



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ 'ΜΕΛΕΤΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ'

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Προσδιορισμός συστατικών και βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών”

Γεωργία Σ. Σκούμπη



Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσιού

ΑΘΗΝΑ, 2014



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ 'ΜΕΛΕΤΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ'

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Προσδιορισμός συστατικών και βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών”

Γεωργία Σ. Σκούμπη

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσίου

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*“Προσδιορισμός συστατικών και βιολογικής δράσης
εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών”*

Γεωργία Σ. Σκούμπη

Επιβλέπων: Καθηγητής Μόσχος Πολυσίου

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου & στον Δημήτρη

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με τίτλο: 'Θετικές επιστήμες στη Γεωπονία', στον κλάδο 'Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων' κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014. Το εργαστηριακό-χημικό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και το μικροβιολογικό κομμάτι της μελέτης στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά, τον Καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου Χημείας, κ. Μόσχο Πολυσιού, επιβλέπων της μεταπτυχιακής μου μελέτης, για την εμπιστοσύνη που έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα και για την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Ακόμη, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Πέτρο Ταραντίλη και τον Επίκουρο Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Χρήστο Παππά για τη διόρθωση και βαθμολόγηση της παρούσας μελέτης.

Εκ βάθους καρδιάς ευχαριστώ την κ. Ειρήνη Αναστασάκη, διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που με τόση υπομονή και καλή διάθεση με δίδαξε πώς εφαρμόζεται η Χημεία στην πράξη. Την ευχαριστώ για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού μέρους της μελέτης όσο και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και των διορθώσεων. Η υποστήριξή της, ακαδημαϊκή και ηθική, σε όλο το διάστημα εκπόνησης της μελέτης ήταν πολύτιμη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω σε όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος που μας μετέδωσαν τις γνώσεις τους και μας βοήθησαν να εμβαθύνουμε σε θέματα που αφορούν την επιστήμη που επιλέξαμε, όπως και στο προσωπικό του εργαστηρίου Χημείας.

Σημαντική ήταν η βοήθεια της κ. Νάντια Αστρακά, μέλος Ε.Τ.Ε.Π., όσον αφορά τις αναλύσεις LC-DAD, την οποία και ευχαριστώ θερμά.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Έφη Τσακαλίδου, Διευθύντρια του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας για τη φιλοξενία στον χώρο του εργαστηρίου, όπως και την Δρ. Γεωργία Ζουμποπούλου για την ουσιαστική καθοδήγηση και βοήθειά της κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων βιολογικής δράσης, όπως και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας.

Δεν μπορώ να παραλείψω από τις ευχαριστίες τους συμφοιτητές μου, ιδιαίτερα για τις στιγμές γέλιου που περάσαμε.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου που πάντα με στηρίζουν και με βοηθούν σε όλα, την αδερφή μου που χάρη στην προτροπή της έδωσα εξετάσεις στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Ευχαριστώ πολύ την Ιωάννα Μαρκοπούλου, καρδιακή φίλη, για την ενίσχυση που μου προσέφερε και την κ. Ειρήνη Νικολιδάκη, υποψήφια διδάκτωρ του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου για την κατανόηση που έδειξε σχετικά με τις προθεσμίες που υπήρχαν για την παράδοση της συγκεκριμένης μελέτης. Τέλος, ένα ευχαριστώ στον Δημήτρη, που όλη τη χρονιά μου συμπαραστάθηκε, με ενέπνευσε, με ενθάρρυνε και κατανόησε σε δύσκολες στιγμές.

Αθήνα, Οκτώβριος 2014

Γεωργία Σ. Σκούμπη

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη οργανικού εκχυλίσματος από αρωματικά φυτά και συγκεκριμένα, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων συστατικών τους και η εκτίμηση της βιολογικής τους δράσης έναντι μικροοργανισμών του στόματος. Μελετήθηκαν τα φυτά: κρίκος (*Crocus sativus* L.), μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.) και χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.).

Για την παραλαβή του μεθανολικού εκχυλίσματος ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: πραγματοποιήθηκε διαδοχική εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (35 KHz), με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας κατά σειρά: πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας. Ακολούθως το φυτικό υλικό εκχυλίστηκε με μεθανόλη υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δεκαέξι περίπου ώρες και η μεθανόλη εξατμίστηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού. Στα εκχυλίσματα της μεθανόλης προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (εκφρασμένο σε καφεϊκό οξύ) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και η αντιοξειδωτική δράση με τις μεθόδους ABTS^{•+} και DPPH[•]. Στη συνέχεια έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των κύριων συστατικών των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων (LC/DAD).

Το εκχύλισμα του κρίκου ήταν πλούσιο σε κροκίνες και συγκεκριμένα κυριάρχησαν οι *trans*-4-GG και η *trans*-3-Gg, στο εκχύλισμα του μελισσόχορτου επιράτησε το ροσμαρινικό οξύ και στο χαμομήλι ο γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Από άποψη φαινολικού περιεχομένου, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά είχε το μελισσόχορτο με 59,00 mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού, ακολούθησε το χαμομήλι με 37,74 mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού και τέλος ο κρίκος με 23,66 καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, με τη μέθοδο DPPH[•], τα εκχυλίσματα έλαβαν την εξής κατάταξη αυξανόμενης αντιοξειδωτικής δράσης: κρίκος με τιμή IC₅₀ 859,1 μg/mL, χαμομήλι με τιμή IC₅₀ 52,7 μg/mL, μελισσόχορτο με τιμή IC₅₀ 9,6 μg/mL. Με τη μέθοδο ABTS^{•+} ισχύει η ακόλουθη κατάταξη αυξανόμενης αντιοξειδωτικής δράσης: κρίκος με τιμή TEAC 0,069 mmol Trolox/g εκχυλίσματος, χαμομήλι με τιμή TEAC 0,544 mmol Trolox/g εκχυλίσματος και μελισσόχορτο με τιμή TEAC 2,407 mmol Trolox/g εκχυλίσματος. Μετά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των παραπάνω μεθόδων διαπιστώθηκε συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων.

Για την εκτίμηση *in vitro* της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων έναντι των *Streptococcus mutans* LMG 14558^T και *Streptococcus sobrinus* LMG14641^T χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες, μεθανόλη-H₂O και αιθανόλη-H₂O σε αναλογία 70:30. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA) με διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων για μια πρώτη εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης τους. Επίσης, επειδή οι *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* εμπλέκονται σε παθογένειες της στοματικής κοιλότητας σχηματίζοντας

βιοϋμένιο, προσδιορίστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν τον σχηματισμό του βιοϋμενίου και να αποικοδομούν το ήδη σχηματισμένο βιοϋμένιο.

Σχετικά με την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο WDA διαπιστώθηκε ικανοποιητική δράση των υδρομεθανολικών και υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus*. Αναφορικά με τη μελέτη παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμενίου, στην περίπτωση του *Streptococcus mutans*, και τα τρία υδρομεθανολικά εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή δράση με αυτό του κρόκου να υπερισχύει ελάχιστα έναντι των εκχυλισμάτων των άλλων φυτών (90,69% παρεμπόδιση). Αντίστοιχα, και τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα επέδειξαν αξιοσημείωτη δράση με το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου να κυριαρχεί ελαφρώς έναντι των εκχυλισμάτων των άλλων φυτών (89,29% παρεμπόδιση). Έναντι του *Streptococcus sobrinus* ισχυρή δράση παρουσίασαν τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, με μικρή διαφορά μεταξύ τους (82,11% και 82,14% παρεμπόδιση αντίστοιχα). Όσον αφορά τη μελέτη αποικοδόμησης του ήδη σχηματισμένου βιοϋμενίου στις δύο ώρες όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν μικρότερη δράση από ότι στη μελέτη παρεμπόδισης του σχηματισμένου βιοϋμενίου. Ακόμη, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν οριακή δράση με αυτό του κρόκου να εμφανίζει ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα (27,76% αποικοδόμηση για τον *Streptococcus mutans* και 26,18% αποικοδόμηση για τον *Streptococcus sobrinus*). Στη μελέτη παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμενίου και αποικοδόμησης του, πιο ανθεκτικός εμφανίστηκε ο *Streptococcus sobrinus*. Γενικά, ισχυρότερη δράση εμφάνισαν τα εκχυλίσματα του κρόκου, κάτι που δεν συνδέεται με την αντιοξειδωτική τους δράση.

Επιστημονικό πεδίο: Χημεία, Γεωπονικές επιστήμες

Λέξεις -Κλειδιά: Αντιοξειδωτική δράση; Αντιμικροβιακή δράση; Folin; DPPH; ABTS; *Crocus sativus* L., *Melissa officinalis* L., *Matricaria recutita* L., *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*

Abstract

'Determination of components and biological activity of aromatic plant extracts'

The aim of this thesis was to study organic extracts from aromatic plants, particularly the quantitative and qualitative determination of the major components and evaluation of their potential antioxidant and biological activity against microorganisms found in the oral cavity. The selected plants were saffron (*Crocus sativus* L.), lemon balm (*Melissa officianalis* L.), and chamomile (*Matricaria recutita* L.).

The procedure in order to obtain the methanolic extract is based on the following steps: the plants were subjected to sequential ultrasound assisted extraction (35 KHz) with solvents of different polarity in the following order: petroleum ether, hexane and diethyl ether. Afterwards, the samples were subjected to extraction by using magnetic stirring and methanol as a solvent, at room temperature, for about 16 hours. Once extraction was finished, the solvent was removed using a rotary vacuum evaporator until dryness. The content of total phenolic compounds in methanolic extracts was determined by Folin–Ciocalteu method (in terms of caffeic acid), while the antioxidant activity was estimated with ABTS^{•+} and DPPH[•] assay. LC-DAD (Liquid chromatograph equipped with a diode array detector) analysis was carried out in order to determine the quality and quantity of the major components.

The results indicate that the *Crocus sativus* L. methanolic extract was rich in crocins, especially *trans*-4-GG and *cis*-4-GG, in *Melissa officianalis* L. methanolic extract rosmarinic acid was prevalent, and in *Matricaria recutita* L. methanolic extract the major constituents were ferulic acid glucoside and apigenin 7-O-glucoside. Concerning the total phenolic content, the *Melissa officianalis* L. methanolic extract was the richest extract in phenolic components (59,00 mg caffeic acid/g dry plant), second in phenolic content was the *Matricaria recutita* L. methanolic extract (37,74 mg caffeic acid/g dry plant) and last the *Crocus sativus* L. methanolic extract (23,66 mg caffeic acid/g dry plant). With respect to the total antioxidant capacity, (DPPH[•] assay) the ranking in increasing order was: saffron methanolic extract (IC₅₀=859,1 µg/mL), chamomile methanolic extract (IC₅₀=52,7 µg/mL) and lemon balm methanolic extract (IC₅₀=9,6 µg/mL). For the ABTS^{•+} assay the ranking in increasing order was as follows: saffron extract (TEAC=0,069 mmol Trolox/g extract), chamomile extract (TEAC=0,544 mmol Trolox/g extract) and lemon balm (TEAC= 2,407 mmol Trolox/g extract). The comparison between the results proved that there is a positive correlation between total phenolic content and antioxidant capacity of the extracts.

In order to determine the *in vitro* antimicrobial activity of the extracts against *Streptococcus mutans* LMG 14558^T and *Streptococcus sobrinus* LMG14641^T, two solvents were used, water- methanol and water- ethanol in 70:30 proportion. Well diffusion assay (WDA) was used as a first antimicrobial screening and extracts in various concentrations were tested against the bacterial strains. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to the pellicle on the tooth surface forming a dental biofilm and thus they are connected with the etiology and pathogenesis of human dental caries.

The aqueous methanol and aqueous ethanol extracts have been investigated for their potential to inhibit the formation of the biofilm and destruct the biofilm that has been already formed by the bacteria.

Regarding the well diffusion assay, all the aqueous methanol and aqueous ethanol extracts showed activity against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. All three aqueous methanolic extracts showed great inhibitory activity against *Streptococcus mutans* (saffron methanolic extract was able to inhibit 90.69% the formation of biofilm). The aqueous ethanol extracts were active too and lemon balm aqueous ethanol extract was slightly more active than the rest of the extracts, showing a biofilm inhibition of 89.29%. Aqueous methanol and aqueous ethanol extracts from *Melissa officinalis* L. were effective against *Streptococcus sobrinus* (82.11% and 82.14% inhibition respectively). Concerning the determination of the destruction that extracts caused to the developed biofilm in two hours, all the extracts showed low activity (saffron extracts yielded the best results for both bacteria, 27.76% destruction for *Streptococcus mutans* and 26.18% destruction for *Streptococcus sobrinus*). Generally, the percentage of inhibition surpassed the percentage of destruction and saffron extract showed the greatest activity, even though this fact is not in a positive correlation with its antioxidant activity. In both assays, *Streptococcus sobrinus* was more resistant than *Streptococcus mutans*.

Discipline: Chemistry, Agricultural Sciences

Keywords: Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Folin; DPPH; ABTS; *Crocus sativus* L., *Melissa officinalis* L., *Matricaria recutita* L., *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Ευχαριστίες | i |
| Περίληψη | ii |
| Περιεχόμενα | vi |
| 1 Εισαγωγή..... | 1 |
| 1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες | 1 |
| 1.1.1 Εισαγωγή | 1 |
| 1.1.2 Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά | 2 |
| 1.1.3 Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στον ανθρώπινο οργανισμό | 4 |
| 1.1.4 Ταξινόμηση δευτερογενών μεταβολιτών | 6 |
| 1.1.5 Φαινολικές ενώσεις | 6 |
| 1.2 Μελέτη κυριότερων συστατικών με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography- LC-DAD)..... | 16 |
| 1.3 Αντιοξειδωτική δράση..... | 17 |
| 1.3.1 Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες | 17 |
| 1.3.2 Αντιοξειδωτικά | 18 |
| 1.3.3 Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού περιεχομένου | 22 |
| 1.4 Αντιμικροβιακή δράση..... | 25 |
| 1.4.1 Γενικά..... | 25 |
| 1.4.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες και αντιμικροβιακή δράση | 26 |
| 1.4.3 Αντιμικροβιακή δράση δευτερογενών μεταβολιτών έναντι μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας..... | 27 |
| 1.5 Περιγραφή των φυτών | 34 |
| 1.5.1 Κρόκος (<i>Crocus sativus</i> L.)- Οικογένεια Iridaceae | 34 |
| 1.5.2 Μελισσόχορτο (<i>Melissa officinalis</i> L.)-Οικογένεια Lamiaceae | 36 |
| 1.5.3 Χαμομήλι (<i>Matricaria recutita</i> L.)-Οικογένεια Asteraceae | 38 |
| 2 Υλικά & Μέθοδοι..... | 41 |
| 2.1 Φυτικό υλικό | 41 |
| 2.2 Προετοιμασία δειγμάτων | 41 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 2.2.1 | Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους –USAE | 42 |
| 2.2.2 | Εκχύλιση υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος..... | 43 |
| 2.3 | Μελέτη των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD) | 44 |
| 2.3.1 | Ποιοτικός προσδιορισμός..... | 44 |
| 2.3.2 | Ποσοτικός προσδιορισμός..... | 45 |
| 2.4 | Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu | 47 |
| 2.5 | Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH•..... | 48 |
| 2.6 | Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος)- ABTS | 49 |
| 2.7 | Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων έναντι μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας..... | 50 |
| 2.7.1 | Προετοιμασία δειγμάτων και μικροοργανισμοί..... | 51 |
| 2.7.2 | Μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA) ... | 52 |
| 2.7.3 | Μελέτη αναστολής σχηματισμού του βιοϋμενίου..... | 53 |
| 2.7.4 | Μελέτη αποικοδόμησης σχηματισμένου βιοϋμενίου..... | 54 |
| 3 | Αποτελέσματα-Συζήτηση | 56 |
| 3.1 | Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD). | 56 |
| 3.1.1 | Ποιοτικός προσδιορισμός..... | 56 |
| 3.1.2 | Ποσοτικός προσδιορισμός..... | 75 |
| 3.2 | Παραλαβή εκχυλίσματος- Αποδόσεις | 79 |
| 3.3 | Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου | 81 |
| 3.4 | Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας..... | 84 |
| 3.5 | Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών έναντι παθογόνων του στόματος..... | 90 |
| 3.5.1 | <i>In vitro</i> μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων των φυτών με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA).... | 90 |
| 3.5.2 | <i>In vitro</i> μελέτη της ικανότητας των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν τον σχηματισμό του βιοϋμενίου (biofilm)..... | 97 |
| 3.5.3 | <i>In vitro</i> μελέτη της ικανότητας των εκχυλισμάτων να αποικοδομούν το σχηματισμένο βιοϋμένιο (biofilm)..... | 101 |

| | |
|--|-----|
| Βιβλιογραφία..... | 112 |
| Παράρτημα | 134 |
| Φάσματα UV-Vis ενώσεων εκχυλισμάτων των φυτών | 134 |
| Αποτελέσματα %Αποικοδόμησης -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου των μικροοργανισμών από τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών στις 24 ώρες..... | 139 |
| Περιεχόμενα Εικόνων..... | 141 |
| Περιεχόμενα Γραφημάτων..... | 142 |
| Περιεχόμενα Πινάκων..... | 143 |
| Πίνακας Συντμήσεων | 144 |

1 Εισαγωγή

1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες

1.1.1 Εισαγωγή

Η προέλευση, οι ιδιότητες και η σημασία των φυσικών προϊόντων, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων εδώ και πολλά χρόνια και πραγματοποιούνται έρευνες τόσο στους τομείς της βοτανικής, της φυσιολογίας φυτών και της βιοχημείας όσο και στους τομείς της χημείας, φαρμακολογίας και ιατρικής σε επίπεδο κυρίως εφαρμογών.

Τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται από την ανθρωπότητα εδώ και χιλιάδες χρόνια (Roberts *et al.*, 1998) ως χρωστικές ουσίες, αρτυματικές ύλες (π.χ. βανιλίνη, καψαϊκίνη), αρώματα (π.χ. ροδέλαιο, έλαιο λεβάντας), διεγερτικά (π.χ. καφεΐνη, νικοτίνη, εφεδρίνη), παραισθησιογόνα (π.χ. μορφίνη, κοκαΐνη, σκοπολαμίνη), εντομοκτόνα (π.χ. νικοτίνη, πιπερίνη, πυρεθρίνη), δηλητήρια (π.χ. κωνειΐνη, στρυχνίνη), ακόμη και ως θεραπευτικοί παράγοντες (π.χ. ατροπίνη, κινίνη, κωδεΐνη) (Wink, 2009).

Οι τάξεις των ενώσεων που παραδοσιακά συνδέθηκαν με τη χημεία των φυσικών προϊόντων είναι οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν μόρια τα οποία είναι θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά και σχηματίζονται από κοινά μεταβολικά μονοπάτια στους περισσότερους οργανισμούς, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη νουκλεϊκά οξέα. Σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν συμμετέχουν στη βασική λειτουργία του οργανισμού και χαρακτηρίζουν το είδος που τα παράγει αφού πολλές φορές είναι μοναδικοί από είδος σε είδος. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχηματίζονται από ενδιάμεσα μονοπάτια-κλειδιά των πρωτογενών μεταβολιτών και σε αυτούς ανήκουν τα φαινολικά συστατικά, τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή και πολλά ετεροκυκλικά παράγωγα.

Συνοψίζοντας καταλήγουμε ότι ο όρος φυσικά προϊόντα αναφέρεται στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού φυτικών και ζωικών οργανισμών, ουσίες οι οποίες ενώ δεν συμμετέχουν στη βασική λειτουργία του οργανισμού, έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν αποτελούν άχρηστα παράγωγα, υπόθεση η οποία κυριαρχούσε παλαιότερα, καθώς τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οργανισμών. Πολλοί από αυτούς συμμετέχουν σε οικολογικές αλληλεπιδράσεις όπως είναι οι σημειοχημικές και τοξικές ουσίες ή λειτουργούν σαν ρυθμιστές συγκεκριμένων βιολογικών λειτουργιών όπως τα στεροειδή. Κάποια παραδείγματα αποτελούν οι φερομόνες φύλου, οι οποίες παράγονται από πολλά είδη εντόμων με σκοπό την ρύθμιση της αναπαραγωγής και εντομοαπωθητικές ενώσεις που παράγονται από πολλά είδη φυτών.

Πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν ενδιαφέρουσες φαρμακολογικές ιδιότητες για αυτό το λόγο εδώ και αιώνες χρησιμοποιούνται τα αρωματικά φυτά και βότανα για τη θεραπεία διαταραχών και ασθενειών. Επίσης, η λειτουργία τους ως φυτοφάρμακα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογία (Stanforth, 2006; Ιγνατιάδου, 2009).

1.1.2 Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντούμε στα φυτά έχουν μεγάλη δομική ποικιλία, προέρχονται από διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια και αποτελούν περίπλοκα μίγματα που διαφέρουν από όργανο σε όργανο και από φυτό σε φυτό. Τα επίπεδα των ενώσεων αυτών στα φυτά εξαρτώνται από την ποικιλία, τις συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης (King *et al.*, 1998).

Ένα τυπικό χαρακτηριστικό τους είναι η αποθήκευσή τους σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, μερικές φορές ακόμη και σε όργανα που δεν τους παράγουν και λειτουργούν ως ανενεργά συστατικά τα οποία ενεργοποιούνται ενζυματικά σε περίπτωση κινδύνου. Σε γενικές γραμμές, διαπιστώνουμε ότι οι ιστοί και τα όργανα τα οποία είναι σημαντικά για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, όπως η επιδερμίδα και ο φλοιός, τα άνθη, οι καρποί και οι σπόροι έχουν συγκεκριμένο προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών και οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποθηκεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αυτά τα όργανα.

Πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες του δευτερογενούς μεταβολισμού συνδέονται στενά με τη λειτουργία των δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι αποτελούν απαραίτητα εργαλεία των φυτών στην άμυνά τους έναντι φυτοφάγων, μικροβίων (βακτήρια, μύκητες) και ιών. Μερικοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες λειτουργούν σαν σήματα για την προσέλκυση εντόμων επικονίασης.

Μία ερώτηση που προκύπτει είναι γιατί οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν αποτελούν άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού. Αυτή η υπόθεση αποτυγχάνει να εξηγήσει κάποια φαινόμενα που παρατηρούνται:

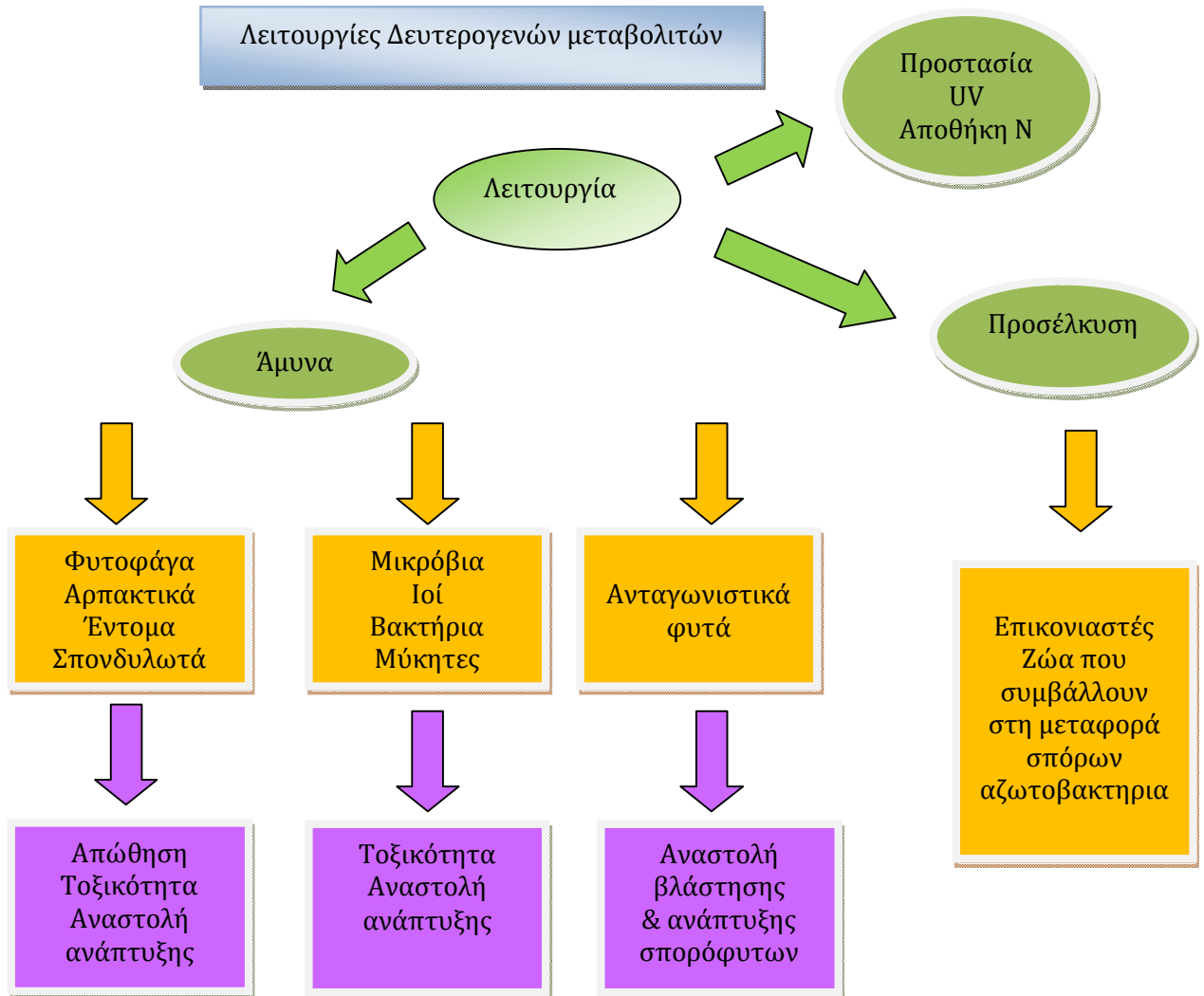
- τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού είναι παρόντα στους ετερότροφους οργανισμούς καθώς αυτοί δεν μπορούν να διασπάσουν πλήρως την τροφή τους για την παραγωγή ενέργειας. Αυτοί οι οργανισμοί εκκρίνουν απόβλητα που είναι συχνά πλούσια σε άζωτο (δηλαδή ουρία, ουρικό οξύ). Ωστόσο, τα φυτά είναι αυτότροφοι οργανισμοί και ως εκ τούτου, δεν χρειάζονται απεκκριτικούς μηχανισμούς.
- το άζωτο είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τα φυτά, συνεπώς η παραγωγή εκκρίσεων που περιέχουν άζωτο, όπως τα αλκαλοειδή, θα ήταν δύσκολο να εξηγηθεί. Πρέπει ακόμη να αναφερθεί ότι τα αλκαλοειδή συναντώνται συχνά σε νεαρούς ή μεταβολικά ενεργούς ιστούς αλλά όχι σε γηρασμένα κύτταρα, όπως θα αναμενόταν σύμφωνα με την υπόθεση του προϊόντος αποβλήτων.

- Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είναι αδρανή τελικά προϊόντα του μεταβολισμού (ένα αναμενόμενο χαρακτηριστικό των αποβλήτων), αλλά πολλοί από αυτούς μεταβολίζονται από τα φυτικά κύτταρα. Για παράδειγμα, τα αλκαλοειδή που περιέχουν άζωτο αποθηκεύονται συχνά σε μεγάλες ποσότητες στα όσπρια. Κατά τη διάρκεια της βλαστήσεως, παρατηρείται υποβάθμιση αυτών των ενώσεων υποδεικνύοντας έτσι ότι το άζωτο τους επαναχρησιμοποιείται από το φυτό.
- Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι αρκετές φορές τόσο περίπλοκα οργανωμένος κάτι που θα ήταν ασυνήθιστο αν επρόκειτο για άχρηστο προϊόν (Wink, 2009).

Η άποψη ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αμυντικό ρόλο έναντι των φυτοφάγων ζώων υποστηρίχθηκε 100 χρόνια πριν από τον Stahl και εξελίχθηκε τις τελευταίες δεκαετίες (Swain, 1977) καθώς ένα εύρος πειραματικών αποδείξεων υποστηρίζει την ιδέα αυτή (Wink, 1988, 1992, 1993a, 2008b; Harborne, 1993, Bernays & Charman, 1994). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν εξελιχθεί για την προστασία ενάντια σε ιούς, βακτήρια, μύκητες, φυτοφάγα ζώα (π.χ. αρθρόποδα και σπονδυλωτά) και φυτά που δρουν σαν ανταγωνιστές για νερό, φως και θρεπτικά συστατικά.

Είναι χαρακτηριστικό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται ως μείγματα διαφόρων ουσιών, συνήθως από διαφορετικές τάξεις π.χ. οι πολυφαινόλες που συχνά συνοδεύονται από τα τερπενοειδή. Συνεπώς, είναι πιο δύσκολο για ένα φυτοφάγο ή μικρόβιο να αναπτύξει αντίσταση σε ένα τέτοιου είδους μίγμα αφού απαιτείται η ταυτόχρονη αντίσταση σε αρκετούς στόχους. Επιπλέον, η δραστηριότητα των μεμονωμένων μεταβολιτών στα μίγματα μπορεί να είναι αθροιστική ή ακόμη και συνεργιστική (Wink, 2010).

Ακόμη, οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να χρησιμεύσουν ως ενώσεις που προσελκύουν τα έντομα επικονιαστές (μονοτερπένια-άρωμα, ανθοκυανίνες & καροτενοειδή-χρώμα) και να συμβάλλουν στη διασπορά των σπόρων (Cirollini & Levey, 1997) (**Σχήμα. 1.1**). Σε αρκετές περιπτώσεις, οι δύο διαφορετικές αυτές δράσεις εμφανίζονται από τις ίδιες ενώσεις: π.χ. οι ανθοκυανίνες μπορεί να προσελκύουν έντομα προς τα άνθη και ταυτόχρονα να λειτουργούν σαν εντομοκτόνα. Αυτή η λειτουργία έχει νόημα, δεδομένου ότι τα έντομα πρέπει να προσελκύνονται ως επικονιαστές, αλλά δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα άνθη ως τροφή, γι' αυτό το λόγο τους παρέχεται το νέκταρ. Επιπλέον, μερικοί δευτερογενείς μεταβολίτες εμφανίζουν φυσιολογικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα να μεταφέρουν και να αποθηκεύουν άζωτο και παράλληλα να προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία (Wink, 2009). Οι λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 1.1 Οικολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά (Wink, 2009)

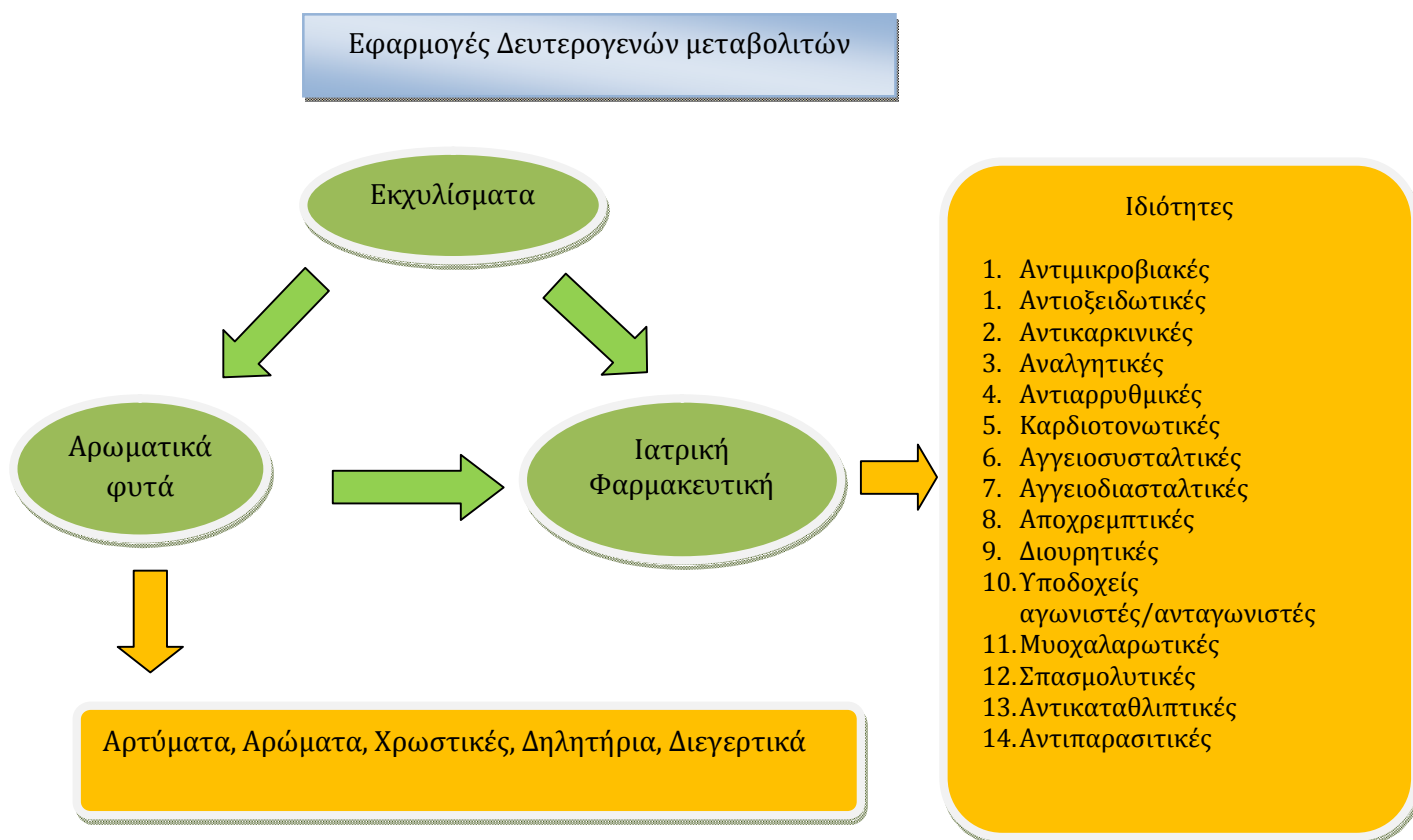
1.1.3 Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στον ανθρώπινο οργανισμό

Όπως ήδη αναφέραμε οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις ιδιαίτερα σημαντικές για τους οργανισμούς που τους παράγουν, καθώς λειτουργούν προστατευτικά. Μπορούν όμως να προστατεύσουν και τον ανθρώπινο οργανισμό από ασθένειες, για αυτό το λόγο τα φυσικά προϊόντα αποτελούν αντικείμενο έρευνας της φαρμακευτικής και της ιατρικής επιστήμης και παρουσιάζουν ποικίλες εφαρμογές (Wink, 2010; Saxena *et al.*, 2013). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαθέτουν εξαιρετική βιολογική δράση καθώς λειτουργούν σαν αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, βοηθούν επίσης στο σχηματισμό των ενζύμων αποτοξίνωσης και των ορμονών, στην

ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και διαθέτουν αντικαρκινική δράση (Narasinga, 2003).

Εκτός από συγκεκριμένες ουσίες με εξακριβωμένες φαρμακευτικές ιδιότητες ουσίες (συμπεριλαμβανομένων των ισχυρών αντινεοπλασματικών φαρμάκων, όπως τα αλκαλοειδή βινβλαστίνη, βινκριστίνη ή ταξόλη) (Wink, 2007), χρησιμοποιούνται συμπλέγματα εκχυλισμάτων ακόμη και ακατέργαστα φυτά (Wink, 2008a). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων από τα φυτά όπως : *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Piper methysticum*, *Chamomilla recutita*, *Crataegus monogyna*, *Silibum marianum*, *Melissa officinalis*, *Valeriana officinalis* (Wagner et al., 1995; Van Wyk et al., 2004).

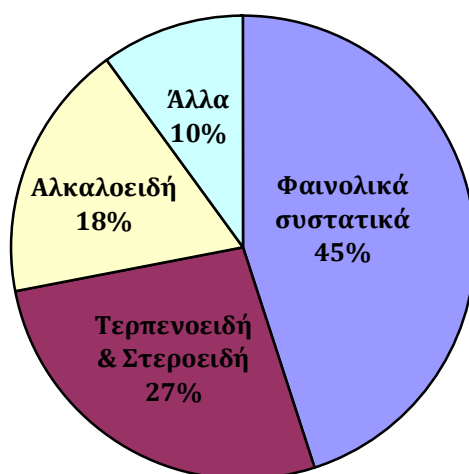
Τα φυσικά προϊόντα όπως ήδη αναφέραμε στην εισαγωγή έχουν και άλλες χρήσεις, ως διεγερτικά (π.χ. καφεΐνη, νικοτίνη, εφεδρίνη), αρώματα (αιθέρια έλαια), αρτύματα (π.χ. καψαϊκίνη, πιπερίνη), φυσικές βαφές, δηλητήρια (π.χ. στρυχνίνη) και παραισθησιογόνα (π.χ. μορφίνη, ηρωίνη, κοκαΐνη). Η χρήση τους συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.2):



15. Σχήμα 1.2 Εφαρμογές και ιδιότητες δευτερογενών μεταβολιτών (Wink, 2009, Narasinga, 2003)

1.1.4 Ταξινόμηση δευτερογενών μεταβολιτών

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναφερθούμε στους κυριότερους δευτερογενείς μεταβολίτες που αφορούν την παρούσα μελέτη τις φαινολικές ενώσεις. Η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι τα φαινολικά συστατικά υπερέχουν σε αριθμό έναντι των υπολοίπων (περισσότερες από 8.000 ουσίες) (Strack, 1997) και ότι έχουν τη μεγαλύτερη δομική ποικιλία σε σύγκριση με τους άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες (Saxena *et al.*, 2013) (Σχήμα 1.3).



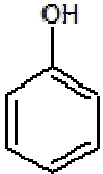
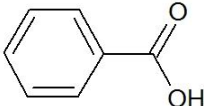
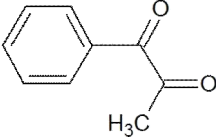
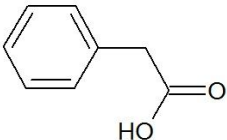
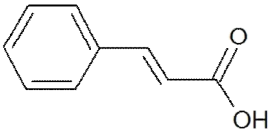
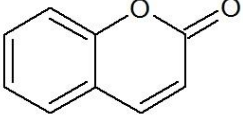
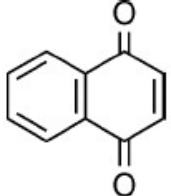
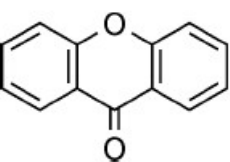
Σχήμα 1.3 Διάγραμμα τύπου πίτας με τις κυριότερες κατηγορίες των δευτερογενών μεταβολιτών (Saxena *et al.*, 2013)

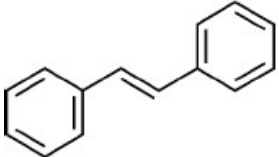
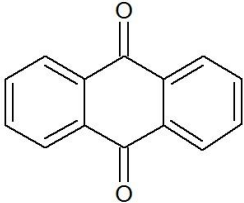
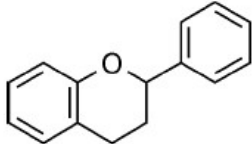
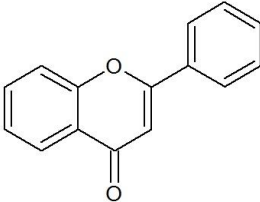
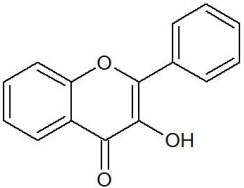
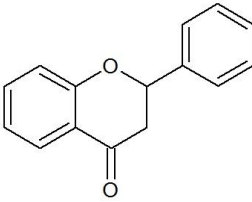
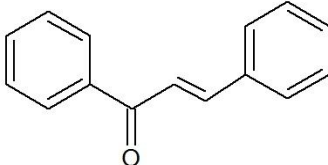
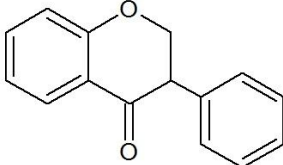
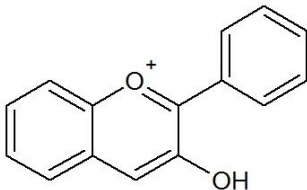
1.1.5 Φαινολικές ενώσεις

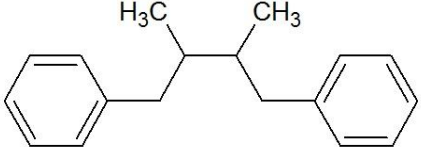
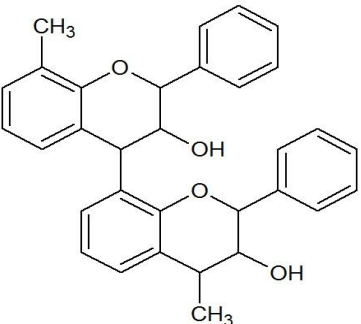
Οι φαινολικές ενώσεις έχουν στο μόριό τους έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια (Ιγνατιάδου, 2009) και παράγονται κατά κύριο λόγο μέσω των μεταβολικών μονοπατιών του σικιμικού και του μηλονικού οξέος (Morimoto *et al.*, 2006). Αποτελούν μία ευρεία ποικιλία ενώσεων συμπεριλαμβανομένων απλών, μικρού μοριακού βάρους μονοκυκλικών φαινολών και φαινολικών οξέων, μέχρι και μεγάλου μοριακού βάρους πολύπλοκων τανινών και πολυφαινολών (Crozier *et al.*, 2006). Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη και πιο μελετημένη ομάδα των φαινολικών συστατικών (Dai *et al.*, 2010).

Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να ταξινομηθούν βάση τον αριθμό και τη διάταξη των ατόμων άνθρακα (Πίνακας 1.1) και απαντώνται συνήθως συζευγμένα με σάκχαρα και οργανικά οξέα (Crozier *et al.*, 2006).

Πίνακας 1.1: Κυριότερες τάξεις φαινολικών ενώσεων (Crozier *et al.*, 2009, Saxena *et al.*, 2013)

| Αριθμός Ανθράκων | Σκελετός | Κατηγορία | Παραδείγματα | Βασική δομή |
|------------------|----------|------------------------|--|---|
| 6 | C6 | Απλές φαινόλες | υδροκινόνη, θυμόλη καρβακρόλη, βανιλίνη |  |
| 7 | C6-C1 | Φαινολικά οξέα | γαλλικό οξύ π-υδροξυβενζοϊκό οξύ |  |
| 8 | C6-C2 | Ακετοφαινόλες | gallacetophenon |  |
| | | Φαινυλοξικό οξύ | π-υδροξυφαινυλο-οξικό οξύ |  |
| 9 | C6-C3 | Υδροξυκινναμωμικά οξέα | π-κουμαρικό οξύ καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ σιναπικό οξύ |  |
| 9 | C6-C3 | Κουμαρίνες | εσκουλετίνη, συμπελλιφερόνη σκοπολετίνη |  |
| 10 | C6-C4 | Ναφθοκινόνες | πλουμπαγκίνη, ζουγκλόνη |  |
| 13 | C6-C1-C6 | Ξανθόνες | μανγκιφερίνη |  |

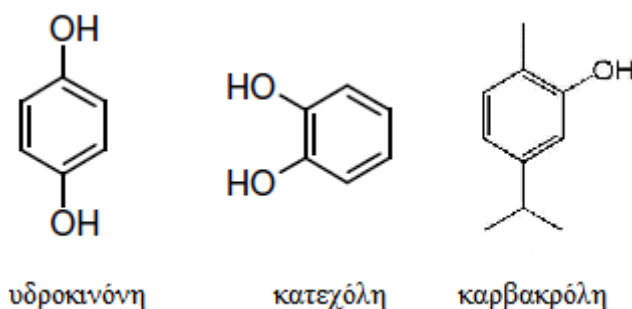
| | | | | |
|----|----------|---------------------|--|---|
| 14 | C6-C2-C6 | Στιλβένια | ρεσβερατρόλη |  |
| 14 | C6-C2-C6 | Ανθρακινόνες | εμοδίνη, αλιζαρίνη |  |
| 15 | C6-C3-C6 | Φλαβονοειδή | |  |
| | | Φλαβόνες | απιγενίνη, χρυσίνη, λουτεολίνη |  |
| | | Φλαβονόλες | κερκετίνη, καεμπερόλη, μυρικετίνη |  |
| | | Φλαβανόνες | ναριγκενίνη, εσπεριτίνη |  |
| | | Χαλκόνες | βουτεΐνη, φλορετίνη |  |
| | | Ισοφλαβόνες | γενιστεΐνη, δαΐζδεΐνη |  |
| | | Ανθοκυανίνες | δελφινιδίνη, κυανιδίνη, μαλβιδίνη, πετουνιδίνη |  |

| | | | | |
|-----------|-------------------------|-----------------------------------|---|---|
| 18 | (C6-C3) ₂ | Λιγνάνες | πινορεσινόλη, σησαμίνη, λαρικρεσινόλη |  |
| N | (C6-C3-C6) _n | Συμπυκνωμένες ταννίνες | προδελφινιδίνες, προπελαργονιδίνες, προκυανιδίνες |  |

Φαινόλες και φαινολικά οξέα

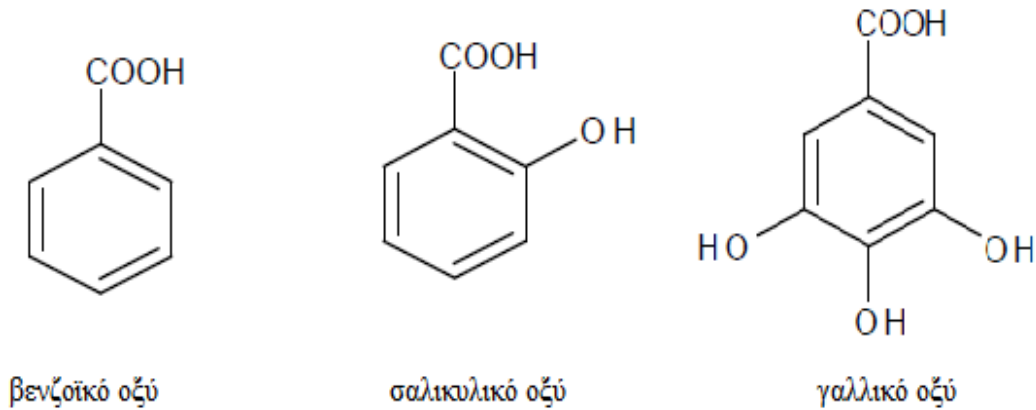
Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα συνήθως εμφανίζονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών στους οποίους απαρτίζουν το άγλυκο τμήμα της ένωσης και σπανίως συναντώνται σε ελεύθερη μορφή στο φυτό (Ιγνατιάδου, 2009). Οι περισσότερες απλές φαινόλες αποτελούν μονομερή συστατικά των πολυφαινολών και οξέων που συνθέτουν μερικούς από τους ιστούς των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της λιγνίνης και της μελανίνης (Cseke *et al.*, 2006). Με αλκαλική υδρόλυση ή σύντηξη διασπώνται οι ενώσεις της ομάδας των φλαβονοειδών προς απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα. Με την όξινη υδρόλυση των φυτικών ιστών ελευθερώνονται φαινολικά οξέα από τους εστέρες και τα άλατά τους και διασπώνται οι γλυκοζίτες (Ιγνατιάδου, 2009).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα απλών φαινολών των φυτών είναι οι υδροκινόνη, καρβακρόλη η οποία είναι από τα κυριότερα συστατικά στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης (Tsimogiannis , *et al.*, 2006) και κατεχόλη των οποίων η δομή παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 1.4):

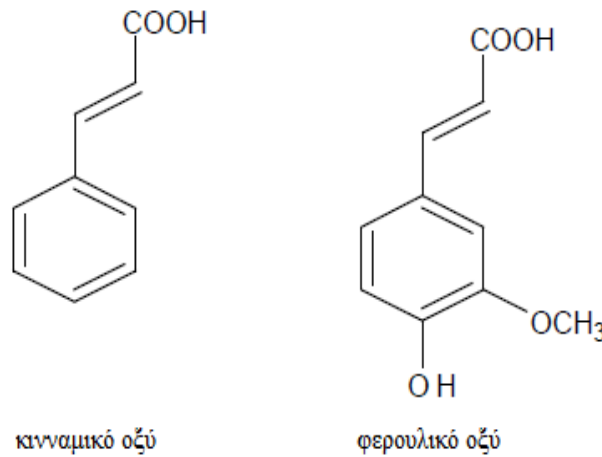


Σχήμα 1.4 Δομές απλών φαινολών (Saxena *et al.*, 2013)

Ο όρος φαινολικά οξέα αναφέρεται σε φαινόλες οι οποίες έχουν ένα καρβοξυλικό οξύ και είναι φυσικά απαντώμενα στο αγγειόσπερμα (Ιγνατιάδου, 2009) με δύο βασικές δομές: υδροξυκιναμωμικά και υδροξυβενζοϊκά οξέα (Balasundram *et al.*, 2006) (Σχήμα 1.5 & 1.6). Στα φυτά μπορούν να βρεθούν με τη μορφή γλυκοζιδίων ή εστέρων με στερόλες, αλκοόλες και υδροξυ-λιπαρά οξέα (Saxena *et al.*, 2013).



Σχήμα 1.5 Υδροξυβενζοϊκά οξέα (Saxena *et al.*, 2013)



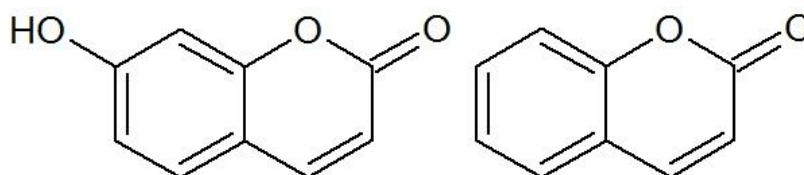
Σχήμα 1.6 Υδροξυκινναμωμικά οξέα (Saxena *et al.*, 2013)

Οι ιδιότητες των φαινολικών οξέων αποτελούν αντικείμενο έρευνας χημικών, βιολογικών και ιατρικών μελετών λόγω της βιολογικής τους δράσης όπως και των ακόλουθων δράσεων: αύξηση έκκρισης της χολής, μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντικαταθλιπτική, αντισπασμωδική όπως και αντιμικροβιακή έναντι στελεχών βακτηρίων (Silva *et al.*, 2007; Ghasemzadeh *et al.*, 2010).

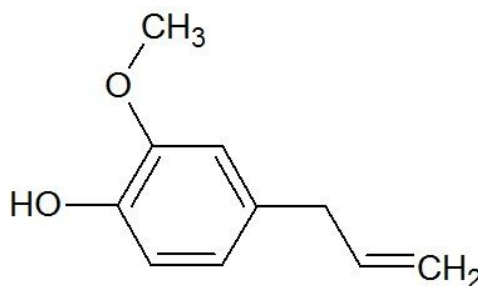
Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι μία γενικότερη κατηγορία φαινολικών συστατικών που διαθέτει μία πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα στον φαινολικό δακτύλιο (Cseke *et al.*, 2006). Σε αυτήν την τάξη ανήκουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα που προαναφέραμε, οι κουμαρίνες και τα φαινυλοπροπένια (Cseke *et al.*, 2006).

Οι κουμαρίνες οι οποίες είναι παράγωγα λακτονοποίησης των ο-υδροξυκινναμωμικών οξέων βρίσκονται σε πολλά φυτά με τη μορφή γλυκοζιτικών παραγώγων. Η ουμπελλιφερόνη που απαντάται στο χαμομήλι, χρησιμοποιείται ως

παράγοντας απορρόφησης των υπεριωδών ακτίνων και βρίσκει εφαρμογή σε αντιηλιακά σκευάσματα (Σχήμα 1.7). Τα φαινυλοπροπένια απαντώνται μαζί με τα τερπένια στα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών και συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό τους άρωμα (Αναστασάκη, 2014). Κάποια από αυτά είναι η ευγενόλη και η ανιθόλη εκ των οποίων η ευγενόλη χρησιμοποιείται σαν αναλγητικό στην οδοντιατρική (Σχήμα 1.8) (Cseke *et al.*, 2006; Samuelsson, 2001).



Σχήμα 1.7 Ουμπελλιφερόνη & κουμαρίνη



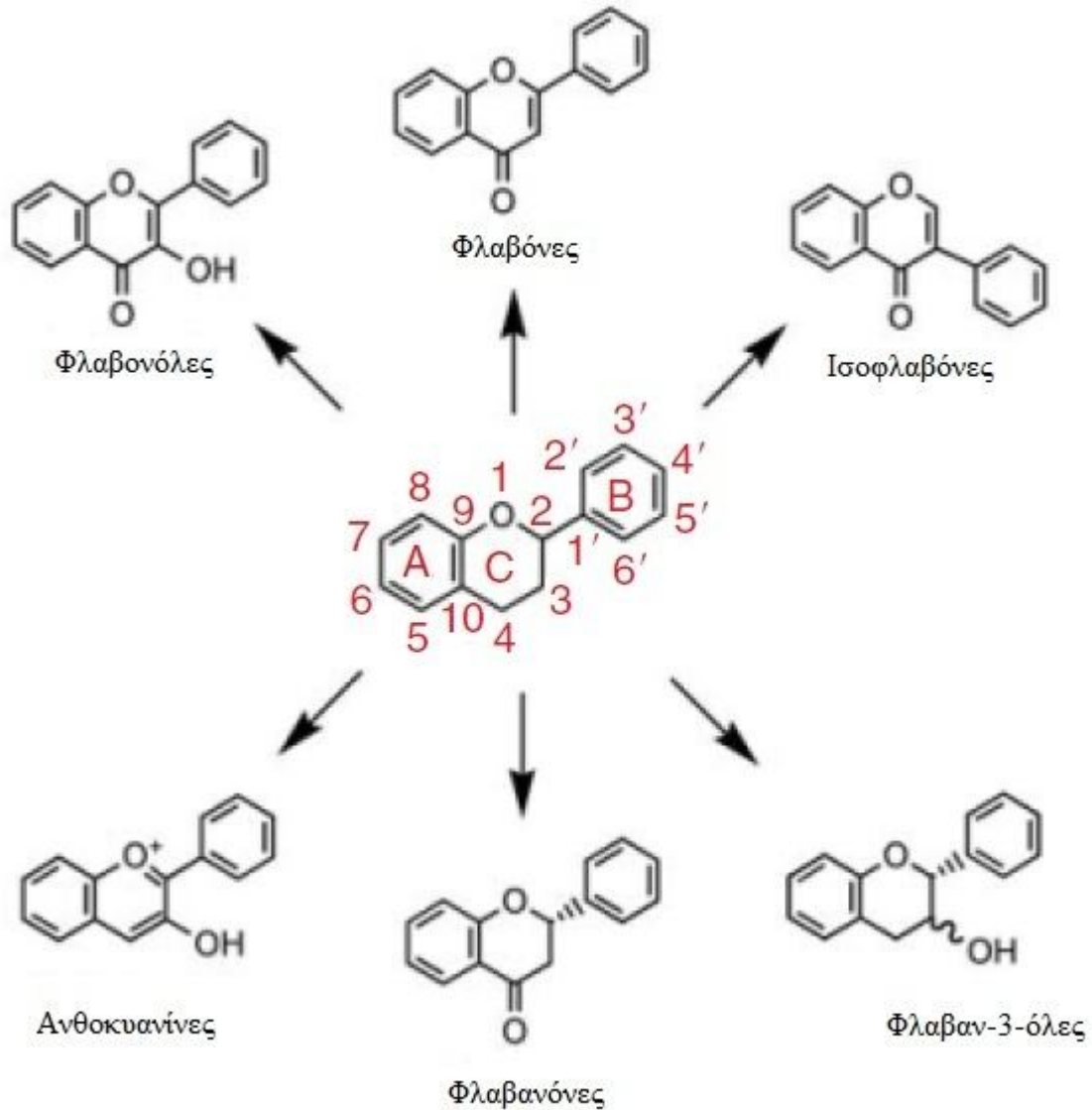
Σχήμα 1.8 Ευγενόλη

Οι ναφθοκινόνες ανήκουν μαζί με τις βενζοκινόνες και τις ανθρακινόνες στην κατηγορία των φυσικών χρωστικών που περιέχουν στο μόριό τους κινσοειδή δακτύλιο και υδροξύλια, τις χρωστικές κινόνες. Οι χρωστικές κινόνες έχουν φαινολικές ιδιότητες και στα φυτά απαντώνται ενωμένες με σάκχαρα ως γλυκοζίτες ή ως διμερείς κινόλες, έτσι η όξινη υδρόλυση οδηγεί σε ελεύθερες κινόνες (Ιγνατιάδου, 2009).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικά συστατικά με γενική δομή C6-C3-C6 και αποτελούνται από 15 άνθρακες, με δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) στα άκρα, οι οποίοι ενώνονται με 3 άτομα άνθρακα προς έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (C) (Crozier *et al.*, 2009; Harborne, 1993). Ανάλογα με την παρουσία ή όχι κάποιων ομάδων στη βασική δομή προκύπτουν οι διάφορες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών με τις κυριότερες να είναι οι: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβον-3 όλες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες και ανθοκυανίνες (Σχήμα 1.8). Οι υδροξυλομάδες βρίσκονται συνήθως

στις θέσεις 4, 5 και 7. Επιπλέον, τα περισσότερα φλαβονοειδή απαντώνται ενωμένα με σάκχαρα με τη μορφή γλυκοζιδίων. Ενώ τα σάκχαρα και οι υδροξυλομάδες αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα των φλαβονοειδών, οι άλλοι υποκαταστάτες, όπως ομάδες μεθυλίου και ισοπεντυλίου καθιστούν λιπόφιλο τον χαρακτήρα των φλαβονοειδών (Crozier *et al.*, 2009). Τα φλαβονοειδή υπάρχουν και ως άγλυκα, δηλαδή χωρίς σάκχαρα και συχνά αντιπροσωπεύουν ένα πολύ σημαντικό ποσοστό του συνόλου των φλαβονοειδών στο φυτό (Pretorius, 2003).

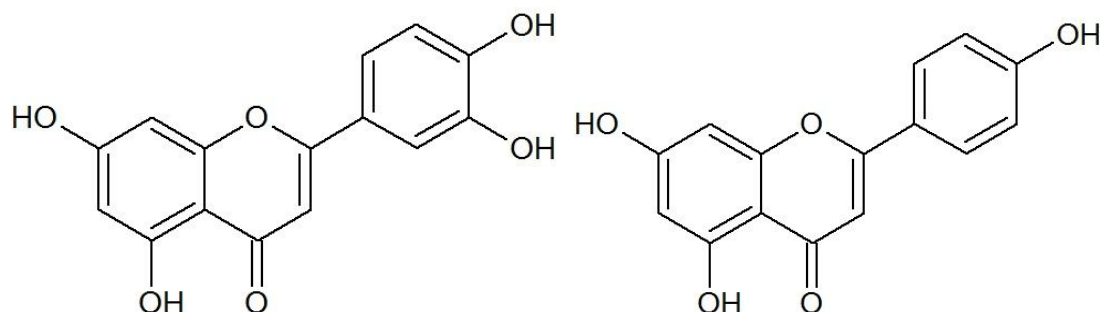


Σχήμα 1.9 Κυριότερες κατηγορίες φλαβονοειδών (Crozier *et al.*, 2009)

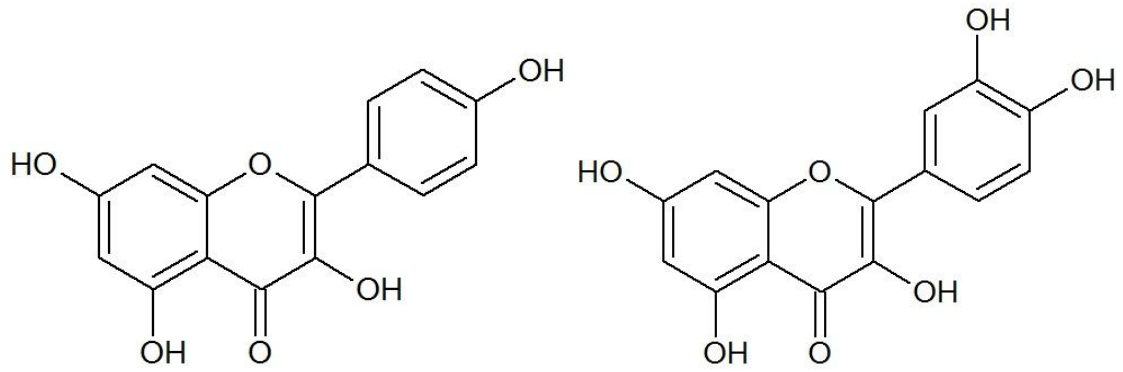
Με περισσότερους από 4500 διαφορετικούς αντιπροσώπους γνωστούς έως τώρα, τα φλαβονοειδή αποτελούν μια τεράστια κατηγορία των φαινολικών συστατικών και εμφανίζονται με τη μορφή μονομερών, διμερών και πολυμερών (Harborne, 1993; Croteau *et al.*, 2000). Βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην

επιδερμίδα των φύλλων και στον φλοιό των καρπών. Στα φυτά, τα φλαβονοειδή εμπλέκονται σε ποικίλες διαδικασίες όπως η προστασία UV και η αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών σε ασθένειες (Koes *et al.*, 1994; Pierpoint 2000).

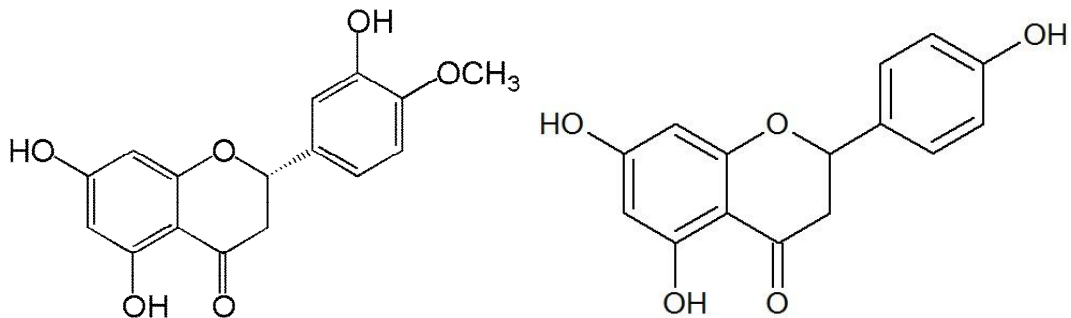
Οι **φλαβόνες** είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβόνης στις θέσεις 5, 7 καθώς και σε μια ή περισσότερες από τις 3', 4' ή 5'. Οι φλαβόνες συνοδεύουν συχνά τις ανθοκυανίνες ως συγχρωστικές ενώ παραδείγματα φλαβονών αποτελούν η απιγενίνη και λουτεολίνη (**Σχήμα 1.10**) (Ιγνατιάδου, 2009). Οι **φλαβονόλες** προκύπτουν από τις φλαβόνες με εισαγωγή ενός υδροξυλίου στη θέση 3 και κάποιοι χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι οι: μυρισετίνη, κερκετίνη και καεμφερόλη (**Σχήμα 1.11**) οι οποίες συναντώνται πιο συχνά σαν O-γλυκοζίτες (Crozier *et al.*, 2009). Οι **φλαβανόνες** προκύπτουν από τις αντίστοιχες φλαβόνες με ανόρθωση του διπλού δεσμού Δ² και οι πιο γνωστές φλαβανόνες είναι η εσπεριτίνη η οποία συναντάται ως γλυκοζίτης στα πράσινα εσπεριδοειδή και η ναριγκενίνη (**Σχήμα 1.12**) (Ιγνατιάδου, 2009). Οι **ισοφλαβόνες** είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ουσίας ισοφλαβόνη και βρίσκονται στα φυτά είτε ελεύθερες είτε ενωμένες ως γλυκοζίτες. Η γενιστεΐνη και δαΐζδεΐνη αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα ισοφλαβονών (**Σχήμα 1.13**). Το παράγωγο της φλαβονόλης που έχει τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο υδρογονωμένο λέγεται **φλαβαν-3-όλη**. Παραδείγματα φλαβαν-3-ολών είναι οι : (+)- κατεχίνη και το ισομερές της (-) επικατεχίνη. Τα ολιγομερή ή πολυμερή των φλαβαν-3-ολών, τα οποία ονομάζονται προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες, αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυσικών φαινολικών παραγώγων (Francisco *et al.*, 2008).



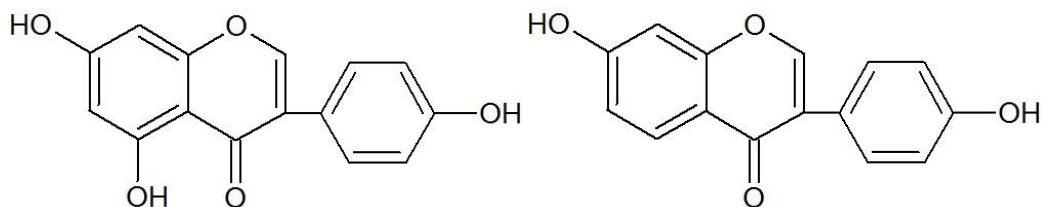
Σχήμα 1.10 Λουτεολίνη & απιγενίνη



Σχήμα 1.11 Καεμφερόλη & κερκετίνη



Σχήμα 1.12 Εσπεριτίνη & Ναριγκενίνη

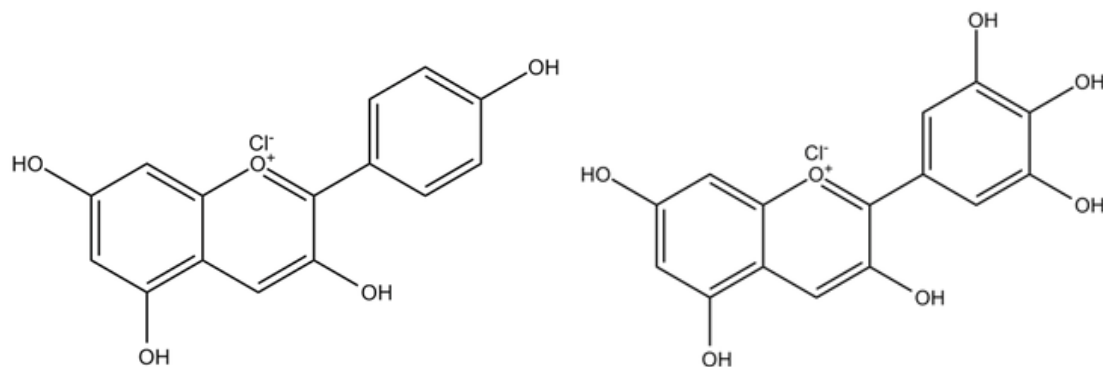


Σχήμα 1.13 Γενιστεΐνη & Δαιΐζεΐνη

Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι η σπουδαιότερη ομάδα φυτικών χρωστικών και σε αυτές οφείλονται οι διάφοροι έντονοι και ελκυστικοί χρωματισμοί των λουλουδιών γιατί σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι ανθοκυανίνες απορροφούν έντονα την ορατή ακτινοβολία προσδίδοντας μία ποικιλία χρωμάτων στην επιφάνεια που βρίσκονται. Στα φυτά συναντώνται μόνο με τη μορφή γλυκοζιτών κυρίως στη θέση C₃, των οποίων τα άγλυκα τμήματα είναι γνωστά ως ανθοκυανιδίνες και προκύπτουν με όξινη υδρόλυση των πρώτων (Ιγνατιάδου, 2009). Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 400 ανθοκυανίνες στα φυτά (Mazza, 2007) εκ των οποίων μόνο έξι ανθοκυανιδίνες

συναντάμε συνήθως στα φυτά συμπεριλαμβανομένων της κυανιδίνης, δελφινιδίνης, μαλβιδίνης, πελαργονιδίνης, παιονιδίνης και πετουνιδίνης. Οι γλυκοζίτες των τριών μη μεθυλιωμένων ανθοκυανιδών (κυανιδίνη, δελφινιδίνη και πελαργονιδίνη) είναι οι πιο διαδεδομένοι στη φύση, σε ποσοστά 80% στα φύλλα, 69% σε καρπούς και 50% σε άνθη (Σχήμα 1.14) (Ghosh *et al.*,2007).



1.14 Πελαργονιδίνη & Δελφινιδίνη

Μία ακόμη σημαντική κατηγορία των φαιολικών συστατικών είναι οι πολυμερείς φαιολικές ενώσεις ταννίνες, λιγνάνες και μελανίνες. Οι συγκεκριμένες ομάδες πολυμερών σχηματίζονται με συμπύκνωση μονομερών φαιολικών ή флаβονικών μονάδων. Οι ταννίνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις υδρολυομένες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυομένες ταννίνες συντίθενται από πολυόλες όπως η γλυκόζη και το κινικό οξύ και συνδέονται με ένα τουλάχιστον μόριο γαλικού οξέος (γαλλο-ταννίνες) ή με ένα μόριο εξα-υδροξυ-διφαινικού οξέος (ελλαγιταννίνες). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες, είναι πολυμερή των флаβον-3-ολών όπως ήδη προαναφέραμε. Παραδείγματα συμπυκνωμένων ταννινών είναι οι προδελφινιδίνες, προπελαργονιδίνες και προκυανιδίνες (Moreno-Arribas *et al.*, 2009).

1.2 Μελέτη κυριότερων συστατικών με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography- LC-DAD)

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενός δείγματος στα επιμέρους τμήματά του. Αυτός ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα με βάση τις αλληλεπιδράσεις του δείγματος με την κινητή και στατική φάση. Τα συστατικά ενός δείγματος διαχωρίζονται σε μια στήλη ανάλογα με τη συγγένεια του κάθε συστατικού με την κινητή φάση. Έτσι, εάν τα συστατικά έχουν διαφορετικές πολικότητες τότε το συστατικό του οποίου η πολικότητα συγγενεύει με αυτής της κινητής φάσης, θα διέρχεται διαμέσου της στήλης ταχύτερα από ότι τα άλλα συστατικά.

Για την επίτευξη ενός επιθυμητού διαχωρισμού είναι απαραίτητο να γίνουν οι κατάλληλες επιλογές τόσο στη στήλη (μεγάλο μήκος ή μικρή διάμετρος υλικού

πλήρωσης) όσο και στη στατική φάση (πολικότητα) και στην κινητή φάση (πολικότητα, τρόπος προώθησης). Ανάλογα με την πολικότητα κινητής-στατικής φάσης η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε: κανονικής φάσης όπου η στατική φάση είναι μία πολική ένωση όπως π.χ. αλκυλονιτρίλιο ή μία αλκυλαμίνη και η κινητή φάση είναι ένας μη πολικός διαλύτης π.χ. εξάνιο και αντίστροφης φάσης, όπου η στατική φάση είναι μία μη πολική ένωση π.χ. οκτασιλάνιο (OS) και η κινητή φάση είναι ένας πολικός διαλύτης όπως π.χ. νερό/ακετονιτρίλιο ή νερό/μεθανόλη. Επίσης, σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό παίζει και η επιλογή του συστήματος προώθησης του διαλύτη (κινητή φάση) διά μέσου της στήλης. Υπάρχει η ισοκρατική έκλυση όπου ένας μόνο διαλύτης ή μείγμα διαλυτών διατηρούνται σταθερά καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και η βαθμιδωτή έκλυση κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης αλλάζει με την πάροδο του χρόνου κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου. Με τη βαθμιδωτή έκλυση επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός καθώς μεταβάλλεται η σύσταση και συνεπώς η πολικότητα της κινητής φάσης. Η στήλη είναι πάντα συνδεδεμένη με ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας (φωτόμετρο υπεριώδους ορατού UV-Vis ή διαφορικό διαθλασίμετρο κ.α.) για την ανίχνευση των συστατικών που εκκλύονται από τη στήλη. Στην περίπτωση του φωτόμετρου UV-Vis μετράται η απορρόφηση των εκκλούμενων συστατικών συνεχώς σε συγκεκριμένο ή σε πολλαπλά ή σε μεταβαλλόμενο μήκος κύματος.

1.3 Αντιοξειδωτική δράση

1.3.1 Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1950, αποδείχθηκε ότι οι αντιδράσεις οξείδωσης που συμβαίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό, εμπλέκονται στη γήρανση και στην εμφάνιση πολλών ασθενειών. Έτσι, προτάθηκε ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να επιβραδύνουν την διαδικασία της γήρανσης, την εξέλιξη ασθενειών και να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής (Gutteridge *et al.*, 2010).

Το οξυγόνο είναι ένα απαραίτητο μόριο για τους ζωντανούς οργανισμούς, ωστόσο, κατά τη διάρκεια των μεταβολικών διαδικασιών αερόβιου τύπου αναπόφευκτα παράγονται οξυγονούχες δραστικές ουσίες (Reactive Oxygen Species) και ελεύθερες ρίζες (Cai *et al.*, 2004; Halliwell *et al.*, 1989; Sánchez, 2002; Miller *et al.*, 1993). Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια που είναι ιδιαίτερα ασταθή και υπόκεινται σε χημικές αντιδράσεις με άλλα μόρια. Προέρχονται από τρία στοιχεία, το οξυγόνο, άζωτο και θείο, δημιουργώντας έτσι (ROS), ελεύθερες ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και ελεύθερες ρίζες θείου (Reactive Sulfur Species, RSS). Οι ROS 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 οξείδιο του αζώτου (NO) και άλλες όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-). Οι RNS προέρχονται από αντιδράσεις του NO αντιδρώντας με O_2^- και οι RSS σχηματίζονται εύκολα με την αντίδραση των ROS με θειόλες (Lü *et al.*, 2010).

Ουσιαστικά, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σαν ένα φυσιολογικό κομμάτι του μεταβολισμού εντός των μιτοχονδρίων, μέσω των διαδικασιών φλεγμονής, φαγοκυττάρωσης, ισχαιμίας και σωματικής άσκησης. Εξωτερικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι το κάπνισμα, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, η ακτινοβολία, τα φάρμακα, τα φυτοφάρμακα, οι βιομηχανικοί διαλύτες και το όζον. Είναι ειρωνικό το γεγονός ότι το οξυγόνο που είναι απαραίτητο για τη ζωή έχει αρνητικά αποτελέσματα στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω αυτών των δραστικών ουσιών (ελευθέρων ριζών) (Lobo *et al.*, 2010).

Οι ελεύθερες ρίζες σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως είναι η απόπτωση, ο αγγειακός τόνος, η διατήρηση της ενέργειας στον οργανισμό, η αποτοξίνωση, η ρύθμιση ορμονών και η ανοσολογική και προσαρμοστική ανταπόκριση στα ένζυμα (Kelly, 1997; Škronánková *et al.*, 2012).

Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες δημιουργούν τη βάση για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νόσων, καρκίνου, νευροεκφυλιστικών διαταραχών, διαβήτη και αυτοάνοσων διαταραχών. Πολλές μελέτες έχοντας σκοπό να συμβάλλουν στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες έχουν δείξει ότι η διατροφή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτό, λόγω της παρουσίας φυτικών βιοδραστικών ενώσεων. Μερικές από αυτές τις ενώσεις είναι τα φαινολικά συστατικά, τα καροτενοειδή, τα τερπενοειδή των οποίων η αντιοξειδωτική δράση και οι δυνητικές ευεργετικές επιδράσεις προς τον οργανισμό μελετώνται ευρέως τα τελευταία χρόνια (Ayoola *et al.*, 2008; Sghaier *et al.*, 2011; Gholivand *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Nahar *et al.*, 2012; Nassar *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Zheleva *et al.*, 2013).

1.3.2 Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη (Halliwell, 2007). Κατά το ίδιο έτος οι Khlebniikov *et al.*, (2007) ορίζουν ως αντιοξειδωτικό κάθε ουσία που απομακρύνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες ή δρα έμμεσα έτσι ώστε να αυξηθεί η αντιοξειδωτική άμυνα ή αναστέλλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά δρουν με τους παρακάτω τρόπους:

- 1) Δεσμευτές οξυγόνου σε συνέργεια με άλλα αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας το οξυγόνο ώστε να μην υπάρχει η απαιτούμενη ποσότητα για να οξειδώσει τα λιπαρά συστατικά.
- 2) Αναστολείς των αντιδράσεων οξείδωσης των ελευθέρων ριζών, εμποδίζοντας τον σχηματισμό ή διασπώντας τα προϊόντα της οξείδωσης.
- 3) Ουσίες που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με τα μέταλλα ώστε να αποτρέψουν την έναρξη της οξείδωσης.
- 4) Ουσίες που διασπών 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.

6) Αναστολείς των προοξειδωτικών ενζύμων (Dangles, O. 2012; Kancheva *et al.*, 2009; Heim *et al.*, 2002).

Οι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς άμυνας έναντι των ελεύθερων ριζών και της βλάβης που προκαλούν, ανάμεσα σε αυτούς είναι: προληπτικοί μηχανισμοί, μηχανισμοί επιδιόρθωσης, φυσική άμυνα και αντιοξειδωτική άμυνα (Aruoma, 1998). Επίσης έχουν διαφόρους τύπους ενζύμων όπως οι βισμούτάσες υπεροξειδίου (SOD), οι αναγωγάσες και υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH), οι καταλάσες των μιτοχονδρίων και διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, το λιποϊκό οξύ, τα καροτενοειδή, η ουβικινόνη και ιόντα μετάλλων (Huang *et al.*, 2005). Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι γενικά πιο αποτελεσματικές στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών σε σχέση με τις καταλάσες (Aruoma, 1998). Όμως, η προστατευτική δράση που παρέχουν αυτοί οι παράγοντες μπορεί να περιορίζεται από μία υψηλή παραγωγή ROS, δημιουργώντας οξειδωτικό στρες στα κύτταρα ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών παραγόντων (Ohkatsu *et al.*, 2001; Triana *et al.*, 2013; Halliwell *et al.*, 1989). Αυτή η ανισορροπία οδηγεί σε βλάβη σημαντικών βιομορίων και κυττάρων, με πιθανές επιπτώσεις για ολόκληρο τον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν οξειδωτικό χαρακτήρα και στόχο μόρια όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, σάκχαρα και νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας τους βλάβες (Triana *et al.*, 2013; Lü *et al.*, 2010; Craft *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2010; Perron & Brumaghim, 2009).

Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να καθυστερήσουν, να αναστείλουν και να εμποδίσουν την οξείδωση που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και να μειώσουν το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, σε συνθήκες νόσου, η άμυνα κατά των ελεύθερων ριζών εξασθενεί ή καταστρέφεται. Υπό αυτές τις συνθήκες, είναι απαραίτητη η εξωτερική τροφοδοσία αντιοξειδωτικών για να αντισταθμιστούν οι βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες (Ratnam *et al.*, 2006; Reuter *et al.*, 2010). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να λειτουργήσουν ως προοξειδωτικά και να προκαλέσουν αντιδράσεις ελεύθερων ριζών (Škronánková *et al.*, 2012).

Η κατανάλωση φυτικών προϊόντων έχει συνδεθεί με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, η αρτηριακή υπέρταση, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ο διαβήτης, ο καρκίνος και άλλες νευρολογικές και εκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson. Η σύνδεση αυτή είναι άμεση καθώς τα προϊόντα αυτά διαθέτουν αντι-φλεγμονώδη, αντι-θρομβωτική, αντι-μικροβιακή, και αντι-νεοπλασματική δράση (Nassar *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2012).

Τα αντιοξειδωτικά συστατικά μπορούν να ενεργούν ανεξάρτητα ή περισσότερο αποτελεσματικά σε συνδυασμό όταν υπάρχει δηλαδή συνέργεια αυτών (ο συνδυασμός τους έχει ισχυρότερη δράση) με μία ποικιλία μηχανισμών (Dai & Mumper, 2010). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποδίδονται στα φλαβονοειδή λόγω της παρουσίας των φαινολικών υδροξυλομάδων που συνδέονται με δομές δακτυλίου και μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, δεσμευτές οξυγόνου ακόμη και να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα. Μπορούν επίσης να

ενεργοποιήσουν αντιοξειδωτικά ενζύμων και να αναστείλουν τις οξειδάσες. Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες χημικά έγκειται στο γεγονός ότι τα δυναμικά οξειδοαναγωγής των φλαβονοειδών ριζών 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; Procházková *et al.*, 2011). Τα φαινολικά οξέα δρουν ως χηλικές ενώσεις με σοβαρό αντίκτυπο στις υδρόξυ- και υπερόξυ- ρίζες (Terpinc *et al.*, 2011) ενώ τα καρτενοειδή δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου και μπορούν με αποσύνθεσή τους να σχηματίσουν ενώσεις που λειτουργούν ως τερματιστές των ελεύθερων ριζών καθώς ενώνονται με αυτές (Paiva and Russell, 1999).

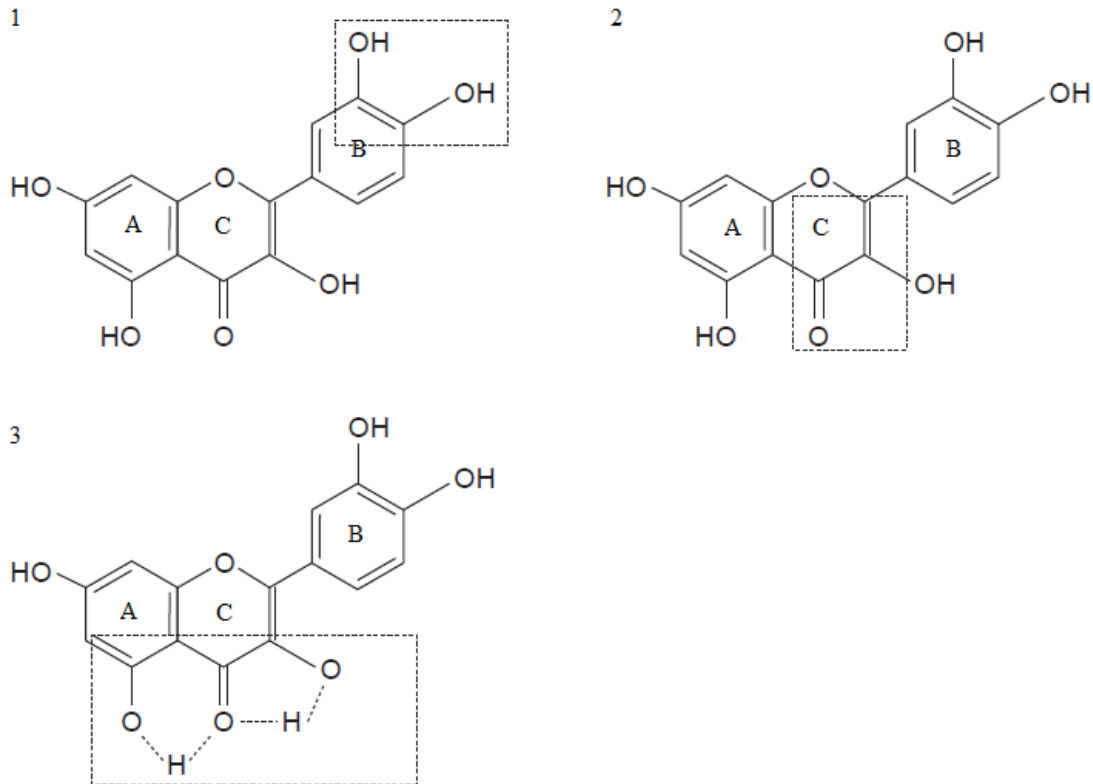
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από το χημικό τύπο και από τον τρόπο με τον οποίο είναι κατανεμημένες οι λειτουργικές ομάδες (-OH) στο μόριο. Οι απλές φαινολικές ενώσεις έχουν μικρότερη δράση σε σχέση με τις πολυμερείς φαινόλες σε μεθόδους που μπλοκάρουν την παρουσία ριζών (Moure *et al.*, 2001; Wright, 2001).

Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που απαιτούνται για την αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών συνοψίζονται παρακάτω (**Σχήμα 1.15**):

1. Ορθο-διυδροξυ δομή του δακτυλίου Β.
2. Διπλός δεσμός στις θέσεις 2,3 σε συζυγία με την 4-κετο-ομάδα.
3. Δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 5.

Η ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, ευθύνεται για τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων στον δακτύλιο Β ενώ η ταυτόχρονη παρουσία του *ο*- διφαινολικού τμήματος στον δακτύλιο Β έχει τον ρόλο του δότη Η για τη σταθεροποίηση των ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ των -OH στις θέσεις 3 και 5 με τη κετο-ομάδα, αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών (Rice-Evans *et al.*, 1996). Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται με την παρουσία γλυκοζιτών στο μόριο σε σχέση με το άγλυκο τμήμα (Rice-Evans *et al.*, 1996; Moure *et al.*, 2001).

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων σε σχέση με την δραστική καρβοξυλομάδα (Rice-Evans *et al.*, 1996). Μονο- υδροξυ υποκαταστημένα βενζοϊκά οξέα με την υδροξυλική ομάδα (-OH) σε όρθο- ή πάρα- θέση σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση ενώ συμβαίνει το αντίθετο όταν ο υποκατάστατος είναι σε μέτα- θέση. Παρατηρείται επίσης αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης με την αύξηση του βαθμού υδροξυλίωσης (Rice-Evans *et al.*, 1996).



Σχήμα 1.15 Κύρια δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών για αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών (Basu *et al.*, 1999)

Σε πρόσφατη έρευνα, μελετήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών της οικογένειας Lamiaceae (*Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum dictamnus* L., *Salvia officinalis* L., *Hyssopus officinalis* L.) για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, με διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης (εκχύλιση στους 80°C, σε θερμοκρασία δωματίου και σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια υπερήχων). Το φυτό *Melissa officinalis* L. επέδειξε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ το φυτό *Hyssopus officinalis* L. τη μικρότερη και με τους δύο τρόπους εκχύλισης. Είναι φανερό ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα επηρεάζεται από τον τρόπο εκχύλισης (Skotti *et al.*, 2014). Το φυτό *Rosmarinus officinalis* L. που ανήκει εξίσου στην οικογένεια Lamiaceae έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση η οποία οφείλεται κυρίως στην παρουσία αντιοξειδωτικών όπως το καρνοσικό οξύ και ροσμαρινικό οξύ (Wellwood & Cole, 2004).

Σε άλλη πρόσφατη έρευνα εξετάσθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτών: *Salvia officinalis*, *Achillea millefolium*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* και *Gentiana lutea*. Τα υδατικά εκχυλίσματα από τα φύλλα του *Achillea millefolium* και *Salvia officinalis* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη δράση στο σύνολο των φυτών, ενώ τα εκχυλίσματα από τη ρίζα του φυτού *Gentiana lutea* τη μικρότερη. Σε γενικές γραμμές τα μεθανολικά εκχυλίσματα επέδειξαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υδατικά. Η αντιοξειδωτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων πιθανόν οφείλεται στην παρουσία φαινολικών ενώσεων, όπως το ροσμαρινικό οξύ και άλλα φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή ή διτερπένια (*Salvia officinalis*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*) (Deans *et al.*, 2000; Skoula *et al.*, 2002), στην παρουσία σεσκιτερπενίων και

τριτερπενίων (*Achillea millefolium*) (Si *et al.*, 2006) και στην παρουσία φλαβονοειδών (*Gentiana lutea*) (Kusar *et al.*, 2006).

1.3.3 Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Τα φυτικά εκχυλίσματα αξιολογούνται για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με διάφορες μεθόδους οι οποίες μετρούν τα ολικά φαινολικά συστατικά, το σύνολο των φλαβονοειδών, το σύνολο των φλαβονολών, τα φαινολικά οξέα, τις κατεχίνες, τις λιγνάνες και τις τανίνες (Skotti *et al.*, 2014, Guimarães *et al.*, 2010).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες μετρούνται χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες μεθόδους: 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH), 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)-ABTS ή Ισοδύναμα Trolox- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity-TEAC, μέθοδος μέτρησης ικανότητας απορρόφησης ελεύθερων ριζών-Oxygen Radical Absorbance Capacity-ORAC, ολικές ρίζες υπεροξυλίου-Trapping Antioxidant Parameter Assay-TRAP, β-καροτένιο/λινολεϊκό οξύ, παρεμπόδιση της αυτοοξειδωσης της LDL, προσδιορισμός αναγωγικής δύναμης μέσω της ικανότητας αναγωγής του Fe³⁺ FRAP- Ferric anion Reducing Antioxidant Power.

Κάθε μέθοδος έχει συγκεκριμένο μηχανισμό και υπάρχουν τρεις βασικοί μηχανισμοί: μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), μεταφορά ηλεκτρονίων (Electron Transfer, ET) και συνδυασμός των δύο προηγούμενων (Prior *et al.*, 2005). Ο μηχανισμός HAT μετράει την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να αποσβένει ελεύθερες ρίζες μέσω δωρεάς υδρογόνου ενώ ο μηχανισμός ET ανιχνεύει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο με σκοπό τη μείωση των ριζών (Huang *et al.*, 2005). Η μέθοδος Folin-Ciocalteu προσδιορίζει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό ET, το ίδιο και οι μέθοδοι ABTS και FRAP. Η μέθοδος ORAC χρησιμοποιεί μηχανισμό HAT ενώ η δοκιμασία DPPH συνδυάζει και τους δύο μηχανισμούς. (Lu *et al.*, 2011; Opitz *et al.*, 2014; Αναστασάκη, 2014; Skotti *et al.*, 2014; Alarcón *et al.*, 2013). Στην περίπτωση των μεθόδων που βασίζονται σε αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων, λαμβάνει χώρα μία αντίδραση οξειδοαναγωγής με το οξειδωτικό. Σε αυτή την αντίδραση, το οξειδωτικό αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό, προκαλώντας αλλαγή στο χρώμα του οξειδωτικού. Ο βαθμός αλλαγής του χρώματος έχει αναλογική σχέση με τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών (Κανέλλου, 2011).

Τα εκχυλίσματα των φυτών περιέχουν λιπόφιλα και υδρόφιλα συστατικά, για αυτό το γεγονός είναι σημαντικό να επιλεγθεί με προσοχή μία συγκεκριμένη μέθοδος. Κάποιες μέθοδοι είναι περισσότερο ευαίσθητες σε λιπόφιλα συστατικά όπως οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν λιπιδικό υπόστρωμα (Παρεμπόδιση της αυτοοξειδωσης της LDL, του β-καροτένιο/λινολεϊκό οξύ) ενώ άλλες μέθοδοι έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε υδατικά αντιοξειδωτικά συστατικά όπως οι μέθοδοι του DPPH, TEAC, FRAP (Chun *et al.*, 2005).

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα μίας μεθόδου όπως είναι οι ιδιότητες των αντιοξειδωτικών μεταξύ λιπιδίων και υδατικής φάσης, οι συνθήκες οξείδωσης και η φυσική κατάσταση του οξειδωμένου υποστρώματος (Frankel *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1996). Παρά το γεγονός ότι είναι διαθέσιμες πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, είναι σημαντικό οι μέθοδοι αυτές να είναι σταθερές και ταχείες. Ενώ κάθε μέθοδος έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά, οι πιο αξιόπιστες και άμεσες μέθοδοι είναι οι ABTS και DPPH οι οποίες έχουν τροποποιηθεί και βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια (Duduku *et al.*, 2011).

1.3.3.1 Μέθοδος μέτρησης φαινολικών συστατικών- Folin-Ciocalteu (FC)

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) (Folin *et al.*, 1915) είναι μία εύκολη αναλυτική τεχνική με καλή επαναληψιμότητα για τον προσδιορισμό των συνολικών πολυφαινολών και βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1998). 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 και λαμβάνει χώρα μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου (Huang *et al.*, 2005).

Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 730 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Αναστασάκη, 2014). Το σύνολο των πολυφαινολών εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος τα οποία χρησιμοποιούνται σαν ποσοτικά πρότυπα (Chen *et al.*, 2015).

Στη συγκεκριμένη μέθοδο μετά από επώαση δείγματος και αντιδραστηρίων για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και απουσία φωτός, μετρείται η απορρόφηση στα 725 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis. Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τη χρήση αυτής της μεθόδου καθορίζεται από τα ισοδύναμα πρότυπα που χρησιμοποιούνται, από τη σειρά με την οποία προστίθενται τα αντιδραστήρια, και από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC), το οποίο περιέχει μολυβδαίνιο Mo (VI) (Folin *et al.*, 1927).

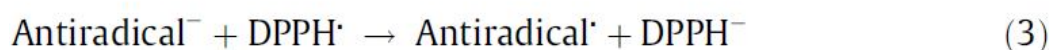
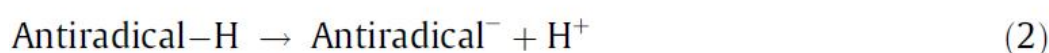
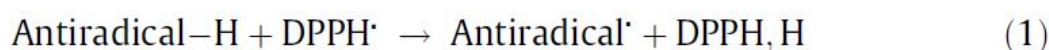
Η μέθοδος FC είναι απλή μέθοδος, δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό και είναι χρήσιμη για τον χαρακτηρισμό βοτανικών δειγμάτων (Prior *et al.*, 2005). Αν και εμφανίζει επαναληψιμότητα σε ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ενώσεων, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να επηρεαστούν από άλλα μη-φαινολικά μόρια (Rover *et al.*, 2013). Η μέθοδος FC μπορεί επίσης να επηρεάζεται από έναν αριθμό παρεμβαλλόμενων ουσιών, όπως σάκχαρα, αρωματικές αμίνες, διοξείδιο του θείου,

ασκορβικό οξύ, οργανικά οξέα κ.α. για αυτό το λόγο πρέπει να γίνονται οι κατάλληλες διορθώσεις (Prior *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Μέθοδος του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH

Η μέθοδος DPPH περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Blois το 1958 και αργότερα τροποποιήθηκε από διάφορους ερευνητές (Duduku *et al.*, 2011). Βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπαρών συστατικών και επομένως μετράται η ικανότητα περιορισμού των ελεύθερων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αποχρωματίζουν το διάλυμα του DPPH[•]. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ταχύτητας που απαιτείται για την ανάλυση και γιατί είναι ιδιαίτερα σταθερή. Το αντιδραστήριο DPPH[•] είναι μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα του οποίου παρουσιάζει έντονο ιώδες χρώμα, αντιδρά με ενώσεις που είναι δότες υδρογόνου και παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 515 nm (Škronánková *et al.*, 2012).

Το αντιδραστήριο DPPH ανάγεται είτε με άμεση μεταφορά υδρογόνου (**Σχήμα 1.16-αντίδραση 1**) ή με έμμεση μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων από την αντιοξειδωτική ένωση (**Σχήμα 1.16, αντιδράσεις 2-4**), με συνέπεια το προκύπτον μόριο DPPH₂ να χάνει μέρος της ικανότητάς του να απορροφά. Έτσι η αναγωγή του DPPH από αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως οι πολυφαινόλες, μπορεί να παρακολουθηθεί μέσω της μείωσης στην απορρόφηση στα 515 nm (Lecomte *et al.*, 2010). Μεγάλη μείωση στην απορρόφηση υποδεικνύει σημαντική αντιοξειδωτική δράση του συστατικού (Duduku *et al.*, 2011) ενώ ο αποχρωματισμός του DPPH υποδηλώνει την ύπαρξη αντιοξειδωτικών συστατικών.



Σχήμα 1.16 Αντιδράσεις αντιοξειδωτικών συστατικών και DPPH (Škronánková *et al.*, 2012).

Συνεπώς, η φασματοφωτομετρική αυτή μέθοδος χρησιμοποιεί τη ρίζα DPPH[•] ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος για 30 min, στους 25 °C μετράται η απορρόφηση στα 515 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται συγκεκριμένος τύπος ο οποίος αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

1.3.3.3 Μέθοδος του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος)- ABTS

Η μέθοδος ABTS αναπτύχθηκε από τους Rice-Evans και Miller το 1994 και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τους Re *et al.*, το 1999. Στην βελτιωμένη έκδοσή της, το ριζικό κατιόν ABTS^{•+} παράγεται από την οξειδωση του 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS²⁻) με υπερθειϊκά ιόντα (Duduku *et al.*, 2011). Η ρίζα του κατιόντος ABTS^{•+} έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα και αποχρωματίζεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών, οπότε ακολουθεί φωτομέτρηση στα 734 nm (Moon *et al.*, 2009). Η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογίζει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο των λιπόφιλων όσο και των υδρόφιλων συστατικών.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος για 6 min, στους 30°C μετράται η απορρόφηση στα 734 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται συγκεκριμένος τύπος, ο οποίος αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Η μέθοδος ABTS^{•+} μαζί με τη μέθοδο DPPH[•] είναι από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας σε φυτικά δείγματα (Duduku *et al.*, 2011).

1.4 Αντιμικροβιακή δράση

1.4.1 Γενικά

Κατά τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί η αντοχή των μικροοργανισμών λόγω της αδιάκριτης χρήσης των φαρμάκων. Αυτή η κατάσταση οδήγησε τους επιστήμονες να ερευνήσουν νέες αντιμικροβιακές ουσίες από διάφορες πηγές, όπως τα αρωματικά φυτά που είναι καλές πηγές αντιμικροβιακών παραγόντων (Chew *et al.*, 2012). Τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία ασθενειών καθώς αποτελούν μια άφθονη πηγή βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών. Επομένως, έχει ερευνηθεί η αντιμικροβιακή δράση μιας ποικιλίας φαρμακευτικών φυτών και των εκχυλισμάτων τους (Cantrell *et al.*, 1998; Cowan, 1999).

Ακόμη, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την αντιμικροβιακή δράση των φαρμακευτικών φυτών και των προϊόντων τους λόγω της εφαρμογής τους στην ασφάλεια των τροφίμων. Η παρουσία τους στα τρόφιμα μπορεί να μειώσει την εμφάνιση μικροβιακής επιμόλυνσης που προκαλείται από ανεπιθύμητους παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus*. Οι αντιμικροβιακές δραστικές ουσίες και τα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών έχουν την ικανότητα να βελτιώσουν τη

διατηρησιμότητα των τροφίμων και γενικά θα μπορούσαν να ελαχιστοποιήσουν τα παθογόνα και τις τοξίνες που παράγονται από μικροοργανισμούς (Škronánková *et al.*, 2012). Υπάρχουν περισσότερα από 1340 φυτά με μελετημένες αντιμικροβιακές ενώσεις και πάνω από 30.000 συστατικά τα οποία έχουν απομονωθεί από έλαια φυτών και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων (Tajkarimi *et al.*, 2010).

1.4.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες και αντιμικροβιακή δράση

Χρησιμοποιώντας μία κλασματοποίηση των βιοδραστικών φυτικών εκχυλισμάτων, έχουν απομονωθεί διαφορετικές κατηγορίες δευτερευόντων μεταβολιτών που εμφανίζουν αντιμικροβιακές δραστηριότητες. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν αποκαλύψει ότι η αντιμικροβιακή δραστηριότητα αυτών των φυτών οφείλεται κυρίως στα αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, τερπενοειδή, φαινολικές ενώσεις και στις τανίνες (Grayer *et al.*, 1994). Όλες οι κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση (αλκαλοειδή, τερπενοειδή, ακετοφαινόνες, φλαβονοειδή, ταννίνες κ.α.). Υπάρχουν επίσης, δευτερεύοντα συστατικά στα οποία οφείλεται ένα σημαντικό μέρος των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων πιθανόν λειτουργώντας συνεργιστικά με τα άλλα συστατικά. Ωστόσο, για να δράσουν αυτές οι ενώσεις αντιμικροβιακά *in vitro* και για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα στα τρόφιμα, απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών (Škronánková *et al.*, 2012).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατά τη διάρκεια διαφόρων μελετών έχουν δοκιμαστεί *in vitro* έναντι των ακόλουθων μικροοργανισμών:

- Θετικά κατά Gram βακτήρια, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Sarcinia flava*, *Sarcinia lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus hemolyticus* και *Streptococcus pneumonia*
- Αρνητικά κατά Gram βακτήρια, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* και *Shigella sonnei*
- Ζύμες, *Candida albicans*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torula glabrata*, *Torulopsis utilis*, *Torulopsis glabrata* και *Trichosporon capitatum*
- Μύκητες, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium tricinctum*, *Microsporum canis*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium spinulosum*, *Trichophyton rubrum* και *Trichophyton mentagrophytes* (Wink *et al.*, 2010).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών και των μικροβίων η οποία τελικά επάγει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη και κατανοητή. Φαίνεται να μην υπάρχει μόνο ένας μηχανισμός δράσης ή ότι δεν είναι μόνο μία ένωση υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση αλλά υπάρχει συνέργεια

πολλών ενώσεων (Wink *et al.*, 2010). Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών έναντι των μικροοργανισμών είναι οι ακόλουθοι: αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία (μήκος-σχήμα), αναστολή της κυτταρικής αναπνοής, μείωση της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής τριφωσφορικής αδενοσίνης που θεωρείται η 'βιολογική μπαταρία' των κυττάρων και αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης (Wink *et al.*, 2010). Επίσης, οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμφανίζουν τοξικότητα έναντι των μικροοργανισμών λόγω της αναστολής διαφόρων μικροβιακών ενζύμων, αναστολής της σύνθεσης των μικροβιακών νουκλεϊνικών οξέων, της απευθείας σύνδεσής τους με το μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα και της διατάραξης-αλλοίωσης της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Cowan, 1999).

Η αντιβακτηριακή και η αντιμυκητιακή δράση των φλαβονοειδών έχουν μελετηθεί επανειλημμένα, όμως ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για τον τρόπο δράσης τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τη σχέση δομής -δράσης και επίδρασης των φλαβονοειδών (π.χ. φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες και κατεχίνες) στη σύνθεση των DNA και RNA, αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Ορισμένες φλαβονόλες (π.χ. μυρικετίνη) έχουν πιο αποτελεσματική αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με φλαβανόνες και φλαβανόλες. Για την αντιμικροβιακή δράση είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός 3',4',5'-τριυδροξυ Β δακτυλίου και μίας ελεύθερης 3-υδροξυλομάδας (Wink *et al.*, 2010).

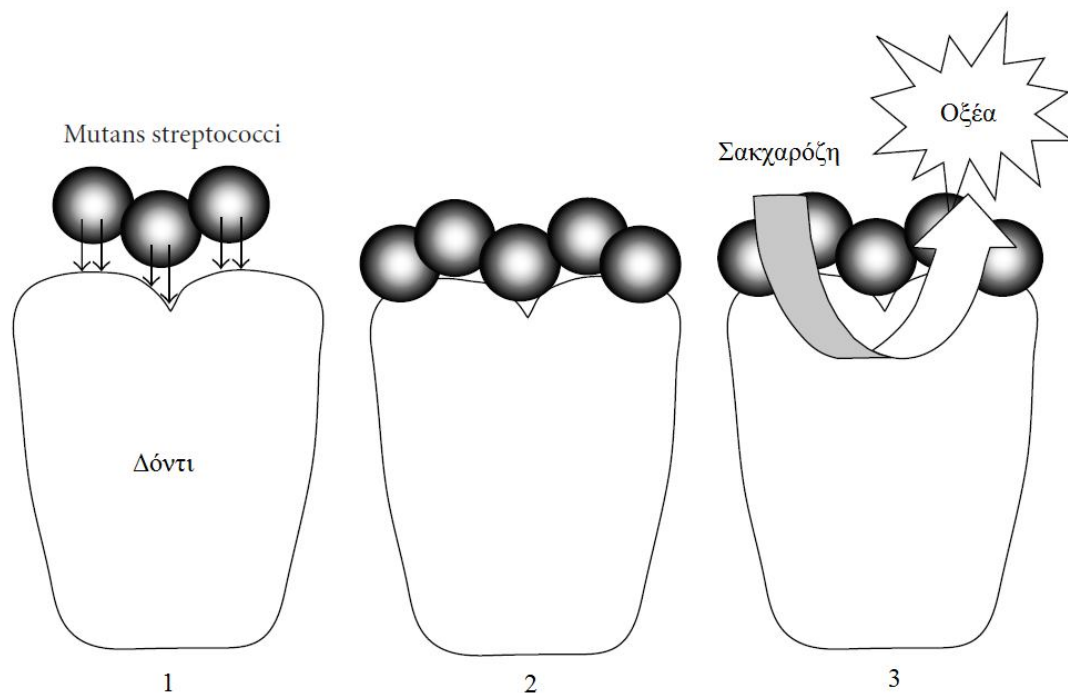
1.4.3 Αντιμικροβιακή δράση δευτερογενών μεταβολιτών έναντι μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας

Η στοματική κοιλότητα του ανθρώπινου οργανισμού είναι ένα δυναμικό περιβάλλον που εκτίθεται σε αλλαγές, όπως οι μεταβολές του pH, τα θρεπτικά συστατικά, η διαθεσιμότητα των υδατανθράκων και άλλα. Πάνω από 350 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών ζουν στη στοματική κοιλότητα, ο πληθυσμός των οποίων όταν είναι ισορροπημένος συμβάλλει στην πρόληψη ποικίλων ασθενειών. Παρόλο αυτά, αυτή η εύθραυστη ισορροπία μπορεί να διαταραχθεί από ενδογενείς παράγοντες που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση του οργανισμού, τη ροή του σάλιου και τη ρυθμιστική ικανότητα, όπως και από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η συχνή παρουσία σακχαρώζης στη διατροφή. Ένας αριθμός από αυτούς τους παράγοντες εμπλέκονται στις παθήσεις του στόματος, των δοντιών και των ούλων (Koo *et al.*, 2006; Jenkinson *et al.*, 2005; Bizzini *et al.*, 2012). Έτσι, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ασθενειών της στοματικής κοιλότητας και των δραστηριοτήτων των μικροβίων που αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του στόματος και αναπτύσσονται σε βιοϋμένια (Jenkinson *et al.*, 2005).

Η οδοντική πλάκα είναι ένα πολύπλοκο βιοϋμένιο το οποίο συσσωρεύεται στην επιφάνεια των δοντιών και αποτελείται από περισσότερα από 500 είδη βακτηρίων. Μία αρχική αποικία βακτηρίων προσκολλάται στην μεμβράνη που δημιουργεί το σάλιο στον σμάλτο του δοντιού και ακολουθεί η προσκόλληση άλλης βακτηριακής αποικίας (Rosan *et al.*, 2000). Το βιοϋμένιο είναι δύσκολο να εξαλειφθεί και είναι πηγή πολλών λοιμώξεων (McNeill *et al.*, 2004). Με τον όρο βιοϋμένιο εννοούμε μια μικροβιακή

κοινότητα που προσκολλάται σε μια επιφάνεια ή μεσεπιφάνεια, συνήθως εγκλειόμενη σε στρώμα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών παραγόμενων από τα ίδια τα μικρόβια.

Τα βακτήρια μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες και παράγουν πολυσακχαρίτες όπως η δεξτράνη από τη γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ από τη φρουκτόζη. Η σύνθεση κολλώδους, αδιάλυτης γλυκάνης από τη σακχαρόζη, προάγει τη σταθερή προσκόλληση των βακτηρίων στην επιφάνεια του δοντιού και έτσι συμβάλλει στο σχηματισμό της οδοντικής πλάκας (**Εικόνα 1.1**) (Hayacibara *et al.*, 2005; Fejerskov *et al.*, 2007). Οι γλυκοσυλτρανσφεράσες είναι ένζυμα που παράγονται από τα βακτήρια και τα οποία χρησιμοποιούνται για την σύνθεση της αδιάλυτης γλυκάνης από τη σακχαρόζη και την προσκόλληση των βακτηρίων στην επιφάνεια των δοντιών. Ευθύνονται και οι γλυκοσυλτρανσφεράσες για τη συσσώρευση των βακτηρίων στην οδοντική επιφάνεια. Μάλιστα μελετάται ιδιαίτερα η βακτηριακή προσκόλληση σε προϋπάρχουσα πλάκα εξετάζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων βακτηριακών στελεχών (Newman *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Fejerskov *et al.*, 2007).



Εικόνα 1.1 Σχηματισμός οδοντικής πλάκας. 1: Αρχική προσκόλληση των βακτηρίων 2: συσσωμάτωση μέσω της σύνθεσης πολυσακχαρίτη 3: μεταβολισμός των υδατανθράκων που οδηγεί σε παραγωγή οξέων (Palombo, 2011).

Τα οξέα όπως το γαλακτικό οξύ, που παράγονται από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων από τα βακτήρια, διαλύουν το φωσφορικό ασβέστιο των δοντιών προκαλώντας απασβέστωση και τελικά φθορά. Η τερηδόνα έχει υπερουλικό χαρακτήρα, δηλαδή, σχηματίζεται πάνω από τα ούλα (Loesche, 2007) από την ομάδα των στρεπτόκοκκων mutans. Αυτή η ομάδα αποτελείται από οξεάντοχα θετικά κατά Gram βακτήρια (*Streptococcus mutans* και *Streptococcus. sobrinus* (Tichy *et al.*, 1998; Jenkinson *et al.*, 2005).

Αντίθετα, οι περιοδοντικές ασθένειες, έχουν υποουλικό χαρακτήρα, δηλαδή σχηματίζονται κάτω από τα ούλα. Η ανάπτυξή τους έχει συνδεθεί με αναερόβια αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως τα: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus* sp., *Prevotella* sp. and *Fusobacterium* sp. (Tichy *et al.*, 1998; Jenkinson *et al.*, 2005). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι περιοδοντικές ασθένειες σχετίζονται με μια ανισορροπία μεταξύ ελεύθερων ριζών και αντιοξειδωτικών στον οργανισμό, τόσο λόγω της αύξησης της παραγωγής ελεύθερων ριζών όσο και λόγω της μειωμένης συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης του σάλιου. Υπάρχουν σήμερα άφθονα στοιχεία που αποδεικνύουν το ρόλο των ελεύθερων ριζών στην καταστροφή των περιοδοντικών ιστών (Atsumi *et al.*, 2007; Diab-Ladki *et al.*, 2003).

Από βιοχημική άποψη, τα βακτήρια στο βιοϋμένιο είναι πάντα μεταβολικά ενεργά προκαλώντας διακυμάνσεις στο pH. Αυτές οι διακυμάνσεις μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια των ανόργανων συστατικών από τα δόντια όταν το pH μειώνεται ή αύξηση της συγκέντρωσης των ανόργανων συστατικών όταν το pH αυξάνεται (Filoche *et al.*, 2010). Το συσσωρευτικό αποτέλεσμα αυτών των αντίθετων διαδικασιών (αύξηση-μείωση των ανόργανων συστατικών) έχει ως συνέπεια την απώλεια των ανόργανων συστατικών, που με τη σειρά της οδηγεί σε διάλυση των σκληρών ιστών και στο σχηματισμό τερηδόνας (Kidd *et al.*, 2004).

Η ομάδα των στρεπτόκοκκων *mutans* περιλαμβάνει τους: *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, και *S. ferus* και έχουν πολλές βιοχημικές και γενετικές διαφορές μεταξύ τους (Hardie *et al.*, 1998; Theodore *et al.*, 2006). Οι *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* θεωρούνται από τους κυριότερους μικροοργανισμούς της στοματικής μικροχλωρίδας που προκαλούν τερηδόνα και συγκεκριμένα ο *Streptococcus mutans* εμπλέκεται σε όλους τους τύπους τερηδόνας (Theodore *et al.*, 2006; Loesche *et al.*, 1986; Hamada *et al.*, 1980).

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες καταπολέμησης της στοματικής πλάκας διαθέσιμοι στο εμπόριο, όμως οι χημικές ουσίες που περιέχουν μπορούν να μεταβάλλουν τη μικροβιακή χλωρίδα του στόματος και να έχουν ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως ο έμετος, η διάρροια, η χρώση των δοντιών, η παροδική απώλεια γεύσης, τοξικές επιδράσεις στους ιστούς, ξηρότητα, πόνο και αλλεργικές επιδράσεις, (Ciancio, 1995 ; Park *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 2006; McCullough *et al.*, 2008; Lindhe *et al.*, 2008). Επίσης, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις βακτηρίων που έχουν αναπτύξει αντοχή στα περισσότερα (αν όχι σε όλα) τα αντιβιοτικά που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων του στόματος (πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη και μετρονιδαζόλη) (Bidault *et al.*, 2007). Άλλοι αντιβακτηριακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και τη θεραπεία των νόσων του στόματος, συμπεριλαμβανομένων των χλωριούχου κετυλοπυριδινίου, χλωρεξιδίνης και φθοριούχων ενώσεων, προκαλούν χρώση των δοντιών ή συνδέονται ακόμα και με τον καρκίνο του στόματος (Knoll *et al.* 2002; Lachenmeier *et al.*, 2008; Neumegen *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007).

Ως εκ τούτου, τα φυσικά προϊόντα που έχουν απομονωθεί από τα φυτά και χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και χρόνια, μπορεί να αποτελέσουν ασφαλή και αποτελεσματικά υποκατάστατα των συνθετικών χημικών ουσιών και να

χρησιμοποιηθούν σε προϊόντα διατροφής, στοματικής υγιεινής και σε φαρμακευτικά σκευάσματα (Prabu *et al.*, 2006, Smullen *et al.*, 2012). Πολλά παραδοσιακά φαρμακευτικά φυτά έχουν αξιολογηθεί για την πιθανή εφαρμογή τους στην πρόληψη ή θεραπεία ασθενειών του στόματος. Μια σειρά από μελέτες έχει διερευνήσει τη δράση των εκχυλισμάτων των φυτών έναντι των παθογόνων του στόματος, ενώ άλλες έχουν επικεντρωθεί στην ικανότητά τους να αναστέλλουν το σχηματισμό του βιοϋμενίου μειώνοντας την προσκόλληση των μικροβίων στην επιφάνεια του δοντιού, κάτι που αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο στον σχηματισμό της οδοντικής πλάκας και στην εξέλιξη της φθοράς των δοντιών και των περιοδοντικών παθήσεων (Steinberg *et al.*, 2004).

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει την αντιβακτηριακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων (Ross *et al.*, 1980; Scheie 1989; Shapiro *et al.* 1994; Van der Weijden *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 1999; Morgan *et al.* 2001, Wagner *et al.*, 2008; More *et al.*, 2008; Antonio *et al.*, 2011; Nam-Hui Yim *et al.*, 2013; Ocheng *et al.*, 2014; Dicler *et al.*, 2014) έναντι των παθογόνων του στόματος. Τα εκχυλίσματα αποτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και προλαμβάνουν την προσκόλλησή τους στο σμάλτο του δοντιού, εμποδίζοντας τη δράση των γλυκοσυλτρανσφερασών (Ribeiro *et al.*, 2007; Fejerskov *et al.*, 2007).

Η αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων αποδίδεται στις πολυφαινόλες οι οποίες προκαλούν δομικές ή λειτουργικές βλάβες στη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη (Yoo, *et al.*, 2011). Αρκετές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι λειτουργικές υδροξυλομάδες και οι συζυγικοί διπλοί δεσμοί των δευτερογενών μεταβολιτών πιθανόν να εμπλέκονται στην σύνδεση με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Τα μικροβιακά κύτταρα επηρεάζονται αρνητικά από τα φυσικά προϊόντα μέσω διαφόρων μηχανισμών που προσβάλλουν τη διπλή στοιβάδα φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και διαταράσσουν τα ενζυμικά συστήματα (Proestos *et al.*, 2008). Επιπλέον, τα φυτικά εκχυλίσματα προκαλούν την μειωμένη λειτουργία μιας σειράς ενζύμων τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του μεταβολισμού του *Streptococcus mutans*, όπως τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των αμινοξέων, υδατανθράκων, λιπιδίων και νουκλεοτιδίων και για τη μετάφραση (Brighenti *et al.*, 2008).

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα αναφορικά με τα εκχυλίσματα φυτών και τους μικροοργανισμούς του στόματος διαιρούνται σε *in vitro* μελέτες που διερευνούν την επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων έναντι των μικροβίων, σε *in vitro* μελέτες που διερευνούν την επίδραση συγκεκριμένων πολυφαινόλων έναντι των μικροβίων και σε *in vivo* μελέτες (Petti *et al.*, 2009) στις οποίες δεν θα αναφερθούμε. Οι *in vitro* μελέτες με εκχυλίσματα φυτών υποδεικνύουν δραστηριότητα έναντι των διαφόρων μεταβολικών δραστηριοτήτων των βακτηρίων, με αποτέλεσμα να υπάρχει μείωση στην ανάπτυξή τους. Αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στις πολυφαινόλες επειδή τα φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν και άλλα συστατικά (Petti *et al.*, 2009).

Οι Tichy και Novak (1998) μελέτησαν μια συλλογή από 27 εκχυλίσματα φυτών και κάποια από αυτά επέδειξαν ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των

στρεπτόκοκκων της στοματικής κοιλότητας. Τα πιο ενεργά εκχυλίσματα προέρχονται από τα φυτά: *Abies Canadensis* (Pinaceae), *Albizia julibrissin* (Fabaceae), *Chelidonium majus* (Papaveraceae), *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Juniperus virginiana* (Cupressaceae), *Pinus virginiana* (Pinaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), *Sassafras albidum* (Lauraceae), *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) και *Thuja plicata* (Cupressaceae).

Οι Iauk *et al.* (2003) αξιολόγησαν την ικανότητα αφεψημάτων και εκχυλισμάτων μεθανόλης ενός αριθμού φαρμακευτικών φυτών, να αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων που λαμβάνονται από το περιοδοντικό υγρό σε ασθενείς με περιοδοντίτιδα. Σε γενικές γραμμές, τα εκχυλίσματα μεθανόλης έδειξαν μεγαλύτερη δράση σε σύγκριση με τα αφεψήματα.

Σε άλλη μελέτη, εκχυλίσματα αιθανόλης από το φυτό *Piper cubeba* (Piperaceae) παρουσίασαν καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι μιας σειράς παθογόνων που προκαλούν τερηδόνα (MIC = 90–200 µg/mL), αν και δεν δίδονται πληροφορίες σχετικά με την δράση έναντι των παθογόνων που προκαλούν περιοδοντίτιδα (Silva *et al.*, 2007). Για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα ενός εκχυλίσματος έναντι μικροοργανισμών λαμβάνεται υπόψη η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) που ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που υπό καθορισμένες *in vitro* συνθήκες, εμποδίζει την εμφάνιση ορατής ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού εντός ενός καθορισμένου χρονικού διαστήματος. Εκχυλίσματα με MIC <100 µg/mL και απομονωμένα φυτοχημικά με MIC <20 µg/mL, μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη προϊόντων με σκοπό την αντιμετώπιση συγκεκριμένων μικροοργανισμών (Palombo, 2009).

Κρύα και ζεστά αφεψήματα όπως και εκχυλίσματα αιθανόλης από τα φυτά *Breynia nivosus* (Euphorbiaceae) και *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) ελέγχθηκαν για τη δράση τους έναντι του *Streptococcus mutans*. Ενώ τα αφεψήματα και αιθανολικά εκχυλίσματα (MIC >25mg/mL) του *Breynia nivosus* παρουσίασαν δραστηριότητα, κανένα από τα αφεψήματα και εκχυλίσματα του *Ageratum conyzoides* δεν είχε δράση. Ωστόσο, ο συνδυασμός των αιθανολικών εκχυλισμάτων των δύο φυτών, είχε συνεργιστική δράση (Amadi *et al.*, 2007).

Οι Smullen *et al.*, (2012) προσδιόρισαν την ικανότητα εμπορικών διαθέσιμων εκχυλισμάτων και εκχυλισμάτων προπανόνης (PE) τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Streptococcus mutans* και άλλων παθογόνων του στόματος. Όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν δράση, με το PE εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δράση έναντι του *Streptococcus mutans* (MIC=500 µgml⁻¹). Τα εκχυλίσματα PE του πράσινου τσαγιού και των κόκκων κακάο ήταν πιο δραστικά έναντι των υπόλοιπων παθογόνων. Συνολικά, τα εμπορικά εκχυλίσματα δεν ήταν τόσο δραστικά όσο τα εκχυλίσματα PE. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα εκχυλίσματα που περιέχουν πολυφαινόλες μπορεί να διαδραματίσουν προληπτικό ρόλο έναντι της τερηδόνας (Palombo, 2011).

Το φυτό *Helichrysum italicum* (Compositae) το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στις παραμεσόγειες περιοχές, έχει αποδειχθεί ότι έχει διάφορες βιολογικές ιδιότητες.

Μάλιστα, εκχύλισμα αιθανόλης από το άνθος βρέθηκε ότι ασκεί αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* και *Streptococcus sobrinus* (MIC 31,25 -62,5 µg/ml) (Nostro *et al.*, 2004).

Σε μία άλλη μελέτη εξετάστηκε μια σειρά από φυτικά εκχυλίσματα, *Cocos nucifera* (Palmae), *Ziziphus joazeiro* (Rhamnaceae), *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) και *Aristolochia cymbifera* (Aristolochiaceae), τα οποία ήταν ενεργά έναντι των βακτηρίων του στόματος, με το αιθανολικό εκχύλισμα από το *Aristolochia cymbifera* να είναι το πιο αποτελεσματικό (MIC=0.1-4.0mg/mL) (Alviano *et al.*, 2008). Αντίστοιχη μελέτη, στα φυτά *Annona senegalensis* (Ammonaceae), *Euclea natalensis* (Ebenaceae) έδειξε ότι τα εκχυλίσματά τους ήταν ιδιαίτερα δραστικά (MIC > 25mg mL⁻¹) (More *et al.*, 2008).

Επίσης, ένας αριθμός από τα συστατικά του τσαγιού, *Camelia sinensis* (Theaceae), εμφάνισε δράση κατά της τερηδόνας μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως: επιπτώσεις στην ανάπτυξη των βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας, πρόληψη της προσκόλλησης των βακτηρίων στην επιφάνεια των δοντιών, αναστολή της παραγωγής γλυκάνης. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε σε μονομερείς πολυφαινόλες και συγκεκριμένα στις κατεχίνες, όπως η επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη και γαλλικού επιγαλλοκατεχινυλεστέρα (Hamilton-Miller *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2004).

Η ναριγκενίνη που ανήκει στα φλαβονοειδή και συνήθως συναντάται στα εσπεριδοειδή, παρεμποδίζει την ανάπτυξη περιοδοντικών παθογόνων και άλλων βακτηρίων του στόματος (MIC=9.8–125mg/ mL)(Tsui *et al.*, 2008).

Εξετάσθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα φλούδας ροδιού διαφορετικών συγκεντρώσεων 4 mg/mL, 8 mg/mL, και 12 mg/mL για την δράση τους ως προς την ανάπτυξη βακτηρίων του στόματος. Τα εκχυλίσματα με συγκεντρώσεις 8 mg/mL και 12 mg/ml ήταν αποτελεσματικά έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus salivarius* (Abdollahzadeh *et al.*, 2011). Σε μία άλλη παρόμοια *in vitro* μελέτη, το εκχύλισμα ροδιού (αιθανόλη:νερό) είχε ανασταλτική επίδραση κατά του *Streptococcus mutans* (Pinon *et al.*, 2012).

Σε άλλη πρόσφατη έρευνα, μελετήθηκαν εκχυλίσματα εξανίου, αιθανόλης όπως και υδατικά εκχυλίσματα 72 φυτών με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well Diffusion Assay-WDA) έναντι των *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* και άλλων μικροβίων του στόματος. Από τα φυτά αυτά, 22 έδειξαν αξιόλογη δράση και ισχυρότερη τα : *Cotinus coggygria* Scop., *Equisetum hyemale* L., *Helichrysum litoreum* Guss, *Juniperus communis* L., και *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman subsp. *scolopendrium*. (Ferrazzano *et al.*, 2013). Το υδατικό εκχύλισμα του *Cotinus coggygria* είχε τη μεγαλύτερη επίδραση και ήταν δραστικό έναντι όλων των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν. Το εκχύλισμα εξανίου του *Juniperus communis* ανέστειλε την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων εκτός του *Lactobacillus casei*. Το αιθανολικό εκχύλισμα του *Helichrysum litoreum* ήταν αποτελεσματικό έναντι των *Streptococcus mutans* και *A. viscosus*, ενώ το αιθανολικό εκχύλισμα του *Phyllitis scolopendrium* subsp. *scolopendrium* είχε αποτέλεσμα κατά του *Streptococcus mutans* και *Lactobacillus casei*. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα των *Bellis perennis* και *Ceterach officinarum* Willd. s.l. επέδειξαν μια μικρή ανασταλτική δράση έναντι του *Streptococcus sobrinus*, ενώ του *Thymus vulgaris* L. s.l.

εμφάνισε μια ήπια δράση έναντι των *Streptococcus sobrinus* και *Lactobacillus casei*. Όλα τα βακτηριακά στελέχη ήταν περισσότερο ευαίσθητα στα αιθανολικά και έπειτα στα υδατικά εκχυλίσματα. Τα ακριβή αίτια δεν είναι ξεκάθαρα, πιθανόν το αιθανολικό εκχύλισμα να περιέχει περισσότερα φλαβονοειδή τα οποία είναι ιδιαίτερα διαλυτά σε αλκοόλες. Το υδατικό εκχύλισμα περιέχει περισσότερες πολικές ενώσεις (Nikitina *et al.*, 2007) οι οποίες είναι λιγότερο ενεργές έναντι των μικροοργανισμών αυτών λόγω της ισχυρής υδροφοβικότητας της κυτταρικής τους επιφάνειας (Weiss, 1982). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το φυτό *Thymus vulgaris* δεν επέδειξε ιδιαίτερη δράση, παρόλο που είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες (Panizzi *et al.*, 1993) και αυτό ίσως οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν έντονα την ποσότητα των δραστικών ενώσεων του φυτού (Hernandez *et al.*, 2009).

Ορισμένα φυτικά προϊόντα έχουν ερευνηθεί λόγω της δυνατότητάς τους να ελέγχουν την ανάπτυξη του βιοϋμενίου, συμπεριλαμβανομένων των εκχυλισμάτων μπιζελιού (*Pisum sativum*) (Hentzer *et al.*, 2003) και των εκχυλισμάτων από φύλλα μουριάς (*Morus alba*) (Islam *et al.*, 2008). Μετά από φαρμακευτική αξιολόγηση, προστέθηκαν εκχυλίσματα από τα συγκεκριμένα φυτά σε στοματικά διαλύματα, οδοντόπαστες και άλλα προϊόντα στοματικής υγιεινής, προκειμένου να καταστεί πιο αποτελεσματική η πρόληψη του σχηματισμού του βιοϋμενίου (Dicler *et al.*, 2014).

1.5 Περιγραφή των φυτών

1.5.1 Κρόκος (*Crocus sativus* L.)- Οικογένεια Iridaceae



Εικόνα 1.2 Κρόκος (*Crocus sativus* L.)

Ο κρόκος (**Εικόνα 1.2**) είναι πολυετές φυτό και οι απόψεις δίστανται όσον αφορά την προέλευσή του, με πιθανότερη εκδοχή να κατάγεται από την Ελλάδα από όπου διαδόθηκε στην Ανατολή και στη συνέχεια σε άλλες περιοχές. Συναντάται σαν αυτοφυές ή καλλιεργούμενο στην κεντρική και νοτιοδυτική Ασία, στη βόρεια Αφρική και σε χώρες της Ευρώπης. Συγκεκριμένα, καλλιεργείται στο Ιράν, στην Ισπανία, στο Μαρόκο, στην Κίνα και στη Νέα Ζηλανδία. Στην Ελλάδα καλλιεργείται στην περιοχή της Κοζάνης

Ανήκει στην οικογένεια Iridaceae και σχηματίζει υπόγειους βλαστούς με διάμετρο 3-5 cm οι οποίοι ονομάζονται κόρμοι, έχουν σχήμα σφαιρικό και καλύπτονται από τρεις προστατευτικούς χιτώνες. Κατά την περίοδο της άνθισης, αναπτύσσεται από τον κόρμο ένας λεπτός βλαστός που εξελίσσεται σε φύλλα και άνθη. Τα φύλλα του είναι παράρριζα, 4-10 σε κάθε κόρμο, έχουν βαθυπράσινο χρώμα και στενόμακρο, σπαθωτό σχήμα. Τα άνθη έχουν ιώδες χρώμα, έξι χωριστά πέταλα, τρεις κίτρινους στήμονες και ωοθήκη με στύλο που χωρίζεται σε τρία κόκκινα στίγματα τα οποία και αποτελούν το εμπορεύσιμο τμήμα του φυτού (Κουτσός 2006; Δόρδας, 2012). Κατά τη διάρκεια του χρόνου παραμένει μέσα στο έδαφος και περίπου στο τέλος του Σεπτεμβρίου εμφανίζεται από το έδαφος. Ο κρόκος καλλιεργείται κυρίως για τα στίγματά του τα οποία χρησιμοποιούνται σαν μπαχαρικό αλλά και σαν χρωστική (Ulbricht *et al.*, 2011).

Η φυτοχημική ανάλυση διαφόρων μερών του κρόκου έχει δείξει ότι το φυτό είναι πλούσιο σε καροτενοειδή φλαβανοειδή και ανθοκυανίνες (Vignolini *et al.*, 2008; Montoro *et al.*, 2008) αλλά είναι αξιοσημείωτη και η παρουσία άλλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως αλκαλοειδών, ταννινών, τερπενοειδών, στεροειδών, ιδιαίτερα στα

πέταλα του κρόκου (Vijender *et al.*, 2011). Το χαρακτηριστικό χρώμα του κρόκου αποδίδεται στις ανθοκυανίνες δελφινιδίνη και πετουνιδίνη ενώ τα πέταλα και τα σέπαλα είναι πλούσιες πηγές γλυκοζυλιωμένων φλαβονολών (Montoro *et al.*, 2008; Termentzi *et al.*, 2008, Vignolini *et al.*, 2008).

Οι σημαντικότερες ενώσεις των στιγμάτων του κρόκου είναι τα καροτενοειδή (κροκετίνη, κροκίνη, α-καροτένιο, λυκοπένιο, ζεξανθίνη), μονοτερπενικές αλδεΐδες (πικροκροκίνη και σαφρανάλη), μονοτερπενοειδή, ισοφορόνες και φλαβονοειδή (Melnyk *et al.*, 2010; Bathaie and Mousavi, 2010). Τα καροτενοειδή όπως η κροκετίνη και οι γλυκοζίτες της (κροκίνη) συνεισφέρουν στο χρώμα ενώ οι μονοτερπενικές αλδεΐδες όπως η πικροκροκίνη και το παράγωγό της σαφρανάλη είναι υπεύθυνες για την πικρή γεύση και το άρωμα του κρόκου (Bhargava, 2011). Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τις ιδιότητες του κρόκου αναφορικά με την υγεία του ανθρώπου λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης των συστατικών του (Abdullaev, 2002; Abdullaev, 2003; Abdullaev, 2004).

Παραδοσιακά χρησιμοποιείται σαν αναλγητικό και αντιφλεγμονώδες, αντιμικροβιακό, αντισπασμωδικό, αποχρεμπτικό, για την τόνωση του καρδιαγγειακού συστήματος, σε παθήσεις του στομαχιού, κατά της δυσεντερίας και του ίκτερου, σαν ηρεμιστικό και χαλαρωτικό και κατά της κατάθλιψης. Επίσης, χορηγείται τοπικά σε παθήσεις του δέρματος (Abdullaev *et al.*, 2004; Bhargava, 2011; Javadi *et al.*, 2003; Mousavi *et al.*, 2011; Ríos *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2008).

Το φαινολικό περιεχόμενο των τεπάλων του κρόκου και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα (Nørnbæk *et al.*, 2002; Termentzi *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2011, 2012; Sanchez-Vioque *et al.*, 2012; Goupy *et al.*, 2013). Ενώ, οι στήμονες του κρόκου έχουν παρουσιάσει σημαντική αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δράση, υποδεικνύοντας έτσι την επέκταση των πιθανών χρήσεων του φυτού (Zheng *et al.*, 2007).

Από μελέτη προέκυψε ότι η αντιοξειδωτική δράση των καροτενοειδών του κρόκου είναι πιο ισχυρή σε σχέση με της σαφρανάλης. Παρόλο αυτά, η συνεργιστική δράση όλων των συστατικών προσδίδει στον κρόκο συγκεκριμένη αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία, μπορεί να προστατεύσει το DNA και RNA από επιβλαβείς αντιδράσεις (Kanakakis *et al.*, 2009). Ακόμη η κροκίνη έχει επιδείξει αξιόλογες ιδιότητες καθώς επιδρά στη μάθηση και στη μνήμη (Pitsikas *et al.*, 2007; Ghadrdoost *et al.*, 2011; Hosseinzadeh *et al.*, 2012). Η αντιφλεγμονώδη δράση της κροκίνης βασίζεται στην αντιοξειδωτική της ικανότητα (Kawabata *et al.*, 2012).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο κρόκος έχει δράση κατά της νόσου του Alzheimer και η κροκίνη δρα ανασταλτικά προς την ακετυλοχολινεστεράση (Geromichalos *et al.*, 2012). *In vitro* όπως και *in vivo* μελέτες αποκαλύπτουν ότι ο κρόκος δύναται να χρησιμοποιηθεί σαν αγχολυτικό και αντικαταθλιπτικό (Akhondzadeh *et al.* 2004; Pitsikas *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Noorbala *et al.*, 2005). Ο κρόκος επιδρά επιπλέον στο καρδιαγγειακό σύστημα ενάντια στην αθηροσκλήρωση, υπερλιπιδαιμία και υπέρταση όπως αποδεικνύουν *in vivo* και *in vitro* μελέτες (He *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007). Χάρη στην παρουσία της κροκετίνης, μειώνονται τα επίπεδα της

χοληστερόλης στο αίμα και έμμεσα μειώνεται ο κίνδυνος καρδιαγγειακών παθήσεων (Giaccio, 2004). Εκχυλίσματα από τα στίγματα και πέταλα του κρόκου εμφανίζουν αντικαρκινική δράση καθώς εμποδίζουν την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων καρκινικών κυττάρων η οποία συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική δράση λόγω του ότι τα συστατικά του κρόκου εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών (Nair, 1994; Tarantilis *et al.*, 1994a; Molnar, 2000; Hosseinzadeh *et al.*, 2005a; Aung *et al.*, 2007; Chryssanthi *et al.*, 2007; Zheng, 2007).

1.5.2 Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.)-Οικογένεια Lamiaceae



Εικόνα 1.3 Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.)

Το μελισσόχορτο (Εικόνα 1.3) είναι αυτοφύες φυτό των μεσογειακών χωρών της Ευρώπης και ο τόπος καταγωγής του θεωρείται η νότια Ευρώπη. Το συναντούμε επίσης σε περιοχές της βόρειας Αφρικής. Στην Ελλάδα αυτοφύεται σε υγρές πεδινές αλλά και ορεινές δασώδεις εκτάσεις(υψόμετρο μέχρι 800 μ.) της Θράκης, της Μακεδονίας και των νησιών του Ιονίου πελάγους. Καλλιεργείται σε χώρες της νότιας και βόρειας Ευρώπης, της Αμερικής και της δυτικής Ασίας.

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και είναι πολυετής πόα με βλαστό τετραγωνικό με αραιό τρίχωμα, πολύκλαδο και ύψος 40-100 m. Τα φύλλα έχουν επιφάνεια τραχειά, είναι καρδιόσχημα ελαφρώς οδοντωτά με μίσχο μακρύ, αυλακωτό, μήκους 2-8 cm και έχουν χαρακτηριστική οσμή λεμονιού. Η ανθοφορία ξεκινά τον Ιούνιο και ολοκληρώνεται τον Αύγουστο. Τα άνθη του (4-12) είναι δίχειλα, 10-14 mm,

μελιτογόνα με χρώμα άσπρο ή ροδίζον ή κίτρινο ανάλογα με την ποικιλία (Κουτσός, 2006; Moradkhani *et al.*, 2010; Δόρδας, 2012).

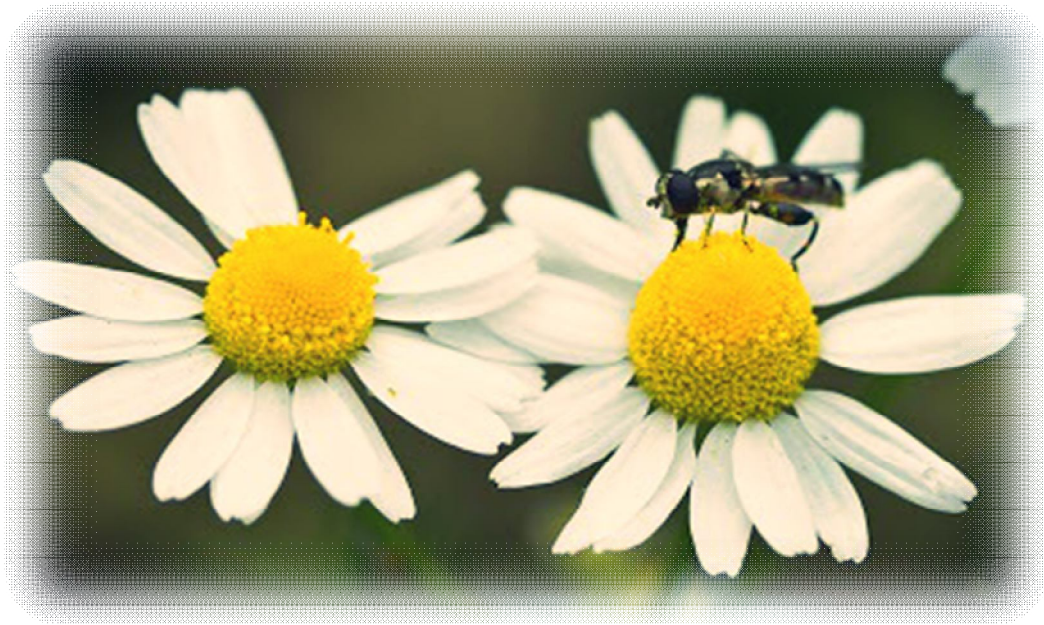
Το μελισσόχορτο έχει μια σύνθετη χημική σύνθεση και σε αυτό απαντώνται πολλές ομάδες συστατικών συμπεριλαμβανομένων των υδροξυκινναμωμικών οξέων (ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ). Υπάρχουν επίσης και άλλα συστατικά, όπως τα φλαβονοειδή, π.χ. γλυκοζίτες της λουτεολίνης, κερκετίνης, απιγενίνης και καεμφερόλης (Arceusz *et al.*, 2013; Dastmalchi *et al.*, 2008; Bolkent *et al.*, 2005; Salah and Jäger, 2005; Gazola *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2003; Ziaková *et al.*, 2003; Heitz *et al.*, 2000; Carnat *et al.*, 1998).

Για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων και στην παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιούνται αποξηραμένα ή φρέσκα φύλλα τα οποία έχουν συνήθως ανθισμένες κορυφές (Carnat *et al.*, 1998; Janina, 2003; Dastmalchi *et al.*, 2008). Παραδοσιακά χορηγείται σε μορφή αφεψήματος, σε περίπτωση πυρετού, κρυολογήματος, πονοκεφάλου, πονόδοντου, δυσπεψίας, κολικού, αναιμίας, υπερθυρεοειδισμού, υπέρτασης, ρευματισμών και άσθματος. Βοηθά στην καλή λειτουργία του κυκλοφορικού και καρδιακού συστήματος, προκαλώντας διαστολή των περιφερειακών αγγείων και μειώνοντας έτσι την πίεση του αίματος. Ενισχύει τη μνήμη και συμβάλλει θετικά σε περιπτώσεις κατάθλιψης, αϋπνίας και άγχους. Επίσης, χρησιμοποιείται ως ηρεμιστικό, αντισπασμωδικό, αφιδρωτικό και για την αντιμετώπιση δερματολογικών προβλημάτων και ερεθισμών (Δόρδας, 2012; Dastmalchi *et al.*, 2008; Salah and Jäger, 2005; Herodez *et al.*, 2003; Anon, 2002; Carnat *et al.*, 1998).

Επιστημονικές αναφορές δείχνουν ότι το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου διαθέτει αντιερπητικές ιδιότητες ενώ το εκχύλισμα υπολιπιδαιμικές (Schnitzler *et al.*, 2008; Bolkent *et al.*, 2005). Επιπλέον έχει αντιοξειδωτική δράση (Skotti *et al.*, 2014; Kamdem *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2012), ηρεμιστική (Kennedy *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006), αντιφλεγμονώδη, ηπατοπροστατευτική (Simmen *et al.*, 2006; Schemann *et al.*, 2006), αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντιϊκή, αντισταμινική (Carnat *et al.*, 1998; Sandraei *et al.*, 2003; Allaverdiyev *et al.*, 2004; Vitullo *et al.*, 2011), αγχολυτική (Santos-Neto *et al.*, 2006; Ibarra *et al.*, 2010). Τέλος παρουσιάζει δράση έναντι καρκινικών κυττάρων (De Sousa *et al.*, 2004) και εμφανίζει αποτελεσματικότητα σε ήπιες περιπτώσεις Alzheimer (Pereira *et al.*, 2014; Akondzadeh *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006).

Έχει μελετηθεί ακόμη, η χρήση εκχυλισμάτων του μελισσόχορτου στη βιομηχανία τροφίμων. Εφαρμόζοντας την κατάλληλη τεχνολογία, τα εκχυλίσματα του φυτού λειτουργούν σαν φυσικά αντιοξειδωτικά που προλαμβάνουν την οξειδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος (Berasategi *et al.*, 2014) Επίσης, παρέχουν τη δυνατότητα διατήρησης του χρώματος, αρώματος και δομής του προϊόντος όπως και συντήρησης του προϊόντος, καθιστώντας τα μία εναλλακτική λύση αντί των συνθετικών αντιοξειδωτικών (Lara *et al.*, 2011).

1.5.3 Χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.)-Οικογένεια Asteraceae



Εικόνα 1.4 Χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.)

Το χαμομήλι (**Εικόνα 1.4**) είναι αυτοφύες και προέρχεται από τη νότια Ευρώπη. Στην Ελλάδα αυτοφύεται σε χέρσες τοποθεσίες, σε ακαλλιέργητες εκτάσεις και είναι διαδεδομένο ως ζιζάνιο στις χειμερινές καλλιέργειες και στους οπωρώνες. Καλλιεργείται σε πολλές χώρες της εύκρατης ζώνης, όπως και στην Ιταλία, Γερμανία, Γαλλία, Κροατία, Ουγγαρία, Βουλγαρία, Σερβία, Αίγυπτο. Συναντάται επίσης στη δυτική Ασία, Αμερική και Αυστραλία (Δόρδας, 2012; McKay *et al.*, 2006; Κουτσός, 2006).

Ανήκει στην οικογένεια Asteraceae, είναι ετήσια πόα με ύψος 10-80 cm και διαθέτει πολύκλαδο βλαστό, όρθιο. Τα φύλλα του είναι πτεροειδή, με τμήματα βραχέα, στενά και έχει την τάση να διακλαδώνεται σε μεγάλο βαθμό. Τα άνθη του, που ονομάζονται κεφαλίδες και έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα της μαργαρίτας που είναι σύνηθες στα είδη της οικογένειας των Asteraceae, έχουν διάμετρο 10-30 mm και εκφύονται μεμονωμένα στην κορυφή κάθε βλαστιδίου. Τα πέταλα είναι λευκά με μήκος 6-11 mm, φάρδος 3,5 mm και είναι τοποθετημένα ομόκεντρα. Το συμπαγές ημισφαιρικό κεντρικό τμήμα έχει κίτρινο χρώμα και πλάτος 6-8 mm. Το χαμομήλι ανθίζει από τα μέσα Απριλίου μέχρι τις αρχές Ιουνίου και ο καρπός είναι αχαίνιο (Δόρδας, 2012; Singh *et al.*, 2011; Κουτσός, 2006).

Στο χαμομήλι έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 120 δευτερογενείς μεταβολίτες (Pirzad *et al.*, 2006; Pino *et al.*, 2002), συμπεριλαμβανομένων 28 τερπενοειδών, 36 φλαβονοειδών και 52 επιπλέον ενώσεων με δυνητική φαρμακευτική δράση (Mann *et al.*, 2002). Από τα πιο δραστικά συστατικά θεωρούνται οι υδροξυ-

κουμαρίνες, τα φλαβονοειδή (απιγενίνη, λουτεολίνη και κερκετίνη), κουμαρίνες, τερπενοειδή (Baser *et al.*, 2006; Lemberkovics *et al.*, 1998).

Για την παρασκευή των διαφόρων σκευασμάτων χαμομηλιού χρησιμοποιούνται οι κεφαλίδες του άνθους ως ξηρή δρόγη ή ως υλικό για παραλαβή του αιθερίου ελαίου. Πολλές βιολογικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί στο χαμομήλι: αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, κατά της ελονοσίας, αντιμεταλλαξιογόνες, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-σπασμολυτικές, επουλωτικές, ηρεμιστικές, υποχοληστερολαιμικές. Θεωρείται ότι βοηθά τη λειτουργία του γαστρεντερικού, κεντρικού νευρικού συστήματος και του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Έχει χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις ερεθισμού του φάρυγγα, του αναπνευστικού συστήματος, δυσπεψίας, ναυτίας, δυσκοιλιότητας, ρινικής καταρροής και νευρικότητας. Επίσης εφαρμόζεται τοπικά στις αιμορροΐδες, στη μαστίτιδα, σε δερματικά εξανθήματα και στο έκζεμα (Δόρδας, 2012; Bhaskaran *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2009; Gardiner *et al.*, 2007; Κουτσός, 2006; Franke *et al.*, 2005; Crotteau *et al.*, 2006; Kroll *et al.*, 2006; Di Stasi *et al.*, 2002; Kintzios *et al.*, 1999; Salamon *et al.*, 1994; Forster *et al.*, 1980).

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δράση του αιθερίου ελαίου (Hussein *et al.*, 2013) των εκχυλισμάτων αιθανόλης και των αφεισημάτων του χαμομηλιού, με τα υδατικά εκχυλίσματα να εμφανίζουν υψηλότερη δράση από τα αιθανολικά (Mckay *et al.*, 2006). Τα υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα του χαμομηλιού παρουσιάζουν μέτρια δραστηριότητα σε σύγκριση με άλλα φαρμακευτικά φυτά (Lee and Shibamoto, 2002; Dragland *et al.*, 2003; Koleckar *et al.*, 2008). Από άλλη έρευνα προκύπτουν στοιχεία για τον σχεδιασμό λειτουργικών τροφίμων με βάση τα εκχυλίσματα χαμομηλιού προκειμένου να προλαμβάνεται η οστεοπόρωση (Kassi *et al.*, 2004). Σε *in vivo* μελέτη εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδη δράση των υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων του χαμομηλιού, με τα υδατικά εκχυλίσματα να παρουσιάζουν αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση ενώ στην ίδια μελέτη και σε άλλη παρατηρήθηκε μείωση της χοληστερόλης σε υπερλιπιδαιμικά ποντίκια (Cemek *et al.*, 2008; Mckay *et al.*, 2006). Σε άλλες έρευνες αξιολογήθηκε εκτός από την αντιφλεγμονώδη και η αντιφλογιστική δράση του χαμομηλιού (Peña *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2005; Carnat *et al.*, 2004; Lemberkovics *et al.*, 1998).

Οι Nakamura *et al.*,(2002), μελέτησαν την επίδραση του χαμομηλιού στο αυτόνομο νευρικό σύστημα, εξετάζοντας τους καρδιακούς παλμούς, την θερμοκρασία του δέρματος και τη διάθεση. Η μείωση των καρδιακών παλμών, η αξιολόγηση της διάθεσης με τη βοήθεια εγκεφαλογραφήματος όπως και η αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος έδειξαν ότι το χαμομήλι έχει χαλαρωτική και αγχολυτική επίδραση στον οργανισμό (Awad *et al.*, 2007, Avallone *et al.*, 2000, Zanolli *et al.*, 2000, Salgueiro *et al.*, 1997, Viola *et al.*, 1995). Επίδρά επίσης και στο καρδιαγγειακό σύστημα με πιθανή μείωση του κινδύνου καρδιακής προσβολής (Hertog *et al.*, 1993, Gould *et al.*, 1973).

Αρκετές μελέτες αναφέρονται στη δράση κρέμας που περιέχει εκχύλισμα χαμομηλιού σε περιπτώσεις εκζέματος ή ατοπικής δερματίτιδας (Patzelt-Wenczler *et al.*,

2000, Hempel *et al.*, 1999) καθώς και γενικά της επιδράσεως του υδατικού εκχυλίσματος χαμομηλιού στην επούλωση πληγών (Martins *et al.*, 2009, Jarrahi, 2008, Jarrahi *et al.*, 2008, Nayak *et al.*, 2007, Glowania *et al.*, 1987). Ακόμη, βρέθηκε ότι ρόφημα χαμομηλιού που καταναλώνεται με τα γεύματα, μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη της εξέλιξης της υπεργλυκαιμίας και του διαβήτη (Kato *et al.*, 2008).

Άλλη έρευνα, έδειξε την αντιαλλεργική ιδιότητα μεθανολικού εκχυλίσματος χαμομηλιού, αφού παρατηρήθηκε επίδραση στα κοκκία των μαστοκυττάρων που απελευθερώνουν τους μεσολαβητές και μείωση της απελευθέρωσης της ισταμίνης και των μεσολαβητών που προκαλούν τα συμπτώματα αλλεργικής επίδρασης (Chandrashekhara *et al.*, 2011, Kobayashi *et al.*, 2003).

2 Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και συγκεκριμένα: το φυτό *Crocus sativus* L. (Κρόκος) από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης, το φυτό *Melissa officinalis* L. (Μελισσόχορτο) από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ) από την περιοχή του Αγρινίου και το φυτό *Marticaria recutita* L. (Χαμομήλι) από την περιοχή Βάγια Βοιωτίας.

Η παραλαβή του φυτικού υλικού και η ξήρανση έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της Ορθής Μετασυλλεκτικής Πρακτικής (Douglas *et al.*, 2005) και ακολούθησε φύλαξη στους -18°C. Το τμήμα του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση του στην περίπτωση του κρόκου ήταν τα στίγματα, του μελισσόχορτου τα φύλλα, και από το χαμομήλι το κεντρικό κίτρινο χρώματος στέλεχος και τα λευκά γλωσσοειδή ανθίδια. Το φυτικό υλικό κονιορτοποιήθηκε χειρωνακτικά και στην περίπτωση του μελισσόχορτου αφαιρέθηκαν οι τυχόν ξυλοποιημένοι βλαστοί.

2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Σε 5 g κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού έγινε διαδοχική εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (Petroleum Benzine 40-60°C, Chem-Lab NV), εξάνιο (Sigma Aldrich), διαιθυλαιθέρα (Diethyl ether, pesticide GRADE, Chem-Lab NV) υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων και με μεθανόλη (Methanol HPLC grade-Sigma Aldrich) υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα.

2.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους -USAE



Εικόνα 2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

Αρχικά το φυτικό υλικό τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 500 mL και πληρώθηκε με 100 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολούθησε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (Grant Ultrasonic bath-Grant Instruments) το οποίο λειτουργεί σε συγκεκριμένη συχνότητα (35 KHz) (**Εικόνα 2.1**). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, διάρκεισε 15 min και με το πέρας της το εκχύλισμα απορρίφθηκε καθώς δεν συμπεριλήφθηκε στην παρούσα μελέτη η ανάλυση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων. Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε εκ νέου ποσότητα 100 mL διαλύτη και ακολούθησε νέα εκχύλιση η οποία συνολικά επαναλήφθηκε 6 φορές. Ακολούθησαν εκχυλίσεις με εξάνιο και διαιθυλαιθέρα όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Το στερεό υπόλειμμα που παρέμεινε μετά την εκχύλιση με τους παραπάνω διαλύτες οδηγήθηκε σε ρεύμα αζώτου N_2 με σκοπό να εξατμιστεί τυχόν περίσσεια διαλύτη.

2.2.2 Εκχύλιση υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος



Εικόνα 2.2 Συμπύκνωση διαλύτη σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού

Το στερεό φυτικό υπόλειμμα 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 διαδικασία πραγματοποιήθηκε απουσία φωτός για αυτό το λόγο το ποτήρι ζέσεως καλύφθηκε με αλουμινοχαρτό. Το πρωί της επόμενης μέρας, έγινε η συλλογή των 800 mL και στο στερεό φυτικό υπόλειμμα προστέθηκαν 400 mL μεθανόλης. Η ποσότητα της μεθανόλης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (Heidolph HB digital Laborota 4000) (συμπύκνωση μέχρι ξηρού) (**Εικόνα 2.2 & 2.3**). Η παραληφθείσα ποσότητα εκχυλίσματος ζυγίστηκε, μεταφέρθηκε σε μπουκαλάκι με βιδωτό πώμα και φυλάχθηκε στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή της. Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος διαλύτης γιατί βάσει μελετών εκχυλίζει καλύτερα τα φαινολικά συστατικά λόγω της πολικότητας του και της καλής διαλυτότητας που έχει για τα φαινολικά συστατικά (Αναστασάκη, 2014, Roby *et al.*, 2013, Siddhuraju *et al.*, 2003).



Εικόνα 2.3 Μεθανολικά εκχυλίσματα των τριών φυτών

2.3 Μελέτη των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD)

Στα εκχυλίσματα της μεθανόλης των φυτών έγινε προσπάθεια ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των συστατικών χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία (LC) και ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA).

2.3.1 Ποιοτικός προσδιορισμός

Ο διαχωρισμός των συστατικών έγινε σε σύστημα Shimadzu LC εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADnr, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20μL και ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA)

SPD-M10Avp. 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 mg/mL σε μεθανόλη και πριν την εισαγωγή στη στήλη τα διαλύματα διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20 μm και διάμετρο 15 mm (Chromafil Xtra PET- 20/15).

Η στήλη ήταν Discovery SUPELCO Analytical (Sigma-Aldrich) C18 ανεστραμμένης φάσης μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης (5μm). Η μέθοδος ανάλυσης που ακολουθήθηκε ήταν μια τροποποίηση της μεθόδου των Caniona και Brandsterona (2001) και ίδια με αυτής της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης A ήταν μεθανόλη υψηλής καθαρότητας για HPLC 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 μεταβαλλόταν βαθμιαία. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον **Πίνακα 2.1**.

Πίνακας 2.1 Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των οργανικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

| Σύσταση Διαλυτών | | |
|-------------------------|-----|-----|
| Χρόνος t (min) | % A | % B |
| 0 | 25 | 75 |
| 5 | 25 | 75 |
| 30 | 65 | 35 |
| 60 | 100 | 0 |
| 90 | 100 | 0 |

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και του φάσματος υπεριώδους-ορατού του κάθε συστατικού με πρότυπων (αναλύθηκαν στην κύρια βιβλιογραφική πηγή-Αναστασάκη, 2014) και με των συστατικών που προσδιορίστηκαν στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014), ενώ όπου δεν υπήρχαν πρότυπα, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων.

2.3.2 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, αντίστοιχα όπως έγινε και στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014). Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2) με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης και τα μήκη κύματος που παρουσιάζουν λ_{\max} στα φάσματα UV-Vis.

Πίνακας 2.2 Πρότυπες ενώσεις που αναλύθηκαν, καθώς και οι αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσης (t_R) και τα λ_{\max} UV-Vis φασμάτων

| Πρότυπες ενώσεις | t_R (min) | UV max (nm) | Εξίσωση πρότυπης καμπύλης |
|--------------------------------|-------------|---------------|---------------------------|
| Χλωρογενικό οξύ | 15.95 | 223, 235, 325 | $y=116264.4x-89011.99$ |
| Καφεϊκό οξύ | 20.87 | 243, 297, 324 | $y=256464.2x-57504.86$ |
| 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης | 28.84 | 255, 350 | $y=142835.2x-31409.56$ |
| Ρουτίνη | 29.33 | 256, 356 | $y=63887.01x-23040.16$ |
| Ροσμαρινικό οξύ | 31.32 | 247, 330 | $y=115082.5x+484428.8$ |
| 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης | 31.73 | 267, 340 | $y=116173.3x-14239.64$ |
| Απιγενίνη | 41.6 | 237, 267, 340 | $y=187631.8x-20843.3$ |

Στις περιπτώσεις αδυναμίας χρήσης πρότυπων ενώσεων η ποσοτικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς των ακόλουθων 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 την απιγενίνη στα 340 nm, οι γλυκοζίτες των φλαβονολών ως προς τη ρουτίνη στα 350 nm, το καφεϊκό και φερουλικό οξύ ως προς το καφεϊκό οξύ στα 330 nm, ενώ τα παράγωγα καφεϊκού και φερουλικού οξέος ως προς το χλωρογενικό οξύ στα 330 nm. Στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου, η ποσοτικοποίηση των κροκινών έγινε σύμφωνα με τους Sánchez *et al.*, (2008) σύμφωνα με τον τύπο:

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

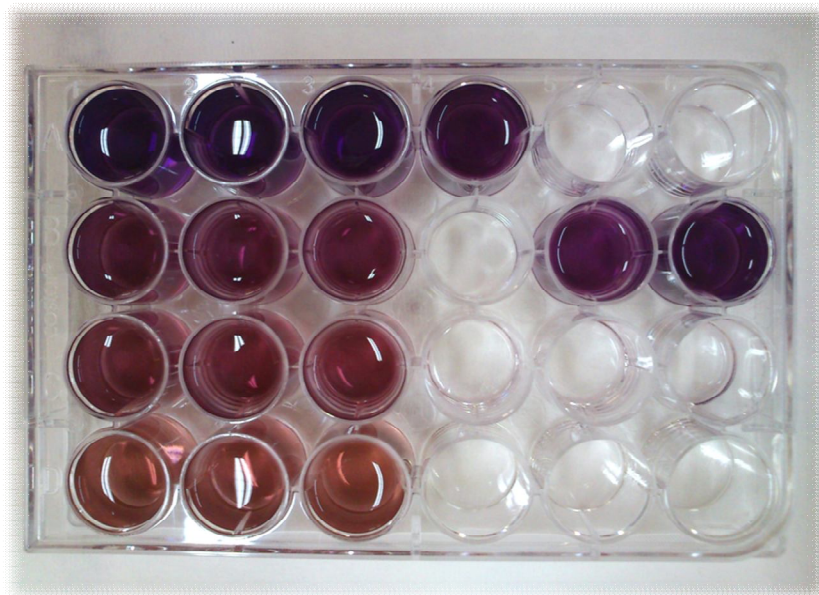
Όπου το A_i το εμβαδόν της κάθε κορυφής στο χρωματογράφημα και A_t το συνολικό εμβαδόν όλων των κροκινών, MW_i ήταν το μοριακό βάρος των κύριων κροκινών, $E_{1\text{cm}}^{1\%} 440\text{nm}$ η χρωστική δύναμη και ϵ_{ct} ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης ο οποίος για τις *trans* κροκίνες είναι $89000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και για τις *cis* κροκίνες $63350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Speranza *et al.*, 1984). Η χρωστική δύναμη υπολογίστηκε στις 230 μονάδες χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο τύπο και μέσω υπολογισμού της υγρασίας του δείγματος και της απορρόφησης στα 440 nm (Αναστασάκη, 2014).

2.4 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η αρχή της μεθόδου περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1.3.3.1. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη και διηθήθηκαν από μεμβρανώδη ηθμό πορώδους 0,45 μm (Chromafil PET-45/25, Macherey-Nagel). Σε 12-well plate προστέθηκαν 1,8 mL απιονισμένο νερό, 30 μL δείγματος, 150 μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck) τα οποία αναδεύτηκαν καλά. Μετά το πέρας 3 min προστέθηκαν 450 μL Na_2CO_3 20% w/v, προκειμένου να δημιουργηθεί το αλκαλικό περιβάλλον και να λάβει χώρα η αντίδραση και 570 μL απιονισμένο νερό. Ακολούθησε επώαση δύο ωρών σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, οπότε και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 725 nm μέσω του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Hach DR/2010 (Hach company). Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με διάλυμα που παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία όμως αντί για δείγμα προστέθηκε μεθανόλη. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε δείγμα.

Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (0-1 mg/mL). Για αυτό το λόγο παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων, ακολουθήθηκε η προαναφερθείσα διαδικασία και προέκυψε πρότυπη καμπύλη μέσω της οποίας έγινε ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών.

2.5 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου – DPPH•



Εικόνα 2.4 Ο αποχρωματισμός του DPPH•

Η αρχή της μεθόδου περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1.3.3.2. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη και διηθήθηκαν από μεμβρανώδη ηθμό πορώδους 0,45 μm (Chromafil PET-45/25, Macherey-Nagel). Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH• χρησιμοποιήθηκε διφαινυλο-πικρυλυδραζύλιο (Sigma Aldrich). Το διάλυμα του DPPH• παρασκευάστηκε την ημέρα της ανάλυσης διαλύοντας 4 mg DPPH σε 100 mL μεθανόλης (Sigma Aldrich, καθαρότητας HPLC). 30 μL από τα δείγματα προστέθηκαν σε 3 mL διαλύματος DPPH• (Εικόνα 2.4). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε μίγμα 3 mL διαλύματος DPPH• με 30 μL μεθανόλης, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη. Αφού αναδεύτηκε το μίγμα, ακολούθησε επώαση 30 λεπτών σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25°C, κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Hach DR/2010 (Hach company) και προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (I%).

Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$I \% = [(A^0 - A)/A^0] * 100$$

όπου I % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας

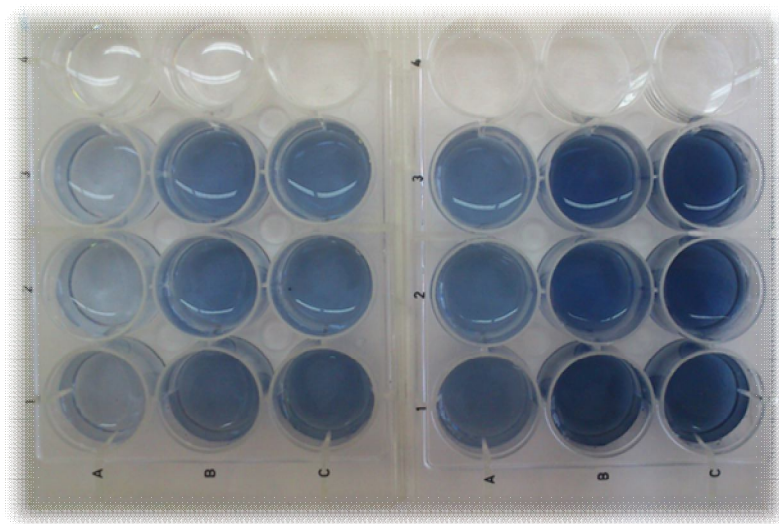
A⁰ = η απορρόφηση του τυφλού

A = η απορρόφηση του δείγματος

Ως μέτρο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ισχύος χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί δέσμευση κατά 50% της ελεύθερης ρίζας και καλείται Inhibition Concentration (IC₅₀). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίστηκε από τη γραφική παράσταση που προέκυψε από τα ποσοστά δέσμευσης της ρίζας DPPH• με τη συγκέντρωση των δειγμάτων.

Στην περίπτωση του κρόκου και λόγω παρεμβολής στην απορρόφηση από τις κροκίνες, μετρήθηκε η απορρόφηση της μεθανόλης και της ελεύθερης ρίζας, μίγμα που χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης ελέγχου και στη συνέχεια το όργανο μηδενίστηκε με μεθανόλη και με 30 μL από το μελετούμενο δείγμα. Ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση της ελεύθερης ρίζας με το δείγμα της μελετούμενης κάθε φορά συγκέντρωσης.

2.6 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος)-ABTS



Εικόνα 2.5 Ο αποχρωματισμός του ABTS^{•+}

Η αρχή της μεθόδου περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1.3.3.3. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη και διηθήθηκαν από μεμβρανώδη ηθμό πορώδους 0,45 μm (Chromafil PET-45/25, Macherey-Nagel). Παρασκευάστηκε διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7mM ζυγίζοντας 38,4 mg σε 10 mL δις απεσταγμένο νερό. Το τελικό

διάλυμα είχε συγκέντρωση 7mM και το κατιόν ABTS^{•+} παρασκευάστηκε από την αντίδραση 7mM αμμωνιακού άλατος ABTS με 2,45 mM υπερθειικό κάλιο K₂S₂O₈. 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 αραιώθηκε με μεθανόλη έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι 0,700±0,005 στα 734nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 3 mL διαλύματος ABTS^{•+} με 30μL μεθανόλης, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκαν 3 mL αιθανόλης με 30 μL μεθανόλης. Σε 3 mL του διαλύματος ABTS^{•+}, προστέθηκαν 30 μL διαφόρων συγκεντρώσεων του προς εξέταση φυτικού εκχυλίσματος (**Εικόνα 2.5**). Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και μετά το πέρας 6 min στους 30 °C μετρήθηκε η απορρόφηση στα 734 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis μοντέλο Hach DR/2010 (Hach company) και υπολογίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης (I %) της ρίζας σύμφωνα με τον τύπο:

$$I \% = [(A^0 - A) / A^0] * 100$$

Όπου I % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας

A⁰ = η απορρόφηση του τυφλού

A = η απορρόφηση του δείγματος

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) . (TEAC mmol / g εκχυλίσματος), το οποίο είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό και υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E. Έτσι, παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων Trolox (0-20 μM) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη μέσω της οποίας έγινε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

2.7 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων έναντι μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας

Οργανικά εκχυλίσματα των φυτών μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι παθογόνων του στόματος. Για την αρχική εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well-diffusion assay). Επειδή οι *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* εμπλέκονται σε παθογένειες της στοματικής κοιλότητας σχηματίζοντας βιοϋμένιο, προσδιορίστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη του βιοϋμένιου και να αποικοδομούν το ήδη σχηματισμένο βιοϋμένιο.

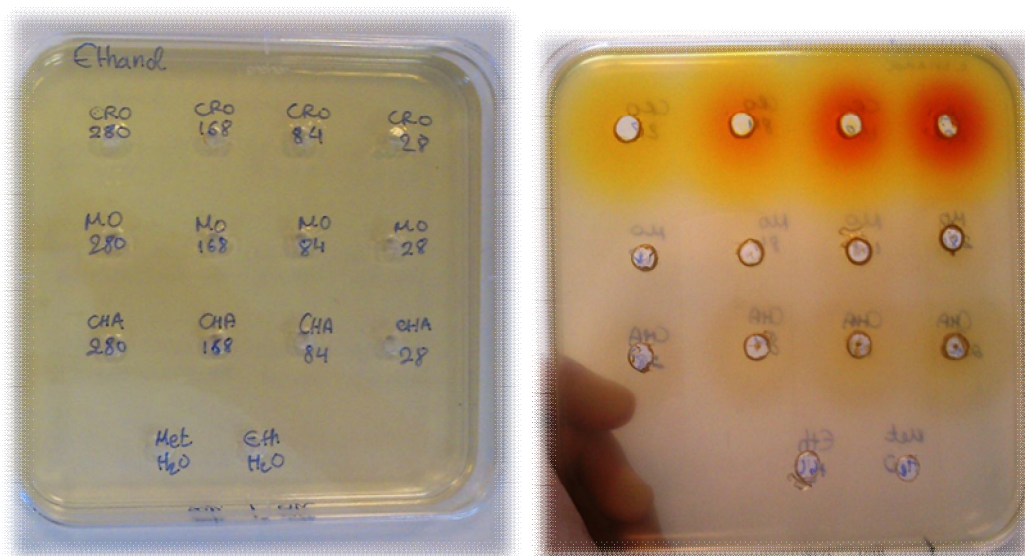
2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μικροοργανισμοί

Πριν τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης έγινε προετοιμασία των δειγμάτων, δηλαδή το μεθανολικό εκχύλισμα σε στερεή μορφή διαλύθηκε σε οργανικούς διαλύτες και νερό σε αναλογία 70:30. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη (Sigma Aldrich) και αιθανόλη (Sigma Aldrich). Η αιθανόλη επιλέχθηκε επειδή έχει το πλεονέκτημα της χαμηλής σχετικά τοξικότητας για τον άνθρωπο και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση με φίλτρα 0.22 μm (Millex Syringe Filter, Millipore, USA) και αποθήκευσή τους στην κατάψυξη.

Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν ήταν οι θετικοί κατά Gram *Streptococcus mutans* LMG 14558^T και *Streptococcus sobrinus* LMG14641^T οι οποίοι είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι στη στοματική κοιλότητα. Επιπλέον, ο *Streptococcus mutans* είναι ο κυριότερος από τους στρεπτόκοκκους που προκαλούν τερηδόνα και ο *Streptococcus sobrinus* συνδέεται σε μεγάλο ποσοστό με την εμφάνισή της (Hardie *et al.*, 1998). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύχθηκε ο *Streptococcus mutans* ήταν BHI (Brain Heart Infusion) και 1% w/w σουκρόζη ενώ ο *Streptococcus sobrinus*, σε BHI (Brain Heart Infusion), 1% w/w σουκρόζη και 10%w/v FBS (Fetal Bovine Serum). Η επώαση των μικροοργανισμών έγινε στους 37°C. 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).

Πριν από κάθε πείραμα ο οργανισμός ανανεωνόταν υπό ασηπτικές συνθήκες, μεταφέροντας 50 μL σε σωληνάκι που περιείχε 5 mL από το αντίστοιχο θρεπτικό υλικό για κάθε μικροοργανισμό. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 24 h υπό μικροαερόφιλες συνθήκες. Για κάθε καλλιέργεια γινόταν δεύτερη ανανέωση μεταφέροντας υπό ασηπτικές συνθήκες 50 μL του μικροοργανισμού σε σωλήνες που περιέχουν 5 mL από το κατάλληλο θρεπτικό υλικό.

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



Εικόνα 2.6 Το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό πριν και μετά τη διάχυση των εκχυλισμάτων- Στη δεύτερη εικόνα διακρίνονται οι ζώνες αναστολής ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (well diffusion assay-WDA).

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν το κατάλληλο για τον κάθε μικροοργανισμό με 1% w/v άγαρ. Καλλιέργειες 18 h (~10⁸ 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 ~10⁶ cfu/mL. Σε τετράγωνα τρυβλία petri μεταφέρονταν 50 mL θρεπτικού υλικού και έπειτα από λίγη ώρα ακολουθούσε 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 (**Εικόνα 2.6**). 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. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα ο διαλύτης στον οποίον ήταν διαλυμένο το κάθε εκχύλισμα. Μετά τις 24 h πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις και

συγκεκριμένα μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού-στόχου που δημιουργήθηκαν περιμετρικά των οπών.

2.7.3 Μελέτη αναστολής σχηματισμού του βιοϋμενίου



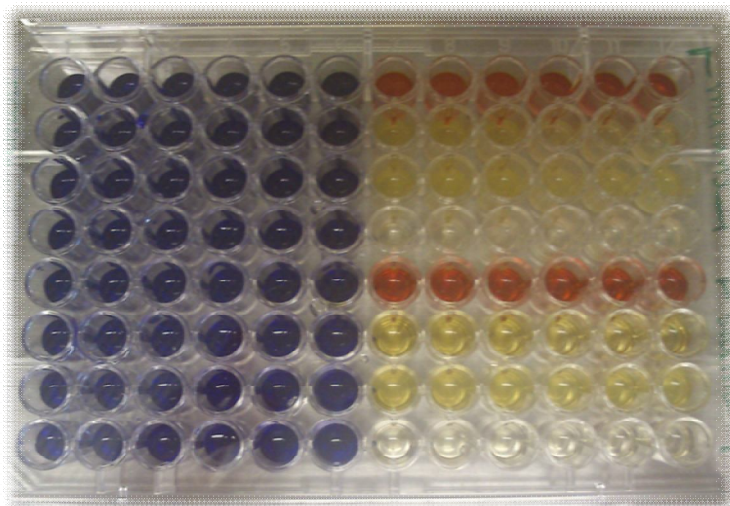
Εικόνα 2.7 Μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm με το φωτόμετρο

Αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ικανότητας των φυσικών προϊόντων να μειώνουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ή να καταστρέφουν μέρος του πληθυσμού τους. Υπάρχουν και μέθοδοι οι οποίες εξετάζουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα: κατά πόσο προλαμβάνουν την προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες (αρχικό στάδιο σχηματισμού του βιοϋμενίου), κατά πόσο προλαμβάνουν την σύνθεση των αδιάλυτων πολυσακχαριτών από τις γλυκοσυλτρανσφεράσες των βακτηρίων (δεύτερο στάδιο και μη αναστρέψιμο ανάπτυξης του βιοϋμενίου) ή κατά πόσο παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του ήδη σχηματισμένου βιοϋμενίου (Palombo, 2009).

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν το σχηματισμό του βιοϋμενίου σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων (96 well plates). Οι καλλιέργειες των στελεχών (18 h , $\sim 10^8 \text{ cfu/mL}$) ανανεώνονταν (εμβόλιο 1,0% v/v) στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο και 95μL του αιωρήματος αυτού μεταφέρονταν σε ξεχωριστές κυψέλες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης. Σε κάθε κυψέλη τοποθετούνταν 5μL από το κάθε εκχύλισμα αρχικής συγκέντρωσης 280 mg/mL οπότε προέκυπτε τελική συγκέντρωση 14 mg/mL. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο

διαλύτης στον οποίο ήταν διαλυμένο το κάθε εκχύλισμα. Επίσης, σε τρεις κυψέλες τοποθετήθηκαν 100 μL από την καλλιέργεια του μικροοργανισμού και σε τρεις ξεχωριστές κυψέλες 100 μL από το αντίστοιχο θρεπτικό υλικό με σκοπό αν υπάρχει κάποιο πρόβλημα με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ή τυχόν επιμόλυνση του θρεπτικού υλικού να γίνει άμεσα φανερό σε αυτές τις κυψέλες. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 24h. Μετα το πέρας των 24 ωρών αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από κάθε κυψέλη και ξεπλύθηκε 3 φορές με 150 μL Ringer με σκοπό την απομάκρυνση των κυττάρων που δεν σχημάτισαν βιοϋμένιο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μL 0.05% v/v Crystal violet ((4-[(4-dimethylaminophenyl)-phenylmethyl]-N,N-dimethyl-aniline), η συγκεκριμένη χρωστική βάφει το DNA και παρέχει πληροφόρηση για τον αριθμό των κύτταρων των μικροοργανισμών (Avila *et al.*, 2011). Η χρωστική αφαιρέθηκε έπειτα από 15 min. Επαναλήφθηκε η έκπλυση με 150 μL διαλύματος Ringer (5 φορές) και κατόπιν προστέθηκαν 100 μL MBDS (modified biofilm dissolving solution) για 5 min. Το συγκεκριμένο διάλυμα απελευθερώνει αποτελεσματικά την χρωστική από το βιοϋμένιο μέσω της διαλυτοποίησης της δομής του βιοϋμενίου (Tram *et al.*, 2013). Ακολούθως, μεταφέρθηκαν τα 100 μL MBDS από κάθε κυψέλη σε διαφορετικά 96 well plates και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600nm με το φωτόμετρο Tecan Elisa Microplate Reader (**Εικόνα 2.7**) Από την απορρόφηση που προέκυψε, έγινε διαίρεση με την απορρόφηση του μάρτυρα και υπολογίστηκε το ποσοστό σχηματισμού του βιοϋμενίου και ακολούθως το ποσοστό παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμενίου.

2.7.4 Μελέτη αποικοδόμησης σχηματισμένου βιοϋμενίου



Εικόνα 2.8 Αριστερά φαίνεται με ιώδες χρώμα η χρώση με Crystal Violet και δεξιά η επώαση του βιοϋμενίου με τα εκχυλίσματα

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μελετήθηκε η ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων να αποικοδομούν το βιοϋμένιο που έχουν ήδη σχηματίσει οι μικροοργανισμοί. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μέθοδο ήταν τα φυτικά εκχυλίσματα

αραιωμένα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο του κάθε μικροοργανισμού με αναλογία 1:10 τελικής συγκέντρωσης 28 mg/mL.

Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, καλλιέργειες των στελεχών (18 h , $\sim 10^8$ cfu/mL) ανανεώνονταν (εμβόλιο 1,0% v/v) στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, 100 μL του αιωρήματος αυτού μεταφέρονταν σε ξεχωριστές κυψέλες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης και επώαστηκαν για 24h στους 37°C ώστε να σχηματιστεί το βιοϋμένιο. Μετά το πέρας το των 24 h αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από κάθε κυψέλη και προστέθηκαν 100 μL αραιωμένου εκχυλίσματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 2h, οπότε και ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφηκε προηγουμένως (crystal violet assay) (**Εικόνα 2.8**).

3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD)

3.1.1 Ποιοτικός προσδιορισμός

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη σε σειρά με ανιχνευτή φωτοδιόδων. Οι κύριες κατηγορίες ενώσεων που προσδιορίστηκαν είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Προτάθηκαν οι πιθανές δομές των φαινολικών συστατικών βάσει του χρωματογραφικού προφίλ, των χρόνων έκλουσης και των φασμάτων υπεριώδους-ορατού τα οποία συγκρίθηκαν με αυτά των αντίστοιχων προτύπων φαινολικών συστατικών και με αυτά που αναφέρονται σε βιβλιογραφικές πηγές.

Στους πίνακες που ακολουθούν δίνονται οι αντίστοιχες προτεινόμενες δομές των συστατικών με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά, το λ_{\max} και το χρόνο έκλουσης t_R . Η σύγκριση έγινε με την κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρόγραμμα ανάλυσης.

Το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου (**Πίνακας 3.1**) χαρακτηρίστηκε από την παρουσία των κροκινών (γλυκοζυλεστέρες κροκετίνης) ενώ οι προτεινόμενες δομές βάσει των δεδομένων LC-DAD παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1 Ποιοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του κρόκου βάσει των δεδομένων LC-DAD

| Δεδομένα LC-DAD Μελέτης | | | | Δεδομένα LC-DAD Βιβλιογραφίας (Αναστασάκη, 2014) | |
|---|--------------------|---------|-------------------------------|--|--------------------|
| Χρόνος έκλουσης (t _R) (min) | λ _{max} | Area% | Προτεινόμενη δομή | Χρόνος έκλουσης (t _R) (min) | λ _{max} |
| 20.7 | 264, 330 | 0.7591 | τριγλυκοζίτης της καεμφερόλης | 20.8 | 265, 33 |
| 23.8 | 249 | 0.7997 | πικροκροκίνη | 23.8 | 250 |
| 25.2 | 265, 357 | 1.0236 | διγλυκοζίτης της καεμφερόλης | 25.4 | 267, 352 |
| 27.2 | 265, 348 | 8.1968 | διγλυκοζίτης της καεμφερόλης | 27.2 | 266, 350 |
| 30.5 | 252, 441, 465 | 1.2091 | <i>trans</i> -5-tG | 30.5 | 255, 441, 465 |
| 31.3 | 265, 437 | 0.5401 | <i>trans</i> -5-nG | 31.3 | 264, 440 |
| 33.5 | 261, 442, 464 | 37.6575 | <i>trans</i> -4-GG | 33.6 | 263, 441, 463 |
| 35.5 | 261, 439, 463 | 1.1800 | <i>trans</i> -4-ng | 35.5 | 262, 438, 465 |
| 36.1 | 261, 442, 463 | 25.4736 | <i>trans</i> -3-Gg | 36.2 | 262, 442, 467 |
| 38.7 | 260, 438, 462 | 1.4338 | <i>trans</i> -2-gg | 38.7 | 263, 440, 465 |
| 44.5 | 258, 433, 457 | 11.3594 | <i>trans</i> -2-G | 44.3 | 260, 434, 457 |
| 45.4 | 261, 325, 432, 455 | 9.1513 | <i>cis</i> -4-GG | 45.3 | 262, 323, 434, 457 |
| 47.9 | 260, 324, 432, 455 | 4.3970 | <i>cis</i> -3-Gg | 47.8 | 261, 323, 433, 459 |
| 50.3 | 261, 326, 431, 454 | 0.3548 | <i>trans</i> -1-g | 50.1 | 262, 433, 458 |
| 53.6 | 260, 321, 427, 450 | 0.4440 | <i>cis</i> -2-G | 53.4 | 261, 323, 433, 455 |

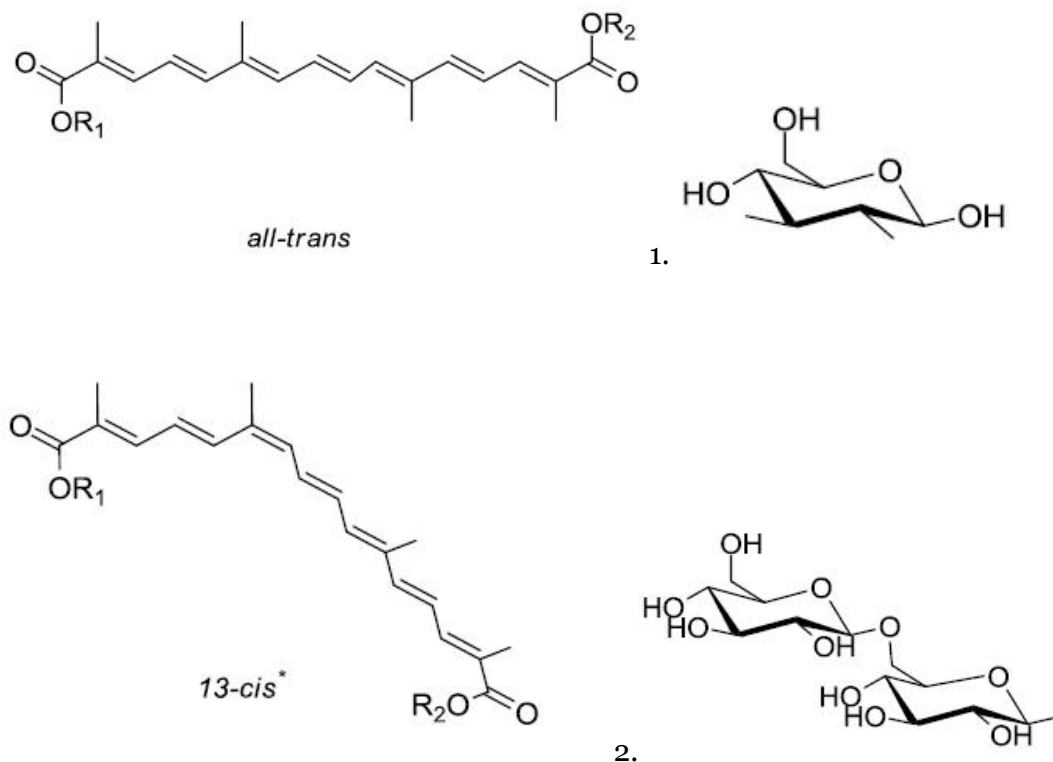
Βάσει της βιβλιογραφίας (Tarantilis *et al.*, 1995), τα φάσματα UV-Vis των *all-trans* κροκινών είναι πολύ χαρακτηριστικά αφού παρουσιάζουν δύο ζώνες απορρόφησης, την πρώτη στα 256 nm λόγω των γλυκοζυλεστερικών δεσμών των κροκινών και τη δεύτερη, μεταξύ 400 και 500 nm. Τα *cis* ισομερή παρουσιάζουν 3 ζώνες απορρόφησης, μία στα 260 nm λόγω των γλυκοζυλεστερικών δεσμών των κροκινών, όπως και στην περίπτωση των *trans*-κροκινών, μία στα 325 nm λόγω της παρουσίας των *cis* διπλών δεσμών στο συζευγμένο σύστημα των κροκινών και μία μεταξύ 400-500 nm με λ_{max} στα 435 nm.

Έτσι, οι τρεις κύριες κορυφές που συναντώνται στα 33.5, 36.1 και 44.5 min αποδίδονται σε *trans* κροκίνες. Η κύρια κορυφή στα 33.5 min αντιπροσωπεύει την κροκετίνη εστεροποιημένη με δύο μόρια γεντοβιόζης, *trans*-κροκίνη-4 (Tarantilis *et al.*, 1995) ή *trans*-4-GG, σύμφωνα με την κωδικοποίηση των Carmona *et al.*, (2006) ενώ η δεύτερη μεγαλύτερη κορυφή στα 36.1 min χαρακτηρίστηκε ως *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. Η κορυφή στα 44.5 min αποδόθηκε στην *trans*-2-G, δηλαδή την κροκετίνη εστεροποιημένη με ένα μόριο γεντοβιόζης (**Σχήμα 3.1**). (Tarantilis *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2006).

Τα UV-Vis των κορυφών στα 38.7 και 45.4 min υποδεικνύουν διαμόρφωση *trans*- και *cis*- κροκινών με την πρώτη εκ των οποίων να αποδίδεται στην *trans*-2-gg (Carmona *et al.*, 2006), δηλαδή, κροκετίνη εστεροποιημένη με ένα μόριο γλυκόζης σε κάθε άκρο (Tarantilis *et al.*, 1995) και τη δεύτερη να χαρακτηρίζεται ως *cis*-4-GG (Carmona *et al.*, 2006), δηλαδή την κροκετίνη εστεροποιημένη με δυο μόρια γεντοβιόζης (Tarantilis *et al.*, 1995).

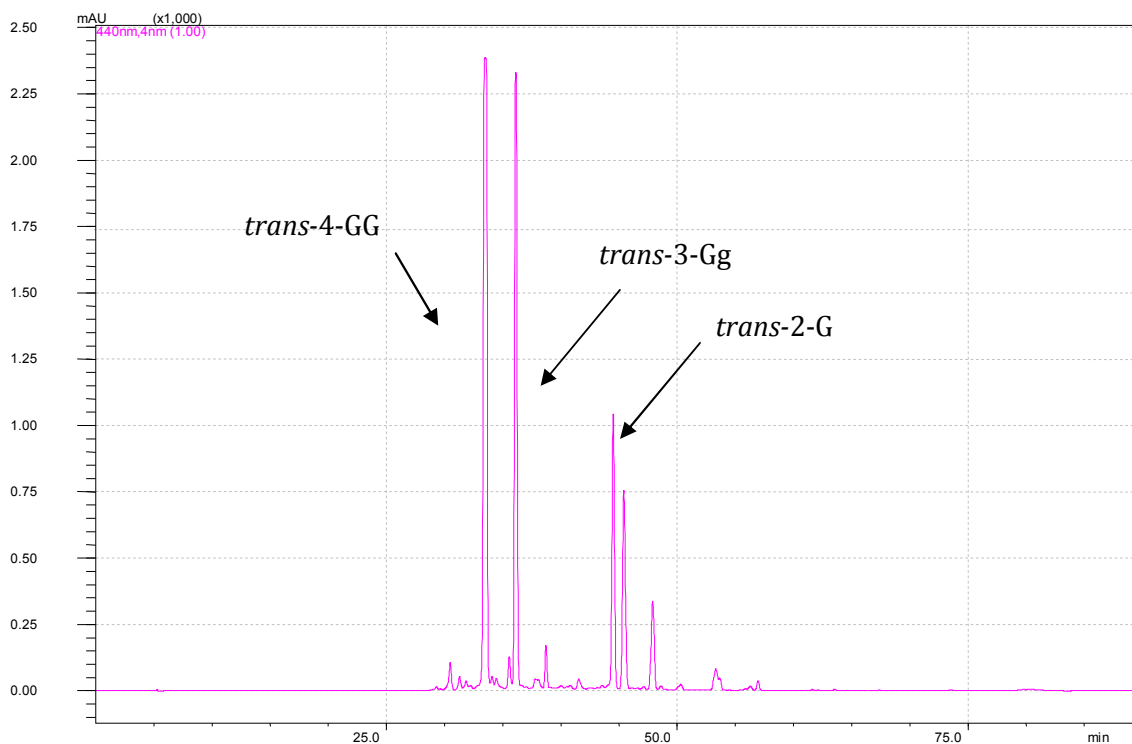
Όσον αφορά την κορυφή στα 30.4 min αποδόθηκε στην κροκετίνη εστεροποιημένη με τρία μόρια γλυκόζης και ένα μόριο γεντοβιόζης (*trans*- 5-tG), η κορυφή στα 31.3 min στην *trans*-5-nG δηλαδή στην κροκετίνη εστεροποιημένη με ένα μόριο νεαπολιτενόζης και ένα μόριο γεντοβιόζης, η κορυφή στα 35.5 min στην *trans*-4-nG δηλαδή στην κροκετίνη εστεροποιημένη με ένα μόριο νεαπολιτενόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Οι υπόλοιπες κορυφές στα 47.9, 50.3 και 53.6 min αντιστοιχούν στην κροκετίνη εστεροποιημένη με: ένα μόριο γεντοβιόζης και ένα γλυκόζης (*cis*-3-Gg), ένα μόριο γλυκόζης (*trans*-1-g) και ένα μόριο γεντοβιόζης αλλά στην *cis* μορφή (*cis*-2-G).

Οι Speranza *et al.*, (1984) έδειξαν ότι οι *trans*-κροκίνες υφίστανται αντιδράσεις φωτοϊσομερισμού και μετατρέπονται σε *cis*-κροκίνες. Αυτή η διαδικασία εξαρτάται από τις γεωργικές και περιβαλλοντικές συνθήκες στην περιοχή προέλευσης των φυτών.



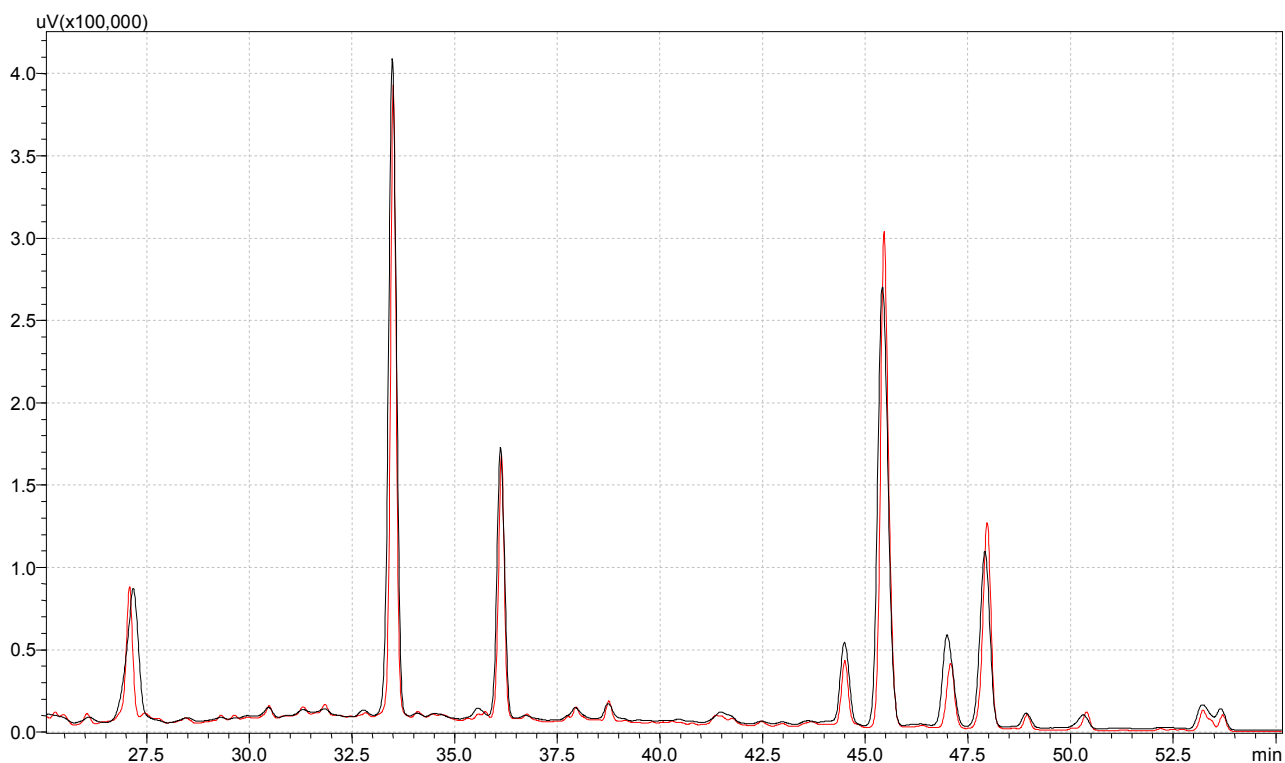
Σχήμα 3.1 Οι κυριότερες κροκίνες στο χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου: 1: γλυκόζη, 2: γεντοβιόζη, R1= R2= δυο μόρια γεντοβιόζης *trans*- και *cis*- crocin-4 (*trans*- ή *cis*-4-GG), R1= ένα μόριο γεντοβιόζης και R2= ένα μόριο γλυκόζης *trans*- crocin-3 (*trans*-3-Gg) (Tarantilis *et al.*, 1995, Αναστασάκη, 2014).

Σχετικά με τα φλαβονοειδή που περιέχει το εκχύλισμα του κρόκου, αυτά χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία των γλυκοζιτών της καεμφερόλης (Tarantilis *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2007). Οι Tarantilis *et al.*, (1995) ανέφεραν πρώτοι την ύπαρξη ενός διγλυκοζίτη της καεμφερόλης σε υδρομεθανολικό εκχύλισμα στιγμάτων κρόκου, ενώ δεν απέκλειαν την ύπαρξη και άλλων γλυκοζιτών. Οι Carmona *et al.*, (2007) επιβεβαίωσαν τον ισχυρισμό τους εξετάζοντας εκχυλίσματα στιγμάτων κρόκου και ταυτοποίησαν την ύπαρξη επιπλέον 4 γλυκοζιδιωμένων μορφών καεμφερόλης. Στα 20.6, 25.1 και 27.2 min τα φασματικά δεδομένα με λ_{\max} 266 και 350 nm υποδηλώνουν την παρουσία φλαβονολών και συγκεκριμένα γλυκοζιτών καεμφερόλης. Τέλος, η κορυφή στα 23.8 min αποδόθηκε στην πικροκροκίνη και εμφανίζει χαρακτηριστική απορρόφηση στα 250 nm λόγω της α,β -ακόρεστης αλδεϋδης στο μόριό της (Tarantilis *et al.*, 1995).



Σχήμα 3.2 Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) κρόκου ($\lambda=440$ nm) με τις κυριότερες κορυφές

Στο παραπάνω χρωματογράφημα (**Σχήμα 3.2**) παρουσιάζονται οι τρεις κύριες ενώσεις του μεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου. Παρακάτω παρατίθεται η σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ της μελέτης με αυτό της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014) (**Σχήμα 3.3**) βάσει του οποίου εξήχθησαν τα συμπεράσματα για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου.

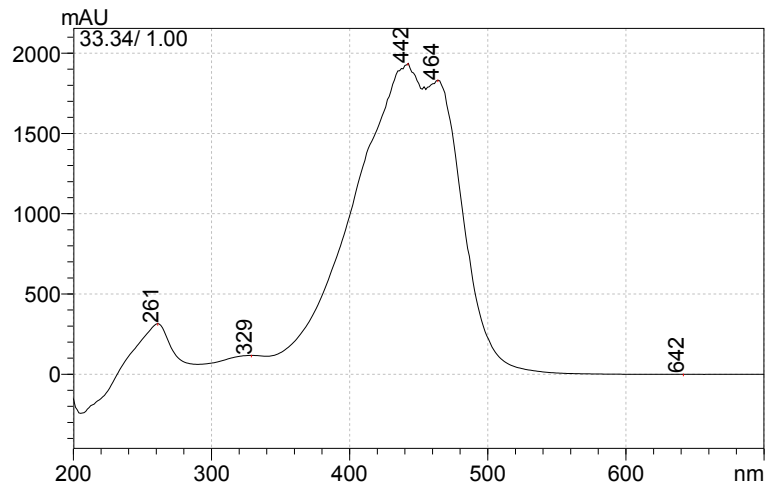


Σχήμα 3.3 Σύγκριση χρωματογραφημάτων μεθανολικού εκχυλίσματος κρόκου μελέτης (μαύρο χρώμα) και κύριας βιβλιογραφικής πηγής (κόκκινο χρώμα) ($\lambda=330\text{nm}$)

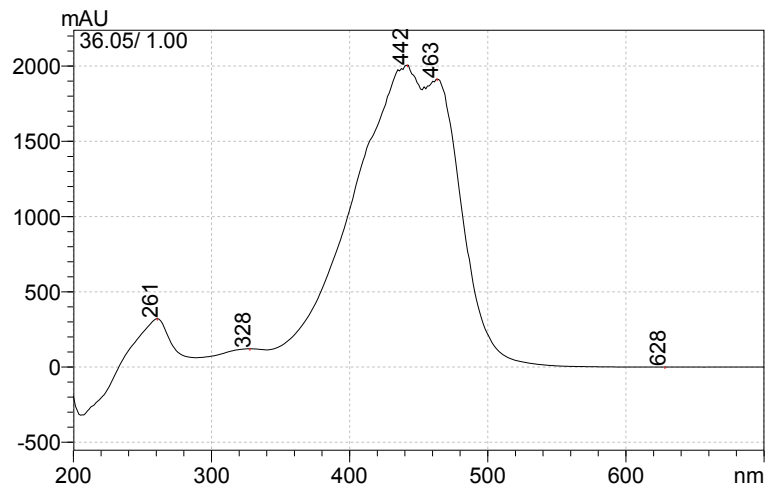
Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της βιβλιογραφικής πηγής και με μαύρο χρώμα το χρωματογράφημα της παρούσας μελέτης. Είναι εμφανές ότι τα χρωματογραφικά προφίλ είναι παρόμοια σε μεγάλο ποσοστό. Διαφορά υπάρχει στην παρουσία της κροκίνης *cis-2-gg* στα 52.9 min με λ_{max} 261, 323, 433 και 455 στην βιβλιογραφική πηγή, η οποία δεν μπορεί να ταυτιστεί με κάποια κορυφή του χρωματογραφήματος της μελέτης γιατί δεν είναι καθαρή η περιοχή που περιλαμβάνει τη συγκεκριμένη κορυφή και λόγω διαφοράς στον χρόνο έκλουσης.

Αποτελέσματα & Συζήτηση

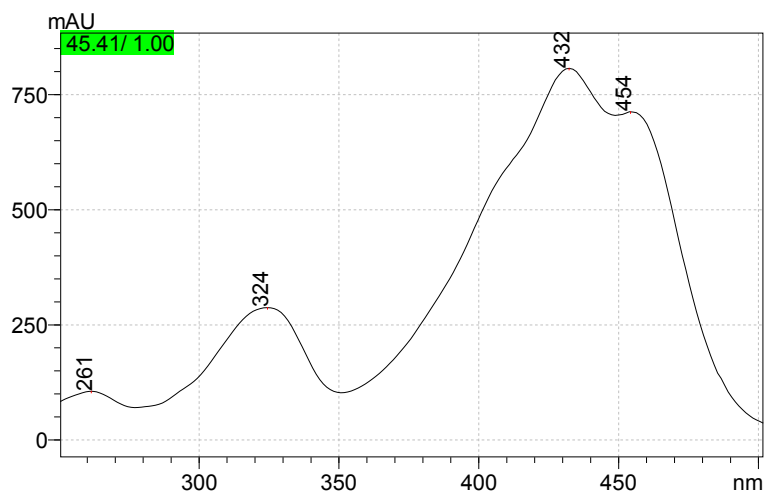
Στο **Σχήμα 3.4** παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των κύριων κορυφών του χρωματογραφήματος με τα χαρακτηριστικά λ_{\max} . Τα φάσματα των υπόλοιπων κορυφών παρατίθενται στο παράρτημα.



1. Φάσμα UV-Vis *trans*-4-GG με κορυφές στα 261, 442 και 464 nm



2. Φάσμα UV-Vis *trans*-3-Gg με κορυφές στα 261, 442 και 463 nm



3. Φάσμα UV-Vis *trans*-2-G με κορυφές στα 261, 324, 432 και 454

Σχήμα 3.4 Φάσματα UV-Vis των δύο κυριότερων κροκινών του μεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου ήταν κυρίαρχη η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος όπως και σε άλλες μελέτες με τον ίδιο ή διαφορετικό οργανικό διαλύτη (Arceusz *et al.*, 2013, Dastmalchi *et al.*, 2008, Ziakova *et al.*, 2003, Guginski *et al.*, 2009, Mencherini *et al.*, 2007). Το εκχύλισμα μεθανόλης της παρούσας μελέτης χαρακτηρίστηκε επιπλέον από την παρουσία παραγώγων υδροξυκινναμωμικών οξέων ενώ παρατηρήθηκε και η παρουσία ενός γλυκοζίτη (**Πίνακας 3.2**). Βάσει των προτύπων ενώσεων προσδιορίστηκαν το καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ.

Πίνακας 3.2 Ποιοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του μελισσόχορτου βάση των δεδομένων LC-DAD

| Δεδομένα LC-DAD Μελέτης | | | | Δεδομένα LC-DAD Βιβλιογραφίας (Αναστασάκη, 2014) | |
|---------------------------------------|---------------------|---------|--------------------------------------|---|-----------------|
| Χρόνος έκλουσης (t_R) (min) | λ_{max} | Area% | Προτεινόμενη δομή | Χρόνος έκλουσης (t_R) (min) | λ_{max} |
| 20.5 | 243, 290, 323 | 0.7755 | καφεϊκό οξύ | 20.9 | 243, 297, 324 |
| 28.1 | 250, 285, 329 | 2.2760 | ισομερές σαλβιανολικού οξέος I | 28.9 | 253, 282, 324 |
| 30.2 | 233, 288, 323 | 6.2604 | ισομερές ροσμαρινικού οξέος | 30.4 | 235, 288, 324 |
| 31.1 | 245, 330 | 61.1147 | ροσμαρινικό οξύ | 31.4 | 234, 324 |
| 33.8 | 250, 290, 315 | 0.3060 | ισομερές λιθοσπερμικού οξέος | 33.9 | 252, 288, 313 |
| 34.1 | 250, 288, 329 | 0.6750 | ισομερές σαλβιανολικού οξέος I | 34.5 | 253, 282, 324 |
| 34.6 | 244, 268, 340 | 3.7080 | γλυκουρονίδιο λουτεολίνης | 34.9 | 240, 268, 341 |
| 36.7 | 248, 289, 327 | 1.1522 | ισομερές σαλβιανολικού οξέος B | 36.5 | 244, 287, 322 |
| 37.8 | 290, 317 | 3.9872 | παράγωγο υδροξυκιναμικού οξέος | 38.1 | 287, 320 |

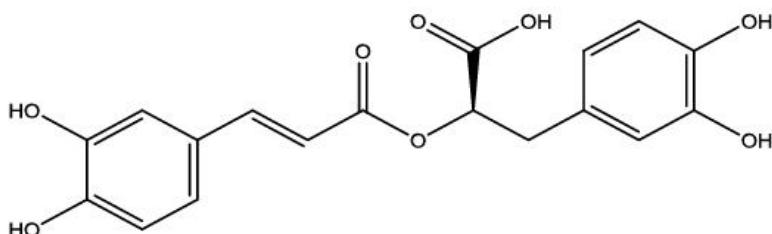
Με βάση τη βιβλιογραφική πηγή, οι κορυφές στα 28.1, 33.8, 34.1, 36.7 και 37.7 min αποδόθηκαν σε παράγωγα καφεϊκού οξέος και συγκεκριμένα σε παράγωγα του σαλβιανολικού οξέος, κυρίως διμερή και τριμερή παράγωγα και σε ισομερές του λιθοσπερμικού οξέος (Hu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Η κορυφή στα 34.5 min, αποδόθηκε σε γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης με τα φασματικά δεδομένα να υποδεικνύουν ότι πρόκειται για το 3'-O-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (Lu *et al.*, 2000). Όπως και σε άλλη πρόσφατη μελέτη (Barros *et al.*, 2013), το 3-O-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης ήταν το μόνο φλαβονοειδές που απομονώθηκε από υδρομεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου και από τους Heitz *et al.*, (2000)

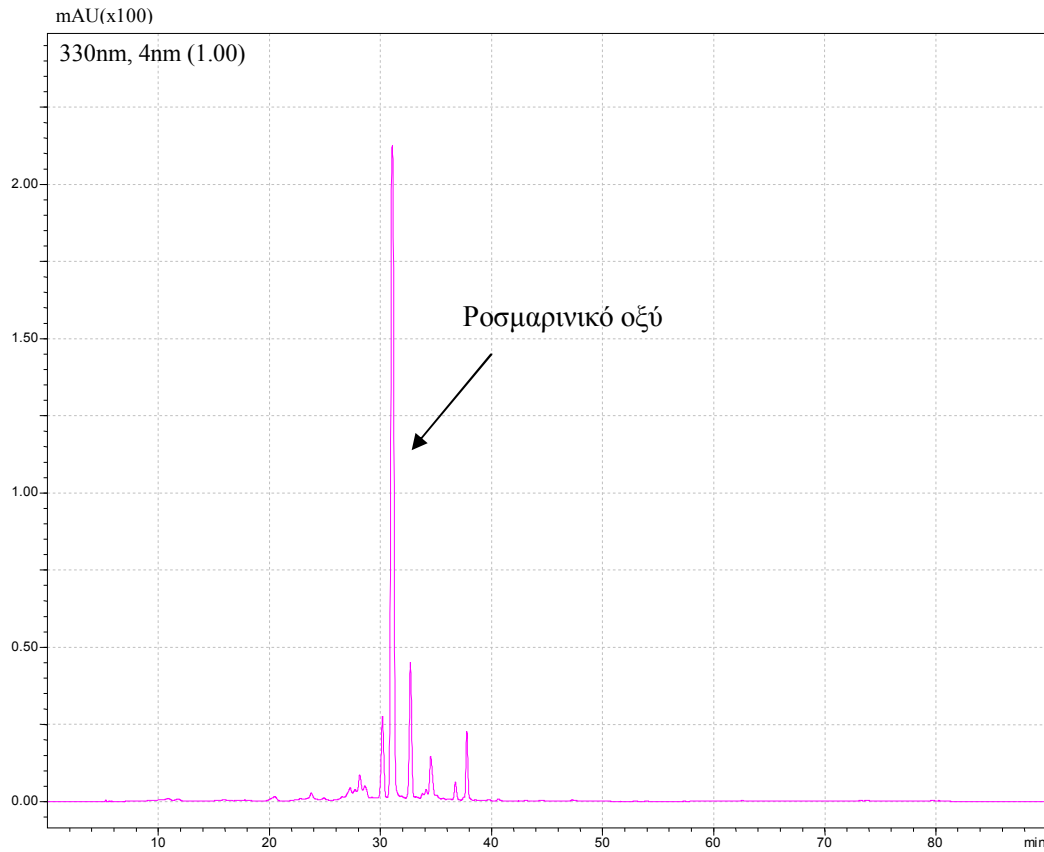
αναφέρεται ως το κύριο φλαβονοειδές στο μελισσόχορτο. Άλλοι συγγραφείς περιγράφουν επίσης την ύπαρξη άλλων παραγώγων λουτεολίνης και απιγενίνης (Fecka *et al.*, 2007, Patora *et al.*, 2002) όπως το 7-O-γλυκοζίδιο λουτεολίνης (Fecka *et al.*, 2007) το οποίο όμως δεν εντοπίστηκε στην παρούσα μελέτη, ούτε στη μελέτη των Barros *et al.* (2013). Οι Mencherini *et al.*, (2007) αναφέρουν τη λουτεολίνη σαν το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό μετά το ροσμαρινικό οξύ. Η απουσία ή παρουσία γλυκοζιδίων λουτεολίνης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το κλίμα και η γεωγραφία της περιοχής στην οποία καλλιεργείται το φυτό καθώς και η διαφορά στη διαδικασία εκχύλισης που ακολουθείται σε μία μελέτη (Zgorcka *et al.*, 2006, Ziakova *et al.*, 2003).

Χαρακτηριστικό είναι ότι σε αιθανολικό εκχύλισμα και σε εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα του μελισσόχορτου ταυτοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενώσεις: ναριγκενίνη, εσπεριτίνη (Dastmalchi *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2012), κερκετίνη, λουτεολίνη, καμφερόλη, απιγενίνη, καμφερίδη και γκεγκουανίνη (Αναστασάκη, 2014) ενώ απουσιάζουν από το μελετούμενο εκχύλισμα όπως και στη μελέτη των Justesen *et al.*, (2001). Σε πρόσφατη μελέτη εκχυλίσματος (MeOH-H₂O, 80:20 v/v) μελισσόχορτου αναφέρεται ότι το χρωματογράφημα HPLC στα 254 nm αποκάλυψε περισσότερες κορυφές από ότι στα 280 και 320 nm (Arceusz *et al.*, 2013). Οι Mueller *et al.*, (2001) αναφέρουν ότι η περιεκτικότητα και η παρουσία φαινολικών συστατικών στα φυτά επηρεάζονται από τον τρόπο ξήρανσης ειδικά αν αυτή η διαδικασία γίνεται σε υψηλή θερμοκρασία.

Παρακάτω (Σχήμα 3.5) παρουσιάζεται η κυριότερη ένωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου, το ροσμαρινικό οξύ και το αντίστοιχο χρωματογράφημα (Σχήμα 3.6).

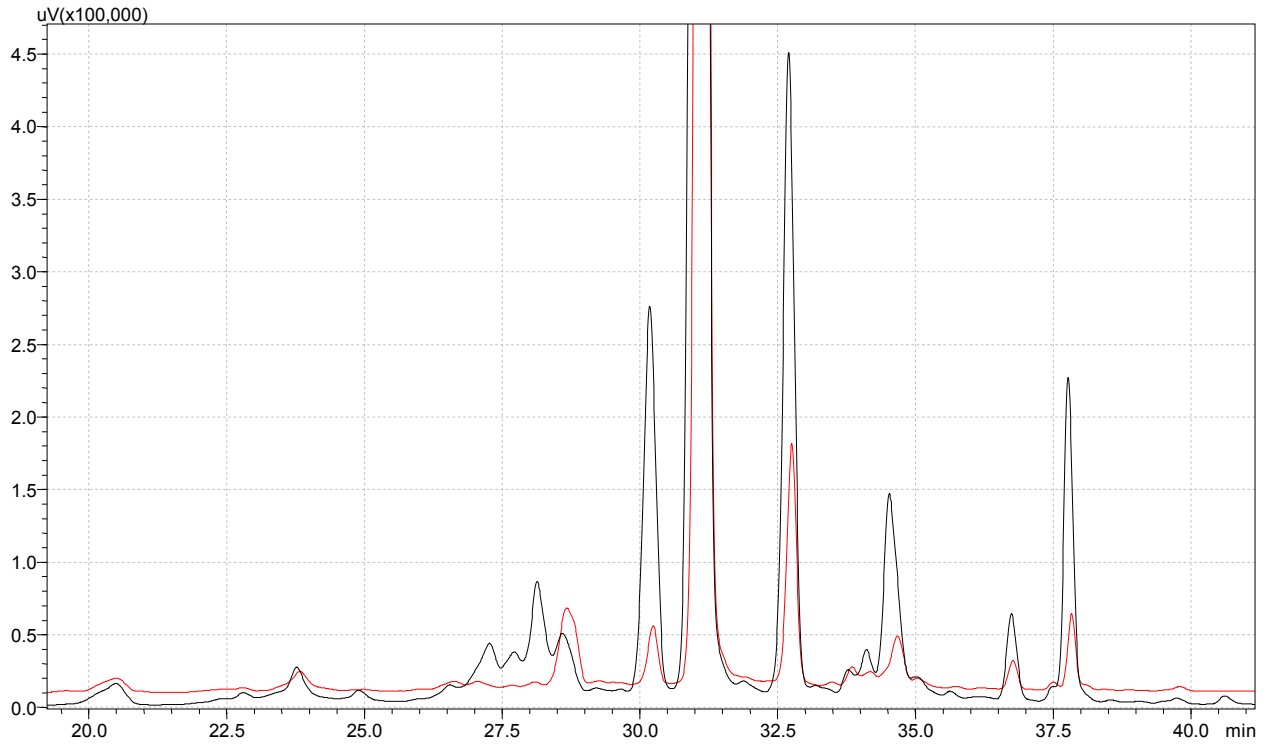


Σχήμα 3.5 Ροσμαρινικό οξύ



Σχήμα 3.6 Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) μελισσόχορτου ($\lambda=330\text{nm}$) με την κυριότερη κορυφή

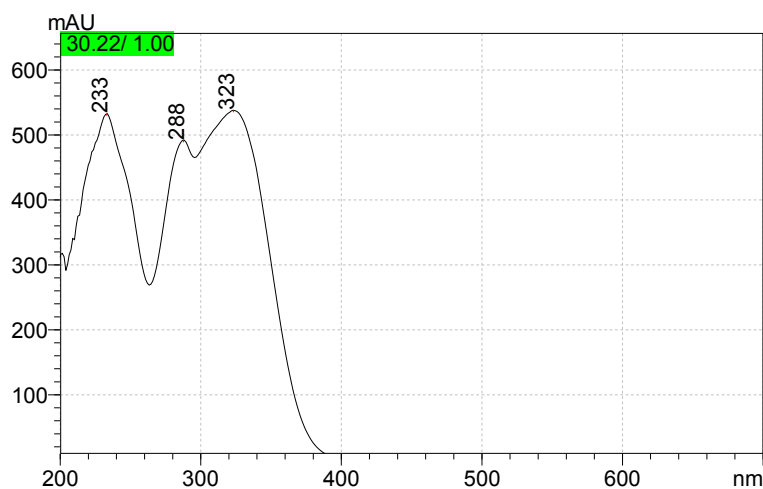
Επίσης, παρατίθεται η σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ της μελέτης με αυτό της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014) βάσει του οποίου εξήχθησαν τα συμπεράσματα για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου (Σχήμα 3.7). Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της βιβλιογραφικής πηγής και με μαύρο χρώμα το χρωματογράφημα της παρούσας μελέτης.



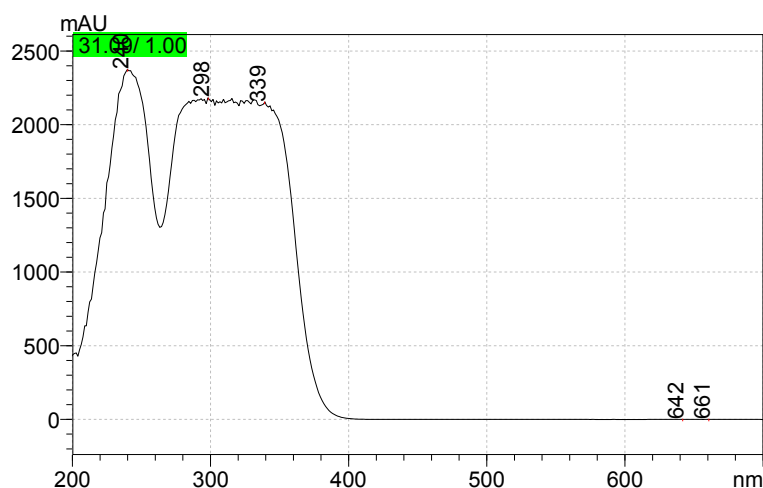
Σχήμα 3.7 Σύγκριση χρωματογραφημάτων μεθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου μελέτης (μαύρο χρώμα) και κύριας βιβλιογραφικής πηγής (κόκκινο χρώμα) ($\lambda=330\text{nm}$)

Από τη σύγκριση συμπεραίνουμε ότι υπάρχουν κάποιες διαφορές περισσότερο ποσοτικές και όχι ποιοτικές καθώς οι κυριότερες κορυφές συμπίπτουν. Παρατηρείται μία μετατόπιση των χρόνων έκλουσης, παρόλο αυτά τα χρωματογραφικά προφίλ των δύο μελετών ταιριάζουν, με το χρωματογράφημα της παρούσας μελέτης να έχει πιο καθαρές κορυφές.

Στο **Σχήμα 3.8** παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των κύριων κορυφών του χρωματογραφήματος με τα χαρακτηριστικά λ_{\max} . Τα φάσματα των υπόλοιπων κορυφών παρατίθενται στο παράρτημα.



1. Φάσμα UV-Vis ισομερές ροσμαρινικού οξέος με κορυφές στα 233, 288 και 323 nm



2. Φάσμα UV-Vis ροσμαρινικού οξέος με κορυφές στα 245 και 339 nm

Σχήμα 3.8 Φάσματα UV-Vis των κυριότερων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου

Το μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού χαρακτηρίστηκε από την ύπαρξη παραγώγων υδροξυκιναμωμικού οξέος και γλυκοζιδιωμένων μορφών φλαβονοειδών, συγκεκριμένα, παράγωγα καφεϊκού και φερουλικού οξέος και γλυκοζιδιωμένες μορφές απιγενίνης αντίστοιχα (**Πίνακας 3.3**).

Πίνακας 3.3 Ποιοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του χαμομηλιού βάση των δεδομένων LC-DAD

| Δεδομένα LC-DAD Μελέτης | | | | Δεδομένα LC-DAD Βιβλιογραφίας (Αναστασάκη, 2014) | |
|---------------------------------------|------------------|---------|--|---|-----------------|
| Χρόνος έκλουσης (t_R) (min) | λ_{max} | Area% | Προτεινόμενη δομή | Χρόνος έκλουσης (t_R) (min) | λ_{max} |
| 16.3 | 239, 325 | 3.7545 | χλωρογενικό οξύ | 16.0 | 240, 324 |
| 17.7 | 242, 325 | 0.5104 | ισομερές χλωρογενικού | 17.8 | 240.324 |
| 20.8 | 236, 302 | 6.5677 | φερουλικός γλυκοζυλεστέρας | 20.8 | 234, 309 |
| 24.1 | 259, 357 | 4.3438 | γλυκοζίτης μεθυλοφλαβονόλης | 24.1 | 259, 354 |
| 25.8 | 254, 288, 328 | 0.4945 | ουμπελλιφερόνη | 25.8 | 253, 324 |
| 27.3 | 240, 297, 322 | 25.5470 | γλυκοζίτης του φερουλικού | 27.3 | 239, 295, 319 |
| 28.5 | 258, 368 | 7.6138 | γλυκοζίτης φλαβονόλης | 28.5 | 258, 370 |
| 30.4 | 247, 328 | 5.7977 | διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος | 30.4 | 244, 326 |
| 31.0 | 266, 330 | 0.4714 | γλυκουρονικό παράγωγο της απιγενίνης | 31.0 | 267, 335 |
| 31.7 | 267, 338 | 9.4973 | 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης | 31.7 | 267, 340 |
| 33.0 | 253, 327 | 3.4344 | γλυκοζίτης φλαβόνης | 33.0 | 252, 268, 335 |
| 34.4 | 266, 340 | 3.8066 | ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης | 34.4 | 266, 333 |
| 35.0 | 267, 338 | 4.3999 | ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης | 35.0 | 266, 339 |
| 37.4 | 267, 337 | 6.7148 | διακετυλιωμένο παράγωγο της απιγενίνης | 37.4 | 267, 338 |
| 41.4 | 265, 344 | 0.3173 | απιγενίνη | 41.5 | 267, 340 |

Οι κυριότερες ενώσεις ήταν οι ακόλουθες: γλυκοζίτης του φερουλικού, και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης (**Σχήμα 3.9**). Σε πρόσφατη μελέτη κυριαρχούν στο μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης και το χλωρογενικό οξύ (Novakova *et al.*, 2010) και σε άλλη μελέτη το *trans*-GMCA [(E)-2-β-d-γλυκοζυλ-4-

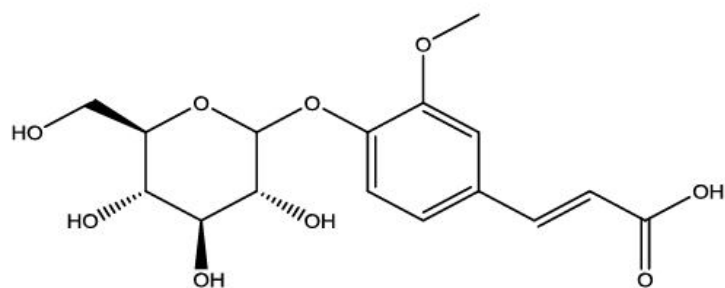
μεθοξυκιναμμικό οξύ], *cis*-GMCA και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης (Avula *et al.*, 2014).

Η κύρια κορυφή βρέθηκε στα 27.3 min, με λ_{\max} 240, 297, 322 και αποδόθηκε σε γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος. Το χλωρογενικό οξύ ταυτοποιήθηκε με βάση την αντίστοιχη πρότυπη ένωση. Η κορυφή με λ_{\max} 325 nm χαρακτηρίστηκε ως ισομερές του χλωρογενικού οξέος συγκρίνοντας τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV με τη βιβλιογραφία όπως και στην περίπτωση της ουμπελλιφερόνης και του διεστέρα καφεϊκού-κινικού οξέος. Η ένωση με χρόνο έκλουσης 20.8 min αποδόθηκε σε φερουλικό γλυκοζυλεστέρα (Fonseca *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2012, Kogiannou *et al.*, 2013, Αναστασάκη, 2014). Η παρουσία ικανών ποσοτήτων φαινυλπροπανοειδών στο χαμομήλι, ειδικά στα ανθίδια, έχει ήδη αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Fonseca *et al.*, 2007, McKay, *et al.*, 2006).

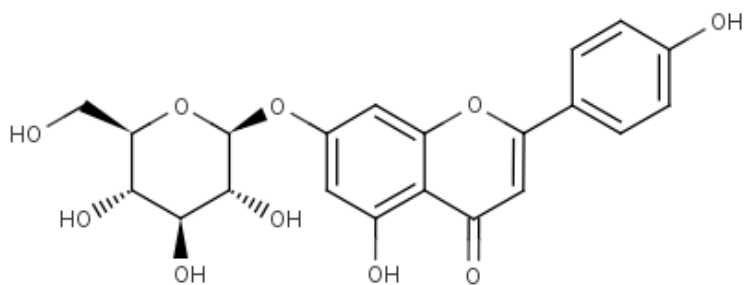
Οι κορυφές με λ_{\max} 266, 267, 338 και 340 nm αποτελούν γλυκοζίτες της απιγενίνης, οι κορυφές στα 31.0 και 37.4 min χαρακτηρίστηκαν ως παράγωγα της απιγενίνης και στα 41.4 min ως απιγενίνη (Lin *et al.*, 2012, Kogiannou *et al.*, 2013, Αναστασάκη, 2014). Υπάρχουν αναφορές ότι η παρουσία αρκετών ακετυλιωμένων παραγώγων απιγενίνης πιθανόν να οφείλεται σε χειρισμούς κατά τη διάρκεια ξήρανσης του δείγματος καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η διάσπαση του εστερικού δεσμού (Švehlíková *et al.*, 2004, Tschiersch *et al.*, 1992). Στην ίδια μελέτη (Švehlíková *et al.*, 2004) όπως και σε άλλη (Lin *et al.*, 2012) αποδείχθηκε η παρουσία αρκετών γλυκοζιτών απιγενίνης όπως τα παράγωγα του 7-O-γλυκοζίτη απιγενίνης μαλότυλο- και καφεοϋλο που ονομάζονται απιγενίνη-7-(6"-μαλονυλογλυκοζίδιο) και απιγενίνη-7-(6"-καφεοϋλογλυκοζίδιο), τα οποία είναι ασταθή και αποικοδομούνται ταχέως για να σχηματίσουν τον 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης. Σε αρκετές μελέτες, Mulinacci *et al.* (2000), Nováková *et al.* (2010), Harbourne *et al.* (2009) και Srivastava *et al.*, (2009) αναφέρεται η παρουσία του 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και άλλων παραγώγων της ενώ σε άλλες όχι (Guimaraes *et al.*, 2013).

Ακόμη, σε άλλη πρόσφατη μελέτη ταυτοποιήθηκε η κερκετίνη και ο 7-O-γλυκοζίτης κερκετίνης (Roby *et al.*, 2013) ενώ δεν συνέβη το ίδιο στην παρούσα μελέτη. Στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) ταυτοποιήθηκε η κερκετίνη αλλά σε εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα. Οι Novakova *et al.* (2010) ταυτοποίησαν και άλλες ενώσεις σε μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού όπως τις φλαβονόλες καεμπερόλη και ισοραμετίνη και διάφορα παράγωγα κερκετίνης. Οι κορυφές στα 24.1, 28.5 min αποδόθηκαν σε φλαβονόλες και η κορυφή στα 33.0 min σε φλαβόνη βάσει των λ_{\max} . Στην μελέτη των Fonseca *et al.* (2007) ταυτοποιήθηκε σε μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού η φλαβανόνη ναριγκενίνη και οι Roby *et al.* (2013) ταυτοποίησαν την φλαβανόνη εσπεριτίνη.

Αποτελέσματα & Συζήτηση

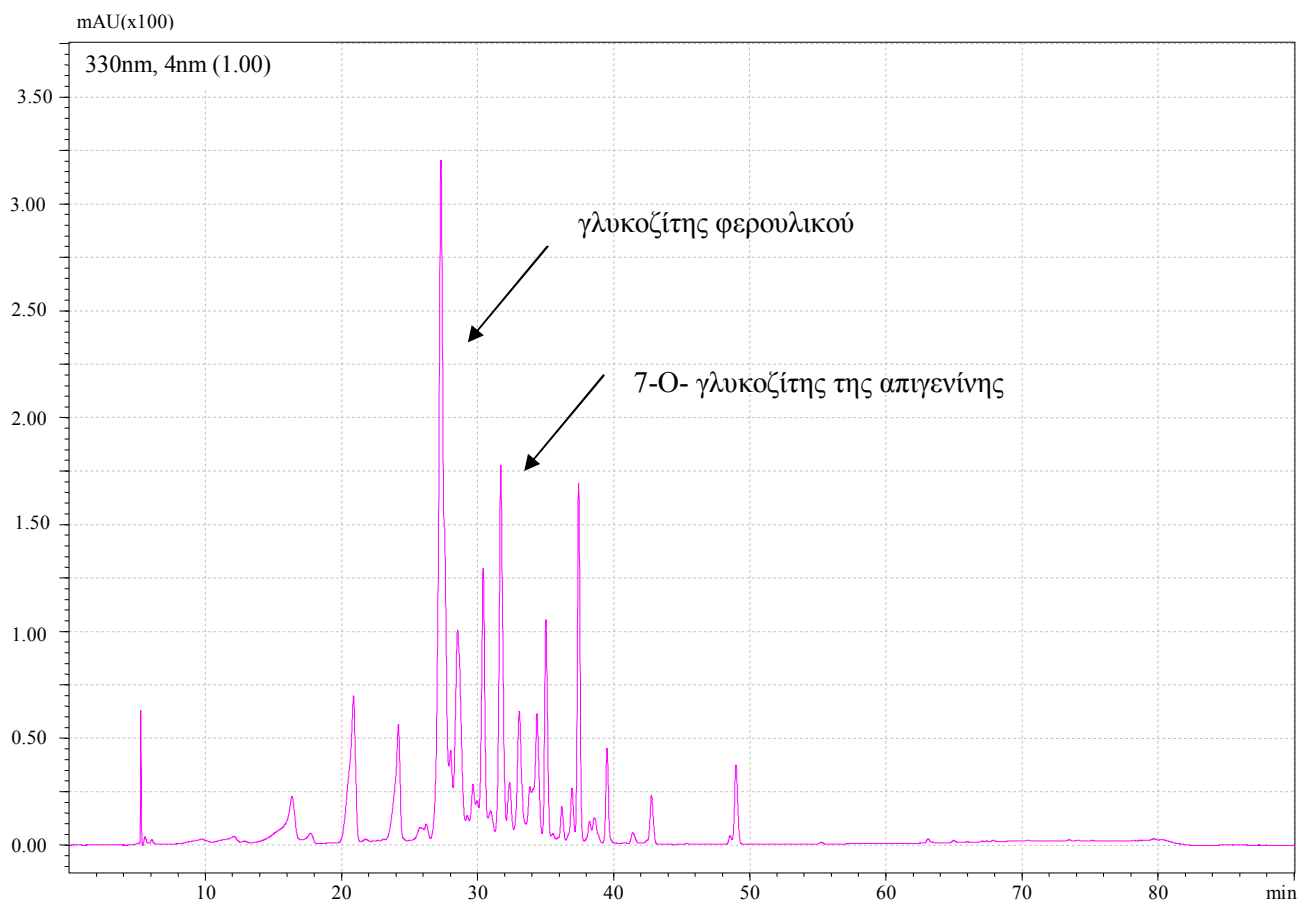


γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος



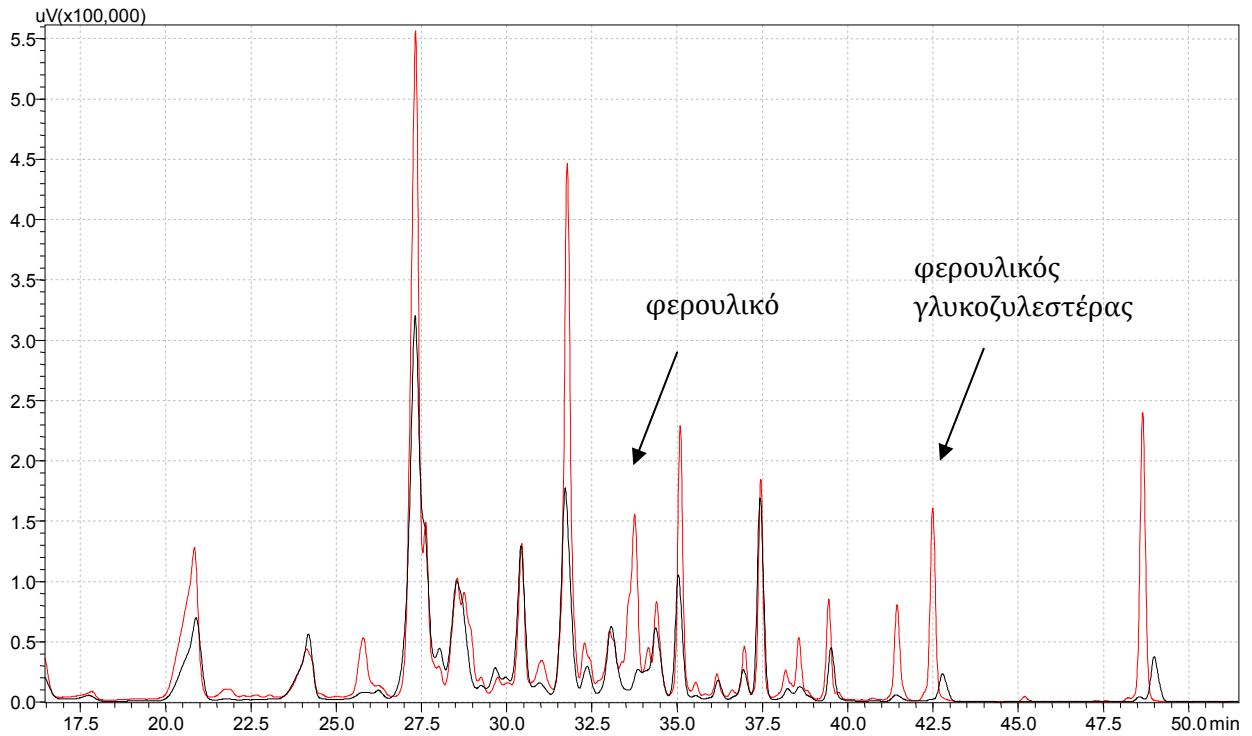
7-O- γλυκοζίτης της απιγενίνης

Σχήμα 3.9 Οι δύο κυριότερες ενώσεις στο χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος του χαμομηλιού



Σχήμα 3.10 Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος (MeOH) χαμομηλιού με τις κυριότερες κορυφές ($\lambda=330$ nm).

Στο παραπάνω χρωματογράφημα (**Σχήμα 3.10**) παρουσιάζονται οι 2 κύριες ενώσεις του μεθανολικού εκχυλίσματος του χαμομηλιού. Παρακάτω (**Σχήμα 3.11**) παρατίθεται η σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ της μελέτης με αυτό της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014) βάσει του οποίου εξήχθησαν τα συμπεράσματα για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού.

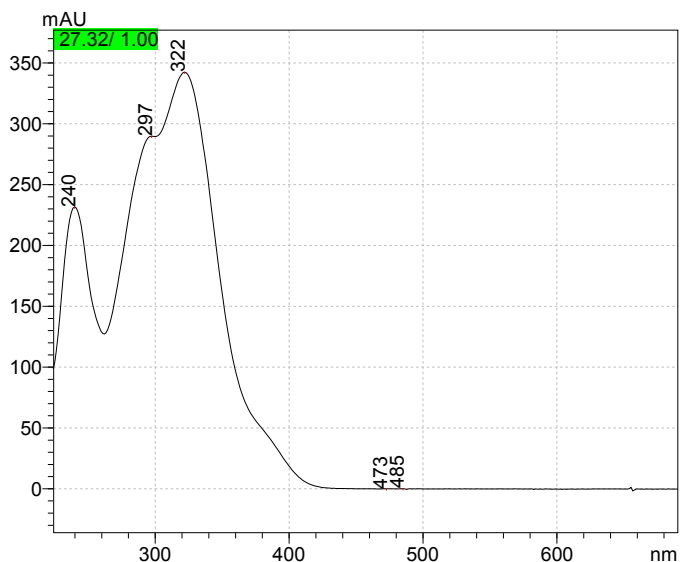


Σχήμα 3.11 Σύγκριση χρωματογραφημάτων μεθανολικού εκχυλίσματος χαμομηλιού μελέτης (μαύρο χρώμα) και κύριας βιβλιογραφικής πηγής (κόκκινο χρώμα) ($\lambda=330\text{nm}$)

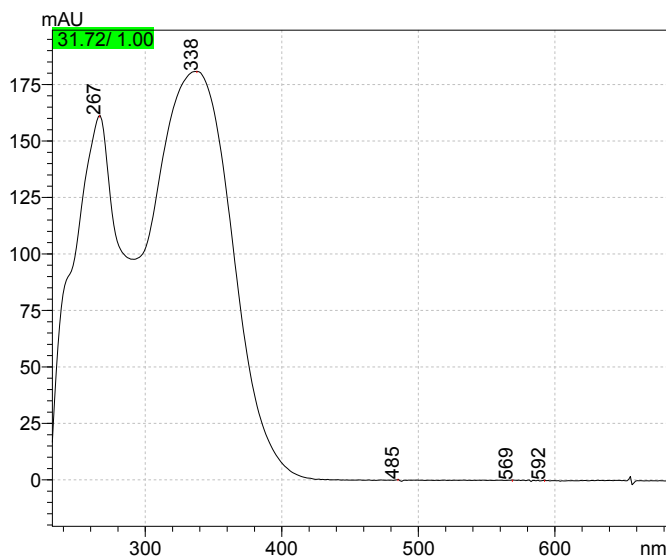
Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της βιβλιογραφικής πηγής και με μαύρο χρώμα το χρωματογράφημα της παρούσας μελέτης. Θα πρέπει να μην ληφθούν υπόψη τυχόν ποσοτικές διαφορές που είναι εμφανείς γιατί το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση LC-DAD στην περίπτωση της βιβλιογραφίας, ήταν μεγαλύτερης συγκέντρωσης (3,25 mg/mL) σε σχέση με αυτό της μελέτης (2 mg/mL). Είναι εμφανές ότι τα χρωματογραφικά προφίλ είναι παρόμοια σε μεγάλο ποσοστό. Σημαντική διαφορά υπάρχει στα 33.8 min και στα 42.5 min όπου παρατηρείται η έκλυση του φερουλικού οξέος και του διμερούς φερουλικού γλυκοζυλεστέρα αντίστοιχα, κάτι που δεν συμβαίνει στο χρωματογράφημα της παρούσας μελέτης καθώς τα λ_{max} των ενώσεων που εκλύονται σε αυτούς τους χρόνους διαφέρουν από αυτά των ενώσεων που προαναφέρθηκαν.

Αποτελέσματα & Συζήτηση

Στο **Σχήμα 3.12** παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των κύριων κορυφών του χρωματογραφήματος με τα χαρακτηριστικά λ_{\max} . Τα φάσματα των υπόλοιπων κορυφών παρατίθενται στο παράρτημα.



1. Φάσμα UV-Vis γλυκοζίτη φερουλικού οξέος με κορυφές στα 240, 297 και 322 nm



2. Φάσμα UV-Vis 7-O-γλυκοζίτη απιγενίνης με κορυφές στα 267 και 338 nm

Σχήμα 3.12 Φάσματα UV-Vis των κυριότερων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος του χαμομηλιού

Οι ποιοτικές διαφορές που παρατηρούνται γενικά στα δείγματα αποτελούν ένδειξη για διαφορετικές επιλογές στη γεωργική πρακτική, όπως και στην αποθήκευση, επεξεργασία του φυτικού υλικού, παράγοντες που επηρεάζουν αναπόφευκτα τη

σύνθεση και το περιεχόμενο των δραστικών ενώσεων στο τελικό προϊόν (Novakova *et al.*, 2010).

3.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.3.2. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των μεθανολικών εκχυλισμάτων των τριών φυτών.

Πίνακας 3.4 Ποσοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του κρόκου βάσει των δεδομένων LC-DAD

| Χρόνος έκλουσης (t_R) (min) | Όνομα ουσίας | μg/mg εκχυλίσματος* | mg/g φυτικού υλικού |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| 20.7 | τριγλυκοζίτης καεμφερόλης | 1,67±0,21 | 0,98±0,14 |
| 25.2 | διγλυκοζίτης καεμφερόλης | 1,99±0,08 | 1,17±0,07 |
| 27.2 | διγλυκοζίτης καεμφερόλης | 14,58±0,75 | 8,59±0,59 |
| 30.5 | <i>trans</i> -5-tG | 91,89±2,92 | 5,41±0,26 |
| 31.3 | <i>trans</i> -5-nG | 43,89±5,32 | 2,59±0,36 |
| 33.5 | <i>trans</i> -4-GG | 2585,76±264,96 | 140,61±1,44 |
| 35.5 | <i>trans</i> -4-ng | 81,63±9,21 | 4,44±0,09 |
| 36.1 | <i>trans</i> -3-Gg | 1639,02±405,25 | 80,37±2,34 |
| 38.7 | <i>trans</i> -2-gg | 90,76±42,12 | 3,83±0,40 |
| 44.5 | <i>trans</i> -2-G | 685,49±286,27 | 29,20±1,54 |
| 45.4 | <i>cis</i> -4-GG | 769,07±69,83 | 45,26±3,35 |
| 47.9 | <i>cis</i> -3-Gg | 347,10±27,05 | 20,46±1,94 |
| 50.3 | <i>trans</i> -1-g | 9,51±2,58 | 0,56±0,14 |
| 53.6 | <i>cis</i> -2-G | 70,84±10,65 | 4,17±0,56 |

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

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου αξιοσημείωτη ήταν η παρουσία των *trans*-4-GG και *trans*-3-Gg όπως και του αντίστοιχου *cis*-4-GG με τιμές 140,61 mg/g, 80,37 mg/g και 45,26 mg/g φυτικού υλικού (Πίνακας 3.4). Η *trans*-4-GG και η *trans*-3-Gg

αποτελούν τις κύριες κροκίνες του εκχυλίσματος όπως και στο μεθανολικό εκχύλισμα της κύριας βιβλιογραφικής πηγής με 157,61 και 89,40 mg/g φυτικού υλικού, ενώ σημαντική ήταν και η ποσότητα της *cis*-4-GG με 30,88 mg/g φυτικού υλικού.

Οι Siracusa *et al.*, (2013) εξέτασαν δείγματα κρόκου των οποίων ο κόρμος προερχόταν από 5 διαφορετικές χώρες (Ιταλία, Ισπανία, Ιράν, Ινδία και Αυστραλία) και εν τέλει για τις ανάγκες του πειράματος φυτεύθηκαν σε περιοχή της Ιταλίας. Οι κυριότερες κροκίνες του υδροαιθανολικού εκχυλίσματος ήταν οι ακόλουθες: *trans*-4-GG με εύρος 75,65- 87,36 mg/g φυτικού υλικού, *cis*-3-Gg με εύρος 55,06- 65,20 mg/g φυτικού υλικού και *trans*-3-Gg με εύρος 37,81-45,05 mg/g φυτικού υλικού. Ο κόρμος με προέλευση την Ισπανία είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κροκίνες (Siracusa *et al.*, 2013).

Σε άλλη μελέτη εξετάστηκαν υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κρόκου από 10 διαφορετικές χώρες όπου η *trans*-4-GG ήταν η κυριότερη κροκίνη σε όλα τα δείγματα με εύρος 6,29-41,21 mg/g φυτικού υλικού. Ο κόρμος προερχόμενος από την Ελλάδα εμφάνισε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κροκίνες 94,06 mg/g φυτικού υλικού και ο κόρμος από την Κίνα τη μικρότερη 9,86 mg/g φυτικού υλικού. Γενικά παρατηρήθηκαν πολλές διακυμάνσεις στις ποσότητες των κροκινών μεταξύ των δειγμάτων κάτι που πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές διεργασίες ξήρανσης, στον χρόνο και τις συνθήκες συσκευασίας και αποθήκευσης του κρόκου τα οποία επηρεάζουν τη συγκέντρωση των κροκινών καθώς αποτελούν θερμικά ασταθή και φωτοευαίσθητα συστατικά (Tarantilis *et al.*, 1995). Οι Anastasaki *et al.*, (2010) μελέτησαν δείγματα κρόκου από τέσσερις διαφορετικές χώρες και διαπίστωσαν ότι η *trans*-4-GG εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή στα δείγματα προερχόμενα από Ιταλία (160 mg/g φυτικού υλικού) και τη μικρότερη τιμή στα δείγματα με προέλευση από το Ιράν (100 mg/g φυτικού υλικού) ενώ ο ελληνικός κόρμος περιείχε 120 mg/g φυτικού υλικού. Σε πρόσφατη μελέτη των Serrano-Díaz *et al.*, (2012) εξετάστηκαν υδατικά εκχυλίσματα κρόκου με ισπανική προέλευση, για την περιεκτικότητά τους σε κροκίνες. Όπως και στις προαναφερθείσες μελέτες τα δείγματα είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε *trans*-4-GG 124,78 mg/g φυτικού υλικού ακολουθούμενη από την *trans*-3-Gg με 94,52 mg/g φυτικού υλικού. Στη μελέτη των Sánchez *et al.*, (2008) εξετάστηκαν 55 δείγματα κρόκου βάσει του ISO/TS 3652 και η περιεκτικότητα των *trans*-4-GG και *trans*-3-Gg διακυμάνθηκε ως εξής: 130,2- 190,3 mg/g και 54,5-96,1 mg/g φυτικού υλικού αντίστοιχα.

Αναφορικά με τα φλαβονοειδή εντοπίστηκαν μόνο από την ομάδα των φλαβονολών, όπως και στην μελέτη των Carmona *et al.*, (2007). Συγκεκριμένα ένας τριγλυκοζίτης και δύο διγλυκοζίτες της καεμφερόλης με ποσότητες 0,98 mg/g, 1,17 mg/g και 8,59 mg/g φυτικού υλικού αντίστοιχα, ποσότητες που κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα σε σχέση με την κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) εκτός του διγλυκοζίτη με χρόνο έκλουσης 27,2 min που είναι σχεδόν διπλάσιος σε ποσότητα (4,66 mg/g φυτικού υλικού). Οι Carmona *et al.*, (2007) εξέτασαν δείγματα κρόκου από τέσσερις διαφορετικές χώρες (Ελλάδα, Ισπανία, Ιράν και Μαρόκο) και αναφέρουν ότι ο κόρμος με ισπανική προέλευση περιέχει 2,58 mg/g καεμφερόλη εστεροποιημένη με σοφορόζη στην 3 θέση και με γλυκοζίτη στην 7 θέση, ενώ ο κόρμος από την Ελλάδα δεν

διέφερε πολύ με 2,24 mg/g φυτικού υλικού. Οι υπόλοιποι γλυκοζίτες απαντώνται σε εύρος 0,59-3,12 mg/g φυτικού υλικού στα διάφορα δείγματα (Carmona *et al.*, 2007).

Πίνακας 3.5 Ποσοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του μελισσόχορτου βάσει των δεδομένων LC-DAD

| Χρόνος έκλουσης (t _R) (min) | Όνομα ουσίας | μg/mg εκχυλίσματος* | μg/g φυτικού υλικού |
|---|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| 20.5 | καφεϊκό οξύ | 1,47±0,46 | 230,3±100,2 |
| 28.1 | ισομερές σαλβιανολικού οξέος I | 6,41±0,88 | 978,8±7,9 |
| 30.2 | ισομερές ροσμαρινικού οξέος | 48,10±21,22 | 9306,0±1832,7 |
| 31.1 | ροσμαρινικό οξύ | 192,68±20,41 | 38965,6±5898,9 |
| 33.8 | ισομερές λιθοσπερμικού οξέος | 1,56±0,40 | 243,9±92,2 |
| 34.1 | ισομερές σαλβιανολικού οξέος I | 2,80±0,64 | 438,2±153,6 |
| 34.5 | γλυκουρονίδιο λουτεολίνης | 13,03±3,18 | 2037,5±747,4 |
| 36.7 | ισομερές σαλβιανολικού οξέος B | 4,03±0,40 | 624,6±141,2 |
| 37.8 | παράγωγο υδροξυκιναμικού οξέος | 11,90±0,18 | 1831,1±207,8 |

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

Στο μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (Πίνακας 3.5) επικρατεί το ροσμαρινικό οξύ με 192,68 μg/mg εκχυλίσματος, τιμή κοντινή σε σχέση με την ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος που καταγράφηκε στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασιάκη, 2014) με 122,56 μg/mg εκχυλίσματος. Σε αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου το ροσμαρινικό οξύ υπολογίσθηκε στα 90,53 μg/mg εκχυλίσματος (Miron *et al.*, 2013) και σε υδροαιθανολικό 96,45 μg/mg εκχυλίσματος (Dastmalchi *et al.*, 2008). Σε άλλη πρόσφατη μελέτη αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου καταγράφηκαν οι ακόλουθες τιμές για το ροσμαρινικό οξύ: 87,33 mg/g φυτικού υλικού και 78,40 mg/g φυτικού υλικού (Lin *et al.*, 2012) με την πρώτη τιμή να αναφέρεται στην περίπτωση λυοφιλίωσης του φυτικού υλικού και στη δεύτερη τιμή να αναφέρεται στη περίπτωση ξήρανσής του με θερμό αέρα. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι το εκχύλισμα που προήλθε από φυτικό υλικό που ξηράνθηκε με θερμό αέρα είχε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ αλλά και στα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά σε σχέση με αυτό που ξηράνθηκε με λυοφιλίωση (Lin *et al.*, 2012). Όπως είχαν αρχικά επισημάνει και οι Okuda *et al.*, (1989) το ροσμαρινικό οξύ υποβαθμίζεται όταν η ξήρανση του φυτικού υλικού γίνεται με θερμό αέρα (60-80 °C).

Αποτελέσματα & Συζήτηση

Σε άλλη μελέτη όμως αποδείχθη ότι τα αποξηραμένα φυτικά υλικά περιέχουν μεγαλύτερα ποσοστά σε φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με τα νωπά φυτικά υλικά (Suvarnakuta *et al.*, 2011) και αυτό παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Barros *et al.*, (2013) πιθανώς λόγω του υψηλότερου στρες που υφίσταται το φυτικό υλικό. Οι Kamdem *et al.*, (2013) κατέγραψαν αναφορικά με το ροσμαρινικό οξύ 14,37 μg/mg εκχυλίσματος σε αιθανολικό εκχύλισμα και 62,09 μg/mg εκχυλίσματος αναφορικά με το καφεϊκό οξύ. Στη μελέτη των Arceusz *et al.*, (2013) εξετάστηκαν τα εκχυλίσματα (MeOH-H₂O, 80:20 v/v) από 19 δείγματα μελισσόχορτου και παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος: 158–48608 μg/g φυτικού υλικού για το ροσμαρινικό οξύ και 47–705 μg/g φυτικού υλικού για το καφεϊκό.

Πίνακας 3.6 Ποσοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του χαμομηλιού βάσει των δεδομένων LC-DAD

| Χρόνος έκλουσης (t _R) (min) | Όνομα ουσίας | μg/mg εκχυλίσματος* | μg/g φυτικού υλικού |
|---|--|---------------------|---------------------|
| 16.3 | Χλωρογενικό οξύ | 5,67±0,10 | 1356,4±48,1 |
| 17.7 | ισομερές χλωρογενικού | 1,16±0,07 | 277,1±11,4 |
| 20.8 | φερουλικός γλυκοζυλεστέρας | 12,12±3,34 | 2890,5±746,2 |
| 24.1 | γλυκοζίτης μεθυλοφλαβονόλης | 11,53±0,09 | 2756,1±28,4 |
| 27.3 | γλυκοζίτης του φερουλικού | 40,03±4,46 | 9557,4±896,6 |
| 28.5 | γλυκοζίτης φλαβονόλης | 22,74±3,92 | 5427,5±840,5 |
| 30.4 | διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος | 8,39±0,39 | 2006,3±127,9 |
| 31.0 | γλυκουρονικό παράγωγο της απιγενίνης | 0,84±0,15 | 200,1±31,4 |
| 31.7 | 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης | 17,78±5,86 | 4237,8±1325,8 |
| 33.0 | γλυκοζίτης φλαβόνης | 5,40±0,60 | 1288,5±121,0 |
| 34.4 | ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης | 7,08±2,23 | 1686,7±502,0 |
| 35.0 | ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης | 7,10±1,06 | 1695,5±224,3 |
| 37.4 | διακετυλιωμένο παράγωγο της απιγενίνης | 10,84±1,67 | 2588,0±353,9 |
| 41.4 | απιγενίνη | 0,43±0,14 | 103,6±31,5 |

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

Όπως ήδη αναφέραμε στο μεθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού είναι σημαντική η παρουσία του γλυκοζίτη του φερουλικού οξέος με 9557,4 μg/g φυτικού υλικού και ακολουθούν ο γλυκοζίτης φλαβονόλης με 5427,5 μg/g φυτικού υλικού όπως και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης με 4237,8 μg/g φυτικού υλικού (**Πίνακας 3.6**). Στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) δεν υπάρχει υπεροχή κάποιου συστατικού αλλά ο γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα (6064,0 και 5739,9 μg/g φ.υ.) με το φερουλικό οξύ (3953,5 μg/g φ.υ.) και τον γλυκοζίτη φλαβανόλης (3268,7 μg/g φ.υ.) να ακολουθούν. Στη μελέτη των Guimaraes *et al.*, (2013) κυριαρχεί εξίσου ο γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος ενώ αναφορικά με τα φλαβονοειδή κυριαρχούν οι φλαβόνες. Οι Srivastava *et al.*, (2010) αναγνώρισαν ως κύριο συστατικό τον 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης τόσο στο μεθανολικό όσο και στο υδατικό εκχύλισμα αν και στο μεθανολικό εκχύλισμα παρατηρήθηκε απώλεια γλυκοζιτικού περιεχομένου. Οι Lin *et al.*, (2012) ανίχνευσαν ως τα κύρια φαινολικά συστατικά σε υδρομεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού τους γλυκοζίτες των φλαβονών. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι τυχόν ποσοτικές διαφορές των φαινολικών συστατικών μπορεί να οφείλονται σε πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των κλιματικών συνθηκών, των εποχιακών αλλαγών, της γεωφυσικής κατάστασης της περιοχής στην οποία αναπτύσσεται το φυτό όπως και του χρόνου συγκομιδής (Srivastava *et al.*, 2010).

Στη μελέτη των Anula *et al.*, (2014) μελετήθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα από 28 δείγματα χαμομηλιού και είναι αξιοσημείωτη η διακύμανση της ποσότητας του 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και της απιγενίνης μεταξύ των δειγμάτων, από 20-3510 μg/g και 120-1300 μg/g φυτικού υλικού αντίστοιχα. Σε άλλη πρόσφατη μελέτη (Haghi *et al.*, 2014), παρουσιάστηκαν τα εξής ποσοτικά αποτελέσματα για μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού: για τον 7-O-γλυκοζίτη απιγενίνης 2100μg/g και για την απιγενίνη 1300μg/g φυτικού υλικού. Οι Novacova *et al.*, (2010) παραθέτουν την ποσοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών σε μmol/L κάτι που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αν και όπως προαναφέραμε είναι σαφής η κυριαρχία του χλωρογενενικού οξέος και του 7-O-γλυκοζίτη απιγενίνης στα μεθανολικά εκχυλίσματα.

3.2 Παραλαβή εκχυλίσματος- Αποδόσεις

Στα φυτά έγιναν διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Αρχικά με πετρελαϊκό αιθέρα ο οποίος παραλαμβάνει τα πτητικά λιγότερα πολικά συστατικά, στη συνέχεια με εξάνιο το οποίο εκχυλίζει τα υπολείμματα των πτητικών συστατικών, ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα για την παραλαβή των άγλυκων φλαβονοειδών και των μεσαίας πολικότητας συστατικών και τέλος με μεθανόλη, η οποία εκχυλίζει τα περισσότερο πολικά συστατικά, τους γλυκοζίτες φλαβονοειδών. Η διαδικασία των εκχυλίσεων πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.7**) παρουσιάζονται οι αποδόσεις των φυτικών εκχυλισμάτων, δηλαδή, το καθαρό βάρος του εκχυλίσματος (g/5 g) για τον

διαλύτη, το οποίο προέκυψε από το αρχικό δείγμα των 5 g και γίνεται έκφραση αυτών και σε g/kg.

Πίνακας 3.7 Αποδόσεις εκχυλισμάτων εκφρασμένες σε 5 g και 1 kg φυτικού υλικού

| Φυτό | Απόδοση (g/5g)* | Απόδοση (g/kg) |
|--------------|-----------------|----------------|
| Κρόκος | 2,95±0,05 | 589,00±9,90 |
| Μελισσόχορτο | 0,86±0,16 | 171,00±32,60 |
| Χαμομήλι | 1,21±0,04 | 242,67±7,02 |

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

Μεγαλύτερη απόδοση έχει το εκχύλισμα του κρόκου με 589,00 g/kg, ακολουθεί το χαμομήλι με 242,67 g/kg και το μελισσόχορτο με τη μικρότερη απόδοση 171,00 g/kg φυτικού υλικού.

Το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου παρουσιάζει λίγο μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με αυτό της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014), όπου υπολογίστηκε στα 519 g/kg φυτικού υλικού. Η υπεροχή της απόδοσης του κρόκου σε σχέση με τα άλλα φυτά είναι φυσιολογική καθώς ο κρόκος αποτελείται από δύο κύριους δευτερογενείς μεταβολίτες, τις κροκίνες και την πικροκροκίνη. Οι κροκίνες έχουν περιεκτικότητα 18-37% (Sánchez *et al.*, 2008; Lage *et al.*, 2009, Anastasaki *et al.*, 2010) και η πικροκροκίνη έχει περιεκτικότητα 15-28,8% (Lage *et al.*, 2009, Del Campo *et al.*, 2010) του ξηρού βάρους του φυτού.

Όσον αφορά το μελισσόχορτο, η απόδοση του μεθανολικού εκχυλίσματος κινήθηκε στα ίδια επίπεδα με της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014), στην οποία μετρήθηκε 179 g/kg φυτικού υλικού. Οι Dastmalchi *et al.*, (2008) εκτίμησαν την απόδοση υδροαιθανολικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εκχύλισης υγρού- στερεού υπό πίεση, στα 309 g/kg φυτικού υλικού, οι Guginski *et al.*, (2009) την απόδοση αιθανολικού στα 130 g/kg φυτικού υλικού και οι Stefanović *et al.*, (2012) την απόδοση αιθανολικού στα 100g/kg φυτικού υλικού.

Σχετικά με το εκχύλισμα του χαμομηλιού, τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με της κύριας βιβλιογραφικής πηγής (Αναστασάκη, 2014) όπου ανήλθαν σε 246,0 g/kg φυτικού υλικού. Οι Roby *et al.*, (2013) σύγκριναν τις αποδόσεις χαμομηλιού από εκχυλίσες με διάφορους διαλύτες και τη μεγαλύτερη απόδοση εμφάνισε το μεθανολικό εκχύλισμα με 196 g/kg φυτικού υλικού, τιμή πολύ κοντά σε αυτήν που προέκυψε από την παρούσα μελέτη. Στην έρευνα των Guimaraes *et al.*, (2013) το εκχύλισμα μεθανόλης του χαμομηλιού παρουσίασε απόδοση 160,9 g/kg φυτικού υλικού ενώ το υδατικό εκχύλισμα λίγο υψηλότερη 193,7 g/kg φυτικού υλικού. Στη μελέτη των Haghí *et al.*, (2014) το μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού είχε τιμή 152 g/kg φυτικού υλικού και το υδροαιθανολικό 217 g/kg φυτικού υλικού. Στην πρόσφατη έρευνα των Formisano *et al.*, (2014), εξετάστηκαν 13 δείγματα χαμομηλιού από διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας. Η απόδοση των μεθανολικών εκχυλισμάτων χαμομηλιού διακυμάνθηκε από 74-245 g/kg φυτικού υλικού και επηρεάστηκε από ένα σύμπλεγμα παραγόντων όπως η

γονιμότητα του εδάφους, η άρδευση και το υψόμετρο. Υψηλότερες αποδόσεις υπήρξαν στην περίπτωση των περιοχών που συνδύαζαν υψηλό υψόμετρο με γόνιμο έδαφος (Formisano *et al.*, 2014) ενώ σε χαμηλότερα υψόμετρα με εντατικά εφαρμοζόμενη άρδευση υπήρξαν χαμηλότερες αποδόσεις λόγω του στρες που υφίσταντο τα φυτά. Στην πρόσφατη μελέτη των Cvetanovic *et al.*, (2014), μελετήθηκαν εκχυλίσματα χαμομηλιού που προέκυψαν με διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης. Το αιθανολικό εκχύλισμα που προήλθε από εκχύλιση ανθέων χαμομηλιού, υποβοηθούμενη από υπερήχους είχε απόδοση 110 g/kg φυτικού υλικού.

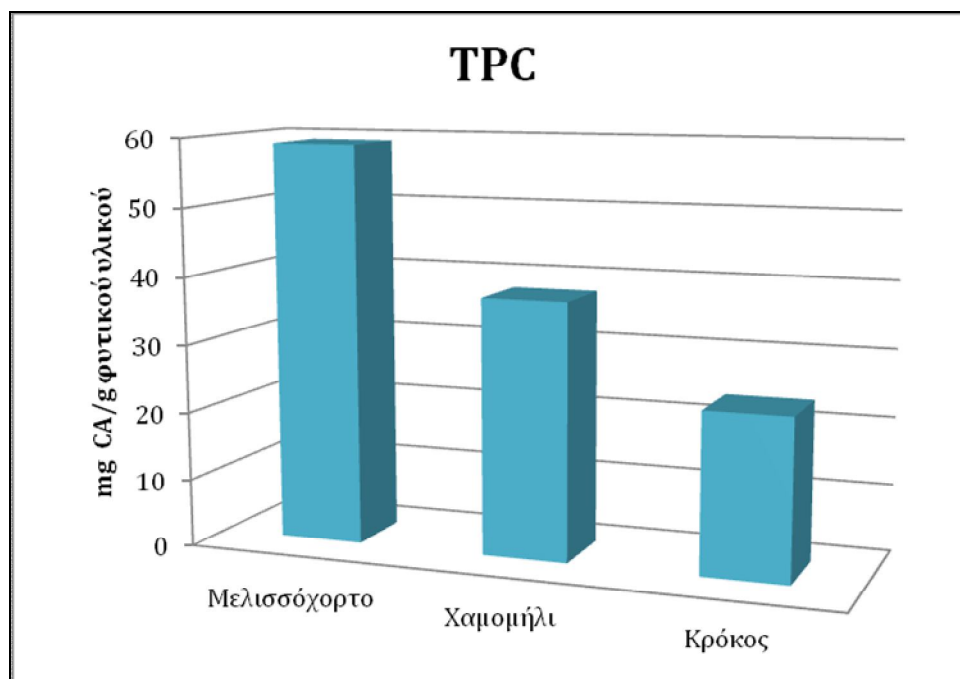
3.3 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Σε αυτή την ενότητα παραθέτονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος και σε mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8 Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά των μεθανολικών εκχυλισμάτων των τριών φυτών

| Φυτό | mg καφεϊκού οξέος/g εκχυλίσματος * | mg καφεϊκού οξέος/g φ.υ. |
|--------------|------------------------------------|--------------------------|
| Κρόκος | 40,2±1,9 | 23,66±1,10 |
| Μελισσόχορτο | 418,2 ±4,5 | 59,00±0,63 |
| Χαμομήλι | 125,5±13,5 | 37,74±4,52 |

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



Γράφημα 3.1 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο - Total Phenolic Content

Όπως φαίνεται και από το **Γράφημα 3.1** υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο διαθέτει το μελισσόχορτο με 59,00 mg καφεϊκού οξέος/g, ακολουθεί το χαμομήλι με 37,74 mg καφεϊκού οξέος/ g και τέλος ο κρόκος με 23,66 mg καφεϊκού οξέος /g φυτικού υλικού. Η ίδια κατάταξη ισχύει όταν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών αναλογούν στο ξηρό βάρος του φυτικού υλικού. Στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) τα φυτά κατατάσσονται ανάλογα με το φαινολικό τους περιεχόμενο παρομοίως, αν και η έκφραση των αποτελεσμάτων είναι σε γαλλικό οξύ: πρώτο το μελισσόχορτο με 64,29 mg γαλλικού οξέος/g, δεύτερο το χαμομήλι με 49,94 mg γαλλικού οξέος/g και τελευταίος ο κρόκος με 26,29 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού.

Το γεγονός ότι ο κρόκος έχει το μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι αναμενόμενο. Όπως προαναφέραμε δεν περιέχει μεγάλο ποσοστό φαινολικών συστατικών αλλά τα κύρια συστατικά του είναι οι κροκίνες. Στη μελέτη των Karimi *et al.*, (2010), στο μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου από το Ιράν, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο υπολογίστηκε στα 6,5 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού ενώ οι Gismondi *et al.*, (2012) προσδιόρισαν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε μεθανολικό εκχύλισμα κρόκου από την Ιταλία στα 53,52 mg καφεϊκού οξέος/g φυτικού υλικού.

Σχετικά με το μελισσόχορτο, οι Kirca *et al.*, (2008) προσδιόρισαν σε μεθανολικό εκχύλισμα ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα άνθη και τα φύλλα, 52,5 mg γαλλικού οξέος/g και 69,2 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού αντίστοιχα. Οι Spiridon *et al.*, (2011) βρήκαν πολύ μικρότερη τιμή φαινολικού περιεχομένου σε μεθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου, 60 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Οι Miron *et al.*, (2013) υπολόγισαν την περιεκτικότητα αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου (εκχύλιση υπό πίεση) στα 167,19 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος, οι Kamdem *et al.*,

(2013) στα 342,21 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος και ο Taqi (2014) στα 56,5 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού.

Στην έρευνα των Dastmalchi *et al.*, (2008) σε υδροαιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου το ολικό φαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε στα 268,9 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Οι Lin *et al.*, (2012) μελέτησαν αιθανολικά εκχυλίσματα μελισσόχορτου των οποίων η ξήρανση έγινε με λυοφιλίωση και με θερμό αέρα. Οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών βρέθηκαν στα 175,15 και 164,13 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος αντίστοιχα. Τέλος, οι Stefanović *et al.*, (2012) σε αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου μέτρησαν 85,65 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Αναφορικά με το χαμομήλι, οι Barros *et al.*, (2010) σε μεθανολικό εκχύλισμα, υπολόγισαν ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα 139,62 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος. Αντίστοιχα, οι Roby *et al.*, (2013) μελέτησαν εκχυλίσματα χαμομηλιού προερχόμενα από εκχύλιση με διάφορους διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, διαιθυλαιθέρα και εξάνιο) και παρατήρησαν ότι η μεθανόλη εκχυλίζει μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών συστατικών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) συγκρίνοντας το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων μεθανόλης, διαιθυλαιθέρα και πετρελαϊκού αιθέρα και το απέδωσε στη διαλυτότητα των συστατικών αυτών στο συγκεκριμένο διαλύτη. Οι Roby *et al.*, (2013) υπολόγισαν πολύ μικρό ολικό φαινολικό περιεχόμενο για το μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού, μόλις 3,7 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού, ενώ σε παρόμοια επίπεδα κινήθηκε και η μελέτη των Miliauskas *et al.*, (2004) με το μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού να παρουσιάζει ολικό φαινολικό περιεχόμενο μόλις 7,5 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού. Οι Formisano *et al.*, (2014), εξέτασαν 13 μεθανολικά εκχυλίσματα χαμομηλιού τα οποία συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας και τα αποτελέσματά τους για την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά έχουν μεγάλο εύρος, από 4,0-26,89 mg γαλλικού οξέος/g φυτικού υλικού. Αυτό το εύρος συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των μελετών που προαναφέρθηκαν υποδεικνύοντας ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών που διερευνούν στην έρευνά τους οι Formisano *et al.*, (2014). Τέλος, οι Cvetanović *et al.*, (2014), υπολόγισαν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο αιθανολικού εκχυλίσματος χαμομηλιού στα 123,40 mg χλωρογενικού οξέος/ g εκχυλίσματος και οι Alibabaei *et al.*, (2014) στα 78,4 mg γαλλικού οξέος/ g εκχυλίσματος.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η βέλτιστη εκχύλιση των συστατικών δεν εξαρτάται μόνο από τον τύπο του διαλύτη που χρησιμοποιείται αλλά και από τη διαδικασία της εκχύλισης. Η διάρκεια της εκχύλισης, η θερμοκρασία, και η πίεση που εφαρμόζεται διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο (Das, 2014). Επίσης, η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων στους διάφορους διαλύτες εξαρτάται σαφώς από την πολικότητα του διαλύτη, τον βαθμό πολυμερισμού των φαινολικών συστατικών καθώς και από την αλληλεπίδρασή τους με άλλα συστατικά των φυτών και τον σχηματισμό αδιάλυτων συμπλοκών. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη διαδικασία που να είναι κατάλληλη για την εκχύλιση όλων των φαινολικών ή συγκεκριμένης κατηγορίας φαινολικών ουσιών στα φυτικά υλικά (Dai *et al.*, 2010).

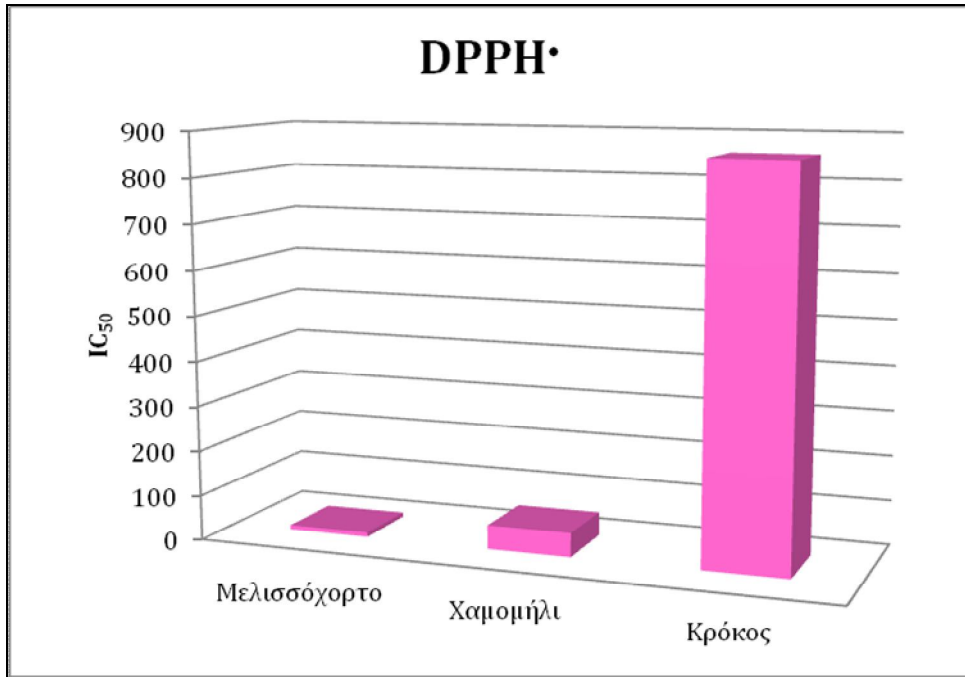
3.4 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών δηλαδή η ικανότητα να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] και το ριζικό κατιόν ABTS^{•+}. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε IC₅₀ (Inhibition Concentration) για τη δοκιμή DPPH[•] δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί δέσμευση κατά 50 % της ελεύθερης ρίζας και σε ισοδύναμα Trolox (TEAC) για τη δοκιμή ABTS^{•+} (Πίνακας 3.9).

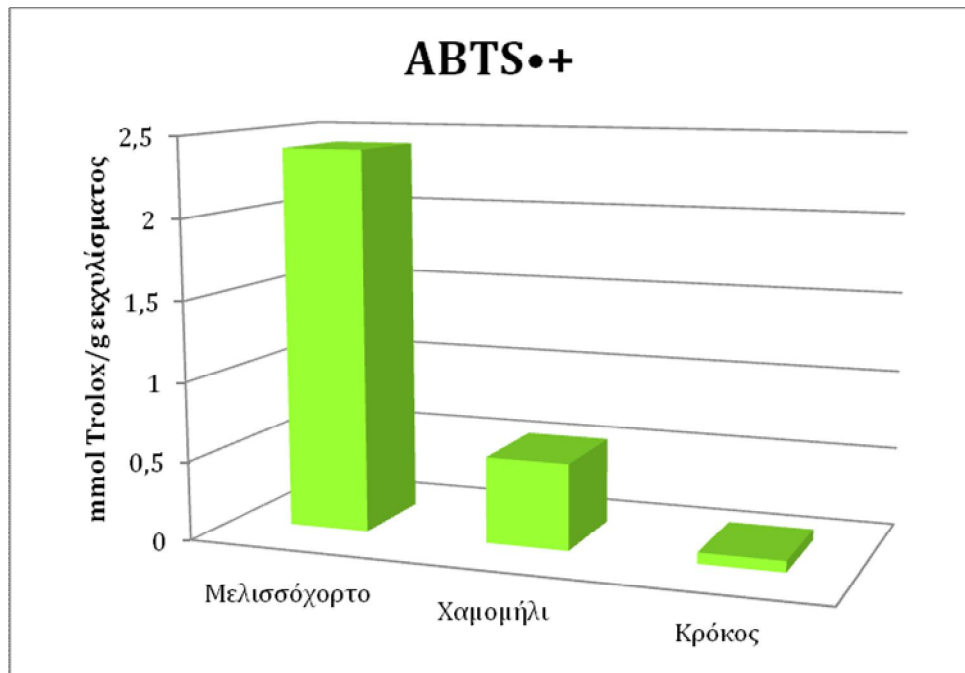
Πίνακας 3.9 Αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των τριών φυτών

| Φυτό | DPPH [•] | ABTS ^{•+} |
|--------------|----------------------------|-------------------------------------|
| | IC ₅₀ (μg/mL) * | TEAC (mmol Trolox/g εκχυλίσματος) * |
| Κρόκος | 859,1±0,6 | 0,069±0,004 |
| Μελισσόχορτο | 9,6±0,2 | 2,407±0,196 |
| Χαμομήλι | 52,7±0,5 | 0,544±0,033 |

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



Γράφημα 3.2 Αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH•



Γράφημα 3.3 Αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS•+

Ισχυρότερο σε αντιοξειδωτική δράση βάσει και των δύο μεθόδων εμφανίζεται το εκχύλισμα του μελισσόχορτου, ακολουθεί αυτό του χαμομηλιού και τελευταίο του κρόκου (**Γράφημα 3.2 & 3.3**).

Το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου παρουσίασε τις ακόλουθες τιμές: για τη δοκιμή DPPH[•], IC₅₀ 859,1 µg/mL και για τη δοκιμή ABTS^{•+} τιμή TEAC στα 0,0069 mmol Trolox/g εκχυλίσματος. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH[•] παρουσιάζει ένα μειονέκτημα στην περίπτωση του κρόκου. Οι κροκίνες εμφανίζουν απορρόφηση στα 440 nm και η δομή τους χαρακτηρίζεται από χρωμοφόρο σύστημα το οποίο δημιουργεί παρεμβολή στη μέθοδο DPPH[•] όπου η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 517 nm, οδηγώντας σε εσφαλμένο αποτέλεσμα (Kanakis *et al.*, 2007). Έτσι οι Kanakis *et al.*, (2007) εφάρμοσαν στα φάσματα UV-Vis, την αποσυνέλιξη των κορυφών στην περιοχή 360-700 nm. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο κατάφεραν να αντιστοιχήσουν τις κορυφές που οφείλονταν στην απορρόφηση των καροτενοειδών στα καροτενοειδή και τις κορυφές που οφείλονταν στην απορρόφηση του DPPH[•], στο DPPH[•]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η κροκετίνη παρουσίασε IC₅₀ 17,8 µg/mL και η αντιοξειδωτική δράση αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης της ένωσης, ενώ είναι χαρακτηριστικό ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της διμεθυλοκροκετίνης είχε αυξητική πορεία μέχρι τα 40 µg/mL, παρουσίασε όμως μείωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η αιτία έγκειται στο γεγονός ότι τα καροτενοειδή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιδρούν μεταξύ τους λόγω της ευχέρειας που έχουν να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες, δρουν δηλαδή ως παράγοντες μεταφοράς οξυγόνου κάτι που περιγράφεται ως προ-οξειδωτικό φαινόμενο (Holloway, *et al.*, 1988). Έτσι, μειώνεται η δυνατότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες από άλλες ουσίες. Η διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση της κροκετίνης και της διμεθυλοκροκετίνης οφείλεται στη δομική διαφορά που έχουν, καθώς η κροκετίνη διαθέτει υδροξύλια στο κάθε άκρο της αλυσίδας της που δρουν ως δότες υδρογόνου. Η ικανότητα της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] να αντιδρά με ομάδες που είναι δότες υδρογόνου αποτελεί τον μηχανισμό δράσης της συγκεκριμένης μεθόδου. Έτσι, η παρουσία ομάδων που λειτουργούν ως δότες υδρογόνου στην κροκετίνη την καθιστά αυτόματα πιο αποτελεσματική στο να αντιδρά με την ελεύθερη ρίζα. Οι Chen *et al.*, (2009) ακολουθούν διαφορετικό τρόπο μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας αιθανολικού εκχυλίσματος κρόκου, εφαρμόζοντας μία παραλλαγή. Υπολόγισαν την απορρόφηση του εκχυλίσματος χωρίς το DPPH[•] την οποία αφαίρεσαν από την απορρόφηση του εκχυλίσματος που μέτρησαν με το DPPH[•]. Η έκφραση του αποτελέσματος έγινε σε ισοδύναμα α-τοκοφερόλης (116 mg/ g).

Παρόλο αυτά, το αποτέλεσμα που δίδει η μέθοδος ABTS^{•+} για το μεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου (0,069 mmol Trolox/g εκχυλίσματος που ανάγεται σε 40,65 mmol/kg φυτικού υλικού χάριν ευκολίας συγκρίσεως) είναι κοντά στο αποτέλεσμα των Papandreou *et al.*, (2006) οι οποίοι υπολόγισαν τιμή TEAC στα 25,07 mmol/kg φυτικού υλικού στα πρώτα 10 min σε υδρομεθανολικό εκχύλισμα κρόκου. Αυτό που έχουν δείξει όλες οι μελέτες προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κρόκου είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος αποδίδεται στη συνεργική δράση όλων των φυτοχημικών, με τις κροκίνες να παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τη σαφρανάλη. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κροκίνες μπορούν να δεσμεύουν εύκολα

ελεύθερες ρίζες λόγω της χημικής τους δομής (Assimopoulou *et al.*, 2005, Papandreou *et al.*, 2006).

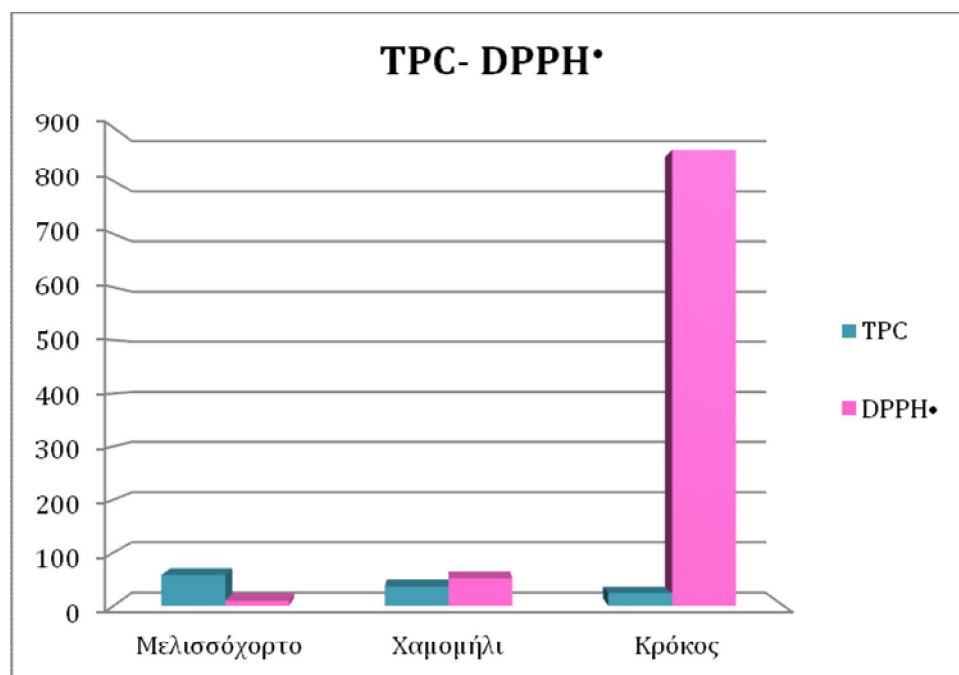
Σχετικά με το μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου, στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014), για τη δοκιμή του DPPH• το εκχύλισμα παρουσίασε τιμή IC₅₀ στα 12,9 µg/mL ενώ για τη δοκιμή ABTS•+ η τιμή TEAC ήταν 1,35 mmol/g εκχυλίσματος. Οι López *et al.*, (2007), εξέτασαν μεθανολικά εκχυλίσματα από 18 φυτά της οικογένειας Lamiaceae με την μέθοδο DPPH•. Για το εκχύλισμα του μελισσόχορτου υπολόγισαν τιμή IC₅₀ στα 13,74 µg/mL, η οποία ήταν η χαμηλότερη από όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα φυτών, κάτι που το καθιστά το φυτό με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Ενώ σε μελέτη εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Lamiaceae οι Spiridon *et al.*, (2011) προσδιόρισαν τιμή IC₅₀ στα 38 µg/mL κατατάσσοντας το μελισσόχορτο στη δεύτερη θέση από άποψη αντιοξειδωτικής ικανότητας. Σε υδροαιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου οι Miron *et al.*, (2013) προσδιόρισαν τιμή IC₅₀ στα 8,09 µg/mL για τη δοκιμή DPPH• και τιμή TEAC στα 2,527 mmol/g για τη δοκιμή ABTS•+. Υπάρχει ιδιαίτερη διακύμανση τιμών για το αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου στις διάφορες μελέτες. Σε αντίστοιχα εκχυλίσματα οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονται από 28,2 µg/mL (Pereira *et al.*, 2014), 48,76 µg/mL (Kamdem *et al.*, 2013) μέχρι 134,16 µg/mL (Dastmalchi *et al.*, 2008) και 202,7 µg/mL (Koksal *et al.*, 2011). Αυτή η διαφορά αποδίδεται σε πολλούς παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες στην περιοχή καλλιέργειας, η ωριμότητα του υλικού και ο χρόνος συγκομιδής (Kamdem *et al.*, 2013). Στη μελέτη των Dastmalchi *et al.*, (2008) αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου εξετάσθηκε για την αντιοξειδωτική του ικανότητα και συγκρίθηκε με τη δράση άλλων αντιοξειδωτικών (Ασκορβικό οξύ, καφεϊκό οξύ κ.ά.). Εμφάνισε αρκετά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα αντιοξειδωτικά και στη δοκιμή DPPH• και στη δοκιμή ABTS•+, όμως με την πάροδο του χρόνου, οι τιμές σε mmol Trolox/L αυξάνονταν ελαφρά, ακόμη και 40 min μετά την πρώτη μέτρηση. Οι Lin *et al.*, (2012) προσδιόρισαν αρκετά διαφορετικές τιμές για αιθανολικά εκχυλίσματα, όσον αφορά το IC₅₀, 36,15 µg/mL και 44,88 µg/mL και TEAC 0,62 mmol/g και 0,48 mmol/g εκχυλίσματος για ξήρανση με λυοφιλίωση και θερμό αέρα αντίστοιχα. Συμπεράναν ότι η ξήρανση με λυοφιλίωση δίδει εκχύλισμα μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας λόγω του υψηλότερου φαινολικού περιεχομένου.

Όσον αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού οι Barros *et al.*, (2010) υπολόγισαν σε εκχύλισμα χαμομηλιού από την Πορτογαλία, τιμή IC₅₀ στα 800 µg/mL, πολύ υψηλότερη από αυτή που υπολογίστηκε στην παρούσα μελέτη. Οι Pereira *et al.*, (2009) σε αντίστοιχο εκχύλισμα υπολόγισαν IC₅₀ 115,9 µg/mL ενώ το αιθανολικό εκχύλισμα είχε λίγο πιο αυξημένη τιμή IC₅₀ στα 258,9 µg/mL. Οι Cvetanovic *et al.*, (2014) υπολόγισαν παρόμοια τιμή IC₅₀ με αυτή της παρούσας μελέτης, για αιθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού με τη δοκιμή DPPH•, συγκεκριμένα: 60,6 µg/mL για την περίπτωση εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους. Οι άλλες μέθοδοι εκχύλισης παρουσίασαν διαφορετική τιμή IC₅₀, 29,5 µg/mL στην περίπτωση εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα και 30,5 µg/mL στην περίπτωση εκχύλισης με συσκευή Soxhlet. Οι Koleckar *et al.*, (2008) μελέτησαν 88 αιθανολικά εκχυλίσματα φυτών από την οικογένεια Asteraceae μεταξύ αυτών και το χαμομήλι. Προσδιόρισαν ένα εύρος τιμών IC₅₀ 46-542 µg/mL ενώ το IC₅₀ του εκχυλίσματος του χαμομηλιού

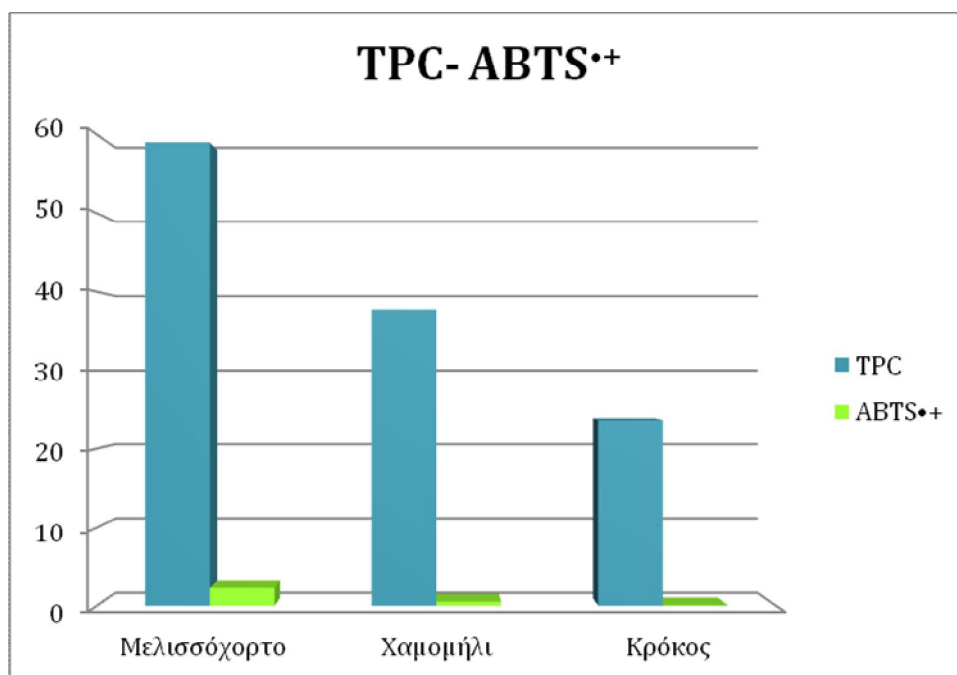
βρέθηκε στα 152 $\mu\text{g}/\text{mL}$, δηλαδή καλής σχετικά αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας Asteraceae. Στην πρόσφατη έρευνα των Alibabaei *et al.*, (2014) σε αιθανολικό εκχύλισμα χαμομηλιού υπολόγισαν IC_{50} στα 49,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, τιμή πάρα πολύ κοντινή στις παρούσας μελέτης.

Η αντιοξειδωτική δράση των αρωματικών φυτών εξαρτάται από το κάθε φυτό (ποικιλία, περιβαλλοντικές συνθήκες, χρόνος και μέθοδος συγκομιδής, επεξεργασία μετά τη συγκομιδή) αλλά και από τη συγκέντρωση της ένωσης που παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση. Για τον σωστό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, είναι σημαντική η τεχνική της εκχύλισης, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται και η μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας που επιλέγεται. Είναι προφανές ότι για την περίπτωση του κρόκου πλεονεκτεί η μέθοδος $\text{ABTS}^{\bullet+}$ καθώς η μέθοδος DPPH^{\bullet} εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς για τους λόγους που προαναφέραμε.

Από τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι φανερό ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων και της περιεκτικότητάς τους σε φαινολικές ενώσεις (Γράφημα 3.4 & 3.5). Στην παρούσα μελέτη, η κατάταξη βάσει αυξανόμενου φαινολικού περιεχομένου, κρόκος < χαμομήλι < μελισσόχορτο, αντιστοιχεί με την κατάταξη βάσει αυξανόμενης αντιοξειδωτικής ικανότητας κρόκος < χαμομήλι < μελισσόχορτο για το $\text{ABTS}^{\bullet+}$ και το DPPH^{\bullet} και αυτό παρατηρείται σε αρκετές μελέτες (Katalinic *et al.*, 2006, Spiridon *et al.*, 2011, Formisano *et al.*, 2014).



Γράφημα 3.4 Συσχέτιση Ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση τους που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH^{\bullet} .



Γράφημα 3.5 Συσχέτιση Ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση τους που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS•+

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των φυτών μπορεί να επηρεάζεται από συγκεκριμένα ιδιαίτερα ενεργά φαινολικά συστατικά όπως είναι το ροσμαρινικό οξύ του οποίου η υπεροχή στο εκχύλισμα του μελισσόχορτου είναι πρόδηλη, όμως στην αντιοξειδωτική δράση συμβάλλουν και μικρότερα σε περιεκτικότητα συστατικά όπως είναι τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στο χαμομήλι. Ακόμη, λόγω της συνέργειας μεταξύ των αντιοξειδωτικών συστατικών στο εκχύλισμα, η αντιοξειδωτική δράση δεν εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση των συστατικών, αλλά και από την δομή τους και από την αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται μεταξύ τους. Ωστόσο, λόγω της ποικιλομορφίας και της πολυπλοκότητας των μειγμάτων των φαινολικών ενώσεων που συναντούμε στα εκχυλίσματα, δεν είναι εύκολο να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε συστατικού ξεχωριστά. Κάθε φυτό περιέχει ένα διαφορετικό σύμπλεγμα φαινολικών ενώσεων, τόσο από ποιοτικής όσο και από ποσοτικής άποψης, με αποτέλεσμα να δίδει ένα διαφορετικό αποτέλεσμα.

3.5 Αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών έναντι παθογόνων του στόματος

3.5.1 *In vitro* μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων των φυτών με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA)

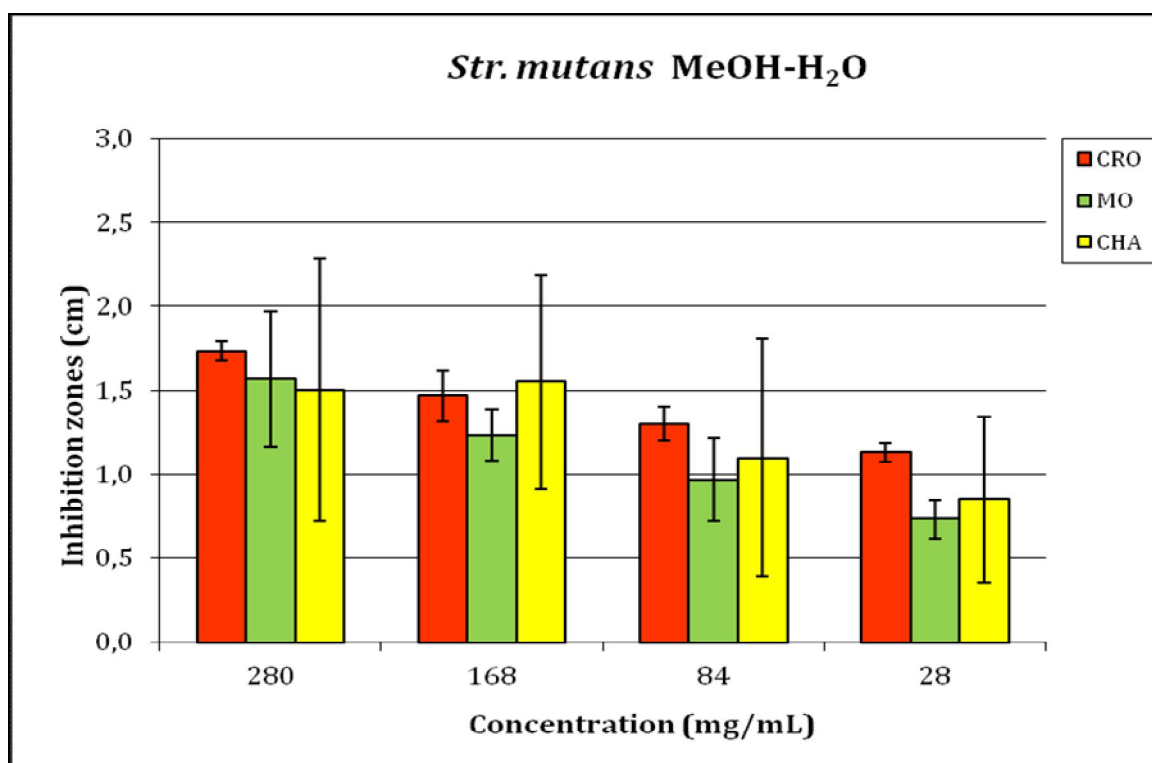
Τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των τριών φυτών μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων *Streptococcus mutans* LMG 14558^T και *Streptococcus sobrinus* LMG14641^T με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ. Η αντιμικροβιακή δράση καταγράφηκε ως ζώνη παρεμπόδισης συγκεκριμένης διαμέτρου γύρω από την οπή (διάμετρος οπής= 6 mm), στην οποία είχαν τοποθετηθεί τα εκχυλίσματα. Το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν ήταν 28-280 mg/mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10

Πίνακας 3.10 Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων υδρομεθανόλης (MeOH-H₂O) και υδροαιθανόλης (EtOH-H₂O) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus*

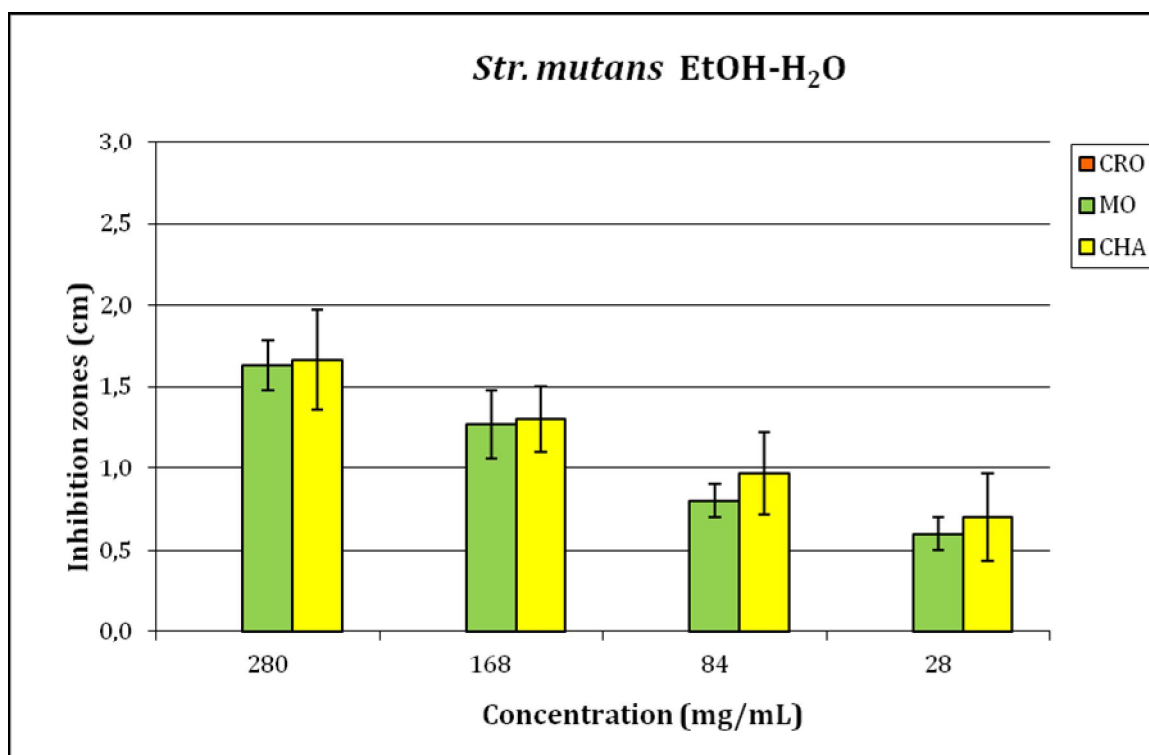
| Φυτό | Διαλύτης | <i>Streptococcus mutans</i> | | | | <i>Streptococcus sobrinus</i> | | | |
|--------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|-------------------------------|--------|--------|--------|
| | | Ζώνη παρεμπόδισης (mm) ανά mg/mL* | | | | | | | |
| | | 28 | 84 | 168 | 280 | 28 | 84 | 168 | 280 |
| Κρόκος | MeOH-H ₂ O (70:30) | 11±0,1 | 13±0,1 | 15±0,2 | 17±0,1 | 13±0,1 | 15 | 17±0,1 | 18±0,1 |
| | EtOH-H ₂ O (70:30) | 0 | 0 | 0 | 0 | 12±0,1 | 15 | 17±0,1 | 18±0,1 |
| Μελισσόχορτο | MeOH-H ₂ O (70:30) | 7±0,1 | 10±0,3 | 12±0,2 | 16±0,4 | 9±0,2 | 12±0,3 | 14±0,3 | 16±0,3 |
| | EtOH-H ₂ O (70:30) | 6±0,1 | 8±0,1 | 13±0,2 | 16±0,2 | 7±0,3 | 10±0,5 | 14±0,5 | 15±0,6 |
| Χαμομήλι | MeOH-H ₂ O (70:30) | 9±0,5 | 11±0,7 | 16±0,6 | 15±0,8 | 7 | 10 | 12 | 16±0,3 |
| | EtOH-H ₂ O (70:30) | 7±0,3 | 10±0,3 | 13±0,2 | 17±0,3 | 9±0,2 | 12±0,4 | 14±0,6 | 16±0,5 |

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

Για τον *Streptococcus mutans*, το εύρος της ζώνης παρεμπόδισης διακυμάνθηκε από 0-17 mm. Στα γραφήματα που ακολουθούν, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται το εκχύλισμα του κρόκου, με πράσινο το εκχύλισμα του μελισσόχορτου και με κίτρινο το εκχύλισμα του χαμομηλιού. Παρατηρούμε ότι τα τρία υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των τριών φυτών εμφάνισαν δράση έναντι του *Streptococcus mutans* με μικρές διαφορές μεταξύ τους (Γράφημα 3.6). Στην υψηλότερη συγκέντρωση (280 mg/mL) το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου εμφάνισε ζώνη παρεμπόδισης 17 mm, του μελισσόχορτου 16 mm και του χαμομηλιού 15 mm. Αξιοσημείωτο είναι ότι το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του κρόκου δεν εμφάνισε καθόλου παρεμπόδιση (Γράφημα 3.7).



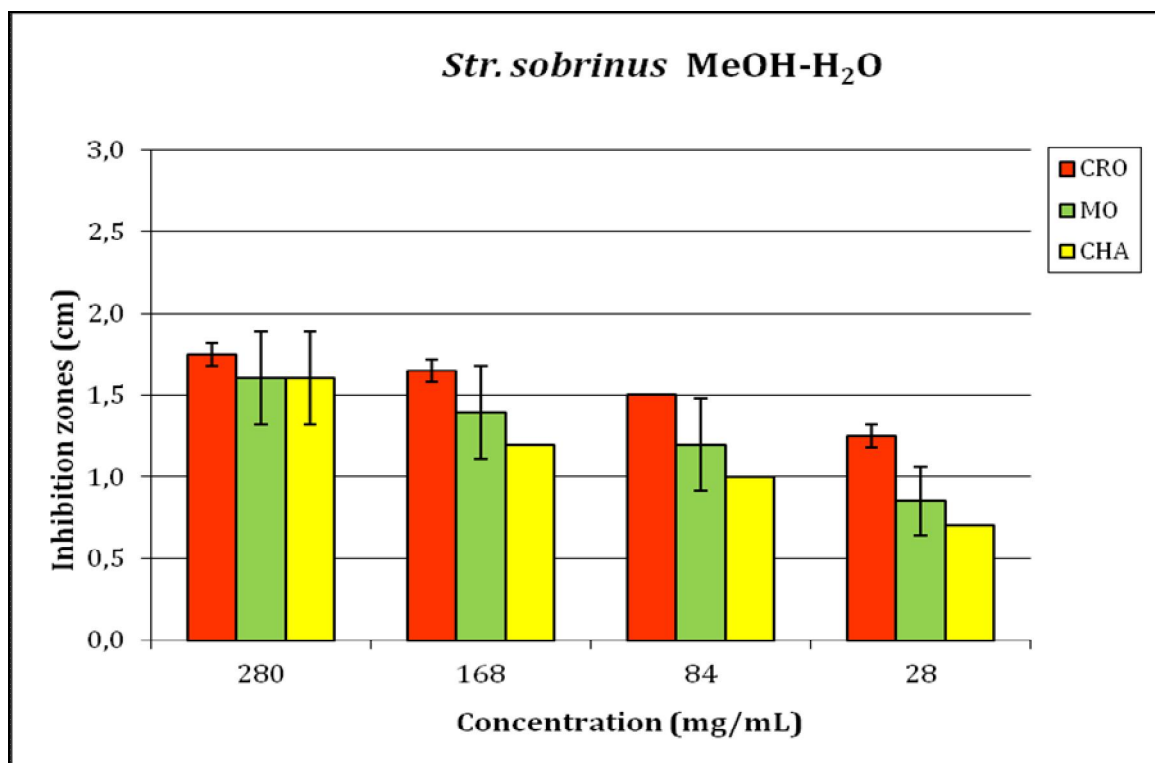
Γράφημα 3.6 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του *Streptococcus mutans*. CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού



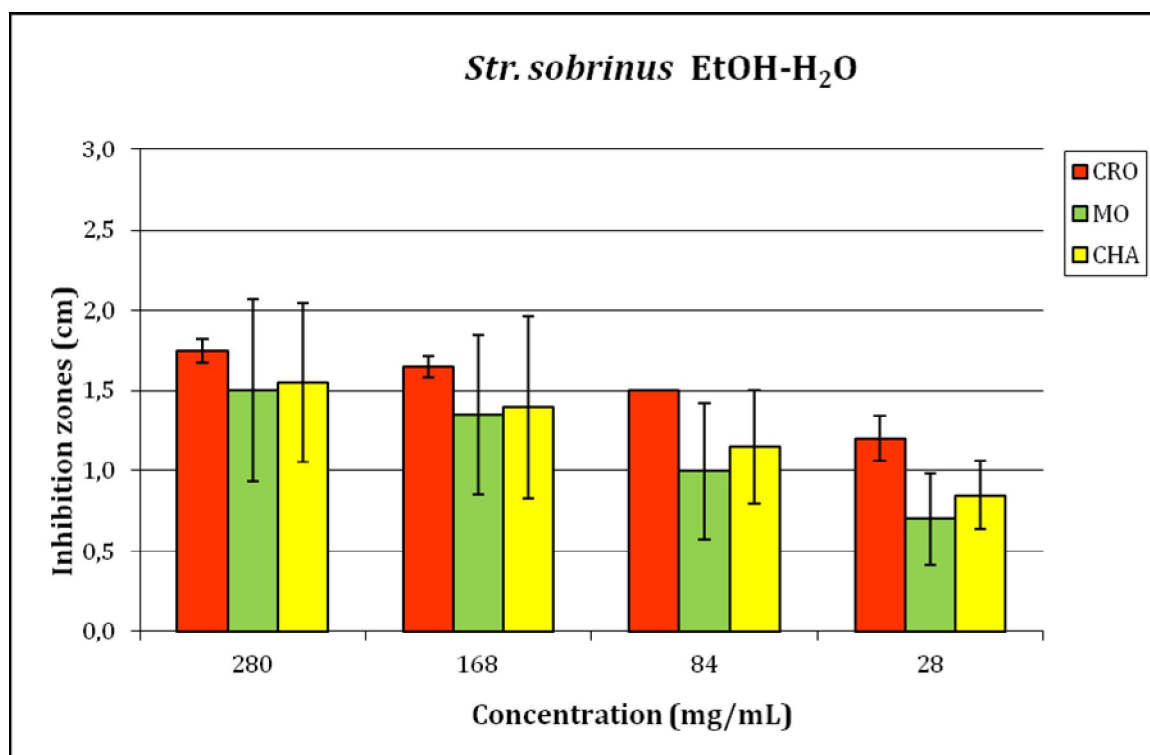
Γράφημα 3.7 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του *Streptococcus mutans*. CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Για τον *Streptococcus sobrinus*, το εύρος της ζώνης παρεμπόδισης διακυμάνθηκε από 7-18 mm. Στην περίπτωση αυτή εμφάνισαν δράση και τα δύο εκχυλίσματα του κρόκου και παρατηρούμε στην μικρότερη συγκέντρωση (28 mg/mL), ζώνη παρεμπόδισης 13 mm για το υδρομεθανολικό και 12 mm για το υδροαιθανολικό εκχύλισμα (Γράφημα 3.8 & 3.9). Οι συγκεκριμένες ζώνες είναι ελαφρώς μεγαλύτερες από τις ζώνες παρεμπόδισης που προσδιορίστηκαν στα υπόλοιπα φυτά για την ίδια συγκέντρωση (28mg/mL), 7 mm και 9 mm για το υδρομεθανολικό και υδροαιθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού αντίστοιχα και 9 mm και 7 mm για το υδρομεθανολικό και υδροαιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου αντίστοιχα. Το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου εμφάνισε λίγο καλύτερη δράση έναντι του *Streptococcus mutans* σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων (28-280 mg/mL) σε σύγκριση με την αντίστοιχη δράση έναντι του *Streptococcus sobrinus* (Πίνακας 3.10). Το υδρομεθανολικό και υδροαιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου είχε λίγο καλύτερα αποτελέσματα έναντι του *Streptococcus sobrinus* ειδικά στις μικρότερες συγκεντρώσεις (28, 84 mg/mL) με μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης σε σύγκριση με τη δράση τους έναντι του *Streptococcus mutans*. Το ίδιο ισχύει και για το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του χαμομηλιού (Πίνακας 3.10).

Τα εκχυλίσματα του κρόκου παρουσίασαν ικανοποιητική δράση έναντι και των δύο μικροοργανισμών κάτι που πιθανόν οφείλεται στην παρουσία των κροκινών και ιδιαίτερα στις κρόκινες με τις δύο γεντοβιόζες στα άκρα οι οποίες έχουν έντονα υδρόφιλο χαρακτήρα και παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό διάχυσης στο άγαρ. Επιπλέον, εμφανίζεται φαινόμενο συνέργειας καθώς διευκολύνεται και η δράση των φαινολικών συστατικών που περιέχουν τα εκχυλίσματα του κρόκου.



Γράφημα 3.8 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του *Streptococcus sobrinus*. CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού



Γράφημα 3.9 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του *Streptococcus sobrinus*. CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Συμπερασματικά πιο ανθεκτικός από τους δύο μικροοργανισμούς αποδεικνύεται ο *Streptococcus mutans* καθώς στον *Streptococcus sobrinus* εμφανίστηκαν μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης.

Στην κύρια βιβλιογραφική πηγή (Αναστασάκη, 2014) μελετήθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα μελισσόχορτου και κρόκου με τη μέθοδο ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης (Killing assay-KA) έναντι των *Streptococcus mutans* LMG 14558^T, *Streptococcus oralis* LMG 14532^T και *Streptococcus sobrinus* LMG 14641^T. Μετά από τέσσερις ώρες επώασης των κυττάρων του *Streptococcus mutans* με το μεθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου παρατηρήθηκε μια μείωση ενός λογαριθμικού κύκλου στα κύτταρα (cfu/mL). Το ίδιο αποτέλεσμα για το εκχύλισμα του κρόκου προέκυψε μετά από επώαση έξι ωρών. Η μείωση που προκάλεσαν τα εκχυλίσματα των δύο φυτών ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$) μετά τις έξι ώρες. Μετά από 24 h επώασης, παρατηρήθηκε μείωση στα κύτταρα του στελέχους η οποία κυμαινόταν μεταξύ 1.5 και 2.0 λογαριθμικών κύκλων παρουσία των μεθανολικών εκχυλισμάτων του κρόκου και του μελισσόχορτου. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα περνούν μια φάση προσαρμογής μεταξύ των έξι και εννιά ωρών 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 κρόκου. Ο *Streptococcus. sobrinus* παρουσιάστηκε ως ο πιο ευαίσθητος μικροοργανισμός σε σύγκριση με τους άλλους δύο. Τα εκχυλίσματα του κρόκου και του μελισσόχορτου μετά από επώαση 24 h, προκάλεσαν μειώσεις

πληθυσμών της τάξης των 4.5 λογαριθμικών κύκλων. Η μείωση κατά ένα λογαριθμικό κύκλο επιτεύχθηκε μέσα σε τέσσερις ώρες, ενώ ήταν στατιστικά σημαντική μετά τις τρεις ώρες.

Γενικώς, έχουν μελετηθεί αλκοολούχα και υδατικά εκχυλίσματα των φυτών ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη δράση των παθογόνων της στοματικής κοιλότητας. Οι Iauk *et al.*, (2003), μελέτησαν τη δράση μεθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου και άλλων φυτών έναντι 18 στελεχών βακτηρίων που προκαλούν περιοδοντίτιδα. Το εκχύλισμα του μελισσόχορτου επέδειξε μία μέτρια δράση με MIC από 1024-8192 µg/mL, ενώ δεν επηρέασε καθόλου την ανάπτυξη των *Fusobacterium nucleatum* και *Capnocytophaga gingivali* με (MIC >16384 µg/mL).

Οι Saleem *et al.*, (2012), εξέτασαν την ευαισθησία των στρεπτόκοκκων της στοματικής κοιλότητας σε υδροαιθανολικά εκχυλίσματα χαμομηλιού διαφορετικών συγκεντρώσεων με τη μέθοδο WDA όπως και *in vivo*. Οι ζώνες παρεμπόδισης αυξάνονταν σε χιλιοστά με την αύξηση της συγκέντρωσης. Επίσης, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση του σχηματισμού πλάκας και αυτό αποδόθηκε στην παρεμπόδιση της δράσης των γλυκοσυλτρανσφερασών. Ήταν χαρακτηριστική η μείωση της παραγωγής οξέων των βακτηρίων που πιθανότατα οφείλεται στην επίδραση του εκχυλίσματος σε ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή οξέων. Αυτό όμως συνέβη μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, ένδειξη ότι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις τα συστατικά του εκχυλίσματος δεν είναι τόσο δραστικά (Saleem *et al.*, 2012).

Ο κρόκος έχει μελετηθεί αλλά για την αντιμικροβιακή του δράση έναντι άλλων μικροοργανισμών. Οι Pintado *et al.*, (2011), εξέτασαν την επιβίωση διαφόρων κλινικών στελεχών *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, καθώς και εργαστηριακών στελεχών *Salmonella typhimurium* και *Staphylococcus 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. Επιπλέον, μελέτησαν σαφρανάλη και κροκίνη, καθώς και μείγματα αυτών και υπολόγισαν τη MIC για κάθε στέλεχος. Η σαφρανάλη είχε μεγαλύτερη δράση 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. Όμως, οι παραπάνω ποσότητες είναι αρκετά υψηλές, δεδομένου ότι στο φυτικό υλικό τα επίπεδα συγκεντρώσεων κυμαίνονται στα 773 µg/g φυτικού υλικού και 313 mg/ g φυτικού υλικού, για τη σαφρανάλη και το σύνολο των κροκινών αντίστοιχα. Συμπέραναν έτσι, ότι ευθύνονται και άλλες ενώσεις του κρόκου για τις αντιβακτηριακές του ιδιότητες.

Στην έρευνα των Tsai *et al.*, (2008), μελετήθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα 12 φυτών έναντι των *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* και *Streptococcus sobrinus* και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Το φυτό *Lonicera japonica* κοινώς αγιόκλημα, ενώ είχε την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωρογενικό οξύ από τα υπόλοιπα φυτά, εμφάνισε μέτρια δράση έναντι του *Streptococcus sanguinis* και δεν επηρέασε την ανάπτυξη των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus*. Αυτό είναι ένδειξη ότι δεν αρκεί η υψηλή συγκέντρωση ενός φαινολικού συστατικού στο

εκχύλισμα ώστε να εμφανίσει το εκχύλισμα αντιβακτηριακή δράση. Ίσως έτσι εξηγείται και το γεγονός ότι ενώ το εκχύλισμα του μελισσόχορτου ήταν πλούσιο σε ροσμαρινικό οξύ, εμφάνισε σε γενικές γραμμές μικρή δράση.

Σε προηγούμενη έρευνα των Tsai *et al.*, (2007), μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Rosmarinus officinalis* επέδειξε ανασταλτική δράση κατά του *Streptococcus sobrinus* με τιμή MIC στα 4 mg/ml και μάλιστα εμπόδισε τη λειτουργία των γλυκοσυλτρανσφερασών του συγκεκριμένου μικροοργανισμού προλαμβάνοντας έτσι το σχηματισμό πλάκας. Άλλη μελέτη εκχυλισμάτων του φυτού *Rosmarinus officinalis* συνδέουν το φαινολικό του περιεχόμενο (καρνοσικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, χλωρογενικό οξύ) με την αντιμικροβιακή του δράση (Moreno *et al.*, 2006). Οι Smullen *et al.*, (2012), διαπίστωσαν την αντιμικροβιακή δράση εκχυλίσματος υδατικής προπανόνης δεντρολίβανου έναντι πλήθος παθογόνων της στοματικής κοιλότητας του γένους *Streptococcus*, όπως και την ανασταλτική δράση των γλυκοσυλτρανσφερασών του *Streptococcus mutans*.

Οι Koo *et al.*, (2002) επιχείρησαν να εξηγήσουν τον μηχανισμό με τον οποίο δρουν τα φλαβονοειδή ώστε να επιτευχθεί η παρεμπόδιση της δράσης των γλυκοσυλτρανσφερασών. Συγκεκριμένα αναφέρουν ότι η παρεμπόδιση αυτή εξαρτάται από τη μοριακή δομή των φλαβονοειδών και από τη φυσική κατάσταση του ενζύμου. Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες, οι οποίες έχουν ένα ακόρεστο διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων στις θέσεις 2 και 3 του C δακτυλίου, επιδεικνύουν αξιοσημείωτη αναστολή της δραστηριότητας των γλυκοσυλτρανσφερασών. Αντίθετα, οι φλαβανόνες και οι διυδροξυφλαβονόλες, οι οποίες στερούνται ένα διπλό δεσμό μεταξύ αυτών των θέσεων, εμφάνισαν μια μέτρια ανασταλτική δράση. Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε η δράση της απιγενίνης έναντι των γλυκοσυλτρανσφερασών του *Streptococcus mutans* (Koo *et al.*, 2002) η οποία όπως προαναφέρθηκε απαντάται στο εκχύλισμα του χαμομηλιού.

Σε πρόσφατη έρευνα (Lee, 2014) εξετάστηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα από διάφορα μέρη του φυτού *Aster sphathulifolius* Maxim. έναντι διαφόρων στρεπτόκοκκων της στοματικής κοιλότητας μεταξύ αυτών και οι *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus*, με τη μέθοδο WDA. Οι ζώνες παρεμπόδισης που μετρήθηκαν είχαν κάποια διακύμανση ανάλογα το εκχύλισμα και το μέρος του φυτού από το οποίο προήλθε. Σε γενικές γραμμές, ο *Streptococcus mutans* εμφανίστηκε πιο ανθεκτικός από τον *Streptococcus sobrinus* με μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης.

Οι Xiao *et al.*, (2012), συμπέραναν έπειτα από έρευνα, ότι η κερκετίνη και η καεμφορόλη που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα κερήθρας (*Nidus Vespaee*) προκάλεσαν μείωση της παραγωγής οξέων από τον *Streptococcus mutans*, αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό pH. Ο *Streptococcus mutans* παράγει γαλακτικό και οξικό οξύ σαν προϊόντα μεταβολισμού τα οποία μειώνουν το pH της οδοντικής πλάκας κάτω του 5,5 το οποίο αποτελεί το κρίσιμο pH για την απασβέστωση του σμάλτου και επομένως την έναρξη και ανάπτυξη της τερηδόνας (Xiao *et al.*, 2006). Οι Pereira *et al.*, (2006) μελέτησαν την δράση υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του ροδιού έναντι διαφόρων παθογόνων του στόματος με τη μέθοδο WDA και παρατήρησαν ζώνες παρεμπόδισης 11 mm στην περίπτωση του *Streptococcus mutans*.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η επεξεργασία που υφίσταται το φυτικό υλικό μετά τη συγκομιδή του διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην δυνητική αντιμικροβιακή του δράση. Οι Oh *et al.*, (2013), μελέτησαν υδροαιθανολικά εκχυλίσματα διαφόρων τύπων τσαγιού και παρατήρησαν διαφορές στην αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus*, παρόλο που η αντιοξειδωτική τους δράση ήταν παρόμοια. Το μαύρο τσάι δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση εναντίον των συγκεκριμένων μικροοργανισμών και αυτό αποδόθηκε στην αλλαγή της σύνθεσης του τσαγιού κατά την επεξεργασία του. Ενώ το πράσινο τσάι παράγεται με αφυδάτωση του φυτικού υλικού, στο μαύρο τσάι ακολουθείται μία διαδικασία ζύμωσης που οδηγεί σε μεταβολές των σημαντικότερων ενώσεων του. Μετά τη ζύμωση σχηματίζεται η θειοφλαβίνη, η κύρια ένωση του μαύρου τσαγιού και οι κατεχίνες, συμπεριλαμβανομένου του γαλλικού επιγαλλοκατεχινυλεστέρα, εξαφανίζονται (Bancirova *et al.*, 2010). Έτσι κατέληξαν ότι δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου με την αντιμικροβιακή δράση (Oh *et al.*, 2013).

Οι Song *et al.*, (2006) μελέτησαν μεθανολικό εκχύλισμα της ρίζας του φυτού *Polygonum cuspidatum*, έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* με τη μέθοδο ελέγχου βακτηριοκτόνου δράσης. Παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και των δύο βακτηρίων μετά από επώαση με το μεθανολικό εκχύλισμα του *Polygonum cuspidatum*, που συνεπάγεται και μείωση του πληθυσμού τους. Η παρεμπόδιση προσκόλλησης των βακτηρίων από το εκχύλισμα συνδέθηκε με την ανασταλτική δράση έναντι των γλυκοσυλτρανσφερασών και την παρεμπόδιση σύνθεσης της αδιάλυτης στο νερό γλυκάνης κάτι που αποδόθηκε στις πολυφαινόλες που έχουν την ικανότητα να συνδέονται ισχυρά με πρωτεΐνες (Mehansho *et al.*, 1987). Επίσης, είναι γνωστό ότι κάποιοι δευτερογενείς μεταβολίτες επηρεάζουν τη διαπερατότητα των φυσικών και συνθετικών μεμβρανών και αναστέλλουν την λειτουργία των ενζύμων όπως είναι οι γλυκοσυλτρανσφεράσες (Havsteen, 1983).

Παρατηρείται μία διακύμανση στα αποτελέσματα μεταξύ των ερευνών, με εκχυλίσματα να παρουσιάζουν ιδιαίτερη δράση σε κάποιες μελέτες και σε άλλες όχι. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο το φυτικό εκχύλισμα (ο τρόπος εκχύλισης, η συγκέντρωση της κάθε ουσίας στο εκχύλισμα), το στέλεχος μικροοργανισμού που εξετάζεται, όπως και η μέθοδος προσδιορισμού που χρησιμοποιείται.

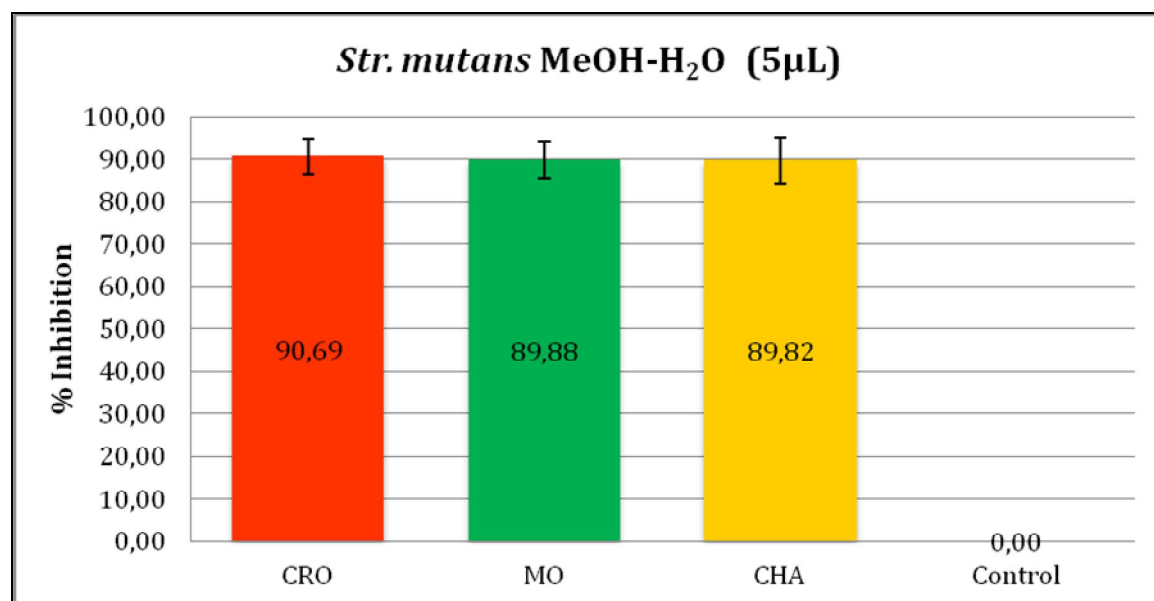
3.5.2 *In vitro* μελέτη της ικανότητας των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν τον σχηματισμό του βιοϋμενίου (biofilm)

Τα εκχυλίσματα των φυτών μελετήθηκαν για την ικανότητά τους να εμποδίζουν τους μικροοργανισμούς να δημιουργούν βιοϋμένιο. Τα αποτελέσματα (% Παρεμπόδιση, % Inhibition) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.11) και στα αντίστοιχα γραφήματα.

Πίνακας 3.11 % Παρεμπόδιση-% Inhibition του σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών

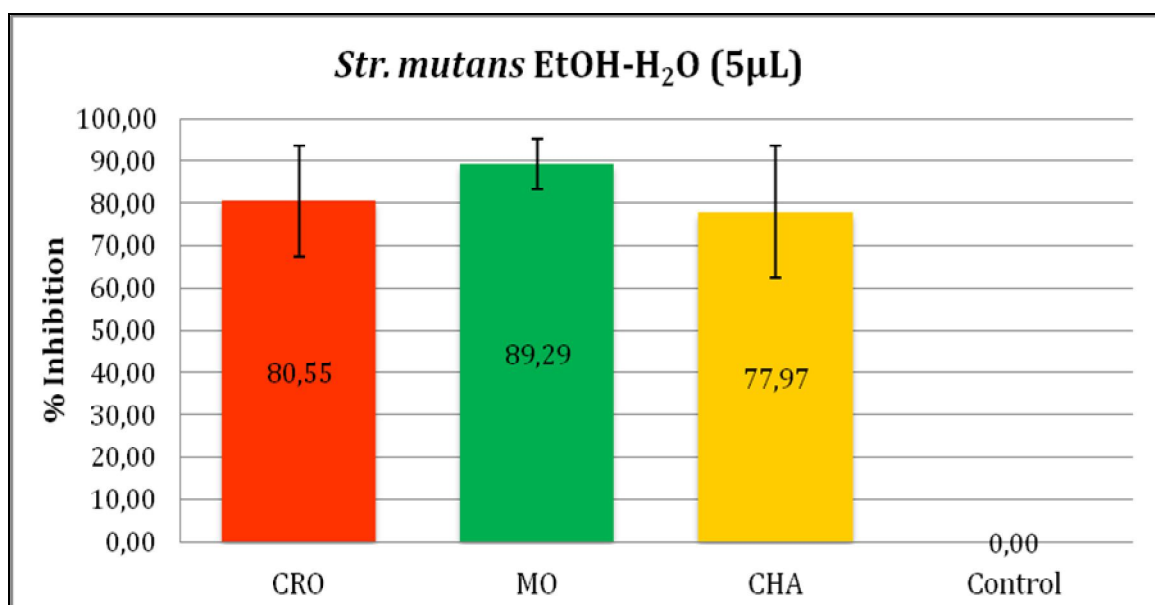
| Φυτό | % Παρεμπόδιση -%Inhibition* | | | |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | <i>Streptococcus mutans</i> | | <i>Streptococcus sobrinus</i> | |
| | MeOH-H ₂ O (70:30) | EtOH-H ₂ O (70:30) | MeOH-H ₂ O (70:30) | EtOH-H ₂ O (70:30) |
| Κρόκος | 90,69±4,24 | 80,55±13,06 | 60,21±7,27 | 59,88±21,23 |
| Μελισσόχορτο | 89,88±4,31 | 89,29±5,99 | 82,11±4,06 | 82,14±5,74 |
| Χαμομήλι | 89,82±5,34 | 77,97±15,64 | 81,68±3,11 | 75,75±8,22 |

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



Γράφημα 3.10 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

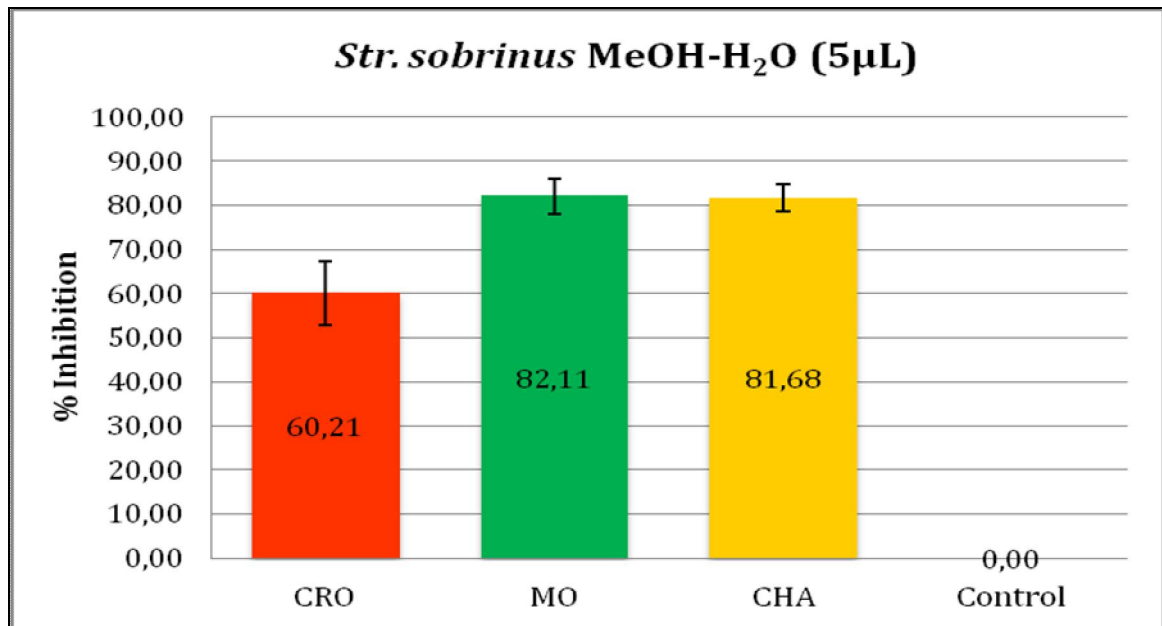
Σε αυτό το γράφημα (Γράφημα 3.10) παρουσιάζεται η ικανότητα παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών. Παρατηρούμε ότι και τα τρία εκχυλίσματα εμφάνισαν ισχυρή δράση παρεμπόδισης με ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους. Το εκχύλισμα του κρόκου παρουσίασε 90,69% παρεμπόδιση, το εκχύλισμα του μελισσόχορτου 89,88% παρεμπόδιση και του χαμομηλιού 89,82% παρεμπόδιση.



Γράφημα 3.11 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

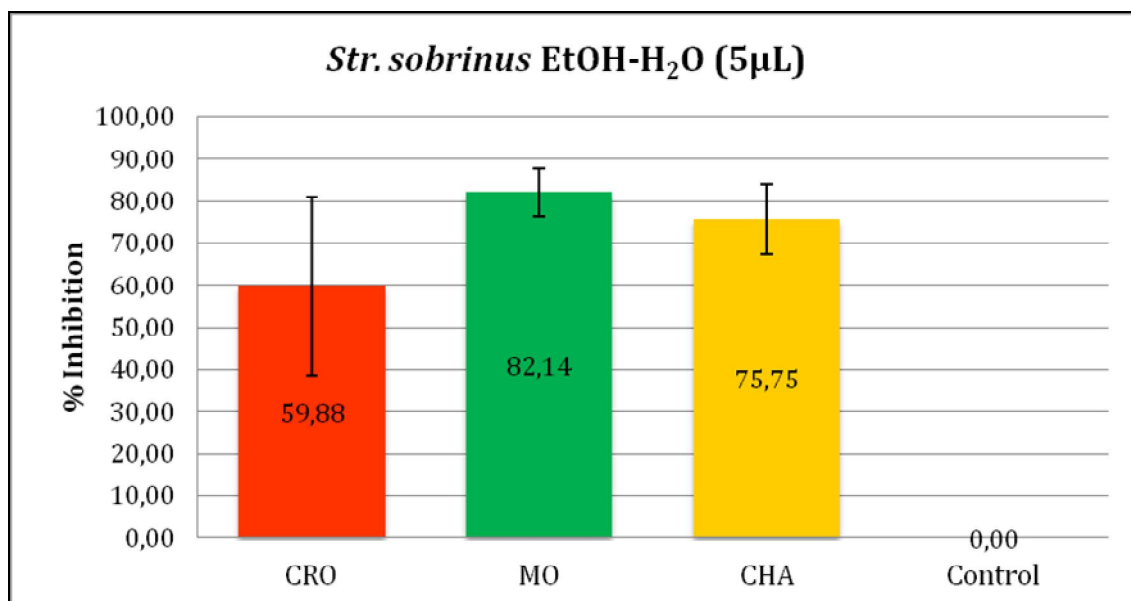
Στο παραπάνω γράφημα (Γράφημα 3.11) εμφανίζεται η ικανότητα παρεμπόδισης των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων ως προς τον σχηματισμό του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans*. Όπως και στην περίπτωση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, έτσι και τα υδροαιθανολικά των τριών φυτών εμφάνισαν κοντινά ποσοστά παρεμπόδισης (89,29% το εκχύλισμα του μελισσόχορτου, 80,55% το εκχύλισμα του κρόκου και 77,97% το εκχύλισμα του χαμομηλιού).

Παρατηρούμε κάποιες διαφορές στη δράση των εκχυλισμάτων με τους δύο διαφορετικούς διαλύτες και καταλαβαίνουμε ότι σίγουρα παίζει ρόλο και το μέσο διάλυσης (μεθανόλη-νερό, αιθανόλη-νερό).



Γράφημα 3.12 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Στο παραπάνω γράφημα (Γράφημα 3.12) εμφανίζονται τα αποτελέσματα παρεμπόδισης ανάπτυξης του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών. Το εκχύλισμα του κρόκου υπολείπεται αρκετά σε δράση έναντι των υπόλοιπων εκχυλισμάτων (60,21% παρεμπόδιση). Το εκχύλισμα του μελισσόχορτου και του χαμομηλιού εμφάνισαν παρόμοια δράση (82,11% και 81,68% αντίστοιχα).



Γράφημα 3.13 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Στο **Γράφημα 3.13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα παρεμπόδισης ανάπτυξης του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών. Το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του κρόκου φάνηκε να έχει την μικρότερη δράση (59,88% παρεμπόδιση), χωρίς οι διαφορές από τα εκχυλίσματα των άλλων φυτών να είναι στατιστικά σημαντικές (82,14% για το εκχύλισμα του μελισσόχορτου και 75,75% για το εκχύλισμα του χαμομηλιού).

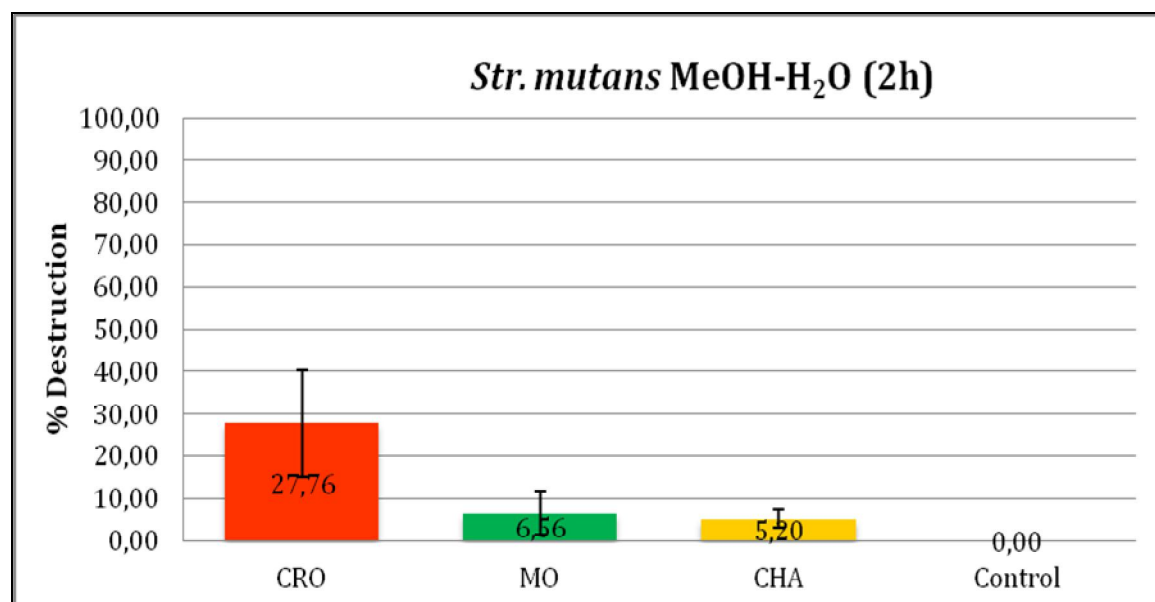
3.5.3 *In vitro* μελέτη της ικανότητας των εκχυλισμάτων να αποικοδομούν το σχηματισμένο βιοϋμένιο (biofilm)

Τα εκχυλίσματα των φυτών μελετήθηκαν για την ικανότητά τους να αποικοδομούν το βιοϋμένιο που έχουν σχηματίσει οι μικροοργανισμοί στις δύο και στις 24 ώρες. Τα αποτελέσματα (% Αποικοδόμηση-% Destruction) για τις δύο ώρες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.12**) και τα αποτελέσματα για τις 24 ώρες στο παράρτημα.

Πίνακας 3.12 % Αποικοδόμηση-% Destruction του σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών

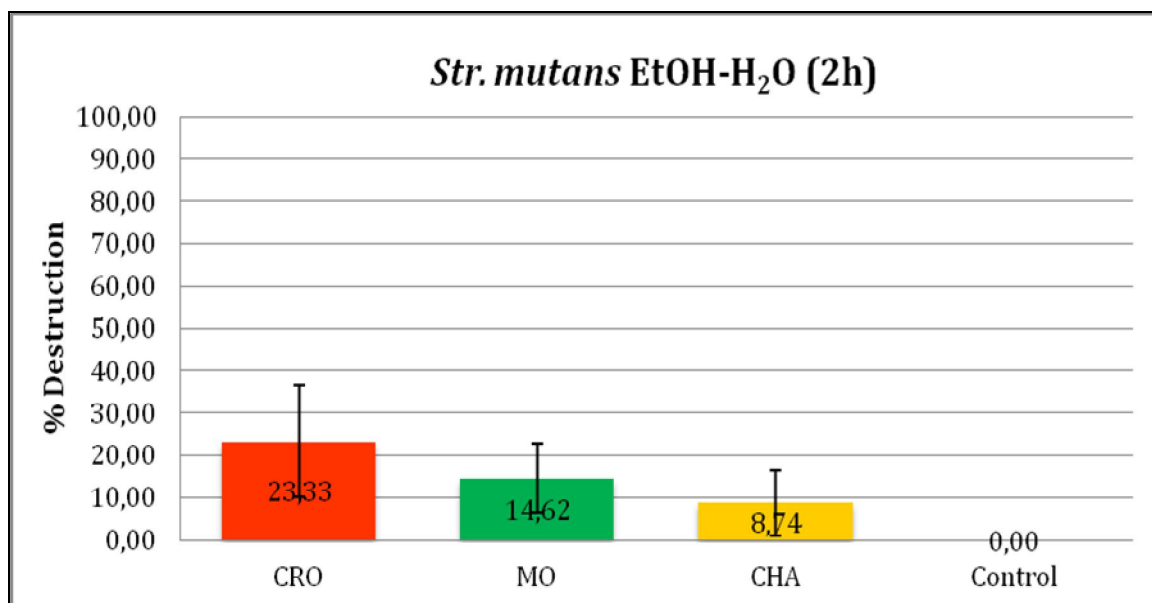
| Φυτό | <i>Streptococcus mutans</i> | | <i>Streptococcus sobrinus</i> | |
|---------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | % Αποικοδόμηση -% Destruction* στις 2 h | | | |
| | MeOH-H ₂ O (70:30) | EtOH-H ₂ O (70:30) | MeOH-H ₂ O (70:30) | EtOH-H ₂ O (70:30) |
| Κρόκος | 27,76±12,59 | 23,33±13,13 | 29,25±16,95 | 20,69±11,80 |
| Μελισσόχορτο | 6,56±5,19 | 14,62±8,13 | 0 | 0 |
| Χαμομήλι | 5,20±2,21 | 8,74±7,60 | 0 | 0 |

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



Γράφημα 3.14 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

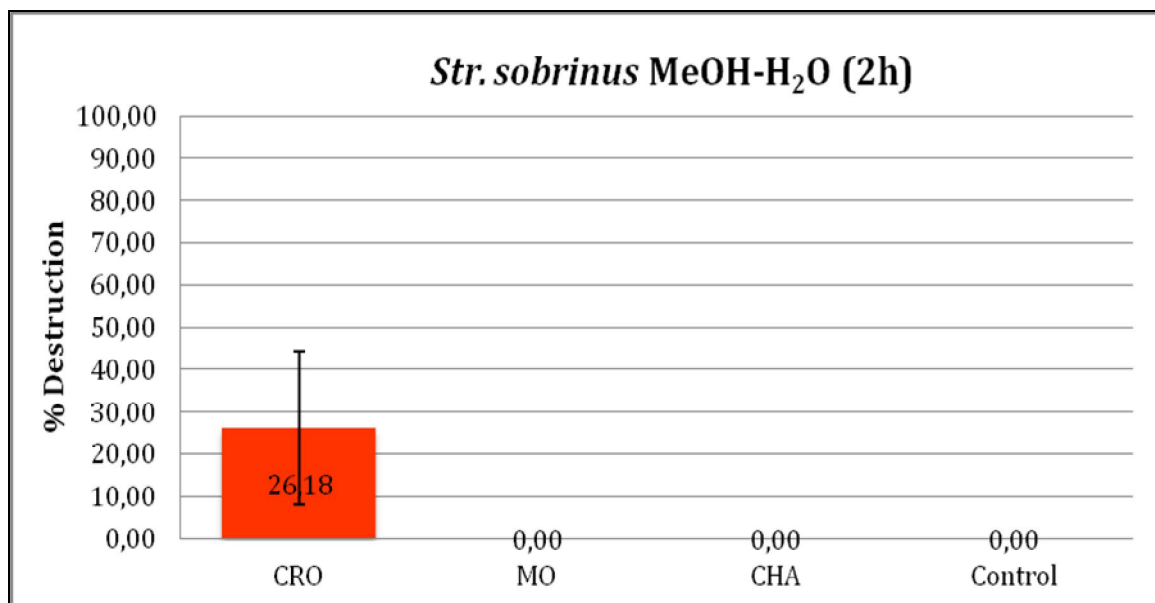
Στο **Γράφημα 3.14** παρατίθενται τα αποτελέσματα (% Αποικοδόμηση-Destruction) των **υδρομεθανολικών** εκχυλισμάτων των φυτών στις **δύο ώρες** για τον ***Streptococcus mutans***. Το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που έχει την ισχυρότερη δράση είναι αυτό του κρόκου (27,76% αποικοδόμηση) και ακολουθούν με οριακή δράση, το εκχύλισμα του μελισσόχορτου (6,56% αποικοδόμηση) και του χαμομηλιού (5,20% αποικοδόμηση).



Γράφημα 3.15 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

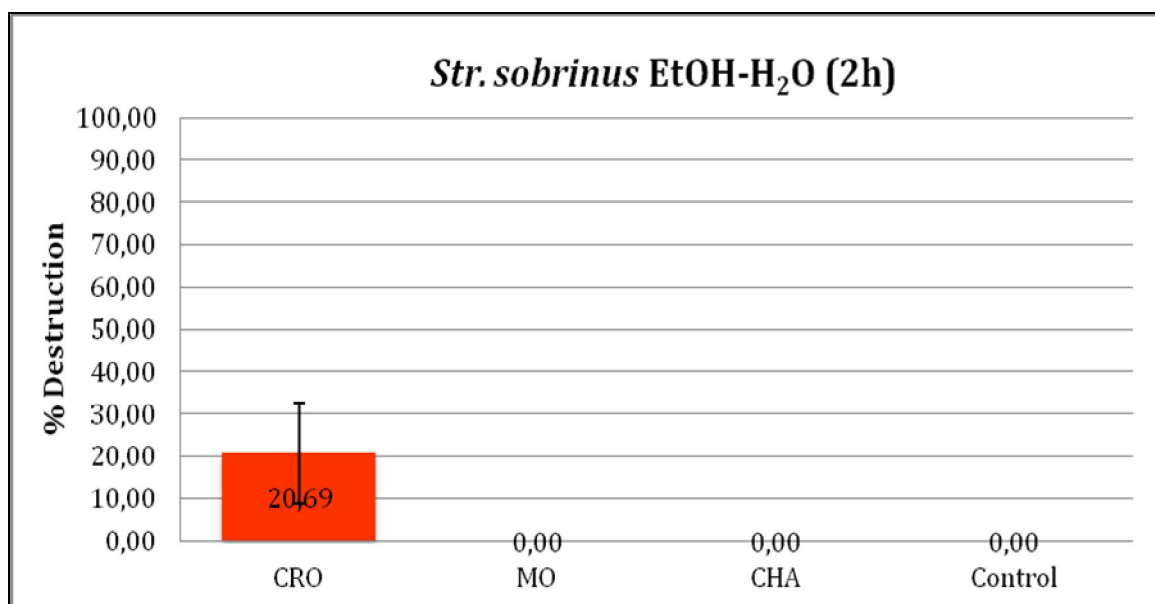
Στο **γράφημα 3.15** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα (% αποικοδόμηση-destruction) των **υδροαιθανολικών** εκχυλισμάτων των φυτών στις **δύο ώρες** για τον *Streptococcus mutans*. Όπως και στην περίπτωση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα ξεχωρίζει σχετικά αυτό του κρόκου με 23,33% αποικοδόμηση. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν δράση αλλά μεταξύ τους δεν έχουν στατιστικά σημαντικές (14,62% αποικοδόμηση για το εκχύλισμα του μελισσόχορτου και 8,74% αποικοδόμηση για το εκχύλισμα του χαμομηλιού).

Στα παρακάτω γραφήματα (**Γραφήμα 3.16 & 3.17**) γίνεται η παράθεση των αποτελεσμάτων (% Αποικοδόμηση, % Destruction) της δράσης των **υδρομεθανολικών** και **υδροαιθανολικών** εκχυλισμάτων έναντι του *Streptococcus sobrinus* στις **δύο** ώρες.



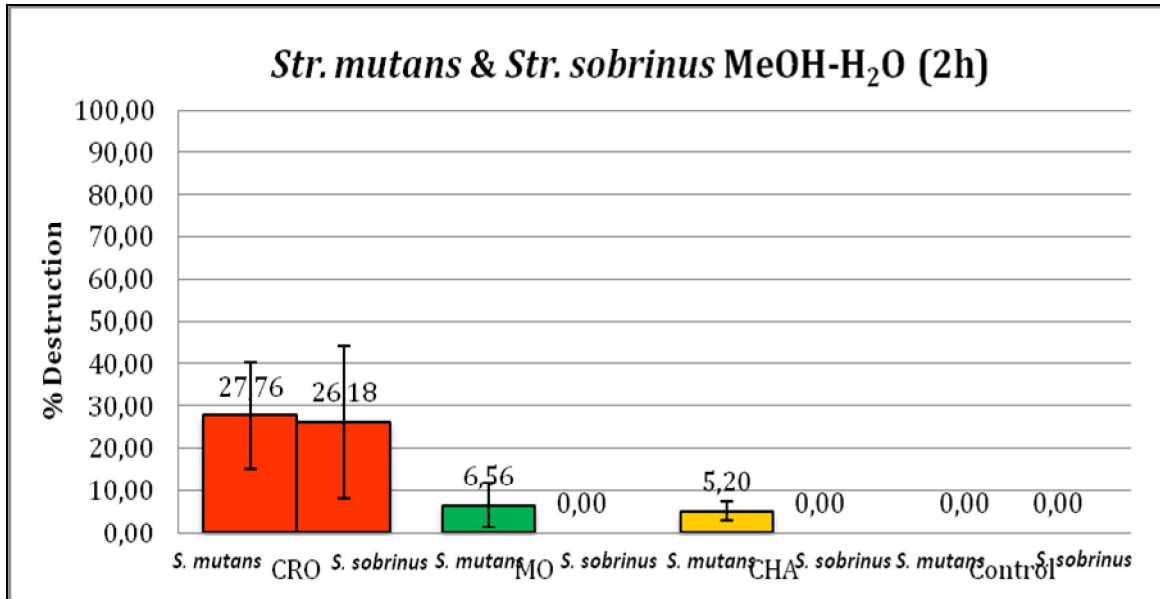
Γράφημα 3.16 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Μόνο το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου εμφάνισε δράση (26,18% αποικοδόμηση) στις δύο ώρες (Γράφημα 3.16) όπως και το αντίστοιχο υδροαιθανολικό (20,69% αποικοδόμηση) (Γράφημα 3.17).



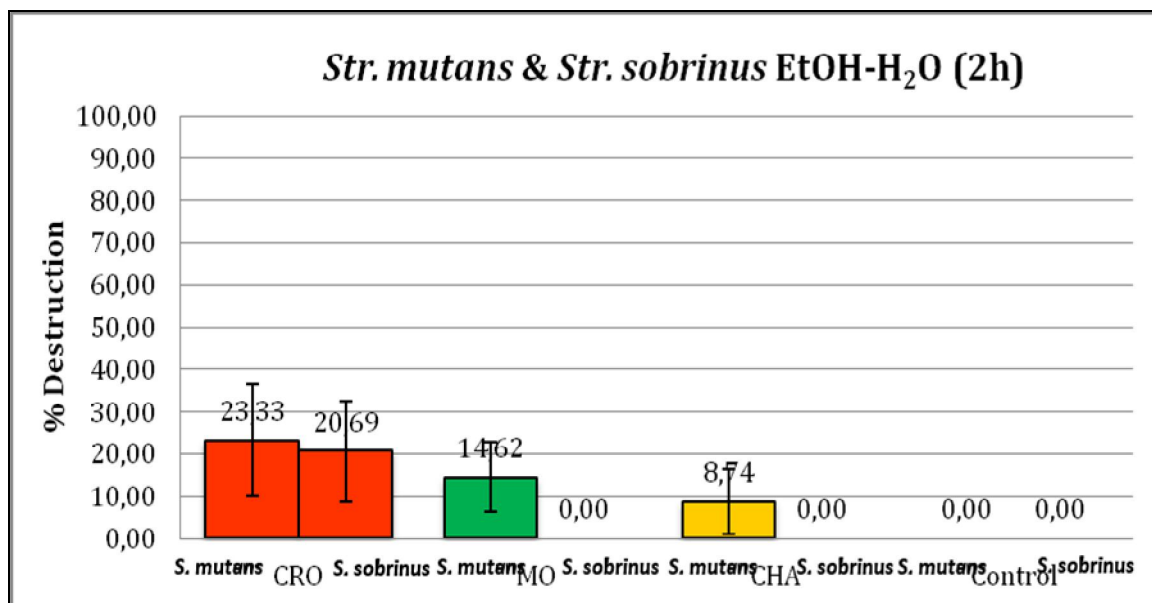
Γράφημα 3.17 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του κρόκου δείχνει πραγματικά ότι ξεχωρίζει καθώς εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα από τα εκχυλίσματα των άλλων φυτών έναντι και των δύο μικροοργανισμών (Γράφημα 3.14 & 3.16). Όσον αφορά τη μέτρηση στις δύο ώρες, σε γενικές γραμμές πιο ανθεκτικός στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα (Γράφημα 3.18) εμφανίζεται ο *Streptococcus sobrinus* καθώς τα επίπεδα του ποσοστού αποικοδόμησης που επιτυγχάνουν τα εκχυλίσματα είναι χαμηλότερα σε σχέση με αυτά του *Streptococcus mutans*. Όμως και οι δύο μικροοργανισμοί παρουσιάζουν σημαντική ευαισθησία στα εκχυλίσματα του κρόκου (Γράφημα 3.18).



Γράφημα 3.18 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Σχετικά με τη δράση των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων στις δύο ώρες (Γράφημα 3.19), η γενική τάση δείχνει ως πιο ευαίσθητο τον *Streptococcus sobrinus* καθώς και τα τρία εκχυλίσματα των φυτών επιτυγχάνουν ποσοστό αποικοδόμησης μικρότερο από τα αντίστοιχα στην περίπτωση του *Streptococcus mutans*.



Γράφημα 3.19 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Από τα παραπάνω αποτελέσματα και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου, καταλαβαίνουμε ότι η απουσία ζώνης αναστολής στη μέθοδο WDA δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το εξεταζόμενο υπερκείμενο είναι ανενεργό. Το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του κρόκου δεν είχε επίδραση στον *Streptococcus mutans* καθώς δεν εμφάνισε ζώνη παρεμπόδισης με τη μέθοδο WDA (Πίνακας 3.10), κάτι που δεν συνέβη κατά τη μελέτη αναστολής ανάπτυξης και αποικοδόμησης του βιοϋμενίου (Πίνακας 3.11 & 3.12) του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Βέβαια, η μέθοδος της διάχυσης προτιμάται συνήθως λόγω της απλότητάς της και του χαμηλού κόστους και χρησιμοποιείται σαν ένα πρώτο στάδιο ελέγχου (Klančnic *et al.*, 2009, Tajkarimi *et al.*, 2010). Ωστόσο, πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι οι μέθοδοι διάχυσης για τον έλεγχο της δράσης των φλαβονοειδών και ενώσεων χαμηλής πολικότητας μπορεί να δώσουν αναξιόπιστες πληροφορίες, γιατί ένα ισχυρό αντιβακτηριακό συστατικό πιθανόν να έχει χαμηλό ποσοστό διάχυσης στο άγαρ (Burt, 2004; Cushnie *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006).

Ο κρόκος σε γενικές γραμμές διαθέτει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση (εκτός από την περίπτωση μελέτης παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus*) κάτι που έρχεται σε αντίθεση με το φαινολικό του περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική του δράση, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και σε άλλη έρευνα με διαφορετικά φυτά (Oh *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2008).

Τα ποσοστά αποικοδόμησης που επιτυγχάνουν τα εκχυλίσματα είναι μικρότερα από τα ποσοστά παρεμπόδισης (Πίνακας 3.11 & 3.12), κάτι που υποδεικνύει ότι είναι πιο δύσκολο να αντιμετωπιστεί το βιοϋμένιο των μικροοργανισμών εφόσον έχει ήδη

σχηματιστεί από αυτούς. Το βιοϋμένιο που σχηματίζεται στις κυψέλες, προσομοιώνει όσο το δυνατόν καλύτερα το περιβάλλον της στοματικής κοιλότητας. Σύμφωνα με μελέτες, το βιοϋμένιο είναι πιο ανθεκτικό και εμφανίζει μεγαλύτερη αντίσταση σε αντιβιοτικά σε σχέση με τα μεμονωμένα κύτταρα που δεν έχουν σχηματίσει βιοϋμένιο. Ως εκ τούτου, η μελέτη των βιοϋμενίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αξιολογηθεί η αντιβακτηριακή δράση των αντιβιοτικών με μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι με μια μελέτη μεμονωμένων κυττάρων που δεν έχουν σχηματίσει βιοϋμένιο (Jung-Eun *et al.*, 2008). Η δυνατότητα να αποτραπεί η βακτηριακή προσκόλληση που αποτελεί τα πρώτα στάδια της μολυσματικής διαδικασίας αντιπροσωπεύει μια ιδανική στρατηγική για την καταπολέμηση των βακτηρίων. Επιπρόσθετα, η αποτροπή της βακτηριακής προσκόλλησης αποτελεί μία προληπτική παρέμβαση για την πρόληψη της μόλυνσης (Cegelski *et al.*, 2008). Για αυτό το λόγο μελετάται η ικανότητα των εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του βιοϋμενίου.

Οι Barbieri *et al.*, (2014) εξέτασαν μεθανολικά εκχυλίσματα (σε διάφορους διαλύτες) των φυτών *Schinus terebinthifolius* και *Croton urucurana* και κατά πόσον παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* και του *Candida albicans*. Το μεθανολικό εκχύλισμα σε υδροαλκοολικό διαλύτη του *Schinus terebinthifolius* περιόρισε την ανάπτυξη του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* κατά 41% ενώ το αντίστοιχο εκχύλισμα του *Croton urucurana* μείωσε την ανάπτυξη του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* κατά 17%. Τα φυτά αυτά επιλέχθηκαν γιατί συγκεντρώνουν ποσοστό πολυφαινολών, συγκεκριμένα το εκχύλισμα του φυτού *Schinus terebinthifolius* έχει βρεθεί ότι περιέχει απιγενίνη και γαλλικό οξύ (Barbieri *et al.*, 2014).

Στην πρόσφατη μελέτη των Taweechaisuparong *et al.*, (2014) εξετάστηκαν εκχυλίσματα του φυτού *Streblus asper* για τη δράση τους έναντι υποουλικών μικροοργανισμών του στόματος. Έγινε επώαση των βιοϋμενίων με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος για δύο, τέσσερις και οχτώ μέρες και παρατηρήθηκε ότι με την πάροδο των ημερών τα βιοϋμένια ήταν πιο ανθεκτικά, κάτι που έχει αποδειχθεί και από άλλους ερευνητές (Sedlacek *et al.*, 2007).

Οι Yano *et al.*, (2012) διερεύνησαν τη δράση εκχυλίσματος από τα στέμφυλα του *Vitis coignetiae* έναντι της ανάπτυξης του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* και του σχηματισμού γλυκάνης από τις γλυκοσυλτρανσφεράσες. Το εκχύλισμα εμφάνισε περιοριστική δράση 83,3% ενώ το φαινολικό κλάσμα του εκχυλίσματος παρουσίασε ποσοστό παρεμπόδισης 69,5%. Αξιοσημείωτο είναι ότι το φαινολικό κλάσμα του εκχυλίσματος από τα στέμφυλα είχε 40-42%(w/w) φαινολικό περιεχόμενο ενώ το φαινολικό κλάσμα του εκχυλίσματος που λήφθηκε από το χυμό του *Vitis coignetiae* είχε φαινολικό περιεχόμενο 43,5% (w/w) το οποίο και εμφάνισε παρεμποδιστική δράση μόλις 4,57%. Ακόμη, το εκχύλισμα από τα στέμφυλα ανέστειλε τη δράση των γλυκοσυλτρανσφερασών-B που συνδέονται με τη σύνθεση αδιάλυτων στο νερό γλυκανών και τη δράση των γλυκοσυλτρανσφερασών-D που συνδέονται με τη σύνθεση των υδατοδιαλυτών γλυκανών. Όμως η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στην δεύτερη περίπτωση ήταν χαμηλότερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της δράσης των γλυκοσυλτρανσφερασών-B. Αρχικά οι γλυκοσυλτρανσφεράσες εκκρίνονται από τον *Streptococcus mutans* και ενσωματώνονται στο υμένιο (ιδιαίτερα

οι γλυκοσυλτρανσφεράσες-C και -B). Σε δεύτερη φάση, οι προσροφημένες στην επιφάνεια γλυκοσυλτρανσφεράσες-C και -B συνθέτουν αδιάλυτες και διαλυτές γλυκάνες με εκκινήτες από τις -D. Έπειτα οι γλυκάνες παρέχουν θέσεις σύνδεσης επί του υμενίου. Οι γλυκοσυλτρανσφεράσες-B συνδέονται κυρίως με την κυτταρική βακτηριακή επιφάνεια, οι -C προσροφώνται εντός του υμενίου και οι -D εκκρίνονται μέσα στη στοματική κοιλότητα. Το εκχύλισμα του *Vitis coignetiae* φάνηκε ότι αναστέλλει τη δράση των -D, αυτό υποδηλώνει ότι η παραγωγή των εκκινήτων για την παραγωγή γλυκάνης από τις -B και -C μειώνεται με συνέπεια να μειώνεται και η παραγωγή γλυκάνης από τις γλυκοσυλτρανσφεράσες-B και -C.

Στη μελέτη των Jung-Eun *et al.*, (2008) αποδείχθη ότι εκχυλίσματα από το φυτό *Curcuma xanthorrhiza* έχουν δράση επί του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* και περιορίζουν τον βακτηριακό πληθυσμό του. Η δράση του αποδόθηκε σε σεσκιτερπένια που αποτελούνται από μία φαινόλη και μία αλυσίδα υδρογονανθράκων και συγκεκριμένα στην υδροξυλομάδα που περιέχουν.

Ο Sung-Hoon (2013) στην έρευνά του για τη δράση φυτικών εκχυλισμάτων έναντι βιοϋμενίων του *Streptococcus mutans* και άλλων μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας αναφερόμενος στις διαφορές που παρατήρησε στην παρεμπόδιση που προκαλούν τα εκχυλίσματα στους διάφορους μικροοργανισμούς και στην ανθεκτικότητά τους εξηγεί ότι τα βιοϋμένια σχηματίζονται ως εξής: πρώτα προσκολλώνται στην επιφάνεια του δοντιού οι *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* και στη συνέχεια ο *Streptococcus mutans* συνδέεται με αυτούς. Έτσι, ο αντιμικροβιακός παράγοντας θα πρέπει να καταπολεμά τον *Streptococcus mutans* που προκαλεί τερηδόνα χωρίς όμως να έχει την ίδια επίδραση στους άλλους μικροοργανισμούς που αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα της στοματικής κοιλότητας.

Διερευνήθηκε η δράση υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών *Plectranthus barbatus* και *Plectranthus ecklonii* που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στην Πορτογαλία, έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* (Figueiredo *et al.*, 2010). Κύριο συστατικό αυτών των φυτών είναι το ροσμαρινικό οξύ (Fale *et al.*, 2009) με το οποίο έγινε σύγκριση της δράσης των εκχυλισμάτων. Προσδιορίστηκε για το *Plectranthus barbatus* τιμή MIC 3,8 mg/mL για τον *Streptococcus sobrinus* και 2,9 mg/mL για τον *Streptococcus mutans*, ενώ στο *Plectranthus ecklonii* τιμή MIC 4,7 mg/mL και 5 mg/mL αντίστοιχα και για το ροσμαρινικό οξύ 8,4 mg/mL και 7,3 mg/mL αντίστοιχα. Οι τιμές IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης του βιοϋμενίου κατά 50% ήταν: Για τον *Streptococcus sobrinus* 0,6, 1 και 3,1 mg/mL των εκχυλισμάτων από τα φυτά *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus ecklonii* και του ροσμαρινικού οξέος αντίστοιχα και για τον *Streptococcus mutans* 1,4, 2,7 και 1,3 mg/mL αντίστοιχα. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρεμπόδιση που ασκούν τα εκχυλίσματα στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου συνδέεται με την περιεκτικότητά τους σε ροσμαρινικό οξύ και ότι το συγκεκριμένο στέλεχος *Streptococcus sobrinus* είναι πιο ευαίσθητο από το αντίστοιχο του *Streptococcus mutans*. Σε κάποιους μικροοργανισμούς διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα είχαν δράση και σε άλλους όχι. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η σύσταση του κάθε εκχυλίσματος και οι ποσότητες των δραστικών ενώσεων που περιέχει. Επιπλέον, δεν πρέπει να

Αποτελέσματα & Συζήτηση

αποκλείσουμε το φαινόμενο της συνεργιστικής ή της ανταγωνιστικής δράσης που λαμβάνει χώρα σε ένα πολύπλοκο σύστημα όπως είναι ένα φυσικό προϊόν (Αναστασάκη, 2014).

Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των συστατικών οργανικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών όπως και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης έναντι μικροοργανισμών που αναπτύσσουν παθογένειες στη στοματική κοιλότητα.

Μελετήθηκαν τα φυτά: κρίκος (*Crocus sativus* L.), μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.) και χαμομήλι (*Matricaria recutita* L.). Στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων συστατικών. Το εκχύλισμα του κρίκου ήταν πλούσιο σε κροκίνες και είχε μικρή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, στο εκχύλισμα του μελισσόχορτου ήταν κυρίαρχη η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος και το εκχύλισμα του χαμομηλιού χαρακτηρίστηκε από την παρουσία παραγώγων φερουλικού οξέος και γλυκοζιδιωμένων μορφών απιγενίνης.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση, τα εκχυλίσματα κατατάχθηκαν με την εξής σειρά αυξανόμενης αντιοξειδωτικής δράσης: κρίκος < χαμομήλι < μελισσόχορτο και με τις δύο μεθόδους προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS^{•+} και DPPH[•]). Την ίδια κατάταξη έλαβαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα και για το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο το οποίο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Το μελισσόχορτο εμφανίζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε ροσμαρινικό οξύ. Στην περίπτωση του κρίκου υπήρχε πρόβλημα στην μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH[•] καθώς οι κροκίνες εμφανίζουν απορρόφηση στα 260, 325 και 435 nm δημιουργώντας παρεμβολή και αλλοίωση του αποτελέσματος δεδομένου ότι και το DPPH[•] μετράται στην ίδια φασματική περιοχή. Η μέθοδος ABTS^{•+} ενδείκνυται πιο πολύ για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κρίκου. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού περιεχομένου είναι εμφανές ότι υπάρχει συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης και της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά.

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες, μεθανόλη-H₂O και αιθανόλη-H₂O. Η αιθανόλη επιλέχθηκε επειδή εμφανίζει χαμηλή σχετικά τοξικότητα για τον άνθρωπο οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων. Με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well diffusion assay-WDA) διαπιστώθηκε ότι για τον *Streptococcus mutans* τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα και των τριών φυτών εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση. Παράδοξο είναι ότι το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του κρίκου δεν εμφάνισε καμία ζώνη παρεμπόδισης στην περίπτωση του *Streptococcus mutans* ενώ εμφάνισε ισχυρή δράση στην περίπτωση του *Streptococcus sobrinus*. Τα εκχυλίσματα (υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά) παρουσίασαν ικανοποιητική δράση και έναντι του *Streptococcus sobrinus*.

Στη μελέτη παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμένιου του *Streptococcus mutans*, όλα τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης με ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους. Σε αυτή τη δοκιμή το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του κρόκου εμφάνισε δράση έναντι του *Streptococcus mutans* (σε αντίθεση με τη μέθοδο WDA). Όσον αφορά τον *Streptococcus sobrinus* τα εκχυλίσματα του κρόκου παρουσίασαν τη μικρότερη δράση παρεμπόδισης.

Αναφορικά με τη μελέτη της ικανότητας αποικοδόμησης του ήδη σχηματισμένου βιοϋμένιου στις δύο ώρες, για τον *Streptococcus mutans*, ξεχώρισε η δράση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του κρόκου. Ο *Streptococcus sobrinus* αποδείχθηκε ιδιαίτερα ανθεκτικός στα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και του χαμομηλιού τα οποία δεν παρουσίασαν ποσοστά αποικοδόμησης. Αντίθετα, τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα του κρόκου αποδείχθηκαν πιο ενεργά με μεγαλύτερα και παρόμοια μεταξύ τους ποσοστά αποικοδόμησης. Σε γενικές γραμμές με τη μέθοδο μελέτης της ικανότητας παρεμπόδισης σχηματισμού του βιοϋμένιου και αποικοδόμησής του εμφανίστηκε πιο ανθεκτικός ο *Streptococcus sobrinus*. Ακόμη, τα ποσοστά αποικοδόμησης του ήδη σχηματισμένου βιοϋμένιου στις δύο ώρες ήταν σαφώς μικρότερα από τα ποσοστά παρεμπόδισης σχηματισμού του, ένδειξη ότι είναι πιο δύσκολη η καταπολέμηση του βιοϋμένιου αφού αυτό έχει σχηματιστεί από τους μικροοργανισμούς.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι κάθε φυτό διαθέτει ένα περίπλοκο μίγμα συστατικών τα οποία μπορεί να εμφανίζουν συνέργεια μεταξύ τους, προσδίδοντας αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Από την άλλη και το βιοϋμένιο που σχηματίζουν οι μικροοργανισμοί είναι ένα περίπλοκο σύστημα το οποίο ανταποκρίνεται με συγκεκριμένο τρόπο στη δράση των εκχυλισμάτων και στο οποίο κάθε εκχύλισμα μπορεί να δρα με διαφορετικό τρόπο, ακόμα και με νέους κάθε φορά μηχανισμούς (Vieira *et al.*, 2014).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι τα εκχυλίσματα των μελετούμενων φυτών διαθέτουν αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση *in vitro*. Απαιτούνται σίγουρα περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* έρευνες ώστε να διευκρινιστεί αν τα συγκεκριμένα φυτά μπορούν να αποτελέσουν όπλα καταπολέμησης των μικροοργανισμών που προκαλούν παθήσεις στη στοματική κοιλότητα.

Βιβλιογραφία

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Abdel-Aal E-S, Abou-Arab AA, Gamel TH, Hucl P, Young JC, Rabalski I. (2008) Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11171-11177.
- Abdollahzadeh S., R. Y.Mashouf, H.Mortazavi *et al.*, (2011) "Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens," *Journal of Dentistry*, vol. 8, no. 1, pp. 1-6.
- Abdullaev F.I., (2002) Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.), *Experimental Biology and Medicine* 227 20.
- Abdullaev F.I., (2003) Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.), *Toxicology in Vitro* 17 751.
- Abdullaev F.I., (2004) Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials, *Cancer Prevention Research*. 28 426-432.
- Agnieszka Arceusz, Marek Wesolowski, (2013) Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 83 215- 220.
- Akhondzadeh, S., Fallah-Pour, H., Afkham, K., Jamshidi, A.H., Khalighi-Cigaroudi, F. (2004) Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial *BMC Complementary and Alternative Medicine* 4, 12.
- Akira Yano, Sayaka Kikuchi, Tohru Takahashi, Keiko Kohama, Yasuo Yoshida, (2012) Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans* *Archives of oral biology* 57 711-719.
- Akondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Amshidi AH, Khani M. (2003) *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 74:863-6.
- Allaverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S. (2004) Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2 *Phytomedicine* 11:657-61.
- Alvin Ibarra, Nicolas Feuillere, Marc Roller, Edith Lesburgere, Daniel Beracochea, (2010) Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extraction anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice *Phytomedicine* 17 397-403.
- Amadi E. S., C. A. Oyeka, R. A. Onyeagba, O. C. Ugbogu, I. Okoli, (2007) "Antimicrobial screening of *Breynia nivosus* and *Ageratum conyzoides* against dental caries organisms," *Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 2, pp. 354-358.
- Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. (2010a) Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis *European Food Research and Technology*, 230, 571-577.
- Andriambelason E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, (1997) Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endotheliumdependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta *British Journal of Nutrition* 120: 1053-1058.
- Anon.. Iranian herbal pharmacopoeia (2002) (Vol. 1, pp.141-121). Tehran: *Ministry of Health Publication*.

- Antonio A.G., N.L.P. Iorio, V.S.S. Pierro, M.S. Candreva, A. Farah, K.R.N. dos Santos, L.C. Maia, (2011) Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*, Volume 56, Issue 6, Pages 556-564.
- Aruoma, O. I. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 199-212.
- Astadi IR, Astuti M, Santoso U, Nugraheni PS. (2009) In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL) *Food Chemistry* 112: 659-663.
- Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S. (2007) Salivary free radical-scavenging activity is affected by physical and mental activities, *Oral Diseases*.
- Aung, H.H., Wang, C.Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S.R., Xie, J.T., Shoyama, C.Y., Yuan, C.S., 2007. Crocin from *Crocus sativus* possesses significant antiproliferation effects on human colorectal cancer cells. *Experimental Oncology* 29, 175-180.
- Avallone, R., Zanolli, P., Puia, G., Kleinschnitz, M., Schreier, P., Baraldi M., (2000) Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla* *Biochemical Pharmacology* 59, 1387-1394.
- Avula Bharathi, Yan-Hong Wang, Mei Wang, Cristina Avonto, Jianping Zhao, Troy J. Smillie, Diego Rua, Ikhlas A. Khan, (2014) 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 *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 88 278-288.
- Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V.L., Arnason, J.T., (2007) Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 85, 933-942.
- Ayoola G, Coker H, Adesegun S, et al. (2008) Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7:1019-1024.
- Balasundram N, Sundram K, Saman S. (2006) Phenolic Compounds in Plants and Agriindustrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Bancirova, M. (2010) Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea *Food Research International*, 43(5), 1379e1382.
- Barbieri Dicler S.V., Fabiana Tonial, Patricia V.A., Lopez, Beatriz H.L.N. Sales Maia, Germana D. Santos, Marina O. Ribas, Chirlei Glienke, Vania A. Vicente, (2014) Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, *Archives of oral biology* 59 887-896.
- Barros Lillian, Montserrat Duepas, Maria Inks Dias, Maria Joyo Sousa, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira, (2013) Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions, *Food Chemistry* 136 1-8.
- Baser KH, Demirci B, Iscan G, et al. (2006) The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. Var. *discoidea* BOISS *Chemical & pharmaceutical bulletin*. (Tokyo) 54:222-225.
- Bathaie SZ, Mousavi SZ. (2010) New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50: 761-86.
- Bellido GG, Beta T. (2009) Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 1022-1028.
- Ben Sghaier M, Bhouri W, Neffati A, et al. (2011) Chemical investigation of different crude extracts from *Teucrium ramosissimum* leaves Correlation with their antigenotoxic and antioxidant properties. *Food and Chemical Toxicology* 49:191-201.

Βιβλιογραφία

- Bergman M, Varshavsky L, Gottlieb HE, Grossman S. (2001) The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions *Phytochemistry* 58:143e152.
- Bernays, E.A. and Chapman, R.F. (1994) Host-Plant Selection by Phytophagous Insects *Chapman & Hall*, New York, p. 312.
- Bhargava VK. (2011) Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* Linn. (saffron) *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3: 22–26.
- Bhaskaran, N., Shukla, S., Srivastava, J.K., Gupta, S., 2010. Chamomile: an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. *International Journal of Molecular Medicine*. 26, 935–940.
- Bidault P., F. Chandad, and D. Grenier, (2007) Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology *Journal of the Canadian Dental Association*, vol. 73, no. 8, pp. 721–725.
- Bizzini B., G. Pizzo, G. Scapagnini, D. Nuzzo, S. Vasto, (2012) Probiotics and oral health, *Current Pharmaceutical Design*, 18 (34) pp. 5522–5531.
- Bolkent S, Yanardag R, Karabulut-Bulan O, Yesilyaprak B. (2005) Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on the liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study *Journal of Ethnopharmacology*, 99:391–8.
- Brighenti FL, Luppens SB, Delbem AC, Deng DM, Hoogenkamp MA, Gaetti-Jardim Jr E *et al.* (2008) Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability protein expression and acid production. *Caries Research*, 42:148–54.
- Britton G, Liaaen- Jensen S., Pfander H., (1995) Carotenoids, Vol. 1, UV/ visible spectroscopy, Birkhauser, Basel, pp 13-62.
- Burt, S. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74:2157-2184.
- Camilo López-Alarcón, Ana Denicola, (2013) Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Analytica Chimica Acta*, Volume 763, Pages 1–10.
- Cantrell, C.L., Fischer, N.H., Urbatsch, L., Guire, M.S. and Franzblau, S.G. (1998). Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine*, 5, 137–45.
- Carmona, M., Sanchez, A.M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomás-Barberan, F., Alonso, G.L., (2007) Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chemistry* 100, 445–450.
- Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A.Ma., Novella, J.L., Alonso, G.L. (2006) 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 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 973-979.
- Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Ricoux L, Lamaison JL. (2004) The aromatic and polyphenolic composition of Roman chamomile tea. *Fitoterapia* 75:32–38.
- Carnat, A.B., Carnat, D., & Lamaison, J.-L. (1998) The aromatic and polyphenolic compositions of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72, 301–305.
- Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. (2008) The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1):17–27.
- Cemek M, Kağa S, Simşek N, Büyükkuroğlu ME, Konuk M. (2008) Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nature Medicine* (Tokyo) 62(3):284-93.
- Chandrashekhhar V.M., K.S. Halagali, R.B. Nidavani, M.H. Shalavadi, B.S. Biradar, D. Biswas, I.S. Muchchandi, (2011) Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model, *Journal of Ethnopharmacology* 137 336– 340.

Βιβλιογραφία

- Chew AL, Jeyanthi JAJ, Sasidharan S. (2012) Antioxidant and antibacterial activity of different parts of *Leucas aspera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3): 176-180.
- Chryssanthi, D.G., Lamari, F.N., Iatrou, G., Pylara, A., Karamanos, N.K., Cordopatis, P., (2007) Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. *Anticancer Research*. 27, 357–362.
- Chun, S-S., *et al.* (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* *Process Biochemistry* 40, 809-816.
- Chung J. Y., J. H. Choo, M. H. Lee, and J. K. Hwang, (2006) "Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*," *Phytomedicine*, vol. 13, no. 4, pp. 261–266.
- Ciancio SG (1995). Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. *Periodontology 2000*, 8: 75-86.
- Cipollini, M.L. and Levey, D.J. (1997). Secondary metabolites of fleshy vertebrate dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *American Naturalist*, 150, 346–73.
- Colditz GA, Branch LG, Lipnick RJ, *et al.* (1985) Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *American Journal of Clinical Nutrition*, 41: 32-36.
- Connolly JD, Hill RA. Dictionary of Terpenoids, Vols. 1–3. *Chapman and Hall*, London, 1991.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–82.
- Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., Pegg, R.B., (2012). Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 148–173.
- Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ (2005) Taxol and Its Analogs. In: *Anticancer Agents from Natural Products*, eds. *Taylor & Francis*, Boca Raton, FL.
- Crotteau, C.A., Wright, S.T., Eglash, A., (2006) Clinical inquiries: what is the best treatment for infants with colic? *Journal of family practice*. 55, 634–636.
- Crozier Alan, Michael N. Clifford, Hiroshi Ashihara, *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet Blackwell Publishing Ltd* (2006).
- Cushnie, T.P.T & Lamb A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids- review *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343- 356.
- Cuvelier, M.-E., Richard H., Berset C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 645-652.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2003) The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *Crop Protection*, 22, 39-44.
- Dai J, Mumper R. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- Dangles, O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols: Chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 692–714.
- De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattas CR (2004). *Melissa officinalis* L. Essential oil: Antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (9):2485-2489.
- Deans S.G., E.J.M. Simpson, (2000) Antioxidants from *Salvia officinalis*, in: S. Kintzios (Ed.), *Sage-The genus Salvia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Harwood, Amsterdam, pp. 185–192.
- DeFuria J, Bennett G, Strissel KJ, *et al.* (2009) Dietary blueberry attenuates whole body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *Journal of Nutrition*; 139: 1-7.

Βιβλιογραφία

- Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tiena, O.S., Kakinamia, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73, 69–91.
- Diab-Ladki R., B. Pellat, R. Chahine, (2003) Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases, *Clinical Oral Investigations*, 7 pp. 103–107.
- Diane L. McKay, Jeffrey B. Blumberg, (2006) A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.), *Phytotherapy Research*. 20, 519–530.
- Dias Maria Inks, Lillian Barros, Maria Jôyo Sousa, Isabel C.F.R. Ferreira, (2012) Systematic comparison of nutraceuticals and antioxidant potential of cultivated, *in vitro* cultured and commercial *Melissa officinalis* samples, *Food and Chemical Toxicology* 50 1866–1873.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R., (2003) Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *Journal of Nutrition* 133, 1286–1290.
- Duduku Krishnaiah, Rosalam Sarbatly, Rajesh Nithyanandam, (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food and Bioproducts Processing* 89 217–233.
- E. Knoll-Kohler and J. Stiebel, (2002) Amine fluoride gel affects the viability and the generation of superoxide anions in human polymorphonuclear leukocytes: an *in vitro* study *European Journal of Oral Sciences*, vol. 110, no. 4, pp. 296–301.
- Edgar Harris, M., & S. Meghji (Eds.), *Clinical oral science* (pp. 199–212). Oxford: Wright Press.
- Falt, P., Borges, C., Madeira, P. J. A., Ascensyo, L., Araújo, M. E. M., Florêncio, M. H., *et al.* (2009). Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“Falso Boldo”). *Food Chemistry*, 114, 798–805.
- Fecka, I., & Turek, S. (2007). Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10908–10917.
- Fejerskov, O., Kidd, E., 2007. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Santos, São Paulo p. 352.
- Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM, Araújo MEM. (2006) The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal *Journal of Ethnopharmacology*, 108:31–7.
- Filoché S., L. Wong, C.H. Sissons, (2010) Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology, *Journal of Dental Research*, 89, pp. 8–18.
- Fimognari C, Berti F, Nusse M, Cantelli-Forti G, Hrelia P. (2004) Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanin-3-O-beta-glucopyranoside. *Biochemical Pharmacology*, 67: 2047-2056.
- Folin O., V. Ciocalteu, (1927) On tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 73 (2), pp. 627–650.
- Folin O., W. Denis. (1915) A colorimetric method for the determination of phenol (and derivatives) in urine, *Journal of Biological Chemistry*, 22 (2), pp. 305–308.
- Fonseca Fabiana N., Marina F.M. Tavares, Csaba Horvath, (2007) Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*, *Journal of Chromatography A*, 1154 390–399.
- Forster, H.B., Niklas, H., Lutz, S., 1980. Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Medica*. 40, 309–319.
- Fraga, C.G.; Galleano, M.; Verstraeten, S.V. & Oteiza, P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol.31, No.6, pp. 435-445, ISSN 0098-2997.
- Francisco M.L.D.L. and Resurrecion A.V.A. (2008). Functional Components in Peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 715-746.
- Franke, R., Schilcher, H., (2005) Chamomile: Industrial Profiles, II Series: Medicinal and Aromatic Plants, vol. 42. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton/Broken Sound Parkway, NW.

Βιβλιογραφία

- Frankel, E.N., S.W. Huang, J. Kanner and J.B. German. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils *versus* emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42:1054-1059.
- Fukumoto LR, Mazza G. (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48: 3597-3604.
- Galvano F, Fauci LL, Vitaglione P, Fogliano V, Vanella L, Felgines C. (2007) Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*; 43: 382-393.
- Gardiner, P., (2007). Complementary, holistic, and integrative medicine: chamomile. *Pediatrics in Review*. 28, 16–18.
- Gazola R, Machado D, Ruggiero C, Singi G, Alexandre MM. (2004) *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacological Research*;50:477–80.
- Geromichalos, G.D., Lamari, F.N., Papandreou, M.A., Trafalis, D.T., Margarity, M., Papageorgiou, A., Sinakos, Z., (2012) Saffron as a source of novel acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking and *in vitro* enzymatic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 6131–6138.
- Ghadroost, B., Vafaei, A.A., Rashidy-Pour, A., Hajisoltani, R., Bandegi, A.R., Motamedi, F., Haghighi, S., Sameni, H.R., Pahlvan, S., (2011). Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *European Journal of Pharmacology*. 667, 222–229.
- Ghasemzadeh, A, Jaafar, HZE, Rahmat, (2010) A. Antioxidant activities, total Phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*; 15: 4324-4333.
- Gholivand MB, Rahimi-Nasrabadi M, Batooli H, Ebrahimabadi AH. (2010) Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens* *Food and Chemical Toxicology*.48:24-28.
- Ghosh D, Konishi T. (2007) Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*; 16: 200-208.
- Giaccio M. (2004) Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 44: 155–72.
- Gianmaria F. Ferrazzano, Lia Roberto, Maria Rosaria Catania, Angela Chiaviello, Antonino De Natale, Emanuela Roscetto, Gabriele Pinto, Antonino Pollio, Aniello Ingenito, Giuseppe Palumbo, (2013) Screening and Scoring of Antimicrobial and Biological Activities of Italian Vulnerary Plants against Major Oral Pathogenic Bacteria, *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume, Article ID 316280, 10 pages.
- Giselle Guginski, Ana Paula Luiz, Morgana Duarte Silva, Murilo Massaro, Daniel Fernandes Martins, Juliana Chaves, Robson Willain Mattos, Damaris Silveira, Vânia M.M. Ferreira, João Batista Calixto, Adair R.S. Santos, (2009) Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 93 10–16.
- Glowania HJ, Raulin C, Swoboda M. (1987) Effect of chamomile on wound healing--a clinical double-blind study. *Zeitschrift für Hautkrankheiten*;62:1267–1271.
- Gould L, Reddy CV, Gomprecht RF. (1973) Cardiac effects of chamomile tea. *Journal of Clinical Pharmacology*.;11:475–479.
- Goupy, P., Vian, M.A., Chemat, F., Caris-Veyrat, C., (2013) Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products* 44, 496–510.

Βιβλιογραφία

- Grayer, R.J. and Harborne, J.B. (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, **37**, 19–42.
- Greg Tram, Victoria Korolik, Christopher J. Day, MBDS Solvent: An Improved Method for Assessment of Biofilms, *Advances in Microbiology*, 2013, 3, 200-204.
- Guimarães Rafaela, Maria João Sousa, Isabel C.F.R. Ferreira, (2010) Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants, *Industrial Crops and Products*, Volume 32, Issue 2, , Pages 152–156.
- Guo H, Ling W, Wang Q, *et al.* (2007) Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods for Human Nutrition*; 62: 1-6.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 561–564.
- Haghi G., A. Hatami, A. Safaei, M. Mehran, (2014) Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(1): 31-37.
- Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, *et al.* (2001) Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn colour, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*; 171: 17-25.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical and Biology Medicine. 2nd ed. Oxford: Oxford University; 1989.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150.
- Hamada S., H.D. Slade, (1980), Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiology Reviews*, 44 pp. 331–384.
- Hamilton-Miller, J.M.T. (2001) Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Medical Microbiology and Immunology* 50, 299–302.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985–990.
- Harborne, J.B. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, 4th edn, *Academic Press*, London.
- Hardie, J. M. (1998). The microbiology of dental caries and periodontal disease. In M.
- Havsteen B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*;32: 1141–8.
- Hayacibara M.F., Koo H., Rosalen P.L., Duarte S., Franco E.M., Bowenb W.H., Ikegaki M. and Cury J.A., (2005). *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development *The Journal of Ethnopharmacology*,101, 110-115.
- He, S.Y., Qian, Z.Y., Tang, F.T., Wen, N., Xu, G.L., Sheng, L., (2005). Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Science*77, 907–921.
- He, S.Y., Qian, Z.Y., Wen, N., Tang, F.T., Xu, G.L., Zhou, C.H., (2007). Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails. *European Journal of Pharmacology*. 554, 191–195.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13, 572–584.
- Heitz A, Carnat A, Fraisse D, Carnat AP, Lamaison JP. (2000) Leotelin 3'-glucoronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. *Fitoterapia*;71:201–2.
- Hempel, B., Martino, V., Bandoni, A., Blaak, G., Capelle, N., (1999). CO₂-extract from German chamomile—proposed medicinal use. *Acta Horticulturae*. 503, 15–19.
- Hentzer M, Givskov M. (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*;112(9):1300–7.
- Heriberto Caballero-Ortega, Rogelio Pereda-Miranda, Fikrat I. Abdullaev, (2007) HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources, *Food Chemistry* 100 1126–1131.

- Hernandez T., M. Canales, A. Duran *et al.*, (2009) "Variation in the hexanic extract composition of *Lippa graveolens* in an arid zone from Mexico: environmental influence or true chemotypes?", *The Open Plant Science Journal*, vol. 3, pp. 29–34.
- Hernandez-Ceruelos, A., Madrigal-Santillan, E., Morales-Gonzalez, J.A., Chamorro-Cevallos, G., Cassani-Galindo, M., Madrigal-Bujaidar, E., (2010). Antigenotoxic effect of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert essential oil in mouse spermatogonial cells and determination of its antioxidant capacity in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 3793–3802.
- Herodez SS, Hadolin M, Skerget M, Knez Z. (2003) Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*;80:275–82.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*.;342:1007–1011.
- Hosseinzadeh, H., Behravan, J., Ramezani, M., Ajgan, K., (2005a). Anti-tumor and cytotoxic evaluation of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts using brine shrimp and potato disc assays. *Journal of medicinal plant research*. 4, 59–65.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ghaeni, F.A., Motamedshariaty, V.S., Mohajeri, S.A., (2012). Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytotherapy Research*. 26, 381–386.
- Hu, P., Liang, Q.-L., Luo, G.-A., Zhao, Z.-Z., Jiang, Z.-H. (2005) Multi-component HPLC fingerprinting of *Radix Salviae Miltiorrhizae* and its LC-MS-MS identification *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 677-683.
- Huang, D., Boxin, O., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hübsch Z., R.L. Van Zyl, I.E. Cock, S.F. Van Vuuren, (2014) Interactive antimicrobial and toxicity profiles of conventional antimicrobials with Southern African medicinal plants, *South African Journal of Botany*, Volume 93, Pages 185–197.
- Iauk L., A. M. Lo Bue, I. Milazzo, A. Rapisarda, and G. Blandino, (2003) Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria *Phytotherapy Research*, vol. 17, no. 6, pp. 599–604.
- Islam B, Khan SN, Haque I, Alam M, Mushfiq M, Asad U. (2008) Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*;62(4):751–7.
- Izaskun Berasategi, Íñigo Navarro-Blasco, Maria Isabel Calvo, Rita Yolanda Cavero, Iciar Astiasarán, Diana Ansorena, (2014) Healthy reduced-fat Bologna sausages enriched in ALA and DHA and stabilized with *Melissa officinalis* extract, *Meat Science* 96 1185–1190.
- Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR. (2005) Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology*; 81: 529-536.
- Janina MS (2003) *Melissa officinalis*. *International Journal of Aromatherapy*., 10: 132-139.
- Janmejai K Srivastava Sanjay Gupta, (2010) Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers, *Molecular Medicine Reports*; 3(6): 895–901.
- Jarrahi M, Vafaei AA, Taherian AA, Miladi H, Rashidi Pour (2008) A. Evaluation of topical *Matricaria chamomilla* extracts activity on linear incisional wound healing in albino rats. *Natural Product Research*.; 22(14):1197-202.
- Jarrahi M. (2008) An experimental study of the effects of *Matricaria chamomilla* extract on cutaneous burn wound healing in albino rats. *Natural Product Research*.; 22(5):422-7.
- Jau-Tien Lin, Yi-Chen Chen, Ying-Chung Lee, Chien-Wei Rolis Hou, Fong-Lin Chen, Deng-Jye Yang, (2012) Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic

- extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *LWT - Food Science and Technology* 49 1-7.
- Javadi B, Emami A. (2003). Investigation on saffron in main Islamic medicine books. Proceedings of the 3rd National Symposium on Saffron. *Ferdowsi University Publication*, Mashhad, 200–211.
- Je-Hyuk Lee, (2014) Antibacterial Activity and Cytotoxicity of *Aster sphathulifolius* Maxim. Against Oral-bacteria and Oral-cancer Cell Lines, *Research Journal of Medicinal Plant* 8 (1): 41-49.
- Jenkinson H. F. and R. J. Lamont, “Oral microbial communities in sickness and in health,” *Trends in Microbiology*, vol. 13, no. 12, pp. 589–595, 2005.
- Ju-Hee Song, Shin-Kyu Kim, Kee-Wan Chang, Seong-Kyu Han ,Ho-Keun Yi , Jae-Gyu Jeon, (2006) In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, *Archives of Oral Biology* 51, 1131–1140.
- Jung-Eun Kim, Jae-Kwan Hwang, Ho-Jeong Lee, Ho-Keum Kwon, Baek-Il Kim, (2008) Antibacterial Characteristics of *Curcuma xanthorrhiza* Extract on *Streptococcus mutans* Biofilm, *The Journal of Microbiology*, p. 228-232.
- Justesen, U., & Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245-250.
- Kahkonen MP, Heinonen M. (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycones *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51: 628-633.
- Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, et al. (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56: 705-712.
- Kamdem Jean Paul, Adekunle Adeniran, Aline Augusti Boligon, Claudia Vargas Klimaczewski, Olusola Olalekan Elekofehinti, Waseem Hassan, Mohammed Ibrahim, Emily Pansera Waczuk, Daiane Francine Meinerz, Margareth Linde Athayde, (2013) Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection, *Industrial Crops and Products* 51 26– 34.
- Kanakis C.D., P.A. Tarantilis, C. Pappas, J. Bariyanga, H.A. Tajmir-Riahi, M.G. Polissiou, (2009) An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95 204–212.
- Kancheva, V.D., (2009). Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain breaking activity: a comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 111, 1072–1089.
- Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD. (2003) Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc (Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters*; 194: 13-19.
- Kassi, E., Papoutsis, Z., Fokialakis, N., Messari, I., Mitakou, S., Moutsatsou, P., (2004). Greek plant extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6956–6961.
- Kato A, Minoshima Y, Yamamoto J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ (2008). Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8206–8211.
- Kawabata K, N.H. Tung, Y. Shoyama, S. Sugie, T. Mori, T. Tanak, (2012) Dietary crocin inhibits colitis and colitis-associated colorectal carcinogenesis in male ICR mice, *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–13.
- Kelly, F.J. (1993) Free radical disorders of preterm infants, *British Medical Bulletin* 49 (3): 668-678.
- Kennedy DO, Wake G, Savelev S, Tildesley NTJ, Perry EK, Wesnes KA, et al. (2003) Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. *Neuropsychopharmacology*; 28:1871–81.

- Keyvan Dastmalchi, H.J. Damien Dorman, Paivi P. Oinonen, Yusrida Darwis, Into Laakso, Raimo Hiltunen, (2008) Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract, *LWT - Food Science and Technology* 41 391–400.
- Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT, (2007) Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15, 1749–1770.
- Kidd E.A.M., O. Fejerskov, (2004), What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms, *Journal of Dental Research*, 83 (Spec Iss C) pp. C35–C38.
- King A, Young G. (1999). Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 24: 213-218.
- Kintzios, S., Michaelakis, A., (1999). Induction of somatic embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). *Plant Cell Reports*. 18, 684–690.
- Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H., Mozina, S.S. (2009) *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations *Journal of Food Protection*, 72, 1744-1752.
- Kobayashi Y, Nakano Y, Inayama K, Sakai A, Kamiya T. (2003) Dietary intake of the flower extracts of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) inhibited compound 48/80-induced itch-scratch responses in mice. *Phytomedicine*; 10(8):657-64.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16, 123–132.
- Kogiannou Dimitra A.A. , Nick Kalogeropoulos, Panagiotis Kefalas, Moschos G. Polissiou, Andriana C. Kaliora, (2013) Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells, *Food and Chemical Toxicology* 61 152–159.
- Koleckar, V., Opletal, L., Brojerova, E., Rehakova, Z., Cervenka, F., Kubikova, K., Kuca, K., Jun, D., Polasek, M., Kunes, J., Jahodar, L., (2008). Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 23, 218–224.
- Koo H., J. Seils, J. Abranches, R.A. Burne, W.H. Bowen, R.G. Quivey, (2006) Influence of apigenin on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans* UA159, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2) pp. 542–546.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.H. (2002) Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1302-1309.
- Krimat Soumia, Dob Tahar, Lamari Lynda, Boumeridja Saida, Chelghoum Chabane, Metidji Hafidha, (2014) Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria, *Journal of Coastal Life Medicine*; 2(6): 478-483.
- Kroll, U., Cordes, C., (2006) Pharmaceutical prerequisites for a multi-target therapy. *Phytomedicine* 5, 12–19.
- Kumar RS, Raj Kapoor B, Perumal P. (2012) Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. using various *in vitro* assay models. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 2(4): 256-261.
- Kusar A., A. Zupancic, M. Sentjurc, D. Baricevic, (2006) Free radical scavenging activities of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) measured by electron spin resonance, Human *Experimental and Toxicologic Pathology*. 25 599–604.
- Lachenmeier D.W., (2008) Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, vol. 3, no. 1, article 26.

Βιβλιογραφία

- Lam, H. S., Proctor, A., Howard, L., & Cho, M. J. (2005). Rapid fruit extracts antioxidant capacity determination by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 70(9), C545–C549.
- Langenheim JH. (1994) Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*; 20: 1223-1280.
- Lara M.S., J.I. Gutierrez, M. Timón, A.I. Andrés, (2011) Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP, *Meat Science* 88 481–488.
- Laura Siracusa, Fabio Gresta, Giovanni Avola, Emidio Albertini, Lorenzo Raggi, Gianpiero Marconi, Grazia M. Lombardo, Giuseppe Ruberto, (2013) Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (*Crocus sativus* L.) of different origin by LC-UV-vis-DAD and AFLP analyses, *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:711–721.
- Lecomte, J., López Giraldo, L. J., Laguerre, M., Baria, B., & Villeneuve, P. (2010). Synthesis, characterization, and free radical scavenging properties of rosmarinic acid fatty esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 615–620.
- Lee J, Lee HK, Kim CY, et al. (2005) Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. *British journal of nutrition*; 93: 895-899.
- Lee S. (2007) Artemisinin, promising lead natural product for various drug developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*;7:411–422.
- Lee, K.G., Shibamoto, T., (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4947–4952.
- Leland J. Cseke, Ara Kirakosyan, Peter B. Kaufman, Sara L. Warber, James A. Duke, Harry L. Briemann, (2006) Natural Products from Plants, *CRC Press Taylor & Francis Group*.
- Lemberkovics E, Kéry A, Marczal G, Simándi B, Szöke E. (1998) Phytochemical evaluation of essential oils, medicinal plants and their preparations. *Acta pharmaceutica Hungarica*;68:141–149.
- Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Ciz, M. and Soliva-Fortuny, R., (2002), Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 603–610.
- Liang-Yu Chen, Chien-Wei Cheng, Ji-Yuan Liang. (2015) Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols, *Food Chemistry*, Volume 170, 1 March, Pages 10–15.
- Lindhe J, Thornily K, Nicklaus P (2008). Clinical periodontology and implant dentistry. 5th Ed. *Wiley Blackwell*, Munksgaard Copenhagen, pp. 106-116.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G., Eaglesham, E., (1998) . Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. J. 13, 98–104.
- Liu YT, Sun J, Luo Zu, et al. (2012) Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology* 50:1238-1244.
- Liu Z, Schwimer J, Liu D, Greenway FL, Anthony CT, Woltering EA. (2005) Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 3909-3915.
- Liu, A.-H., Lin, Y.-H., Yang, M., Guo H., Guan S.-H., Sun, J.-H., Guo, D.-A. (2007) Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 846, 32-41.
- Lobo, V., Phatak, A., Chandra, N., (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4, 118–126.

- Loesche W., (2007) "Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications," *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 21, no. 2, pp. 471–502.
- Loesche W.J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, *Microbiological Reviews*, 50, pp. 353–380.
- Long-Ze Lin and James M. Harnly, (2012) LC-PDA-ESI/MS Identification of the Phenolic Components of Three Compositae Spices: Chamomile, Tarragon, and Mexican Arnica, *Natural Product Communications*; 7(6): 749–752.
- Lü, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.14, 840–860.
- Malliga Raman Murali, Sangeetha Vasudevaraj Naveen, Chang Gue Son, Hanumantha Rao Balaji Raghavendran, (2014) Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some commonly known natural products: bench to bedside, *Integrative Medicine Research*.
- Mann C, Staba EJ. (2002) The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Craker LE, Simon JE, editors. Herbs, spices and medicinal plants- recent advances in botany, horticulture and pharmacology. USA: *Haworth Press Inc*; pp. 235–80.
- Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, Pavesi VC, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP (2009) Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An *in vitro* and *in vivo* study. *Phytotherapy Research*.; 23(2):274-8.
- Matheus ME, Fernandes SB, Silveira CS, Rodrigues VP, Menezes FD, Fernandes PD. (2006) Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. On nitric oxide production and iNOS expression. *Journal of Ethnopharmacology*; 107: 291-296.
- Matsumoto H, Nakamura Y, Iida H, Ito K, Ohguro H. (2006) Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Experimental Eye Research*; 83: 348-356.
- Mazza G. (2007) Anthocyanins and heart health. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*; 43: 369-374.
- McCullough M. J. and C. S. Farah, (2008) The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol containing mouthwashes *Australian Dental Journal*, vol. 53, no. 4, pp. 302–306.
- McNeill K., I.R. Hamilton, (2004), Effect of acid stress on the physiology of biofilm cells of *Streptococcus mutans*, *Microbiology*, 150 pp. 735–742
- Mehansho H, Butler LG, Carlson DM. (1987) Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annual Review of Nutrition*;7:423—40.
- Melnyk JP, Wang SN, Marcone MF. (2010) Chemical and biological properties of the world's most expensive spice saffron. *Food Research International* 43: 1981–1989.
- Mencherini, T., Picemo, P., Scesa, C., & Aquino, R. (2007). Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Nature Products*, 70, 1889-1894.
- Miller N, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*.;84:407.
- Miloš Nikolić, Jasmina Glamočlija, Isabel C.F.R. Ferreira, Ricardo C. Calhelha, Ângela Fernandes, Tatjana Marković, Dejan Marković, Abdulhamed Giweli, Marina Soković, (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils, *Industrial Crops and Products*, Volume 52, Pages 183–190.
- Miron T.L., M. Herrero, Elbanaz, (2013) Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 1288 1– 9.

- Mohamed Hussein Hamdy Roby, Mohamed Atef Sarhan, Khaled Abdel-Hamed Selim, Khalel Ibrahim Khalel, (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *Industrial Crops and Products* 44 437– 445.
- Molnar J, Szabo D, Pusztai R, Mucsi I, Berek L, Ocsovszki I, Kawata E, Shoyama Y. (2000) Membrane associated antitumor effects of crocin-, ginsenoside- and cannabinoid derivatives. *Anticancer Research*;20:861–7.
- Montoro, P., Tuberoso, C.I.G., Maldini, M., Cabras, P., Pizza, C., (2008). Qualitative profile and quantitative determination of flavonoids from *Crocus sativus* L. Petals by LC–MS/MS. *Natural product communications*. 3, 2013–2016.
- Moon, J., Shibamoto, T., (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1655–1666.
- Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A., Meftahizade H., (2010) *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(25), pp. 2753-2759, Special Review,.
- More G., T.E. Tshikalange, N. Lall, F. Botha, J.J.M. Meyer, (2008) Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 119, Issue 3, Pages 473–477.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006), Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223–231.
- Moreno-Arribas Victoria M., Carmen Polo, (2009) Wine Chemistry and Biochemistry, *Springer Science & Business Media*.
- Morgan, T.D., Beezer, A.E., Mitchell, J.C. and Bunch, A.W.(2001) A microcalorimetric comparison of the anti-Streptococcus mutans efficiency of plant extracts and antimicrobial agents in oral hygiene formulations. *Journal of Applied Microbiology* 90, 53–58.
- Morimoto M., H. Fukumoto, M. Hiratani, W. Chavasir and K. Komai, (2006), Insect antifeedants, pterocarpan and pterocarpol in heartwood of pterocarpus macrocarpus kruz, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70 (8) 1864-1868.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J. (2001) Natural antioxidants from residual sources *Food Chemistry*, 72, 145- 171.
- Mousavi SZ, Bathaei SZ. (2011). Historical uses of saffron: identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 1: 57–66.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 3-20.
- Mulinacci N, Romani A, Pinelli P, Vincieri FF, Prucher D. (2000), Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. *Chromatographia* Volume 51, Issue 5-6, pp 301-307.
- Müller SF, Klement S. (2006) A combination of valerian and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dysomnia in children. *Phytomedicine*;13:383–7.
- Nahar L, Zahan R, Morshed MTI, Haque A, Alam Z, Mosaddik (2012) A. Antioxidant, analgesic and CNS depressant effects of *Synedrella nodiflora*. *Pharmacognosy Journal*.;4:29-36.
- Nair SC, Varghese CD, Pannikar KR, Kurumboor SK, Parathod RK. (1994) Effects of saffron on vitamin A levels and its antitumor activity on the growth of solid tumors in mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical*;32:105–14.
- Nakamura Y, Matsumoto H, Todoki K. (2002) Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta. *Japanese Journal of Pharmacology*; 89: 29-35.
- Nakamura, H., Moriya, K., Oda, S., Yano, E., Kakuta, H., (2002). Changes in the parameters of autonomic nervous system and emotion spectrum calculated from encephalogram after drinking chamomile tea. *Journal of Aromatherapy*. 3, 251–255 (Japanese).

- Nam-Hui Yim, Young Pil Jung, Won-Kyung Cho, Taesoo Kim, Aeyung Kim, Minju Im, Jin Yeul Ma, (2013) Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria, *Integrative Medicine Research*, Volume 2, Issue 1, Pages 18–24.
- Narasinga Rao. (2003) Bioactive phytochemicals in Indian foods and their potential in health promotion and disease prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*: 12 (1): 9-22.
- Nassar MI, Aboutabl ESA, Eskander DM, Grace MH, EL Khriy EDA, Sleem AA. (2013) Flavonoid glycosides and pharmacological activity of *Amphilophium paniculatum*. *Pharmaceutical Research*, 5:17.
- Naumann, D. (2001). FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*, 36(2&3), 239–298.
- Nayak BS, Raju SS, Rao AV. (2007) Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. *Journal of Wound Care*. 16(7):298-302.
- Neumegen R. A., A. R. Fernandez-Alba, and Y. Chisti, (2005) Toxicities of triclosan, phenol, and copper sulfate in activated sludge *Environmental Toxicology*, vol. 20, no. 2, pp. 160–164.
- Neusa L. Figueiredo, Sara Raquel M.M. de Aguiar, Pedro Luis Fale, Lia Ascensao, Maria Luisa M. Serralheiro, Ana Rosa L. Lino, (2010) The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* , *Food Chemistry* 119 664–668.
- Newman MG, Takei HH, Klokkevold P, Carranza FA (2006). *Carranza's Clinical Periodontol.*, 10th Ed., 9: 134 -142.
- Nikitina V. S., L. Y. Kuzmina, A. I. Melentev, and G. V. Shendel, (2007) Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of Geraniaceae and Rosaceae families *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 629–634.
- Noorbala, A.A., Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Jamshidi, A.H., (2005). Hydroalcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *Journal Of Ethnopharmacology*. 97, 281–284.
- Nørbæk, R., Brandt, K., Nielsen, J.K., Ørgaard, M., Jacobsen, N., (2002). Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 763–791.
- Nostro A., M. A. Cannatelli, G. Crisafi, A. D. Musolino, F. Procopio, and V. Alonzo, (2004) Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract *Letters in Applied Microbiology*, vol. 38, no. 5, pp. 423–427.
- Novakova Lucie, Anna Vildova, Joana Patricia Mateus, Tiago Gonc, alves, Petr Solich, (2010) Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts, *Talanta* 82 1271–1280.
- Ocheng Francis, Freddie Bwanga, Moses Joloba, Ann-Karin Borg-Karlson, Anders Gustafsson, Celestino Obua, (2014) Antibacterial activities of extracts from Ugandan medicinal plants used for oral care, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 155, Issue 1, Pages 852–855.
- Ohkatsu Y, Kajiyama T, Arai Y. (2001) Antioxidant activities of tocopherols. *Polymer Degradation and Stability*;72:303-311.
- Okuda, T., Yoshida, T., & Hatano, T. (1989) New methods of analyzing tannins, *Journal of Nature Products*, 52, 1-31.
- Ompal Singh, Zakia Khanam Neelam Misra, Manoj Kumar Srivastava, (2011) Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview *Pharmacognosy Reviews* 5(9): 82–95.
- Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y., Hirasawa, M. (1991) Anticaries effect of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Research Journal* 25, 438–443.
- Ozen F., F.Y. Ekinçi, M. Korachi (2014) The inhibition of *Helicobacter pylori* infected cells by *Origanum minutiflorum*, *Industrial Crops and Products*, Volume 58, Pages 329–334.

Βιβλιογραφία

- Paiva, S.A.R., Russell, R.M., (1999). b-Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Journal of the American College of Nutrition*. 18, 426–433.
- Palombo Enzo A., (2011) Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases, *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume, Article ID 680354, 15 pages.
- Panizzi L., G. Flamini, P. L. Cioni, and I. Morelli, (1993) "Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 39, no.3, pp. 167–170.
- Park K. M., J. S. You, H. Y. Lee, N. I. Baek, and J. K. Hwang, (2003) Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 84, no. 2-3, pp. 181–185.
- Patora, J., & Klimek, B. (2002) Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Polish Pharmaceutical Society*, 59, 139–143.
- Patzelt-Wenczler, R., Ponce-Poschl, E., (2000) Proof of efficacy of Kamillosan® cream in atopic eczema *European Journal of Medical Research*. 5, 171–175.
- Peña D, Montes de Oca N, Rojas S. (2006) Anti-inflammatory and anti-diarrheic activity of *Isocarpha cubana* Blake. *Pharmacologyonline*.;3:744–749.
- Pereira, J.V., Pereira, M.S.V., Sampaio, F.C., Sampaio, M.C.C., Alves, P.M., Araújo, C.R.F., Higino, J.S., (2006) .Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. Sobre microrganismos do biofilme dental. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16, 88–93.
- Pérez-Bueno M, Johnson MP, Zia A, Ruban AV, Horton P (2008) The Lhcb protein and xanthophyll composition of the light harvesting antenna controls the ΔpH-dependency of nonphotochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 582 1477–1482.
- Pericles Markakis, Anthocyanins as Food Colors, *Academic Press Inc.*, 1982
- Perron, N.R. & Brumaghim, J.L. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, Vol.53, No.2, pp. 75–100, ISSN 1085-9195
- Petti Stefano, Crispian Scully, (2009) Polyphenols, oral health and disease: A review, *Journal of dentistry* 37 413–423.
- Pierpoint, W.S. (2000) Why do plants make medicines. *Biochemist*, 22, 37–40.
- Pino JA, Bayat F, Marbot R, Aguero J. (2002) Essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. From Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 14:407–8.
- Pirzad A, Alyari MR, Shaliba S, Zehtab-Salmasi, Moammadi A. (2006) Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *Journal of Agronomy and Crop Science*.;5:451–5.
- Pitsikas, N., Boultsadakis, A., Georgiadou, G., Tarantilis, P., Sakellaridis, N., (2008) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins in an animal model of anxiety. *Phytomedicine* 15, 1135–1139.
- Pitsikas, N., Zisopoulou, S., Tarantilis, P.A., Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Sakellaridis, N., (2007) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats memory. *Behavioural Brain Research*. 183, 141–146.
- Prabu G. R., A. Gnanamani, and S. Sadulla, (2006) "Guaijaverin—a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*," *Journal of Applied Microbiology*, vol.101, no. 2, pp. 487–495.
- Pretorius J.C. (2003) Flavonoids: A Review of Its Commercial Application Potential as Anti-Infective Agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti Infective Agents*, 2: 335-353.
- Prior R.L., X. Wu, K. Schaich, (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (10) pp. 4290–4302.

Βιβλιογραφία

- Procházková, D., Boušova, I., Wilhelmova, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523.
- Proestos C., I.S. Boziaris, G.-J.E. Nychas, M. Komaitis, (2006) Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity *Food Chemistry* 95 664–671.
- Proestos, C., Boziaris, I., Kapsokefalou, S. M., & Komaitis, M. (2008) Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 151-156.
- Rajeev K Singla, Varadaraj Bhat G, (2011) Crocin: An Overview, *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1(4): 281-286.
- Ratnam, D.V.; Ankola, D.D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.K. & Kumar, M.N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, Vol.113, No.3, pp. 189-207, ISSN 0168-3659.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U. and Saller, R. (2009) Essential oil of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties –an overview. *Forschende Komplementärmedizin* 16, 79–90.
- Reichling, J., Suschke, U., Schneele, J. and Geiss, H.K. (2006) Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components – structure–activity relationship *Natural Product Communications* 1, 1003–12.
- Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M. & Aggarwal, B.B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.49, No.11, pp. 1603-1616, ISSN 0891-5849
- Ribeiro L.G., Hashizume L.N., Maltz M., (2007) The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans Streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *Journal of Dentistry* 35, 359–370.
- Rice-Evens, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S. (1996). An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research* 10: 189–193.
- Roberts, M.F. and Wink, M, (1998). *Alkaloids: Biochemistry, Ecological Functions and Medical Applications*. Plenum, New York.
- Robinson T., *The Organic Constituents of Higher Plants*, Burgess, Minneapolis, 1963.
- Roby, M. H. H., Sarhana, M. A., Selima, K. A. & Khalela, K. I. (2013b) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) *Industrial Crops and Products*, 44, 437-445
- Rodney Croteau, Toni M. Kutchan, Norman G. Lewis, *Natural Products (Secondary Metabolites), Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds *American Society of Plant Physiologists*, 2000.
- Rodrigues F., M. Lehmann, V. S. do Amaral, M. L. Reguly, H. H. R. de Andrade, (2007) Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol, Periogard, and Plax, in the *Drosophila* wing-spot test *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 48, no. 8, pp. 644–649.
- Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W. (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society Transactions*.;33:785–791.
- Romaiana Picada Pereira, Aline Augusti Boligon, Andri Storti Appel, Roselei Fachinnetto, Carla Speroni Ceron, José Eduardo Tanus-Santos, Margareth Linde Athayde, Jôyô Batista Teixeira Rocha, (2014) Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis* *Industrial Crops and Products* 53 34– 45
- Rosan, B., Lamont, R.J., (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection* 2, 1599–1607.
- Rosas- Pinon Y., A.Mejiaa, G. Diaz-Ruiz *et al.*, (2012) Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections *Journal of Ethnopharmacology* vol. 141, pp. 860–865.

- Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. (2006) Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*; 187: 363-371.
- Ross, S.A., El-Keltawi, N.E. and Megalla, S.E. (1980) Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. *Fitoterapia* 51, 201-205.
- Rover M.R., R.C. Brown, (2013) Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, pp. 366-371.
- Rozenberg O, Howell A, Aviram M. (2006) Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape juice sugar fraction increases it. *Atherosclerosis*; 188: 68-76.
- Sakai H, Misawa M. (2005) Effect of sodium azulene sulfonate on capsaicin-induced pharyngitis in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*;96:54-55.
- Salah SM, Jäger AK. (2005) Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *Journal of Ethnopharmacology*;97:145-9.
- Salamon, I., Honcariv, R., (1994). Growing condition and breeding of chamomile (*Chamomilla recutita* L.) Rauschert regarding the essential oil qualitative-quantitative characterization in Slovakia. *Herba Polonica*, 68-74.
- Saleem Mona A. B.D.S, H.D.D., M.Sc. Athraa M. Al-Weheb, B.D.S., (2012) M.Sc. Effect of german chamomile (*Matricaria recutita*) extracts on Mutans Streptococci in comparison to chlorhexidine gluconate: A comparative in vitro and in vivo study *Journal of College of Dentistry of Uinversity of Baghdad*, Vol. 24(1).
- Salgueiro, J.B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M.B., Izquierdo, I., Medina, J.H., (1997). Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 58, 887-891.
- Samuelsson G., (2001) Drugs of Natural Origin: A textbook of Pharmacognosy. 4th ed., *Swedish Pharmaceutical Press*, Stockholm, Sweden,.
- Sánchez C. (2002) Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*;8:121-137.
- Sánchez, A.M., Carmona, M., Zalacain, A., Carot, J.M., Jabaloyes, J.M., Alonso, G.L. (2008) Rapid determination of crocetin esters and picrocrocin from saffron spice (*Crocus sativus* L.) using UV-visible spectrophotometry for quality control *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3167-3175.
- Sanchez, A.M., Jerz, G., Serrano-Díaz, J., Alonso, G.L., Winterhalter, P., (2011). Flavonol composition and isolation of kaempferol 3-sophoroside from saffron (*Crocus sativus* L.) floral bio-residues. In: Proceeding 40. *Deutscher Lebensmittelchem- ikertag, Gesellschaft Deutscher Chemiker*, Halle, Germany, p. 231.
- Sanchez, A.M., Jerz, G., Serrano-Díaz, J., Alonso, G.L., Winterhalter, P., (2012). High Speed Countercurrent Chromatography in the analysis of polyphenols from saffron (*Crocus sativus* L.) floral bio-residues. In: Proceedings of the Sixth World Congress on Polyphenols Applications: Clinical Evidences, Polyphenols and Waste Valorisation, *International Society of Antioxidants in Nutrition and Health*, Paris, France, p. 93.
- Sanchez-Moreno C, Satue-Gracia MT, Frankel EN. (2000) Antioxidant activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48: 5581-5587.
- Sanchez-Vioque, R., Rodríguez-Conde, M.F., Reina-Ureñ a, J.V., Escolano-Tercero, M.A., Herraiz-Peñalver, D., Santana-Me´ ridas, O., (2012). *In vitro* antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products* 39, 149-153.
- Sandraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. (2003) Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*;74:445-52.

- Santos-Neto LL, Toledo MAV, Medeiros-Souza P, Souza GA. (2006) The use of Herbal medicine in Alzheimer's disease — a systematic review *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*;23:441–5.
- Sasaki H., M. Matsumoto, T. Tanaka *et al.*, (2004) Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against *Streptococcus mutans* *Caries Research*, vol. 38, no. 1, pp. 2–8.
- Saxena Mamta, Jyoti Saxena, Rajeev Nema, Dharmendra Singh & Abhishek Gupta (2013). Phytochemistry of Medicinal Plants, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Volume 1 Issue 6.
- Scheie, A.A. (1989) Modes of action of currently known antiplaque agents other than chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 68, 1609–1616.
- Schemann M, Michel K, Zeller F, Hohenester B, Rühl A. (2006) Region-specific effects of STW 5 (Iberogast) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. *Phytomedicine*;13:90–9.
- Schnitzler P., A. Schuhmacher, A. Astani, Jurgen Reichling, (2008) *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses, *Phytomedicine* 15 734–740.
- Schwarz K., Frankel E.N., German J.B., (1996) Partition behaviour of antioxidative phenolic compounds in heterophasic systems, *Lipid / Fett*, Volume 98, Issue 3, pages 115–121.
- Sebastian E.W. Opitz, Samo Smrke, Bernard A. Goodman, Chahan Yeretizian, (2014) Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays, *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Pages 253–264.
- Sedlacek, M.J., Walker, C., (2007). Antibiotic resistance in an *in vitro* subgingival biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology*. 22, 333–339.
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Maggi, L., Martínez-Tome, M., García-Diz, L., Murcia, M.A., Alonso, G.L. (2012) Increasing the Applications of *Crocus sativus* Flowers as Natural Antioxidants *Journal of Food Science*, 77, 1162-1168.
- Shan Q, Cao G, Cai H, Cai B. (2013) Simultaneous determination of four bioactive compounds in *Glechoma longituba* extracts by high performance liquid chromatography. *Pharmacognosy Magazine*.;9:216.
- Shapiro, S., Meier, A. and Guggenheim, B. (1994) The antimicrobial activity of essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 9, 202–208.
- Si X.T., M.L. Zhang, Q.W. Shi, H. Kiyota, *Chem. Biodivers.* 3 (2006) 1163–1180.
- Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. (2007) Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*; 101: 1012-18.
- Silva M. L. D. A., H. S. Coimbra, A. C. Pereira *et al.*, (2007) Evaluation of *Piper cubeba* extract, (-)-cubebin and its semisynthetic derivatives against oral pathogens *Phytotherapy Research*, vol. 21, no. 5, pp. 420–422.
- Simmen U, Kelber O, Okpaneji SN, Jaeggi R, Buetler B, Weiser D. (2006) Binding of STW 5 (Iberogast) and its components to intestinal 5-HT, muscarinic M3 and opioid receptors. *Phytomedicine*;13:51–5.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1998) Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.
- Skotti Efstathia, Eirini Anastasaki, Georgia Kanellou, Moschos Polissiou, Petros A. Tarantilis, (2014) Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants, *Industrial Crops and Products*, Volume 53, Pages 46–54.
- Skoula M., J.B. Harborne, (2002) The taxonomy and chemistry of *Origanum*, in: S. Kintzios (Ed.), *Oregano—The genera Origanum and Lippia Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Harwood, Amsterdam, pp. 67–108.

Βιβλιογραφία

- Smullen, J., Finney, M., Storey, D.M., Foster, H.A. (2012) Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts *Journal of Applied Microbiology*, 113, 964-973.
- Soliman, K.M., Badeaa, R.I., (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 1669–1675.
- Soňa Škrovánková, Ladislava Mišurcová, Ludmila Machů, (2012) Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants, *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 67.
- Soobrattee, M. A. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions *Mutation Research*, 579, 200- 213.
- Speranza, G., Dada, G., Manitto, P., Monti, D., Gramatica, P., (1984). 13-*cis*-crocin: a new crocinoid of saffron. *Gazzetta Chimica Italiana*. 114, 189–192.
- Srivastava, J.K., Pandey, M., Gupta, S., (2009). Chamomile, a novel and selective Cox-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sciences*. 85, 663–669.
- Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H., (2003) *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*. 88, 175–179.
- Stanforth Stephen P. Natural Product Chemistry at a glance (2006) *Blackwell Publishing Ltd*, Oxford.
- Steinberg D., M. Feldman, I. Ofek, and E. I. Weiss, (2004) Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 54, no. 1, pp. 86–89.
- Strack D. (1997). Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Plant Biochemistry*. London, UK: *Academic Press*, p. 387–416.
- Sung-Hoon Lee, (2013) Antimicrobial Effects of Herbal Extracts on *Streptococcus mutans* and Normal Oral Streptococci, *Journal of Microbiology* Vol. 51, No. 4, pp. 484–489.
- Suvarnakuta, P., Chaweerungrat, C., & Devahastin, S. (2011) Effects of drying methods on assay and antioxidant activity of xanthenes in mangosteen rind, *Food Chemistry*, 125, 240–247.
- Švehlíková, V., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Needs, P.W., Piacente, S., Kroon, P.A., Bao, Y. (2004) Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) *Phytochemistry*, 65, 2323-2332.
- Swain, T. (1977) Secondary compounds as protective agents *Annual Review of Plant Physiology*, 28, 479–501.
- Syed Faisal Zaidi, Jibrán Sualeh Muhammad, Saeeda Shahryar, Khan Usmanghani, Anwarul-Hassan Gilani, Wasim Jafri, Toshiro Sugiyama, (2012) Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 141, Issue 1, Pages 403–410.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tapan K. Basu, Norman J. Temple, Manohar L. Garg, (1999) Antioxidants in Human Health And Disease, *Cabi Publishing*.
- Tapas AR, DM Sakarkar, RB Kakde, (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 7 (3): 1089-1099.
- Tarantilis P.A., V.E. Troianou, C.S. Pappas, Y.S. Kotseridis, M.G. Polissiou, (2008) Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, volume 111, Issue 1, Pages 192–196.
- Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., & Polissiou, M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography–UV–Vis photodiodearray detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699, 107–118.
- Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., Polissiou, M. (1995) Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography- UV

Βιβλιογραφία

- Visible photodiodearray detection-mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 699, 107–118.
- Tarantilis, P.A., Morjani, H., Polissiou, M., Manfait, M., (1994a). Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer research*. 14, 1913–1918.
- Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Manfait, M., (1994b). Separation of picrocrocin, cis trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*. 664, 55–61.
- Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., (1997). Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 459–462.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., Polissiou, M., (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography–UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 699, 107–118.
- Taweechaisupapong S., W. Pinsuwan,W. Suwannarong, R. Kukhetpitakwong, S. Luengpailin, (2014) Effects of *Streblus asper* leaf extract on the biofilm formation of subgingival pathogens, *South African Journal of Botany* 94 1–5.
- Termentzi, A., Kokkalou, E., (2008). LC–DAD–MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts. *Planta Medica*. 74, 573–581.
- Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N.P., Abramovic, H., (2011). Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*. 128, 62–68.
- Theodore MR, Harald OH, Edward JS (2006). *Sturdevanat’s Art and Science of Operative Dentistry* 5th Ed., pp. 75-93.
- Thomson R.H., *The Chemistry of Natural Products*, Springer Science & Business Media, 1993.
- Tichy J. and J. Novak, (1998) Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (*Streptococcus sp.*) *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 39–45.
- Triana LE, Carvajal SM. (2013) Protective effect of Galantamine against oxidative damage using human Lymphocytes: a novel in vitro model. *Archives of Medical Research*.;44:85-92.
- Tsai, P.-J., Tsai, T.-H. and Ho, S.-C. (2007) *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry* 105, 311–316.
- Tschiersch, K., Holzl, J. (1992) Evidence and analytical procedure for acylated Apigenin-7-glucosides *PZ Wissenschaft*, 137, 208-214.
- Tsimogiannis Dimitrios, Maria Stavrakaki & Vassiliki Oreopoulou, (2006) Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*), *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (Supplement 1), 39–48.
- Tsui V. W. K., R. W. K. Wong, and A.-B. M. Rabie, (2008) The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens *in vitro* *Phytotherapy Research*, vol. 22, no. 3, pp. 401–406.
- Ulbricht, C., Conquer, J., Costa, D., Hollands, W., Iannuzzi, C., Isaac, R., Jordan, J.K., Ledesma, N., Ostroff, C., Grimes Serrano, J.M., Shaffer, M.D., Varghese, M., 2011. An evidence-based systematic review of saffron (*Crocus sativus*) by the natural standard research collaboration. *Journal of Dietary Supplements* 8, 58–114.
- Van der Weijden, G.A., Timmer, C., Timmerman, M.F., Reijerse, E., Mantel, M.S. and van der Velden, U. (1998), The effect of herbal extracts in an experimental mouthrinse on established plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 399–403.
- Van Wyk, B.-E. & Wink, M. (2004) *Medicinal Plants of the World*. Briza, Pretoria, South Africa.
- Vega-Avila Elisa and Michael K. Pugsley, (2011) An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells, *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 54: 10-14.

- Verica Aleksic, Petar Knezevic, (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L., *Microbiological Research*, Volume 169, Issue 4, Pages 240–254.
- Vieira Denise R.P, Flavia M.M. Amaral , Márcia C.G.Maciel, Flávia R.F. Nascimento, Silvana A. Libério, Vandilson P.Rodrigues (2014). Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation, *Journal of Ethnopharmacology* .
- Vignolini, P., Heimler, D., Pinelli, P., Ieri, F., Sciuillo, A., Romani, A., 2008 Characterization of by-products of saffron (*Crocus sativus* L.) production *Natural Product Communications* 3, 1959–1962.
- Vijender, K., Bhat, Z.A., Dinesh, K., Shah, M.Y., Chashoo, I.A., Khan, N.A., (2011). Physicochemical and preliminary phytochemical studies on petals of *Crocus sativus* ‘Cashmerianus’. *Pharmacognosy Journal* 3, 46–49.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J.H., Paladini, A.C., (1995) Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects *Planta Medica* 61, 213–216.
- Vitullo, G. Ripabelli M., I. Fanelli, M. Tamburro, S. Delfine, M.L. Sammarco (2011) Microbiological and toxicological quality of dried herbs *Letters in Applied Microbiology*.
- Wagner S. Alviano, Daniela S. Alviano, Cláudio G. Diniz, Angelo R. Antonioli, Celuta S. Alviano, Luiz M. Farias, Maria Auxiliadora R. Carvalh, Margareth M.G. Souza, Ana Maria Bolognese, (2008) *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine, *Archives of Oral Biology*, Volume 53, Issue 6, Pages 545–552.
- Wagner, H. & Wiesenauer, M. (1995) *Phytotherapie*. Fischer, Stuttgart.
- Wang, Y., Han, T., Zhu, Y., Zheng, C.J., Ming, Q.L., Rahman, K., Qin, L.P., (2010) Antidepressant properties of bioactive fractions from the extract of *Crocus sativus* L. *Journal of Natural Medicines* 64, 24–30.
- Weiss E., M. Rosenberg, H. Judes, and E. Rosenberg, (1982) Cellsurface hydrophobicity of adherent oral bacteria *Current Microbiology*, vol. 7, no. 2, pp. 125–128.
- Wellwood, C. R. L., & Cole, R. A. (2004) Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6101–6107.
- Wink Michael, (2009). Ecological function of secondary metabolites. *Annual Plant Reviews* 39, 1–20.
- Wink Michael, (2010). Biochemistry, Physiology and Ecological functions of Secondary Metabolites, *Annual Plant Reviews* 40, 1–19.
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores *Theoretical and Applied Genetics* 75, 225–33.
- Wink, M. (1992) The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions in Insect-Plant Interactions, Vol. IV (ed. E.A. Bernays), *CRC Press*, Boca Raton, pp. 133–69.
- Wink, M. (1993a). Allelochemical properties and the raison detre of alkaloids, in *The Alkaloids*, Vol. 43 (ed. G. Cordell), *Academic Press*, Orlando, pp. 1–118.
- Wink, M. (2008b). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural product communications.*, 3, 1205–16.
- Withers ST, Keasling JD. (2007) Biosynthesis and engineering of isoprenoids small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*.73:980–990.
- Wong L, Knapsy K. (2008). Food for the seasons: eat well and stay healthy the traditional Chinese way. *Red Dog Books: Fitzroy*; 180.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173–1183.

Βιβλιογραφία

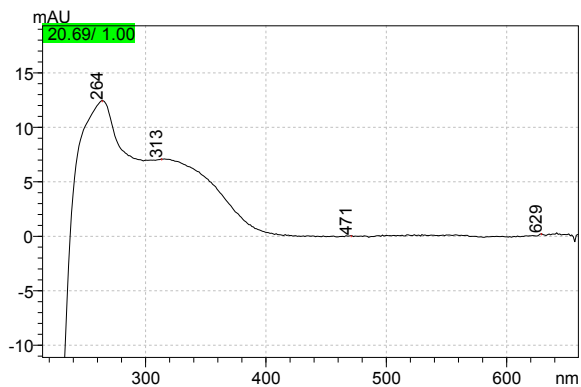
- Xiao J, Liu Y, Zuo YL, Li JY, Ye L, Zhou XD. (2006) Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on the growth and acidogenicity of oral microorganisms *Archives of Oral Biology*, 51:804–13
- Xiaoxu Guan, Yi Zhou, Xue Liang, Jin Xiao, Libang He, Jiyao Li, Effects of compounds found in *Nidus Vespae* on the growth and cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*, *Microbiological Research* 167 (2012) 61– 68.
- Xu, G.L., Qian, Z.Y., Yu, S.Q., Gong, Z.N., Shen, X.C., (2006). Evidence of crocin against endothelial injury induced by hydrogen peroxide in vitro. *Journal of Asian Natural Products Research*. Res. 8, 79–85.
- Yoo, S., Murata, R. M., & Duarte, S. (2011). Antimicrobial traits of tea- and cranberry derived polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 45(4), 327-335.
- Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M., (2000) Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin *Fitoterapia* 71 (Suppl 1), S117–S123.
- Zgorzka, G., Glowniak, K. (2006). Variation of free phenolics acid in medicinal plants belongin to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79–87.
- Zheleva-Dimitrova DZ. (2013) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of *Amorpha fruticosa* L. and *Phytolacca americana* L. *Pharm Mag.*;9:109.
- Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. (2007) Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Research*;1138:86–94.
- Ziaková A, Bradsteterová E, Blahová E. (2003) Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A*;983:271–5.
- Ziakova, A., Brandsteterova, E. (2003), Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 26, 443–453.

Ελληνική Βιβλιογραφία

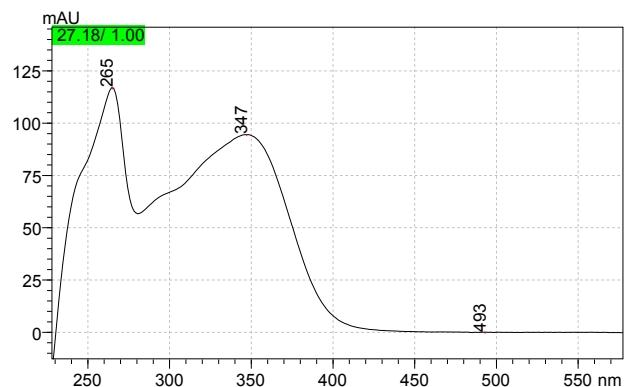
- Αναστασάκη Ειρήνη, «Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της Μεσογειακής χλωρίδας. Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας», Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Χημείας, 2014.
- Δόρδας Χρήστος, Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά, Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη 2012.
- Κανέλλου Γεωργία, Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
- Κουτσός Θεόδωρος, Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά, Ζήτη, Θεσσαλονίκη 2006.
- Παζιώτου Γεωργία, Μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ριζών του φυτού *Echinacea purpurea* καλλιεργούμενου στην Ελλάδα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
- Ραγκούση- Ιγνατιάδου, Β. Χημεία Φυσικών Προϊόντων (1998). Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Παράρτημα

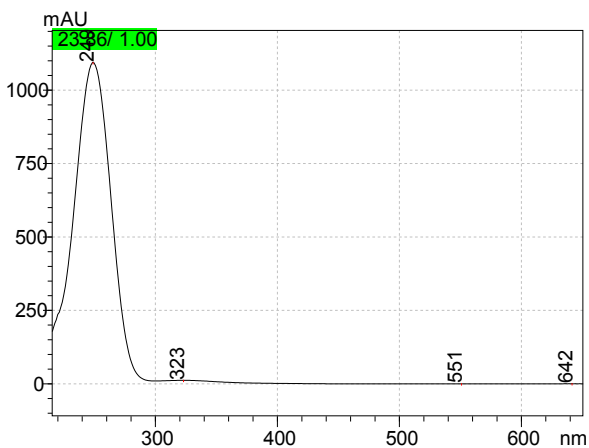
Φάσματα UV-Vis ενώσεων εκχυλισμάτων των φυτών



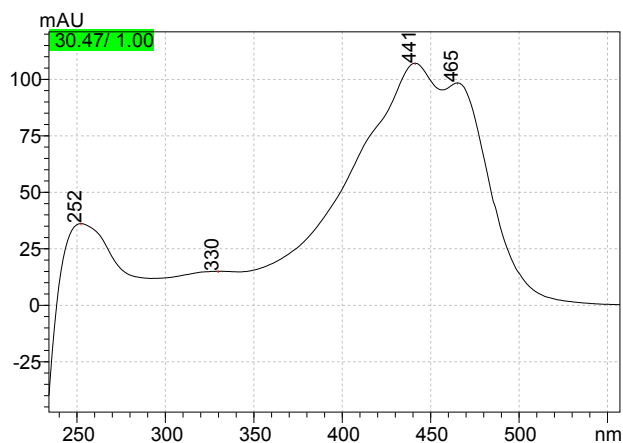
τριγλυκοζίτης καεμφερόλης



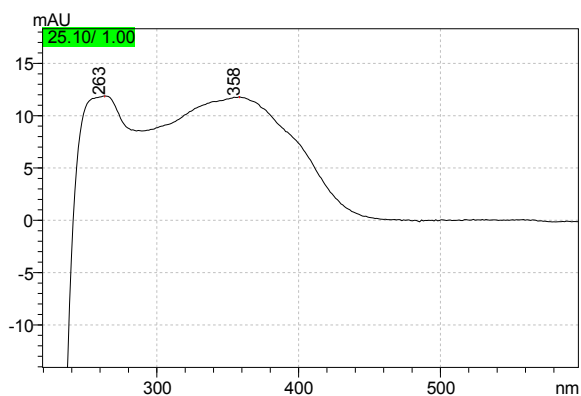
διγλυκοζίτης της καεμφερόλης



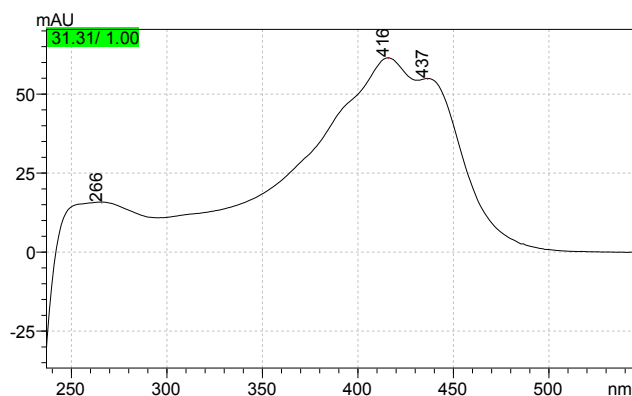
πικροκροκίνη



trans-5-tG

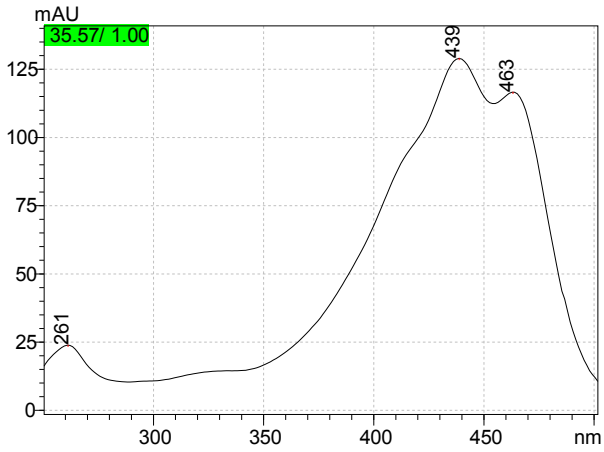


διγλυκοζίτης της καεμφερόλης

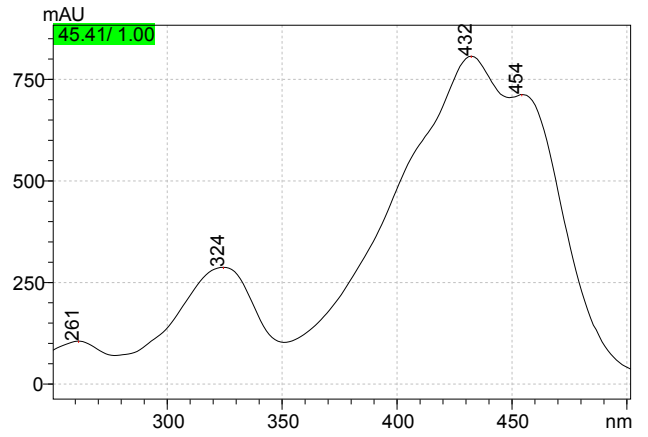


trans-5-nG

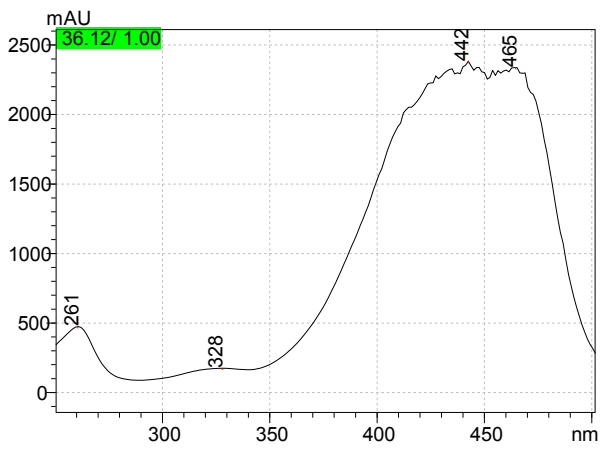
Παράρτημα



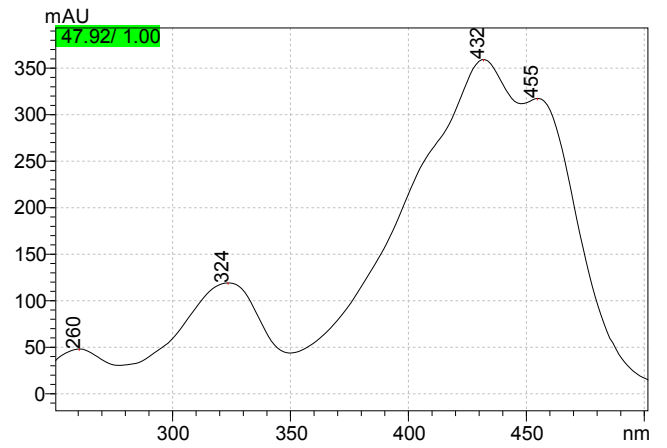
trans-4-ng



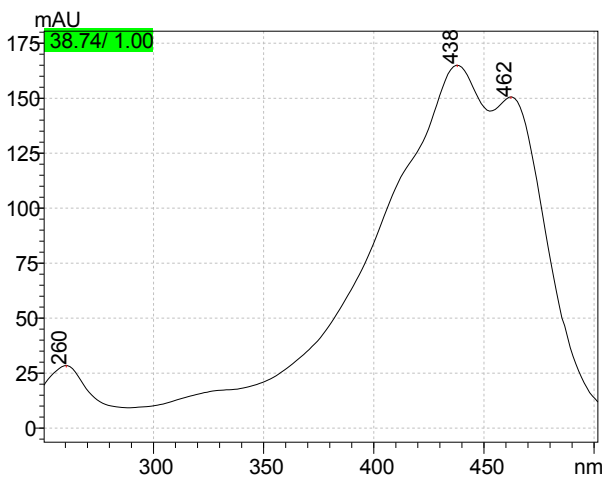
cis-4-GG



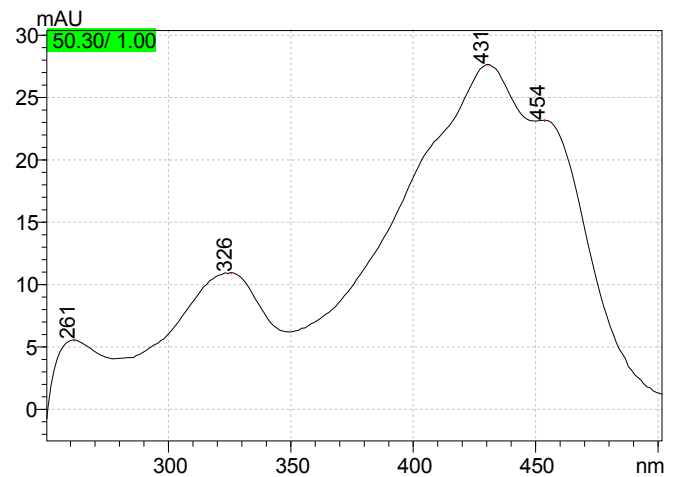
trans-3-Gg



cis-3-Gg

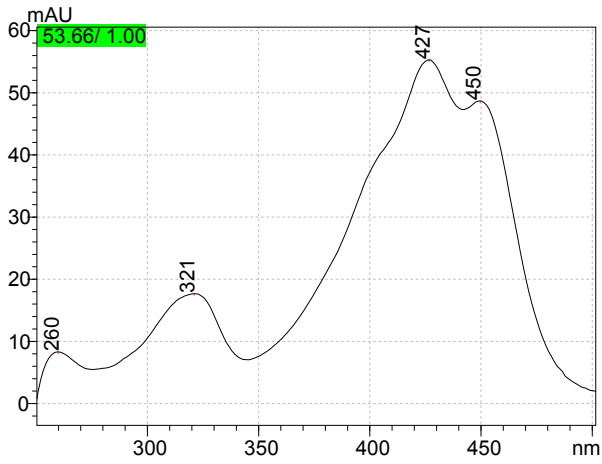


trans-2-gg

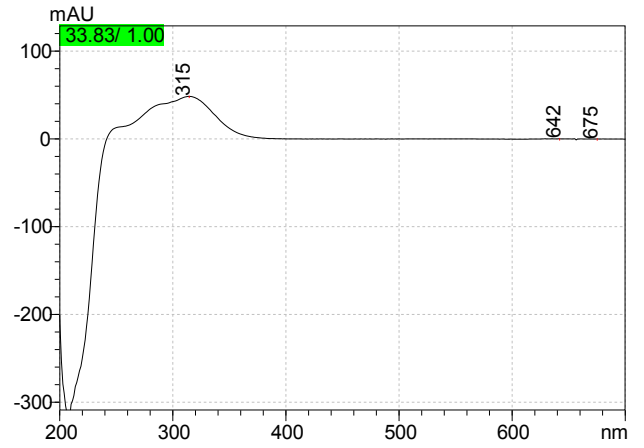


trans-1-g

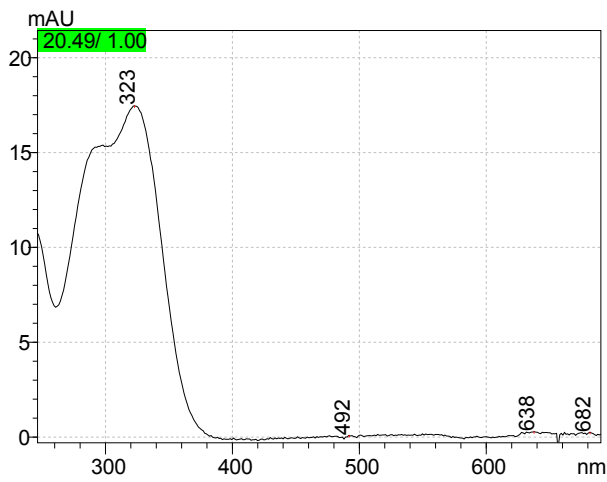
Παράρτημα



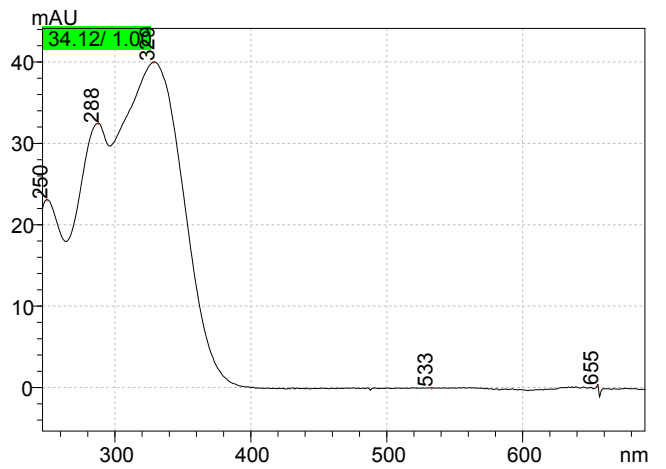
cis-2-G



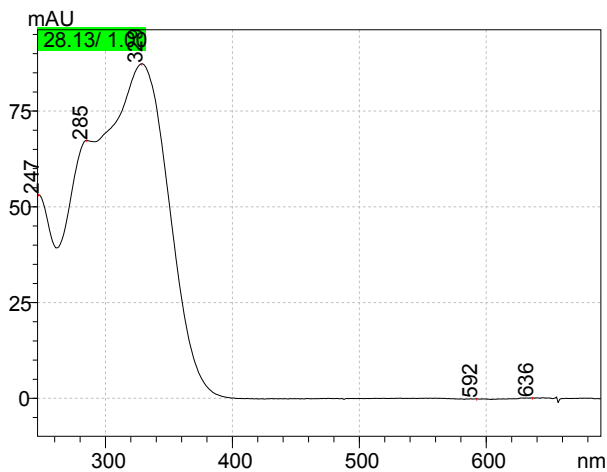
ισομερές λιθοσπερμικού οξέος



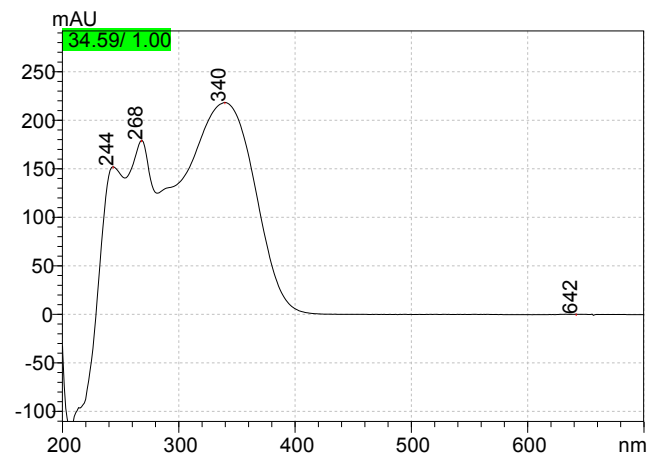
καφεϊκό οξύ



ισομερές του σαλβιανολικού οξέος I

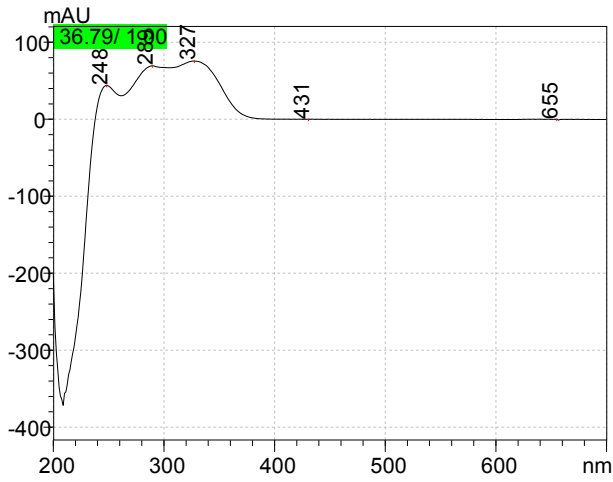


ισομερές σαλβιανολικού οξέος II

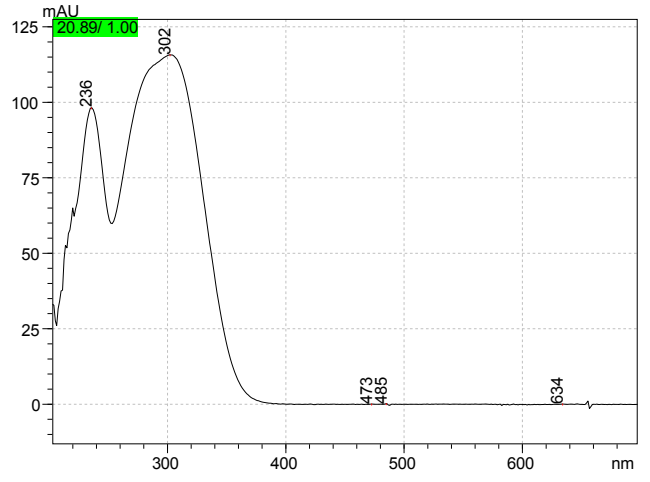


γλυκουρονίδιο λουτεολίνης

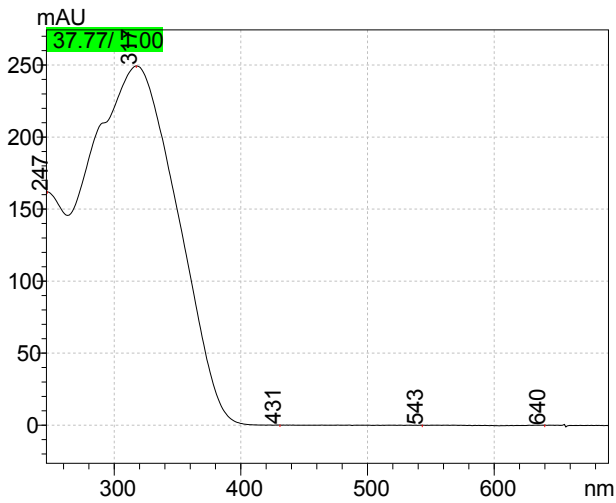
Παράρτημα



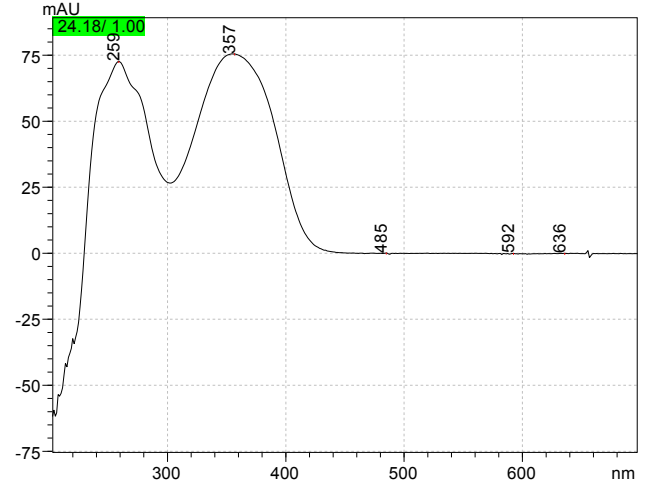
ισομερές του σαλβιανολικού οξέος Β



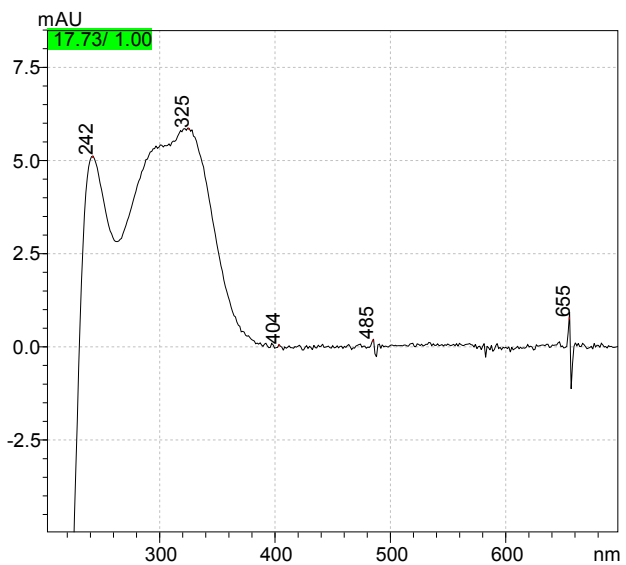
φερουλικός γλυκοζυλεστέρας



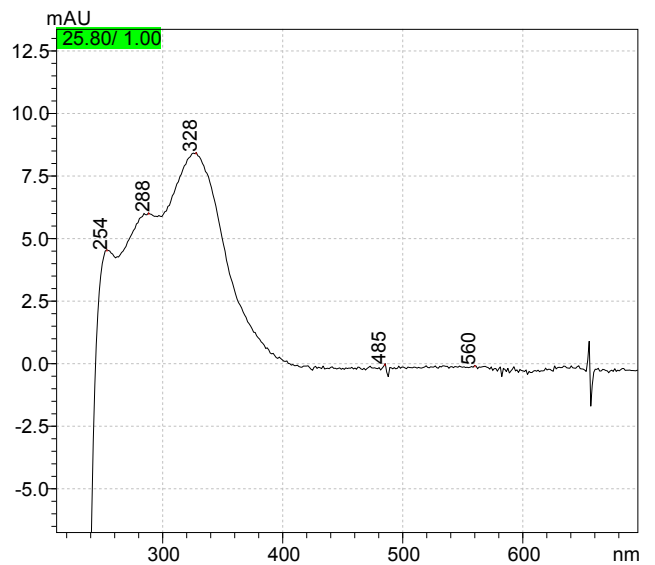
παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος



γλυκοζίτης μεθυλοφλαβονόλης

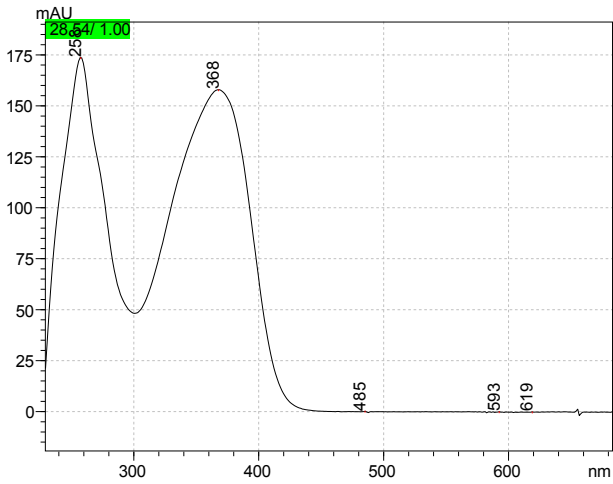


ισομερές χλωρογενικού

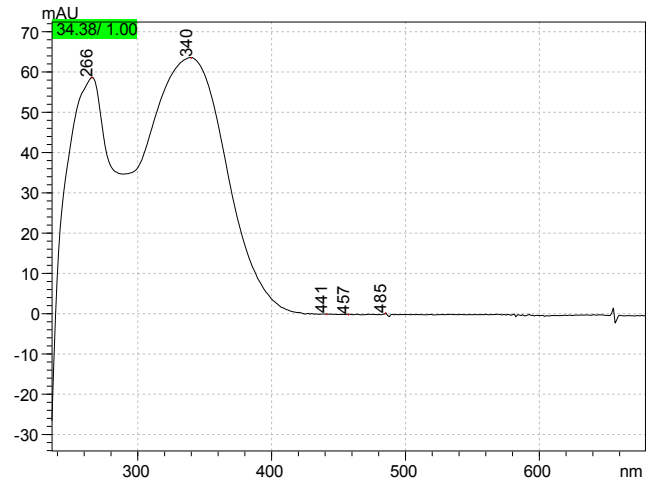


συμπελλιφερόνη

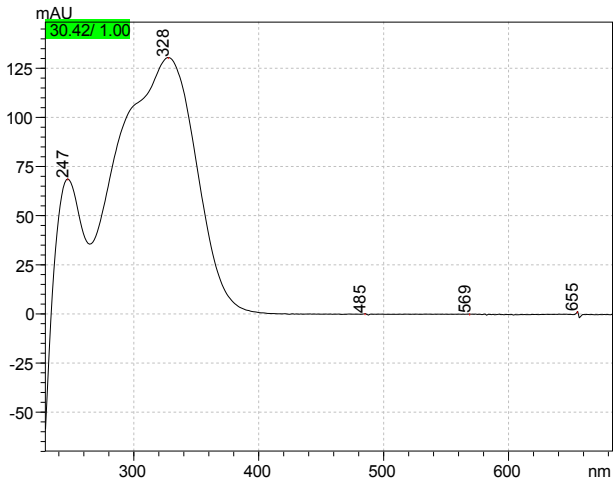
Παράρτημα



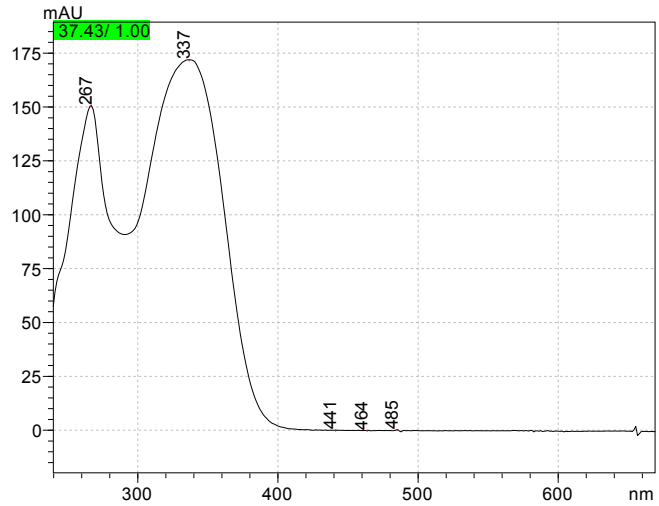
γλυκοζίτης φλαβονόλης



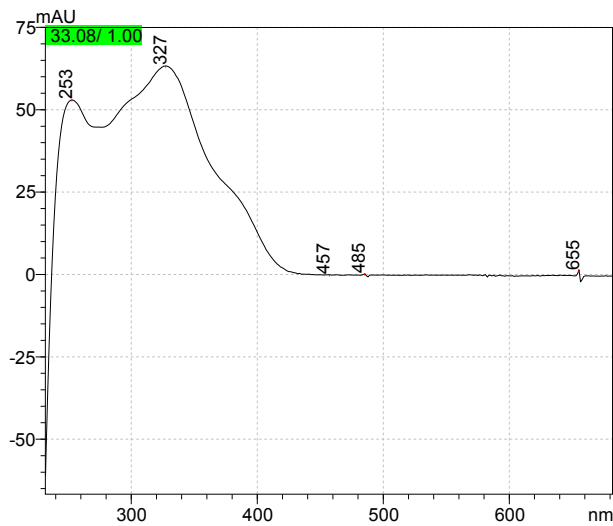
ακετυλογλυκοζίτης της απιγενίνης



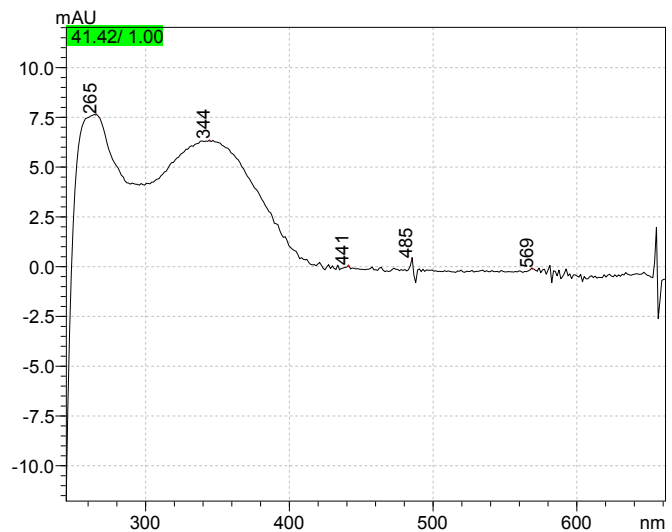
διεστέρας καφεϊκού-κινικού οξέος



διακετυλωμένο παράγωγο της απιγενίνης

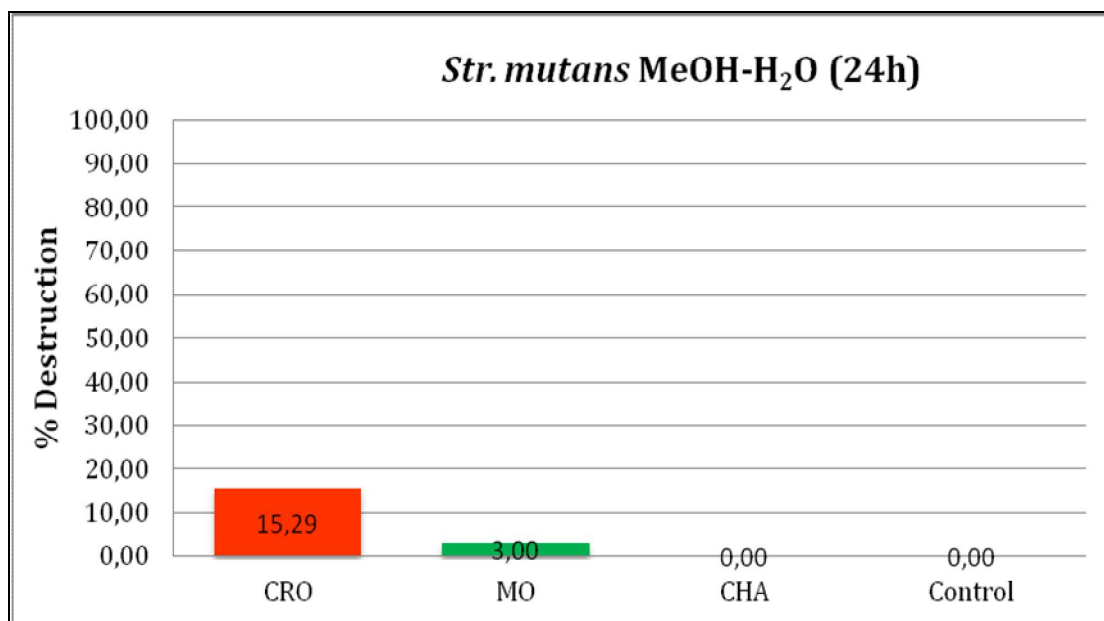


γλυκοζίτης φλαβόνης

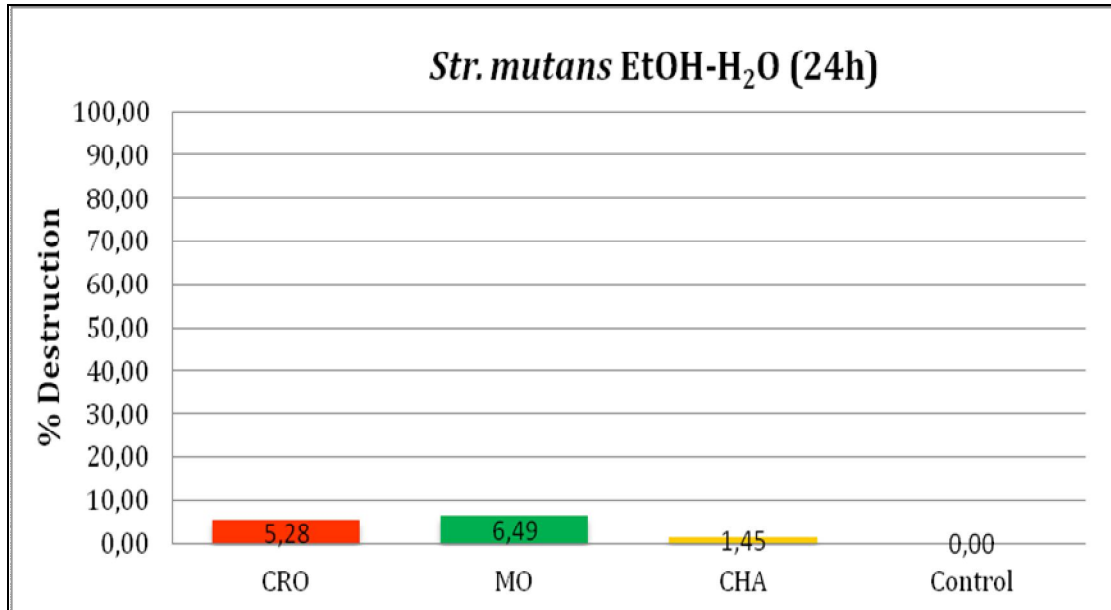


απιγενίνη

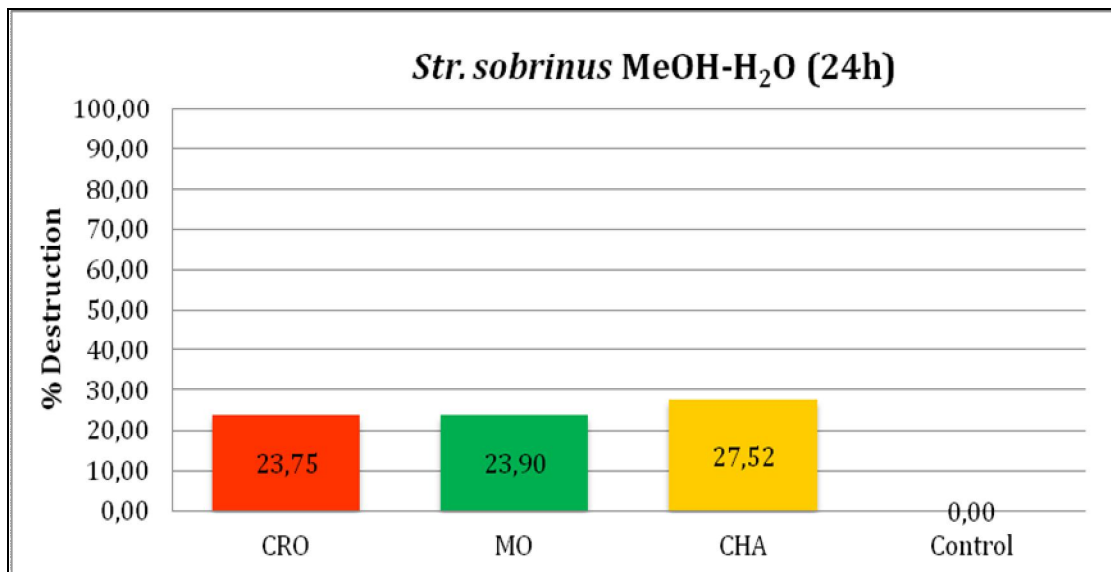
Αποτελέσματα %Αποικοδόμησης -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου των μικροοργανισμών από τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών στις 24 ώρες



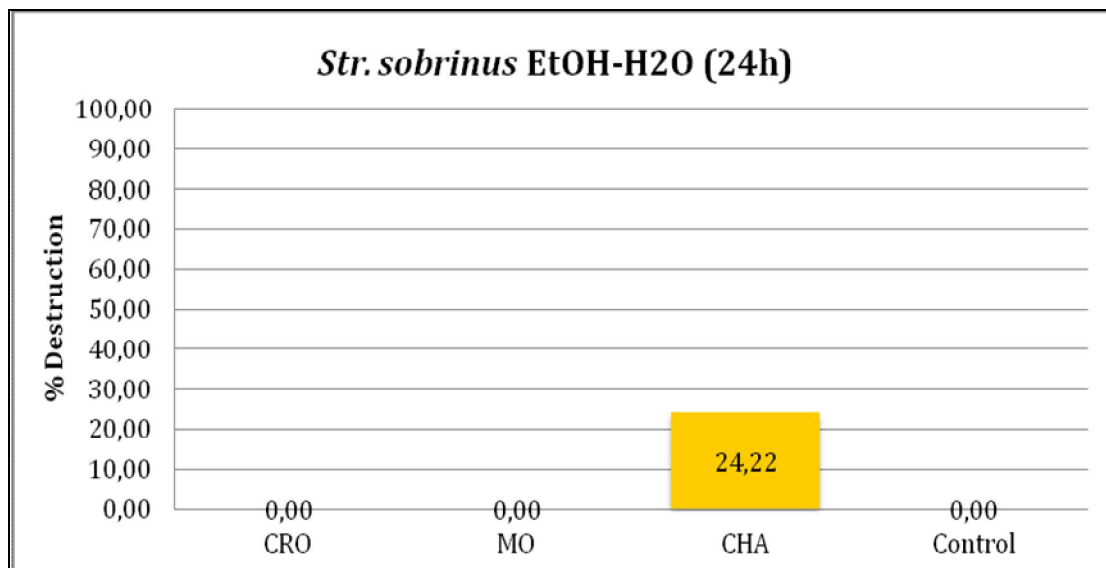
%Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών στις 24 ώρες, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού



%Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus mutans* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών στις 24 ώρες, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού



%Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών στις 24 ώρες, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού



%Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του *Streptococcus sobrinus* από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών στις 24 ώρες, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού

Περιεχόμενα Εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1.1 Σχηματισμός οδοντικής πλάκας. 1: Αρχική προσκόλληση των βακτηρίων 2: συσσωμάτωση μέσω της σύνθεσης πολυσακχαρίτη 3: μεταβολισμός των υδατανθράκων που οδηγεί σε παραγωγή οξέων (Palombo, 2011)..... | 28 |
| Εικόνα 1.2 Κρόκος (<i>Crocus sativus</i> L.)..... | 34 |
| Εικόνα 1.3 Μελισσόχορτο (<i>Melissa officinalis</i> L.)..... | 36 |
| Εικόνα 1.4 Χαμομήλι (<i>Matricaria recutita</i> L.)..... | 38 |
| Εικόνα 2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους..... | 42 |
| Εικόνα 2.2 Συμπύκνωση διαλύτη σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού..... | 43 |
| Εικόνα 2.3 Μεθανολικά εκχυλίσματα των τριών φυτών..... | 44 |
| Εικόνα 2.4 Ο αποχρωματισμός του DPPH• | 48 |
| Εικόνα 2.5 Ο αποχρωματισμός του ABTS*+..... | 49 |
| Εικόνα 2.6 Το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό πριν και μετά τη διάχυση των εκχυλισμάτων- Στη δεύτερη εικόνα διακρίνονται οι ζώνες αναστολής ανάπτυξης των μικροοργανισμών..... | 52 |
| Εικόνα 2.7 Μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm με το φωτόμετρο..... | 53 |
| Εικόνα 2.8 Αριστερά φαίνεται με ιώδες χρώμα η χρώση με Crystal Violet και δεξιά η επώαση του βιοϋμενίου με τα εκχυλίσματα..... | 54 |

Περιεχόμενα Γραφημάτων

| | |
|--|-----|
| Γράφημα 3.1 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο – Total Phenolic Content | 82 |
| Γράφημα 3.2 Αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH• | 85 |
| Γράφημα 3.3 Αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS•+ | 85 |
| Γράφημα 3.4 Συσχέτιση Ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση τους που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH•..... | 88 |
| Γράφημα 3.5 Συσχέτιση Ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση τους που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS•+..... | 89 |
| Γράφημα 3.6 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του <i>Streptococcus mutans</i> . CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 91 |
| Γράφημα 3.7 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του <i>Streptococcus mutans</i> . CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 92 |
| Γράφημα 3.8 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του <i>Streptococcus sobrinus</i> . CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 93 |
| Γράφημα 3.9 Ζώνες παρεμπόδισης ανά mg/mL των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών έναντι του <i>Streptococcus sobrinus</i> . CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 94 |
| Γράφημα 3.10 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus mutans</i> από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 98 |
| Γράφημα 3.11 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus mutans</i> από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 99 |
| Γράφημα 3.12 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus sobrinus</i> από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 100 |
| Γράφημα 3.13 %Παρεμπόδιση- % Inhibition σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus sobrinus</i> από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 101 |
| Γράφημα 3.14 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus mutans</i> από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 102 |
| Γράφημα 3.15 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus mutans</i> από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 103 |
| Γράφημα 3.16 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus sobrinus</i> από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 104 |
| Γράφημα 3.17 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου του <i>Streptococcus sobrinus</i> από τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού..... | 104 |

Γράφημα 3.18 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού.....105

Γράφημα 3.19 %Αποικοδόμηση -% Destruction σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών, CRO: εκχύλισμα κρόκου, MO: εκχύλισμα μελισσόχορτου, CHA: εκχύλισμα χαμομηλιού.....106

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1.1: Κυριότερες τάξεις φαινολικών ενώσεων (Crozier *et al.*, 2009,Saxena *et al.*,2013).....7

Πίνακας 2.1 Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των οργανικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών 45

Πίνακας 2.2 Πρότυπες ενώσεις που αναλύθηκαν, καθώς και οι αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσης (RT) και τα λmax UV-Vis φασμάτων..... 46

Πίνακας 3.1 Ποιοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του κρόκου βάσει των δεδομένων LC-DAD..... 57

Πίνακας 3.2 Ποιοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του μελισσόχορτου βάση των δεδομένων LC-DAD 64

Πίνακας 3.3 Ποιοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του χαμομηλιού βάση των δεδομένων LC-DAD..... 69

Πίνακας 3.4 Ποσοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του κρόκου βάσει των δεδομένων LC-DAD..... 75

Πίνακας 3.5 Ποσοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του μελισσόχορτου βάσει των δεδομένων LC-DAD 77

Πίνακας 3.6 Ποσοτικά αποτελέσματα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού (MeOH) εκχυλίσματος του χαμομηλιού βάσει των δεδομένων LC-DAD 78

Πίνακας 3.7 Αποδόσεις εκχυλισμάτων εκφρασμένες σε 5 g και 1 kg φυτικού υλικού..... 80

Πίνακας 3.8 Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά των μεθανολικών εκχυλισμάτων των τριών φυτών..... 81

Πίνακας 3.9 Αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των τριών φυτών..... 84

Πίνακας 3.10 Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων υδρομεθανόλης (MeOH-H₂O) και υδροαιθανόλης (EtOH-H₂O) με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (WDA) έναντι των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus*..... 90

Πίνακας 3.11 % Παρεμπόδιση-% Inhibition του σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών 98

Πίνακας 3.12 % Αποικοδόμηση-% Destruction του σχηματισμού του βιοϋμενίου των *Streptococcus mutans* και *Streptococcus sobrinus* από τα υδρομεθανολικά και υδροαιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών.....102

Πίνακας Συντμήσεων

| Σύντμηση | Αγγλική ονομασία | Ελληνική ονομασία |
|------------------|---|--|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) | 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl | 2,2-διφαινυλ-πικρυλ-υδραζύλιο |
| ET | Electron transfer | Μεταφορά ηλεκτρονίου |
| FC | Folin-Ciocalteu | - |
| HAT- | Hydrogen Atom Transfer | Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου |
| IC ₅₀ | Inhibition Concentration | - |
| LC-DAD | Liquid Chromatography with Diode Array Detection | Υγρή Χρωματογραφία με ανιχνευτή UV-Vis μεταβαλλόμενου μήκους κύματος |
| PDA | Photodiode Array (PDA) Detector | Ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων |
| PE | Propanone | Προπανόνη |
| RNS | Reactive Nitrogen Species | Ελεύθερες ρίζες αζώτου |
| ROS | Reactive Oxygen Species | Οξυγονούχες δραστικές ουσίες |
| RSS | Reactive Sulfur Species | Ελεύθερες ρίζες θείου |
| TEAC | Trolox Equivalent Antioxidant Capacity | - |
| UV-Vis | Ultraviolet-Visible | Υπεριώδες-ορατό |
| WDA | Well-diffusion assay | Διάχυση υπερκειμένου σε άγαρ |