	x

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>1. Πηγές δευτερογενών μεταβολιτών: Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά της Μεσογειακής Χλωρίδας .....</b>	<b>3</b>
1.1. Εισαγωγή .....	3
1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες .....	4
1.3. Ταξινόμηση Δευτερογενών Μεταβολιτών .....	5
1.3.1. Φαινολικές Ενώσεις .....	6
1.3.2. Τερπένια .....	11
<b>2. Βιολογική Δράση Δευτερογενών Μεταβολιτών .....</b>	<b>16</b>
2.1. Αντιοξειδωτική Δράση .....	16
2.1.1. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών .....	18
2.1.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	21
2.1.3. Σχέση δομής και αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	23
2.2. Αντιμικροβιακή Δράση .....	25
2.2.1. Μηχανισμός αντιβακτηριδιακής δράσης.....	27
2.3. Άλλες βιολογικές δράσεις.....	28
<b>3. Παρουσίαση των Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών της Μεσογειακής Χλωρίδας .....</b>	<b>29</b>
3.1. Δεντρολίβανο- <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (οικ. Lamiaceae) .....	29
3.2. Δίκταμο- <i>Origanum dictamnus</i> L. (οικ. Lamiaceae) .....	31
3.3. Μελισσόχορτο- <i>Melissa officinalis</i> L. (οικ. Lamiaceae).....	32
3.4. Κρόκος- <i>Crocus sativus</i> L. (οικ. Iridaceae) .....	33
3.5. Φασκόμηλο- <i>Salvia officinalis</i> L. (οικ. Lamiaceae) .....	34
3.6. Χαμομήλι- <i>Marticaria recutita</i> L. (οικ. Asteraceae) .....	35
3.7. Προοπτικές καλλιέργειας αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών .....	37
<b>ΣΚΟΠΟΣ .....</b>	<b>39</b>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας <i>in vitro</i> αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b> .....	43
1.1. Προμήθεια φυτικού υλικού .....	43
1.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	43
1.2.1. Εκχύλιση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος .....	44
1.2.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη σε λουτρό υπερήχων.....	45
1.2.3. Εκχύλιση σε θερμοκρασία 85 °C.....	46
1.2.4. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη .....	46
1.2.5. Λυοφιλίωση.....	46
1.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu .....	47
1.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου-DPPH* .....	48
1.5. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)-ABTS** .....	50
1.6. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR .....	52
1.7. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR .....	53
<b>2. Χρωματογραφική μελέτη πτητικών και φαινολικών συστατικών αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b> .....	54
2.1. Μελέτη των εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	54
2.2. Μελέτη των αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	55
2.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών .....	56
2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών .....	56
2.2. Μελέτη των αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (LC-MS) .....	57
<b>3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας <i>in vitro</i> οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b> .....	58
3.1. Προμήθεια φυτικού υλικού .....	58
3.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	58
3.2.1. Εκχύλιση υποβοηθούμενη σε λουτρό υπερήχων.....	59
3.2.2. Εκχύλιση υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος .....	60
3.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu .....	60
3.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH* .....	61

3.5. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH*	61
<b>4. Χρωματογραφική μελέτη πτητικών και φαινολικών συστατικών οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b>	<b>63</b>
4.1. Μελέτη των εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία	63
4.1.1. Ποιοτικός προσδιορισμός	63
4.1.2. Ποσοτικός προσδιορισμός	63
4.2. Μελέτη των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία	65
4.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός	65
4.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός	67
<b>5. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b>	<b>71</b>
5.1. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων <i>in vitro</i>	71
5.1.1. Μικροοργανισμοί και ανανεώσεις	71
5.1.2. Μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well Diffusion assay-WDA)	73
5.1.3. Μέθοδος ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης (Killing assay-KA)	74
5.2. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR	75
5.2.1. Μικροοργανισμοί και ανανεώσεις	75
5.2.2. Παρασκευή δειγμάτων για ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR	76
5.2.3. Λήψη φασμάτων FT-IR και επεξεργασία	77

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

<b>1. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b>	<b>81</b>
1.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά	81
1.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας	89
1.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR	96
1.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR	101
<b>2. Χρωματογραφική μελέτη πτητικών και φαινολικών συστατικών αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών</b>	<b>105</b>
2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός των εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)	105
2.2. Χρωματογραφική ανάλυση αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC-DAD, LC-MS)	116
2.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός	116
2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός	130

<b>3. Εκχύλιση και χρωματογραφική μελέτη οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών .....</b>	<b>140</b>
3.1. Παραλαβή οργανικών εκχυλισμάτων και αποδόσεις .....	140
3.2. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία (GC-MS/FID) .....	143
3.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός .....	143
3.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός .....	157
3.3. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD/MS) .....	164
3.3.1. Ποιοτικός προσδιορισμός .....	164
3.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός .....	195
<b>4. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών .....</b>	<b>211</b>
4.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά .....	211
4.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	215
<b>5. Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών .....</b>	<b>225</b>
5.1. <i>In vitro</i> μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο διάχυσης περκειμένου σε άγαρ(Well diffusion assay- WDA) .....	225
5.1.1. <i>In vitro</i> αντιμικροβιακή δράση υδατικών εκχυλισμάτων .....	225
5.1.1. <i>In vitro</i> αντιμικροβιακή δράση οργανικών εκχυλισμάτων .....	227
5.2. <i>In vitro</i> μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης (Killind assay- KA) .....	246
5.3. <i>In vitro</i> μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR .....	255
5.1.1. Φάσματα FT-IR .....	255
5.1.2. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal component analysis- PCA) στα φάσματα FT-IR των κυττάρων .....	263
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>273</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>281</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>309</b>
<b>Περιεχόμενα εικόνων .....</b>	<b>323</b>
<b>Περιεχόμενα πινάκων .....</b>	<b>324</b>
<b>Περιεχόμενα σχημάτων .....</b>	<b>327</b>

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 1. Πηγές Δευτερογενών μεταβολιτών: Αρωματικά και Φαρμακευτικά της Μεσογειακής Χλωρίδας

### 1.1. Εισαγωγή

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα σε όλο τον κόσμο για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες καθώς και για την ικανότητά τους να προσδίδουν ιδιαίτερη γεύση και άρωμα στα φαγητά.

Αρωματικά θεωρούνται όλα εκείνα τα φυτά, τα οποία αναδύουν μια χαρακτηριστική οσμή οφειλόμενη στα αιθέρια έλαια. Ένα αξιοσημείωτο μορφολογικό χαρακτηριστικό είναι η παρουσία αδενωδών και μη τριχών σε όλα τα υπέργεια τμήματα των φυτών. Οι αδενώδεις τρίχες στα φύλλα και στους βλαστούς εκκρίνουν αιθέρια έλαια. Τα αρωματικά φυτά χαρακτηρίζονται και ως φαρμακευτικά ή φυτοθεραπευτικά επειδή περιέχουν ποικίλα βιοδραστικά συστατικά.

Τα φυτά ωστόσο δεν άρχισαν να εξετάζονται από καθαρά ακαδημαϊκό ενδιαφέρον αλλά από την χρησιμότητά τους από πολύ παλιά ως χρωστικές ουσίες, ίνες, πολυμερή, κόλλες, έλαια, κήροι, αρωματικοί παράγοντες, αρώματα και φάρμακα.

Είναι πλέον γνωστό ότι το σύνολο των ιδιοτήτων τους αποδίδεται σε χημικές ουσίες, που τα ίδια παράγουν, γνωστές με τον όρο δευτερογενείς μεταβολίτες ή φυσικά προϊόντα ή φυτοχημικά και σήμερα μελετάται η πιθανή τους χρήση για την πρόληψη, την ίαση ή/και τη συμπληρωματική θεραπεία εκφυλιστικών νοσημάτων. Κατ' επέκταση η χρήση τους είτε ως τρόφιμα, μέσω των αφεψημάτων αυτών, είτε σε συμπληρωματικά στα τρόφιμα, μας επιβάλλει να τα διερευνήσουμε.

Για να κατανοηθούν όμως οι χρήσεις των φαρμακευτικών φυτών και οι τρόποι που ενεργούν είναι αναγκαίο να αναφερθούν τα ενεργά τους συστατικά, δηλαδή, οι δευτερογενείς μεταβολίτες και η αποτελεσματικότητά τους.

## 1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Σήμερα σαν φυσικά προϊόντα έχει καθιερωθεί να χαρακτηρίζονται τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού, ουσίες που παράγονται για συγκεκριμένο λόγο από ζωντανούς φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς, χωρίς να συμμετέχουν στη βασική οργανική του λειτουργία. Ο ρόλος τους στον οργανισμό που τους εκκρίνει, είναι να λειτουργούν ως σημειοχημικές ή τοξικές ουσίες ή ρυθμιστές συγκεκριμένης βιολογικής λειτουργίας (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998).

Πιο συγκεκριμένα συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών με την ενίσχυση του φυτικού σκελετού και με την αντοχή απέναντι σε μύκητες και έντομα (Appel, 1993; Harbone και Williams, 2000). Πολλά από αυτά είναι συτφά στη γεύση και εμφανίζουν τοξικότητα με αποτέλεσμα την αποτροπή κατανάλωσής τους από τα φυτοφάγα ζώα και έντομα.

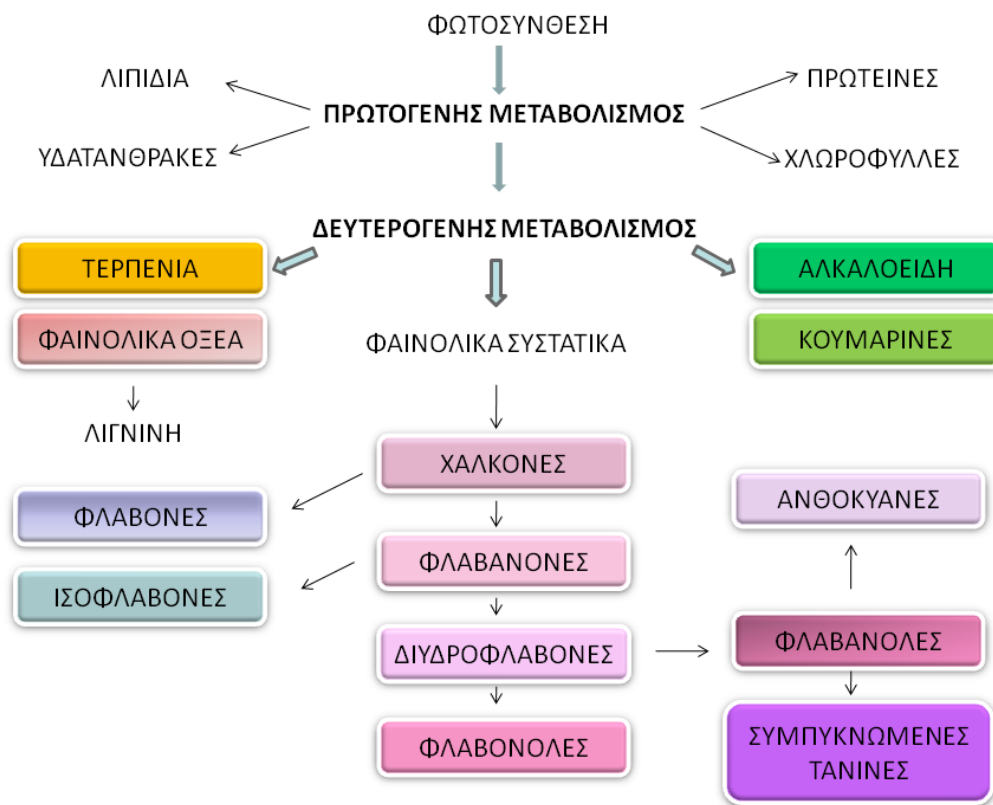
Επιπλέον, προστατεύουν τα φυτά από την επιβλαβή UV ακτινοβολία (Harbone και Williams, 2000). Μία από τις σημαντικότερες φυσιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών είναι η αλληλοπάθεια. Με τον όρο αυτό εννοούμε την ικανότητα τους να απελευθερώνονται στο περιβάλλον του φυτού που τις εκκρίνει, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη άλλων φυτών. Έτσι, μειώνεται ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και νερό που ενδεχομένως θα προέκυπτε (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998).

Τα καροτενοειδή και τα φαινολικά συστατικά, κυρίως οι ανθοκυανίνες με την ταυτόχρονη παρουσία φλαβονών, φλαβονολών και τανινών, είναι υπεύθυνα για το χρωματισμό των καρπών και των ανθέων. Η ποικιλία χρωμάτων δρα ελκυστικά προσελκύοντας τα έντομα- επικονιαστές που μεταφέρουν τη γύρη και συμβάλλουν στη διασπορά σπόρων των φυτών (Harbone, 1998; Seigler, 1998).

Οι ουσίες που χρησιμοποιούν οι οργανισμοί για απώθηση των εχθρών και την γενικότερη προστασία τους, κάτω από το σύγχρονο πρίσμα της έρευνας έχουν γίνει αντικείμενα μελέτης πολυετών και πολυδάπανων ερευνητικών προσπαθειών για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, ουσιών για τη βελτίωση της διατροφής του ανθρώπου και σύγχρονων μέσων καταπολέμησης ασθενειών των φυτών και των ζώων.

### 1.3. Ταξινόμηση Δευτερογενών Μεταβολιτών

Από άποψη δομής, οι τάξεις ενώσεων που συνδέονται με τους δευτερογενείς μεταβολίτες είναι: φαινολικές ουσίες (φαινολικά οξέα, ανθοκυάνες, φλαβονοειδή), τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή και πολλά ετεροκυκλικά παράγωγα. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν υδατάνθρακες, α-αμινοξέα, πρωτεΐνες, λίπη, νουκλεϊνικά οξέα κ.λ.π., που είναι θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων πρακτικά των οργανισμών, χρησιμοποιούνται σαν πρόδρομες ενώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών (Σχήμα 1.1).



**Σχήμα 1.1.** Συσχέτιση πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (προσαρμοσμένο από Morris και Robbins, 1997)

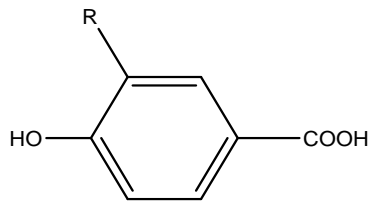


Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν την πλέον πολυπληθή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με πάνω από 8.000 ουσίες (Soobratee *et al.*, 2005). Οι ενώσεις αυτές περιέχουν στο μόριό τους ένα τουλάχιστο αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια (Harbone, 1998). Περιλαμβάνουν από απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, флаβονοειδή μέχρι πολυφαινόλες (τανίνες, λιγνίνες), με τα флаβονοειδή να είναι η κυρίαρχη υπομονάδα (Soobratee *et al.*, 2005). Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις βιοσυντίθενται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος.

### 1.3.1. Φαινολικές ενώσεις

Οι **απλές φαινόλες** και τα **φαινολικά οξέα** σπάνια απαντώνται ελεύθερα στο φυτό. Συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών, στους οποίους αποτελούν το άγλυκο τμήμα της ένωσης. Όξινη υδρόλυση των φυτικών ιστών ελευθερώνει φαινολικά οξέα, από τους εστέρες και τα άλατά τους και επίσης διασπά τους γλυκοζίτες. Αλκαλική υδρόλυση ή αλκαλική σύντηξη διασπά ενώσεις της κατηγορίας των флаβονοειδών προς απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998).

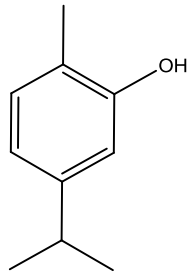
Θυμόλη, καρβακρόλη είναι δυο ισομερείς φαινόλες, που είναι τα δυο κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της ρίγανης (Daferera *et al.*, 2000). Από τα φαινολικά οξέα το πρωτοκατεχικό, το π-υδροξυβενζοϊκό έχουν ανεβρεθεί σε οργανικά και υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών (Zheng και Wang, 2001; Pizzale *et al.*, 2002) (**Σχήμα 1.2**).



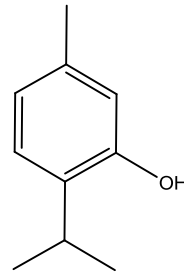
R= H π-υδροξυβενζοϊκό οξύ

R=OH πρωτοκατεχικό οξύ

R= OCH<sub>3</sub> βανιλλικό οξύ



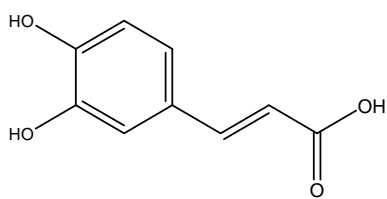
καρβακρόλη



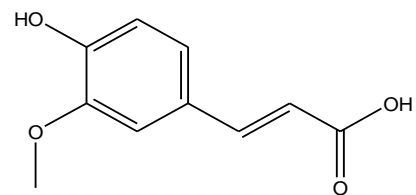
θυμόλη

**Σχήμα 1.2.** Δομές απλών φαινολών και φαινολικών οξέων

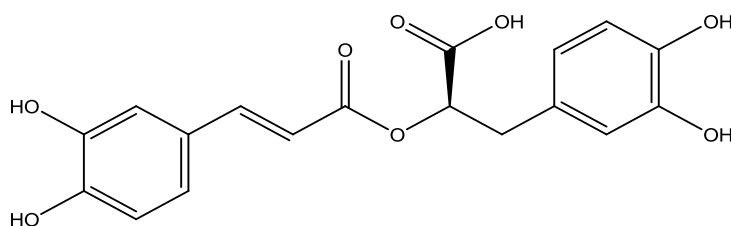
A



καφεϊκό οξύ

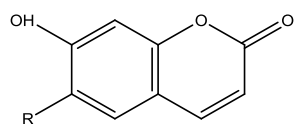


φερουλικό οξύ



Ροσμαρινικό Οξύ

B



R= H ουμπελλιφερόνη

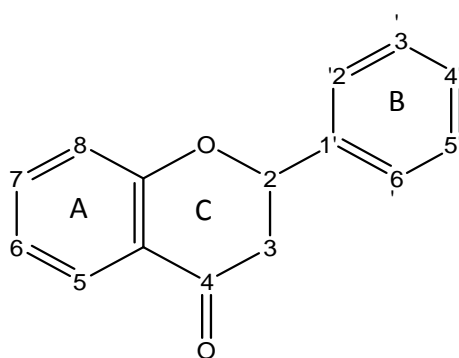
R=OH εσκουλετίνη

R= OCH<sub>3</sub> σκοπολετίνη

**Σχήμα 1.3.** Δομές φαινυλοπροπανοειδών

(A) υδροξυκιναμωνικά οξέα και παράγωγα τους, (B) κουμαρίνες

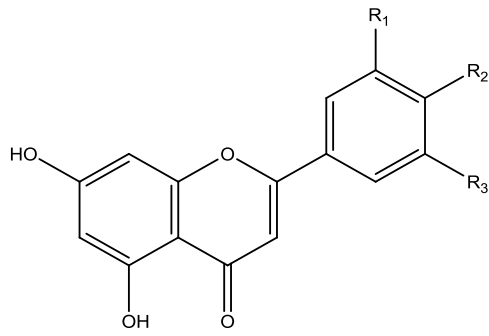
Τα **φαινυλοπροπανοειδή** είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν μια πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα στον αρωματικό τους δακτύλιο (**Σχήμα 1.3**). Τα σπουδαιότερα φαινυλοπροπανοειδή στα φυτά είναι: τα *φαινυλοπροπένια* που απαντώνται μαζί με τα τερπένια στα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών, τα *υδροξυκινναμωμικά οξέα*, όπως φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, καθώς και το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος, τα οποία έχουν εντοπιστεί σε φρούτα, σε δημητριακά (Kahkonen *et al.*, 1999), στο δίκταμο (Proestos *et al.*, 2005), το φασκόμηλο (Zheng και Wang, 2001; Matsingou *et al.*, 2003), τη ρίγανη (Chun *et al.*, 2005) καθώς και *κουμαρίνες* που είναι παράγωγα λακτονοποίησης των ο-υδροξυκινναμωμικών οξέων. Η συμπελλιφερόνη, κουμαρίνη που απαντάται στο χαμομήλι, χρησιμοποιείται ως παράγοντας απορρόφησης των υπεριωδών ακτίνων και βρίσκει εφαρμογή σε αντιηλιακά σκευάσματα.



**Σχήμα 1.4.** Βασικός σκελετός φλαβονοειδών

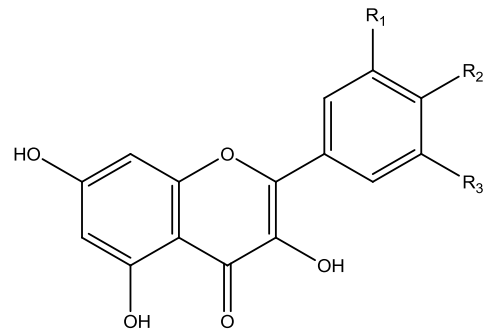
Τα **φλαβονοειδή**, τα οποία είναι η πολυπληθέστερη τάξη φυσικών φαινολικών ενώσεων, συναντώνται κυρίως ως μίγματα στο φυτικό ιστό και συνήθως με την μορφή γλυκοζίτη. Στην τάξη αυτή ανήκουν **τα παράγωγα της φλαβόνης** και οι **ανθοκυανίνες**. Οι τελευταίες είναι η σπουδαιότερη ομάδα φυτικών χρωστικών. Σε αυτές οφείλονται οι διάφοροι έντονοι χρωματισμοί των λουλουδιών. Η γενική τους δομή είναι C6-C3-C6, δηλαδή φέρουν 2 αρωματικούς δακτυλίους (A και B) στα άκρα οι οποίοι ενώνονται με 3 άτομα άνθρακα προς έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (C) (**Σχήμα 1.4**). Τα παράγωγα της φλαβόνης, ανάλογα με την παρουσία ή όχι κάποιων ομάδων στο βασικό σκελετό περιλαμβάνουν: Φλαβόνες, Φλαβονόλες, Χαλκόνες, Ισοφλαβόνες (Rice-Evans *et al.*, 1996, 1997; Harbone, 1998; Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998) (**Σχήμα 1.5**).

**Φλαβόνες**



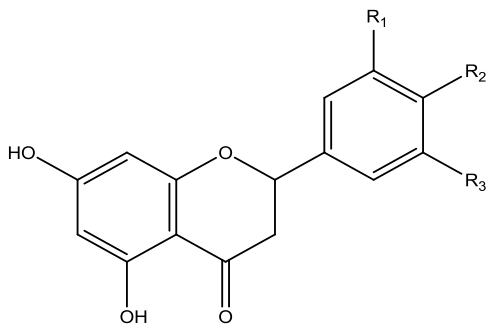
$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$  απιγενίνη  
 $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = H$  λουτεολίνη

**Φλαβονόλες**



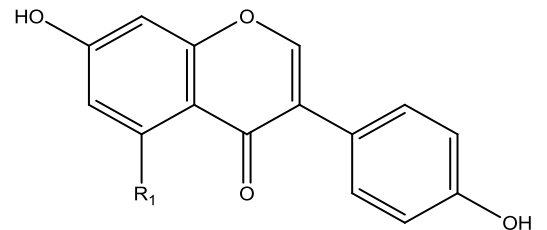
$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$  καμφερόλη  
 $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = H$  κερκετίνη

**Φλαβανόνες**



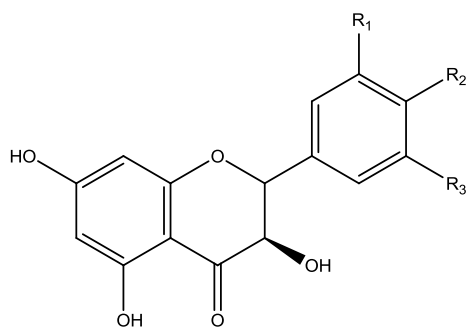
$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$  ναριγκενίνη  
 $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = H$  εριοδικτυόλη

**Ισοφλαβόνες**



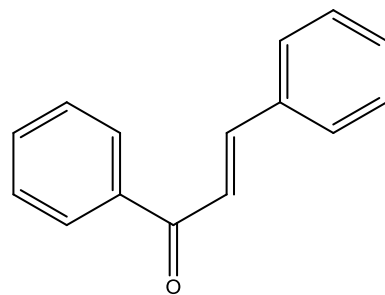
$R_1 = H$  δαϊζεΐνη  
 $R_1 = OH$  γενιστεΐνη

**Φλαβανόλες**



$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH$  κατεχίνη  
 $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH$  γαλλοκατεχίνη

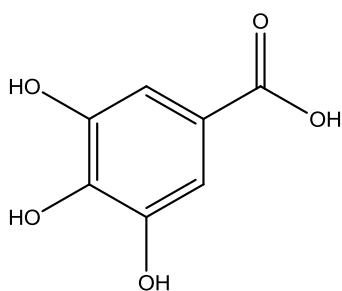
**Χαλκόνες**



Σχήμα 1.5. Δομές φλαβονοειδών

Οι φλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβόνης στις θέσεις 5,7 καθώς και σε μια ή περισσότερες από τη 3', 4' ή 5'. Οι φλαβονόλες προκύπτουν από τις φλαβόνες με εισαγωγή ενός υδροξυλίου στη θέση 3. Η παρουσία αυτής της ομάδας στο μόριο των φλαβονολών τους προσδίδει ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά. Οι φλαβανόνες προκύπτουν από τις αντίστοιχες φλαβόνες με ανόρθωση του διπλού δεσμού Δ<sup>2</sup>. Οι χαλκόνες είναι φλαβονοειδή με ανοιχτή αλυσίδα, θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις για πολλά άλλα φλαβονοειδή και εύκολα ισομερίζονται προς φλαβανόνες. Οι ισοφλαβόνες διαφέρουν ως προς τις φλαβόνες ως προς τη θέση της φαινυλο ομάδας. Η λουτεολίνη και η απιγενίνη είναι παραδείγματα φλαβονών, ενώ η κερκετίνη και η καμφερόλη εκπρόσωποι των φλαβονολών.

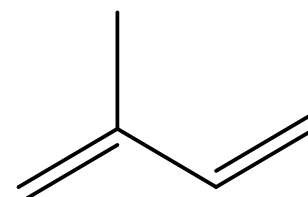
Από τις υποκατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες αποτελούν τις πιο διαδεδομένες στη φύση, ενώ οι φλαβανόνες, οι χαλκόνες και οι ισοφλαβόνες, λόγω της μικρής τους εξάπλωσης στο φυτικό βασίλειο, θεωρούνται δευτερεύοντα φλαβονοειδή. Οι φλαβανόλες συχνά αποκαλούνται και κατεχίνες (Μπόσκου, 2004). Με συμπύκνωση φλαβονικών παραγώγων σχηματίζονται πολυμερή, τα οποία καλούνται προανθοκυανιδίνες οι οποίες ονομάζονται και συμπυκνωμένες ταννίνες. Ενώ οι υδρολυόμενες ταννίνες έχουν σα δομικό στοιχείο το γαλλικό οξύ (Kaufman *et al.*, 1999) (Σχήμα 1.6). Οι ταννίνες μαζί με τις λιγνάνες και τις μελανίνες χαρακτηρίζονται ως **πολυμερείς φαινολικές ενώσεις**.



Σχήμα 1.6. Γαλλικό οξύ

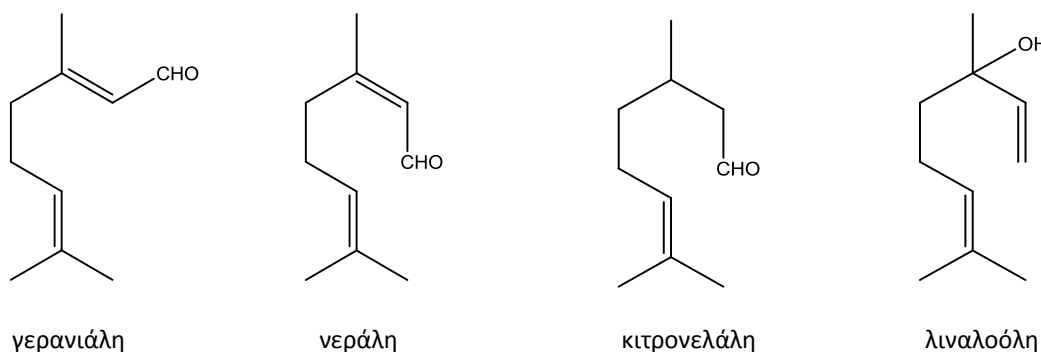
### 1.3.2. Τερπένια

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου (**Σχήμα 1.7**) ανοικτής αλυσίδας ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Οι μονάδες του ισοπρενίου συνδέονται μεταξύ τους ως «κεφαλή-ουρά» για να σχηματίσουν τις γραμμικές αλυσίδες ή δακτυλίους και οδηγούν στον σχηματισμό σκελετών με  $C_{10}$ ,  $C_{15}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{30}$  και  $C_{40}$ . Σύμφωνα με τον αριθμό των ισοπρενικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριό τους κατατάσσονται διαδοχικά σε *μονοτερπένια* (2 ισοπρενικές ομάδες), *σεσκιτερπένια* (3 ισοπρενικές ομάδες), *διτερπένια* (4 ισοπρενικές ομάδες), *σεστερτερπένια* (5 ισοπρενικές ομάδες), *τριτερπένια* (6 ισοπρενικές ομάδες), *τετρατερπένια* (8 ισοπρενικές ομάδες), *πολυτερπένια* (>8 ισοπρενικές ομάδες) (Conolly και Hill, 2007).



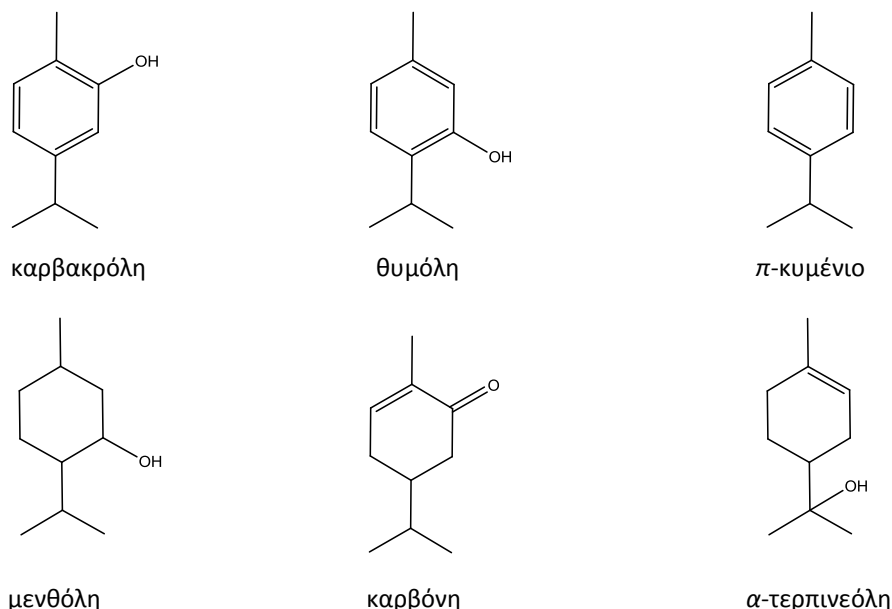
**Σχήμα 1.7.** Ισοπρένιο

Η βιοσύνθεσή τους ακολουθεί τη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος, η οποία περιλαμβάνει τρία στάδια: α) τη βιοσύνθεση του φωσφορομεβαλονικού οξέος, β) το σχηματισμό των αλυσίδων πολυπροπενίου και γ) την κυκλοποίησή τους προς μονο- και πολυκυκλικά τερπενοειδή.



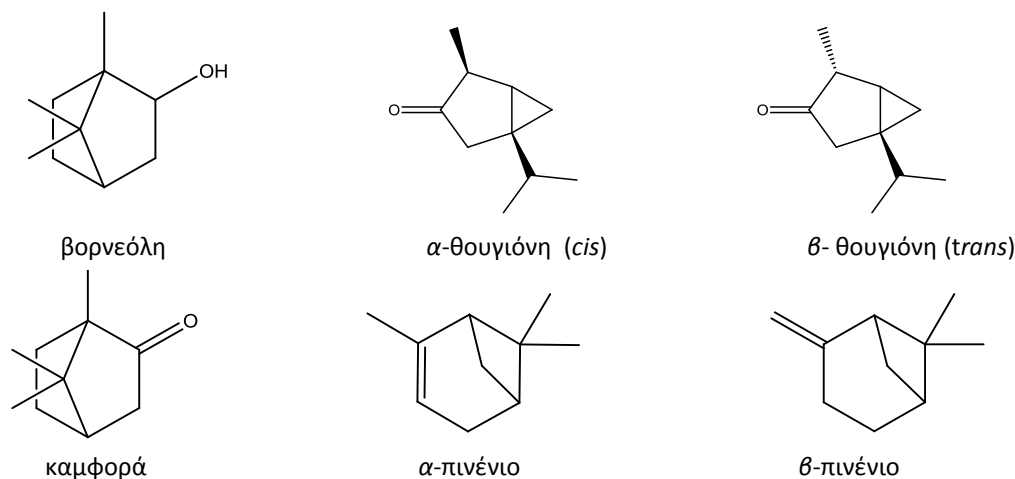
**Σχήμα 1.8.** Άκυκλα μονοτερπένια

Τα *μονοτερπένια* και τα *σεσκιτερπένια* ανευρίσκονται κυρίως στα φυτά και αποτελούν συστατικά των αιθέριων ελαίων των φυτών. Εκτός όμως από αυτό αποτελούν και πρόδρομες ενώσεις για τα πιο σημαντικά ποσοτικά φαινολικά και αρωματικά συστατικά των αιθέριων ελαίων. Τα μονοτερπένια μπορεί να είναι άκυκλα, μονοκυκλικά ή δικυκλικά. Άκυκλα μονοτερπένια είναι η γερανιάλη, η νεράλη,



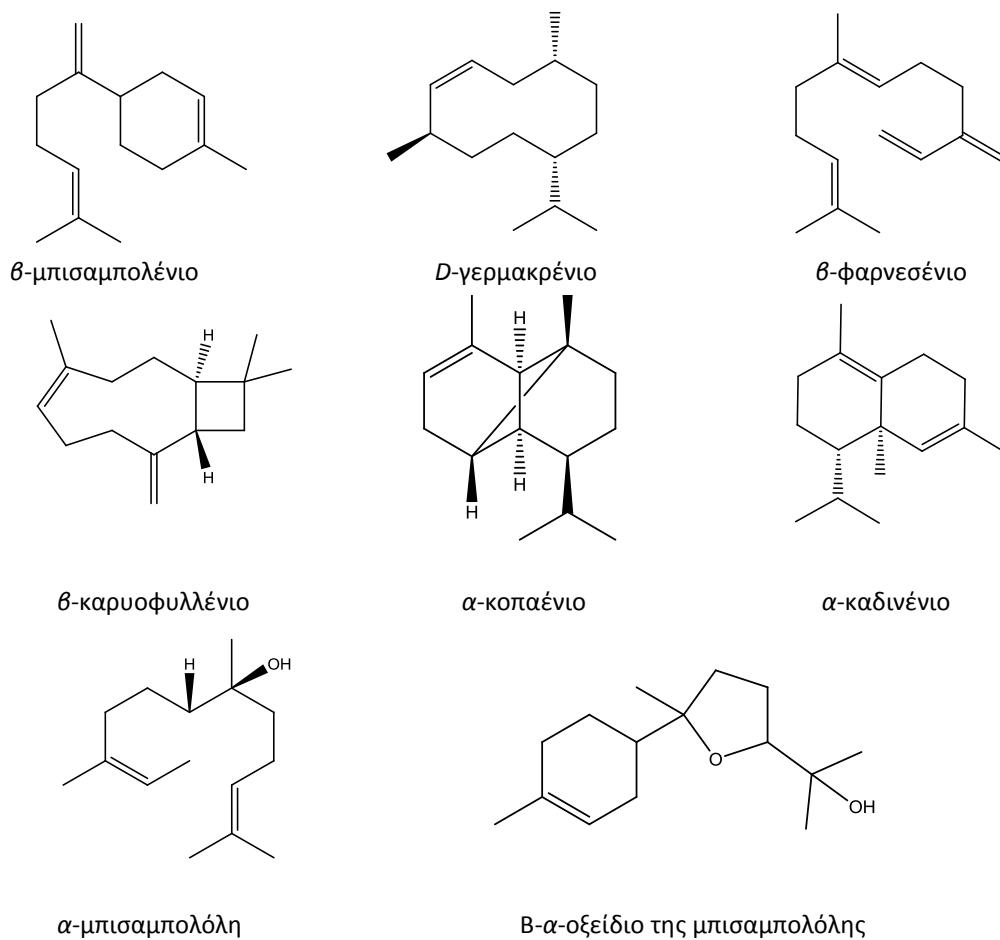
**Σχήμα 1.9.** Μονοκυκλικά μονοτερπένια

η κιτρονελάλη που αποτελούν τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του μελισσόχορτου (Carnat *et al.*, 1998), η λιναλοόλη που απαντάται στο αιθέριο έλαιο πολλών φυτών (**Σχήμα 1.8**). Η καρβακρόλη, η θυμόλη και το π-κυμένιο που περιέχονται σε σημαντικά ποσοστά στο αιθέριο έλαιο από ρίγανη, θυμάρι και δίκταμο, η μενθόλη στη μέντα, η καρβόνη, α-τερπινεόλη στο δεντρολίβανο και στο φασκόμηλο (Daferera *et al.*, 2003) είναι χαρακτηριστικά μονοκυκλικά μονοτερπένια (**Σχήμα 1.9**). Από τα δικυκλικά αυτά που απαντώνται ευρέως στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά είναι το α- και β-πινένιο, η βορνεόλη, η καμφορά, η θουγιόνη (**Σχήμα 1.10**) κύριοι εκπρόσωποι των αιθεριών ελαίων του δεντρολίβανου, του φασκόμηλου.



**Σχήμα 1.10.** Δικυκλικά μονοτερπένια

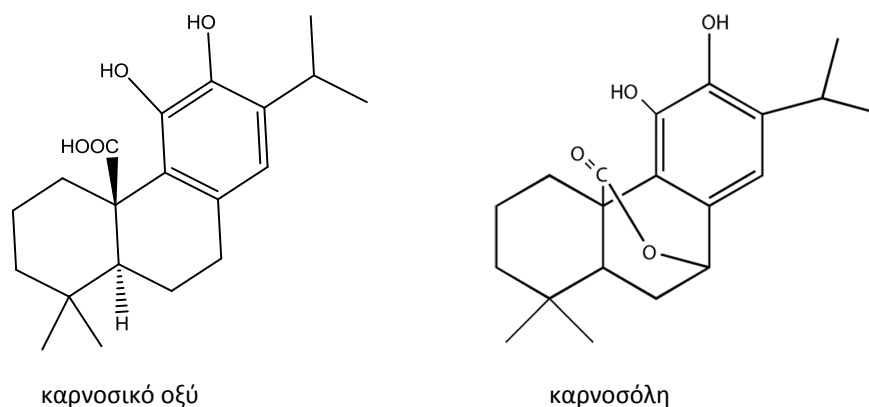
Τα σεσκιτερπένια, ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων ταξινομούνται με τη σειρά τους σε άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά και τρικυκλικά. Τα μονοκυκλικά β-μπιζαμπολένιο και το *D*-γερμακρένιο, τα δικυκλικά β-καρυοφυλένιο,  $\alpha$ -κοπαένιο,  $\alpha$ -καδινένιο ανευρίσκονται στα αιθέρια έλαια των φυτών του γένους *Origanum*, του μελισσόχορτου. Τα σεσκιτερπένια αποτελούν τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του χαμομηλιού, όπως η μονοκυκλική μπιζαμπολόλη και τα οξείδιά της αλλά και το β-φαρνεσένιο (Σχήμα 1.11).



Σχήμα 1.11. Σεσκιτερπένια

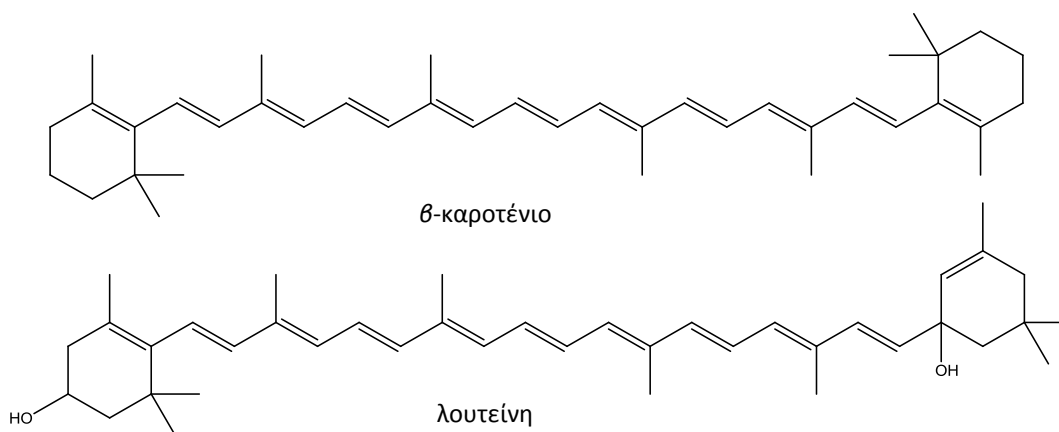
Τα **διτερπένια** είναι μια ομάδα ενώσεων με 20 άτομα άνθρακα, τα οποία δεν παραλαμβάνονται με υδροαπόσταξη από τα φυτά (Harbone, 1998; Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998). Τα πιο χαρακτηριστικά διτερπένια είναι το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη (Σχήμα 1.12) που έχουν ανευρεθεί σε οργανικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου (Cuvelier *et al.*, 1996).





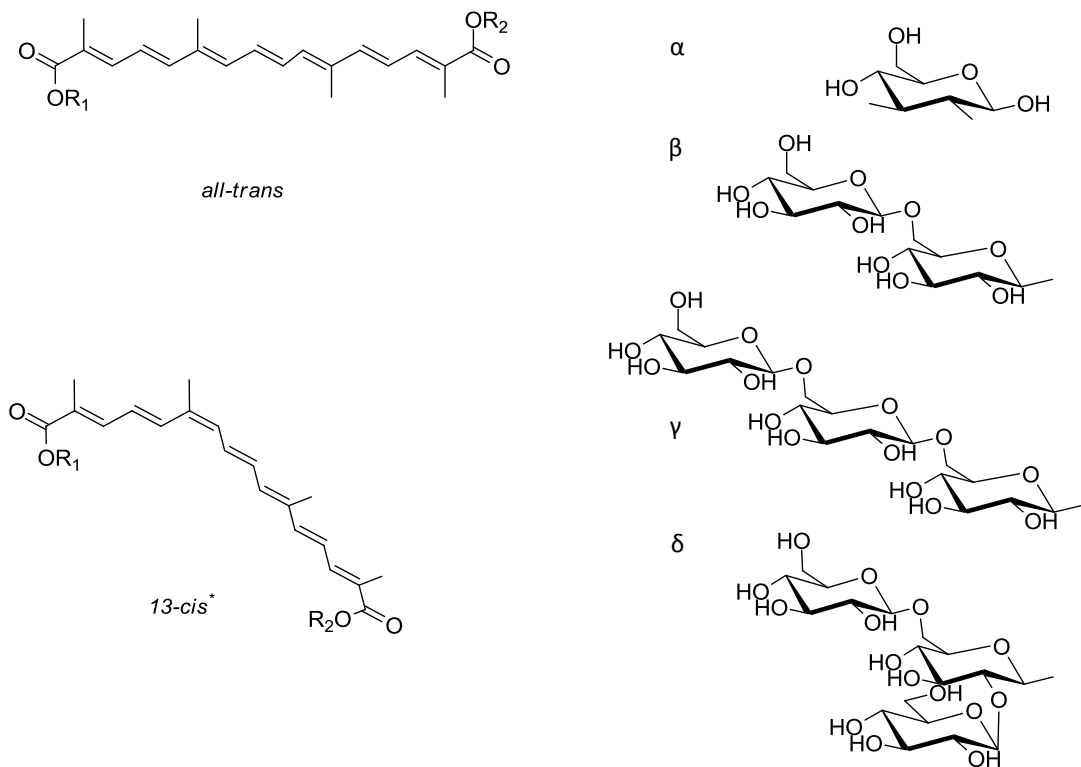
Σχήμα 1.12. Διτερπένια

Μια σημαντική κατηγορία τετρατερπενίων είναι τα **καροτενοειδή**. Πρόκειται για μια ομάδα κίτρινων και κόκκινων λιποδιαλυτών φυσικών χρωστικών που συναντώνται στα φύλλα και σε άλλα μέρη των φυτών αλλά και σε μεγάλο αριθμό φρούτων ενώ παράγονται και από ορισμένα είδη κατώτερων οργανισμών (μικροοργανισμών). Το δομικό τμήμα αποτελείται από τέσσερις ομάδες ισοπρενίου, ενωμένες όμως με σχέση «κεφαλή- κεφαλή». Αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης, το κεντρικό τμήμα των ενώσεων αυτών σχηματίζει από μια μακριά ανθρακική αλυσίδα με συζυγιακούς διπλούς δεσμούς. Αποτέλεσμα αυτών είναι να έχουν χαρακτηριστικό σχήμα, χημική δραστικότητα και ικανότητα απορρόφησης του φωτός. Τα άκρα τους μπορεί να είναι κυκλοποιημένα ( $\beta$ -καροτένιο) ή όχι (λυκοπένιο) ή και τα δύο. Ο όρος καροτένια αναφέρεται μόνο στους ακόρεστους υδρογάνθρακες, ενώ τα οξυγονούχα παράγωγα είναι γνωστά ως ξανθοφύλλες (Σχήμα 1.13).



Σχήμα 1.13. Καροτενοειδή

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και πολυένια που δομικά μοιάζουν με τα καροτενοειδή, αλλά έχουν λιγότερα από 40 άτομα άνθρακα και αναφέρονται ως αποκαροτενοειδή. Το μόριο, αυτών των μη συνηθισμένων καροτενοειδών, όπως οι κροκίνες, αποτελείται από 20 άτομα άνθρακα ενωμένα με συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, ενώ στα άκρα υπάρχουν εστεροποιημένα ένα, δυο ή τρία μόρια γλυκόζης (**Σχήμα 1.14**). Οι **κροκίνες**, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα καροτενοειδή, είναι υδατοδιαλυτές. Αποτελούν τις κύριες ενώσεις του φυτού κρόκου (*Crocus sativus* L.) στις οποίες οφείλεται το χαρακτηριστικό χρώμα των σιγμάτων του φυτού. Ενώ απαντάται και στον καρπό του φυτού *Gardenia jasminoides* Ellis.



α) γλυκόζη, β) γεντοβιόζη γ) τριγλυκόζη δ) νεαπολιτενόζη

**Σχήμα 1.14.** Δομές κροκινών

## 2. Βιολογική Δράση Δευτερογενών Μεταβολιτών

Η κατανόηση της πολυπλοκότητας και εξειδίκευσης των δευτερογενών μεταβολικών οδών στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς πολύ γρήγορα οδήγησε στην αντίληψη του πλούτου των αξιοποιήσιμων χημικών ουσιών που μπορεί να προέλθουν από τα δύο αυτά βασίλεια, τα οποία ο άνθρωπος χρησιμοποιεί εμπειρικά εδώ και εκατοντάδες χρόνια (Ameenah, 2006).

Μελέτες, όσο και κλινικές έρευνες τελευταίων ετών δείχνουν πως η χρήση φαρμακευτικών και διαφόρων φυτών, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων κυρίως λόγω της προστατευτικής δράσης των παραπάνω προϊόντων (Kinsella *et al.*, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1996; Lionis *et al.*, 1998; Trichoroulou *et al.*, 2000; Moure *et al.*, 2001).

Η ικανότητά τους να προστατεύουν έναντι ασθενειών οφείλεται σε ένα πλήθος δράσεων, οι οποίες αποδίδονται στη χημική δομή τους. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν συσχετιστεί με τις ιδιότητες των παραπάνω είναι φαινολικά συστατικά και τερπενοειδείς ενώσεις (Pokorny, 1991; Rice-Evans *et al.*, 1997).

### 2.1. Αντιοξειδωτική Δράση

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

Ο οξειδωτικός μεταβολισμός είναι απαραίτητος για την επιβίωση των κυττάρων μέσω του μεταβολισμού των λιπών, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Παρ'όλα αυτά, το οξυγόνο πηγή ζωής για τον ανθρώπινο οργανισμό, μπορεί να μετατραπεί σε αμείλικτο εχθρό σε κυτταρικό επίπεδο, οξειδώνοντας και καταστρέφοντας πολύτιμα στοιχεία του.

Στα κύτταρα, κατά τη διάρκεια της αναερόβιας αναπνοής είναι δυνατό να δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες και άλλες οξυγονούχες δραστικές ουσίες (Reactive

Oxygen Species, ROS), που περιλαμβάνουν ιόντα οξυγόνου και υπεροξειδία τόσο ανόργανα όσο και οργανικά, όπως το υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^-$ ), η υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $HO_2^\bullet$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $-OH^\bullet$ ), το οξειδίο του αζώτου (NO), και άλλες όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), υποχλωριώδες ανιόν ( $ClO^-$ ). Επιπλέον είναι δυνατό από την αντίδραση του NO με  $O_2^-$  να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), όπως  $ONOO^-$ . Ενώ αντιδράσεις των ROS με θειόλες δημιουργούν ελεύθερες ρίζες θείου (Reactive Sulfur Species, RSS) (Lü *et al.*, 2010).

Ουσιαστικά οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικές ενώσεις τους λείπει ένα ηλεκτρόνιο και το αναζητούν όπου μπορούν, προκαλώντας έτσι σοβαρές βλάβες. Οι ROS μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή του DNA και των λιπιδίων, προβλήματα στη λειτουργία της μεμβράνης και της πρωτεϊνοσύνθεσης (Aruoma, 1998; Lopez-Reveuetla *et al.*, 2006).

Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει στον οργανισμό μια προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, όπως αυτή που προσφέρουν ορισμένα ένζυμα, όπως οι βισμουτάσες υπεροξειδίου (SOD), οι αναγωγάσες και υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH), οι καταλάσες των μιτοχονδρίων και διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, το  $\alpha$ -λιποϊκό, τα καροτενοειδή, η ουβικινόνη, ιόντα μετάλλων (Aruoma, 2003; Huang *et al.*, 2005). Τα αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική καταστροφή τους. Όταν η ισορροπία ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και την αντιοξειδωτική άμυνα διαταραχτεί, τότε οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη διάφορων ασθενειών (Rice-Evans *et al.*, 1996; Aruoma, 2003; Lopez-Reveuetla *et al.*, 2006).

Υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών ενοχοποιείται στην αιτιολογία πλήθους εκφυλιστικών ασθενειών, όπως οι καρδιακές παθήσεις, ο διαβήτης, ο καρκίνος, το Alzheimer, η αρτηριοσκλήρωση, ο εκφυλισμός της ώχρας κηλίδας του ματιού που οδηγεί στην απώλεια της όρασης, αλλά και η διαδικασία του γήρατος ή και οξείες καταστάσεις όπως οι τραυματισμοί ή ένα εγκεφαλικό επεισόδιο, καταπληξία, λοιμώξεις.

Δυστυχώς όμως στο περιβάλλον του σύγχρονου ανθρώπου, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ηλιακή ακτινοβολία, το στρες, το κάπνισμα και οι διάφορες τοξικές ουσίες

που διαχέονται στο περιβάλλον, ως προϊόντα της νέας τεχνολογίας, αποτελούν μερικούς από τους σημαντικότερους φορείς και δότες ηλεκτρισμένων σωματιδίων, των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Η έκθεση όμως σε πολλούς φορείς ελευθέρων ριζών αυξάνει την ανάγκη για άμεση εξουδετέρωσή τους, με αποτέλεσμα να αυξάνονται και οι απαιτήσεις για αντιοξειδωτική δράση και να εξαντλούνται τα αποθέματα των ενδογενών αντιοξειδωτικών.

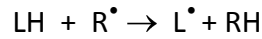
Κατά συνέπεια, απαιτείται αύξηση της κατανάλωσης τροφών που περιέχουν αντιοξειδωτικά, τα οποία «θυσιάζονται» στον αγώνα που δίνει ο οργανισμός στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών. Προσφέρουν το ηλεκτρόνιό τους κι έτσι συνδέονται με την ελλιπή χημική ένωση δημιουργώντας μια ολοκληρωμένη χημική αλυσίδα. Η κάθε μια από αυτές τις ουσίες ενεργεί και εξουδετερώνει συγκεκριμένη ομάδα ελευθέρων ριζών, ενισχύοντας τους ήδη υπάρχοντες μηχανισμούς εξουδετέρωσης του οργανισμού.

### **2.1.1. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών**

Ένα μεγάλος αριθμός χημικών και φυσικών φαινομένων μπορεί να προκαλέσει οξείδωση, η οποία θα προχωρεί πάνω στο κατάλληλο υπόστρωμα μέχρι κάποιος μηχανισμός άμυνας (αντιοξειδωτικό) να μπλοκάρει την όλη διαδικασία. Τα υποστρώματα- στόχοι είναι συνήθως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), φωσφορολιπίδια, χοληστερόλη και DNA.

Η οξειδωτική αποσύνθεση των λιπιδίων αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων και της οξειδωτικής μετατροπής της LDL χοληστερόλης (low density lipoproteins- λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας). Η οξείδωση των λιπαρών υλών λαμβάνει χώρα με τη μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης που διακρίνονται σε τρία στάδια: έναρξη, διάδοση, τερματισμός.

Κατά το πρώτο στάδιο παρουσία φωτός, θέρμανσης, μετάλλων (Cu, Fe) ή μεταλλοπρωτεϊνών σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες:

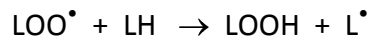
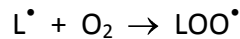


Όπου LH το λιπαρό υπόστρωμα

R<sup>•</sup> ο οξειδωτικός παράγοντας

L<sup>•</sup> ρίζα

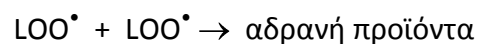
Στη συνέχεια, οι ρίζες (L<sup>•</sup>) ενώνονται με οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες (LOO<sup>•</sup>), οι οποίες αποσπούν ένα μόριο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο (LH) και σχηματίζουν υπεροξειδίο (LOOH) και μια νέα ρίζα (L<sup>•</sup>). Η νέα ρίζα μπορεί επίσης να αντιδράσει με οξυγόνο και να δώσει νέες ρίζες και υπεροξειδία.



Τα υπεροξειδία είναι άοσμα, αλλά διασπώνται σε αλκοόλες, αλδεΐδες και κετόνες, που προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή στα αλλοιωμένες λιπαρές ύλες, καθώς και υδρογονάνθρακες και αλκοξυλ-ρίζες (LO<sup>•</sup>).

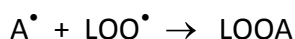
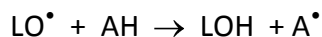
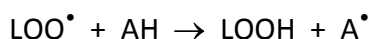
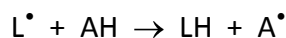


Κατά το τρίτο στάδιο οι ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους παρέχοντας αδρανή προϊόντα.



Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξασκήσουν την προστατευτική τους δράση με διάφορους τρόπους. Έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δυο κύριες κατηγορίες: σε παρεμποδιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης ή πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (chain-breaking or primary antioxidants) και σε προστατευτικά ή δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά (preventive or secondary antioxidants) (Frankel και Meyer, 2000; Antolovich *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2002). Τα δευτερεύοντα απλώς καθυστερούν τον ρυθμό της οξείδωσης. Τα πρωτεύοντα καθυστερούν ή παρεμποδίζουν το στάδιο έναρξης, αντιδρώντας με τη ρίζα (L<sup>•</sup>) ή παρεμποδίζουν το στάδιο διάδοσης αντιδρώντας με τις υπεροξειδικές (LOO<sup>•</sup>) και αλκοξυλ-ρίζες (LO<sup>•</sup>). Παράλληλα

σχηματίζεται ελεύθερη αντιοξειδωτική ρίζα ( $A^\bullet$ ), που δεν έχει την ικανότητα να αρχίσει και να προάγει νέα αλυσιδωτή αντίδραση, απλά μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες και να δώσει υπερόξυ αντιοξειδωτικά συστατικά.



Ωστόσο υπάρχουν και άλλες χρησιμοποιούμενες κατηγοριοποιήσεις. Σύμφωνα με τους Dorman *et al.*, (2003), τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν στις εξής κατηγορίες:

1) Δεσμευτές οξυγόνου ουσίες που δεσμεύουν οξυγόνο ώστε να μην υπάρχει η απαιτούμενη ποσότητα για να οξειδώσει τα λιπαρά συστατικά, όπως συμβαίνει με το ασκορβικό οξύ.

2) Προστατευτικά ή δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά, που παρεμποδίζουν ή διασπούν τα προϊόντα της οξείδωσης.

3) Ουσίες που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με τα μέταλλα ώστε να αποτρέψουν την έναρξη της οξείδωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας ένωσης είναι το EDTA (Huang *et al.*, 2005).

4) Ουσίες που διασπούν τα υπεροξειδία έτσι ώστε να μην διασπαστούν σε ρίζες.

5) Τερματιστές ελευθέρων ριζών. Πρόκειται για ουσίες που τερματίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση προσφέροντας υδρογόνο ή ηλεκτρόνια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα γνωστά συνθετικά αντιοξειδωτικά, το BHA, το BHT, ο γαλλικός προπυλεστέρας (Antolovich *et al.*, 2002), καθώς και τοκοφερόλες, το γαλλικό οξύ και οι εστέρες του (Frankel και Meyer, 2000).

Οι Moure *et al.*, (2001) αναφέρουν πως τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες, αναλόγως με το μηχανισμό δράσης. Στην πρώτη κατηγορία υπάρχουν αντιοξειδωτικά όπως τα καρotenοειδή και δεσμευτές οξυγόνου, όπως το ασκορβικό οξύ. Η δεύτερη αφορά τερματιστές ριζών και πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά και η τρίτη ενώσεις που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με τα μέταλλα

(Moure *et al.*, 2001). Ωστόσο επισημαίνουν πως αρκετά αντιοξειδωτικά συστατικά μπορεί να ενεργούν και ως πρωτεύοντα αλλά και ως δευτερεύοντα.

Κάτω από αυτή τη διαπίστωση πολλοί ερευνητές αναφέρουν διάφορους μηχανισμούς δράσεις για τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να δράσουν σα δεσμευτές οξυγόνου, σα δότες υδρογόνου, ενώ μπορούν να δημιουργήσουν και χηλικά σύμπλοκα (Rice-Evans *et al.*, 1996; Lu και Foo, 2001; Pizzale *et al.*, 2002; Dorman *et al.*, 2003; Tsimogiannis και Oreopoulou, 2006).

Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες χημικά έγκειται στο γεγονός ότι τα δυναμικά οξειδοαναγωγής των φλαβονοειδών ριζών (A<sup>•</sup>) που σχηματίζονται είναι αρκετά χαμηλά σε σχέση με αυτά των υπεροξειδικών και αλκοξυλοριζών. Αυτό σημαίνει ότι τα φλαβονοειδή απενεργοποιούν αυτές τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν τις καταστροφικές συνέπειες των περαιτέρω αντιδράσεων (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Σημαντική είναι και η συνεισφορά των καρτενοειδών στην αντιοξειδωτική ικανότητα, παρ' όλου που η δομή τους διαφέρει σημαντικά από αυτή των φαινολικών συστατικών (Krinsky, 2001; Krinsky και Yeum, 2003).

### **2.1.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός ξεχωριστά συστατικού του φυτικού εκχυλίσματος είναι σχεδόν αδύνατο να πραγματοποιηθεί λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασης του εκχυλίσματος, καθώς και της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των συστατικών (Huang *et al.*, 2005). Υπάρχουν πλήθος μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης, αλλά καμία επίσημη μέθοδο προσδιορισμού (Frankel και Meyer, 2000; Moure *et al.*, 2001; Antilovich *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005) με αποτέλεσμα τα στοιχεία να μην μπορούν να συγκριθούν και να αξιολογηθούν (Frankel και Meyer, 2000). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των συστημάτων επιβάλλει τη χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Frankel και Meyer, 2000; Antilovich *et al.*, 2002; Aruoma, 2003; Huang *et al.*, 2005).



Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών επηρεάζεται από τη μέθοδο προσδιορισμού, το χημικό τους τύπο, τρόπο εκχύλισης και τις συνθήκες με τις οποίες έγινε, τη συγκέντρωση του δείγματος.

Υπάρχουν μέθοδοι που μπλοκάρουν την παρουσία ριζών (free radical- trapping methods) και άλλες που προσδιορίζουν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν την οξείδωση των λιπαρών συστατικών (lipid oxidation) (Frankel και Meyer, 2000; Pérez-Jiménez και Saura-Calixto, 2006).

**Πίνακας 1.1.** Μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας

<p><b>Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου - Electron Transfer based assays- ET</b></p> <p>Μέθοδος του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου - DPPH                  Μέθοδος του 2,2' - αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) - ABTS ή Ισοδύναμα Trolox- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity-TEAC                  Μέθοδος της ικανότητας αναγωγής ιόντων σιδήρου Fe<sup>+3</sup> - Ferric Ion Reducing Power Assay –FRAP                  Μέθοδος μέτρησης ικανότητας απορρόφησης ελευθέρων ριζών - Oxygen Radical Absorbance Capacity- ORAC                  Μέθοδος της ικανότητας αναγωγής ιόντων χαλκού Cu<sup>+2</sup> - Total Antioxidant Potential Assay using Cu(II)</p>
<p><b>Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου- Hydrogen Atom Transfer based assays – HAT</b></p> <p>Θειοβαρβουτουρικά παράγωγα- Thiobarbutyric Acid Reactive Substances - TBARS                  Ολικές ρίζες υπεροξυλίου- Trapping Antioxidant Parameter Assay - TRAP                  β-καροτένιο/ λινολεϊκό οξύ                  Μέθοδος των κροκινών                  Παρεμπόδιση της αυτοοξείδωσης της LDL</p>

Σε σχέση με τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι μέθοδοι χωρίζονται σε:

μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays- ET)

μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays – HAT)

Οι ET μέθοδοι μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αλλάζει χρώμα καθώς ανάγεται στην αντίδραση με το οξειδωτικό. Οι HAT μέθοδοι εξετάζουν την κινητική των αντιδράσεων και οι συγκεντρώσεις απορρέουν από τις κινητικές καμπύλες (Huang *et al.*, 2005).

Στον **Πίνακα 1.1** φαίνονται οι πιο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης και η κατηγοριοποίηση τους ανάλογα με τη χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα.

Επειδή, τα εκχυλίσματα φυτών περιέχουν τόσο λιπόφιλα όσο και υδρόφιλα συστατικά, η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί έχει αντίκτυπο στην μετρούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα. Άλλες μέθοδοι έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε υδατικά αντιοξειδωτικά συστατικά όπως οι μέθοδοι του DPPH, TEAC, FRAP, ενώ άλλες μεγαλύτερη ευαισθησία σε λιπόφιλα συστατικά όπως οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν λιπιδικό υπόστρωμα (TBARs, Παρεμπόδιση της αυτοοξείδωσης της LDL, του β-καροτένιο/ λινολεϊκό οξύ) (Chun *et al.*, 2005).

### 2.1.3. Σχέση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης

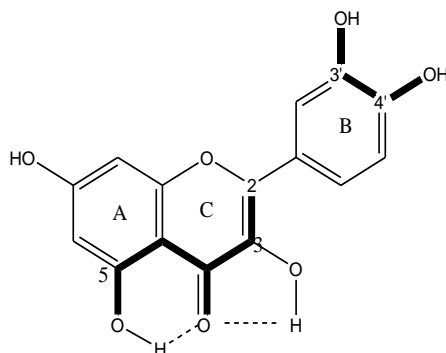
Η αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών των ενώσεων εξαρτάται από το χημικό τύπο και πως είναι κατανομημένες οι λειτουργικές ομάδες (-OH) στο μόριο. Οι απλές φαινολικές ενώσεις έχουν μικρότερη δράση έναντι των πολυμερών φαινολών σε μεθόδους που μπλοκάρουν την παρουσία ριζών (Moore *et al.*, 2001).

Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων σε σχέση με την δραστική καρβοξυλομάδα (Rice-Evans *et al.*, 1996, Robards *et al.*, 1999). Mono- υδροξυ υποκαταστημένα βενζοϊκά οξέα με την υδροξυλική ομάδα (-OH) σε όρθο- ή παρά- θέση σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα κάτι που δεν συμβαίνει όταν ο υποκατάστατος είναι σε μέτα- θέση (Rice-Evans *et al.*, 1996). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης. Έτσι το γαλλικό οξύ με τα 3 -OH παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα. Επιπλέον η παρουσία της προπενικής αλυσίδας (-CH=CH-COOH) στα

υδροξυκιναμικά οξέα προσδίδει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την παρουσία μόνο του καρβοξυλίου -COOH στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Rice-Evans *et al.*, 1996; Soobratee *et al.*, 2005) Από τα υδροξυκιναμικά οξέα το καφεϊκό έχει καλύτερη δράση από το φερουλικό και αυτό από το π-κουμαρικό (Lu και Foo, 2001).

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, όσο μεγαλύτερος είναι βαθμός πολυμερισμού τους, τόσο μεγαλύτερη και η ικανότητα να μπλοκάρουν ρίζες (Moore *et al.*, 2001). Η θέση των υποκαταστατών στο χώρο θεωρείται ότι είναι ο πιο σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την κύρια δομή της φλαβόνης. Η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση. Η παρουσία γλυκοζιτών στο μόριο μειώνει την αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το άγλυκο τμήμα (Rice-Evans *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2001).

Η ταυτόχρονη παρουσία στα φλαβονοειδή (**Σχήμα 2.1**): α) του διπλού δεσμού ανάμεσα στις θέσεις 2,3, του C δακτυλίου σε συζυγία με την κετο-ομάδα, β) δυο υδροξυλίων σε όρθο θέση στο δακτύλιο B και γ) δυο υδροξυλίων στις θέσεις 3,5, είναι σημαντικά για την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Η ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, είναι υπεύθυνη για τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων στον B δακτύλιο, η ταυτόχρονη παρουσία του ο- διφαινολικού τμήματος στον B δακτύλιο χρησιμοποιείται ως δότης H για να σταθεροποιηθούν οι ελεύθερες ρίζες ενώ ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ των -OH στις θέσεις 3 και 5 με τη κέτο ομάδα, αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Rice-Evans *et al.*, 1996; Soobratee *et al.*, 2005; Trouillas *et al.*, 2006; Tsimogiannis και Oreopoulou, 2006).



**Σχήμα 2.1.** Κύρια δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών για αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών

Τέλος, μια επιπλέον ικανότητα ορισμένων φυτοχημικών είναι να εμφανίζουν προ-οξειδωτική δράση. Κάποια φυτοχημικά όπως φαινολικά συστατικά και καροτενοειδή όταν υπάρχουν μέσα στα κύτταρα σε μεγάλες συγκεντρώσεις και κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να εμφανίσουν προ-οξειδωτική. Το αντιοξειδωτικό στη μορφή της ρίζας σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατό να αντιδράσει με το οργανικό υπόστρωμα επάγοντας περισσότερο το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Η προοξειδωτική δράση των φαινολικών σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των υροξυλομάδων (Cao *et al.*, 1997; Heim *et al.*, 2002). Ενώ μελέτες *in vivo* έχουν δείξει πως γλυκοζιδίωση ή μεθυλίωση των ενώσεων αυτών μειώνει το παραπάνω φαινόμενο (Cao *et al.*, 1997).

## 2.2. Αντιμικροβιακή δράση

Η εξέλιξη και η εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά καθώς και η εξέλιξη νέων στελεχών παραγόντων που προκαλούν ασθένειες αποτελούν ένα αυξανόμενο πρόβλημα για πολλά χρόνια. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες όπως φαινόλες, κινόνες, φλαβόνες, τανίνες, τερπενοειδή και αλκαλοειδή έχουν μελετηθεί για την αντιμικροβιακή τους δράση.

Συγκεκριμένα, η καρβακρόλη και η θυμόλη, κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων της ρίγανης, του θυμαριού, έχουν ισχυρή μυκητοτοξική δράση έναντι του *Penicillium digitatum* (Daferera *et al.*, 2000). Παράλληλα έχουν δείξει και ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση έναντι στελεχών του *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Lambert *et al.*, 2001) και *Bacillus cereus* (Ultee *et al.*, 2002). Πολλά συστατικά αιθερίων ελαίων έχουν μελετηθεί για την αντιβακτηριδιακή τους δράση έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων όσο και αρνητικών κατά Gram (Dorman και Deans, 2000). Τα αιθέρια έλαια ρίγανης και θυμαριού σε ποσοστά 5- 20  $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$  παρεμποδίζουν τη *Listeria monocytogenes* σε προϊόντα κρέατος (Tsigarida *et al.*, 2000) και το *Escherichia coli* O157:H7 σε μελιτζανοσαλάτα κυρίως λόγω της παρουσίας καρβακρόλης (Skandamis και Nychas, 2001). Στις ίδιες ποσότητες το αιθέριο έλαιο της

μέντας δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό όσο αυτό της ρίγανης έναντι του *Salmonella enteritidis* σε ταραμοσαλάτα (Tassou *et al.*, 1995; Koutsoumanis *et al.*, 1999).

Φαινολικά συστατικά που έχουν βρεθεί σε υδατικά εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* έχουν δράση έναντι μυκήτων, ιών, βακτηριών. Φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ έχουν μελετηθεί για τη δράση τους έναντι στελεχών παθογόνων βακτηρίων *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Listeria monocytogenes* (Herald και Davidson, 1983; Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007, 2010).

Φλαβονοειδή έχουν δράση έναντι ειδών του μύκητα *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* (Wachter *et al.*, 1999; Cushnie και Lamb, 2005). Αρκετά φλαβονοειδή μεταξύ αυτών η μυρισετίνη, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, η ταξιφολίνη, φέρεται να παρεμποδίζουν κάποια ένζυμα του ιού που ευθύνεται για το AIDS- HIV-1 (human immunodeficiency virus- type 1) (Fesen *et al.*, 1994), ενώ η απιγενίνη, η ακασετίνη και η χρυσίνη συμμετέχουν στην παρεμπόδιση της διαδικασίας μεταγραφής του ιού (Cushnie και Lamb, 2005). Η καμφερόλη και η χρυσίνη, φλαβονοειδή που βρέθηκαν στην πρόπολη, παρεμποδίζουν την αντιγραφή του ιού του απλού έρπητα HVS (herpes simplex virus) (Cushnie και Lamb, 2005). Η ταυτόχρονη παρουσία καμφερόλης και λουτεολίνης παρουσιάζει συνέργια στην παρεμπόδιση του ιού HVS (Amoros *et al.*, 1992). Η κερκετίνη, η λουτεολίνη, η καμφερόλη, απιγενίνη παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση (Tsuchiya *et al.*, 1996; Koo *et al.*, 2002). Οι Tsuchiya *et al.*, (1996) αναφέρουν ότι η ύπαρξη δυο -OH ομάδων στις θέσεις 2', 4' ή 2', 6' του B δακτυλίου και 5,7 του A είναι καθοριστική για τη δράση έναντι στελεχών του MRSA- *Staphylococcus aureus*. Επιπλέον, η υποκατάσταση στη θέση 6 ή 8 με n-αλκυλ αλυσίδα ενισχύει τη δράση. Άλλη έρευνα έδειξε ότι υποκατάσταση με C8 και C10 αλυσίδες των φλαβαν-3-ολών ενισχυθεί επίσης τη δράση τους έναντι στελεχών του *St. aureus* (Stapleton *et al.*, 2004). Οι 5- υδροξυφλαβονόλες με υδροξύλια στις θέσεις 7, 2' ή 4', όπως η κερκετίνη παρεμποδίζουν την ανάπτυξη στελεχών παθογόνων της στοματικής κοιλότητας των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* (Cushnie και Lamb, 2005).

### 2.2.1. Μηχανισμός αντιβακτηριδιακής δράσης

Αρκετές έρευνες γίνονται και στην προσπάθεια να εξηγηθεί ο μηχανισμός δράσης. Η αντιβακτηριδιακή δράση των φαινολικών ενώσεων εντοπίζεται σε τρεις κατευθύνσεις. Έχουν προταθεί μηχανισμοί όπου οι φαινολικές ενώσεις α) επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη επηρεάζοντας τη διαπερατότητα των μεμβρανών των βακτηρίων και παρεμβαίνοντας στη βαθμίδωση της συγκέντρωσης των ιόντων  $H^+$  κατά μήκος αυτής, β) αδρανοποιούν ένζυμα, γ) προκαλούν καταστροφή ή λειτουργική αδρανοποίηση του γενετικού υλικού κυτταρικής μεμβράνης (Lambert *et al.*, 2001; Skandamis *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Burt *et al.*, 2007; Arques *et al.*, 2008).

Έρευνες σε στελέχη *Bacillus cereus* έδειξαν ότι η καρβακρόλη αλληλεπιδρά με την κυτταρική του μεμβράνη, όπου διαλύεται στη διπλή στοιβάδα των φωσφορολιπιδίων και ευθυγραμμίζεται μεταξύ των αλυσίδων λιπαρών οξέων. Η αποσταθεροποίηση της φυσιολογικής δομής προκαλεί αύξηση της υδαρότητας, που με τη σειρά της αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Ultee *et al.*, 2002). Ενώ σε στελέχη *Ps. aeruginosa* και *St. aureus* προκαλεί διαρροή φωσφορικών ιόντων (Lambert *et al.*, 2001).

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, οι περισσότερες έρευνες αναδεικνύουν ότι τα περισσότερα αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη διαταράσσοντας τη διαπερατότητα. Οι Tsuchiya και Iinuma (2000) αναφέρουν ότι η σοφοραφλαβονόνη G και η ναριγενίνη προκαλούν αλλοίωση της ρευστότητας μεμβράνης σε υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές, με την πρώτη να είναι πιο δραστική. Επιπροσθέτως και οι κατεχίνες δρουν καταστρέφοντας τις κυτταρικές μεμβράνες, με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια να είναι πιο ευαίσθητα (Ikigai *et al.*, 1993). Σε ενζυμικό επίπεδο, τα φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί ότι παρεμποδίζουν τη σύνθεση DNA του *Proteus vulgaris*, ενώ επηρεάζουν και σύνθεση RNA του *St. aureus* (Mori *et al.*, 1987). Η κερκετίνη και η απιγενίνη παρεμποδίζουν τη DNA γυράση του *E. coli* (Ohemeng *et al.*, 1993).

Ένα φυσικό προϊόν που αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό δραστικών ουσιών, το πιο πιθανό είναι η αντιβακτηριδιακή του ικανότητα να μην οφείλεται σε

ένα μηχανισμό δράσης, αλλά μπορεί να έχει πολλούς στόχους στο κύτταρο (Burt, 2004).

### 2.3. Άλλες βιολογικές δράσεις

Πέρα της αντιοξειδωτικής τους και αντιμικροβιακής δράσης τα παραπάνω φυσικά προϊόντα παρουσιάζουν πλήθος δράσεων, οι οποίες αποδίδονται στη χημική δομή τους. Έρευνες έχουν δείξει πως η βιολογική τους δράση περιλαμβάνει και άλλες δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτική, αντικαρκινογόνο, αντιαλλεργική. Η αντιφλεγμονώδης δράση έγκειται στο ότι εμποδίζουν την οξειδωτική μετατροπή των LDL από τα μακροφάγα κύτταρα, επίσης αναστέλλουν τη σύνθεση των εικοσανοειδών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (Soobratee *et al.*, 2005). Η αντιθρομβωτική δράση αποδίδεται στα φλαβονοειδή από την ικανότητά τους να αυξάνουν την αντίσταση των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων και παράλληλα να ελαττώνουν τη διαπερατότητά τους, καθώς και στην ικανότητα των ουσιών αυτών να παρεμποδίζουν την αμιδολυτική ικανότητα της θρομβίνης (Mozzicafreddo *et al.*, 2006). Η αντικαρκινική- χημειοπροστατευτική δράση των φυτοχημικών έγκειται ότι μπορούν να δράσουν απευθείας πριν ή μετά την έναρξη της καρκινογένεσης ονομάζονται παρεμποδιστές (blocker agents) ή ακόμα μπορούν που δρουν στη φάση της έναρξης την καρκινογένεσης και να επηρεάσουν τη φάση της προαγωγής, οπότε και ονομάζονται καταστολείς (suppressor agents).

### 3. Παρουσίαση Αρωματικών και Φαρμακευτικών της Μεσογειακής Χλωρίδας

Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, διάρκεια ημέρας, υψόμετρο, φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους) στην Ελλάδα είναι τέτοιες όπου ευνοούν στο έπακρο την καλλιέργεια των περισσότερων ειδών αρωματικών φυτών εξασφαλίζοντας μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις τη μέγιστη απόδοση και την καλύτερη ποιότητα. Επιπροσθέτως, στη χώρα μας, πολλά από αυτά τα φυτά (π.χ. ρίγανη, φασκόμηλο, χαμομήλι, αχίλλεια, δίκταμο και πολλά ακόμη) αυτοφύονται και μπορούν να εντοπιστούν και σε μη καλλιεργούμενες εκτάσεις (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998; Ameenah, 2006).

Τα φυτά της μελέτης στην πλειοψηφία τους ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae με εξαίρεση το Χαμομήλι που ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και τον κρόκο που ανήκει στην οικογένεια Iridaceae.

#### 3.1. Δεντρολίβανο- *Rosmarinus officinalis* L. (οικ. Lamiaceae)



Εικόνα 3.1. Δεντρολίβανο  
*Rosmarinus officinalis* L.

Το δεντρολίβανο είναι είδος κοινό της Ελληνικής χλωρίδας, γνωστό επίσης ως αρισμαρί, δυσομαρίνι και λιβανόδεντρο. Αν και αποτελεί χαρακτηριστικό φυτό της Μεσογείου, αναπτύσσεται ως καλλιεργούμενο σε πολλές εύκρατες της Ευρώπης και της Αμερικής. Οι ανθισμένες κορυφές συλλέγονται από το Μάιο ως το Σεπτέμβριο, ενώ τα φύλλα κατά τη διάρκεια ή μετά τη πλήρη άνθιση. Πολύ συχνά καλλιεργείται ως καλλωπιστικό και χρησιμοποιείται ως άρτυμα. Εξαιτίας του αιθέριου ελαίου που περιέχουν τα φύλλα και τα άνθη του, χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική και την



αρωματοποιία.

Πρόκειται για αειθαλή θάμνο, ύψους 0,50-2 m. Ο βλαστός του είναι τετράγωνος, ορθόκλαδος, πολύκλαδος και πυκνόφυλλος. Έχει φύλλα βελονοειδή, μήκους 1,5-4 cm, δερματώδη, γραμμοειδή, άμισχα. Η κάτω επιφάνεια των φύλλων φέρει άφθονες τρίχες και γι' αυτό έχει λευκοπράσινο χρωματισμό. Τα άνθη είναι, λευκά προς τα γαλάζιο ή ανοιχτά ιώδη και βγαίνουν πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων ή στις άκρες των βλαστών (Πολυσιού, 2002).

Τα φύλλα και τα άνθη του δενδρολίβανου έχουν έντονη αρωματική οσμή και πικρή καμφορούχα γεύση. Το αιθέριο έλαιο έχει απόδοση που κυμαίνεται από 1% έως 2,5% με κύριες ουσίες την ευκαλυπτόλη, καμφορά, λεμονένιο, α-πνένιο, καμφένιο (Daferera et al., 2002). Ενώ εκχυλίσματα του φυτού με οργανικούς διαλύτες περιέχουν φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, διτερπενικά οξέα και άλλα συστατικά (Madsen και Bertelsen, 1995; Cuvelier et al., 1996; Zheng και Wang, 2001). Σε μεγαλύτερη ποσότητα βρέθηκε η καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, η ροσμαρόλη, το ροσμαρινικό οξύ (Madsen και Bertelsen, 1995; Rice-Evans et al., 1997; Almela et al., 2006).

Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη από πότισμα και μπορεί να φυτρώσει και σε βραχώδεις ορεινές περιοχές καθώς πρόκειται για ένα πολύ ανθεκτικό φυτό που προσαρμόζεται πολύ εύκολα στην περιοχή που φύεται και αντέχει ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η καλλιέργειά του είναι εύκολη και πολλαπλασιάζεται με παραφυάδες, ιδίως σε έδαφος ασβεστούχο.

Το δενδρολίβανο συναντάται στην αρχαιότητα να καίγεται ως υλικό θυμιάματος κατά της διάρκεια θυσιών και εξευμενισμού θεοτήτων δίπλα στους βωμούς. Το δενδρολίβανο χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για να ενισχύσει και να δυναμώσει τη μνήμη. Οι αρχαίοι Έλληνες μάλιστα, δεν παρέλειπαν να φορέσουν ένα στεφάνι δενδρολίβανου στο κεφάλι τους σε περιόδους σκληρής μελέτης. Στον Μεσαίωνα πίστευαν ότι φυτρώνει μόνο του μόνο στην αυλή των δικαίων ανθρώπων.

Στη φαρμακευτική χρησιμοποιείται γιατί δρα ως χολαγωγό, διουρητικό, εμμηναγωγό, τονωτικό και σπασμολυτικό. Είναι επίσης γνωστό για τις αντισηπτικές (Bult et al., 1985), αντιρρευματικές (Makino et al., 2000), αντιφλεγμονώδεις (Juhas et al., 2009; Beninca et al., 2011) και αντισπασμωδικές ιδιότητες. Τα διάφορα

εκχυλίσματα δενδρολίβανου έχουν μελετηθεί για ηπατοπροστατευτικές (Sotelo-Felix *et al.*, 2002;), αντιδιαβητικές (Bakirel *et al.*, 2008) και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες (Machado *et al.*, 2009).

### 3.2. Δίκταμο -*Origanum dictamnus* L. (οικ. Lamiaceae)

Το είδος *Origanum dictamnus* είναι ενδημικό αρωματικό φυτό της Κρήτης. Αυτοφύεται σε ασβεστούχα εδάφη, σε απόκρημνες, βραχώδεις τοποθεσίες, στα φαράγγια του νησιού, συνήθως σε σκιώδη μέρη σε υψόμετρο 300 έως 1500 μέτρα (Σφήκας, 2005). Το όνομά του το πήρε από το όρος Δίκτυ (Λασηθιώτικα Όρη) όπου παλαιότερα αφθονούσε. Οι ντόπιοι το αποκαλούν "έρωντα" αναφερόμενοι στις ελαφρές αφροδισιακές τους ιδιότητες. Είναι ένα από τα σπουδαιότερα φαρμακευτικά φυτά, γνωστό στη Μινωική Κρήτη και την Αρχαία Ελλάδα.



Εικόνα 3.2. Δίκταμο  
*Origanum dictamnus* L.

Είναι φυτό πολυετές, το ύψος του φτάνει μέχρι τα 20 εκατοστά. Φέρει φύλλα δισκοειδή ή πλατειά ωοειδή μήκους 8-25 χιλιοστών, που καλύπτονται με πυκνό λευκό τρίχωμα. Τα άνθη ξεπροβάλλουν σε σταχύδια μέσα από μεγάλα, πλατιά, σχεδόν κυκλικά βράκτια και έχουν βιολετί χρώμα (Kintzios, 2002). Όλα σχεδόν τα υπέργεια τμήματα του φυτού φέρουν αδενώδεις τρίχες, πλούσιες σε αιθέριο έλαιο. Το τελευταίο κυμαίνεται σε ποσοστό 1,20-1,70 %, ενώ κύρια συστατικά του είναι η καρβακρόλη, το π-κυμένιο και η θυμόλη στα οποία έχουν αποδοθεί αντιμικροβιακές ιδιότητες (Daferera *et al.*, 2000). Μεθανολικά εκχυλίσματα δίκταμου περιέχουν σημαντικές ποσότητες υδροξυκινναμικών οξέων, υδροξυβενζοϊκών οξέων και φλαβονοειδών (Proestos *et al.*, 2005; Chatzopoulou *et al.*, 2010).

Το δίκταμο έχει αντισπασμωδική, τονωτική και διεγερτική δράση. Επιπλέον, δρα εξωτερικά ως επουλωτικό. Το δίκταμο ήταν ευρύτερα γνωστό και στην

αρχαιότητα το οποίο θεωρούνταν πολύτιμο φαρμακευτικό φυτό και χρησίμευε ως πανάκεια σε διάφορες παθήσεις, αλλά και ως θεραπευτικό των τραυμάτων. Άλλωστε από την εποχή του Μίνωα, θεωρούσαν το δίκταμο ως το πολυτιμότερο φαρμακευτικό φυτό. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε το δίκταμο στην νήσο Κω για θεραπεία της χολής, των πνευμόνων αλλά και ως κατάπλασμα στα πρηξίματα. Ο Διοσκουρίδης μεταχειριζόταν το φυτό για να γιατρέψει τα τραύματα από πολεμικά όπλα. Ενώ ο Αριστοτέλης αναφέρει ότι οι αίγαγροι του Ψηλορείτη έτρωγαν δίκταμο, έγλυφαν με αυτό τις πληγές τους κι έτσι απέβαλλαν τα βέλη των κυνηγών, επουλώνοντας τις πληγές τους. Στον μεσαίωνα οι Βενεδικτίνοι και οι Τραπιστές και άλλοι καλόγεροι χρησιμοποιούσαν τον δίκταμο στα περίφημα λικέρ τους που θεωρούνταν σπουδαία ορεκτικά και χωνευτικά επιδόρπια (Bauman, 1999).

### 3.3. Μελισσόχορτο- *Melissa officinalis* L. (οικ. Lamiaceae)

Το μελισσόχορτο είναι αυτοφυές φυτό των μεσογειακών χωρών της Ευρώπης. Στην Ελλάδα αυτοφύεται σε υγρές πεδινές ή σε ορεινές δασώδεις εκτάσεις της Μακεδονίας, της Θράκης και των νησιών του Ιονίου. Καλλιεργείται σε χώρες της νότιας και βόρειας Ευρώπης, της Αμερικής και της δυτικής Ασίας.

Το φυτό αυτό είναι πολυετής πόα, με βλαστό τετραγωνικό, τριχωτό, πολύκλαδο, ύψους 40-80 cm. Τα φύλλα είναι καρδιόσχημα με μακρύ μίσχο, αυλακωτό, μήκους 3-5 cm και πλάτους 3 cm με χείλη πριονωτά και χαρακτηριστική οσμή λεμονιού. Τα άνθη είναι δίχειλα, μικρά, έχουν χρώμα λευκό, ροδίζον ή κίτρινο ανάλογα με την ποικιλία. Το μελισσόχορτο ανθίζει από τον Ιούνιο μέχρι και τον Αύγουστο.



Εικόνα 3.3. Μελισσόχορτο  
*Melissa officinalis* L.

Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο είναι αρκετά χαμηλή ωστόσο περιέχει υψηλό ποσοστό κιτράλης αλλά και άλλων ουσιών όπως κιτρονελλάλη, λιναλοόλη και γερανιόλη (Mimica-Dukic *et al.*, 2004), στις οποίες οφείλει το έντονο άρωμα του που θυμίζει κυρίως το άρωμα του λεμονιού. Τα οργανικά και υδατικά του εκχυλίσματα περιέχουν υψηλά ποσοστά ροσμαρινικού οξέος (Dastmalchi *et al.*, 2008).

Φαρμακευτικά αφεψήματα και παρασκευάσματα της δρόγης χρησιμοποιούνται σαν ηρεμιστικά, σε διαταραχές ύπνου και διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος (Κουτσός, 2006). Επιπλέον, βελτιώνει την πνευματική διαύγεια και την μνήμη και έχει βοηθήσει σε μικρό αριθμό κλινικών δοκιμών ανθρώπους που πάσχουν από ήπια συμπτώματα της νόσου Alzheimer (Akhondzadeh, 2003).

### 3.4. Κρόκος- *Crocus sativus* L. (οικ. Iridaceae)



Εικόνα 3.4. Κρόκος  
*Crocus sativus* L.

Ο κρόκος ο ήμερος είναι ένα από τα πιο σημαντικά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της Μεσογειακής χλωρίδας. Είναι στείρο τριπλοειδές φυτό, πράγμα που σημαίνει ότι είναι στείρο και δεν μπορεί να αναπαραχθεί εγγενώς. Δεν παράγει σπόρους. Ο μόνος τρόπος για την αναπαραγωγή του είναι μέσω της διάσπασης και σποράς των βολβών του (Fernández *et al.*, 2011). Πιστεύεται ότι μάλλον προήλθε από τον *Crocus cartwrightianus*.

Χρειάζεται ξηρό και θερμό καιρό το καλοκαίρι και κρύο το χειμώνα. Η σπορά γίνεται τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο, με την τοποθέτηση των βολβών σε αυλάκια βάθους 20 εκατοστών και σε απόσταση 10 εκατοστών μεταξύ τους. Η συγκομιδή γίνεται στα τέλη Οκτωβρίου με αρχές Νοέμβριου. Το άνθος του ανοίγει την αυγή, αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η

συγκομιδή γίνεται από όταν ξημερώσει μέχρι πριν τις 10 το πρωί. Μόλις τα άνθη μαζευτούν γίνεται διαχωρισμός του στίγματος από το υπόλοιπο λουλούδι.

Τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα του άνθους αποτελούν το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται ως άρτυμα ή δρόγη. Στην παγκόσμια αγορά αναγνωρίζονται με την εμπορική ονομασία «Saffron».

Τα κύρια συστατικά του των στιγμάτων κρόκου, οι κροκίνες, η σαφρανάλη και η πικροκροκίνη είναι υπεύθυνα για το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση. Οι κροκίνες, οι γλυκοζίτες της κροκετίνης, είναι υδατοδιαλυτές και η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 16,9 με 32,8 mg/100g φ.υ. (Sánchez *et al.*, 2008; Anastasaki *et al.*, 2010b). Η πικροκροκίνη, γλυκοζίτης της σαφρανάλης, κυμαίνεται από 7,4 έως 26,6 mg/100g φ.υ. (Sánchez *et al.*, 2008; Del Campo *et al.*, 2010). Η σαφρανάλη αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου, είναι μια μονοτερπενική αλδεΐδη, που προέρχεται κατά την υδρόλυση της πικροκροκίνης, κατά την επεξεργασία της ξήρανσης των στιγμάτων (Kanakakis *et al.*, 2004).

Ο Διοσκουρίδης αναφέρει ότι ο κρόκος διαθέτει χωνευτικές, διουρητικές, μαλακτικές και αφροδισιακές ιδιότητες, τα ροφήματά του έχουν ευεργετική δράση στα εσωτερικά όργανα, ενώ ανακατεμένος με γλυκό κρασί προστατεύει από τη μέθη. Οι κροκίνες έχουν μελετηθεί για τις αντικαρκινικές (Tarantilis *et al.*, 1994), αντιυπερτασικές (Fatehi *et al.*, 2003), αντισπασμωδικές (Hosseinzadeh και Talebzadeh, 2005), αγχολυτικές (Pitsikas *et al.*, 2008), αντικαταθληπτικές (Hosseinzadeh *et al.*, 2004), αντιφλεγμονώδεις (Hosseinzadeh και Younesi, 2002) ιδιότητές τους.

### **3.5. Φασκόμηλο - *Salvia officinalis* L. (οικ. Lamiaceae)**

Το γένος *Salvia* περιλαμβάνει περίπου 900 είδη ποωδών και ξυλωδών φυτών που είναι ιθαγενή των εύκρατων και τροπικών περιοχών της γης και ιδιαίτερα του Νέου Κόσμου. Στην Ελλάδα απαντούν αυτοφυή 23 είδη *Salvia* κοινώς γνωστά ως αγριοσφακιά, αλισφακιά, μηλοσφακιά, φασκομηλιά, σπατζιά, χαχομηλιά (Kintzios, 2000).



**Εικόνα 3.5.** Φασκόμηλο  
*Salvia officinalis* L.

Το όνομα του γένους *Salvia* προέρχεται από το λατινικό ρήμα *salvare* (=σώζω ζωές). Ο Ιπποκράτης και ο Γαληνός το χρησιμοποιούσαν για θεραπευτικούς σκοπούς, ενώ οι Λατίνοι το θεωρούσαν ιερό φυτό και το χρησιμοποιούσαν σε θρησκευτικές τελετές.

Το φασκόμηλο είναι ένας μικρός, πολυετής, αιθαλής θάμνος, που το ύψος του φτάνει μέχρι τα 70 cm, με βλαστό πολύκλαδο, τετραγωνικό και χνουδωτό. Τα φύλλα είναι αντίθετα, αργυρότεφρα, χνουδωτή στην κάτω επιφάνεια, μήκους 5-8 cm και πλάτους 2-3 cm. Τα άνθη του φύονται κατά σπονδύλους έχουν μήκος 1,5-2 cm, δύο χείλη ιώδους

χρώματος, και ανθίζουν από το Μάιο έως τον Ιούνιο. Βρίσκεται σε όλες της Ελλάδας και ιδιαίτερα σε ξηρά και πετρώδη μέρη.

Τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου είναι η ευκαλυπτόλη, η καμφορά, η  $\alpha$ - και η  $\beta$ -θουγιόνη, η βορνεόλη, το *trans*-καρυοφυλλένιο, το καμφένιο και το  $\alpha$ - και  $\beta$ -πινένιο (Länger *et al.*, 1996). Σε αιθανολικά και ακετονικά εκχυλίσματα βρέθηκε σημαντική ποσότητα ροσμαρινικού οξέος καθώς και λουτεολίνη, απιγενίνη και κερκετίνη (Exarchou *et al.*, 2002). Ενώ σημαντικές είναι και οι ποσότητες καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης και παραγώγων τους σε οργανικά εκχυλίσματα (Cuvelier *et al.*, 1996).

### **3.6. Χαμομήλι - *Matricaria recutita* L. (οικ. Asteraceae)**

Η ονομασία χαμομήλι προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «χαμαί» και «μήλο» δηλαδή μήλο του εδάφους και ορισμένοι πιστεύουν πως το δεύτερο συστατικό του ονόματός του σχετίζεται με το άρωμα.

Το χαμομήλι είναι ετήσια πόα, ύψους 20-60 cm, με βλαστό όρθιο, πολύκλαδο, συνήθως ανοιχτού πράσινου χρώματος.

Τα φύλλα του πτεροειδή (δίπτερα ή τρίπτερα), βελονοειδή, εντελώς άμισχα ή με κοντούς μίσχους. Το ανώτερο τμήμα του βλαστού καταλήγει συνήθως σε 1-2 ανθοκεφαλές. Τα άνθη έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα της μαργαρίτας, με διάμετρο 10-17 mm. Το χρώμα του συμπαγούς ημισφαιρικού κεντρικού τμήματος είναι κίτρινο και τα περιφερειακά πέταλα της στεφάνης λευκά αργυρώδη. Η ανθοφορία του φυτού διαρκεί από τα μέσα Απριλίου μέχρι την πρώτη εβδομάδα του Ιουνίου. Ο καρπός είναι αχάινιο (Κουτσός, 2006).



Εικόνα 3.6. Χαμομήλι  
*Matricaria recutita* L.

Το χαμομήλι έχει βρεθεί ότι είναι πλούσιο σε δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι τα τερπενοειδή και τα флаβονοειδή. Το αιθέριο έλαιο του χαρακτηρίζεται από έντονο μπλε χρώμα λόγω της παρουσίας χαμαζουλενίου, άλλα σεσκιτερπένια που ανευρίσκονται είναι η μπισαμπολόλη και τα οξειδιά της αλλά και το β-φαρνεσένιο (Szöke *et al.*, 2004). Υψηλά ποσοστά καφεϊκού και φερουλικού οξέος καθώς και παραγώγων τους, απιγενίνης έχουν αναφερθεί σε εκχυλίσματα χαμομηλιού (Mulinacci *et al.*, 2000; Švehlíková *et al.*, 2004) καθώς και κουμαρίνες (Petrušová-Poracká *et al.*, 2013).

Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του χαμομηλιού είναι ήδη γνωστές από την αρχαιότητα. Πρώτος ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της ιατρικής ήταν αυτός που ανέφερε τις ευεργετικές του ιδιότητες. Το χαμομήλι χρησιμοποιείται ευρύτατα στη θεραπεία φλεγμονών του δέρματος και των βλεννογόνων, και για διάφορες βακτηριακές λοιμώξεις του δέρματος, της στοματικής κοιλότητας, των ούλων και της αναπνευστικής οδού. Χρησιμοποιείται ως καταπραϊντικό του στομάχου, σε περιπτώσεις έλκους, για τον παροξυσμό του άσθματος, σε νευραλγίες, μυϊκές κράμπες, σπασμούς και ημικρανίες καθώς και για την καταπολέμηση της αϋπνίας χάρη στις ηρεμιστικές/ χαλαρωτικές ιδιότητες που έχει.

### 3.7. Προοπτικές καλλιέργειας αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

Η καλλιέργεια αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι ένας επιθετικός κλάδος στη γεωργική πράξη. Η αξιοποίηση των προϊόντων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην ελληνική γη μόνο οφέλη μπορεί να παρουσιάσει. Επιπλέον, η επιβεβλημένη αντικατάσταση των παραδοσιακών προϊόντων (όπως καπνός, βαμβάκι κ.ά.) προσδίδει μεγάλη ώθηση και προσδοκίες για την χρησιμοποίηση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών ως εναλλακτικές καλλιέργειες.

Τα βραχυπρόθεσμα οφέλη για την αγροτική οικονομία από την καλλιέργεια αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αποτυπώνονται από τα πρώτα χρόνια καλλιέργειας. Η ευκολία στην προσαρμογή των συγκεκριμένων φυτών στις εδαφικές και κλιματικές συνθήκες της περιοχής της Μεσογειακής λεκάνης συνοδεύεται με την αύξηση του αγροτικού εισοδήματος.

Τα μακροπρόθεσμα οφέλη επικεντρώνονται στη μεγιστοποίηση της εμπορικής αξίας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αφού θα είναι δυνατόν από αυτά να παραχθούν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα προϊόντα αυτά θα μπορούν μάλιστα να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών ή ακόμα και στη φαρμακοβιομηχανία.

Η καλλιέργεια αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών μπορεί να αποτελέσει την ιδανική λύση για να αυξηθεί το αγροτικό εισόδημα και να συγκρατηθεί ο αγροτικός πληθυσμός στην ύπαιθρο ιδιαίτερα, δε να αποτελέσει ένα ισχυρό κίνητρο για την ενασχόληση με τον πρωτογενή τομέα ηλικιακά νέων παραγωγών.





## ΣΚΟΠΟΣ

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτελεί η μελέτη συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της μεσογειακής χλωρίδας και η δυνατότητα αξιοποίησής τους ως φυσικά αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά.

Τα αιθέρια έλαια και οργανικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Εν τούτοις υπάρχουν λίγες εργασίες σχετικές με την ανάλυση των αφεψημάτων τους-τη μορφή δηλαδή υπό την οποία στην πραγματικότητα καταναλώνονται-και τα διαδοχικά κλάσματα που προέρχονται από την εκχύλιση τους με οργανικούς διαλύτες. Επί προσθέτως, ακόμη πιο λίγες είναι οι μελέτες που ασχολούνται με τα ενδημικά φυτά της Μεσογειακής χλωρίδας.

Σε πρώτη φάση, η μελέτη επικεντρώθηκε στα αφεψήματα και υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Προσδιορίστηκαν τα πτητικά και τα υδατοδιαλυτά συστατικά αυτών με αέρια και υγρή χρωματογραφία, αντίστοιχα, συνδυασμένες με φασματογράφο μάζας. Μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση *in vitro* με τις μεθόδους δέσμευσης του ριζικού κατιόντος ABTS<sup>•+</sup> και της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Επίσης, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση *in vitro* με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε αγαρ (Wall diffusion assay-WDA) έναντι 19 θετικών κατά Gram και 5 αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Εν συνεχεία έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR και χημειομετρίας.

Σε δεύτερη φάση, ακολούθησε η διαδοχική εκχύλιση του φυτικού υλικού με πετρελαϊκό αιθέρα, διαιθυλαιθέρα και μεθανόλη. Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων. Ακολούθησε η μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους ικανότητας, όπως παραπάνω.

Εν συνεχεία, με βάση την αντιμικροβιακή τους δράση έγινε επιλογή ζευγών εκχυλίσματος και μικροοργανισμού-στόχου και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους

δράση με τη μέθοδο ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης (Killing assay-KA). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η περαιτέρω μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR και χημειομετρίας με σκοπό τη διερεύνηση των δομικών αλλαγών που υφίστανται τα κύτταρα του κάθε μικροοργανισμού- στόχου μετά την επώαση τους με το κάθε εκχύλισμα.

Η ανάδειξη των πιο ισχυρών εν δυνάμει αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών κλασμάτων από τα Ελληνικά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά μπορεί να έχει άμεσα οφέλη στην αγροτική οικονομία. Η ανάπτυξη νέων προϊόντων φυτικής προέλευσης με υψηλή προστιθέμενη αξία θα αποφέρει μεγιστοποίηση της εμπορικής αξίας των συγκεκριμένων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

Επιπλέον, η επιβεβλημένη αντικατάσταση των παραδοσιακών καλλιεργειών (όπως καπνός, βαμβάκι κ.ά.) προσδίδει μεγάλη ώθηση στον κλάδο των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, ως εναλλακτική δυναμική και ελπιδοφόρα καλλιέργεια. Η διαδικασία παραγωγής νέων προϊόντων (ξηρής δρόγης και εκχυλισμάτων) είναι σχετικά απλή και δεν προϋποθέτει την επένδυση μεγάλων κεφαλαίων, αφού είναι δυνατόν να παραχθούν ακόμα και από μικρομεσαίες μονάδες χωρίς την ανάγκη πολυέξοδων εγκαταστάσεων.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ II**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro* αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

### 1.1. Προμήθεια φυτικού υλικού

Η συλλογή των φυτών έλαβε χώρα από συγκεκριμένα φυσικά οικοσυστήματα της Ελλάδας, ειδικότερα για τα είδη *Rosmarinus officinalis* L. (Δεντρολίβανο), *Melissa officinalis* L. (Μελισσόχορτο), *Marticaria recutita* L. (Χαμομήλι), *Salvia officinalis* L. (Φασκόμηλο) η προμήθεια θα γίνει από τον «Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας» (ΑΣΚΑΦΕΦΑ) που δραστηριοποιείται σε πειραματικές καλλιέργειες αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών σε περιοχές που καλλιεργούταν καπνός. Το είδος *Origanum dictamnus* L. (Δίκταμο) προέρχεται από την Κρήτη. Η παραλαβή του φυτικού υλικού και η ξήρανση έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της Ορθής Μετασυλλεκτικής Πρακτικής (Douglas *et al.*, 2005) και στη συνέχεια φυλάχθηκαν στους -18 °C.

### 1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Σε πρώτη φάση, έγιναν δοκιμές για τον τρόπο παραλαβής των εκχυλισμάτων, το χρόνο εκχύλισης, το διαλύτη και τον όγκο αυτού και το συσχετισμό τους με την ολική ποσότητα των πολυφαινολών που υπάρχει στα εκχυλίσματα (μέθοδος Folin-Ciocalteu).

Ο διαλύτης είναι ένα καίριο στοιχείο για την παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών από τα παραπάνω φυτά. Επειδή τα φυτικά υλικά που θα μελετήσουμε, χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον σαν αφεψήματα στην ελληνική διατροφή αποφασίστηκε σε πρώτη φάση, η παραλαβή να δοκιμαστεί με διαλύτη εκχύλισης το μεταλλικό νερό, έναν διαλύτη που θα παραλαμβάνει κυρίως φαινολικά συστατικά. Η ποσότητα του διαλύτη εξετάστηκε στα 100 και στα 200 mL.

Η παραλαβή των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με το διαλύτη (νερό) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς καθόλου ανάδευση, με απλή ανάδευση, υποβοηθούμενη από τους υπερήχους και σε θερμοκρασία 85 °C στο φυτό-δοκιμή *Melissa officinalis* (Μελισσόχορτο).

Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στα 9, 15, 30, 45, 60 min.

Συνεκτιμώντας τα παραπάνω δεδομένα η παραλαβή των εκχυλισμάτων θα γίνει όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 1.1**) σε:

1. θερμοκρασία 85 °C χωρίς ανάδευση
2. θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς ανάδευση
3. θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη από τους υπερήχους

Ο διαλύτης θα είναι μεταλλικό νερό όγκου 200 mL, δηλαδή μια κούπα.

Η ποσότητα του φυτικού υλικού 2 g, δηλαδή ένα κουταλάκι του γλυκού.

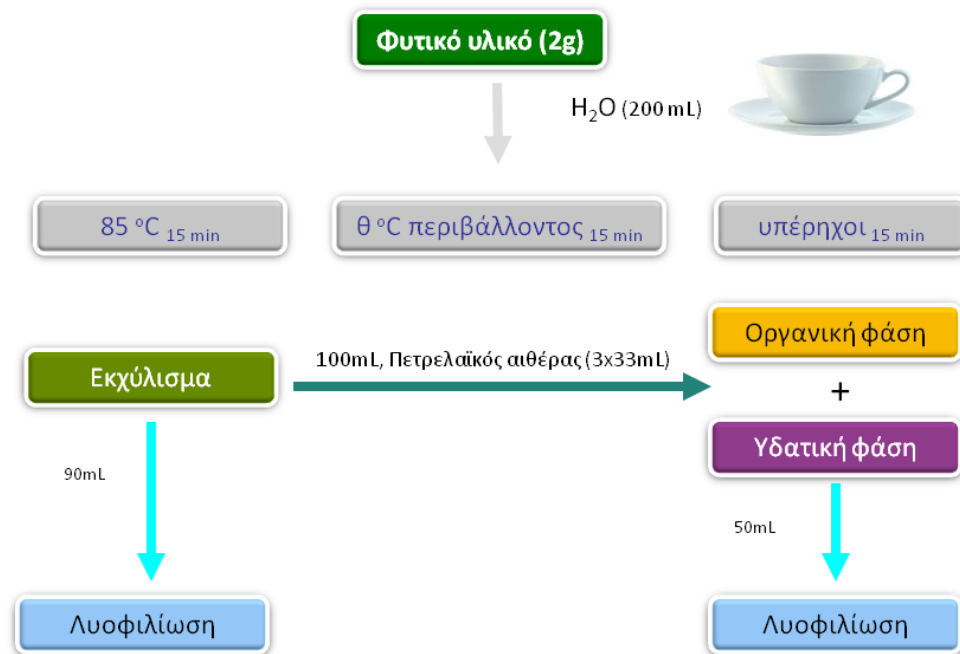
Ο χρόνος εκχύλισης 15 min.

Στη συνέχεια, ένα μέρος του εκχυλίσματος εκχυλίζεται εκ νέου με άπολο οργανικό διαλύτη όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας προκειμένου να παραλάβουμε τα πτητικά συστατικά που μπορεί να υπάρχουν στα εκχυλίσματα- αφεψήματα.

Ένα μέρος των εκχυλισμάτων πριν και μετά την επεξεργασία με τον πετρελαϊκό αιθέρα λυοφυλιώνεται και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

### **1.2.1. Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος**

Σε ποτήρι ζέσεως (pyrex) τοποθετούνται 2 g φυτικού υλικού προστίθεται ποσότητα 200 mL μεταλλικού νερού με ογκομετρικό κύλινδρο και αφήνεται για 15 min. Στη συνέχεια το εκχύλισμα διηθείται υπό κενό με χωνί Buchner σε διηθητικό χαρτί Whatman No 1. Ακολούθως μεταφέρεται σε ογκομετρική των 200 mL και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή.



**Σχήμα 1.1.** Πειραματική διαδικασία παραλαβής υδατικών εκχυλισμάτων

### 1.2.2. Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη σε λουτρό υπέρηχων –USAE

Με την τεχνική αυτή, το ποτήρι ζέσεως με το φυτικό υλικό με την καθορισμένη ποσότητα νερού μεταφέρεται σε λουτρό υπέρηχων (SONOREX SUPER RK255H) που λειτουργεί σε συγκεκριμένη συχνότητα (35 KHz). Η εκχύλιση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία των  $25 \pm 1$  °C και διαρκεί για 15 min. Στη συνέχεια στο εκχύλισμα ακολουθείται η διαδικασία της διήθησης όπως παραπάνω.



### 1.2.3. Εκχύλιση με νερό θερμοκρασίας 85 °C

Σε ποτήρι ζέσεως (pyrex) τοποθετούνται 2 g φυτικού υλικού προστίθεται ποσότητα 200 mL μεταλλικού νερού θερμοκρασίας 85 °C με ογκομετρικό κύλινδρο και αφήνεται για 15 min. Αφήνουμε το αφέψημα να πάρει θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολουθούμε τη διαδικασία διήθησης όπως παραπάνω.

### 1.2.4. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Στη συνέχεια, 100 mL του κάθε παραλαμβανομένου εκχυλίσματος τοποθετείται σε εκχυλιστική χοάνη και εκχυλίζεται με 33 mL πετρελαϊκού αιθέρα προκειμένου να παραλάβουμε τα πτητικά συστατικά που μπορεί να υπάρχουν στα εκχυλίσματα- αφεψήματα. Η εκχυλιστική χοάνη ανακινείται καλά, μετά την εξισορρόπηση των φάσεων, η οργανική φάση συλλέγεται και η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες δυο φορές με πετρελαϊκό αιθέρα.

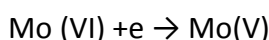
Η οργανική φάση συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (Boeco RVO 400 SD) μέχρις όγκου 2 mL και στη συνέχεια υπό ρεύμα N<sub>2</sub> μέχρις όγκου 0,5 mL και φυλάσσεται σε ειδικά φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας μέχρι την ανάλυση στην κατάψυξη.

### 1.2.5. Λυοφιλίωση

Ένα μέρος των εκχυλισμάτων πριν και μετά την επεξεργασία με τον πετρελαϊκό αιθέρα τοποθετείται σε ειδικές φιάλες λυοφιλίωσης, οι οποίες παραμένουν για λίγη ώρα στη συντήρηση 4 °C και στη συνέχεια τοποθετούνται στους -18 °C για 24 h. Οδηγούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης (Virtis 25 EL Freemobile) όπου μετά από 48 h παραλαμβάνουμε αφυδατωμένα δείγματα. Το στερεό υπόλειμμα παραλαμβάνεται, ζυγίζεται και φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή του.

### 1.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1998). Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφοβολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ), πιθανώς  $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$ , χαρακτηριστικού κυανού χρώματος. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα (Huang *et al.*, 2005):



Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 725 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών που παραλήφθηκαν και με τους τρεις τρόπους όπως περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και στην υδατική φάση μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα.

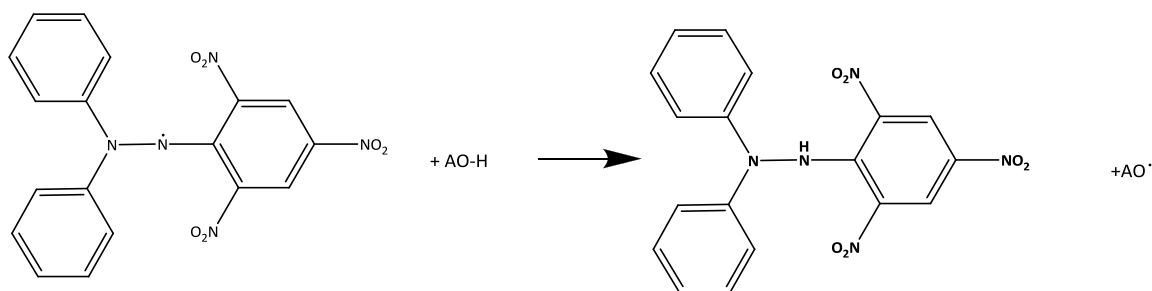
Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, προστίθενται 6 mL απιονισμένου νερού, 100μL από το εξεταζόμενο δείγμα, 500μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και αναμιγνύονται καλά. Μετά το πέρας 3 λεπτών προστίθεται 1,5mL  $Na_2CO_3$  20% w/v, προκειμένου να δημιουργηθεί το αλκαλικό περιβάλλον και να λάβει χώρα η αντίδραση και συμπληρώνεται νερό μέχρι τη χαραγή. Μετά από επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και απουσία φωτός, μετριέται η απορρόφηση στα 725 nm φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V-550. Ο

μηδενισμός του οργάνου γίνεται με διάλυμα που παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία αντί για δείγμα προστίθεται νερό.

Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως παραπάνω.

#### 1.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH<sup>•</sup>

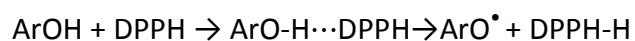
Η μέθοδος αυτή είναι η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας. Το DPPH<sup>•</sup> είναι μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα του οποίου παρουσιάζει έντονο ιώδες (μοβ) χρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αποχρωματίζουν το διάλυμα του DPPH<sup>•</sup> (Σχήμα 1.2).



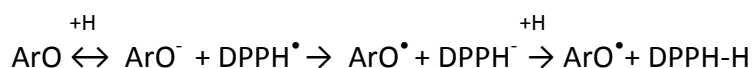
Σχήμα 1.2. Μηχανισμός δράσης DPPH<sup>•</sup>

Το DPPH<sup>•</sup>, σύμφωνα με τους (Foti *et al.*, 2004), αντιδρά με τις φαινολικές ενώσεις (ArOH) με δυο διαφορετικούς τρόπους:

α) με απόσπαση ενός φαινολικού H από τη ρίζα του DPPH<sup>•</sup> (HAT- αντίδραση).



β) με μεταφορά ηλεκτρονίου από τη φαινολική ένωση ή από το φαινολικό ανιόν προ της ελεύθερης ρίζας (ET- αντίδραση).



Οι Foti *et al.*, (2004) μελέτησαν τις κινητικές των αντιδράσεων κινναμικών οξέων και εστέρων τους με DPPH<sup>•</sup> σε μεθανόλη και αιθανόλη. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση γίνεται με μηχανισμό μιας ET- αντίδρασης που γίνεται αρκετά γρήγορα, ενώ η HAT αντίδραση είναι πολύ αργή. Σε πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη, τα μόρια των φαινολικών ενώσεων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη. Αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να αντιδράσουν αυτές κάτω από το μηχανισμό μεταφοράς Η στην ελεύθερη ρίζα (Foti *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005).

Η φασματοφωτομετρική αυτή μέθοδος χρησιμοποιεί τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστήριου και δείγματος για 30 min, στους 25 °C μετράται η απορρόφηση στα 515 nm. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$I \% = [(A_0 - A)/A_0] * 100$$

Όπου I % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας

A<sub>0</sub> = η απορρόφηση του τυφλού

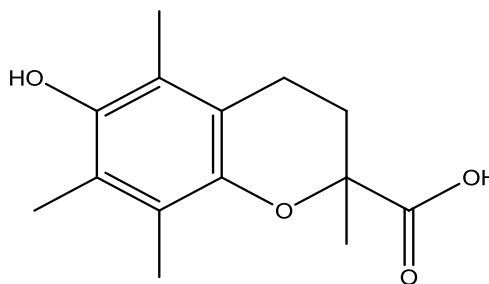
A = η απορρόφηση του δείγματος

Χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών που παραλήφθηκαν και με τους τρεις τρόπους όπως περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και στην υδατική φάση μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα.

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH<sup>•</sup> χρησιμοποιήθηκε διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (Sigma). Το διάλυμα του DPPH<sup>•</sup> (60μM) παρασκευάζεται καθημερινά διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα σε αιθανόλη (BDH, καθαρότητας HPLC). Η απορρόφηση του διαλύματος είναι 0,680±0,005.

30 μL από τα δείγματα προστέθηκαν σε 3 mL διαλύματος DPPH<sup>•</sup>. Για το τυφλό αντί 30μL δείγματος χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη. Μετά από περίοδο επώασης 30 λεπτών σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25 °C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V-550 και προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (I %). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν.

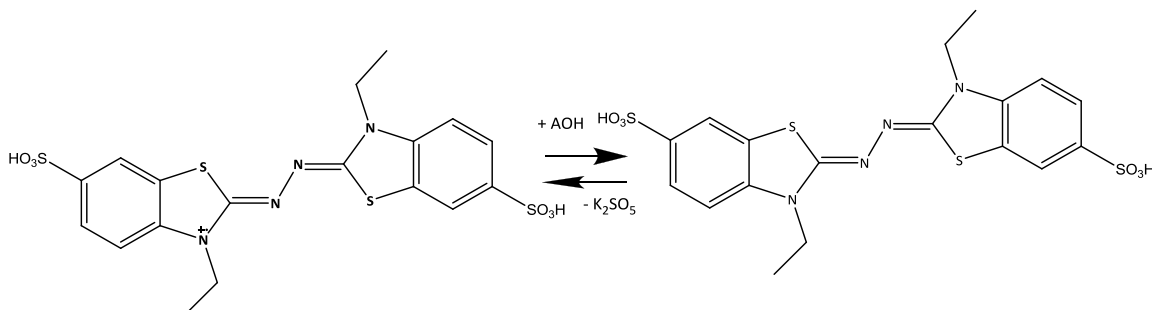
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα TROLOX, (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) το οποίο είναι ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E και ισχυρό αντιοξειδωτικό (Σχήμα 1.3). Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX (0-20 μM) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα. Εν συνεχεία κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη.



Σχήμα 1.3. Δομή TROLOX

### 1.5. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξέος)- ABTS

Το αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου είναι το 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate)]- ABTS. Η μέθοδος ABTS αναπτύχθηκε αρχικά από τους Miler και Rice-Evans το 1993 και αργότερα εξελίχθηκε τους Re *et al.*, (1999). Στην βελτιωμένη έκδοσή της, το οξειδωτικό, το ριζικό κατιόν  $ABTS^{•+}$  παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξέος) ( $ABTS^{2-}$ ) με υπερθειικά ιόντα. Η ρίζα του κατιόντος  $ABTS^{•+}$  έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα, η οποία αποχρωματίζεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών σύμφωνα με το Σχήμα 1.4.



Σχήμα 1.4. Μηχανισμός δράσης ABTS

Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος για 6 min, στους 30 °C μετράται η απορρόφηση στα 734 nm. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$I \% = [(A_0 - A)/A_0] * 100$$

Όπου I % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας

$A_0$  = η απορρόφηση του τυφλού

A = η απορρόφηση του δείγματος

Χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών που παραλήφθηκαν και με τους τρεις τρόπους όπως περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και στην υδατική φάση μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα.

Διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7mM παρασκευάζεται ζυγίζοντας 38,4 mg σε 10 mL δις απεσταγμένο νερό. Το κατιόν  $ABTS^{•+}$  παρασκευάζεται από την αντίδραση 7mM αμμωνιακού άλατος ABTS με 2,45 mM υπερθειικό κάλιο  $K_2S_2O_8$ . Η οξείδωση του ABTS αρχίζει αμέσως αλλά λόγω της στοιχειομετρικής αναλογίας 1:0,5, η απορρόφηση παραμένει σταθερή μετά από 12 ώρες.

Μετά την παραμονή του διαλύματος της ρίζας για 12-16 ώρες στο σκοτάδι, αυτό αραιώνεται με αιθανόλη έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι  $0,700 \pm 0,005$  στα 734nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V- 550. Ως δείγμα αναφοράς για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη.

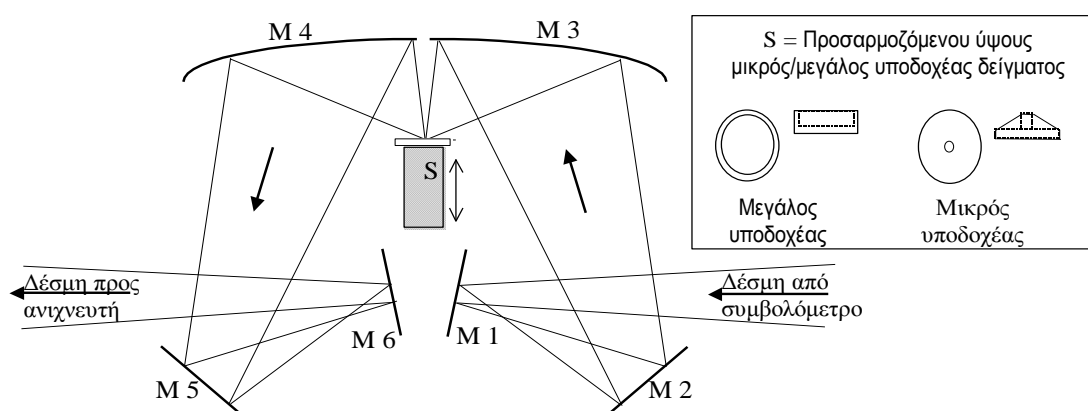
Σε 3 mL του διαλύματος προστίθενται 30  $\mu$ L από τα δείγματα ή νερό για το τυφλό. Αναμιγνύονται καλά και τοποθετούνται σε κλίβανο 30 °C. Μετά την πάροδο 6 λεπτών μετράται η απορρόφηση και υπολογίζεται το ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας σύμφωνα με τον τύπο.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα TROLOX, για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη TROLOX. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX (0-20 $\mu$ M) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα.

### 1.6. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

Η φασματοσκοπία FT-IR σε συνδυασμό με χημειομετρία έχει αποδειχθεί ένα γρήγορο εργαλείο για την πρόβλεψη ή την ποσοτικοποίηση κύριων συστατικών σε διάφορα προϊόντα. Η προσπάθειά μας επικεντρώθηκε στην αξιοποίηση της ταχύτητας που μας παρέχει η φασματοσκοπία υπεράυθρου στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας ολικών φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Στα λυοφιλωμένα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy-DRIFTS). Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης είναι μία από τις τεχνικές λήψης FT-IR φασμάτων από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως σε μορφή σκόνης. Η μέθοδος DRIFTS χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια γιατί είναι απλή, πάρα πολύ γρήγορη και δεν απαιτεί ουσιαστικά προηγούμενη κατεργασία του δείγματος. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος (Σχήμα 1.5). Το εξάρτημα αυτό διαθέτει 6 κάτοπτρα. Τα κάτοπτρα  $M_1$ ,  $M_2$  και  $M_3$  εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα  $M_4$ ,  $M_5$  και  $M_6$  εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Ο χώρος όπου τοποθετείται το δείγμα (υποδοχέας) μπορεί να είναι δύο μεγεθών. Ο μεγαλύτερος έχει διάμετρο 13 mm και ύψος 2 mm ενώ ο μικρός 3 και 2 mm αντίστοιχα.



Σχήμα 1.5. Εξάρτημα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης

Ποσότητα 2 mg του δείγματος σε μορφή σκόνης τοποθετήθηκε στο ειδικό δισκίο και γίνεται λήψη του φάσματος FT-IR στο φασματόμετρο Thermo Nicolet 6700. Ως φάσμα αναφοράς λαμβανόταν ως υπόβαθρο (background) το φάσμα του καθαρού βρωμιούχου καλίου (KBr). Σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 σαρώσεις (scans), η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν  $0.3165\text{ mms}^{-1}$ . Στα όλα τα φάσματα FT-IR έγιναν οι συνήθεις επεξεργασίες που γίνονται, η εξομάλυνση του σήματος (smoothing) και η διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correct). Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς. Οι παραπάνω επεξεργασίες γίνονται χρησιμοποιώντας την αυτόματη διαδικασία από το λογισμικό πρόγραμμα OMNIC. Στη συνέχεια, με το λογισμικό πρόγραμμα Turbo Quant Analyst software (TQ Analyst) έκδοση 7.2.2.161 by Thermo Electron Corp., κατασκευάστηκαν μοντέλα βαθμονόμησης μερικώς ελαχίστων τετραγώνων (Partial least square regression-PLS) σε διάφορες περιοχές του φάσματος. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δείγματα βαθμονόμησης και σε δείγματα πρόβλεψης.

### **1.7. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με την παραπάνω.



## 2. Χρωματογραφική μελέτη πτητικών και φαινολικών συστατικών αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

### 2.1. Μελέτη των εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η οργανική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα αναλύθηκε με αέριο χρωματογράφο Hewlett Packard 5890 II εφοδιασμένο με μια HP- 5MS τριχοειδή στήλη μήκους 30 m, διαμέτρου 0,25 mm και πάχους 0,25 μm και ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας, Hewlett Packard 5972.

Ο διαχωρισμός των συστατικών έγινε με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και η ταυτοποίηση με φασματομετρία μαζών.

Η θερμοκρασία στο θάλαμο εισαγωγής του δείγματος είναι στους 220 °C ενώ, η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς του ανιχνευτή είναι στους 290 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης ξεκινά από τους 50 °C όπου παραμένει για 3 min και σταδιακά φθάνει τους 180 °C ενώ, αυξάνεται ανά 3 °C/min. Στη συνέχεια, από τους 180 °C φθάνει τους 250 °C και αυξάνεται με ρυθμό 15 °C/min. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He) όπου η ταχύτητα ροής του είναι 1 mL/min. Τα δείγματα, όγκου 1μL, εισήχθησαν χειροκίνητα με μικροσύριγγες στο θάλαμο εξαέρωσης (Kanakis *et al.*, 2004; Anastasaki *et al.*, 2009).

Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίζεται στη σύγκριση τους με ενώσεις όπου έχουν καταχωρηθεί σε βάσεις δεδομένων δηλαδή, βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, που περιέχουν το “αποτύπωμα” κάθε ένωσης, καθώς και σχετική βιβλιογραφία. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι Adams 07, NIST 98, και Wiley 275. Τα ποσοστά επί τοις εκατό (%) των ενώσεων λαμβάνονται ηλεκτρονικώς από το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και την αναγωγή του σε ποσοστό.

## 2.2. Μελέτη των αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Τα αφεψήματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στη λυοφιλιωμένη τους μορφή αναλύθηκαν με το σύστημα 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector- DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 2mg/mL σε μεθανόλη και πριν την εισαγωγή στη στήλη τα διαλύματα διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20μm και διάμετρο 15 mm (Chromafil Xtra PET- 20/15).

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανεστραμμένης φάσης (HPLC- RF). Η μέθοδος ανάλυσης που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνα με τη μέθοδο των Caniona και Brandsterona (2001). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης A ήταν δισαπεσταγμένο και φιλτραρισμένο H<sub>2</sub>O ρυθμισμένο σε pH 2,5 με προσθήκη μυρμιγκικού οξέος και ο διαλύτης B ήταν μεθανόλη μεγάλης καθαρότητας για HPLC. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 0,4 mL/min. Η πίεση κυμαινόταν από 140-240 bar. Η στήλη ήταν Supelco Discovery HS C<sub>18</sub>, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4 mm. Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Αυτό έγινε κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου, με στόχο να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με κατάλληλη σύριγγα HPLC και ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μL. Το πρόγραμμα έκλουσης της στήλης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2.1**).

**Πίνακας 2.1.** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αφεψημάτων

ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ		
Χρόνος t (min)	% A	% B
0	75	25
2	75	25
40	10	90

Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 280, 330 και στα 370 nm. Το μήκος κύματος 280 nm χρησιμοποιείται για τα φαινολικά οξέα και 330 και 370 nm για τα φλαβονοειδή.

Για την ταυτοποίηση ουσιών έγινε σύγκριση με χρωματογραφήματα μεμονωμένων πρότυπων ουσιών. Τα χρωματογραφήματα των πρότυπων λήφθηκαν με τον ίδιο τρόπο, που λήφθηκαν τα άγνωστα, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους (χρόνους, συγκεντρώσεις διαλυτών κινητής φάσης). Η σχετική ταυτοποίηση κάθε φορά γινόταν με συνδυασμό του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος του εκλουόμενου συστατικού και τη σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα γνωστών πρότυπων ουσιών.

### **2.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών**

Οι πρότυπες ενώσεις που αναλύθηκαν ήταν φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγκικό οξύ, βανιλλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, κατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη του γαλλικού οξέος, επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος, κερκετίνη, καεμφερόλη, λουεολίνη, 7-Ο- γλυκοζίτης της λουτεολίνης. Για κάθε πρότυπη ένωση παρασκευάστηκε αρχικά ένα μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκεντρώσεως 1 mg/mL (1000 ppm) σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC, που διατηρήθηκε στην κατάψυξη στους -18 °C. Εν συνεχεία, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 100 ppm και αναλύθηκε στις ίδιες συνθήκες.

### **2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός ροσμαρινικού οξέος με HPLC**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος έγινε με τη μέθοδο των εξωτερικών προτύπων. Από το μητρικό διάλυμα του 1 mg/mL, παρασκευάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις από 1-120 ppm και αναλύθηκαν με τις ίδιες συνθήκες. Τα πρότυπα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -18 °C. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεταξύ του εμβαδού της κορυφής του ροσμαρινικού οξέος και της αντίστοιχης συγκέντρωσης. Η κάθε συγκέντρωση αναλύθηκε τρεις φορές.

### 2.3. Μελέτη των αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των συστατικών των αφεψημάτων έγινε σε σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10 ADnr, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10 ADnr ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20  $\mu\text{L}$ , ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA) SPD-M10 Avr και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (MS-ESI, ElectroSpray Ionization, negative mode). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό Lab Solutions της εταιρείας Shimadzu version 3.40.307 για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Η στήλη και το πρόγραμμα έκλουσης ήταν όμοια με αυτά της παραγράφου 2.2.

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

Θερμοκρασία πηγής ιονισμού CDL(Curved Dissolvation Line) 250  $^{\circ}\text{C}$  , ροή αερίου εκνέφωσης ( $\text{N}_2$ ) 1,5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  , πίεση αερίου ξήρανσης ( $\text{N}_2$ ) 0,1 MPa (ροή 10  $\text{L}/\text{min}$ ), θερμοκρασία heat block 300  $^{\circ}\text{C}$ , δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface) - 3,5kV, τάση CDL-20V και τάση ανιχνευτή -1,48kV.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα αφεψημάτων όμοιας συγκέντρωσης, όπως και στην παράγραφο 2.2.2 και τα οποία διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20 $\mu\text{m}$  και διάμετρο 15 mm (Chromafil Xtra PET- 20/15) πριν την εισαγωγή τους. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες αναλύθηκαν αντιστοίχως και τα διαλύματα των προτύπων ενώσεων της παραγράφου 2.2.1.

### **3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών *in vitro*.**

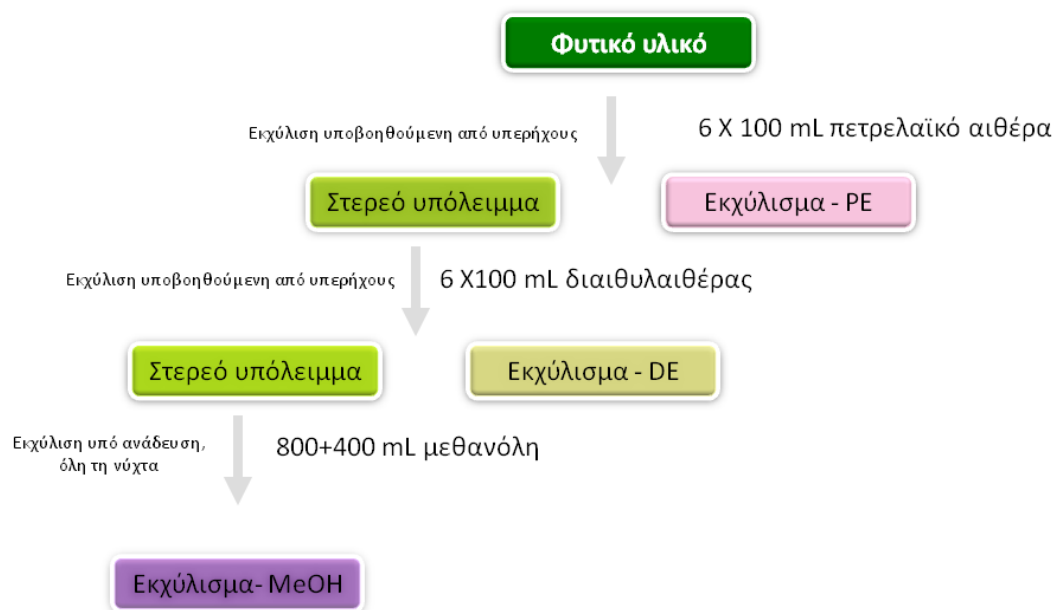
#### **3.1. Προμήθεια φυτικού υλικού**

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο με του προηγούμενου πειράματος, με την προσθήκη του *Crocus sativus* L., η προμήθεια του οποίου έγινε από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Τα είδη *Rosmarinus officinalis* L. (Δεντρολίβανο), *Melissa officinalis* L. (Μελισσόχορτο), *Marticaria recutita* L. (Χαμομήλι), *Salvia officinalis* L. (Φασκόμηλο) προήλθαν από τον «Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας» (ΑΣΚΑΦΕΦΑ). Το είδος *Origanum dictamnus* L. (Δίκταμο) προέρχεται από την Κρήτη. Η παραλαβή του φυτικού υλικού και η ξήρανση έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της Ορθής Μετασυλλεκτικής Πρακτικής (Douglas *et al.*, 2005) και στη συνέχεια φυλάχθηκαν στους -18 °C.

#### **3.2. Προετοιμασία δειγμάτων**

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.1).

Σε 5 g κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού έγινε διαδοχική εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (Petroleum Benzine 40-60 °C, Emsure Merck), διαιθυλαιθέρα (Diethyl ether, pesticide pur, Carlo Erba) υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων και με μεθανόλη (Methanol HPLC - PLUS – Gradient, Carlo Erba) υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα.



**Σχήμα 3.1.** Πειραματική διαδικασία παραλαβής οργανικών εκχυλισμάτων

### 3.2.1. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων –USAE

Αρχικά το φυτικό υλικό τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 500 mL και πληρώθηκε με 100 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολούθησε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (SONOREX SUPER RK255H) που λειτουργεί σε συγκεκριμένη συχνότητα (35 KHz). Η εκχύλιση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία των  $25 \pm 1$  °C και διαρκεί για 15 min. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα διηθήθηκε με φίλτρο πορώδους 0,45 μm και διάμετρο 25 mm (Chromafil Xtra PET- 45/25) και φυλάχθηκε στην κατάψυξη.

Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε εκ νέου ποσότητα 100 mL διαλύτη και ακολουθήθηκε νέα εκχύλιση. Συνολικά, έγιναν 6 εκχυλίσεις και συλλέχθηκαν 6 οργανικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (Boeco RVO 400 SD) μέχρις όγκου περίπου 5 mL. Στη συνέχεια, η ποσότητα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο μπουκαλάκι με βιδωτό πώμα και η συμπύκνωση συνεχίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου N<sub>2</sub>. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή τους.

Το στερεό υπόλειμμα που παρέμεινε μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα οδηγήθηκε σε ρεύμα αζώτου  $N_2$  για να εξατμιστεί τυχόν περίσσεια διαλύτη. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία εκχύλισης όπως παραπάνω χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά σε διαλύτη εκχύλισης το διαιθυλαιθέρα. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε τρεις φορές.

### **3.2.2. Εκχύλιση υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος**

Από το στερεό φυτικό υπόλειμμα απομακρύνθηκε υπό ρεύμα αζώτου  $N_2$  η περίσσεια του διαιθυλαιθέρα και μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 2000 mL. Προστέθηκε ποσότητα 800 mL μεθανόλης και τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα, (Heidolph MR Hei-Standard) για όλο το βράδυ. Η όλη διαδικασία γινόταν απουσία φωτός. Για το λόγο αυτό, το ποτήρι ζέσεως ήταν καλυμμένο με αλουμινόχαρτο. Το πρωί της άλλης μέρας, γινόταν η συλλογή των 800 mL και στο στερεό φυτικό υπόλειμμα γινόταν προσθήκη 400 mL μεθανόλης. Η ποσότητα της μεθανόλης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (Boeco RVO 400 SD).

### **3.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu**

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως της παραγράφου 1.3. με μικρές διαφοροποιήσεις. Αφενός, επειδή οι ποσότητες ήταν αρκετά μικρές, οι όγκοι τροποποιήθηκαν αναλόγως. Σε 12- well plate προστέθηκε 1,5 mL απιονισμένο νερό, 25  $\mu$ L δείγματος και 125  $\mu$ L από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και αναδεύονται καλά. Μετά την πάροδο 3 min προσθέτονται 375  $\mu$ L  $Na_2CO_3$  και 475  $\mu$ L απιονισμένο νερό. Μετά από επώαση δύο ωρών στο σκοτάδι μετριέται η απορρόφηση μέσω του φωτόμετρου ρυθμισμένο στα 725 nm. Αφετέρου, τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν με μεθανόλη και διηθήθηκαν από μεμβρανώδη ηθμό πορώδους 0,45  $\mu$ m. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με διάλυμα που παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία αντί για δείγμα προστίθεται μεθανόλη.

### **3.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH\***

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε κάποιες διαφοροποιήσεις από την αντίστοιχη της παραγράφου 1.4. Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH\* σε μεθανόλη αντί αιθανόλης. Σε 3 mL του διαλύματος DPPH\*, προστίθεται 30 μL διαφόρων συγκεντρώσεων σε μεθανόλη του προς εξέταση φυτικού εκχυλίσματος. Το μίγμα αναδεύεται καλά, αφήνεται στο σκοτάδι, μετριέται η απορρόφηση στα 515 nm και προσδιορίζεται το ποσοστό δέσμησης της ρίζας. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε μίγμα 3 mL διαλύματος DPPH\* με 30 μL μεθανόλης, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμή TEAC, διαιρώντας την κλίση της ευθείας του TROLOX, προς την κλίση της ευθείας των δειγμάτων από τις γραφικές παραστάσεις που προκύπτουν από τα ποσοστά δέσμησης της ρίζας DPPH\* με τη συγκέντρωση του TROLOX και των δειγμάτων, αντίστοιχα.

Επιπλέον, ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ισχύς χρησιμοποιείται και η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί δέσμηση κατά 50 % της ελεύθερης ρίζας και καλείται Inhibition Concentration (IC<sub>50</sub>). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται από τη γραφική παράσταση που προκύπτει από τα ποσοστά δέσμησης της ρίζας DPPH\* με τη συγκέντρωση των δειγμάτων.

### **3.5. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)- ABTS**

Η διαδικασία για την παρασκευή του ριζικού κατιόντος ABTS<sup>\*+</sup> είναι η ίδια όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.5 με μικρές διαφοροποιήσεις.

Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 3 mL διαλύματος ABTS<sup>\*+</sup> με 30μL μεθανόλης, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε 3 mL αιθανόλης με 30 μL μεθανόλη.



Σε 3 mL του διαλύματος ABTS<sup>•+</sup>, προστίθεται 30  $\mu$ L διαφόρων συγκεντρώσεων σε μεθανόλη του προς εξέταση φυτικού εκχυλίσματος. Το μίγμα αναδεύεται καλά μετά από 6 min στους 30 °C μετρίεται η απορρόφηση στα 734 nm και προσδιορίζεται το ποσοστό δέσμευσης της ρίζας.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμή TEAC και επίσης υπολογίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub> όπως παραπάνω.

## **4. Χρωματογραφική μελέτη πτητικών και φαινολικών συστατικών οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών**

### **4.1. Μελέτη των εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία**

Στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα των φυτών έγινε ποιοτική ανάλυση των συστατικών με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματόμετρο μάζας και στη συνέχεια ποσοτική ανάλυση με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector-FID).

#### **4.1.1. Ποιοτικός προσδιορισμός**

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε με την ίδια διαδικασία της παραγράφου 2.1.

#### **4.1.2. Ποσοτικός προσδιορισμός**

Η ποσοτική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου συνδυασμένου με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας. Η λειτουργία του βασίζεται στο ότι κατά την καύση μιας οργανικής ουσίας σε φλόγα αέρα-H<sub>2</sub> παράγονται ιόντα που υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου δημιουργούν μικρό ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο καταγράφεται. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των συστατικών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μετριέται το εμβαδόν μιας ένωσης που χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο και η οποία εισάγεται στην ίδια ποσότητα τόσο στο άγνωστο δείγμα, όσο και σε διαλύματα προτύπων ουσιών.

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η ισοοκτανόλη συγκέντρωσης 2000 ppm σε διαιθυλαιθέρα. Αρχικά, παρασκευάστηκαν δείγματα πρότυπων ενώσεων γνωστής συγκέντρωσης και ισοοκτανόλης, τα οποία αναλύθηκαν στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες και καταγράφηκαν τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο εσωτερικός συντελεστής απόκρισης (Internal Response Factor) της κάθε ένωσης σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$IRS = (A_{IS} \times C_C) / (C_{IS} \times A_C)$$

Όπου IRS = εσωτερικός συντελεστής απόκρισης

$A_{IS}$  = το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου

$A_C$  = το εμβαδό της κορυφής της πρότυπης ένωσης

$C_{IS}$  = η ποσότητα του εσωτερικού προτύπου

$C_C$  = η ποσότητα της πρότυπης ένωσης

Ακολουθεί η ανάλυση του δείγματος, που περιέχει τις ενώσεις αγνώστου συγκέντρωσης, με την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου και καταγράφονται τα εμβαδά των προς προσδιορισμό ενώσεων και του εσωτερικού προτύπου. Η ποσότητα της κάθε ένωσης υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο χρησιμοποιώντας τον εσωτερικό συντελεστή απόκρισης της κάθε ένωσης:

$$\text{Ποσότητα} = (A_C \times C_{IS} \times IRS_C) / A_{IS}$$

Όπου  $A_C$  = το εμβαδό της κορυφής της ένωσης

$C_{IS}$  = η ποσότητα του εσωτερικού προτύπου

$IRS_C$  = εσωτερικός συντελεστής απόκρισης της ένωσης

$A_{IS}$  = το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου

Στην περίπτωση της αδυναμίας εύρεσης προτύπων ή της μη ύπαρξης αυτών, η ποσοτικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό συντελεστή απόκρισης εμπορικών διαθέσιμων προτύπων παρόμοιας δομής με την προσδιοριζόμενη ένωση.

## 4.2. Μελέτη των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία

Στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα και της μεθανόλης των φυτών έγινε ποιοτική ανάλυση των συστατικών με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματόμετρο μάζας και στη συνέχεια ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA).

### 4.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε σε σύστημα Shimatzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADnr, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20μL, ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA) SPD-M10Anr και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (MS-ESI, ElectroSpray Ionization, negative mode). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό Lab Solutions της εταιρείας Shimatzu version 3.40.307 για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 2 και 10 mg/mL σε μεθανόλη για τα μεθανολικά και αιθερικά εκχυλίσματα αντίστοιχα, και πριν την εισαγωγή στη στήλη τα διαλύματα διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20μm και διάμετρο 15 mm (Chromafil Xtra PET- 20/15).

Η στήλη ήταν Discovery SUPELCO Analytical (Sigma-Aldrich) C18 αναστραμμένης φάσης μήκους 250 nm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης (5μm). Η μέθοδος ανάλυσης που ακολουθήθηκε ήταν μια τροποποίηση της μεθόδου των Caniona και Brandsterova (2001). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης A ήταν μεθανόλη μεγάλης καθαρότητας για MS και ο διαλύτης B ήταν δις απεσταγμένο νερό ρυθμισμένο σε pH 2,5 με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 0,5 mL/min και η πίεση κυμαινόταν από 140-160 bar. Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (Gradient elution), κατά την οποία

η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Το σύστημα, που χρησιμοποιήθηκε, φαίνεται στον **Πίνακα 4.1**.

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

Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού CDL(Curved Dissolvation Line) 250 °C , ροή αερίου εκνέφωσης (N<sub>2</sub>) 1,5Lmin<sup>-1</sup> , πίεση αερίου ξήρανσης (N<sub>2</sub>) 0,1MPa (ροή 10L/min), θερμοκρασία heat block 300 °C, δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface) -3,5kV, τάση CDL-20V και τάση ανιχνευτή -1,48kV.

**Πίνακας 4.1.** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των οργανικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ		
Χρόνος t (min)	% A	% B
0	25	75
5	25	75
30	65	35
60	100	0
90	100	0

Στα χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης (scan mode) καταγράφηκε η περιοχή από 100 έως 1000 amu (λόγος μάζας προς φορτίο,  $m/z$  ) με χρόνο σάρωσης 6000 amu/s.

Εκτός από τα εκχυλίσματα των φυτών, αναλύθηκαν επίσης και διαλύματα πρότυπων όπως φαίνεται στον πίνακα. Η ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών ενώσεων έγινε με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης, του φάσματος υπεριώδους- ορατού και του φάσματος μάζας του κάθε συστατικού με των προτύπων, ενώ όπου δεν υπήρχαν πρότυπα, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων.

#### 4.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός

Η ποσοτική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων. Για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών στα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εξωτερικού προτύπου.

Πρότυπο μητρικό διάλυμα 1 mg/mL των φαινολικών ενώσεων χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ, 7-ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ρουτίνη, ροσμαρινικό οξύ, 7-ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, εριοδικτυόλη, ναριγενίνη, λουτεολίνη, καεμφερόλη, απιγε-

**Πίνακας 4.2.** Πρότυπες ενώσεις που αναλύθηκαν, καθώς και οι αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσης (RT), τα  $\lambda_{\max}$  UV-Vis φασμάτων, το κύριο θραύσμα μάζας (m/z) σε ESI<sup>-</sup>

Πρότυπες ενώσεις	RT (min)	UV max (nm)	m/z
Χλωρογενικό οξύ	15.95	223, 235, 325	353
Κυναρίνη	19.22	244, 322	515
Καφεϊκό οξύ	20.87	243, 297, 324	179
Κιχορικό οξύ	24.12	294, 329	474
Οριεντίνη	25.28	256,267,349	447
Γκενιστίνη	27.41	260,326	431, 477
7-ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	28.84	255, 350	447
Μυρισιτρίνη	28.84	229, 256, 352	463
Ρουτίνη	29.33	256, 356	609
3-β-διγλυκοζίτης της κερκετίνης	30.13	226,256,356	463
Ροσμαρινικό οξύ	31.32	247, 330	359
Ελαγικό οξύ	31.42	254,367	301
7-ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης	31.73	267, 340	431
Μυρικετίνη	32.58	231,253,363	317
Κερκιτρίνη	32.58	231,253,363	447
Εριοδικτυόλη	34.28	231, 288	287
Ναριγενίνη	37.45	231, 289	271
Λουτεολίνη	38.27	254, 350	285
Γκενιστεΐνη	39.09	256	269
Καεμφερόλη	40.68	265, 366	285
Απιγενίνη	41.6	237, 267, 340	269
Διοσμετίνη	41.61	252, 347	299
Ακασετίνη	49.3	238, 267, 331	283
Καμφερίδη	49.73	265, 365	299
Γκεγκουανίνη	50.57	267, 339	283
Καρνοσικό οξύ	62.9	234, 285	331, 685

νίνη, καμφερίδη, γκεγκουανίνη παρασκευάστηκε σε νερό, μεθανόλη ή αιθανόλη αναλόγως με τη διαλυτότητά τους. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα κάθε ένωσης σε εύρος συγκεντρώσεων που φαίνεται στον **Πίνακα 4.3**. Επιπλέον, μίγματα αυτών παρασκευάστηκαν στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεταξύ του εμβαδού της κάθε κορυφής και της αντίστοιχης συγκέντρωσης στο μέγιστο μήκος απορρόφησης.

**Πίνακας 4.3.** Πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων και εύρος συγκεντρώσεων

	$\lambda_{\max}$ (nm)	Εύρος συγκεντρώσεων (mg/L)
<b>Απιγενίνη</b>	340	1-50
<b>7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>	340	1-100
<b>Γκεγκουανίνη</b>	340	0,5-50
<b>Εριοδουκτυόλη</b>	290	0,5-50
<b>Καμφερίδη</b>	370	1-50
<b>Καεμφερόλη</b>	370	1-50
<b>Καρνοσικό οξύ</b>	280	1-250
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	330	0,5-50
<b>Λουτεολίνη</b>	350	1-50
<b>7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης</b>	350	1-48,3
<b>Ναριγενίνη</b>	290	0,5-56
<b>Ροσμαρινικό οξύ</b>	330	1-250
<b>Ρουτίνη</b>	370	1-50
<b>Χλωρογενικό οξύ</b>	330	1-50

Στις περιπτώσεις αδυναμίας χρήσης πρότυπων ενώσεων η ποσοτικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς των παραπάνω πρότυπων ενώσεων. Οι γλυκοζίτες της λουτεολίνης ποσοτικοποιήθηκαν ως προς τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης στα 350 nm, οι γλυκοζίτες της απιγενίνης και των φλαβονών ως προς τον 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης στα 340 nm, οι φλαβόνες ως προς απιγενίνη στα 340 nm, οι μεθυλφλαβόνες ως προς τη γκεγκουανίνη στα 340 nm, οι φλαβονόλες ως προς καεμφερόλη στα 370 nm, οι μεθυλφλαβονόλες ως καμφερίδη στα 370 nm, οι γλυκοζίτες των φλαβονολών ως προς ρουτίνη στα 350 nm, το καφεϊκό και φερουλικό οξύ ως προς καφεϊκό οξύ στα 330 nm, ενώ τα παράγωγα καφεϊκού και φερουλικού

οξέος ως προς το χλωρογενικό οξύ στα 330 nm, τα τερπενικά παράγωγα ως προς το καρνοσικό οξύ στα 285 nm..

Στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου, η ποσοτικοποίηση των κροκινών έγινε σύμφωνα με τους Sánchez *et al.*, (2008) σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση}_i \text{ (mg/100 mg)} = (A_i \times 100/A_t) \times (MW_i / \epsilon_{c,t}) \times E_{1cm}^{1\%} 440\text{nm} / 10$$

Όπου το  $A_i$  το εμβαδόν της κάθε κορυφής στο χρωματογράφημα και  $A_t$  το συνολικό εμβαδόν όλων των κροκινών,  $MW_i$  ήταν το μοριακό βάρος των κύριων κροκινών,  $E_{1cm}^{1\%} 440\text{nm}$  η χρωστική δύναμη και  $\epsilon_{c,t}$  ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης και ο οποίος για τις *trans* κροκίνες  $89000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  και *cis* κροκίνες  $63350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Speranza *et al.*, 1984).

Έτσι παράλληλα, προσδιορίστηκε η υγρασία του δείγματος σύμφωνα με τις προδιαγραφές του ISO/TS 3632-2:2003. Ποσότητα 1,000 g στιγμάτων κρόκου ζυγίστηκε με ακρίβεια 0,001 g και τοποθετήθηκε σε ξηραμένη κάψα και τοποθετήθηκε σε κλίβανο  $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  για 16 h.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως εξής:

$$\text{υγρασία} = 100 \times (\text{αρχικό βάρος} - \text{τελικό βάρος}) / \text{αρχικό βάρος}$$

Ακολούθησε ο προσδιορισμός της χρωστικής δύναμης  $E_{1cm}^{1\%} 440\text{nm}$  σύμφωνα με τις προδιαγραφές του ISO/TS 3632-2:2003. 250 mg στίγματα κρόκου ζυγίστηκαν σε ζυγαριά ακριβείας (0,001 g). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε μια ογκομετρική φιάλη 500 mL και προστέθηκαν 450 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα (1000 rpm) για 1h απουσία φωτός. Στη συνέχεια προστέθηκε νερό μέχρι τη χαραγή και το διάλυμα ομογενοποιήθηκε. 10 mL του διαλύματος τοποθετήθηκαν σε 100 mL ογκομετρική φιάλη και προστέθηκε νερό και ακολούθησε καλή ανάδευση.



Το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρου πολυτετρααιθυλενίου (polytetraethylene- PTFE) με διάμετρο 0,45 μm πόρου. Καταγράφηκε το φάσμα απορρόφησης μεταξύ 190 και 900 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV- Vis μοντέλο Jasco V- 550 χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία 1 cm μήκους διαδρομής. Η χρωστική δύναμη υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$E_{1cm}^{1\%} 440nm = (A_{440} \times 10000) / \text{μάζα μετά την ξήρανση σε γραμμάρια} \times (100\text{-υγρασία})$$

Όπου  $A_{440}$  η απορρόφηση στα 440 nm

## 5. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

Τα εκχυλίσματα, τόσο τα υδατικά όσο και τα οργανικά μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι αλλοιογόνων, παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων και έναντι παθογόνων της στοματικής κοιλότητας. Μετά την επιλογή των κατάλληλων ζευγών εκχυλίσματος μικροοργανισμού-στόχου έγινε μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης και τέλος μελετήθηκαν οι δομικές αλλαγές των μικροοργανισμών με τη χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας.

Τα φυτικά εκχυλίσματα επαναδιαλυθήκαν στο διαλύτη εκχύλισης, διηθήθηκαν με φίλτρα 0.22 $\mu$ m (Millex Syringe Filter, Millipore, USA) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

### 5.1. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων *in vitro*

#### 5.1.1. Μικροοργανισμοί και ανανεώσεις

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αλλοιόγωνα και παθογόνα θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια τροφίμων καθώς και θετικοί κατά Gram μικροοργανισμοί της στοματικής κοιλότητας. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 5.1**) φαίνονται τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, το θρεπτικό μέσο που αναπτύχθηκαν και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους.

Οι μικροοργανισμοί διατηρούνταν στους -80 °C, σε ειδικά φιαλίδια (Nalgen Company, USA) με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία γλυκερόλης (Mallinckrodt, USA) σε ποσοστό 20% (v/v).

Για την εκτέλεση του πειράματος, ανανεώνονταν για τον έλεγχο της ζωτικότητάς τους. Υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφερόταν με κρίκο ποσότητα κυττάρων σε σωλήνες που περιέχουν 5 mL κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος. Ακολουθούσε επώαση στους 30 ή 37 °C, ανάλογα με τον μικροοργανισμό για 18-24 h υπό μικροαερόφιλες συνθήκες.

Στην περίπτωση των στελεχών των *Clostridium*, η επώαση έγινε για 2 μέρες υπό αναερόβιες συνθήκες με τη βοήθεια του συστήματος GasPak Plus Anaerobic System (Beckton Dickinson, USA). Τα βασικά συστατικά του αναερόβιου συστήματος είναι δύο: ο GasPak φάκελος παραγωγής H<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> και το ειδικό αεροστεγώς πλαστικό δοχείο με εφαρμοστό κλείστρο. Το H<sub>2</sub> που απελευθερώνεται από το GasPak

**Πίνακας 5.1.** Εξεταζόμενα στελέχη μικροοργανισμών με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και τις συνθήκες επώασης

	Μικροοργανισμοί	Μέσο ανάπτυξης	Θερμοκρασία, °C
Θετικά κατά Gram	<i>Clostridium sporogenes</i> LMG 8421 <sup>T</sup>	RMC*, 2d**	37
	<i>Clostridium sporogenes</i> LMG 14743	RMC, 2d	37
	<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Streptococcus anginosus</i> LMG 14502 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	BHI	37
	<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 <sup>T</sup>	BHI	37
	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	BHI	37
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> FMCC B-202	BHI	37
	<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 <sup>T</sup>	TSB	30
	<i>Bacillus licheniformis</i> FMCC B-91	TSB	30
	<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	TSB	37
	<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 <sup>T</sup>	BHI	30
	<i>Listeria innocua</i> 13568	BHI	30
	<i>Listeria innocua</i> BL 86/26	BHI	30
<i>Listeria welschimeri</i> 15008	BHI	30	
Αρνητικά κατά Gram	<i>Escherichia coli</i> CFA-I	BHI	37
	<i>Escherichia coli</i> C1845	BHI	37
	<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	BHI	37
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	TSB	30
	<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	BHI	37

\*RMC: Reinforced Medium Clostridial, TSB: Tryptone Soya Broth, BHI: Brain Heart Infusion

\*\*2d: 2 ημέρες επώασης

φάκελο δεσμεύει το ατμοσφαιρικό O<sub>2</sub> του ειδικού δοχείου. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η δημιουργία αναερόβιων συνθηκών και η παραγωγή H<sub>2</sub>O.

Για κάθε καλλιέργεια γινόταν δεύτερη ανανέωση μεταφέροντας υπό ασηπτικές συνθήκες 50 mL σε σωλήνες που περιείχαν 5 mL κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος. Ακολουθούσε επώαση στους 30 ή 37 °C, ανάλογα με τον μικροοργανισμό για 18-24 h υπό μικροαερόφιλες συνθήκες ή στις αντίστοιχες συνθήκες για τα *Clostridium*.

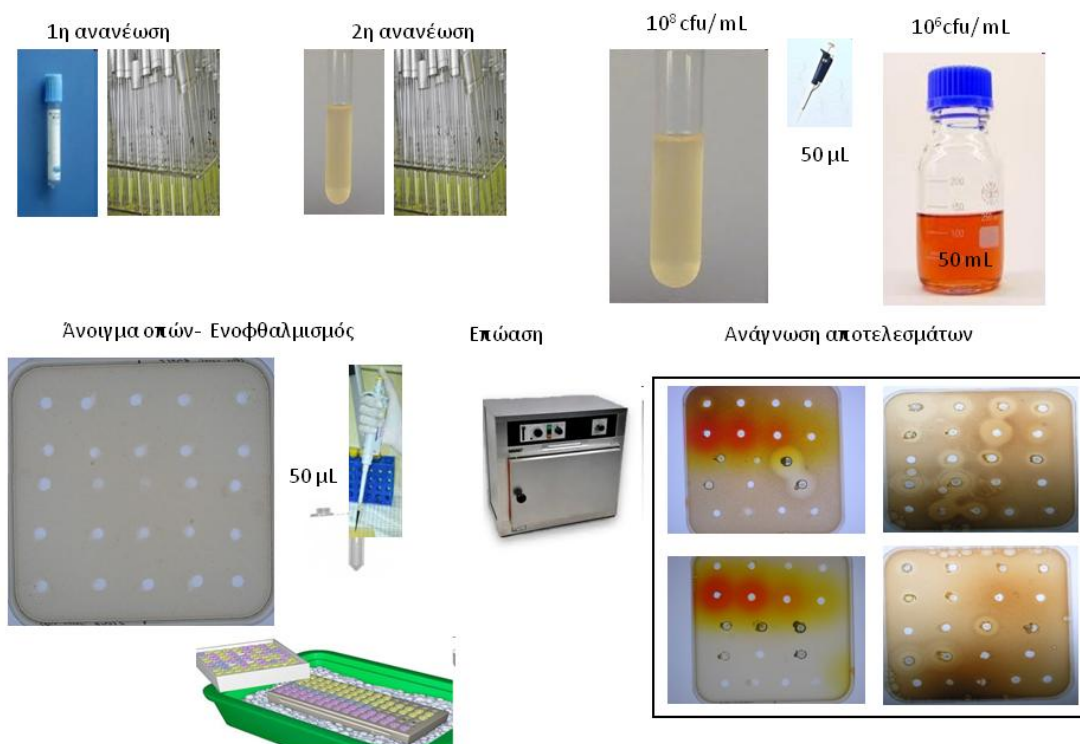
### 5.1.2 Μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA)

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων είναι μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ γνωστή ως “well diffusion assay- WDA” και η όλη διαδικασία αποτυπώνεται σχηματικά στο **Σχήμα 5.1**. Το στερεό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν είτε BHI - Brain Heart Infusion, είτε με TSB- Tryptic Soy Broth, είτε RMC- Reinforced Clostridial Medium με 1,5% άγαρ (w/v), ανάλογα με τον κάθε μικροοργανισμό- στόχο, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5.1**.

Καλλιέργειες 18 h (~10<sup>8</sup> cfu/mL) ενσωματώνονταν στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (εμβόλιο 1,0% v/v), όταν η θερμοκρασία του μέσου ήταν περίπου στους 40 °C, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων στο θρεπτικό υλικό να ανέρχεται στα ~10<sup>6</sup> cfu/mL. Σε τετράγωνα τρυβλία petri μεταφέρονταν 50 mL θρεπτικού μέσου και έπειτα από λίγη ώρα επιτυγχάνετε η σταθεροποίησή τους.

Σε κάθε ένα από τα τρυβλία ανοίχθηκαν οπές διαμέτρου 6 mm στο στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur και εκεί τοποθετούνταν 50μL φυτικού εκχυλίσματος διαφόρων συγκεντρώσεων και ο μάρτυρας, ο οποίος ήταν ο κάθε διαλύτης. Ακολούθησε η παραμονή των ενοφθαλμισμένων τρυβλίων στους 4 °C για 1-2 h ώστε να επιτευχθεί η διάχυση του υγρού δείγματος στο στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια, έγινε η επώασή τους σε επωαστικό θάλαμο στην κατάλληλη θερμοκρασία και συνθήκες για 24 ώρες ή 48 ώρες στην περίπτωση των *Clostridium*. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε

αντίστοιχα ο διαλύτης στον οποίον είναι διαλυμένο το κάθε εκχύλισμα. Μετά τις 24 ή 48 h πραγματοποιούνται παρατηρήσεις και συγκεκριμένα μετράται η διάμετρος των ζωνών αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού-στόχου που δημιουργήθηκαν περιμετρικά των οπών.



**Σχήμα 5.1.** Πειραματική διαδικασία της μεθόδου διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA)

### 5.1.3. Μέθοδος ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης (Killing assay-KA)

Κατά τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένα ζεύγη εκχυλίσματος και μικροοργανισμού-στόχου. Η βακτηριοκτόνος δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των κρόκου (*Crocus sativus* L.) και του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.) μελετήθηκε έναντι των παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutans* LMG 14558<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis* LMG 14532<sup>T</sup> και *Streptococcus*

*sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup>. Ενώ στα αιθερικά εκχυλίσματα των παραπάνω φυτών, μελετήθηκε η δράση τους έναντι των εντερικών παθογόνων στελεχών *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* SL1344.

Αρχικά έγιναν δοκιμές για τη βελτιστοποίηση των ποσοτήτων, τόσο του εκχυλίσματος όσο του θρεπτικού υλικού. Κύτταρα εν ηρεμία του κάθε μικροοργανισμού- στόχου, προερχόμενα από καλλιέργεια 18 h, ανανεωνόταν εκ νέου (εμβόλιο 1,0% v/v για τα εντερικά παθογόνα και 2,0%, v/v για τα στοματικά παθογόνα) σε υγρό θρεπτικό μέσο σε Brain Heart Infusion- BHI. Μετά από επώαση 2 h, 750 mL αιωρήματος κύτταρων βρισκόμενα στην αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης αναμείχθηκαν με 625 μL υγρού θρεπτικού μέσου BHI και 75μL φυτικού εκχυλίσματος τελικής συγκέντρωσης 28 mg/mL για τα μεθανολικά και 5 mg/mL για τα αιθερικά εκχυλίσματα και επώαστηκαν στους 37°C για 24 h. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, γίνονταν καταμέτρηση των κυττάρων που επιβίωσαν με την κλασική μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer (Oxoid), πραγματοποιώντας ενσωμάτωσή τους σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα BHI με άγαρ 1,5% (w/v). Η επώαση των τρυβλίων γίνονταν για 48 h σε κατάλληλες συνθήκες ανάλογα με τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό -στόχο σε κάθε περίπτωση. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 7% ή 10% στη θέση του εκχυλίσματος.

## **5.2. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR**

### **5.2.1. Μικροοργανισμοί και ανανεώσεις**

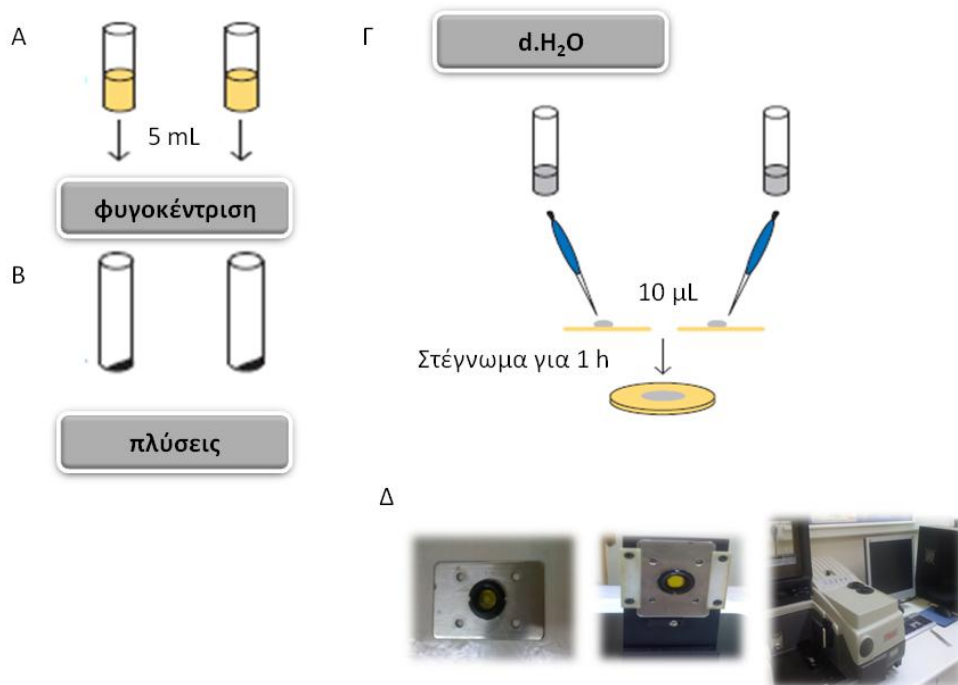
Σε αυτή τη σειρά των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών κρόκου (*Crocus sativus* L.) και του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.) έναντι των παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutans* LMG 14558<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis* LMG 14532<sup>T</sup> και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup>, καθώς και το αιθερικό εκχύλισμα του κρόκου έναντι των

εντερικών παθογόνων στελεχών *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* SL1344.

Οι μικροοργανισμοί διατηρούνταν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , σε ειδικά φιαλίδια (Nalgen Company, USA) με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI παρουσία γλυκερόλης (Mallinckrodt, USA) σε ποσοστό 20% (v/v).

### 5.2.2. Παρασκευή δειγμάτων για ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR

Αιώρημα κυττάρων προερχόμενα από καλλιέργεια 2 h του μικροοργανισμού-στόχου βρισκόμενα στην αρχή της λογαριθμικής φάσης αναμείχθηκε με ποσότητα φυτικού εκχυλίσματος αραιωμένου σε υγρό θρεπτικό μέσο BHI (10%, v/v) τελικής συγκέντρωσης 28 mg/mL για τα μεθανολικά και 5 mg/mL για τα αιθερικά εκχυλίσματα και επώαστηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για χρονικό διάστημα όπου ο πληθυσμός του μικροοργανισμού-στόχου είχε μειωθεί κατά 1 λογαριθμικό κύκλο από τα αντίστοιχα πειράματα της παραγράφου 5.1.3. Ο συνολικός όγκος ήταν 5 mL.



**Σχήμα 5.2.** Πειραματική διαδικασία της μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR (προσαρμοσμένο από Lefier *et al.*, 2007)

Στο χρόνο 0 h και στον παραπάνω χρόνο, ανάλογα με τον κάθε μικροοργανισμό, γίνονταν καταμέτρηση των κυττάρων του μικροοργανισμού- στόχου πραγματοποιώντας ενσωμάτωση των κυττάρων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα BHI με άγαρ 1,5% (w/v). Στα ίδια χρονικά σημεία, το αιώρημα κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα φυγοκεντρώνταν (10000 g, 15 min, 25 °C) (**Σχήμα 5.2A**) και το ίζημα επαναιωρούνταν σε ίσο όγκο αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού (0,9% w/v) (**Σχήμα 5.2B**). Η διαδικασία έκπλυσης των κυττάρων του στελέχους "στόχου" επαναλήφθηκε τρεις φορές προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως κάθε ίχνος από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα. Μετά την τελική έκπλυση, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 30 μL απιονισμένου νερού και 10 μL αυτού τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια δισκίου σελινούχου ψευδαργύρου ZnSe, το οποίο χρησιμοποιείται κατά τη λήψη φασμάτων IR (**Σχήμα 5.2Γ**). Για τη δημιουργία ενός ομοιογενούς στρώματος στεγνών κυττάρων, ο δίσκος τοποθετήθηκε για 1 h σε θάλαμο νηματοειδούς ροής σε θερμοκρασία δωματίου (**Σχήμα 5.2Γ**).

### 5.2.3. Λήψη φασμάτων FT-IR και επεξεργασία

Για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700. Ως φάσμα αναφοράς λαμβανόταν ως υπόβαθρο (background) το φάσμα του καθαρού δισκίου ZnSe (**Σχήμα 5.2Δ**). Σε κάθε δείγμα γινόταν 100 σαρώσεις (scans), η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4 \text{ cm}^{-1}$ , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν  $0.3165 \text{ mm s}^{-1}$ .

Στα όλα τα φάσματα FT-IR έγιναν οι συνήθεις επεξεργασίες που γίνονται, η εξομάλυνση του σήματος (smoothing) και η διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correct). Επιπλέον, έγινε και ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου του φάσματος (second derivative) για το διαχωρισμό των επικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης. Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς. Οι παραπάνω επεξεργασίες γίνονται χρησιμοποιώντας την αυτόματη διαδικασία από το λογισμικό πρόγραμμα OMNIC (Thermo Electron Inc., California, U.S.A.).



Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η τεχνική της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA). Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί εκτεταμένα στο παρελθόν για τη διάκριση φασμάτων υπερύθρου από μικροοργανισμούς (Rodriguez-Saona *et al.*, 2001; Oust *et al.*, 2004; Al-Qadiri *et al.*, 2006). Η τεχνική αυτή ανάλυσης δεδομένων σκοπό έχει τη δημιουργία καινούργιων μεταβλητών, οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών (κυματαριθμοί), έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και να περιέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Οι νέες μεταβλητές που παράγονται ονομάζονται κύριες συνιστώσες (Field, 2005; Karoui *et al.*, 2010). Επιπλέον, οι κύριες συνιστώσες που προκύπτουν μπορούν να ερμηνεύσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης, που σημαίνει πως καταλήγουμε σε ένα πιο μικρό αριθμό μεταβλητών (κυματαριθμοί) από ότι είχαμε αρχικά, με κόστος ότι χάνουμε ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας. Η πρώτη κύρια συνιστώσα αποδίδει τη μεγαλύτερη ποσότητα της πληροφορίας, ακολουθούμενη από τη δεύτερη κ.ο.κ. Η ανάλυση αυτή, εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, στη δεύτερη παράγωγο συγκεκριμένων περιοχών των φασμάτων FT-IR των βακτηρίων, οι οποίες είναι γνωστό ότι αντιστοιχούν σε περιοχές απορρόφησης βασικών κυτταρικών συστατικών. Η επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Statgraphics Centurion (version XV), με την επιλογή του υπολογισμού του ελάχιστου αριθμού κύριων συνιστωσών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## 1. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

### 1.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά

Στον Πίνακα 1.1. παραθέτονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών που παρασκευάστηκαν με τους τρεις τρόπους α) με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος, β) με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος υποβοηθούμενη με υπέρηχους και γ) με ζεστό νερό, καθώς και της υδατικής φάσης που παρέμεινε μετά την εκχύλιση τους με πετρελαϊκό αιθέρα.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/200mL, και αντιστοιχούν στην ποσότητα των φαινολικών που αντιστοιχεί σε μια κούπα τσαγιού. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 8,1 έως 195,2 mg καφεϊκού οξέος/200mL. Όσον αφορά τα αφεψήματα που προήλθαν μετά από εκχύλιση με ζεστό νερό οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών κυμάνθηκαν μεταξύ 28,5 και 195,2 mg καφεϊκού οξέος/200 mL, για αυτά που εκχυλίστηκαν με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος από 8,1 έως 137,0 mg καφεϊκού οξέος/200mL, ενώ σε αυτά που η εκχύλιση με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος υποβοηθήθηκε με τους υπερήχους οι τιμές διακυμάνθηκαν από 10,2 έως 156,7 mg καφεϊκού οξέος/200mL.

Στην περίπτωση της εκχύλισης των παραπάνω εκχυλισμάτων με τον οργανικό διαλύτη- πετρελαϊκό αιθέρα και τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση, οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 8,7 και 185,9 mg καφεϊκού οξέος/200 mL. Όταν η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με ζεστό νερό οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών ήταν μεταξύ 27,1 και 185,9 mg καφεϊκού οξέος/200 mL, με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος από 8,8 έως 118,8 mg καφεϊκού οξέος/200 mL, ενώ όταν η εκχύλιση με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος υποβοηθήθηκε από τους υπερήχους οι τιμές κυμάνθηκαν από 8,5 έως 145,8 mg καφεϊκού οξέος/200 mL.

**Πίνακας 1.1.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε mg καφεϊκού οξέος/200 mL.

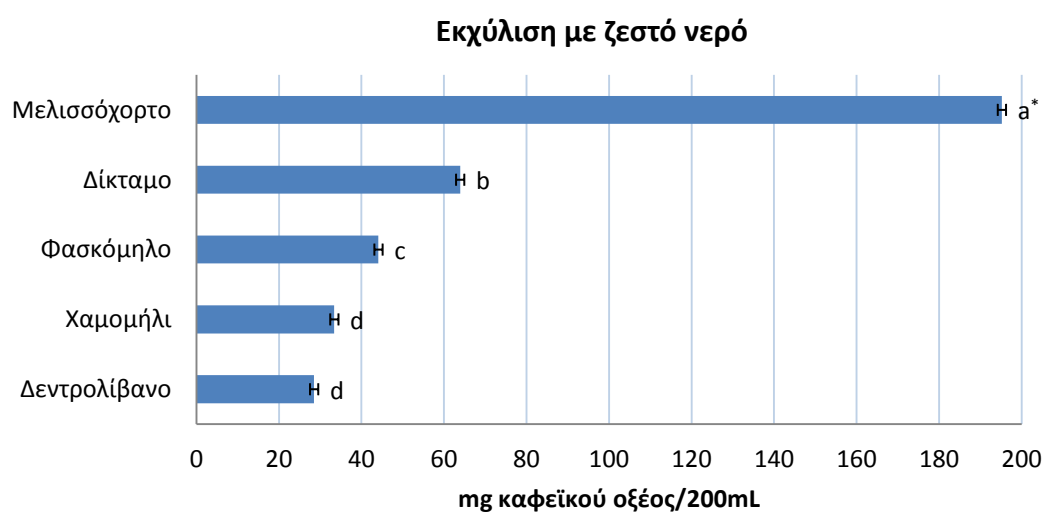
	A*	B	Γ	A-πε**	B-πε	Γ-πε
Δεντρολίβανο	8,1±0,4a***	14,9±0,5b	28,5±1,1c	8,8±0,3a	13,6±0,4b	27,1±0,8c
Χαμομήλι	9,5±0,3a	10,2±0,8b	33,4±0,3d	8,7±0,4a	8,5±1,1a	28,9±1,1c
Φασκόμηλο	17,1±1,0a	18,9±0,7a	44,1±1,0b	16,6±4,1a	18,7±0,7a	40,6±2,3b
Δίκταμο	28,7±0,5a	34,5±0,4b	63,9±0,3d	27,9±0,4a	32,9±0,6b	58,0±1,4c
Μελισσόχορτο	137,0±2,6b	156,7±6,0d	195,2±5,6f	118,8±1,4a	145,8±1,9c	185,9±3,4e

\* (Α) Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (Β) Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, (Γ) Εκχύλιση με ζεστό νερό

\*\* -πε αναφέρεται στην υδατική φάση των παραπάνω μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα

\*\*\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για το ίδιο φυτό

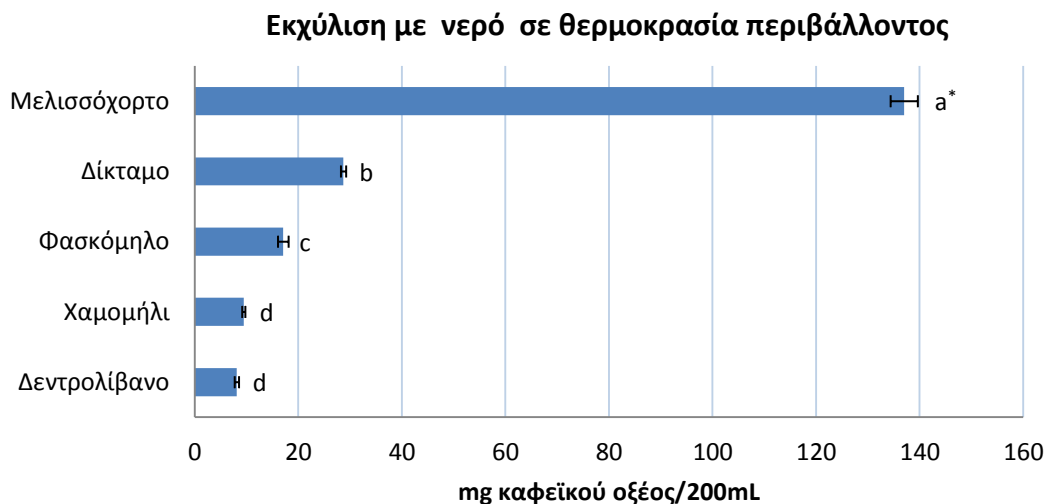
Στο **Σχήμα 1.1** παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων που προήλθαν μετά την εκχύλιση με ζεστό νερό. Φαίνεται ξεκάθαρα η υπεροχή του μελισσόχορτου, το οποίο εμφάνισε στατιστικά μεγάλη διαφορά με τα υπόλοιπα τέσσερα φυτά (Tukey B test, σε επίπεδο σημαντικότητας 95%). Ακολουθούν το δίκταμο και το φασκόμηλο, τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά παρουσίασαν το χαμομήλι και το δεντρολίβανο, τα οποία δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

**Σχήμα 1.1.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο αφεψημάτων

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )

Στα υδατικά εκχυλίσματα που προήλθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά είναι κατά φθίνουσα σειρά: μελισσόχορτο > δίκταμο > φασκόμηλο > χαμομήλι > δεντρολίβανο. Το μελισσόχορτο και σε αυτή την περίπτωση εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά (**Σχήμα 1.2**).

Η φθίνουσα σειρά έχει μια διαφοροποίηση στην περίπτωση του χαμομηλιού και του δεντρολίβανου, όταν η εκχύλιση με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος υποβοηθήθηκε με τους υπέρηχους (**Σχήμα 1.3**). Αντίστοιχες σειρές κατάταξης παρατηρούνται και για τα εκχυλίσματα στα οποία έγινε κατεργασία με τον οργανικό διαλύτη (**Σχήματα 1.4, 1.5, 1.6**).

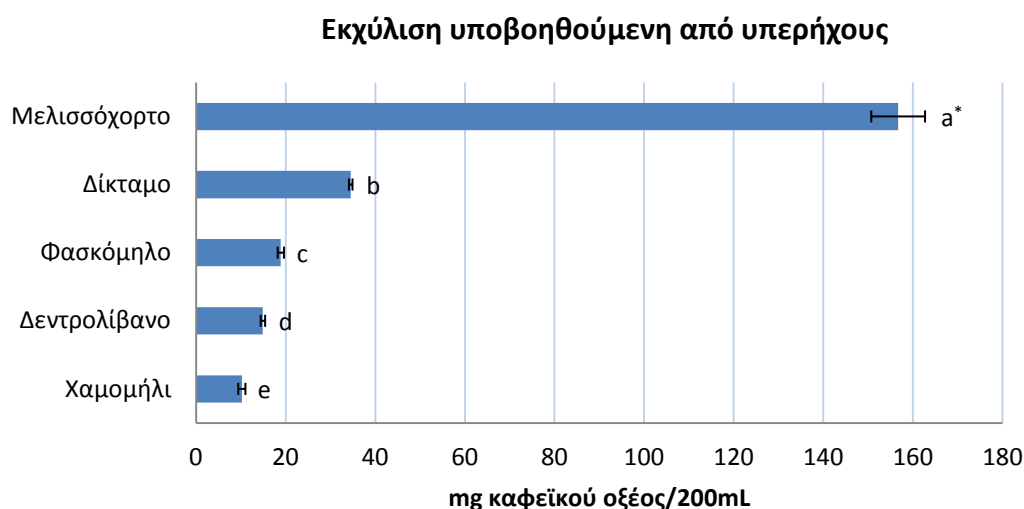


**Σχήμα 1.2.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )

Σε όλες τις περιπτώσεις, το μελισσόχορτο βρέθηκε να είναι το πιο πλούσιο φυτό σε ολικά φαινολικά συστατικά, ενώ το δεντρολίβανο και το χαμομήλι τα πιο φτωχά. Το μελισσόχορτο έχει αναφερθεί ότι είναι αρκετά πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών και ιδιαιτέρως σε ροσμαρινικό οξύ (Fecka και Turek, 2007). Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι το υδατικό ζεστό εκχύλισμα του δεντρολίβανου ήταν επίσης το πιο φτωχό από τα φυτά που εξετάστηκαν, ακολουθούμενο από το φασκόμηλο, ενώ το

εκχύλισμα του δίκταμου ήταν το πιο πλούσιο (Kaliora *et al.*, 2014). Οι Chrpová *et al.*, (2010) μελετώντας αφεψήματα 10 διαφορετικών φυτών παρατήρησαν ότι το αφέψημα του μελισσόχορτου παρουσίασε υψηλές τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου, ενώ το φασκόμηλο υπολειπόταν κατά 80% της τιμής του. Οι ερευνητές επιβεβαιώνουν ότι το αφέψημα του δεντρολίβανου ήταν το πιο φτωχό συγκριτικά με

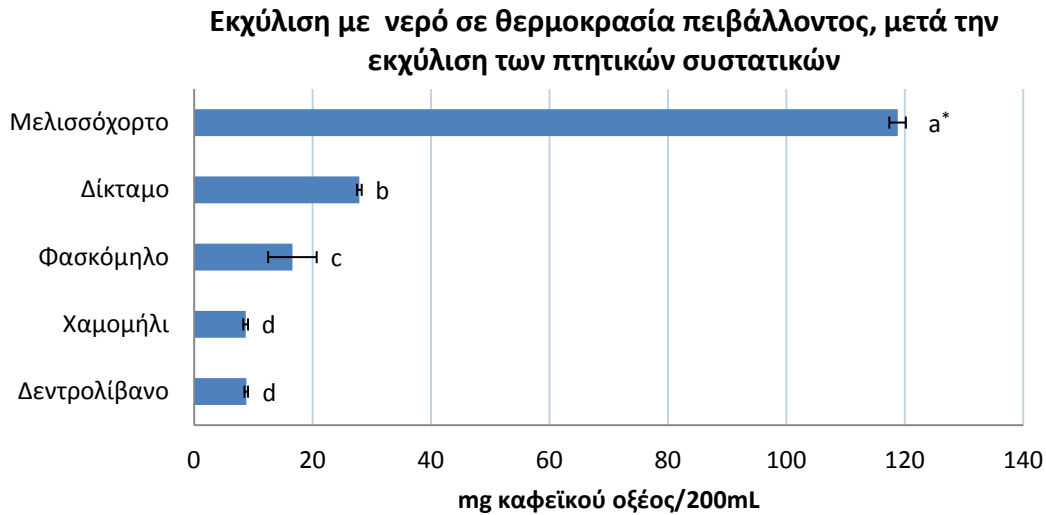


**Σχήμα 1.3.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )

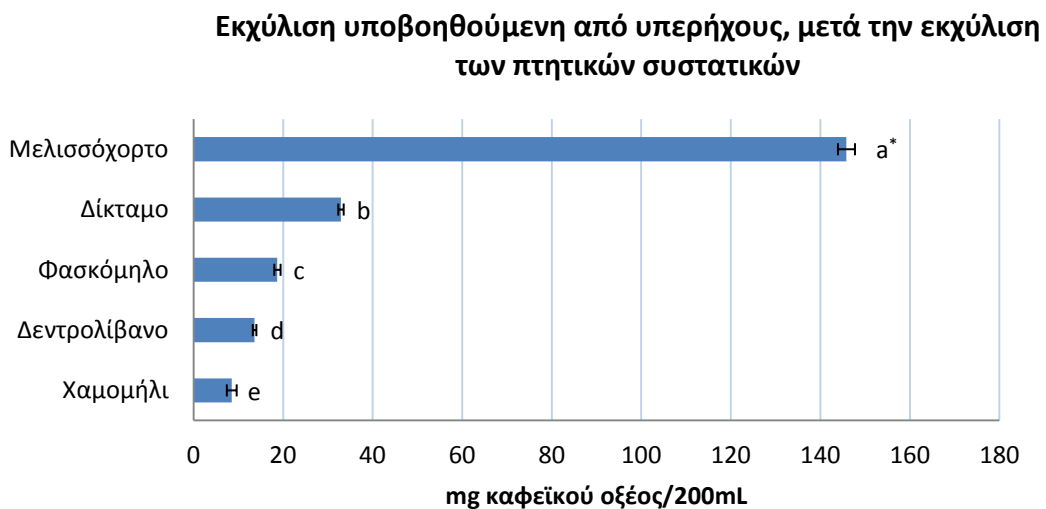
όλα τα εξεταζόμενα φυτά. Ωστόσο σε άλλη μελέτη αναφέρεται παρόμοιο φαινολικό περιεχόμενο για τα αφεψήματα του μελισσόχορτου και του δεντρολίβανου, με το φασκόμηλο να ακολουθεί (Albayrak *et al.*, 2013).

Άλλες συγκριτικές μελέτες με υδατικά εκχυλίσματα φυτών στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μελισσόχορτο, έδειξαν ότι αυτό υπερείχε στην περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα υπόλοιπα (Ivanova *et al.*, 2005; Katalinic *et al.*, 2006; Fecka και Turek, 2007).



**Σχήμα 1.4.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )



**Σχήμα 1.5.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών

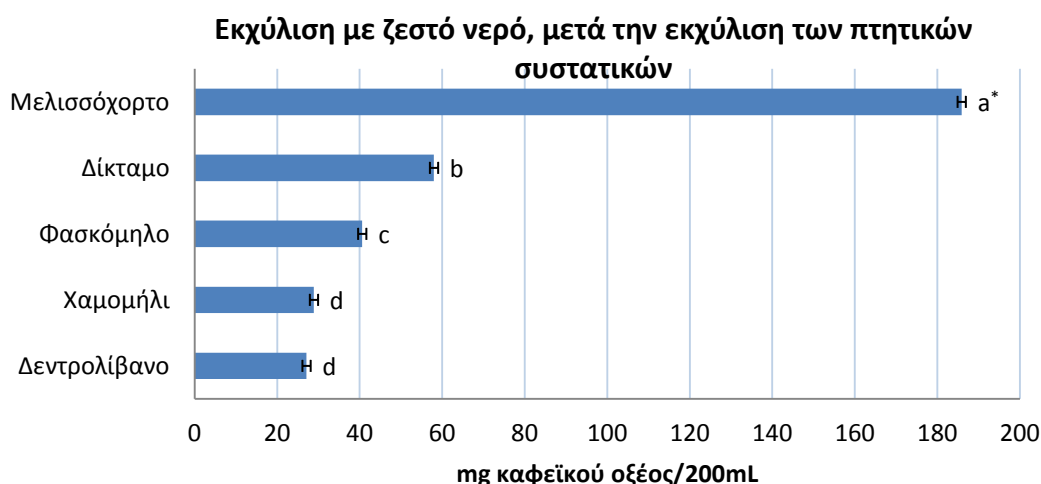
\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )

Ανάμεσα σε εκχυλίσματα με ζεστό νερό 70 διαφορετικών φυτών από την Κροατία το μελισσόχορτο ήταν το πιο πλούσιο σε φαινορικά συστατικά ακολουθούμενο από το φασκόμηλο, το χαμομήλι και το δεντρολίβανο (Katalinic *et al.*,



2006). Άλλη έρευνα, σε ζεστά εκχυλίσματα φυτών από τη Βουλγαρία, έδειξε επίσης ότι το μελισσόχορτο ήταν από τα πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά φυτά, ενώ το χαμομήλι υπολείπονταν κατά 80% της αντίστοιχης περιεκτικότητας του μελισσόχορτου (Ivanova *et al.*, 2005).

Όσον αφορά, τους διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης, το ζεστό νερό παραλαμβάνει σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με τους άλλους δυο τρόπους σε όλες τις περιπτώσεις των φυτών (Πίνακας 1.1). Στις περιπτώσεις του φασκόμηλου και του δίκταμου, η περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών δεν διέφερε σημαντικά όταν η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή υποβοηθήθηκε από τους υπέρηχους. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, του χαμομηλιού και του δεντρολίβανου. Όταν τα δείγματα εκχυλίστηκαν με τον οργανικό διαλύτη στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε όλους τους τρόπους εκχύλισης παρατηρήθηκαν για το μελισσόχορτο και το χαμομήλι. Επίσης, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του δίκταμου αλλά μόνο στην εκχύλιση με ζεστό νερό. Για τα υπόλοιπα φυτά η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη δεν επηρέασε σημαντικά το αποτέλεσμα.



**Σχήμα 1.6.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο αφεψημάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85 °C, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πλήθος αναφορών, όπου φαίνεται η υπεροχή του ζεστού νερού έναντι του νερού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών σε διάφορα είδη τσαγιού (Yang *et al.*, 2007; Venditti *et al.*, 2010), στη ρίγανη (Teixeira *et al.*, 2013) σε μανιτάρια (Vamanu και Nita, 2013). Ωστόσο, λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα, υπάρχουν για την εκχύλιση με νερό υποβοηθούμενη από λουτρό υπέρηχων. Οι μελέτες σχετικά με τη χρήση των υπερήχων για την παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών ενώσεων από φυτικές ύλες έχουν αναφερθεί (Caniona & Brandsterona, 2001; Raniwnyk *et al.*, 2001; Vinatoru 2001; Proestos και Komaitis, 2006). Τα πιθανά οφέλη από την εκχύλιση με υπερήχους είναι μαζική εντατικοποίηση της μεταφοράς, η διατάραξη των κυττάρων και τη βελτίωση της διείσδυσης του διαλύτη στο φυτικό ιστό. Οι υπέρηχοι σπουν τα φυτικά κύτταρα και απελευθερώνουν τα περιεχόμενα των κυττάρων εντός του μέσου εκχύλισης. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην περίπτωση του συστήματος εκχύλισης υπερήχων, δεδομένου ότι η χρήση του καθετήρα μπορεί να οδηγήσει στην υποβάθμιση των ενώσεων μέσω του σχηματισμού ριζών υδροξυλίου κατά την διάρκεια της υπερηχητικής επεξεργασίας του υδατικού διαλύτη (Raniwnyk *et al.*, 2001). Οι Proestos και Komaitis (2006), συγκρίνοντας την ικανότητα διαφόρων διαλυτών μεταξύ αυτών νερό, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, οξικό αθυλεστέρα στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών με τη βοήθεια υπερήχων και θέρμανσης, κατέληξαν ότι το νερό ήταν το λιγότερο αποδοτικό στην περίπτωση των υπερήχων. Τα αρωματικά φυτά που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται ευρέως στη μεσογειακή διατροφή, είτε ως αφεψήματα ή καρυκεύματα τροφίμων και στη βιομηχανίας τροφίμων που τείνει επίσης να χρησιμοποιεί πιο εξελιγμένες τεχνικές εκχύλισης, όπως υπέρηχοι (Vilkhu *et al.*, 2008).

Σε γενικές γραμμές, σημαντικές ποσοτικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των αποτελεσμάτων οφείλονται τόσο σε παράγοντες που αφορούν τον τρόπο παρασκευής του εκχυλίσματος, όσο και στη φυσιολογία του φυτού. Η πληθώρα των αναφορών στα αντίστοιχα φυτά αφορά κυρίως εκχυλίσματα με οργανικούς διαλύτες, κυρίως αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα, μίγματα αυτών ή μίγματα αυτών με νερό. Το νερό, ως αποκλειστικός διαλύτης εκχύλισης, δεν χρησιμοποιείται ευρέως, για το λόγο αυτό δεν υπάρχουν πολλά διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Οι περισσότεροι ερευνητές σε συγκριτικές μελέτες αναφέρουν πως το νερό ως διαλύτης δεν είναι τόσο αποδοτικός στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, ο στόχος όμως του πειράματος είναι η εν δυνάμει παρουσία φαινολικών συστατικών σε ένα εκχύλισμα που προσομοιάζει τις περιπτώσεις καθημερινής χρήσης. Για το σκοπό αυτό, η ποσότητα του φυτικού υλικού, ο όγκος του νερού και ο χρόνος εκχύλισης προσαρμόστηκαν έτσι ώστε να είναι αντανακλούν σε πραγματικές συνθήκες παρασκευής και κατανάλωσης.

Από την άλλη μεριά και η ταυτότητα του φυτικού υλικού διαφοροποιεί αναλόγως το αποτέλεσμα. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το κλίμα, το έδαφος, η άρδευση, η θερμοκρασία της περιοχής, η έκθεση σε ασθένειες και παράσιτα, η εποχή συγκομιδής, ο τρόπος ξήρανσης και αποθήκευσης ή ακόμα το μέρος του φυτικού ιστού που θα χρησιμοποιηθεί, η περιεκτικότητα αυτού σε νερό. Η εν γένει φυσιολογία του φυτού, η κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων αυτού, που επιτραπούν ευκολότερα ή δυσκολότερα να εκχυλιστούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Όλοι αυτοί είναι παράμετροι που θα πρέπει να τους λαμβάνουμε υπ' όψιν.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα το δεντρολίβανο, που λόγω φυσιολογίας των φύλλων του, αυτά είναι αρκετά δύσκολο να εκχυλιστούν σε κρύο νερό ή και ακόμα στο ζεστό νερό, με αποτέλεσμα ενώ στη βιβλιογραφία να αναφέρεται ως ένα φυτό με αρκετό πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο, στην προκειμένη περίπτωση δεν επιβεβαιώνεται, αφού βρέθηκε να είναι από τα πιο φτωχά φυτά.

## 1.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Στην παρούσα παράγραφο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ικανότητας των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών που παρασκευάστηκαν με τους τρεις τρόπους α) με ζεστό νερό, β) με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος και γ) με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος υποβοηθούμενη με υπέρηχους, καθώς και της υδατικής φάσης που παρέμεινε μετά την εκχύλιση τους με πετρελαϊκό αιθέρα, να δρουν ως αντιοξειδωτικά μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup> και του ριζικού κατιόντος ABTS<sup>•+</sup>.

Στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 1.2 και 1.3) φαίνονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις δυο μεθόδους προσδιορισμού, τα οποία είναι εκφρασμένα σε  $\mu\text{mol Trolox}/200\text{mL}$ . Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH<sup>•</sup> κυμάνθηκαν από 20,8 έως 1206,3  $\mu\text{mol Trolox}/200\text{ mL}$  και 33,5 έως 1321,7  $\mu\text{mol Trolox}/200\text{ mL}$  για τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>.

**Πίνακας 1.2.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS εκφρασμένα σε  $\mu\text{mol Trolox}/200\text{ mL}$ .

	A*	B	Γ	A-πε**	B-πε	Γ-πε
Δεντρολίβανο	52,5±3,7b***	59,0±4,4c	135,8±14,6e	33,5±1,7a	59,4±4,0c	120,4±1,7d
Χαμομήλι	61,8,5±6,8b	62,3±2,6b	138,3±9,2d	56,6±0,6b	53,6±7,7a	121,7±4,2c
Φασκόμηλο	99,21±3,7b	123,1±3,4d	321,0±3,8e	89,6±1,0a	107,9±2,3c	318,1±6,4e
Δίκταμο	169,9±11,1c	182,6±3,4d	329,0±3,9f	139,1±5,9a	160,3±1,0b	304,3±13,2e
Μελισσόχορτο	746,1±10,6b	871,6±9,4c	1321,7±15,7e	684,3±3,3a	902,4±42,5d	1319,5±10,5e

\* (A) Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (B) Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους, (Γ) Εκχύλιση με ζεστό νερό

\*\* -πε αναφέρεται στην υδατική φάση των παραπάνω μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα

\*\*\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για το ίδιο φυτό

**Πίνακας 1.3.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH<sup>•</sup> εκφρασμένα σε  $\mu\text{mol Trolox}/200\text{ mL}$ .

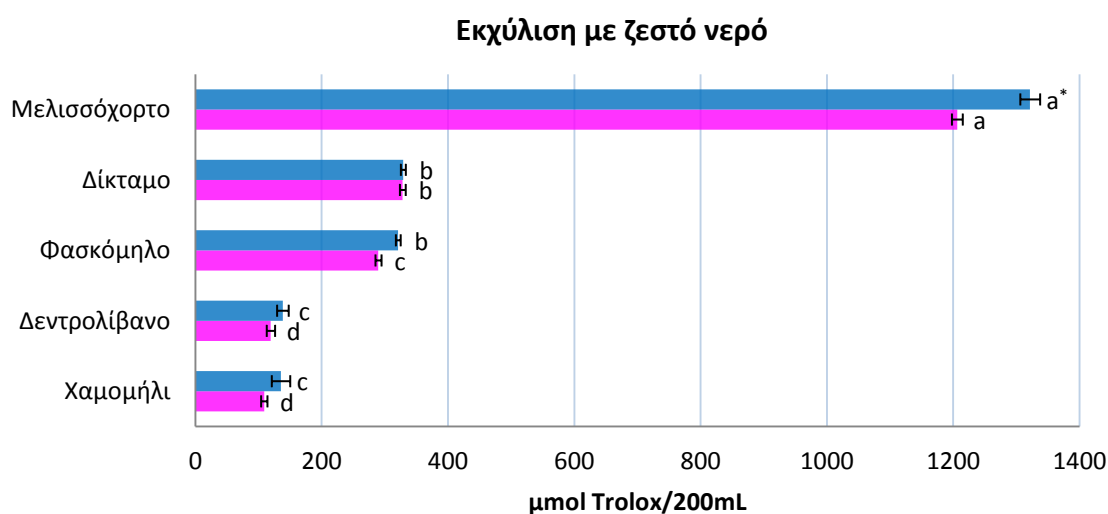
	A*	B	Γ	A-πε**	B-πε	Γ-πε
Δεντρολίβανο	35,1±2,0a***	56,9±2,8b	108,8±5,0b	30,3±1,8a	49,8±3,6a	95,9±10,9b
Χαμομήλι	23,2±1,0a	28,3±3,0a	119,3±6,6b	20,8±4,4a	23,2±0,9a	97,9±2,9b
Φασκόμηλο	77,7±2,9b	83,7±2,2c	289,7±4,8d	66,6±1,8a	68,6±0,5a	306,6±3,3d
Δίκταμο	147,2±1,3b	177,0±6,4c	328,2±4,6e	123,7±4,4a	155,5±3,6b	299,7±2,6d
Μελισσόχορτο	644,5±36,9b	752,7±3,8d	1206,3±8,6e	605,5±18,2a	672,3±11,9c	1182,0±14,9e

\* (A) Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (B) Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, (Γ) Εκχύλιση με ζεστό νερό

\*\* -πε αναφέρεται στην υδατική φάση των παραπάνω μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα

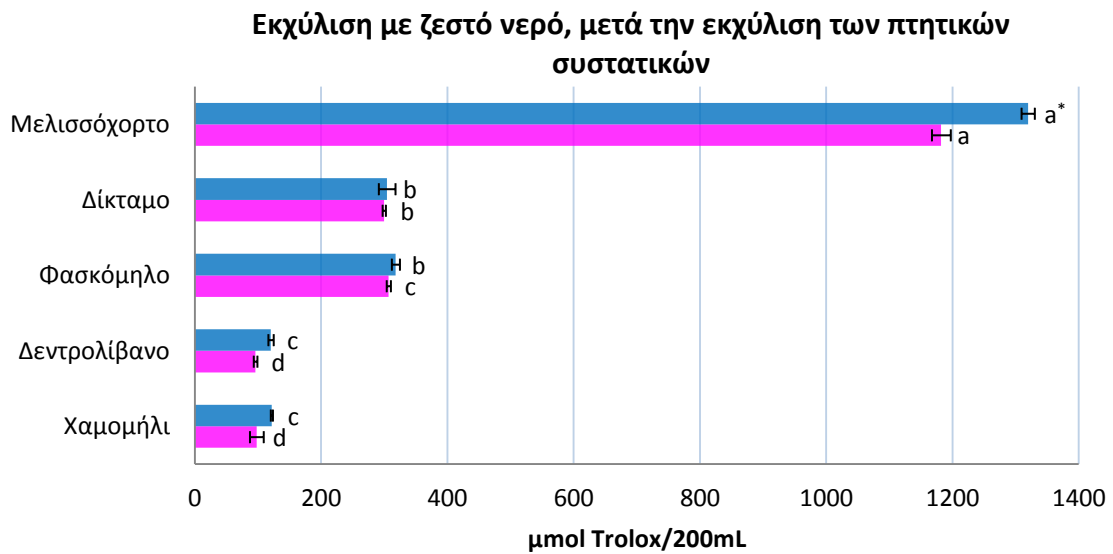
\*\*\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για το ίδιο φυτό

Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση. Η κατάταξη των φυτών είναι παρόμοια και με τις δυο μεθόδους προσδιορισμού. Το μελισσόχορτο παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση με όλους τρόπους εκχύλισης, ενώ το δεντρολίβανο και το χαμομήλι τη μικρότερη. Όσον αφορά, τους διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης, τα φυτά όταν εκχυλίστηκαν με ζεστό νερό παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τους άλλους δυο τρόπους σε όλες τις περιπτώσεις των φυτών.



**Σχήμα 1.7.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) αφεψημάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85 °C

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για την ίδια μέθοδο

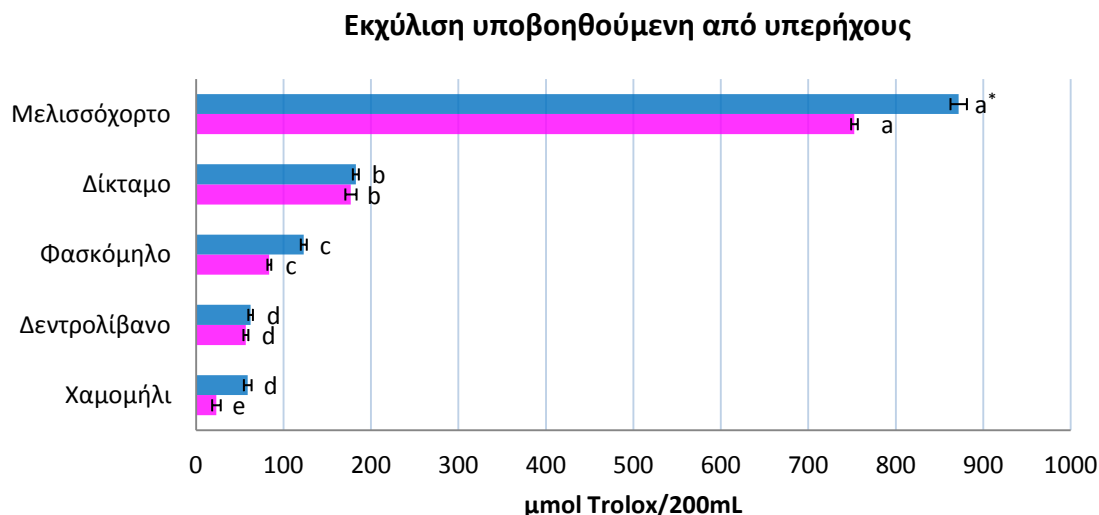


**Σχήμα 1.8.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (◆) αφεψημάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85 °C, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών

\*διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για την ίδια μέθοδο

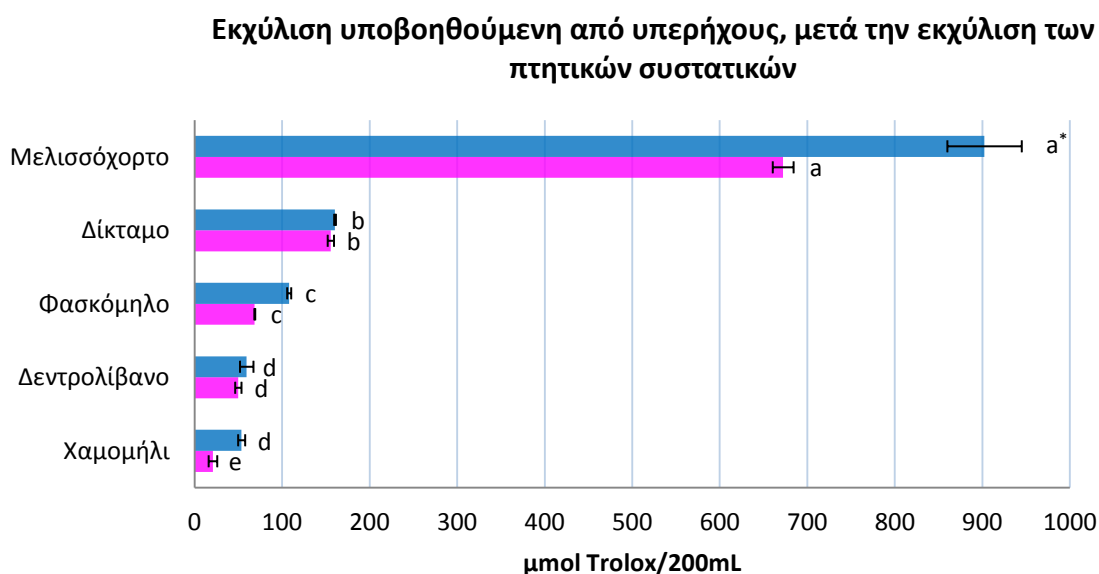
Μελετώντας τα αποτελέσματα της εκχύλισης με ζεστό νερό, το μελισσόχορτο εμφάνισε στατιστικά μεγάλη διαφορά με τα υπόλοιπα τέσσερα φυτά και στις δυο μεθόδους. Ακολουθούν το δίκταμο και το φασκόμηλο, τα οποία δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους με τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>, διέφεραν όμως σημαντικά με τη μέθοδο DPPH<sup>•</sup>. Το χαμομήλι και το δεντρολίβανο δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και με τις δυο μεθόδους (Σχήμα 1.7). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται στην υδατική φάση που παραμένει μετά την εκχύλιση με τον πετρελαϊκό αιθέρα (Σχήμα 1.8).

Η σειρά κατάταξης και για τις δυο μεθόδους όταν η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη με υπέρηχους κατά φθίνουσα σειρά ήταν μελισσόχορτο, δίκταμο, φασκόμηλο, δεντρολίβανο και χαμομήλι (Σχήμα 1.9 και 1.10). Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα σε όλα τα φυτά με τη μέθοδο DPPH<sup>•</sup>, ενώ ανάμεσα στο δεντρολίβανο και το χαμομήλι οι τιμές δεν διέφεραν σημαντικά με τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>. Όταν η εκχύλιση έγινε με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η σειρά κατάταξης για τα τρία πρώτα φυτά είναι ίδια και



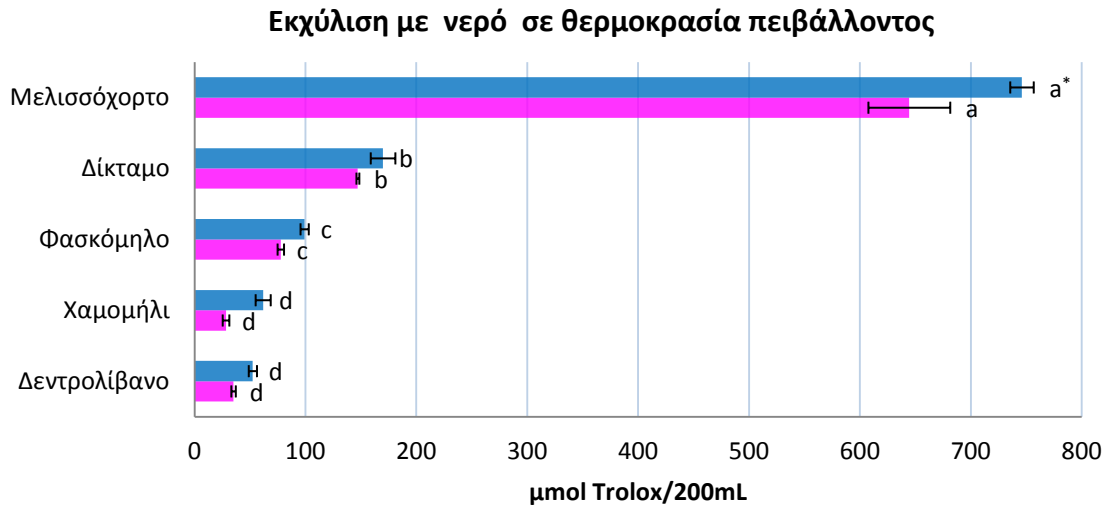
**Σχήμα 1.9.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για την ίδια μέθοδο



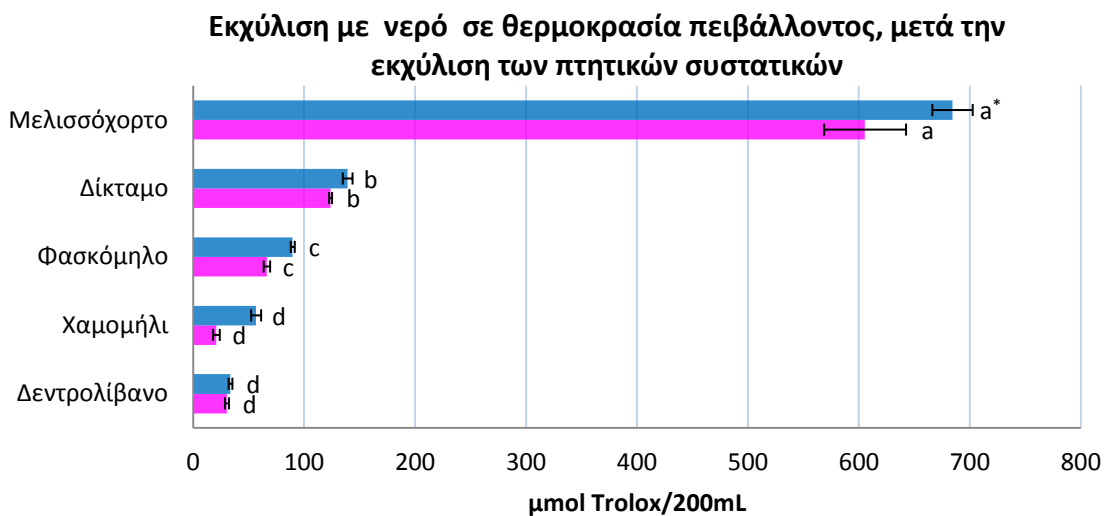
**Σχήμα 1.10.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών

\* διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για την ίδια μέθοδο



**Σχήμα 1.11.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

\*διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για την ίδια μέθοδο



**Σχήμα 1.12.** Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών

\*διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) για την ίδια μέθοδο



και στις δυο μεθόδους με σημαντικά στατιστικά διαφορές μεταξύ τους. Το χαμομήλι και το δεντρολίβανο παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας, που και με τις δυο μεθόδους δε διέφεραν σημαντικά (**Σχήμα 1.11** και **1.12**).

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί, με το μελισσόχορτο να παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το χαμομήλι με τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup> (Ivanova *et al.*, 2005). Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, σε άλλη συγκριτική μελέτη μεταξύ φυτών που χρησιμοποιούνται ως καρυκεύματα, τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae παρουσίασαν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα και μεταξύ αυτών οι τιμές για το φασκόμηλο ήταν μεγαλύτερες από τις τιμές του δεντρολίβανου (Shan *et al.*, 2005). Με τη μέθοδο DPPH<sup>•</sup> στο αφέψημα του δίκταμου προσδιορίστηκε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι του φασκόμηλου και του δεντρολίβανου (Kaliora *et al.*, 2014). Ενώ οι Chironá *et al.*, (2010) αναφέρουν ότι το αφέψημα του μελισσόχορτου έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτή του φασκόμηλου και του δεντρολίβανου, κατά αντιστοιχία και με το ολικό τους φαινολικό περιεχόμενο.

Η δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> υποδεικνύει την ύπαρξη ουσιών που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες δρώντας ως δότες ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου. Πλήθος αναφορών συσχετίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με την παρουσία φαινολικών συστατικών (Dorman *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Čanadanović-Brunet *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν καταλήξει σε αντίθετα αποτελέσματα (Kahkönen *et al.*, 1999) ενώ υπάρχουν και άλλες που αναφέρουν πολύ μικρή συσχέτιση (Stagos *et al.*, 2013). Ο αντίστοιχος συσχετισμός στην παρούσα μελέτη αποτυπώνεται στα διαγράμματα. Παρατηρείται θετική γραμμική συσχέτιση, τόσο μεταξύ του φαινολικού ολικού περιεχομένου και των δυο μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας ( $r_{\text{FOLIN-ABTS}}=0.979$ ;  $r_{\text{FOLIN-DPPH}}=0.971$ ,  $p<0.01$ ), όσο και μεταξύ των δυο μεθόδων μεταξύ τους ( $r_{\text{ABTS-DPPH}}=0.992$ ,  $p<0.01$ ).

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται από τη μέθοδο προσδιορισμού, τον τρόπο εκχύλισης και τις συνθήκες με τις οποίες έγινε αυτή, τη συγκέντρωση του δείγματος, το χημικό τύπο των συστατικών που περιέχουν.

Παρατηρήθηκαν διαφορετικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο αλλά διαφορετικό διαλύτη (Pérez-Jiménez και Saura-Calixto, 2006). Επιπλέον, οι ενώσεις που περιέχονται στο αφέψημα επηρεάζουν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα, διότι μπορούν να ενεργούν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά μεταξύ τους.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων εξαρτάται από το χημικό τύπο και πως είναι καταμεμημένες οι χαρακτηριστικές ομάδες (-OH) στο μόριο. Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, το γαλλικό που έχει στο μόριο του τρία -OH θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό. Τα υδροξυκινναμωνικά οξέα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, έχει αποδειχθεί ότι ταυτόχρονη παρουσία στα φλαβονοειδή (**Σχήμα 2.1**, §2.1.3):

A) δυο υδροξυλίων σε όρθο θέση στο δακτύλιο B,

B) του διπλού δεσμού ανάμεσα στις θέσεις 2,3, του C δακτυλίου σε συζυγία με την κετο-ομάδα,

Γ) δυο υδροξυλίων στις θέσεις 3,5,

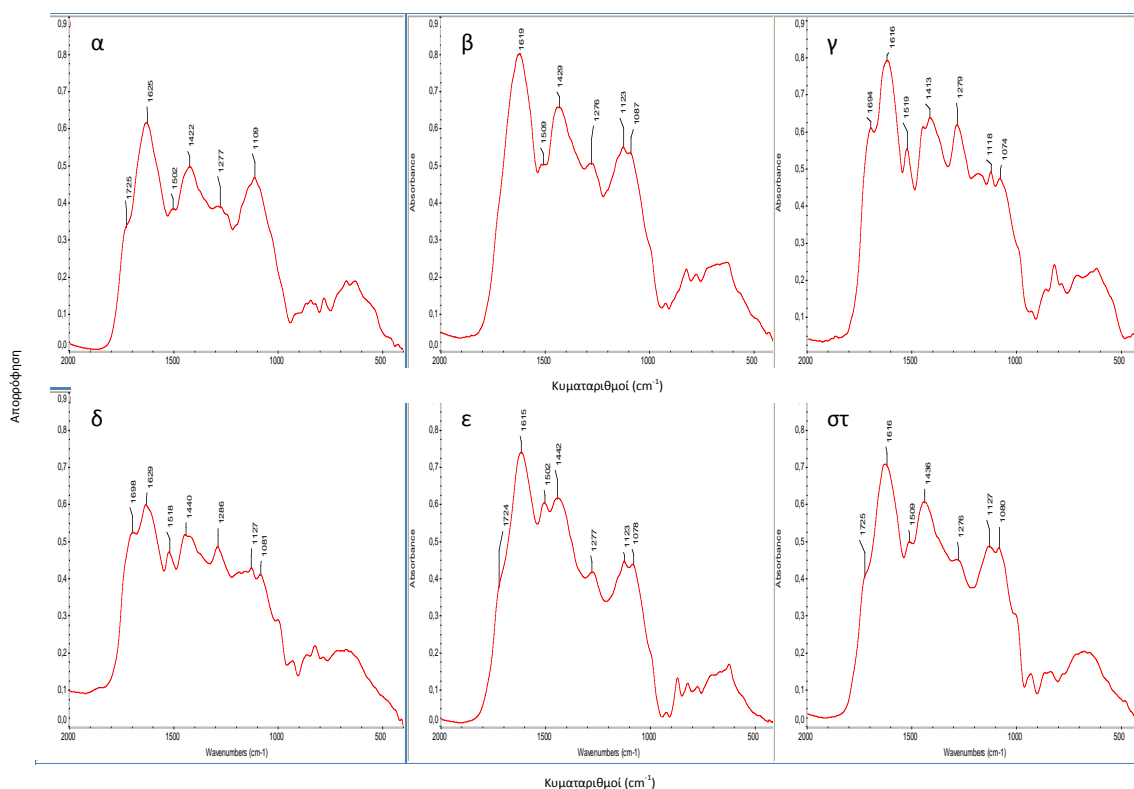
είναι σημαντικά για την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. (Rice-Evans *et al.*, 1996; Soobrattee *et al.*, 2005; Trouillas *et al.*, 2006; Tsimogiannis και Oreoroulou, 2006)

Όσο μεγαλύτερος είναι βαθμός πολυμερισμού τους, τόσο μεγαλύτερη και η ικανότητα να μπλοκάρουν ρίζες (Moure *et al.*, 2001), ενώ η παρουσία γλυκοζιτών στο μόριο μειώνει την αντιοξειδωτική δράση (Rice-Evans *et al.*, 1996; Moure *et al.*, 2001).

Από τα παραπάνω είναι σαφές πως μόνο με τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου δεν μπορούν να εξαχθούν ειδικότερα συμπεράσματα για την αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων, απαιτείται ένας πιο ενδεδειγμένος έλεγχος με την ανάλυση αυτών με υγρή χρωματογραφία.

### 1.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

Τα φάσματα FT-IR των λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων των φυτών ελήφθησαν με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης. Η προσπάθειά μας επικεντρώθηκε στην αξιοποίηση της ταχύτητας που μας παρέχει η φασματοσκοπία υπερέθρου στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας ολικών φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.



**Σχήμα 1.13.** Αντιπροσωπευτικά φάσματα FT-IR στην περιοχή  $2000-400\text{ cm}^{-1}$  λυοφιλωμένων αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων α) αφεψήματος χαμομηλιού, β) αφεψήματος δίκταμου, γ) αφεψήματος μελισσόχορτου, δ) κρύου εκχυλίσματος μελισσόχορτου ε) αφεψήματος δεντρολίβανου και στ) αφεψήματος φασκόμηλου

Στο **Σχήμα 1.13** φαίνονται τα φάσματα FT-IR των λυοφιλωμένων αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων. Οι απορροφήσεις στην περιοχή μεταξύ  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται σε δονήσεις του καρβονυλίου και αρωματικών δακτυλίων. Στα φάσματα των εκχυλισμάτων παρατηρείται μια ταινία απορρόφησης στα  $1730-1731\text{ cm}^{-1}$ , που έχει αποδοθεί στο καρβονύλιο της εστερομάδας. Στη φαρδιά

ταινία απορρόφησης στα  $1600\text{ cm}^{-1}$  αλληλεπικαλύπτονται η τάση των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου, οι απορροφήσεις των καρβοξυλικών ανιόντων και το δεσμευμένο νερό που δεν απομακρύνεται ακόμα και μετά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης.

Η περιοχή, που εκτείνεται από τα  $1500$  έως τα  $600\text{ cm}^{-1}$  είναι η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η απορρόφηση γύρω στα  $1515\text{ cm}^{-1}$ , οφείλεται στην τάση των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου. Η κορυφή στα  $1400\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο και σε συνδυασμό με την εντός επιπέδου κάμψη των  $-\text{CH}_2-$ , και  $-\text{CH}_3$  καθώς στη δόνησης τάσης του C-O, και της παραμόρφωσης του O-H. Στα  $1280\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται η εντός επιπέδου κάμψη του -OH, ενώ στα  $1120\text{ cm}^{-1}$  η δόνηση τάσης του C-O των εστέρων. Τέλος, οι απορροφήσεις στα  $1123\text{ cm}^{-1}$  και  $1080\text{ cm}^{-1}$  αναφέρονται στις σκελετικές δονήσεις των  $-\text{C-OH}$  και  $-\text{C-O-C}$  των δακτυλίων της πυρανόζης των σακχάρων (Socrates, 1994; Nakanishi *et al.*, 1997; Παππάς, 2000; Schulz *et al.*, 2007).

**Πίνακας 1.4.** Σύγκριση των μοντέλων βαθμονόμησης που αναπτύχθηκαν σε διάφορες περιοχές του φάσματος για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Φασματική περιοχή $\text{cm}^{-1}$	Αριθμός παραγόντων	Βαθμονόμηση		Διασταυρούμενη		Πρόβλεψη
				Επικύρωση		
		r	RMSEC	r	RMSECV	
2000-800	10	0.98	4.67	0.96	8.28	7.27
1800-1180	10	0.99	4.33	0.97	7.61	6.07
1800-1500	10	0.99	5.32	0.97	8.33	5.06
1320-1180	9	0.98	6.44	0.94	10.70	8.16
1800-1500 & 1320-1180	10	0.99	3.74	0.98	5.76	4.41

Κατασκευάστηκαν μοντέλα βαθμονόμησης μερικώς ελαχίστων τετραγώνων (partial least square model calibration) σε διάφορες φασματικές περιοχές μεταξύ  $2000-800\text{ cm}^{-1}$  όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 1.4**. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν τυχαία σε δυο κατηγορίες. Στη μια υπήρχαν 48 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη

βαθμονόμηση του μοντέλου και η άλλη περιελάμβανε τα 22 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη αυτού.

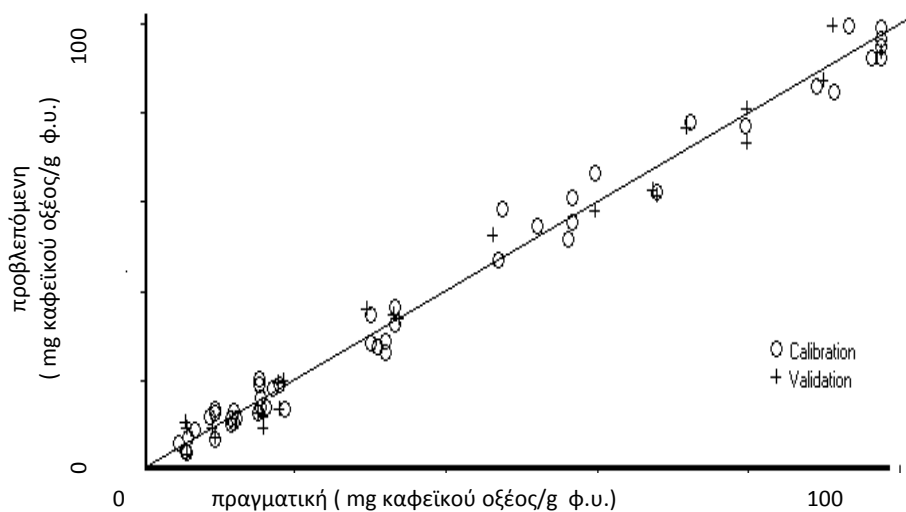
Σε κάθε φασματική περιοχή υπολογίστηκαν τα στατιστικά στοιχεία. Στην περιοχή 1800-1500 & 1320-1180  $\text{cm}^{-1}$ , η μέση τετραγωνική ρίζα του σφάλματος βαθμονόμησης (RMSEC) και η μέση τετραγωνική ρίζα του σφάλματος διασταυρωμένης επικύρωσης (RMSECV) παρουσίασαν τη μικρότερη διαφορά. Επιπλέον, στην περιοχή αυτή, η μέση τετραγωνική ρίζα του σφάλματος πρόβλεψης ήταν μικρότερη από ότι στις άλλες φασματικές περιοχές που εξετάστηκαν. Τα στατιστικά στοιχεία (συντελεστής συσχέτισης-  $r$  0.99, μέση τετραγωνική ρίζα των σφαλμάτων βαθμονόμησης- RMSEC 3.74, μέση τετραγωνική ρίζα της πρόγνωσης- RMSEP 4.41, μέση τετραγωνική ρίζα σφαλμάτων της επικύρωσης- RMSECV 5.76) δείχνουν ότι το μοντέλο είναι αποδεκτό.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε ο δείκτης υπολειμματικής πρόβλεψης απόκλισης RPD (residual predictive deviation) που ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης των τιμών της μεθόδου αναφοράς, δηλαδή τις τιμές που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu προς RMSECV. Στις γεωπονικές επιστήμες, ο δείκτης αυτός έχει βρεθεί πως αν η τιμή κυμαίνεται μεταξύ 3 και 5, τότε το μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο, ενώ όταν είναι  $>5$  θεωρείται πολύ καλό για έλεγχο ποιότητας (Cozzolino *et al.*, 2008). Στην προκειμένη περίπτωση, ο δείκτης βρέθηκε 6,4, τιμή που μας επιτρέπει να χαρακτηρίσουμε το μοντέλο ως αξιόπιστο.

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά, που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη αυτού, όπως προσδιορίστηκε με τη φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu κυμάνθηκε από 4,20-97,60 mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού, ενώ με τη νέα μέθοδο με τη χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά ήταν μεταξύ 3,06 και 99,52 mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού (**Πίνακας 1.5**). Ενώ στο **Σχήμα 1.14**, παρουσιάζεται το μοντέλο βαθμονόμησης που προέκυψε.

Η φασματοσκοπία FT-IR έχει αποδειχθεί ένα ισχυρό εργαλείο για την πρόβλεψη ή και την ποσοτικοποίηση συστατικών σε διάφορα προϊόντα όπως σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Karoui *et al.*, 2006a,b), σε κρέας και συναφή προϊόντα (Osorio *et al.*, 2009), σε αιθέρια έλαια (Petraakis *et al.*, 2009), σε δείγματα κρόκου

(Anastasaki *et al.*, 2010). Σε πρόσφατες μελέτες, η χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR έχει εφαρμογή και σε για την πρόβλεψη την περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών σε βατόμουρα (Sinelli *et al.*, 2008), σε κρασιά (Cozzolino *et al.*, 2006), με τις περισσότερες έρευνες να χρησιμοποιούν την εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία. Οι Saltas *et al.*, (2013), χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου και χημειομετρία προσδιόρισαν την περιεκτικότητα του ροσμαρινικού οξέος σε φυτά της οικογένειας Lamiaceae, χρησιμοποίησαν την περιοχή  $1344-806\text{ cm}^{-1}$  για τη δημιουργία μοντέλου βαθμονόμησης.



**Σχήμα 1.14.** Μοντέλο βαθμονόμησης και πρόβλεψης με χρήση πολυμεταβλητής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για τα ολικά φαινολικά συστατικά εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/g φ.υ.

**Πίνακας 1.5.** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη του μοντέλου βαθμονόμησης, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin Ciocalteu και με το μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τα φάσματα FT-IR.

Δείγμα	Folin Ciocalteu	FT-IR
	(mg καφεϊκού οξέος/g φ.υ.)	
Δεντρολίβανο Α	4,20	4,09
Χαμομήλι Β	4,90	9,38
Χαμομήλι Β-πε	4,33	3,06
Φασκόμηλο Α-πε	8,34	6,99
Φασκόμηλο Α	9,10	9,39
Δίκταμο Α-πε	13,71	9,29
Δίκταμο Α	14,55	11,76
Χαμομήλι Γ-πε	15,23	12,54
Δίκταμο Β-πε	16,43	13,29
Δίκταμο Β	17,78	19,52
Δίκταμο Β	18,53	19,72
Δίκταμο Α-πε	29,45	36,15
Δίκταμο Γ	31,86	31,86
Δίκταμο Γ	33,01	34,87
Μελισσόχορτο Α-πε	59,3	52,40
Μελισσόχορτο Α-πε	59,64	58,09
Μελισσόχορτο Α	67,29	62,58
Μελισσόχορτο Α	68,11	62,24
Μελισσόχορτο Β-πε	72,88	76,61
Μελισσόχορτο Β	80,22	77,13
Μελισσόχορτο Γ-πε	91,20	99,52
Μελισσόχορτο Γ	97,60	93,60

\* (Α) Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (Β) Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, (Γ) Εκχύλιση με ζεστό νερό

\*\* -πε αναφέρεται στην υδατική φάση των παραπάνω μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα

#### 1.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

Έχοντας υπολογίσει τη θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του φαινολικού ολικού περιεχομένου και των δυο μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας, σκοπός μας ήταν η χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας και στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Θετικά αποτελέσματα έχουν καταγραφεί σε άλλες μελέτες για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH στο κρασί (Patz *et al.*, 2004) και στο μέλι (Escuredo *et al.*, 2013) με τη μέθοδο ABTS σε πράσινο τσάι (Zhang *et al.*, 2004) και σιτηρά (Zhang *et al.*, 2008). Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν την εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία (NIR) ( $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ ). Τα φάσματα NIR είναι δύσκολο να ερμηνευθούν εξαιτίας του γεγονότος ότι υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις ταινιών απορρόφησης θεμελιωδών ομάδων. Αντίθετα, στα φάσματα MIR οι ζώνες απορρόφησης είναι καλύτερα οριοθετημένες και τα φάσματα μπορούν να ερμηνευθούν ευκολότερα. Αφ' ενός χρησιμοποιείται η περιοχή  $4000-400$  όπου ο κορυφές είναι πιο έντονες, με καλύτερη διαχωριστική ικανότητα, αφετέρου αξιοποιούμε φασματικές περιοχές που περιέχουν απορροφήσεις που αποδίδονται σε συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ομάδες ή στο δακτυλικό αποτύπωμα ολόκληρου του μορίου. Ωστόσο, λίγες αναφορές της παραπάνω εφαρμογής υπάρχουν για τη μέση υπέρυθρη φασματοσκοπία και μέχρι στιγμής καμία πάνω στα αρωματικά και φαρμακευτικά που μελετάμε.

Για την κατασκευή των μοντέλων βαθμονόμησης μερικώς ελαχίστων τετραγώνων (partial least square model calibration) χρησιμοποιήθηκε η φασματική περιοχή  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  και  $1320-1180\text{ cm}^{-1}$ , που παραπάνω είχε τα καλύτερα αποτελέσματα. Τα στατιστικά στοιχεία (συντελεστής συσχέτισης-  $r$ , μέση τετραγωνική ρίζα του σφάλματος βαθμονόμησης- RMSEC, μέση τετραγωνική ρίζα του σφάλματος πρόγνωσης- RMSEP, μέση τετραγωνική ρίζα του σφάλματος της διασταυρούμενης επικύρωσης- RMSCV) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.6). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS κυμάνθηκε από 109,59 μέχρι 1321,00  $\mu\text{mol TROLOX}/200\text{ mL}$  και με τη μέθοδο DPPH 69,20-1215,27  $\mu\text{mol TROLOX}/200\text{ mL}$



(Πίνακας 1.7), ενώ με τη νέα μέθοδο με τη χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν για τις δυο μεθόδους μεταξύ των τιμών 76,94 και 1237,19  $\mu\text{mol TROLOX}/200\text{ mL}$  και από 54,98 μέχρι 1211,88  $\mu\text{mol TROLOX}/200\text{ mL}$ , αντίστοιχα. Στο Σχήμα 1.15, παρουσιάζονται τα μοντέλα βαθμονόμησης που προέκυψαν για την κάθε μέθοδο.

**Πίνακας 1.6.** Στατιστικά στοιχεία για τα μοντέλα βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

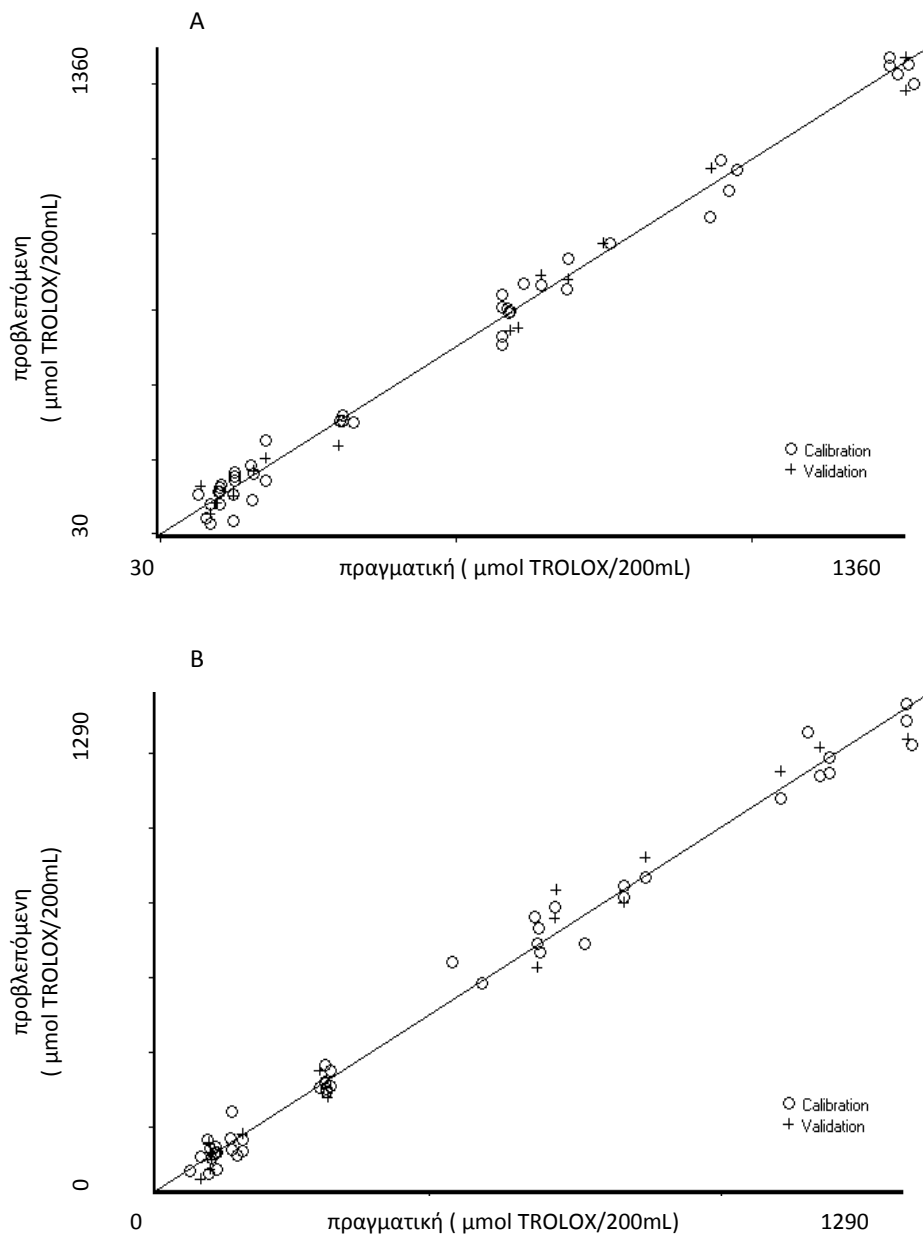
Μέθοδος	Αριθμός παραγόντων	Βαθμονόμηση		Διασταυρούμενη Επικύρωση		Πρόβλεψη
		r	RMSEC	r	RMSECV	
ABTS	10	0.98	4.67	0.96	8.28	7.27
DPPH	10	0.99	3.74	0.98	5.76	4.41

**Πίνακας 1.7.** Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη του μοντέλου βαθμονόμησης, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS και με το μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τα φάσματα FT-IR.

Δείγμα	ABTS	FT-IR	DPPH	FT-IR
	( $\mu\text{mol TROLOX}/200\text{mL}$ )			
Φασκόμηλο Β-πε	109,59	122,70	69,20	127,08
Χαμομήλι Γ-πε	119,31	76,94	123,19	102,34
Φασκόμηλο Β	125,05	143,71	86,10	54,98
Χαμομήλι Γ	141,05	131,47	95,76	84,61
Δίκταμο Β	179,60	137,56	179,98	168,59
Δίκταμο Γ-πε	311,90	352,47	301,90	234,79
Φασκόμηλο Γ	326,10	279,80	328,40	297,42
Μελισσόχορτο Α-πε	686,50	626,67	602,45	542,79
Μελισσόχορτο Α	746,12	789,45	629,48	666,25
Μελισσόχορτο Β-πε	868,03	798,85	689,71	680,33
Μελισσόχορτο Β	871, 80	865,65	750,00	776,32
Μελισσόχορτο Γ-πε	1319,49	1211,88	1160,70	1211,88
Μελισσόχορτο Γ	1321,00	1237,19	1215,27	1183,85

\* (Α) Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (Β) Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, (Γ) Εκχύλιση με ζεστό νερό

\*\* -πε αναφέρεται στην υδατική φάση των παραπάνω μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα



**Σχήμα 1.15.** Μοντέλο βαθμονόμησης και πρόβλεψης με χρήση πολυμεταβλητής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για τη μέθοδο ABTS (A) και τη μέθοδο DPPH (B)

Συμπερασματικά, από τη μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους DPPH και ABTS βρέθηκε ότι τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά παρουσίασε το αφέψημα του μελισσόχορτου κάτι που έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές σε διάφορες μελέτες για τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae. Ακολουθούν κατά ελαττωμένη σειρά τα αφεψήματα φασκόμηλο, δίκταμο, χαμομήλι, και τέλος το δενδρολίβανο. Επίσης, μεγάλη ήταν η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων στα οποία η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με ζεστό νερό θερμοκρασίας 85° C και στα δείγματα όπου η εκχύλιση ήταν υποβοηθούμενη από υπερήχους ή γινόταν με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ η διαφορά των δύο τελευταίων τρόπων εκχύλισης είναι αρκετά μικρή. Οι τιμές που παρατηρούνται στα αφεψήματα διέφεραν αλλά ήταν συγκρίσιμες με τις τιμές που προέκυψαν στα εκχυλίσματα μετά την εκχύλιση με τον πετρελαϊκό αιθέρα. Ακόμα βρέθηκε ότι η σχέση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα, ήταν θετική και γραμμική, που δηλώνει ότι το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Επίσης, η ανάλυση των λυοφιλιωμένων δειγμάτων με φασματοσκοπία FT-IR σε συνδυασμό με χημειομετρία οδήγησε σε αποδεκτά μοντέλα βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε αφεψήματα και υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Έτσι λοιπόν, η δυνατότητα αξιοποίησης της φασματοσκοπίας FT-IR σε αυτό τον τομέα είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς αποτελεί μια γρήγορη μέθοδο ανάλυσης.

## 2. Χρωματογραφική ανάλυση αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

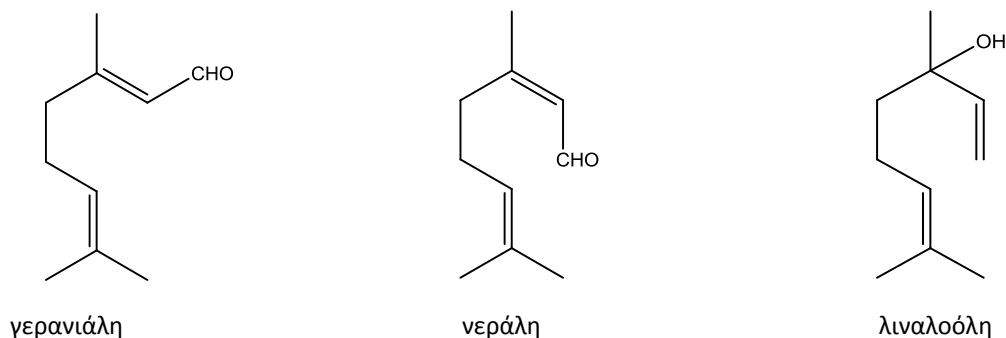
### 2.1 Ποιοτικός προσδιορισμός των εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)

Η οργανική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα αναλύθηκε με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας. Τα πτητικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν με βάση το χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας πρότυπων ενώσεων (για τις κύριες ουσίες), καθώς και από τη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας και της βιβλιοθήκης φασμάτων NBS75K, Wiley 275 και Adams 2007, που υπάρχει στο λογισμικό του οργάνου.

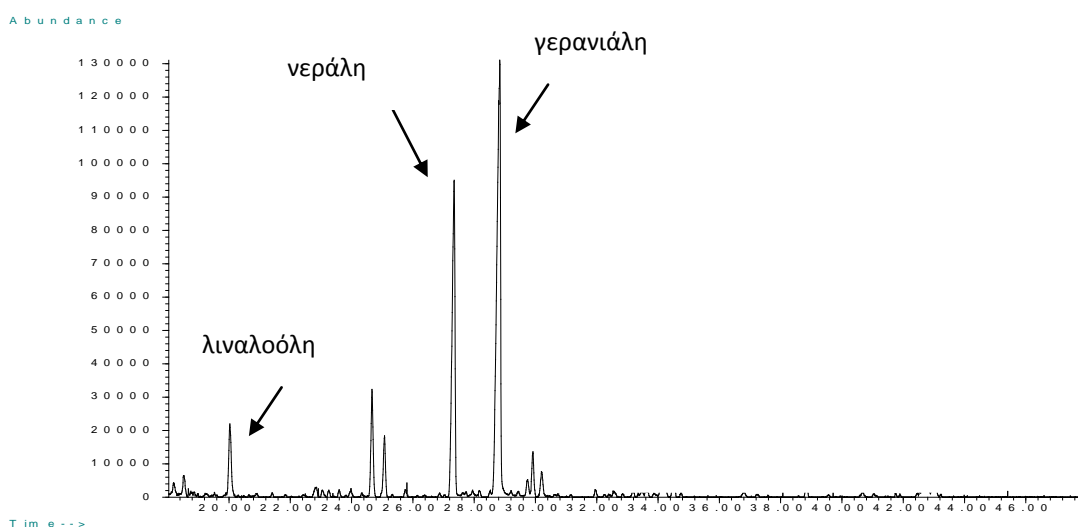
Στον **Πίνακα 2.1** παρουσιάζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα της οργανικής φάσης του πετρελαϊκού αιθέρα των εκχυλισμάτων των φυτών με τους διαφορετικούς τρόπους παρασκευής του αφεψήματος. Στην περίπτωση του μελισσόχορτου, παρατηρείται ότι η νεράλη και η γερανιάλη, οι οποίες αποτελούν την κιτράλη είναι οι κυρίαρχες ουσίες στο οργανικό εκχύλισμα ανεξαρτήτως του τρόπου που γίνεται η παρασκευή των εκχυλισμάτων (**Σχήμα 2.1**). Στο **Σχήμα 2.2**, παρουσιάζεται ενδεικτικά το χρωματογράφημα της οργανικής φάσης του αφεψήματος. Η κιτράλη ήταν η κυρίαρχη ουσία στο αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου που αναλύθηκε από άλλους ερευνητές (Mimica-Dukic *et al.*, 2004, Cosge *et al.*, 2009, Iordache *et al.*, 2009, Meftahizade *et al.*, 2010, Rehman *et al.*, 2013). Ωστόσο, σε άλλες εργασίες η χημική σύσταση είναι πολύ διαφορετική και με απουσία των δυο παραπάνω ουσιών (Ntalli *et al.*, 2010, Koliopoulos *et al.*, 2010). Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις διαφοροποιήσεις παίζουν το είδος του φυτού, το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται, οι κλιματικές συνθήκες όπου αναπτύσσεται το φυτό, η εποχή συλλογής.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές για τη σύσταση των αιθεριών ελαίων των φυτών είναι πάμπολλες, ωστόσο, ελλιπής είναι οι γνώσεις μας στα πτητικά συστατικά που εκχυλίζονται κατά την παρασκευή των αφεψημάτων και προσδιορίζουν το άρωμα τους. Ερευνητές που έχουν ασχοληθεί αναφέρουν ότι η χημική σύσταση των

αφεψημάτων διαφέρει από την αντίστοιχη του αιθερίου ελαίου και επιπλέον διαφέρει και από τον τρόπο που γίνεται εν τέλει και η προετοιμασία της παραλαβής του των πτητικών συστατικών από τα αφεψήματα. Οι συνήθεις τεχνικές είναι η υδροαπόσταξη, εκχύλιση υγρού- υγρού, εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction-SPE), μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase microextraction- SPME).



**Σχήμα 2.1.** Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη



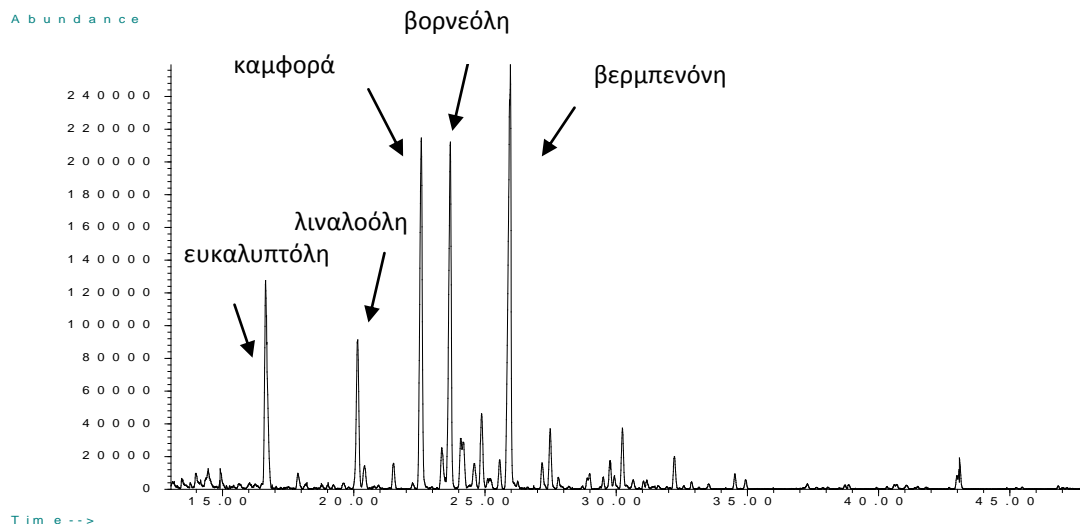
**Σχήμα 2.2.** Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του μελισσόχορτου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα

Οι Carnat *et al.*, 1998, μελέτησαν τη σύσταση του αιθερίου ελαίου φύλλων μελισσόχορτου που παραλήφθηκε με υδροαπόσταξη καθώς και τη σύσταση του αιθερίου ελαίου του αφεψήματος των φύλλων που παραλήφθηκε και αυτό με υδροαπόσταξη. Κατέληξαν ότι και στις δυο περιπτώσεις η κυρίαρχη ένωση ήταν η

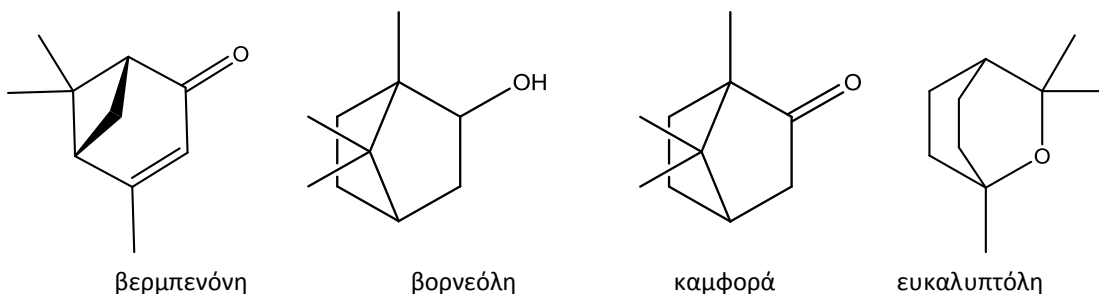
κιτράλη, ενώ στην περίπτωση του αφεψήματος τα πιο πτητικά συστατικά δεν ανιχνεύτηκαν, μάλλον λόγω των πολλών επεξεργασιών κατά τη διαδικασία. Αντίστοιχες παρατηρήσεις πηγάζουν και από τα αποτελέσματα, όπου δεν ανιχνεύονται στην οργανική φάση πολύ πτητικά συστατικά, επιπλέον η κυρίαρχη ομάδα ενώσεων είναι οι αλδεΐδες.

Όσον αφορά το δεντρολίβανο, η κύρια ουσία στην περίπτωση της εκχύλισης με νερό θερμοκρασίας 85 °C ήταν η βερμπενόνη, ακολουθούμενη από τη βορνεόλη και την καμφορά, ενώ στους άλλους δυο τρόπους εκχύλισης η βορνεόλη υπερείχε, με την καμφορά και την ευκαλυπτόλη να ακολουθούν (**Σχήμα 2.3**). Αρκετές διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στη χημική σύσταση των πτητικών συστατικών κατά τη διαδικασία παρασκευής του εκχυλίσματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η βερμπενόνη βρέθηκε σε χαμηλότερα ποσοστά στα εκχυλίσματα με νερό θερμοκρασίας περιβάλλοντος υποβοηθούμενο ή όχι από τους υπερήχους σε σχέση με το ζεστό αφέψημα, ενώ φαίνεται ότι το αρωματικό προφίλ των δυο αυτών εκχυλισμάτων εμπλουτίστηκε σε καρβακρόλη. Η ανάλυση του αντίστοιχου αιθέριου ελαίου έδειξε ότι η ευκαλυπτόλη ήταν η ένωση με το μεγαλύτερο ποσοστό (17,6%), ακολουθούμενη από το  $\alpha$ -πινένιο με 15%, τη καμφορά (12,4%), μετά τη βορνεόλη (9,6%) και τέλος τη βερμπενόνη (7,2%) (Αναστασάκη και συν., 2011). Αντιστοίχως με την περίπτωση του αφεψήματος του μελισσόχορτου παρατηρείται απώλεια των υδρογονανθράκων όπως το  $\alpha$ -πινένιο, μείωση των λιγότερο πολικών συστατικών και ο εμπλουτισμός του αφεψήματος κυρίως με πολικά οξυγονούχα συστατικά, παρατηρήσεις που επιβεβαιώνονται και από άλλες μελέτες για το αρωματικό προφίλ των αφεψημάτων δεντρολίβανου (Schneider *et al.*, 1992; Tschiggerl και Bucar, 2010a). Ενώ στην περίπτωση του μελισσόχορτου δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στο αρωματικό προφίλ των εκχυλισμάτων ως προς τον τρόπο που αυτά παρασκευάστηκαν, στο δεντρολίβανο παρατηρούμε την ύπαρξη επτά συστατικών που είναι παρόντα μόνο στο αφέψημα. Ειδικότερα, η χρυσανθενόνη και η φιλιφολόνη δεν έχουν αναφερθεί στο αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου, αντίθετα θεωρούνται τα κύρια συστατικά αιθέριων ελαίων κυρίως φυτών της οικογένειας Asteraceae (Asfaw *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2013). Οι Asfaw *et al.*, 2001 μελετώντας το αιθέριο έλαιο του φυτού *Laggera tomentosa* από την Αιθιοπία κατέληξε ότι η ταυτόχρονη παρουσία των

δυσ αυτών συστατικών οφείλεται στη μερική ισομερίωση της χρυσανθενόνης σε φιλιφολόνη κατά τη διάρκεια της υδροαπόσταξης.



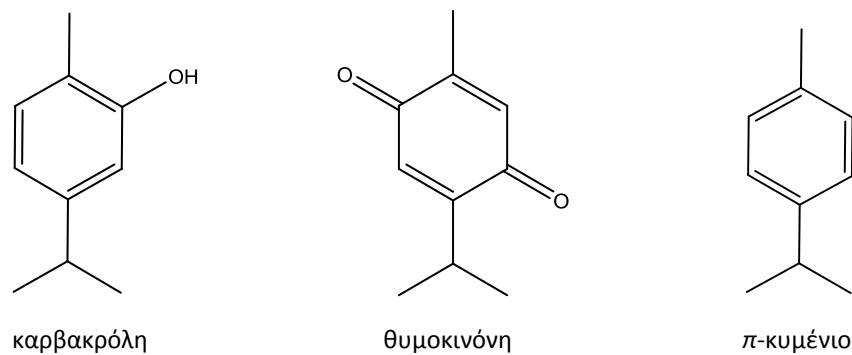
**Σχήμα 2.3.** Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφέψηματος του δεντρολίβανου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα



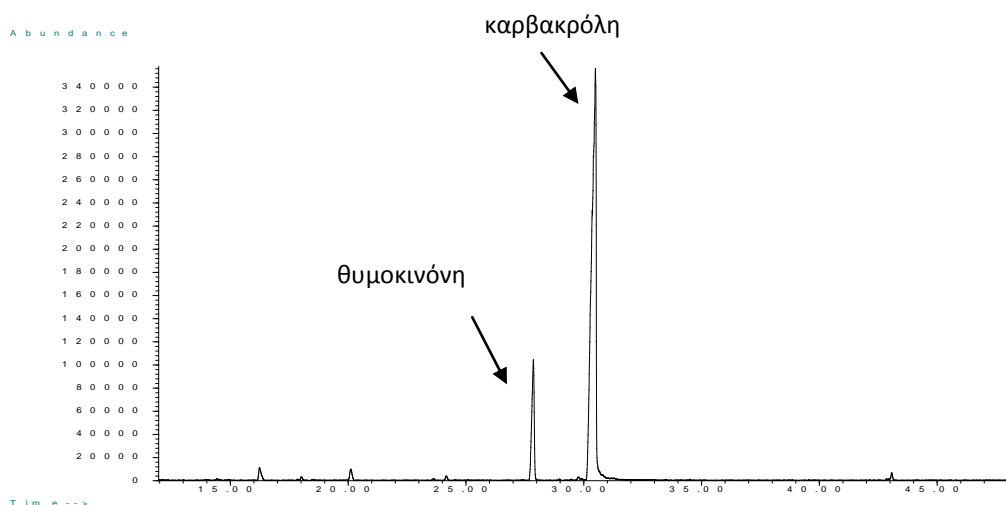
**Σχήμα 2.4.** Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη

Στην περίπτωση του δίκταμου, παρατηρείται απουσία ή μειωμένο ποσοστό υδρογονανθράκων σε σχέση με το αιθέριο έλαιο, ωστόσο, η κυρίαρχη ένωση στην οργανική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα ήταν η καρβακρόλη, που είναι άλλωστε και η κύρια ένωση στο αιθέριο έλαιο (Sivgoroulou *et al.*, 1996; Daferera *et al.*, 2002; Chorianoopoulos *et al.*, 2004). Η ουσία με το δεύτερο μεγαλύτερο ποσοστό ήταν η θυμοκινόνη με ποσοστά που κυμαίνονται από 12,1-19,7%. Η παρουσία της στο

αιθέριο έλαιο έχει αναφερθεί από τους Economidou *et al.*, (2005) σε φύλλα του είδους *Origanum dictamnus* που καλλιεργηθήκαν με υδροπονική μέθοδο. Επιπλέον έχει αναφερθεί η παρουσία της σε οργανικά εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου (Skoula *et al.*, 1999) και πετρελαϊκού αιθέρα (Kouri *et al.*, 2007). Μελετώντας τα πτητικά συστατικά του αφεψήματος και του υδρολύματος του *Thymus pulegioides* που παρελήφθησαν μετά από κατεργασία με SPE, η θυμοκινόννη ήταν απύσα στο υδρόλυμα αλλά παρούσα στο αφέψημα σε ποσοστό 7,27%, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η θυμοκινόννη είναι παραπροϊόν της διαδικασίας παρασκευής του αφεψήματος (Rădulescu *et al.* 2009). Αντίστοιχα στην εργασία των Tschiggerl και Bucar (2011) ανιχνεύθηκε θυμοκινόννη στα πτητικά συστατικά του αφεψήματος του *Thymus vulgaris* μετά από κατεργασία με SPE.



**Σχήμα 2.5.** Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του δίκταμου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη



**Σχήμα 2.6.** Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του δίκταμου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα



**Πίνακας 2.1.** Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των πτητικών συστατικών που προσδιορίστηκαν μέσω GC-MS στην οργανική φάση του πετρελαϊκού αθέρα των αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών

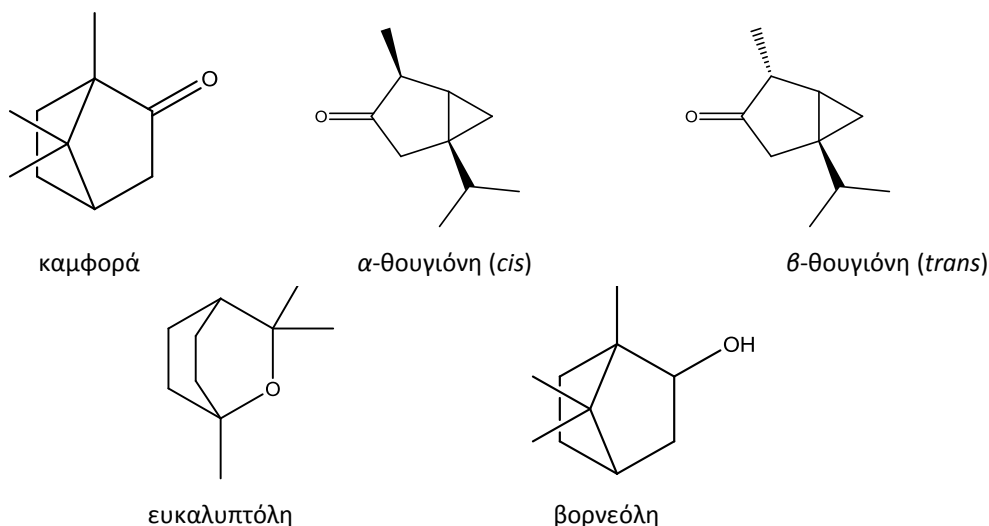
ΚΙ*	Συστατικό	Μελισσόχορτο			Δεντρολίβανο			Φασκόμηλο			Δίκταμο			Χαμομήλι		
		A**	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
1011	π-κυμένιο	-***	-	-	-	-	-	0,50	0,68	0,41	0,22	0,44	1,42	-	-	-
1019	Ευκαλυπτόλη	-	-	-	8,02	10,66	10,05	21,14	19,38	20,13	-	-	-	-	-	-
1043	γ-τερπινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	0,20	0,07	-	-	-
1054	cis- οξείδιο της λιναλοόλης	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1083	Λιναλοόλη	1,07	1,09	2,63	10,75	8,01	6,50	0,92	0,92	0,69	1,55	1,87	1,29	-	-	-
1085	Φιλιφολόνη	-	-	-	-	-	1,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1087	α-θουγιόνη (cis)	-	-	-	-	-	-	27,93	29,04	26,11	-	-	-	-	-	-
1098	β-θουγιόνη (trans)	-	-	-	-	-	-	3,90	3,91	4,5	-	-	-	-	-	-
1101	Χρυσανθενόνη	-	-	-	-	-	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1128	Καμφορά	-	-	-	7,36	11,56	14,84	34,44	36,08	35,54	-	-	-	-	-	-
1141	Πινοκαμφόνη	-	-	-	0,63	0,83	1,96	-	-	0,19	-	-	-	-	-	-
1147	Βορνεόλη	-	-	-	21,90	25,03	14,72	5,11	3,62	5,90	-	-	-	-	-	-
1155	Ισοπινοκαμφόνη	-	-	-	1,88	2,03	1,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1158	Τερπινεν-4-όλη	-	-	-	-	-	1,80	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-
1163	π-κυμεν-8-όλη	-	-	-	-	-	1,27	-	-	0,59	-	-	-	-	-	-
1170	α-τερπινεόλη	-	-	-	0,60	0,94	3,16	0,41	0,23	0,41	0,48	0,50	0,40	-	-	-
1177	Μυρτενόλη	-	-	-	-	-	0,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Μελισσόχορτο			Δεντρολίβανο			Φασκόμηλο			Δίκταμο			Χαμομήλι		
	A**	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
KI* Συστατικό															
1191 Βερμπενόνη	-	-	-	5,16	8,86	20,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1216 Νεράλη	32,05	31,05	35,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1242 Γερανιάλη	62,58	62,58	59,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1257 Οξικός βορνυλεστέρας	-	-	-	1,44	1,67	0,46	0,63	0,69	0,43	-	-	-	-	-	-
1260 Θυμοκινόνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,60	15,71	12,43	-	-	-
1267 Θυμόλη	0,67	0,88	1,09	0,84	1,27	1,08	-	-	0,42	0,28	0,28	0,37	-	-	-
1272 Καρβακρόλη	1,12	1,50	2,03	10,09	6,70	2,25	0,66	1,07	1,31	82,88	79,03	78,96	-	-	-
1303 Πιπεριτενόνη	-	-	-	-	-	1,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1554 Β-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,86	17,06	14,26
1576 Α-α-οξείδιο της μπισαμπολόνης	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,79	9,37	6,80
1588 Μεθυλουμπελιφερόνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,91	20,80	11,49
1608 Α-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,71	30,98	34,06
1653 Ζ- σπιθοαιθερας	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,46	10,98	19,05
1657 Ε- σπιροαιθέρας	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,83	7,98	12,89

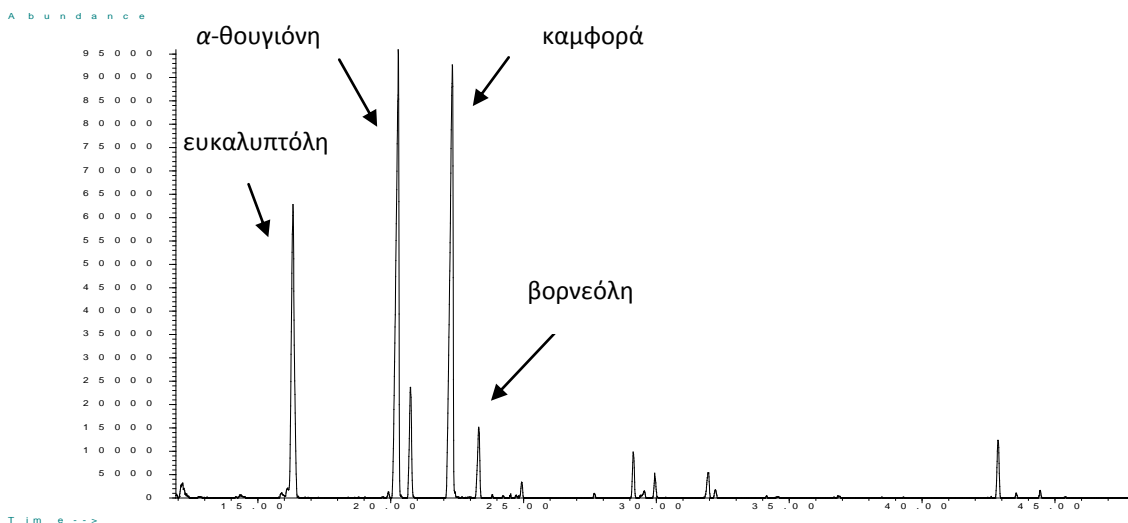
\* Δείκτης Kovats σε μη πολική στήλη HP-5ms σε σχέση με η αλκάνια

\*\* (Α) Εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (Β) Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, (Γ) Εκχύλιση με ζεστό νερό

\*\*\* Δεν ανιχνεύθηκε



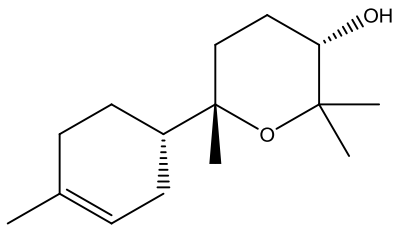
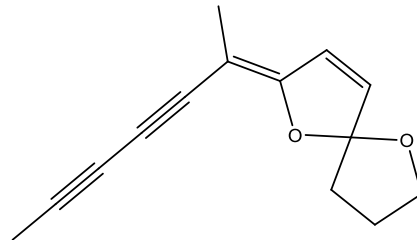
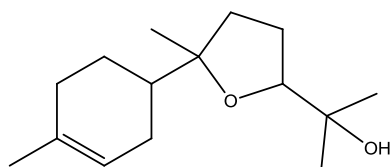
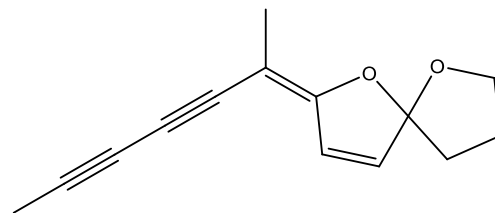
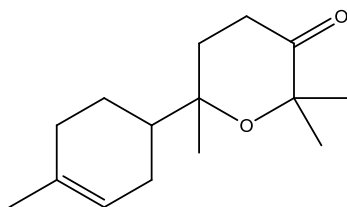
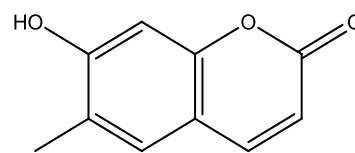
**Σχήμα 2.7.** Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του φασκόμηλου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη



**Σχήμα 2.8.** Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του φασκόμηλου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα

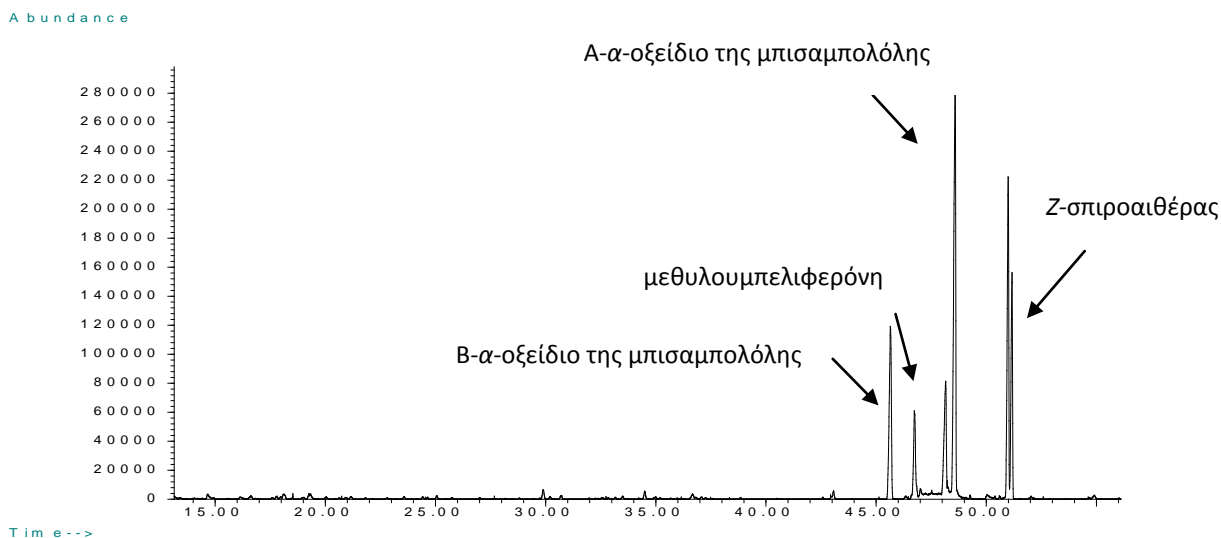
Τα κύρια συστατικά στην περίπτωση του φασκόμηλου ανεξαρτήτως του τρόπου εκχύλισης ήταν η καμφορά, η α-θουγιόνη και η ευκαλυπτόλη, ακολουθούμενα από τη βορνεόλη και τη β-θουγιόνη. Οι τρεις πρώτες ενώσεις αποτελούν τις κυρίαρχες ενώσεις της οργανικής φάσης με εξάνιο και διχλωρομεθάνιο του αφεψήματος φασκόμηλου προέλευσης Ρουμανίας (Râdulescu *et al.* 2004). Καμφορά, ευκαλυπτόλη, α-, β-θουγιόνη και βορνεόλη ανιχνεύθηκαν στο αφέψημα όπου η απομόνωση των πτητικών έγινε με την τεχνική solvent-assisted flavor evaporation –SAFE (Ehrnhöfer-Ressler *et al.*, 2013). Σε άλλη πιο πρόσφατη έρευνα η

σύγκριση της απομόνωσης των πτητικών συστατικών από αφέψημα φασκόμηλου με διάφορες παραλλαγές της τεχνικής headspace έδειξε ότι οι κύριες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν οι  $\alpha$ -,  $\beta$ -θουγιόνη, καμφορά, ευκαλυπτόλη, βορνεόλη, οξικό βορνύλιο, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της SPME και SBSE παρατηρήθηκε εμπλουτισμός με οξυγονούχα σесκιτερπένια όπως οξείδιο του καρυοφυλλενίου, εποξείδια του χουμουλενίου (Arceusz *et al.*, 2013). Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης θουγιόνης και της καμφοράς σε αφεψήματα φασκόμηλου από τους Walch *et al.*, (2011) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι είναι καλύτερο η εκχύλιση να διαρκεί 5 μόνο min για να μην εμπλουτίζεται το αφέψημα με τις δυο αυτές ενώσεις, που θεωρούνται ισχυρά κυτταροτοξικές (Sivgorouli *et al.*, 1997).

Α- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης*trans*-(*Z*)-σπιροαιθέραςΒ- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης*cis*-(*E*)-σπιροαιθέραςΑ- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόνης

μεθυλουμπειφερόνη

**Σχήμα 2.9.** Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του χαμομηλιού, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη



**Σχήμα 2.10.** Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφέψηματος του χαμομηλιού, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα

Οι κύριες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο αφέψημα και στα εκχυλίσματα του χαμομηλιού ήταν οξείδια, αιθέρες και κουμαρίνες, με το A-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης, το Z-σπιροαιθέρα και τη μεθυλουμπελιφερόνη να είναι τα κυρίαρχα, αντίστοιχα (**Σχήμα 2.9**). Όπως σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις και εδώ παρατηρείται απουσία μονοτερπενικών υδρογονανθράκων. Στο **Σχήμα 2.10** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της οργανικής φάσης του αφέψηματος. Οι Tschiggerl και Bucar, (2011) κατέληξαν σε παρόμοια συμπεράσματα, μελετώντας το αφέψημα του χαμομηλιού και το αντίστοιχο αιθέριο έλαιο. Το αφέψημα χαρακτηριζόταν από υψηλές ποσότητες σπιροαιθέρων (Z-, E-) περίπου 30% σε σχέση με 12% στο αιθέριο έλαιο και κουμαρινών (περίπου 7%) καθώς και μειωμένες ποσότητες οξειδίων της μπισαμπολόλης (32% στο αφέψημα έναντι 60% στο αιθέριο έλαιο), με αρωματικό προφίλ πολύ διαφορετικό από αυτό του αιθερίου ελαίου. Σε έρευνες που έχουν γίνει στο αιθέριο έλαιο χαμομηλιού, αυτό κυρίως χαρακτηρίζεται από σεσκιτερπένια όπως A-α-οξείδιο της μπισαμπολόνης, A-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης, Β-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης, β-φαρνασένιο, α-μπισαμπολόλη, χαμαζουλένιο και από σπιροαιθέρες (Rubiolo *et al.*, 2006, Tschiggerl και Bucar, 2011, Roby *et al.*, 2013). Ανάλογα με την κυρίαρχη ένωση ο Schilcher (1987) όρισε έξι διαφορετικούς χημειότυπους για το χαμομήλι (**Πίνακας 2.2**).

**Πίνακας 2.2.** Οι έξι χημειότυποι του αιθερίου ελαίου του χαμομηλιού σύμφωνα με τον Schilcher (1987)

	Χημειότυπος	Χαρακτηριστικά
1	Τύπος Α	Κύρια ένωση: Α-α- οξείδιο της μπισαμπολόλης
2	Τύπος Β	Κύρια ένωση: Β-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης
3	Τύπος Γ	Κύρια ένωση: α-μπισαμπολόλης
4	Τύπος Δ	Ίσες αναλογίες α- μπισαμπολόλης και Α- και Β-α-οξειδίων της μπισαμπολόλης
5		Κύρια ένωση: Α-α-οξείδιο της μπισαμπολόνης
6		Αιθέριο έλαιο πράσινου χρώματος λόγω απουσίας χαμαζουλενίου

Η απώλεια ή η απουσία των πιο πτητικών ενώσεων και ιδιαίτερα των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων στα αφεψήματα σε σχέση με τα αιθέρια έλαια, μπορεί εύκολα να εξηγηθεί από τη διαφορά μεταξύ των πειραματικών συνθηκών των διαφορετικών τρόπων απομόνωσης των πτητικών ενώσεων από τα φυτά. Στην συσκευή τύπου Cleverger έχουμε συναπόσταξη με υδρατμούς των πτητικών ενώσεων, η οποία γίνεται σε μια χαμηλότερη θερμοκρασία από τα σημεία βρασμού τους. Στην περίπτωση του αφεψήματος, η εκχύλιση γίνεται με νερό σε θερμοκρασία βρασμού του σε ένα ανοιχτό σύστημα, στο οποίο οι ενώσεις χάνονται λόγω της άμεσης πτητικότητας και, ταυτόχρονα, της συν-εξάτμιση με υδρατμούς. Επιπλέον, σημαντικής σημασίας είναι και η διαλυτότητα του κάθε συστατικού στο νερό, με τους υδρογονάνθρακες να έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, με αποτέλεσμα οι λιγότεροι πτητικοί υδρογονάνθρακες λόγω λιποφιλικότητας να μην μπορούν να εκχυλιστούν στο νερό, ενώ οι αλκοόλες και οι κετόνες και γενικώς οι οξυγονούχες ενώσεις να έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό και τον εμπλουτισμό του αφεψήματος σε αυτές.

## 2.2 Χρωματογραφική ανάλυση αφεψημάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC-DAD, LC-MS)

### 2.2.1 Ποιοτικός προσδιορισμός

Η ποιοτική ανάλυση των φαινολικών ουσιών των αφεψημάτων επιτεύχθηκε αρχικά με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC-DAD). Τα φαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα ήταν το γαλλικό, το χλωρογενικό οξύ (5-εστέρας του καφεϊκού- κινικού οξέος), η κυναρίνη (1,5-δι εστέρας του καφεϊκού- κινικού οξέος), το καφεϊκό, το συριγκικό, το βανιλλικό, το π-κουμαρικό, το φερουλικό και το ροσμαρινικό οξύ ενώ, από τα φλαβονοειδή ήταν η απιγενίνη, ο 7-Ο-γλυκουζίτης της απιγενίνης, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η καεμφερόλη, η κατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος και η επικατεχίνη του γαλλικού οξέος. Η ταυτοποίηση κάθε φαινολικής ένωσης βασίστηκε στο συνδυασμό του χρόνου συγκράτησης, του φάσματος και του μήκους κύματος στο οποίο παρουσίασε το μέγιστο της απορρόφησης στο UV-Vis, σε σύγκριση με αυτά των πρότυπων ουσιών. Οι δομές κάποιων προτύπων φαίνονται στα **Σχήματα 2.11, 2.13 και 2.17**.

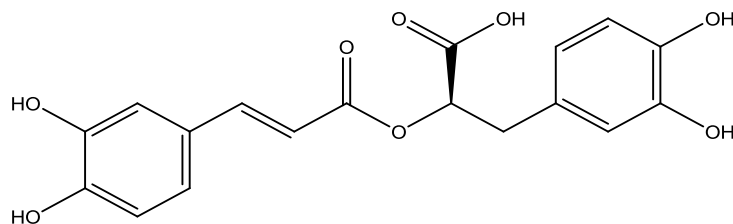
Πέραν των ταυτοποιημένων συστατικών υπήρξαν και άλλες κορυφές οι οποίες λόγω μη ύπαρξης πρότυπων ενώσεων να μην μπορούν να προσδιοριστούν. Βέβαια, από το φάσμα UV-Vis και τη χρωματογραφική συμπεριφορά τους, κατέστη δυνατό τα συστατικά αυτά να αποδοθούν σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Τα βενζοϊκά παράγωγα παρουσιάζουν μια μέγιστη απορρόφηση μεταξύ 246-262 nm και μια ωμοπλάτη μεταξύ 290-315 nm. Το φάσματα UV-Vis των φλαβονοειδών χαρακτηρίζεται από δυο χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης. Η ταινία I μεταξύ 300-380 nm που αποδίδεται στο B- δακτύλιο και η άλλη 240-290 nm που αφορά το A- δακτύλιο (Merken και Beecher, 2000). Πιο συγκεκριμένα, αν η ταινία I είναι μεταξύ 310-350 nm πρόκειται για φλαβόνες, όταν αυτή είναι μεταξύ 350-385 nm για φλαβανόλες, ενώ όταν παρατηρείται μια μικρή κορυφή ή μια ωμοπλάτη μεταξύ 300-330 nm έχουμε να κάνουμε με φλαβανόνες ή υδροξυφλαβονόλες. Όσον αφορά την ταινία II αυτή έχει να κάνει με τους υποκατάστατες στο δακτύλιο, όσοι περισσότεροι

-OH υποκατάστατες υπάρχουν στο δακτύλιο A, τόσο μεγαλύτερο είναι το φαινόμενο της βαθυχρωμίας (Sakakibara *et al.*, 2003).

Ωστόσο, επειδή αρκετές κορυφές ήταν αδύνατο να ταυτοποιηθούν, τα δείγματα αναλύθηκαν εκ νέου με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματογράφο μάζας (LC-MS). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3).

Το ροσμαρινικό οξύ βρέθηκε σε όλα τα αφεψημάτα των φυτών της οικογένειας Lamiaceae. Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι η παραπάνω ένωση βρίσκεται σε όλα τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae (Tagashira *et al.*, 1998; Lamaison *et al.*, 1991; Hohmann *et al.*, 1999; Janicsák *et al.*, 1999). Όσον αφορά, το χαμομήλι παρατηρήθηκαν τρεις κυρίαρχες κορυφές με την μια εξ αυτών να ταυτοποιείται ως ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης.

Από τα χρωματογραφήματα παρατηρείται ότι τα αφεψήματα δεν έδωσαν ταυτόσημο φαινολικό προφίλ. Αποτυπώνεται ότι στα υδατικά εκχυλίσματα κυριαρχούν κυρίως πολικά φαινολικά συστατικά, όπως υδροκινναμωνικά και υδροξυβενζοϊκά οξέα και γλυκοζίτες των φλαβονοειδών. Σε αντίστοιχες παρατηρήσεις κατέληξαν και άλλοι ερευνητές μελετώντας υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Lamiaceae (Dorman *et al.*, 2004; Miron *et al.*, 2011). Πρόσφατα οι Zimmermann *et al.*, (2011) ανέφεραν την ύπαρξη λιγότερων πολικών συστατικών όπως καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος σε αφεψήματα φασκόμηλου χρησιμοποιώντας Ultra υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

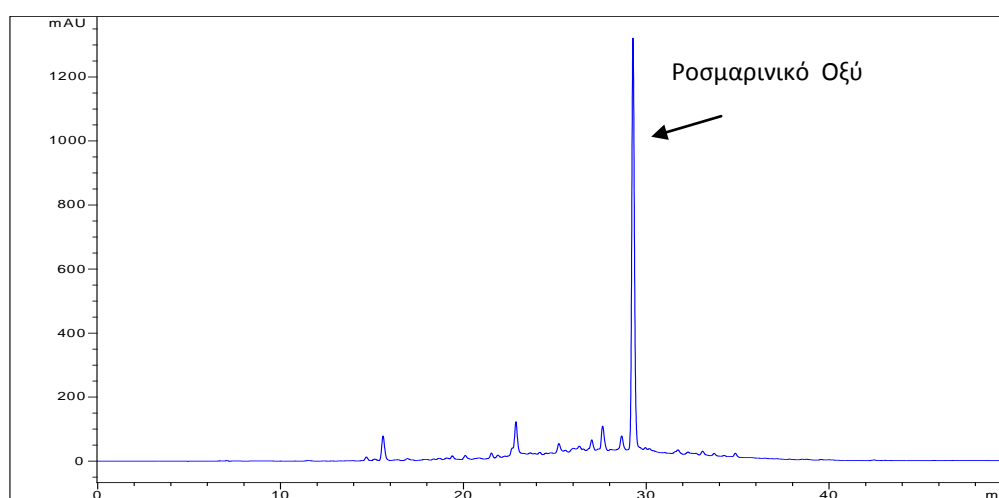


Σχήμα 2.11. Ροσμαρινικό Οξύ

Στο αφέψημα του μελισσόχορτου, το ροσμαρινικό οξύ ήταν το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό (Σχήμα 2.11). Ανιχνεύθηκαν επίσης καφεϊκό οξύ και επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος. Από τα φάσματα MS και UV-Vis, οι υπόλοιπες κορυφές που δεν ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια των πρότυπων ενώσεων, ανήκουν

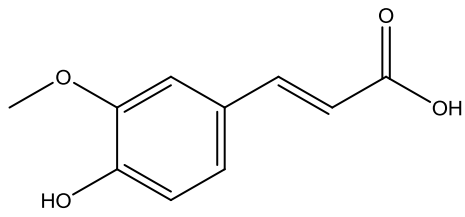


στην ομάδα των φαινολικών οξέων, και κυρίως των υδροξυκιναμικών οξέων. Στο αφέψημα του μελισσόχορτου ανιχνεύθηκαν δυο κορυφές με  $[M-H]^-$  537 και με  $\lambda_{\max}$  στα 328 και 274 nm, οι οποίες αποδίδονται σε ισομερή του σαλβιανολικού οξέος (Liu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2011). Επιπλέον, τα θραύσματα  $m/z$  179, υποδηλώνει ότι αποτελούν παράγωγο του καφεϊκού οξέος (Liu *et al.*, 2007). Πρόσφατα οι Barros *et al.*, (2013), σε μελέτη τεσσάρων φυτικών δειγμάτων μελισσόχορτου αναφέρουν την παρουσία των δυο αυτών ενώσεων στα αντίστοιχα αφεψήματα. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήσανε το ροσμαρινικό οξύ ήταν η κυρίαρχη ένωση.

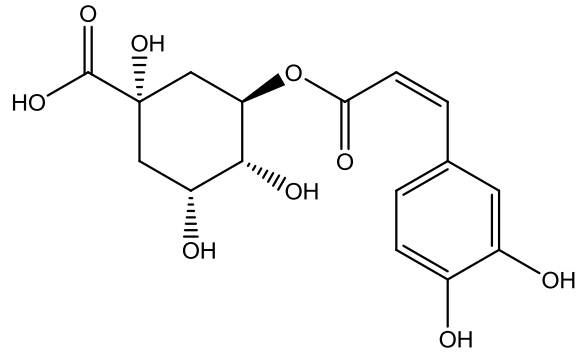


**Σχήμα 2.12.** Χρωματογράφημα αφεψήματος μελισσόχορτου ( $\lambda=330$  nm).

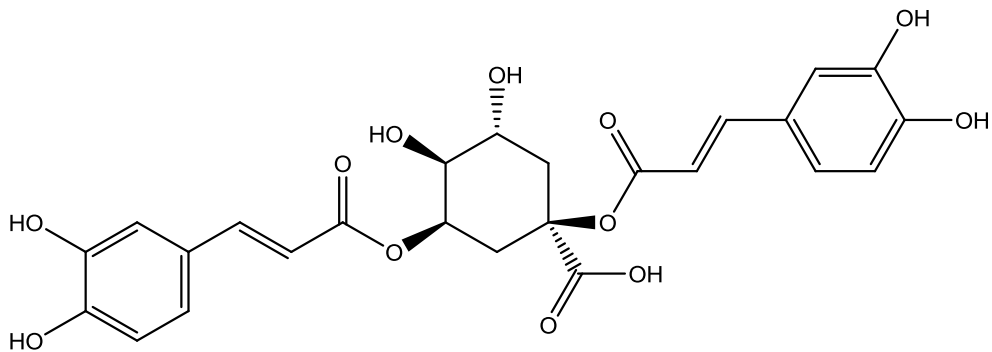
Η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος και υδροξυκιναμικών οξέων και παραγώγων του σε αφέψημα μελισσόχορτου έχει ήδη αναφερθεί, παράλληλα με την παρουσία γλυκοζιτών της λουτεολίνης (Carnat *et al.*, 1998; Fecka και Turek, 2007). Το ροσμαρινικό οξύ ως κύριο συστατικό έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες που έχουν προκύψει από μελέτη του φυτού σε διάφορους διαλύτες (Caniona και Brandstetenova, 2001; Ziakova και Brandsteterova, 2002, 2003; Zgorcka και Glowniak, 2006; Dastmalchi *et al.*, 2008). Επιπλέον, σε μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού έχει ανευρεθεί ποσότητα καφεϊκού οξέος (Proestos *et al.*, 2005; Zgorcka και Glowniak, 2006), φερουλικού οξέος και κατεχίνης (Zgorcka και Glowniak 2006). Σε υδροαλκοολούχα εκχυλίσματα μελισσόχορτου βρέθηκαν επίσης ο 7-O-γλυκοζίτης της εριοδι-



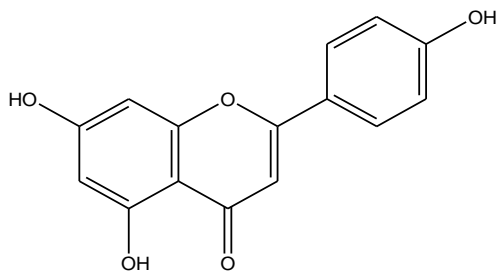
φερουλικό οξύ



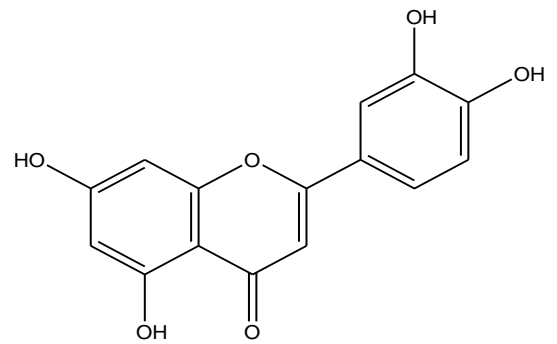
χλωρογενικό οξύ



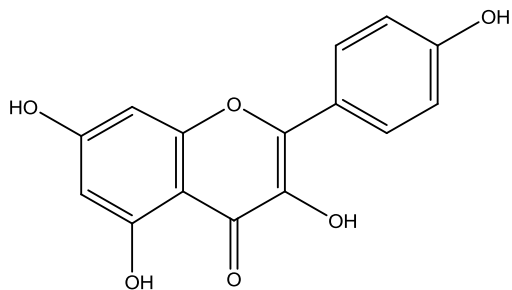
κυναρίνη



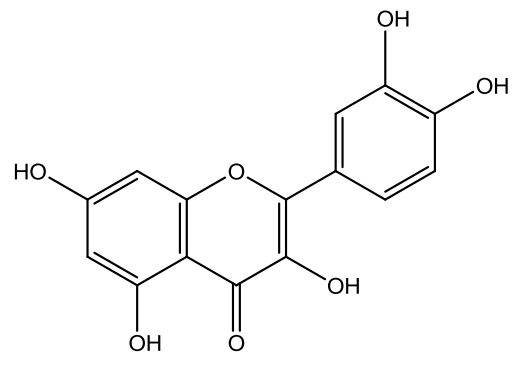
απιγενίνη



λουτεολίνη



καεμφερόλη

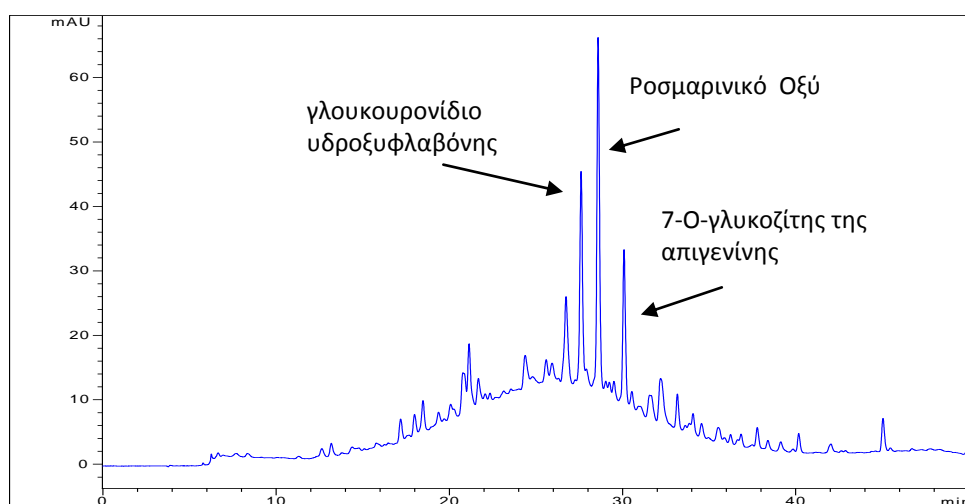


κερκετίνη

Σχήμα 2.13. Δομές προτύπων ενώσεων

κτυόλης, εσπεριδίνη, εσπεριτίνη, ναριγενίνη και ναργινίνη (Dastmalchi *et al.*, 2008).

Στην περίπτωση του δεντρολίβανου (Σχήμα 2.14), το κύριο φαινολικό συστατικό ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από τον 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και την κορυφή στα 29.8 min με  $[M-H]^-$  477, με θραύσμα  $m/z$  301 και  $\lambda_{max}$  344 και 272 nm, που συμφωνεί με τους Zimmermann *et al.*, (2011), η οποία αποδίδεται σε γλουκουρονίδιο υδροξυφλαβόνης. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ, συριγκικό οξύ, σιναπικό οξύ) καθώς και φλαβόνες (απιγενίνη, λουτεολίνη), φλαβανόλες (γαλλοκατεχίνη) και φλαβονόλες (καεμφερόλη). Οι υπόλοιπες κορυφές αποδόθηκαν κυρίως υδροξυκιναμικά οξέα και γλυκοζίτες φλαβονών. Δυο κορυφές είχαν το ίδιο  $[M-H]^-$  461, αλλά διαφορετικά φάσματα UV-Vis και χρόνους συγκράτησης, έτσι η μεν η πρώτη αποδίδεται σε γλουκουρονίδιο φλαβόνης (Hossain *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2011; Kaliora *et al.*, 2014) και πιο συγκεκριμένα σε αυτό της λουτεολίνης, ενώ η δεύτερη σε γλυκοζίτη μεθυλοφλαβόνης και ίσως στην ομοπλανταγκενίνη, της οποίας τα μέγιστα του φάσματος συμφωνούν απόλυτα με τους Cuvelier *et al.*, (1996) και Kaliora *et al.*, (2014). Σε αντίθεση με το αφέψημα του μελισσόχορτου, δεν ταυτοποιήθηκαν διμερή παράγωγα του σαλβιανολικού οξέος, αλλά τριμερές παράγωγο του σαλβιανολικού οξέος με  $[M-H]^-$  717 (Liu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2011).



Σχήμα 2.14. Χρωματογράφημα αφεψήματος δεντρολίβανου ( $\lambda=330$  nm).

Πίνακας 2.3. Φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα αφεψήματα μέσω LC-MS.

Min	Μελισσόχορτο	Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι	$\lambda_{\max}$	[M-H]- m/z	Άλλα θραύσματα	Συστατικό
9.8	○	○	○	○	●	269	169		Γαλλικό οξύ <sup>1</sup>
15.1	○	○	○	○	●	328	353	179	εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
15.7	●	○	○	○	●	328	353	179	Χλωρογενικό οξύ (5-εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος) <sup>1</sup>
16.7	○	○	○	●		281	289		Κατεχίνη <sup>1</sup>
17.6	○	●	○	●	○		515		Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
18.9	○	●	○	●	●	240, 326	353	191	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
19.1	●	○	○	○	○	270	457		Επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος <sup>1</sup>
20.0	○	●	○	●	●	243, 326	353	191	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
20.2	●	●	○	●	●		515		Κυναρίνη (1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος) <sup>1</sup>
21.1	○	●	●	○	○	280	305		Γαλλοκατεχίνη <sup>1</sup>
22.0	○	●	○	●	○		565	387	Παράγωγο καφεϊκού οξέος
22.4	○	○	○	○	●		355	711, 193	Γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος
22.5	○	●	●	●	○		565	387, 179	Παράγωγο καφεϊκού οξέος
23.0	●	●	○	●	○	243, 297, 324	179		Καφεϊκό οξύ <sup>1</sup>
24.1	●	○	●	○	○	274, 323	537		Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος

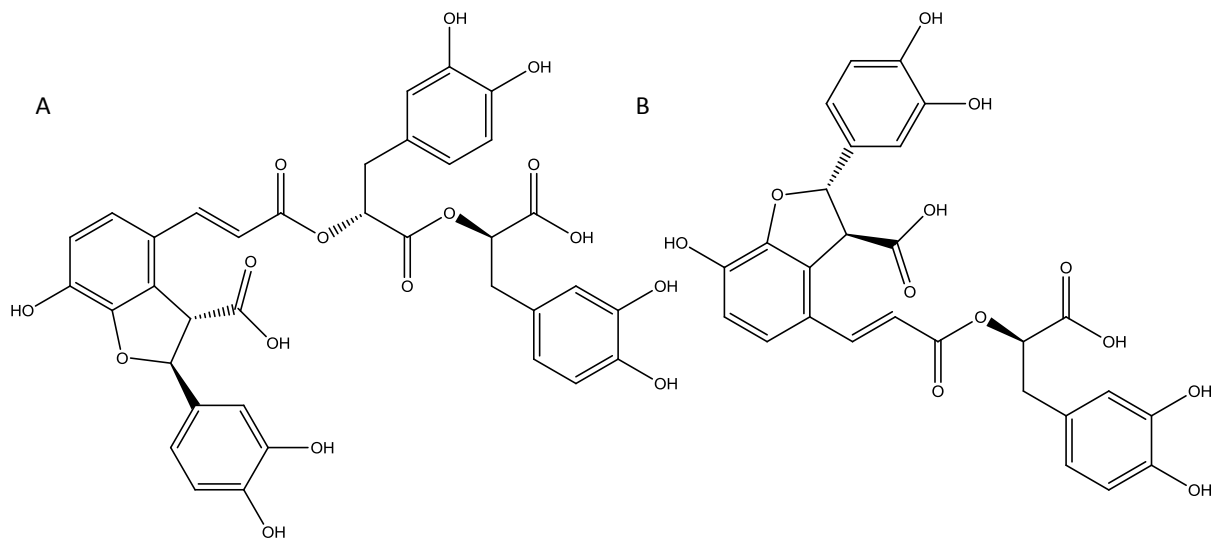
Min	Μελισσόχορτο	Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι	$\lambda_{\max}$	[M-H]- m/z	Άλλα θραύσματα	Συστατικό
24.3	○	○	●	○	○	254, 266, 346		431, 285	Γλυκοζίτης καεμφερόλης
24.5	●	○	●	○	○	250, 278, 328	537		Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
24.8	○	○	●	●	○	255, 265, 349	637	285	Διγλυκουρονίδιο της λουτεολίνης
26.6	○	●	○	○	○	250, 330	431		Γλυκοζίτης της απιγενίνης
26.8	○	○	●	○	○	250, 267, 338	415		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
27.5	○	○	●	○	○	267, 337	621	269	Διγλυκουρονίδιο της απιγενίνης
27.6	○	○	○	○	●		515	193, 161	Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
27.9	○	○	●	○	○	250, 271, 337	415		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
28.1	○	○	○	●	○	253, 266, 340	593		Γλυκοζίτης φλαβόνης
28.2	○	○	○	○	●		355	711	Φερουλιωμένη γλυκόζη
28.9	○	●	●	●	○	253, 348	461		Γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης
29.0	●	○	○	○	○	246, 286, 319	565		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
29.3	○	●	●	●	○	255, 350	447	285	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης <sup>1</sup>
29.8	○	●	○	○	○	272, 344	477	301	Γλυκουρονίδιο υδροξυφλαβόνης
30.4	○	○	○	○	●	250, 327	515		Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
30.5	●	○	●	●	○		359		Ισομερές του ροσμαρινικού οξέος
31.2	●	●	●	●	○		359		Ροσμαρινικό οξύ <sup>1</sup>

Min	Μελισσόχορτο	Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι	$\lambda_{\max}$	[M-H]- m/z	Άλλα θραύσματα	Συστατικό
31.7	○	●	●	●	●		431	269	7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης <sup>1</sup>
32.5	○	●	○	○	○	254, 276, 333	461	299, 269	Γλυκοζίτης μεθυλοφλαβόνης
33.8	●	○	○	○	○		723	359	Παράγωγο του ροσμαρινικού οξέος
33.9	○	○	○	○	●	244, 293, 328	193		Φερουλικό οξύ
34.6	○	●	●	○	○	254, 272, 328	537	493, 197	Λιθοσπερμικό οξύ
34.9	○	○	○	○	●		473	431, 269	Ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης
35.7	○	●	●	○	○	254, 272, 331	717	519, 167	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
37.1	○	○	○	○	●		431	269	Γλυκοζίτης απιγενίνης
38.2	○	●	●	●	○		285		Λουτεολίνη <sup>1</sup>
38.3	○	○	○	○	●	265, 333	473	431, 269	Ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης
40.7	○	●	●	○	●	267, 341	269		Απιγενίνη <sup>1</sup>
41.0	○	●	○	○	○	265, 373	285		Καεμφερόλη <sup>1</sup>
43.5	○	○	●	●	○	273, 335	313		Μεθυλοφλαβόνη (Κιρσιμαριτίνη)
45.0	○	○	●	●	○	273, 335	343		Μεθυλοφλαβόνη

Όπου ● παρουσία συστατικού, ○ απουσία συστατικού

<sup>1</sup> ταυτοποίηση με βάση πρότυπη ένωση

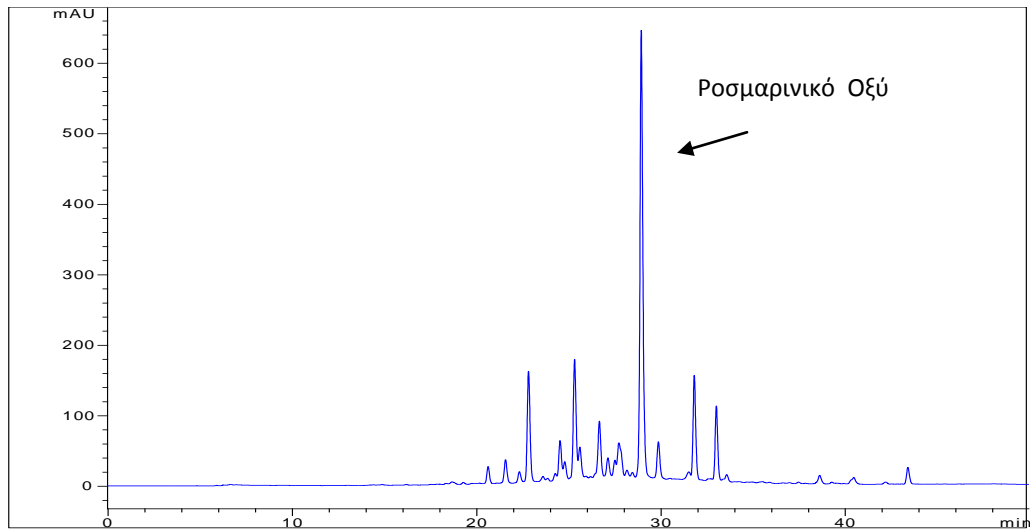
Επίσης, για την κορυφή με  $[M-H]^-$  537 στα 35.7 min, παρατηρείται μεγαλύτερη αφθονία του θραύσματος  $m/z$  493 και όχι του  $m/z$  537, αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κορυφή αυτή δεν είναι κάποιο ισομερές/παράγωγο του σαλβιανολικού οξέος, αλλά ότι πρόκειται για το λιθοσπερμικό οξύ (Hu *et al.*, 2005).



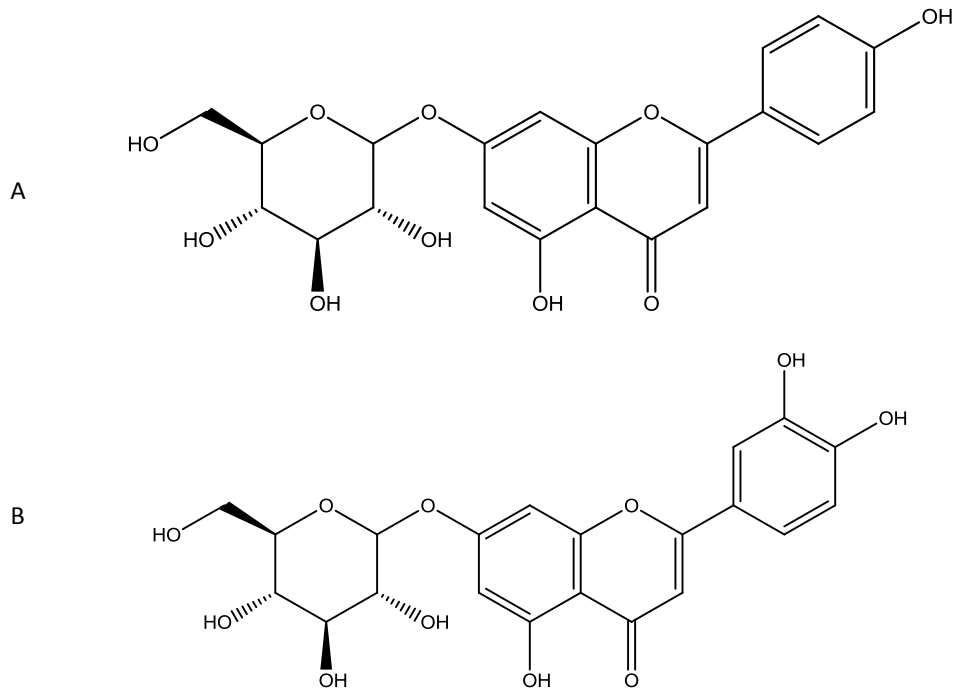
Σχήμα 2.15. Α) σαλβιανολικό οξύ Β

Β) λιθοσπερμικό οξύ

Έρευνες σε υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου έδειξαν την ύπαρξη ροσμαρινικού οξέος ως κυρίαρχου συστατικού, καθώς και την ύπαρξη κυρίως φλαβονών, λουτεολίνης και ισομερών απιγενίνης (Debersac *et al.*, 2001). Πρόσφατα, στο αφέψημα του δεντρολίβανου προσδιορίστηκαν κυρίως υδροξυβενζοϊκά οξέα (βαννιλικό, πρωτοκατεχικό, συριγκικό), υδροξυκινναμωνικά οξέα (καφεϊκό, κινναμικό, φερουλικό, σιναπικό, π-κουμαρικό, ροσμαρινικό), φλαβανόλες (κατεχίνη και επικατεχίνη), φλαβόνες (γλυκοζίτες της λουτεολίνης, απιγενινική και ισομερή της), με κυρίαρχο ωστόσο συστατικό το ροσμαρινικό οξύ (Kaliora *et al.*, 2014). Στην ίδια μελέτη, δεν ανιχνεύθηκαν παράγωγα του σαλβιανολικού οξέος. Σε οργανικά εκχυλίσματα με υψηλό ποσοστό κυρίως μεθανόλης ή αιθανόλης ταυτοποιούνται επιπλέον και φαινολικά διτερπένια όπως καρνοσόλη, καρνοσικό οξύ, ροσμανόλη, επιροσμανόλη, παράγωγα και ισομερή αυτών (Bicchi *et al.*, 2000; Wellwood και Cole; 2004; Troncoso *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2010).



Σχήμα 2.16. Χρωματογράφημα αφεψήματος δίκταμου ( $\lambda=330$  nm).



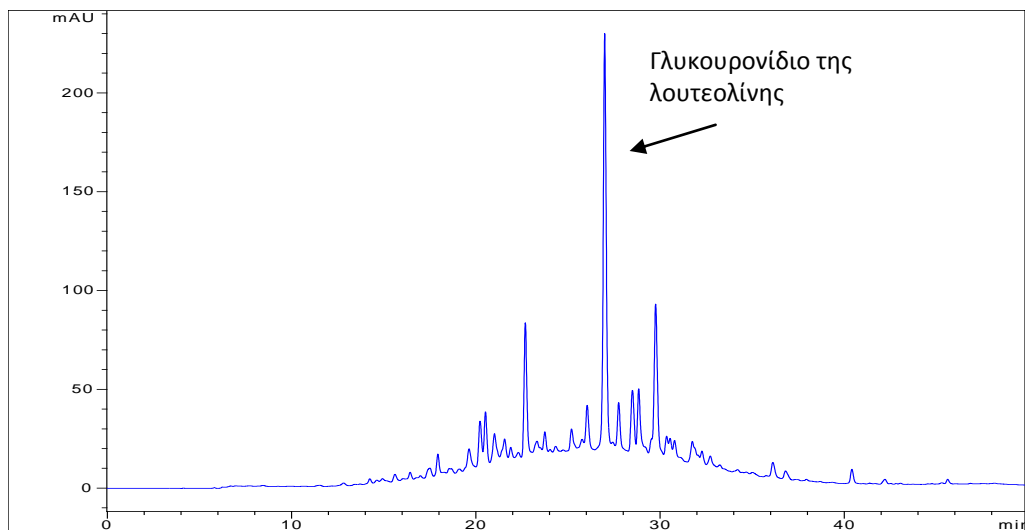
Σχήμα 2.17. Α) 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης Β) 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης



Το ροσμαρινικό οξύ ήταν επίσης η κύρια φαινολική ένωση που ταυτοποιήθηκε στο αφέψημα του δίκταμου (Σχήμα 2.16). Επιπλέον, βρέθηκαν λουτεολίνη και απιγενίνη και οι αντίστοιχοι 7-Ο-γλυκοζίτες, γαλλοκατεχίνη καθώς και αρκετά υδροξυκιναμωνικά οξέα και άλλα φλαβονοειδή κυρίως γλυκοζιδιωμένες μορφές. Οι κορυφές με  $[M-H]^-$  537 στα 24.1 και 24.5 min αποδόθηκαν σε ισομερή/παράγωγα του σαλβιανολικού οξέος, ενώ η κορυφή στα 34.6 min στο λιθοσπερμικό οξύ λόγω της αφθονίας του  $m/z$  493 (Hu *et al.*, 2005). Η κορυφή στα 24.6 min με  $[M-H]^-$  637 και  $m/z$  285 αποδίδεται σε διγλυκορουνίδιο της λουτεολίνης, ενώ αυτή στα 27.5 min με  $[M-H]^-$  621 και  $m/z$  269 σε διγλυκουρονίδιο της απιγενίνης (Zimmermann *et al.*, 2011). Στα 43.5 και 45.0 min, δυο μικρές κορυφές εμφανίζονται με  $[M-H]^-$  313 και 343, αντίστοιχα, οι οποίες από το φάσμα UV-Vis και το χρόνο συγκράτησης καταλήγουμε ότι πρόκειται για μεθυλοφλαβόνες, με την πρώτη να αποδίδεται στη κισιμαριτίνη. Οι Kaliora *et al.*, (2014), αναφέρουν την παρουσία κισιμαριτίνη και μεθυλοφλαβόνης με αντίστοιχα MW, χρησιμοποιώντας ESI<sup>+</sup>. Στην ίδια έρευνα, το ροσμαρινικό οξύ ήταν το κυρίαρχο φαινολικό οξύ, ενώ υψηλά ποσοστά των δυο υπομονάδων του, καφεϊκού και 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικού οξέος καταγράφηκαν επίσης. Η παρουσία φλαβονοειδών σε άγλυκες και γλυκοζιδιωμένες μορφές καθώς και λιθοσπερμικού οξέος και παραγώγων του αναφέρεται. Οι Atoui *et al.*, (2005) στην ανάλυση του αφεψήματος μετά από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα δεν ανέφεραν την ύπαρξη ροσμαρινικού οξέος, αλλά κυρίως παράγωγων υδροκινναμικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες και φλαβόνολες. Οι Chatzourouli *et al.*, (2010), σε διαδοχική εκχύλιση μεθανολικού εκχυλίσματος δίκταμου με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας ανέφεραν την ύπαρξη ροσμαρινικού οξέος, απιγενίνης, καεμφερόλης, ταξιφολίνης, ναριγενίνης, κερκετίνης, εριοδικτυόλης, καφεϊκού οξέος, καθώς και την παρουσία σαλβιανολικού οξέος P με  $[M-H]^-$  537 στο υδατικό υπόλειμμα. Οι Proestos *et al.*, (2006α,β), σε υδροαλκοολούχα εκχυλίσματα (62,5% υδατική μεθανόλη) μετά από όξινη υδρόλυση ανιχνεύουν σημαντικές ποσότητες φερουλικού, καφεϊκού και υδροξυκαφεϊκού οξέος, ενώ από τα φλαβονοειδή κυρίως κατεχίνη.

Στο φασκόμηλο ταυτοποιήθηκαν με βάση τις πρότυπες ενώσεις οι παρακάτω: ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της

απιγενίνης, κατεχίνη, κυναρίνη (Σχήμα 2.18). Παράλληλα, τα μη ταυτοποιημένα φαινολικά συστατικά ήταν κυρίως υδροξυκιναμικά οξέα και γλυκοζίτες φλαβονών. Στα 15.6 min η κορυφή με  $[M-H]^-$  515 και  $\lambda_{\max}$  324 nm αποδίδεται σε διεστέρα καφεϊκού-κινικού οξέος (Clifford *et al.*, 2003; Gouveia *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2013). Σύμφωνα με την ιεραρχική σειρά έκλουσης που έχουν προτείνει οι Clifford *et al.*, (2003, 2008), ο συγκεκριμένος διεστέρας μπορεί να αποδοθεί σε 1,3-διεστέρα καφεϊκού-κινικού οξέος. Η κορυφή στα 24.6 min με  $[M-H]^-$  637 και  $m/z$  285 αποδί-



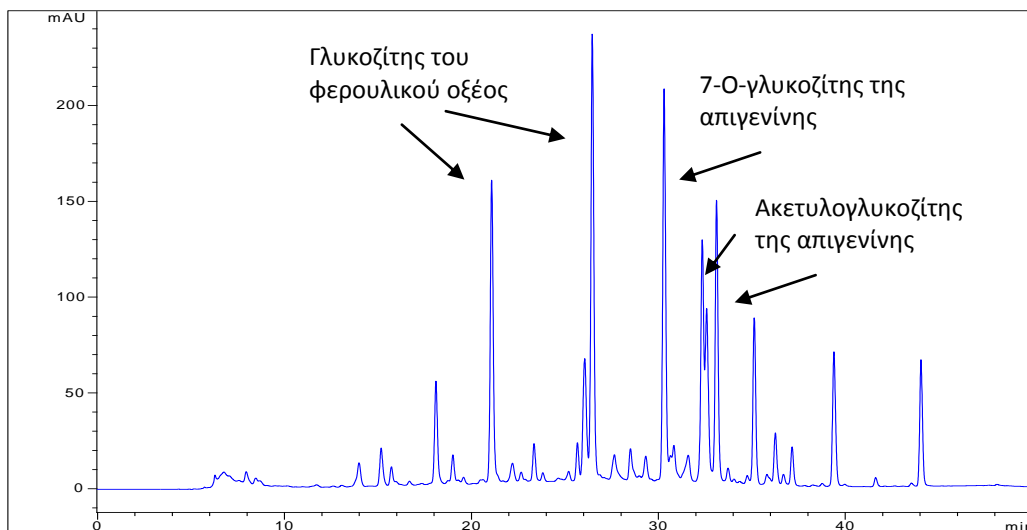
Σχήμα 2.18. Χρωματογράφημα αφεψήματος φασκόμηλου ( $\lambda=330$  nm).

δεται σε διγλυκουρονίδιο της λουτεολίνης, ενώ αυτή στα 28.9 min με  $[M-H]^-$  461, σε γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης, οι οποίες έχουν αναφερθεί σε αφεψήματα φασκόμηλου (Zimmermann *et al.*, 2011). Αντίθετα, με τα αφεψήματα των άλλων τριών φυτών που εξετάστηκαν, στην περίπτωση του φασκόμηλου, το κύριο φαινολικό συστατικό δεν ήταν το ροσμαρινικό οξύ, αλλά το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης. Υψηλά ποσοστά γλυκοζιδιωμένων μορφών της λουτεολίνης και ειδικότερα του 7-O-γλυκοζίτη (Fecka και Turek, 2007) και του 7-O-γλυκουρονιδίου (Zimmermann *et al.*, 2011) έχουν ήδη ανευρεθεί σε αφεψήματα. Το ροσμαρινικό οξύ έχει αναφερθεί ότι είναι το πιο πλούσιο φαινολικό οξύ σε διάφορα είδη *Salvia* (Cuvelier *et al.*, 1994; Lu και Foo, 1999), ενώ από τα φλαβονοειδή η λουτεολίνη και η απιγενίνη, με τους αντίστοιχους 7-O-γλυκοζίτες και 7-O-γλυκουρονίδια (Lu και Foo, 2002).

Όσον αφορά το χαμομήλι, το χρωματογραφικό προφίλ ήταν πολύ διαφορετικό από αυτά των φυτών της οικογένειας Lamiaceae (Σχήμα 2.19). Ταυτοποιήθηκαν γαλλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κυναρίνη, απιγενίνη και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της. Επιπλέον, δυο κορυφές είχαν  $[M-H]^-$  353,  $\lambda_{max}$  324 nm ίδιο με αυτό του χλωρογενικού οξέος και αποδίδονται σε ισομερή του χλωρογενικού οξέος (Clifford *et al.*, 2003; Gouveia *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2013a,b). Πέρα από τους μονοεστέρες του καφεϊκού-κινικού οξέος, τρεις κορυφές είχαν  $[M-H]^-$  515, στα 20.2, 27.5 και 30.4 min. Η μεν πρώτη κορυφή ταυτοποιήθηκε με βάση τα φάσματα MS, UV-Vis και το χρόνο συγκράτησης με την πρότυπη ένωση, κυναρίνη (1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος). Οι άλλες σύμφωνα με το φάσμα UV-Vis και τα επιμέρους θραύσματα στα  $m/z$  353, 179 χαρακτηρίζονται ως διεστέρες καφεϊκού-κινικού οξέος. Την ύπαρξη των παραπάνω εστέρων σε φυτά της οικογένειας *Asteraceae* έχουν αναφέρει αρκετοί ερευνητές (Carnat *et al.*, 2004; Atoui *et al.*, 2005; Gouveia *et al.*, 2011; Miron *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2013a,b). Δυο κορυφές επιπλέον είχαν  $[M-H]^-$  355 και  $m/z$  193, που υποδηλώνει την παρουσία φερουλικού οξέος αλλά διαφορετικό φάσμα UV-Vis. Η κορυφή στα 22.4 min είχε  $\lambda_{max}$  στα 238 και 309 nm, ενώ η δεύτερη στα 23.8, 294, 319 nm. Οι Mulinacci *et al.*, (2000) αναφέρουν την ύπαρξη δυο ενώσεων με MW 356, και με παρόμοια φάσματα UV-Vis, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως παράγωγα του φερουλικού οξέος. Αντίστοιχα και οι Atoui *et al.*, (2005) σε αφέψημα χαμομηλιού αναφέρουν την ύπαρξη αυτών των ενώσεων και τις χαρακτηρίζουν ως γλυκοζίτες του φερουλικού οξέος. Ωστόσο, οι πρώτοι μελετώντας το φάσμα UV-Vis, κατέληξαν ότι η μεν πρώτη κορυφή είναι γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος, όπου ο γλυκοζιτικός δεσμός δημιουργείται μέσω ενός -OH του αρωματικού δακτυλίου του οξέος και της γλυκόζης, ενώ η δεύτερη αντιστοιχεί στον εστέρα του φερουλικού οξέος με τη γλυκόζη (φερουλικός γλυκοζυλεστέρας). Πρόσφατα, σε άλλη έρευνα στο αφέψημα του χαμομηλιού, δυο κορυφές με MW 356 και αντίστοιχα φάσματα UV-Vis αποδόθηκαν η μεν, με  $\lambda_{max}$  στα 238 και 309 nm, σε γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος, η δε με  $\lambda_{max}$  238, 294, 319 nm σε γλυκόζη στην οποία έχει εστεροποιηθεί ένα μόριο φερουλικού οξέος ως φερουλικός γλυκοζυλεστέρας (Kogiannou *et al.*, 2013).

Τα φλαβονοειδή που ανιχνεύθηκαν στο αφέψημα του χαμομηλιού ήταν απιγενίνη και γλυκοζίτες αυτής. Τρεις κορυφές με  $[M-H]^-$  473 και  $m/z$  431, 269 και  $\lambda_{max}$

266 και 335 nm αποδίδονται σε γλυκοζίτες της απιγενίνης. Ωστόσο οι 43 επιπλέον μονάδες στο σύνθετες  $[M-H]^-$  431 των γλυκοζιτών με υπομονάδα γλυκόζης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα της ύπαρξης ακετυλογλυκόζης. Η παρουσία τους έχει επίσης αναφερθεί σε αφέψημα χαμομηλιού άλλα και σε άλλα φυτά της οικογένειας *Asteraceae* (Švehlíková *et al.*, 2004; Atoui *et al.*, 2005; Lin και Harnly, 2010). Στην παρούσα μελέτη, το προφίλ των φλαβονοειδών στο αφέψημα του χαμομηλιού χαρακτηρίζεται αποκλειστικά από την παρουσία της απιγενίνης και παραγώγων της, ωστόσο σε άλλες έρευνες το αφέψημα αυτό εμπλουτίζεται από γλυκοζίτες της λουτεολίνης, κερκετίνης, μυρισετίνης, και από φλαβονοειδή όπως χρυσίνη, επικατεχίνη, κατεχίνη, γκενιστεΐνη, καεμφερόλη (Carnat *et al.*, 2004; Atoui *et al.*, 2005; Kogiannou *et al.*, 2013).



**Σχήμα 2.19.** Χρωματογράφημα αφεψήματος χαμομηλιού ( $\lambda=330$  nm).

### 2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη χρήση εξωτερικών προτύπων. Επειδή, δεν ήταν εφικτή η προμήθεια όλων των πρότυπων ενώσεων για την ποσοτικοποίηση της κάθε ουσίας, τα φλαβονοειδή, άγλυκα και γλυκοζιδιωμένα, ποσοτικοποιήθηκαν ως προς τον 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος ως προς το ροσμαρινικό οξύ. Από την ανάλυση διαφόρων συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων των δυο παραπάνω ενώσεων, δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς ως προς τα αντίστοιχα εμβαδά.

Για την περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς σε περιοχές συγκεντρώσεων 1,5-120 ppm. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον παραπάνω ποσοτικό προσδιορισμό είναι η ακόλουθη:

$$y=133,37x+41,23$$

Αντίστοιχα, το εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης κυμάνθηκε από 1-80 ppm και η εξίσωση είναι:

$$y=110,35x+21,13$$

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του καφεϊκού οξέος, ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων τους, καθώς και των φλαβονοειδών παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Από τα αποτελέσματα, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ ανάμεσα στα αφέψημα που προήλθαν από τα φυτά της οικογένειας Lamiales την κατέχει το μελισσόχορτο (14.923,9 μg/g φ.υ.) και τη χαμηλότερη το δεντρολίβανο (86,2 μg/g φ.υ.) (Πίνακας 2.4 και 2.7). Το αφέψημα του μελισσόχορτου ήταν το πιο πλούσιο σε συνολικά φαινολικά συστατικά που προσδιορίστηκαν μέσω της HPLC-DAD, ενώ το δεντρολίβανο το πιο φτωχό, το οποίο συμφωνεί και με τα αποτελέσματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Το αφέψημα του δίκταμου ήταν το δεύτερο πιο πλούσιο αφέψημα τόσο σε ροσμαρινικό οξύ όσο και στο σύνολο των καφεϊκών παραγώγων που ποσοτικοποιήθηκαν μέσω της HPLC, ακολουθούμενο από αυτό του φασκόμηλου. Στο τελευταίο παρατηρείται υπεροχή των φλαβονοειδών σε σχέση με τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος. Η σειρά κατάταξης κατά φθίνουσα σειρά είναι: μελισσόχορτο>

δίκταμο> φασκόμηλο > δεντρολίβανο, που αντιστοιχεί και με τη σειρά κατάταξης της παραγράφου 1.1.

Οι Fecka και Turek (2007) σε 29 αφεψήματα μελισσόχορτου αναφέρουν ότι η περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ κυμαίνεται από 5,2-32,6 mg/g φ.υ., ενώ τα ολικά παράγωγα του καφεϊκού οξέος, συμπεριλαμβανόμενου του ροσμαρινικού οξέος, ήταν μεταξύ 9,3-52,9 mg/g φ.υ. Η παρουσία φλαβονοειδών ήταν πολύ περιορισμένη, που επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη, όπου η παρουσία φλαβονοειδών στο αφέψημα του μελισσόχορτου είναι σχεδόν ανύπαρκτη. Στην εργασία των Barros *et al.*, (2013), τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν μόλις το 4-8% των ολικών φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων μελισσόχορτου. Η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος κυμαίνεται από 15,46 έως 55,68 mg/g εκχυλίσματος. Αν αντιστοιχίσουμε τα δικά μας αποτελέσματα σε mg/g εκχυλίσματος, η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος βρίσκεται μέσα στο παραπάνω εύρος συγκεντρώσεων (47,2 mg/g εκχυλίσματος).

**Πίνακας 2.4.** Συγκέντρωση ( $\pm$  τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του μελισσόχορτου εκφρασμένη σε mg/g φ.υ.

Min	μg/g φ.υ.	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Συστατικό
15.7	1.017,1 $\pm$ 81,6	353	Χλωρογενικό οξύ (5-εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος)
20.2	239,4 $\pm$ 17,8	515	Κυναρίνη (1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος)
23.0	1.675,7 $\pm$ 40,3	179	Καφεϊκό οξύ
24.1	506,9 $\pm$ 65,5	537	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
24.5	472,8 $\pm$ 20,3	537	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
27.4	506,9 $\pm$ 65,5	719	Παράγωγο του ροσμαρινικού οξέος
29.0	1021,4 $\pm$ 64,1	565	Παράγωγο καφεϊκού οξέος
30.5	652,0 $\pm$ 59,3	359	Ισομερές του ροσμαρινικού οξέος
31.2	14.923,9 $\pm$ 750,9	359	Ροσμαρινικό οξύ
33.8	216,5 $\pm$ 73,3	723	Παράγωγο του ροσμαρινικού οξέος
	20.725,7		Σύνολο καφεϊκών παραγώγων

**Πίνακας 2.5.** Συγκέντρωση ( $\pm$  τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του δίκταμου εκφρασμένη σε  $\mu\text{g/g}$  φ.υ.

Min	$\mu\text{g/g}$ φ.υ.	[M-H]- m/z	Συστατικό
22.5	210,5 $\pm$ 22,0		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
24.1	303,6 $\pm$ 4,2	537	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
24.5	159,6 $\pm$ 30,0	537	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
24.8	1.669,7 $\pm$ 40,3	637	Διγλυκουρονίδιο της λουτεολίνης
26.8	606,8 $\pm$ 23,3	415	Παράγωγο καφεϊκού οξέος
27.5	1.872,5 $\pm$ 67,7	621	Διγλυκουρονίδιο της απιγενίνης
27.9	479,3 $\pm$ 72,9	415	Παράγωγο καφεϊκού οξέος
28.9	917,3 $\pm$ 38,5	461	Γλυκουρονίδιο φλαβόνης
29.3	927,9 $\pm$ 8,8	447	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης
30.5	83,2 $\pm$ 24,2	359	Ισομερές του ροσμαρινικού οξέος
31.2	5.780,2 $\pm$ 21,7	359	Ροσμαρινικό οξύ
31.7	592,2 $\pm$ 17,4	431	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης
34.6	1.268,0 $\pm$ 44,4	537	Λιθοσπερμικό οξύ
35.7	873,6 $\pm$ 0,4	717	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
38.2	15,9 $\pm$ 1,8	285	Λουτεολίνη
40.7	162,8 $\pm$ 41,0	269	Απιγενίνη
43.5	168,0 $\pm$ 18,6	313	Μεθυλοφλαβόνη (Κιρσιμαριτίνη)
45.0	38,0 $\pm$ 2,9	343	Μεθυλοφλαβόνη
	8.878,8		Σύνολο καφεϊκών παραγώγων
	7.976,3		Σύνολο φλαβονοειδών

Στην εργασία των Fecka και Turek (2007), όσον αφορά 26 αφεψήματα φασκόμηλου, η παρουσία 7-O-γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 4,0-10,6  $\text{mg/g}$  φ.υ και αυτή του ροσμαρινικού οξέος 2,9-22,1  $\text{mg/g}$  φ.υ., ενώ σε κάποια από αυτά τα δείγματα το γλυκουρονίδιο ήταν το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό όπως στην παρούσα εργασία. Άλλη έρευνα σε 16 εμπορικά σκευάσματα αφεψήματος φασκόμηλου, το 7-O-γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης και το ροσμαρινικό οξύ ήταν τα δυο κύρια συστατικά και οι τιμές κυμαίνονταν από 40,4-

107,8 mg/L και από 30,5-295,7 mg/L, αντίστοιχα. Επίσης, βρέθηκαν και σημαντικές ποσότητες του διγλυκορουνίδιου της λουτεολίνης (Zimmermann *et al.*, 2011).

Σε πιο πρόσφατη εργασία, για τα αφεψήματα αρωματικών φυτών, μια κούπα αφεψήματος φασκόμηλου είχε 8.082,7 μg ροσμαρινικού οξέος και 262,8 μg καφεϊκού οξέος, ενώ η κούπα δίκταμου 7.244 και 67.8 μg, αντίστοιχα. Το αφέψημα του δεντρολίβανου και σε αυτή την εργασία παρουσίασε τις μικρότερες τιμές φαινολικών συστατικών, με μια κούπα να περιέχει μόλις το 10% ροσμαρινικού οξέος της αντίστοιχης του δίκταμου (Kaliora *et al.*, 2014). Μελετώντας υδροαλκοολικά εκχυλίσματα δίκταμου, οι Proestos *et al.*, (2006a,b) δεν αναφέρουν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος, αλλά κυρίως καφεϊκού οξέος.

**Πίνακας 2.6.** Συγκέντρωση ( $\pm$  τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του φασκόμηλου εκφρασμένη σε μg/g φ.υ.

Min	μg/g φ.υ.	[M-H]- m/z	Συστατικό
17.6	58,6 $\pm$ 1,2	515	Διεστέρας καφεϊκού- κινικού οξέος
20.0	89,3 $\pm$ 6,1	353	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
20.2	153,5 $\pm$ 6,1	515	Κυναρίνη (1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος)
22.0	152,3 $\pm$ 10,8		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
22.5	78,8 $\pm$ 22,7	565	Παράγωγο καφεϊκού οξέος
23.0	77,3 $\pm$ 16,2	179	Καφεϊκό οξύ
24.8	508,6 $\pm$ 17,3	637	Διγλυκορουνίδιο της λουτεολίνης
28.1	170,7 $\pm$ 11,0	593	Γλυκοζίτης φλαβόνης
28.9	1.699,2 $\pm$ 60,6	461	Γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης
29.3	152,7 $\pm$ 17,1	447	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης
30.5	218,8 $\pm$ 0,8	359	Ισομερές του ροσμαρινικού οξέος
31.2	221,2 $\pm$ 10,8	359	Ροσμαρινικό οξύ
31.7	666,3 $\pm$ 56,6	431	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης
38.2	69,7 $\pm$ 4,2	285	Λουτεολίνη
40.7	27,0 $\pm$ 11,2	269	Απιγενίνη
43.5	54,1 $\pm$ 3,7	313	Μεθυλοφλαβόνη (Κιρσιμαριτίνη)
45.0	20,6 $\pm$ 3,6	343	Μεθυλοφλαβόνη
	1.260,9		Σύνολο καφεϊκών παραγώγων
	3.299,5		Σύνολο φλαβονοειδών



**Πίνακας 2.7.** Συγκέντρωση ( $\pm$  τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του δεντρολίβανου εκφρασμένη σε  $\mu\text{g/g}$  φ.υ.

Min	$\mu\text{g/g}$ φ.υ.	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Συστατικό
17.6	5,9 $\pm$ 1,4	515	Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
18.9	7,4 $\pm$ 2,0	353	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
20.0	6,4 $\pm$ 1,6	353	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
20.2	9,3 $\pm$ 5,0	515	Κυναρίνη (1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος)
22.0	13,2 $\pm$ 6,0		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
22.5	22,2 $\pm$ 4,5		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
23.0	11,8 $\pm$ 3,1	179	Καφεϊκό οξύ
26.6	4,7 $\pm$ 1,0	431	Γλυκοζίτης της απιγενίνης
28.9	31,7 $\pm$ 2,7	461	Γλυκουρονίδιο φλαβόνης
29.3	6,0 $\pm$ 0,8	447	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης
29.8	62,3 $\pm$ 2,8	477	Γλυκουρονίδιο υδροξυφλαβόνης
31.2	86,2 $\pm$ 9,5	359	Ροσμαρινικό οξύ
31.7	39,7 $\pm$ 3,6	431	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης
32.5	12,2 $\pm$ 3,1	461	Γλυκοζίτης μεθυλοφλαβόνης
34.6	9,2 $\pm$ 1,3	537	Λιθοσπερμικό οξύ
35.7	9,0 $\pm$ 2,7	717	Ισομερές του σαλβιανολικού οξέος
36.6	9,0 $\pm$ 1,6		Παράγωγο καφεϊκού οξέος
38.2	6,6 $\pm$ 1,8	285	Λουτεολίνη
40.7	4,0 $\pm$ 1,2	269	Απιγενίνη
41.0	4,5 $\pm$ 0,5	285	Καεμφερόλη
	112,4		Σύνολο καφεϊκών παραγώγων
	136,6		Σύνολο φλαβονοειδών

Οι Zheng και Wang (2001) σε υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου, οι τιμές που αναφέρουν για το ροσμαρινικό οξύ είναι 328 και 1178  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. Συγκρίνοντας άλλα οργανικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου, τα τελευταία παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές ροσμαρινικού οξέος και γενικά φαινολικών συστατικών (Exarchou *et al.*, 2002; Κοζάρ *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2005; Παπαγεωργίου *et al.*, 2008).

Το χαμομήλι παρουσίασε αρκετά υψηλές τιμές καφεϊκών παραγώγων αλλά και φλαβονοειδών, ωστόσο η δομή αυτών ήταν αρκετά διαφορετική από αυτή των αφεψημάτων της οικογένειας *Lamiaceae*. Υψηλές ποσότητες χλωρογενικού οξέος έχουν ανευρεθεί σε αφέψημα χαμομηλιού από την Κρήτη (Kogiannou *et al.*, 2013). Οι

**Πίνακας 2.8.** Συγκέντρωση ( $\pm$  τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του χαμομηλιού εκφρασμένη σε  $\mu\text{g/g}$  φ.υ.

Min	Χαμομήλι	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Συστατικό
15.1	101,6 $\pm$ 8,9	353	εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
15.7	132,1 $\pm$ 6,6	353	Χλωρογενικό οξύ (5-εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος)
17.6	69,6 $\pm$ 1,2	515	Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
18.9	343,8 $\pm$ 22,7	353	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
20.0	108,5 $\pm$ 9,5	353	Ισομερές του χλωρογενικού οξέος
20.2	138,4 $\pm$ 12,5	515	Κυναρίνη (1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος)
22.4	1031,4 $\pm$ 68,1	355	Γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος
27.6	513,4 $\pm$ 37,4	515	Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
28.2	1523,2 $\pm$ 37,4	355	Φερουλιωμένη γλυκόζη
30.4	232,6 $\pm$ 27,3	515	Διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος
31.7	1605,6 $\pm$ 70,3	431	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης
33.9	1396,5 $\pm$ 9,8	193	Φερουλικό οξύ
34.9	1122,9 $\pm$ 40,5	473	Ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης
37.1	637,1 $\pm$ 15,0	431	Γλυκοζίτης απιγενίνης
38.3	217,3 $\pm$ 8,2	473	Ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης
40.7	551,6 $\pm$ 34,2	269	Απιγενίνη
	5358,5		Σύνολο καφεϊκών παραγώγων
	4134,5		Σύνολο φλαβονοειδών

Guimarães *et al.*, (2013b) σε αφεψήματα άγριου χαμομηλιού αναφέρουν τιμή των ισομερών του χλωρογενικού οξέος στα 0,77 g/100 g φ.υ., ενώ τα ισομερή της κυναρίνης ανέρχονται στα 1,16 g/100 g φ.υ. Τα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος καταλαμβάνουν το 1,06% ξηρού βάρους λουλουδιών, ενώ τα φλαβονοειδή το 2,36% σε αφέψημα Ρομανικού χαμομηλιού *Chamaemelum nobile* (Carnat *et al.*, 2004).

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν πρόσφατα για το ίδιο είδος, όπου στο αφέψημα κυρίαρχη ήταν η παρουσία παράγωγων φλαβονών και υδροξυκιναμικών οξέων με 2,18 g/100g και 1,94 g/100g, αντίστοιχα (Guimarães *et al.*, 2013a). Σε μεθανολικά εκχυλίσματα αφεψήματος χαμομηλιού παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις χλωρογενικού οξέος και 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης, με τις τιμές να κυμαίνονται από 11,0-116,0 και 7,3-127,1  $\mu\text{mol/L}$ , αντίστοιχα (Νονάκονά *et al.*, 2010).

Βέβαια, στις παραπάνω συγκρίσεις θα πρέπει να έχουμε υπ' όψιν μας και το διαφορετικό τρόπο και χρόνο εκχύλισης για κάθε φυτικό παρασκεύασμα, αφού η παρασκευή οργανικών εκχυλισμάτων συνεπάγεται μια εξαντλητική εκχύλιση σε συσκευές Soxhlet για 6 ώρες ή απλά μια εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 έως 48 ώρες. Η παραπάνω διαπίστωση είναι γενικός κανόνας και σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν.

Εκτός από τις διαφορές που προκύπτουν λόγω του τρόπου εκχύλισης είναι φυσικό διαφορές να υπάρχουν και λόγω άλλων παραγόντων κυρίως περιβαλλοντικών, καλλιεργητικών αλλά και διαφορών που παρατηρούνται στα διάφορα είδη. Οι Parageorgiou *et al.*, (2008), αναφέρουν ότι μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονοειδών παρατηρούνται σε δεντρολίβανο και φασκόμηλο που έχουν συγκομιστεί την περίοδο της ανθοφορίας, ενώ μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών οξέων παρατηρείται όταν η συγκομιδή έγινε την περίοδο καρποφορίας. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων είναι μεγαλύτερη σε αυτά που συγκομίστηκαν κατά το καλοκαίρι λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας φαινολικών οξέων. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Celiktas *et al.*, (2007) και Jordán *et al.*, (2013), μελετώντας και αυτοί διάφορα δείγματα δεντρολίβανου των οποίων η συγκομιδή έγινε από σε διαφορετικές περιοχές, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυτού και από διαφορετικά μέρη του φυτού. Οι Križman *et al.*, (2007) αναφέρουν ότι η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών είναι δυνατόν να επηρεαστεί από γενετικούς παράγοντες, από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, τις συνθήκες της περιοχής. Η αλληλεπίδραση γονότυπου-συνθηκών ανάπτυξης ασκεί σημαντική επίδραση στη συνολική ανάπτυξη του φυτού αλλά και στην ποσότητα των δευτερογενών μεταβολιτών (Buter *et al.*, 1998). Άλλωστε οι Pichersky και Gang (2000) αναφέρουν ότι η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που εμπλέκει εξελικτικούς μηχανισμούς για τη βελτίωση της άμυνας των

φυτών έναντι προσβολών από έντομα ή παθογόνα, από την επίδραση της ακτινοβολίας, τις συνθήκες stress (ξηρασία, βροχόπτωση, ψύχος, τροφοπενίες θρεπτικών συστατικών).

Η χρωματογραφική ανάλυση των αφεψημάτων δείχνει αρκετές ποσοτικές διαφορές σε όλο το φάσμα των φαινολικών ενώσεων. Πλήθος αναφορών συσχετίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων με την παρουσία φαινολικών συστατικών. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα σχετίζεται με τις οξειδαναγωγικές τους ιδιότητες που τους επιτρέπει να δρουν ως αναγωγικά μέσα, δότες υδρογόνου και δεσμευτές ελευθέρων ριζών (Rice-Evans *et al.*, 1995). Όπως ήδη αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, υπάρχει θετική γραμμική συσχέτιση, τόσο μεταξύ του φαινολικού ολικού περιεχομένου όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και των δυο μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας ( $r_{\text{FOLIN-ABTS}}=0.979$ ;  $r_{\text{FOLIN-DPPH}}=0.971$ ,  $p<0.01$ ).

Στην παρούσα ενότητα, προσπαθούμε να συσχετίσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων με τα ολικά φαινολικά συστατικά, τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, τα φλαβονοειδή και την ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος όπως αυτά προσδιορίστηκαν μέσω της HPLC. Θετική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων και των ολικών φαινολικών συστατικών ( $r_{\text{HPLC-ABTS}}=0.785$ ;  $r_{\text{HPLC-DPPH}}=0.806$ ,  $p<0.01$ ). Όσον αφορά τη συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων με τα επιμέρους φαινολικά συστατικά, και οι τρεις κατηγορίες ενώσεων παρουσιάζουν θετική συσχέτιση, με τις ποσότητες του ροσμαρινικού οξέος και το σύνολο των καφεϊκών παραγώγων να παρουσιάζουν καλύτερη συσχέτιση σε σχέση με τις ποσότητες των φλαβονοειδών. Βέβαια, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι τιμές των φλαβονοειδών αντικατοπτρίζουν τόσο τις άγλυκες δομές όσο και τις γλυκοζιδιωμένες μορφές, πού όπως έχει αναφερθεί αυτά μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των άγλυκων δομών (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Η TEAC της λουτεολίνης, μειώνεται κατά 17% και 37% σε σχέση με τον 4-O-γλυκοζίτη και τον 3,7-O-διγλυκοζίτη, αντίστοιχα (Rice-Evans *et al.*, 1996, 1997). Επιπλέον, η μορφή των φλαβονοειδών επηρεάζει καθοριστικά το αποτέλεσμα, μιας και η παρουσία ενός επιπλέον υδροξυλίου (-OH) στη θέση 3' στο μόριο της λουτεολίνης σε σχέση με το μόριο της απιγενίνης αυξάνει τη τιμή TEAC κατά 45%, ενώ

η παρουσία και ενός επιπλέον υδροξυλίου (-OH) σε θέση 3 στο μόριο της κερκετίνης αυξάνει την τιμή TEAC κατά 125% (Rice-Evans *et al.*, 1996, 1997). Η ταυτόχρονη παρουσία στα φλαβονοειδή Α) δυο υδροξυλίων (-OH) σε όρθο θέση στο δακτύλιο Β, Β) του διπλού δεσμού ανάμεσα στις θέσεις 2,3, του C δακτυλίου σε συζυγία με την κετο-ομάδα Γ) δυο υδροξυλίων στις θέσεις 3,5, είναι σημαντικά για την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες όψιν (Rice-Evans *et al.*, 1996; Moure *et al.*, 2001; Soobrattee *et al.*, 2005; Trouillas *et al.*, 2006; Tsimogiannis και Oreopoulou, 2006).

Όσον αφορά, τα φαινολικά οξέα, τα υδροξυκιναμωνικά οξέα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά. Η παρουσία της προπενικής αλυσίδας (-CH=CH-COOH) στο μόριο των πρώτων επιτρέπει λόγω συντονισμού την καλύτερη σταθεροποίηση της σχηματιζόμενης φαινοξυ ρίζας σε σύγκριση με εκείνη της καρβοξυλομάδας στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Soobrattee *et al.*, 2005). Εξάιρεση αποτελεί το γαλλικό οξύ, όπου η παρουσία των τριών υδροξυλίων (-OH) φαίνεται ότι ενισχύει την αντιοξειδωτική του ικανότητα (Rice- Evans *et al.*, 1996; Soobrattee *et al.*, 2005).

Σε πρόσφατη μελέτη, η σειρά κατάταξης της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρότυπων φαινολικών ενώσεων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH ήταν γαλλικό οξύ> κερκετίνη> μυρικετίνη> λουτεολίνη> καφεϊκό οξύ> ροσμαρινικό οξύ> χλωρογενικό οξύ> ρουτίνη> φερουλικό οξύ> π-κουμαρικό οξύ> βανιλλικό οξύ. Η σειρά κατάταξης δεν είχε μεγάλες διαφορές όταν εφαρμόστηκε και η μέθοδος ABTS με το γαλλικό οξύ να είναι πιο ισχυρό ακολουθούμενο από την κερκετίνη, τη μυρικετίνη το καφεϊκό οξύ, λουτεολίνη, ροσμαρινικό οξύ, φερουλικό οξύ, ρουτίνη, χλωρογενικό οξύ, βανιλλικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ (Παπαγεωργίου, 2009).

Η παρουσία στο αφέψημα του χαμομηλιού κυρίως γλυκοζιτών της απιγενίνης και του γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος σε σχέση με την παρουσία στα αφεψήματα των φυτών της οικογένειας Lamiaceae ροσμαρινικού οξέος, παραγώγων καφεϊκού οξέος και γλυκοζιτών κυρίως λουτεολίνης αποτυπώνει την εύρεση μεγαλύτερων τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας στα αφεψήματα των τελευταίων. Και ενώ οι τιμές που προσδιορίστηκαν για την αντιοξειδωτική ικανότητα για το αφέψημα του χαμομηλιού και του δεντρολίβανου και με τις δυο μεθόδους είναι σχεδόν παραπλήσιες, οι τιμές

των φαινολικών συστατικών που προσδιορίστηκαν με τη HPLC ήταν εμφανώς μεγαλύτερες στην περίπτωση του χαμομηλιού.

Συμπερασματικά, η χρωματογραφική ανάλυση των αφεψημάτων και των υδατικών εκχυλισμάτων έδειξε ότι τα πτητικά συστατικά που παραλαμβάνονται από το αφέψημα μετά από εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (πετρελαϊκό αιθέρα) είναι κατά κύριο λόγο οξυγονούχα τερπένια και πολικά συστατικά. Τα συστατικά αυτά είναι πολύ λιγότερα από αυτά που έχουν αναλυθεί στο αιθέριο έλαιο και αναφέρονται στη βιβλιογραφία πράγμα που οφείλεται στον τρόπο εκχύλισης του φυτικού υλικού. Επίσης, στα αφεψήματα όπου η παραλαβή γίνεται με ζεστό νερό παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός συστατικών σε σχέση με τους άλλους δύο τρόπους παραλαβής.

Τα αφεψήματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία για την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών που περιέχουν και που προσδίδουν σε αυτά την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα αφεψήματα ήταν πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Το συστατικό που βρέθηκε σε όλα τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae είναι το ροσμαρινικό οξύ το οποίο λόγω των τεσσάρων υδροξυλομάδων που διαθέτει θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό. Η ποσοτικοποίηση των κύριων συστατικών έδειξε πως η σειρά κατάταξης κατά φθίνουσα σειρά είναι: μελισσόχορτο > δίκταμο > φασκόμηλο > δεντρολίβανο, που αντιστοιχεί με τα αποτελέσματα της § 1 του κεφαλαίου III.

### 3. Εκχύλιση και Χρωματογραφική μελέτη οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

#### 3.1. Παραλαβή οργανικών εκχυλισμάτων και αποδόσεις

Στην προηγούμενη ενότητα τα φυτά εξετάστηκαν για το φαινολικό τους περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα όντας σε μορφή υδατικού εκχυλίσματος. Στην παρούσα ενότητα, προστέθηκε και το φυτό κρίκος (*Crocus sativus* L.) και στα φυτά έγινε διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Ο πετρελαϊκός αιθέρας παραλαμβάνει τα λιγότερα πολικά συστατικά. Ο διαιθυλαιθέρας με τη σειρά του εκχυλίζει τα άγλυκα φλαβονοειδή και τα μέσης πολικότητας συστατικά. Τέλος, τα περισσότερα πολικά συστατικά ανακτούνται με τη μεθανόλη. Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 3.1**) παραθέτονται οι αποδόσεις των φυτικών εκχυλισμάτων για κάθε διαλύτη, που προέκυψαν από αρχικό δείγμα των 5 g καθώς και εκφρασμένα σε g/kg.

**Πίνακας 3.1.** Αποδόσεις εκχυλισμάτων εκφρασμένες σε 5 g και 1 kg φυτικού υλικού

Φυτό	Απόδοση (g/5g)*			Απόδοση (g/kg)		
	PE**	DE	MeOH	PE*	DE	MeOH
Δεντρολίβανο	0,13±0,03a***	0,35±0,03b	0,49±0,01a	26,8±5,6	69,9±2,8	98,0±2,8
Δίκταμο	0,24±0,03b	0,11±0,03a	1,02±0,03c	47,2±5,5	22,6±3,6	204,0±5,7
Κρόκος	0,15±0,00a	0,31±0,04b	2,55±0,02e	29,8±0,8	62,8±7,9	519,0±4,2
Μελισσόχορτο	0,10±0,01a	0,11±0,01a	0,90±0,04b	20,9±0,0	21,5±0,8	179,0±7,1
Φασκόμηλο	0,27±0,02b	0,12±0,01a	1,05±0,05c	54,7±4,6	23,8±1,6	209,0±9,9
Χαμομήλι	0,24±0,02b	0,08±0,01a	1,23±0,04d	47,3±3,7	16,1±2,1	246,0±14,1

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

\*\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

\*\*\* Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (p<0.05)

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 3.1**, υψηλότερες αποδόσεις έχουν τα μεθανολικά εκχυλίσματα (MeOH) ακολουθούν τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) έπονται τα αιθερικά εκχυλίσματα (DE). Όσον αφορά τα μεθανολικά εκχυλίσματα η σειρά κατάταξης με φθίνουσα σειρά είναι κρίκος> χαμομήλι> φασκόμηλο> δίκταμο> μελισσόχορτο> δεντρολίβανο. Στα αιθερικά εκχυλίσματα

υπερέχει το δεντρολίβανο ακολουθούμενο από τον κρόκο και έπονται το φασκόμηλο, το μελισσόχορτο και το δίκταμο, με το χαμομήλι να παρουσιάζει τη μικρότερη απόδοση. Τα εκχυλίσματα που προήλθαν από τον πετρελαϊκό αιθέρα ακολουθούν μια κατάταξη ανάλογη με την περιεκτικότητα των φυτών σε αιθέριο έλαιο, ωστόσο οι αποδόσεις είναι μεγαλύτερες από αυτές του αντίστοιχου ελαίου, αφού και άλλα συστατικά, όπως κηροί είναι δυνατό να εκχυλιστούν με τον άπολο αυτό διαλύτη.

Η απόδοση του εκχυλίσματος PE του δίκταμου βρέθηκε 47,2 g/kg, σχεδόν ίδια με αυτή που αναφέρουν οι Kougi *et al.*, (2007) στα 46,7 g/kg. Συμπεραίνουν αντίστοιχα ότι η απόδοση είναι μεγαλύτερη από αυτή του αιθέριου ελαίου, που ανέρχεται περίπου στο 2-4% (Economidou *et al.*, 2002, 2005; Perakis *et al.*, 2010). Η απόδοση του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα βρέθηκε μικρότερη 22,6 έναντι 37,3 g/kg, αλλά η απόδοση του εκχυλίσματος του περισσότερο πολικού διαλύτη ήταν περίπου δυόμισι φορές μεγαλύτερη. Βέβαια, ο διαλύτης στη δική μας περίπτωση ήταν η μεθανόλη, ενώ αυτοί χρησιμοποίησαν αιθανόλη.

Αντίστοιχα και στην περίπτωση του φασκόμηλου, το εκχύλισμα του PE είχε μεγαλύτερη απόδοση από το αντίστοιχο του DE. Το αιθέριο έλαιο του κυμαίνεται από 1-3% (Perry *et al.*, 1999; Couladis *et al.*, 2002), ενώ και εδώ το PE βρέθηκε με μεγαλύτερη απόδοση. Οι Veličković *et al.*, (2006, 2008) μελετώντας την εκχύλιση φασκόμηλου με υπερήχους αναφέρουν την απόδοση του εκχυλίσματος PE σε επίπεδα αντίστοιχα με της παρούσας μελέτης (54,7 έναντι 49,0 και 47,0 g/kg).

Η ίδια σειρά κατάταξης ως προς τις αποδόσεις παρατηρείται και στο χαμομήλι. Το εκχύλισμα PE είχε σκούρο κίτρινο χρώμα, γεγονός που υποδεικνύει τη μη παραγωγή από την πρόδρομη ένωση ματρικίνη χαμαζουλενίου με το χαρακτηριστικό μπλέ χρώμα που συμβαίνει τη θερμική κατεργασία του δείγματος. Αντίστοιχη παρατήρηση έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές κατά την εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Scalia *et al.*, 1999). Στην ίδια τάξη μεγέθους με τα δικά μας αποτελέσματα, έχει αναφερθεί απόδοση εκχυλίσματος εξανίου (5,6%), διαλύτη αντίστοιχης πολικότητας με τον πετρελαϊκό αιθέρα. Ενώ οι αποδόσεις για άλλους διαλύτες βρέθηκαν για το διαιθυλαιθέρα στα 6,2%, αιθανόλη 12,6% και μεθανόλη 19,6% (Roby *et al.*, 2012).



Οι αποδόσεις των εκχυλισμάτων του μελισσόχορτου βρέθηκαν 20,9 g/kg, 21,5 g/kg και 179,0 g/kg, για τον πετρελαϊκό αιθέρα, το διαιθυλαιθέρα και τη μεθανόλη, αντίστοιχα. Η απόδοση του ελαίου είναι αρκετά χαμηλή 0,3% (Carnat *et al.*, 1998), 0,11% (Ntalli *et al.*, 2010), 0,05-0,44 % (Seidler-Łożykowska *et al.*, 2013). Επιπλέον, το μελισσόχορτο ως επί το πλείστον χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυρίως φαινολικών οξέων. Τα φλαβονοειδή παρατηρούνται σε μικρές ποσότητες. Όπως είδαμε το αφέψημα του συγκεκριμένου μελισσόχορτου χαρακτηρίζεται αποκλειστικά από υδροξυκιναμωνικά οξέα, για το λόγο και η μικρή ποσότητα στο εκχύλισμα DE. Η απόδοση του PE εκχυλίσματος συμφωνεί με άλλη έρευνα, η οποία αναφέρει απόδοση 3 mg/g (Uzun *et al.*, 2004). Οι ίδιοι αναφέρουν και απόδοση του αιθανολικού εκχυλίσματος στα 16,1 mg/g.

Στην περίπτωση του δεντρολίβανου, το εκχύλισμα DE είχε μεγαλύτερη απόδοση από αυτή του PE. Το μεθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε τη χαμηλότερη απόδοση από όλα τα φυτά που μελετήθηκαν. Ενώ στα άλλα προαναφερθέντα φυτά, η απόδοση του εκχυλίσματος PE είναι μεγαλύτερη από αυτή του αντίστοιχου ελαίου, στην προκειμένη περίπτωση βρίσκεται στα ίδια επίπεδα. Η απόδοση του αιθέριου ελαίου κυμαίνεται από 0,8-3,3% (Orhan *et al.*, 2008; Parageorgiou *et al.*, 2008; Zaouali *et al.*, 2010, 2012). Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τη διαπίστωση που είχε γίνει στην προηγούμενη ενότητα, ότι η υφή του φύλλου του δεντρολίβανου απαιτεί διαφορετικό χειρισμό προκειμένου να παραλάβουμε περισσότερα δραστικά συστατικά. Στην υδροαπόσταξη λόγω του βρασμού που συντελείται, η απόδοση μεγιστοποιείται.

Το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόδοση από όλα τα φυτά που εξετάστηκαν. Αν αναλογιστούμε πως οι δυο κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες του κρόκου, οι κροκίνες που αποτελούν το 20-30% του ξηρού βάρους του φυτού (Sánchez *et al.*, 2008; Anastasaki *et al.*, 2010) και η πικροκροκίνη με ένα ποσοστό 15-20% (Del Campo *et al.*, 2010) τότε το 519,0 mg/g είναι κάτι αναμενόμενο.

### 3.2. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία (GC-MS/FID)

#### 3.2.1. Ποιοτικός προσδιορισμός

Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών. Τα πτητικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν με βάση το χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας πρότυπων ενώσεων (για τις κύριες ουσίες), καθώς και από τη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας και της βιβλιοθήκης φασμάτων NBS75K, Wiley 275 και Adams 2007, που υπάρχει στο λογισμικό του οργάνου.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι ουσίες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μέσω του GC-MS και η εκατοστιαία σύσταση (**Πίνακας 3.2**). Αξίζει να σημειωθεί ότι πέραν των παραπάνω ουσιών ανιχνεύθηκαν και υδρογονάνθρακες κυρίως στα δείγματα με μικρή απόδοση, η προέλευση των οποίων αποδίδεται στο διαλύτη. Οι Veličković *et al.*, (2008) αναφέρουν την παρουσία αυτών των ενώσεων στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα δυο ειδών *Salvia* που εκχυλίστηκαν με υπερήχους.

Όπως παρατηρήθηκε και στην οργανική φάση των αφεψημάτων, η σύσταση των πτητικών συστατικών διαφέρει από αυτή του αιθέριου ελαίου. Αντίστοιχα και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων PE, υπάρχουν τα κύρια συστατικά που συναντάμε στα αντίστοιχα αιθέρια έλαια, αλλά κυρίως τα πιο πτητικά συστατικά είναι πιο σπάνια.

Οι κυριότερες ενώσεις στο PE εκχύλισμα του δεντρολίβανου είναι βορνεόλη, η βερμπενόνη και η καμφορά στα ίδια ποσοστά με 14,90, 14,75 και 14,57% αντίστοιχα, με την ευκαλυπτόλη (10,31%) και το  $\alpha$ -πινένιο (7,69%) να ακολουθούν (**Σχήμα 3.1**). Η ανάλυση του αντίστοιχου αιθερίου ελαίου έδειξε ότι η ευκαλυπτόλη ήταν η ένωση με το μεγαλύτερο ποσοστό (17,6%), ακολουθούμενη από το  $\alpha$ -πινένιο με 15%, τη καμφορά (12,4%), μετά τη βορνεόλη (9,6%) και τέλος τη βερμπενόνη (7,2%) (Αναστασάκη και συν., 2011). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ύπαρξη δυο χημειότυπων αιθερίου ελαίου όπου στο πρώτο υπάρχει  $\alpha$ -πινένιο σε ίση περίπτωση αναλογία με την ευκαλυπτόλη και την καμφορά, όπως συμβαίνει στην

**Πίνακας 3.2.** Ποσοστιαία περιεκτικότητα των πτητικά συστατικών των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα που παραλήφθηκαν με εκχύλιση υποβοηθούμενη σε λουτρό υπερήχων

		Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Κρόκος	Μελισσόχορτο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι
KI*	Συστατικό						
926	α-πινένιο	7,69±1,34	-**	-	-	7,87±1,55	-
961	καμφένιο	2,71±0,31	-	-	-	1,35±0,20	-
1011	π-κυμένιο	0,66±0,07	8,64±1,04	-	-	0,16±0,00	-
1015	λεμονένιο	2,54±0,25	-	-	-	1,73±0,10	-
1019	ευκαλυπτόλη	10,31±0,25	-	-	-	16,51±1,36	-
1043	γ-τερπινένιο	-	4,58±0,65	-	-	0,41±0,02	-
1047	αρτεμισία κετόνη	-	-	-	-	-	1,29±0,12
1083	λιναλοόλη	3,63±0,33	0,53±0,21	-	0,44±0,04	0,54±0,06	-
1087	α-θουγιόνη ( <i>cis</i> )	-	-	-	-	20,54±1,31	-
1093	φαινυλική αλκοόλη	-	-	1,46±0,14	-	-	-
1098	β-θουγιόνη ( <i>trans</i> )	-	-	-	-	3,41±0,28	-
1106	ισοφορόνη	-	-	8,00±0,77	-	-	-
1128	καμφορά	14,57±1,30	-	-	-	22,83±0,76	-
1130	4-κετοισοφορόνη	-	-	4,90±0,30	-	-	-
1133	κιτρονελάλη	-	-	-	2,69±0,18	-	-
1141	πινοκαμφόνη	3,03±0,21	-	-	-	-	-
1147	βορνεόλη	14,90±1,18	-	-	-	5,50±0,89	-

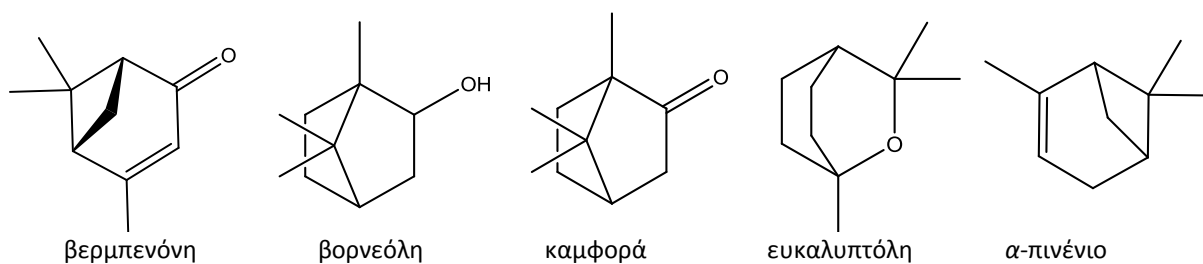
		Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Κρόκος	Μελισσόχορτο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι
KI*	Συστατικό						-
1155	ισοπινοκαμφόνη	2,84±0,57	-	-	-		-
1158	τερπινεν-4-όλη	0,68±0,10	-	-	-	0,51±0,05	-
1163	π-κυμεν-8-όλη	1,44±0,20	-	-	-	0,18±0,02	-
1170	α-τερπινεόλη	3,77±0,39	-	-	-	0,55±0,11	-
1177	μυρτενόλη	0,51±0,08	-	-	-	-	-
1183	σαφρανάλη	-	-	48,56±2,00	-	-	-
1191	βερμπενόνη	14,75±1,32	-	-	-	-	-
1202	4-μεθυλενοισοφορόνη	-	-	1,33±0,24	-	-	-
1216	νεράλη	-	-	-	16,71±1,03	-	-
1218	μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης	-	0,10±0,03	-	-	-	-
1242	γερανιάλη	-	-	-	31,10±0,10	-	-
1257	οξικός βορνυλεστέρας	2,61±0,70	-	-	-	2,51±0,19	-
1260	θυμοκινόνη	-	4,38±0,38	-	-		-
1267	θυμόλη	2,33±0,71	0,54±0,04	-	1,29±0,28	0,68±0,20	-
1272	καρβακρόλη	6,80±0,48	73,55±2,77	-	2,10±0,15	1,08±0,48	-
1291	4-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλο-2-κυκλοεξεν-1-όνη	-	-	1,86±0,17	-	-	-
1303	πυπεριτενόνη	0,79±0,12	-	-	-	-	-
1333	α-κουμπενένιο	-	0,58±0,09	-	-	-	-

		Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Κρόκος	Μελισσόχορτο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι
ΚΙ*	Συστατικό						
1313	4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξο-κυκλοεξ-1-εν-1 καρβοξαλδεΐδη	-	-	1,06±0,14	-	-	-
1336	α-κοπαένιο	-	1,87±0,33	-	3,82±0,93	-	-
1338	οξικός γερανυλεστέρας	-	-	-	1,22±0,04	-	-
1356	4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξο-κυκλοεξα-1,4-διεν-1-καρβοξαλδεΐδη	-	-	9,30±0,40	-	-	-
1375	β-καρυοφυλλένιο	1,13±0,13	0,61±0,06	-	8,39±0,27	1,51±0,25	-
1385	HTCC	-	-	11,94±0,70	-	-	-
1398	E-β-φαρνασένιο	-	-	-	-	-	4,86±0,56
1402	α-χουμουλένιο	-	-	-	1,06±0,12	1,73±0,32	-
1422	D-γερμακρένιο	1,40±0,21	0,18±0,03	-	5,81±0,72	-	0,09±0,04
1443	β-μπισαμπολένιο	-	0,13±0,03	-	-	-	-
1455	δ-καδινένιο	-	0,30±0,07	-	-	-	-
1499	σπαθουλενόλη	-	-	-	-	-	1,03±0,42
1504	οξείδιο του καρυοφυλλενίου	-	0,83±0,35	-	19,72±0,80	0,98±0,30	-
1511	βιριδοφλορόρη	-	-	-	-	6,16±1,85	-
1554	B-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	-	-	-	-	-	17,36±2,18
1576	A-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	-	-	-	-	-	9,17±1,00
1608	A-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	-	-	-	-	-	35,21±0,93

		Δεντρολίβανο	Δίκταμο	Κρόκος	Μελισσόχορτο	Φασκόμηλο	Χαμομήλι
KI*	Συστατικό						
1653	Z- σπιθοαιθερας ( <i>cis</i> )	-	-	-	-	-	11,57±2,76
1657	E- σπιροαιθέρας ( <i>trans</i> )	-	-	-	-	-	6,83±0,51
1730	εξαδεκανοικό οξύ	-	-	-	-	-	3,85±0,22

\* Δείκτης Kovats σε μη πολική στήλη HP-5ms σε σχέση με η αλκάνια

\*\* Δεν ανιχνεύθηκε

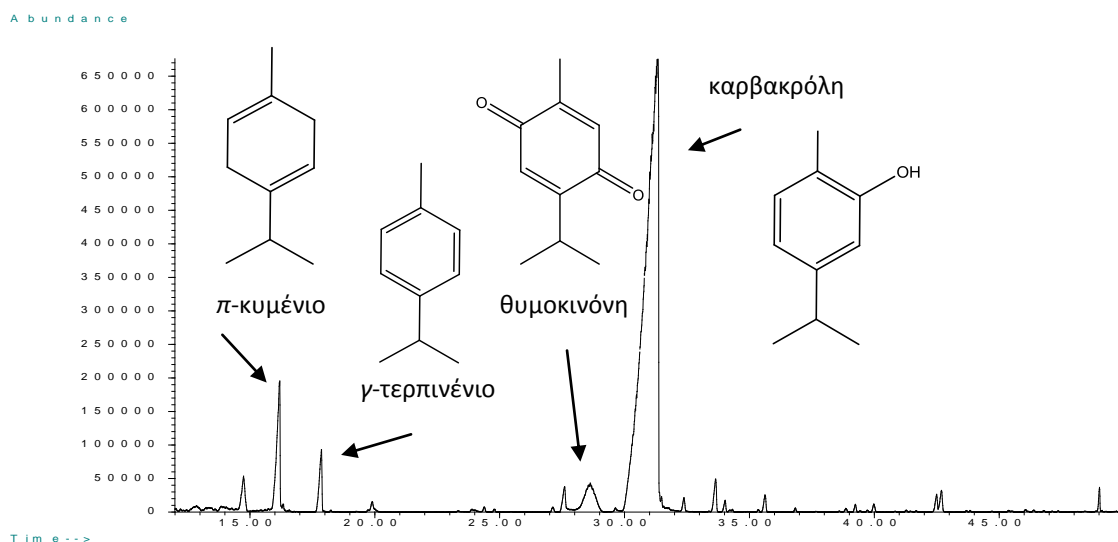


**Σχήμα 3.1.** Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο ΡΕ εκχύλισμα του δεντρολίβανου

προκειμένη περίπτωση και ο δεύτερος χημειότυπος χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη περιεκτικότητα σε ευκαλυπτόλη (Pintore *et al.*, 2002; Celiktas *et al.*, 2007; Napoli *et al.*, 2013). Ωστόσο και μέσα στον ίδιο χημειότυπο παρατηρούνται διαφορές, έτσι ανάλογα με την % σύσταση των τριών κύριων συστατικών του πρώτου χημειότυπου υπάρχει χημειότυπος E-aP-C, E-C-aP, C-E-aP, C-aP-E και aP-E-C, ανάλογα με το ποσοστό του κάθε συστατικού, όπου ευκαλυπτόλη (E), α-πινένιο (aP) και καμφορά (C) (Jordán *et al.*, 2013a). Τα τρία αυτά συστατικά ήταν τα κυριότερα στο αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου που μελετήθηκε σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού από διαφορετικές βιοκλιματικές περιοχές της Μεσογειακής λεκάνης (Jordán *et al.*, 2013b), από την Τυνησία (Zaouali *et al.*, 2012), την Αλγερία (Zoubiri και Baaliouamer, 2011), την Κίνα (Jiang *et al.*, 2011). Σε σύγκριση με άλλες μελέτες, οι Paragerogiou *et al.*, (2008) μελέτησαν την εποχική διακύμανση του αιθερίου ελαίου του δεντρολίβανου χημειότυπου κινεόλης με την ευκαλυπτόλη να κυμαίνεται μεταξύ 48,3 και 58,7%. Οι Celiktas *et al.*, (2007) αναφέρουν χημειότυπο κινεόλης σε αιθέριο έλαιο από την περιοχή της Μερσίνης στην Τουρκία, ενώ η περιοχή της Σμύρνης παρουσίασε χημειότυπο E-C-aP και η περιοχή των Δαρδανελλίων C-E-aP, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως όσο πιο ζεστό είναι το κλίμα τόσο ενισχύεται η περιεκτικότητα της ευκαλυπτόλης στο αιθέριο έλαιο.

Στην περίπτωση του δίκταμου, το ΡΕ εκχύλισμα χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη (73,55%), με το π-κυμένιο, τη θυμοκινόνη και το γ-τερπινένιο να απαντούν σε ποσοστά πάνω από 4% (Πίνακας 3.2, Σχήμα 3.2). Η καρβακρόλη έχει αναφερθεί άλλωστε ότι είναι η κύρια ένωση του αιθερίου ελαίου (Sivropoulou *et al.*, 1996; Daferera *et al.*, 2002; Chorianoopoulos *et al.*, 2004; Economakis *et al.*, 2005; Liolios *et al.*, 20010; Ntalli *et al.*, 2010). Οι Kouri *et al.*, (2007)

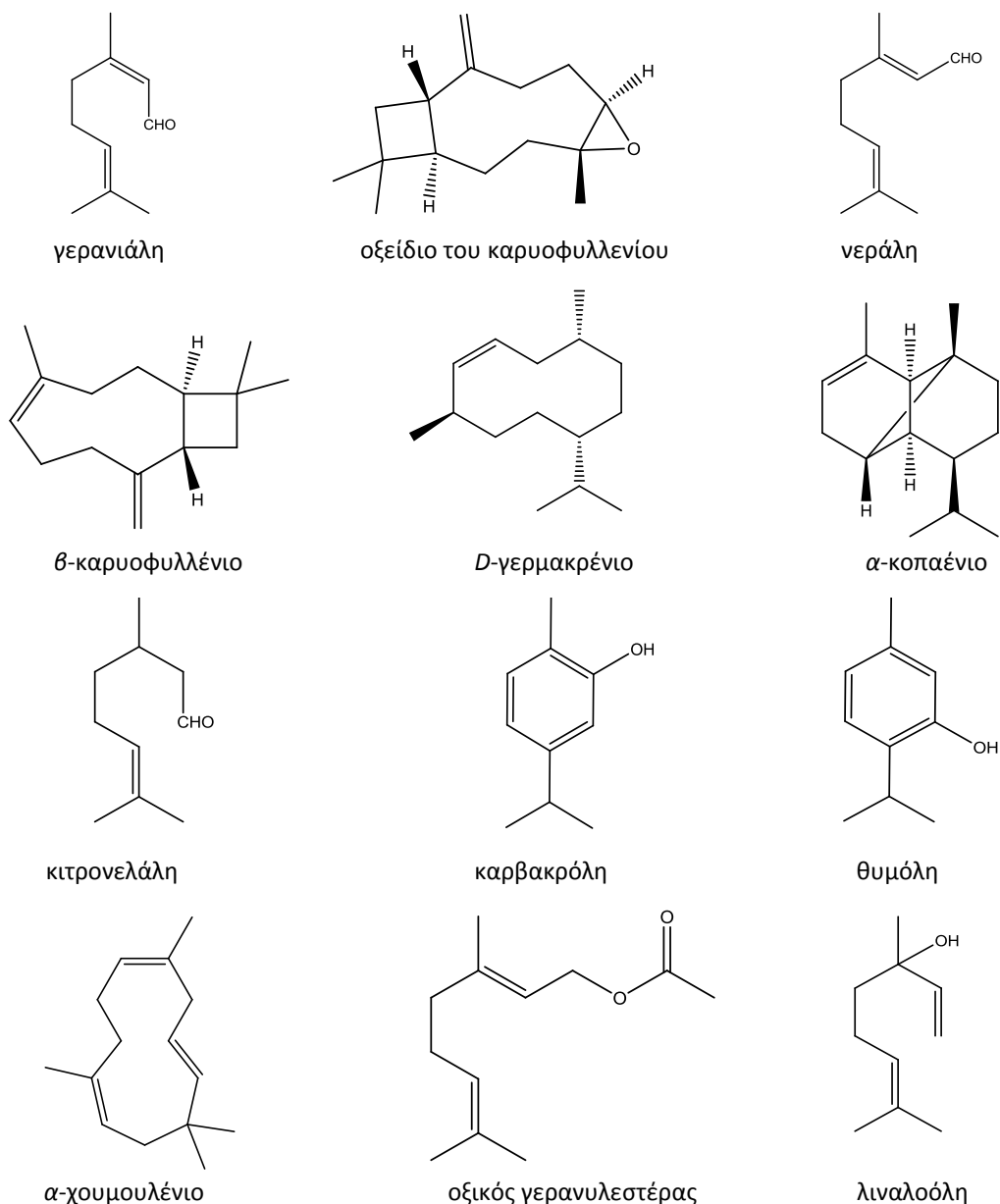
βρήκαν στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα κύρια ένωση την καρβακρόλη, ακολουθούμενη από τη μεθυλ-1,4-βενζοκινόννη, που ουσιαστικά είναι ισομερές της θυμοκινόννης, τα οποία αποτελούν το 70% του εκχυλίσματος με τα επιπλέον συστατικά βορνεόλη, θυμόλη, π-κυμένιο, οξείδιο του καρυοφυλενίου, λιναλοόλη, β-καρυοφυλένιο, α-κοπαένιο, β-μπισαμπολένιο και καλαμενένιο να συνθέτουν το εκχύλισμα. Η σύσταση του παραπάνω εκχυλίσματος κατά μεγάλο ποσοστό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με μόνη διαφορά τη μην ανίχνευση βορνεόλης και καλαμενενίου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και σε αυτήν την περίπτωση όπως και στην ανάλυση της οργανικής φάσης των αφεψημάτων η ύπαρξη της θυμοκινόννης. Η ουσία αυτή αποτελεί την κύρια ένωση στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Nigella sativa* (Ramadan, 2007) και θεωρείται εν δυνάμει αντικαρκινικό συστατικό (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006).



**Σχήμα 3.2.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (PE) του δίκταμου.

Στην περίπτωση του μελισσόχορτου, παρατηρείται ότι η κιτράλη (η νεράλη και η γερανιάλη) και το οξείδιο του καρυοφυλενίου αποτελούν τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος με ποσοστά 16,71, 31,10 και 19,72%, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα με μικροδιαφορές αναφέρονται και από τον Κανάκη (2010) σε εκχυλίσματα μελισσόχορτου που παραλήφθηκαν με εκχύλιση με διαυθυλαιθέρα υπο-





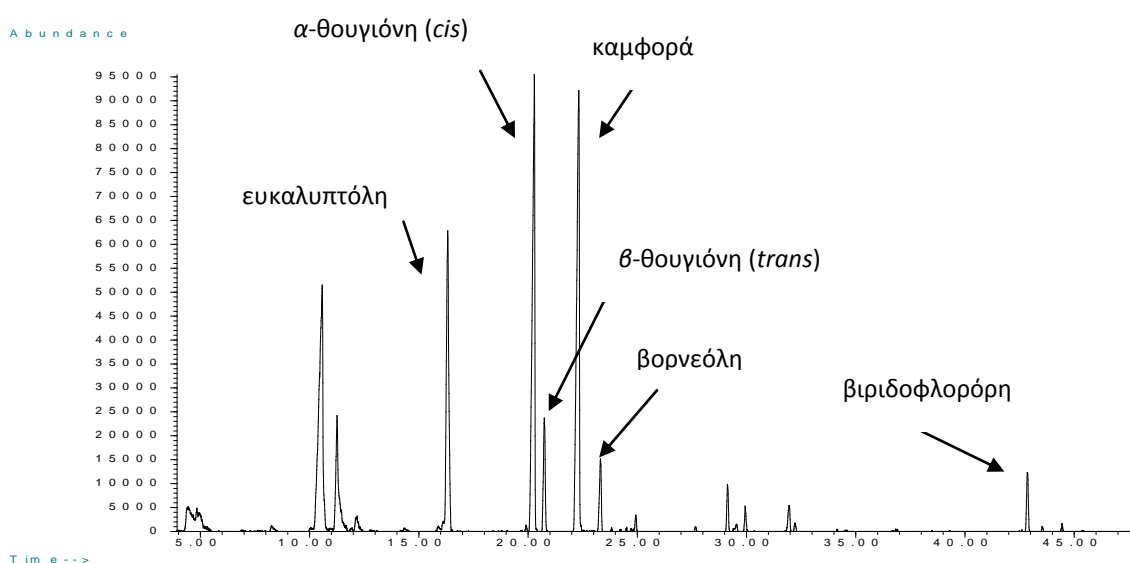
**Σχήμα 3.3.** Οι ουσίες που ανευρέθηκαν στο PE εκχύλισμα του μελισσόχορτου κατά φθίνουσα σειρά ποσοστιαίας περιεκτικότητας

βοηθούμενης από υπερήχους. Η κύρια ένωση είναι η κιτράλη με τη γερανιάλη και τη νεράλη να κυμαίνονται από 26,84 έως 49,63% και από 11,02 έως 24,30%, αντίστοιχα. Ειδικότερα, στο δείγμα που προήλθε από την ίδια περιοχή με αυτό της παρούσας μελέτης ταυτοποιήθηκε γερανιάλη (26,84%), κιτρονελάλη (14,58%), νεράλη (11,02%), β-καρυοφυλλένιο (11,82%), οξύδιο του καρυφυλλενίου (10,46%), καρβακρόλη (6,82%), D-γερμακρένιο (2,68%), κιτρονελικός μεθυλεστέρας (2,02%), θυμόλη (1,60%), α-κοπαένιο (1,21%) και λιναλοόλη, γερανικός μεθυλεστέρας, γερανικό οξύ, οξικός

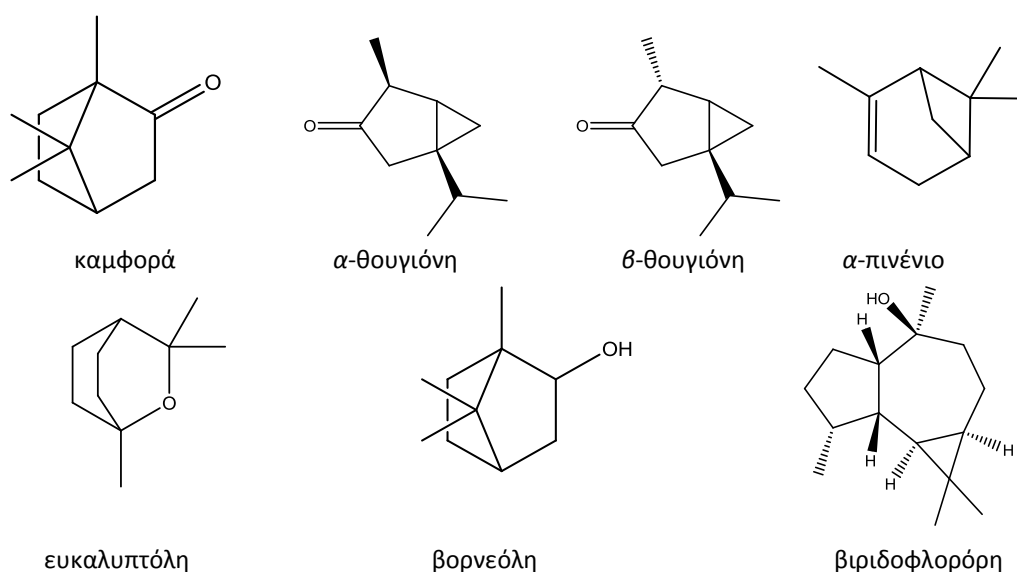
γερανυλεστέρας,  $\alpha$ -χουμουλένιο, 1,6-γερμακραδιεν-5-όλη, οπλαπανόνη σε ποσοστά >1%. Οι διαφορές που υπάρχουν στα δυο αυτά εκχυλίσματα ίσως να οφείλονται στη διαφορετική εποχή συλλογής, σε καιρικούς παράγοντες ή ακόμα στην εκλεκτικότητα που έχει και ο κάθε διαλύτης, μιας και οι πολικότητες είναι διαφορετικές. Κατά αντιστοιχία, όταν το ίδιο δείγμα αναλύθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης με υδρατμούς-εκχύλισης σε οργανικό διαλύτη, η σύσταση του ήταν αρκετά διαφορετική με την κιτρονελάλη να αποτελεί την κύρια ένωση, ενώ αρκετά πτητικές ενώσεις που δεν ανιχνεύθηκαν με τους υπέρηχους να είναι παρούσες. Σε άλλες μελέτες εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα:εξανίου και χλωροφορμίου:εξανίου από δείγματα μελισσόχορτου που προέρχονται από τη Ρουμανία, η κιτράλη ήταν η κύρια ένωση. Στην πρώτη περίπτωση βρέθηκε επίσης κιτρονελλάλη, μεθυλ-κιτρονελλάλη, οξικός γερανυλεστέρας, 2,3-εποξυοξικός γερανυλεστέρας,  $\beta$ -καρυοφυλλένιο, οξείδιο του καρυοφυλλενίου (Iordache et al., 2009). Στην άλλη περίπτωση, βρέθηκε κιτρονελλάλη, γερανιόλη,  $\beta$ -κιτρονελλάλη, τερπινεόλη, λιναλοόλη,  $\beta$ -πινένιο, λιμονένιο,  $\beta$ -οκιμένιο,  $\alpha$ -κουμπεμπένιο,  $\alpha$ - και  $\beta$ -καρυοφυλλένιο,  $\delta$ -καδινένιο και  $\alpha$ -καλακορένιο (Antal et al., 2011).

Στο **Σχήμα 3.4** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με πετρελαϊκού αιθέρα του φασκόμηλου. Η ουσία με το υψηλότερο ποσοστό στο εκχύλισμα είναι η καμφορά σε ποσοστό 22,83% και ακολουθούν η *cis*- $\alpha$ -θουγιόνη η ευκαλυπτόλη, η *trans*- $\beta$ -θουγιόνη, το  $\alpha$ -πινένιο, η βιριδοφλορόρη και η βορνεόλη σε ποσοστά, 20,54%, 16,51%, 6,16%, 3,83%, και 5,50%, αντίστοιχα (**Σχήμα 3.5**). Οι Veličković et al., (2008) αναφέρουν την παρουσία στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα *Salvia officinalis* από την Ανατολική Σερβία που παραλήφθηκε με υπέρηχους,  $\alpha$ -θουγιόνης, ευκαλυπτόλης,  $\alpha$ -χουμουλένιου,  $\beta$ -καρυοφυλλένιου, βορνεόλης,  $\beta$ -θουγιόνης, ενώ η κυρία ένωση του δικού μας εκχυλίσματος, η καμφορά δεν ανιχνεύθηκε. Από την άλλη μεριά, οι Länger et al., (1996) σε εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου που παραλήφθηκαν πάλι με υπέρηχους, η καμφορά ήταν το κύριο συστατικό και κυμαινόταν από 14,4-47,4%, ακολουθούμενη από τη  $\alpha$ -θουγιόνη (7,5-41,9%), την ευκαλυπτόλη (2,8-22,8%), τη βορνεόλη (2,1-22,7%),  $\beta$ -καρυοφυλλένιο (0,6-15,9%), καμφένιο (1,6-12,3%),  $\alpha$ -πινένιο (0,7-13,6%) οξικό βορνύλιο (0,4-9,8%) και  $\beta$ -πινένιο (1-1,8%). Σε μελέτες για τη σύσταση του αιθερίου ελαίου έχει παρατηρηθεί

αρκετή διαφοροποίηση ως προς τα κύρια συστατικά και τη σχετική τους αναλογία. Αναφέρεται ότι η περιεκτικότητα της θουγιόνης ( $\alpha$ - και  $\beta$ -) σε δείγματα από τη Δαλματία κυμαίνεται από 9-44%, τα φύλλα έχουν περισσότερο ποσοστό συνολικής θουγιόνης από ότι τα άνθη, ενώ κατά τους ανοιξιάτικους και καλοκαιρινούς μήνες αυτή βρίσκεται σε χαμηλότερα ποσοστά από ότι τι φθινόπωρο και χειμώνα (Perry *et al.*, 1999). Οι Couladis *et al.*, (2002) αναφέρουν επίσης μεγάλες διαφοροποιήσεις σε 11 πληθυσμούς φασκόμηλου από το Μαυροβούνιο και τη Σερβία, καταλήγουν και αυτοί στο ίδιο συμπέρασμα ότι τα φύλλα περιέχουν μεγαλύτερα ποσοστά θουγιόνης



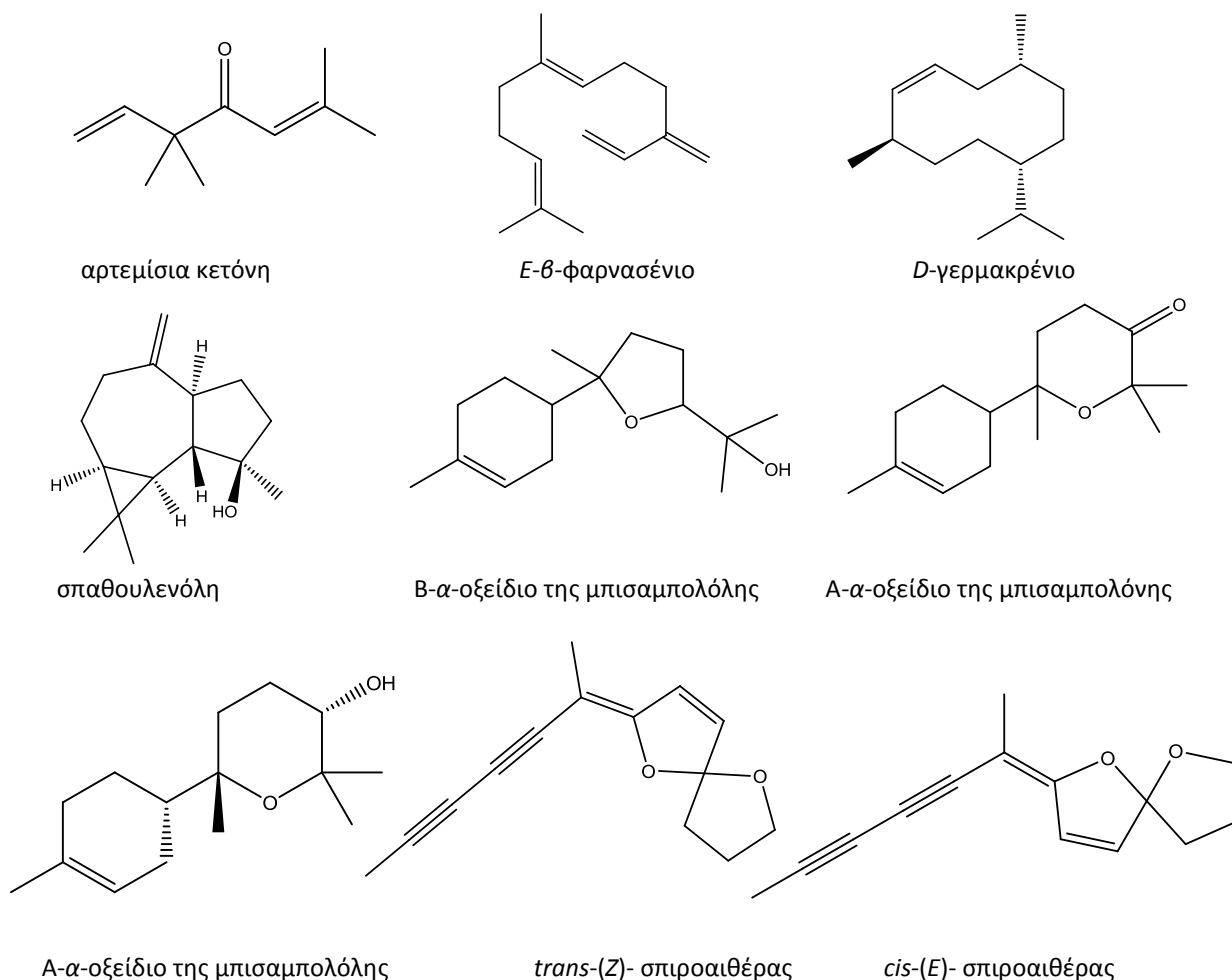
Σχήμα 3.4. Χρωματογράφημα εκχύλισματος πετρελαϊκού αιθέρα (PE) του φασκόμηλου.



Σχήμα 3.5. Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο PE εκχύλισμα του φασκόμηλου

αλλά και καμφφοράς από ότι τα άνθη. Οι 6 κύριες ενώσεις σε όλους τους πληθυσμούς ήταν η ευκαλυπτόλη με ποσοστά από 6,35 έως 18,54%, η  $\alpha$ -θουγιόνη από 8,47-25,35%, η  $\beta$ -θουγιόνη με διακύμανση από 1,33 έως 6,04%, η καμφφορά από 0,15 έως 24,8%, η βορνεόλη με 0,2-8,50% και το οξικό βορνύλιο με ποσοστά 0,05-4,91%. Η παρουσία καρβακρόλης αναφέρεται σε μικρά ποσοστά σε δυο πληθυσμούς που είχαν προέλθει από τη Νοτιοανατολική περιοχή της Σερβίας με κλίμα αντίστοιχο της περιοχής του Αγρινίου. Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Longaray-Delamare *et al.*, (2007), βρέθηκε ότι τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου προερχόμενα από τη Βραζιλία είναι η  $\alpha$ -θουγιόνη, η ευκαλυπτόλη, η βορνεόλη, η καμφφορά και το  $\beta$ -πινένιο σε ποσοστά 24,8%, 14,8%, 11,1%, 10,9% και 9,87%, αντίστοιχα. Πιο πρόσφατα οι Ntalli *et al.*, (2010), σε φασκόμηλο ελληνικής προέλευσης βρήκαν ότι στο αιθέριο έλαιο τα συστατικά τα οποία κυριαρχούσαν είναι η ευκαλυπτόλη σε ποσοστό 25,5% και την ακολουθούν η καμφφορά, η  $\alpha$ -θουγιόνη, το καμφένιο και το  $\beta$ -πινένιο σε ποσοστά 16,8%, 6%, 4,9% και 4,6% αντίστοιχα. Τέλος, οι Schmiderer *et al.*, (2013) σε δείγματα από την Αλβανία αναφέρουν με τη σειρά τους μεγάλες διακυμάνσεις στα κύρια μονοτερπένια ευκαλυπτόλη (2-16%),  $\alpha$ -θουγιόνη (4-26%),  $\beta$ -θουγιόνη (1-11%) καμφφορά (13-41%) και στα σесκιτερπάνια  $\beta$ -καρυοφυλένιο (3-12%),  $\alpha$ -χουμουλένιο (4-13%) και βιριδοφλορόρη (1-10%).

Όσον αφορά τα άλλα δυο φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, το εκχύλισμα του χαμομηλιού χαρακτηρίζεται από οξείδια, αιθέρες, σесκιτερπένια και κηρούς, με το Α- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης, το Ζ-σπιροαιθέρα, το  $\beta$ -φαρνεσένιο και το εξαδεκανοϊκό οξύ να είναι τα κυρίαρχα στις παραπάνω αντίστοιχες κατηγορίες ενώσεων. Το προφίλ του εκχυλίσματος έχει περισσότερες ομοιότητες με αντίστοιχα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται από εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Reverchon και Senatore, 1994; Scalia *et al.*, 1998). Οι τελευταίοι αναφέρουν ότι το Α- $\alpha$ -οξείδιο οξείδιο της μπισαμπολόνης και ο Ζ-σπιροαιθέρας ήταν τα δυο κυρίαρχα συστατικά με ποσοστά 28,5 και 25,9%, αντίστοιχα, με το  $\beta$ -φαρνεσένιο να ακολουθεί με 9,6%, το Β- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης με 4,6% και η σπαθουλενόλη με 1,0%. Σημαντικές είναι και οι ποσότητες κηρών που ανιχνεύονται με ποσοστά που φτάνουν το 13,2% και ματρικίνης (7,5%), πρόδρομη ένωση του χαμαζουλενίου. Οι δυο παραπάνω ενώσεις,



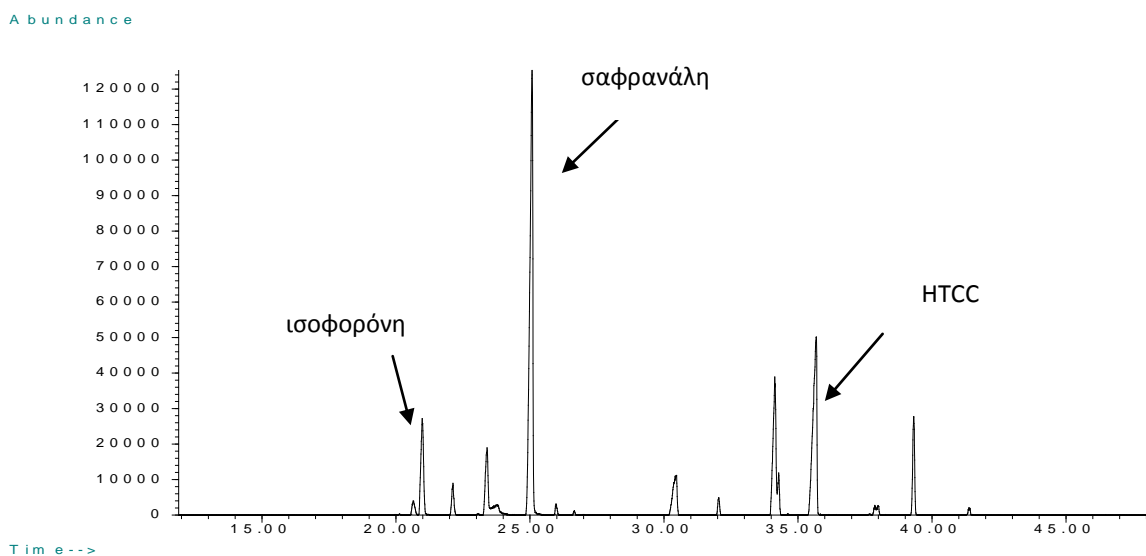
**Σχήμα 3.6.** Οι ουσίες που ανευρέθηκαν στο PE εκχύλισμα του χαμομηλιού κατά σειρά έκλουσης

όπως και το μεγάλο ποσοστό σπιροαιθέρων είναι χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων και όχι του αιθέριου ελαίου του χαμομηλιού. Τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενων πληθυσμών χαμομηλιού από την Πολωνία παρουσίασαν μεγάλες διακυμάνσεις στα ποσοστά τους. Στη μια περίπτωση, η α-μπισαμπολόλη βρέθηκε σε ποσοστό 30,0%, το χαμαζουλένιο σε ποσοστό 24,5%, το β-φαρνεσένιο 12,80%, τα οξείδια Α- και Β- της α-μπισαμπολόλης σε ποσοστά 7,32% και 6,00%, αντίστοιχα, και σε μικρότερα ποσοστά βρέθηκαν οι *cis*- και *trans*- σπιροαιθέρες (7,48% και 0,90%, αντίστοιχα) και το Α-α-οξύδιο οξύδιο της μπισαμπολόλης (0,55%). Ενώ στην άλλη, η α-μπισαμπολόλη βρέθηκε σε ποσοστό μόλις 1,49% με το Α-α-οξύδιο της μπισαμπολόλης να είναι το κύριο συστατικό (36,27%), με το χαμαζουλένιο (23,41%), Β-α-οξύδιο της μπισαμπολόλης (8,25%), το β-φαρνασένιο (8,22%), Α-α-οξύδιο της μπισαμπολόλης (4,13%) και τους σπιροαιθέρες (*cis*- 3,43% και *trans*- 6,01%) να συνθέτουν το αιθέριο έλαιο (Szöke *et al.*, 2004). Ο Schilcher (1987) όρισε έξι

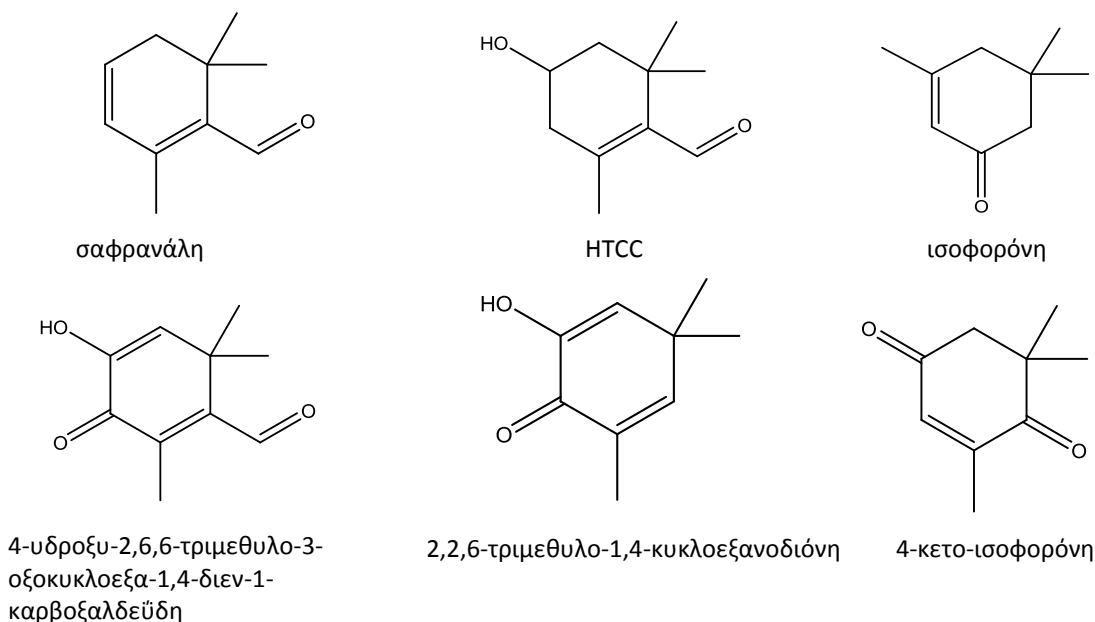
διαφορετικούς χημειότυπους για το χαμομήλι ανάλογα με τα ποσοστά της κάθε ένωσης στο αιθέριο έλαιο, έτσι η πρώτη περίπτωση έχει να κάνει με χημειότυπο μπισαμπολόλης (Τύπος C) και η δεύτερη με χημειότυπο Α-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης (Τύπος Α). Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού από την περιοχή των Ιμαλάϊων παρουσίασε χημειότυπο με το Α-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης ως κυρίαρχη ένωση (Sashidhara *et al.*, 2006). Πρόσφατα οι Raal *et al.*, (2012) αναφέρουν την ύπαρξη κηρών και αυξημένων ποσοστών σπιθοαιθέρων σε αιθέριο έλαιο από εμπορικά σκευάσματα χαμομηλιού έτοιμα για παρασκευή αφεψήματος. Η παρουσία αυτών των ενώσεων ίσως να οφείλεται στον τρόπο παρασκευής της δρόγης που χρησιμοποιείται.

Τέλος, στο εκχύλισμα του κρόκου (**Σχήμα 3.7**), η κύρια ένωση ήταν η σαφρανάλη, η οποία είναι και η χαρακτηριστική ένωση του αιθερίου ελαίου και των μη πολικών οργανικών εκχυλισμάτων (Zarghami και Heinz, 1971; Rödel και Petrizka, 1991; Semiond *et al.*, 1996; Tarantilis και Polissiou, 1997; Kanakis *et al.*, 2004). Λόγω της ιδιαιτερότητας του κρόκου, η μεγάλη του τιμή καθιστά ασύμφορη την παραλαβή αιθερίου ελαίου. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η μεγάλη θερμική επεξεργασία που υφίσταται το δείγμα κατά την υδροαπόσταξη οδηγεί στην καταστροφή ευαίσθητων ενώσεων και στη παραγωγή παραπροϊόντων από τη θερμική διάσπαση των καρτενοειδών (Tarantilis και Polissiou, 1997; Carmona *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που είχαμε αναφέρει όταν αναλύθηκαν δείγματα κρόκου από τέσσερις διαφορετικές χώρες (Ελλάδα, Ιταλία, Ιράν, Ισπανία) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης τον διαιθυλαιθέρα (Anastasaki *et al.*, 2009). Η κύρια ένωση για τα ελληνικά δείγματα ήταν η σαφρανάλη, ακολουθούμενη από την ισοφορόνη, την 4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξεν-1-καρβοξαλδεΐδη (HTCC), τη 2,6,6-τριμεθυλ-1,4-κυκλοεξανεδιενόνη και την 4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλ-3-οξοκυκλοεξα-1.4-διεν-1-καρβοξαλδεΐδη. Οι πέντε αυτές ενώσεις είναι κοινές σε όλα τα δείγματα, αλλά ανάλογα με τη χώρα προέλευσης αλλάζει η σειρά κατάταξής τους. Αυτό κατά κύριο λόγο έχει να κάνει με το διαφορετικό τρόπο ξήρανσης που εφαρμόζεται σε κάθε περιοχή, που πολλοί ερευνητές έχουν τονίσει ότι ο διαφορετικός τρόπος ξήρανσης (θερμοκρασία, χρόνος) επηρεάζει άμεσα την παραγωγή των συστατικών εκείνων που προσδιορίζουν το άρωμα του κρόκου (Raina *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005). Κάτω από

αυτό το πρίσμα κατέσπει δυνατό να διαχωριστούν τα αιθερικά εκχυλίσματα του κρόκου από τις τέσσερις διαφορετικές χώρες προέλευσης με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (Anastasaki *et al.*, 2009) και υπέρυθρης φασματοσκοπίας συνδυασμένες (Anastasaki *et al.*, 2010a) με στατιστικά πακέτα χημειομετρίας.



Σχήμα 3.7. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (PE) του κρόκου.



Σχήμα 3.8. Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο PE εκχύλισμα του κρόκου.

### 3.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός

Η ποσοτική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου συνδυασμένου με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του εσωτερικού και τον εσωτερικό συντελεστή απόκρισης. Επειδή, δεν ήταν εφικτή η προμήθεια όλων των πρότυπων ενώσεων για την ποσοτικοποίηση της κάθε ένωσης, στην περίπτωση αυτή η ποσοτικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας τον εσωτερικό συντελεστή απόκρισης εμπορικών διαθέσιμων προτύπων παρόμοιας δομής με την προσδιοριζόμενη ένωση.

Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης των κύριων συστατικών των εκχυλισμάτων εκφρασμένα τόσο σε  $\mu\text{g}/\text{mg}$  εκχυλίσματος, όσο και  $\mu\text{g}/\text{g}$  φ.υ.

**Πίνακας 3.3.** Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του δεντρολίβανου

	$\mu\text{g}/\text{mg}$ εκχυλίσματος	$\mu\text{g}/\text{g}$ φ.υ.
<b><math>\alpha</math>-πινένιο</b>	0,82 $\pm$ 0,18	22,0 $\pm$ 4,7
<b>καμφένιο</b>	0,32 $\pm$ 0,03	8,6 $\pm$ 0,8
<b><math>\pi</math>-κυμένιο</b>	0,050 $\pm$ 0,002	1,3 $\pm$ 0,1
<b>λεμονένιο</b>	0,200 $\pm$ 0,001	5,40 $\pm$ 0,01
<b>ευκαλυπτόλη</b>	0,76 $\pm$ 0,04	20,2 $\pm$ 1,1
<b>λιναλοόλη</b>	0,46 $\pm$ 0,02	12,3 $\pm$ 0,2
<b>καμφορά</b>	3,08 $\pm$ 0,34	82,5 $\pm$ 9,2
<b>πινοκαμφόνη</b>	0,39 $\pm$ 0,06	10,4 $\pm$ 1,6
<b>βορνεόλη</b>	1,87 $\pm$ 0,32	50,0 $\pm$ 8,4
<b>ισοπινοκαμφόνη</b>	0,28 $\pm$ 0,10	7,4 $\pm$ 2,7
<b>τερπινε-4-όλη</b>	0,07 $\pm$ 0,02	2,0 $\pm$ 0,4
<b><math>\pi</math>-κυμεν-8-όλη</b>	0,18 $\pm$ 0,02	4,8 $\pm$ 0,6
<b><math>\alpha</math>-τερπινεόλη</b>	0,47 $\pm$ 0,12	12,5 $\pm$ 3,1
<b>μυρτενόλη</b>	0,06 $\pm$ 0,02	1,5 $\pm$ 0,5
<b>βερμπενόνη</b>	1,83 $\pm$ 0,34	49,1 $\pm$ 9,1
<b>οξικό βορνύλιο</b>	0,44 $\pm$ 0,08	11,8 $\pm$ 2,3
<b>θυμόλη</b>	0,79 $\pm$ 0,21	21,1 $\pm$ 5,6
<b>καρβακρόλη</b>	0,85 $\pm$ 0,25	22,8 $\pm$ 9,4
<b>πιπεριτενόνη</b>	0,10 $\pm$ 0,02	2,6 $\pm$ 0,4
<b><math>\beta</math>-καρυοφυλένιο</b>	0,15 $\pm$ 0,04	4,1 $\pm$ 1,1
<b>D-γερμακρένιο</b>	0,16 $\pm$ 0,06	4,3 $\pm$ 1,6



Από τους πίνακες αναδεικνύεται ότι το εκχύλισμα του δίκταμου ήταν το πιο πλούσιο, με την καρβακρόλη να είναι η ένωση με τη μεγαλύτερη τιμή. Το πιο φτωχό δείγμα ήταν αυτό του δεντρολίβανου. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει ακόμη μια φορά ότι η φύση του συγκεκριμένου υλικού απαιτεί έναν πιο ιδιαίτερο τρόπο χειρισμού προκειμένου να παραλάβουμε αρκετά δραστικά συστατικά.

Η κύρια ένωση στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου ήταν η καμφορά (82,5 μg/g φ.υ.) ακολουθούμενη από τη βορνεόλη (50,0 μg/g φ.υ.) και τη βερμπενόνη (49,1 μg/g φ.υ.), ενώ η ευκαλυπτόλη βρέθηκε μόλις 20,2 μg/g φ.υ. Η σειρά αυτή κατάταξης, ωστόσο δε συμφωνεί με τα αποτελέσματα της εκατοστιαίας περιεκτικότητας του **Πίνακα 3.2**, όπου η καμφορά και ευκαλυπτόλη παρουσίαζαν παρόμοια εκατοστιαία περιεκτικότητα. Η διαφοροποίηση οφείλεται στο μικρό συντελεστή απόκρισης της τελευταίας.

**Πίνακας 3.4.** Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του δίκταμου

	μg/mg εκχυλίσματος	μg/g φ.υ.
π-κυμένιο	7,93±0,14	374,3±6,8
γ-τερπινένιο	5,62±0,13	265,3±6,2
λιναλοόλη	1,19±0,19	56,0±9,0
μεθυλ αιθέρας της καρβακρόλης	0,16±0,01	7,6±0,2
θυμοκινόνη	13,11±0,60	618,2±28,5
θυμόλη	0,65±0,04	30,6±0,9
καρβακρόλη	98,03±17,09	4624,3±806,1
α-κουπεμπένιο	0,96±0,13	45,5±6,1
α-κοπαένιο	2,96±0,86	139,4±40,7
β-καρσοφυλλένιο	1,08±0,08	51,0±3,8
D- γερμακένιο	0,37±0,10	17,5±4,8
β-μπισαμπολένιο	0,20±0,05	9,4±1,0
δ-καδινένιο	0,46±0,15	21,5±3,0
οξείδειο του καρσοφυλλενίου	3,82±1,12	180,2±52,7

Στο εκχύλισμα του δίκταμου η κύρια ένωση ήταν η καρβακρόλη με 4624,3 μg/g φ.υ., ακολουθούμενη από τη θυμοκινόνη με 618,2 μg/g φ.υ. Η καρβακρόλη είναι κατά κανόνα η κύρια ένωση που παρατηρείται στο δίκταμο και γενικά στα είδη του γένους *Origanum*. Οι Figiel *et al.*, (2010) αναφέρουν ότι η καρβακρόλη κυμαίνεται από 3,64-

9,09 g/kg φ.υ. σε δείγματα αιθερίων ελαίων ρίγανης (*Origanum vulgare*) από την Πολωνία.

**Πίνακας 3.5.** Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του μελισσόχορτου

	μg/mg εκχυλίσματος	μg/g φ.υ.
λιναλόλη	0,12±0,01	2,6±0,2
κιτρονελάλη	1,09±0,06	22,7±1,2
νεράλη	12,13±0,39	253,4±8,1
γερανιάλη	24,71±0,40	516,3±8,4
θυμόλη	0,30±0,03	6,2±0,5
καρβακρόλη	0,48±0,02	10,1±0,5
α-κοπαένιο	1,03±0,16	21,4±3,4
οξικός γερανυλεστέρας	0,60±0,01	12,6±0,3
β-καρυοφυλλένιο	2,51±0,04	52,5±0,9
α-χουμουλένιο	0,24±0,02	5,0±0,5
D- γερμακένιο	1,49±0,13	31,1±2,7
οξείδιο του καρυοφυλλενίου	12,38±0,43	258,7±9,0

Το εκχύλισμα του μελισσόχορτου χαρακτηρίστηκε από μικρές τιμές σε πτητικά συστατικά. Η γερανιάλη και η νεράλη βρέθηκαν στα 516,3 και 253,4 μg/g φ.υ, αντίστοιχα. Το άθροισμα των δυο αυτών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν την κιτράλη είναι στα 769,7 μg/g φ.υ. Το οξείδιο του καρυοφυλλενίου επίσης βρέθηκε σε αρκετά σημαντική ποσότητα (258,7 μg/g φ.υ.). Παρόμοιες τιμές για τη γερανιάλη και νεράλη αναφέρονται σε μελέτη οργανικών εκχυλισμάτων μελισσόχορτου από διάφορες περιοχές της Ρουμανίας (300,3 και 592,0 μg/g φ.υ., αντίστοιχα), με την κιτρονελάλη να ακολουθεί (197,2 μg/g φ.υ.), ενώ οξείδιο του καρυοφυλλενίου υπολείπεται σημαντικά σε σχέση με την παρούσα μελέτη (14,7 μg/g φ.υ.). Το β-καρυοφυλλένιο και ο οξικός γερανυλεστέρας αναφέρονται στα 11,3 και 14,3 μg/g φ.υ.), με το πρώτο να υπολείπεται ενώ το δεύτερο συστατικό να ανευρίσκεται στα ίδια επίπεδα (Iordache *et al.*, 2009). Σε άλλη μελέτη, σε εκχυλίσματα χλωροφορμίου: εξανίου (1:1) αναφέρεται ότι η ποσότητα της κιτράλης (νεράλης και γερανιάλης) κυμαίνεται από 81,59-123,65 mg/100 g φ.υ. αναλόγως με τον τρόπο ξήρανσης του φυτικού υλικού (Antal *et al.*, 2014). Στη μελέτη αυτή, αναφέρεται κιτρονελάλη σε τιμές που κυμαίνονται από

54,9-77,33 mg/100 g φ.υ., ωστόσο δεν αναφέρεται η παρουσία οξειδίου του καρυοφυλλενίου.

Μελετώντας το εκχύλισμα του φασκόμηλου, παρατηρούμε η καμφορά και η *cis*-θουγιόνη είναι οι δυο κύριες ενώσεις με τιμές 1942,7 και 1072,8 μg/g φ.υ., αντίστοιχα. Ακολουθεί η ευκαλυπτόλη με τιμή 487,4 μg/g φ.υ., ενώ σε τιμές κοντά στα 300 μg/g φ.υ, βρέθηκαν το *α*-πινένιο, η βορνεόλη, το οξικό βορνύλιο και η βιριδοφλορόρη. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην περίπτωση του φασκόμηλου λόγω της παρουσίας θουγιόνης. Σύμφωνα με την οδηγία Νο 88/388 του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, η μέγιστη ποσότητα της θουγιόνης (*α*- και *β*-) στα τρόφιμα και τα ποτά δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 mg/kg. Το όριο ανεβαίνει στα 25 mg/kg στα τρόφιμα που περιέχουν παρασκευάσματα με βάση το φασκόμηλο. Με τον κανονισμό 1334/2008, το παραπάνω όριο αφαιρέθηκε και μόνο τα ποτά αλκοολούχα και μη που παράγονται από τα είδη *Artemisia* υπόκεινται σε περιορισμούς. Ωστόσο η

Πίνακας 3.6. Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του φασκόμηλου

	μg/mg εκχυλίσματος	μg/g φ.υ.
<i>α</i> -πινένιο	6,51±1,71	356,4±93,7
καμφένιο	1,05±0,18	57,2±9,9
<i>π</i> -κυμένιο	0,080±0,004	4,2±0,2
λιμονένιο	0,98±0,13	53,7±7,3
ευκαλυπτόλη	8,92±1,27	487,4±69,3
<i>γ</i> -τερπινένιο	0,33±0,04	18,2±2,1
λιναλοόλη	0,52±0,02	28,5±1,0
<i>α</i> -θουγιόνη	19,6±2,73	1072,8±149,4
<i>β</i> -θουγιόνη	3,16±0,37	173,2±20,3
καμφορά	35,51±5,31	1942,7±290,3
βορνεόλη	5,11±0,99	279,6±53,9
τερπιν-4-όλη	0,48±0,04	26,0±2,0
<i>π</i> -κυμενόλη	0,15±0,02	8,1±1,0
<i>α</i> -τερπινεόλη	0,47±0,09	25,8±5,1
οξικό βορνύλιο	5,51±0,84	301,3±45,8
θυμόλη	0,48±0,13	26,5±5,1
καρβακρόλη	0,80±0,33	44,0±18,2
<i>β</i> -καρυοφυλένιο	1,46±0,36	79,7±19,5
<i>α</i> -χουμουλένιο	1,66±0,41	90,8±22,3
οξείδιο του καρυοφυλλενίου	2,18±0,73	119,5±40,2
βιριδοφλορόρη	5,96±1,40	326,2±76,3

θουγιόνη ( $\alpha$ - και  $\beta$ -) μαζί με άλλες 14 ενώσεις απαγορεύονται να προστίθενται ως έχουν στα τρόφιμα. Οι Walch *et al.*, (2011) προσδιόρισαν τη θουγιόνη ( $\alpha$ - και  $\beta$ -) και τη καμφορά που περιέχονται σε φυτικό υλικό φασκόμηλο και σε πολλά τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα με βάση το φασκόμηλο. Αναφέρουν ότι σε αποξηραμένο φυτικό υλικό, η  $\alpha$ -θουγιόνη κυμαίνεται από 699-954 mg/kg, η  $\beta$ -θουγιόνη βρίσκεται μεταξύ 211-399 mg/kg και η καμφορά από 1651 έως 4322 mg/kg. Σε φρέσκο φυτικό υλικό οι τιμές κυμαίνονται από 341-1482 mg/kg για την  $\alpha$ -θουγιόνη, 82-419 mg/kg για τη  $\beta$ -θουγιόνη και 821-1695 mg/kg για την καμφορά. Αντίστοιχες τιμές αναφέρουν και οι Baranauskienė *et al.*, (2011) σε φρέσκο και αποξηραμένο φυτικό υλικό. Η ποσότητα της  $\alpha$ -θουγιόνης κυμαίνεται από 264,2 έως 1271,0 mg/kg στο φρέσκο υλικό και από 148,0-721,3 mg/kg στο αποξηραμένο.

Τα Α και Β- $\alpha$ -οξείδια της μπισαμπολόλης είναι τα κυρίαρχα συστατικά στο εκχύλισμα του χαμομηλιού με 1195,6  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. για το Β- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης και 2363,4  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. για το Α- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης. Ο Ζ-σπιροαιθέρας έπεται με 867,4  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. και ο Ε- με 409,2  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. σημαντική επίσης είναι και η παρουσία του Α- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόνης με 604,0  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. Στο ίδιο εύρος τιμών κυμαίνονται τα παραπάνω συστατικά σε μελέτη οργανικών εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διάφορες περιοχές της Ρουμανίας (Iordache *et al.*, 2009). Το Α- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης κυμαίνεται μεταξύ 682,2-1798,0  $\mu\text{g/g}$  φ.υ., ενώ χαμηλότερες τιμές παρατηρούνται για το Β- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόλης που οι τιμές είναι μεταξύ 55,1 και 230,9  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. Οι σπιροαιθέρες απαντούν από 563,7 μέχρι 1647,0  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. ο Ζ- και από 132,0 έως 582,0  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. ο Ε-. Όσον αφορά τις άλλες ενώσεις, η αρτεμισια κετόνη και το D-γερμακρένιο δεν ανιχνεύθηκαν, ενώ το Ε- $\beta$ -φαρνασένιο, η σπαθουλενόλη και το Α- $\alpha$ -οξείδιο της μπισαμπολόνης σε κάποια δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν και στα άλλα οι τιμές κυμαίνονται από 61,0-68,7  $\mu\text{g/g}$  φ.υ., 70,9-74,2  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. και 100-237,7  $\mu\text{g/g}$  φ.υ., αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.7.** Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του χαμομηλιού

	μg/mg εκχυλίσματος	μg/g φ.υ
αρτεμισία κετόνη	0,092±0,004	4,3±0,2
E-φαρνασένιο	2,91±0,09	137,7±4,3
D-γερμακρένιο	0,049±0,006	2,3±0,3
σπαθουλενόλη	0,35±0,01	16,3±0,5
B-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	25,28±3,60	1195,6±170,3
A-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	12,77±2,41	604,0±114,0
A-α-οξείδιο της μπισαμπολόλης	49,97±10,09	2363,4±477,3
Z-σπιροαιθεράς	18,34±1,13	867,4±53,4
E-σπιροαιθεράς	8,65±0,86	409,2±40,7

Τέλος, το εκχύλισμα του κρόκου χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη περιεκτικότητα σε σαφρανάλη (773,2 μg/g φ.υ.) και ακολουθεί το ΗΤCC (426,1 μg/g φ.υ.), η 4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλ-3-οξοκυκλο-εξα-1,4-διεν-1-καρβοξαλδεΐδη (216,6 μg/g φ.υ.) και η ισοφορόνη (182,0 μg/g φ.υ.). Οι Kanakis *et al.*, (2004) αναφέρουν ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων από 40,7 μέχρι 491,8 mg/100g για τη σαφρανάλη και 41,7-397,7 mg/100g για το ΗΤCC σε εκχύλισμα διαυθυλαιθέρα: νερού (1:1) ελληνικού κρόκου που παραλήφθηκαν με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους. Οι Alonso *et al.*, (1996), αναφέρουν ότι η περιεκτικότητα σαφρανάλης σε δείγμα ισπανικού κρόκου με την τεχνική της θερμικής εκρόφησης (thermal desorption) είναι 206,5 mg/kg, ήτοι 20,7 mg/100g, ώστε να είναι στην ίδια τάξη μεγέθους με τις παραπάνω τιμές. Αρκετά μεγαλύτερες τιμές σαφρανάλης στα 435,6 mg/100g και ΗΤCC 73,6 mg/100g παρατηρούνται σε ιρανικό κρόκο (Jalali-Heravi *et al.*, 2009). Η ισοφορόνη (20,1 mg/100g), η 4-κετοισοφορόνη (8,8 mg/100g) αναφέρονται σε παρόμοιες τιμές με αυτές της παρούσας μελέτης. Πιο πρόσφατα οι Culleré *et al.*, (2011) ποσοτικοποιώντας τη σαφρανάλη και την ισοφορόνη σε δείγματα ισπανικού κρόκου βρήκαν τιμές σαφρανάλης μέσα στο εύρος των συγκεντρώσεων των Kanakis *et al.*, (2004), υψηλότερη από αυτή των Alonso *et al.*, (1996) και χαμηλότερη από αυτή των Jalali-Heravi *et al.*, (2009) στα 1365 mg/kg. Όσο για την ισοφορόνη, η τιμή της βρέθηκε στα 99,1 mg/kg.

Πίνακας 3.8. Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του κρόκου

	μg/mg εκχυλίσματος	μg/g φ.υ
Φαινυλαιθυλική αλκοόλη	0,51±0,21	15,1±6,2
ισοφορόνη	6,19±1,03	182,0±30,3
4-κετοισοφορόνη	2,65±0,44	78,0±12,9
2,2,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξανοδιόνη	2,96±0,18	87,1±5,3
σαφρανάλη	26,60±1,82	773,1±47,1
4-μεθυλενοισοφορόνη	0,67±0,09	19,8±2,6
4-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλο-2-κυκλοεξεν-1-όνη	0,97±0,08	28,5±2,4
4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξο-κυκλοεξ-1-εν-1-καρβοξαλδεΐδη	0,63±0,10	18,5±2,8
4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξοκυκλοεξ-1,4-διεν-1-καρβοξαλδεΐδη	7,37±0,63	216,6±18,5
4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξεν-1-καρβοξαλδεΐδη ((HTCC)	14,49±1,81	426,1±53,2

### 3.3. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD/MS)

#### 3.3.1. Ποιοτικός προσδιορισμός

Τα φυτικά εκχυλίσματα που προήλθαν από την εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και μεθανόλη αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη σε σειρά με ανιχνευτή φωτοδιόδων και φασματόμετρο μαζών (LC-MS).

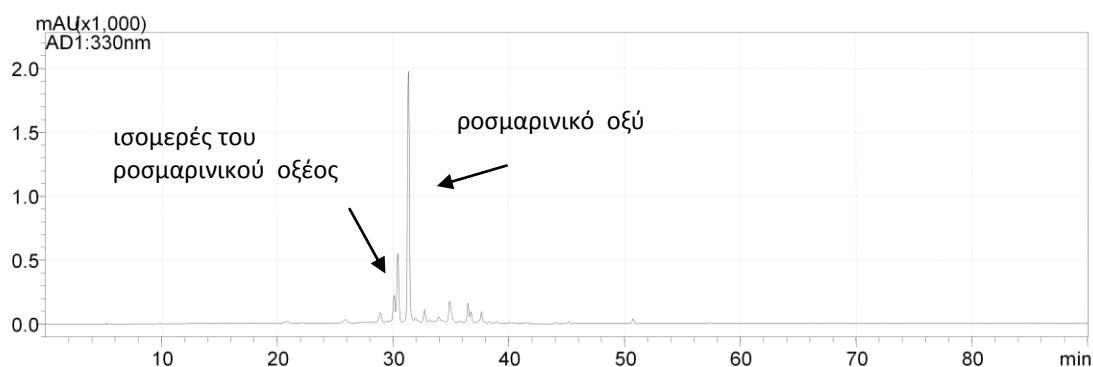
Οι κύριες κατηγορίες ενώσεων που προσδιορίστηκαν είναι τα φαινολικά οξέα τα φλαβονοειδή και τερπενικά παράγωγα. Η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών βασίστηκε στο συνδυασμό του μοριακού τους βάρους, του φάσματος μάζας, του χρόνου έκλυσης και του φάσματος υπεριώδους-ορατού. Συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των πρότυπων φαινολικών συστατικών και από βιβλιογραφικές αναφορές.

Στους πίνακες που ακολουθούν δίνονται οι αντίστοιχες προτεινόμενες δομές των συστατικών με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά, τα  $m/z$  των κύριων θραυσμάτων των ιόντων, το  $\lambda_{max}$ , το χρόνο έκλυσης και τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα.

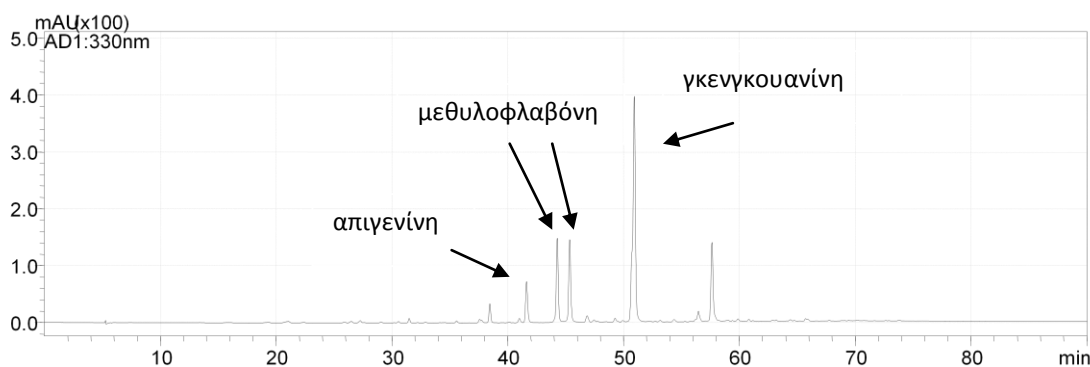
Όσον αφορά τα μεθανολικά εκχυλίσματα (MeOH) των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, το ροσμαρινικό οξύ ήταν η κύρια ένωση. Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι η παραπάνω ένωση βρίσκεται σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (Tagashira *et al.*, 1998; Lamaison *et al.*, 1991; Hohmann *et al.*, 1999; Janicsak *et al.*, 1999). Ταυτοποιήθηκαν επίσης φλαβονοειδή κυρίως σε μορφή γλυκοζιτών, φαινολικά οξέα και τερπενικές ενώσεις. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων με διαιθυλαιθέρα (DE), αυτά χαρακτηρίζονται κυρίως από την παρουσία άγλυκων μορφών φλαβονοειδών.

Στην περίπτωση του MeOH εκχυλίσματος του δεντρολίβανου, το κύριο φαινολικό συστατικό ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από την κορυφή στα 30.4 min με  $[M-H]^-$  359 και  $\lambda_{max}$  αντίστοιχο με αυτά του ροσμαρινικού οξέος, η οποία αποδίδεται σε κάποιο ισομερές αυτού (**Σχήμα 3.9**). Με βάση τις πρότυπες ενώσεις, στο ME εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν το χλωρογενικό οξύ, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, η λουτεολίνη, η διοσμετίνη, η

απιγενίνη και η γκενγκουανίνη (Πίνακας 3.9). Οι υπόλοιπες κορυφές αποδόθηκαν κυρίως σε υδροξυκιναμικά οξέα, γλυκοζίτες φλαβονών και τερπενικά παράγωγα. Το εκχύλισμα DE χαρακτηρίστηκε από την παρουσία κυρίως φλαβονοειδών και τερπενικών ενώσεων, όπως λουτεολίνη, απιγενίνη, διοσμετίνη, ακασετίνη, γκενγκουανίνη, καρνοσικό οξύ (Σχήμα 3.10). Παρατηρούμε επίσης την παρουσία ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος σε μικρά ποσοστά και την απουσία γλυκοζιτών των αντίστοιχων φλαβονοειδών, κάνοντας σαφές πως ο διαλύτης εκχύλισης παίζει σημαντικό ρόλο στην παραλαβή της κάθε κατηγορίας ενώσεων (Πίνακας 3.9).



**Σχήμα 3.9.** Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) δεντρολίβανου ( $\lambda=330$  nm).



**Σχήμα 3.10.** Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) δεντρολίβανου ( $\lambda=330$  nm).

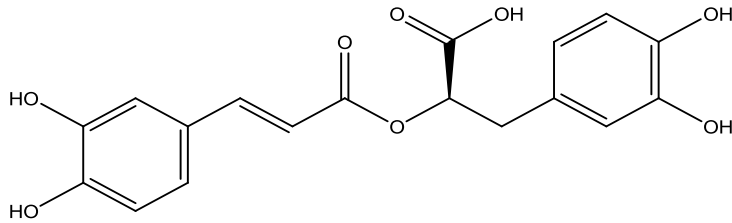
Στο MeOH εκχύλισμα, η κορυφή στα 20.9 min με  $[M-H]^-$  515 και  $\lambda_{max}$  324 nm αποδίδεται σε διεστέρα καφεϊκού-κινικού οξέος (Clifford *et al.*, 2003; Gouveia *et al.*, 2011; Guimaraães *et al.*, 2013). Παράγωγα υδροξυκιναμικού οξέος χαρακτηρίζονται και οι κορυφές στα 22.2, 27.2, 31.9, 33.1, 33.9, 35.7 min. Σε όλες τις παραπάνω



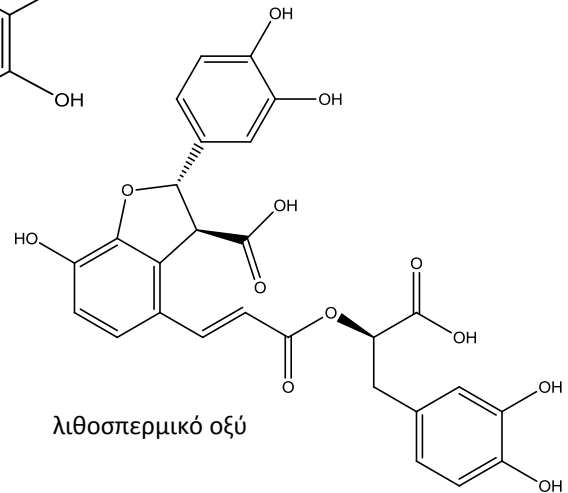
κορυφές υπάρχει το θραύσμα  $m/z$  179, υποδηλώνοντας ότι αποτελούν παράγωγα του καφεϊκού οξέος (Liu *et al.*, 2007). Ειδικότερα, οι κορυφές με  $[M-H]^-$  537 χαρακτηρίζονται ως ισομερή του σαλβιανολικού οξέος I (Liu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2011). Η κορυφή με  $[M-H]^-$  555, αναφέρεται ως ισομερές του σαλβιανολικού οξέος K (Lu και Foo, 1999) (Σχήμα 3.11).

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, η κορυφή στα 30.1 min με  $[M-H]^-$  477 με θραύσμα  $m/z$  301 και  $\lambda_{max}$  345 και 280 nm, βρέθηκε σε σημαντικό ποσοστό στην εκατοστιαία περιεκτικότητα του εκχυλίσματος. Τα φασματικά δεδομένα συμφωνούν με αυτά που αναφέρουν οι Lu και Foo, (1999), οι οποίοι αποδίδουν την κορυφή σε γλουκουρονίδιο υδροξυφλαβόνης και πιο συγκεκριμένα σε γλουκουρονίδιο της υδροξυλουτεολίνης. Δυο κορυφές είχαν το ίδιο  $[M-H]^-$  461, με διαφορετικούς χρόνους έκλυσης στα 32.7 και 34.9 min. Τα φάσματα MS και UV-Vis μας οδηγούν ότι η μεν πρώτη είναι γλυκοζίτης μεθυλοφλαβόνης. Το  $\lambda_{max}$  στα 335 nm μας κάνει να αποδώσουμε την κορυφή σε κάποιο γλυκοζίτη μεθυλοφλαβόνης και όχι σε γλουκουρονίδιο της λουτεολίνης που έχει  $\lambda_{max}$  γύρω στα 345 nm (Cuvelier *et al.*, 1996). Almela *et al.*, 2006; Kaliora *et al.*, 2014). Ίσως μπορεί να είναι η ομοπλανταγκενίνη, της οποίας τα μέγιστα του φάσματος συμφωνούν απόλυτα με τους Cuvelier *et al.*, (1996), Almela *et al.*, (2006) και Kaliora *et al.*, (2014). Άλλωστε, η παρουσία αυτής της ένωσης αναφέρεται σε μεθανολικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου (Cuvelier *et al.*, 1996; Almela *et al.*, 2006). Η δε άλλη κορυφή είναι ένα γλουκουρονίδιο της λουτεολίνης με τα φασματικά δεδομένα να μας οδηγούν ότι πρόκειται για το 3'-Ο-γλουκουρονιδίου της λουτεολίνης (Lu και Foo, 2000). Η κορυφή στα 25.9 min με  $[M-H]^-$  463 και θραύσμα  $m/z$  301 αποδίδεται σε γλυκοζίτη υδροξυφλαβόνης. Τα φασματικά δεδομένα συμφωνούν με τους Cuvelier *et al.*, (1996) και τους Lu και Foo, (2000), που ταυτοποιούν την κορυφή ως 7-Ο-γλυκοζίτη της 6-υδροξυλουτεολίνης. Αντίστοιχα και οι Almela *et al.*, (2006) αναφέρουν την ύπαρξη της παραπάνω ένωσης σε μεθανολικά εκχυλίσματα άγριου και καλλιεργούμενου δεντρολίβανου. Τρεις επιπλέον κορυφές είχαν  $[M-H]^-$  503 με θραύσματα  $m/z$  399 και 285, οι οποίες αποδίδονται σε ακετυλο-γλουκουρονίδιο της λουτεολίνης (Justesen, 2000; Ferreira *et al.*, 2012). Για τις κορυφές στα 44.1 και 45.1 min μελετώντας το φάσμα UV-Vis και το χρόνο έκλυσης καταλήγουμε ότι πρόκειται για μεθυλοφλαβόνες (Cuvelier *et al.*, 1996; Atoui *et al.*, 2005 Almela *et al.*, 2006). Οι

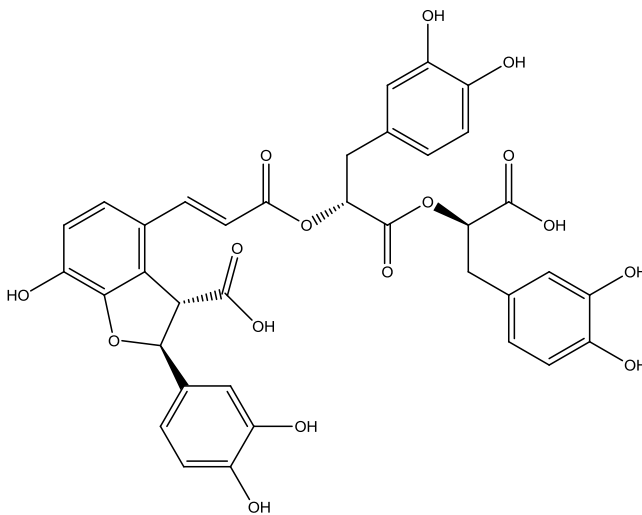
ενώσεις αυτές παρατηρούνται και στα δυο εκχυλίσματα, σαφώς με μεγαλύτερα ποσοστά στο DE. Ένα μικρό ποσοστό αυτών εκχυλίζεται και στη μεθανόλη.



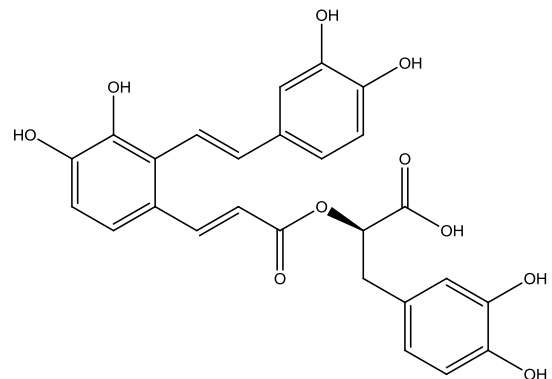
ροσμαρινικό οξύ



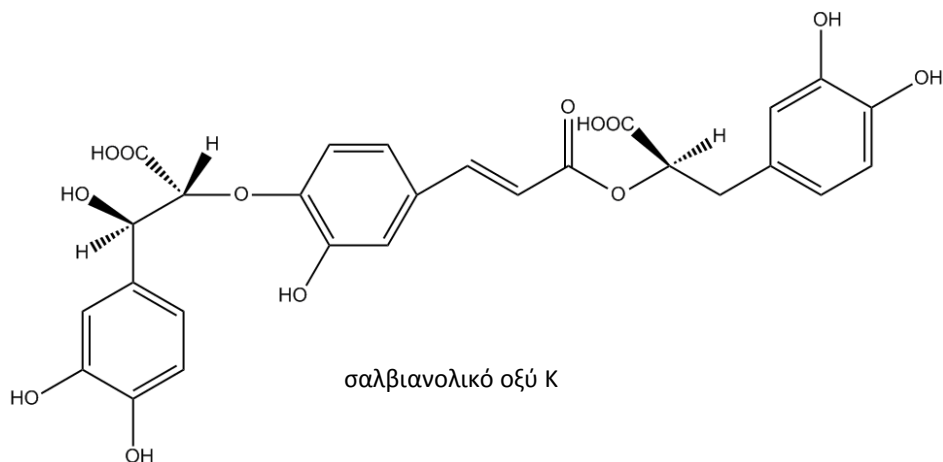
λιθοσπερμικό οξύ



σαλβιανολικό οξύ B



σαλβιανολικό οξύ A



σαλβιανολικό οξύ K

**Σχήμα 3.11.** Δομές ροσμαρινικού οξέος, λιθοσπερμικού οξέος και σαλβιανολικών οξέων

**Πίνακας 3.9.** LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του δεντρολίβανου

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
16.0	235, 323	353		χλωρογενικό οξύ	○	●
20.9	248, 294, 324	515	179	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	●
21.1	248, 294, 324	179		καφεϊκό οξύ	●	○
22.2		537	179	ισομερές του σαλβιονολικού οξέος I	○	●
25.9	254, 272, 343	463		γλυκοζίτης υδροξυφλαβόνης	○	●
27.2	250, 284, 324	555	493, 179	ισομερές του σαλβιονολικού οξέος K	○	●
28.9	254, 344	447	285	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	○	●
30.1	275, 345	477	301	γλυκουρονίδιο υδροξυλουτεολίνης	○	●
30.4	233,286, 324	359	179, 161	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	○	●
31.3	233,286, 324	359	179, 161	ροσμαρινικό οξύ	●	●
31.7	267, 338	431	269	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
31.9		487	359, 179	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	○	●
32.7	268, 335	461	299	γλυκοζίτης της μεθυλοφλαβόνης	○	●
33.1		537	359	ισομερές του σαλβιονολικού οξέος I	○	●
33.9	253, 285, 324	639	507, 359	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	○	●
34.9	240, 268, 341	461	285	γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	○	●
35.7		537	493, 179	ισομερές του σαλβιονολικού οξέος I	○	●
36.4	246,268, 339	503	285	ακετυλο γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	○	●
36.7	246,268, 339	503	399,285	ακετυλο γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	○	●
37.6	246,268, 339	503	285	ακετυλο γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	○	●
38.3	254, 347	285		λουτεολίνη	●	●
40.0	284, 332	345	301	μεθυλοφλαβόνη	●	●
40.3	277, 332	345	301	μεθυλοφλαβόνη	●	●
41.4	267, 338	269		απιγενίνη	●	●
41.7	267, 338	299		διοσμετίνη	●	●
44.1	273, 338	313		μεθυλοφλαβόνη	●	●

Χρόνος έκλυσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
45.1	283, 335	343		μεθυλοφλαβόνη	●	⊗
46.9	269, 350	299		μεθυλοφλαβόνη	●	○
49.3	270, 335	283		ακασεΐνη	⊗	○
50.7	275, 332	283		γκεγκουανίνη	●	●
51.9	282	359		μεθοξυκαρνοσόλη	⊗	⊗
52.5	289	359		ισομερές του μεθυλαιθέρα της ροσμανόλης	⊗	⊗
54.1	289	329	285	καρνοσόλη	●	●
56.1	284	343		ροσμαδιάλη	⊗	⊗
56.4	426	329		κινόνη του καρνοσικού οξέος	●	○
57.6	286	373		ισομερές του αιθυλαιθέρα της ροσμανόλης	●	⊗
62.9	234, 284	331		καρνοσικό οξύ	●	○

Όπου ● παρουσία συστατικού συστατικού σε ποσοστό <1%,

⊗ παρουσία συστατικού σε ποσοστό >1%,

○ απουσία συστατικού

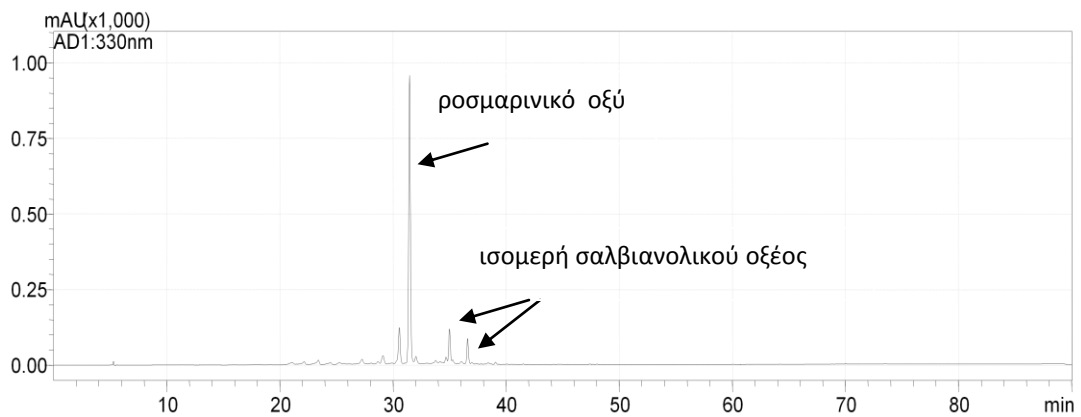
Τέλος, οι κορυφές που εμφανίζονται σε χρόνους μετά τα 50 min, υποδεικνύοντας ότι διαθέτουν λιγότερο πολικό χαρακτήρα και εμφανίζοντας  $\lambda_{\max}$  στα 290 nm, μπορούν να αποδοθούν σε τερπενικά παράγωγα όπως ροσμανόλη, μεθόξυ καρνοσόλη, ισομερές του μεθυλαιθέρα της ροσμανόλης, καρνοσόλη, ροσμαδιάλη, κινόνη του καρνοσικού οξέος κατά αντιστοιχία με το μοριακό ιόν και τα θραύσματα (Inatani *et al.*, 1982; Cuvelier *et al.*, 1994, 1996; Almela *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Kontogianni *et al.*, 2013) (**Σχήμα 3.19**). Οι παραπάνω ενώσεις αναφέρονται σε μεθανολικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου (Cuvelier *et al.*, 1996; Bicchi *et al.*, 2000; Wellwood και Cole; 2004; Troncoso *et al.*, 2005; Almela *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2010; Kontogianni *et al.*, 2013). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ωστόσο, πως αυτές οι ενώσεις αποτελούν προϊόντα διάσπασης του καρνοσικού οξέος που είναι ιδιαίτερα ασταθές σε μεθανολικά διαλύματα (Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του MeOH με τα αντίστοιχα του αφέψηματος του δεντρολίβανου παρατηρούμε ότι οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν σχεδόν οι ίδιες και στις δυο περιπτώσεις. Η διαφοροποίηση έγκειται στην περίπτωση του MeOH στο οποίο ταυτοποιήθηκαν επιπλέον τερπενικές ενώσεις που αυτό δεν έγινε σε κανένα από τα εξεταζόμενα αφεψήματα.

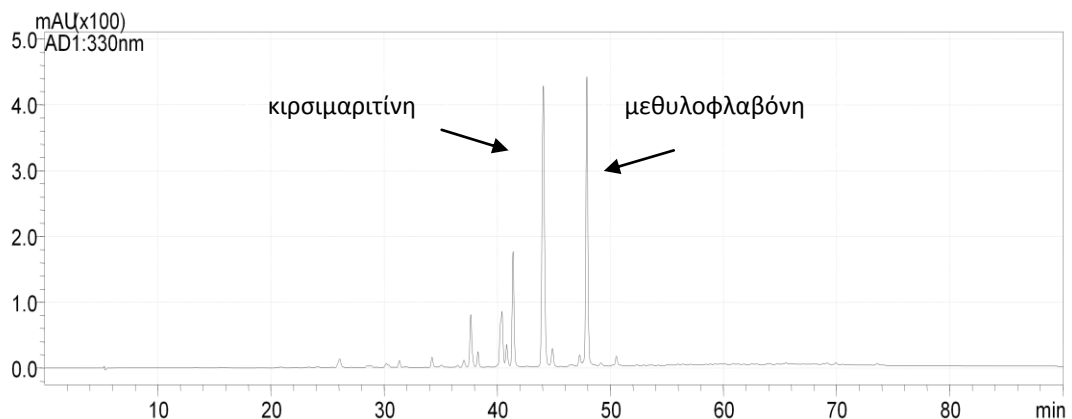
Το ροσμαρινικό οξύ ήταν επίσης η κύρια φαινολική ένωση που ταυτοποιήθηκε στο MeOH εκχύλισμα του δίκταμου, μαζί με ισομερές του (**Σχήμα 3.12**). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν με βάση τις πρότυπες ενώσεις που είχαμε στη διάθεσή μας, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, η γκενιστίνη, η απιγενίνη και η λουτεολίνη, ενώ στο DE εκχύλισμα η εριοδουκτυόλη, η ναριγενίνη, η λουεολίνη, η απιγενίνη, η ακασετίνη, η γκενγκουανίνη, καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ (**Πίνακας 3.10**).

Στο χρωματογράφημα του DE εκχυλίσματος (**Σχήμα 3.13**), οι δυο κύριες κορυφές ήταν αυτές στα 44.1 και 48.0 min, με  $[M-H]^-$  313 και 343, αντίστοιχα, οι οποίες από το φάσμα UV-Vis και το χρόνο έκλουσης καταλήγουμε ότι πρόκειται για μεθυλοφλαβόνες, με την πρώτη να αποδίδεται στη κισιμαριτίνη (Cuvelier *et al.*, 1996; Almela *et al.*, 2006). Η κορυφή στα 26.1 min αποδόθηκε στην ταξιφολίνη, όπου το φάσμα UV-Vis και MS επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία (Tsimogiannis *et al.*,

2006). Οι Kouri *et al.*, (2007), μελετώντας εκχύλισμα DE δίκταμου, αναφέρουν αντίστοιχα την ύπαρξη μικρών ποσοτήτων καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος. Από φλαβονοειδή αναφέρουν και αυτοί την ύπαρξη μεθυλοφλαβονών, ταξιφολίνης, εριοδουκτυόλης, λουτεολίνης, ωστόσο η κύρια ένωση της κατηγορίας αυτής ήταν η απιγενίνη. Η κύρια, ωστόσο, ένωση του εκχυλίσματος ήταν ο αιθυλαιθέρας της επιροσμανόλης. Βρέθηκαν επίσης καρνοσόλη και ροσμαδιάλη. Σε αντίθεση, το DE της παρούσας μελέτης χαρακτηρίζεται από την απουσία τερπενικών ενώσεων.



**Σχήμα 3.12.** Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) δίκταμου ( $\lambda=330$  nm).



**Σχήμα 3.13.** Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) δίκταμου ( $\lambda=330$  nm).

**Πίνακας 3.10.** LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του δίκταμου

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
21.0	248, 286, 322	515	353	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	●
21.2		179		καφεϊκό οξύ	⊗	○
22.1	271, 333	593	431	διγλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
23.4	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●
24.4	266, 342	637	285	διγλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	○	⊗
26.0	288	303		ταξιφολίνη	●	○
27.4	267, 333	621	431	διγλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
28.6	268, 333	431		γλυκοζίτης της απιγενίνης	○	⊗
29.1	254, 348	447	285	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	○	●
30.2	290	287		φλαβονοειδές	⊗	○
30.5	324,286,233	359	359	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	○	●
31.4	359,235	359		ροσμαρινικό οξύ	⊗	●
31.7		431		7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
32.0	331, 267	461		γλυκοζίτης της μεθυλοφλαβόνης	○	●
33.7	282, 322	537	296	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	⊗
34.1	282, 322	555	179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος K	○	⊗
34.3	287	287		εριοδουκτούλη	●	○
34.6	234, 288,322	493	296	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος A	○	●
34.9	234, 288,322	493	296	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος A	○	●
35.2	225, 286, 322		197, 179	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	○	⊗
36.0	224, 254, 310	537	493, 383, 295	ισομερές λιθοσπερμικού οξέος	○	⊗
36.5	244, 287,322	717	519, 359, 267	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος B	○	●
37.5	288	271		ναριγενίνη	●	○
38.4	254, 350	285		λουτεολίνη	●	⊗
40.3	256,289, 344	329		μεθυλοφλαβόνη	●	⊗

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
40.8	257, 271, 347	329		μεθυλοφλαβόνη	●	⊗
41.6	267, 338	269		απιγενίνη	●	⊗
44.1	274, 338	313		μεθυλοφλαβόνη	●	⊗
48.0	275, 335	343		μεθυλοφλαβόνη	●	⊗
49.3	270, 335	283		ακασετίνη	⊗	○
50.7	275, 332	283		γκεγκουανίνη	⊗	○

Όπου ● παρουσία συστατικού συστατικού σε ποσοστό <1%,

⊗ παρουσία συστατικού σε ποσοστό >1%,

○ απουσία συστατικού



**Πίνακας 3.11.** LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του μελισσόχορτου

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
20.9	243, 297, 324	179		καφεϊκό οξύ	●	⊗
28.9	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●
30.4	235,288, 324	359	359	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	⊗	●
31.4	234, 324	359	359	ροσμαρινικό οξύ	●	●
33.0	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●
33.9	252, 288, 313	493	537, 295	ισομερές λιθοσπερμικού οξέος	○	●
34.5	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●
34.9	240, 268, 341	461	285	γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	○	●
36.5	244, 287,322	717	519, 359, 267	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος B	○	⊗
37.8	253, 373	301		κερκετίνη	⊗	○
38.1	287, 320		179	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	○	●
38.4	254, 347	285		λουτεολίνη	●	○
38.9		313		άγνωστο	⊗	○
39.7	270, 373			φλαβονόλη	⊗	○
40.7	261, 370	285		καεμφερόλη	⊗	○
41.4	267, 340	269		απιγενίνη	⊗	○
43.2	254, 374			φλαβονόλη	⊗	○
44.5	254, 374	329		φλαβονόλη	⊗	○
45.2	260, 375			φλαβονόλη	●	○
48.3	278, 309	345		άγνωστο	●	○
49.9	265, 366	299		καμφερίδη	●	○
50.5	267, 336	283		γκεγκουανίνη	●	○

Όπου ● παρουσία συστατικού συστατικού σε ποσοστό <1%,

⊗ παρουσία συστατικού σε ποσοστό >1%,

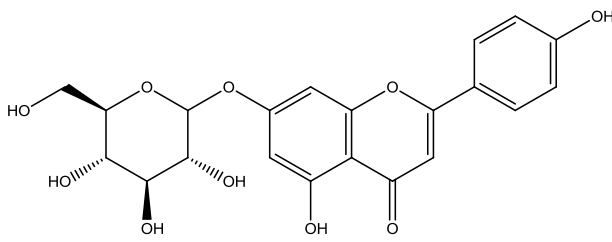
○ απουσία συστατικο

Σημαντικές κορυφές στο εκχύλισμα MeOH είναι αυτές στα 34.6 και 34.9 min με  $[M-H]^-$  493 που αποδίδονται σε ισομερή του σαλβιανολικού οξέος A (Hu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Η κορυφή στα 36.5 min αποδίδεται σε τριμερές του σαλβιανολικού οξέος με  $[M-H]^-$  717 (Hu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2011). Σε ισομερή του σαλβιανολικού οξέος I αποδίδονται και οι κορυφές στα 23.4 και 33.7 min με  $[M-H]^-$  537, σε ισομερές του σαλβιανολικού οξέος K η κορυφή στα 34.2 min (Hu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007) με  $[M-H]^-$  555, ενώ στα 36.0 min η κορυφή  $[M-H]^-$  537 δεν αποδίδεται σε ισομερή του σαλβιανολικού οξέος I, αλλά στο λιθοσπερμικό οξύ (**Σχήμα 3.11**). Το φάσμα UV-Vis διαφέρει από αυτό του σαλβιανολικού οξέος I, ενώ η θραυσματοποίηση είναι και αυτή διαφορετική, με τη μεγαλύτερη αφθονία να παρουσιάζει το  $m/z$  493 (Hu *et al.*, 2005). Η κορυφή στα 20.9 min πρόκειται για διεστέρα καφεϊκού-κινικού οξέος όπως και στην περίπτωση του δεντρολίβανου.

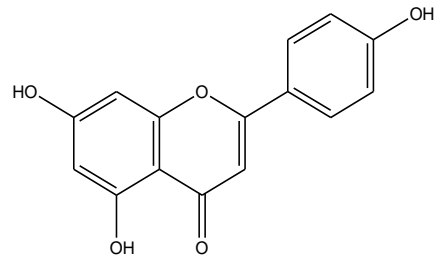
Οι υπόλοιπες κορυφές αποδίδονται σε φλαβονοειδή. Οι κορυφές στα 22.1 και 23.4 min χαρακτηρίζονται ως διγλυκοζίτες και αυτές στα 28.6 και 32.0 min ως μονογλυκοζίτες φλαβονών. Η κορυφή στα 22.1 min με  $[M-H]^-$  593 και  $m/z$  431 αποδίδεται σε διγλυκορουνίδιο της απιγενίνης (Zimmermann *et al.*, 2011; Kaliora *et al.*, 2014), ενώ αυτή στα 23.4 min με  $[M-H]^-$  637 και  $m/z$  285 σε διγλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (Zimmermann *et al.*, 2011). Στα 28.6 min με  $[M-H]^-$  431 και  $\lambda_{max}$  στα 331 και 267 nm, έχουμε ένα γλυκοζίτη της απιγενίνης (Zimmermann *et al.*, 2011) και στα 32.0 min γλυκοζίτη μεθυλοφλαβόνης (Kaliora *et al.*, 2014). Στα 44.1 και 48.0 min, δυο μικρές κορυφές εμφανίζονται με  $[M-H]^-$  313 και 343, οι οποίες αποτελούν τις κύριες κορυφές του DE εκχυλίσματος. Η παρουσία αυτών των δυο ενώσεων βρέθηκε και στο αντίστοιχο αφέψημα, ενώ και οι Kaliora *et al.*, (2014), αναφέρουν την παρουσία κισιμαριτίνης και μεθυλοφλαβόνης με αντίστοιχο MW σε υδατικό αφέψημα δίκταμου.

Το MeOH εκχύλισμα του μελισσόχορτου χαρακτηρίστηκε σχεδόν από την κυριαρχία του ροσμαρινικού οξέος και παραγώγων υδροξυκινναμικού οξέος ενώ παρατηρήθηκε και η παρουσία ενός γλυκοζίτη (**Σχήμα 3.15**). Με βάση τις πρότυπες ενώσεις ταυτοποιήθηκε καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ τόσο στο MeOH, όσο και στο DE

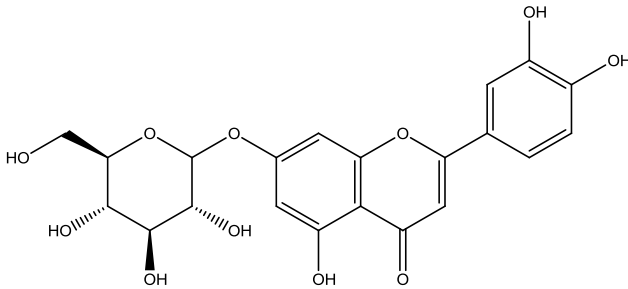
εκχύλισμα, κερκετίνη, λουτεολίνη, καεμφερόλη, απιγενίνη, καμφερίδη και γκεγκουανίνη στο DE.



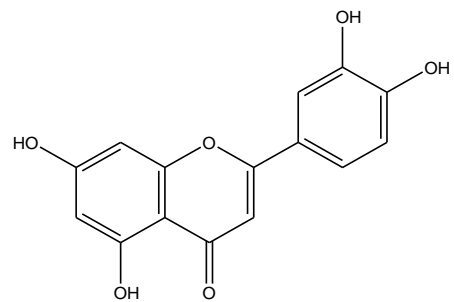
7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης



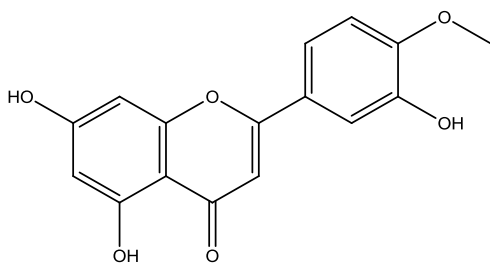
απιγενίνη



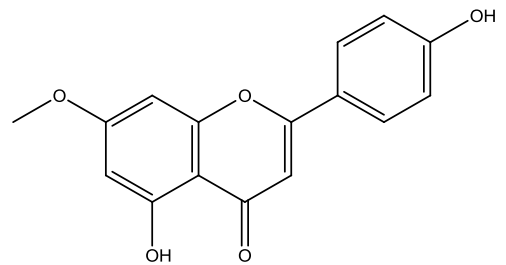
7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης



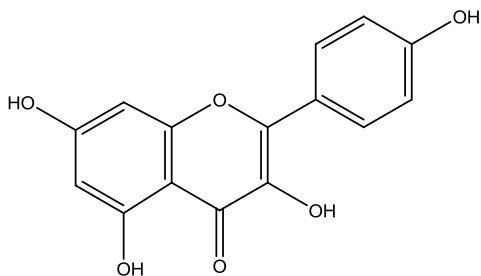
λουτεολίνη



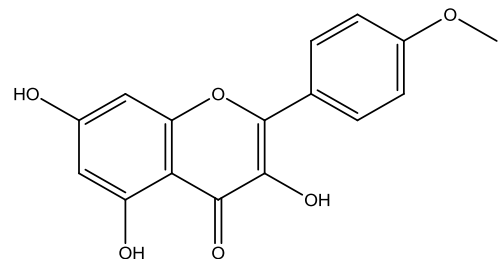
διοσμετίνη



γκενγκουανίνη



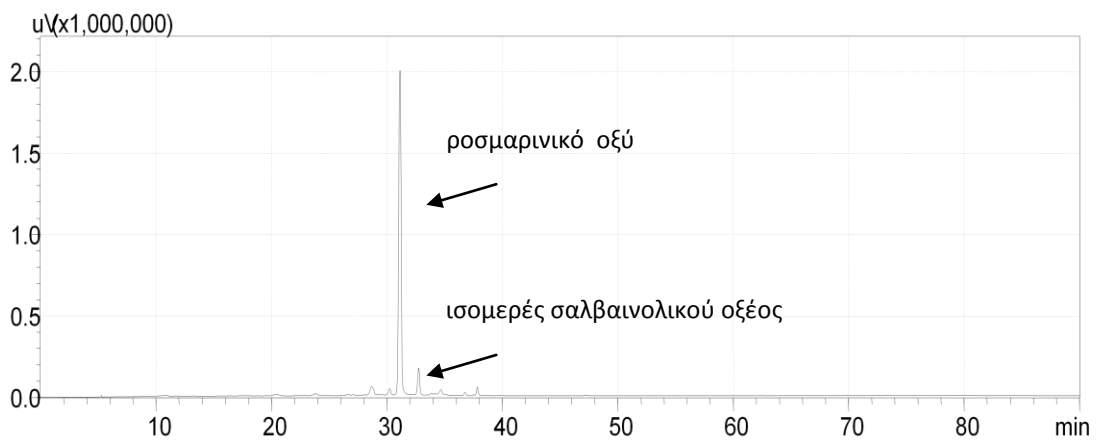
καεμφερόλη



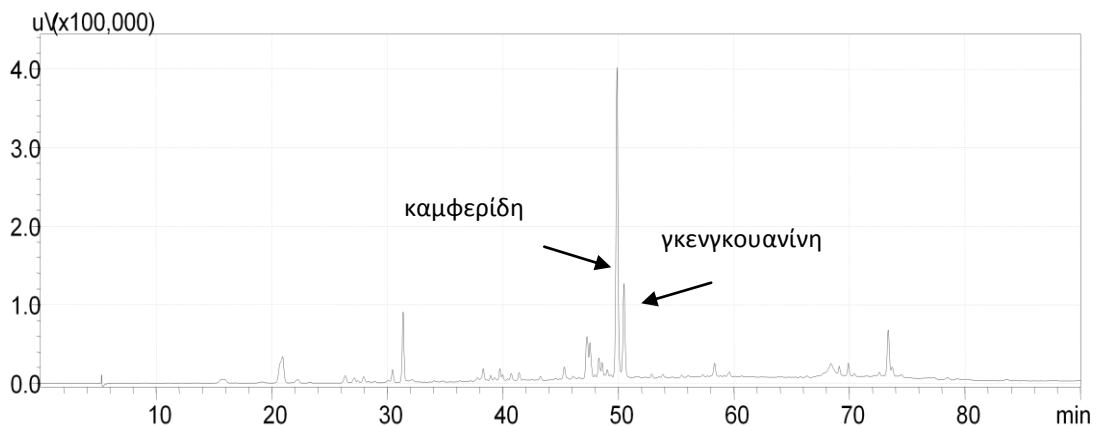
καμφερίδη

Σχήμα 3.14. Δομές φλαβονοειδών

Στο MeOH, η κορυφή στα 34.9 min, αποδίδεται σε γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης με τα φασματικά δεδομένα να μας οδηγούν ότι πρόκειται για το 3'-O-γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης (Lu και Foo, 2000). Σε υδατικά αφεψήματα μελισσόχορτου έχει αναφερθεί η παρουσία της παραπάνω ένωσης (Barros *et al.*, 2013). Με βάση τα φασματικά δεδομένα και τις βιβλιογραφικές αναφορές οι κορυφές που εμφανίζονται στα 28.9, 33.0, 33.9, 34.5, 36.5 και 38.1 min αποδίδονται σε παράγωγα καφεϊκού οξέος και δη σε παράγωγα του σαλβιανολικού οξέος, κυρίως διμερή και τριμερή παράγωγα και σε ισομερές του λιθοσπερμικού οξέος (Hu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).



**Σχήμα 3.15.** Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) μελισσόχορτου ( $\lambda=330$  nm).

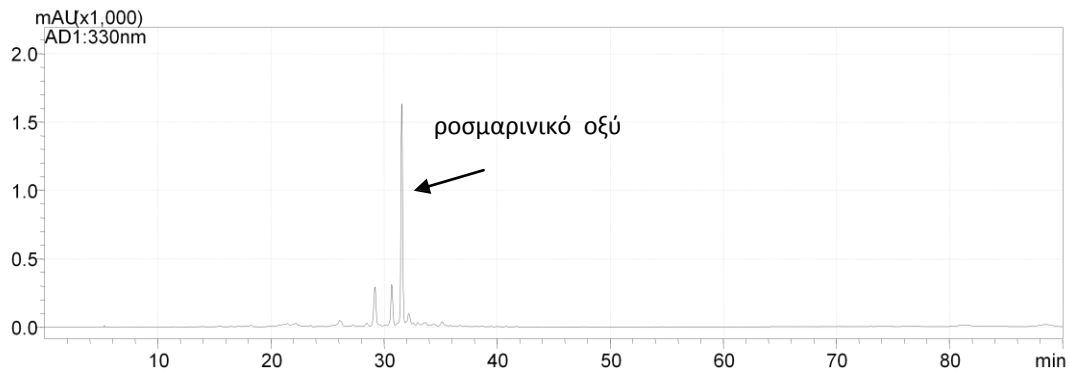


**Σχήμα 3.16.** Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) μελισσόχορτου ( $\lambda=330$  nm).

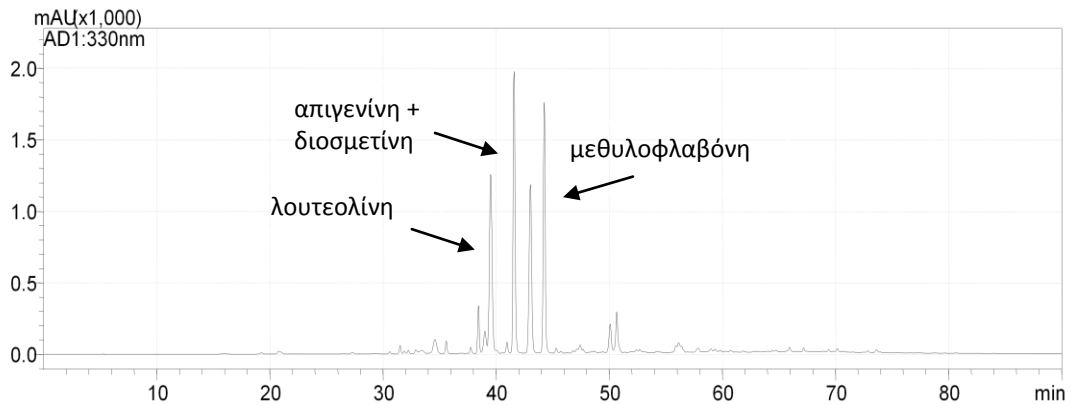
Στο DE εκχύλισμα κυριαρχούν οι άγλυκες μορφές των φλαβονοειδών, με τη καμφερίδη και τη γκενγκουανίνη να αποτελούν το 50% της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (**Σχήμα 3.16**). Οι δυο αυτές ενώσεις δεν έχουν αναφερθεί σε εκχυλίσματα μελισσόχορτου. Επιπλέον, αρκετές κορυφές αποδόθηκαν σε φλαβονόλες, από τα χαρακτηριστικά του φάσματος UV-Vis, χωρίς όμως να είμαστε σε θέση να τις ταυτοποιήσουμε. Σε αντιστοιχία με το εκχύλισμα του δίκταμου, δεν παρατηρήθηκαν τερπενικά παράγωγα. Ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν την ύπαρξη των παραπάνω ενώσεων σε εκχυλίσματα μελισσόχορτου. Οι Herodež *et al.*, (2003) μελέτησαν την κινητική εκχύλισης μελισσόχορτου του καρνοσικού οξέος εφαρμόζοντας διαφορετικές αναλογίες στερεού φυτικού υλικού και αιθανόλης, διαφορετικό μέγεθος φυτικού υλικού κατέληξαν ότι το καρνοσικό οξύ που υπάρχει στα φύλλα του μελισσόχορτου ανέρχεται στα 0,045%. Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν την ύπαρξη υδροξυκιναμικών παραγώγων και φλαβονοειδών σε οργανικά εκχυλίσματα μελισσόχορτου (Proestos *et al.*, 2005; Zgorcka και Glowniak, 2006; Dastmalchi *et al.*, 2008; Komes *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014).

Στην περίπτωση του φασκόμηλου η κύρια ένωση που ταυτοποιήθηκε στο MeOH εκχύλισμα ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από ισομερές του, τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (**Σχήμα 3.17**). Ταυτοποιήθηκαν με βάση τις πρότυπες ενώσεις επίσης και άλλα φαινολικά οξέα, όπως χλωρογενικό οξύ, κυναρίνη, καφεϊκό οξύ, και φλαβονοειδή, λουτεολίνη, απιγενίνη με τον 7-O-γλυκοζίτη της, διοσμετίνη, ακασετίνη, γκενγκουανίνη (**Πίνακας 3.12**). Από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, οι κορυφές στα 22.4 και 28.4 min με  $[M-H]^-$  593 και  $m/z$  431 αποδίδονται σε διγλυκοζίτες της απιγενίνης (Zimmermann *et al.*, 2011; Kaliora *et al.*, 2014). Η κορυφή στα 26.0 min με  $[M-H]^-$  463 και θραύσμα  $m/z$  301 αποδίδεται σε γλυκοζίτη υδροξυφλαβόνης. Τα φασματικά δεδομένα συμφωνούν με τους Cuvelier *et al.*, (1996) και τους Lu και Foo, (2000), που ταυτοποιούν την κορυφή ως 7-O-γλυκοζίτη της 6-υδρο-ξυ-λουτεολίνης. Όπως και στα MeOH των ήδη αναφερθέντων φυτών, έτσι και στην προκειμένη περίπτωση, το MeOH του φασκόμηλου χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη παραγώγων υδροξυκιναμικών οξέων και πιο συγκεκριμένα παραγώγων καφεϊκού οξέος, με τα παράγωγα του σαλβιονολικού οξέος να κυριαρχούν. Η παρουσία των τελευταίων είναι πολύ

διαδεδομένη σε πολικά εκχυλίσματα διαφόρων ειδών *Salvia* (Kasimu *et al.*, 1998; Tezuka *et al.*, 1998; Lu και Foo, 1999; Hu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2011). Τέλος, στο MeOH εκχύλισμα παρατηρείται στα 39.9 min κορυφή με  $[M-H]^-$  345 και  $\lambda_{\max}$  στα 284 nm, που μπορεί να αποδοθεί με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε ισομερές της ροσμαρόλης (Cuvelier *et al.*, 1994, 1996; Almela *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Kontogianni *et al.*, 2013).



**Σχήμα 3.17.** Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) φασκόμηλου ( $\lambda=330$  nm).



**Σχήμα 3.18.** Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) φασκόμηλου ( $\lambda=330$  nm).

**Πίνακας 3.12.** LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του φασκόμηλου

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
15.8	240, 324	353	179	χλωρογενικό οξύ	○	⊗
18.2	240, 324	487	193, 179	παράγωγο υδροξυ κινναμικού οξέος	○	●
19.9	237, 283, 324	515	179	1,5-διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	⊗
21.2	243, 297, 324		179	καφεϊκό οξύ	○	⊗
21.4	237, 281, 327		179	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	○	⊗
22.2	237, 281, 325	537	359, 285	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●
22.4	271, 333	593	431	διγλυκοζίτης της απιγενίνης	○	⊗
23.5	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	⊗
25.6	248, 294, 324	515	179	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	⊗
26.0	254, 272, 343	463	301	γλυκοζίτης υδροξυφλαβόνης	○	●
27.2	250, 284, 324	555	493, 179	ισομερές του σαλβιονολικού οξέος K	○	⊗
28.4	255, 267, 341	593	431	διγλυκοζίτης φλαβόνης	○	●
28.8	254, 350	447	285	7-ο- γλυκοζίτης της λουτεολίνης	○	●
29.1	254, 348	461	285	γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	○	●
30.6	235,288, 324	359	359	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	⊗	●
31.5	234, 324	359	359	ροσμαρινικό οξύ	⊗	●
31.8	284	345	301, 283	ισομερές της ροσμανόλης	⊗	○
32.1	267, 340	431	269	7-ο- γλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
32.2	284	345	301, 283	ισομερές της ροσμανόλης	⊗	○
32.5	249, 289, 333		359, 179	παράγωγο ροσμαρινικού οξέος	○	⊗
32.8	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●
32.9	249, 276, 334	345	301	φλαβόνη	⊗	○
33.4	254, 348	285		ισομερές της λουτεολίνης	⊗	○
33.6	253, 282, 324	537	493, 179	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	○	●

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
34.3	252, 270, 330		179	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	○	⊗
34.5	254, 270, 348	315		μεθοξυλουτεολίνη	●	○
35.1	288, 323	493	179, 161	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος A	○	●
35.5	282, 338	285		φλαβόνη (σκουτελαρίνη)	⊗	○
37.7	239, 289	345	299, 283	ισομερές της ροσμανόλης	⊗	○
38.4	254, 348	285		λουτεολίνη	●	⊗
39.0	267, 341	269		φλαβόνη	●	○
39.5	273, 336	299		μεθυλοφλαβόνη	●	○
39.9	284	345	301, 283	ισομερές της ροσμανόλης	⊗	⊗
40.6	261, 370	285		καεμφερόλη	⊗	○
40.9	254, 271, 347	315		μεθυλοφλαβόνη	⊗	○
41.4	267, 340	269		απιγενίνη	●	⊗
41.7	252, 348	299		διοσμετίνη	●	⊗
43.0	273, 335	313		μεθυλοφλαβόνη	●	○
44.2	273, 335	313		μεθυλοφλαβόνη	●	○
47.4	236, 291	345		ισομερές της ροσμανόλης	⊗	○
50.0	267, 339	283		ακασετίνη	●	○
50.7	275, 332	283		γκεγκουανίνη	●	○
51.9	289	359		μεθοξυκαρνοσόλη	⊗	○
52.4	289	359	285	ισομερές του μεθυλαιθέρα της ροσμανόλης	⊗	○
54.2	289	329	285	καρνοσόλη	●	○
56.1	284	343	315, 299	ροσμαδιάλη	●	○
56.4	426	329	285	κινόνη του καρνοσικού οξέος	●	○
57.6	286	373		ισομερές του αιθυλαιθέρα της ροσμανόλης	⊗	○
60.7	279, 409	301		5,6,7,10-τετραϋδρο-7-υδροξυ-ροσμαρικινόνη	●	○
61.8	286	373		ισομερές του αιθυλαιθέρα της ροσμανόλης	●	○



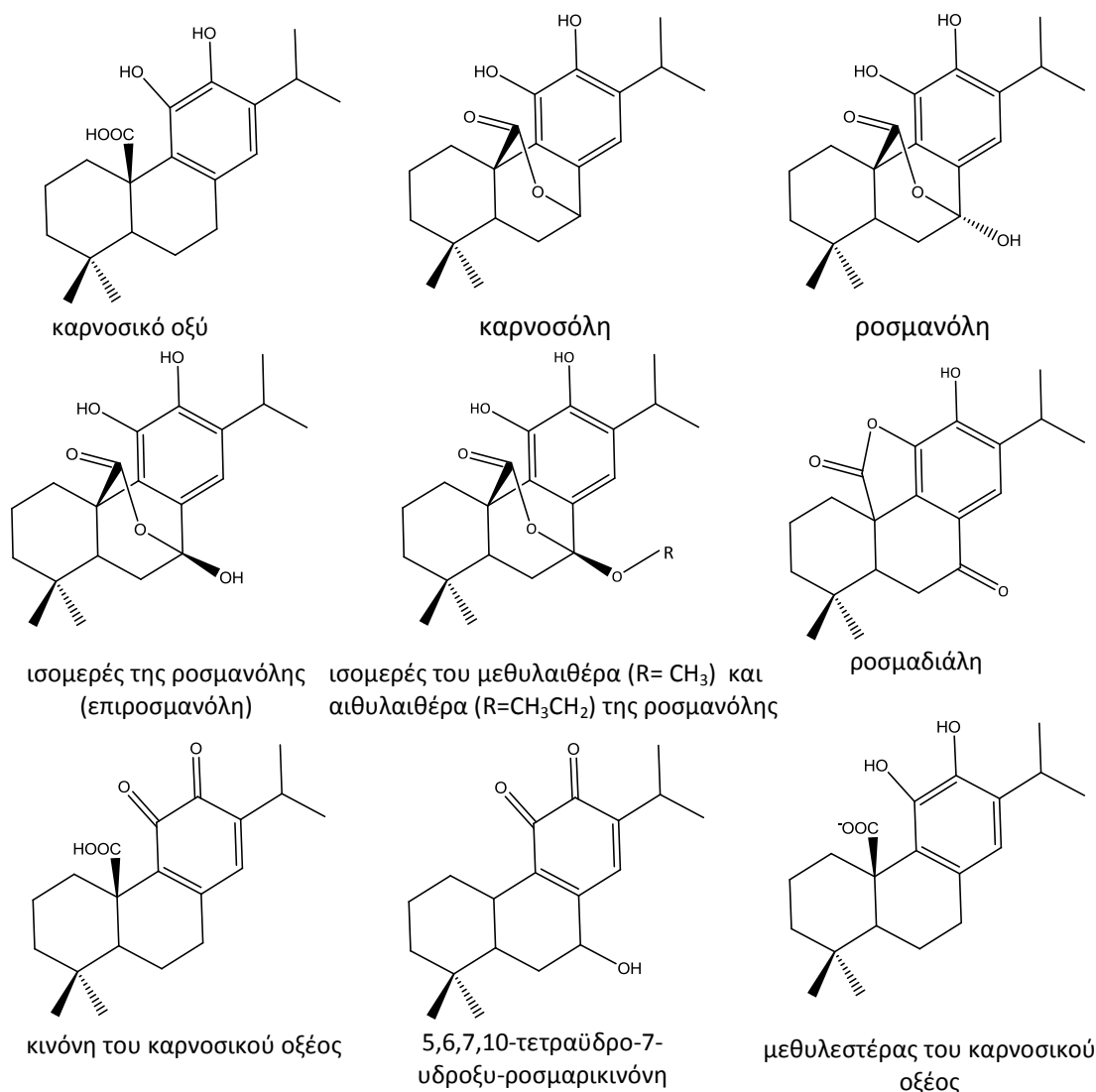
Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	$[M-H]^-$	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
62.9	234, 284	331	287, 244	καρνοσικό οξύ	●	○
64.7	237, 283	345	301	μεθυλεστέρας καρνοσικού οξέος	●	○

Όπου ● παρουσία συστατικού συστατικού σε ποσοστό <1%,

⊗ παρουσία συστατικού σε ποσοστό >1%,

○ απουσία συστατικού

Πλούσιο σε τερπενικά παράγωγα και άγλυκες μορφές φλαβονοειδών ήταν το DE εκχύλισμα (**Πίνακας 3.12**). Οι φλαβόνες αποτελούν την κύρια κατηγορία ενώσεων που παρατηρείται στο παραπάνω εκχύλισμα, με την απιγενίνη και τη διοσμετίνη να κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό. Σημαντικές κορυφές αποτελούν αυτές στα 43.0 και 44.2 min με  $[M-H]^-$  313, όπου η μια εξ αυτών μπορεί να αποδοθεί στη κισιμαριτίνη (Cuvelier *et al.*, 1996) (**Σχήμα 3.18**). Η παρουσία των παραπάνω ενώσεων έχει αναφερθεί σε αιθερικά, ακετονικά εκχυλίσματα (Azeias *et al.*, 2000; Zheng και Wang, 2001), σε ελαιούχα εκχυλίσματα (oleoresin) (Cuvelier *et al.*, 1996) και σε μεθανολικά εκχυλίσματα (Hossain *et al.*, 2010; Farhat *et al.*, 2013; Roby *et al.*, 2013) διαφόρων ειδών *Salvia*. Όσον αφορά τα τερπενικά παράγωγα (**Σχήμα 3.19**), πέραν του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης, παρατηρούνται επίσης και πολλά άλλα παράγωγα, όπως ισομερή της ροσμανόλης, του μεθυλαιθέρα της ροσμανόλης, του αιθυλαιθέρα της ροσμανόλης, ροσμαδιάλη, μεθοξυκαρνοσόλη, μεθυλεστέρας καρνοσικού οξέος, καθώς και δυο κινόνες (την κινόνη του καρνοσικού οξέος και την 5,6,7,10-τετραϋδρο-7-υδροξυ-ροσμαρικινόνη), η αναγνώριση των οποίων έγινε από τις βιβλιογραφικές αναφορές (Inatani *et al.*, 1982; Cuvelier *et al.*, 1994, 1996; Almela *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Kontogianni *et al.*, 2013). Καρνοσικό και καρνοσόλη έχει αναφερθεί σε εκχυλίσματα με ακετόνη φρέσκων φύλλων φασκόμηλου (Okamura *et al.*, 1994). Σε ελαιούχα εκχυλίσματα (oleoresin) αναφέρεται η παρουσία καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης, ροσμαδιάλης, ροσμανόλης, επιροσμανόλης (ισομερές της ροσμανόλης), μεθυλεστέρας καρνοσικού οξέος (Cuvelier *et al.*, 1994). Επίσης σε μεθανολικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν τόσο με την τεχνική των υπερηχών (Ollanketo *et al.*, 2002) όσο και σε συσκευή Soxhlet (Farhat *et al.*, 2013) ταυτοποιήθηκαν καρνοσόλη, καρνοσικό οξύ και ο μεθυλεστέρας καρνοσικού οξέος. Οι Hossain *et al.*, (2010) σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα αναφέρουν την ύπαρξη των παραπάνω ενώσεων καθώς επίσης ροσμαδιάλης, επιροσμανόλης και μεθοξυ καρνοσόλης. Οι ίδιες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν σε εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (Kontogianni *et al.*, 2013). Πρόσφατα, ακόμα και σε αφεψήματα εμπορικών σκευασμάτων φασκόμηλου αναφέρονται οι παραπάνω ενώσεις (Zimmermann *et al.*, 2011).



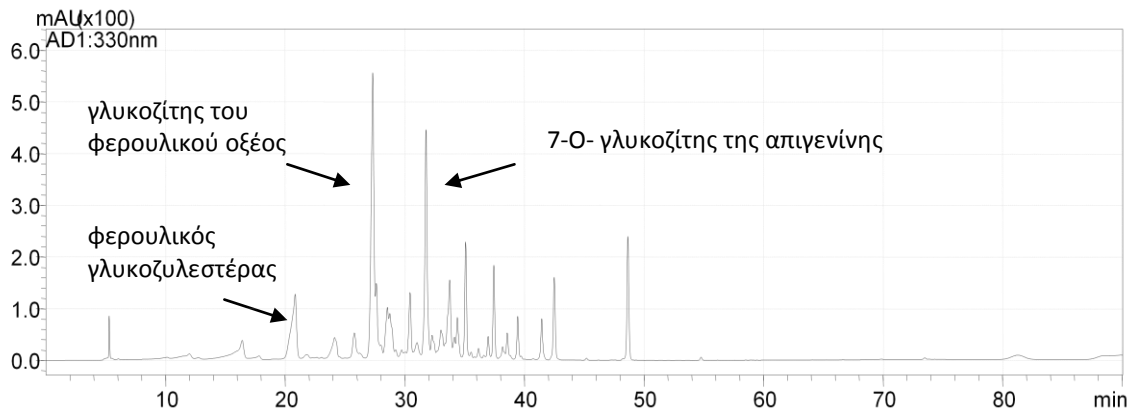
**Σχήμα 3.19.** Δομές τερπενικών παραγώγων

Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει την αποικοδόμηση του καρνοσικού οξέος σε μεθανολικό διάλυμα. Οι Brieskorn και Dömling (1969) παρατήρησαν ότι καρνοσικό οξύ μετατρέπεται σε καρνοσόλη σε μεθανολικό διάλυμα. Οι Cuvelier *et al.*, (1994) παρατήρησαν μια σημαντική μείωση του καρνοσικού οξέος, ενώ η καρνοσόλη, η ροσμαδιάλη, ο μεθυλεστέρας του καρνοσικού οξέος και μια άγνωστη ένωση αυξήθηκαν όταν το μεθανολικό διάλυμα του καρνοσικού οξέος αναλύθηκε για αρκετές ημέρες. Οι Wenkert *et al.*, από το 1965 πρότειναν ότι μια οξείδωση και μια ισομερίωση λαμβάνουν χώρα κατά την αποικοδόμηση του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη από μέσω μιας ο-κινόνη ως ενδιάμεσου. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την αντιοξειδωτική αντίδραση του καρνοσικού οξέος από τους Masuda *et al.*, (2001).

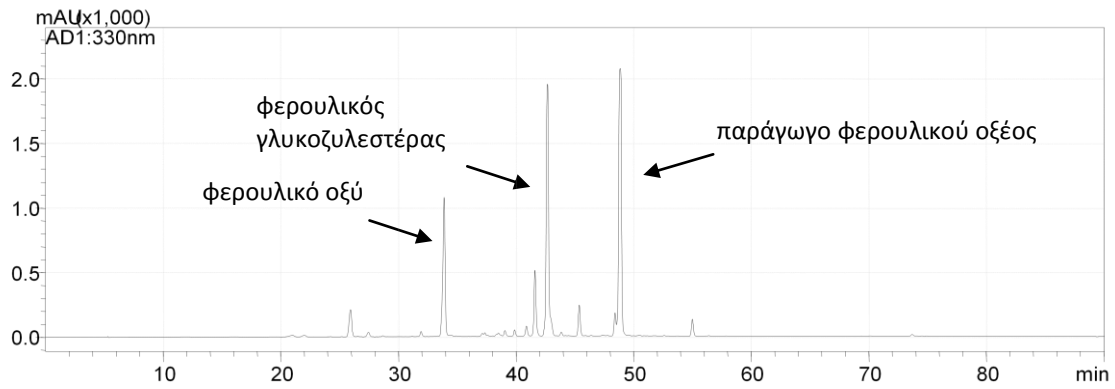
Αργότερα, οι Masuda *et al.*, (2002) αποκάλυψαν ότι καρνοσικό οξύ παράγει δύο κινόνες κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, με κύριο παράγωγο την ορθοκινόνη του καρνοσικού οξέος. Αυτή η κινόνη μπορεί να μετατραπεί σε καρνοσόλη, ροσμανόλη, και 7-μεθυλ ροσμανόλη σε διάλυμα μεθανόλης, όταν υπόκεινται σε 60 °C για 2 h (Masuda *et al.*, 2002). Πρόσφατα οι Song *et al.*, (2014), μελέτησαν το μηχανισμό αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, καταλήγοντας εκ νέου στη μικρή σταθερότητα του.

Όσον αφορά τα άλλα δυο φυτά που εξετάστηκαν το χαμομήλι και τον κρόκο, τα χρωματογραφήματα ήταν αρκετά διαφορετικά από αυτά των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*. Τα εκχύλισμα του χαμομηλιού χαρακτηρίστηκαν από την ύπαρξη παραγώγων υδροξυκιναμικού οξέος και φλαβονοειδών, όπου οι άγλυκες μορφές αυτών παρατηρήθηκαν στο DE εκχύλισμα, ενώ η παρουσία γλυκοζιδωμένων μορφών ήταν αισθητή στο ME (**Σχήματα 3.20 και 3.21**). Η κορυφή στα 25.8 min παρατηρήθηκε και στα δυο εκχυλίσματα. Με βάση το  $[M-H]^-$  161 και  $\lambda_{max}$  325 nm και βιβλιογραφικές αναφορές η ένωση χαρακτηρίστηκε ως ουμπελιφερόνη (Νονάκονά *et al.*, 2010).

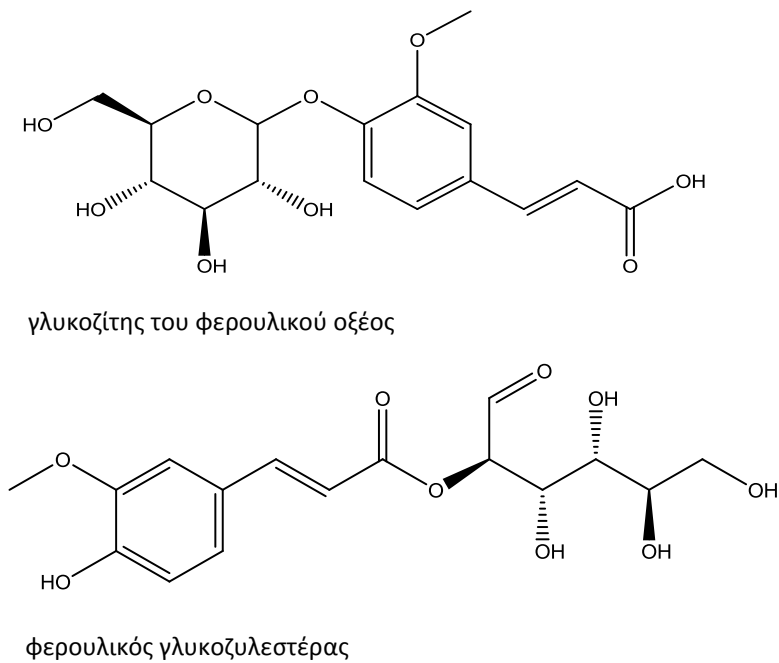
Στο DE εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν με βάση τις πρότυπες ενώσεις φλαβονοειδών ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, λουτεολίνη, κερκετίνη, καεμφερόλη, απιγενίνη. Τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, αναλόγως του φάσματος UV-Vis που είχαν, χαρακτηρίστηκαν είτε ως φλαβόνες είτε ως φλαβανόλες. Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, οι τρεις κυρίαρχες κορυφές ήταν αυτή στα 33.7 min που ταυτοποιήθηκε ως φερουλικό οξύ με βάση πρότυπη ένωση και άλλες δυο στα 42.5 και 48.7 min με  $\lambda_{max}$  241 και 310 nm. Η παρουσία του  $m/z$  193 και στις δυο, υποδηλώνει την παρουσία φερουλικού οξέος. Η μεν πρώτη με  $[M-H]^-$  711 αποδίδεται σε ένα διμερές φερουλικού γλυκοζυλεστέρα (Guimarães *et al.*, 2013b), ενώ η άλλη σε παράγωγο φερουλικού οξέος. Η κορυφή στα 27.2 min με  $[M-H]^-$  355 και  $m/z$  193, υποδηλώνει και εδώ την παρουσία φερουλικού οξέος. Επιπλέον, το  $\lambda_{max}$  στα 244, 293, 319 nm μας οδηγεί να τη χαρακτηρίσουμε ως γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος, όπου ο γλυκοζιτικός δεσμός δημιουργείται μέσω ενός -OH του αρωματικού δακτυλίου του οξέος και της γλυκόζης (Kogiannou *et al.*, 2013) (**Σχήμα 3.22**). Τέλος, η κορυφή στα 54.9 min με  $m/z$  311, 179 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για κάποιο παράγωγο του καφταρικού



Σχήμα 3.20. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) χαμομηλιού (λ=330 nm).



Σχήμα 3.21. Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) χαμομηλιού (λ=330 nm).



Σχήμα 3.22. Δομές παραγώγων φερουλικού οξέος

οξέος. Το παραπάνω οξύ έχει ανευρευθεί σε φυτά της οικογένειας Asteraceae (Miron *et al.*, 2011).

Το MeOH εκχύλισμα αποτελείται κυρίως από γλυκοζιδομένες μορφές απιγενίνης και παράγωγα καφεϊκού και φερουλικού οξέος. Τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με βάση τις πρότυπες ενώσεις ήταν το χλωρογενικό και το φερουλικό οξύ. Η κορυφή με  $[M-H]^-$  353,  $\lambda_{\max}$  324 nm ίδιο με αυτό του χλωρογενικού οξέος αποδίδεται σε ισομερές του χλωρογενικού οξέος, ενώ αυτές με  $[M-H]^-$  515 και με τα επιμέρους θραύσματα στα  $m/z$  353, 179 χαρακτηρίζονται ως διεστέρες καφεϊκού-κινικού οξέος (Clifford *et al.*, 2003; Gouveia *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2013a,b). Ωστόσο, η κύρια κορυφή είναι αυτή στα 27.2 min με  $[M-H]^-$  355, η οποία όπως και στην περίπτωση του DE εκχυλίσματος, χαρακτηρίζεται ως γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος (Kogiannou *et al.*, 2013). Η άλλη κορυφή με  $[M-H]^-$  355, και  $\lambda_{\max}$  238 και 309 nm σε γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος (Guimarães *et al.*, 2013b; Kogiannou *et al.*, 2013).

Στην περίπτωση των φλαβονοειδών ταυτοποιήθηκαν ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης και η απιγενίνη. Οι κορυφές με  $[M-H]^-$  473 και  $m/z$  431, 269 και  $\lambda_{\max}$  266 και 335 nm αποδίδονται σε γλυκοζίτες της απιγενίνης και πιο συγκεκριμένα οι 43 επιπλέον μονάδες στο σύννηδες  $[M-H]^-$  431 των γλυκοζιτών με υπομονάδα γλυκόζης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα της ύπαρξης ακετυλογλυκόζης (Mulinacci *et al.*, 2000; Lin και Harnly, 2010; Avula *et al.*, 2014). Οι τρεις κορυφές στα 31.0, 32.3 και 37.4 min, έχουν χαρακτηριστικό θραύσμα  $m/z$  269, οπότε αυτό τα καθιστά τρία παράγωγα της απιγενίνης. Η έρευνα των Guimarães *et al.*, (2013a) αναφέρει ότι το παράγωγο της απιγενίνης με  $[M-H]^-$  607 ότι είναι γλυκουρονικό παράγωγο, ενώ το παράγωγο με  $[M-H]^-$  515, σύμφωνα με τους Mulinacci *et al.*, (2000) είναι ένα διακετυλιωμένο παράγωγο. Οι Švehlíková *et al.*, (2004) αναφέρουν ότι η παρουσία αρκετών ακετυλιωμένων παραγώγων απιγενίνης μπορεί να οφείλεται στο χειρισμό κατά τη ξήρανση του δείγματος. Έχει αναφερθεί ότι αυξημένη θερμοκρασία αυξάνει την διάσπαση του εστερικού δεσμού (Tschiersch και Hölzl, 1992). Τέλος, οι κορυφές στα 24.1, 28.5, 32.3, 36.9, 39,8, 43.7 και 45.3 min από τα φάσματα UV-Vis αποδίδονται σε φλαβανόλες.

**Πίνακας 3.13.** LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του χαμομηλιού

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
16.0	240, 324	353	179	χλωρογενικό οξύ	○	●
17.8	240, 324	353	179	εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	⊗
20.8	234, 309	355	193	φερουλικός γλυκοζυλεστέρας	○	●
24.1	259, 354	479	301	γλυκοζίτης μεθυλοφλαβονόλης	○	●
25.8	253, 324	161		ουμπελιφερόνη	●	●
27.3	239, 295, 319	355		γλυκοζίτης του φερουλικού	⊗	●
27.5	244, 326	515	353, 179	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	●
28.5	258, 370	493	301	γλυκοζίτης φλαβονόλης	○	●
28.8	254, 350	447	285	7-ο- γλυκοζίτης της λουτεολίνης	○	●
29.1	254, 348	461	285	γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	○	⊗
30.4	244, 326	515	353, 179	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	○	●
31.0	267, 335	607	269	γλυκουρονικό παράγωγο της απιγενίνης	○	⊗
31.7	267, 340	431	269	7-ο- γλυκοζίτης της απιγενίνης	⊗	●
32.3	269, 366	507		γλυκοζίτης φλαβονόλης	○	●
33.0	252, 268, 335	477	447, 285	γλυκοζίτης φλαβόνης	○	●
33.8	239, 322	193		φερουλικό οξύ	●	●
34.1	266, 333	473	269	ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης	○	⊗
34.4	266, 333	473	269	ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
35.0	266, 339	473	269	ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●
36.9	255, 340	593	315, 301	γλυκοζίτης μεθυλοφλαβονόλης	○	⊗
37.2	255, 373	301		κερκετίνη	●	○
37.4	267, 338	515	269	διακετυλιωμένο παράγωγο της απιγενίνης	○	●
38.2	254, 350	285		λουτεολίνη	⊗	○
39.0	257, 354	345		μεθυλοφλαβόνη	⊗	○
39.4	310		193	παράγωγο φερουλικού οξέος	○	●

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
39.8	250, 373	345	283	φλαβονόλη	●	○
40.8	265, 363	285		καεμφερόλη	●	○
41.5	267, 340	269		απιγενίνη	●	●
42.5	241, 310	711	193	διμερές φερουλικού γλυκοζυλεστέρα	●	●
42.7	255, 352	299		μεθυλοφλαβόνη	●	○
43.7	265, 373	329	269	μεθυλοφλαβονόλη	●	○
45.3	257, 351	373		μεθυλοφλαβονόλη	●	○
48.2	241, 312		193, 179	παράγωγο φερουλικού οξέος	●	○
48.7	239, 310		193, 179	παράγωγο φερουλικού οξέος	●	●
54.8	251, 265, 317		311, 179	παράγωγο καφταρικού οξέος	●	○

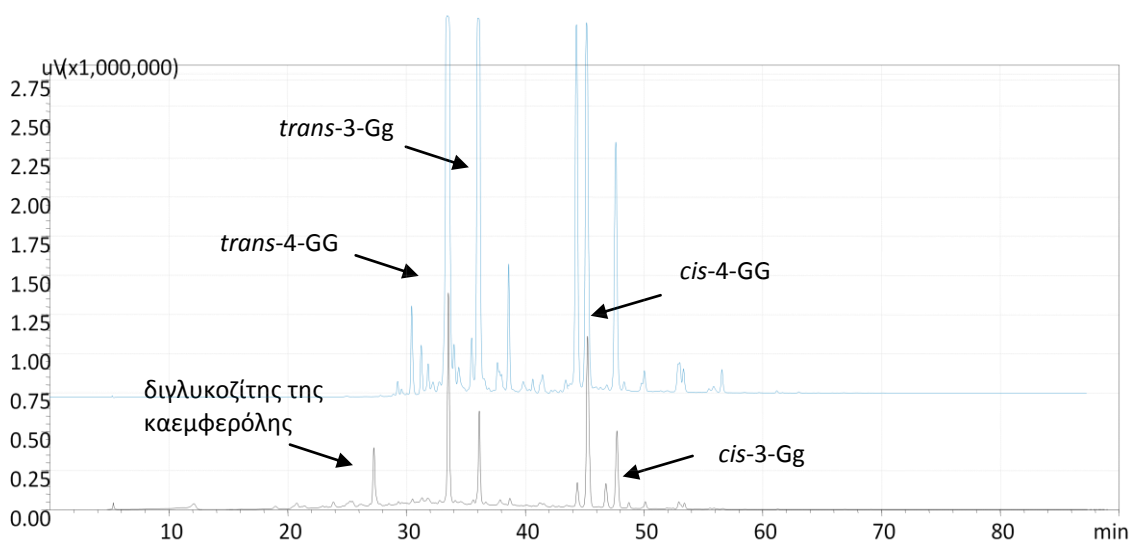
Όπου ● παρουσία συστατικού συστατικού σε ποσοστό <1%,

⊗ παρουσία συστατικού σε ποσοστό >1%,

○ απουσία συστατικού



Το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου (Σχήμα 3.23) χαρακτηρίζεται από την παρουσία των κροκίνων. Οι δυο κύριες κορυφές στα 33.6 και 36.2 min αποδίδονται σε *trans*-κροκίνες (Σχήμα 3.24). Η πρώτη αποδίδεται στην κροκετίνη εστεροποιημένη με δυο 2 μόρια γεντοβιόζης, *trans*-κροκίνη-4 (Tarantilis *et al.*, 1995) ή *trans*-4-GG, σύμφωνα με την κωδικοποίηση των Carmona *et al.*, (2006) με  $[M-H]^-$  975 και  $m/z$  651. Το θραύσμα  $m/z$  651 υποδηλώνει την απώλεια του μορίου γεντοβιόζης  $[M-H-γεντοβιόζη]^-$  (Lech *et al.*, 2009). Η δεύτερη μεγαλύτερη κορυφή με  $[M-H]^-$  813 αποδίδεται στη *trans*-κροκίνη-3, *trans*-3-Gg, όπου στο μόριο της κροκετίνης είναι εστεροποιημένα ένα μόριο γλυκόζης από τη μια και ένα μόριο γεντοβιόζης από την άλλη (Tarantilis *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2006). Τα θραύσματα  $m/z$  651 και 489 υποδηλώνουν την απώλεια του μορίου γλυκόζης  $[M-H-γλυκόζης]^-$  και της γεντοβιόζης, αντίστοιχα. Παρατήρηση που συμφωνεί με τους Lech *et al.*, (2009), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ESI<sup>-</sup> για την ανάλυση των δειγμάτων τους όπως έγινε και στην παρούσα μελέτη. Για τη συγκεκριμένη κορυφή, επιπλέον δυο θραύσματα εμφανίστηκαν με  $m/z$  927 και 859, τα οποία επίσης παρατηρήθηκαν και τους Lech *et al.*, (2009). Επειδή η οξίνιση της κινητής φάσης έγινε με μυρμιγκικό οξύ, τα παραπάνω δυο θραύσματα οφείλονται σε ιόντα προσθήκης (adduct ions), τα οποία είναι τα  $[M-H+μυρμιγκικό\ οξύ+μυρμιγκικό\ νάτριο]^-$  και  $[M-H+μυρμιγκικό\ οξύ]^-$ , αντίστοιχα (Lech *et al.*, 2009). Τα UV-Vis των κορυφών στα 38.7, 44.7 και 50.1 min υποδεικνύουν ότι



**Σχήμα 3.23.** Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) κρόκου — (λ=440 nm) και — (λ=330 nm)

έχουν τη διαμόρφωση *trans*-κροκινών. Η πρώτη χαρακτηρίζεται ως η *trans*-2-gg (Carmona *et al.*, 2006), δηλαδή, κροκετίνη εστεροποιημένη με ένα μόριο γλυκόζης σε κάθε άκρο (Tarantilis *et al.*, 1995). Η θραυσματοποίηση συμφωνεί με τους Lech *et al.*, (2009), οι οποίοι αναφέρουν  $m/z$  489 και 697. Το ιόν που προκύπτει από την απώλεια ενός μορίου γλυκόζης  $[M-H- \text{γεντοβιόζη}]^-$  δίνει θραύσμα 489, ενώ το ιόν προσθήκης  $[M-H+ \text{μυρμιγκικό οξύ}+ \text{μυρμιγκικό νάτριο}]^-$  δίνει θραύσμα 697. Η κορυφή στα 44.7 min με  $[M-H]^-$  651 και  $m/z$  765, αντιπροσωπεύει τη *trans*-2-G Carmona *et al.*, 2006), την κροκετίνη εστεροποιημένη με δυο μόρια γεντοβιόζης (Tarantilis *et al.*, 1995). Το  $m/z$  765 προέρχεται από το ιόν  $[M-H+ \text{μυρμιγκικό οξύ}+ \text{μυρμιγκικό νάτριο}]^-$  (Lech *et al.*, 2009). Ενώ η κορυφή στα 50.1 min με  $[M-H]^-$  489 αποδίδεται σε κροκετίνη με ένα μόριο γλυκόζης- *trans*-1-g (Tarantilis *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2006). Αντίστοιχα θραύσματα παρατηρούνται και στις αντίστοιχες περιπτώσεις των *cis*- διαμορφώσεων των παραπάνω κροκινών, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 3.14**.

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή του κρόκου, αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία της καεμφερόλης και των γλυκοζιτών της (Tarantilis *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2007). Οι Tarantilis *et al.*, (1995) είναι οι πρώτοι που αναφέρουν την ύπαρξη ενός διγλυκοζίτης της καεμφερόλης σε υδρομεθανολικό εκχύλισμα στιγμάτων κρόκου, ενώ δεν απέκλειαν την ύπαρξη και άλλων γλυκοζιτών. Οι Carmona *et al.*, το 2007 εξετάζοντας εκχυλίσματα στιγμάτων κρόκου επιβεβαίωσαν την παραπάνω υποψία και ταυτοποίησαν την ύπαρξη επιπλέον 4 γλυκοζιδιωμένων μορφών καεμφερόλης. Στα 12.5, 20.8, 25.4 και 27.2 min τα φασματικά δεδομένα με  $\lambda_{\max}$  350 και 266 nm υποδηλώνουν την παρουσία φλαβονολών και συγκεκριμένα γλυκοζιτών καεμφερόλης. Οι δυο πρώτες κορυφές με  $[M-H]^-$  771 και  $m/z$  609 υποδηλώνουν την παρουσία τριγλυκοζιτών. Σύμφωνα με τους Carmona *et al.*, (2007), ο πρώτος γλυκοζίτης της καεμφερόλης απαρτίζεται από μια γλυκόζη στη θέση 7 και μια σοφορόζη στη θέση 3, ενώ ο δεύτερος έχει μόρια γλυκόζης στις θέσεις 3,7,4'. Όσον αφορά τους διγλυκοζίτες, το  $m/z$  447 της κορυφής στα 25.4 min δείχνει την απώλεια ενός μορίου γλυκόζης, ενώ το αντίστοιχο θραύσμα δεν παρατηρείται για την κορυφή στα 27.2 min. Αυτή η διαφοροποίηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρώτη κορυφή αποδίδεται σε ένα γλυκοζίτη με 2 μόρια εξόζης, ενώ ο δεύτερος είναι καμφερόλη με ένα μόριο σοφορόζης στη θέση 3 (Carmona *et al.*, 2007) (**Σχήμα 3.25**).

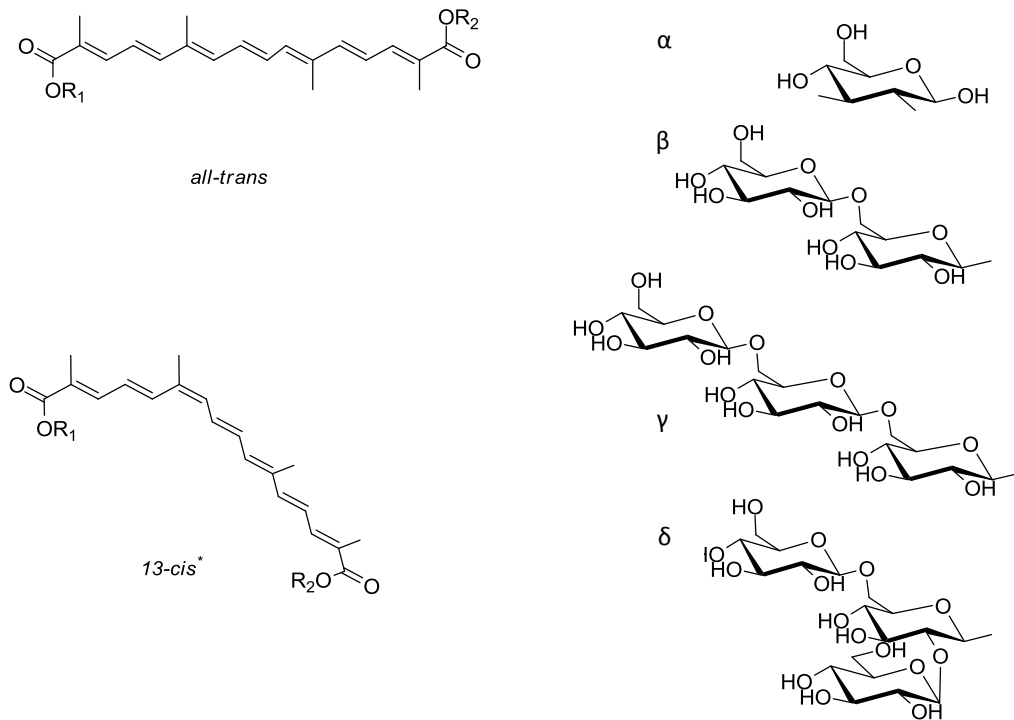
Πίνακας 3.14. LC-DAD-MS δεδομένα των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του κρόκου

Χρόνος έκλουσης	$\lambda_{\max}$	[M-H] <sup>-</sup>	κύρια θραύσματα	Όνομα ουσίας	DE	MeOH
12.5	266, 347	771	609	τριγλυκοζίτης της καεμφερόλης	○	●
20.8	265, 333	771	609	τριγλυκοζίτης της καεμφερόλης	○	●
23.8	250		375	πικροκροκίνη	●	●
25.4	267, 352	609	447	διγλυκοζίτης της καεμφερόλης	○	●
27.2	266, 350	609		διγλυκοζίτης της καεμφερόλης	○	●
30.3	250			άγνωστη	●	○
30.5	255, 441, 465		975	<i>trans</i> -5t-G	○	●
31.3	264, 440		975	<i>trans</i> -5-nG	○	●
33.6	263, 441, 463	975	651	<i>trans</i> -4-GG	○	●
35.5	262, 438, 465	975	651	<i>trans</i> -4-ng	○	●
36.2	262, 442, 467	813	927, 651	<i>trans</i> -3-Gg	○	●
38.7	263, 440, 465		697, 489	<i>trans</i> -2-gg	○	●
40.7	263, 366	285		καεμφερόλη	⊗	○
44.3	260, 434, 457	651	765, 697	<i>trans</i> -2-G	○	●
45.3	262, 323, 434, 457	975	651	<i>cis</i> -4-GG	○	●
47.8	261, 323, 433, 459	813	927, 651	<i>cis</i> -3-Gg	○	●
50.1	262, 433, 458	489		<i>trans</i> -1-g	○	⊗
52.9	261, 323, 433, 455	651	697, 489	<i>cis</i> -2-gg	○	⊗
53.4	261, 323, 433, 455	651	765, 697	<i>cis</i> -2-G	○	⊗

Όπου ● παρουσία συστατικού συστατικού σε ποσοστό <1%,

⊗ παρουσία συστατικού σε ποσοστό >1%,

○ απουσία συστατικού

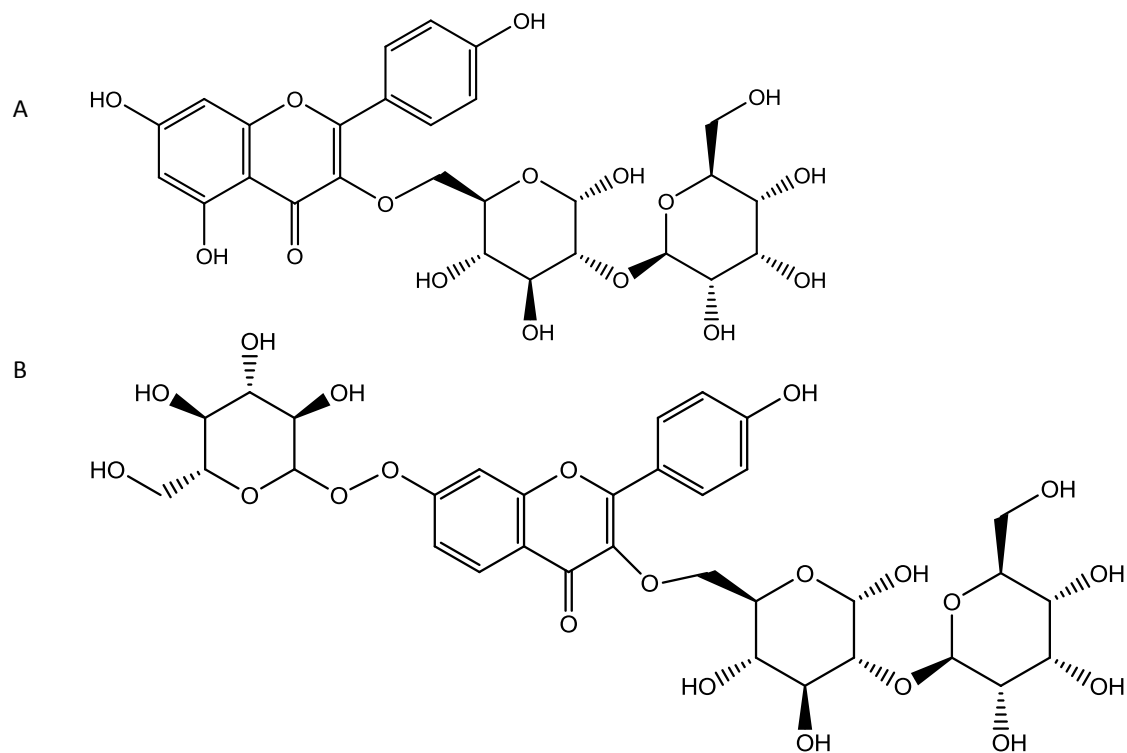


α) γλυκόζη, β) γεντοβιόζη γ) τρι-γλυκόζη δ) νεαπολιτενόζη

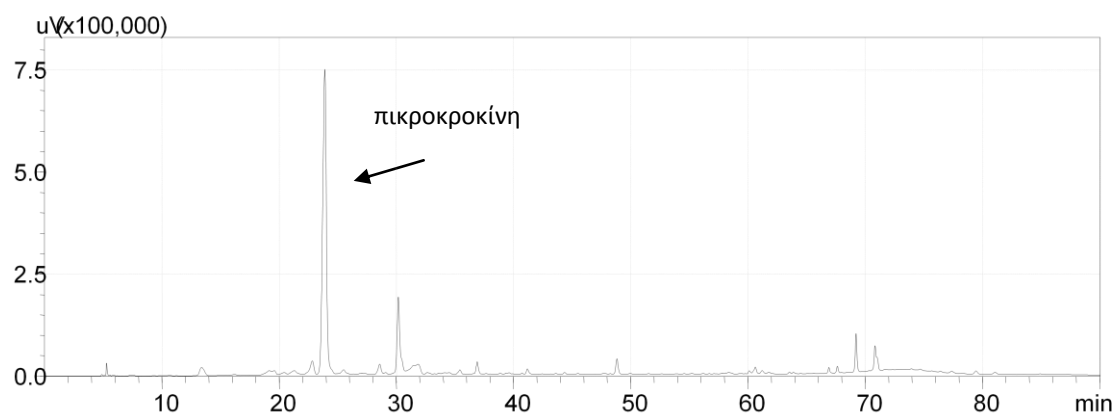
- $R_1$  = τρία μόρια γλυκόζης και  $R_2$  = ένα μόριο γεντοβιόζης *trans*- ή *cis*- crocin-5 (*trans*- ή *cis*-5-tG)  
 $R_1$  = ένα μόριο νεαπολιτενόζης και  $R_2$  = ένα μόριο γεντοβιόζης *trans*- ή *cis*- crocin-5' (*trans*- ή *cis*-5-nG)  
 $R_1$  =  $R_2$  = δυο μόρια γεντοβιόζης *trans*- ή *cis*- crocin-4 (*trans*- ή *cis*-4-GG)  
 $R_1$  = ένα μόριο νεαπολιτενόζης και  $R_2$  = ένα μόριο γλυκόζης *trans*- ή *cis*- crocin-4' (*trans*- ή *cis*-4-ng)  
 $R_1$  = ένα μόριο γεντοβιόζης και  $R_2$  = ένα μόριο γλυκόζης *trans*- ή *cis*- crocin-3 (*trans*- ή *cis*-3-Gg)  
 $R_1$  =  $R_2$  = ένα μόριο γεντοβιόζης *trans*- ή *cis*- crocin-4 (*trans*- ή *cis*-2-G)  
 $R_1$  =  $R_2$  = ένα μόριο γλυκόζης *trans*- ή *cis*- crocin-2' (*trans*- ή *cis*-2-gg)  
 $R_1$  = ένα μόριο γλυκόζης και  $R_2$  = H *trans*- ή *cis*- crocin-1 (*trans*- ή *cis*-1-g)

**Σχήμα 3.24.** Δομές κροκινών

Το αιθερικό εκχύλισμα (DE) του κρόκου χαρακτηρίστηκε από την παρουσία πικροκροκίνης (Σχήμα 3.26). Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση δεν ανιχνεύεται το  $[M-H]^-$  329, αλλά παρατηρούμε το θραύσμα  $m/z$  375 που προέρχεται από το ιόν  $[M-H+\text{μυρμιγκικό οξύ}]^-$  (Lech *et al.*, 2009). Πικροκροκίνη επίσης ταυτοποιείται και στο μεθανολικό εκχύλισμα. Επιπλέον, στο εκχύλισμα ανιχνεύθηκε καεμφερόλη.



**Σχήμα 3.25.** Γλυκοζίτες της καεμφερόλης A) διγλυκοζίτης με σοφορόζη στη θέση 3 και B) τριγλυκοζίτης με σοφορόζη στη θέση 3 και γλυκόζη στη θέση 7.



**Σχήμα 3.26.** Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) κρόκου ( $\lambda=250$  nm).

### 3.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη χρήση εξωτερικών προτύπων. Επειδή, δεν ήταν εφικτή η προμήθεια όλων των πρότυπων ενώσεων για την ποσοτικοποίηση της κάθε ουσίας, οι γλυκοζίτες της λουτεολίνης ποσοτικοποιήθηκαν ως προς τον 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης στα 350 nm, οι γλυκοζίτες της απιγενίνης και των φλαβονών ως προς τον 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης στα 340 nm, οι φλαβόνες ως προς απιγενίνη στα 340 nm, οι μεθυλοφλαβόνες ως προς τη γκενγουανίνη στα 340 nm, οι φλαβονόλες ως προς καεμφερόλη στα 370 nm, οι μεθυλφλαβονόλες ως καμφερίδη στα 370 nm, οι γλυκοζίτες των φλαβονολών ως προς ρουτίνη στα 350 nm, το καφεϊκό και φερουλικό οξύ ως προς καφεϊκό οξύ στα 330 nm, ενώ τα παράγωγα καφεϊκού και φερουλικού οξέος ως προς το χλωρογενικό οξύ στα 330 nm, τα τερπενικά παράγωγα ως προς το καρνοσικό οξύ στα 285 nm. Από την ανάλυση διαφόρων συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων των παραπάνω προτύπων ενώσεων, δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς ως προς τα αντίστοιχα εμβαδά. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.15) φαίνονται το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε ένωση και οι αντίστοιχες κλίσεις αυτών μέσω των οποίων έγινε η ποσοτικοποίηση των ενώσεων.

**Πίνακας 3.15.** Πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων και εύρος συγκεντρώσεων

	$\lambda_{\max}$ (nm)	Εύρος συγκεντρώσεων (mg/L)	Κλίση ευθείας
<b>Απιγενίνη</b>	340	1-50	$R^2=0,99997$
<b>7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>	340	1-100	$R^2=0,99999$
<b>Γκενγκουανίνη</b>	340	0,5-50	$R^2=0,99986$
<b>Εριοδουκτούλη</b>	290	0,5-50	$R^2=0,99988$
<b>Καμφερίδη</b>	370	1-50	$R^2=0,99993$
<b>Καεμφερόλη</b>	370	1-50	$R^2=0,99995$
<b>Καρνοσικό οξύ</b>	280	1-250	$R^2=0,99540$
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	330	0,5-50	$R^2=0,99979$
<b>Λουτεολίνη</b>	350	1-50	$R^2=0,99998$
<b>7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης</b>	350	1-48,3	$R^2=0,99991$
<b>Ναριγενίνη</b>	290	0,5-56	$R^2=0,99946$
<b>Ροσμαρινικό οξύ</b>	330	1-250	$R^2=0,99852$
<b>Ρουτίνη</b>	370	1-50	$R^2=0,99991$
<b>Χλωρογενικό οξύ</b>	330	1-50	$R^2=0,99950$

Στους πίνακες που ακολουθούν παραθέτονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των μεθανολικών (MeOH) και αιθερικών (DE) εκχυλισμάτων των φυτών.

**Πίνακας 3.16.** Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του δεντρολίβανου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
16.0	χλωρογενικό οξύ	1,13±0,16	110,7±15,7
20.9	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	2,19±0,13	214,5±12,9
21.1	καφεϊκό οξύ	1,46±0,06	143,0±5,6
22.2	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	0,74±0,08	72,7±8,0
25.9	<b>γλυκοζίτης υδροξυφλαβόνης</b>	<b>5,31±0,16</b>	<b>520,0±15,1</b>
27.2	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος K	1,16±0,23	113,7±22,2
28.9	<b>7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης</b>	<b>5,45±0,73</b>	<b>534,2±71,9</b>
30.1	<b>γλυκουρονίδιο υδροξυλουτεολίνης</b>	<b>12,33±0,12</b>	<b>1208,2±11,9</b>
30.4	<b>ισομερές του ροσμαρινικού οξέος</b>	<b>23,61±2,27</b>	<b>2313,4±222,6</b>
31.3	<b>ροσμαρινικό οξύ</b>	<b>100,81±1,77</b>	<b>9879,3±173,6</b>
31.7	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	0,91±0,11	89,2±10,8
31.9	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	1,57±0,09	153,5±9,2
32.7	<b>γλυκοζίτης της μεθυλοφλαβόνης</b>	<b>5,03±0,08</b>	<b>492,6±7,8</b>
33.1	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	1,05±0,22	103,2±21,2
33.9	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	3,10±0,14	303,9±14,0
34.9	<b>γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης</b>	<b>11,05±0,30</b>	<b>1082,8±29,4</b>
35.7	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	0,93±0,09	91,4±9,3
36.4	<b>ακετυλογλυκουρινίδιο της λουτεολίνης</b>	<b>6,38±0,06</b>	<b>624,9±5,9</b>
36.7	ακετυλογλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	3,62±0,05	354,9±4,9
37.6	ακετυλογλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	3,64±0,07	357,0±7,0
38.3	λουτεολίνη	0,83±0,01	81,4±0,7
40.0	μεθυλοφλαβόνη	0,31±0,22	103,2±21,2
40.3	μεθυλοφλαβόνη	0,25±0,02	30,8±1,9
41.4	απιγενίνη	0,37±0,03	36,5±2,6
44.1	μεθυλοφλαβόνη	0,39±0,01	38,3±1,1
45.1	μεθυλοφλαβόνη	0,51±0,04	50,0±4,3
46.9	μεθυλοφλαβόνη	0,09±0,01	8,9±0,1
49.3	ακασετίνη	0,07±0,01	6,8±0,9
50.7	γκενγκουανίνη	0,99±0,01	97,0±1,3
51.9	μεθοξυκαρνοσόλη	1,78±0,14	174,8±14,0
52.5	ισομερές του μεθυλαιθέρα της ροσμανόλης	1,23±0,03	120,4±2,5
54.1	<b>καρνοσόλη</b>	<b>9,07±0,09</b>	<b>888,8±9,3</b>
56.1	ροσμαδιάλη	2,40±0,02	234,7±2,4
57.6	ισομερές του αιθυλαιθέρα της ροσμανόλης	1,88±0,17	184,6±16,6

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

**Πίνακας 3.17.** Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του δεντρολίβανου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
21.1	καφεϊκό οξύ	0,53±0,00	37,1±0,1
31.3	ροσμαρινικό οξύ		ίχνη
38.3	λουτεολίνη	0,27±0,01	18,±0,5
40.0	μεθυλ φλαβόνη		ίχνη
40.3	μεθυλο φλαβόνη		ίχνη
41.4	απιγενίνη	0,51±0,00	35,3±0,1
44.1	μεθυλοφλαβόνη	0,73±0,01	51,1±1,1
45.1	μεθυλοφλαβόνη	0,73±0,04	51,3±4,3
46.9	μεθυλοφλαβόνη	0,09±0,01	6,4±0,1
49.3	ακασετίνη	0,05±0,01	6,8±0,1
50.7	γκενγκουανίνη	2,36±0,01	165,2±0,1
51.9	μεθοξυκαρνοσόλη	3,04±0,05	212,2±3,5
52.5	ισομερές του μεθυλαιθέρα της ροσμανόλης	1,56±0,03	109,2±2,5
54.1	<b>καρνοσόλη</b>	<b>33,55±0,31</b>	<b>2344,3±21,7</b>
56.1	ροσμαδιάλη	2,55±0,60	178,0±42,6
56.4	<b>κινόνη του καρνοσικού οξέος</b>	<b>23,25±0,81</b>	<b>1624,7±56,6</b>
57.6	<b>ισομερές του αιθυλαιθέρα της ροσμανόλης</b>	<b>17,39±0,07</b>	<b>1215,4±5,2</b>
62.9	<b>καρνοσικό οξύ</b>	<b>45,19±1,58</b>	<b>3157,9±110,3</b>
64.7	<b>μεθυλεστέρας καρνοσικού οξέος</b>	<b>8,02±0,24</b>	<b>560,8±16,7</b>

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

Από την ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων αποτυπώνεται ότι το ροσμαρινικό οξύ είναι το κυρίαρχο συστατικό των MeOH εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Lamiales, η συγκέντρωση του οποίου κυμαίνεται από 43,87 έως 122,56 μg/mg εκχυλίσματος. Με τη μικρότερη τιμή να προσδιορίζεται στο εκχύλισμα του δίκταμου και τη μεγαλύτερη τιμή σε αυτό του μελισσόχορτου. Τα εκχυλίσματα των δυο αυτών φυτών είναι αντίστοιχα το πιο φτωχό και το πιο πλούσιο σε φαινολικά οξέα (67,35 έναντι 152,31 μg/mg εκχυλίσματος). Στο σύνολο των φλαβονοειδών το πιο πλούσιο φυτικό MeOH εκχύλισμα ήταν αυτό του δεντρολίβανου, ακολουθούμενο από αυτό του φασκόμηλου, του δίκταμου και τέλος του μελισσόχορτου.

Από την πλευρά των DE εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Lamiales, τα πιο πλούσια φυτικά εκχυλίσματα ήταν του φασκόμηλου και του δεντρολίβανου, στα οποία κυριαρχούν οι τερπενικές ενώσεις και παραγώγων τους, ενώ τα αντίστοιχα



DE εκχυλίσματα του δίκταμου και του μελισσόχορτου ήταν πιο φτωχά, με την παρουσία φλαβονοειδών να υπερτερεί.

Αναφορικά και από άλλες μελέτες εκχυλισμάτων μελισσόχορτου έχει αναφερθεί μειωμένη ύπαρξη φλαβονοειδών, ενώ το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί την κύρια ένωση (Fecka και Turek, 2007; Dastmalchi *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2013). Οι Azceusz και Wesolowski (2013) εξετάζοντας 19 δείγματα μελισσόχορτου αναφέρουν ότι η τιμή του ροσμαρινικού οξέος κυμαίνεται σε ένα μεγάλο εύρος από 0,16 έως 49,28 mg/g φ.υ., ενώ το καφεϊκό οξύ από 0,05 έως 0,51 mg/g φ.υ. Σε αιθανολικά εκχυλίσματα μελισσόχορτου, η ξήρανση του οποίου πραγματοποιήθηκε με δυο διαφορετικούς τρόπους, το ροσμαρινικό οξύ βρέθηκε στα 87,33 στο λυοφιλιωμένο δείγμα και 78,40 mg/g εκχυλίσματος στο ξηραμένο με ζεστό αέρα και το καφεϊκό οξύ στα 3,24 και 3,09 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Lin *et al.*, 2012). Ίδια επίπεδα αναφοράς στα 96,45 mg/g εκχυλίσματος βρέθηκε και σε υδροαιθανολικό εκχύλισμα (Dastmalchi *et al.*, 2008). Στο DE εκχύλισμα η καμφερίδη και η γκενγουανίνη ήταν οι κύριες ενώσεις με τιμές 2,74 και 0,53 μg/mg εκχυλίσματος. Ο προσδιορισμός της καμφερίδης δεν έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες, οι οποίες εξετάζουν φλαβονοειδή του μελισσόχορτου.

Το MeOH εκχύλισμα του δεντρολίβανου χαρακτηρίστηκε τόσο από την παρουσία του ροσμαρινικού οξέος, όσο και από γλυκοζίτες της λουτεολίνης, ενώ κάποιες ποσότητες φαινολικών τερπενικών ενώσεων που δεν παρελήφθησαν με τον διαυθλαιθέρα παρατηρούνται επίσης (Πίνακας 3.17). Οι τελευταίες άλλωστε αποτελούν τις κυρίαρχες ενώσεις στο DE εκχύλισμα. Οι Shan *et al.*, (2005) προσδιόρισαν σε εκχυλίσματα 80% μεθανόλης, ροσμαρινικό οξύ στα 12864 έναντι 9879,3 μg/g φ.υ., καρνοσικό οξύ 6552,0 μg/g φ.υ. και καρνοσόλη στα 8016,0 μg/g φ.υ., σχεδόν διπλάσιες σε σχέση με την παρούσα μελέτη (3157,9 και 3233,1 μg/g φ.υ., αντίστοιχα). Ενώ σε άλλη μελέτη, η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος που προσδιορίστηκε σε MeOH εκχύλισμα ήταν σε αντίστοιχα επίπεδα και πιο συγκεκριμένα στα 114,0 mg/g εκχυλίσματος (Öztürk *et al.*, 2010), ενώ σε άλλη υπολείπεται κατά 50% την τιμή της παρούσας μελέτης (Kozar *et al.*, 2005). Μεγάλες διακυμάνσεις στις τρεις παραπάνω ενώσεις παρατηρούνται ανάλογα με το στάδιο συγκομιδής και τη γεωγραφική θέση που αναπτύσσεται το φυτό, έτσι το ροσμαρινικό

**Πίνακας 3.18.** Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του δίκταμου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
16.3	χλωρογενικό οξύ	0,48±0,02	95,1±3,8
21.0	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	1,18±0,14	236,6±27,7
22.1	διγλυκοζιτής της απιγενίνης	1,00±0,21	200,3±41,3
23.4	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	1,77±0,03	354,1±6,9
24.4	διγλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	0,61±0,11	122,0±21,3
27.4	<b>διγλυκοζιτής της απιγενίνης</b>	<b>2,23±0,62</b>	<b>445,4±123,1</b>
28.6	γλυκοζιτής της απιγενίνης	0,94±0,01	189,0±1,7
29.1	7-O-γλυκοζιτής της λουτεολίνης	1,37±0,17	274,0±33,7
30.5	<b>ισομερές του ροσμαρινικού οξέος</b>	<b>3,25±1,34</b>	<b>650,9±268,2</b>
31.4	<b>ροσμαρινικό οξύ</b>	<b>43,87±1,20</b>	<b>8773,6±240,7</b>
31.7	7-O-γλυκοζιτής της απιγενίνης		ίχνη
32.0	<b>γλυκοζιτής της μεθυλοφλαβόνης</b>	<b>1,98±0,07</b>	<b>396,0±14,5</b>
33.7	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	1,44±0,43	288,7±86,8
34.1	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος K	1,00±0,22	199,3±44,4
34.6	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος A	1,61±0,19	321,7±37,3
34.9	<b>ισομερές του σαλβιανολικού οξέος A</b>	<b>5,60±0,31</b>	<b>1120,3±61,3</b>
35.2	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	1,08±0,13	216,6±26,3
36.0	ισομερές λιθοσπερμικού οξέος	0,73±0,19	145,6±37,4
36.5	<b>ισομερές του σαλβιανολικού οξέος B</b>	<b>3,95±0,15</b>	<b>789,7±29,3</b>
38.4	λουτεολίνη	0,45±0,07	89,1±13,1
40.3	μεθυλοφλαβόνη	0,15±0,01	30,3±2,8
40.8	μεθυλοφλαβόνη	0,12±0,01	23,8±2,1
41.6	απιγενίνη	0,15±0,03	29,4±5,1
44.1	μεθυλοφλαβόνη	0,12±0,02	21,2±1,1
48.0	μεθυλοφλαβόνη	0,11±0,01	13,7±0,33
50.7	γκεγκουανίνη		ίχνη

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

οξύ κυμάνθηκε από 1166,7 κατά την άνθιση στο πιο ψυχρό κλίμα έως 3671,1 mg/kg εκχυλίσματος κατά την καρποφορία στο πιο θερμό περιβάλλον (Jordán *et al.*, 2013). Αντίστοιχες διαπιστώσεις κάνουν και οι Parageorgiou *et al.*, (2008) ως προς την εποχική διακύμανση του ροσμαρινικού οξέος. Οι Celiktas *et al.*, (2007) αναφέρουν επίσης διακυμάνσεις στα επίπεδα του καρνονικού οξέος και της καρνοσόλης ανάλογα με την εποχή συγκομιδής και την περιοχή στην οποία αναπτύσσεται. Το πρώτο κυμαίνεται μεταξύ 5,0 με 115,5 mg/g εκχυλίσματος, και το δεύτερο από 3,3 έως 18,4

**Πίνακας 3.19.** Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του δίκταμου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
21.1	καφεϊκό οξύ	0,36±0,01	8,1±0,2
26.0	ταξιφολίνη	0,65±0,09	14,7±1,9
34.3	εριοδουκτούλη	0,53±0,05	12,9±1,6
37.5	ναριγενίνη	0,56±0,15	12,6±3,4
38.4	λουτεολίνη	0,20±0,00	4,6±0,1
40.3	μεθυλοφλαβόνη	0,70±0,08	15,7±1,8
40.8	μεθυλοφλαβόνη	0,21±0,02	4,7±0,5
41.6	απιγενίνη	1,14±0,00	25,7±0,1
44.1	<b>μεθυλοφλαβόνη</b>	<b>2,79±0,09</b>	<b>63,0±2,0</b>
48.0	<b>μεθυλοφλαβόνη</b>	<b>2,11±0,02</b>	<b>47,8±1,2</b>
49.3	ακασετίνη		ίχνη
50.7	γκεγκουανίνη		ίχνη

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

mg/g εκχυλίσματος. Οι Babonic *et al.*, (2010) κατά την εκχύλιση δεντρολίβανου με υπερκρίσιμα υγρά προσδιόρισαν καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη στα 47,6 και 39,4 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Τιμές οι οποίες είναι στα ίδια επίπεδα με τα αποτελέσματα του DE εκχυλίσματος. Σε εκχύλισμα οξικού αιθυλεστερά μετά από εκχύλιση με εξάνιο, προσδιορίστηκε ροσμαρινικό οξύ σε τιμή στα 11,6 mg/g εκχυλίσματος, περίπου 10 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, το καρνοσικό οξύ βρέθηκε αρκετά πιο αυξημένο, στα 177,3 mg/g εκχυλίσματος, η καρνοσόλη στα 21,5 mg/g εκχυλίσματος, τα ισομερή της ροσμανόλης κυμαίνονται από 1,7 έως 23,5 mg/g εκχυλίσματος και ο μεθυλεστεράς του καρνοσικού οξέος σε αντίστοιχα επίπεδα με τα αποτελέσματά μας στα 7,9 mg/g εκχυλίσματος (Kontogianni *et al.*, 2013). Η μικρή ποσότητα ροσμαρινικού οξέος μπορεί να αποδοθεί στο διαλύτη εκχύλισης. Οι Atoui *et al.*, (2005) χρησιμοποιώντας τον παραπάνω διαλύτη για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών αφεψημάτων από τα φυτά της οικογένειας Lamiales που μελέτησαν, δεν αναφέρουν την ύπαρξη ροσμαρινικού οξέος. Σημαντικός παράγοντας στην ποσότητα των φαινολικών συστατικών παίζει η διαδικασία παραλαβής τους, αφού σε αρκετές μελέτες αναφέρε-

**Πίνακας 3.20.** Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του μελισσόχορτου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
20.9	<b>καφεϊκό οξύ</b>	<b>7,53±0,48</b>	<b>1355,9±86,0</b>
28.9	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	3,98±1,06	716,7±190,9
30.4	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	3,23±0,58	580,6±104,0
31.4	<b>ροσμαρινικό οξύ</b>	<b>122,56±13,18</b>	<b>22060,7±2372,8</b>
33.0	<b>ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I</b>	<b>8,80±0,67</b>	<b>1583,4±121,3</b>
33.9	ισομερές λιθοσπερμικού οξέος	1,36±0,20	227,7±29,8
34.5	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	1,12±0,10	191,7±9,3
34.9	γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	2,34±0,20	421,9±34,6
36.5	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος B	1,34±0,19	260,5±12,0
38.1	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	2,40±0,79	513,4±20,1

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

**Πίνακας 3.21.** Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του μελισσόχορτου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
20.9	καφεϊκό οξύ	3,75±0,02	80,5±0,5
30.4	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	ίχνη	
31.4	ροσμαρινικό οξύ	0,43±0,00	9,2±0,1
37.8	κερκετίνη	0,05±0,00	0,92±0,1
38.4	λουτεολίνη	0,16±0,00	3,37±0,1
38.9		0,06±0,00	1,30±0,2
39.7	φλαβονόλη	0,12±0,03	2,5±0,6
40.7	καεμφερόλη	0,14±0,00	3,05±0,1
41.4	απιγενίνη	0,08±0,00	1,87±0,1
43.2	φλαβονόλη	0,05±0,01	1,3±0,3
44.5	φλαβονόλη	0,05±0,00	1,11±0,1
45.2	φλαβανόλη	0,24±0,01	5,09±0,3
48.3		0,33±0,02	7,2±0,4
49.9	<b>καμφερίδη</b>	<b>2,74±0,03</b>	<b>58,7±0,6</b>
50.5	<b>γκεγκουανίνη</b>	<b>0,53±0,00</b>	<b>11,9±0,2</b>

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

**Πίνακας 3.22.** Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του φασκόμηλου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος	μg/g φ.υ.
15.8	χλωρογενικό οξύ	1,56±0,37	311,3±73,3
18.2	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	2,36±0,33	472,2±66,5
19.9	1,5-διεστέρας καφεϊκού- κινικού οξέος	0,82±0,35	163,8±69,7
21.2	καφεϊκό οξύ	10,86±4,98	2101,9±372,6
21.4	παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος	2,71±0,84	542,0±168,0
22.2	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	3,59±0,17	717,1±34,8
22.4	διγλυκοζίτης της απιγενίνης	0,71±0,25	141,7±49,2
23.5	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	1,55±0,54	309,1±107,2
25.6	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	1,14±0,11	228,8±22,1
26.0	<b>γλυκοζίτης υδροξυφλαβόνης</b>	<b>8,71±1,23</b>	<b>1742,6±245,7</b>
27.2	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος K	1,43±0,37	285,9±73,6
28.4	διγλυκοζίτης φλαβόνης	4,11±0,93	821,6±185,4
28.8	<b>7-ο- γλυκοζίτης της λουτεολίνης μαζί με το</b>	<b>17,26±1,02</b>	<b>3452,5±203,5</b>
29.1	<b>γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης</b>		
30.6	<b>ισομερές του ροσμαρινικού οξέος</b>	<b>10,86±4,98</b>	<b>2171,7±996,2</b>
31.5	<b>ροσμαρινικό οξύ</b>	<b>75,36±4,33</b>	<b>15073,6±866,7</b>
32.1	<b>7-ο- γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>	<b>9,79±1,73</b>	<b>1957,3±270,7</b>
32.5	παράγωγο ροσμαρινικού οξέος	1,57±0,78	314,3±155,9
32.8	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	2,44±1,32	488,9±263,9
33.6	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I	3,10±0,94	620,1±187,1
34.3	παράγωγο υδροξυ κινναμικού οξέος	2,26±0,96	452,6±191,4
35.1	ισομερές του σαλβιανολικού οξέος A	3,36±0,82	672,9±164,5
38.4	λουτεολίνη	0,21±0,02	42,9±3,9
39.9	ισομερές της ροσμανόλης	1,66±0,03	115,8±1,9
40.9	μεθυλοφλαβόνη	0,18±0,02	35,1±4,1
41.4	απιγενίνη	0,09±0,01	17,5±1,5
41.7	διοσμετίνη	0,22±0,01	44,1±1,5

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

ται πολλή μικρή ποσότητα, ή σε κάποιες περιπτώσεις καθόλου, ροσμαρινικού οξέος και γλυκοζιτών γιατί κατά τη διαδικασία της απομόνωσης λαμβάνει χώρα η υδρόλυση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραλαβή άγλυκων φλαβονοειδών και μικρότερων φαινολικών οξέων όπως καφεϊκού και π-υδροξυβενζοϊκού οξέος, συστατικά του ροσμαρινικού οξέος (Proestos *et al.*, 2005; Parageorgiou *et al.*, 2008).

Το φασκόμηλο χαρακτηρίστηκε από την παρουσία ροσμαρινικού οξέος και γλυκοζιτών λουτεολίνης και απιγενίνης στο ΜΕΟΗ εκχύλισμα και από την παρουσία

καρνοσικού οξέος και παραγώγων αυτού στο DE εκχύλισμα (**Πίνακες 3.22 και 3.23**). Υψηλότερες τιμές σε σχέση με αυτές της βιβλιογραφίας προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη για το ροσμαρινικό οξύ (Zheng και Wang, 2001; Pizzale *et al.*, 2002; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Farhat *et al.*, 2009), για τη λουτεολίνη (Farhat *et al.*, 2009, 2013; Hamrouni-Sellami *et al.*, 2013), για την απιγενίνη (Proestos *et al.*, 2005), για τον 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης (Kontogianni *et al.*, 2013), για το καρνοσικό οξύ (Pizzale *et al.*, 2002; Farhat *et al.*, 2009; Babovic *et al.*, 2010; Hamrouni-Sellami *et al.*, 2013; Kontogianni *et al.*, 2013) και για την καρνοσόλη (Pizzale *et al.*, 2002; Grzegorzczuk *et al.*, 2007; Babovic *et al.*, 2010; Hamrouni-Sellami *et al.*, 2013; Kontogianni *et al.*, 2013). Ενώ από άλλους ερευνητές έχουν αναφερθεί υψηλότερες τιμές από αυτές της παρούσας μελέτης για το ροσμαρινικό οξύ (Lima *et al.*, 2007), την καρνοσόλη, τη γκενγκουανίνη και το μεθυλεστέρα του καρνοσικού οξέος (Farhat *et al.*, 2013), καθώς και για τη λουτεολίνη (Košar *et al.*, 2005; Wojdyło *et al.*, 2007).

Το δίκταμο ήταν το πιο φτωχό MeOH εκχύλισμα σε ροσμαρινικό οξύ με τιμή 43,87 μg/mg εκχυλίσματος, σχεδόν 3 φορές χαμηλότερη από αυτή του μελισσόχορτου. Σημαντική ήταν και η παρουσία των παραγώγων/ισομερών του σαλβιανολικού οξέος που αθροιστικά φτάνουν τα 14,33 μg/mg εκχυλίσματος (**Πίνακας 3.19**). Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια καλή πηγή πληροφοριών για τις ποσότητες των φαινολικών συστατικών του δίκταμου, μιας και οι προηγούμενες μελέτες αποτυπώνουν μόνο μια ποιοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών (Skoula *et al.*, 1999; Kouri *et al.*, 2007; Chatzopoulou *et al.*, 2010; Lemonis *et al.*, 2013). Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι Proestos *et al.*, (2006) αναφέρουν την παρουσία κατεχίνης και φερουλικού οξέος στα 0,22 και 0,34 mg/100g φ.υ. σε υδρολυμένα εκχύλισματα υδατικής μεθανόλης. Οι Proestos και Komaitis (2006) μελετώντας την αποτελεσματικότητα διαφόρων διαλυτών και μιγμάτων αυτών προσδιόρισαν τα επίπεδα του καφεϊκού οξέος (1,0- 2,2 mg/100 g φ.υ.), του π-κουμαρικού οξέος (1,7- 2,9 mg/100 g φ.υ.), της ρουτίνης (1,1- 2,6 mg/100 g φ.υ.), του φερουλικού οξέος (2,4- 3,9 mg/100 g φ.υ.) και της ναριγενίνης (0,9- 2,1 mg/100 g φ.υ.). Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε η ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών με GC-MS σε αφεψήματα δίκταμου (Kaliora *et al.*, 2014), σε ένα μέρος των φαινολικών ενώσεων, ενώ για τους γλυκοζίτες των φλαβονοειδών και τα παράγωγα των απλών φαινολικών οξέων αυτή η

Πίνακας 3.23. Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του φασκόμηλου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
21.2	καφεϊκό οξύ	0,88±0,1	21,0±2,9
30.6	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος		ίχνη
31.5	ροσμαρινικό οξύ	0,09±0,03	2,2±0,7
31.8	ισομερές της ροσμανόλης	9,13±1,09	217,0±25,9
32.2	<b>ισομερές της ροσμανόλης</b>	<b>95,81±2,11</b>	<b>2275,5±50,1</b>
32.9	φλαβόνη	0,21±0,03	5,1±0,7
33.4	ισομερές της λουτεολίνης	0,19±0,01	4,6±0,2
34.5	μεθοξυλουτεολίνη	0,82±0,19	19,5±4,6
35.5	φλαβόνη (σκουτελαρίνη)	0,45±0,07	10,8±1,6
37.7	<b>ισομερές της ροσμανόλης</b>	<b>17,59±1,22</b>	<b>418,0±29,0</b>
38.4	λουτεολίνη	1,73±0,80	41,0±18,0
39.0	φλαβόνη	1,30±0,10	31,0±2,3
39.5	μεθυλοφλαβόνη	7,99±1,72	189,7±40,9
40.6	καεμφερόλη	5,03±1,11	119,4±26,3
40.9	μεθυλοφλαβόνη	0,36±0,05	8,5±1,3
41.4	<b>απιγενίνη μαζί με τη</b>	<b>13,27±0,18</b>	<b>315,0±4,3</b>
41.7	<b>διοσμετίνη</b>		
43.0	μεθυλοφλαβόνη	7,23±2,01	171,8±47,7
44.2	μεθυλοφλαβόνη	8,20±1,42	194,8±33,7
47.4	ισομερές της ροσμανόλης	7,42±0,88	176,4±20,9
50.0	ακασετίνη	1,15±0,22	27,2±5,2
50.7	γκεγκουανίνη	1,57±0,05	37,5±1,3
51.9	μεθοξυκαρνοσόλη	7,59±1,22	180,4±28,9
	ισομερές του μεθυλαιθέρα της	11,34±1,08	269,3±25,7
52.4	ροσμανόλης		
54.2	<b>καρνοσόλη</b>	<b>79,75±4,15</b>	<b>1894,2±98,6</b>
56.1	<b>ροσμαδιάλη</b>	<b>69,57±3,22</b>	<b>1652,2±76,5</b>
56.4	<b>κινόνη του καρνοσικού οξέος</b>	<b>56,47±1,55</b>	<b>1341,1±36,8</b>
	ισομερές του αιθυλαιθέρα της	9,89±0,78	235,0±18,5
57.6	ροσμανόλης		
60.7	<b>5,6,7,10-τετραϋδρο-7-υδροξυ-ροσμαρικινόνη</b>	<b>140,10±3,11</b>	<b>3327,5±73,9</b>
	ισομερές του αιθυλαιθέρα της	18,94±2,82	449,8±66,9
61.8	<b>ροσμανόλης</b>		
62.9	<b>καρνοσικό οξύ</b>	<b>212,42±4,12</b>	<b>5045,0±97,9</b>
64.7	<b>μεθυλεστέρας καρνοσικού οξέος</b>	<b>152,13±5,22</b>	<b>3613,2±124,0</b>

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

**Πίνακας 3.24.** Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του χαμομηλιού

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
16.2	<b>χλωρογενικό οξύ</b>	<b>5,90±1,01</b>	<b>1452,1±248,9</b>
17.8	εστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	0,90±0,03	221,8±9,0
20.8	<b>φερουλικός γλυκοζυλεστέρας</b>	<b>10,25±0,52</b>	<b>2552,7±129,6</b>
24.1	γλυκοζίτης μεθυλοφλαβανόλης	1,24±0,02	304,2±3,9
27.3	<b>γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος</b>	<b>24,65±0,95</b>	<b>6064,0±234,8</b>
27.5	διεστέρας καφεϊκού- κινικού οξέος	4,88±0,24	1200,2±59,3
28.5	<b>γλυκοζίτης φλαβονόλης</b>	<b>13,29±2,77</b>	<b>3268,7±682,4</b>
28.8	<b>7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης</b>	<b>5,77±1,51</b>	<b>1420,3±370,5</b>
29.1	γλυκουρινίδιο της λουτεολίνης	0,65±0,24	158,2±58,9
30.4	διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος	3,95±1,09	1161,8±270,4
31.0	γλυκουρονικό παράγωγο της απιγενίνης	1,87±0,29	459,9±70,7
31.7	<b>7-O- γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>	<b>23,33±9,21</b>	<b>5739,9±2266,6</b>
32.3	<b>γλυκοζίτης φλαβονόλης</b>	<b>5,49±0,27</b>	<b>1350,4±67,8</b>
33.0	γλυκοζίτης φλαβόνης	3,65±0,22	898,8±54,0
33.8	<b>φερουλικό οξύ</b>	<b>16,07±2,65</b>	<b>3953,5±650,7</b>
34.1	ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης	1,56±0,16	383,2±38,6
34.4	<b>ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης</b>	<b>5,04±2,72</b>	<b>1240,5±669,1</b>
35.0	<b>ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης</b>	<b>7,96±1,62</b>	<b>1959,2±399,4</b>
36.9	γλυκοζίτης μεθυλοφλαβανόλης	3,08±0,55	757,8±135,3
37.4	<b>διακετυλιωμένο παράγωγο της απιγενίνης</b>	<b>5,77±1,51</b>	<b>1420,2±261,6</b>
39.4	παράγωγο φερουλικού οξέος	2,29±0,56	563,1±88,9
41.5	απιγενίνη	2,24±0,79	551,2±193,7
42.5	<b>διμερές φερουλικού γλυκοζυλεστέρα</b>	<b>5,08±1,36</b>	<b>1248,5±334,8</b>
48.7	<b>παράγωγο φερουλικού οξέος</b>	<b>7,40±0,78</b>	<b>1819,9±191,7</b>

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

μέθοδος δεν ενδείκνυται. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων στα αφεψήματα ήταν η LC-DAD/MS.

Το MeOH εκχύλισμα του χαμομηλιού παρουσίασε υψηλές τιμές σε φαινολικά οξέα και παράγωγα τους (20,9 mg/g φ.υ.) και σε φλαβονοειδή (22,3 mg/g φ.υ.). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των φυτών της οικογένειας Lamiales, στο συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν υπάρχει υπεροχή κάποιου συστατικού, αλλά ο γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης κυμαίνονται στις ίδιες τιμές περίπου μεταξύ τους (6064,0 και 5739,9 μg/g φ.υ.) και ακολουθούν το



**Πίνακας 3.25.** Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του χαμομηλιού

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	μg/mg εκχυλίσματος*	μg/g φ.υ.
27.3	γλυκοζίτης του φερουλικού	1,67±0,09	27,0±1,6
31.7	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	1,42±0,11	22,9±1,7
33.8	<b>φερουλικό οξύ</b>	<b>176,32±3,25</b>	<b>2837,0±104,7</b>
37.2	κερκετίνη	0,98±0,03	15,5±0,5
38.2	λουτεολίνη	0,71±0,06	11,4±1,0
39.0	μεθυλοφλαβόνη	0,80±0,02	12,9±0,5
39.8	φλαβανόλη	1,67±0,11	27,0±1,8
40.8	καεμφερόλη	1,92±0,03	31,0±0,4
41.5	απιγενίνη	11,17±0,26	179,7±4,2
42.5	<b>διμερές φερουλικού γλυκοζυλεστέρα</b>	<b>74,69±3,15</b>	<b>1201,8±50,8</b>
42.7	μεθυλοφλαβόνη	24,41±1,43	393,8±19,5
43.7	μεθυλοφλαβονόλη	0,55±0,04	8,9±0,6
45.3	μεθυλοφλαβονόλη	3,03±0,27	48,9±4,4
48.2	παράγωγο φερουλικού οξέος	5,80±0,07	93,3±1,1
48.7	<b>παράγωγο φερουλικού οξέος</b>	<b>91,49±1,16</b>	<b>1472,0±18,7</b>
54.8	παράγωγο καφταρικού οξέος	4,46±0,22	71,7±3,6

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

φερουλικού οξύ, ο γλυκοζίτης φλαβανόλης, ο φερουλικός γλυκοζυλεστέρας (**Πίνακας 3.24**). Στο DE εκχύλισμα, ωστόσο, το φερουλικό οξύ και δυο παράγωγά του βρέθηκαν σε υψηλές τιμές σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά, κυρίως φλαβονοειδή, που ταυτοποιήθηκαν (**Πίνακας 3.25**). Οι Νονάκονά *et al.*, (2010) μελέτησαν το φαινολικό προφίλ MeOH εκχυλισμάτων και αφεισημάτων του χαμομηλιού, στο οποίο βρέθηκαν πέρα του 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης, φερουλικό οξύ και παράγωγα του σε μικρές ποσότητες, επίσης φλαβονόλες, όπως καεμφερόλη, κερκετίνη και παράγωγά τους. Η ποσοτικοποίηση εκφράστηκε σε μmol/L, γεγονός που καθιστά αυτά τα αποτελέσματα μη συγκρίσιμα με τα παρόντα αποτελέσματα. Η χημική σύσταση του MeOH εκχυλίσματος των *Guimaraes et al.*, (2013b) ήταν αρκετά διαφορετική με ένα ακέτυλογλυκοζίτη της λουτεολίνης, ένα γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος και ένα ισομερές του χλωρογενικού οξέος να αποτελούν τις κύριες ενώσεις με τιμές στα 2,10, 1,02 και 1,02 g/100 g φ.υ. Οι τιμές ολικών φλαβονοειδών βρίσκονται στα ίδια επίπεδα με αυτά της παρούσας μελέτης, ενώ οι τιμές για τα φαινολικά οξέα ήταν διπλάσια. Σε πιο πρόσφατη μελέτη (*Anula et al.*, 2014), ο 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης

κυμαίνεται από 270- 3510  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. και το χλωρογενικό οξύ μεταξύ 30 και 900  $\mu\text{g/g}$  φ.υ. σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αποτελέσματα τα οποία είναι 5739,9 και 1452  $\mu\text{g/g}$  φ.υ., αντίστοιχα. Η απιγενίνη, τέλος, βρέθηκε μεταξύ 20 και 480  $\mu\text{g/g}$  φ.υ.

Το MeOH εκχύλισμα του κρόκου παρουσίασε υψηλές τιμές σε *trans* κροκίνες (Πίνακας 3.26). Η *trans*-4-GG και η *trans*-3-Gg αποτελούν τις κύριες κροκίνες του εκχυλίσματος με 157,61 και 89,40  $\text{mg/g}$  φ.υ., ενώ σημαντικές ήταν αντίστοιχες *cis* με 30,88 και 19,51  $\text{mg/g}$  φ.υ. Οι τέσσερις αυτοί εστέρες της κροκετίνης αποτελούν σχεδόν το 95% της περιεκτικότητας των ολικών κροκινών. Έρευνες πάνω στα καρτενοειδή του κρόκου αναφέρουν ότι αυτές οι τέσσερις ενώσεις αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά του κρόκου με ποσοστά που κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα (Sánchez *et al.*, 2008; Anastasaki *et al.*, 2010; Del Campo *et al.*, 2010). Οι Sánchez *et al.*, (2008) εξέτασαν 55 δείγματα που κατηγορίας I σύμφωνα με τον ISO/TS 3652. Οι τιμές

Πίνακας 3.26. Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του κρόκου

Χρόνος έκλουσης	Όνομα ουσίας	$\mu\text{g}/\text{mg}$ εκχυλίσματος*	$\text{mg}/\text{g}$ φ.υ.
12.5	τριγλυκοζίτης της καεμφερόλης	2,28 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,03
20.8	τριγλυκοζίτης της καεμφερόλης	1,28 $\pm$ 0,12	0,65 $\pm$ 0,06
25.4	διγλυκοζίτης της καεμφερόλης	2,55 $\pm$ 0,04	1,30 $\pm$ 0,02
27.2	διγλυκοζίτης της καεμφερόλης	9,14 $\pm$ 0,19	4,66 $\pm$ 0,11
30.5	<i>trans</i> -5t-G	44,07 $\pm$ 12,54	2,25 $\pm$ 0,64
31.3	<i>trans</i> -5-nG	27,03 $\pm$ 11,69	1,38 $\pm$ 0,60
33.6	<b><i>trans</i>-4-GG</b>	<b>3090,38<math>\pm</math>113,44</b>	<b>157,61<math>\pm</math>5,79</b>
35.5	<i>trans</i> -4-ng	34,96 $\pm$ 17,11	1,78 $\pm$ 0,87
36.2	<b><i>trans</i>-3-Gg</b>	<b>1753,03<math>\pm</math>11,22</b>	<b>89,40<math>\pm</math>0,57</b>
38.7	<i>trans</i> -2-gg	58,82 $\pm$ 11,09	3,00 $\pm$ 0,57
44.3	<i>trans</i> -2-G	111,03 $\pm$ 4,50	5,66 $\pm$ 0,23
45.3	<b><i>cis</i>-4-GG</b>	<b>605,45<math>\pm</math>31,11</b>	<b>30,88<math>\pm</math>1,59</b>
47.8	<b><i>cis</i>-3-Gg</b>	<b>382,52<math>\pm</math>14,10</b>	<b>19,51<math>\pm</math>0,72</b>
50.1	<i>trans</i> -1-g	21,16 $\pm$ 2,19	1,08 $\pm$ 0,11
52.9	<i>cis</i> -2-gg	12,20 $\pm$ 4,93	0,62 $\pm$ 0,25
53.4	<i>cis</i> -2-G	12,01 $\pm$ 2,42	0,61 $\pm$ 0,12

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση

της *trans*-4-GG κυμαίνονται από 130,2- 190,3 mg/g φ.υ., της *trans*-3-Gg από 54,5 έως 96,1 mg/g φ.υ., της *cis*-4-GG μεταξύ 2,1 και 31,5 mg/g φ.υ. και της *cis*-3-Gg από 2,2 έως 11,4 mg/g φ.υ. Οι Anastasaki *et al.*, (2010) μελετώντας δείγματα στιγμάτων κρόκου από τέσσερις διαφορετικές περιοχές αναφέρουν ότι ο μέσος όρος της *trans*-4-GG παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή στα Ιρανικά δείγματα με 100 mg/g φ.υ. και τη μεγαλύτερη στα Ιταλικά με 160 mg/g φ.υ. Οι τιμές για τα Ισπανικά και Ελληνικά ήταν στα 140 και 120 mg/g φ.υ., αντίστοιχα. Από την πλευρά τους, οι Serrano-Díaz *et al.*, (2012), αναφέρουν τιμή για την *trans*-4-GG στα 124,78 mg/g φ.υ., για την *trans*-3-Gg στα 94,52 mg/g φ.υ., για τη *cis*-4-GG στα 10,70 mg/g φ.υ. και για τη *cis*-3-Gg στα 3,38 mg/g φ.υ. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται μέσα στο εύρος των τιμών που αναφέρονται και σε άλλες έρευνες.

Όσον αφορά, τους γλυκοζίτες της καεμφερόλης, ο διγλυκοζίτης με τη σοφορόζη εστεροποιημένη στη θέση 3 είναι το πιο πλούσιο φλαβονοειδές του μεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου και ακολουθούν ο άλλος διγλυκοζίτης και οι δυο τριγλυκοζίτες. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους Carmona *et al.*, (2007), οι οποίοι βρίσκουν ότι ο συγκεκριμένος διγλυκοζίτης κυμαίνεται από 1,09 έως 3,12 mg/g φ.υ. και βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στα Ισπανικά δείγματα. Οι υπόλοιποι γλυκοζίτες απαντούν σε τιμές που κυμαίνονται κοντά στα 1-2 mg/g φ.υ., τιμές αντίστοιχες με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Επιπροσθέτως, η παρουσία της καεμφερόλης στο αιθερικό εκχύλισμα του κρόκου βρέθηκε στα  $3,03 \pm 0,02$  μg/g φ.υ.

Συνοψίζοντας, στα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα παραλάβαμε πτητικά συστατικά που αποτελούν κύρια συστατικά που ταυτοποιούνται και στα αντίστοιχα αιθέρια έλαια. Τα κυριότερα συστατικά που παραλήφθησαν ήταν η καρβακρόλη στο δίκταμο, στο δεντρολίβανο ήταν βερμπενόνη, καμφορά και βορνεόλη, η κιτράλη με το οξειδίο του καρυοφυλλενίου στο μελισσόχορτο, στο φασκόμηλο η καμφορά, η α-θουγιόνη και η ευκαλυπτόλη, στα στίγματα του κρόκου η σαφρανάλη ακολουθούμενη από το ΗΤCC και τέλος στο χαμομήλι, οι κύριες ενώσεις ήταν τα οξείδια της αμπισαμπολόλης.

Στα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα ταυτοποιήθηκαν φαινολικά συστατικά, κυρίως άγλυκα μέρη των φλαβονοειδών και τερπενικά παράγωγα. Το καρνοσικό οξύ

και η καρνοσόλη ήταν τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος του δεντρολίβανου, ακολουθούμενα από τα παράγωγά τους. Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, το εκχύλισμα χαρακτηρίστηκε κυρίως από την παρουσία γκενγκουανίνης και απιγενίνης. Στο DE εκχύλισμα του δίκταμου παραλάβαμε κυρίως φλαβονοειδή και ειδικότερα μεθυλοφλαβόνες. Η καμφερίδη και η γκενγουανίνη ήταν οι κύριες ενώσεις του εκχυλίσματος του μελισσόχορτου που πρώτη φορά αναφέρονται στο φυτό αυτό. Το φασκόμηλο χαρακτηρίστηκε τόσο από την παρουσία καρνονικού οξέος και παραγώγων του όσο και φλαβονοειδών, κυρίως απιγενίνης και διοσμειτίνης. Για το χαμομήλι, τα κυριότερα συστατικά ήταν κυρίως φαινολικά οξέα, φερουλικό οξύ και παράγωγα αυτού, ενώ η απιγενίνη ήταν το κύριο φλαβονοειδές συστατικό του. Τέλος, το κυρίαρχο συστατικό του DE εκχυλίσματος του κρόκου ήταν η πικροκροκίνη, ενώ ανιχνεύθηκε και μικρή ποσότητα καεμφερόλης.

Στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, το ροσμαρινικό οξύ ήταν η κύρια ένωση. Ταυτοποιήθηκαν επίσης παράγωγα αυτού, κυρίως ισομερή σαλβιανολικού οξέος καθώς και φλαβονοειδή κυρίως σε μορφή γλυκοζιτών. Στην περίπτωση του MeOH εκχυλίσματος του δεντρολίβανου, το κύριο φαινολικό συστατικό ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από το ισομερές του, ενώ σημαντική είναι και η παρουσία γλυκοζιτών της λουτεολίνης. Το αντίστοιχο εκχύλισμα του δίκταμου χαρακτηρίστηκε από την παρουσία ροσμαρινικού οξέος και ισομερών σαλβιανολικού οξέος, αλλά συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* παρουσίασε τη μικρότερη τιμή σε ροσμαρινικό οξύ. Τη μεγαλύτερη τιμή σε ροσμαρινικό οξύ είχε το εκχύλισμα του μελισσόχορτου, το οποίο χαρακτηρίστηκε σχεδόν από την κυριαρχία του ροσμαρινικού οξέος και παραγώγων υδροξυκιναμικού οξέος ενώ παρατηρήθηκε και η παρουσία ενός γλυκοζίτη. Στην περίπτωση του φασκόμηλου η κύρια ένωση που ταυτοποιήθηκε στο MeOH εκχύλισμα ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από ισομερές του, τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης.

Όσον αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομήλιου χαρακτηρίστηκε από την παρουσία παραγώγων φερουλικού και χλωρογενικού οξέος, ενώ σε σημαντική ποσότητα βρέθηκε και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης.

Η *trans*-4-GG και η *trans*-3-Gg αποτελούν τις κύριες κροκίνες του εκχυλίσματος του κρόκου, ενώ σε σημαντικές ποσότητες βρέθηκαν και οι αντίστοιχες *cis*- κροκίνες. Οι τέσσερις αυτοί εστέρες της κροκετίνης αποτελούν σχεδόν το 95% της περιεκτικότητας των ολικών κροκινών. Από τα флаβονοειδή, ο κύριος εκπρόσωπος ήταν ο γλυκοζίτης της καεμφερόλης με σοφορόζη στη θέση 3, ενώ ταυτοποιήθηκαν δυο τριγλυκοζίτες και ένας επιπλέον διγλυκοζίτης.

#### 4. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

##### 4.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά

Στον Πίνακα 4.1. παραθέτονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά των οργανικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος και σε mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού.

Οι τιμές κυμάνθηκαν από 13,6 έως 563,2 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Διαπιστώνεται ότι υψηλότερες τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου έχουν τα μεθανολικά εκχυλίσματα ακολουθούν τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα έπονται τα αιθερικά εκχυλίσματα. Όσον αφορά τα μεθανολικά εκχυλίσματα η σειρά κατάταξης με φθίνουσα σειρά είναι δεντρολίβανο> μελισσόχορτο> δίκταμο> φασκόμηλο> χαμομήλι> κρόκος. Αντίθετα, όταν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών αναλογούν στο ξηρό βάρος του φυτικού υλικού ακολουθούν διαφορετική σειρά. Έτσι, πρώτο σε περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών είναι το μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου ακολουθούμενο από το δεντρολίβανο, το δίκταμο, το χαμομήλι, το φασκόμηλο και τελευταίο πάλι τον κρόκο.

Πίνακας 4.1. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων

Φυτό	mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος*			mg γαλλικού οξέος/g φ.υ.		
	PE**	DE	MeOH	PE	DE	MeOH
Δεντρολίβανο	44,6±2,3b***	32,7±1,0b	563,2±45,4e	1,19±0,06b	2,28±0,07c	55,20±4,45d
Δίκταμο	115,9±7,5d	49,4±3,0c	252,5±18,2c	5,47±0,36d	1,12±0,07b	51,51±3,72c,d
Κρόκος	δ.π.****	δ.π.	44,6±0,1a	δ.π.	δ.π.	26,29±0,08a
Μελισσόχορτο	14,5±1,5a	17,9±0,5a	359,2±31,8d	0,30±0,03a	0,37±0,01a	64,29±5,70e
Φασκόμηλο	78,2±4,2c	70,3±2,7d	206,7±9,3b	4,28±0,20c	2,41±0,94c	43,20±1,94b
Χαμομήλι	13,6±0,5a	41,8±1,9c	203,0±12,2b	0,64±0,03a,b	0,67±0,03a	49,94±3,01c

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

\*\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

\*\*\* Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (p<0.05)

\*\*\*\* δ.π δεν προσδιορίστηκε

Ο τελευταίος δε χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα από τα φαινολικά του συστατικά όσο από τους άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, για το λόγο αυτό παρατηρείται η μικρή τιμή σε ολικά φαινολικά συστατικά, η οποία υπολείπεται από αυτή των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Lamiaceae κατά 5-10 φορές. Στην ίδια διαπίστωση κατέληξαν και οι Ordoudi *et al.*, (2009), μελετώντας μεθανολικά εκχυλίσματα κρόκου, ρίγανης και κουρκουμά. Οι Tarantilis *et al.*, (1995) είναι οι πρώτοι που αναφέρουν την ύπαρξη ενός διγλυκοζίτης της καεμφερόλης σε υδρομεθανολικό εκχύλισμα στιγμάτων κρόκου. Ενώ οι Carmona *et al.*, (2007) εξετάζοντας εκχυλίσματα στιγμάτων κρόκου ταυτοποίησαν την ύπαρξη 5 παραγώγων καεμφερόλης.

Το μεθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου με 563,2 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Το PE εκχύλισμα ακολουθεί με 44,6 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος και τέλος, το αιθερικό με 32,7 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Το μεθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου, από την ποιοτική και ποσοτική του ανάλυση μέσω της υγρής χρωματογραφίας, παρουσίασε υψηλές ποσότητες ροσμαρινικού και καρνοσόλης, γεγονός που εξηγεί τη μεγάλη τιμή και σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Οι Shan *et al.*, (2005), μελετώντας 26 υδρομεθανολικά εκχυλίσματα διαφόρων μπαχαρικών μεταξύ αυτών και το δεντρολίβανο αναφέρουν τιμή αντίστοιχη με της παρούσας εργασίας στα 50,7 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ., ενώ ελαφρώς χαμηλότερες τιμές δίνουν οι Tawaha *et al.*, (2007 στα 39,1 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ και 37,4 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ. οι Yosr *et al.*, (2013). Οι Erkan *et al.*, (2008) αναφέρουν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου με 6 % καρνοσικό οξύ και 8% ροσμαρινικό οξύ αποδίδει ολικά φαινολικά 162 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Οι Lagouri *et al.*, (2010), αναφέρουν τιμές 129,52 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος για μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου που παραλήφθηκε με συσκευή Soxhlet, η οποία εκχύλιση ολοκληρώθηκε σε 6 h αντί για εκχύλιση 18 h με απλή μηχανική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία. Οι ίδιοι αναφέρουν τιμές ολικών φαινολικών συστατικών για εξανικό εκχύλισμα δεντρολίβανου, που παραλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο (Soxhlet) στα 14,5 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Πρόσφατα, οι Bubonja-

Sonje *et al.*, (2011) αναφέρουν τιμές πιο κοντά με τις δικές μας στα 450 mg καφεϊκού οξέος/ g εκχυλίσματος, αφού η χρονική διάρκεια της εκχύλιση ήταν στις 24 h με απλή μηχανική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην περίπτωση του δίκταμου, σημαντική ήταν η παρουσία ολικών φαινολικών συστατικών στο PE εκχύλισμα (115,9 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος). Ο λόγος είναι η μεγάλη ποσότητα καρβακρόλης που περιέχει το PE εκχύλισμα όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της παραγράφου 3.2.2. Διπλάσια τιμή φαινολικών παρουσιάζει το ΜΕΟΗ εκχύλισμα σε σχέση με το PE εκχύλισμα, ενώ υπολείπεται κατά 45% με το αντίστοιχο εκχύλισμα του δεντρολίβανου. Πράγμα αναμενόμενο αφού το εκχύλισμα του δίκταμου υπολείπεται και σε φαινολικά συστατικά όπως προσδιορίστηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας. Βέβαια, η ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου ήταν διπλάσια της αντίστοιχης των Lagouri *et al.*, (2010), οι οποίοι αναφέρουν τιμές 129,51 mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος για μεθανολικό εκχύλισμα δίκταμου που παραλήφθηκε με εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet όπως αναφέρεται παραπάνω και για το δεντρολίβανο.

Το μελισσόχορτο από την πλευρά του εμφανίζει υψηλή τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου (359,2 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος) και υπολείπεται έναντι του δεντρολίβανου, ωστόσο αν τα αποτελέσματα αναχθούν σε g φ.υ. αυτό ανακτά τα πρωτία λόγω της μεγαλύτερης απόδοσης, σε σχέση με το δεντρολίβανο, κατά την εκχύλιση (64,29 έναντι 55,2 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ.). Οι Dastmalchi *et al.*, (2008) προσδιόρισαν ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου στα 268,9 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος, σε τιμή της ίδιας τάξης μεγέθους με τα τωρινά αποτελέσματα. Κατά 50% χαμηλότερες τιμές αναφέρουν οι Lin *et al.*, (2012) στη μελέτη αιθανολικών εκχυλισμάτων που αποξηράνθηκαν είτε με λυοφιλίωση, είτε με θερμό αέρα, όπου οι τιμές βρέθηκαν στα 175,15 και 164,13 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Οι Kirca και Arslan (2008) εκφράζοντας τα αποτελέσματά τους σε g φ.υ. αναφέρουν 52,5 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ. για τα άνθη και 69,2 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ. για τα φύλλα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα άλλα δυο εκχυλίσματα ήταν 16,2 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος ή 0,34 mg γαλλικού οξέος/ g φ.υ. για το PE και 59,16 mg γαλλικού οξέος/ g εκχυλίσματος ή 1,27 mg γαλλικού οξέος/ g φ.υ. για το εκχύλισμα με διαυθυλαιθέρα (DE). Οι Canadianονι-



Brunet *et al.*, (2008) σε διαδοχικές εκχυλίσεις μεθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου με πετρελαϊκό αιθέρα, χλωροφόρμιο, οξικό αιθυλεστέρα, βουτανόλη και νερό προσδιόρισαν ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα 1,37, 3,36, 36,6, 94,5 και 21,8 mg χλωρογενικού οξέος/g φ.υ., αντίστοιχα.

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου βρέθηκε στα 78,2, 70,3 και 206,7 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος για το εκχύλισμα του PE, του DE και του MeOH, αντίστοιχα. Οι Κοζαρ *et al.*, (2005) σε μεθανολικά εκχυλίσματα φασκόμηλου αναφέρουν ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα 241 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος, αντίστοιχη τιμή με αυτό της παρούσας μελέτης. Ενώ οι Stagos *et al.*, (2012), το προσδιόρισαν ελαφρώς σε χαμηλότερα επίπεδα στα 184 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Οι Shan *et al.*, (2005) βρίσκουν σε δείγμα φασκόμηλου από φύλλα και στελέχη τιμή 53,2 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ. και οι Kirca και Arslan (2008) 43,5 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ. στα φύλλα και μειωμένο στο μισό (22,3 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ.) στα στελέχη. Σε μελέτη μεθανολικών εκχυλισμάτων, 16 διαφορετικών ειδών *Salvia* το φαινολικό περιεχόμενο κυμάνθηκε από 45,6 έως 212,0 mg γαλλικού οξέος/g φ.υ. (Kamatou *et al.*, 2010). Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων εξανίου που παραλήφθηκαν με εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet της *Salvia tomentosa* προσδιορίστηκε στα 200 mg γαλλικού οξέος/mg εκχυλίσματος, της *Salvia virgrata* στα 28,31 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος (Κοζαρ *et al.*, 2008) και της *Salvia halophila* στα 29,21 mg γαλλικού οξέος/ g εκχυλίσματος (Κοζαρ *et al.*, 2011). Στα δυο τελευταία είδη έγινε εκ νέου διαδοχική εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, μεθανολή, 50% υδατική μεθανόλη και νερό. Προσδιορίστηκε το φαινολικό περιεχόμενο στα παραπάνω εκχυλίσματα και πιο συγκεκριμένα οι τιμές για τα μεθανολικά εκχυλίσματα ήταν για τη *S. virgrata* 133,8 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος (Κοζαρ *et al.*, 2008) και 73,21 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος για τη *S. halophila* (Κοζαρ *et al.*, 2011).

Το χαμομήλι παρουσίασε χαμηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο στο εκχύλισμα PE στα 13,6 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος, άλλωστε το εκχύλισμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία οξειδίων, αιθέρων, σесκιτερπενίων και όχι τόσο φαινολικών ενώσεων. Στο DE εκχύλισμα το ολικό φαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε στα 41,8, ενώ στο MeOH στα 203,0 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλί-

σματος. Οι Roby *et al.*, (2013) μελετώντας την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ικανότητα διαφόρων εκχυλισμάτων χαμομηλιού, κατέληξαν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή φαινολικών συστατικών, και ακολουθούσαν το αιθανολικό, του διαιθυλαιθέρα και το εξανικό, παρόλου που οι τιμές που δίνουν είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι Miliauskas *et al.*, (2004) εξέτασαν μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού (άνθη, στο στάδιο της πλήρους άνθισης) από τη Λιθουανία εξίσου φτωχό σε ολικά φαινολικά συστατικά (7,5 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος). Πιο πρόσφατα, οι Barros *et al.*, (2010) σε αντίστοιχο εκχύλισμα από την Πορτογαλία που ανέλυσαν, βρήκαν πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά (139.62 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος), αντίστοιχης με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

#### 4.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Στην παρούσα παράγραφο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ικανότητας των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών να δρουν ως αντιοξειδωτικά μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup> και του ριζικού κατιόντος ABTS<sup>•+</sup>. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς IC<sub>50</sub> (Inhibition Concentration), δηλαδή ως προς τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί δέσμευση κατά 50 % της ελεύθερης ρίζας (Πίνακας 4.2). ενώ στον Πίνακα 4.3 τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως Ισοδύναμα Trolox (TEAC).

Τα εκχυλίσματα των φυτών που μελετήθηκαν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς περιέχουν συστατικά που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τόσο την ελεύθερη ρίζα DPPH<sup>•</sup> όσο και το ριζικό κατιόν ABTS<sup>•+</sup>. Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο της προηγούμενης παραγράφου,

Πίνακας 4.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων

Φυτό	IC <sub>50</sub> (μg/mL) *					
	ABTS <sup>•+</sup>			DPPH <sup>•</sup>		
	PE **	DE	MeOH	PE	DE	MeOH
Δεντρολίβανο	54,1±2,0b ***	56,3±0,9b	7,3±0,6a	127,0±3,1b	106,0±6,9b	13,8±0,8a
Δίκταμο	23,4±2,8a	58,7±2,4b	13,7±0,8c	152,8±27,0b	310,7±6,0c	35,2±7,4b
Κρόκος	420,7±5,1c	>800	155,0±5,0e	>800	δ.π	437,2±6,3d
Μελισσόχορτο	>800	61,1±0,8b	8,1±0,1a	>800	62,8±2,9a	12,9±0,9a
Φασκόμηλο	23,1±0,8a	31,3±1,5a	11,2±0,6b	45,2±2,3a	48,7±1,2a	19,5±0,7a,b
Χαμομήλι	>800	286,6±12,5c	68,2±0,8d	>800	545,4±24,0d	99,4±3,4c

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

\*\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

\*\*\* Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (p<0.05)

\*\*\*\*δ.π δεν προσδιορίστηκε

Πίνακας 4.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων

Φυτό	TEAC (mmol Trolox/g εκχυλίσματος) *					
	ABTS <sup>•+</sup>			DPPH <sup>•</sup>		
	PE <sup>**</sup>	DE	MeOH	PE	DE	MeOH
Δεντρολίβανο	0,192±0,002b,c <sup>***</sup>	0,094±0,003b	1,70±0,02d <sup>***</sup>	0,20±0,07b	0,23±0,02b	1,44±0,0b
Δίκταμο	0,31±0,02c,d	0,161±0,014c,d	0,90±0,12b	0,189±0,001b	0,066±0,003a	0,712±0,001d
Κρόκος	0,0054±0,003a	δ.π	0,069±0,003a	δ.π	δ.π	δ.π
Μελισσόχορτο	0,012±0,002a	0,234±0,020d	1,35±0,07c	0,137±0,002b	0,49±0,02c	1,83±0,02a
Φασκόμηλο	0,525±0,001d	1,045±0,007e	0,97±0,15b	0,47±0,08b	0,51±0,13c	1,04±0,09c
Χαμομήλι	0,019±0,001a	0,354±0,005a	0,61±0,05b	0,028±0,002a	0,053±0,002c	1,15±0,07c

\* Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση

\*\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

\*\*\* Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (p<0.05)

\*\*\*\*δ.π δεν προσδιορίστηκε

τα μεθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου διαλύτη να εκχυλίζει τα φαινολικά συστατικά των φυτικών δειγμάτων και να αποδίδει εκχυλίσματα με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Αναφορικά με την κατάταξη είναι παρόμοια και στις δυο μεθόδους προσδιορισμού. Τα άλλα δυο εκχυλίσματα του PE και DE παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές  $IC_{50}$  και χαμηλότερες τιμές TEAC (**Πίνακες 4.2 και 4.3**).

Από τη χημική ανάλυση των MeOH εκχυλισμάτων αποτυπώνεται πως η κύρια κατηγορία ενώσεων των φυτών της οικογένειας Lamiales είναι τα υδροξυκιναμωνικά οξέα με κύριο εκπρόσωπο το ροσμαρινικό οξύ, και флаβονοειδή στην ύπαρξη των οποίων αποδίδεται κατά κύριο λόγο η έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Οι βιβλιογραφικές αναφορές για το  $IC_{50}$  του ροσμαρινικού οξέος είναι 2,63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ως προς τη μέθοδο DPPH και όσο για τη μέθοδο ABTS αυτό αντιστοιχούσε σε 1,16 mmol φερουλικού οξέος/L (Παπαγεωργίου, 2009). Οι τιμές του  $IC_{50}$  που προσδιορίστηκαν στα φυτικά μεθανολικά εκχυλίσματα των παραπάνω φυτών, υπερέχουν κατά πολύ από τις αντίστοιχες του κρόκου, ενώ διέφεραν στατιστικά σημαντικά και από αυτές του χαμομηλιού. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 7,3 έως 13,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στη μέθοδο ABTS και 12,9 έως 35,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στη μέθοδο DPPH (**Πίνακας 4.2**).

Οι τιμές  $IC_{50}$  για το δεντρολίβανο βρέθηκαν χαμηλότερες από αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας που κυμαίνονται για τη μέθοδο DPPH από 6,6 έως 27,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Terpinc *et al.*, 2009), μεταξύ 6,74 και 16,70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ανάλογα της περιοχής που καλλιεργήθηκαν τα φυτικά δείγματα (Jemia *et al.*, 2013), ανάλογα με την εποχή και τη χρονιά συγκομιδής από 12,4 έως 43,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Papageorgiou *et al.*, 2008). Οι Zaouali *et al.*, (2013), δίνουν τιμές  $IC_{50}$  από 15,2 έως 32,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ανάλογα με την εποχή συγκομιδής και το μέρος του φυτικού ιστού που χρησιμοποιείται, ενώ οι Jordán *et al.*, (2013) έδωσαν σαφώς μεγαλύτερες τιμές από τις προηγούμενες μελέτες, 151,5 με 597,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ανάλογα της εποχής συγκομιδής και της περιοχής που αναπτύσσεται το φυτό.

Στη μέθοδο ABTS, οι τιμές κυμαίνονται από 5,92 έως 192,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Jemia *et al.*, 2013). Στις περισσότερες μελέτες, οι συγκρίσεις γίνονται με τα ισοδύναμα Trolox,

όπου αναφέρονται τιμές 37,8 mmol Trolox/100 g φ.υ. (Shan *et al.*, 2005), 274 μmol Trolox/g φ.υ. (Tawaħa *et al.*, 2007), 146,7 και 424,4 μmol Trolox/g φ.υ. για στελέχη και φύλλα, αντίστοιχα (Kirca και Arslan, 2008). Τα άλλα δυο εκχυλίσματα παρουσίασαν παρόμοια δράση, αρκετά μικρότερη από τα αντίστοιχα MeOH, στην ίδια διαπίστωση και άλλοι ερευνητές με το εξανικό εκχύλισμα δεντρολίβανου να παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή IC<sub>50</sub> από τα αντίστοιχα MeOH (Lagouri *et al.*, 2010).

Στην περίπτωση του μελισσόχορτου, τα αποτελέσματα και με τις δυο μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης φανερώνουν πως το MeOH εκχύλισμα είναι από τα πιο δραστικά από αυτά που μελετήθηκαν. Οι Pereira *et al.*, (2009) αναφέρουν τιμή IC<sub>50</sub>, με τη μέθοδο DPPH, MeOH εκχυλίσματος 24,3 μg/mL, αιθανολικού στα 28,2 μg/mL και υδατικού στα 32,9 μg/mL. Οι López *et al.*, (2007), με την ίδια μέθοδο αναφέρουν τιμές IC<sub>50</sub> MeOH εκχυλίσματος μετά από εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο και οξικό αιθυλεστέρα στα 13,74 μg/mL, το οποίο μάλιστα είναι το πιο ισχυρό εκχύλισμα από όλα τα υπόλοιπα τα οποία εξετάστηκαν. Με την ίδια μέθοδο προσδιορισμού, ανάλογα με τον τρόπο ξήρανσης του φυτού αναφέρονται τιμές 36,15 και 44,88 μg/mL σε αιθανολικά εκχυλίσματα (Lin *et al.*, 2012). Σε αντίστοιχα εκχυλίσματα οι τιμές κυμαίνονται από 28,2 μέχρι 48,76 μg/mL (Pereira *et al.*, 2004, 2014; Kamdem *et al.*, 2013). Σε άλλες μελέτες, στις οποίες γίνεται σύγκριση των εκχυλισμάτων με διάφορους διαλύτες παρατηρούνται αντίστοιχα αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη όπου τα εκχυλίσματα των πιο άπολων διαλυτών όπως διχλωρομεθάνιο ή πετρελαϊκό αιθέρα να μην παρουσιάζουν καθόλου αντιοξειδωτική δράση (López *et al.*, 2007; Çanadanović-Brunet *et al.*, 2008).

Οι τιμές IC<sub>50</sub> για το MeOH εκχύλισμα του φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) βρέθηκε στα 11,2 και 19,5 μg/mL για τη μέθοδο ABTS και DPPH, αντίστοιχα. Το MeOH εκχύλισμα φασκόμηλου έχει ήδη αναφερθεί ότι έχει IC<sub>50</sub> 13,5 μg/mL με τη μέθοδο DPPH (Lima *et al.*, 2007). Μελετώντας μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα διαφορών ειδών *Salvia*, μεταξύ αυτών και *Salvia officinalis*, οι Stagos *et al.*, (2012) αναφέρουν τιμή IC<sub>50</sub> 18 μg/mL για τα MeOH εκχύλιστα και για τις δυο μεθόδους προσδιορισμού. Ενώ σε MeOH εκχυλίσματα άλλων ειδών *Salvia* οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 19 και 36 μg/mL για τη μέθοδο DPPH και από 13 έως 60 μg/mL για τη μέθοδο ABTS. Αντίστοιχες τιμές με την πρώτη μέθοδο αναφέρονται και σε άλλες μελέτες για MeOH εκχυλίσματα

για άλλα είδη *Salvia*, όπως *S. cryptantha* (18,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *S. multicaulis* (16,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και *S. tomentosa* (18,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Tere *et al.*, 2004, 2005). Ανάλογα με τον τρόπο ξήρανσης του φυτικού υλικού, στα MeOH εκχυλίσματα του φασκόμηλου το IC<sub>50</sub> κυμαίνεται από 13,49 έως 58,48  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Hamrouni-Sellami *et al.*, 2013). Επίσης ανάλογα με την περιοχή που αναπτύσσεται το φασκόμηλο, οι τιμές κυμαίνονται από 3,37 σε 10,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ενώ για άλλα είδη *Salvia* οι αντίστοιχες τιμές κυμαίνονται από 23,00 έως 40,91  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για το είδος *S. verbenaca*, από 21,13 έως 22,62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για το είδος *S. aegyptiaca* και από 33,85 έως 77,07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για το είδος *S. argentea* (Farhat *et al.*, 2013a,b). Ενώ ανάλογα με την εποχή και τη χρονιά συγκομιδής το IC<sub>50</sub> MeOH εκχυλισμάτων του είδους *S. fruticosa* κυμαίνεται μεταξύ 21,3 και 42,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Parageorgiou *et al.*, 2008). Από την άλλη πλευρά, κανένα από τα εκχυλίσματα του είδους *S. pratensis* δεν παρουσίασε αντιοξειδωτική ικανότητα (López *et al.*, 2007). Αισθητά πιο χαμηλές τιμές παρουσιάζονται σε πιο πρόσφατη μελέτη κλαματοποίησης αιθανολικού εκχυλίσματος φασκόμηλου με διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα, βουτανόλη και νερό και αντίστοιχες τιμές στα 2,3, 3,9, 4,1 και 2,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Albano και Miguel, 2011). MeOH εκχύλισμα φασκόμηλου με τη μέθοδο DPPH παρουσιάζει τιμή IC<sub>50</sub> αντίστοιχη του γνωστού αντιοξειδωτικού BHT (Koşar *et al.*, 2005). Όπως παρατηρείται και για τα δυο προηγούμενα φυτά, τα PE και DE εκχυλίσματα παρουσιάζουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα άλλων ειδών *Salvia*, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της *S. tomentosa* (Tere *et al.*, 2005), της *S. virgata* (Koşar *et al.*, 2008) και της *S. halophila* (Koşar *et al.*, 2011).

Το δίκταμο εμφάνισε IC<sub>50</sub> MeOH εκχυλίσματος 13,7 και 35,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  με τη μέθοδο ABTS και DPPH, αντίστοιχα. Αντίστοιχη τιμή IC<sub>50</sub> MeOH εκχυλίσματος στα 22,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  αναφέρουν και οι Exarchou *et al.*, (2013). Η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα του MeOH εκχυλίσματος είναι σύμφωνη με τις προηγούμενες μελέτες (Møller *et al.*, 1999; Lagouri *et al.*, 2009, 2010; Gortzi *et al.*, 2007; Kouri *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα της διαδοχικής εκχύλισης έδειξαν ότι το πιο πολικό εκχύλισμα παρουσίασε την υψηλότερη δραστηριότητα, που ακολουθείται από την αντίστοιχη των PE και DE εκχυλισμάτων. Στην ίδια διαπίστωση κατέληξαν οι Kouri *et al.*, (2007), με το

αιθανολικό εκχύλισμα να είναι πιο δραστικό, ακολουθούμενο από το DE και λιγότερο δραστικό το PE εκχύλισμα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του MeOH εκχυλίσματος του χαμομηλιού προσδιορίστηκε στα 68,2 και 99,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  με τη μέθοδο ABTS και DPPH, αντίστοιχα. Αντίστοιχες τιμές έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες με τους Pereira *et al.*, (2009) να αναφέρουν  $\text{IC}_{50}$  115,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  με τη μέθοδο DPPH σε MeOH εκχύλισμα, ενώ σε αιθανολικό στα 152  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Koleckar *et al.*, 2008). Σε άγριο χαμομήλι, οι Barros *et al.*, (2010) αναφέρουν  $\text{IC}_{50}$  στα 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , τιμή αρκετά υψηλότερη από αυτή που προσδιορίσαμε, παρ'όλου που η ποσότητα ολικών φαινολικών συστατικών του αντίστοιχου εκχυλίσματος ήταν στα ίδια επίπεδα με τα δικά μας αποτελέσματα. Γενικώς και από άλλες μελέτες η αντιοξειδωτική ικανότητα του χαμομηλιού θεωρείται μετρίας δυναμικότητας σε σχέση με άλλα φυτά κυρίως της οικογένειας Lamiaceae (Lee και Shibamoto, 2002; Dragland *et al.*, 2003; Katalinic *et al.*, 2006).

Στην περίπτωση του MeOH εκχυλίσματος του κρόκου, η παρουσία των κροκινών και η απορρόφηση που έχουν στα 440 nm δημιουργεί ένα χρωμοφόρο σύστημα που οδηγεί στην παρεμπόδιση προσδιορισμού της μείωσης της απορρόφησης του DPPH, το μέγιστο του οποίου είναι στα 515 nm, που ήταν επίσης εμφανές στην παρούσα μελέτη και έχει επίσης αναφερθεί ως μειονέκτημα της μεθόδου (Perez-Jimenez *et al.*, 2008). Στην ίδια παρατήρηση κατέληξαν τόσο οι Kanakis *et al.*, (2007), όσο και οι Ordoudi *et al.*, (2009). Άλλοι ερευνητές, ωστόσο αναφέρουν  $\text{IC}_{50}$  στα 2500 ppm (Assimopoulou *et al.*, 2005) και άλλοι ότι τα 300 ppm μεθανολικού εκχυλίσματος προκάλεσαν παρεμπόδιση της ρίζας DPPH\* κατά 68,23% (Karimi *et al.*, 2010). Σε πιο πρόσφατη μελέτη, το αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις μεταξύ 20-100  $\text{mg}/\text{mL}$  δεν παρουσίασε καμία δράση, ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις 1-10  $\text{mg}/\text{mL}$  αρκετά μικρή παρεμπόδιση της ρίζας (Ramadan *et al.*, 2012). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τα καροτενοειδή δρουν ως παράγοντας μεταφοράς οξυγόνου. Αυτό συχνά αναφέρεται ως προ-οξειδωτικό φαινόμενο δεδομένου ότι θεωρητικά η ένωση θα μπορούσε να δημιουργήσει περισσότερες ρίζες από ό,τι καταναλώνει (Krinsky και Yeung, 2003). Αυτή τη διαπίστωση έχουν κάνει αρκετοί ερευνητές μελετώντας είτε κροκίνες από το φυτό *Gardenia jasminoides* Ellis (Pham et



al., 2000), είτε μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (Proestos *et al.*, 2005), είτε κροκετίνη και διμεθυλοκροκετίνη (Kanakis *et al.*, 2007).

Οι Kanakis *et al.*, (2007) προτείνουν στα φάσματα UV-Vis, την αποσυνέλιξη των κορυφών στην περιοχή 360- 700 nm για να εξαλειφθεί το πρόβλημα της παρεμπόδισης. Οι Chen *et al.*, (2009) από την πλευρά τους, μετράνε τόσο την απορρόφηση του εκχυλίσματος με τη ρίζα όσο και την απορρόφηση του εκχυλίσματος ως έχει την οποία στη συνέχεια την αφαιρούν και εκφράζουν το αποτέλεσμα σε ισοδύναμα  $\alpha$ -τοκοφερόλης (107 mg/ g). Εφαρμόζοντας στην παρούσα μελέτη την παραπάνω εκδοχή το IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε στα 437  $\mu$ g/mL. Στα άλλα δυο εκχυλίσματα δεν παρατηρήθηκε ανάλογο φαινόμενο, λόγω της μικρής ή της καθόλου παρουσίας κροκινών. Το PE εμφάνισε IC<sub>50</sub> 850  $\mu$ g/mL, όταν η σαφρανάλη έχει αναφερθεί με IC<sub>50</sub> 95  $\mu$ g/mL (Kanakis *et al.*, 2007), ενώ το DE ήταν ανενεργό, άλλωστε η κύρια ένωση του εκχυλίσματος δε χαρακτηρίζεται ως ισχυρό αντιοξειδωτικό συστατικό. Από τους πίνακες είναι εμφανής η υπεροχή της μεθόδου ABTS, το πλεονέκτημα της μεθόδου έγκειται στο ότι το ριζικό κατιόν απορροφά στα 734 nm, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται από την απορρόφηση των κροκινών στα 440 nm, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της μεθόδου DPPH.

Από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φαίνεται πως σε όλες τις περιπτώσεις η μέθοδος ABTS έδωσε χαμηλότερες τιμές IC<sub>50</sub> σε σχέση με τη μέθοδο DPPH. Οι Floegel *et al.*, (2011) κατέληξαν πως η μέθοδος ABTS είναι καλύτερη από αυτή του DPPH όταν εφαρμόζονται σε μια ποικιλία από φυτικές τροφές που περιέχουν υδρόφιλες, λιπόφιλες και αρκετά χρωματισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Αυτή η διαπίστωση αντικατοπτρίζεται στα PE και DE εκχυλίσματα, όπου τα λιπόφιλα συστατικά αντιδρούν καλύτερα με το ABTS από ότι με το DPPH. Ενώ στην περίπτωση του κρόκου λόγω του έντονου χρώματος, είναι ξεκάθαρη η υπεροχή του ABTS.

Ολοκληρώνοντας, διαπιστώνεται ότι η τιμή IC<sub>50</sub> των MeOH εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου και του μελισσόχορτου δε διαφέρει σημαντικά και με τις δυο μεθόδους προσδιορισμού, ενώ η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλισμα του μελισσόχορτου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του δεντρολίβανου, ωστόσο η αντιοξειδωτική ικανότητα του τελευταίου είναι ελαφρώς καλύτερη. Το γεγονός αυτό

μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της καρνοσόλης στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου, η οποία απουσιάζει από το αντίστοιχο εκχύλισμα του μελισσόχορτου.

Συνεπώς, η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος είναι σημαντικός δείκτης για την απόδοση στο εκχύλισμα αντιοξειδωτικών χαρακτηριστικών, αλλά δεν πρέπει να θεωρείται ο μοναδικός. Τα MeOH εκχυλίσματα του δίκταμου και του φασκόμηλου έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση και όμως στο φασκόμηλο η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος είναι κατά 40% υψηλότερη από αυτή του δίκταμου. Φαίνεται ότι η παρουσία των ισομερών του σαλβιανολικού οξέος προσδίδουν στο εκχύλισμα του δίκταμου επιπλέον αντιοξειδωτική δράση. Οι ενώσεις αυτές έχουν αναφερθεί άλλωστε ότι είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά συστατικά και μάλιστα καλύτερα σε σχέση με τις γλυκοζιδιωμένες μορφές των φλαβονοειδών (Lu και Foo, 2001a,b).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του PE εκχυλίσματος του δίκταμου οφείλεται κατά κύριο λόγο στην καρβακρόλη, η οποία χαρακτηρίζεται για την αντιοξειδωτική της ικανότητα τόσο σε λιπόφιλα όσο και υδατικά συστήματα (Ruberto και Baratta, 2000; Bentayeb *et al.*, 2014). Το φασκόμηλο και το δεντρολίβανο από την άλλη χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία κυρίως καμφοράς, θουγιόνης, ευκαλυπτόλης και βερμπενόνης (κεφάλαιο III, § 3.2). Παρ' όλα αυτά, έρευνες σε καθαρές μορφές ενώσεων, όπως η καμφορά, η ευκαλυπτόλη, η βορνεόλη, όταν ελέγχθηκαν για αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH δεν είχαν δράση, ωστόσο τα δείγματα των φυτικών εκχυλισμάτων παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση (Kordali *et al.*, 2005; Kelen και Tere, 2008). Βέβαια, όταν οι ίδιες καθαρές ενώσεις βέβαια εξετάστηκαν σε λιπόφιλα συστήματα παρουσίασαν δράση άλλες σε μικρότερο και άλλες σε μεγαλύτερο βαθμό, με τα οξυγονούχα τερπένια και ειδικότερα τις αλκοόλες να είναι πιο δραστικές από τα υπόλοιπα σεσκιτερπένια και μονοτερπένια. Εξάιρεση στα τελευταία αποτελεί το τερπινολένιο, το α- και γ- τερπινένιο, που είναι αρκετά πιο δραστικά από την κατηγορία τους και αυτό μάλλον οφείλεται στην ύπαρξη ενεργών μεθυλενομάδων στο μόριό τους (Ruberto και Baratta, 2000).

Τα DE εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται τα μεν του μελισσόχορτου, δίκταμου και χαμομηλιού από την παρουσία φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων, τα δε του δεντρολίβανου και του φασκόμηλου από τερπενικές ενώσεις κυρίως καρνοσικό οξύ, καρνοσόλης και παραγώγων τους. Τα υψηλά ποσοστά των τελευταίων στα δυο

παραπάνω φυτικά εκχυλίσματα εξηγούν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν σε σχέση με τα υπόλοιπα. Οι ενώσεις αυτές θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων στα οποία ανιχνεύονται (Cuvelier *et al.*, 1996; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011; Kontogianni *et al.*, 2013).

## 5. Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

### 5.1. *In vitro* μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA)

#### 5.1.1. *In vitro* αντιμικροβιακή δράση υδατικών εκχυλισμάτων

Αρχικά, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση λυοφιλιωμένων υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 5 mg/mL, έναντι 19 θετικών κατά Gram και 5 αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 5.1.** της παραγράφου 5.1.1. Μόνο τα υδατικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου παρουσίασαν, και με τους τρεις τρόπους παρασκευής, αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους *Clostridium sporogenes* LMG 8421<sup>T</sup>, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στο στέλεχος *Clostridium sporogenes* LMG 14743. Πιο συγκεκριμένα, η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων καταγράφηκε ως ζώνη παρεμπόδισης διαμέτρου 10 mm γύρω από την οπή (διάμετρος οπής= 6 mm), στην οποία είχαν τοποθετηθεί τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα, ενώ δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα με το δείγμα του μάρτυρα (νερό). Στα υπόλοιπα στελέχη που εξετάστηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν καμία αντιμικροβιακή δράση.

Οι μελέτες της αντιμικροβιακής δράσης υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων είναι διφορούμενες. Τα αποτελέσματα επηρεάζονται άμεσα από το εξεταζόμενο στέλεχος το είδος του φυτικού υλικού, την ποσότητα του φυτικού υλικού που χρησιμοποιείται, το χρόνο εκχύλισης, τη συγκέντρωση που τελικά εξετάζεται και τη μέθοδο η οποία ακολουθείται (Klančnik *et al.*, 2009). Οι Turker και Usta (2010), μελετώντας υδατικά εκχυλίσματα 22 διαφόρων φυτών της Τουρκίας, χρησιμοποίησαν την ίδια ποσότητα νερού (200 mL) θερμοκρασίας 80 °C, αλλά το δεκαπλάσιο φυτικό υλικό και η εκχύλισή τους ολοκληρώθηκε σε 1h, με αποτέλεσμα περισσότερες δραστικές ενώσεις να εκχυλιστούν μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα. Τα περισσότερα εκχυλίσματα ήταν δραστικά έναντι στελεχών του *Staphylococcus aureus*

και του *Staphylococcus epidermidis*, ενώ το πιο ανθεκτικό βρέθηκε να είναι το στελέχος *Pseudomonas aeruginosa*, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης δισκίων (Disc diffusion assay-DDA). Ενώ οι Babrou *et al.*, (2009) εφαρμόζοντας τη μέθοδο των αραιώσεων (Broth dilution) και χρησιμοποιώντας αντίστοιχες αρχικές συγκεντρώσεις και μεθοδολογία σε τέσσερα φυτά, μεταξύ αυτών και το μελισσόχορτο, κατέληξαν ότι κανένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, σε εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 100-500  $\mu\text{g/mL}$ , δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι στελεχών του γένους *Streptococcus* και πιο συγκεκριμένα στελέχη *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sanguinis*. Αντίθετα, Κινέζοι ερευνητές μελετώντας υδατικά εκχυλίσματα από 20 παραδοσιακά κινέζικα φυτά σε συγκέντρωση 200 φορές μεγαλύτερη από την εξεταζόμενη στην παρούσα μελέτη, βρήκαν ότι μόνο 3 υδατικά εκχυλίσματα είχαν δράση έναντι των δυο παραπάνω μικροοργανισμών με τη μέθοδο διάχυσης δισκίων (Wong *et al.*, 2010). Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, οι Teixeira *et al.*, (2013) τα ζεστά και κρύα εκχυλίσματα ρίγανης δεν παρουσίασαν καμία δράση έναντι στελεχών *Escherichia coli*, *Listeria innocua* και *Listeria monocytogenes*. Σε άλλη πρόσφατη έρευνα ενάντια της δράσης βακτηρίων και ζυμών αφεψημάτων και άλλων εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, όπως δεντρολίβανου, μελισσόχορτου, φασκόμηλου, αναφέρεται ότι μόνο το τελευταίο αφέψημα παρουσιάζει μια οριακή παρεμπόδιση με τη μέθοδο διάχυσης σε τρυβλία έναντι στελεχών *Bacillus cereus* και *Ps.aeruginosa* (Albayrak *et al.*, 2013).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα αφεψήματα των φυτών στη συγκέντρωση που εξετάστηκαν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση, η οποία ήταν διαφορετική σε επίπεδο στελεχούς (strain specific) έναντι του είδους *Clostridium sporogenes*. Από τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της παραγράφου 2.2. σε κανένα αφέψημα δεν ταυτοποιήθηκε καρνοσικό οξύ ή καρνοσόλη, ενώσεις οι οποίες έχουν αναφερθεί ότι είναι ισχυροί αντιμικροβιακοί παράγοντες (Del Campo *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006), ενώ το ροσμαρινικό οξύ ήταν το κυρίαρχο συστατικό των αφεψημάτων σε τιμές που κυμαίνονται από 2,12 έως 47,18  $\mu\text{g/mg}$  εκχυλίσματος. Όταν μελετήθηκε έναντι διαφόρων μικροοργανισμών βρέθηκε ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (minimum inhibitory concentration- MIC) του ροσμαρινικού οξέος ήταν 5  $\mu\text{g/mL}$  έναντι στελεχούς του *St.*

*aureus*, ενώ όταν εξετάστηκε επί στελέχους *E. coli* σε συγκέντρωση 250 µg/mL ήταν ανενεργό (Moreno *et al.*, 2006). Σύμφωνα με τους Mencherini *et al.*, (2007), αυτό οφείλεται στις μικρές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στη δική τους μελέτη αναφέρουν ότι η MIC του ροσμαρινικού οξέος έναντι εξεταζόμενων στελεχών *St. aureus* και *St. epidermidis* ήταν στα 0.12 mg/mL. Πιο πρόσφατα, οι Klančnik *et al.*, (2010), μελετώντας διαφορετικές μεθόδους εκτίμησης της αντιμικροβιακής δράσης, η MIC του ροσμαρινικού οξέος έναντι στελεχών *St. aureus* κυμάνθηκε από 5 -10 mg/mL ανάλογα με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε, ενώ για το καρνοσικό οξύ η αντίστοιχη τιμή ήταν στα 0,156 mg/mL. Για στελέχη *B.cereus* η τιμή MIC για το ροσμαρινικό οξύ κυμάνθηκε από 5-8 mg/mL και του καρνοσικού οξέος μεταξύ 0,078 και 0,156 mg/mL, αντίστοιχα.

#### 5.1.2. *In vitro* αντιμικροβιακή δράση οργανικών εκχυλισμάτων

Τα οργανικά εκχυλίσματα των φυτών εξετάστηκαν με τη σειρά τους έναντι των 19 θετικών κατά Gram βακτηρίων και 5 αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν ήταν 25-50 mg/mL για τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και του διαιθυλαιθέρα (DE) και 28-280 mg/mL για τα μεθανολικά (MeOH) εκχυλίσματα. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί ήταν ευαίσθητοι σε κάποιο από τα παραπάνω φυτικά εκχυλίσματα.

Στους πίνακες που ακολουθούν, τα αποτελέσματα ομαδοποιούνται κατά ομάδες μικροοργανισμών- στόχων. Η 1<sup>η</sup> ομάδα περιλαμβάνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς της στοματικής κοιλότητας του γένους *Streptococcus*, και πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν στελέχη των *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*. Η 2<sup>η</sup> ομάδα περιλαμβάνει τα θετικά κατά Gram βακτήρια του γένους *Bacillus* με στελέχη των ειδών *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* και *Bacillus subtilis*, από το γένος *Listeria* οι εκπροσώποι που μελετήθηκαν ήταν τρία στελέχη *Listeria innocua* και ένα στέλεχος *Listeria welschimeri*, καθώς και στελέχη των *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus agalactiae* και

δύο στελέχη *Clostridium sporogenes*, τα οποία χαρακτηρίζονται σαν αλλοιογόνοι και παθογόνοι μικροοργανισμοί τροφίμων. Τέλος, η 3<sup>η</sup> ομάδα αποτελείται από αρνητικά κατά Gram παθογόνα στελέχη των *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, που σχετίζονται με παθογένεια στα τρόφιμα.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα (PE), αυτά του δίκταμου και του δεντρολίβανου, ακολουθούμενο από αυτό του φασκόμηλο παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων της στοματικής κοιλότητας (Πίνακας 5.1). Ενώ το μελισσόχορτο, το χαμομήλι και ο κρόκος αρκετά μικρότερη δράση, ενώ σε κάποια στελέχη τα δύο τελευταία είναι ανενεργά (*Str. mutans*, *Str. salivarius* *Str. sanguinis*). Ωστόσο, τα εκχυλίσματα του διαλυθαιθέρα (DE), όλα παρουσίασαν αξιοσημείωτη δράση. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα (MeOH) συγκριτικά με τα δύο παραπάνω εκχυλίσματα εμφανίζουν μικρότερη παρεμποδιστική δράση (Πίνακας 5.2). Πιο ανθεκτικός μικροοργανισμός αποδεικνύεται το στέλεχος του *Str. mutans*, ενώ πιο ευαίσθητος το στέλεχος του *Str. gordonii*.

Αλκοολούχα εκχυλίσματα των παραπάνω φυτών έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη δράση των παθογόνων της στοματικής κοιλότητας. Οι Babrou *et al.*, (2009) αναφέρουν ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα μελισσόχορτου παρεμποδίζουν την ανάπτυξη στελεχών του *Str. mutans* και του *Str. sanguis*. Μεθανολικά εκχυλίσματα (80 %) χαμομηλιού είχαν δράση έναντι παθογόνων στελεχών του γένους *Streptococcus*, και ειδικότερα των *Str. mutans*, *Str. sanguinis* και *Str. sobrinus* (Albuquerque *et al.*, 2010). Υδροαλοολούχα εκχυλίσματα (80% αιθανόλη)

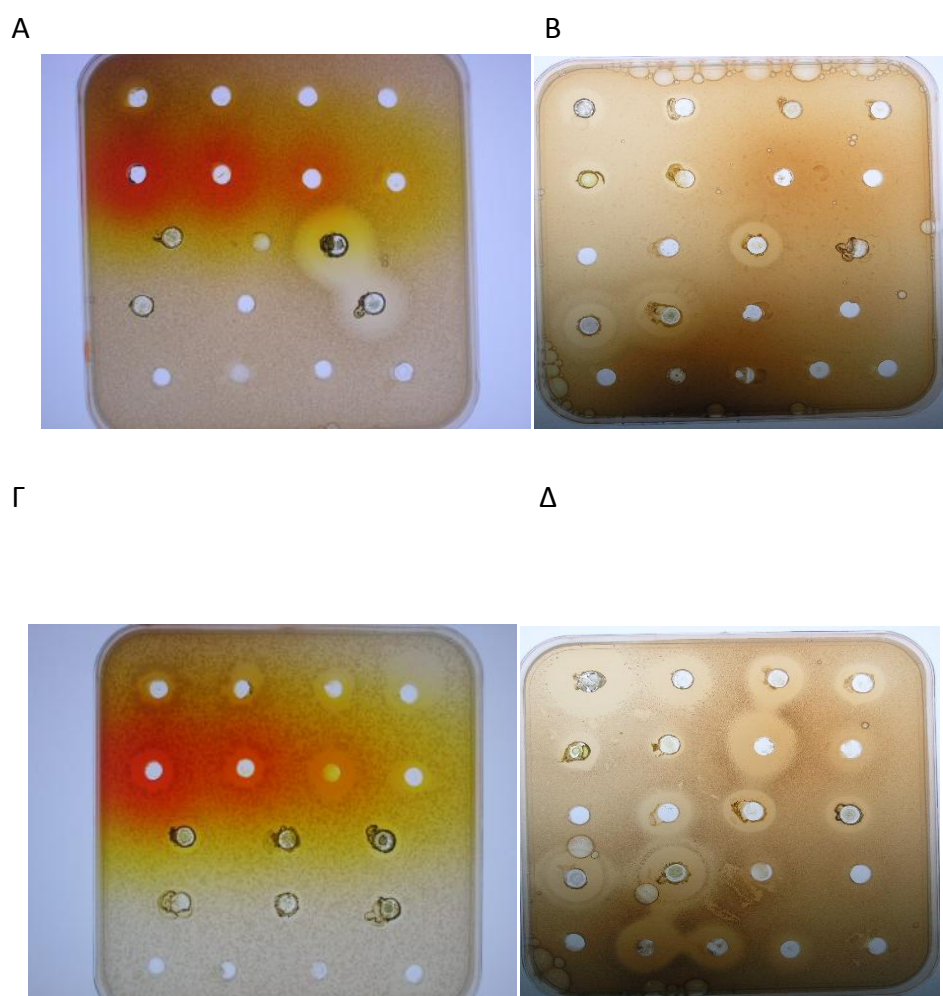
φύλλων δεντρολίβανου παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι στελεχών των *Str. mutans*, *Str. salivarius*, *Str. sanguinis* και *Str. sobrinus*. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (minimum inhibitory concentration- MIC) των παραπάνω εκχυλισμάτων ήταν 350 µg/mL, έναντι των στελεχών *Str. mutans* και *Str. sanguinis*, οι οποίοι ήταν και οι πιο ευαίσθητοι. Για τα στελέχη των άλλων τριών ειδών η MIC πάνω από 400 µg/mL (Bernardes *et al.*, 2010). Στη μελέτη αυτή, η αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων αποδίδεται κυρίως στην παρουσία καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης και λιγότερο στο ροσμαρινικό οξύ, ενώσεις που απομονώθηκαν και

**Πίνακας 5.1.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι παθογόνων της στοματικής κοιλότητας

Φυτό	Διαλύτης εκχύλισης	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)					
			<i>Str. gordonii</i> LMG 14518 <sup>T</sup>	<i>Str. mutans</i> LMG 14558 <sup>T</sup>	<i>Str. oralis</i> LMG 14532 <sup>T</sup>	<i>Str. salivarius</i> LMG 11489 <sup>T</sup>	<i>Str. sanguinis</i> DSM 20068	<i>Str. sobrinus</i> LMG 14641 <sup>T</sup>
Δεντρολίβανο	PE*	50	26	18	26	19	20	20
		25	25	14	22	14	18	17
	DE	25	25	16	28	19	17	14
Δίκταμο	PE	50	26	26	20	26	22	25
		25	25	25	18	24	16	25
	DE	25	25	25	22	17	12	14
Κρόκος	PE	50	8	15	10	0	0	8
		25	8	12	8	0	0	8
	DE	50	27	40	27	28	30	25
		25	20	25	22	20	23	25
Μελισσόχορτο	PE	50	11	7	11	7	10	11
		25	8	0	7	0	0	9
	DE	50	16	17	26	12+8	17	13
		25	10	12	21	11+6	14	10
Φασκόμηλο	PE	50	25	18	20	20	20	25
		25	22	16	18	18	17	22
	DE	25	24	16	18	16	17	19
Χαμομήλι	PE	50	14	0	9	7	11	9
		25	10	0	7	0	8	7
	DE	25	23	15	17	18	14	13

\* PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.





**Εικόνα 5.1.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου στο άγαρ (WDA) έναντι κυττάρων *S. typhimurium* (Α), *St. aureus* (Β) *Str. oralis* (Γ) και *Str. epidermitis* (Δ).

**Πίνακας 5.2.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι παθογόνων της στοματικής κοιλότητας

Φυτό	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)					
		<i>Str. gordonii</i> LMG 14518 <sup>T</sup>	<i>Str. mutans</i> LMG 14558 <sup>T</sup>	<i>Str. oralis</i> LMG 14532 <sup>T</sup>	<i>Str. salivarius</i> LMG 11489 <sup>T</sup>	<i>Str. sanguinis</i> DSM 20068	<i>Str. sobrinus</i> LMG 14641 <sup>T</sup>
Δεντρολίβανο	280	25	20	25	22	20	25
	168	24	18	24	20	19	24
	84	22	17	20	18	18	17
	28	18	11	16	11	13	13
Δίκταμο	280	26	19	26	17	18	17
	168	25	18	24	15	16	16
	84	16	7	16	9	14	15
	28	13	0	13	7	10	12
Κρόκος	280	20	16	17	15	20	20
	168	18	15	16	15	19	18
	84	16	13	15	11	18	16
	28	12	7	13	8	13	14
Μελισσόχορτο	280	17	9	14	13	15	10
	168	15	7	13	12	14	10
	84	12	0	12	10	12	7
	28	7	0	9	9	9	0
Φασκόμηλο	280	20	19	15	13	14	17
	168	18	16	14	11	13	15
	84	16	7	14	7	12	14
	28	14	0	11	0	7	13
Χαμομήλι	280	16	17	14	8	15	14
	168	14	14	14	7	14	13
	84	14	7	13	7	11	11
	28	10	0	10	0	8	8

ταυτοποιήθηκαν στα παραπάνω εκχυλίσματα. Οι MIC του καρνοσικού οξέος ήταν 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έναντι στελεχών *Str. mutans* και *Str. salivarius*, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έναντι στελέχους *Str. sobrinus* και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έναντι στελέχους *Str. sanguinis*. Η καρνοσόλη έδωσε MIC στα 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έναντι στελεχών *Str. salivarius* και *Str. sanguinis*, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έναντι στελέχους *Str. sobrinus* και 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έναντι στελέχους *Str. mutans*, ενώ η MIC του ροσμαρινικού οξέος για τους παραπάνω στελέχη μικροοργανισμών ήταν σχεδόν δεκαπλάσια, πάνω από 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Οι Ferrazzano *et al.*, (2013), μελετώντας υδατικά, αιθανολικά και εξανικά εκχυλίσματα 72 φυτών της Ιταλίας, αναφέρουν ότι κανένα εκχύλισμα του δεντρολίβανου δεν είχε δράση έναντι των στελεχών *Str. mutans* και *Str. sobrinus* που μελετήσανε. Από τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, τα αιθανολικά εκχυλίσματα συγκεντρώσεως (50 και 25  $\text{mg}/\text{mL}$ ) του *Thymus vulgaris*, και 50  $\text{mg}/\text{mL}$  των *Lavandula angustifolia* και *L. dentata* είχαν δράση έναντι μόνο του στελέχους *Str. sobrinus*. Στην εργασία αυτή, η αντιμικροβιακή ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων αποδίδεται στην παρουσία флаβονοειδών και άλλων σχετικών ενώσεων. Η αντιμικροβιακή ικανότητα των флаβονοειδών έναντι των παθογόνων της στοματικής κοιλότητας έχει επίσης αναφερθεί στο παρελθόν από διάφορους ερευνητές (Sakanaka *et al.*, 1989; Tsuchiya *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1997). Η παρουσία υδροξυλικών ομάδων (-OH) στις θέσεις 3', 4' και 5' στο Β δακτύλιο ενισχύουν την αντιμικροβιακή δράση των флаβονοειδών (Sakanaka *et al.*, 1989). Στην παρουσία μυρισετίνης σε μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου αποδίδουν την αντιμικροβιακή του δράση έναντι στελεχών *Str. mutans* και *Str. sanguinis* οι Tsai *et al.*, (2008). Το MeOH εκχύλισμα του δεντρολίβανου ήταν δραστικό και έναντι του στελέχους *Str. sobrinus* BCRC14757 επιπλέον βρέθηκε σε άλλη βιοδοκιμή ότι αναστέλλει τη δράση των γλυκοσυλοτρανσφερασών του συγκεκριμένου μικροοργανισμού και κατ' επέκταση προλαμβάνει το σχηματισμό της οδοντικής πλάκας (Tsai *et al.*, 2007). Στη συγκεκριμένη έρευνα μάλιστα αναφέρεται ότι οι флаβόνες και οι флаβονόλες έχουν καλύτερη δράση έναντι της αδρανοποίησης των ενζύμων (γλυκοσυλοτρανσφερασών), εξαιτίας της παρουσίας στο μόριο τους του διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων στη θέση 2 και 3 του C δακτυλίου, ενώ οι флаβανόνες και οι διυδροξυφλαβονόλες, οι οποίες δεν έχουν τον παραπάνω διπλό δεσμό παρουσιάζουν καλύτερη δράση έναντι

των κυττάρων του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Η απιγενίνη είχε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι των γλυκοσυλοτρανσφερασών του *Str. mutans* UA159 (Koo *et al.*, 2002). Πρόσφατη έρευνα των Smullen *et al.*, (2012), σε εκχυλίσματα υδατικής προπανόνης δεντρολίβανου και φασκόμηλου, αναφέρει τόσο την αντιμικροβιακή τους παρεμπόδιση έναντι πλήθος παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας του γένους *Streptococcus*, μεταξύ αυτών *Str. gordonii*, *Str. mutans* *Str. oralis* και *Str. salivarius* όσο και την ανασταλτικής δράσης των γλυκοτρανσφερασών του εξεταζόμενου στελέχους *Str. mutans*.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και με την παρούσα μελέτη. Η παρουσία ροσμαρινικού οξέος στα MeOH εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Laminaceae* (§ 3.2), προσδίδει στα φυτικά εκχυλίσματα αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, η παρουσία των φλαβονοειδών σαφώς ενισχύει αισθητά τη δράση αυτή. Αυτό επιβεβαιώνεται από την περίπτωση του MeOH εκχυλίσματος του μελισσόχορτου, που εμφανίζει μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης έναντι των υπολοίπων φυτών, λόγω της παρουσίας στο εκχύλισμα κυρίως ροσμαρινικού οξέος και όχι τόσο φλαβονοειδών. Επιπλέον, η παρουσία στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου καρνοσόλης, έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης με τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης που παρατηρούνται. Στην παρουσία των φλαβονοειδών και των τερπενικών ενώσεων άλλωστε μπορεί να αποδοθεί η αντιμικροβιακή ικανότητα των αιθερικών (DE) εκχυλισμάτων.

Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) χαρακτηρίζονται από πιο άπολα συστατικά και κυρίως ενώσεις που απαντώνται στα αντίστοιχα αιθέρια έλαια των φυτών. Τα τελευταία έχουν εκτενώς μελετηθεί για την αντιμικροβιακή τους ικανότητα έναντι τόσο θετικών κατά Gram όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Burt, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010). Η καρβακρόλη καθώς και το ισομερές θυμόλη έχουν μελετηθεί έναντι διαφόρων στελεχών *Str. mutans* με πολύ καλά αποτελέσματα (Botelho *et al.*, 2007; Ciandrini *et al.*, 2013). Η θυμοκινόνη επίσης έχει βρεθεί ότι είναι δραστική έναντι διαφόρων στελεχών των *Str. mutans*, *Str. oralis* και *Str. salivarius* (Jrah Harzallah *et al.*, 2011). Η υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη και η σημαντική παρουσία θυμοκινόνης στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα του δίκταμου εξηγεί και τις μεγάλες ζώνες παρεμπόδισης για τα είδη *Streptococcus* που μελετήσαμε.

Αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου πλούσιο σε  $\alpha$ -πινένιο (18,25%), καμφορά (6,02%), ευκαλυπτόλη (5,25%) και καμφένιο (5,02%) είχε δράση σε μια σειρά μικροοργανισμών, μεταξύ αυτών και ο *Str. mutans* (Derwich *et al.*, 2011). Αιθέριο έλαιο με σύσταση διαφορετική από την προηγούμενη (πιπεριτενόνη-23,65%,  $\alpha$ -πινένιο- 14,94%, λιναλοόλη- 14,89%, ευκαλυπτόλη- 7,43%, καμφορά- 4,97%) έδειξε και αυτό είχε σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι στελέχους του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Rasooli *et al.*, 2008). Οι Galvão *et al.*, (2012) μελέτησαν διάφορα αιθέρια έλαια και αντίστοιχα κλάσματα αυτών προκειμένου να αποδώσουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του *Str. mutans* UA159 σε συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων. Τα πιο δραστικά κλάσματα των παραπάνω αιθερίων ελαίων ήταν αυτά που περιείχαν τις ενώσεις θυμόλη, πινοκαμφόνη, ισοπινοκαμφόνη, σπαθουλενόλη και ήταν δραστικότερα σε σχέση με το αρχικό αιθέριο έλαιο. Στη σημαντική παρουσία των παραπάνω ενώσεων στα PE εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, φασκόμηλου και χαμομηλιού της παρούσας μελέτης μπορεί να αποδοθεί η αντιμικροβιακή δράση που παρατηρήσαμε και είναι πιο έντονη σε σχέση με τα αντίστοιχα MeOH.

Όσον αφορά τα στελέχη των ειδών των θετικών κατά Gram βακτηρίων που σχετίζονται με τρόφιμα, τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (Πίνακες 5.3, 5.4, 5.5 και 5.6). Το PE εκχύλισμα του κρόκου δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση σε κανένα από τα εξεταζόμενα είδη του *Bacillus*, στα MeOH η ζώνη παρεμπόδισης κυμαίνεται από 7-12 mm, ενώ το DE εκχύλισμα του βρέθηκε να είναι το πιο δραστικό από όλα τα εκχυλίσματα των εξεταζόμενων φυτών. Στα υπόλοιπα φυτά, παρατηρούμε πως τα PE εκχυλίσματα είναι πιο δραστικά, ακολουθούμενα από τα DE. Τα MeOH εκχυλίσματα παρουσίασαν μικρές ζώνες παρεμπόδισης σε σχέση με τα άλλα δυο εκχυλίσματα, με το στέλεχος *B. subtilis* FMCC B-109 να είναι ο πιο ανθεκτικός. Στην περίπτωση του MeOH του μελισσόχορτου δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη παρεμπόδισης σε όλες τις συγκεντρώσεις έναντι του συγκεκριμένου στελέχους.

**Πίνακας 5.3.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων των γενών *Bacillus*, *Clostridium* και *Listeria*

Φυτό	Διαλύτης εκχύλισης	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)								
			<i>B. cereus</i> LMG 6923 <sup>T</sup>	<i>B. licheniformis</i> FMCC B-91	<i>B. subtilis</i> FMCC B-109	<i>C. sporogenes</i> LMG 8421 <sup>T</sup>	<i>C. sporogenes</i> LMG 14743	<i>L.innocua</i> LMG 11387 <sup>T</sup>	<i>L.innocua</i> 13568	<i>L.innocua</i> BL 86/26	<i>L.welschimeri</i> 15008
Δεντρολίβανο	PE*	50	20	20	18	25	18	17	16	20	15
		25	18	18	14	22	16	14	12	16	13
	DE	25	17	16	15	28	24	18	18	18	18+3
Δίκταμο	PE	50	24	26	26	27	22	19	17	17	14
		25	16	24	24	25	21	11	13	13	12
	DE	25	18	12	14	24	19	11	8	10	12
Κρόκος	PE	50	0	0	0	20	18	0	0	0	0
		25	0	0	0	18	17	0	0	0	0
	DE	50	31	30	28	25	20	20+6	31	31	25+5
		25	20	20	20	25	20	14+8	27	27	18+4
Μελισσόχορτο	PE	50	10	11	11	25	15	0	0	0	0
		25	8	10	10	25	15	0	0	0	0
	DE	50	10	13	12	25	18	20	20	17	7
		25	8	11	10	25	18	14	14	14	0
Φασκόμηλο	PE	50	20	19	17	22	18	20	21	24	16
		25	18	17	15	20	18	18	19	23	14
	DE	25	16	15	15	24	22	15	15	17	14
Χαμομήλι	PE	50	9	7	8	23	16	10	10	14	9
		25	8	7	7	21	15	8	7	24	0
	DE	25	19	13	10	23	18	14+2	14+2	23	15

\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

Οι μελέτες σε αντίστοιχα εκχυλίσματα αναφέρουν άλλοτε δράση και άλλοτε όχι. Σαφώς σημαντικός παράγοντας σε όλες τις περιπτώσεις παίζει τόσο το φυτικό εκχύλισμα (ο τρόπος εκχύλισης, η συγκέντρωση της κάθε ουσίας στο εκχύλισμα), όσο και το στέλεχος που χρησιμοποιείται, καθώς και η μέθοδος προσδιορισμού. Αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή ικανότητα παρουσιάζει το MeOH εκχύλισμα του φασκόμηλου, ενώ μικρή αντιμικροβιακή ικανότητα αναφέρεται για αντίστοιχα εκχυλίσματα δεντρολίβανου, δίκταμου, μελισσόχορτου και χαμομηλιού έναντι στελέχους *B. cereus* (Proestos *et al.*, 2005, 2006b). Δράση έναντι του άλλου στελέχους του συγκεκριμένου είδους αναφέρουν και οι Roby *et al.*, (2013b), για εκχυλίσματα μεθανόλης, αιθανόλης, διαιθυλαιθέρα και εξανίου από χαμομήλι.

Οι Klančnik *et al.*, (2010) μελετώντας εκχυλίσματα δεντρολίβανου διαφορετικών συγκεντρώσεων σε καρνοσικό και ροσμαρινικό οξύ απέδειξαν ότι αυτά με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του καρνοσικού οξέος είχαν την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι κλινικού απομονωμένου στελέχους *B. cereus*. Αυτό εξηγεί και τα καλύτερα αποτελέσματα που πήραμε για το MeOH εκχύλισμα του δεντρολίβανου. Οι Herald και Davidson (1983) έδειξαν ότι τα 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  πικουμαρικού, καφεϊκού οξέος, και φερουλικού οξέος ανέστειλαν την ανάπτυξη του *B. cereus* ATCC 14579. Οι Rauha *et al.*, (2000) εξέτασαν τόσο τα φλαβονοειδή όσο και τα φαινολικά οξέα για τη δράση τους έναντι δυο στελεχών *B. subtilis*. Τα φλαβονοειδή ναριγενίνη, κερκετίνη, καμφερόλη και μορίνη εμφανίσαν κατά φθίνουσα σειρά αντιμικροβιακή δράση. Τα φαινολικά οξέα (γαλλικό και πρωτοκατεχικό οξύ), στη συγκέντρωση που εξετάστηκαν, (500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) με τη μέθοδο διάχυσης σε τρυβλία, ήταν ανενεργά. Ωστόσο, οι Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, (2012) αναφέρουν ότι οι MIC των αντίστοιχων φαινολικών οξέων έναντι 10 διαφορετικών στελεχών *B. cereus* κυμαίνονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (600-4800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Όσον αφορά τις κύριες ουσίες των PE εκχυλισμάτων, η καρβακρόλη και η θυμόλη ήταν πολύ δραστικές έναντι στελεχών *B. subtilis* και του *B. cereus* με το πικυμένιο και  $\gamma$ -τερπινένιο να είναι ανενεργά (Sivropoulou *et al.*, 1996; Cosentino *et al.*, 1999). Η θυογιόνη ακολουθούμενη από την ευκαλυπτόλη ήταν πιο δραστική από την

**Πίνακας 5.4.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων των γενών *Bacillus*, *Clostridium* και *Listeria*

Φυτό	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)								
		<i>B. cereus</i> LMG 6923 <sup>T</sup>	<i>B. licheniformis</i> FMCC B-91	<i>B. subtilis</i> FMCC B-109	<i>C. sporogenes</i> LMG 8421 <sup>T</sup>	<i>C. sporogenes</i> LMG 14743	<i>L.innocua</i> LMG 11387 <sup>T</sup>	<i>L.innocua</i> 13568	<i>L.innocua</i> BL 86/26	<i>L.welschimeri</i> 15008
Δεντρολίβανο	280	16	16	14	25	19	16	16	14	13
	168	15	15	10	23	17	16	15	13	12
	84	14	14	9	20	16	14	13	8	12
	28	12	11	7	14	12	11	11	7	0
Δίκταμο	280	11	14	10	25	18	15	15	10	0
	168	10	13	9	22	17	15	15	9	0
	84	9	9	8	20	15	14	14	8+3	0
	28	7	7	0	16	11	8	8	0	0
Κρόκος	280	12	8	0	25	22	0	0	0	0
	168	11	7	0	20	20	0	0	0	0
	84	10	7	7	18	15	0	0	0	0
	28	9	7	7	18	12	0	0	0	0
Μελισσόχορτο	280	11	10	0	25	20	0	0	0	0
	168	9	9	0	22	18	0	0	0	0
	84	8+4	8+4	0	20	15	0	0	0	0
	28	7+8	8+4	0	15	12	0	0	0	0
Φασκόμηλο	280	11	9	8	25	20	16	16	0	0
	168	9	8	8	23	19	15	15	0	0
	84	7	7	0	19	14	12	13	0	0
	28	0	0	0	15	12	7	7	0	0
Χαμομήλι	280	13	10	11	22	20	7	9	0	0
	168	12	9	10	20	18	7	8	0	0
	84	11	8	9	15	15	0	7	0	0
	28	7	7	0+7	13	10	0	0	0	0



καμφορά έναντι του παραπάνω στελέχους *B. subtilis* (Sivgorouliou *et al.*, 1997). Οι Dorman και Deans (2000) αναφέρουν ότι η κιτράλη χαρακτηρίζεται από μέτρια δραστικότητα σε σχέση με την καρβακρόλη, την  $\alpha$ -τερπινεόλη, την τερπινε-4-όλη, τη θουγιόνη, τη βορνεόλη και τη λιναλοόλη έναντι του ίδιου στελέχους *B. subtilis*. Η καρβακρόλη ήταν πιο δραστική από τις φαινόλες και τα φαινολικά οξέα που εξετάστηκαν σε 10 διαφορετικά στελέχη του *B. cereus* (Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012). Από το παραπάνω είναι εμφανής ο λόγος της μειωμένης δραστικότητας του PE εκχυλίσματος του μελισσόχορτου, λόγω της παρουσίας κυρίως μικρής ποσότητας κιτράλης. Ενώ η σημαντική δράση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων του δίκταμου, δεντρολίβανου και φασκόμηλου αποδίδεται στα μεγάλα ποσοστά καρβακρόλης, ευκαλυπτόλης, βορνεόλης και θουγιόνης στα παραπάνω εκχυλίσματα. Οι Móricz *et al.*, (2012) αναφέρουν αντιμικροβιακή δράση του χαμομηλιού έναντι στελέχους *B. subtilis* που απομονώθηκε από το έδαφος. Απομονώνοντας και εξετάζοντας τη δράση των συστατικών του κατέληξαν ότι οι σπιροαιθέρες είχαν σημαντική δράση, με την ουμπελιφερόνη να μην παρουσιάζει δράση και η  $\alpha$ -μπισαμπολόλη να εμφανίζει οριακή παρεμπόδιση, ενώ τα οξείδια αυτής είχαν ισχυρή παρεμποδιστική δράση.

Τα είδη της *Listeria* που μελετήσαμε δεν θεωρούνται παθογόνοι μικροοργανισμοί, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι μια ένδειξη δυνητικής παρεμπόδισης και του παθογόνου *L. monocytogenes*. Όλα τα DE εκχυλίσματα παρουσίασαν αξιόλογη δράση έναντι των εξεταζόμενων ειδών και στελεχών. Στα άλλα δυο εκχυλίσματα, τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται ανάλογα το φυτό το διαλύτη και το στέλεχος. Τα PE εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και του κρόκου δεν ήταν δραστικά σε κανένα από τα εξεταζόμενα είδη και στελέχη, ενώ αυτό του χαμομηλιού παρουσίασε οριακή παρεμπόδιση (7-10 mm, ζώνη παρεμπόδισης). Τα PE εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, δίκταμου και φασκόμηλου παρουσίασαν σημαντική αντιμικροβιακή ικανότητα. Τα MeOH εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και του κρόκου δεν είχαν δράση έναντι κανενός από τα εξεταζόμενα είδη και στελέχη, ενώ αυτά του φασκόμηλου και του χαμομηλιού παρουσίασαν παρεμπόδιση μόνο στο είδος *L. innocua* και μόνο στα στελέχη *L. innocua* LMG 11387<sup>T</sup> και *L. innocua* 13568. Το αντίστοιχο εκχύλισμα του δίκταμου είχε δράση μόνο έναντι όλων των στελεχών *L.*

*innocua*. Από τα MeOH εκχυλίσματα που μελετήθηκαν μόνο αυτό του δεντρολίβανου ήταν δραστικό έναντι στη *L. welschimeri*.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η παρουσία φλαβονοειδών και τερπενικών ενώσεων είναι αυτή που προσδίδει αντιμικροβιακή δράση στα DE MeOH εκχυλίσματα. Το καρνοσικό οξύ βρέθηκε ότι είναι το πιο αποτελεσματικό έναντι της *L. monocytogenes* Scott A, με τη λουτεολίνη, το 12-μεθοξυκαρνοσικό οξύ, το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ να παρουσιάζουν λιγότερη δραστικότητα σε σχέση με το πρώτο, ενώ η καρνοσόλη και ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, 100 και 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  αντίστοιχα, δεν είχαν δράση (Del Campo *et al.*, 2003). Για το ίδιο στέλεχος αναφέρεται ότι η καρβακρόλη είναι η πιο δραστική μαζί με τη γερανιόλη, με την κιτράλη, τη λιναλοόλη και την κιτρονελλάλη να προκαλούν παρεμπόδιση του παραπάνω μικροοργανισμού (Kim *et al.*, 1995). Σε μελέτη άλλου στελέχους *L. monocytogenes*, η καρβακρόλη και η θυμόλη είχαν δράση με το  $\alpha$ -πινένιο,  $\pi$ -κυμένιο,  $\gamma$ -τερπινένιο την  $\alpha$ -τερπινεόλη και τη λιναλοόλη, στη συγκέντρωση 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  που εξετάστηκαν, να μην παρουσιάζουν δράση (Cosentino *et al.*, 1999). Φλαβονοειδή που μελετήθηκαν είχαν δράση έναντι ειδών του γένους *Listeria*. Η εριοδουκτυόλη αναφέρεται ότι παρουσιάζει τη μικρότερη MIC έναντι στελέχους *L. innocua* (Mandalari *et al.*, 2007). Η ρουτίνη, η κερκετίνη και η κατεχίνη είχαν ισχυρότερη δράση σε σχέση με το καφεϊκό οξύ έναντι κλινικά απομονωμένου στελέχους *L. monocytogenes* (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007).

Τα δυο στελέχη του *C. sporogenes* ήταν ευαίσθητα σε όλα τα φυτικά εκχυλίσματα που εξετάσαμε, με το στέλεχος *C. sporogenes* LMG 14743 να αποδεικνύεται οριακά πιο ανθεκτικό. Σχεδόν όλες οι ενώσεις που μελέτησαν οι Dorman και Deans (2000) παρουσίασαν δράση έναντι του στελέχους *C. sporogenes* που μελετήσανε με την καρβακρόλη, τον οξικό γερανυλεστέρα και τη θουγιόνη να εμφανίζουν τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης.

Για τα άλλα τέσσερα είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων που μελετήσαμε (Πίνακες 5.5 και 5.6), τα PE εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, δίκταμου και φασκόμηλου είχαν αντιμικροβιακή δράση έναντι και των δυο ειδών του *Streptococcus* και *Staphylococcus*. Το PE εκχύλισμα του χαμομηλιού παρουσίασε καλύτερη δράση έ-

ναντι των στελεχών *Str. agalactiae* και *Str. anginosus* από ότι των στελεχών *St. aureus* και *St. epidermidis*. Το αντίστοιχο εκχύλισμα του μελισσόχορτου είχε οριακή παρεμποδιστική δράση μόνο στο *Str. agalactiae*, με το εκχύλισμα του κρόκου να είναι αδρανές και στα τέσσερα παραπάνω βακτήρια. Όπως σε όλες τις παραπάνω εξεταζόμενες ομάδες μικροοργανισμών, έτσι και εδώ όλα τα DE εκχυλίσματα όλων των φυτών ήταν δραστικά. Τα MeOH εκχυλίσματα παρουσιάζουν διαφορετική δράση ανάλογα των μικροοργανισμό-στόχο και του φυτικό υλικό. Το εκχύλισμα του κρόκου είχε δράση μόνο έναντι των ειδών του γένους *Streptococcus*. Τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του δίκταμου, μελισσόχορτου και φασκόμηλου είχαν δράση έναντι των στελεχών *Str. agalactiae* και *Str. anginosus* και οριακή παρεμποδιστική δράση στα στελέχη *St. aureus* και *St. epidermidis*, κυρίως στις μεγάλες συγκεντρώσεις. Αντίθετα τα MeOH εκχυλίσματα του δεντρολίβανου και του χαμομηλιού ήταν δραστικά έναντι

**Πίνακας 5.5.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαυθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων των γενών *Streptococcus* και *Staphylococcus*

Φυτό	Διαλύτης Εκχύλισης	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)			
			<i>Str. agalactiae</i> LMG 14694 <sup>T</sup>	<i>Str. anginosus</i> LMG 14502 <sup>T</sup>	<i>St. aureus</i> DSM 21705	<i>St. epidermidis</i> FMCC B-202
Δεντρολίβανο	PE*	50	18	16	16	16
		25	16	13	13	14
	DE	25	20	24	17	16
Δίκταμο	PE	50	24	19	22	26
		25	20	14	18	18
	DE	25	14	10	10	12
Κρόκος	PE	50	0	0	0	0
		25	0	0	0	0
	DE	50	35	25	30	30
25		17	15	24	25	
Μελισσόχορτο	PE	50	7	0	0	0
		25	0	0	0	0
	DE	50	15+13	12	20	18
		25	12+10	9	14	14
Φασκόμηλο	PE	50	20	16	18	18
		25	18	13	15	16
	DE	25	20	14	14	14
Χαμομήλι	PE	50	14	12	7	7
		25	11	10	0	0
	DE	25	16	16	20	24

\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, δισυθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

των τεσσάρων στελεχών.

Οι περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές επικεντρώνονται κυρίως την αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων των φυτών της οικογένειας Lamiaceae και Asteraceae έναντι των παραπάνω μικροοργανισμών (Sivgoroulou *et al.*, 1996, 1997; Marino *et al.*, 2001; Celiktas *et al.*, 2007; Longaray Delamare *et al.*, 2007; Liolios *et al.*, 2009; Okoh *et al.*, 2010; Móricz *et al.*, 2012; Jordán *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). Η θυμόλη ήταν πιο δραστική από την καρβακρόλη έναντι στελεχών του γένους *Staphylococcus* (Cosentino *et al.*, 1999). Ενώ σε άλλη έρευνα, μελετώντας 10 διαφορετικά στελέχη του *St. aureus* παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα (Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012).

**Πίνακας 5.6.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων των γενών *Streptococcus* και *Staphylococcus*

Φυτό	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)			
		<i>Str. agalactiae</i> LMG 14694 <sup>T</sup>	<i>Str. anginosus</i> LMG 14502 <sup>T</sup>	<i>St. aureus</i> DSM 21705	<i>St. epidermidis</i> FMCC B-202
Δεντρολίβανο	280	17	15	13	20
	168	15	13	11	19
	84	14	10	7	13
	28	11	9	0	0
Δίκταμο	280	16	15	9	9
	168	14	13	9	8
	84	14	11	0	0
	28	11	10	0	0
Κρόκος	280	15	18	0	0
	168	14	15	0	0
	84	13	13	0	0
	28	10	9	0	0
Μελισσόχορτο	280	13	15	7	0+10
	168	12	13	0	0
	84	11	10	0	0
	28	10	7	0	0
Φασκόμηλο	280	16	15	8	7
	168	15	13	0	0
	84	14	11	0	0
	28	10	9	0	0
Χαμομήλι	280	16	15	14	13
	168	14	12	14	12
	84	13	11	11	10
	28	10	9	9	8

Ωστόσο, διάφορα εκχυλίσματα έχουν αναφερθεί με αντιμικροβιακή δράση. Μεθανολικά, υδατικά, ακετονικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου (Moreno *et al.*, 2006), εκχυλίσματα υδατικής μεθανόλης (62%) δικτάμου (Proestos *et al.*, 2006b), εκχυλίσματα μελισσόχορτου σε πετρελαϊκό αιθέρα, αιθανόλη και νερό (Mencherini *et al.*, 2007; Čanadanović-Brunet *et al.*, 2008), εκχυλίσματα εξανίου, διαιθυλαιθέρα, αιθανόλης και μεθανόλης του χαμομηλιού (Roby *et al.*, 2013), παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι στελεχών *St. aureus*. Η δράση οφείλεται στην παρουσία κυρίως καρνοσικού οξέος και δευτερευόντως στο ροσμαρινικό οξύ (Moreno *et al.*, 2006).

Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα MeOH εκχυλίσματα στην πλειονότητα τους δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση, πλην αυτό του δεντρολίβανου για τις περιπτώσεις των στελεχών *Ps. aeruginosa* και *K. oxytoca* (Πίνακας 5.7). Τα PE του δεντρολίβανου, δίκταμου και φασκόμηλου παρουσίασαν παρεμποδιστική δράση σε όλα τα στελέχη των αρνητικών κατά Gram βακτήρια που εξετάστηκαν. Το αντίστοιχο εκχύλισμα του χαμομηλιού είχε δράση μόνο έναντι των δυο στελεχών του *E. coli* και της *S. typhimurium*, στα άλλα δυο στελέχη δεν εμφάνισε ζώνη παρεμπόδισης. Τα PE εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και του κρόκου δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση σε κανένα από τα βακτήρια που εξετάστηκαν. Τα DE εκχυλίσματα όλων ανεξαιρέτως των φυτών παρουσίασαν αξιόλογη δράση, με αυτό του κρόκου να είναι πιο δραστικό έναντι δυο στελεχών του *E. coli* (Πίνακας 5.8).

Στην παρούσα έρευνα επιβεβαιώνεται ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα θετικά κατά Gram, κάτι που έχει αναφερθεί και από πολλούς (Burt, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010). Έτσι, λίγες αναφορές υπάρχουν για δράση μεθανολικών και γενικά πολικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών και όταν αυτή αναφέρεται η δράση είναι αισθητά πιο περιορισμένη από την αντίστοιχη των αιθερίων ελαίων. Τα τελευταία έχουν μελετηθεί για τη δράση τους έναντι στελεχών γενών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Sivropoulou *et al.*, 1996, 1997; Marino *et al.*, 2001; Celiktas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2001). Οι Moreno *et al.*, (2006) αναφέρουν ότι η MIC μεθανολικών εκχυλισμάτων δεντρολίβανου έναντι στελεχών αρνητικών κατά Gram βακτήρια όπως *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ps. mirabilis* είναι 4πλάσια σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται για τα

**Πίνακας 5.7.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι αρνητικών κατά Gram παθογόνων τροφίμων

Φυτό	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)				
		<i>E.coli</i> CFA-I	<i>E. coli</i> C1845	<i>S.typhimurium</i> SL1344	<i>Ps. aeruginosa</i> FMCC B-26	<i>K.oxytoca</i> FMCC B-197
Δεντρολίβανο	280	0	0	0	9	9
	168	0	0	0	9	9
	84	0	0	0	8	7
	28	0	0	0	7	0
Δίκταμο	280	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0
	84	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
Κρόκος	280	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0
	84	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
Μελισσόχορτο	280	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0
	84	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
Φασκόμηλο	280	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0
	84	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
Χαμομήλι	280	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0
	84	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0

αντίστοιχα θετικά κατά Gram βακτήρια. Αντίστοιχα και η MIC του καρνοσικού οξέος κυμαίνεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με το ροσμαρινικό οξύ να μην έχει δράση. Οι Chatzorouliou *et al.*, (2010) απομόνωσαν 15 ενώσεις από μεθανολικό εκχύλισμα δίκταμου και τις εξέτασαν ως προς την αντιμικροβιακή τους ικανότητα έναντι κλινικά απομονωμένων στελεχών *Ps. aeruginosa* και *K. pneumoniae*. Από τις 15 αυτές ενώσεις μόνο οι τέσσερις είχαν δράση έναντι του πρώτου με πιο ισχυρό το σαλβιανολικό οξύ P, ακολουθούμενο από τον μεθυλεστέρα του ροσμαρινικού οξέος, την εριοδουκτουόλη και το καφεϊκό οξύ, ενώ στο δεύτερο μόνο το σαλβιανολικό οξύ P έδειξε δράση.

**Πίνακας 5.8.** Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι αρνητικών κατά Gram παθογόνων τροφίμων

Φυτό	Διαλύτης Εκχύλισης	mg/mL	Ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος, mm)				
			<i>E.coli</i> CFA-I	<i>E. coli</i> C1845	<i>S.typhimurium</i> SL1344	<i>Ps. aeruginosa</i> FMCC B-26	<i>K.oxytoca</i> FMCC B-197
Δεντρολίβανο	PE*	50	16	15	14	7	14
		25	14	13	10	0	10
	DE	25	14	13+5	15	11	17
Δίκταμο	PE	50	14	15	14	7	14
		25	11	13	10	0	10
	DE	25	11	12	12	11	11
Κρόκος	PE	50	0	0	0	0	0
		25	0	0	0	0	0
	DE	50	24	25+6	20	19	17
		25	18	18+7	15	13	0+14
Μελισσόχορτο	PE	50	0	0	0	0	0
		25	0	0	0	0	0
	DE	50	13+7	13+7	11	11	15
		25	7	7	7	0	0
Φασκόμηλο	PE	50	12	13	12	0	0
		25	10	10	9	0	0
	DE	25	14	17	16	0+10	7
Χαμομήλι	PE	50	10	12	12	0	0
		25	7	10	10	0	0
	DE	25	14+5	14+5	14	14	20

\*PE, DE και MeOH οι διαλύτες: πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας και μεθανόλη, αντίστοιχα.

Η περίπτωση του κρόκου είναι ιδιαίτερη. Για πρώτη φορά μελετάται το φυτό αυτό και τα εκχυλίσματά του σε ένα τόσο μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Παλιότερες αναφορές επικεντρώνονται σε αντιμυκητιακή δράση και δράση έναντι του *Helicobacter pylori* μεθανολικών εκχυλισμάτων, σαφρανάλης και κροκινών (Sekine *et al.*, 2007; Nakhaei *et al.*, 2008). Οι Pintado *et al.*, (2011) μελέτησαν την επιβίωση διαφόρων κλινικών στελεχών *S. enterica*, *E. coli* *St. aureus*, καθώς και εργαστηριακών στελεχών *S. typhimurium* και *St. aureus* μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε δείγματα κρόκου διαφορετικής προέλευσης. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε θανάτωση των στελεχών μετά από 16 μέρες αποθήκευσης, με τα εργαστηριακά στελέχη να είναι πιο ευαίσθητα. Πηγαίνοντας ένα βήμα παρακάτω, οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν καθαρή σαφρανάλη και κροκίνη, καθώς και μείγματα αυτών και υπολόγισαν τη MIC για κάθε στέλεχος. Η σαφρανάλη βρέθηκε ότι είναι πιο δραστική

από την κροκίνη, με τις τιμές να κυμαίνονται από 2- 8 mg/mL και 64-128 mg/mL, αντίστοιχα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα συνεργιστικής δράσης. Ωστόσο, οι παραπάνω ποσότητες είναι αρκετά υψηλές, αφού στο φυτικό υλικό τα επίπεδα συγκεντρώσεων κυμαίνονται στα 773 μg/g φ.υ και 313 mg/ g φ.υ., για τη σαφρανάλη και το σύνολο των κροκινών, αντίστοιχα. Έτσι, κατέληξαν πως και άλλες ενώσεις που βρίσκονται στον κρόκο είναι υπεύθυνες για την αντιβακτηριδιακή του ικανότητα.

Με την παραπάνω διαπίστωση μπορούμε να εξηγήσουμε τις μικρές ζώνες παρεμπόδισης των PE και MeOH εκχυλισμάτων, οι κύριες ενώσεις των οποίων είναι η σαφρανάλη και οι κροκίνες, αντίστοιχα, και να εξηγήσουμε τη μεγάλη δραστικότητα του DE εκχυλίσματος, η κύρια ουσία του οποίου είναι η πικροκροκίνη. Η ένωση αυτή είναι γλυκοζιτής του οποίου το άγλυκο τμήμα είναι η πρόδρομη ένωση της σαφρανάλης. Ο γλυκοζιτής αυτός, που προσδίδει την πικρή γεύση των στιγμάτων του κρόκου, δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες.

Συμπερασματικά, σε γενικές γραμμές, κανένα εκχύλισμα δεν έδωσε ένα πανομοιότυπο αποτέλεσμα. Σε κάποιους μικροοργανισμούς διαπιστώσαμε εκχυλίσματα να έχουν δράση και σε άλλους όχι. Σημαντικό ρόλο παίζει η σύσταση του κάθε εκχυλίσματος και οι ποσότητες των δραστικών ενώσεων που περιέχει. Επιπλέον, δεν πρέπει να αποκλείσουμε το φαινόμενο της συνεργιστικής ή της ανταγωνιστικής δράσης που λαμβάνει χώρα σε ένα πολύπλοκο σύστημα όπως είναι ένα φυσικό προϊόν. Το π-κυμένιο δεν παρουσίασε δράση έναντι στελεχούς *B. cereus* αλλά βρέθηκε ότι εντείνει την αντιμικροβιακή ικανότητα της καρβακρόλης (Ultrree *et al.*, 2000). Συνδυασμοί θυμόλης και καρβακρόλης προσδίδουν καλύτερο αποτέλεσμα έναντι στελεχών *St. aureus* και *Ps. aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001). Ενώ ο συνδυασμός ευκαλυπτόλης και λιναλοόλης, εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα έναντι στελεχούς *E. coli* σε σχέση με την καθαρή λιναλοόλη (Tajkarimi *et al.*, 2010).

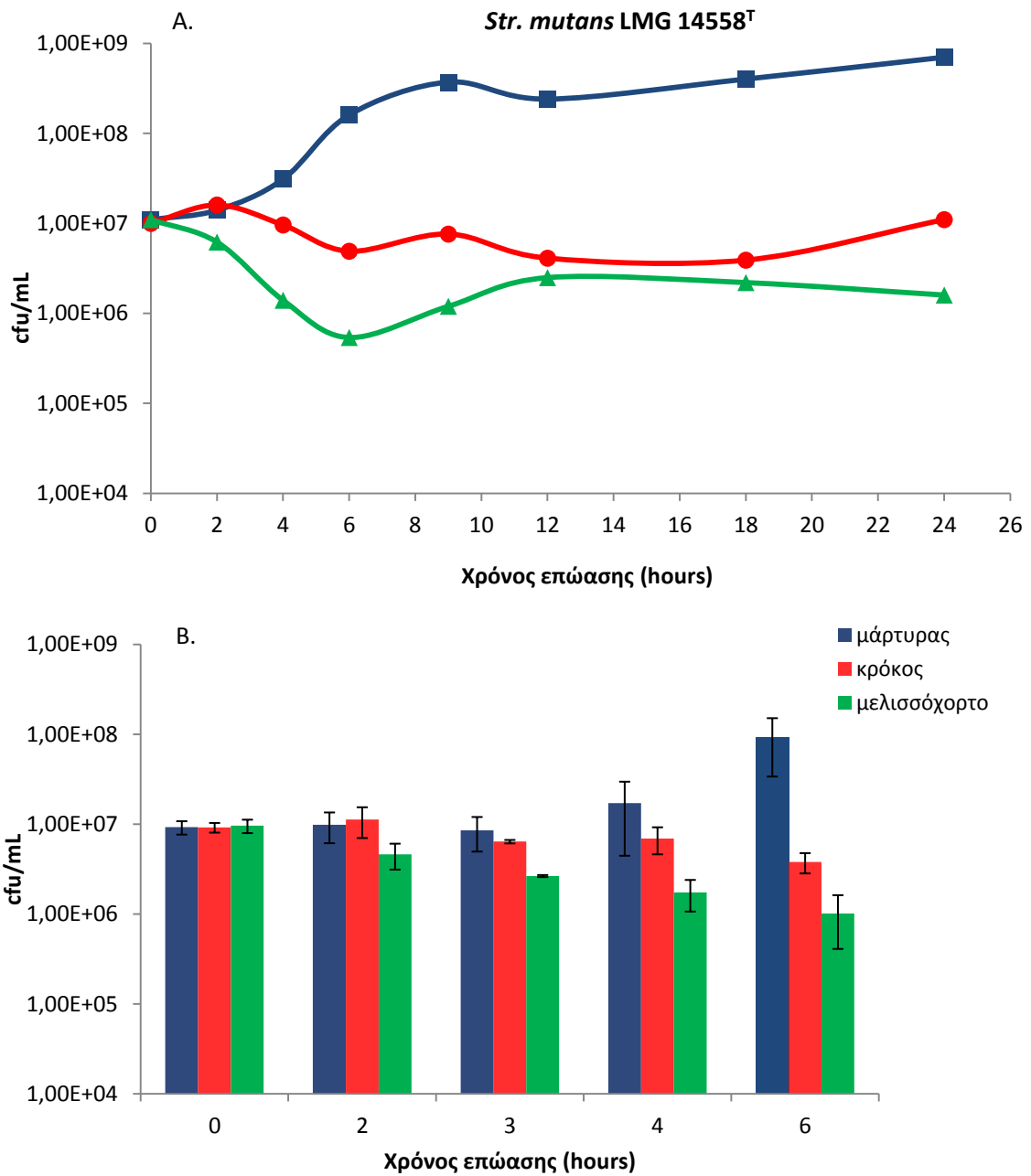


## 5.2. *In vitro* μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης (Killing assay-KA)

Κατά τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένα ζεύγη εκχυλίσματος και μικροοργανισμού-στόχου. Η βακτηριοκτόνος δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των κρίκου (*Crocus sativus* L.) και του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.) μελετήθηκε έναντι των παθογόνων της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutans* LMG 14558<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis* LMG 14532<sup>T</sup> και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup>. Ενώ στα αιθερικά εκχυλίσματα των παραπάνω φυτών, μελετήθηκε η δράση τους έναντι των εντερικών παθογόνων *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* SL1344.

Από τα σχήματα φαίνεται η εμφανής δράση των εκχυλισμάτων έναντι του κάθε παθογόνου στελέχους με μείωση του πληθυσμού του στελέχους κατά τη διάρκεια επώασής του με το κάθε υπερκείμενο. Πιο αναλυτικά, μετά από 4 h επώασης των κυττάρων του στελέχους *Str. mutans* LMG 14558<sup>T</sup> παρατηρήθηκε μια οριακή μείωση 1 λογαριθμικού κύκλου στα κύτταρα (cfu/mL) του στελέχους LMG 14558<sup>T</sup>, τα οποία επώαστηκαν με το μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα για τον κρίκο λαμβάνεται μετά από 6 h. Ωστόσο και για τα δυο φυτικά εκχυλίσματα η μείωση που προκάλεσαν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P < 0.05$ ) μετά τις 6 h. Μετά από 24 h επώαση, παρατηρήθηκε μείωση στα κύτταρα του στελέχους η οποία κυμαίνονταν μεταξύ 1.5 και 2.0 λογαριθμικών κύκλων παρουσία των μεθανολικών εκχυλισμάτων του κρίκου και του μελισσόχορτου, ενώ δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη μείωση για το δείγμα του μάρτυρα (μεθανόλη 7%). Κατά τη διάρκεια της επώασης παρατηρείται πως τα κύτταρα του στελέχους περνούν μια φάση προσαρμογής μεταξύ των 6 και 9 h επώασης και τελικά σταθεροποιούνται στα  $10^6$ -  $10^7$  κύτταρα (cfu/mL), με το μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου να έχει καλύτερη δράση σε σχέση με το αντίστοιχο του κρίκου (**Σχήμα 5.1**).

Στην περίπτωση του στελέχους *Str. oralis* LMG 14532<sup>T</sup>, παρατηρούμε ότι η μείωση των κυττάρων αυτού μετά την επώαση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα είναι στατιστικά σημαντική μετά τις 4 h επώασης (**Σχήμα 5.2**). Ενώ η μείωση κατά 1 λογαριθμικό κύκλο είναι εμφανής μετά από επώαση 6 h. Η αντιμικροβιακή ικανότητα

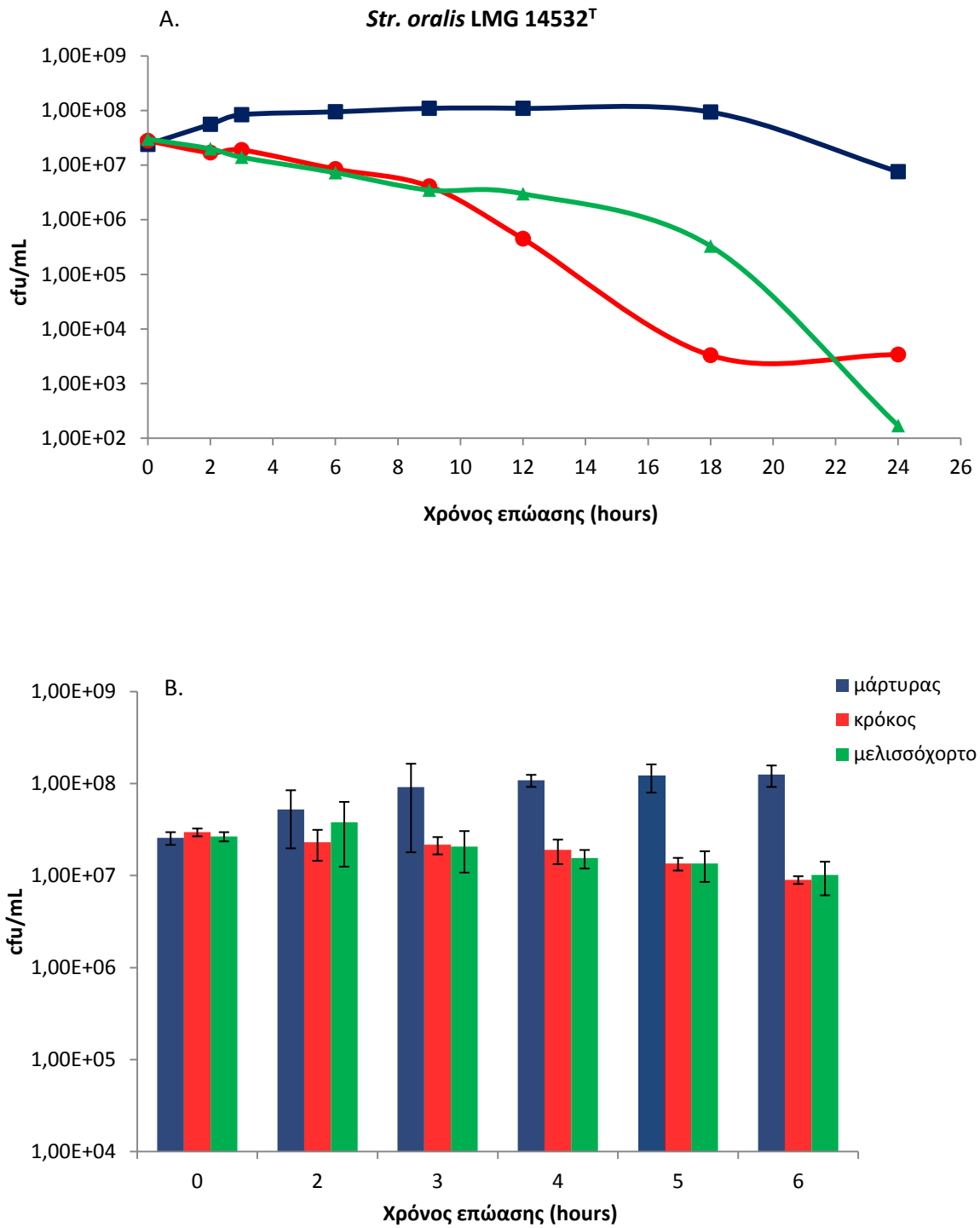


**Σχήμα 5.1.** Επιβίωση του στελέχους *Str. mutans* LMG 14558<sup>T</sup> κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων.

A) Σε 24 h επώαση

B) Σε 6 h επώαση

Κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 7%, ενώ χρησιμοποιήθηκαν MeOH εκχυλίσματα κρόκου και μελισσόχορτου, τα οποία αραιώθηκαν με BHI τελικής συγκέντρωσης 28 mg/mL.

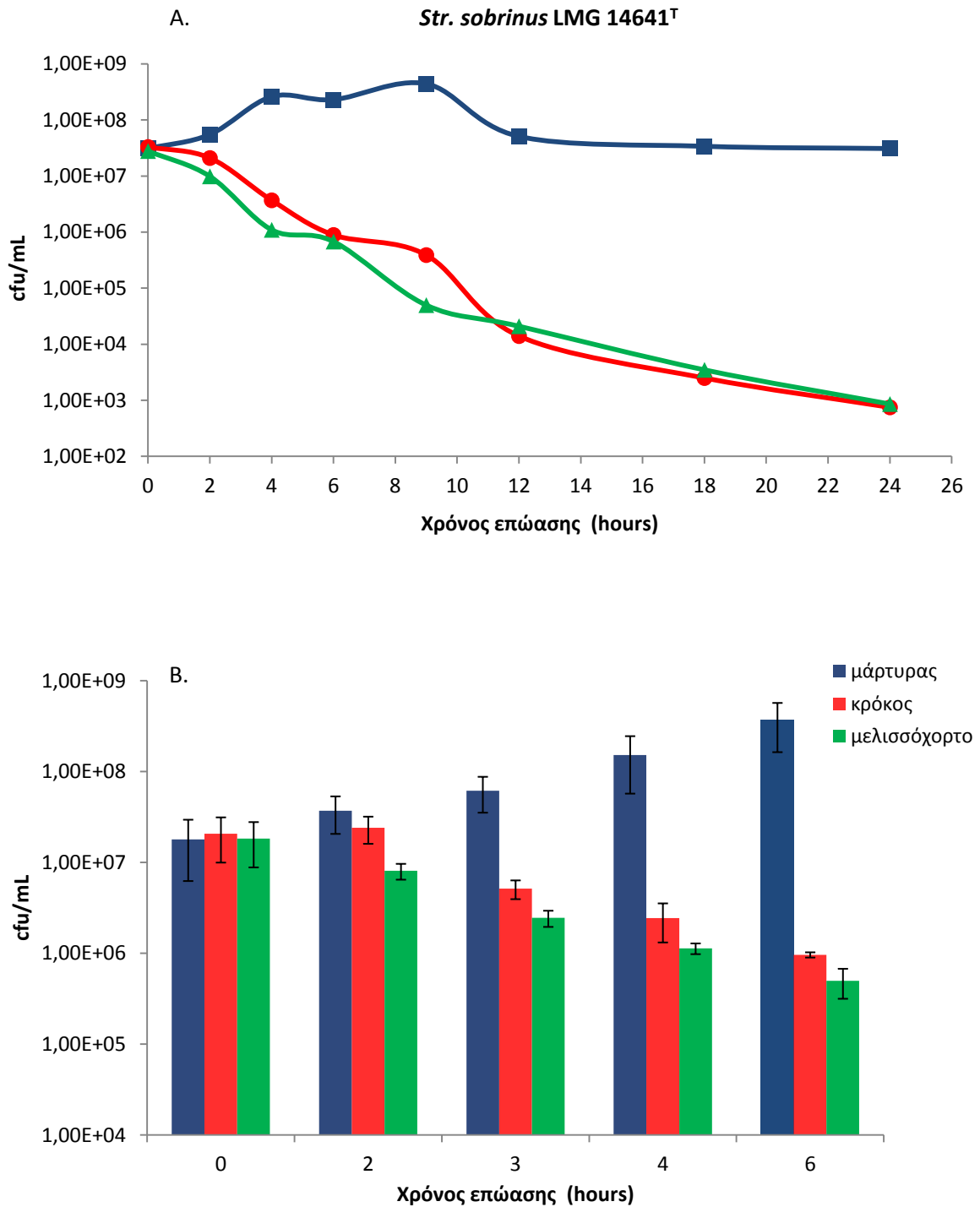


**Σχήμα 5.2.** Επιβίωση του στελέχους *Str. oralis* LMG 14532<sup>T</sup> κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων.

A) Σε 24 h επώαση

B) Σε 6 h επώαση

Κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 7%, ενώ χρησιμοποιήθηκαν MeOH εκχυλίσματα κρόκου και μελισσόχορτου, τα οποία αραιώθηκαν με BHI τελικής συγκέντρωσης 28 mg/mL.



**Σχήμα 5.3.** Επιβίωση του στελέχους *Str. sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων.

A) Σε 24 h επώαση

B) Σε 6 h επώαση

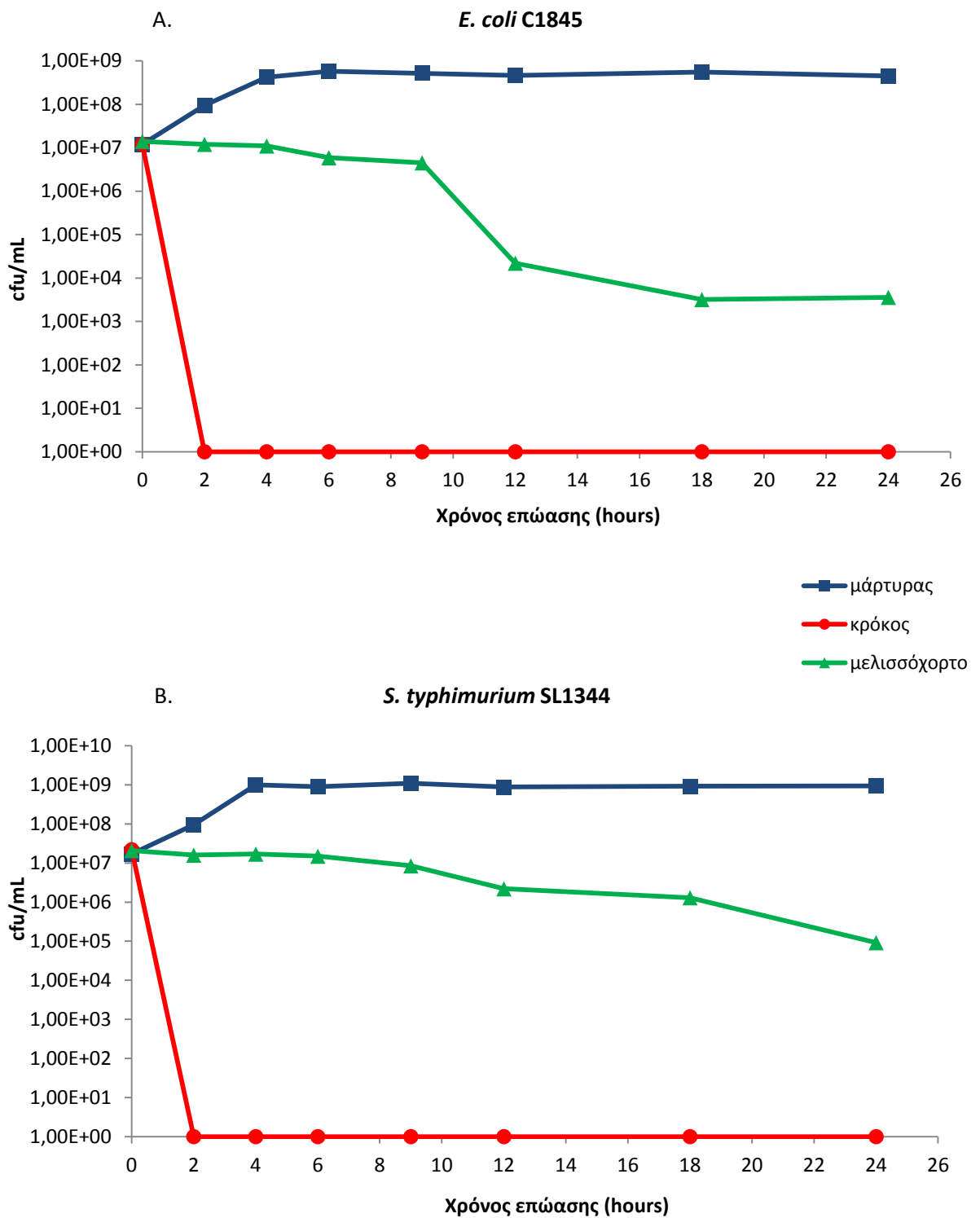
Κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 7%, ενώ χρησιμοποιήθηκαν MeOH εκχυλίσματα κρόκου και μελισσόχορτου, τα οποία αραιώθηκαν με BHI τελικής συγκέντρωσης 28 mg/mL.

των εκχυλισμάτων φαίνεται πως είναι παρόμοια μέχρι τις 9 h, αλλά μετά η μείωση που προκαλεί το εκχύλισμα του κρόκου είναι πιο έντονη. Στις 18 h, η μείωση των κυττάρων φτάνει τους 4,5 και 2,5 λογαριθμικούς κύκλους για τον κρόκο και το μελισσόχορτο, αντίστοιχα. Μετά από 24 h επώαση, τα κύτταρα στο δείγμα του μάρτυρα παρουσιάζουν μια οριακή μείωση, που μπορεί να οφείλεται αφ' ενός στην παρουσία της μεθανόλης, αφ' ετέρου από έλλειψη άλλων θρεπτικών συστατικών στο μέσο.

Το στελέχος *Str. sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> φαίνεται ότι είναι το πιο ευαίσθητο από τα υπόλοιπα δυο, με τα εκχυλίσματα τόσο του κρόκου, όσο και του μελισσόχορτου να προκαλούν αντίστοιχες μειώσεις πληθυσμών. Μετά από επώαση 24 h, η μείωση που προκαλούν και τα δυο φυτικά εκχυλίσματα είναι της τάξης των 4,5 λογαριθμικών κύκλων. Η μείωση κατά 1 λογαριθμικό κύκλο επιτελείται μέσα σε 4 h, ενώ αυτή είναι στατιστικά σημαντική μετά τις 3 h (**Σχήμα 5.3**).

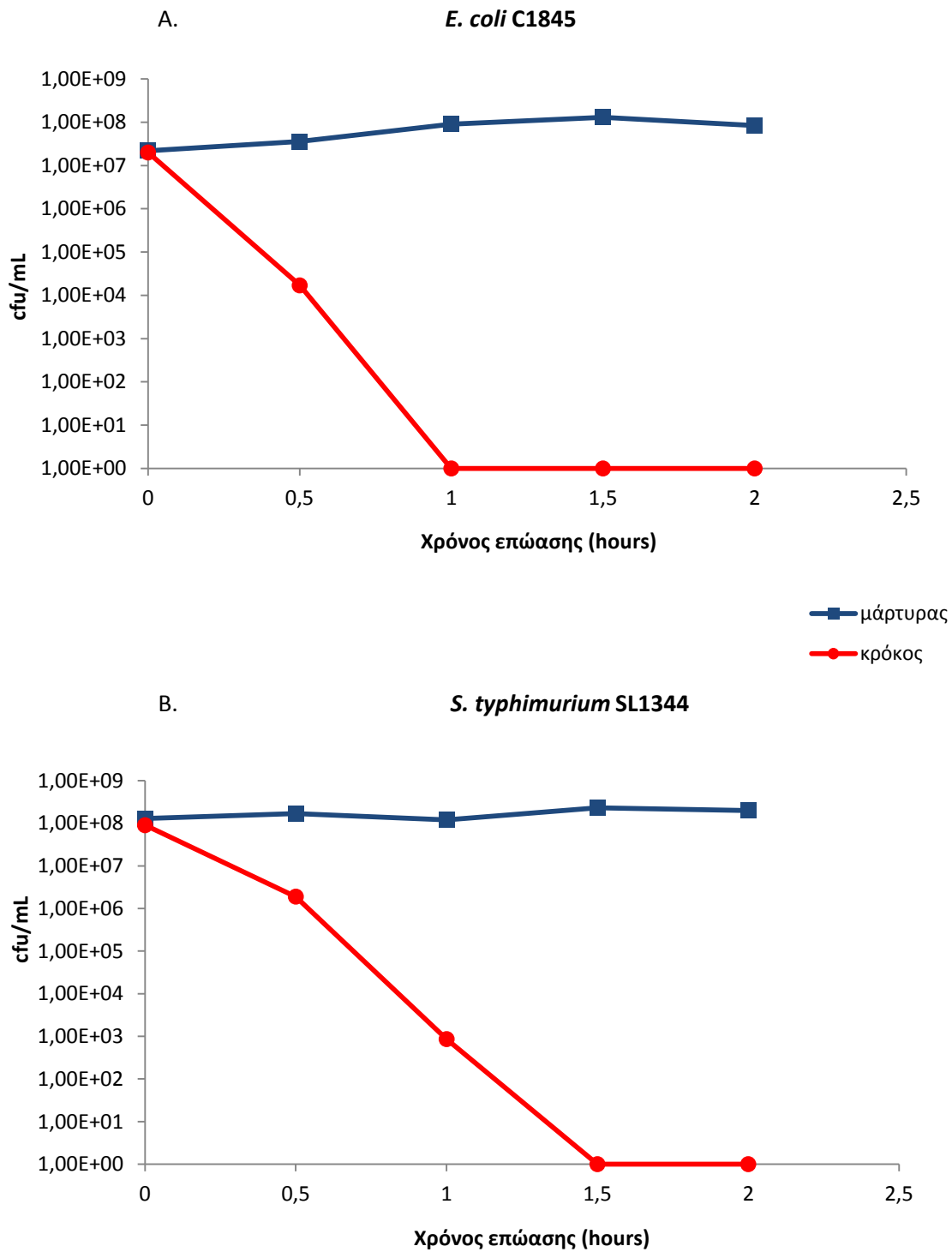
Εξετάζοντας την περίπτωση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, παρατηρούμε ότι το DE εκχύλισμα του κρόκου, στη συγκέντρωση που το μελετήσαμε, είχε βακτηριοκτόνος δράση και στα δυο στελέχη μικροοργανισμών *E. coli* C1845 και *S.typhimurium* SL1344. Μάλιστα στο αρχικό πείραμα της 24 h επώασης, μέσα σε 2 ώρες τα στελέχη είχαν θανατωθεί (**Σχήμα 5.4**). Μελετώντας την επιβίωση των στελεχών μέσα στο διάστημα των 2 h, παρατηρήσαμε πως η θανάτωση επιτεύχθηκε μέσα σε 1 h για το *E. coli* C1845, ενώ η *S. typhimurium* SL1344 είχε λίγη καλύτερη αντοχή και το θανατηφόρο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε μέσα σε 1,5 h (**Σχήμα 5.5**). Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 10%. Σε καμία περίπτωση, αυτή δεν προκάλεσε μείωση των κυττάρων στους μικροοργανισμούς- στόχους.

Από την άλλη πλευρά, η δράση των εκχυλισμάτων του μελισσόχορτου είχαν βακτηριοστατική δράση, με τη μείωση κατά 1 λογαριθμικό κύκλο στα κύτταρα (cfu/mL) του *E. coli* C1845 να συμβαίνει μετά από επώαση 4 h, με τη μείωση των κυττάρων να είναι στατιστικά σημαντική μετά τις 2 h επώασης. Το ανάλογο αποτέλεσμα στα κύτταρα του στελέχους *S. typhimurium* SL1344 μεταξύ 4 και 6 h, με τη μείωση να θεωρείται στατιστικά σημαντική μετά τις 4 h (**Σχήμα 5.6**).



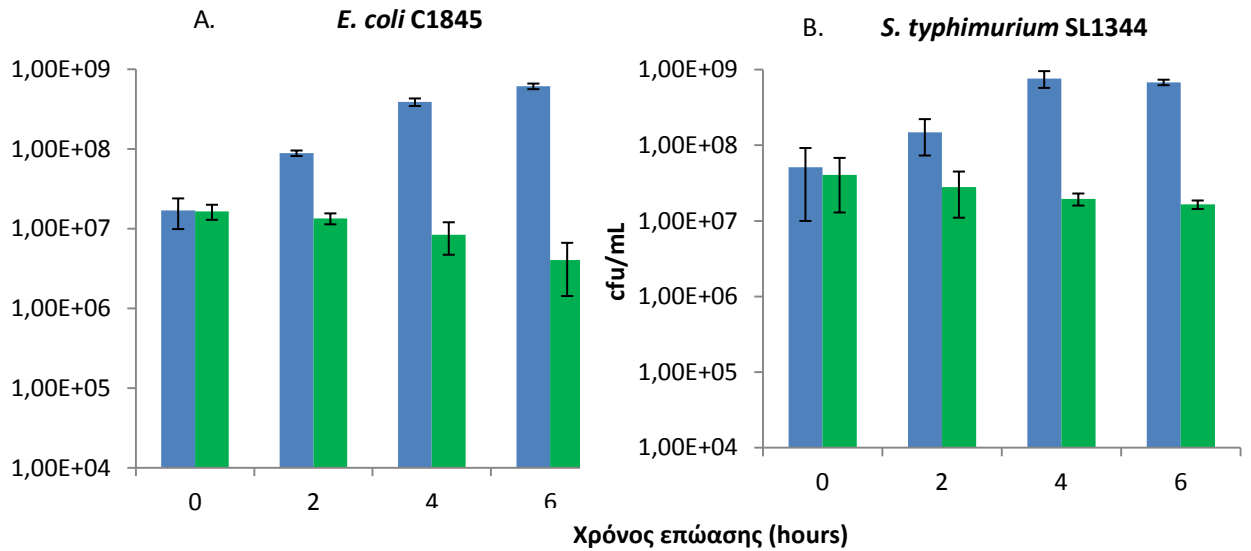
**Σχήμα 5.4.** Επιβίωση των στελεχών *E. coli* C1845 (A) και *S. typhimurium* SL1344 (B) κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων μετά από 24 h επώαση

Κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 10%, ενώ χρησιμοποιήθηκαν DE εκχυλίσματα κρόκου και μελισσόχορτου, τα οποία αραιώθηκαν με BHI τελικής συγκέντρωσης 5 mg/mL.



**Σχήμα 5.5.** Επιβίωση των στελεχών *E. coli* C1845 (A) και *S. typhimurium* SL1344 (B) κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης του DEεκχυλίσματος του κρόκου μετά από 2 h επώαση

Κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 10%, ενώ χρησιμοποιήθηκαν DE εκχυλίσματα κρόκου αραιωμένο με BHI τελικής συγκέντρωσης 5 mg/mL.



**Σχήμα 5.6.** Επιβίωση των στελεχών *E. coli* C1845 (A) και *S. typhimurium* SL1344 (B) κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης του DEεκχυλίσματος του μελισσόχορτου μετά από 6 h επώαση

Κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και μεθανόλη τελικής συγκέντρωσης 10%, ενώ χρησιμοποιήθηκαν DE εκχυλίσματα μελισσόχορτου αραιώμενο με BHI τελικής συγκέντρωσης 5 mg/mL.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου, επιβεβαιώνεται ότι η απουσία ζώνης αναστολής δεν σημαίνει απαραίτητα το εξεταζόμενο υπερκείμενο είναι ανενεργό. Η συγκέντρωση του MeOH εκχυλίσματος που μελετήσαμε στα πειράματα της βακτηριοκτόνου δράσης δεν είχαν δείξει ζώνη παρεμπόδισης για τα στελέχη κοιλότητας *Str. mutans* LMG 14558<sup>T</sup> και *Str. sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> με τη μέθοδο WDA (Πίνακας 5.2). Βέβαια, η μέθοδος της διάχυσης είναι ελκυστική λόγω της απλότητάς της και του χαμηλού κόστους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα πρώτο στάδιο ελέγχου (Klančnic *et al.*, 2010; Tajkarimi *et al.*, 2010). Ωστόσο, πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι οι μέθοδοι διάχυσης για έλεγχο της δράσης των φλαβονοειδών και ενώσεων χαμηλής πολικότητας μπορεί να δώσουν αναξιόπιστες πληροφορίες, διότι ένα ισχυρό αντιβακτηριακό συστατικό μπορεί να έχει χαμηλό ποσοστό διάχυσης στο άγαρ (Burt, 2004; Cushnie και Lamb, 2005; Moreno *et al.*, 2006).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιβακτηριακής δραστηριότητας, οι μέθοδοι της αραιώσης είναι οι πιο κατάλληλοι, όπου η αντιβακτηριακή δράση των



φυτικών εκχυλίσματων βρέθηκε να κυμαίνεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τις μεθόδους διάχυσης (Klančnik *et al.*, 2010). Ωστόσο, η παραπάνω μέθοδος πάλι δεν μας διασφαλίζει τη βακτηριοκτόνο ή τη βακτηριοστατική δράση των δειγμάτων.

Η ένταση και ο ρυθμός της παρεμποδιστικής δράσης των εκχυλισμάτων διαφέρει ανάλογα το εκχύλισμα και το μικροοργανισμό- στόχο που μελετήσαμε. Οι διαφορετικές ενώσεις που αποτελούν το κάθε εκχύλισμα συνεισφέρουν με το δικό τους τρόπο κάθε φορά στο τελικό αποτέλεσμα. Άλλωστε, οι Del Campo *et al.*, (2003), χρησιμοποιώντας στατιστικά προγράμματα, αναφέρουν ότι η ένταση της παρεμποδιστικής δράσης των φαινολικών συστατικών είναι διαφορετική ανάλογα με τον χρόνο επώασης. Οι 8 ενώσεις που απομονωθήκαν από εκχύλισμα δεντρολίβανου είχαν διαφορετική δράση ανάλογα με τον χρόνο επώασης. Έτσι, το καρνοσικό οξύ ήταν αυτό που, από τις 8 ενώσεις, προκάλεσε τη μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων του στελέχους *L. monocytogenes* Scott A στις 9 και 24 h επώασης, με το μεθοξυ καρνοσικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τη λουτεολίνη να έχουν μικρότερη παρεμποδιστική δράση από ότι το καρνοσικό οξύ. Η δράση της λουτεολίνης έγινε πιο έντονη μετά τις 72 h. Ωστόσο, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της και η καρνοσόλη δεν είχαν μεγάλη επίδραση. Το καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ εμφανίζονται με ισχυρή ανασταλτική δράση μόνο μετά από 72 h, ενώ το φερουλικό οξύ ενίσχυσε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

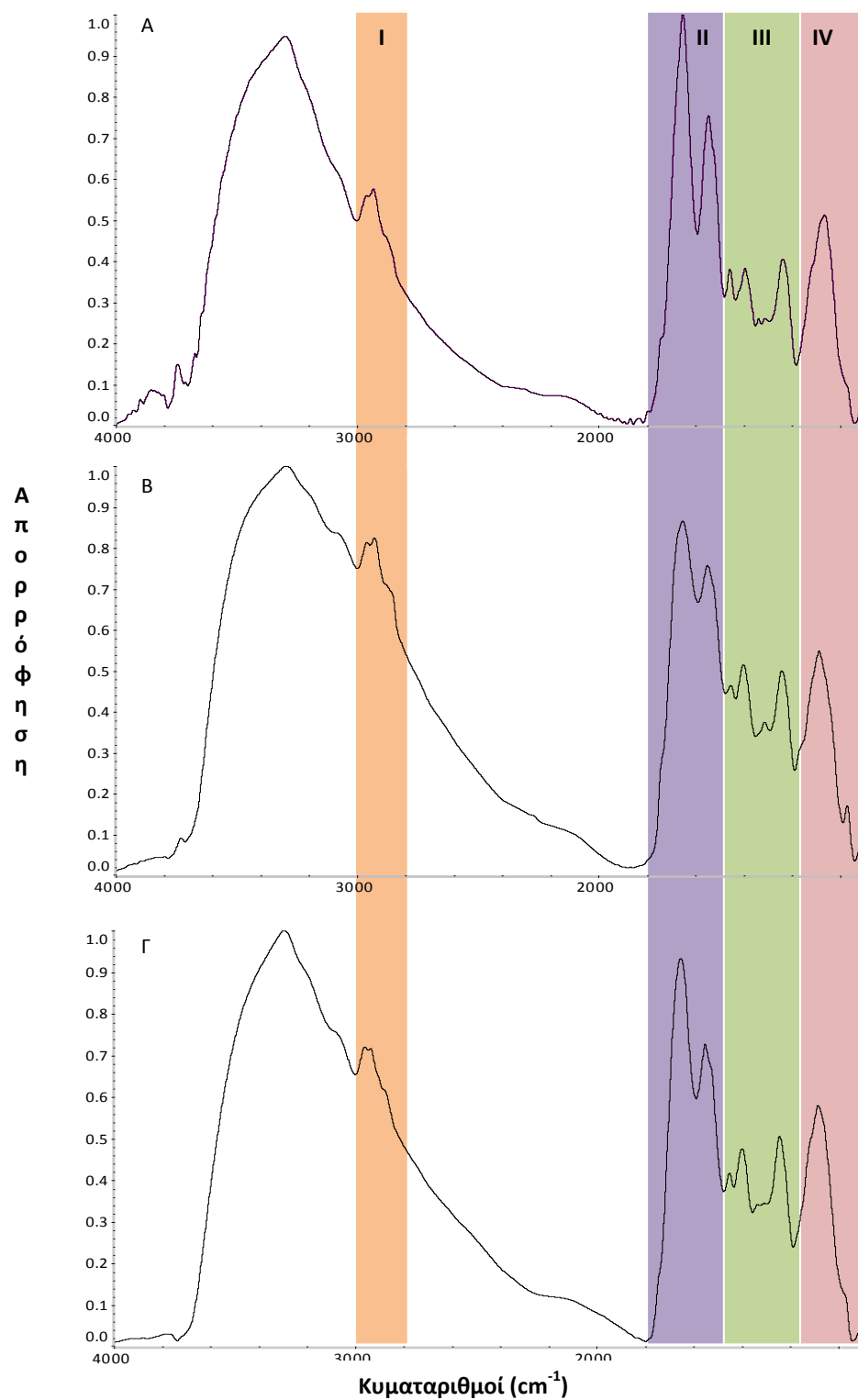
### 5.3. *In vitro* μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

#### 5.3.1. Φάσματα FT-IR

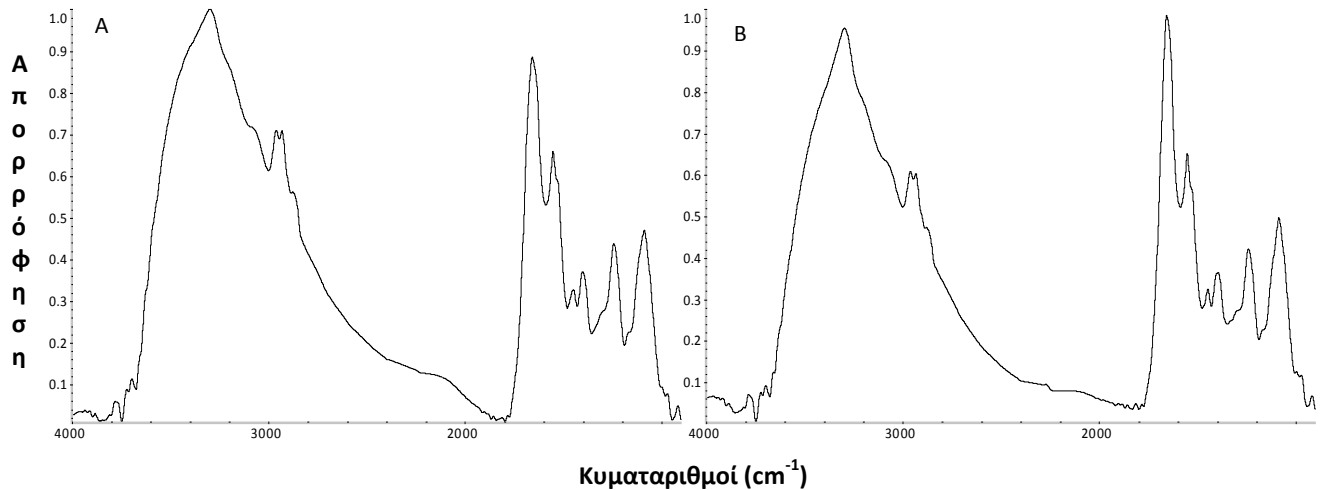
Η αντιμικροβιακή δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των κρόκου (*Crocus sativus* L.) και του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.) μελετήθηκε έναντι των παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutans* LMG 14558<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis* LMG 14532<sup>T</sup> και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR. Επίσης μελετήθηκε και η δράση του αιθερικού κλάσματος του κρόκου έναντι των στελεχών *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* SL1344.

Στο **Σχήμα 5.7** παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR (4000-900cm<sup>-1</sup>) των κυττάρων των στελεχών *Str. mutans* LMG 14558<sup>T</sup>, *Str. oralis* LMG 14532<sup>T</sup> και *Str.sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> ύστερα από επώασή τους για 6 h (*Str. mutans* και *Str. oralis*) και 4 h (*Str.sobrinus*) με μεθανόλη (7%). Στο **Σχήμα 5.8** αποτυπώνονται τα φάσματα (4000-900cm<sup>-1</sup>) των κυττάρων των στελεχών *E. coli* C1845 και *S. typhimurium* SL1344 μετά από επώασή τους για 0.5 h με μεθανόλη (10%). Τα φάσματα υπερύθρου που προέκυψαν περιέχουν ποιοτικές πληροφορίες για την ολική βιοχημική σύσταση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα βακτηρίων περιέχουν πληροφορίες για τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης (φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, πεπτιδογλυκάνη και λιποπολυσακχαρίτες), όσο και του κυτταροπλάσματος (λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα) (Helm *et al.*, 1991; Naumann *et al.*, 1991).

Τα φάσματα παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των βακτηριακών κυττάρων, περιοχές του υπερύθρου (Naumann *et al.*, 1988; van der Mei *et al.*, 1996). Η πρώτη χαρακτηριστική περιοχή του φάσματος (Περιοχή I, 3000-2800 cm<sup>-1</sup>) διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των αλυσίδων των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις δονήσεις τάσης δεσμών άνθρακα-υδρογόνου. Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα των κυττάρων στα 2960 cm<sup>-1</sup> και στα 2926 cm<sup>-1</sup> ο-



**Σχήμα 5.7.** Φάσματα FT-IR (400-900 cm<sup>-1</sup>) των κυττάρων του *Str. mutans* LMG 14558<sup>T</sup> (Α), *Str. oralis* LMG 14532<sup>T</sup> (Β) και *Str. sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> (Γ) μετά από 6 h επώαση για τα δυο πρώτα και 4 h για το τρίτο με μαθανόλη (7%).



**Σχήμα 5.8.** Φάσματα FT-IR ( $400-900\text{ cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *E.coli* C1845 (A) και *S.typhimurium* SL1344 μετά από 0.5 h επώαση με μεθανόλη (10%).

φείλονται στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων ( $-\text{CH}_3$ ) και των μεθυλενομάδων ( $>\text{CH}_2$ ) των λιπαρών οξέων αντίστοιχα, ενώ οι κορυφές στα  $2870$ ,  $2850$  και  $2835\text{ cm}^{-1}$  στις συμμετρικές δονήσεις των ίδιων ομάδων, αντίστοιχα (Schultz και Naumann, 1991; Schmitt και Flemming, 1998; Al-Qadiri *et al*, 2008).

Στη δεύτερη περιοχή του φάσματος (Περιοχή II,  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ ) απορροφούν οι αμιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων των κυττάρων (Van der Mei *et al*, 1996). Στα όλα φάσματα των κυττάρων παρατηρήθηκαν δύο έντονες απορροφήσεις στα  $1652\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1546\text{ cm}^{-1}$ . Η πρώτη είναι χαρακτηριστική για τους αμιδικούς δεσμούς I (αμίδιο I) και προκύπτει από τη δόνηση τάσης του δεσμού  $>\text{C}=\text{O}$  (Schmitt και Flemming, 1998; Choo-Smith *et al.*, 2001). Η δεύτερη είναι χαρακτηριστική για τους αμιδικούς δεσμούς II (αμίδιο II) και προκύπτει από τη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και από τη δόνηση τάσης του δεσμού C-N των πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Schmitt και Flemming, 1998).

Η τρίτη περιοχή του φάσματος (Περιοχή III,  $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ ) διαμορφώνεται από απορροφήσεις τόσο των πρωτεϊνών, όσο και των λιπαρών οξέων των κυττάρων (van der Mei *et al.*, 1996). Στα φάσματα των εξεταζόμενων κυττάρων, η κορυφή στα  $1455\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται κυρίως σε σύμμετρες δονήσεις παραμόρφωσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων ( $-\text{CH}_3$ ) και σε ασύμμετρες δονήσεις

παραμόρφωσης των μεθυλενομάδων ( $>CH_2$ ) (Helm και Naumann, 1995). Ενώ η κορυφή στα  $1400\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται σε συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-οξυγόνου (C-O) των καρβοξυλικών ομάδων ( $COO^-$ ) (Schmitt και Flemming, 1998). Τέλος, η κορυφή μεσαίας έντασης στα  $1240\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστική των ασύμμετρων δονήσεων τάσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών ( $>P=O$ ) των νουκλεοτιδίων των μόρια DNA και RNA, καθώς και των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών (Zeroual *et al.*, 1994; Kansiz *et al.*, 1999).

Η τέταρτη περιοχή του φάσματος (Περιοχή IV,  $1200-900\text{ cm}^{-1}$ ) διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Οι απορροφήσεις αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-OH και C-O-C, αλλά και στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-O-P και P-O-P των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος (Socrates, 1997; Filip και Hermann, 2001).

Από τα παραπάνω δυο σχήματα (**Σχήματα 5.7** και **5.8**) φαίνεται ότι τα φάσματα FT-IR των βακτηρίων είναι παρόμοια, υπάρχουν ωστόσο μικροδιαφορές κυρίως στις εντάσεις των κορυφών εξαιτίας των αλλαγών των κυτταρικών συστατικών και της διαφορετικής σύστασης των Gram και των Gram βακτηρίων. Η φασματοσκοπία FT-IR έχει βρει εφαρμογή στην ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων βακτηρίων όπως των γενών *Streptococcus* (Van der Mei *et al.*, 1993). Τα τελευταία χρόνια συνδυασμένη με τεχνικές χημειομετρίας δεν περιορίζεται πια η εφαρμογή στα είδη αλλά φτάνει ακόμα και σε επίπεδο στελεχών του *E. coli* (Al-Qadiri *et al.*, 2006), της *Listeria monocytogenes* (Davis και Mauer, 2011), της *Salmonella enteritica* (Preisner *et al.*, 2012), του *Staphylococcus aureus* (Grunert *et al.*, 2013). Επιπλέον, λόγω της ταχύτητας που παρέχει ο συνδυασμός φασματοσκοπίας FT-IR και χημειομετρίας, αποτελεί πλέον εργαλείο στην γρήγορη ταυτοποίηση διαφορετικών μικροοργανισμών που υπάρχουν ταυτοχρόνως σε ένα δείγμα (Al-Holy *et al.*, 2006; Schäwe *et al.*, 2011).

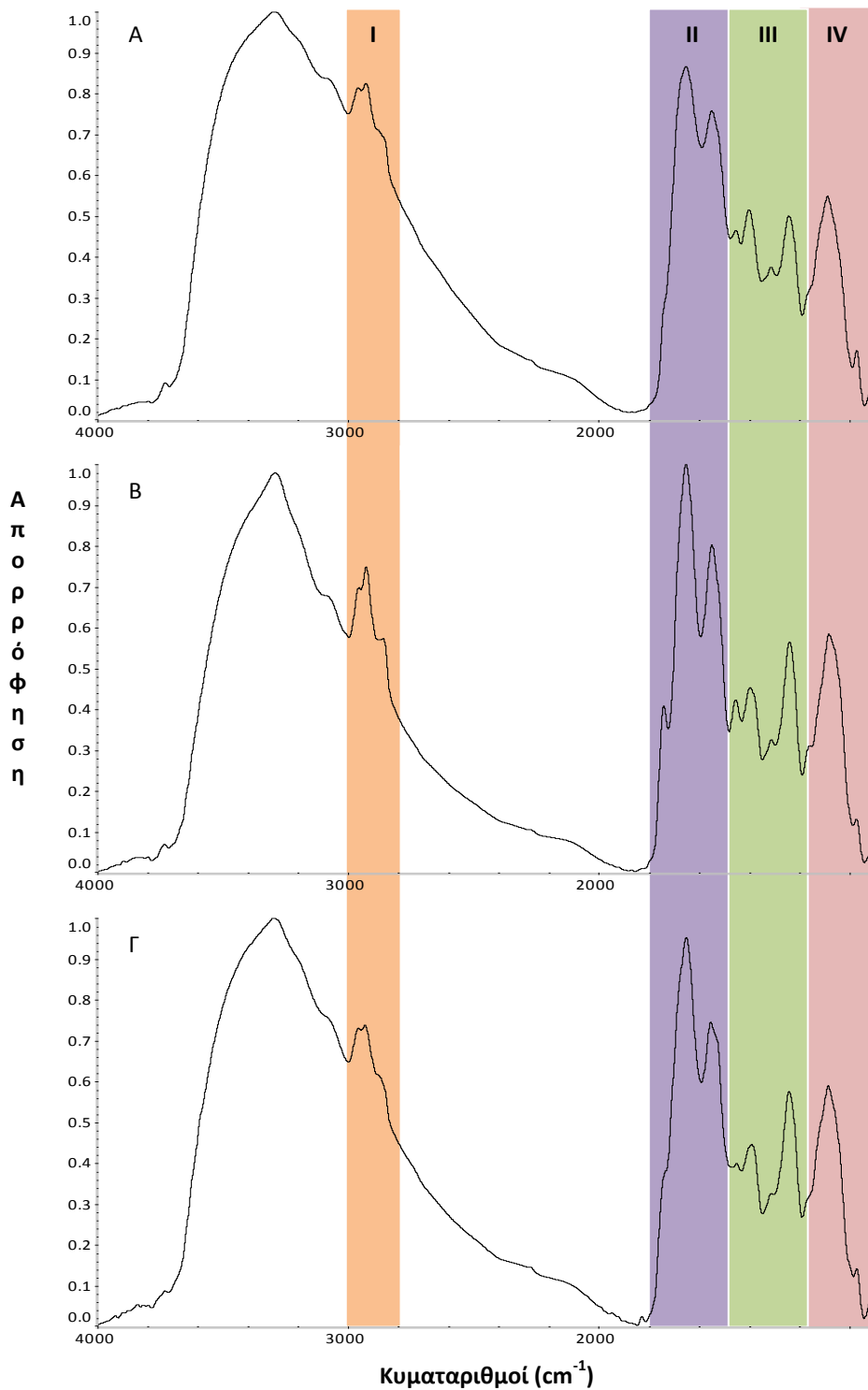
Επιπλέον, πέρα της ευρείας χρήσης της στην ταξινόμηση των βακτηρίων, η τεχνική φασματοσκοπίας FT-IR τα τελευταία χρόνια αρχίζει να εφαρμόζεται στην ανίχνευση κυτταρικών αλλαγών λόγω επίδρασης διαφόρων παραγόντων. Οι Ζουμπροπούλου *et al.*, (2010), μελέτησαν τις δομικές αλλαγές της *Salmonella typhimurium* μετά από επώαση 24 h με υπερκείμενα τριών στελεχών

γαλακτοβακίλλων, εντοπίζοντας τις διαφοροποιήσεις στο κυτταρικό τοίχωμα και στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Ενώ δομικές αλλαγές με τη χρήση της φασματοσκοπίας IR έχουν αναφερθεί σε κύτταρα *S. typhimurium* μετά από επώαση με ευγενόλη (Devi *et al.*, 2010). Υπερκείμενα στελέχους *Str. macedonicus* ACA-DC 198 καθώς και καθαρής βακτηριοσίνης, μακεδοσίνης, προκάλεσαν αλλαγές στη κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα παθογόνων μικροοργανισμών στοματικής κοιλότητας όταν μελετήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR (Zoumporoulou *et al.*, 2013). Επιπροσθέτως, με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR έχει γίνει η μελέτη αλλαγών στη δομική κατάσταση των βακτηρίων σε συνθήκες στρες (Papadimitriou *et al.*, 2008; Kamnev, 2008).

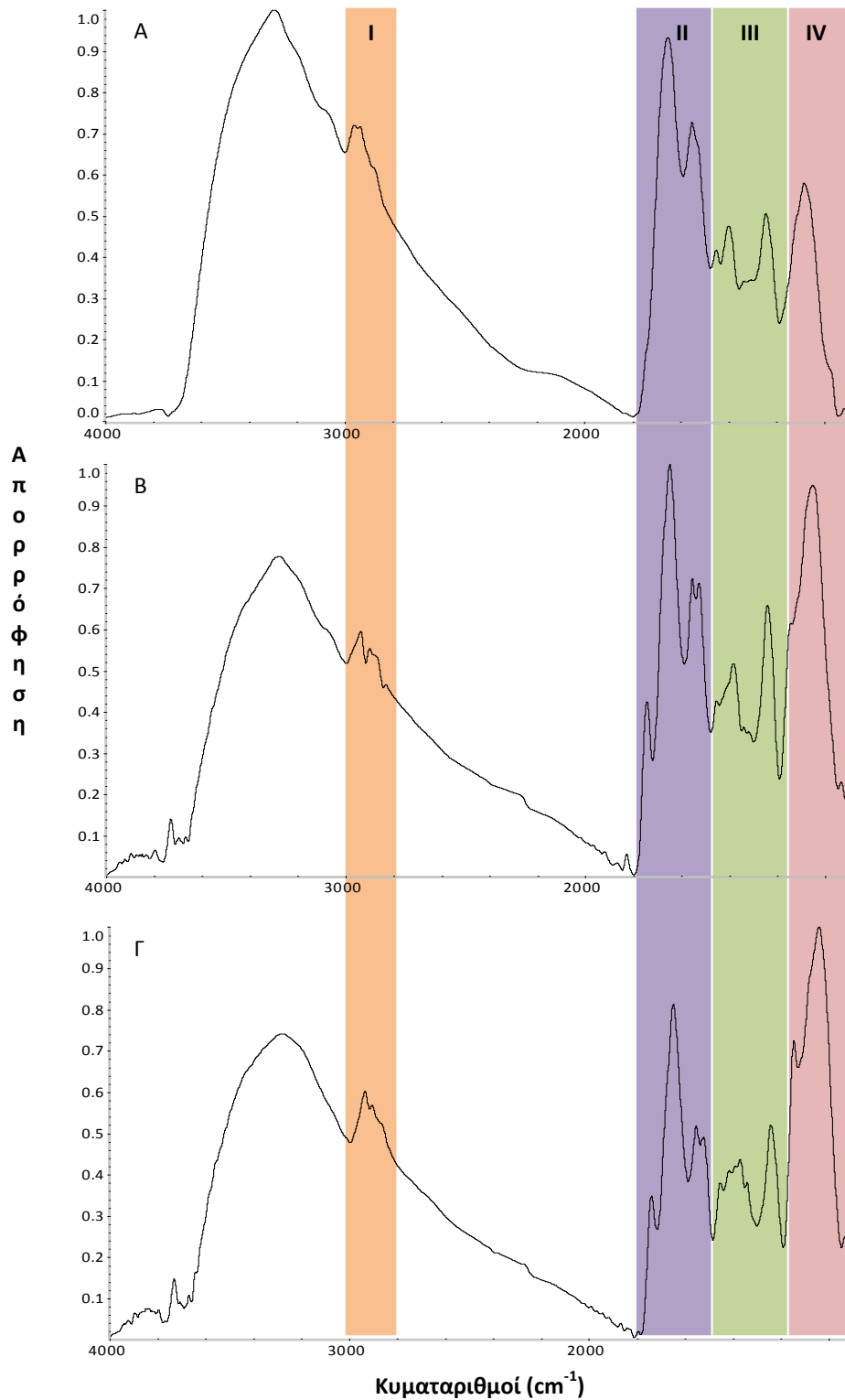
Στο σχήμα που ακολουθεί (**Σχήμα 5.9**) φαίνονται τα φάσματα των κυττάρων του *Str. oralis* ύστερα από επώασή τους για 6 h με τα μεθανολικά εκχυλίσματα του κρόκου και του μελισσόχορτου, με μάρτυρα τη μεθανόλη (7%). Παρατηρούμε την ύπαρξη αρκετών διαφορών τόσο στις εντάσεις, όσο και στις διαφοροποιήσεις διαφορών κορυφών, οι οποίες είναι πιο έντονες στην περίπτωση της επώασης με το MeOH εκχύλισμα του κρόκου. Οι διαφοροποιήσεις παρουσιάζονται κυρίως στις περιοχές I, II και III, ενώ στην περιοχή IV δεν υπάρχουν ορατές διαφορές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η ύπαρξη της κορυφής στα  $1740\text{ cm}^{-1}$ , η οποία είναι εμφανής στο φάσμα των κυττάρων που επώαστηκαν με τον κρόκο, ενώ σε αυτά με το μελισσόχορτο εμφανίζεται μια μικρή ωμοπλάτη. Η κορυφή αυτή αποδίδεται στη λειτουργική ομάδα του καρβονύλιου ( $>C=O$ ) των εστερικών ομάδων και συγκεκριμένα στις εστερικές ομάδες των λιπιδίων.

Αυτές οι διαφοροποιήσεις είναι πιο έντονες στην περίπτωση των κυττάρων του *Str. sobrinus* (**Σχήμα 5.10**). Οι διαφοροποιήσεις εδράζονται και στις τέσσερις χαρακτηριστικές περιοχές του φάσματος, με πολύ έντονες αλλαγές στην περιοχή των πολυσακαχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος.

Στην περίπτωση του *Str. mutans*, η αποικοδόμηση της κυτταρικής συνοχής είναι διακριτή και από την προετοιμασία του δείγματος κατά την οποία ήταν αρκετά δύσκολη η επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε δις απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Η αδυναμία σχηματισμού φιλμ μας οδήγησε στην χρήση διαλύματος NaCl 0,9%, οπότε έγινε δυνατή η λήψη φάσματος. Η παρατήρηση αυτή



**Σχήμα 5.9.** Φάσματα FT-IR ( $400-900\text{ cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *Str. oralis* LMG 14532<sup>T</sup> μετά από 6 h επώαση με μεθανόλη (7%) (Α), με μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου 28 mg/mL (Β) και με μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου 28 mg/mL (Γ).



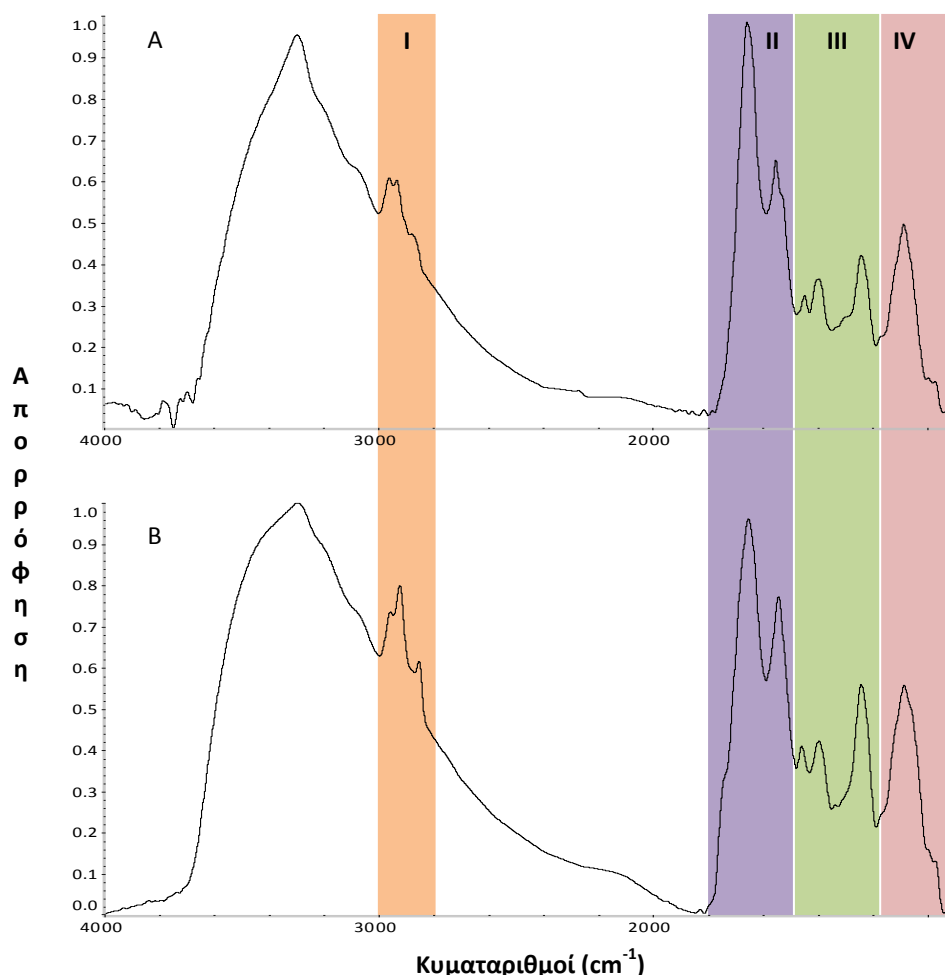
**Σχήμα 5.10.** Φάσματα FT-IR ( $400\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *Str.sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> μετά από 4 h επώαση με μεθανόλη (7%) (Α), με μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου 28 mg/mL (Β) και με μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου 28 mg/mL (Γ).



έδειξε ότι στα κύτταρα υπήρχαν φορτισμένες ομάδες που έκαναν αδύνατη την προσκόλληση αυτών, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως τα κύτταρα του *Str. mutans* βρέθηκαν σε συνθήκες stress απελευθερώνοντας πεπτιδογλυκάνες.

Αντίστοιχα και τα φάσματα των κυττάρων Gram βακτηρίων που μελετήθηκαν μετά την επώασή τους με τα αιθερικά εκχυλίσματα του κρόκου παρουσιάζουν αλλαγές, με πιο έντονες στην περίπτωση του *E. coli*. Οι αλλαγές των κυττάρων της *S. typhimurium* ήταν πολύ μικρές (**Σχήμα 5.11**).

Οι παραπάνω αυτές παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν αλλαγές στη δομή και στα βασικά συστατικά των κυττάρων ανάλογα με το εκχύλισμα και το μικροοργανισμό που μελετήσαμε.



**Σχήμα 5.11.** Φάσματα FT-IR ( $400-900\text{ cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *S. typhimurium* SL1344 μετά από 0.5 h επώαση με μεθανόλη (10%) (A) και με αιθερικό εκχύλισμα κρόκου 5 mg/mL (B).

### 5.3.2. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal component analysis- PCA) στα φάσματα FT-IR των κυττάρων

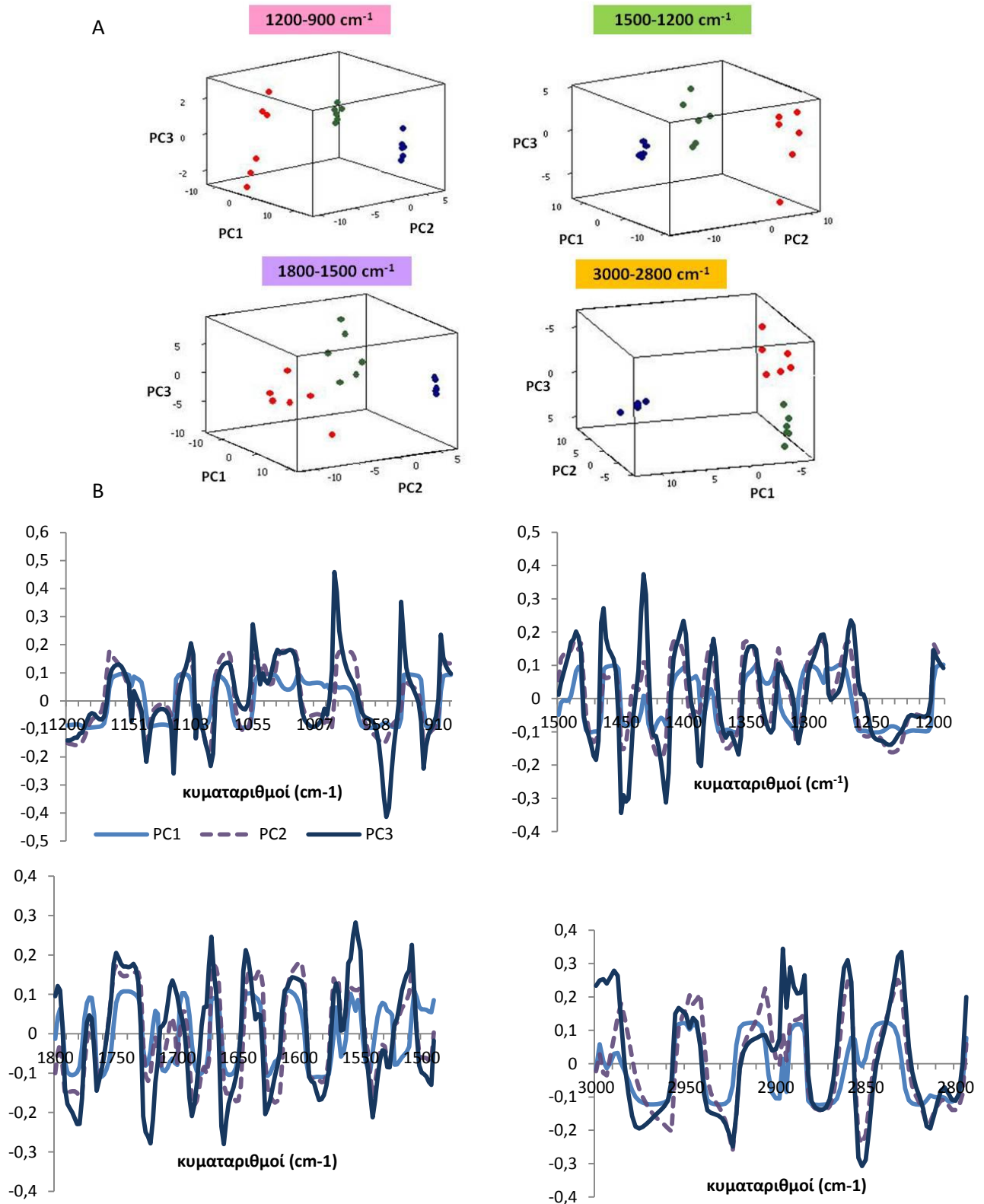
Στα περισσότερα φάσματα υπήρχαν εμφανής διαφορές, σε κάποια όμως αυτές ήταν πολύ μικρές. Με σκοπό την πιο λεπτομερή διερεύνηση των αλλαγών που υφίστανται τα κύτταρα μετά την επώαση με το κάθε εκχύλισμα, προχωρήσαμε στη στατιστική επεξεργασία των φασμάτων, υπολογίζοντας τη δεύτερη παράγωγο των φασμάτων. Με τη δεύτερη παράγωγο εμφανίζονται κορυφές, οι οποίες υπερκαλύπτονται κάτω από τις φαρδιές ζώνες απορρόφησης του αρχικού φάσματος. Ωστόσο, λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας του είναι αρκετά δύσκολο να ερμηνευτεί.

Για το λόγο αυτό, ακολούθησε η επεξεργασία της δεύτερης παραγώγου των φασμάτων με την τεχνική της πολυμεταβλητής ανάλυσης PCA, προκειμένου να ομαδοποιηθούν τα φάσματα ανάλογα με κοινά χαρακτηριστικά τους. Η τεχνική αυτή ανάλυσης δεδομένων σκοπό έχει τη δημιουργία καινούργιων μεταβλητών, οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών (κυματαριθμοί), έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και να περιέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Οι νέες μεταβλητές που παράγονται ονομάζονται κύριες συνιστώσες. Επιπλέον, οι κύριες συνιστώσες που προκύπτουν μπορούν να ερμηνεύσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης, που σημαίνει πως καταλήγουμε σε ένα πιο μικρό αριθμό μεταβλητών (κυματαριθμοί) από ότι είχαμε αρχικά. Έτσι, η ανάλυση PCA εφαρμόστηκε ξεχωριστά για κάθε μια από τις χαρακτηριστικές περιοχές του φάσματος (I, II, III, IV) του κάθε μικροοργανισμού-στόχου.

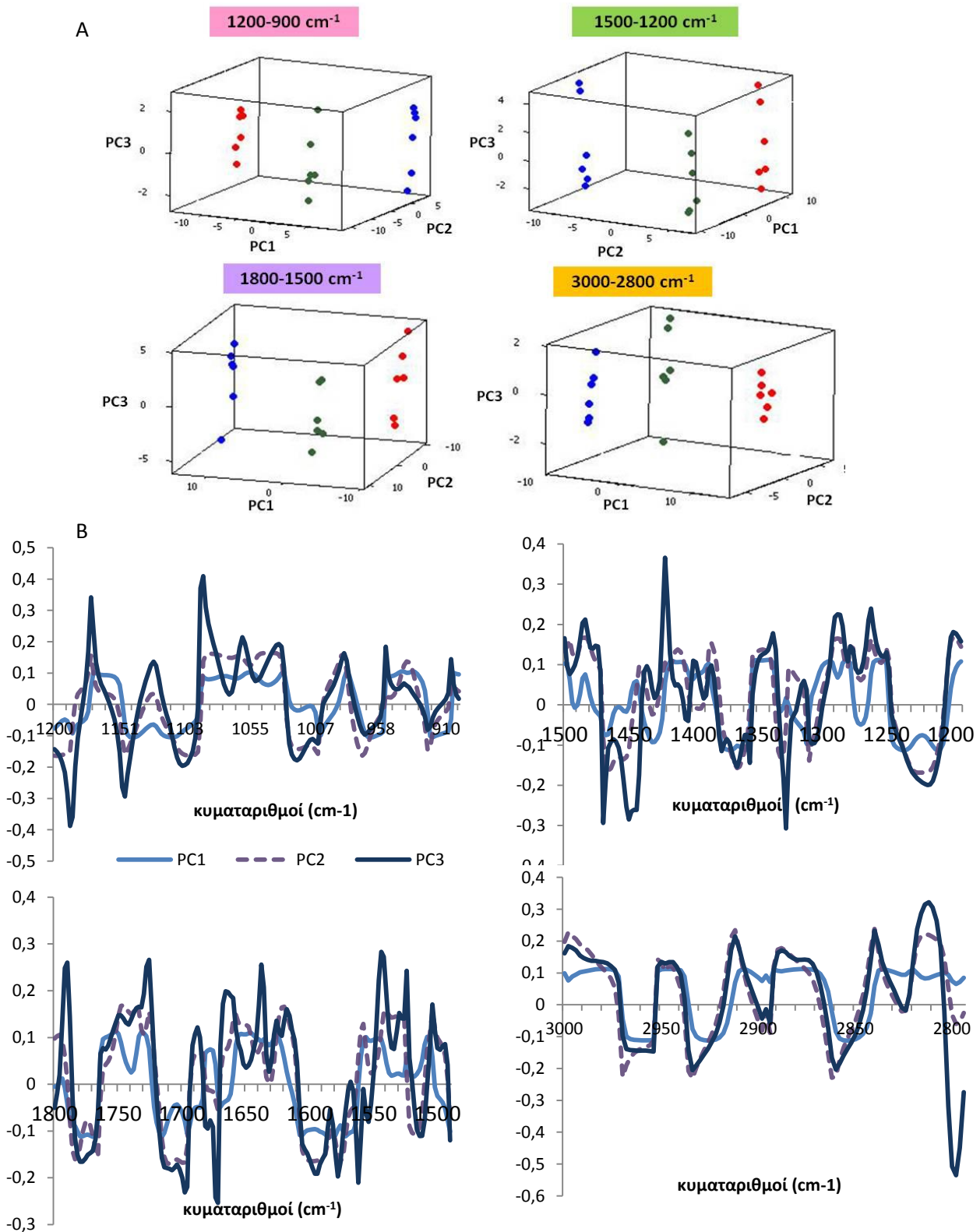
Χρησιμοποιώντας κάθε φορά τις τρεις πρώτες συνιστώσες της ανάλυσης, δημιουργήθηκε διάγραμμα σκέδασης των τριών κύριων συνιστωσών (principal components scores). Επιπροσθέτως, από τα διαγράμματα του φορτίου (loadings) λαμβάνουμε πληροφορίες για το πόσο σημαντική είναι η κάθε μεταβλητή, δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση ο κυματαριθμός, σε καθεμία από τις κύριες συνιστώσες. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να αξιολογήσουμε ποιοι κυματαριθμοί συνεισφέρουν στην κάθε κύρια συνιστώσα και να βγάλουμε συμπεράσματα για το ποιες λειτουργικές ομάδες αλλάζουν μετά την επίδραση του κάθε εκχυλίσματος.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCA του κάθε μικροοργανισμού-στόχου. Στο **Σχήμα 5.12.A**, τα κύτταρα του *Str. mutans* που επώαστηκαν με 7% μεθανόλη που θεωρείται μάρτυρας διαχωρίστηκαν πλήρως από τα κύτταρα που επώαστηκαν με τα μεθανολικά εκχυλίσματα του κρόκου και του μελισσόχορτου. Επιπλέον, τα κύτταρα ομαδοποιούνται διαφορετικά αναλόγως με το ποιο εκχύλισμα επώαστηκαν. Στην περιοχή I, από 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , οι τρεις πρώτες συνιστώσες εξηγούν το 89,8% της συνολικής διακύμανσης. Στην περιοχή II (1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) το αντίστοιχο ποσοστό φτάνει στο 87,9%, στην περιοχή III (1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) οι τρεις πρώτες συνιστώσες εξηγούν αθροιστικά το 96,4% συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων, ενώ στην τέταρτη περιοχή (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ) φτάνει το 97,7%.

Από το διάγραμμα φορτίου (**Σχήμα 5.12**) για την περιοχή I (3000-2800 $\text{cm}^{-1}$ ), η οποία διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, είναι εμφανές ότι οι απορροφήσεις κοντά στα 2960  $\text{cm}^{-1}$  και στα 2927  $\text{cm}^{-1}$  από τις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου επηρεάζουν σημαντικά και τις τρεις κύριες συνιστώσες, σε αντίθεση με τις απορροφήσεις των συμμετρικών δονήσεων τάσης των ίδιων δεσμών στα 2870, 2850 και 2835  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες επηρεάζουν μόνο τη δεύτερη και τρίτη κύριες συνιστώσα (**Σχήμα 5.12**). Στην περιοχή των πεπτιδικών δεσμών από το διάγραμμα φορτίου φαίνεται η συμβολή σχεδόν όλης της περιοχής των απορροφήσεων στις τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες και κατά συνέπεια για όλη την χαρακτηριστική περιοχή φαίνεται η σημαντική συνεισφορά τους στην ομαδοποίηση των δειγμάτων. Η τρίτη περιοχή του φάσματος (Περιοχή III, 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) διαμορφώνεται από απορροφήσεις τόσο των πρωτεϊνών, όσο και των λιπαρών οξέων των κυττάρων. Το αντίστοιχο διάγραμμα φορτίου δείχνει ότι οι απορροφήσεις που συνδέονται με τις απορροφήσεις των φωσφορικών δεσμών δεν συμβάλλουν στην ομαδοποίηση, υποδεικνύοντας ότι αυτοί οι δεσμοί δεν έχουν επηρεαστεί από την επώαση των κυττάρων με τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Τέλος, οι απορροφήσεις στην περιοχή των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (Περιοχή IV, 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ), επηρεάζουν σημαντικά και τις τρεις κύριες συνιστώσες, με τις απορροφήσεις στην περιοχή 1000-900  $\text{cm}^{-1}$  να επηρεάζουν μόνο την τρίτη κύρια συνιστώσα και ως εκ τούτου να μην συνεισφέρουν στην ομαδοποίηση των δειγμάτων.



**Σχήμα 5.12.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *Str. mutans* LMG 14558 ύστερα από επώασή τους για 6 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (7%) (●), 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (●) και 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (▲). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή.

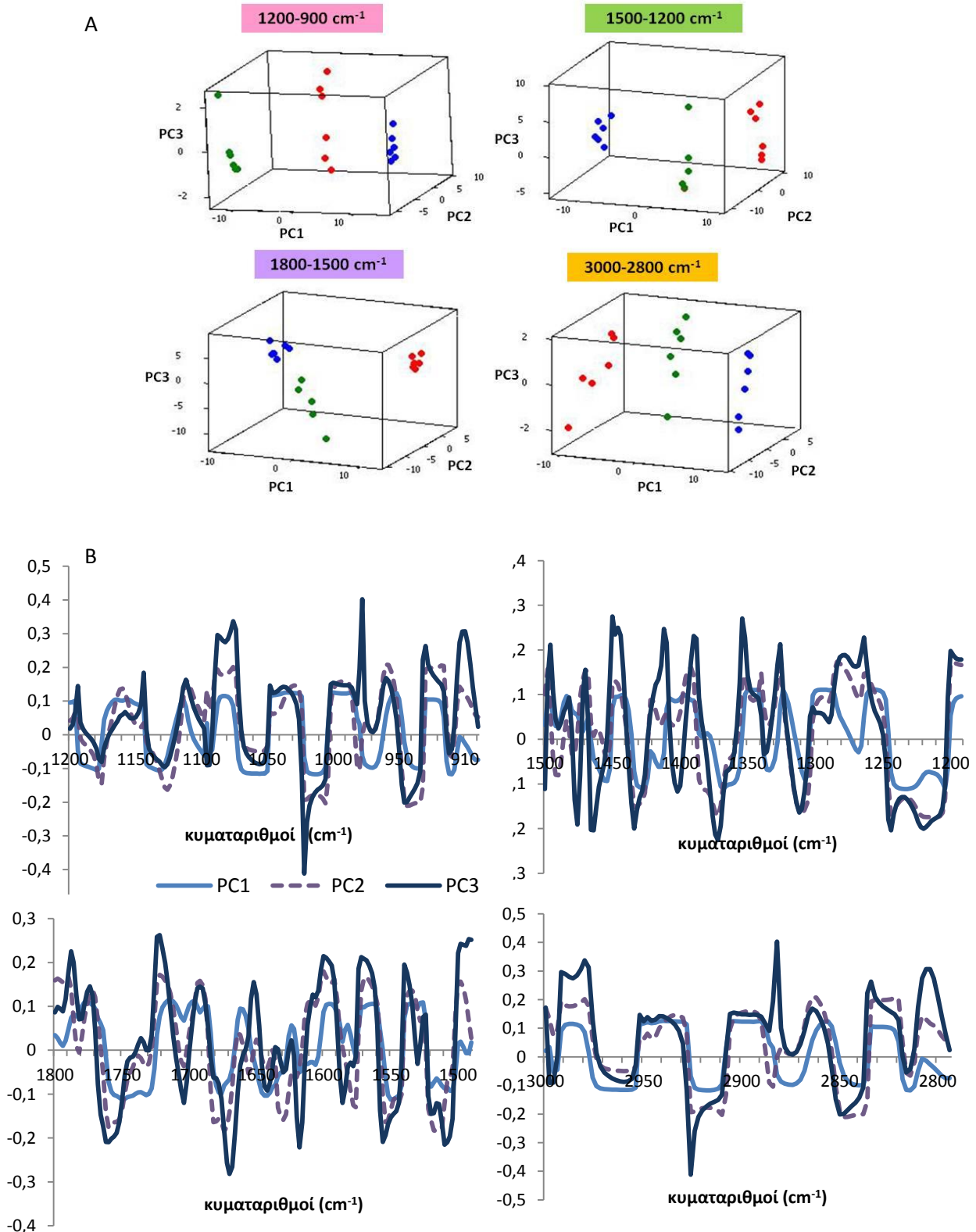


**Σχήμα 5.13.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *Str. oralis* LMG 14532 ύστερα από επώασή τους για 6 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (7%) (●), 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (●) και 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (▲). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή.

Στο **Σχήμα 5.13** παρουσιάζεται η ανάλυση PCA για τα κύτταρα του *Str. oralis*. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα ομαδοποιούνται και στις τέσσερις περιοχές που μελετάμε. Στην περιοχή I, από 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , οι τρεις συνιστώσες εξήχθησαν και εξηγούν το 98,9 % της συνολικής διακύμανσης. Στην περιοχή II (1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) οι τρεις πρώτες συνιστώσες εξηγούν αθροιστικά το 93,9% συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων, στην περιοχή III (1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) το αντίστοιχο ποσοστό φτάνει στο 95,9% ενώ στην τέταρτη περιοχή (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ) πάλι οι τρεις συνιστώσες υπήρξαν και οι οποίες εξηγούν το 98,4% της διακύμανσης.

Στην περιοχή I, οι απορροφήσεις τόσο συμμετρικών όσο και ασύμμετρων δονήσεων τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου επηρεάζουν και τις τρεις συνιστώσες, ενώ οι απορροφήσεις κοντά στα 2800  $\text{cm}^{-1}$  επηρεάζονται κυρίως από την τρίτη συνιστώσα (**Σχήμα 5.13**). Επιπλέον και στην περιοχή των πεπτιδικών δεσμών οι απορροφήσεις επηρεάζουν και τις τρεις συνιστώσες. Η περιοχή III, και κυρίως η περιοχή μεταξύ 1250 και 1200  $\text{cm}^{-1}$ , όπως και στην περίπτωση του *Str. mutans*, συνεισφέρει κατά πολύ λίγο στις συνιστώσες. Ωστόσο η περιοχή αυτή φαίνεται ότι επηρεάζεται περισσότερο στην περίπτωση του *Str. oralis*. Τέλος, η περιοχή IV (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ), οι συνιστώσες επηρεάζονται κυρίως από τους κυματαριθμούς 1170 και 1140  $\text{cm}^{-1}$ , με το μεγαλύτερο μέγιστο και ελάχιστο, αντίστοιχα και για τις τρεις συνιστώσες. Ενώ ο κυματαριθμός 1090  $\text{cm}^{-1}$  επηρεάζει κατά κύριο λόγο μόνο την τρίτη συνιστώσα, η οποία όμως διαφοροποιεί τα μεθανολικά εκχυλίσματα του κρόκου από τα υπόλοιπα (**Σχήμα 5.13 A**).

Εξετάζοντας τη στατιστική ανάλυση των κυττάρων του *Str. sobrinus* LMG 14641, παρατηρούμε πως σε όλες τις περιοχές τόσο ο μάρτυρας όσο και τα μεθανολικά εκχυλίσματα του κρόκου και του μελισσόχορτου ομαδοποιούνται το καθένα ξεχωριστά. Η περιοχή II (1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ ), φαίνεται ότι επηρεάζεται περισσότερο με την επώαση των κυττάρων με το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου από ότι με το αντίστοιχο του μελισσόχορτου (**Σχήμα 5.14**). Ωστόσο στην περιοχή αυτή οι τρεις πρώτες συνιστώσες εξηγούν μόνο το 85,7 % της συνολικής διακύμανσης. Όταν για την περιοχή I (3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ), οι τρεις κύριες συνιστώσες συνεισφέρουν κατά 96,0%, για την περιοχή III και IV κατά 93,1 και 99,0%, αντίστοιχα.



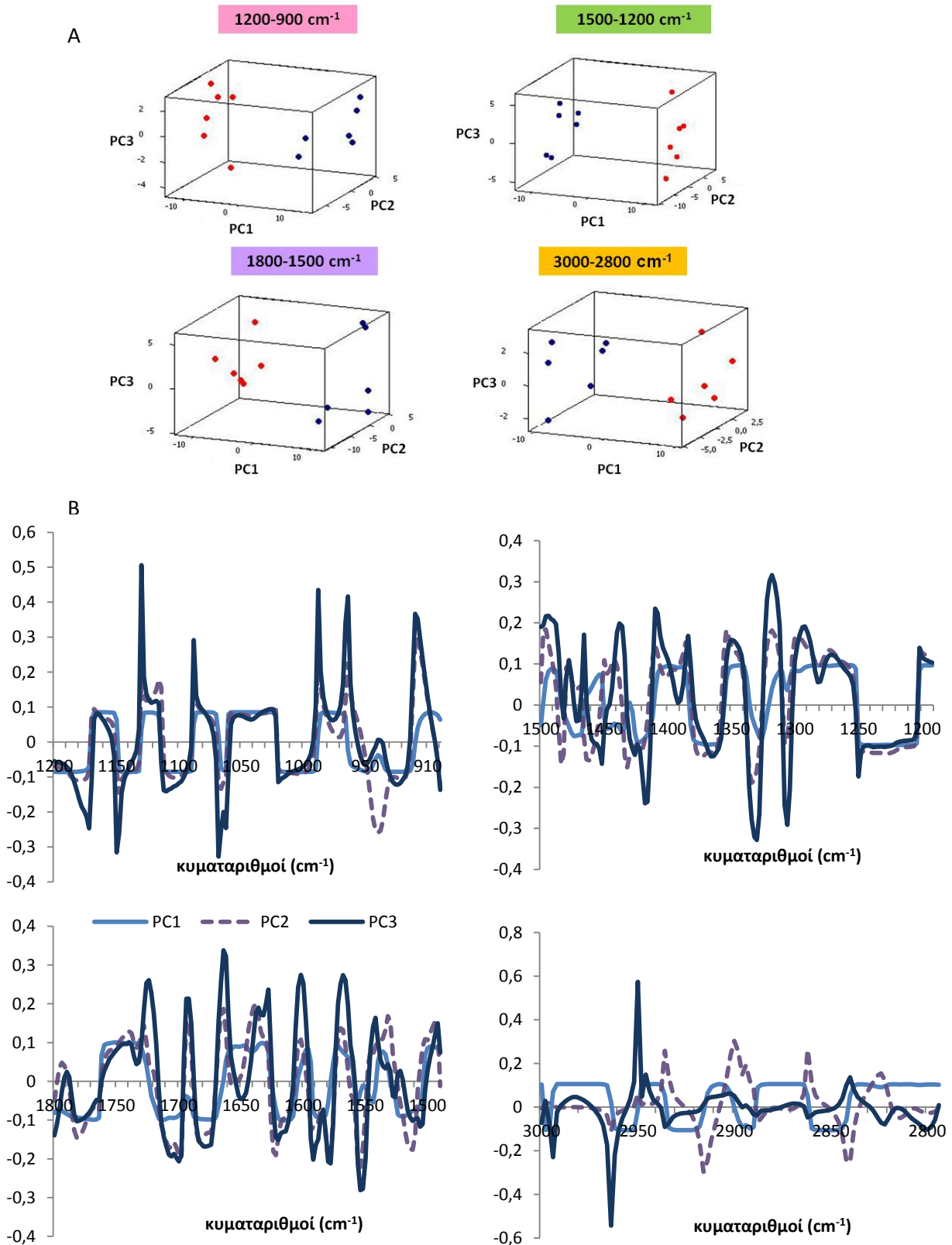
**Σχήμα 5.14.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *Str. sobrinus* LMG 14641 ύστερα από επώασή τους για 4 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (7%) (●), 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (●) και 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (▲). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή.

Το διάγραμμα φορτίου της περιοχής I, δείχνει ότι οι απορροφήσεις κοντά στα 2870, 2850 και 2835  $\text{cm}^{-1}$ , επηρεάζουν σημαντικά εξίσου και τις τρεις κύριες συνιστώσες, ενώ για τους κυμαριθμούς στα 2960  $\text{cm}^{-1}$  και στα 2927  $\text{cm}^{-1}$  που αποδίδονται στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων ( $-\text{CH}_3$ ) και των μεθυλενομάδων ( $>\text{CH}_2$ ) των λιπαρών οξέων και οι τρεις συνιστώσες επηρεάζονται, με μεγαλύτερη συνεισφορά να παρατηρείται για την τρίτη κύρια συνιστώσα (**Σχήμα 5.14**). Τα διαγράμματα φορτίου για τις άλλες τρεις περιοχές δείχνουν τη συμβολή των απορροφήσεων στις τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες και κατά συνέπεια τη σημαντική συνεισφορά τους στην ομαδοποίηση των δειγμάτων.

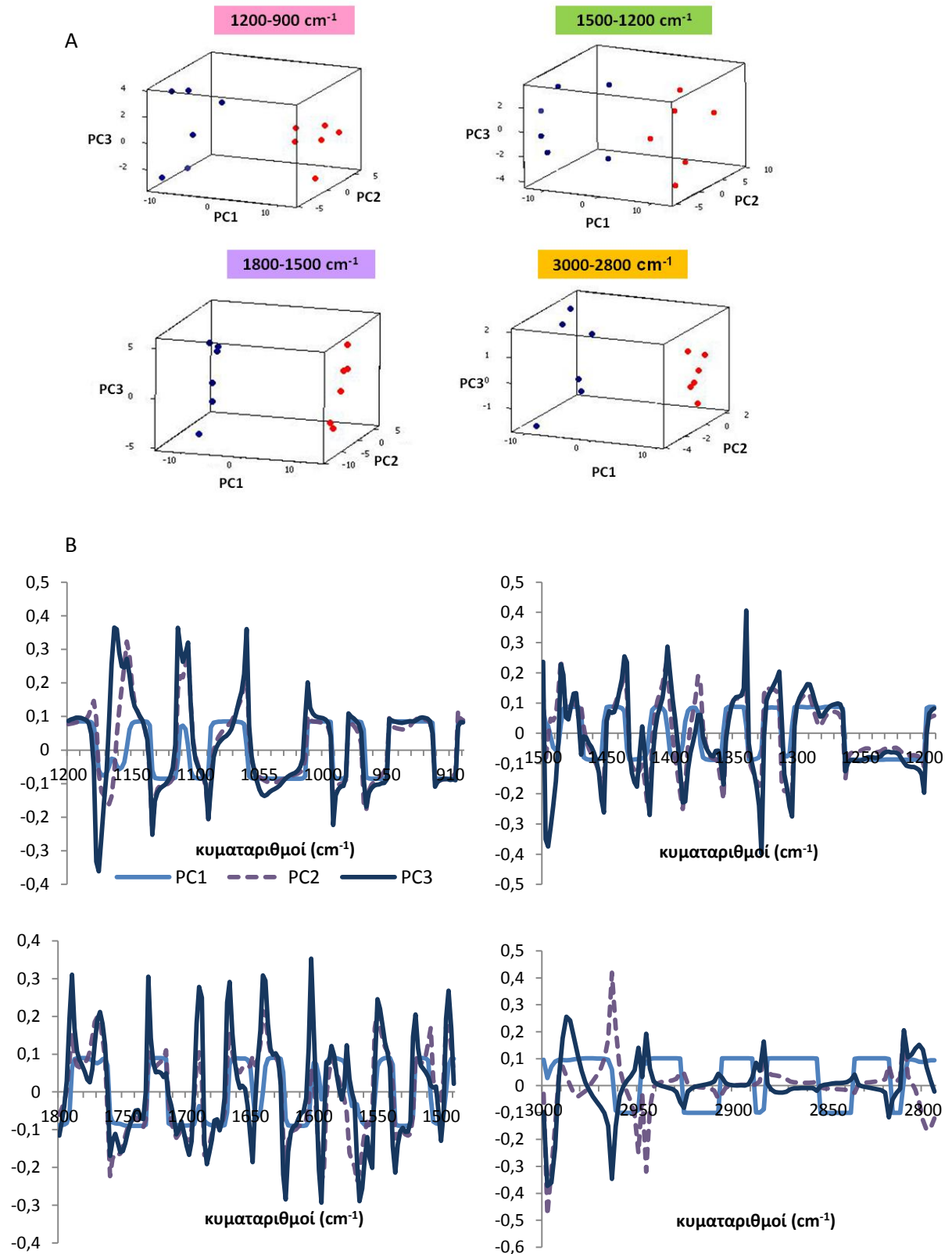
Όσον αφορά την ανάλυση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*E. coli* C1845 και *S. typhimurium* SL1344) μετά την επώασή τους με το αιθερικό εκχύλισμα του κρόκου, παρατηρούμε ότι και σε αυτές τις περιπτώσεις τα κύτταρα ομαδοποιούνται σε όλες τις περιοχές του φάσματος (**Σχήματα 5.15 και 5.16**). Από τα διαγράμματα φορτίου των διαφόρων περιοχών του φάσματος που μελετάμε, φαίνεται ότι το διάγραμμα φορτίου της περιοχής I, και για τις δυο περιπτώσεις των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ότι οι απορροφήσεις στους κυμαριθμούς 2960 και 2950  $\text{cm}^{-1}$  συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των δειγμάτων του μάρτυρα και των προς εξέταση εκχυλισμάτων. Οι απορροφήσεις αποδίδονται στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων ( $-\text{CH}_3$ ) και των μεθυλενομάδων ( $>\text{CH}_2$ ) των λιπαρών οξέων. Επιπλέον και στην περιοχή των πεπτιδικών δεσμών (περιοχή III- 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) οι απορροφήσεις επηρεάζουν και τις τρεις συνιστώσες. Η περιοχή III, και κυρίως η περιοχή μεταξύ 1250 και 1200  $\text{cm}^{-1}$ , στη οποία αποδίδονται ασύμμετρες δονήσεις τάσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών ( $>\text{P}=\text{O}$ ) των νουκλεοτιδίων των μόρια DNA και RNA επηρεάζονται πάρα πολύ λίγο από την επώαση με τα εκχυλίσματα μας. Από τα διάγραμμα φορτίου της τέταρτης περιοχής του φάσματος (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ) με τις απορροφήσεις των πολυσακχαρίτες και τα φωσφορολιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος φαίνεται ότι και οι τρεις συνιστώσες συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση.

Οι παραπάνω διαπιστώσεις επιβεβαιώνουν τους *Devi et al.*, (2010) μελετώντας με φασματοσκοπία FT-IR την επίδραση της ευγενόλης σε κύτταρα *S. typhimurium* έδειξαν ότι το συστατικό αυτό προκαλεί διαφοροποιήσεις στους πολυ-





**Σχήμα 5.15.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *E. coli* C1845 ύστερα από επώασή τους για 1 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος FT-IR με μεθανόλη (10%) (●) και 5 mg/mL αιθερικό εκχύλισμα κρόκου (●). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή.



**Σχήμα 5.16.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *S. typhimurium* SL1344 ύστερα από επώασή τους για 0.5 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος FT-IR με μεθανόλη (10%) (●) και 5 mg/mL αιθερικό εκχύλισμα κρόκου (●). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή.

σακχαρίτες και τα φωσφορολιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ αλλαγές παρατηρούνται και στις αλυσίδες των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης. Αντίθετα, η σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin), η οποία χρησιμοποιήθηκε σα θετικός μάρτυρας δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στη διαπερατότητα των μεμβρανών. Αυτή έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη DNA γυράση κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σταματά τον βακτηριακό μεταβολισμό και την αναπαραγωγή των κυττάρων.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις από τη στατιστική ανάλυση των φασμάτων FT-IR, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η επώαση των κυττάρων όλων των ευαίσθητων στελεχών με τα εκχυλίσματα του κρόκου και του μελισσόχορτου επηρέασε τη δομή συγκεκριμένων συστατικών των κυττάρων. Αναλυτικότερα, διαφορές παρατηρήθηκαν στις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος και στις πρωτεΐνες των κυττάρων. Η μείωση συνεπώς της βιωσιμότητας των βακτηρίων από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα μπορεί να συνδεθεί με τις δομικές αλλαγές στα συστατικά τόσο του κυτταρικού τοιχώματος, όσο και αυτών της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων. Με τα παραπάνω ουσιαστικά καταλήγουμε πως τα φυσικά αντιμικροβιακά συστατικά δεν έχουν ένα μηχανισμό δράσης, αλλά επηρεάζουν όλα τα δομικά συστατικά του κύτταρου (multiple cellular target). Αυτό άλλωστε θα πρέπει να θεωρηθεί ως το συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων αντιμικροβιακών ουσιών που χρησιμοποιούνται, τα οποία στοχεύουν σε ένα κυρίως δομικό συστατικό ή μια βιοχημική αντίδραση. Λίγες είναι οι γνώσεις για τις σχέση δομής- αντιμικροβιακής δράσης των φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων. Δομικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία αρωματικού δακτύλιου ή οι αριθμοί των υδροξυλίου και μεθόξυ ομάδων μπορεί να αλλάξουν σημαντικά την διαπερατότητα της μεμβράνης, όταν αλληλοεπιδράσουν με αυτήν (Tsuchiya *et al.*, 1996; Fitzgerald *et al.*, 2004; Cushnie και Lamb, 2005). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η υδροφοβικότητα και στερεοχημική δομή των άπολων ενώσεων επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιβακτηριακές δραστηριότητες των αιθέριων έλαιων (Shapiro και Guggenheim 1998).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της μεσογειακής χλωρίδας και η δυνατότητα αξιοποίησής τους ως φυσικά αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά.

Σε πρώτη φάση, η διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη υδατικών εκχυλισμάτων και αφεψημάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της μεσογειακής χλωρίδας, δεδομένου ότι η αξιοποίηση κοινών αφεψημάτων αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο που τώρα αναπτύσσεται.

Η παραλαβή των υδατικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση α) με ζεστό νερό θερμοκρασίας 85° C (αφεψήματα), β) με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και γ) με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων. Κατά τη μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους DPPH και ABTS βρέθηκε ότι η σχέση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα, ήταν θετική και γραμμική, που δηλώνει ότι το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά παρατηρήθηκε στα αφεψήματα των υπό εξέταση φυτών, ενώ οι δυο άλλοι τρόποι παραλαβής έδωσαν στατιστικά σημαντικά μικρότερες τιμές. Το μελισσόχορτο παρουσίασε τόσο τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά όσο και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, αντίστοιχη διαπίστωση έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές σε διάφορες μελέτες για τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae. Ακολουθούν κατά ελαττωμένη σειρά τα αφεψήματα του δίκταμου, του φασκόμηλου, του χαμομηλιού και τέλος του δενδρολίβανου.

Η χρωματογραφική ανάλυση που έγινε στα αφεψήματα έδειξε ότι περιέχουν πλήθος φαινολικών συστατικών. Τα αφεψήματα ήταν πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Το συστατικό που βρέθηκε σε όλα τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae είναι το ροσμαρινικό οξύ. Η ποσοτικοποίηση των κύριων συστατικών έδειξε ότι η σειρά κατάταξης κατά φθίνουσα σειρά είναι: μελισσόχορτο> δίκταμο> φασκόμηλο>

δεντρολίβανο, που αντιστοιχεί με τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Πέρα της εν δυνάμει αντιοξειδωτικής τους δράσης όταν τα αφεψήματα καταναλώνονται προσδίδουν άρωμα. Η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία της οργανικής φάσης που παραλαμβάνεται από τα αφέψημα-υδατικά εκχυλίσματα μετά από εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (πετρελαϊκό αιθέρα) έδειξε ότι τα πτητικά συστατικά τους είναι κατά κύριο λόγο οξυγονούχα τερπένια και πολικά συστατικά. Τα συστατικά αυτά είναι πολύ λιγότερα από αυτά που έχουν αναλυθεί στα αντίστοιχα αιθέρια έλαια και αναφέρονται στη βιβλιογραφία, πράγμα που οφείλεται στον τρόπο παραλαβής από το φυτικό υλικό. Επίσης, στα αφεψήματα όπου η παραλαβή έγινε με ζεστό νερό παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός συστατικών σε σχέση με τους άλλους δύο τρόπους παραλαβής.

Η μελέτη των εκχυλισμάτων, στη λυοφιλιωμένη τους μορφή, με φασματοσκοπία FT-IR σε συνδυασμό με κατάλληλη στατιστική επεξεργασία-χημειομετρία μας έδωσε τη δυνατότητα να κατασκευάσουμε μοντέλα βαθμονόμησης στην περιοχή  $1800-1500$  &  $1320-1180$   $\text{cm}^{-1}$  για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Έτσι λοιπόν δίνεται η δυνατότητα στη φασματοσκοπία FT-IR να χρησιμοποιηθεί ως ισχυρό μέσο ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού δευτερογενών μεταβολιτών.

Αντιμικροβιακή δράση παρουσίασαν μόνο τα υδατικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και με τους τρεις τρόπους παρασκευής, έναντι του στελέχους *Clostridium sporogenes* LMG 8421<sup>T</sup>, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στο στέλεχος *Clostridium sporogenes* LMG 14743. Η παρατήρηση δράσης μόνο στα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία κυρίως του ροσμαρινικού οξέος το οποίο βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης στο μελισσόχορτο σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά. Βιβλιογραφικές αναφορές για το ροσμαρινικό οξύ έχουν ήδη δείξει και αντιμικροβιακή ικανότητα του πέραν της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης.

Ακολούθως στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά μελετήθηκαν τα επιμέρους εκχυλίσματα που παραλαμβάνουμε μετά από διαδοχική εκχύλιση τους με

οργανικούς διαλύτες, όπως τον πετρελαϊκό αιθέρα, το διαιθυλαιθέρα και τη μεθανόλη.

Στα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα παραλαμβάνονται πτητικά συστατικά, τα οποία αποτελούν τα κύρια συστατικά του αντίστοιχου αιθέριου ελαίου. Τα κυριότερα συστατικά που παραλήφθησαν ήταν η καρβακρόλη στο δίκταμο, στο δεντρολίβανο ήταν βερμπενόνη, καμφορά και βορνεόλη, η κιτράλη με το οξείδιο του καρυοφυλλενίου στο μελισσόχορτο, η καμφορά, η  $\alpha$ -θουγιόνη και η ευκαλυπτόλη στο φασκόμηλο, η σαφρανάλη ακολουθούμενη από το ΗΤCC και την ισοφορόνη στα στίγματα του κρόκου και τέλος στο χαμομήλι, οι κύριες ενώσεις ήταν τα οξείδια της  $\alpha$ -μπισαμπολόλης.

Στα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα ταυτοποιήθηκαν φαινολικά συστατικά, κυρίως άγλυκα μέρη των φλαβονοειδών και τερπενικά παράγωγα. Το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη ήταν τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος του δεντρολίβανου, ακολουθούμενα από τα παράγωγά τους. Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, το εκχύλισμα χαρακτηρίστηκε κυρίως από την παρουσία γκενγκουανίνης και απιγενίνης. Στο αιθερικό εκχύλισμα του δίκταμου παραλάβαμε κυρίως φλαβονοειδή και ειδικότερα μεθυλοφλαβόνες. Η καμφερίδη και η γκενγκουανίνη ήταν οι κύριες ενώσεις του εκχυλίσματος του μελισσόχορτου που πρώτη φορά αναφέρονται στο φυτό αυτό. Το φασκόμηλο χαρακτηρίστηκε τόσο από την παρουσία καρνοσικού οξέος και παραγώγων του όσο και φλαβονοειδών, κυρίως απιγενίνης και διοσμετίνης. Για το χαμομήλι, τα κυριότερα συστατικά ήταν κυρίως φαινολικά οξέα, φερουλικό οξύ και παράγωγα αυτού, ενώ η απιγενίνη ήταν το κύριο φλαβονοειδές συστατικό του. Τέλος, το κυρίαρχο συστατικό του αι εκχυλίσματος του κρόκου ήταν η πικροκροκίνη, ενώ ανιχνεύθηκε και μικρή ποσότητα καεμφερόλης.

Στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, το ροσμαρινικό οξύ ήταν η κύρια ένωση. Ταυτοποιήθηκαν επίσης παράγωγα αυτού, κυρίως ισομερή σαλβιανολικού οξέος καθώς και φλαβονοειδή κυρίως σε μορφή γλυκοζιτών. Στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου, το κύριο φαινολικό συστατικό ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από το ισομερές του, ενώ σημαντική ήταν και η παρουσία γλυκοζιτών της λουτεολίνης. Το αντίστοιχο εκχύλισμα του δίκταμου χαρακτηρίστηκε από την παρουσία ροσμαρινικού



οξέος και ισομερών σαλβιανολικού οξέος, αλλά συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας Lamiales παρουσίασε τη μικρότερη τιμή σε ροσμαρινικό οξύ. Τη μεγαλύτερη τιμή σε ροσμαρινικό οξύ είχε το εκχύλισμα του μελισσόχορτου, το οποίο χαρακτηρίστηκε σχεδόν από την κυριαρχία αυτού και παραγώγων του υδροξυκιναμικού οξέος ενώ παρατηρήθηκε και η παρουσία ενός γλυκοζίτη. Στην περίπτωση του φασκόμηλου, η κύρια ένωση που ταυτοποιήθηκε στο μεθανολικό εκχύλισμα ήταν το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από ισομερές του, τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης. Όσον αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού χαρακτηρίστηκε από την παρουσία παραγώγων φερουλικού και χλωρογενικού οξέος, ενώ σε σημαντική ποσότητα βρέθηκε και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Η *trans*-4-GG και η *trans*-3-Gg αποτελούν τις κύριες κροκίνες του εκχυλίσματος ενώ σε σημαντικές ποσότητες βρέθηκαν και οι αντίστοιχες *cis*-κροκίνες. Οι τέσσερις αυτοί εστέρες της κροκετίνης αποτελούν σχεδόν το 95% της περιεκτικότητας των ολικών κροκινών. Από τα флаβονοειδή, ο κύριος εκπρόσωπος ήταν ο γλυκοζίτης της καεμφερόλης με το σάκχαρο σοφορόζη στη θέση 3, ενώ ταυτοποιήθηκαν επίσης δυο τριγλυκοζίτες και ένας επιπλέον διγλυκοζίτης.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, όπου η σειρά κατάταξης με φθίνουσα σειρά είναι δεντρολίβανο > μελισσόχορτο > δίκταμο > φασκόμηλο > χαμομήλι > κρόκος. Αντίστοιχη σειρά κατάταξης παρατηρείται και στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όπου σε όλες τις περιπτώσεις η μέθοδος ABTS έδωσε χαμηλότερες τιμές IC<sub>50</sub> σε σχέση με τη μέθοδο DPPH. Στα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του διαυθυλαιθέρα, τα λιπόφιλα συστατικά των αρωματικών φυτών δίνουν καλύτερα αποτελέσματα με τη μέθοδο ABTS από ότι με τη μέθοδο του DPPH. Αυτή η διαπίστωση εντάσσεται στα ίδια συμπεράσματα που κατέληξαν και άλλες έρευνες. Πράγματι, η μέθοδος ABTS είναι καλύτερη από αυτή του DPPH όταν εφαρμόζονται σε μια ποικιλία από φυτικές τροφές που περιέχουν υδρόφιλες, λιπόφιλες και αρκετά χρωματισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Κάθε φυτό και κάθε εκχύλισμα περιέχει διαφορετικά φαινολικά συστατικά και κάθε συστατικό περιέχει διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα. Μπορεί κάλλιστα η

αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε φυτού να οφείλεται σε συνεργιστική αλληλεπίδραση των φαινολικών συστατικών ή ακόμα σε άλλα απροσδιόριστα συστατικά. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις περιπτώσεις του μελισσόχορτου και του δεντρολίβανου. Η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος στο μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του δεντρολίβανου, ωστόσο η αντιοξειδωτική ικανότητα του τελευταίου είναι ελαφρώς καλύτερη. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της καρνοσόλης στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου, η οποία απουσιάζει από το αντίστοιχο εκχύλισμα του μελισσόχορτου.

Σε αντίθεση με τα υδατικά εκχυλίσματα, τα οργανικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών που εξετάστηκαν. Σε όλες τις περιπτώσεις μικροοργανισμών-στόχων, τα εκχυλίσματα του διαλυθαιθέρα παρουσίασαν την πιο αξιοσημείωτη δράση. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα, αυτά του δίκταμου και του δεντρολίβανου, ακολουθούμενο από αυτό του φασκόμηλο παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των θετικά κατά Gram βακτηρίων παθογόνων της στοματικής κοιλότητας και παθογόνων τροφίμων. Τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του μελισσόχορτο, του χαμομηλιού και του κρόκου εμφάνισαν αρκετά μικρότερη δράση, ενώ σε κάποια στελέχη ήταν ανενεργά. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα συγκριτικά με τα άλλα δυο οργανικά εκχυλίσματα εμφανίζουν μικρότερη παρεμποδιστική δράση. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ήταν πιο ανθεκτικά, με μόνο τα μεθανολικά εκχυλίσματα του δεντρολίβανου να εμφανίζουν δράση έναντι στελεχών *Ps. aeruginosa* και *K. oxytoca*. Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα του μελισσόχορτο και του κρόκου ήταν ανενεργά σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη.

Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα χαρακτηρίζονται από συστατικά και που απαντώνται στα αντίστοιχα αιθέρια έλαια των φυτών. Τα τελευταία έχουν εκτενώς μελετηθεί για την αντιμικροβιακή τους ικανότητα έναντι τόσο θετικών κατά Gram όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η παρουσία ροσμαρινικού οξέος στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Laminaceae* (§ 3.2), προσδίδει στα φυτικά εκχυλίσματα αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, η παρουσία των φλαβονοειδών σαφώς ενισχύει αισθητά τη δράση αυτή. Η παρουσία στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου καρνοσόλης, έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της

αντιμικροβιακής δράσης με τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης που παρατηρούνται. Στην παρουσία των φλαβονοειδών και των τερπενικών ενώσεων άλλωστε μπορεί να αποδοθεί η αντιμικροβιακή ικανότητα των αιθερικών εκχυλισμάτων.

Στην προσπάθεια να εξηγήσουμε τις αλλαγές που παρατηρούνται στη δομική-βιοχημική σύσταση των κυττάρων έγινε χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR. Τα φάσματα FT-IR των βακτηρίων περιέχουν πληροφορίες για τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης (φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, πεπτιδογλυκάνη και λιποπολυσακχαρίτες), όσο και του κυτταροπλάσματος (λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα). Η αντιμικροβιακή δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των κρόκου και του μελισσόχορτου μελετήθηκε έναντι των παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutans* LMG 14558<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis* LMG 14532<sup>T</sup> και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup>. Επίσης μελετήθηκε και η δράση του αιθερικού εκχυλίσματος του κρόκου έναντι των στελεχών *Escherichia coli* C1845 και *Salmonella typhimurium* SL1344. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι από την επώαση των παραπάνω εκχυλισμάτων επηρεάζονται κυρίως τα δομικά συστατικά των κυττάρων των μικροοργανισμών-στόχων. Μελετώντας τις χαρακτηριστικές περιοχές του φάσματος καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μεγαλύτερη διαφοροποίηση έγκειται σε μεταβολές της δομικής διευθέτησης των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, στους πολυσακχαρίτες και στα φωσφορολιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της μεσογειακής χλωρίδας παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση *in vitro*. Ωστόσο, περαιτέρω πειράματα *in vivo*, είναι απαραίτητα προκειμένου να αποσαφηνιστεί η βιοδραστικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών όταν αυτά χρησιμοποιούνται με την μορφή αφεψήματος, ώστε να έχουμε μία ολοκληρωμένη εικόνα της ποσότητας που τελικά χρησιμοποιείται από τον οργανισμό καθώς και των ευεργετικών επιδράσεων που φέρει η κατανάλωση τους.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akhondzadeh, S. *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial (2003) *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 74, 863-866.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Albayrak, S., Sagdic, O. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. Iranian (2013) *Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 37, 1-9.
- Albano, S.M., Miguel, M.G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal (2011) *Industrial Crops and Products*, 33, 338-343.
- Al-Holy, M.A., Lin, M., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice (2006) *Food Microbiology*, 23, 162-168.
- Al-Qadiri, H.M., Al-Holy, M.A., Lin, M., Alami, N.I., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis (2006) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5749-5754.
- Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Al-Holy, M.A., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype typhimurium and *Listeria monocytogenes* using fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm<sup>-1</sup>) (2008) *Journal of Food Science*, 73, 54- 61.
- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J.A., Roca, M.J., Rabe, V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material (2006) *Journal of Chromatography A*, 1120, 221-229.
- Alonso, G.L., Salinas, M.R., Esteban-Infantes, F.J., Sánchez-Fernández, M.A. Determination of Safranal from Saffron (*Crocus sativus* L.) by Thermal Desorption - Gas Chromatography (1996) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 185-188.
- Ameenah, Gurib-Fakim. Medical plants: Traditions of yesterday and drung of tomorrow (2006) *Molecular aspects of medicine*, 27, 1-93.
- Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. Geographical differentiation of saffron by GC-MS/FID and chemometrics (2009) *European Food Research and Technology*, 229, 899-905.
- Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis (2010a) *European Food Research and Technology*, 230, 571-577.
- Anastasaki, E.G., Kanakis, C.D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics (2010b) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6011-6017.
- Antal, T., Chong, C.H., Law, C.L., Sikolya, L. Effect of freeze drying on retention of essential oils, changes in glandular trichomes of lemon balm leaves (2014) *International Food Research Journal*, 21, 387-394.

- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., Mcdonald, S., & Robards, K. Methods for testing antioxidant activity (2001) *Analyst*, 127, 183-198.
- Appel, H.M. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation (1993) *Journal of Chemical Ecology*, 19, 1521-1552.
- Arceusz, A., Occhipinti, A., Capuzzo, A., Maffei, M.E. Comparison of different extraction methods for the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thujone in sage (*Salvia officinalis* L.) herbal tea (2013) *Journal of Separation Science*, 36, 3130–3134.
- Arceusz, A., Wesolowski, M. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids (2013) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 215-220.
- Areias, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural-factors (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6081-6084.
- Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., & Medina, M. Inactivation of gram negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system (2008) *European Food Research and Technology*, 227, 77–82.
- Aruoma, I. O. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease (1998) *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 199–212.
- Asfaw, N., Storesund, H.J., Skattebol, L., Aasen, A.J. Coexistence of chrysanthenone, filifolone and (Z)-isogeranic acid in hydrodistillates (2001) *Artefacts! phytochemistry* 58, 489–492.
- Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z., Papageorgiou, V.P. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents (2005) *Phytotherapy Research*, 19, 997-1000.
- Atoui, A., K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile (2005) *Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Avula, B., Wang, Y.-H., Wang, M., Avonto, C., Zhao, J., Smillie, T.J., Rua, D., Khan, I.A. Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/*Chrysanthemum* flower heads (2014) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 278-288.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity (2010) *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 98-107.
- Babpour, E., Angaji, S.A., Angaji, S.M. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque (2009) *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 132-137.
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.U., Ülgen, S.G., Yardibi, H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits (2008) *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 64-73.
- Barauskiene, R., Dambrauskiene, E., Venskutonis, P.R., Viskelis, P. Influence of harvesting time on the yield and chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) (2011) 6th Baltic Conference on Food Science and Technology: Innovations for Food Science and Production, FOODBALT-2011 - Conference Proceedings, 104-109.

- Barros L, Oliveira S., Carvalho A. M. & Ferreira I. C.F.R. In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine (2010) *Industrial Crops and Products*, 32, 572-579.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M.I., Sousa M.J. Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions (2013) *Food Chemistry*, 136, 1-8.
- Beninca, J.P. Dalmarco, J.B, Pizolatti, M.G., Frode, T.S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in nice (2011) *Food Chemistry*, 124, 468-475.
- Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C., Nerín, C. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils (2014) *Food Chemistry*, 148, 204-208.
- Bicchi, C., Binello, A., Rubiolo, P. Determination of phenolic diterpene antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis (2000) *Phytochemical Analysis*, 11, 236-242.
- Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Rao, V.S., Brito, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens (2007) *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40 (3) , pp. 349-356.
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols (2011) *Food Chemistry*, 127, 1821-1827.
- Bult, H., Herman, A.G., Rampart, M. Modification of endotoxin induced haemodynamic and hematological changes in the rabbit by methylpendnisome, F(ab')<sub>2</sub> fragments and rosmarinic acid (1985) *British Journal of Pharmacology*, 84, 317-327.
- Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review (2004) *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Burt, S.A., Van Der Zee, R., Koets, A.P., De Graaff, A.M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7 (2007) *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4484-4490.
- Büter, B., Orlacchio, C., Soldati, A., Berger, K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum* (1998) *Planta Medica*, 64, 431-437.
- Cabral, C., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Cruz M.T., Lopes, M.C., Salgueiro, L. *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link as a source of a bioactive and fragrant oil (2013) *Industrial Crops and Products*, 43, 484-489.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, j., Luo, Q., & Corke, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants (2006) *Life Sciences*, 78, 2872-2888.
- Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., Čanadanović, V. Radical Scavenging, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts (2008) *Journal of Medicinal Food*, 11, 133-143.
- Caniova, A., & Brandsterova, E. HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa officinalis*. (2001) *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 24, 2647-2659.



- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships (1997) *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 749-760.
- Carmona, M., Zalacain, A., Pardo, J.E., López, E., Alvarruiz, A., Alonso, G.L. Influence of different drying and aging conditions on saffron constituents (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3974-3979.
- Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A.Ma., Novella, J.L., Alonso, G.L. Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS (2006) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 973-979.
- Carmona, M, Zalacain, A, Salinas, MR, Alonso, GL. A new approach to saffron aroma (2007a) *Critical Reviews in Food Science*, 47, 145–159.
- Carmona, M., Sánchez, A.M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomás-Barberán, F., Alonso, G.L. Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins (2007b) *Food Chemistry*, 100, 445-450.
- Carnat, A.B., Carnat, D., & Lamaison, J.-L. The aromatic and polyphenolic compositions of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea (1998) *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72, 301–305.
- Carnat, A., Carnat, A.P., Fraise, D., Ricoux, L., Lamaison, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of Roman camomile tea (2004) *Fitoterapia*, 75, 32-38.
- Celiktas- Yesil, O., Girgin, G., Orhan, H., Wichers H.J, Bedir, E., Vardar-Sukan, F. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times (2007) *European Food Research and Technology*, 224, 443-451.
- Chatzopoulou, A., Karioti, A., Gousiadou, C., et al. Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their in vitro antimicrobial activity in clinical strains (2010) *J Agric Food Chem*, 58, 6064-6068.
- Chen, Y., Zhang, H., Tian, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., Jia, L., Yin, H.-X. Chen, C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia Jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents (2009) *Food Chemistry*, 109, 484-4921.
- Choo-Smith, L.-P., Maquelin, K., Van Vreeswijk, T., Bruining, H.A., Puppels, G.J., Ngo Thi, N.A., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Villa, A.M., Orsini, F., Doglia, S.M., Lamfarraj, H., Sockalingum, G.D., Manfait, M. Allouch, P., Endtz, H.P. Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy (2001) *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1461-1469.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku S, Nychas, G.-J., Haroutounian, S.A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8261-8267.
- Chrpová, D., Kourimská, L., Gordon, M.H., Hermanova V., Roubícková, I., Pánek, J. Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions (2010) *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 317-325.

- Chun, S.-S., et.al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* (2005) *Process Biochemistry* 40, 809-816.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids (2003) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Conolly, J.D. & Hill, R. Triterpenoids (2007) *Natural Product Reports*, 2, 465-486.
- Cosge, B., Ipek, A., & Gurbuz, B. GC/MS analysis of herbage essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in Turkey (2009) *Journal of applied biological sciences*, 3, 136-139.
- Couladis, M., Tzakou, O., Mimica-Dukić, N., Janić, R., Stojanović, D. Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro (2002) *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 119-126.
- Cozzolino, D., Damberg, R.G., Janik, L., Cynkar, W.U., Gishen, M. Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy (2006) *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14, 279-289.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Mercurio, M.D., Smith, P.A. Measurement of condensed tannins and dry matter in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least squares (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7631-7636.
- Cushnie, T.P.T & Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids- review (2005) *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343- 356.
- Cuvelier, M.-E., Berset C., Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*) (1994) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 665-669.
- Cuvelier, M.-E., Richard H., Berset C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary (1996) *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 645-652.
- Daferera, D.J., Zogas, B.N., Polissiou, M.G. GC- MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum* (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2576- 2581.
- Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. Characterization of essential oils from Lamiaceae species by Fourier transform Raman spectroscopy (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5503-5507.
- Daferera, D.J., Zogas, B.N., Polissiou, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (2003) *Crop Protection*, 22, 39-44.
- Dastmalchi, K., Dorman, H. J., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract (2008) *LWT*, 41, 391-400.
- Davis, R. & Mauer, L.J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* at the haplotype level by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and multivariate statistical analysis (2011) *International Journal of Food Microbiology*, 150, 140-149.
- Debersac, P., Vernevaux, M.-F., Amiot, M.-J., Suschetet, M., Siess, M.-H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver (2001) *Food and Chemical Toxicology*, 39, 109-117.

- Del Campo, J., Nguyen-The, C., Sergent, M., Amiot, M.J. Determination of the most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria Monocytogenes*: Influence of concentration, pH, and NaCl (2003) *Journal of Food Science*, 68, 2066-2071.
- Del Campo, P.C., Carmona, M., Maggi, L., Kanakis, C.D., Anastasaki, E.G., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Alonso, G.L. Picrocrocine content and quality categories in different (345) worldwide samples of saffron (*Crocus sativus* L.) (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1305-1312.
- Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R., Taouil, R. In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco (2011) *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 89-95.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane (2010) *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107-115.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils (2000) *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs (2003) *Food Chemistry*, 83, 255-262.
- Dorman, H. J. D., Bachmayer, O., Kosar, M., & Hiltunen, R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563–4569.
- Douglas, M., Heyes, J., Smallfield, B. Herbs, spices and essential oils: post-harvest operations in developing countries, (2005) FAO Publishing Management Service, Rome, Italy.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants (2003) *Journal of Nutrition*, 133, 1286-1290.
- Economakis, C., Skaltsa, H., Demetzos, C., Soković, M., Thanos, C.A. Effect of phosphorus concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves and bracts of *Origanum dictamnus* (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6276-6280.
- Economakis, C., Karioti, A., Skaltsa, H., Perdetzoglou, D., Demetzos, C. Effect of solution conductivity on the volatile constituents of *Origanum dictamnus* L. in nutrient film culture (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1656-1660
- Ehrnhöfer-Ressler, M.M., Fricke, K., Pignitter, M., Walker J.M., Walker J. Rychlik, M., Somoza, V. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *salvia officinalis* L. Infusion using human gingival fibroblasts (2013) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3451-3459.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol (2008) *Food Chemistry*, 110, 76-82.
- Escuredo, O., Seijo, M.C., Salvador, J., González-Martín, M.I. Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey *Food Chemistry* (2013), 141, 3409–3414.

- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis I.P., Troganis, A., Boskou, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5294-5299.
- Farhat, M.B., Jordán, M.J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., Sotomayor, J.A. Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. (2009) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10349-10356.
- Farhat, M.B., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats (2013) *Industrial Crops and Products*, 49, 904-914.
- Fatehi, M., Rashidabady, T., Fatehi-Hassanabad, Z. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum (2003) *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 199-203.
- Fecka, I., & Turek, S. Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *J. Agric. (2007) Food Chemistry*, 55, 10908–10917.
- Fernandez J.-A., Santana O., Guardiola J.-L., Molina R.-V., Heslop-Harrison P., Borbely G., Branca F., (...), De-Los-Mozos-Pascual M. The World Saffron and Crocus collection: Strategies for establishment, management, characterisation and utilisation (2011) *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58, 125-137.
- Ferrazzano, G.F., Roberto, L., Catania, M.R., Chiaviello, A., De Natale, A., Roscetto, E., Pinto, G., Pollio, A., Ingenito, A., Palumbo, G. Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria (2013) *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine Article ID 316280*.
- Ferreira, F.M., Dinis, L.T., Azedo, P., Cristina I.C. Galhano, C., Simões, A., Cardoso, S.M., Rosário, M., Pereira, O.R., Palmeira, C.M., Peixoto, F.P. Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts (2012) *CyTA - Journal of Food*, 10, 92–102.
- Fesen M.R., Pommier Y., Leteurtre F., Hiroguchi S., Yung J., Kohn K.W. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds (1994) *Biochemical Pharmacology*, 48, 595-608.
- Field, A. *In Discovering Statistics using SPSS* (2005) Sage Publications.
- Figiel, A., Szumny, A., Gutiérrez-Ortíz, A., Carbonell-Barrachina, A.A. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method (2010) *Journal of Food Engineering*, 98, 240-247.
- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., Narbad, A. Mode of antimicrobial of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua* (2004) *Journal of Applied Microbiology*, 97, 104-113.
- Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH. Radical in Alcoholic Solutions (2004) *Journal of Organic Chemistry*, 69, 2309-2314.
- Frankel, E.N., & Meyer, A.S. Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants (2000) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1241.

- Gali-Muhtasib, H., El-Najjar, N., Schneider-Stock, R. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components (2006) *Advances in Phytomedicine*, 2, 133-153.
- Galvão, L.C.D.C., Furletti, V.F., Bersan, S.M.F., Da Cunha, M.G., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E.D., Sartoratto, A., De Alencar, S.M., Rosalen, P.L. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects (2012) *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, art. no. 751435
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes (2007) *Molecules*, 12, 932-945.
- Gouveia S.C. & P. C. Castilho. *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity (2013) *Industrial Crops and Products*, 45, 170-181.
- Gregory, M.J., Menary, R.C., Davies, N.W. Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5969-5975.
- Grunert, T., Wenning, M., Barbagelata, M.S., Fricker, M., Sordelli, D.O., Buzzola, F.R., Ehling-Schulz, M. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted fourier transform infrared spectroscopy (2013) *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 2261-2266.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., Ferreira, I. C.F.R. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations (2013) *Food Chemistry*, 136, 718-725.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., Ferreira, I. C.F.R. Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds (2013) *Food Chemistry*, 136, 947-954.
- Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M.R., del Valle, P. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria (2012) *Food Control*, 26, 555-563.
- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F.Z., Rebey, I.B., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods (2013) *Food and Bioprocess Technology*, 6, 806-817.
- Harbone, J.B. *In Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis.* (1998) Chapman & Hall, 3<sup>rd</sup> edition.
- Harbone, J.B., & Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. (2000) *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships (2002) *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy (1991) *Journal of General Microbiology*, 137, 69-79.

- Helm, D. & Naumann, D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy (1995) *FEMS Microbiology Letters*, 126, 75-79.
- Herald, P.J. & Davidson, P.M. Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids (1983) *Journal of Food Science*, 48, 1378-1379.
- Herodež, S.S., Hadolin, M., Škerget, M., Knez, Ž. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves (2003) *Food Chemistry*, 80, 275-282.
- Hohmann, J., Zupkó, I., Rédei, D., Csányi, M., Falkay, G., Máthé, I., Janicsák, G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia Officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula Angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation (1999) *Planta Medica*, 65, 576-578.
- Hossain, M. B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A. B., Barry-Ryan, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS (2010), 58, 10576-10581.
- Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M. *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice (2002) *BMC Pharmacology*, 2, art. no. 7
- Hosseinzadeh, H., Karimi, Gh., Niapoor, M. Antidepressant effects of *Crocus sativus* stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice (2004) *Phytotherapy Research*, 18, 484-487.
- Hu, P., Liang, Q.-L., Luo, G.-A., Zhao, Z.-Z., Jiang, Z.-H. Multi-component HPLC fingerprinting of *Radix Salviae Miltiorrhizae* and its LC-MS-MS identification (2005) *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 677-683.
- Huang, D., Boxin, O., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Ikgai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer (1993) *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1147, 132-136.
- Iordache, A., Culea, M., Gherman, C., Cozar, O. Characterization of some plant extracts by GC-MS (2009) *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267, 338-342.
- ISO 3632/TS-1,2 Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 1: Specifications, Part 2: Test Methods; ISO: Geneva, Switzerland, 2003.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., & Yankova, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants (2005) *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.
- Jalali-Heravi, M., Parastar, H., Ebrahimi-Najafabadi, H. Characterization of volatile components of Iranian saffron using factorial-based response surface modelling of ultrasonic extraction combined with gas chromatography chromatography–mass spectrometry analysis. (2009) *Journal of Chromatography A* 1216, 6088–6097.
- Janicsák, G., Máthé, I., Miklóssy-Vári, V., Blunden, G. Comparative Studies of the Rosmarinic and Caffeic Acid Contents of Lamiaceae Species (1999) *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 733-738.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.-J., Wang W., Luo M., Zhao C.-J., Zu, Y.-G., Liu, X.-L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary (2011) *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 63-68.

- Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. (2013a) Food Control, 30, 463 - 468
- Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract (2013b) Industrial Crops and Products, 48, 144– 152.
- Jrah Harzallah, H., Kouidhi, B., Flamini, G., Bakhrouf, A., Mahjoub, T. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone (2011) Food Chemistry, 129, 1469-1474.
- Juhas, S., Bukovska, A., Cikos, S., Czikkova, S., Fabian, D., Koppel, J. Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice (2009) Acta Veterinaria Brno, 78, 121-127.
- Justesen, U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs (2000) Journal of Chromatography A, 902, 369-379.
- Kahkönen, M., Hopia, A., Vuorella, H.J. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds (1999) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3954- 3962.
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Steenkamp, P. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species (2010) Food Chemistry, 119, 684-688.
- Kamdem, J.P., Adeniran, A., Boligon, A.A., Klimaczewski, C.V., Elekofehinti, O.O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuk, E.P. Meinerz, D.F., Athayde, M.L. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection (2013) Industrial Crops and Products, 51, 26-34.
- Kamnev, A.A. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signaling (2008) Spectroscopy, 22, 83-95.
- Kaliora, A.C., Kogiannou, D.A.A., Kefalas, P., Issidora S. Papassideri, I.S., Kalogeropoulos, N. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? (2014) Food Chem. 142, 233–241
- Kanakis, C.D., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron (2004) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4515-4521.
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J., McNaughton, D. Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains (1999) Phytochemistry, 52, 407-417.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Jaafar, H.Z.E. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity (2010) Molecules, 15, 6244-6256.
- Karoui, R., Downey, G., Blecker, C. Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: A tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships-A review (2010) Chemical Reviews, 110, 6144-6168.

- Karoui, R., Pillonel, L., Schaller, E., Bosset, J.-O., De Baerdemaeker, J. Prediction of sensory attributes of European Emmental cheese using near-infrared spectroscopy: A feasibility study (2006) *Food Chemistry*, 101, 1121-1129.
- Karoui, R., Mouazen, A.M., Dufour, E., Pillonel L., Schaller E., De Baerdemaeker, J., Bosset, J.-O. Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools (2006) *International Dairy Journal*, 16, 1211-1217.
- Kasimu, R., Tanaka, K., Tezuka, Y., Gong, Z.-N., Li, J.-X., Basnet P., Namba, T., Kadota, S. Comparative study of seventeen *Salvia* plants: Aldose reductase inhibitory activity of water and MeOH extracts and liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) analysis of water extracts (1998) *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46, 500-504.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Lukic, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols (2006) *Food Chemistry*, 94, 550-557.
- Kaufman, B.P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., & Brielmann, H.L. (1993). *Natural products from plants* (1993) CRC Press, 20-23.
- Kelen, M., Tepe, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora (2008) *Bioresource Technology*, 99, 4096-4104.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods (1993) *Food Technology*, 47, 85-89.
- Kintzios, S. *Oregano. The genera Origanum and Lippia. In Medical and Aromatic Plants- Industrial Profiles* (2002) Taylor & Francis, NY.
- Kintzios, S. *Sage. In Medical and Aromatic Plants- Industrial Profiles* (2000) Taylor & Francis, NY.
- Kirca, A., Arslan, E. Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey (2008) *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2038-2046.
- Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H., Mozina, S.S. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations (2009) *Journal of Food Protection*, 72, 1744-1752.
- Kogiannou, D.A.A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M.G., Kaliora, A.C. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells (2013) *Food and Chemical Toxicology*, 61, 152-159.
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity : a Comparative Study on Three Testing Methods (2002) *Phytochem. Anal.*, 13, 8- 17.
- Koleckar, V., Opletal, L., Brojerova, E., Rehakova, Z., Cervenka, F., Kubikova, K., Kuca, K., Kunes, J., Jahodar, L. Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae (2008) *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 218-224.
- Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A., Tzakou, O. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens* (2010) *Parasitology Research*, 107, 327-335.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S., Berendika, M. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis (2011) *Phytochemical Analysis*, 22, 172-180.



- Kontogianni, V.G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., A. G. Tzakos. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity (2013) *Food Chemistry*, 136, 120-129.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity (2002) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1302-1309.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., Yildirim, A. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,1408-1416.
- Koşar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species (2005) *Food Chemistry*, 91, 525-533.
- Koşar, M., Göger, F., Başer, K.H.C. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2369-2374.
- Koşar, M., Göger, F., Hüsnü Can Baer, K. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey (2011) *Food Chemistry*, 129, 374-379.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus* (2007) *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 155-162.
- Krinsky, N.I. & Yeum, K.-J. Carotenoid-radical interactions (2003) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 754-760.
- Krinsky, N.I. Carotenoids as antioxidants (2001) *Nutrition*, 17, 815-817.
- Križman, M., Baričević, D., Prošek, M. Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC-MS using a monolithic reversed-phase column (2007) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 481-485.
- Lagouri, V., Bantouna, A., Stathopoulos, P. A comparison of the antioxidant activity and phenolic content of nonpolar and polar extracts obtained from four endemic lamiaceae species grown in greece (2010) *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 872-886.
- Lamaison, J.L.; Petitjean-Freytet, C.; & Carnat, A. Lamiacées Médicinales à Propriétés Antioxydantes, Sources Potentielles d'Acide Rosmrinique (1991) *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66, 185-188.
- Länger, R., Mechtler, Ch., Jurenitsch, J. Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: A comparison of oils obtained by extraction and steam distillation (1996) *Phytochemical Analysis*, 7, 289-293.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol (2001) *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- Lech, K., Witowska-Jarosz, J., Jarosz, M. Saffron yellow: Characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection (2009) *Journal of Mass Spectrometry*, 44, 1661-1667.

- Lefier, D., Beccard, B., Bradley, M. Classification of Bacteria Using FT-IR (2007) The application Notebook September 2007, available in <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/data/articlestandard//spectroscopy/442007/469984/article.pdf>
- Lee, K.-G., Shibamoto, T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4947-4952.
- Lemonis, I., Tsimogiannis, D., Louli, V., Voutsas, E., Oreopoulou, V., Magoulas, K. Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO<sub>2</sub> and liquid solvent (2013) *Journal of Supercritical Fluids*, 76, pp. 48-53.
- Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants (2008) *LWT*, 41, 385–390.
- Lin L.-Z., Harnly J.M. Identification of the phenolic components of Chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) (2010) *Food Chemistry*, 120, 319-326.
- Liolios, C.C., Graikou, K., Skaltsa, E., Chinou, I. Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review (2010) *J. Ethnopharmacol*, 131, 229-241.
- Lionis C., Faresjo A., Skoula M., Kapsokefalou M., Faresjo T. Antioxidant effects of herbs in Crete (1998) *Lancet*, 352, 1987- 1988.
- Longaray-Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil (2007) *Food Chemistry*, 100, 603-608.
- Liu, A.-H., Lin, Y.-H., Yang, M., Guo H., Guan S.-H., Sun, J.-H., Guo, D.-A. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MS<sup>n</sup> (2007) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 846, 32-41.
- Liu, X., Du, J., Ou, Y., (...), He, L., Cao, Y. Degradation pathway of carnosic acid in methanol solution through isolation and structural identification of its degradation products (2013) *European Food Research and Technology*, 237, 617–626.
- López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress (2006) *Chemico-Biological Interactions*, 161, 79- 91.
- López, V., Akerreta, S., Casanova, E., Garcia-Mina, J.M., Cavero, R.Y., Calvo, M.I. In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of lamiaceae herbal extracts (2007) *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 151-155.
- Lu Y. and L. Yeap Foo. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis* (1999) *Phytochemistry*, 51, 91- 94.
- Lu Y. and L. Yeap Foo. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis* (2000) *Phytochemistry*, 55 263- 267.
- Lu Y. and L. Yeap Foo. Antioxidants activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*) (2001) *Food Chemistry*, 75, 197- 202.
- Lu Y. and L. Yeap Foo. Polyphenolics of *Salvia* - A review (2002) *Phytochemistry*, 59, 117-140.
- Lü, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell Mod. Med.* (2010), 14, 840-860

- Machado D.G., Bettio L.E.B., Cunha M.P., Capra J.C., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., Rodrigues A.L.S. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system (2009) *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33, 642-650.
- Madsen, H.L. & Bertelsen, G. Review: Spices as antioxidants (1995) *Trends in Food Science & Technology*, 64, 271- 277.
- Makino, T., Ono, T., Muso, E., Yoshida, H., Honda, G., Sasayama, S. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells (2000) *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15, 1140-1145.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry (2007) *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2056-2064.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae (2001) *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187-195.
- Masuda, T., Inaba, Y., Takeda, Y. Antioxidant mechanism of carnosic acid: Structural identification of two oxidation products (2001) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5560-5565.
- Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., Takeda, Y., Tamura, H., Yamaguchi, H. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5863-5869.
- Matsingou, T.C., Petrakis, N., Kapsokefalou, M., Salifoglou, A. Antioxidant Activity of Organic Extracts from Aqueous Infusions of Sage (2003) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6696- 6701.
- Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lofti, M., Naseri, A. Improved in vitro culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes (2010) *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 240-246.
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., Aquino, R. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis* (2007) *Journal of Natural Products*, 70 (12) , pp. 1889-1894.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts (2004) *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates (1993) *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2485-2489.

- Miron, T.L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants (2011) *Journal of Chromatography A*, 1218, 4918-4927.
- Møller, J.K.S., Lindberg Madsen, H., Aaltonen, T., Skibsted, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants (1999) *Food Chemistry*, 64, 215-219.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition (2006) *Free Radical Research*, 40 (2), pp. 223-231.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus* (1987) *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- Móricz, Á.M., Szarka, S., Ott, P.G., Hethelyi, E.B., Szoke, É., Tyihák, E. Separation and identification of antibacterial chamomile components using OPLC, bioautography and GC-MS (2012) *Medicinal Chemistry*, 8, 85-94.
- Morris, P., and Robbins, M. (1997). Manipulating the chemical composition of plants, In *Manipulating Plant Chemistry*. Iger Innovations.
- Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Vincieri F. F., & Prucher D. Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC–MS and HPLC–DAD analysis (2000) *Chromatographia*, 51, 301–307.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J. Natural antioxidants from residual sources (2001) *Food Chemistry*, 72, 145- 171.
- Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Eleuteri, A.M., Fioretti, E., Angeletti, M. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin (2006) *Biochimie*, 88, 1297- 1306.
- Nakanishi, K. & Solomon, P.H. *In Infrared absorption spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> edition, Holden-Day Inc., San Francisco 1997.
- Nakhaei, M., Khaje-Karamoddin, M., & Ramezani, M. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by saffron (*Crocus sativus* L.) (2008) *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 11, 91-96.
- Naumann, D., Fijala, V., Labischinski, H. The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis (1988) *Mikrochimica Acta*, 94, 373-377.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy (1991) *Nature*, 351, 81-82.
- Nováková, L., Vildová, A., Mateus, J.P., Goncalves, T., Solich, P. Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts (2010) *Talanta*, 82, 1271-1280.
- Ntalli N. G., Ferrari F., Giannakou I. & Menkssoglu-Spiroudi U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7856-7863.
- Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P., Barrett, J.F. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1) (1993) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3, 225-230.

- Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S., Yagi, A. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* (1994) *Journal of Chromatography A*, 679, 381-386.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods (2010) *Food Chemistry*, 120, 308-312.
- Ollanketo, M., Peltoketo, A., Hartonen, K., Hiltunen, R., Riekkola, M.-L. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: Antioxidant activity of the extracts (2002) *European Food Research and Technology*, 215, 158-163.
- Ordoudi, S.A., Befani, C.D., Nenadis, N., Koliakos, G.G., Tsimidou, M.Z. Further examination of antiradical properties of *Crocus sativus* stigmas extract rich in crocins (2009) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3080-3086.
- Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Şener, B., Hüsni Can Başer, K. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes (2008) *Food Chemistry*, 108, 663-668.
- Osorio, M.T., Zumalacárregui, J.M., Alaiz-Rodríguez, R., Guzman-Martinez R., Engelsén, S.B., Mateo, J. Differentiation of perirenal and omental fat quality of suckling lambs according to the rearing system from Fourier transforms mid-infrared spectra using partial least squares and artificial neural networks analysis (2009) *Meat Science*, 83, 140-147.
- Oust, A., Mørretrø, T., Kirschner, C., Narvhus, J.A., Kohler, A. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli (2004) *Journal of Microbiological Methods*, 59, 149-162
- Öztürk, M., Duru, M.E., Ince, B., Harmandar, M., Topçu, G. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts (2010) *Food Chemistry*, 123, 1352-1356.
- Papadimitriou, K., Boutou, E., Zoumpopoulou, G., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Vorgias, C.E., Tsakalidou, E. RNA arbitrarily primed PCR and fourier transform infrared spectroscopy reveal plasticity in the acid tolerance response of *Streptococcus macedonicus* (2008) *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6068-6076.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., Mason, T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica* (2001) *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 299-301.
- Pardo, J.E., Zalacain, A., Carmona, M., López, E., Alvarruiz, A., Alonso, G.L. Influence of the type of dehydration process on the sensory properties of saffron spice (2002) *Italian Journal of Food Science*, 14, 413-421.
- Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., Komaitis, M. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7254-7264.
- Patz, C.-D., Blieke, A., Ristow, R., Dietrich, H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis (2004) *Analytica Chimica Acta*, 513, 81-89.
- Perakis, C., Louli, V., Voutsas, E., Magoulas, K. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of dittany oil: Experiments and modelling (2010) *Journal of Supercritical Fluids*, 55, 573-578.
- Pereira, R.P., Fachineto, R., De Souza Prestes, A., Puntel, R.L., Santos Da Silva, G.N., Heinzmann, B.M., Boschetti, T.K., Morsch, V.M., Rocha, J.B.T. Antioxidant effects of

- different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus* (2009) *Neurochemical Research*, 34, 973-983.
- Pereira, R.P., Boligon, A.A., Appel, A.S., Fachinetto, R., Ceron, C.S., Tanus-Santos, J.E., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis* (2014) *Industrial Crops and Products*, 53, 34-45.
- Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays (2006) *Food Research International*, 39, 791-800.
- Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas M.H., Heaney A.J., McGimpsey, J.A., Smallfield, B.M. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plant parts, seasons, and sites (1999) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2048-2054.
- Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy (2009) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10044-10048.
- Petrulová-Poracká V., Repčák, M., Vilková, M., Imrich, J. Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides *Food Chemistry* (2013), 141, 54–59
- Pham, T.Q., Cormier, F., Farnworth, E., Van Tong, H., Van Calsteren, M.-R. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1455-1461.
- Pichersky, E., Gang, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective (2000) *Trends in Plant Science*, 5, 39-445.
- Pintado, C., de Miguel, A., Acevedo, O., Nozal, L., Novella, J.L., Rotger, R. Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage (2011) *Food Control*, 22 (3-4) , pp. 638-642.
- Pitsikas, N., Bouladakis, A., Georgiadou, G., Tarantilis, P.A., Sakellaris, N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety (2008) *Phytomedicine*, 15, 1135-1139.
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., Conte, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content (2002) *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82, 1645-1651.
- Pokorny J. Natural antioxidants for food use (1991) *Trends in Food Science Technology*, 9, 223-227.
- Preisner, O.E., Menezes, J.C., Guiomar, R., Machado, J., Lopes, J.A. Discrimination of *Salmonella enterica* serotypes by Fourier transform infrared spectroscopy (2012) *Food Research International*, 45, 1058-1064.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., & Komaitis, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity (2005) *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 1190-1195.
- Proestos, C. & Komaitis, M. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: Comparison with conventional extraction techniques (2006) *Journal of Food Quality*, 29, 567-582.

- Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. (2006a) *Food Chemistry*, 95, 44-52.
- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity (2006b) *Food Chemistry*, 95, 664-671.
- Raal, A., Kaur, H., Orav, A., Arak, E., Kailas, T. & Müürisepp, M. Content and composition of essential oils in some Asteraceae species (2011) *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 60, 55–63.
- Rădulescu, V., Pavel, M., Teodor, A., Tănase, A., Ilieș, D.C. Analysis of volatile compounds from infusion and hydrodistillate obtained from the species *Thymus pulegioides* L. (Lamiaceae) (2009) *Farmacologia*, 57, 282-289.
- Raina, B. L.; Agarwal, G. S.; Bhatia, A. K.; Gaur, G. S. Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage (1996) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 27-32.
- Ramadan, M.F. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): An overview (2007) *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1208-1218.
- Rasooli, I., Shayegh, S., Taghizadeh, M., Darvish, S., Astaneh, A. *Rosmarinus officinalis* and *Thymus eriocalyx* essential oils combat in vitro and in vivo dental biofilm formation (2008) *Pharmacognosy Magazine*, 4, 65-72.
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds (2000) *International Journal of Food Microbiology*, 56, 3-12.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay (1999) *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rehman, S.-U., Latief, R., Bhat, K.A., Khuroo, M.Ashawl, A.S., Chandra, S. Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques (2013) *Arabian Journal of Chemistry*, in press
- Reverchon, E., Senatore, F. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry (1994) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 154-158.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids (1995) *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids (1996) *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. Review: Antioxidant properties of phenolic compounds (1997) *Trends in plant science*, 2, 152- 159.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts (2013a) *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.

- Roby, M. H. H., Sarhana, M. A., Selima, K. A. & Khalela, K. I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) (2013b) *Industrial Crops and Products*, 44, 437-445.
- Rödel, W.; Petrzika, M. Analysis of the volatile components of saffron (1991) *Journal of High-Resolution Chromatography*, 14, 771-774.
- Rodríguez-Saona, L.E., Khambaty, F.M., Fry, F.S., Calvey, E.M. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy (2001) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 574-579.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes* (2007) *Food Control*, 18, 587-593.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Tomassini Serravalle, L.R., Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions (2010) *Food Control*, 21, 779-785.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits (1999) *Food Chem.*, 66, 401-436
- Ruberto, G., Baratta, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems (2000) *Food Chemistry*, 69, 167-174.
- Rubiolo, P., Belliardo, F., Cordero, C., Liberto E., Sgorbini, B., Bicchi, C. Headspace - Solid-phase microextraction fast GC in combination with principal component analysis as a tool to classify different chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.) (2006) *Phytochemical Analysis*, 17, 217-225.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas (2003) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581.
- Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium (1989) *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2307-2311.
- Saltas, D., Pappas, C.S., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. Direct determination of rosmarinic acid in Lamiaceae herbs using diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics (2013) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 3235-3241.
- Sánchez, A.M., Carmona, M., Zalacain, A., Carot, J.M., Jabaloyes, J.M., Alonso, G.L. Rapid determination of crocetin esters and picrocrocin from saffron spice (*Crocus sativus* L.) using UV-visible spectrophotometry for quality control (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3167-3175.
- Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.) (2002) *Plant Science*, 162, 981-987.
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Inuma, M., Tosa, H., Ohkawa, Y. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria (1996) *Journal of Ethnopharmacology*, 54, 171-176.



- Sato, M., Tsuchiya, H., Akagiri, M., Takagi, N., Iinuma, M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones (1997) *Australian Dental Journal*, 42, 343-346.
- Scalia, S., Giuffreda, L., Pallado, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods (1999) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 549-558.
- Schäwe, R., Fetzer, I., Tönniges, A., Härtig, C., Geyer, W., Harms, H., Chatzinotas, A. Evaluation of FT-IR spectroscopy as a tool to quantify bacteria in binary mixed cultures (2011) *Journal of Microbiological Methods*, 88, 182- 187.
- Schilcher, H. Die Kamille. *In Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler* (1987) Wiss, Stuttgart, 152.
- Schmiderer, C., Torres-Londoño, P., Novak, J. Proof of geographical origin of Albanian sage by essential oil analysis (2013) *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, 70–77
- Schmitt, J., Flemming, H.-C. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis (1998) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 1-11.
- Schneider, K., Pulver, G., Kubelka, W. Infusions of Rosemary leaves: Dissolution rate and kinetics of the main volatile compounds (1992) *Planta Medica*, 58 (7 SUPPL.)
- Schultz, C., Naumann, D. In vivo study of the state of order of the membranes of Gram-negative bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) (1991) *FEBS Letters*, 294, 43-46.
- Schulz, H. & Baranska, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy (2007) *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13–25.
- Seidler-Łożykowska, K., Bocianowski, J., Król, D. The evaluation of the variability of morphological and chemical traits of the selected lemon balm (*Melissa officinalis* L.) genotypes (2013) *Industrial Crops and Products*, 49, 515–520
- Seigler, D. S. *In Plant secondary metabolism* (1998) Kluwer Academic Publishers: Norwell.
- Sekine, T., Sugano, M., Majid, A., Fujii, Y. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs (2007) *Journal of Chemical Ecology*, 33, 2123-2132.
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Maggi, L., Martínez-Tome, M., García-Diz, L., Murcia, M.A., Alonso, G.L. Increasing the Applications of *Crocus sativus* Flowers as Natural Antioxidants (2012) *Journal of Food Science*, 77, 1162-1168.
- Shan, B., Cai Y.Z., Sun, M., Corke, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.
- Semiond, D., Dautraix, S., Desage, M., Majdalani, R., Casabianca H., Brazier JL. Identification and isotopic analysis of safranal from supercritical fluid extraction and alcoholic extracts of saffron (1996) *Analytical Letters*, 29, 1027–1039
- Silva, N., Alves, S., Gonçalves, A., Amaral, J.S., Poeta, P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria (2013) *Food Science and Technology International*, 19, 503- 510.

- Sinelli, N., Spinardi, A., Di Egidio, V., Mignani, I., Casiraghi, E. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy (2008) *Postharvest Biology and Technology*, 50, 31-36.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent (1998) *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini S. Lanaras, T., Arsenakis, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils (1996) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1202-1205
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini S. Lanaras, T., Arsenakis, M. Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil (1997) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3197-3201.
- Skandamis, P.N. & Nychas, G.-J.E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oils concentrations (2000) *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1646- 1653.
- Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.-J.E. Inhibition of oregano essential oil and edta on *Escherichia coli* O157:H7 (2001) *Italian Journal of Food Science*, 13, 65-75.
- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., Johnson, C.B. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae) (1999) *Phytochemistry*, 52, 649-657.
- Smullen, J., Finney, M., Storey, D.M., Foster, H.A. Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts (2012) *Journal of Applied Microbiology*, 113, 964-973.
- Socrates, G. *In* Infrared characteristic group frequencies, tables and charts (1994) 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & sons, Chichester.
- Soobrattee, M. A. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions (2005) *Mutation Research*, 579, 200- 213.
- Sotelo-Felix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Castillo, D., Yahuaca, P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat (2002) *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 145-154.
- Stagos D, Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species (2012) *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4115-4124.
- Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., Taylor, P.W. Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins (2004) *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 374-380.
- Švehlíková, V., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Needs, P.W., Piacente, S., Kroon, P.A., Bao, Y. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) (2004) *Phytochemistry*, 65, 2323-2332.

- Szőke, É., Máday, E., Tyihák, E., Kuzovkina, I. N. & Lemberkovics, É. New terpenoids in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro) (2004) *Journal of Chromatography B*, 800, 231-238.
- Tagashira, M.; & Ohtake, Y. A New Antioxidative 1,3-Benzodioxole from *Melissa Officinalis* (1998) *Planta Medica*, 64, 555-558.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food (2010) *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tarantilis, P.A., Morjani, H., Polissiou, M., Manfait, M. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. (1994) *Anticancer Research*, 14, 1913-1918.
- Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., Polissiou, M. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography- UV Visible photodiodearray detection-mass spectrometry (1995) *Journal of Chromatography A*, 699, 107-118.
- Tarantilis, P.A, Polissiou, M. Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.) (1997) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 459-462
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species (2007) *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.
- Teixeira, B., Marques, A., Cristina Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil (2013) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2707-2714.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl) (2004) *Food Chemistry*, 84, 519-525.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae) (2005) *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- Tezuka, Y., Kasimu, R., Li, J.X., Basnet, P., Tanaka, K., Namba, T., Kadota, S. Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang (Xinjiang-Danshen) (1998) *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46, 107-112.
- Tsai, P.-J., Tsai, T.-H., Ho, S.-C. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus* (2007) *Food Chemistry*, 105, 311-316.
- Tsai, T.-H., Tsai, T.-H., Chien, Y.-C., Lee, C.-W., Tsai, P.-J. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs (2008) *Food Chemistry*, 110, 859-864.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Inuma, M., Yokoyama, J., Ohyama, M., Tanaka, T., Takase, I., Namikawa, I. Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones (1994) *Experientia*, 50, 846-849.
- Tschiersch, K., Holzl, J. Evidence and analytical procedure for acylated Apigenin-7-glucosides (1992) *PZ Wissenschaft*, 137, 208-214.

- Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, Ch., Foufa, E., Kaloudis, Tr., Kromhout, D., (...), Theophilou, D. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: A potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet (2000) *Food Chemistry*, 70, 319-323.
- Troncoso, N., Sierra, H., Carvajal, L., Delpiano, P., Günther, G. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary (2005) *Journal of Chromatography A*, 1100, 20-25.
- Trouillas, P., Marsal, P., Siri, D., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site (2006) *Food Chemistry*, 97, 679- 688.
- Tschiggerl, C. & Bucar, F. Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts (2010) *Scientia Pharmaceutica*, 78, 483-492.
- Tschiggerl, C. & Bucar, F. Influence of saponin plants on the volatile fraction of thyme in herbal teas (2011) *Fitoterapia*, 82, 903-910.
- Tschiggerl, C. & Bucar, F. The volatile fraction of herbal teas (2012) *Phytochemistry Reviews*, 11, 245- 254.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.-J.E. Behaviour of *Listeria Monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. J. of (2000) *Applied Microbiology*, 89, 901- 909.
- Tsimogiannis, D.I. & Oreopoulou, V. The contribution of flavonoid C- ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4' – hydroxy substituted members (2006) *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 7, 140- 146.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996) *Journal of Ethnopharmacology*, 50, 27- 34.
- Tsuchiya, H., Iinuma, M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua* (2000) *Phytomedicine*, 7, 161-165.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol (2000) *Archives of Microbiology*, 174, 233-238.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* (2002) *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561-1568.
- Uzun, E., Sariyar, G., Adersen, A., Karakoc B., Otuk G., Oktayoglu, E., Pirildar, S. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species (2004) *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 287-296.
- van der Mei, H.C., Naumann, D., Busscher, H.J. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification (1993) *Archives of Oral Biology*, 38, 1013-1019.
- van Der Mei, H.C., Naumann, D., Busscher, H.J. Grouping of *Streptococcus mitis* strains grown on different growth media by FT-IR (1996) *Infrared Physics and Technology*, 37, 561-564.

- Veličković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage (2006) *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 150-156.
- Veličković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B. Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia sp.* essential oil hydrodistillation (2008) *Biochemical Engineering Journal*, 42, 97-104.
- Venditti, E., Bacchetti, T., Tiano, L., Carloni, P., Greci, L., Damiani, E. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? (2010) *Food Chemistry*, 119, 1597–1604.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review (2008) *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161–169.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs (2001) *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Yang, D.-J., Hwang, L.S., Lin, J.-T. Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions (2001) *Journal of Chromatography A*, 1156, 312–320.
- Wächter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E., Timmermann, B.N. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana* (1999) *Phytochemistry*, 52, 1469-1471.
- Walch, S.G., Kuballa, T., Stühlinger, W., Lachenmeier, D.W. Determination of the biologically active flavour substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (*Salvia officinalis* L.) (2011) *Chemistry Central Journal*, 5, art. no. 44.
- Wellwood, C.R.L., Cole, R.A. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), accessions for optimization of antioxidant yield (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6101-6107.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs (2007) *Food Chemistry*, 105, 940–949.
- Zarghami, N.S. & Heinz, D E. Monoterpene aldehydes and isophorone-related compounds of saffron (1971) *Phytochemistry*, 10, 2755-2761.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities (2010) *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3144-3152.
- Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R., Boussaid, M. Genetic diversity and population structure among *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) varieties: Var. *typicus* Batt. and var. *trogodytorum* Maire. based on multiple traits (2012) *Industrial Crops and Products*, 38, 166-176.
- Zeroual, W., Choisy, C., Doglia, S.M., Bobichon, H., Angiboust, J.-F., Manfait, M. Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy (1994) *BBA - Molecular Cell Research*, 1222, 171-178.
- Zhang, M.H., Luypaert, J., Fernández Pierna, J.A., Xu, Q.S., Massart, D.L. Determination of total antioxidant capacity in green tea by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration (2004) *Talanta*, 62, 25-35.

- Zhang, Y., Smuts, J.P., Dodbiba, E., Rangarajan R., Lang, J.C., Armstrong, D.W. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC (2012) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9305-9314.
- Zgorka, G., & Glowniak, K. Variation of free phenolics acid in medicinal plants belongin to the Lamiaceae family (2006) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79–87.
- Zhang, C., Shen, Y., Chen, J., Xiao, P., Bao, J. Nondestructive prediction of total phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8268-8272.
- Zheng, W. and Wang S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs (2001) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165- 5170.
- Zimmermann, B. F., Walch, S. G., Tinzoh, L. N., Stöhlinger, W. & Lachenmeier, D. W. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea) (2011) *Journal of Chromatography B*, 879, 2459-2464.
- Zoubiri, S., Baaliouamer, A. Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria (2011) *Food Chemistry*, 129, 179-182.
- Zoumpopoulou, G., Papadimitriou, K., Polissiou, M.G., Tarantilis, P.A., Tsakalidou, E. Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy (2010) *International Journal of Food Microbiology*, 144, 202-207.
- Zoumpopoulou, G., Pepelassi, E., Papaioannou, W., Georgalaki, M., Maragkoudakis, P.A., Tarantilis, P.A., Polissiou M., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens (2013) *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 4640-4654.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

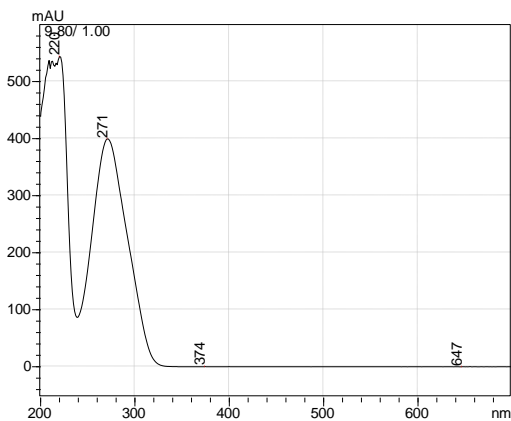
- Αναστασάκη, Ε., Κανέλλου, Γ., Δαφερέρα, Δ., Ταραντίλης, Π., Πολυσιού, Μ. (2011) Πτητικά συστατικά αφεψημάτων μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*), και δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*) Ημέρες Χημείας 2011, 4-5 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα, Γενικό Χημείο του Κράτους.
- Baumann, H. Η Ελληνική χλωρίδα στον μύθο, στη Τέχνη, στη Λογοτεχνία. Κεφ. Θεραπευτικά και μαγικά βότανα. Τα φάρμακα των γιατρών (1999) Εκδόσεις Ελλ. Εταιρεία προστασίας της φύσης, 119-121.
- Κουτσός, Θ.Β. Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά (2006) (Σελ. 223-232, 301-322, 329-335). Εκδόσεις Ζήτη.
- Ραγκούση- Ιγνατιάδου, Β. Χημεία Φυσικών Προϊόντων (1998) Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Κανάκης, Χ. Ανάπτυξη μεθόδου πιστοποίησης γεωγραφικής ένδειξης καλλιεργούμενων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών με χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους (2010) Μεταδιδακτορική διατριβή.
- Μπόσκου, Δ. Χημεία Τροφίμων (2004) Ε΄ Έκδοση, 221-227. Εκδόσεις Γαρταγάνη.

- Παππάς, Χ. Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (2000) Διδακτορική διατριβή.
- Παπαγεωργίου, Β. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ουσιών σε φαρμακευτικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας (2008) Διδακτορική διατριβή.
- Πολυσίου, Μ. Επενδυτικές δυνατότητες στον τομέα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα (2002) Υπουργείο Εθνικής Οικονομίας- Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

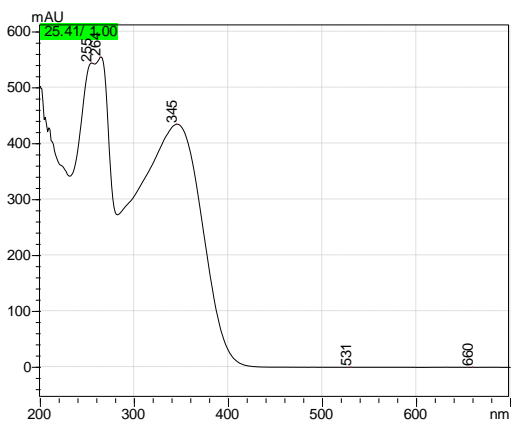
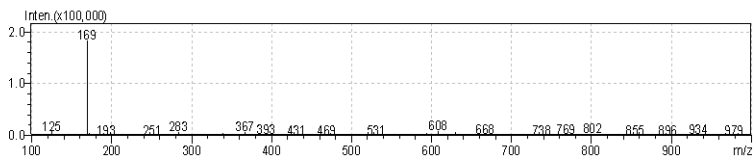
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



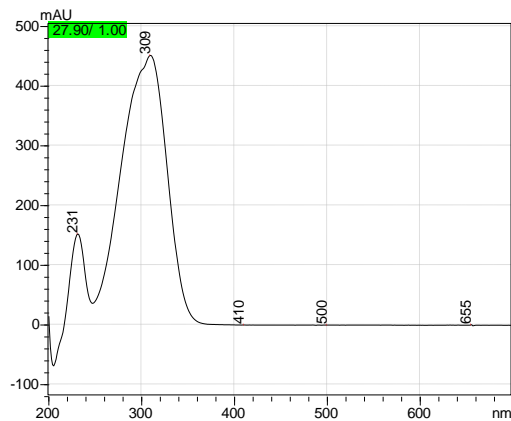
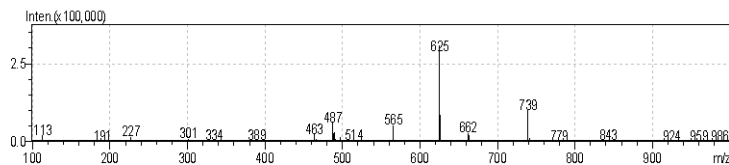




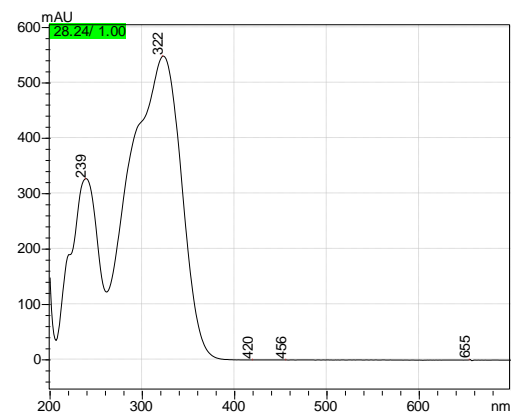
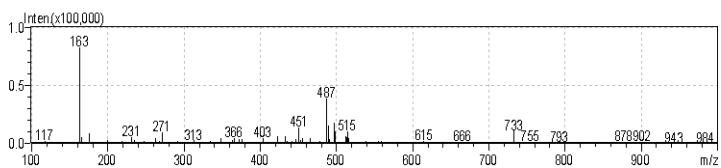
Γαλλικό οξύ



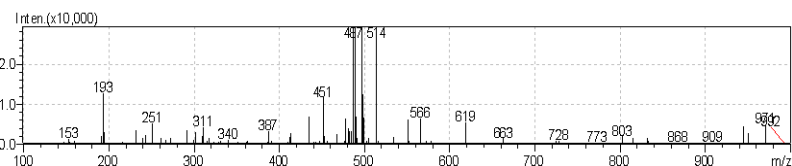
3,4-O-διγαλλοζιτης κερκετίνης

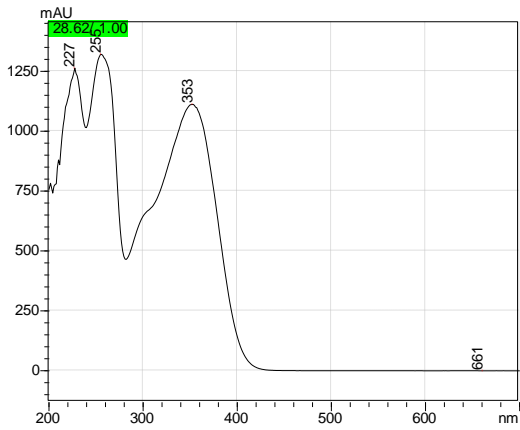


π-κουμαρικό οξύ

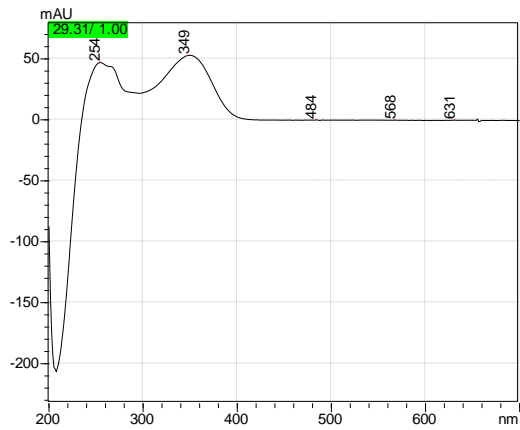
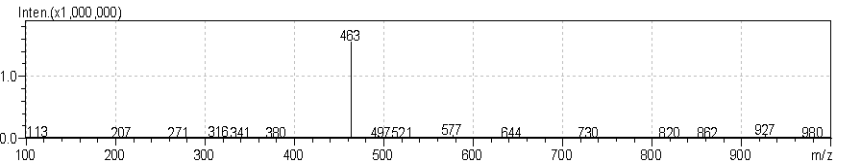


φερουλικό οξύ

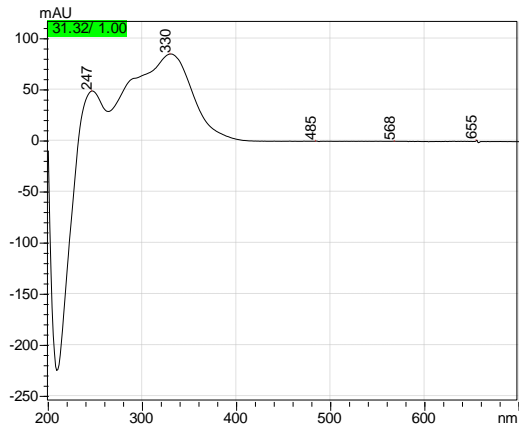
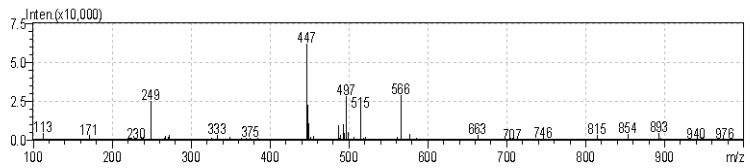




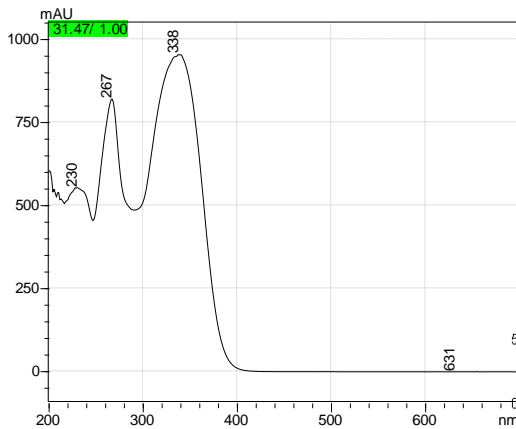
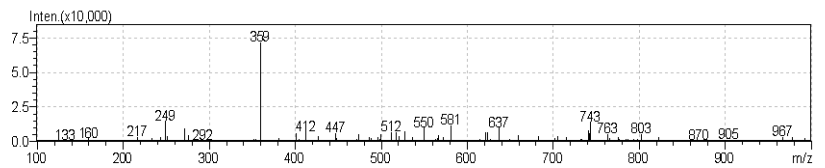
### 3-O-ραμνοζίτης μυρισετίνης



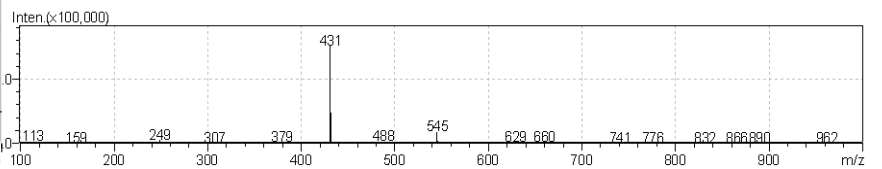
### 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης

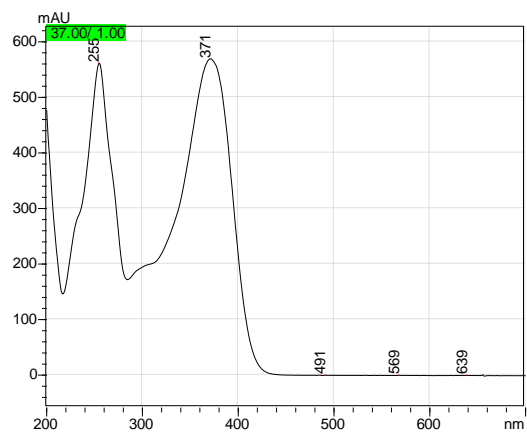


### Ροσμαρινικό οξύ

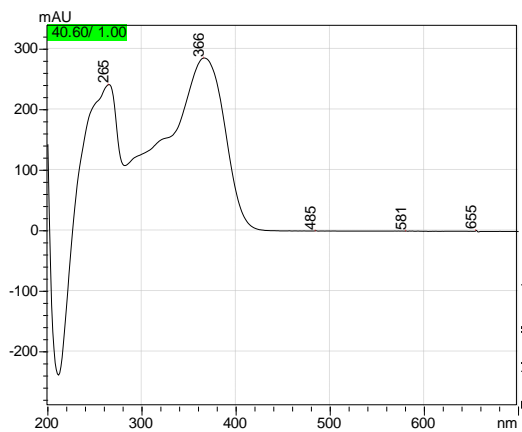
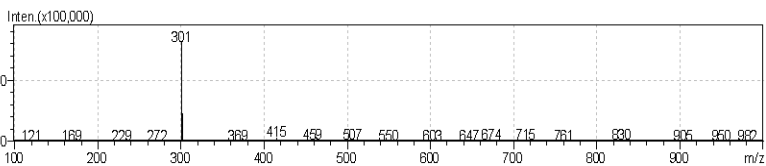


### 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης

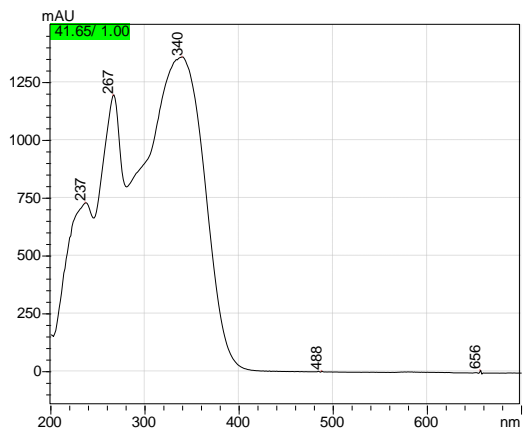
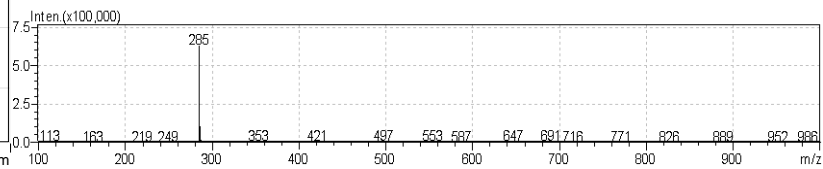




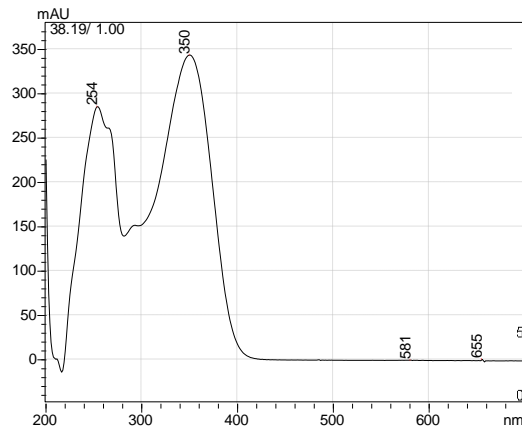
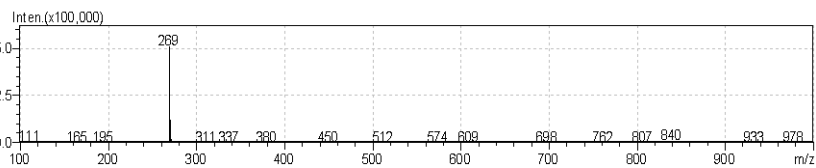
κερκετίνη



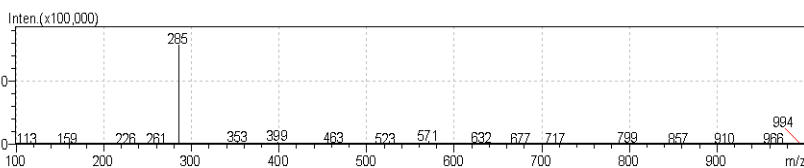
καεμφερόλη

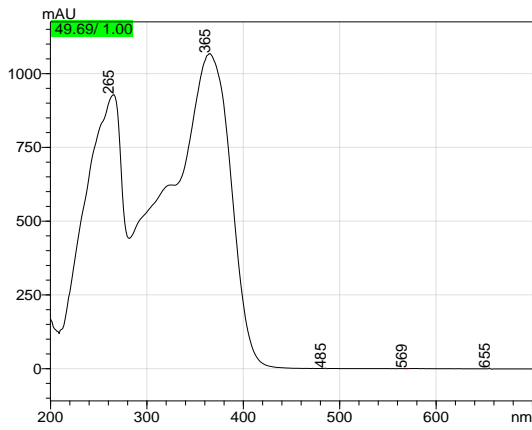


απιγενίνη

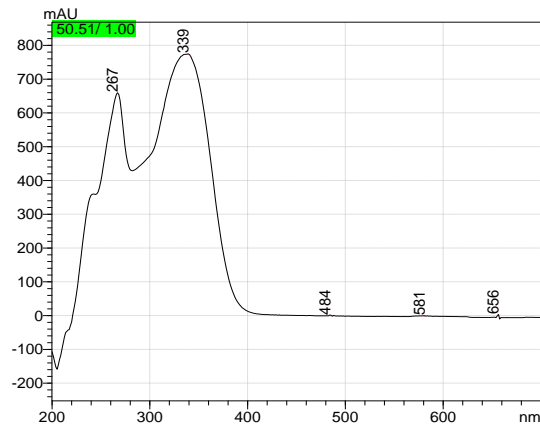
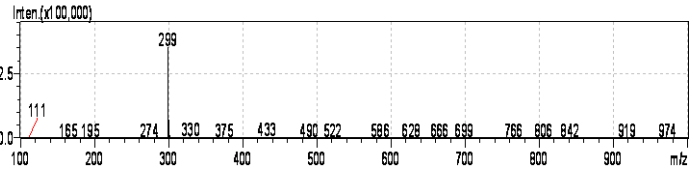


λουεολίνη

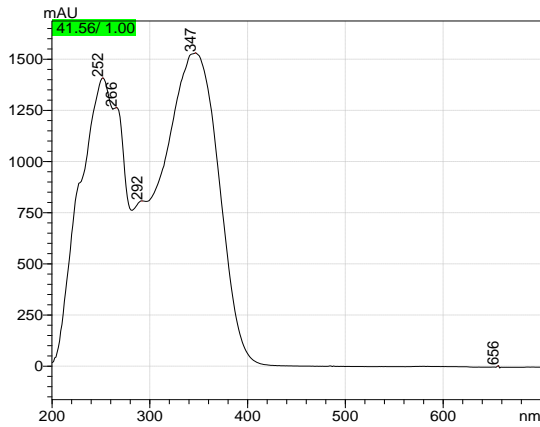
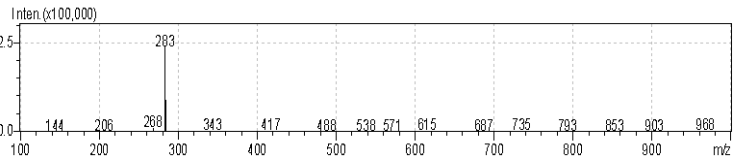




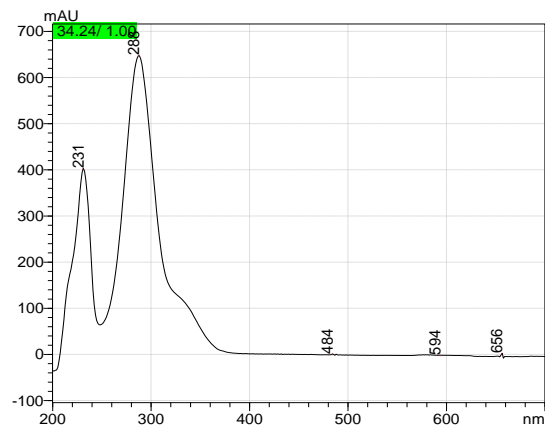
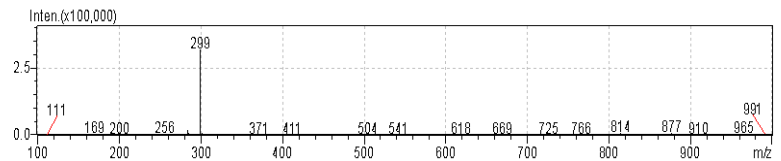
καμφερίδη



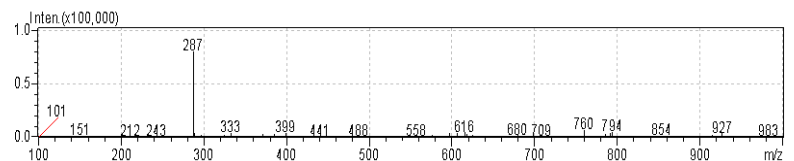
γκενγκουανίνη

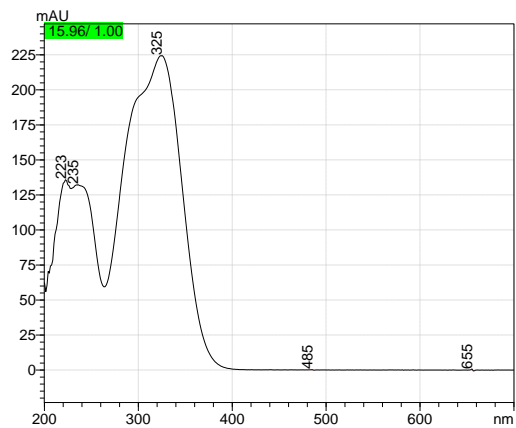


διοσμετίνη

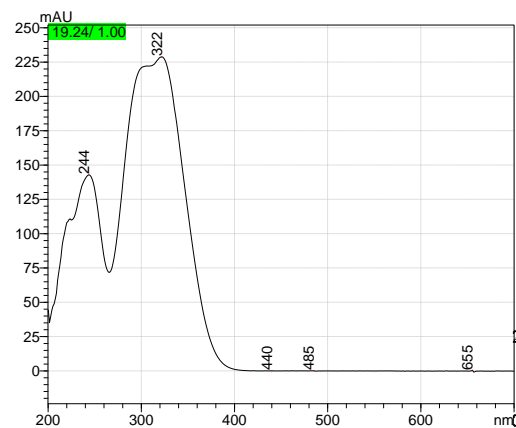
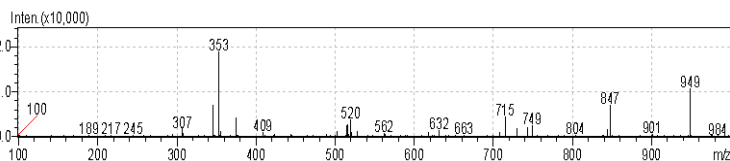


εριοδουκυόλη

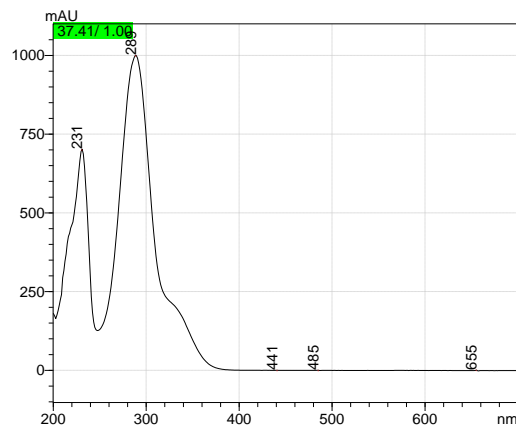
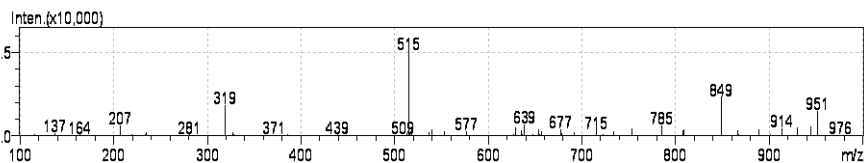




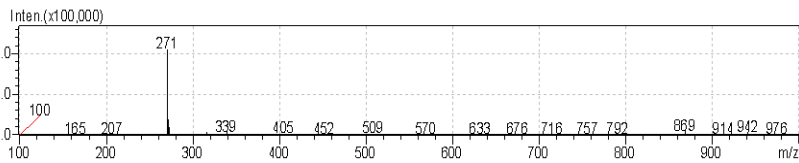
**Χλωρογενικό οξύ**



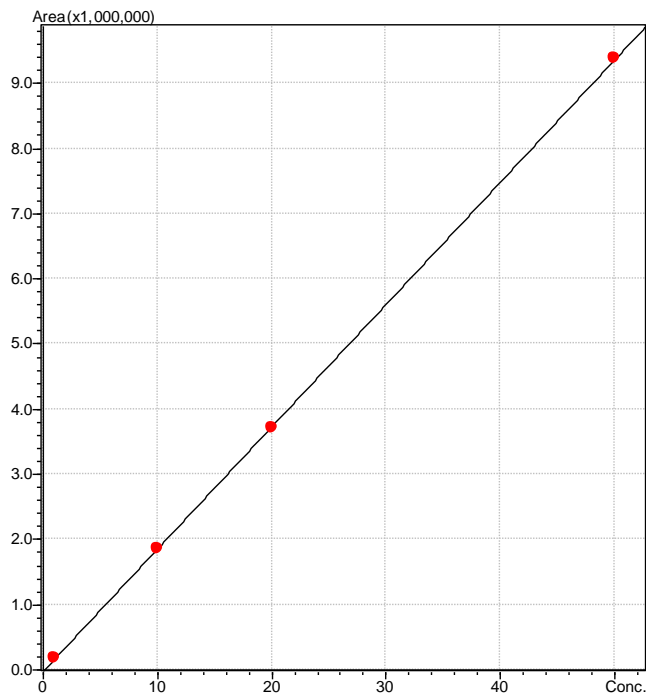
**κυναρίνη**



**ναριγενίνη**



Απιγενίνη Ch2 340nm 41.383 min 1 10 20 50

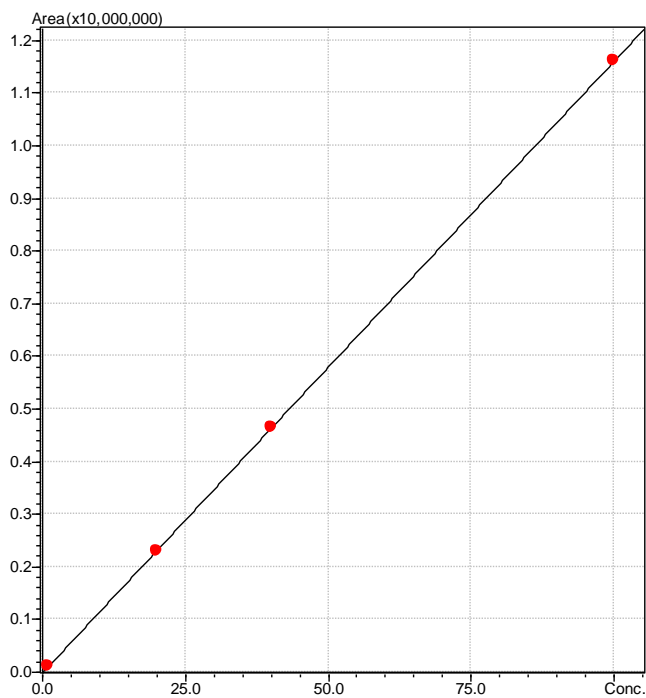


Y = aX + b  
a = 187631.8  
b = -20843.3  
R<sup>2</sup> = 0.9999741  
R = 0.9999871

External Standard  
Curve Fit Type:Linear  
Origin:Not Forced  
Weight:None

Mean RF : 185844.0  
RF SD : 2370.621  
RF %RSD : 1.275597

7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης Ch2 340nm 31.724 min 1 20 40 100

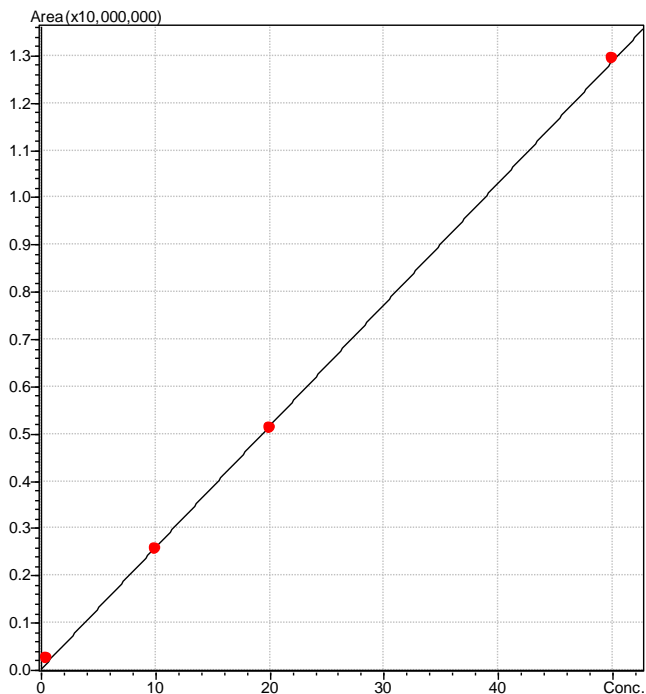


Y = aX + b  
a = 116173.3  
b = -14239.64  
R<sup>2</sup> = 0.9999990  
R = 0.9999995

External Standard  
Curve Fit Type:Linear  
Origin:Not Forced  
Weight:None

Mean RF : 112622.1  
RF SD : 5708.703  
RF %RSD : 5.068899

Γκενγκουανίνη Ch2 340nm 50.500 min 0.5 10 20 50

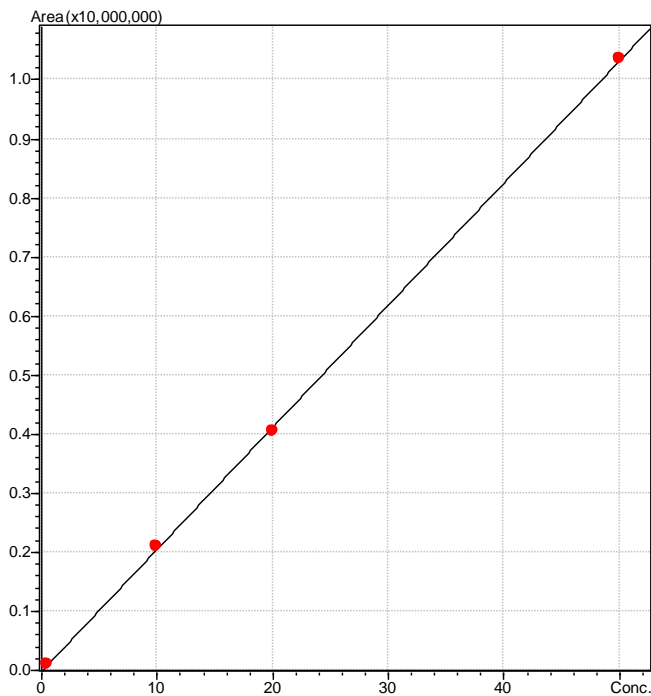


$Y = aX + b$   
 $a = 257184.9$   
 $b = 36083.81$   
 $R^2 = 0.9998637$   
 $R = 0.9999318$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 312867.5  
 RF SD : 101668.0  
 RF %RSD : 32.49555

Εριοδουκυόλη Ch1 285nm 34.118 min 0.5 10 20 50



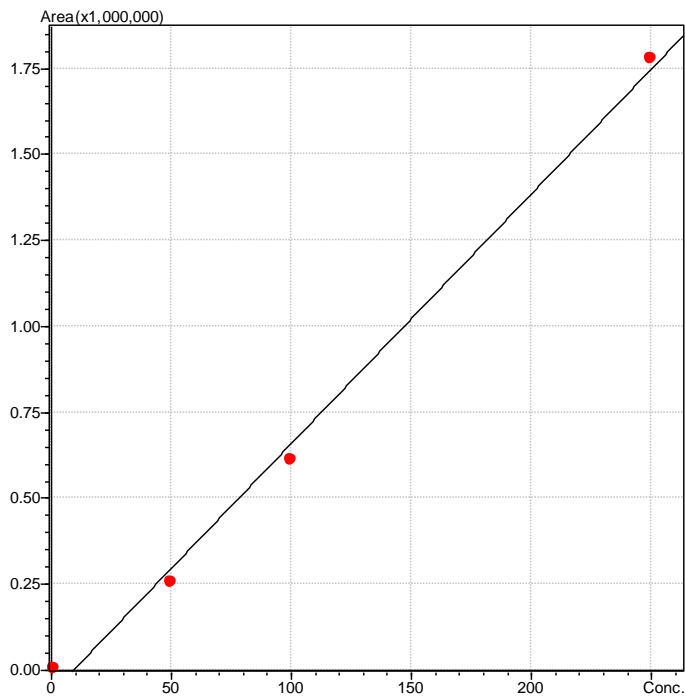
$Y = aX + b$   
 $a = 206783.7$   
 $b = -15463.95$   
 $R^2 = 0.9998810$   
 $R = 0.9999405$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 203549.0  
 RF SD : 8899.318  
 RF %RSD : 4.372076



Καρνοσικό οξύ Ch1 285nm 62.480 min 1 50 100 250

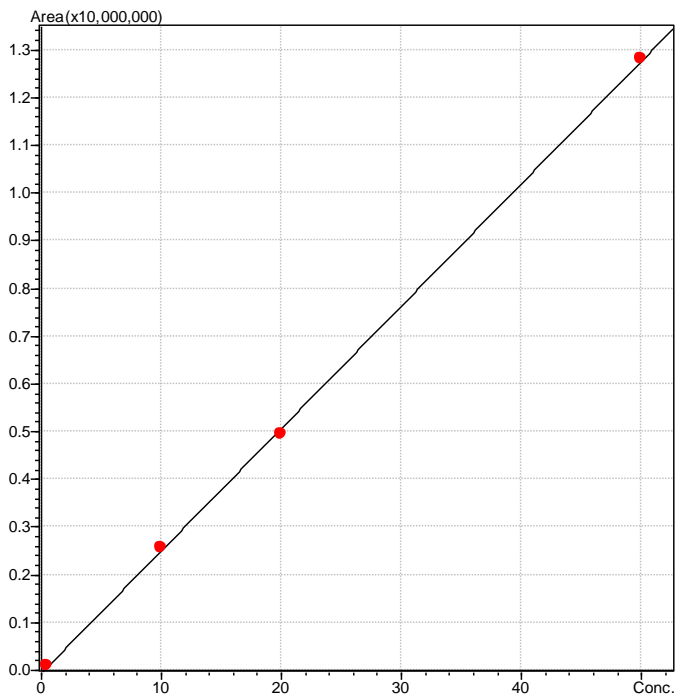


$Y = aX + b$   
 $a = 7261.007$   
 $b = -65802.81$   
 $R^2 = 0.9954080$   
 $R = 0.9977014$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 5562.431  
 RF SD : 1531.025

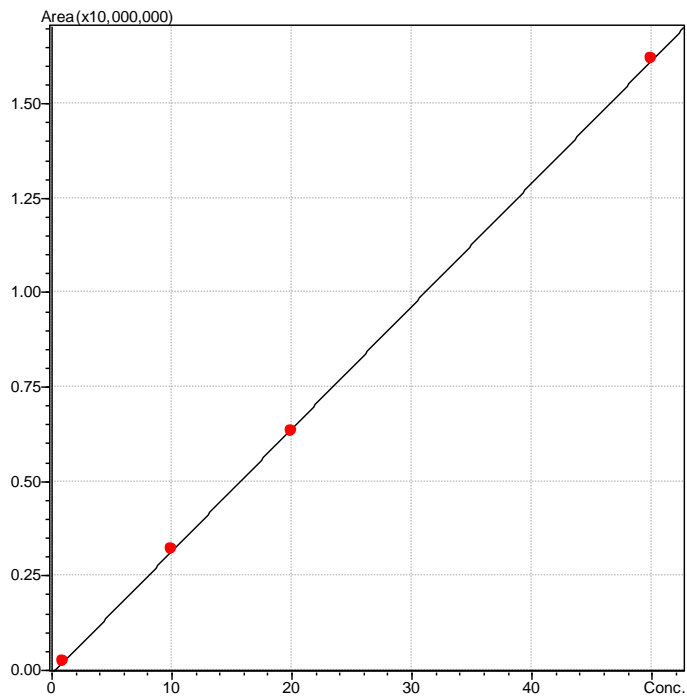
Καφεϊκό οξύ Target Ch2 330nm 20.778 min 0.5 10 20 50



$Y = aX + b$   
 $a = 256464.2$   
 $b = -57504.86$   
 $R^2 = 0.9997986$   
 $R = 0.9998993$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Καεμφερίδη Ch4 370nm 50.042 min 1 10 20 50

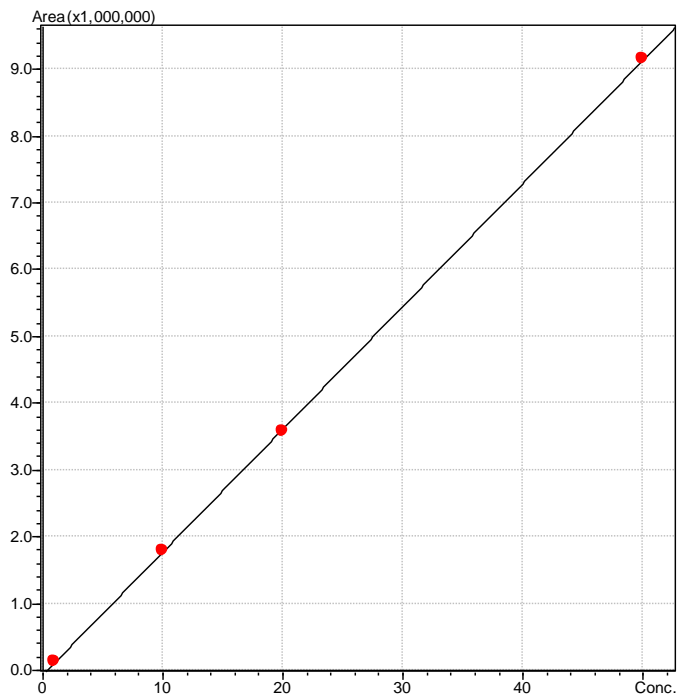


$Y = aX + b$   
 $a = 324997.6$   
 $b = -95373.68$   
 $R^2 = 0.9999389$   
 $R = 0.9999695$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 299229.3  
 RF SD : 38713.70  
 RF %RSD : 12.93780

Καεμφερόλη Ch4 370nm 40.600 min 1 10 20 50

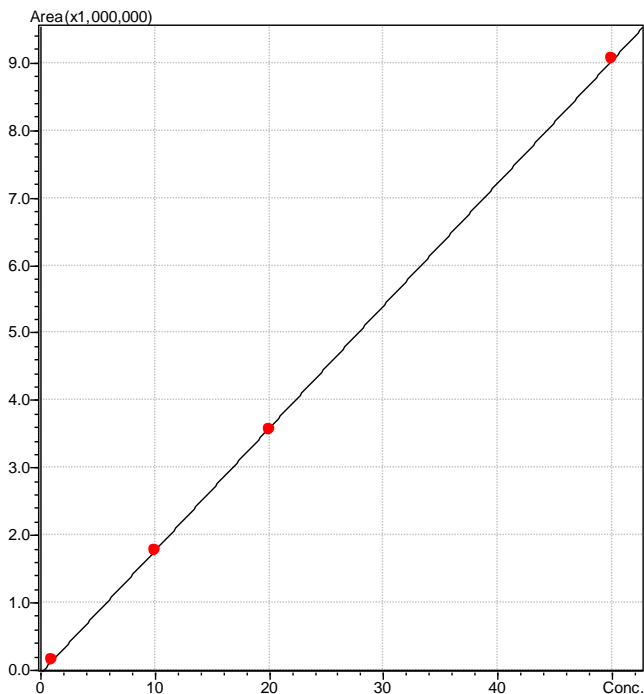


$Y = aX + b$   
 $a = 184013.9$   
 $b = -66054.53$   
 $R^2 = 0.9999585$   
 $R = 0.9999793$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 168543.6  
 RF SD : 21348.15  
 RF %RSD : 12.66625

Λουτεολίνη Ch3 350nm 38.270 min 1 10 20 50

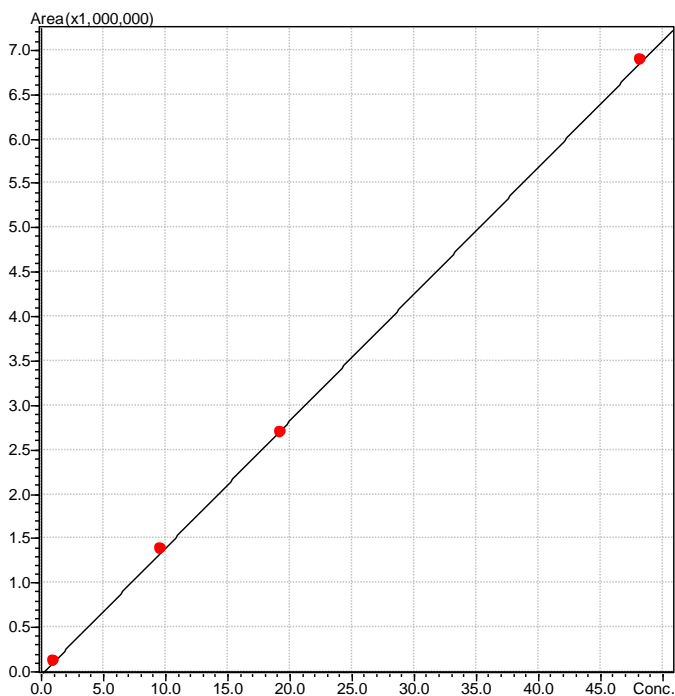


$Y = aX + b$   
 $a = 181631.9$   
 $b = -38326.92$   
 $R^2 = 0.9999807$   
 $R = 0.9999903$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 173787.0  
 RF SD : 9866.046  
 RF %RSD : 5.677091

7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης Ch3 350nm 28.768 min 1 9.66 19.32 48.3

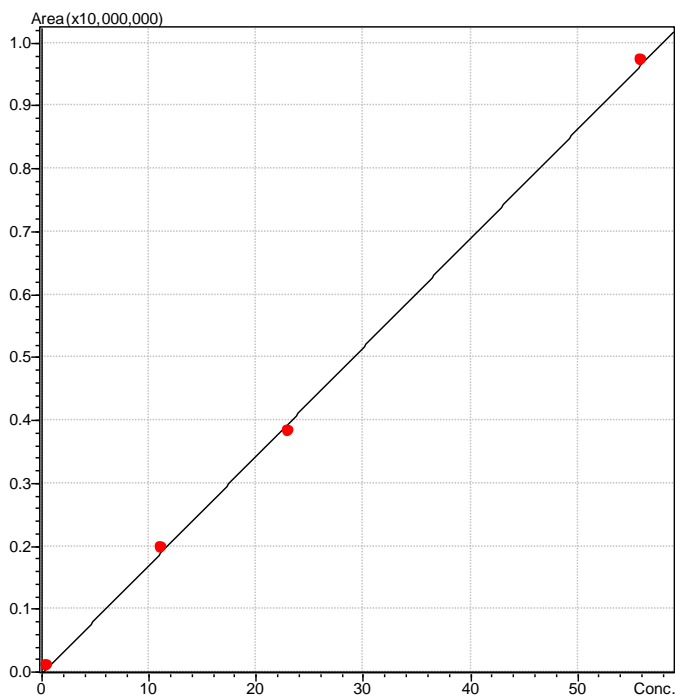


$Y = aX + b$   
 $a = 142835.2$   
 $b = -31409.56$   
 $R^2 = 0.9999159$   
 $R = 0.9999580$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 134404.9  
 RF SD : 13071.95  
 RF %RSD : 9.725797

**Ναριγενίνη** Ch1 285nm 37.721 min 0.5 11.2 23 56

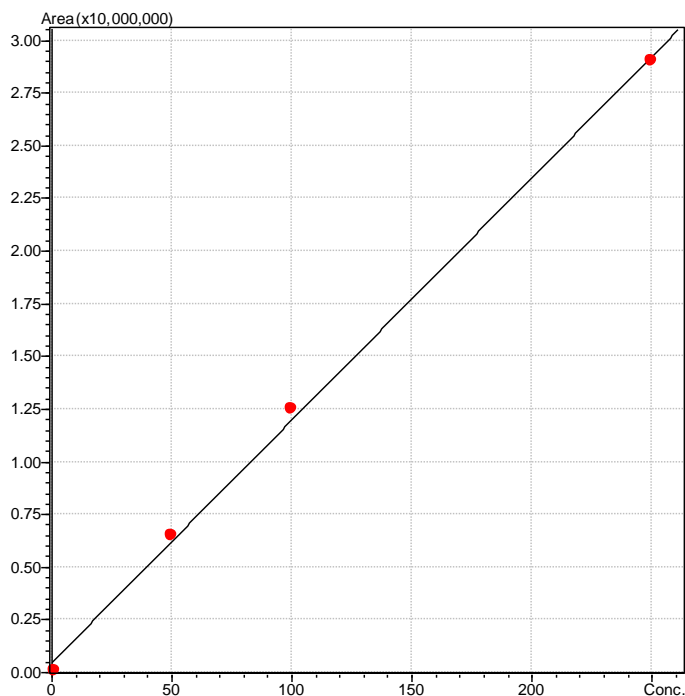


$Y = aX + b$   
 $a = 173133.0$   
 $b = -27847.0$   
 $R^2 = 0.9994682$   
 $R = 0.9997341$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 173608.8  
 RF SD : 7857.928  
 RF %RSD : 4.526228

**Ροσμαρινικό οξύ** Ch2 330nm 31.238 min 1 50 100 250

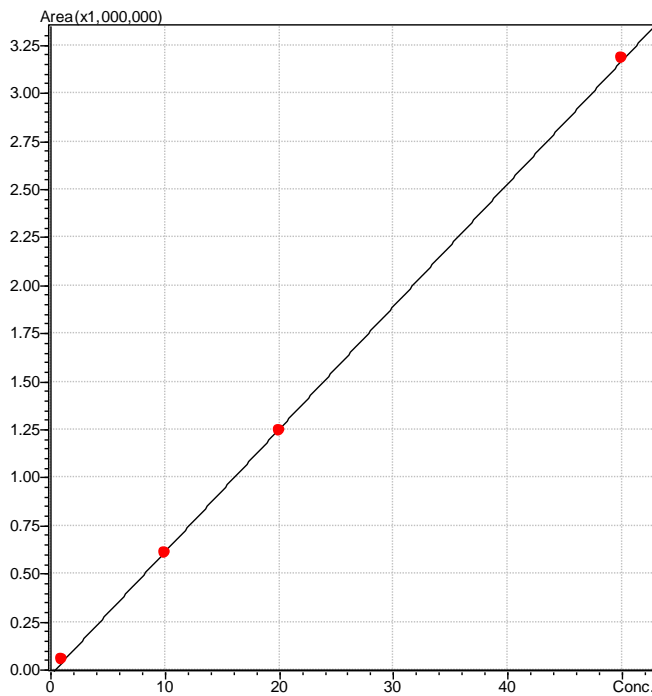


$Y = aX + b$   
 $a = 115082.5$   
 $b = 484428.8$   
 $R^2 = 0.9985234$   
 $R = 0.9992614$

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 112136.6  
 RF SD : 22049.81  
 RF %RSD : 19.66335

Ρουτίνη Ch3 350nm 29.761 min 1 10 20 50

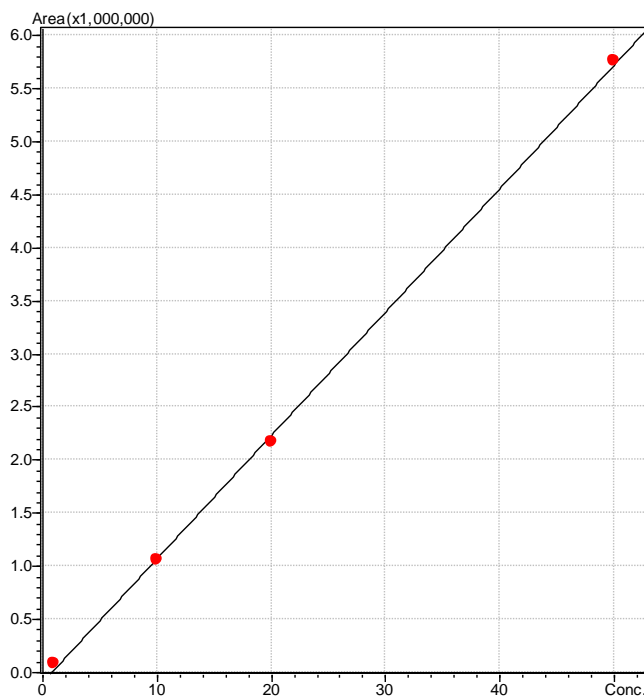


Y = aX + b  
 a = 63887.01  
 b = -23040.16  
 R<sup>2</sup> = 0.9999179  
 R = 0.9999590

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 60315.84  
 RF SD : 3570.500  
 RF %RSD : 5.919671

Χλωρογενικό οξύ Ch1 330nm 16.279 min 1 10 20 50



Y = aX + b  
 a = 116264.4  
 b = -89011.99  
 R<sup>2</sup> = 0.9995048  
 R = 0.9997524

External Standard  
 Curve Fit Type:Linear  
 Origin:Not Forced  
 Weight:None

Mean RF : 103375.9  
 RF SD : 12741.82  
 RF %RSD : 12.32571

**Περιεχόμενα εικόνων****ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>Εικόνα 3.1.</b> Δεντρολίβανο <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	29
<b>Εικόνα 3.2.</b> Δίκταμο <i>Origanum dictamnus</i> L.	31
<b>Εικόνα 3.3.</b> Μελισσόχορτο <i>Melissa officinalis</i> L.	32
<b>Εικόνα 3.4.</b> Κρόκος <i>Crocus sativus</i> L.	33
<b>Εικόνα 3.5.</b> Φασκόμηλο <i>Salvia officinalis</i> L.	35
<b>Εικόνα 3.6.</b> Χαμομήλι <i>Matricaria recutita</i> L.	36

**ΚΕΦΑΛΑΙΟΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

<b>Εικόνα 5.1.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι κυττάρων <i>S. typhimurium</i> (Α), <i>St. aureus</i> (Β), <i>Str. oralis</i> (Γ) και <i>Str. epidermitis</i> (Δ).	230
---	-----

## Περιεχόμενα πινάκων

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 1.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας	22
---	----

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 2.1. Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αφεψημάτων	55
Πίνακας 4.1. Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των οργανικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών	66
Πίνακας 4.2. Πρότυπες ενώσεις που αναλύθηκαν, καθώς και οι αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσης (RT), τα $\lambda_{\max}$ UV-Vis φασμάτων, το κύριο θραύσμα μάζας (m/z) και το μοριακό τους βάρος (MW)	67
Πίνακας 5.1. Εξεταζόμενα στελέχη μικροοργανισμών με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και τις συνθήκες επώασης	72

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πίνακας 1.1. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε mg καφεϊκού οξέος/200 mL.	82
Πίνακας 1.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS εκφρασμένα σε μmol Trolox/200 mL.	89
Πίνακας 1.3. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH <sup>*</sup> εκφρασμένα σε μmol Trolox/200 mL.	90
Πίνακας 1.4. Σύγκριση των μοντέλων βαθμονόμησης που αναπτύχθηκαν σε διάφορες περιοχές του φάσματος για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου	97
Πίνακας 1.5. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη του μοντέλου βαθμονόμησης, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και με το μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τα φάσματα FT-IR.	100
Πίνακας 1.6. Στατιστικά στοιχεία για τα μοντέλα βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR	102
Πίνακας 1.7. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη του μοντέλου βαθμονόμησης, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS και με το μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τα φάσματα FT-IR.	102
Πίνακας 2.1. Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των πτητικών συστατικών που προσδιορίστηκαν μέσω GC-MS στην οργανική φάση του πετρελαϊκού αθέρα των αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών	110
Πίνακας 2.2. Οι έξι χημειότυποι του αιθερίου ελαίου του χαμομηλιού σύμφωνα με τον Schilcher (1987)	115
Πίνακας 2.3. Φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα αφεψήματα μέσω LC-MS.	121
Πίνακας 2.4. Συγκέντρωση ( $\pm$ τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του μελισσόχορτου εκφρασμένη σε $\mu\text{g/g}$ φ.υ.	131

<b>Πίνακας 2.5.</b> Συγκέντρωση ( $\pm$ τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του δίκταμου εκφρασμένη σε $\mu\text{g/g}$ φ.υ.	132
<b>Πίνακας 2.6.</b> Συγκέντρωση ( $\pm$ τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του φασκόμηλου εκφρασμένη σε $\mu\text{g/g}$ φ.υ.	133
<b>Πίνακας 2.7.</b> Συγκέντρωση ( $\pm$ τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του δεντρολίβανου εκφρασμένη σε $\mu\text{g/g}$ φ.υ.	134
<b>Πίνακας 2.8.</b> Συγκέντρωση ( $\pm$ τυπική απόκλιση) των κύριων φαινολικών συστατικών του αφεψήματος του χαμομηλιού εκφρασμένη σε $\mu\text{g/g}$ φ.υ.	135
<b>Πίνακας 3.1.</b> Αποδόσεις εκχυλισμάτων εκφρασμένες σε 5 g και 1 kg φυτικού υλικού	140
<b>Πίνακας 3.2.</b> Ποσοστιαία περιεκτικότητα των πτητικά συστατικών των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα που παραλήφθηκαν με εκχύλιση υποβοηθούμενη σε λουτρό υπερήχων	144
<b>Πίνακας 3.3.</b> Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του δεντρολίβανου	157
<b>Πίνακας 3.4.</b> Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του δίκταμου	158
<b>Πίνακας 3.5.</b> Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του μελισσόχορτου	159
<b>Πίνακας 3.6.</b> Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του φασκόμηλου	160
<b>Πίνακας 3.7.</b> Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του χαμομηλιού	162
<b>Πίνακας 3.8.</b> Ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα του κρόκου	163
<b>Πίνακας 3.9.</b> LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του δεντρολίβανου	168
<b>Πίνακας 3.10.</b> LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του δίκταμου	172
<b>Πίνακας 3.11.</b> LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του μελισσόχορτου	174
<b>Πίνακας 3.12.</b> LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του φασκόμηλου	180
<b>Πίνακας 3.13.</b> LC-DAD-MS δεδομένα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του χαμομηλιού	188
<b>Πίνακας 3.14.</b> LC-DAD-MS δεδομένα των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στο αιθερικό (DE) και μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα του κρόκου	192
<b>Πίνακας 3.15.</b> Πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων και εύρος συγκεντρώσεων	195
<b>Πίνακας 3.16.</b> Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του δεντρολίβανου	196
<b>Πίνακας 3.17.</b> Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του δεντρολίβανου	197
<b>Πίνακας 3.18.</b> Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του δίκταμου	199
<b>Πίνακας 3.19.</b> Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του δίκταμου	200
<b>Πίνακας 3.20.</b> Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του μελισσόχορτου	201
<b>Πίνακας 3.21.</b> Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του μελισσόχορτου	201
<b>Πίνακας 3.22.</b> Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του φασκόμηλου	202



<b>Πίνακας 3.23.</b> Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του φασκόμηλου	204
<b>Πίνακας 3.24.</b> Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του χαμομηλιού	205
<b>Πίνακας 3.25.</b> Ποσοτική ανάλυση του DE εκχυλίσματος του χαμομηλιού	206
<b>Πίνακας 3.26.</b> Ποσοτική ανάλυση του MeOH εκχυλίσματος του κρόκου	207
<b>Πίνακας 4.1.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων	211
<b>Πίνακας 4.2.</b> Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων	216
<b>Πίνακας 4.3.</b> Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων	217
<b>Πίνακας 5.1.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι παθογόνων της στοματικής κοιλότητας	229
<b>Πίνακας 5.2.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι παθογόνων της στοματικής κοιλότητας	231
<b>Πίνακας 5.3.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι <i>Gram</i> <sup>+</sup> βακτηρίων των γενών <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> και <i>Listeria</i>	235
<b>Πίνακας 5.4.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι <i>Gram</i> <sup>+</sup> βακτηρίων των γενών <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> και <i>Listeria</i>	237
<b>Πίνακας 5.5.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι <i>Gram</i> <sup>+</sup> βακτηρίων των γενών <i>Streptococcus</i> και <i>Staphylococcus</i>	240
<b>Πίνακας 5.6.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι <i>Gram</i> <sup>+</sup> βακτηρίων των γενών <i>Streptococcus</i> και <i>Staphylococcus</i>	241
<b>Πίνακας 5.7.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της μεθανόλης (MeOH) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι έναντι <i>Gram</i> <sup>-</sup> παθογόνων τροφίμων	243
<b>Πίνακας 5.8.</b> Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (PE) και διαιθυλαιθέρα (DE) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι <i>Gram</i> <sup>-</sup> παθογόνων τροφίμων	244

## Περιεχόμενα σχημάτων

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σχήμα 1.1. Συσχέτιση πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού	5
Σχήμα 1.2. Δομές απλών φαινολών και φαινολικών οξέων	7
Σχήμα 1.3. Δομές φαινυλοπροπανοειδών	7
Σχήμα 1.4. Βασικός σκελετός флаβονοειδών	8
Σχήμα 1.5. Δομές флаβονοειδών	9
Σχήμα 1.6. Γαλλικό οξύ	10
Σχήμα 1.7. Ισοπρένιο	11
Σχήμα 1.8. Άκυκλα μονοτερπένια	11
Σχήμα 1.9. Μονοκυκλικά μονοτερπένια	12
Σχήμα 1.10. Δικυκλικά μονοτερπένια	12
Σχήμα 1.11. Σεσκιτερπένια	13
Σχήμα 1.12. Διτερπένια	14
Σχήμα 1.13. Καροτενοειδή	14
Σχήμα 1.14. Δομές κροκινών	15
Σχήμα 2.1. Κύρια δομικά χαρακτηριστικά флаβονοειδών για αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών	24

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σχήμα 1.1. Πειραματική διαδικασία παραλαβής υδατικών εκχυλισμάτων	45
Σχήμα 1.2. Μηχανισμός δράσης DPPH <sup>•</sup>	48
Σχήμα 1.3. Δομή TROLOX	50
Σχήμα 1.4. Μηχανισμός δράσης ABTS	50
Σχήμα 1.5. Εξάρτημα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης	52
Σχήμα 3.1. Πειραματική διαδικασία παραλαβής οργανικών εκχυλισμάτων	59
Σχήμα 5.1. Πειραματική διαδικασία της μεθόδου διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA)	74
Σχήμα 5.2. Πειραματική διαδικασία της μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR	76

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

<b>Σχήμα 1.1.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο αφεψημάτων	82
<b>Σχήμα 1.2.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	83
<b>Σχήμα 1.3.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων	84
<b>Σχήμα 1.4.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών	85
<b>Σχήμα 1.5.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων που προήρθαν μετά από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών	85
<b>Σχήμα 1.6.</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο αφεψημάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85 °C, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών	86
<b>Σχήμα 1.7.</b> Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) αφεψημάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85 °C	90
<b>Σχήμα 1.8.</b> Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) αφεψημάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85 °C, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών	91
<b>Σχήμα 1.9.</b> Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων	92
<b>Σχήμα 1.10.</b> Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών	92
<b>Σχήμα 1.11.</b> Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	93
<b>Σχήμα 1.12.</b> Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS (●) και DPPH (●) εκχυλισμάτων που προήρθαν από εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετά την εκχύλιση των πτητικών συστατικών	93
<b>Σχήμα 1.13.</b> Αντιπροσωπευτικά φάσματα FT-IR στην περιοχή 2000-400 cm <sup>-1</sup> λυοφιλιωμένων αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων α) αφεψήματος χαμομηλιού, β) αφεψήματος δίκταμου, γ) αφεψήματος μελισσόχορτου, δ) κρύου εκχυλίσματος μελισσόχορτου ε) αφεψήματος δεντρολίβανου και στ) αφεψήματος φασκόμηλου	96
<b>Σχήμα 1.14.</b> Μοντέλο βαθμονόμησης και πρόβλεψης με χρήση πολυμεταβλητής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για τα ολικά φαινολικά συστατικά εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/g φ.υ.	99
<b>Σχήμα 1.15.</b> Μοντέλο βαθμονόμησης και πρόβλεψης με χρήση πολυμεταβλητής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για τη μέθοδο ABTS (A) και τη μέθοδο DPPH (B)	103
<b>Σχήμα 2.1.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη	106

<b>Σχήμα 2.2.</b> Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του μελισσόχορτου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα	106
<b>Σχήμα 2.3.</b> Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του δεντρολίβανου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα	108
<b>Σχήμα 2.4.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη	108
<b>Σχήμα 2.5.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του δίκταμου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη	109
<b>Σχήμα 2.6.</b> Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του δίκταμου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα	109
<b>Σχήμα 2.7.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του φασκόμηλου, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη	112
<b>Σχήμα 2.8.</b> Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του φασκόμηλου, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα	112
<b>Σχήμα 2.9.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο αφέψημα και στα υδατικά εκχυλίσματα του χαμομηλιού, μετά την εκχύλιση αυτών με οργανικό διαλύτη	113
<b>Σχήμα 2.10.</b> Χρωματογράφημα οργανικής φάσης του αφεψήματος του χαμομηλιού, μετά την εκχύλιση αυτού με πετρελαϊκό αιθέρα	114
<b>Σχήμα 2.11.</b> Ροσμαρινικό Οξύ	117
<b>Σχήμα 2.12.</b> Χρωματογράφημα αφεψήματος μελισσόχορτου ( $\lambda=330$ nm).	118
<b>Σχήμα 2.13.</b> Δομές προτύπων ενώσεων	119
<b>Σχήμα 2.14.</b> Χρωματογράφημα αφεψήματος δεντρολίβανου ( $\lambda=330$ nm).	120
<b>Σχήμα 2.15.</b> Α) σαλβιανολικό οξύ Β Β) λιθοσπερμικό οξύ	124
<b>Σχήμα 2.16.</b> Χρωματογράφημα αφεψήματος δίκταμου ( $\lambda=330$ nm).	125
<b>Σχήμα 2.17.</b> Α) 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης Β) 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	125
<b>Σχήμα 2.18.</b> Χρωματογράφημα αφεψήματος φασκόμηλου ( $\lambda=330$ nm).	127
<b>Σχήμα 2.19.</b> Χρωματογράφημα αφεψήματος χαμομηλιού ( $\lambda=330$ nm).	129
<b>Σχήμα 3.1.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο ΡΕ εκχύλισμα του δεντρολίβανου	148
<b>Σχήμα 3.2.</b> Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (ΡΕ) του δίκταμου.	149
<b>Σχήμα 3.3.</b> Οι ουσίες που ανευρέθηκαν στο ΡΕ εκχύλισμα του μελισσόχορτου κατά φθίνουσα σειρά ποσοστιαίας περιεκτικότητας	150
<b>Σχήμα 3.4.</b> Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (ΡΕ) του φασκόμηλου.	152
<b>Σχήμα 3.5.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο ΡΕ εκχύλισμα του φασκόμηλου	152
<b>Σχήμα 3.6.</b> Οι ουσίες που ανευρέθηκαν στο ΡΕ εκχύλισμα του χαμομηλιού κατά σειρά έκλουσης	154
<b>Σχήμα 3.7.</b> Χρωματογράφημα εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (ΡΕ) του κρόκου.	156
<b>Σχήμα 3.8.</b> Κύριες ουσίες που ανευρέθηκαν στο ΡΕ εκχύλισμα του κρόκου.	156
<b>Σχήμα 3.9.</b> Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) δεντρολίβανου ( $\lambda=330$ nm).	165

<b>Σχήμα 3.10.</b> Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) δεντρολίβανου ( $\lambda=330$ nm).	165
<b>Σχήμα 3.11.</b> Δομές ροσμαρινικού οξέος, λιθοσπερμικού οξέος και σαλβιαλονικών οξέων	167
<b>Σχήμα 3.12.</b> Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) δίκταμου ( $\lambda=330$ nm).	171
<b>Σχήμα 3.13.</b> Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) δίκταμου ( $\lambda=330$ nm).	171
<b>Σχήμα 3.14.</b> Δομές φλαβονοειδών	176
<b>Σχήμα 3.15.</b> Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) μελισσόχορτου ( $\lambda=330$ nm).	177
<b>Σχήμα 3.16.</b> Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) μελισσόχορτου ( $\lambda=330$ nm).	177
<b>Σχήμα 3.17.</b> Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) φασκόμηλου ( $\lambda=330$ nm).	179
<b>Σχήμα 3.18.</b> Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) φασκόμηλου ( $\lambda=330$ nm).	179
<b>Σχήμα 3.19.</b> Δομές τερπενικών παραγώγων	184
<b>Σχήμα 3.20.</b> Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) χαμομηλιού ( $\lambda=330$ nm).	186
<b>Σχήμα 3.21.</b> Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) χαμομηλιού ( $\lambda=330$ nm).	186
<b>Σχήμα 3.22.</b> Δομές παραγώγων φερουλικού οξέος	186
<b>Σχήμα 3.23.</b> Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) κρόκου ( $\lambda=440$ nm) και ( $\lambda=330$ nm)	190
<b>Σχήμα 3.24.</b> Δομές κροκινών	193
<b>Σχήμα 3.25.</b> Γλυκοζίτες της καεμφερόλης A) διγλυκοζίτης με σοφορόζη στη θέση3 και B) τριγλυκοζίτης με σοφορόζη στη θέση 3 και γλυκόζη στη θέση 7	194
<b>Σχήμα 3.26.</b> Χρωματογράφημα αιθερικού εκχυλίσματος (DE) κρόκου ( $\lambda=250$ nm).	194
<b>Σχήμα 5.2.</b> Επιβίωση του στελέχους <i>Str. mutans</i> LMG 14558 <sup>T</sup> κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων.	247
<b>Σχήμα 5.3.</b> Επιβίωση του στελέχους <i>Str. oralis</i> LMG 14532 <sup>T</sup> κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων.	248
<b>Σχήμα 5.3.</b> Επιβίωση του στελέχους <i>Str. sobrinus</i> LMG 14641 <sup>T</sup> κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων.	249
<b>Σχήμα 5.4.</b> Επιβίωση των στελεχών <i>E. coli</i> C1845 (A) και <i>S. typhimurium</i> SL1344 (B) κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης επιλεγμένων υπερκειμένων μετά από 24 h επώαση	251
<b>Σχήμα 5.5.</b> Επιβίωση των στελεχών <i>E. coli</i> C1845 (A) και <i>S. typhimurium</i> SL1344 (B) κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης του DEεκχυλίσματος του κρόκου μετά από 2 h επώαση	252
<b>Σχήμα 5.6.</b> Επιβίωση των στελεχών <i>E. coli</i> C1845 (A) και <i>S. typhimurium</i> SL1344 (B) κατά τη μέθοδο ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης του DEεκχυλίσματος του μελισσόχορτου μετά από 6 h επώαση	253
<b>Σχήμα 5.7.</b> Φάσματα FT-IR ( $400-900$ $\text{cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του <i>Str. mutans</i> LMG 14558 <sup>T</sup> (A), <i>Str. oralis</i> LMG 14532 <sup>T</sup> (B) και <i>Str.sobrinus</i> LMG 14641 <sup>T</sup> (Γ) μετά από 6 h επώαση για τα δυο πρώτα και 4 h για το τρίτο με μαθανόλη (7%).	256
	257

- Σχήμα 5.8.** Φάσματα FT-IR (400-900  $\text{cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *E.coli* C1845 (A) και *S.typhimurium* SL1344 μετά από 0.5 h επώαση με μεθανόλη (10%).
- Σχήμα 5.9.** Φάσματα FT-IR (400-900  $\text{cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *Str. oralis* LMG 14532<sup>T</sup> μετά από 6 h επώαση με μεθανόλη (7%) (A), με μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου 28 mg/mL (B) και με μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου 28 mg/mL (Γ). 260
- Σχήμα 5.10.** Φάσματα FT-IR (400-900  $\text{cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *Str.sobrinus* LMG 14641<sup>T</sup> μετά από 4 h επώαση με μεθανόλη (7%) (A), με μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου 28 mg/mL (B) και με μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου 28 mg/mL (Γ). 261
- Σχήμα 5.11.** Φάσματα FT-IR (400-900  $\text{cm}^{-1}$ ) των κυττάρων του *S.typhimurium* SL1344 μετά από 0.5 h επώαση με μεθανόλη (10%) (A) και με αιθερικό εκχύλισμα κρόκου 5 mg/mL (B). 262
- Σχήμα 5.12.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *Str. mutans* LMG 14558 ύστερα από επώασή τους για 6 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (7%) (●), 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (●) και 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (▲). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή. 264
- Σχήμα 5.13.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *Str. oralis* LMG 14532 ύστερα από επώασή τους για 6 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (7%) (●), 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (●) και 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (▲). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή. 266
- Σχήμα 5.14.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *Str. sobrinus* LMG 14641 ύστερα από επώασή τους για 4 h. (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (7%) (●), 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου (●) και 28 mg/mL μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (▲). (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή. 266
- Σχήμα 5.15.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *E. coli* C1845 ύστερα από επώασή τους για 1 h (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (10%) (●) και 5 mg/mL αιθερικό εκχύλισμα κρόκου (●). (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος FT-IR (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή. 270
- Σχήμα 5.16.** Ανάλυση PCA των τεσσάρων περιοχών (I, II, III, IV) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του στελέχους *S. typhimurium* SL1344 ύστερα από επώασή τους για 0.5 h (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος, με μεθανόλη (10%) (●) και 5 mg/mL αιθερικό εκχύλισμα κρόκου (●). (A) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κυρίων συνιστωσών για κάθε μια από τις τεσσάρες περιοχές του φάσματος FT-IR (B) Διάγραμμα φορτίου για τις τρεις πρώτες συνιστώσες σε κάθε περιοχή. 271