



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Τομέας Σύνθεσης και
Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Επίδραση μεθόδων εκχύλισης στο χημικό προφίλ και τη βιοδραστικότητα του φυτού *Sideritis clandestina*

Διπλωματική εργασία:

ΕΛΕΝΗ ΦΟΥΦΑ

Επιβλέπων καθηγητής:

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

Περίληψη

Η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων για ιατροφαρμακευτικούς σκοπούς εφαρμόζεται από την αρχαιότητα. Σήμερα, τα φυτικά εκχυλίσματα αποτελούν συχνά θεμελιώδες συστατικό μιας νέας κατηγορίας προϊόντων προσωπικής φροντίδας, των *cosmeceuticals*. Τα πλεονεκτήματά τους σε σχέση με τις συνθετικές ενώσεις, καθώς και η περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά, όπως οι φαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή και οι τανίνες, που δρουν κατά των ελευθέρων ριζών και, σύμφωνα με μελέτες, μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη διάφορων ασθενειών, μεταξύ των οποίων και η πρόωγη γήρανση, τα καθιστούν ακόμα πιο ελκυστικά για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν ως προς τη βιοδραστικότητα και το προφίλ τους εκχυλίσματα του φυτού *Sideritis clandestina* σε τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες (2,5%, 5% & 7,5% w/v), με χρήση δύο διαφορετικών διαλυτών (γλυκερόλη/νερό σε αναλογία 1:1 & αιθανόλη) και υπό τρεις διαφορετικές μεθόδους: συμβατική εκχύλιση, εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Επιπλέον, κατά τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες εκχύλισης και μελετήθηκαν και αυτά ως προς τη βιοδραστικότητά τους.

Αρχικά, η βιοδραστικότητα των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, των ολικών φλαβονοειδών με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου, των ολικών συμπυκνωμένων τανινών με τη μέθοδο οξιμισμένης βανιλίνης, όπως επίσης και με την ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με τη χρήση της μεθόδου του αντιδραστήριου DPPH (ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλ υδραζίλιο). Από το σύνολο των παραπάνω αναλύσεων, σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα γλυκερόλης αναδείχτηκαν ως ισχυρότερα το εκχύλισμα της συμβατικής μεθόδου 72 ωρών και αυτό της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους, ενώ παράλληλα βρέθηκε ανάλογη σχέση της αύξησης της θερμοκρασίας εκχύλισης με την αύξηση της βιοδραστικότητας του τελικού εκχυλίσματος. Όσον αφορά στη σύγκριση των δύο διαλυτών, έντονη διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στο δείγμα συμβατικής εκχύλισης 24 ωρών, το οποίο παρουσίασε βελτίωση όταν εκχυλίστηκε σε αιθανόλη, αλλά και στο δείγμα που προέκυψε από τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα στους 60°C, το οποίο εμφάνισε μειωμένη δραστικότητα κατά την εκχύλιση του σε αιθανόλη.

Τέλος, τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν σε διαλύτη αιθανόλη αναλύθηκαν, έπειτα από παραγωγοποίηση με διαλύτη BSTFA, σε αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο μάζας (GC-MS) και μελετήθηκε συγκριτικά το προφίλ τους. Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους εκχύλισης υποβοηθούμενες από μικροκύματα και υπερήχους προέκυψαν εμφανώς πιο πλούσια συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Επίσης, σε όλα τα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές που αντιστοιχούν σε σιλιλυωμένα παράγωγα του κινικού οξέος και της απιγενίνης.

Λέξεις κλειδιά: *Sideritis clandestina*, συμβατική εκχύλιση, εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, αντιοξειδωτικά, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Abstract

The use of herbal extracts for medical purposes has been applied since antiquity. Today, plant extracts are often a fundamental component of a new category of personal care products, cosmeceuticals. Their advantages over synthetic compounds, as well as their antioxidant content, such as phenolic compounds, flavonoids and tannins, which act against free radicals and, according to studies, can help prevent various diseases, including premature aging, make them even more attractive for use in cosmetic products.

In the present study, extracts of *Sideritis clandestina* were prepared and studied for their bioactivity and profile in three different contents (2.5%, 5% & 7.5% w / v) using two different solvents (glycerol / water in 1: 1 ratio & ethanol) and three different methods: conventional extraction, microwave assisted extraction and ultrasonic assisted extraction. In addition, during microwave assisted extraction method, extracts were prepared at different extraction temperatures and were also studied for their bioactivity.

Firstly, the bioactivity of the extracts was estimated by determining the total phenolic components using the Folin-Ciocalteu method, total flavonoids using the aluminum chloride colorimetric method, total condensed tannins using the acidified vanillin method, as well as by analyzing the antioxidant capacity, using the DPPH reagent method (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical). Of all the above, regarding the glycerol extracts, those of the conventional 72-hour method and of the ultrasound-assisted extraction proved to be stronger, while the increase in the extraction temperature was found to be related to the increase in the bioactivity of the final extract. Regarding the comparison of the two solvents, a strong differentiation was observed in the conventional 24-hour extraction sample, which was improved when extracted in ethanol but also in the sample resulting from the microwave-assisted extraction method at 60°C, which showed reduced activity when extracted in ethanol.

Finally, ethanol-extracted samples were analyzed, after derivatization with BSTFA solvent, using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and their profile was studied comparatively. Samples prepared by microwave and ultrasonic assisted extraction appeared to be significantly richer than the rest. Also, in all the analyzed extracts, peaks corresponding to silylated derivatives of quinic acid and apigenin were identified.

Keywords: *Sideritis clandestina*, conventional extraction, ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction, antioxidants, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Περιεχόμενα

Ευρετήριο εικόνων	6
Ευρετήριο διαγραμμάτων	7
Ευρετήριο πινάκων.....	9
Πρόλογος.....	10
ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΡΟΣ	11
Εισαγωγή.....	12
Θεωρητικό μέρος.....	13
1. Φυτικά εκχυλίσματα & Καλλυντικά	13
1.1. Θεραπευτικές ιδιότητες φυτικών συστατικών.....	13
1.2. Cosmeceuticals	14
2. Sideritis spp.	15
2.1. Προέλευση & Γεωγραφική εξάπλωση	15
2.2. Βοτανική περιγραφή.....	15
2.3. Ταξινόμηση	16
2.4. Χημική σύσταση.....	17
2.5. Ιδιότητες και εφαρμογές.....	18
3. Εκχύλιση δραστικών συστατικών	18
3.1. Προκατεργασία.....	20
3.2. Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης.....	20
3.3. Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	21
3.3.1. Ultrasound-assisted extraction (UAE)	21
3.3.2. Microwave assisted extraction (MAE)	22
4. Βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων	23
4.1. Δραστικά συστατικά.....	23
4.2. Αντιοξειδωτική δράση.....	24
4.2.1. Ελεύθερες ρίζες & Οξειδωτικό στρες.....	24
4.2.2. Αντιοξειδωτικά	26
4.3. Φαινολικές ενώσεις	26
4.3.1. Φλαβονοειδή.....	27
4.3.2. Τανίνες.....	28
4.4. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών συστατικών	29
4.4.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu).....	29
4.4.2. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών (μέθοδος χλωριούχου αργιλίου)	30
4.4.3. Προσδιορισμός συμπυκνωμένων τανινών (μέθοδος οξινισμένης βανιλίνης).....	30

4.4.4.	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος αντιδραστηρίου DPPH).....	31
5.	Μελέτη φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων	32
5.1.	Μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία	32
5.2.	Μέθοδος παραγωγοποίησης	33
5.2.1.	Αντίδραση συλλίωσης	34
5.2.2.	Παραγωγοποίηση με BSTFA.....	35
	Πειραματικό μέρος.....	37
	Αναλυτική περιγραφή πειραμάτων	37
1.	Αντιδραστήρια & Όργανα.....	37
2.	Μέθοδοι.....	38
2.1.	Προετοιμασία εκχυλισμάτων	38
2.2.	Ανάλυση βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων	39
2.2.1.	Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content)	39
2.2.2.	Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content)	40
2.2.3.	Μέτρηση ολικών τανινών (Total Condensed Tannins)	40
2.2.4.	Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH (Antioxidant Activity)	41
2.3.	Ανάλυση φυτοχημικού προφίλ με αέρια χρωματογραφία (GC-MS)	42
2.3.1.	Παραγωγοποίηση	42
2.3.2.	Αέρια χρωματογραφία.....	42
	Παρουσίαση αποτελεσμάτων & Σχολιασμός.....	43
1.	Μελέτη βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων.....	43
1.1.	Εκχυλίσματα με διαλύτη Γλυκερόλη/Νερό 1:1	43
1.1.1.	Ολικές Φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content).....	43
1.1.3.	Συμπυκνωμένες Τανίνες (Total Condensed Tannins).....	52
1.1.4.	Αντιοξειδωτική δράση – Δοκιμή DPPH (Antioxidant activity)	57
1.2.	Εκχυλίσματα με διαλύτη αιθανόλη.....	69
1.2.1.	Ολικές Φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content).....	69
1.2.2.	Αντιοξειδωτική δράση – Δοκιμή DPPH (Antioxidant activity)	70
1.3.	Σύγκριση εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη και αιθανόλη	71
2.	Ανάλυση προφίλ με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)	74
2.1.	Δοκιμή με γαλλικό οξύ	74
2.2.	Εκχυλίσματα σε αιθανόλη	79
	Συμπεράσματα-Προοπτικές.....	85
	Αναφορές.....	87
	Παράρτημα.....	95

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Διάγραμμα ροής της έρευνας φαρμακευτικών φυτών και τοποθέτηση των μεθόδων εκχύλισης σε αυτό (προσαρμοσμένο από Farnsworth et al. (1985)).....	13
Εικόνα 2: Κατανομή του γένους <i>Sideritis</i>	15
Εικόνα 3: <i>Sideritis scardica</i> , <i>lanata</i> & <i>syriaca</i> (από αριστερά προς δεξιά).....	16
Εικόνα 4: Φυλογενετικό δέντρο γένους <i>Sideritis</i> (Stanoeva et al., 2015).....	17
Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα των φυτικών δομών. (Vinatoru et al., 2001).....	19
Εικόνα 6: Α) Πειραματική διάταξη συμβατικής εκχύλισης μορίων υψηλής προστιθέμενης αξίας από φυτικές μήτρες σε εργαστηριακή κλίμακα. Β) Διάταξη εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους και φαινόμενο σπηλαίωσης. Γ) Διάταξη εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα σε εργαστηριακή κλίμακα και μηχανισμός μοριακής περιστροφής. (Barba et al., 2016).....	20
Εικόνα 7: Σύστημα εκχύλισης με υπερήχους (UAE). (Kadam et al., 2013).....	22
Εικόνα 8: Σύστημα εκχύλισης με μικροκύματα (MAE). (Costa et al., 2017).....	23
Εικόνα 9: Διαφορετικά είδη ROS και RNS που παράγονται στο κύτταρο. (Veena Dhawan 2014).....	25
Εικόνα 10: Βασική δομή φλαβονοειδών.....	27
Εικόνα 11: Οι τανίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες - υδρολυόμενες τανίνες, συμπυκνωμένες τανίνες και φλοροτανίνες. (Praveen Kumar Asho et al., 2012).....	28
Εικόνα 12: Σύμπλοκο φλαβονοειδούς-γλωριούχου αργιλίου.	30
Εικόνα 13: Αντίδραση οξεισμένης βανιλίνης για τον προσδιορισμό συμπυκνωμένων τανινών.	31
Εικόνα 14: Α. Οι δομές συντονισμού της ρίζας DPPH. Β. Η αντίδραση του DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών.	32
Εικόνα 15: Βασικά χαρακτηριστικά του BSTFA.....	35
Εικόνα 16: Αντίδραση παραγωγοποίησης με BSTFA.....	36
Εικόνα 17: Φάσμα μάζας γαλλικού οξέος (NIST Spectral Library).....	75
Εικόνα 18: Αντίδραση παραγωγοποίησης με BSTFA.	75
Εικόνα 19: Σιλυλιωμένα παράγωγα γαλλικού οξέος και τα μοριακά τους βάρη.....	75
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος.....	76
Εικόνα 21: Κορυφές παραπροϊόντος της αντίδρασης παραγωγοποίησης.....	77
Εικόνα 22: Βασικά θραύσματα παραγωγοποιημένου γαλλικού οξέος.....	78
Εικόνα 23: Φάσμα μάζας γαλλικού οξέος μετά την παραγωγοποίηση.....	79
Εικόνα 24: Προφίλ εκχυλισμάτων σε αιθανόλη.....	80
Εικόνα 25: Παραπροϊόν αντίδρασης παραγωγοποίησης στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη.....	81
Εικόνα 26: Φάσμα μάζας απιγενίνης (NIST Spectral Library).	83
Εικόνα 27: Ταυτοποίηση απιγενίνης στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη.....	83
Εικόνα 28: Φάσμα μάζας κινικού οξέος (NIST Spectral Library).	84
Εικόνα 29: Ταυτοποίηση κινικού οξέος στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη.....	84

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος	43
Διάγραμμα 2: Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (1)	44
Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (2)	45
Διάγραμμα 4: Περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα (1)	45
Διάγραμμα 5: Περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα (2)	46
Διάγραμμα 6: Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης	48
Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση φλαβονοειδών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (1)	49
Διάγραμμα 8: Συγκέντρωση φλαβονοειδών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (2)	50
Διάγραμμα 9: Περιεχόμενο φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα (1)	50
Διάγραμμα 10: Περιεχόμενο φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα (2)	51
Διάγραμμα 11: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης	53
Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (1)	54
Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (2)	54
Διάγραμμα 14: Περιεχόμενο συμπυκνωμένων τανινών στα εκχυλίσματα (1)	55
Διάγραμμα 15: Περιεχόμενο συμπυκνωμένων τανινών στα εκχυλίσματα (2)	55
Διάγραμμα 16: Καμπύλη αναφοράς DPPH	57
Διάγραμμα 17: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 2,5% (1)	58
Διάγραμμα 18: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 2,5% (2)	58
Διάγραμμα 19: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 5% (1)	59
Διάγραμμα 20: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 5% (2)	59
Διάγραμμα 21: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 7,5% (1)	60
Διάγραμμα 22: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 7,5% (2)	60
Διάγραμμα 23: Πλήθος αναγόμενων ριζών σε συνάρτηση με την % περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων. (1)	61
Διάγραμμα 24: Πλήθος αναγόμενων ριζών σε συνάρτηση με την % περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων. (2)	62
Διάγραμμα 25: % Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 2,5% (1)	64
Διάγραμμα 26: % Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 2,5% (2)	64
Διάγραμμα 27: % Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 5% (1)	65
Διάγραμμα 28: % Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 5% (2)	65
Διάγραμμα 29: % Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 7,5% (1)	66
Διάγραμμα 30: % Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 7,5% (2)	66

Διάγραμμα 31: Μεταβολή IC_{50} με την % περιεκτικότητα εκχυλισμάτων (1).....	67
Διάγραμμα 32: Μεταβολή IC_{50} με την % περιεκτικότητα εκχυλισμάτων (2).....	68
Διάγραμμα 33: Μεταβολή συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων. ...	70
Διάγραμμα 34: Αναστολή % σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων.	70
Διάγραμμα 35: Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.	72
Διάγραμμα 36: Περιεχόμενο ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.	72
Διάγραμμα 37: Πλήθος αναγόμενων ριζών εκχυλισμάτων με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.	73
Διάγραμμα 38: IC_{50} εκχυλισμάτων με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.....	74

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για παραγωγοποίηση.....	34
Πίνακας 2: Μάζα φυτού και όγκος διαλύτη προ εκχύλισης.....	38
Πίνακας 3: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με πρότυπα διαλύματα	43
Πίνακας 4: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά των εκχυλισμάτων.	44
Πίνακας 5: Γραμμές τάσης συγκέντρωσης και ολικού περιεχομένου φαινολικών σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα.	46
Πίνακας 6: Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης.....	48
Πίνακας 7: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις φλαβονοειδών ενώσεων και συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων.....	49
Πίνακας 8: Γραμμές τάσης συγκέντρωσης και ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα.	51
Πίνακας 9: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης.....	52
Πίνακας 10: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις συμπυκνωμένων τανινών και συνολικό περιεχόμενο σε τανίνες των εκχυλισμάτων.....	53
Πίνακας 11: Γραμμές τάσης συγκέντρωσης και περιεχομένου τανινών σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα.	56
Πίνακας 12: Καμπύλη αναφοράς DPPH.....	57
Πίνακας 13: Γραμμές τάσης συσχετισμού μεταβολής συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος.	61
Πίνακας 14: Γραμμές τάσης μεταβολής πλήθους αναγόμενων ριζών με την % περιεκτικότητα εκχυλίσματος.....	62
Πίνακας 15: Γραμμές τάσης συσχετισμού αναστολής με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος.	67
Πίνακας 16: Τιμές IC ₅₀ των εκχυλισμάτων	67
Πίνακας 17:Γραμμές τάσης μεταβολής IC ₅₀ με την % περιεκτικότητα εκχυλισμάτων	68
Πίνακας 18: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά των εκχυλισμάτων.	69
Πίνακας 19: Γραμμές τάσης μεταβολής συγκέντρωσης DPPH και % Αναστολής, IC ₅₀	71
Πίνακας 20: Συγκριτικός πίνακας φαινολικών ενώσεων εκχυλισμάτων γλυκερόλης και αιθανόλης.	71
Πίνακας 21: Συγκριτικός πίνακας αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων γλυκερόλης και αιθανόλης.	73
Πίνακας 22: Σύσταση εκχυλισμάτων <i>Sideritis clandestina</i> (Vasilopoulou et al., 2011).....	82
Πίνακας 23: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 2,5% (1) 95	
Πίνακας 24: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 2,5% (2) 96	
Πίνακας 25: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 5% (1) ..	97
Πίνακας 26: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 5% (2) ..	98
Πίνακας 27: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 7,5% (1) 99	
Πίνακας 28: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 7,5% (2)	100

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία, διεξήχθη κατά το 10ο εξάμηνο, της Σχολής Χημικών Μηχανικών τη χρονική περίοδο Φεβρουαρίου-Σεπτεμβρίου 2017 και πραγματοποιήθηκε κατόπιν συνεργασίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου με την εταιρία Arivita S.A.-Natural Cosmetics. Η πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε, στο οριζόντιο εργαστήριο αναλύσεων, το εργαστήριο οργανικής χημείας και το εργαστήριο βιοτεχνολογίας της σχολής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Δημήτρη Κέκο, καθηγητή Ε.Μ.Π., επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, όπως επίσης και την κυρία Αναστασία Δέτση, αναπληρώτρια καθηγήτρια Ε.Μ.Π, για τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης και της εκπόνησης της εργασίας. Επιπλέον, οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κυρία Θεοπίστη Λυμπεροπούλου, υπεύθυνη του οριζόντιου εργαστηρίου, για τη στήριξή της σε όλους τους τομείς, επιστημονικούς και μη, και για την άριστη συνεργασία μας, σε όλη τη διάρκεια του εξαμήνου αυτού. Ακόμα, από την εταιρία Arivita S.A.-Natural Cosmetics, ευχαριστώ τον κύριο Κώστα Γαρδίκη, ο οποίος συντέλεσε στην επίτευξη της συνεργασίας της σχολής με την εταιρία, καθώς και την κυρία Ελένη Σπανίδη για τη συνεργασία της στα στάδια της εργασίας που ήταν αναγκαία. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για τη στήριξή τους και τους φίλους μου Δέσποινα Μόσχου και Φοίβο Χατζηδημητρίου, που συντέλεσαν στην ολοκλήρωση τόσο της συγκεκριμένης εργασίας, όσο και συνολικά της φοίτησής μου στη σχολή.

ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο ζωντανό όργανο που προστατεύει το σώμα από το εξωτερικό περιβάλλον, συμβάλλοντας στη ρύθμιση της θερμοκρασίας και της ισορροπίας υγρών, διατηρώντας τα επιβλαβή μικρόβια και χημικά και προσφέροντας κάποια προστασία από το φως του ήλιου. Αν και τα φυσικά συστατικά χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά για αιώνες για τη φροντίδα του δέρματος, γίνονται όλο και πιο διαδεδομένα στις σύγχρονες συνθέσεις καλλυντικών προϊόντων. Ο όρος "φυσικό" ορίζεται ως κάποιο συστατικό που παράγεται από τη φύση ή βρίσκεται στη φύση και εξάγεται απευθείας από φυτά ή ζωικά προϊόντα. Πηγές φυσικών συστατικών μπορούν να περιλαμβάνουν βότανα, φρούτα, λουλούδια, φύλλα, ορυκτά, νερό και τη γη. Η επίδραση των φυσικών συστατικών στα προϊόντα φροντίδας του δέρματος εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα *in vitro* και *in vivo* και από τον τύπο της δερματολογικής βάσης όπου ενσωματώνονται.

Από την αρχαιότητα, αναζητώντας τη θεραπεία για διάφορες ασθένειες, οι άνθρωποι αναζητούσαν φάρμακα στη φύση. Οι αρχές της χρήσης των φαρμακευτικών φυτών ήταν ενστικτώδεις. Καθώς τότε δεν υπήρχαν επαρκείς πληροφορίες είτε σχετικά με τις αιτίες των ασθενειών είτε σχετικά με τα ίδια τα φυτά και πώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπείες, όλα βασίζονταν στην εμπειρία. Με τον καιρό ανακαλύφθηκαν οι λόγοι για τη χρήση ειδικών φαρμακευτικών φυτών στη θεραπεία ορισμένων ασθενειών. Έτσι, η χρήση των φαρμακευτικών φυτών σταδιακά εγκατέλειψε το εμπειρικό πλαίσιο και βασίστηκε σε επιστημονικές εξηγήσεις. Μέχρι την έλευση της ιατροχημείας τον 16ο αιώνα, τα φυτά ήταν η πηγή της θεραπείας και της προφύλαξης. Παρ' όλα αυτά, η μειούμενη αποτελεσματικότητα των συνθετικών φαρμάκων και οι αυξανόμενες αντενδείξεις της χρήσης τους καθιστούν και σήμερα αναγκαία τη χρήση των φυσικών συστατικών.

Παρά το γεγονός ότι δεν έχει νομική αξία, ο όρος *cosmeceutical* χρησιμοποιείται συνήθως για να ορίσει τα καλλυντικά προϊόντα με δραστικά συστατικά που προκαλούν οφέλη ανάλογα με αυτά των φαρμάκων. Έτσι, ένα *cosmeceutical* έχει στη σύνθεση του συστατικά με φαρμακευτικές ιδιότητες που εκδηλώνουν ωφέλιμες τοπικές δράσεις και παρέχουν προστασία έναντι των εκφυλιστικών δερματικών καταστάσεων. Βελτιώνουν την εμφάνιση παρέχοντας τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για υγιές δέρμα. Είναι σε θέση να βελτιώσουν τον τόνο, την υφή και την ακτινοβολία του δέρματος ενώ μειώνουν τις ρυτίδες. Τα *cosmeceuticals* είναι το ταχέως αναπτυσσόμενο τμήμα της φυσικής βιομηχανίας προσωπικής φροντίδας.

Η παρούσα εργασία μελετά τη βιοδραστικότητα του φυτού *Sideritis clandestina*, υπό διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, αλλά και το χημικό προφίλ των εκχυλισμάτων που προκύπτουν, με σκοπό την εφαρμογή τους σε καλλυντικά προϊόντα και συνεπώς την αξιοποίηση των ωφέλιμων δράσεων τους στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως αυτές έχουν επιβεβαιωθεί από πληθώρα ερευνών.

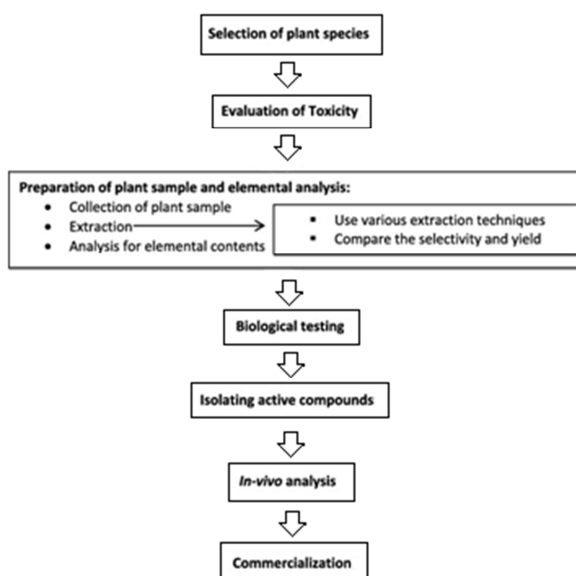
Θεωρητικό μέρος

1. Φυτικά εκχυλίσματα & Καλλυντικά

1.1. Θεραπευτικές ιδιότητες φυτικών συστατικών

Οι φυσικές θεραπείες χρησιμοποιούνταν για αιώνες για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων και μια ποικιλία δερματολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονών, της φωτοτοξικότητας, της ψωρίασης, της ατοπικής δερματίτιδας και της αλωπεκίας. Τα φυτικά υλικά για την ανακούφιση αυτών των συμπτωμάτων έχουν προφανώς επιλεγεί από μια διαδικασία «δοκιμής και λάθους». Ωστόσο, επιστημονική μελέτη δείχνει ότι τα φυτά διαθέτουν ένα τεράστιο και πολύπλοκο οπλοστάσιο φυτοχημικών συστατικών, που όχι μόνο ηρεμεί, αποκαθιστά και θεραπεύει το δέρμα αλλά και ανταποκρίνεται σε κλινικές και φαρμακολογικές δοκιμές. (Talal et al., 2003)

Η επίδραση των φυσικών συστατικών στα προϊόντα φροντίδας του δέρματος εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα *in vitro* και *in vivo* και από τον τύπο της δερματολογικής βλάβης όπου ενσωματώνονται. Τα φυτά αποτελούν την κύρια πηγή όλων των καλλυντικών πριν από τη χρήση συνθετικών ουσιών με παρόμοιες ιδιότητες. Εκτιμάται ότι 14-28% των υψηλότερων φυτικών ειδών χρησιμοποιούνται ιατρικά και ότι το 74% των φαρμακολογικά δραστικών φυτικών συστατικών ανακαλύφθηκαν μέσω της παρακολούθησης της εθνο-ιατρικής χρήσης των φυτών. Η ανάπτυξη φαρμακευτικών ουσιών αρχίζει με την ταυτοποίηση δραστικών ουσιών, λεπτομερών βιολογικών ποσοτικών προσδιορισμών και δοσολογικών σχηματισμών, ακολουθούμενες από κλινικές μελέτες για την καθιέρωση της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητας και του φαρμακοκινητικού προφίλ του νέου φαρμάκου. (Ncube et al., 2008 , Ribeiro et al. 2015)



Εικόνα 1: Διάγραμμα ροής της έρευνας φαρμακευτικών φυτών και τοποθέτηση των μεθόδων εκχύλισης σε αυτό (προσαρμοσμένο από [Farnsworth et al. \(1985\)](#)).

1.2. Cosmeceuticals

Καθώς η βιομηχανία αρωμάτων, καλλυντικών και παρασκευασμάτων καλλωπισμού μπήκε στη δεκαετία του 1990, αντιμετώπισε πολλές προκλήσεις, όπως οι ρυθμιστικές αλλαγές, οι ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων, οι απαιτήσεις για επιστημονικά δεδομένα για την αναγνώριση των αξιώσεων των προϊόντων, η αύξηση οικολογικής συνείδησης, η στροφή στα φυσικά συστατικά, η πίεση από το αυξανόμενο κίνημα των δικαιωμάτων των ζώων, η οικονομία και τα δίκτυα της αγοράς για τη διανομή προϊόντων. Οι νομοθέτες στις ΗΠΑ άρχισαν να ερευνούν ενδεχόμενες αναθεωρήσεις των παραδοσιακών ορισμών «φαρμάκων» και «καλλυντικών» που θεσπίστηκαν στο πλαίσιο του νόμου για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά. Παράλληλα, με την αυξημένη περιβαλλοντική συνείδηση ήρθε και η ανησυχία για υγιεινά προϊόντα. Προϊόντα που θεωρούνταν ασφαλή για το περιβάλλον θεωρήθηκαν ως υγιεινά και για τους χρήστες. Αυτή η φιλοσοφία οδήγησε στην τάση για αυξημένη χρήση φυσικών προϊόντων που περιέχουν συστατικά όπως πρωτεΐνες και βιταμίνες. Τα καλλυντικά αναμένεται πλέον να κάνουν περισσότερα από το να προσθέτουν χρώμα και να καλύπτουν τις ατέλειες του δέρματος. (Kumar et al., 2005)

Έτσι, η διάκριση μεταξύ καλλυντικών και φαρμάκων κατέληγε συχνά ασαφής. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της FDA, τα προϊόντα που ισχυρίζονταν ότι προσφέρουν ιατρικά οφέλη ή φυσιολογικές επιδράσεις ήταν φάρμακα χωρίς ιατρική συνταγή. Εάν η FDA αναγνώριζε ένα καλλυντικό προϊόν ως φάρμακο χωρίς απαίτηση ιατρικής συνταγής, τότε αντιμετωπιζόταν ως νέο φάρμακο. Ο κατασκευαστής ήταν τότε υποχρεωμένος να αποδείξει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του προϊόντος για να αποκτήσει την έγκριση του FDA. Μια έκθεση με τίτλο «Ταξινόμηση και ρύθμιση των καλλυντικών και των φαρμάκων: Μια νομική επισκόπηση και εναλλακτικές λύσεις για τη νομοθετική μεταβολή» περιελάμβανε διατάξεις για μια τρίτη κατηγορία προϊόντων, αυτή των «Cosmeceuticals» για να συμπεριλάβει προϊόντα όπως αντηλιακά που έπεφταν στο χάσμα μεταξύ φαρμάκων και καλλυντικών. (Kumar et al., 2005)

Ο όρος Cosmeceuticals χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Raymond Reed, ιδρυτικό μέλος της US Society of Cosmetics Chemist, το 1961. Χρησιμοποίησε τη λέξη αυτή για να συνοψίσει τα δραστικά και επιστημονικά βασισμένα καλλυντικά. Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω από τον Dr Albert Kligman κατά το έτος 1984 για να αναφερθούν οι ουσίες που έχουν τόσο καλλυντικά όσο και θεραπευτικά οφέλη. Τα cosmeceuticals είναι δηλαδή υβρίδια καλλυντικών-φαρμακευτικών προϊόντων που αποσκοπούν στην ενίσχυση της υγείας και της ομορφιάς μέσω συστατικών που επηρεάζουν τη βιολογική υφή και τη λειτουργία του δέρματος. (Joshi et al., 2015)

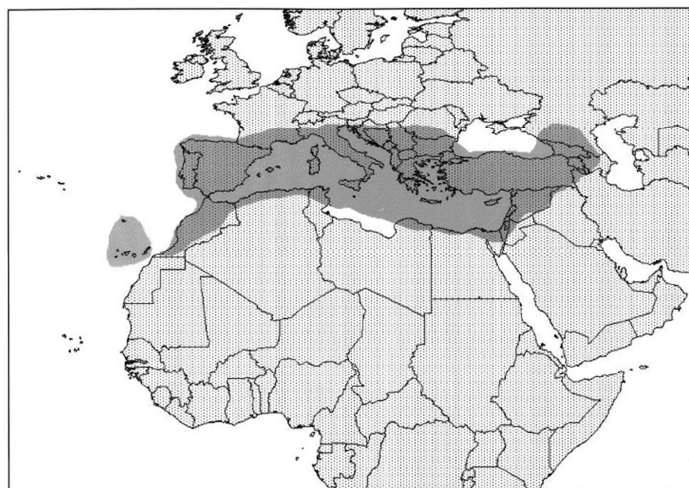
Η χρήση φυσικών συστατικών σε καλλυντικά σκευάσματα αποτελεί στην πραγματικότητα ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, τη βιομηχανία καλλυντικών και τους καταναλωτές. Αυτά τα συστατικά μπορεί να είναι φυσικά μαλακτικά, φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας, αντιοξειδωτικά ή άλλες φυσικές ουσίες που μπορούν να προσδώσουν αξία στο προϊόν. Τα τελευταία χρόνια, τα προϊόντα που ισχυρίζονται ότι παρουσιάζουν αντιγηραντικές ιδιότητες με αντιοξειδωτικά στη φόρμουλά τους έχουν αυξηθεί στην αγορά. (Costa et al., 2017)

2. *Sideritis* spp.

2.1. Προέλευση & Γεωγραφική εξάπλωση

Το γένος *Sideritis* ανήκει στην οικογένεια Labiateae, στο φύλο Lamiaceae. Το γένος αυτό περιλαμβάνει περισσότερα από 150 είδη που διανέμονται σε εύκρατες και τροπικές περιοχές του Βόρειου Ημισφαιρίου, από τις Μπαχάμες μέχρι τη Δυτική Κίνα και από τη Γερμανία στο Μαρόκο. Τα περισσότερα είδη βρίσκονται στη μεσογειακή περιοχή σε βραχώδεις πλαγιές και βοσκοτόπους από λίγα μέτρα πάνω από τη στάθμη της θάλασσας σε περισσότερα από 3000 μέτρα. Τα είδη *Sideritis* απαιτούν μέσο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και ελαφρώς αλκαλικό χώμα. Η Ισπανία, η Τουρκία και η Ελλάδα καταέχουν τον υψηλότερο αριθμό ειδών *Sideritis*. (González-Burgos et al., 2011, Dincer et al. 2017)

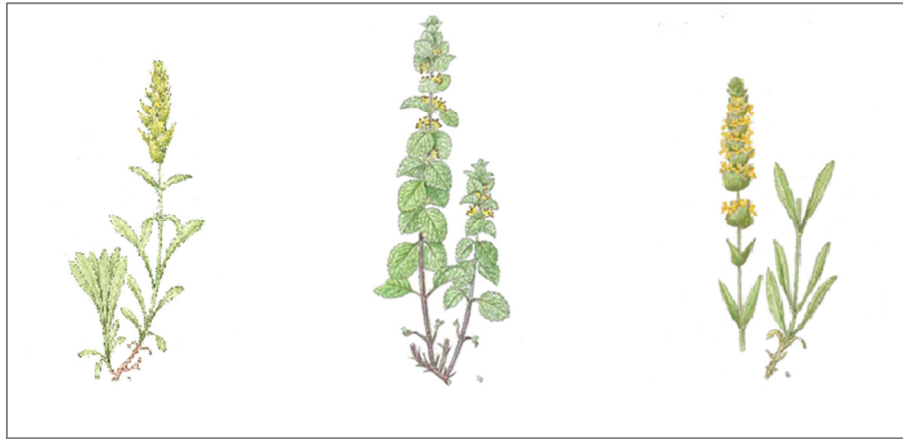
Το όνομα του γένους *Sideritis* L., προέρχεται από την ελληνική λέξη *sideros* (σίδηρος), λόγω της χρήσης τους, κατά την αρχαιότητα, να θεραπεύουν πληγές που προκαλούνται από όπλα κατασκευασμένα με αυτό το μέταλλο. Εκτός από αυτή την ιδιότητα epούλωσης, τα είδη *Sideritis* χρησιμοποιούνταν ευρύτατα για αιώνες για τις αντιφλεγμονώδεις, πεπτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές τους. (González-Burgos et al., 2011)



Εικόνα 2: Κατανομή του γένους *Sideritis*. Το ηπειρωτικό υποείδος *Sideritis* εμφανίζει κατανομή περιμετρική της Μεσογείου, ενώ τα μέλη του υπογέנוς *Marrubiastrum* εμφανίζονται μόνο στο αρχιπέλαγος των Καναρίων Νήσων και της Μαδέρας. (Barber et al., 2002)

2.2. Βοτανική περιγραφή

Είναι μονοετείς ή πολυετείς πόες αποξυλωμένες στη βάση και τριχωτές. Συνήθως είναι πολύ αρωματικές λόγω του περιεχόμενου αιθέριου ελαίου. Τα φύλλα τους είναι οδοντωτά και τα άνθη τους λευκά ή κίτρινα. Ο κάλυκας τους είναι κωνοειδής με 10 νευρώσεις και 5 οδόντες διαταγμένους σε δύο χείλη. Το επάνω χείλος αποτελείται από δύο συμφυή πέταλα, ενώ το κάτω καταλήγει σε τρεις λοβούς, από τους οποίους ο μεσαίος είναι ο μεγαλύτερος. Οι στήμονες είναι τέσσερις και οι μπροστινοί δύο είναι επιμηκέστεροι από τους άλλους δύο. Ο στύλος καταλήγει σε δύο άνισα στίγματα. Η ωοθήκη είναι δίχωρη, ενώ με ψευδή διαφράγματα γίνεται τετράχωρη. Οι καρποί είναι τέσσερα κάρυα που περικλείουν από ένα σπέρμα. (Ανάσης Ε. 2008 , Θανασούλια κ.α., 2008)

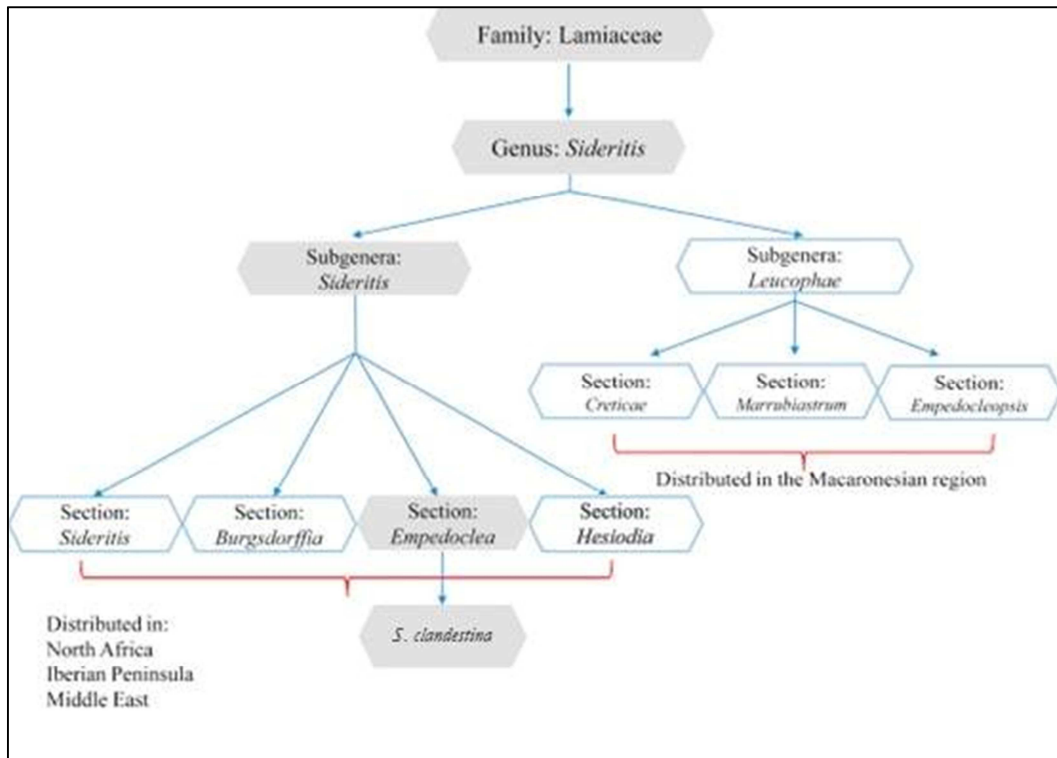


Εικόνα 3: *Sideritis scardica*, *lanata* & *syriaca* (από αριστερά προς δεξιά)

2.3. Ταξινόμηση

Κατά τη διάρκεια της ιστορικής εξέλιξης, έγιναν πολλές προσπάθειες για την ταξινόμηση του γένους *Sideritis*. Ο βαθμός πολυμορφισμού του, η παρουσία ποικιλίας οικοτύπων και ο συχνός υβριδισμός μεταξύ των ήδη ταυτοποιημένων ειδών, καθιστούν την προσπάθεια αυτή ακόμα πιο δύσκολη. Η ταξινόμηση του γένους βασίζεται σε μορφολογικούς και γενετικούς παράγοντες και στην επιστήμη της παλυνολογίας. (González-Burgos et al., 2011)

Σύμφωνα με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, το γένος *Sideritis* έχει διαχωριστεί σε δύο υποκατηγορίες: την *Sideritis* και την *Marrubiastrum*. Τα περισσότερα ταυτοποιημένα είδη *Sideritis* spp. ανήκουν στο υποείδος *Sideritis*. Αυτό το υποείδος, με συνολικά περίπου 125 είδη, περιλαμβάνει χερσαία ενδημικά είδη που αναπτύσσονται μέσω της περιοχής της Δυτικής Μεσογείου, ιδιαίτερα της νοτιοανατολικής Ισπανίας και της Βορειοδυτικής Αφρικής. Το υποείδος *Sideritis* χωρίζεται σε τέσσερα τμήματα: δύο τμήματα που περιλαμβάνουν πολυετή είδη, το *Sideritis* και το *Empedoclea*, τα οποία βρίσκονται στην περιοχή της Δυτικής Μεσογείου (κυρίως στην Ιβηρική Χερσόνησο) και στην Ανατολική Μεσόγειο αντίστοιχα (Βαλκάνια, Τουρκία, Συρία) και άλλα δύο τμήματα που περιλαμβάνουν μια πολύ μικρή ομάδα ετήσιων ειδών, τα *Hesiodia* και τα *Burgsdorffia*, που αναπτύσσονται στις περιοχές της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη είναι θαμνώδη αλλά κανένα πραγματικά ξυλώδες. Το υποείδος *Marrubiastrum* περιλαμβάνει 24 ξυλώδη πολυετή ενδημικά φυτά που αναπτύσσονται στο αρχιπέλαγος της Μαδέρας και των Καναρίων. Οι περαιτέρω διακρίσεις του είδους *Marrubiastrum* χωρίζονται σε 3 τμήματα το *Empedocleopsis*, το *Marrubiastrum* και το *Creticae*. (González-Burgos et al., 2011)



Εικόνα 4: Φυλογενετικό δέντρο γένους *Sideritis* (Stanoeva et al., 2015)

Τα φυτά αναπτύσσονται άγρια στη Βαλκανική Χερσόνησο, ενώ μόνο στην Ελλάδα 17 διαφορετικά είδη είναι εγχώρια, αρωματικά και πολύ παραγωγικά όπως: το *Sideritis athoa* (που αναπτύσσεται στο Άγιον Όρος), το *Sideritis clandestina* (που αναπτύσσεται στο ιδιαίτερα τραχύ όρος Χελμός και τον Ταύγετο στην Πελοπόννησο), το *Sideritis scardica* (στον Όλυμπο), το *Sideritis raeseri* (στον Παρνασσό), το *Sideritis syriaca* (στα βουνά της Κρήτης, γνωστό ως μαλοτήρα) και το *Sideritis euboica* (στα βουνά της Εύβοιας). Μεταξύ αυτών τα *Sideritis raeseri*, *Sideritis scardica*, *Sideritis syriaca* και *Sideritis clandestina* μπορούν να βρεθούν τόσο άγρια όσο και καλλιεργημένα. Σύμφωνα με τη Flora Europaea, το είδος *Sideritis clandestina* ανήκει στο τμήμα *Empedoclea* και συναντάται ως ενδημικό στη νότια Πελοπόννησο. (European Medicines Agency, 2016)

2.4. Χημική σύσταση

Πολλά χημικά συστατικά έχουν ταυτοποιηθεί στο γένος *Sideritis* όπως τερπένια, флаβονοειδή, αιθέρια έλαια, ιριδοειδή, κουμαρίνες, λιγνάνες και στερόλες. Τα διτερπένια, τα флаβονοειδή και τα αιθέρια έλαια εμφανίζονται σε όλα σχεδόν τα είδη. Στην πραγματικότητα είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τη φαρμακολογική δράση τους. (González-Burgos et al., 2011)

Τα είδη *Sideritis* είναι πλούσια σε διτερπένια. Τουλάχιστον 160 διαφορετικά διτερπένια με αξιόλογη δομική ποικιλία έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί από τα εναέρια μέρη των φυτών. Μέχρι σήμερα, σημαντικός αριθμός μελετών έχει αναφέρει την παρουσία διτερπενοειδών, ιδιαίτερα σε εκείνα τα φυτά που αναπτύσσονται στην Ιβηρική Χερσόνησο και τις Κανάριες Νήσους. (González-Burgos et al., 2011)

Επιπλέον, το γένος *Sideritis* είναι πλούσια πηγή флаβονοειδών. Εκτεταμένες μελέτες σχετικά με την περιεκτικότητα σε флаβονοειδή σε είδη *Sideritis* της Μεσογείου και του Ατλαντικού έχουν πραγματοποιηθεί από διάφορες ομάδες (Barberán et al., 1985, Villar et al., 1985, Tomas-Barberan et al., 1990, Menkovic et al. Palomino et al., 1996), ενώ μάλιστα,

παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του τύπου φλαβονοειδών και της γεωγραφικής κατανομής των ειδών *Sideritis*. (González-Burgos et al., 2011)

Ακόμα, πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί σχετικά με τη χημική σύσταση αιθέριου ελαίου από είδη *Sideritis*. Στη βιβλιογραφία παρατηρήθηκαν ορισμένες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των συστατικών του αιθέριου ελαίου από το ίδιο είδος. Αυτές οι διαφορές τόσο ως προς την περιεκτικότητα σε έλαιο όσο και ως προς τη σύνθεση μπορεί να οφείλονται σε διάφορους λόγους όπως οι κλιματολογικοί και γενετικοί παράγοντες, οι αγρονομικές πρακτικές ή ο χημειότυπος. Ωστόσο, αν και η οικογένεια *Lamiaceae* είναι γνωστή λόγω του πλούτου της σε αιθέρια έλαια, τα είδη *Sideritis* έχει αναφερθεί ότι συγκριτικά με άλλα είναι πτωχά σε αιθέρια έλαια. (González-Burgos et al., 2011)

2.5. Ιδιότητες και εφαρμογές

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί βαθιές έρευνες για το γένος αυτό, βασισμένες κυρίως στις βοτανικές, φυτοχημικές και φαρμακολογικές πτυχές του. (González-Burgos et al., 2011, Vasilopoulou et al., 2013)

Συγκεκριμένα, αρκετά είδη του γένους *Sideritis* έχουν μελετηθεί για το περιεχόμενό τους σε διτερπένια (Garcia-Granados et al., 1986, Fraga et al., 1991), σεσκιτερπένια (Garcia-Granados et al., 1986, Cabresa et al., 1988), αιθέρια έλαια (Gergis et al., 1990, Ezer et al., 1996) και φλαβονοειδή (Tomas-Barberan et al., 1988, Palomino et al., 1996, Abdel-Sattar et al., 1993). Μέσω των μελετών αυτών, έχουν καταγραφεί διάφορες βιολογικές ιδιότητες, όπως η αντιοξειδωτική (Rios et al., 1992) και η αντιμικροβιακή (Diaz et al., 1988; Gergis et al., 1990) δράση, η αντιφλεγμονώδης δράση (Villar et al., 1984 · Yesilada και Ezer, 1989 · de Las Heras et al., 1990 · Manez et al., 1990 · Godoy et al., 2000 · Villena et al., 2000) η δράση κατά του έλκους (Villar et al., 1984) και του καταρράκτη (Tomas-Barberan et al., 1986), και η ανοσορρυθμιστική δράση (Navarro et al., 2000).

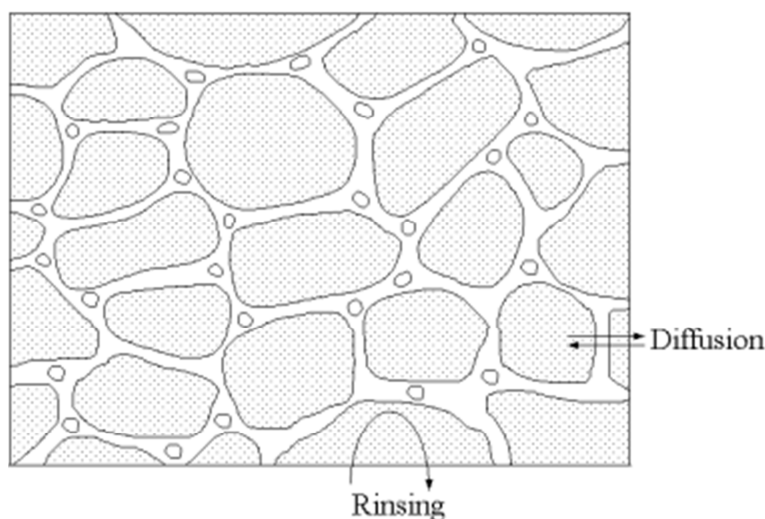
Η θεραπευτική χρήση του είδους *Sideritis* όμως αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Διοσκουρίδη στο βιβλίο του "Περί ύλης ιατρικής" που γράφτηκε τον 1ο αιώνα. Τα είδη *Sideritis* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως τσάι, γευστικοί παράγοντες ή για θεραπευτικούς σκοπούς. Οι περισσότερες από τις φαρμακευτικές χρήσεις του *Sideritis* spp. περιορίζονται στη λαϊκή ιατρική, αν και αξίζει να σημειωθεί η ολοένα και συχνότερη παρουσία του *Sideritis* spp. στην αγορά βοτάνων. Το αφένημα ή η έγχυση των εναέριων μερών του φυτού, που χορηγούνται από το στόμα ή και τοπικά, χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική ως αντιφλεγμονώδεις, αντιπηκτικοί, αντιμικροβιακοί, επουλωτικοί, αντισπασμωδικοί, αναλγητικοί και χωνευτικοί παράγοντες. Αρκετές μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τις εθνοφαρμακολογικές χρήσεις ορισμένων ειδών *Sideritis*. Σε γενικές γραμμές, οι συχνότερα καταγεγραμμένες ιατρικές χρήσεις των *Sideritis* spp. σχετίζονται με τις πεπτικές, αντιφλεγμονώδεις και επουλωτικές ιδιότητές τους. Διαφορές στις χρήσεις έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των *Sideritis* spp. και την περιοχή όπου αναπτύσσονται. (González-Burgos et al., 2011, Dincer et al., 2017, Kupeli et al., 2007, Diaz et al., 1987)

3. Εκχύλιση δραστικών συστατικών

Εκχύλιση είναι ο διαχωρισμός των φαρμακευτικά ενεργών τμημάτων των φυτών με τη χρήση εκλεκτικών διαλυτών μέσω τυποποιημένων διαδικασιών. Ο σκοπός όλων των εκχυλίσεων είναι ο διαχωρισμός των διαλυτών φυτικών μεταβολιτών, αφήνοντας πίσω τους τα αδιάλυτα κυτταρικά στελέχη (κατάλοιπα). Τα αρχικά ακατέργαστα εκχυλίσματα που προκύπτουν από

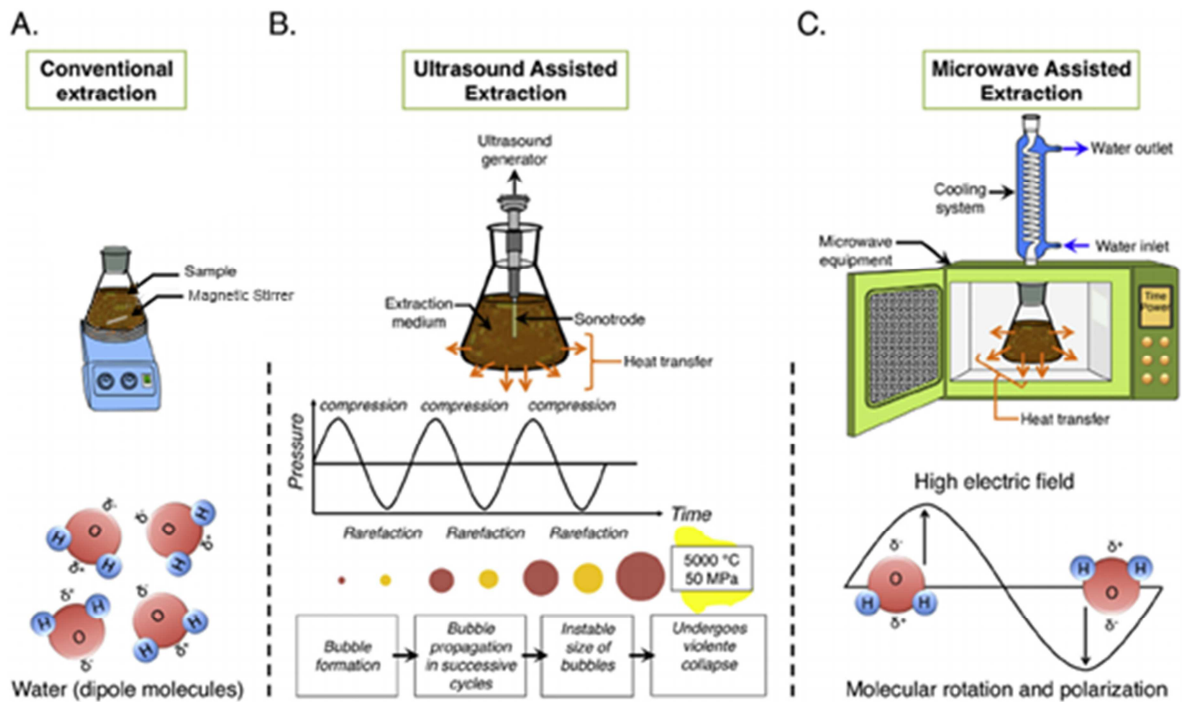
αυτές τις μεθόδους περιέχουν σύνθετο μείγμα πολλών φυτικών μεταβολιτών, όπως αλκαλοειδή, γλυκοσίδες, φαινολικά, τερπενοειδή και флаβονοειδή. Ορισμένα από τα αρχικά ληφθέντα εκχυλίσματα μπορεί να είναι έτοιμα για χρήση ως φαρμακευτικά μέσα με τη μορφή βάμματος και υγρών εκχυλισμάτων, αλλά μερικά χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία. (Azwanida, 2015)

Ο φυτικός ιστός αποτελείται από κύτταρα που περιβάλλονται από κυτταρικά τοιχώματα. Ο μηχανισμός εκχύλισης περιλαμβάνει δύο τύπους φυσικών φαινομένων: τη διάχυση μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων και την έκπλυση των περιεχομένων των κυττάρων μόλις σπάσουν τα τοιχώματα. Ορισμένα κύτταρα βρίσκονται υπό μορφή αδένων (εξωτερικών ή εσωτερικών) γεμάτων με αιθέριο έλαιο. Ένα χαρακτηριστικό αυτών των αδένων (όταν είναι εξωτερικοί) είναι ότι το δέρμα τους είναι πολύ λεπτό και μπορεί εύκολα να καταστραφεί με υπερήχους. Αυτό εξηγεί γιατί η εκχύλιση αιθέριου ελαίου, καθώς και λιπαρού ελαίου, διευκολύνεται με υπερήχους. Για τους εσωτερικούς αδένες, ο βαθμός άλεσης του φυτικού υλικού παίζει σημαντικό ρόλο. (Vinatoru et al., 2001)



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα των φυτικών δομών. (Vinatoru et al., 2001)

Οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι η συμβατική μέθοδος της διαβροχής και οι μη συμβατικές μέθοδοι, της εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα αντίστοιχα.



Εικόνα 6: Α) Πειραματική διάταξη συμβατικής εκχύλισης μορίων υψηλής προστιθέμενης αξίας από φυτικές μήτρες σε εργαστηριακή κλίμακα. Β) Διάταξη εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους και φαινόμενο σπηλαιώσης. Γ) Διάταξη εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα σε εργαστηριακή κλίμακα και μηχανισμός μοριακής περιστροφής. (Barba et al., 2016)

3.1. Προκατεργασία

Η όλη διαδικασία εκχύλισης μπορεί να χωριστεί σε διάφορα στάδια όπως η προεπεξεργασία, η εκχύλιση, η απομόνωση και ο καθαρισμός. (Routray et al., 2012)

Τα στάδια προκατεργασίας μπορεί να περιλαμβάνουν διαβροχή, ομογενοποίηση, άλεση ή ξήρανση. Η ξήρανση μπορεί να είναι χρήσιμη για την αύξηση της απόδοσης ανά μονάδα βάρους της πρώτης ύλης, την αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης της πρώτης ύλης, τη μείωση της απαιτούμενης χωρητικότητας και σε ορισμένες περιπτώσεις για τη διευκόλυνση στην περαιτέρω επεξεργασία. Η διαβροχή, η άλεση και η ομογενοποίηση αυξάνουν την επιφάνεια επαφής μεταξύ του διαλύτη και του δείγματος που περιέχει τη διαλυμένη ουσία. Αυτά τα στάδια προεπεξεργασίας οδηγούν στην διάσπαση κυτταρικών δομών που ενισχύουν περαιτέρω την απόδοση των βιοδραστικών ενώσεων. (Routray et al., 2012)

3.2. Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Η διαβροχή είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στην παραγωγή κρασιού, ενώ πλέον έχει υιοθετηθεί και χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα των φαρμακευτικών φυτών. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τον εμποτισμό φυτικών υλικών (ακατέργαστων ή κονιοποιημένων) σε πωματισμένο δοχείο πληρωμένο με διαλύτη και διατήρηση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για κάποιες ώρες ή ημέρες με συχνή ανάδευση. Η διεργασία αυτή αποσκοπεί στη χαλάρωση και το σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού ώστε να απελευθερωθούν τα διαλυτά φυτοχημικά συστατικά του. Μετά το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος, το μείγμα συμπιέζεται ή διηθείται. Σε αυτή τη συμβατική μέθοδο, η θερμότητα μεταφέρεται μέσω αγωγής και συναγωγής και η επιλογή των διαλυτών

καθορίζει τον τύπο της ένωσης που εξάγεται από τα δείγματα. (Azwanida, 2015, Sukhdev Swami Handa et al., 2008)

Η έγχυση και η εκχύλιση με βρασμό χρησιμοποιούν την ίδια αρχή με τη διαβροχή. Και στις δύο μεθόδους πραγματοποιείται εμποτισμός σε κρύο ή νερό σε βρασμό. Η εκχύλιση με βρασμό είναι κατάλληλη μόνο για την εξαγωγή θερμικά σταθερών ενώσεων, σε σκληρά μέρη φυτών (πχ. ρίζες και φλοιούς) και συνήθως έχει ως αποτέλεσμα περισσότερες ελαιοδιαλυτές ενώσεις σε σύγκριση με τη διαβροχή και την έγχυση. Αυτή η τεχνική είναι η ευκολότερη και απλούστερη μέθοδος. Η μεταβολή της θερμοκρασίας και η κατάλληλη επιλογή των διαλυτών μπορούν να ενισχύσουν τη διαδικασία εκχύλισης, να μειώσουν τον απαιτούμενο όγκο διαλύτη και για αυτό χρησιμοποιούνται στην τεχνική διαβροχής, όταν αυτή η μετατροπή είναι αποδεκτή. (Azwanida, 2015, Sukhdev Swami Handa et al., 2008)

3.3. Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Οι μεγάλες προκλήσεις της συμβατικής εκχύλισης είναι ο αυξημένος χρόνος εκχύλισης, η απαίτηση για δαπανηρό και υψηλής καθαρότητας διαλύτη, η εξάτμιση μεγάλης ποσότητας του διαλύτη, η χαμηλή εκλεκτικότητα της εκχύλισης και η θερμική αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων, εισάγονται νέες και ελπιδοφόρες τεχνικές. Αυτές οι τεχνικές αναφέρονται ως μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Δύο από τις πιο ελπιδοφόρες τεχνικές είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction) και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction). (Azmir et al., 2013)

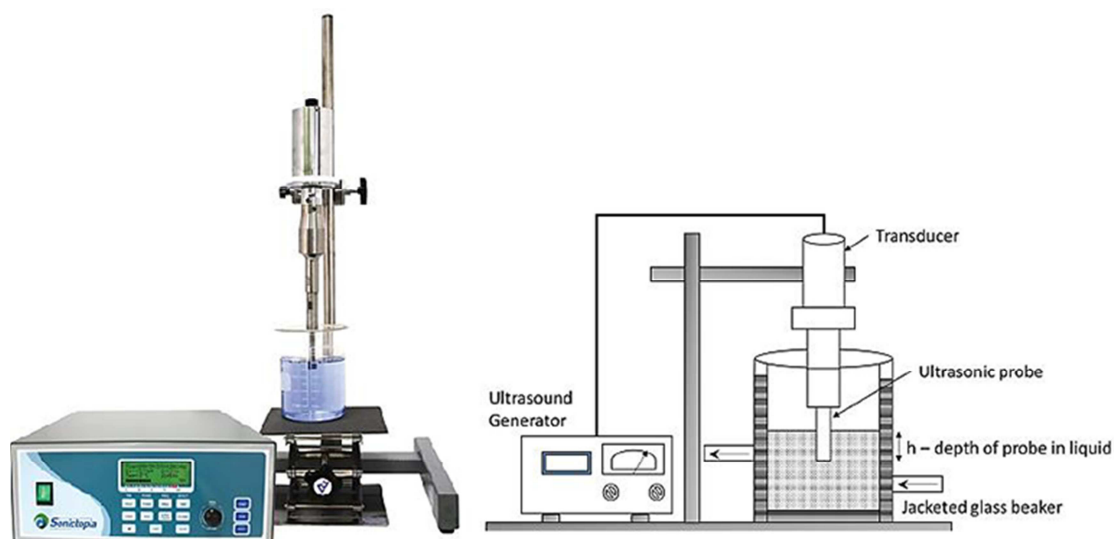
3.3.1. Ultrasound-assisted extraction (UAE)

Ο υπέρηχος είναι ένας ειδικός τύπος ηχητικού κύματος πέρα από την ανθρώπινη ακοή. Συνήθως, κυμαίνεται από 20 kHz έως 100 MHz. Όπως και άλλα κύματα, διαπερνά ένα μέσο δημιουργώντας συμπίεση και διαστολή. Αυτή η διαδικασία προκαλεί το φαινόμενο της σπηλαίωσης, που σημαίνει παραγωγή, ανάπτυξη και κατάρρευση φυσαλίδων. Μια μεγάλη ποσότητα ενέργειας μπορεί να παραχθεί από τη μετατροπή της κινητικής ενέργειας της κίνησης σε θέρμανση του περιεχομένου της φυσαλίδας. Το φαινόμενο της σπηλαίωσης συναντάται μόνο σε υγρά και υγρά που περιέχουν στερεά υλικά. Έτσι αναπτύχθηκε η μέθοδος της εκχύλισης μέσω υπερήχων. Μικρογραφίες ηλεκτρονίων σάρωσης (SEM) έδωσαν αποδείξεις των μηχανικών επιδράσεων του υπερήχου, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως από την καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων. Σε αντίθεση με τις συμβατικές εκχυλίσεις, τα φυτικά εκχυλίσματα διαχέονται διαμέσου κυτταρικών τοιχωμάτων λόγω των υπερήχων, προκαλώντας ρήξη κυττάρων σε μικρότερη περίοδο. (Azmir et al., 2013, Wang et al., 2006, Azwanida 2015, Barba et al., 2016)

Το κύριο όφελος της μεθόδου μπορεί να παρατηρηθεί σε δείγμα στερεών φυτών επειδή η ενέργεια των υπερήχων διευκολύνει την έκπλυση οργανικών και ανόργανων ενώσεων από το φυτικό πλέγμα. Πιθανός μηχανισμός είναι η εντατικοποίηση της μεταφοράς μάζας και η επιτάχυνση της πρόσβασης του διαλύτη στα κυτταρικά υλικά των μερών του φυτού. Ο μηχανισμός εκχύλισης με υπερήχους περιλαμβάνει δύο κύριους τύπους φυσικών φαινομένων, (α) τη διάχυση διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και (β) την έκπλυση των περιεχομένων του κυττάρου μετά τη διάλυση των τοιχωμάτων. (Azmir et al., 2013)

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι εξοπλισμού εκχύλισης με υπερήχους, ένα υπερηχητικό υδατόλουτρο και ένα υπερηχητικό σύστημα εξοπλισμένο με χάλκινους μετατροπείς. Στην

παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το σύστημα UAE εξοπλισμένο με Ultrasonic Probe. (Kadam et al., 2013)



Εικόνα 7: Σύστημα εκχύλισης με υπερήχους (UAE). (Kadam et al., 2013)

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία, ο βαθμός άλεσης, το μέγεθος των σωματιδίων και ο διαλύτης είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες για την επίτευξη αποδοτικής και αποτελεσματικής εκχύλισης. Είναι προφανές ότι η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του φυτικού υλικού αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που εκτίθενται άμεσα στο διαλύτη και κατ'επέκταση την υπερηχητικά προκαλούμενη σπηλαιώση. Αυτό το φαινόμενο επιτυγχάνεται με άλεση του υλικού πριν από την εκχύλιση. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, ωστόσο, ότι οι ισχυροί υπερήχοι λειτουργούν και για τη μίξη του φυτικού υλικού. Επιπλέον, η θερμοκρασία, η πίεση, η συχνότητα και ο χρόνος της υπερήχησης είναι οι θεμελιώδεις παράγοντες για τη δράση του υπερήχου. (Azmir et al., 2013, Vinatoru et al., 2001)

Τα πλεονεκτήματα της UAE περιλαμβάνουν τη μείωση του χρόνου εκχύλισης, της ενέργειας και της χρήσης του διαλύτη. Η ενέργεια των υπερήχων διευκολύνει επίσης την αποτελεσματικότερη ανάμιξη, την ταχύτερη μεταφορά ενέργειας, τη μείωση των θερμικών βαθμίδων και της θερμοκρασίας εκχύλισης, την επιλεκτικότητα της εκχύλισης, το μειωμένο μέγεθος εξοπλισμού, την ταχύτερη απόκριση στον έλεγχο της διαδικασίας της εκχύλισης, την ταχεία εκκίνηση, την αυξημένη παραγωγικότητα και τον αποκλεισμό βημάτων διεργασιών. Η εκχύλιση με υπερήχους φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική τεχνική για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά. (Azmir et al., 2013)

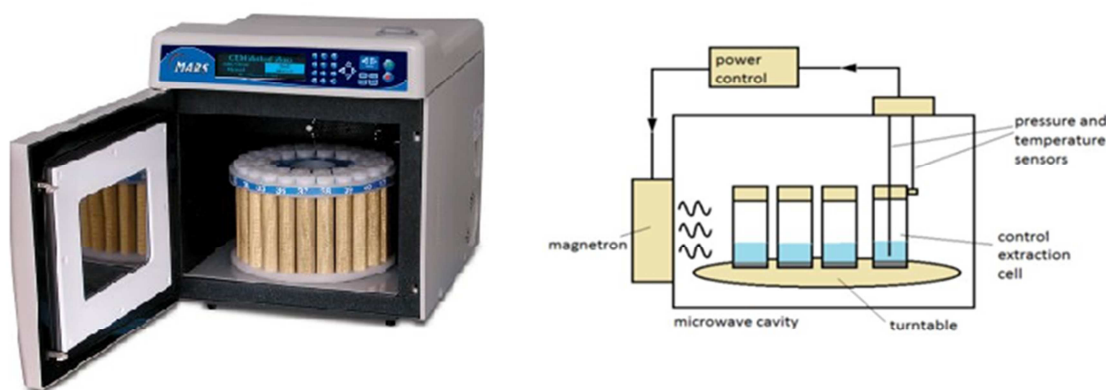
3.3.2. Microwave assisted extraction (MAE)

Η εκχύλιση με μικροκύματα θεωρείται επίσης μια νέα μέθοδος για την εκχύλιση διαλυτών προϊόντων από ένα ευρύ φάσμα υλικών σε ένα ρευστό, χρησιμοποιώντας ενέργεια μικροκυμάτων. Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά πεδία στην περιοχή συχνοτήτων από 300 MHz έως 300 GHz. Αποτελούνται από δύο ταλαντευόμενα πεδία που είναι κάθετα μεταξύ τους όπως το ηλεκτρικό πεδίο και το μαγνητικό πεδίο. Η αρχή της θέρμανσης με χρήση μικροκυμάτων βασίζεται στην άμεση επίδρασή της στα πολικά υλικά. Σε αντίθεση με τη συμβατική θέρμανση, η οποία εξαρτάται από το φαινόμενο της αγωγής και συναγωγής, και τελικά οδηγεί σε σημαντική απώλεια θερμικής ενέργειας στο περιβάλλον, στην περίπτωση της MAE, η θέρμανση συμβαίνει με στοχευμένο και επιλεκτικό τρόπο, ενώ

ουσιαστικά δεν υπάρχει απώλεια θερμότητας προς το περιβάλλον. (Azmir et al., 2013, Mandal et al., 2007, Azwanida, 2015, Barba et al., 2016)

Η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα μέσω μηχανισμών ιοντικής αγωγής και περιστροφής διπόλου. Κατά το μηχανισμό ιοντικής αγωγής, παράγεται θερμότητα λόγω της αντίστασης του μέσου στη ροή των ιόντων. Από την άλλη πλευρά, τα ιόντα διατηρούν την κατεύθυνση τους κατά μήκος του πεδίου, η οποία αλλάζει συχνά. Αυτή η συχνή αλλαγή κατευθύνσεων οδηγεί σε σύγκρουση μεταξύ μορίων και κατά συνέπεια δημιουργεί θερμότητα. Ο μηχανισμός εκχύλισης με μικροκύματα υποτίθεται ότι περιλαμβάνει τρία διαδοχικά βήματα που περιγράφονται από τον Alurului (2012): πρώτον, το διαχωρισμό των διαλυμένων ουσιών από τις ενεργές θέσεις της μήτρας του δείγματος υπό αυξημένη θερμοκρασία και πίεση, δεύτερον, τη διάχυση του διαλύτη στη μήτρα του δείγματος και τρίτον, την απελευθέρωση των διαλυμένων ουσιών από τη μήτρα του δείγματος στο διαλύτη. (Azmir et al., 2013)

Τα δοχεία εκχύλισης MAE τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο δίσκο μέσα σε φούρνο και υποβάλλονται σε ακτινοβολίες μικροκυμάτων που παράγονται από ένα μάγνητρο. Ένας προγραμματισμένος μικροϋπολογιστής ελέγχει και παρακολουθεί την ισχύ, τη θερμοκρασία και την πίεση μέσα σε ένα από τα δοχεία, το δοχείο αναφοράς. (Costa et al., 2017)



Εικόνα 8: Σύστημα εκχύλισης με μικροκύματα (MAE). (Costa et al., 2017)

Διάφορα πλεονεκτήματα της MAE έχουν περιγραφεί από τους Cravotto et al. (2008), όπως η ταχύτερη θέρμανση για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από φυτικά υλικά, οι μειωμένες θερμικές βαθμίδες, το μειωμένο μέγεθος εξοπλισμού και η αυξημένη απόδοση εκχυλίσματος. Η μέθοδος MAE μπορεί να εκχυλίσει βιοδραστικές ενώσεις τόσο ταχύτερα όσο και με καλύτερη ανάκτηση από τις συμβατικές διεργασίες εκχύλισης. Είναι μια εκλεκτική τεχνική για την εκχύλιση πιο αέριων οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων. Η MAE αναγνωρίζεται επίσης ως πράσινη τεχνολογία επειδή μειώνει τη χρήση οργανικού διαλύτη. (Azmir et al., 2013)

4. Βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων

4.1. Δραστικά συστατικά

Η προώθηση ενός προϊόντος φροντίδας του δέρματος περιλαμβάνει μια θετική επίδραση στο δέρμα (π.χ. αντιγηραντική, αντιοξειδωτική δράση), που εκτελείται από ένα δραστικό συστατικό (π.χ. ρεσβερατρόλη, βιταμίνη E), χορηγούμενο μέσω ενός «οχήματος» (π.χ.

κρέμα, λοσιόν) χρησιμοποιώντας μια σύγχρονη τεχνολογία (π.χ. νανοσωματίδια, λιποσώματα). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων πρέπει να εξετάζει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση, όχι μόνο επικεντρωμένη στη διαδικασία διαμόρφωσης, αλλά και στην αντίληψη και τις απαιτήσεις των καταναλωτών, καθώς και στις στρατηγικές μάρκετινγκ, προκειμένου να παραχθεί ένα επιτυχημένο προϊόν. Τα ενεργά συστατικά όμως είναι ίσως ένας από τους βασικότερους παράγοντες που διαφοροποιούν ένα προϊόν ανάμεσα σε χιλιάδες άλλα που ισχυρίζονται ότι έχουν τον ίδιο σκοπό. (Costa et al., 2017)

Η χρήση βιοδραστικών εκχυλισμάτων ή φυτοχημικών προϊόντων από μια ποικιλία βοτάνων στα καλλυντικά επιτυγχάνει δύο λειτουργίες: τη φροντίδα του σώματος, αλλά και την επίδραση των συστατικών αυτών στις βιολογικές λειτουργίες του δέρματος με την παροχή θρεπτικών συστατικών για υγιές δέρμα. Γενικά, τα βοτανικά προϊόντα αποτελούν πλούσια πηγή βιταμινών, αντιοξειδωτικών, αιθέριων ελαίων και ελαίων, υδροκολλοειδών, πρωτεϊνών, τερπενοειδών και άλλων βιοδραστικών ενώσεων. Σύμφωνα με τη σύνθεσή τους, αυτά τα εκχυλίσματα μπορούν να παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες. (Ribeiro et al., 2015)

4.2. Αντιοξειδωτική δράση

4.2.1. Ελεύθερες ρίζες & Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες (EP) είναι ουσίες που προέρχονται από ατελώς οξειδωμένες ενώσεις που έχουν υποστεί μερική καύση και έχουν στη δομή τους ομάδες οξυγόνου ικανές να εκκινούν, στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών ή ακόμα και εντός των κυττάρων, επιθετικές αντιδράσεις οξείδωσης. Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται και από ενδογενείς διαδικασίες που εμφανίζονται στο σώμα (ελλιπής καταβολισμός, παραγωγή ενέργειας, ηπατική αποτοξίνωση κ.λπ.), αλλά και εξωγενείς από το περιβάλλον (καπνός τσιγάρων, μολυσμένος αέρας, τρόφιμα, φάρμακα, νερό κ.λπ.). Δημιουργούνται στο στάδιο της έναρξης, συμμετέχουν σε μια ακολουθία αντιδράσεων διάδοσης στην οποία ο αριθμός των ριζών είναι σταθερός και αργότερα καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της φάσης τερματισμού. (Butnariu et al., 2012)

Στα ζωντανά κύτταρα, ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω διαδικασιών όπως η ομόλυση των χημικών δεσμών, η φωτόλυση και η ραδιόλυση και ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής. Στους αερόβιους οργανισμούς, οι ελεύθερες ρίζες ROS/RNS σχηματίζονται ως παραπροϊόντα του κανονικού μεταβολισμού. Ο πιο πιθανός τρόπος εκκίνησης του σχηματισμού των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα είναι η διαδικασία στην οποία η ομόλυση χημικών δεσμών συνοδεύεται από το σχηματισμό άλλων δεσμών, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης της διαδικασίας στο σύνολό της. (Butnariu et al., 2012, Praveen Kumar Asho et al., 2012)

Reactive Oxygen Species (ROS)

Radicals:		Non-Radicals:	
$O_2^{\cdot-}$	Superoxide	H_2O_2	Hydrogen peroxide
OH^{\cdot}	Hydroxyl	$HOCl^{\cdot}$	Hypochlorous acid
RO_2^{\cdot}	Peroxy	O_3	Ozone
RO^{\cdot}	Alkoxy	1O_2	Singlet oxygen
HO_2^{\cdot}	Hydroperoxyl	$ONOO^{\cdot}$	Peroxynitrite

Reactive Nitrogen Species (RNS)

Radicals:		Non-Radicals:	
NO^{\cdot}	Nitric Oxide	$ONOO^{\cdot}$	Peroxynitrite
NO_2^{\cdot}	Nitrogen dioxide	$ROONO$	Alkyl peroxynitrites
		N_2O_3	Dinitrogen trioxide
		N_2O_4	Dinitrogen tetroxide
		HNO_2	Nitrous acid
		$NO_2^{\cdot-}$	Nitronium anion
		$NO^{\cdot-}$	Nitroxyl anion
		NO^+	Nitrosyl cation
		NO_2Cl	Nitryl chloride

Εικόνα 9: Διαφορετικά είδη ROS και RNS που παράγονται στο κύτταρο. (Veena Dhawan 2014)

Οι κύριες δράσεις των ελευθέρων ριζών σε ένα βιολογικό σύστημα είναι η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη, η οξείδωση των αμινοξέων στις πρωτεΐνες, ο αποπολυμερισμός του ναλουρικού οξέος, η οξειδωτική οξείδωση του DNA, η τροποποίηση της δραστηριότητας της νουκλεοτιδικής κυκλάσης, η ρύθμιση της δραστηριότητας και της σύνθεσης της προσταγλανδίνης και άλλα. Οι σύγχρονες αντιλήψεις για την ένδειξη δραστηκών ειδών οξυγόνου (ROS) μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο μηχανισμούς δράσης, τις μεταβολές της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης και τις πρωτεϊνικές οξειδωτικές αλλαγές. (Ribeiro et al. 2015, Satish Balasaheb Nimse et al., 2015, Butnariu et al., 2012)

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως υπερβολική παραγωγή οξυγονωμένων ελευθέρων ριζών, συνοδευόμενη από παρεκτόπιση αντιοξειδωτικών παραγόντων και πρόκειται για έναν από τους κύριους μηχανισμούς για τη γήρανση του δέρματος και τις δερματολογικές παθήσεις. Οι φυσιολογικές βιοχημικές αντιδράσεις, η αυξημένη έκθεση στο περιβάλλον και τα υψηλότερα επίπεδα διατροφικών ξеноβιοτικών οδηγούν στη δημιουργία δραστηκών ειδών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), τα οποία είναι υπεύθυνα για το οξειδωτικό στρες σε διαφορετικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Τα κυτταρικά συστατικά του ανθρώπινου σώματος μεταβάλλονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα διάφορες καταστάσεις ασθένειας. Συγκεκριμένα, υπάρχει αυξημένη ένδειξη για τη σύνδεσή του με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι αυτοάνοσες διαταραχές, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η γήρανση κλπ. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να εξουδετερωθεί αποτελεσματικά με την ενίσχυση των κυτταρικών αμυντικών συστημάτων με τη μορφή αντιοξειδωτικών. Ορισμένες ενώσεις δρουν ως in vivo αντιοξειδωτικά αυξάνοντας τα επίπεδα ενδογενούς αντιοξειδωτικής δράσης. (Ribeiro et al. 2015, Satish Balasaheb Nimse et al., 2015, Butnariu et al., 2012)

4.2.2. Αντιοξειδωτικά

Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών ελέγχεται φυσικά από διάφορες ωφέλιμες ενώσεις γνωστές ως αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά είναι παράγοντες που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν τις βλάβες που προκαλούνται από τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να μειώσουν σημαντικά τις βλάβες που οφείλονται στα οξειδωτικά μέσα εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες προτού επιτεθούν στα κύτταρα αποτρέποντας την καταστροφή των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, των ενζύμων και των υδατανθράκων. Ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών τόσο από φυσική όσο και από συνθετική προέλευση έχει προταθεί για χρήση στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου. Αν και οι αντιοξειδωτικές άμυνες είναι διαφορετικές από είδος σε είδος, η παρουσία της αντιοξειδωτικής άμυνας είναι καθολική. Επιπλέον, η τοπική εφαρμογή των αντιοξειδωτικών παρέχει αποτελεσματική στρατηγική για τον εμπλουτισμό του ενδογενούς δερματικού συστήματος, οδηγώντας σε μείωση της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από την ακτινοβολία UV και πρόληψη ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. (Ribeiro et al. 2015, Kalita et al., 2013, Satish Balasaheb Nimse et al. 2015)

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με πολλούς τρόπους. Με βάση τη δραστηριότητά τους, διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν διασπώντας και αφαιρώντας τις ελεύθερες ρίζες. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά μετατρέπουν επικίνδυνα οξειδωτικά προϊόντα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και έπειτα σε νερό, σε μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων παρουσία συμπαραγόντων όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και ο σίδηρος. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν με διακοπή αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η φυτική πολυφαινόλη, τα καροτενοειδή και η γλουταθειόνη. (Satish Balasaheb Nimse et al. 2015)

Φυσικά αντιοξειδωτικά

Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά σήμερα παράγονται με σύνθεση και, ως επί το πλείστον, προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες όταν καταναλώνονται in vivo. Τελευταία, υπάρχει μια γενική τάση για την εύρεση φυσικώς απαντώμενων αντιοξειδωτικών, ασφαλών και αποτελεσματικών, που να συμπληρώνουν τα επεξεργασμένα τρόφιμα ή τα φαρμακευτικά προϊόντα και να αντικαθιστούν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που περιορίζονται λόγω των δυσμενών παρενεργειών που προκαλούν. Τα φυτά αποτελούν μία από τις σημαντικότερες πηγές ανεκτίμητων αντιοξειδωτικών. (Lallianrawna et al., 2013)

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν συγκεντρωθεί αποδείξεις ότι οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μια σημαντική κατηγορία αμυντικών αντιοξειδωτικών. Αυτές οι ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλες τις φυτικές πηγές, συχνά σε υψηλά επίπεδα, και περιλαμβάνουν φαινόλες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τανίνες και λιγνάνες. Η παρουσία τέτοιων αντιοξειδωτικών στα φυτά μπορεί να παρέχει προστασία ενάντια σε πολλές ασθένειες. Τα φαρμακευτικά φυτά εξετάζονται ως εκ τούτου για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και η ζήτηση για φυσικά αντιοξειδωτικά και συντηρητικά τροφίμων αυξάνεται. (Baba et al., 2015, Pietta et al., 2000)

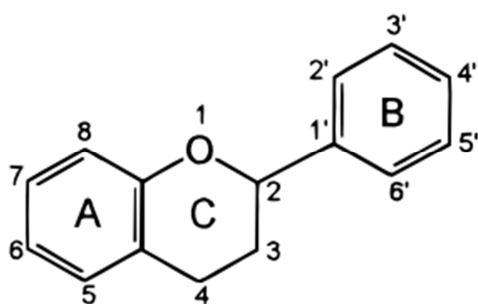
4.3. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι βιοδραστικές ουσίες ευρέως καταναλημένες στα φυτά και περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, όπως τα φλαβονοειδή (ανθοκυανίνες, φλαβονολίνες, φλαβόνες κλπ.) και διάφορες κατηγορίες μη φλαβονοειδών (φαινολικά οξέα, λιγνίνες, στιλβένια). Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και η συγκέντρωσή

τους μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως φυσιολογικές διαφορές, περιβαλλοντικές και γεωγραφικές συνθήκες, γενετικούς παράγοντες και εξέλιξη. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων ποικίλλει ανάλογα με τις υπάρχουσες μοριακές δομές. Η σχέση δομής-δραστηριότητας υποδηλώνει τον αριθμό των υδροξυλομάδων ως τον σημαντικότερο παράγοντα που καθορίζει την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορούν να χορηγηθούν στον οργανισμό με τη μορφή φυτικών εκχυλισμάτων όπως φάρμακα, συμπληρώματα διατροφής και καλλυντικά. Η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις επηρεάζεται έντονα από τη μέθοδο εκχύλισης καθώς και από την επιλογή του διαλύτη. (Ribeiro et al., 2015)

4.3.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, που υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα αναπτυσσόμενα μέρη τους. Έχει αναφερθεί ότι είναι η πλέον άφθονη φυτική χρωστική ουσία μαζί με τη χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή. Η βασική φλαβονοειδής δομή είναι ο φλαβονοειδής πυρήνας, ο οποίος αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε τρεις δακτυλίους (C6-C3-C6) (A, B και C). Οι διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών διαφέρουν στο βαθμό οξειδωσης και στο μοτίβο υποκατάστασης των δακτυλίων του άνθρακα, ενώ μεμονωμένες ενώσεις εντός μιας τάξης διαφέρουν στο πρότυπο υποκατάστασης των δακτυλίων A και B. (Routray et al., 2012, Pietta et al., 2000)



Εικόνα 10: Βασική δομή φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή παίζουν διαφορετικούς ρόλους στην οικολογία των φυτών. Λόγω των ελκυστικών χρωμάτων τους, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανιδίνες μπορούν να λειτουργήσουν ως οπτικά σήματα για τα επικονιαστικά έντομα. Λόγω της στυπτικότητας τους, οι κατεχίνες και άλλες φλαβονόλες μπορούν να αντιπροσωπεύσουν ένα αμυντικό σύστημα έναντι εντόμων επιβλαβών για το φυτό. Τα φλαβονοειδή δρουν ως καταλύτες στη φωτοσύνθεση και/ή ως ρυθμιστές των διαύλων σιδήρου που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση. Μπορούν επίσης να λειτουργήσουν προστατευτικά κατά του οξειδωτικού στρες στα φυτικά κύτταρα με σύρωση των ελευθέρων ριζών που παράγονται από το φωτοσυνθετικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Επιπλέον, λόγω των ευνοϊκών τους ιδιοτήτων απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας, τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά από την ακτινοβολία του ήλιου και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούνται από αυτή. (Pietta et al., 2000)

Ως φαινολικές ενώσεις, είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά και μάλιστα έχουν προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον τελευταία λόγω των πιθανών ευεργετικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία στην καταπολέμηση ασθενειών. Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν ως αντιοξειδωτικά εξαρτάται από τη μοριακή δομή τους. Η θέση των υδροξυλικών ομάδων

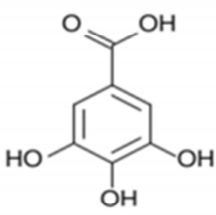
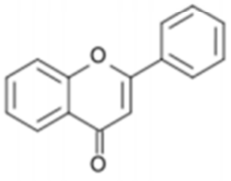
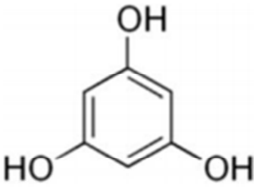
και άλλα χαρακτηριστικά στη χημική δομή τους είναι σημαντικοί παράγοντες για την αντιοξειδωτική δράση και τη δράση τους κατά των ελευθέρων ριζών. (Kalita et al., 2013)

Συγκεκριμένα, όπως όλα τα αντιοξειδωτικά, δρουν ευεργετικά κατά πολλών χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος (Birt et al., 2001, Middleton et al., 2000), οι φλεγμονές (Manthey et al 2001, Middleton et al, 2000), οι καρδιαγγειακές (Kris-Etherton και Keen 2002, Mennen et al. 2004) και νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Lu et al., 2010, Moosmann and Behl 2002) και άλλα προβλήματα υγείας όπως η οστεοαρθρίτιδα (Farid et al., 2010) και οι οφθαλμικές διαταραχές (Majumdar και Srirangam 2010), ενώ δρουν ως φυτο-οιστρογόνα (Cherdshewasart et al, 2007, Han et al. 2002) αλλά και κατά του θυροειδούς (Chandra and De 2010; Chandra et al. 2010).

4.3.2. Τανίνες

Σύμφωνα με τον ορισμό των Bate-Smith και Swain, οι τανίνες είναι "υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις που έχουν μοριακά βάρη μεταξύ 500 και 3000. Εκτός από τη συμμετοχή τους στις συνήθεις φαινολικές αντιδράσεις, διαθέτουν ειδικές ιδιότητες όπως η ικανότητα να καθιζάνουν αλκαλοειδή, ζελατίνη και άλλες πρωτεΐνες". (Amarowicz 2007)

Πολλές ομάδες φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν τις γενικές ιδιότητες των τανινών όπως ορίζονται από τον Bate-Smith, είναι αρκετά διαφορετικές μεταξύ τους όσον αφορά τη χημική τους δομή, όπως απεικονίζεται από τις αντιπροσωπευτικές ενώσεις που φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. Οι φυτοχημικοί έχουν διαχωρίσει τις τανίνες σε τρεις κύριες κατηγορίες (α) τις συμπυκνωμένες τανίνες (δηλ. προανθοκυανιδίνες), οι οποίες απελευθερώνουν ανθοκυανιδίνες σε υψηλές θερμοκρασίες σε διαλύματα αλκοόλης ή σε ισχυρό ανόργανο οξύ (β) οι γαλοτανίνες και οι ελλαγιτανίνες ανήκουν στην οικογένεια των υδρολυόμενων τανινών και (γ) οι φλορογλουκινόλες είναι υπομονάδες φλοροτανινών, οι οποίες υπάρχουν μόνο σε θαλάσσια καφέ άλγη. (Hagerman et al., 1998, Amarowicz 2007)

Base Unit:	 Gallic Acid	 Flavone	 Phloroglucinol
Class/Polymer:	Hydrolyzable Tannins	Condensed Tannins	Phlorotannins
Sources	Plants	Plants	Brown algae

Εικόνα 11: Οι τανίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες - υδρολυόμενες τανίνες, συμπυκνωμένες τανίνες και φλοροτανίνες. (Praveen Kumar Asho et al., 2012)

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τανίνες βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτά και σε όλα τα κλίματα σε όλο τον κόσμο. Τα χαμηλότερα φυτά όπως τα άλγη, οι μύκητες και τα βρύα δεν παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε τανίνες. Το ποσοστό των τανινών που υπάρχει στα φυτά, ωστόσο, ποικίλλει. Ενώ ορισμένα φυτά παρουσιάζουν σημαντικές αναλογίες, πολλά άλλα έχουν πολύ χαμηλές περιεκτικότητες. Οι τανίνες συνήθως βρίσκονται σε μεγάλες

ποσότητες στο φλοιό των δέντρων, όπου λειτουργούν ως φραγμός για τους μικροοργανισμούς και προστατεύουν το δέντρο. Δεδομένου ότι τα φυτά είναι ακίνητα, χρειάζονται μια αποτελεσματική άμυνα έναντι ορισμένων επιβλαβών εξωτερικών επιδράσεων, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία. Είναι σε θέση να υπερασπιστούν τον εαυτό τους σε κάποιο βαθμό ενάντια στην κατανάλωσή τους από ζώα ή από επιθέσεις από μύκητες, βακτήρια και ιούς. Τα φλαβονοειδή και οι τανίνες, ως πικρές ενώσεις των επιφανειών των φυτών, διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην άμυνα έναντι αυτών των επιβλαβών εξωτερικών επιρροών. Επιπλέον, υψηλή περιεκτικότητα σε τανίνες ευνοεί την ανάπτυξη φυτών σε φτωχό έδαφος, όπου τα ίδια φυτικά είδη με χαμηλή περιεκτικότητα σε τανίνες δεν μπορούν να αναπτυχθούν. (Häsig et al., 1999, Praveen Kumar Asho et al., 2012)

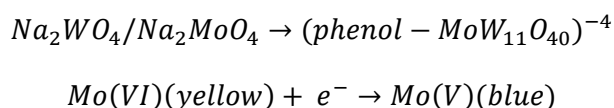
Επίσης, οι τανίνες δε λειτουργούν αποκλειστικά ως πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (δηλ. ως δότες ατόμων υδρογόνου ή ηλεκτρονίων), αλλά και ως δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά. Συγκεκριμένα, όπως και τα φλαβονοειδή, ασκούν, μεταξύ άλλων, τις ακόλουθες δράσεις: (1) αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, (2) σάρωση των ριζών οξυγόνου, (3) δέσμευση και αδρανοποίηση προ-οξειδωτικών μεταλλικών στοιχείων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, και (4) δέσμευση πρωτεϊνών με καταστολή της ενζυμικής δραστηριότητάς τους (αναστολή πρωτεάσης). Με αυτές τις αναγωγικές δραστηριότητες, οι ίδιες οι τανίνες οξειδώνονται. (Häsig et al., 1999, Amarowicz 2007)

4.4. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών συστατικών

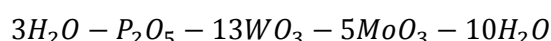
4.4.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Η δοκιμασία Folin-Ciocalteu (F-C) αναπτύχθηκε το 1927 για τη μέτρηση της τυροσίνης. Το αντιδραστήριο αποτελείται από ένα μίγμα μολυβδαινικού νατρίου, βολφραμικού νατρίου και άλλων αντιδραστηρίων. Κατά την αντίδραση με φαινόλες, παράγει ένα μπλε χρώμα το οποίο απορροφά στα 765 nm. Πιστεύεται ότι το μπλε χρώμα οφείλεται σε ένα σύμπλοκο είδος Mo (V). Ο προσδιορισμός έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και πολλά χρόνια από τη βιομηχανία τροφίμων και τη γεωργία για τον προσδιορισμό της φαινολικής περιεκτικότητας φυτικών προϊόντων. (Folin O., 1927, Singleton and Rossi, 1965, Prior R. et al. 2005)

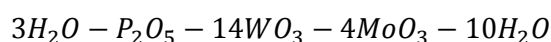
Η αρχική μέθοδος F-C που αναπτύχθηκε το 1927 προέρχεται από χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση τυροσίνης, όπου η οξείδωση των φαινολών από ένα αντιδραστήριο μολυβδοδεσμευτικού αποδίδει ένα έγχρωμο προϊόν με λ_{max} στα 745-750 nm:



Η μέθοδος είναι απλή, ευαίσθητη και ακριβής. Ωστόσο, η αντίδραση είναι αργή σε όξινο pH και στερείται εξειδίκευσης. Οι Singleton και Rossi βελτίωσαν τη μέθοδο με τα αντιδραστήρια



και



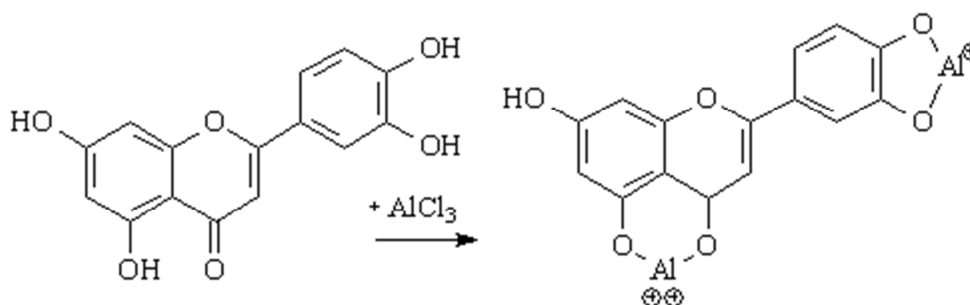
που ανάγουν τις φαινόλες πιο εξειδικευμένα. Το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης, λ_{max}, για το προϊόν είναι 765 nm. Επίσης επέβαλαν υποχρεωτικά μέτρα και προϋποθέσεις

για τη λήψη αξιόπιστων και προβλέψιμων δεδομένων: (1) κατάλληλη αναλογία όγκου αλκαλίων και αντιδραστηρίων F-C, (2) βέλτιστο χρόνο αντίδρασης και θερμοκρασία για την ανάπτυξη χρώματος. (3) παρακολούθηση της οπτικής πυκνότητας στα 765 nm. και (4) χρήση του γαλλικού οξέος ως στάνταρ φαινόλη αναφοράς. Η βελτιωμένη μέθοδος που περιγράφεται από το Singleton και τον Rossi καθόρισε τις συνθήκες ελαχιστοποίησης της μεταβλητότητας και της εξάλειψης των ασταθών αποτελεσμάτων. (Folin O., 1927, Singleton and Rossi , 1965, Prior R. et al. 2005)

4.4.2. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών (μέθοδος χλωριούχου αργιλίου)

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών βασίζεται στην συμπλοκοποίησή τους με το χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) και στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του σχηματιζόμενου συμπλόκου, η οποία παρέχει μία βροχοχρωμική μετατόπιση και το υπερχρωμικό αποτέλεσμα. Σε αυτή τη μέθοδο, αρκετοί παράγοντες είναι κρίσιμοι για τον σχηματισμό συμπλόκων φλαβονοειδούς- AlCl_3 και πρέπει να βελτιστοποιηθούν για να βελτιωθεί η απόδοση της μεθόδου, όπως ο χρόνος αντίδρασης, η συγκέντρωση του μέσου συμπλοκοποίησης, η αναλογία φλαβονοειδών/φυτικού υλικού και η χημική δομή της πολυφαινόλης. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πολυπαραγοντική προσέγγιση για την αξιολόγηση της επίδρασης των κρίσιμων μεταβλητών στην επιλεγμένη απόκριση. (Dantas Fernandes et al. 2012)

Η αρχή που εμπλέκεται στην χρωματομετρική μέθοδο του χλωριούχου αλουμινίου (AlCl_3) είναι ότι το AlCl_3 σχηματίζει όξινα σταθερά σύμπλοκα με τις ομάδες κετόνης C-4 και είτε την ομάδα υδροξυλίου C-3 ή C-5 φλαβονών και φλαβονολών. Επιπλέον, επίσης σχηματίζει συμπλέγματα ασταθή σε οξύ με τις ορθο-διϋδροξυλομάδες στον δακτύλιο A ή B των φλαβονοειδών.

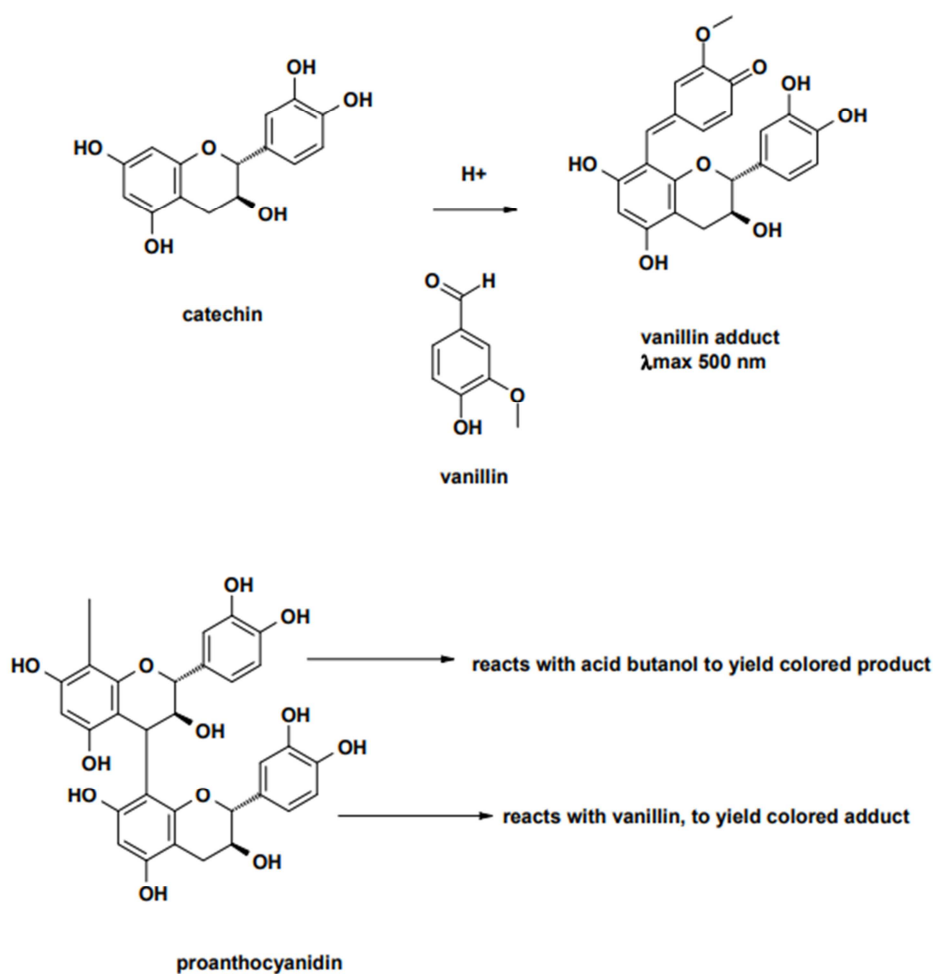


Εικόνα 12: Σύμπλοκο φλαβονοειδούς-χλωριούχου αργιλίου.

4.4.3. Προσδιορισμός συμπυκνωμένων τανινών (μέθοδος οξινισμένης βανιλίνης)

Αυτή η μέθοδος της λειτουργικής ομάδας για συμπυκνωμένες τανίνες χρησιμοποιείται ευρέως ιδιαίτερα από γεωπόνους. Η κατανόηση της δομικής χημείας των συμπυκνωμένων τανινών και φλαβονοειδών είναι απαραίτητη για την ορθή χρήση της συγκεκριμένης ανάλυσης. Η αντίδραση βανιλίνης περιλαμβάνει την αντίδραση μίας αρωματικής αλδεϋδης, της βανιλίνης, με τον μετα-υποκατεστημένο δακτύλιο φλαβονολών, για να δώσει ένα ερυθρό προϊόν προσθήκης. Αν και η αντίδραση βανιλίνης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση συμπυκνωμένων τανινών (προανθοκυανιδίνες), η αντίδραση δεν είναι εξειδικευμένη για συμπυκνωμένες τανίνες. Οποιαδήποτε κατάλληλα υποκατεστημένη φλαβανόλη αντιδρά στην ανάλυση. Επομένως, το τυπικό "μονομερές" των συμπυκνωμένων

τανινών, η κατεχίνη, αντιδρά επίσης για να αποδώσει ένα προϊόν προσθήκης ερυθρού χρώματος.



Εικόνα 13: Αντίδραση οξινισμένης βανιλίνης για τον προσδιορισμό συμπυκνωμένων τανινών.

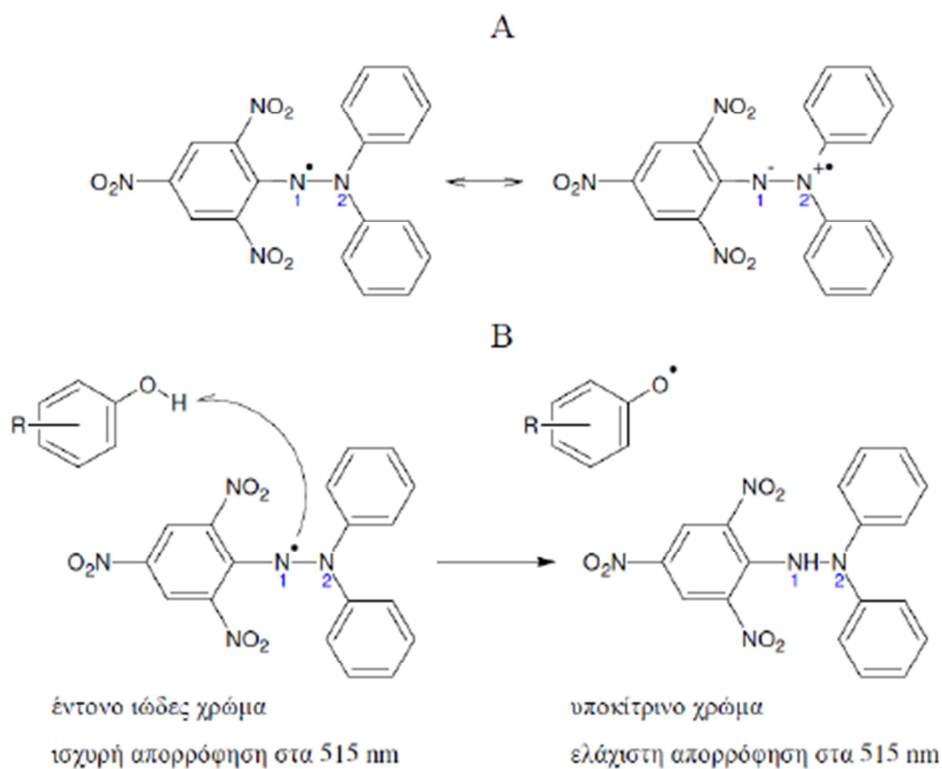
Η κατεχίνη χρησιμοποιείται συνήθως για την τυποποίηση της αντίδρασης βανιλίνης, αν και παρουσιάζονται προβλήματα κατά την ερμηνεία της έννοιας των "ισοδύναμων κατεχίνης". Υπό κανονικές συνθήκες για την ανάλυση βανιλίνης (διαλύτης μεθανόλη), οι τανίνες (προανθοκυανιδίνες) και η κατεχίνη αντιδρούν με τη βανιλίνη, αλλά οι ρυθμοί αντίδρασης του πολυμερούς και του μονομερούς είναι αρκετά διαφορετικοί. Γενικά, η απόδοση χρώματος είναι χαμηλότερη για το μονομερές από ότι για το πολυμερές. Αν και οι απορροφήσεις που λαμβάνονται από τη διεξαγωγή της αντίδρασης βανιλίνης σε μεθανόλη σε ένα άγνωστο δείγμα που περιέχει τανίνες μπορούν να μετατραπούν σε "ισοδύναμα κατεχίνης", οι πολυπλοκότητες του συστήματος καθιστούν δύσκολη την ερμηνεία της έννοιας αυτών των ισοδυνάμων στο μοριακό επίπεδο. Η τροποποιημένη μέθοδος βανιλίνης αναπτύχθηκε για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, αλλά αποδεικνύεται περισσότερο χρήσιμη για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των συμπυκνωμένων τανινών από ότι για την ποσοτική ανάλυση. (Price et al. 1978)

4.4.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος αντιδραστηρίου DPPH)

Η αλληλεπίδραση μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών παρέχει άμεσες αποδείξεις για την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και έχει

χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αξιολόγηση της ικανότητάς τους στην απομάκρυνση ριζών. Ρίζες όπως το DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζιλίου) έχουν ισχυρή απορρόφηση στην ορατή περιοχή, ενώ η απορρόφηση τους μειώνεται αναλογικά όταν λαμβάνουν ένα ηλεκτρόνιο ή υδρογόνο από τα αντιοξειδωτικά. Έτσι, η ικανότητα απομάκρυνσης ελευθέρων ριζών των αντιοξειδωτικών μπορεί να αξιολογηθεί με βάση την αλλαγή της απορρόφησης. (Ak T. and Gulcin I., 2008)

Το DPPH έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών από διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες. Στον προσδιορισμό DPPH, τα αντιοξειδωτικά είναι ικανά να δώσουν ένα υδρογόνο για την αναγωγή της σταθερής ρίζας DPPH με ιώδες χρώμα προς τη ένωση διφαινυλο-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H), μια ένωση με κίτρινο χρωματισμό. Το DPPH χρησιμοποιείται συνήθως ως αντιδραστήριο για την αξιολόγηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών με βάση την αλλαγή απορρόφησης του στα 515 nm μετρούμενη φασματοφωτομετρικά. (Ak T. And Gulcin I., 2008, Kang et al., 2008, Dairam et al., 2008, Fogliano et al., 1999)



Εικόνα 14: Α. Οι δομές συντονισμού της ρίζας DPPH. Β. Η αντίδραση του DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών.

5. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων

5.1. Μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία

Η μελέτη των βοτάνων περιλαμβάνει την απομόνωση και τον προσδιορισμό των δομών των ενώσεών τους, για την κατανόηση και την αξιολόγηση του θεραπευτικού τους δυναμικού. Ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ταχεία εκχύλιση από διαφορετικές μήτρες και για την ακριβή ανάλυση αυτών των ενεργών ενώσεων των βοτάνων αύξησε την ανάγκη για βελτιστοποίηση του πειραματικού σχεδιασμού, για καλύτερη ανάκτηση, χαμηλή κατανάλωση

διαλύτη και μειωμένους χρόνους εκχύλισης. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τη μελέτη των οργανικών ενώσεων των φυτών και της δραστηριότητάς τους έχει αυξηθεί. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι εκχύλισης και αναλυτικές μέθοδοι όπως η φασματοφωτομετρία, η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, η αεριοχρωματογραφία (GC) με ανίχνευση ιονισμού φλογών (FID) και η φασματομετρία αέριας χρωματογραφίας-μάζας (GC-MS). Ο συνδυασμός μιας ιδανικής τεχνολογίας διαχωρισμού (GC) με την καλύτερη τεχνική ταυτοποίησης (MS) έκανε το GC-MS ιδανική τεχνική για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων. Επιπλέον, απαιτείται όμως και η χρήση κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης. (Andreea Maria I. et al. 2009)

Το πράσινο τσάι, όπως ο *sideritis*, καθώς και το μαύρο τσάι έχουν εξεταστεί από πολλούς ερευνητές για το περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες. Στα φυτικά υλικά είναι δύσκολο να προσδιοριστούν μεμονωμένες φλαβονοειδείς γλυκοσίδες. Έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι ανάλυσης για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων που βασίζονται κυρίως στην τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με φασματοφωτομετρία υπεριώδους ακτινοβολίας επειδή δεν απαιτείται παραγωγοποίηση πριν από την ανάλυση. Ωστόσο, σε σύγκριση με τη φασματομετρία μάζας (MS), το φάσμα UV-Vis δεν παρέχει επαρκή ισχύ προσδιορισμού. Ως εκ τούτου, η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (GC-MS) μπορεί να δώσει ακριβέστερα αποτελέσματα. (Proestos et al., 2013)

Ο προσδιορισμός του προφίλ αναφέρεται στη λεπτομερή ανάλυση με τεχνικές σύζευξης όπως η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC / MS), η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC / MS) ή η φασματομετρία μάζας τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE / MS). Τέτοιες τεχνικές παρέχουν ένα λεπτομερές χρωματογραφικό προφίλ του δείγματος και συνεπώς μετρήσεις των σχετικών ή απόλυτων ποσοτήτων των συστατικών του. Ο αριθμός των μετρούμενων συστατικών εξαρτάται από την ανάλυση του χρωματογραφικού συστήματος και την εξειδίκευση της τεχνικής ανίχνευσης. Ένα φασματόμετρο μάζας μπορεί να λειτουργήσει ως ένας ιδιαίτερα εξειδικευμένος ανιχνευτής χρωματογραφίας και ένα φασματόμετρο μάζας υψηλής ανάλυσης ακόμη περισσότερο. (Halket et al., 2005)

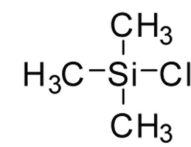
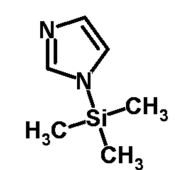
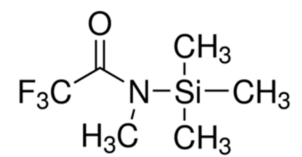
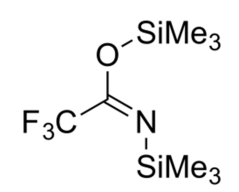
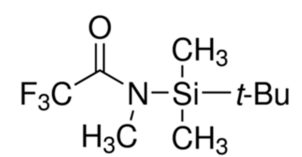
5.2. Μέθοδος παραγωγοποίησης

Η παραγωγοποίηση είναι μια χημική διαδικασία για την τροποποίηση ενώσεων με σκοπό την παραγωγή νέων προϊόντων με καλύτερες χρωματογραφικές ιδιότητες. Αρκετοί είναι οι λόγοι, για τους οποίους μπορεί να απαιτείται το στάδιο παραγωγοποίησης, όπως για παράδειγμα η βελτίωση της θερμικής σταθερότητας κάποιων ενώσεων που περιέχουν πολικές λειτουργικές ομάδες βελτιώνοντας την πτητικότητά τους και εισάγοντας στο μόριο έναν δείκτη προσανατολισμένο στον ανιχνευτή. Για την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας (GC), μόρια που περιέχουν λειτουργικές ομάδες όπως -COOH, -OH, -NH και -SH προκαλούν μεγάλη ανησυχία λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ενώσεων. Αυτό οδηγεί σε ασθενή πτητικότητα, σε ανεπαρκή θερμική σταθερότητα ή μπορεί να προκαλέσει αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με το πληρωτικό υλικό της στήλης με αποτέλεσμα χαμηλή ανιχνευσιμότητα. Κάποιες φορές, τα μη παραγωγοποιημένα μόρια παράγουν επίσης αδρανή χρωματογραφήματα λόγω πολλαπλών κορυφών ή κακών διαχωρισμών των στερεοϊσομερών. Η παραγωγοποίηση με ένα εκλεκτικό αντιδραστήριο βελτιώνει την ανιχνευσιμότητα σε δείγματα σύνθετης μήτρας και η παραγωγοποίηση με χειρόμορφα αντιδραστήρια βελτιώνει τον διαχωρισμό των κορυφών. Μερικοί φυτικοί

μεταβολίτες όπως αυτοί που περιέχονται στα αιθέρια έλαια είναι ιδιαίτερα κατάλληλοι για ανάλυση GC / MS χωρίς παραγωγολοποίηση. Πάντως, η χημική παραγωγολοποίηση απαιτείται συνήθως για να μειωθούν οι πολικότητες των λειτουργικών ομάδων και να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός τους με GC και μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες του φάσματος μάζας τους . (Halket et al., 2005, Schummer et al., 2009)

5.2.1. Αντίδραση σιλυλίωσης

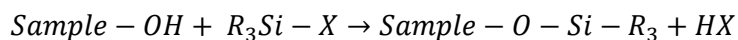
Η παραγωγολοποίηση γίνεται συνήθως με υποκαταστάσεις στην πολική λειτουργία, όπου οι πιο κοινές αντιδράσεις είναι η αλκυλίωση, η ακυλίωση και η σιλυλίωση. Η σιλυλίωση είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική παραγωγολοποίησης και τα κοινά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το TMCS, TMSI, MSTFA, BSTFA και MTBSTFA, εκ των οποίων τα δύο τελευταία χρησιμοποιούνται συχνότερα, ιδιαίτερα όταν αναλύονται φαινολικές ενώσεις, στερόλες και σάκχαρα. (Schummer et al., 2009)

Συντομογραφία	Πλήρης ονομασία	Δομή
TMCS	Trimethylsilyl Chloride	
TMSI	Trimethylsilyl Imidazole	
MSTFA	2,2,2-trifluoro-N-methyl-N-trimethylsilylacetamide	
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	
MTBSTFA	N-Methyl-N-tert-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide	

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για παραγωγολοποίηση

Η αντίδραση σιλυλίωσης μετατρέπει τις ομάδες υδροξυλίου στα αντίστοιχα τριμεθυλοσιλυλοπαράγωγά τους μέσω αντίδρασης υποκατάστασης, η οποία αποδίδει ένα κύριο προϊόν για κάθε ένωση με υψηλή απόδοση μετατροπής. Συγκεκριμένα, ένα ασταθές υδρογόνο από οξέα, αλκοόλες, θειόλες, αμίνες, αμίδια ή ενολιζόμενες κετόνες και αλδεύδες αντικαθίσταται από μια ομάδα τριμεθυλοσιλυλίου. Η αντίδραση συμβαίνει μέσω νουκλεοφιλικής προσβολής και η παρουσία μιας ισχυρής αποχωρούσας ομάδας συχνά

βελτιώνει την απόδοση της αντίδρασης. Τα προϊόντα είναι γενικά πιο πτητικά και θερμικά σταθερά. Σε αντίθεση με την ακυλίωση, η σιλυλίωση κανονικά δεν απαιτεί στάδιο καθαρισμού και τα παράγωγα μπορούν να εγχυθούν απευθείας στο GC. (Schummer et al., 2009, Pietrogrande et al., 2009)



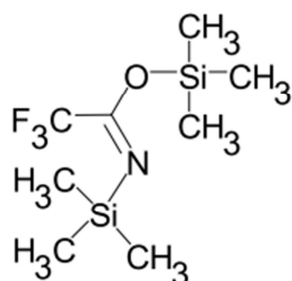
Η γενική αντίδραση για σιλυλίωση παρουσιάζεται στην παραπάνω εξίσωση. Η ιδανική αποχωρούσα ομάδα σιλυλίου πρέπει να είναι τέτοια ώστε να χάνεται εύκολα από τη μεταβατική κατάσταση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αλλά να διαθέτει επαρκή χημική σταθερότητα σε συνδυασμό με την αλκυλο σιλυλομάδα για να επιτρέπει μακροπρόθεσμη αποθήκευση του παράγοντα παραγωγοποίησης για χρήση όπως απαιτείται. Καθώς ο σχηματισμός της μεταβατικής κατάστασης είναι αναστρέψιμος, η παραγωγοποίηση θα ολοκληρωθεί μόνο εάν η βασικότητα της αποχωρούσας ομάδας υπερβεί την βασικότητα της ομάδας που αντικαθιστά. (Ross 1977, Gallo et al., 1995, Pena et al., 1995, Wenclawiak et al., 1993, Molever 1993, Iijima et al., 1992, Fraser et al., 1991)

5.2.2. Παραγωγοποίηση με BSTFA

Το BSTFA όπως και το BSA (N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide) είναι τα δύο δημοφιλέστερα αντιδραστήρια για τον σχηματισμό παραγώγων σιλυλίωσης. Αντιδρούν γρήγορα με οργανικά οξέα για να δώσουν υψηλές αποδόσεις. Το BSTFA αντιδρά ταχύτερα και πιο ολοκληρωτικά από το BSA, λόγω της παρουσίας τριφθοροακετυλομάδας. (Orata et al., 2012)

BSTFA

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

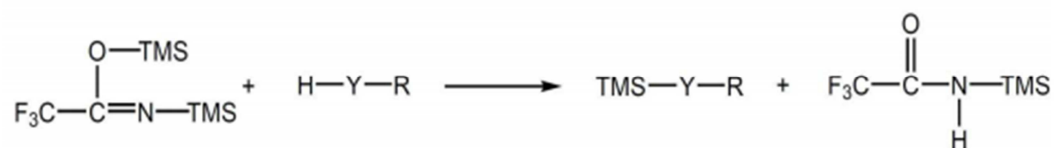


Molecular Formula: $\text{CF}_3\text{C}=\text{NSi}(\text{CH}_3)_3\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$
CAS Number: 25561-30-2
Formula Weight: 257.40
bp: 45-55°/14mm
Flash Point: 75°F (23°C)
d: 0.969
 n_D : 1.384 at 20°C
Appearance: Clear, colorless to very light yellow liquid, moisture sensitive

Εικόνα 15: Βασικά χαρακτηριστικά του BSTFA

Η υψηλή πτητικότητα του BSTFA και των υποπροϊόντων του έχει σαν αποτέλεσμα τον διαχωρισμό κορυφών πρώιμης έκλυσης. Επιπλέον, τα προϊόντα του είναι θερμικά σταθερά, αλλά πιο ευαίσθητα στην υδρόλυση από τις αρχικές ενώσεις, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν χαμηλό θόρυβο ανίχνευσης και ρύπανση. Ακόμα, το BSTFA είναι πολύ προσαρμοστικό, αντιδρά δηλαδή με πληθώρα πολικών οργανικών ενώσεων, γρήγορα και ολοκληρωτικά. Επίσης, είναι πολύ διαλυτό στους πιο συνηθισμένους διαλύτες σιλυλίωσης. Έχει καλή διαλυτική ικανότητα και μπορεί να λειτουργεί ως αντιδραστήριο σιλυλίωσης χωρίς επιπλέον διαλύτες. Επιπρόσθετα, σε αντίθεση με την αλκυλίωση, η σιλυλίωση κανονικά δεν απαιτεί στάδιο καθαρισμού και τα παράγωγα μπορούν να εγχυθούν απευθείας στο σύστημα GC. Παρ'όλα αυτά, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι το αντιδραστήριο σιλυλίωσης είναι επικίνδυνο και μπορούν να παραχθούν κάποια παραπροϊόντα κατά την αντίδραση. Επίσης, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην αποτροπή της εισόδου νερού στα

δείγματα, καθώς αυτό οδηγεί σε υδρόλυση του αντιδραστηρίου BSTFA και παρεμποδίζει την παραγωγοποίηση των στοχευμένων ενώσεων. (Ross 1977, Gallo et al., 1995, Pena et al., 1995, Wenclawiak et al., 1993, Molever 1993, Iijima et al., 1992, Fraser et al., 1991, Pietrogrande et al., 2009, Orata et al., 2012)



Εικόνα 16: Αντίδραση παραγωγοποίησης με BSTFA

Πειραματικό μέρος

Αναλυτική περιγραφή πειραμάτων

1. Αντιδραστήρια & Όργανα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

1. Ζυγός ακριβείας Adventurer OHAUS ($\pm 0,0001\text{g}$)
2. Milestone Start D - Microwave Digestion System
3. Vibra Cell VCX 400 της Sonics and Materials
4. V-770 UV/Vis Spectrophotometer της Jasco
5. S-22 UV/Vis Spectrophotometer της BOECO
6. Varian 450GC (Χρωματογραφική στήλη VF-23ms της Agilent με διαστάσεις $60\text{m}\times 0,25\text{mm}\times 0,25\mu\text{m}$) & Varian Mass Spectrometer 220 MS Ion Trap

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Methanol HPLC grade, $\geq 99,9\%$ Sigma-Aldrich
2. Ethanol, absolute, for HPLC, $\geq 99,8\%$ Sigma-Aldrich
3. Glycerol, $\geq 99\%$ Sigma-Aldrich
4. 1M Sodium Hydroxide (NaOH) Sigma-Aldrich
5. Hydrochloric Acid (HCl) 37% Sigma-Aldrich
6. Ανθρακικό Νάτριο (Sodium Hydrogen Carbonate- NaHCO_3), 99.7 - 100.3 % Merck
7. Νιτρώδες Νάτριο (Sodium Nitrite- NaNO_2), $\geq 99\%$ Sigma-Aldrich
8. Χλωριούχο Αλουμίνιο (Aluminum Chloride- AlCl_3), $\geq 99\%$ Sigma-Aldrich
9. Folin-Ciocalteu Reagent (FCR), Sigma-Aldrich
10. Γαλλικό οξύ (Gallic Acid), 97.5-102.5% Sigma-Aldrich
11. Κατεχίνη (Catechin), $\geq 99.0\%$ Sigma-Aldrich
12. Κερκετίνη (Quercetin), $\geq 95\%$ Sigma-Aldrich
13. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Sigma-Aldrich
14. Βανιλίνη (Vanillin), $\geq 98\%$ Sigma-Aldrich
15. N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), Sigma-Aldrich

2. Μέθοδοι

2.1. Προετοιμασία εκχυλισμάτων

Το φυτό *Sideritis clandestina* παραλήφθηκε αποξηραμένο από την εταιρία APIVITA S.A. και αρχικά υπέστη τεμαχισμό. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του φυτού με διαλύτες γλυκερόλη/ νερό 1:1 υπό 3 διαφορετικές μεθόδους (συμβατική, υποβοηθούμενη από μικροκύματα, υποβοηθούμενη από υπερήχους) και σε 3 διαφορετικές περιεκτικότητες (2,5% w/v, 5% w/v, 7,5% w/v) με στόχο τη μελέτη της επίδρασης της μεθόδου στη βιοδραστικότητα του εκάστοτε εκχυλίσματος. Επιπλέον, με τις 3 αυτές μεθόδους παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα σε διαλύτη αιθανόλη περιεκτικότητας 5% w/v, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του φυτοχημικού προφίλ μέσω αέριας χρωματογραφίας.

Μέθοδος/ Δείγμα		% Περιεκτικότητα εκχυλίσματος	Μάζα φυτού (g)	Όγκος διαλύτη (ml)	
Εκχυλίσματα Γλυκερόλης/Νερού 1:1	Conventional 24h	2,5	0,5041	20	
		5	0,4958	10	
		7,5	0,7507	10	
	Conventional 72h	2,5	0,4965	20	
		5	1,0095	20	
		7,5	1,515	20	
	Microwave 20°C	2,5	0,5190	20	
		5	0,9977	20	
		7,5	1,5065	20	
	Microwave 40°C	2,5	0,5067	20	
		5	1,0112	20	
		7,5	1,5069	20	
	Microwave 60°C	2,5	0,2531	10	
		5	0,5082	10	
		7,5	0,7519	10	
	Microwave 100°C	2,5	0,5052	20	
		5	1,0779	20	
		7,5	1,5029	20	
	Ultrasonic 40%	2,5	0,4988	20	
		5	1,0075	20	
		7,5	1,4970	20	
	Εκχυλίσματα Αιθανόλης	Conventional 24h	5	0,4982	10
		Conventional 72h	5	0,5047	10
		Microwave 60°C	5	0,5077	10
		Ultrasonic 40%	5	0,4998	10

Πίνακας 2: Μάζα φυτού και όγκος διαλύτη προ εκχύλισης.

2.1.1. Συμβατική εκχύλιση (Conventional Extraction)

Δείγματα του φυτού εκχυλίστηκαν για 24h και 72h υπό ήπια μαγνητική ανάδευση. Έπειτα, τα δείγματα διηθήθηκαν, τα στερεά υπολείμματά τους απορρίφθηκαν, ενώ τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε περιέκτες δειγμάτων και φυλάχτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.1.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction -MAE)

Το φυτό εκχυλίστηκε για 30 λεπτά σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες (20°C, 40°C, 60°C, 100°C) για την παρασκευή των εκχυλισμάτων με διαλύτη γλυκερόλη/νερό, ενώ για το εκχύλισμα αιθανόλης επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 60°C. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε Milestone Start D - Microwave Digestion System και έπειτα το κάθε δείγμα διηθήθηκε, το στερεό υπόλειμμα απορρίφθηκε και τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν σε περιέκτες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.1.3. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasonic Assisted Extraction - UAE)

Τα δείγματα του φυτού εκχυλίστηκαν με υπερήχους για 30 λεπτά, σε Vibra Cell VCX 400 της Sonics and Materials σε ένταση 40% της μέγιστης απόδοσης του οργάνου και έπειτα τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν και τα στερεά υπολείμματα απορρίφθηκαν.

2.2. Ανάλυση βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων

2.2.1. Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content)

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε μέσω της φωτομετρικής μεθόδου Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Στη συγκεκριμένη μέθοδο αναμειγνύονται 0,5ml διαλύματος εκχυλίσματος σε αιθανόλη σε κατάλληλη αραιώση, 2,5ml υδατικού διαλύματος Folin-Ciocalteu 10% και 2,5ml υδατικού διαλύματος NaHCO₃ 7,5%. Τα δείγματα στη συνέχεια επιάζονται για 30 λεπτά στους 4°C και έπειτα προσδιορίζεται η απορρόφησή τους σε $\lambda_{\max}=760\text{nm}$ χρησιμοποιώντας V-770 UV/Vis Spectrophotometer της Jasco.

Το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιείται περιέχει 0,5ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 40%, 2,5ml υδατικού διαλύματος Folin-Ciocalteu 10% και 2,5ml υδατικού διαλύματος NaHCO₃ 7,5%, ενώ η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με διαλύματα γαλλικού οξέος σε διάφορες συγκεντρώσεις (20μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml).

Τα δείγματα κάθε εκχυλίσματος παρασκευάζονται εις τριπλούν για κάθε ανάλυση και τελικά λαμβάνεται η μέση τιμή απορρόφησης. Με βάση την μετρούμενη απορρόφηση, η συγκέντρωση φαινολικών (mg/L) υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης και η περιεκτικότητα φαινολικών στα εκχυλίσματα εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg γαλλικού οξέος /g αρχικού φυτού). Ο υπολογισμός των φαινολικών ενώσεων σε συνάρτηση με το γαλλικό οξύ με βάση την απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος, έγινε μέσω της εξίσωσης που προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος.

Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC)}(mg/g) = \frac{C_{GA}(mg/L) \times V_{ext.solution}(L)}{m(g)}$$

Όπου: C_{GA} είναι η συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος που υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς, $V_{ext.solution}$ είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος προ εκχύλισης και m , η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια.

2.2.2. Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content)

Για την εύρεση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων σε κάθε εκχύλισμα προς μελέτη, χρησιμοποιείται, η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου (Chang et al., 2002). Στη συγκεκριμένη μέθοδο αναμειγνύονται 1ml διαλύματος εκχυλίσματος σε μεθανόλη σε κατάλληλη αραιώση, 4ml απεσταγμένου νερού, 0,3ml υδατικού διαλύματος NaNO_2 5% και μετά το πέρας 5 λεπτών επώασης 0,3ml υδατικού διαλύματος AlCl_3 10%. Τα δείγματα στη συνέχεια αφήνονται για χρονικό διάστημα 6 λεπτών και στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 2ml διαλύματος NaOH 1mol/L και 2,4ml δις-απεσταγμένου νερού. Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα προσδιορίζεται η απορρόφησή τους σε $\lambda_{\max}=510\text{nm}$ χρησιμοποιώντας V-770 UV/Vis Spectrophotometer της Jasco.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται και για το τυφλό δείγμα, το οποίο αντί διαλύματος εκχυλίσματος περιέχει μεθανόλη. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με χρήση κερκετίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (20μg/ml , 40 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml).

Τα δείγματα κάθε εκχυλίσματος παρασκευάζονται εις τριπλούν για κάθε ανάλυση και τελικά λαμβάνεται η μέση τιμή απορρόφησης. Με βάση την μετρούμενη απορρόφηση, η συγκέντρωση φλαβονοειδών (mg/L) υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης και η περιεκτικότητα φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα εκφράζεται σε ισοδύναμα κερκετίνης (mg κερκετίνης /g αρχικού φυτού). Ο υπολογισμός των φλαβονοειδών ενώσεων σε συνάρτηση με την κερκετίνη με βάση την απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος, έγινε μέσω της εξίσωσης που προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων κερκετίνης.

Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Total Flavonoids Content (TFC)}(mg/g) = \frac{C_{QUE}(mg/L) \times V_{ext.solution}(L)}{m(g)}$$

Όπου: C_{QUE} είναι η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κερκετίνης που υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς, $V_{ext.solution}$ είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος προ εκχύλισης και m , η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια.

2.2.3. Μέτρηση ολικών τανινών (Total Condensed Tannins)

Για την εύρεση των ολικών τανινών σε κάθε εκχύλισμα προς μελέτη χρησιμοποιείται, η χρωματομετρική μέθοδος οξινισμένης βανιλίνης, (Broadhurst et al., 1978). Στη συγκεκριμένη μέθοδο αναμειγνύονται 0,5ml διαλύματος εκχυλίσματος σε μεθανόλη σε κατάλληλη αραιώση, 1,5ml μεθανολικού διαλύματος βανιλίνης 4% και 1,5 ml πυκνού HCl . Τα δείγματα στη συνέχεια αφήνονται για χρονικό διάστημα 15 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα προσδιορίζεται η απορρόφησή τους σε $\lambda_{\max}=500\text{nm}$ χρησιμοποιώντας S-22 UV/Vis Spectrophotometer της BOECO.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται και για το τυφλό δείγμα, το οποίο αντί διαλύματος εκχυλίσματος περιέχει μεθανόλη. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με χρήση κατεχίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (1 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml).

Τα δείγματα κάθε εκχυλίσματος παρασκευάζονται εις τριπλούν για κάθε ανάλυση και τελικά λαμβάνεται η μέση τιμή απορρόφησης. Με βάση την μετρούμενη απορρόφηση, η συγκέντρωση τανινών υπολογίζεται (mg/L) από την καμπύλη βαθμονόμησης και η περιεκτικότητα τανινών στα εκχυλίσματα εκφράζεται σε ισοδύναμα κατεχίνης (mg κατεχίνης /g αρχικού φυτού). Ο υπολογισμός των τανινών σε συνάρτηση με την κατεχίνη με βάση την απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος, έγινε μέσω της εξίσωσης που προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων κατεχίνης.

Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε τανίνες, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Total Condensed Tannins (TCC)}(mg/g) = \frac{C_{CAT}(mg/L) \times V_{ext.solution}(L)}{m(g)}$$

Όπου: C_{CAT} είναι η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης που υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς, $V_{ext.solution}$ είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος προ εκχύλισης και m , η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια.

2.2.4. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH (Antioxidant Activity)

Για τις δοκιμές DPPH χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Brand-Williams et al. (1995). Αρχικά, ζυγίζονται 0,0025 g DPPH, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα, προστίθεται κάποια ποσότητα μεθανόλης και ακολουθεί έντονη ανακίνηση, μέχρι πλήρη διάλυση του αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια γίνεται πλήρωση με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή της φιάλης και ακολουθεί εκ νέου ανάδευση. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται καθημερινά κατά το χρονικό διάστημα των μετρήσεων.

Ακολούθως, 0,1ml μεθανολικού διαλύματος του κάθε εκχυλίσματος σε κατάλληλη αραιώση προστίθεται σε 3,9ml διαλύματος DPPH (δείγμα συγκέντρωσης C) και ακολουθούν αραιώσεις του αρχικού αυτού διαλύματος σε συγκεντρώσεις 0,8C, 0,6C, 0,5C, 0,4C και 0,2C. Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου δηλαδή ολοκληρωθεί πρακτικά η χημική αντίδραση οξείδωσης, και έπειτα προσδιορίζεται η απορρόφησή τους σε $\lambda_{max}=515\text{nm}$ χρησιμοποιώντας V-770 UV/Vis Spectrophotometer της Jasco.

Το σύνολο των υπολογισμών, βασίζεται στην καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου DPPH (διάγραμμα $A_{DPPH} - C_{DPPH}$). Βάση της καμπύλης αυτής, υπολογίζεται η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος DPPH καθώς και του μη ανηγμένου DPPH μετά το τέλος της εκάστοτε αντίδρασης. Για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας της αντίδρασης αντιοξειδωτικού-DPPH, αρχικά γίνεται αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων σε τιμές συγκέντρωσης DPPH (μέσω της καμπύλης αναφοράς) και έπειτα κατασκευή του γραφήματος $C_{ant.} - \Delta C_{DPPH}$. Τέλος, γίνεται προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας, της οποίας η κλίση εκφράζει το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο αντιοξειδωτικού.

2.3. Ανάλυση φυτοχημικού προφίλ με αέρια χρωματογραφία (GC-MS)

2.3.1. Παραγωγοποίηση

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε παραγωγοποίηση των εκχυλισμάτων με χρήση του αντιδραστηρίου N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθοροακεταμίδιο (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA). Για το σκοπό αυτό, 0,5ml του κάθε εκχυλίσματος σε αιθανόλη εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκαν 250μl BSTFA. Τα δείγματα έπειτα θερμάνθηκαν για 20 λεπτά στους 70°C σε ελαιόλουτρο.

2.3.2. Αέρια χρωματογραφία

Για τον προσδιορισμό του προφίλ των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Varian 450GC. Ποσότητα 1μl από κάθε παραγωγοποιημένο εκχύλισμα εγχέεται στο χρωματογράφο με split ratio 1:20. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μια στήλη VF-23ms της Agilent με διαστάσεις 60m×0,25mm×0,25μm, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He) με παροχή 0,6 ml/min. Ο injector ρυθμίζεται σε θερμοκρασία 180°C και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλέγεται είναι το εξής: αρχική θερμοκρασία 70°C για 5 λεπτά, 70-130°C με ρυθμό 15°C/min, 130-160°C με ρυθμό 4°C/min και παραμονή για 15 λεπτά και τέλος 170-300°C με ρυθμό 10°C/min και παραμονή για 15 λεπτά. Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιείται Mass Spectrometer Varian 220 MS Ion Trap με Mass Range 40-650.

Παρουσίαση αποτελεσμάτων & Σχολιασμός

1. Μελέτη βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων

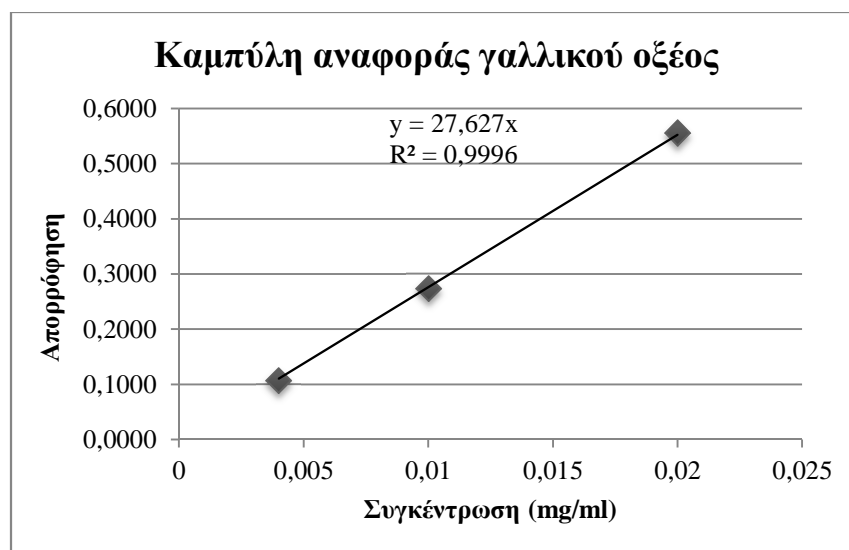
1.1. Εκχυλίσματα με διαλύτη Γλυκερόλη/Νερό 1:1

1.1.1. Ολικές Φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις απορρόφησης για την καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων.

Δείγμα	Συγκέντρωση διαλυμάτων γαλλικού οξέος (mg/L)	Αραιώσεις	Συγκέντρωση διαλυμάτων μετά την αραιώση (mg/mL)	Απορρόφηση (1)	Απορρόφηση (2)	Απορρόφηση (3)	M.O. Απορρόφησης
E1	20	5	0,004	0,1186	0,1022	0,0972	0,1060±0,0112
E2	50		0,01	0,2440	0,2942	0,2805	0,2729±0,0259
E3	100		0,02	0,5408	0,5788	0,5458	0,5551±0,0206

Πίνακας 3: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με πρότυπα διαλύματα

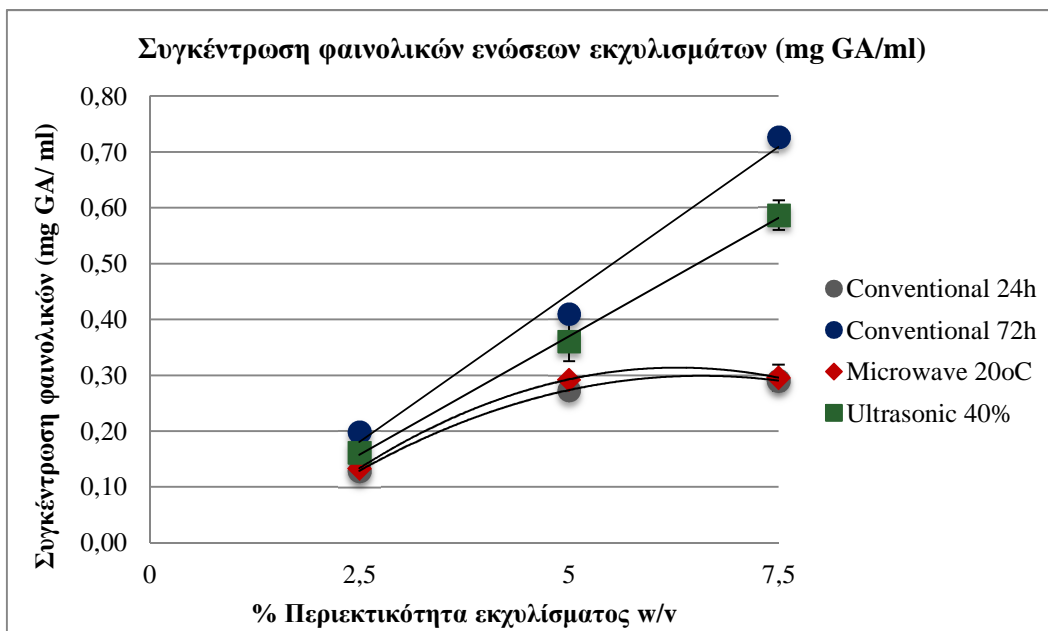


Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

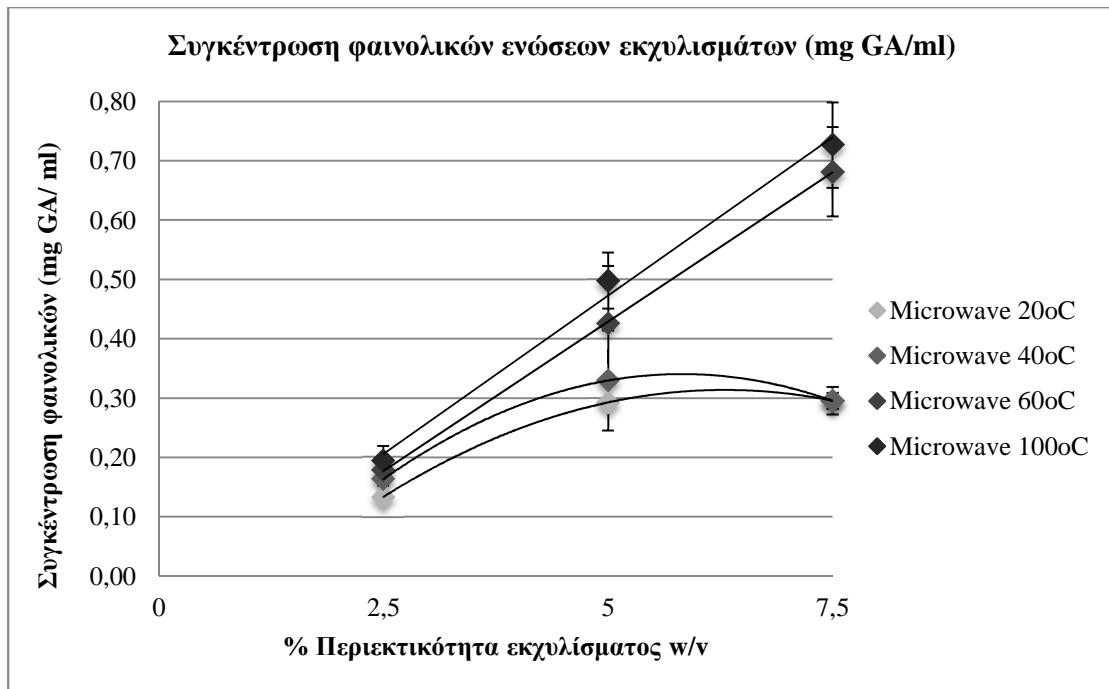
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος όρος της απορρόφησης κάθε αραιωμένου δείγματος εκχυλίσματος, η συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά ml εκχυλίσματος στο αρχικό εκχύλισμα, όπως επίσης και το συνολικό περιεχόμενο ολικών φαινολικών ενώσεων ανά γραμμάριο φυτού.

Δείγμα		Αραιώσεις	M.O. Απορρόφησης	C (mg GA/ml) εκχυλίσματος	TPC (mg GA/g φυτού)
Conventional 24h	2,50%	7	0,5092 ± 0,0077	0,1290 ± 0,0020	5,118 ± 0,078
	5%	9	0,8395 ± 0,0279	0,2735 ± 0,0091	5,516 ± 0,183
	7,50%	9	0,8914 ± 0,0325	0,2904 ± 0,0106	3,868 ± 0,141
Conventional 72h	2,50%	15	0,3652 ± 0,0123	0,1983 ± 0,0067	7,987 ± 0,269
	5%	15	0,7543 ± 0,0160	0,4095 ± 0,0087	8,114 ± 0,172
	7,50%	30	0,4459 ± 0,0126	0,7265 ± 0,0068	9,591 ± 0,090
Microwave 20°C	2,50%	25	0,1476 ± 0,0095	0,1336 ± 0,0086	5,147 ± 0,330
	5%	25	0,3235 ± 0,0050	0,2927 ± 0,0045	5,868 ± 0,090
	7,50%	25	0,3266 ± 0,0252	0,2956 ± 0,0228	3,924 ± 0,303
Microwave 40°C	2,50%	15	0,3009 ± 0,0213	0,1634 ± 0,0116	6,449 ± 0,457
	5%	15	0,6071 ± 0,1551	0,3296 ± 0,0842	6,519 ± 1,665
	7,50%	15	0,5438 ± 0,0243	0,2953 ± 0,0132	3,919 ± 0,175
Microwave 60°C	2,50%	15	0,3277 ± 0,0219	0,1779 ± 0,0119	7,030 ± 0,470
	5%	25	0,4706 ± 0,1058	0,4258 ± 0,0958	8,379 ± 1,884
	7,50%	25	0,7531 ± 0,0831	0,6815 ± 0,0752	9,064 ± 1,000
Microwave 100°C	2,50%	25	0,2140 ± 0,0265	0,1937 ± 0,0240	7,668 ± 0,949
	5%	25	0,5499 ± 0,0526	0,4976 ± 0,0476	9,234 ± 0,883
	7,50%	25	0,8033 ± 0,0789	0,7269 ± 0,0714	9,674 ± 0,950
Ultrasonic 40%	2,50%	25	0,1789 ± 0,0206	0,1619 ± 0,0187	6,491 ± 0,749
	5%	25	0,3985 ± 0,0387	0,3606 ± 0,0350	7,158 ± 0,695
	7,50%	25	0,6477 ± 0,0291	0,5861 ± 0,0263	7,831 ± 0,352

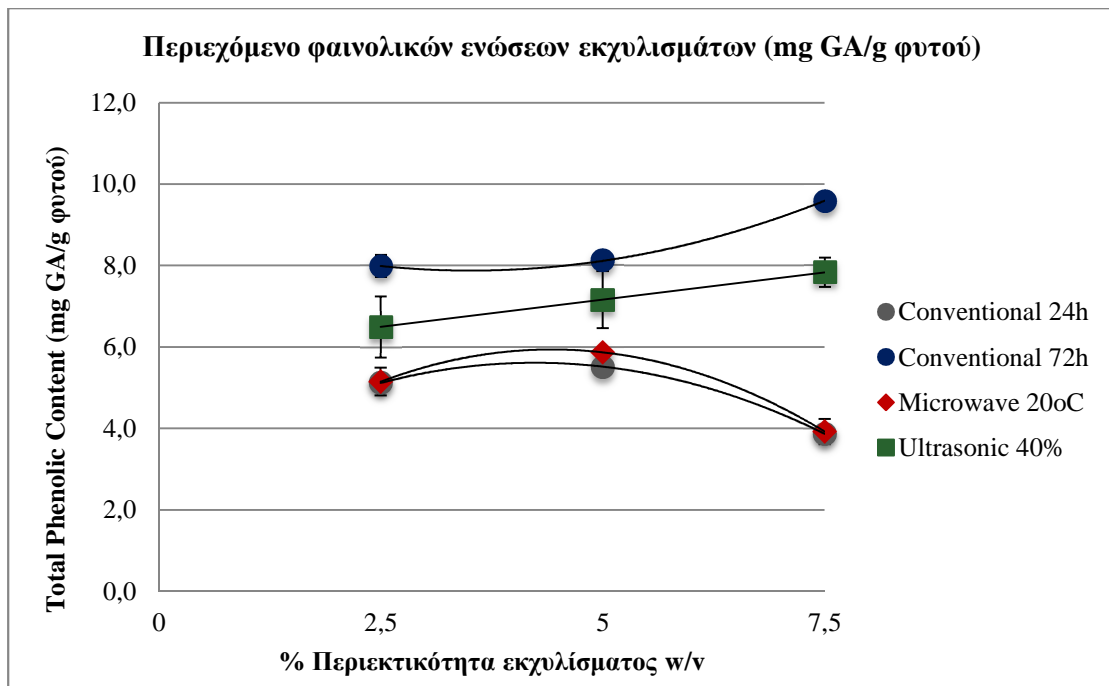
Πίνακας 4: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά των εκχυλισμάτων.



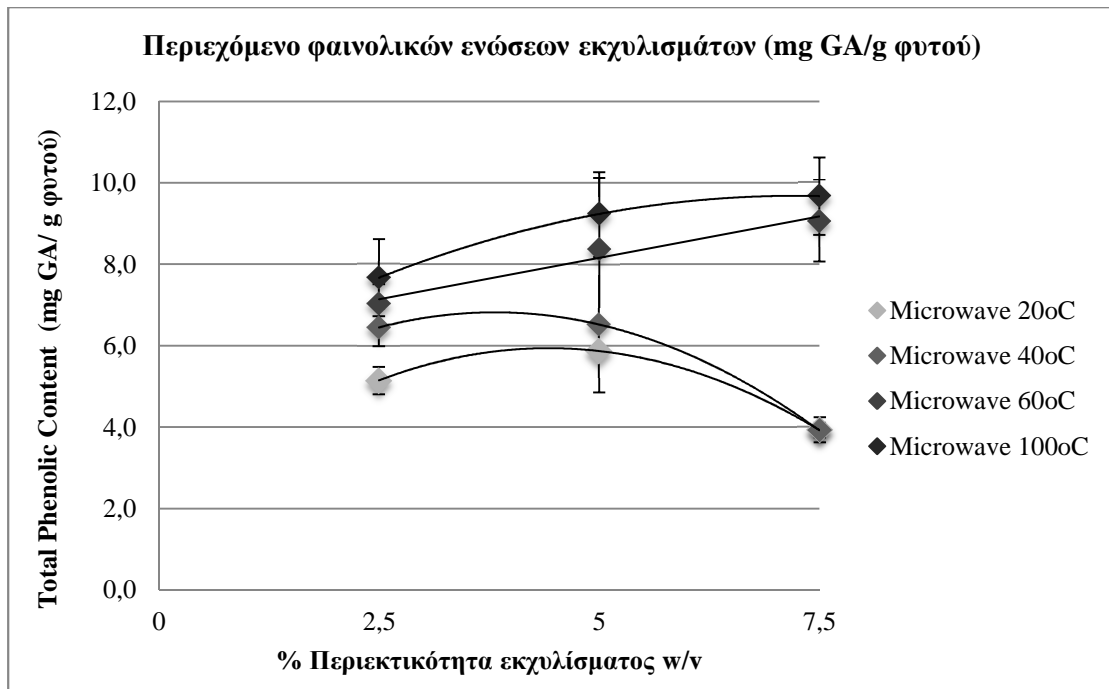
Διάγραμμα 2: Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (1)



Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (2)



Διάγραμμα 4: Περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα (1)



Διάγραμμα 5: Περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα (2)

Μέθοδος/Δείγμα		C (mg GA/ml)	TPC (mg GA/g φυτού)
Conventional	24h	$y = -0,0102x^2 + 0,1344x - 0,1431$ $R^2 = 1$	$y = -0,1637x^2 + 1,3868x + 2,6743$ $R^2 = 1$
	72h	$y = 0,1056x - 0,0834$ $R^2 = 0,9868$	$y = 0,1080x^2 - 0,7595x + 9,2109$ $R^2 = 1$
Microwave Assisted	20°C	$y = -0,0125x^2 + 0,1574x - 0,1819$ $R^2 = 1$	$y = -0,2131x^2 + 1,8869x + 1,7620$ $R^2 = 1$
	40°C	$y = -0,0160x^2 + 0,1868x - 0,2034$ $R^2 = 1$	$y = -0,2136x^2 + 1,6305x + 3,7075$ $R^2 = 1$
	60°C	$y = 0,1007x - 0,0752$ $R^2 = 1$	$y = 0,4068x + 6,1237$ $R^2 = 0,966$
	100°C	$y = 0,1066x - 0,0605$ $R^2 = 0,994$	$y = -0,0901x^2 + 1,302x + 4,9754$ $R^2 = 1$
Ultrasonic Assisted	40% ampl.	$y = 0,0848x - 0,0547$ $R^2 = 0,999$	$y = 0,2679x + 5,8204$ $R^2 = 1$

Πίνακας 5: Γραμμές τάσης συγκέντρωσης και ολικού περιεχομένου φαινολικών σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα.

Σχολιασμός

Αρχικά, όπως προκύπτει από το διάγραμμα 2, το οποίο αποσκοπεί στη σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης, τα εκχυλίσματα που παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ανά ml εκχυλίσματος είναι το εκχύλισμα που παρασκευάστηκε με συμβατική εκχύλιση 72 ωρών, όπως επίσης και το εκχύλισμα που προέκυψε από τη μέθοδο υποβοηθούμενη από υπερήχους. Ακόμα, παρατηρείται πως για τα συγκεκριμένα δείγματα η σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος % w/v προσεγγίζει τη γραμμικότητα, σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση 24 ωρών και από εκχύλιση υποβοηθούμενη από

μικροκύματα, οι μετρήσεις των οποίων οδηγούν σε πολυωνυμική συσχέτιση των δύο αυτών παραγόντων. Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνονται και από το διάγραμμα 4. Είναι εμφανές πως για τις δύο μεθόδους, από τις οποίες προκύπτουν τα πιο πλούσια σε φαινολικές ενώσεις εκχυλίσματα (Conventional 72h, Ultrasound Assisted), η αύξηση της περιεκτικότητας σε βάρος κατ'όγκο του εκχυλίσματος οδηγεί σε αύξηση του συνολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις ανά γραμμάριο φυτού. Αντιθέτως, για τις μεθόδους που δίνουν πιο φτωχά εκχυλίσματα σε φαινολικές ενώσεις, η αύξηση της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος οδηγεί σε πτώση του συνολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων ανά γραμμάριο φυτού. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στην ύπαρξη σημείου κορεσμού σε τέτοιες χαμηλές θερμοκρασίες, πέρα από το οποίο η εκχυλισσιμότητα των φαινολικών ενώσεων δεν αυξάνεται παρά την αύξηση της μάζας του φυτού, η οποία μάλιστα καταλήγει να δυσχεραίνει την ανάδευση και διάχυση του διαλύτη και άρα την τελική απόδοση της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων.

Όσον αφορά στις διαφορετικές θερμοκρασίες που μελετήθηκαν κατά τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3 και 5. Από τα διαγράμματα αυτά, είναι εμφανής η ανάλογη συσχέτιση της εκχυλισσιμότητας των φαινολικών ενώσεων με τη θερμοκρασία εκχύλισης. Τα δείγματα που προέκυψαν από εκχυλίσεις σε θερμοκρασίες 60°C και 100°C παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων ανά ml εκχυλίσματος, όπως επίσης και αυξημένο συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις ανά γραμμάριο φυτού, συγκριτικά με αυτά που προέκυψαν από τις εκχυλίσεις σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (20°C ,40°C). Παράλληλα, παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση η γραμμική σχέση της συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων ανά ml εκχυλίσματος με την περιεκτικότητα σε βάρος κατ'όγκο των εκχυλισμάτων για τις αποτελεσματικότερες μεθόδους (Microwave Assisted 60°C & 100°C), η οποία για τις λιγότερο ικανοποιητικές μεθόδους (Microwave Assisted 20°C & 40°C) μετατρέπεται σε πολυωνυμική. Αντίστοιχα συμπεράσματα προκύπτουν και από το διάγραμμα 5, το οποίο παρουσιάζει το συνολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων ανά γραμμάριο φυτού.

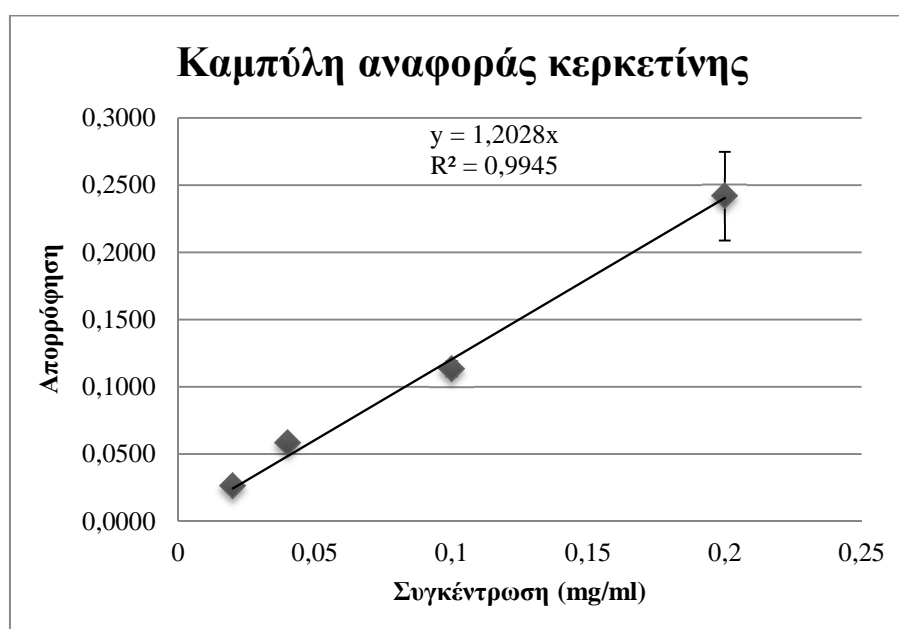
Τα παραπάνω, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά και συγκριτικά στον πίνακα 5, ο οποίος παρουσιάζει τις εξισώσεις των γραμμών τάσης που προκύπτουν από τα διαγράμματα 2-5 και εκφράζουν ποσοτικοποιημένα τις σχέσεις συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά ml εκχυλίσματος και περιεκτικότητας σε βάρος κατ'όγκο εκχυλίσματος, όπως επίσης και το συνολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων ανά γραμμάριο φυτού με την περιεκτικότητα σε βάρος κατ'όγκο εκχυλίσματος, αναδεικνύοντας έτσι, μέσω της κλίσης τους, τις αποτελεσματικότερες μεθόδους εκχύλισης φαινολικών ενώσεων. Συμπερασματικά, οι μέθοδοι που παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την εκχύλιση φαινολικών συστατικών ήταν οι εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από μικροκύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (60°C, 100°C), όπως επίσης και η συμβατική εκχύλιση 72 ωρών.

1.1.2. Ολικά Φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις απορρόφησης για την καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων.

Δείγμα	Συγκέντρωση διαλυμάτων κερκετίνης (mg/L)	Αραιώσεις	Συγκέντρωση διαλυμάτων μετά την αραιώση (mg/mL)	Απορρόφηση (1)	Απορρόφηση (2)	Απορρόφηση (3)	M.O. Απορρόφησης
E1	100	5	0,02	0,0254	0,0255	0,0274	0,0261 ± 0,0011
E2	200		0,04	0,0588	0,0602	0,055	0,0580 ± 0,0027
E3	500		0,1	0,1129	0,1193	0,1081	0,1134 ± 0,0056
E4	1000		0,2	0,2037	0,2618	0,2599	0,2418 ± 0,0330

Πίνακας 6: Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης.

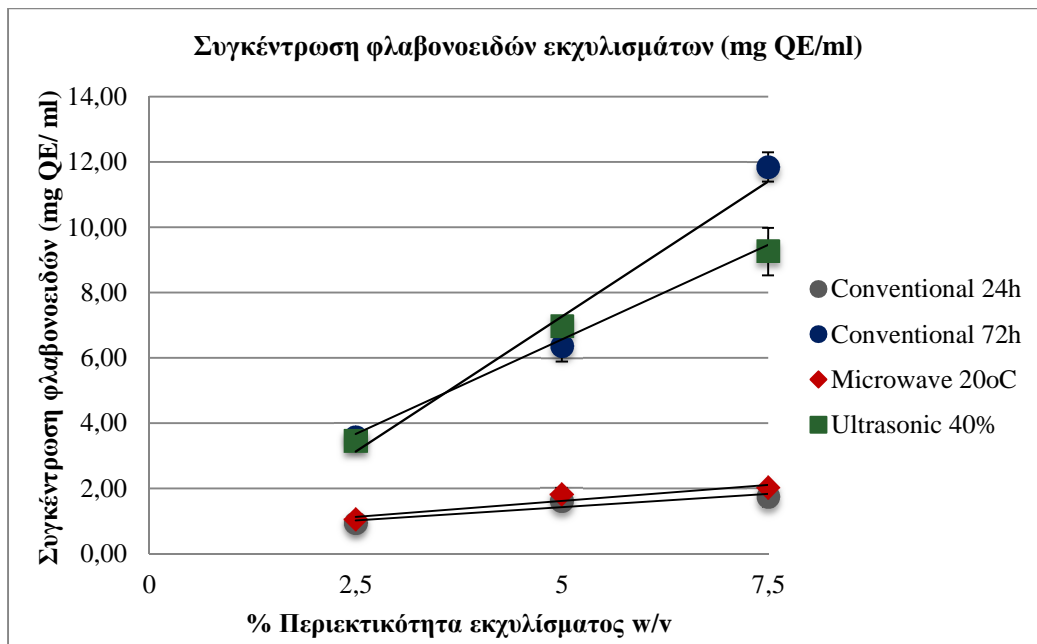


Διάγραμμα 6: Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης.

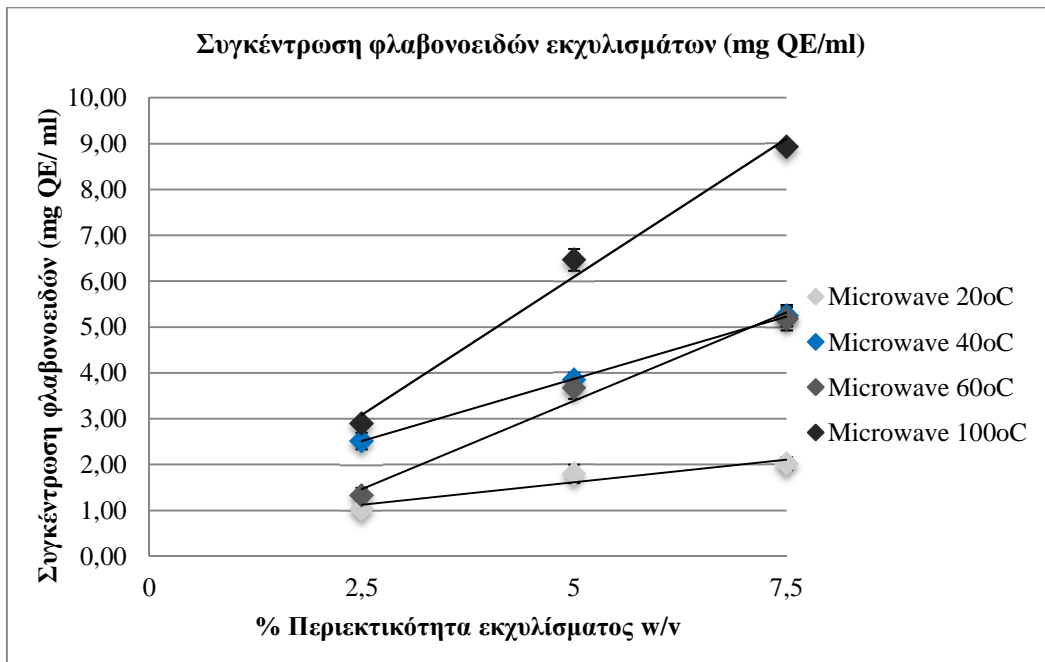
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος όρος της απορρόφησης κάθε αραιωμένου δείγματος εκχυλίσματος, η συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης ανά ml εκχυλίσματος στο αρχικό εκχύλισμα, όπως επίσης και το συνολικό περιεχόμενο ολικών φλαβονοειδών ανά γραμμάριο φυτού.

Δείγμα		Αραιώσεις	Μ.Ο. Απορρόφησης	C (mg QE/ml) εκχυλίσματος	TFC (mg QE/g φυτού)
Conventional 24h	2,50%	10	0,1118 ± 0,0120	0,929 ± 0,100	36,87 ± 3,96
	5%	10	0,1925 ± 0,0215	1,600 ± 0,179	32,27 ± 3,61
	7,50%	10	0,2100 ± 0,0351	1,746 ± 0,291	23,25 ± 3,88
Conventional 72h	2,50%	40	0,1074 ± 0,0046	3,573 ± 0,154	143,9 ± 6,21
	5%	40	0,1916 ± 0,0143	6,371 ± 0,474	126,2 ± 9,39
	7,50%	80	0,1781 ± 0,0066	11,848 ± 0,441	156,4 ± 5,82
Microwave 20°C	2,50%	10	0,1240 ± 0,0093	1,031 ± 0,077	39,72 ± 2,97
	5%	10	0,2165 ± 0,0236	1,800 ± 0,196	36,08 ± 3,93
	7,50%	10	0,2424 ± 0,0163	2,015 ± 0,136	26,75 ± 1,80
Microwave 40°C	2,50%	20	0,1518 ± 0,0108	2,524 ± 0,179	99,63 ± 7,06
	5%	20	0,2309 ± 0,0093	3,839 ± 0,154	75,94 ± 3,05
	7,50%	40	0,1577 ± 0,0068	5,244 ± 0,227	69,61 ± 3,01
Microwave 60°C	2,50%	30	0,0531 ± 0,0067	1,325 ± 0,167	52,36 ± 6,59
	5%	30	0,1469 ± 0,0092	3,664 ± 0,229	72,10 ± 4,51
	7,50%	30	0,2076 ± 0,0098	5,179 ± 0,244	68,88 ± 3,25
Microwave 100°C	2,50%	40	0,0873 ± 0,0030	2,902 ± 0,098	114,9 ± 3,89
	5%	40	0,1942 ± 0,0069	6,458 ± 0,230	119,8 ± 4,26
	7,50%	40	0,2684 ± 0,0009	8,925 ± 0,030	118,8 ± 0,40
Ultrasonic 40%	2,50%	40	0,1040 ± 0,0038	3,460 ± 0,125	138,7 ± 5,02
	5%	40	0,2093 ± 0,0021	6,960 ± 0,070	138,2 ± 1,39
	7,50%	80	0,1391 ± 0,0109	9,254 ± 0,724	123,6 ± 9,67

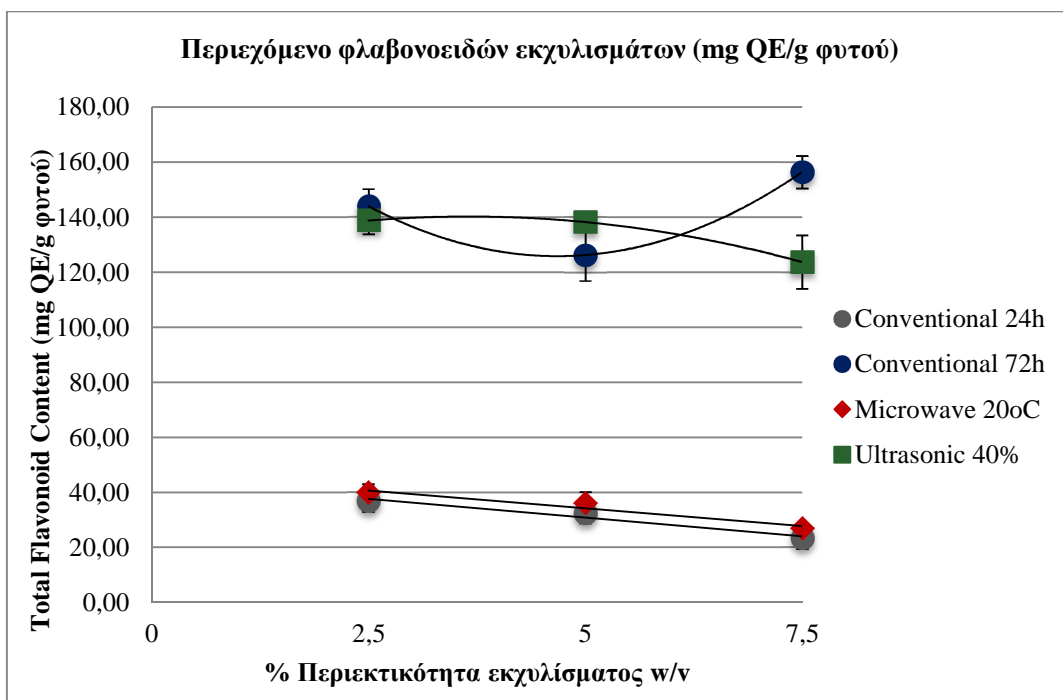
Πίνακας 7: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις φλαβονοειδών ενώσεων και συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων.



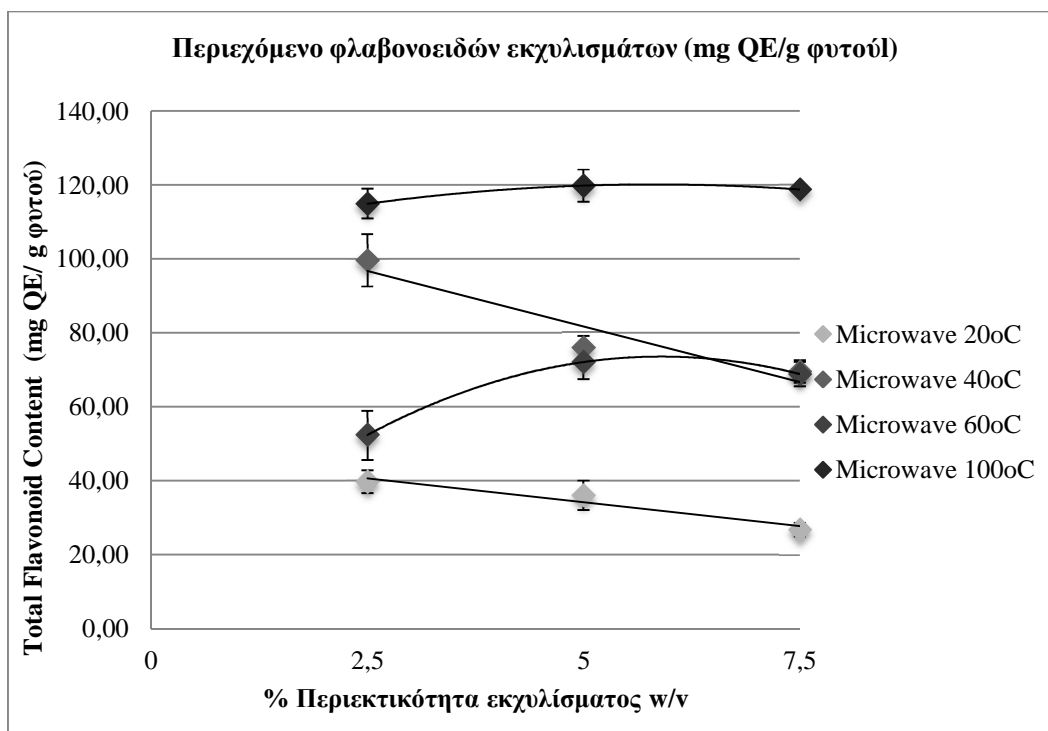
Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση φλαβονοειδών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (1).



Διάγραμμα 8: Συγκέντρωση φλαβονοειδών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (2).



Διάγραμμα 9: Περιεχόμενο φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα (1).



Διάγραμμα 10: Περιεχόμενο φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα (2).

Μέθοδος/Δείγμα		C (mg QE/ml)	TFC (mg QE/g φυτού)
Conventional	24h	$y = 0,1633x + 0,6086$ $R^2 = 0,8787$	$y = -2,7226x + 44,411$ $R^2 = 0,9659$
	72h	$y = 1,655x - 1,0113$ $R^2 = 0,9662$	$y = 3,8318x^2 - 35,82x + 209,52$ $R^2 = 1$
Microwave Assisted	20°C	$y = 0,1969x + 0,6308$ $R^2 = 0,9046$	$y = -2,5932x + 47,147$ $R^2 = 0,9398$
	40°C	$y = 0,5441x + 1,1490$ $R^2 = 0,9996$	$y = -6,0048x + 111,75$ $R^2 = 0,8997$
	60°C	$y = 0,7707x - 0,4642$ $R^2 = 0,9850$	$y = -1,8366x^2 + 21,669x + 9,6667$ $R^2 = 1$
	100°C	$y = 1,2045x + 0,0724$ $R^2 = 0,9892$	$y = -0,4803x^2 + 5,5789x + 103,94$ $R^2 = 1$
Ultrasonic Assisted	40% ampl.	$y = 1,1589x + 0,7638$ $R^2 = 0,9857$	$y = -1,119x^2 + 8,174x + 125,28$ $R^2 = 1$

Πίνακας 8: Γραμμές τάσης συγκέντρωσης και ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα.

Σχολιασμός

Αρχικά, σε ότι αφορά στη διαφοροποίηση της τελικής συγκέντρωσης φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων με βάση τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόστηκε, όπως και για τις ολικές φαινολικές ενώσεις, υψηλότερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με συμβατική εκχύλιση 72 ωρών και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ολικά φαινολικά συστατικά, για τα φλαβονοειδή η συσχέτιση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος με την περιεκτικότητά τους σε βάρος κατ'όγκο εμφανίζεται σε όλες τις περιπτώσεις γραμμική, με διαφοροποίηση φυσικά στην

κλίση της ευθείας που προκύπτει. Ακόμα, με βάση το διάγραμμα 9, για τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με συμβατική εκχύλιση 24 ωρών και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε θερμοκρασία 20°C, η εξάρτηση του συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή ανά γραμμάριο φυτού με την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων είναι γραμμική με πολύ μικρή κλίση, ενώ για τα πιο πλούσια σε φλαβονοειδή δείγματα (Conventional 72h & Ultrasound Assisted), οι καμπύλες που προκύπτουν εκφράζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια ως πολυωνυμικές εξισώσεις, αν και το συμπέρασμα αυτό, λαμβάνοντας υπόψη τα σφάλματα των μετρήσεων, είναι επισφαλές. Παρόλα αυτά, σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή TFC παρουσιάζει μικρή εξάρτηση από την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος για τα παραπάνω δείγματα.

Όσον αφορά στη θερμοκρασιακή μελέτη της μεθόδου εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, τα αποτελέσματα που προκύπτουν και παρουσιάζονται στο διάγραμμα 8, αλληλοεπιβεβαιώνονται με όσα προέκυψαν και από την ανάλυση των ολικών φαινολικών ενώσεων. Είναι εμφανές, πως η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της εκχυλισσιμότητας των φλαβονοειδών, για αυτό και τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με εκχύλιση υψηλής θερμοκρασίας (100°C) παρουσιάζουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ισοδύναμα κερκετίνης. Ωστόσο, τα δείγματα που προέκυψαν από τις θερμοκρασίες 40°C και 60°C αντιστοιχούν σε εκχυλίσματα με πολύ κοντινές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών. Τα παραπάνω συμπεράσματα, επιβεβαιώνονται και από το διάγραμμα 10, απ'όπου και πάλι διαφαίνεται η αυξημένη εκχυλισσιμότητα των φλαβονοειδών σε υψηλές θερμοκρασίες, συγκριτικά με τις χαμηλότερες. Και στο διάγραμμα αυτό όμως, όπως είναι αναμενόμενο, τα αποτελέσματα για τις θερμοκρασίες 40°C και 60°C δεν είναι ξεκάθαρα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι ενδεχομένως έως και τους 60°C ο ρυθμός αύξησης της εκχυλισσιμότητας με τη θερμοκρασία να είναι μικρότερος, απ'ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

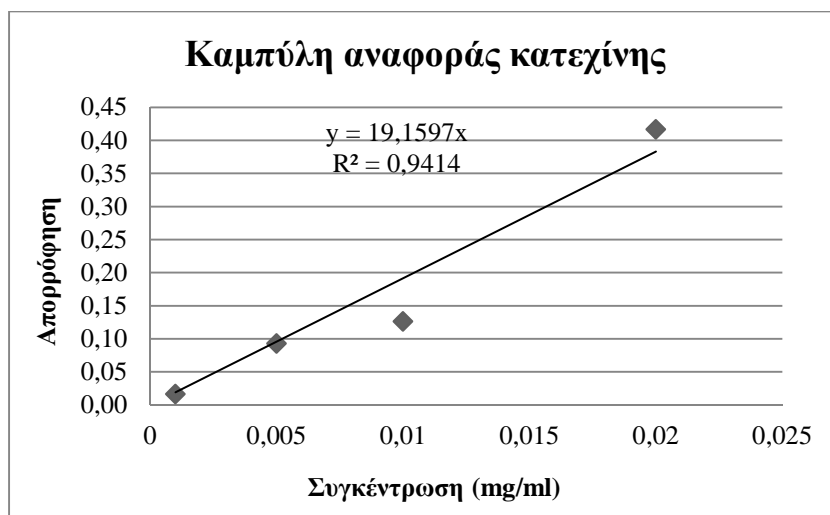
Τα παραπάνω συμπεράσματα, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά και συγκριτικά στον πίνακα 8, στον οποίο βρίσκονται οι γραμμές τάσεις που συνδέουν τόσο τη συγκέντρωση φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης ανά ml εκχυλίσματος, όσο και το συνολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ανά γραμμάριο φυτού, με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε βάρος κατ'όγκο. Από τις καμπύλες που προκύπτουν και συγκεκριμένα από τις κλίσεις τους, διακρίνονται οι αποτελεσματικότερες μέθοδοι για την εκχύλιση φλαβονοειδών, οι οποίες είναι η συμβατική εκχύλιση 72 ωρών, η εκχύλιση με μικροκύματα στους 100°C και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους.

1.1.3. Συμπυκνωμένες Τανίνες (Total Condensed Tannins)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις απορρόφησης για την καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών συμπυκνωμένων τανινών των εκχυλισμάτων.

Δείγμα	Συγκέντρωση διαλυμάτων κατεχίνης (mg/ml)	Απορρόφηση (1)	Απορρόφηση (2)	Απορρόφηση (3)	M.O. Απορρόφησης
E1	0,001	0,015	0,015	0,019	0,0163 ± 0,0023
E2	0,005	0,092	0,096	0,091	0,0930 ± 0,0026
E3	0,01	0,128	0,126	0,125	0,1263 ± 0,0015
E4	0,02	0,412	0,418	0,42	0,4167 ± 0,0042

Πίνακας 9: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης.

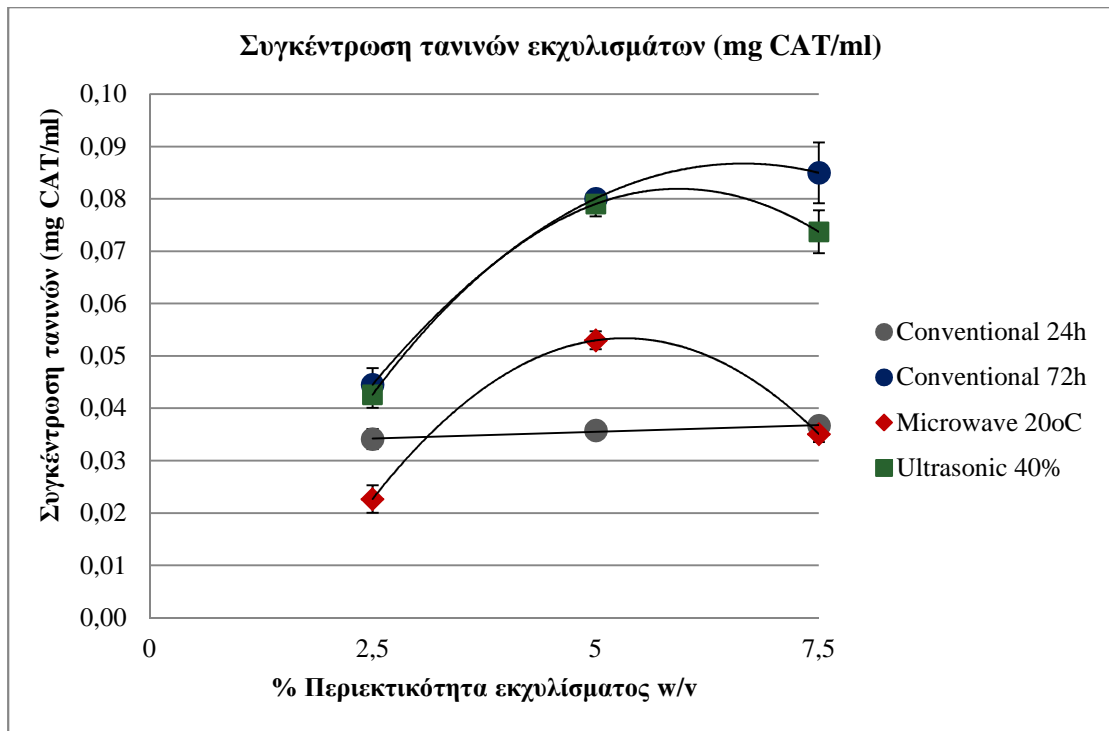


Διάγραμμα 11: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης.

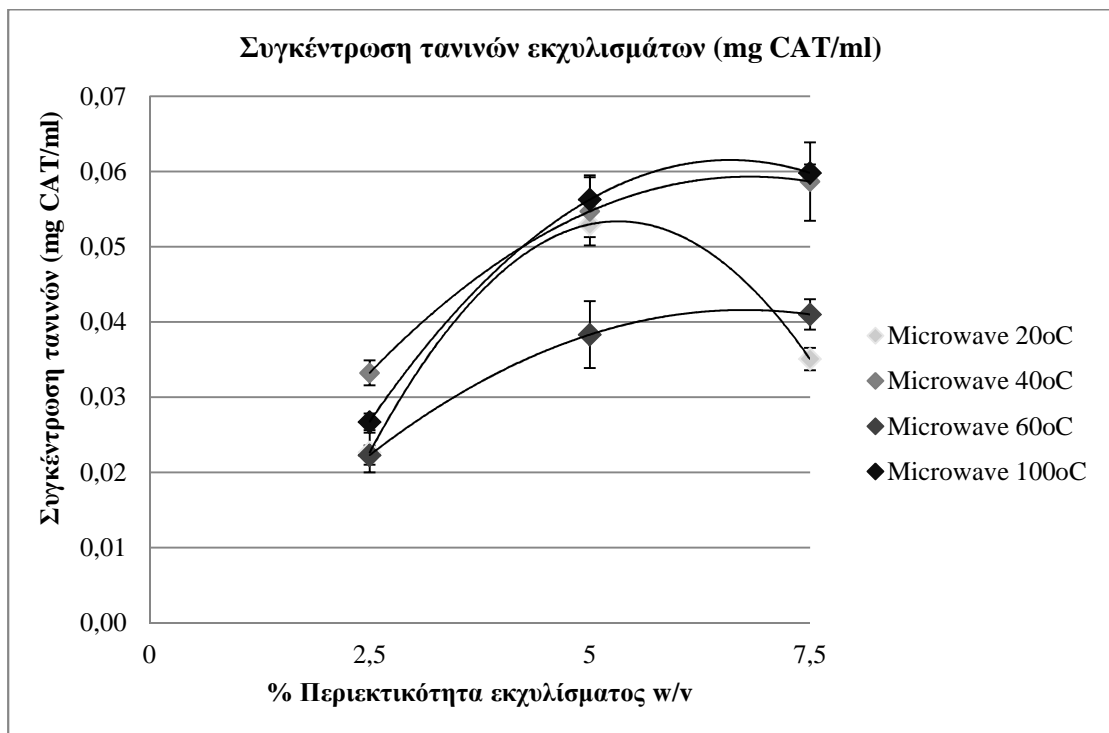
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος όρος της απορρόφησης κάθε αραιωμένου δείγματος εκχυλίσματος, η συγκέντρωση ολικών συμπυκνωμένων τανινών σε ισοδύναμα κατεχίνης ανά ml εκχυλίσματος στο αρχικό εκχύλισμα, όπως επίσης και το συνολικό περιεχόμενο ολικών συμπυκνωμένων τανινών ανά γραμμάριο φυτού.

Δείγμα		Αραιώσεις	M.O. Απορρόφησης	C (mg CAT/ml) εκχυλίσματος	TCC (mg CAT/g φυτού)
Conventional 24h	2,50%	2	0,327±0,018	0,034±0,002	1,35 ± 0,08
	5%	3	0,228±0,004	0,036±0,001	0,72 ± 0,01
	7,50%	3	0,234±0,008	0,037±0,001	0,49 ± 0,02
Conventional 72h	2,50%	3	0,284±0,020	0,045±0,003	1,79 ± 0,13
	5%	3	0,511±0,003	0,080±0,000	1,59 ± 0,01
	7,50%	6	0,271±0,019	0,085±0,006	1,12 ± 0,08
Microwave 20oC	2,50%	2	0,217±0,025	0,023±0,003	0,87 ± 0,10
	5%	3	0,338±0,011	0,053±0,002	1,06 ± 0,03
	7,50%	3	0,224±0,010	0,035±0,001	0,47 ± 0,02
Microwave 40oC	2,50%	2	0,318±0,016	0,033±0,002	1,31 ± 0,07
	5%	6	0,175±0,015	0,055±0,005	1,08 ± 0,09
	7,50%	3	0,375±0,033	0,059±0,005	0,78 ± 0,07
Microwave 60oC	2,50%	3	0,142±0,008	0,022±0,001	0,88 ± 0,05
	5%	3	0,245±0,028	0,038±0,004	0,75 ± 0,09
	7,50%	3	0,262±0,013	0,041±0,002	0,55 ± 0,03
Microwave 100oC	2,50%	2	0,256±0,010	0,027±0,001	1,06 ± 0,04
	5%	6	0,180±0,010	0,056±0,003	1,04 ± 0,06
	7,50%	6	0,191±0,004	0,060±0,001	0,80 ± 0,02
Ultrasonic 40%	2,50%	2	0,408±0,024	0,043±0,002	1,71 ± 0,10
	5%	6	0,252±0,008	0,079±0,002	1,57 ± 0,05
	7,50%	6	0,235±0,013	0,074±0,004	0,98 ± 0,05

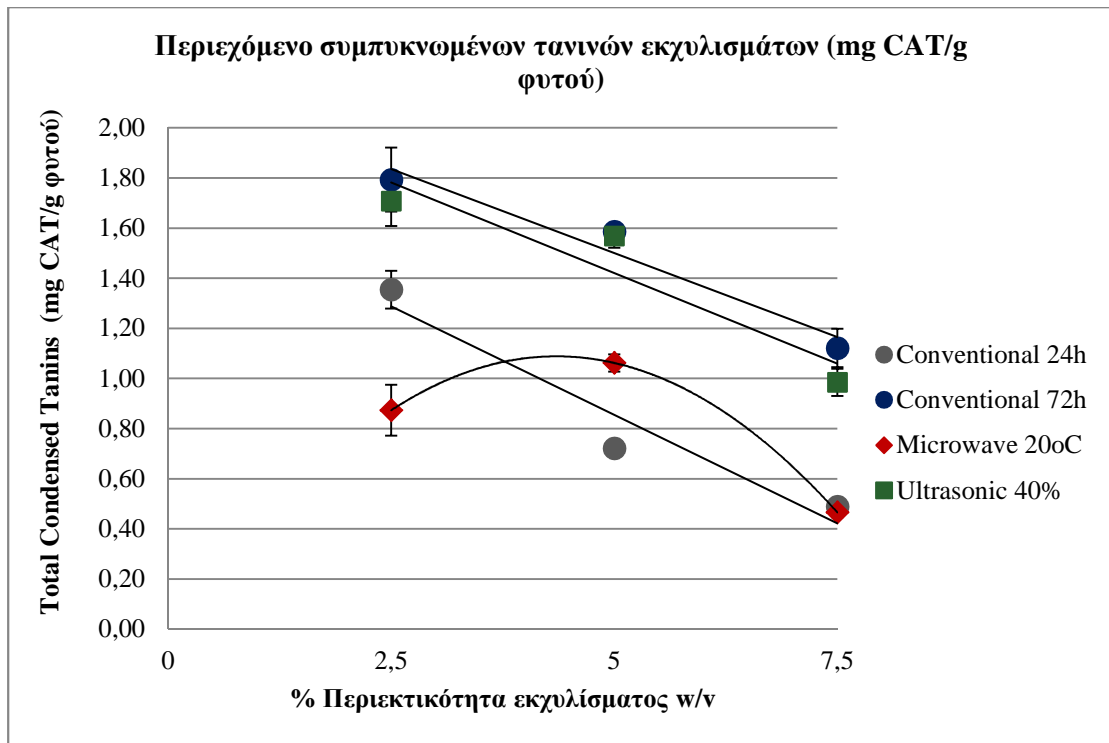
Πίνακας 10: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις συμπυκνωμένων τανινών και συνολικό περιεχόμενο σε τανίνες των εκχυλισμάτων.



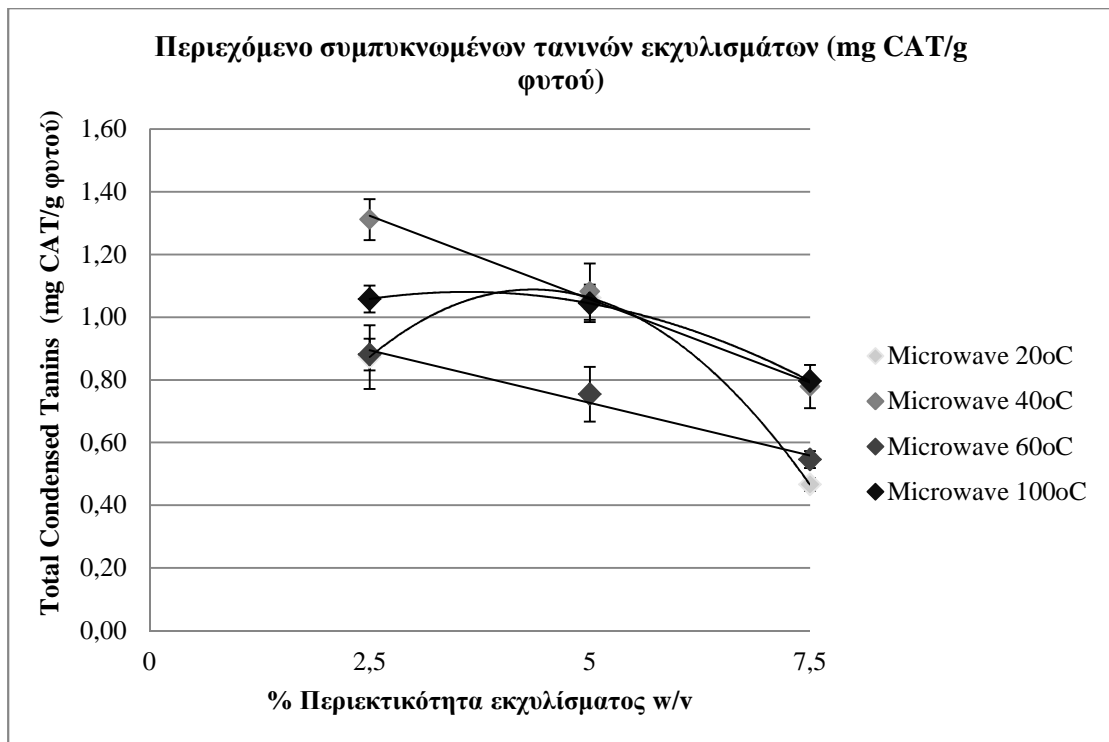
Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (1).



Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων (2).



Διάγραμμα 14: Περιεχόμενο συμπυκνωμένων τανινών στα εκχυλίσματα (1).



Διάγραμμα 15: Περιεχόμενο συμπυκνωμένων τανινών στα εκχυλίσματα (2).

Μέθοδος/Δείγμα		C (mg CAT/ml)	TCC (mg CAT/g φυτού)
Conventional	24h	$y = 0,0005x + 0,033$ $R^2 = 0,9778$	$y = -0,1731x + 1,7201$ $R^2 = 0,9332$
	72h	$y = -0,0025x^2 + 0,0326x - 0,0217$ $R^2 = 1$	$y = -0,1343x + 2,1721$ $R^2 = 0,9534$
Microwave Assisted	20°C	$y = -0,0039x^2 + 0,0411x - 0,0559$ $R^2 = 1$	$y = -0,0628x^2 + 0,5469x - 0,1015$ $R^2 = 1$
	40°C	$y = -0,0014x^2 + 0,0191x - 0,0057$ $R^2 = 1$	$y = -0,1066x + 1,5903$ $R^2 = 0,9937$
	60°C	$y = -0,0011x^2 + 0,0144x - 0,0071$ $R^2 = 1$	$y = -0,0671x + 1,0618$ $R^2 = 0,9805$
	100°C	$y = -0,0021x^2 + 0,00274x - 0,0288$ $R^2 = 1$	$y = -0,0187x^2 + 0,1348x + 0,8378$ $R^2 = 1$
Ultrasonic Assisted	40% ampl.	$y = -0,0033x^2 + 0,0396x - 0,0356$ $R^2 = 1$	$y = -0,1446x + 2,1434$ $R^2 = 0,8879$

Πίνακας 11: Γραμμές τάσης συγκέντρωσης και περιεχομένου τανινών σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα.

Σχολιασμός

Με βάση το διάγραμμα 12, όπως και στην περίπτωση των ολικών φαινολικών συστατικών, αλλά και των φλαβονοειδών, τα δείγματα που παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση ολικών συμπυκνωμένων τανινών σε σταθερή θερμοκρασία είναι αυτά που παρασκευάστηκαν με τη συμβατική μέθοδο των 72 ωρών και τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους. Ωστόσο, φαίνεται πως η αύξηση της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε βάρος κατ' όγκο δεν οδηγεί σε ανάλογη αύξηση της τελικής συγκέντρωσης τανινών. Μάλιστα στην περίπτωση της συμβατικής εκχύλισης των 24 ωρών δεν εμφανίζεται καμία αύξηση της συγκέντρωσης τανινών με αύξηση της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος, ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, η συσχέτιση των δύο αυτών μεγεθών παρουσιάζει μέγιστο σε κάποια περιεκτικότητα ανάμεσα στο 5% και το 7,5%, και έπειτα σημαντικά πτωτική τάση. Έτσι, και στο διάγραμμα 14, το τελικό περιεχόμενο σε ολικές συμπυκνωμένες τανίνες ανά γραμμάριο φυτού προκύπτει αντιστρόφως ανάλογο με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε βάρος κατ' όγκο. Το γεγονός αυτό, ενδεχομένως οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητα συμπυκνωμένων τανινών στο συγκεκριμένο φυτό ή στη χαμηλή εκχυλισσιμότητα των ενώσεων αυτών με τις συγκεκριμένες μεθόδους.

Όσον αφορά στη θερμοκρασιακή μελέτη της μεθόδου εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, η οποία παρουσιάζεται στο διάγραμμα 13, τα συμπεράσματα είναι επισφαλή. Σε αντίθεση με τα ολικά φαινολικά συστατικά και τα ολικά φλαβονοειδή, η εκχυλισσιμότητα των συμπυκνωμένων τανινών δεν παρουσιάζει αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αντίστοιχα, σύμφωνα με το διάγραμμα 15, αν και είναι εμφανής η πτωτική τάση του συνολικού περιεχομένου σε συμπυκνωμένες τανίνες ανά γραμμάριο φυτού με την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων, για τα εκχυλίσματα σε θερμοκρασίες 40°C και 60°C, η σχέση αυτή προσεγγίζει τη γραμμική, ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα (θερμοκρασίες 20°C & 100°C) είναι πολυωνυμική. Συνεπώς, δεν διαφαίνεται κάποιο μοτίβο στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Τα αποτελέσματα αυτά, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 11, που περιλαμβάνει τις γραμμές τάσεις που προκύπτουν από τα διαγράμματα 12-15. Για την περίπτωση των

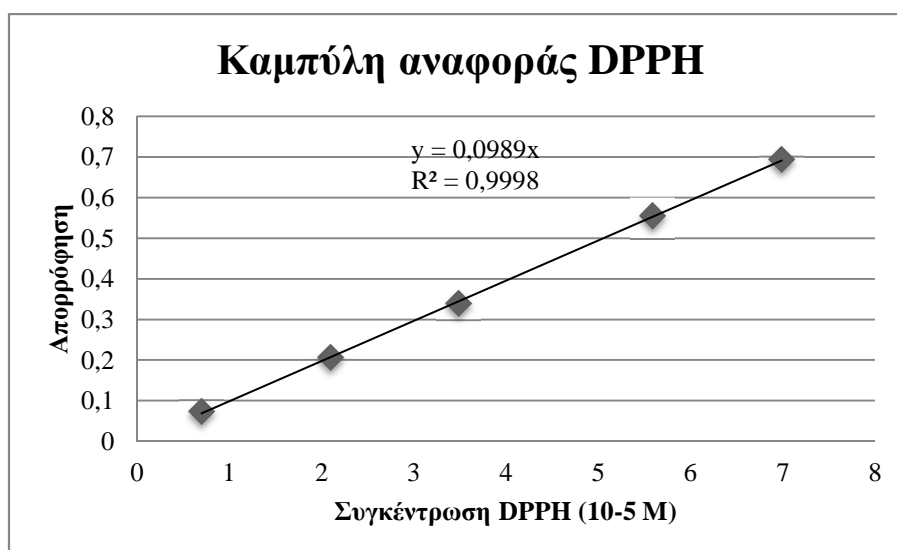
συμπυκνωμένων τανινών, η διάκριση της αποτελεσματικότερης μεθόδου δεν είναι ξεκάθαρη. Παράλληλα, σε όλα τα δείγματα τόσο οι συγκεντρώσεις, όσο και το συνολικό περιεχόμενο τανινών δεν είναι αυξημένο και αυτό αποτελεί έναν από τους λόγους που δυσχεραίνουν την επιλογή της αποτελεσματικότερης μεθόδου. Ωστόσο, συγκριτικά είναι γεγονός πως τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τη συμβατική μέθοδο 72 ωρών και τη μέθοδο υποβοηθούμενη από υπερήχους δίνουν τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα, όσον αφορά στην εκχύλιση συμπυκνωμένων τανινών.

1.1.4. Αντιοξειδωτική δράση - Δοκιμή DPPH (Antioxidant activity)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων DPPH για την καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

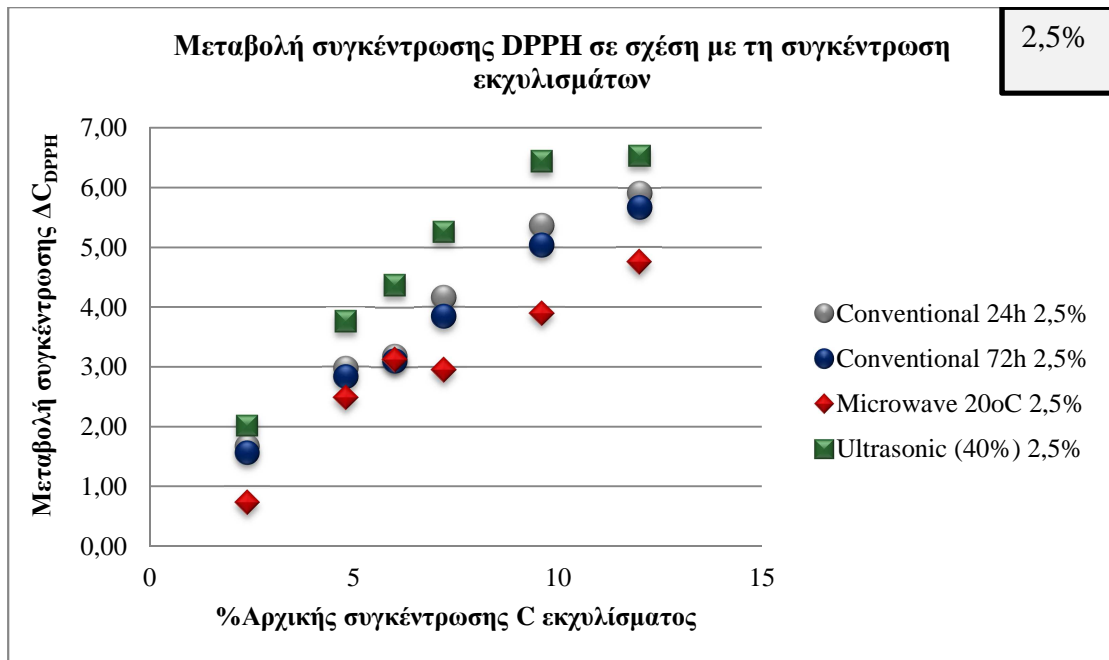
Δείγμα	Αραίωση (%C)	C_{DPPH} μετά την αραίωση (10^{-5} M)	Απορρόφηση
E1	1	0,699	0,0732
E2	0,8	2,1	0,2061
E3	0,5	3,49	0,3401
E4	0,3	5,59	0,5543
E5	0,1	6,99	0,6929

Πίνακας 12: Καμπύλη αναφοράς DPPH

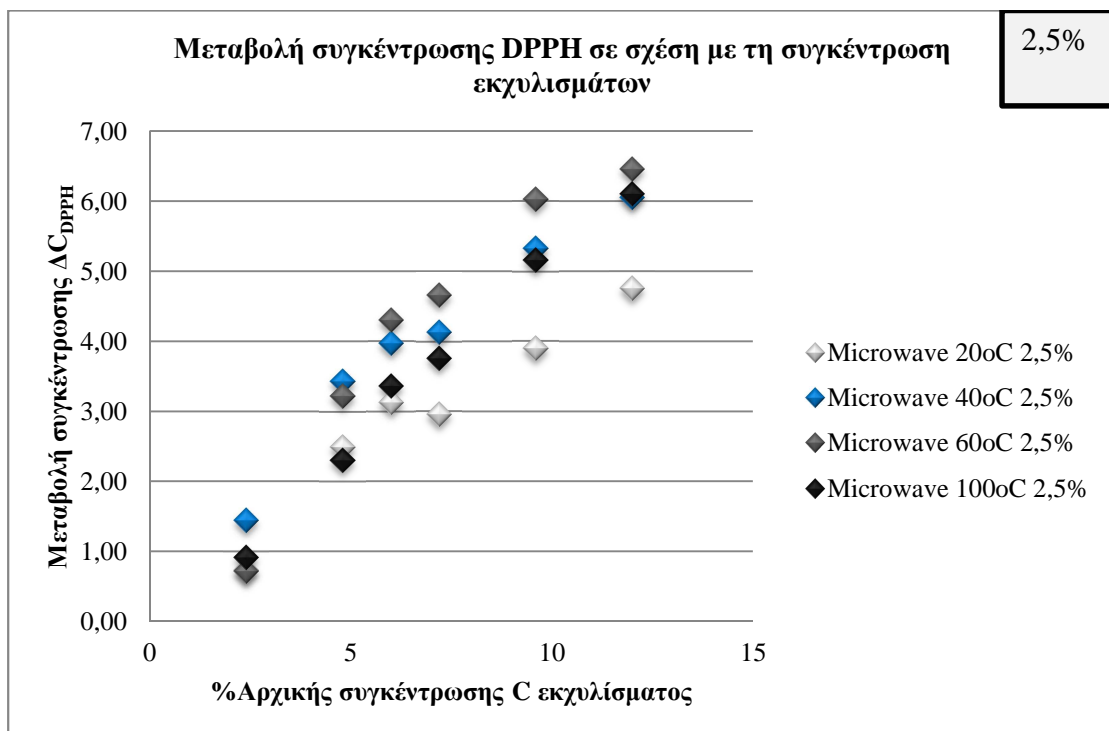


Διάγραμμα 16: Καμπύλη αναφοράς DPPH

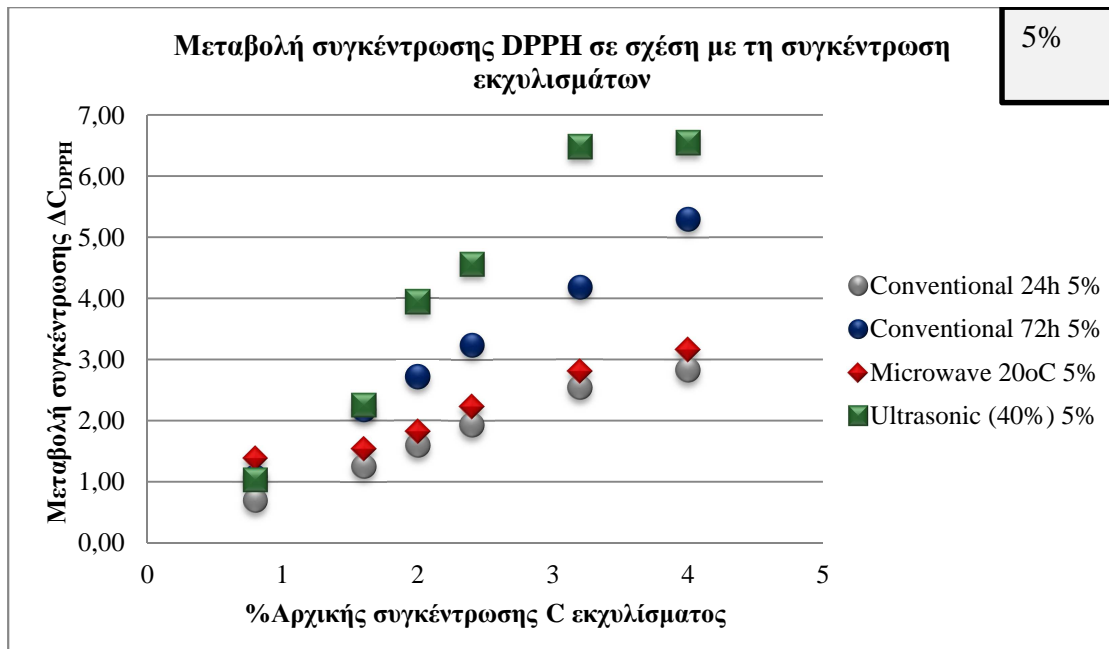
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του DPPH σε σχέση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος για τις 3 περιεκτικότητες που εξετάστηκαν. Οι επιμέρους μετρήσεις βρίσκονται στο παράρτημα.



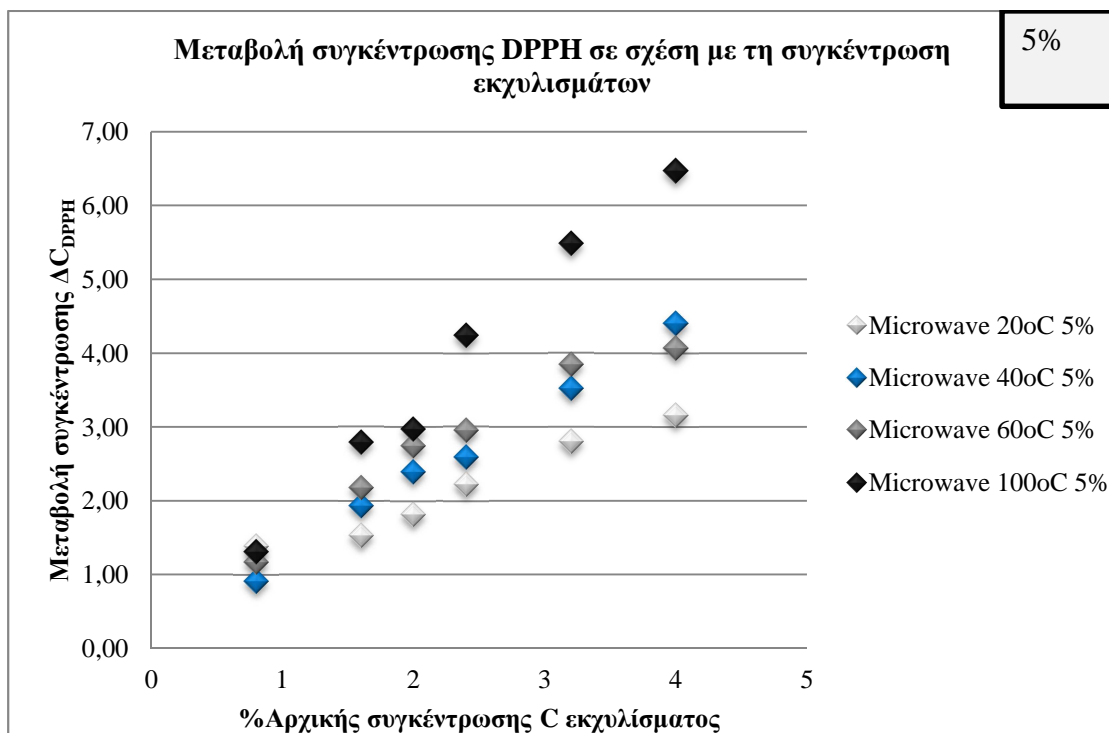
Διάγραμμα 17: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 2,5% (1)



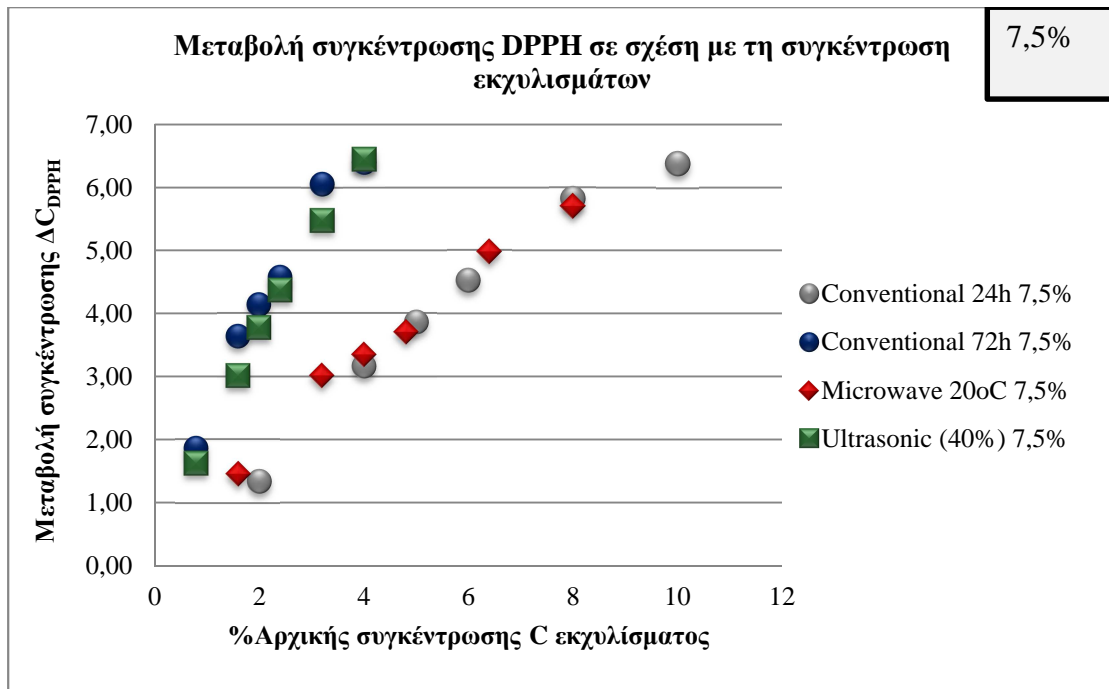
Διάγραμμα 18: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 2,5% (2)



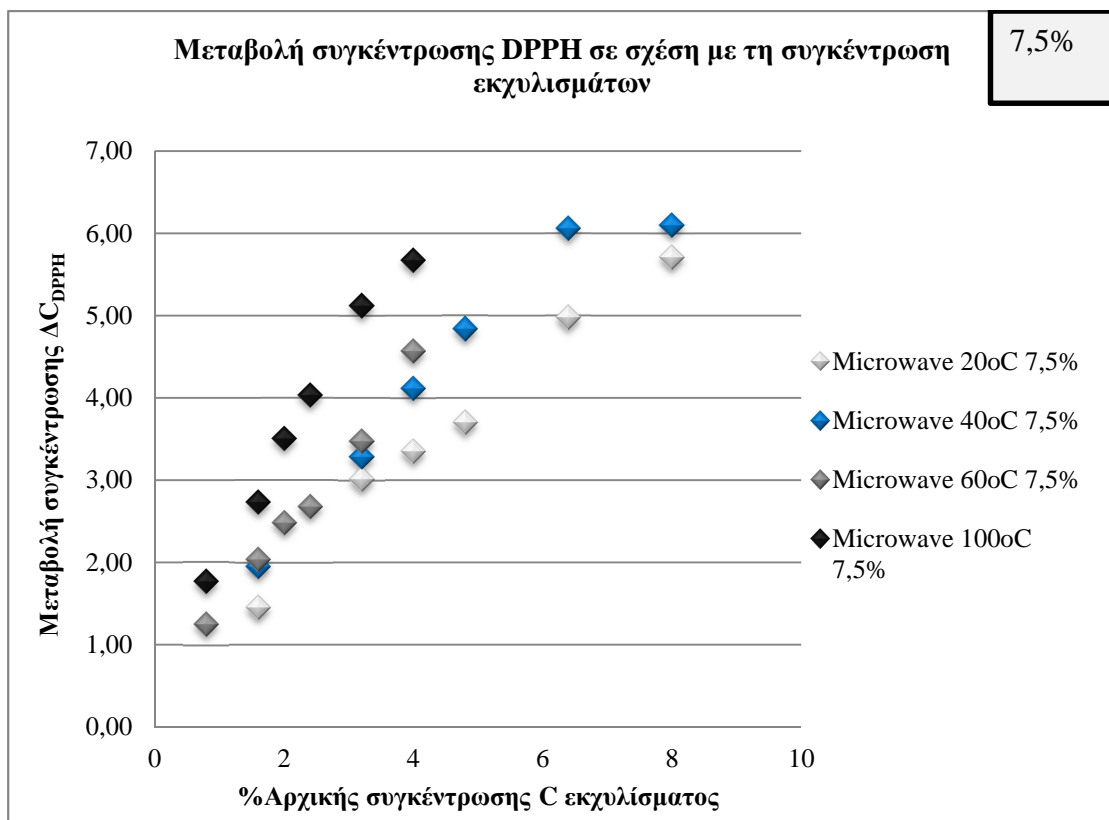
Διάγραμμα 19: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 5% (1)



Διάγραμμα 20: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 5% (2)



Διάγραμμα 21: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 7,5% (1)



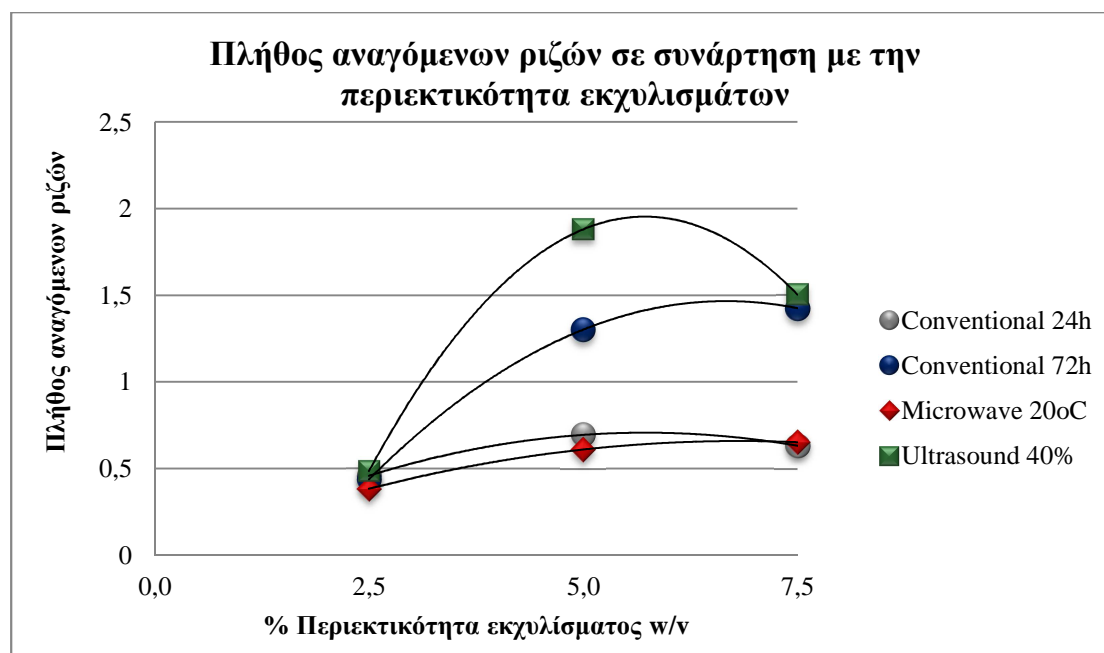
Διάγραμμα 22: Μεταβολή της συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος περιεκτικότητας 7,5% (2)

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι γραμμές τάσης που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα για το κάθε εκχύλισμα, των οποίων οι κλίσεις εκφράζουν το πλήθος

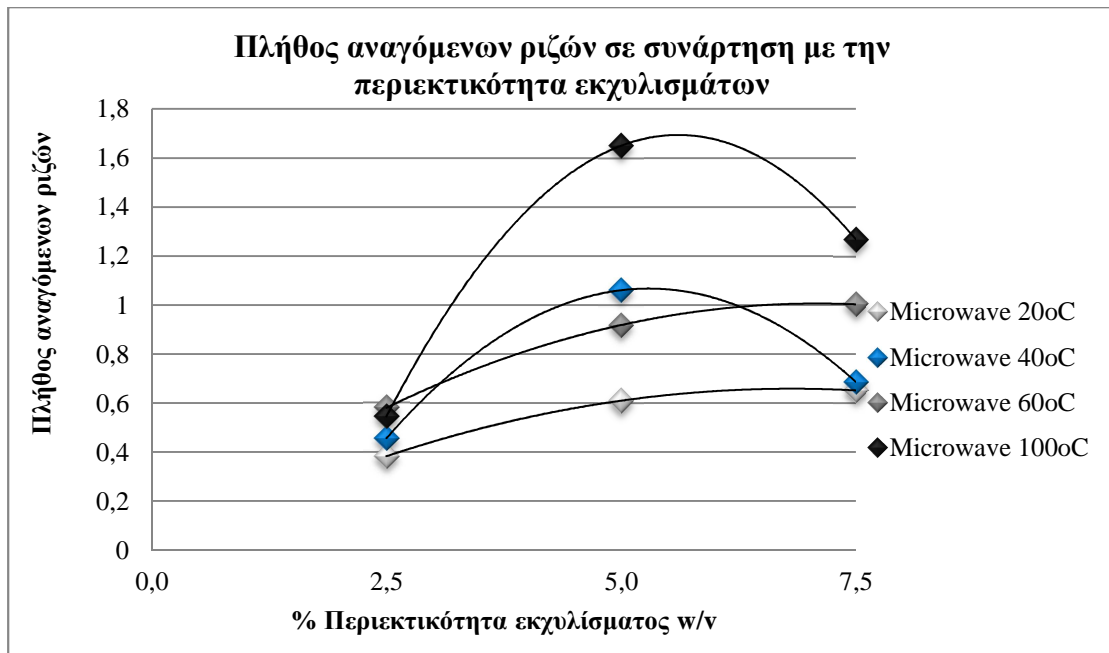
των αναγόμενων ριζών DPPH και συνεπώς την αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε δείγματος.

Μέθοδος / Περιεκτικότητα		2,50%	5%	7,50%
Conventional	24h	$y = 0,4852x + 0,6698$ $R^2 = 0,9792$	$y = 0,6943x + 0,1903$ $R^2 = 0,9860$	$y = 0,6313x + 0,5017$ $R^2 = 0,9664$
	72h	$y = 0,4376x + 0,6157$ $R^2 = 0,9883$	$y = 1,3017x + 0,0778$ $R^2 = 0,9992$	$y = 1,4252x + 1,1179$ $R^2 = 0,9589$
Microwave Assisted	20°C	$y = 0,383x + 0,3135$ $R^2 = 0,9278$	$y = 0,6098x + 0,7348$ $R^2 = 0,9645$	$y = 0,6518x + 0,6614$ $R^2 = 0,9827$
	40°C	$y = 0,4563x + 0,8634$ $R^2 = 0,9506$	$y = 1,0605x + 0,1526$ $R^2 = 0,9944$	$y = 0,6861x + 1,1908$ $R^2 = 0,9354$
	60°C	$y = 0,5809x + 0,164$ $R^2 = 0,9157$	$y = 0,9184x + 0,6833$ $R^2 = 0,9567$	$y = 1,0028x + 0,4093$ $R^2 = 0,9895$
	100°C	$y = 0,5451x - 0,214$ $R^2 = 0,9882$	$y = 1,6502x + 0,0293$ $R^2 = 0,9854$	$y = 1,2676x + 0,8477$ $R^2 = 0,9841$
Ultrasonic Assisted	40%	$y = 0,4852x + 1,3319$ $R^2 = 0,931$	$y = 1,8807x - 0,2509$ $R^2 = 0,9347$	$y = 1,5034x + 0,6127$ $R^2 = 0,9922$

Πίνακας 13: Γραμμές τάσης συσχετισμού μεταβολής συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 23: Πλήθος αναγόμενων ριζών σε συνάρτηση με την % περιεκτικότητα των εκχυλίσματος. (1)



Διάγραμμα 24: Πλήθος αναγόμενων ριζών σε συνάρτηση με την % περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων. (2)

Δείγμα		Πλήθος αναγόμενων ριζών	Γραμμή τάσης
Conventional 24h	2,5%	0,4582	$y = -0,0239x^2 + 0,2739x - 0,077$
	5,0%	0,6943	
	7,5%	0,6313	
Conventional 72h	2,5%	0,4376	$y = -0,0592x^2 + 0,790x - 1,1671$
	5,0%	1,3017	
	7,5%	1,4252	
Microwave 20°C	2,5%	0,383	$y = -0,0148x^2 + 0,2016x - 0,0286$
	5,0%	0,6098	
	7,5%	0,6518	
Microwave 40°C	2,5%	0,4563	$y = -0,0783x^2 + 0,8288x - 1,1265$
	5,0%	1,0605	
	7,5%	0,6861	
Microwave 60°C	2,5%	0,5809	$y = -0,0202x^2 + 0,2869x - 0,0097$
	5,0%	0,9184	
	7,5%	1,0028	
Microwave 100°C	2,5%	0,5451	$y = -0,1190x^2 + 1,3347x - 2,0477$
	5,0%	1,6502	
	7,5%	1,2676	
Ultrasonic 40%	2,5%	0,4852	$y = -0,1418x^2 + 1,6219x - 2,6831$
	5,0%	1,8807	
	7,5%	1,5034	

Πίνακας 14: Γραμμές τάσης μεταβολής πλήθους αναγόμενων ριζών με την % περιεκτικότητα εκχυλίσματος.

Σχολιασμός

Αρχικά, σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα περιεκτικότητας 2,5%, η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων είναι μικρή. Τόσο ως προς τις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης σε σταθερή θερμοκρασία, όσο και ως προς τη θερμοκρασιακή μελέτη της μεθόδου εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, για τα εκχυλίσματα της συγκεκριμένης περιεκτικότητας, το πλήθος αναγόμενων ριζών που εκφράζεται από την κλίση της γραμμής τάσης $\Delta C_{DPPH} - \% C_{αρχ.δλμ.}$, δεν αλλάζει σημαντικά.

Ως προς τα εκχυλίσματα περιεκτικότητας 5%, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 19 και σε συμφωνία με τις αναλύσεις ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών φλαβονοειδών, τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με τη συμβατική μέθοδο των 72 ωρών και τη μέθοδο υποβοηθούμενη από υπερήχους, εμφανίζουν ξεκάθαρη επικράτηση των υπολοίπων ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Παράλληλα, στο διάγραμμα 20 είναι επίσης για ακόμα μια φορά εμφανής η εξάρτηση της εκχυλισσιμότητας των συστατικών του φυτού με την αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες (60°C και 100°C) παρουσιάζουν αυξημένο πλήθος αναγόμενων ριζών.

Για τα εκχυλίσματα περιεκτικότητας 7,5%, το μοτίβο που διαφαίνεται από τα εκχυλίσματα 5%, ακολουθείται και στη συγκεκριμένη περίπτωση. Οι επικρατέστερες μέθοδοι εξακολουθούν να είναι η συμβατική εκχύλιση 72 ωρών και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, ενώ σε ότι αφορά την θερμοκρασιακή μελέτη, τα εκχυλίσματα που προέκυχαν από τη μέθοδο υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε υψηλές θερμοκρασίες εμφανίζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα.

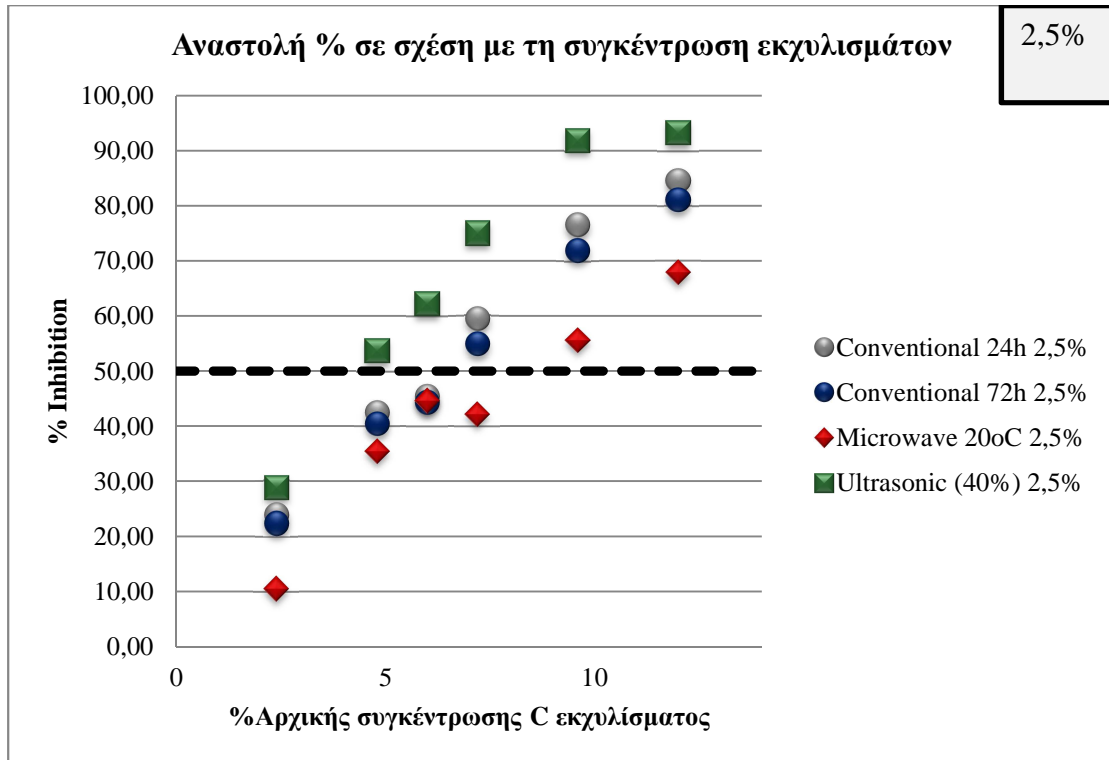
Τα παραπάνω συμπεράσματα, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 13, από τον οποίο προκύπτουν και τα αντίστοιχα διαγράμματα που εκφράζουν το πλήθος των αναγόμενων ριζών, δηλαδή την κλίση της γραμμής τάσης $\Delta C_{DPPH} - \% C_{αρχ.δλμ.}$, σε σχέση με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε βάρος κατ'όγκο. Τόσο η επικράτηση των μεθόδων συμβατικής εκχύλισης 72 ωρών, όσο και η ανάλογη συσχέτιση της θερμοκρασίας με την εκχυλισσιμότητα αντιοξειδωτικών επιβεβαιώνεται και πάλι. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί, πως για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, η καμπύλη που συνδέει το πλήθος αναγόμενων ριζών με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος, παρουσιάζει μέγιστο σε κάποια περιεκτικότητα μεταξύ του 5% και του 7,5% και έπειτα σταδιακή πτώση. Συνεπώς, από κάποια κρίσιμη περιεκτικότητα και μετά, παρά την προσθήκη αυξημένης μάζας φυτού στο εκχύλισμα, η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν αυξάνεται, αλλά μειώνεται. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως επεξηγείται μέσω μιας μη γραμμικής σχέσης εκχυλισσιμότητας και περιεκτικότητας εκχυλίσματος, καθώς με την αύξηση της μάζας προς εκχύλιση, δυσχεραίνονται τα φαινόμενα μεταφοράς και διάχυσης του διαλύτη και άρα μειώνεται η απόδοση της διεργασίας.

Εκτός από την παραπάνω ανάλυση, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, επίσης, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδρασή της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με την εξίσωση:

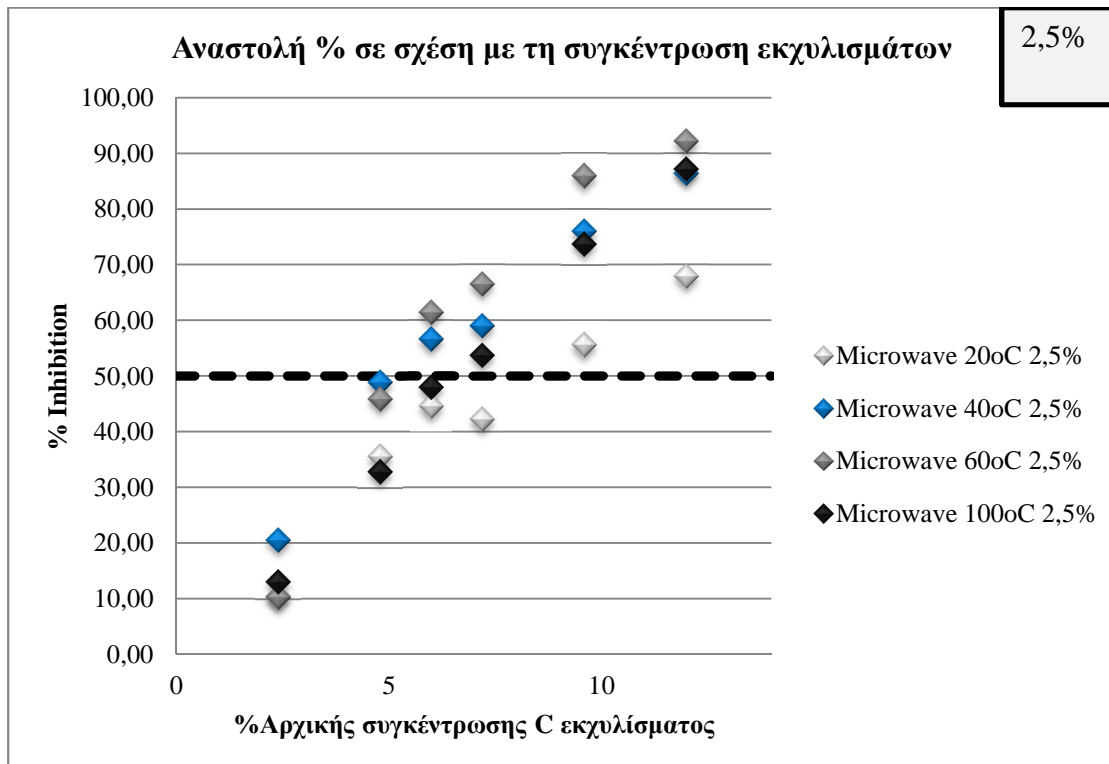
$$\% \text{Αναστολή του DPPH} = \left(\frac{A_{αρχική} - A_{δείγματος}}{A_{αρχική}} \right) \times 100\%$$

Όπου $A_{αρχική}$ είναι η απορρόφηση του DPPH χωρίς το εκχύλισμα, και $A_{δείγματος}$ η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η επί τοις

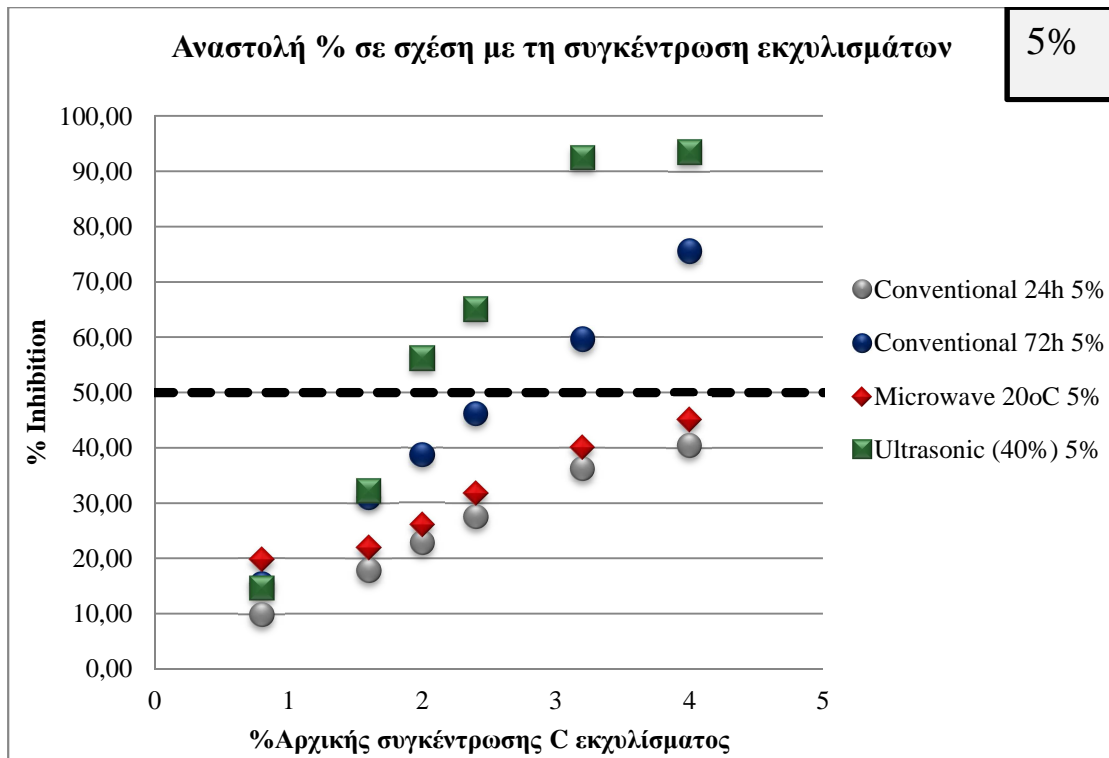
εκατό αναστολή του κάθε δείγματος σε σχέση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος για τις 3 περιεκτικότητες που εξετάστηκαν.



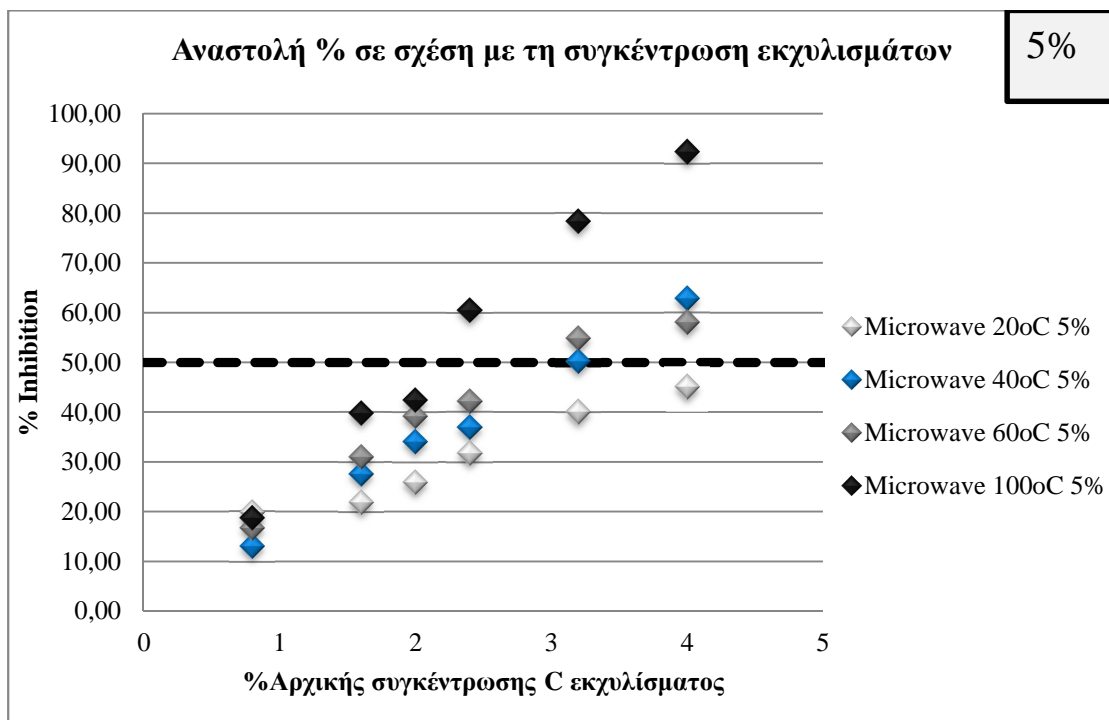
Διάγραμμα 25: %Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 2,5% (1).



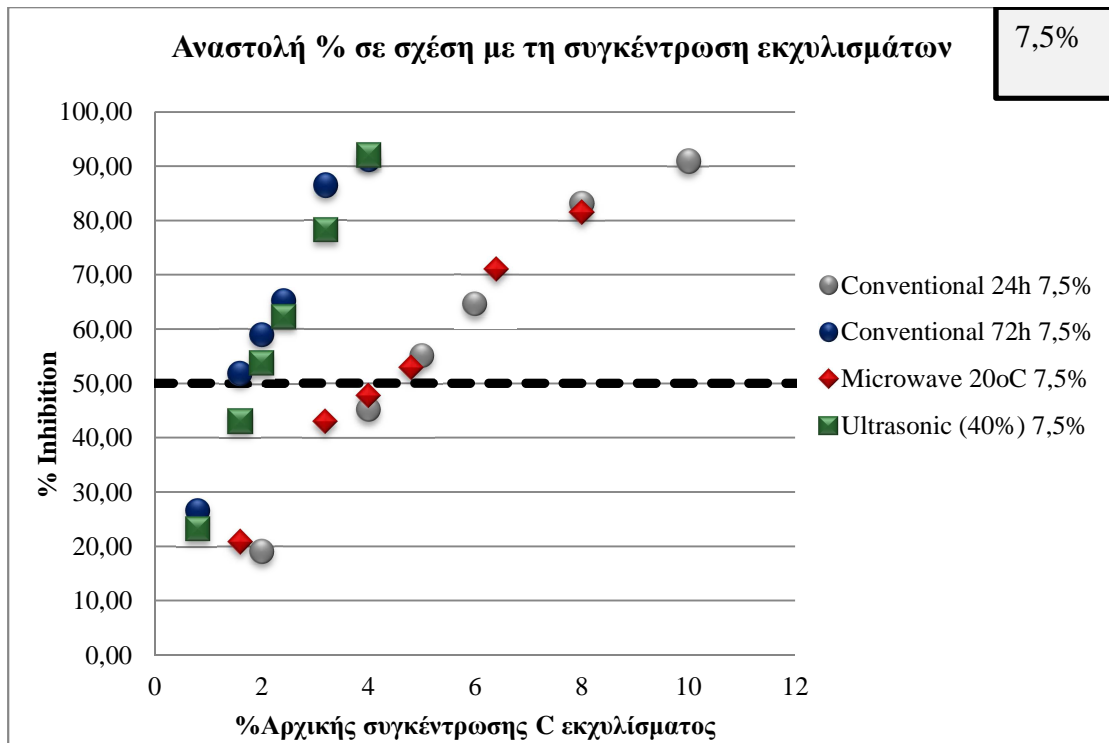
Διάγραμμα 26: %Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλίσμάτων 2,5% (2).



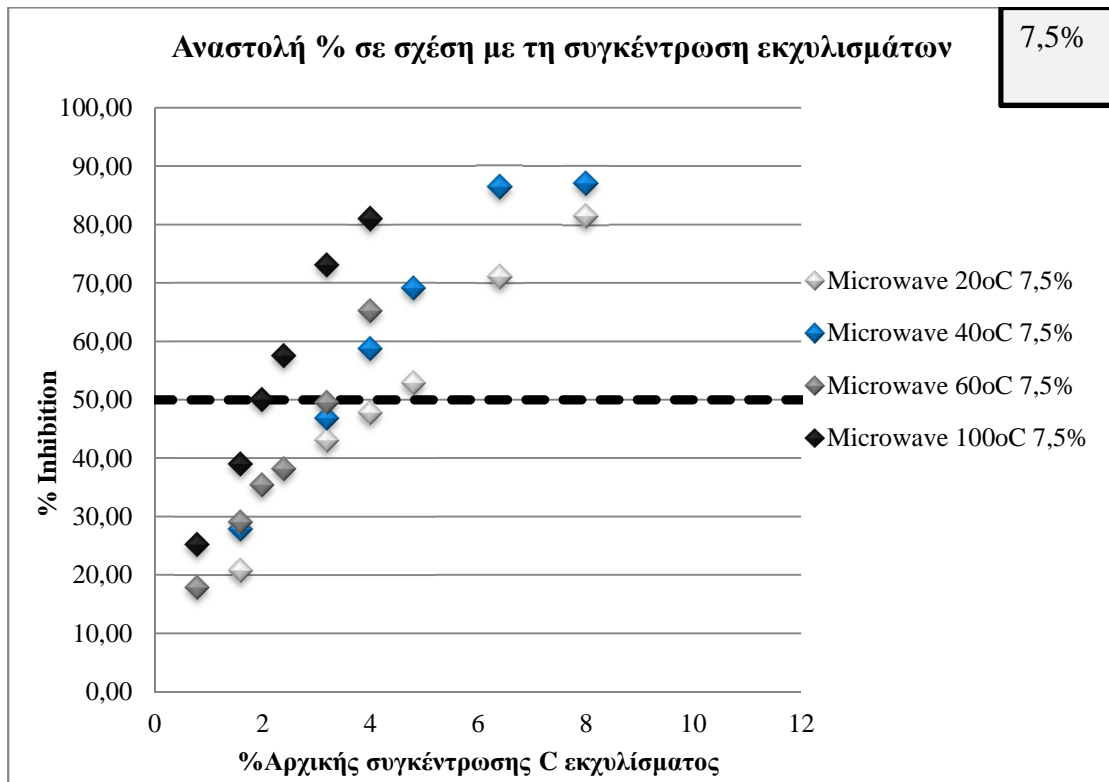
Διάγραμμα 27: %Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 5% (1).



Διάγραμμα 28: %Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 5% (2).



Διάγραμμα 29: %Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 7,5% (1).



Διάγραμμα 30: %Αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκχυλισμάτων 7,5% (2).

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι γραμμές τάσης της αναστολής κάθε εκχυλίματος που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα.

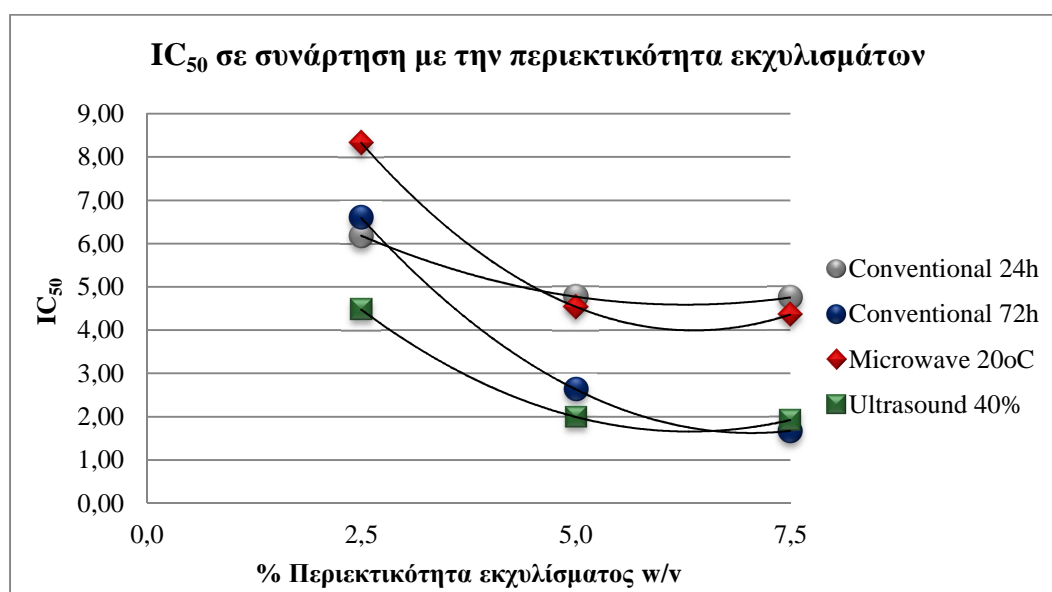
Μέθοδος / Περιεκτικότητα		2,50%	5%	7,50%
Conventional	24h	$y = 6,5406x + 9,5609$ $R^2 = 0,9792$	$y = 9,9098x + 2,7156$ $R^2 = 0,9860$	$y = 9,0106x + 7,1604$ $R^2 = 0,9664$
	72h	$y = 6,2467x + 8,7887$ $R^2 = 0,9883$	$y = 18,58x + 1,11$ $R^2 = 0,9992$	$y = 20,343x + 15,956$ $R^2 = 0,9589$
Microwave Assisted	20oC	$y = 5,4663x + 4,4748$ $R^2 = 0,9278$	$y = 8,7044x + 10,488$ $R^2 = 0,9645$	$y = 9,3031x + 9,4405$ $R^2 = 0,9827$
	40oC	$y = 6,5126x + 12,323$ $R^2 = 0,9506$	$y = 15,136x + 2,178$ $R^2 = 0,9944$	$y = 9,7923x + 16,997$ $R^2 = 0,9354$
	60oC	$y = 8,2911x + 2,3413$ $R^2 = 0,9157$	$y = 13,109x + 9,7525$ $R^2 = 0,99567$	$y = 14,314x + 5,8422$ $R^2 = 0,9895$
	100oC	$y = 7,7805x - 3,054$ $R^2 = 0,9882$	$y = 23,554x + 0,4185$ $R^2 = 0,9854$	$y = 18,093x + 12,1$ $R^2 = 0,9841$
Ultrasound Assisted	40%	$y = 6,9249x + 19,011$ $R^2 = 0,9310$	$y = 26,844x - 3,5812$ $R^2 = 0,9347$	$y = 21,458x + 8,7452$ $R^2 = 0,9922$

Πίνακας 15: Γραμμές τάσης συσχετισμού αναστολής με τη συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος.

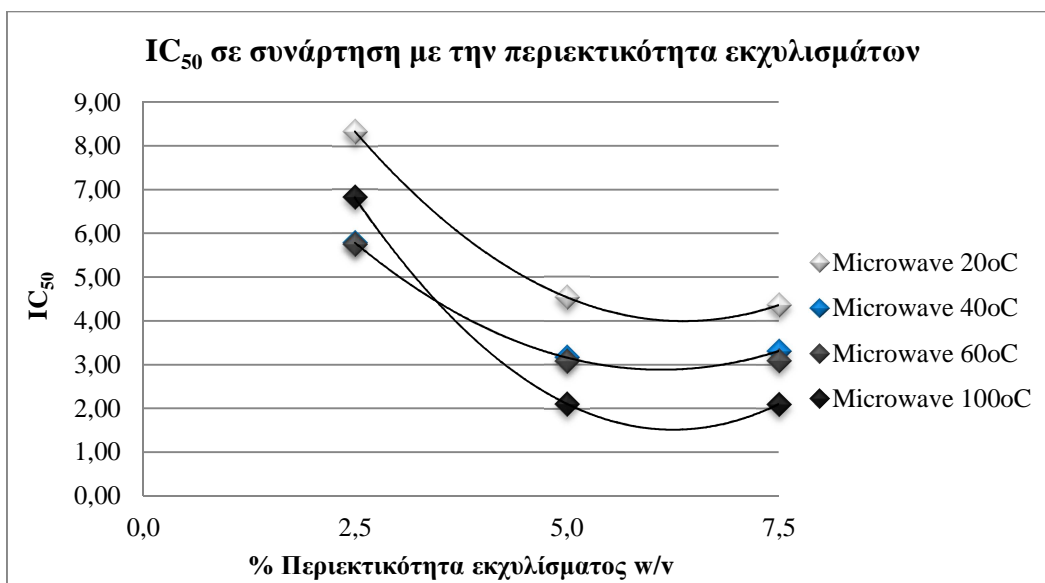
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή εκφράζει το επί τοις εκατό ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης C του εκχυλίσματος που απαιτείται για την κατά 50% αναστολή. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50% (δείκτης IC_{50}) έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλιμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Μέθοδος / Περιεκτικότητα	Conventional		Microwave Assisted				Ultrasound Assisted
	24h	72h	20°C	40°C	60°C	100°C	
2,50%	6,18	6,60	8,33	5,79	5,75	6,82	4,48
5%	4,77	2,63	4,54	3,16	3,07	2,11	2,00
7,50%	4,75	1,67	4,36	3,31	3,08	2,09	1,92

Πίνακας 16: Τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων



Διάγραμμα 31: Μεταβολή IC_{50} με την % περιεκτικότητα εκχυλισμάτων (1).



Διάγραμμα 32: Μεταβολή IC₅₀ με την % περιεκτικότητα εκχυλισμάτων (2).

Δείγμα		IC ₅₀	Γραμμή τάσης
Conventional 24h	2,5%	6,18	$y = 0,1115x^2 - 1,401x + 8,9883$
	5,0%	4,77	
	7,5%	4,75	
Conventional 72h	2,5%	6,60	$y = 0,2407x^2 - 3,3913x + 13,571$
	5,0%	2,63	
	7,5%	1,67	
Microwave 20°C	2,5%	8,33	$y = 0,2888x^2 - 3,6813x + 15,727$
	5,0%	4,54	
	7,5%	4,36	
Microwave 40°C	2,5%	5,79	$y = 0,2221x^2 - 2,7157x + 11,187$
	5,0%	3,16	
	7,5%	3,31	
Microwave 60°C	2,5%	5,75	$y = 0,2154x^2 - 2,6868x + 11,119$
	5,0%	3,07	
	7,5%	3,08	
Microwave 100°C	2,5%	6,82	$y = 0,3763x^2 - 4,7077x + 16,236$
	5,0%	2,11	
	7,5%	2,09	
Ultrasound 40%	2,5%	4,48	$y = 0,1924x^2 - 2,4349x + 9,3596$
	5,0%	2,00	
	7,5%	1,92	

Πίνακας 17: Γραμμές τάσης μεταβολής IC₅₀ με την % περιεκτικότητα εκχυλισμάτων

Σχολιασμός

Στην ανάλυση της % αναστολής της δράσης του DPPH, τα συμπεράσματα που προκύπτουν ταυτίζονται με αυτά του πλήθους αναγόμενων ριζών. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων

2,5%, τα αποτελέσματα δε δείχνουν σημαντική διαφοροποίηση ούτε ως προς τη μέθοδο, αλλά ούτε και ως προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Ωστόσο, στα εκχυλίσματα περιεκτικότητας 5% και ακόμα περισσότερο στα εκχυλίσματα 7,5%, ικανοποιητικότερα αποτελέσματα παρουσιάζουν οι μέθοδοι συμβατικής εκχύλισης 72 ωρών και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Παράλληλα, σε ότι αφορά τη θερμοκρασιακή εξάρτηση, όπως είναι αναμενόμενο, η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης αυξάνει την % αναστολή της δράσης του DPPH.

Τα συμπεράσματα αυτά, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 15, που περιλαμβάνει τις γραμμές τάσης που συσχετίζουν την % αναστολή με το ποσοστό % της αρχικής συγκέντρωσης C των εκχυλισμάτων. Από τον συγκεκριμένο πίνακα προκύπτουν και οι τιμές IC₅₀ κάθε εκχυλίσματος, οι οποίες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 16. Στα διαγράμματα 31 και 32, συνδυαστικά με τον πίνακα 17, ποσοτικοποιείται η πτώση της τιμής IC₅₀ με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος. Όπως είναι λογικό, μεγαλύτερη πτωτική τάση υποδηλώνει μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την περιεκτικότητα. Παρόλα αυτά, όπως και στην περίπτωση του πλήθους αναγόμενων ριζών, έτσι και στην τιμή IC₅₀ για όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζεται μια ελάχιστη τιμή σε κάποια περιεκτικότητα ανάμεσα στο 5% και το 7,5%, έπειτα από την οποία η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος εμφανίζει μείωση.

1.2. Εκχυλίσματα με διαλύτη αιθανόλη

1.2.1. Ολικές Φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content)

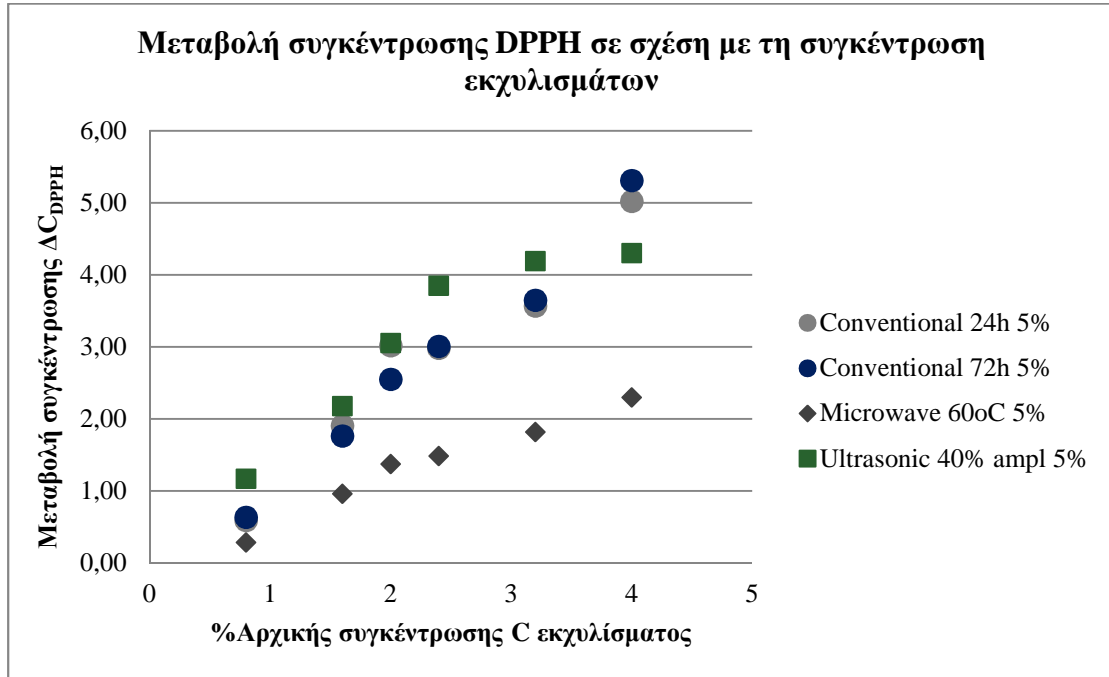
Δείγμα		Αραιώσεις	M.O. Απορρόφησης	C (mg GA/ml) εκχυλίσματος	TPC (mg GA/g φυτού)
Conventional 24h	5%	25	0,4863 ± 0,0354	0,445 ± 0,032	8,934 ± 0,650
Conventional 72h	5%	15	0,1870 ± 0,0167	0,411 ± 0,009	8,138 ± 0,182
Microwave 60oC	5%	25	0,2600 ± 0,0370	0,238 ± 0,034	4,687 ± 0,667
Ultrasonic 40%	5%	25	0,4415 ± 0,0035	0,404 ± 0,003	8,085 ± 0,065

Πίνακας 18: Απορροφήσεις δειγμάτων, συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά των εκχυλισμάτων.

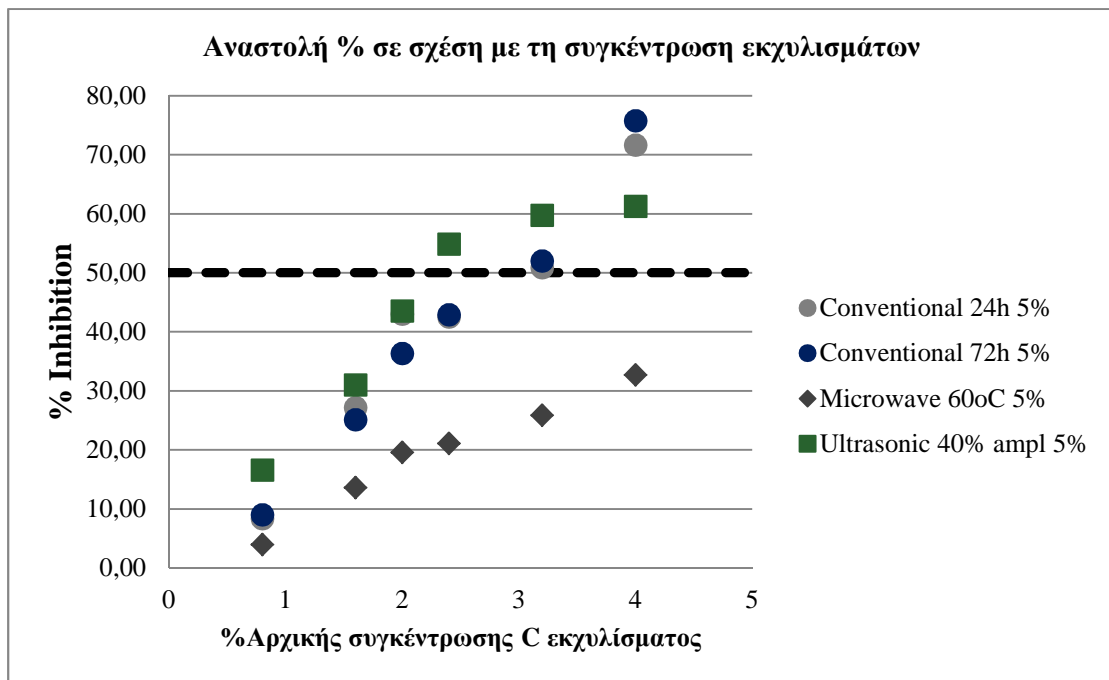
Σχολιασμός

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη, είναι εμφανές ότι τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται σημαντικά σε σχέση με τα εκχυλίσματα σε γλυκερόλη, ως προς τη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, αν και το εκχύλισμα που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους βρίσκεται και πάλι στα πιο πλούσια δείγματα, τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση 24 και 72 ωρών παρουσιάζουν ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε φαινολικά συστατικά. Το δείγμα των 24 ωρών μάλιστα φαίνεται να ξεπερνά σε περιεκτικότητα και αυτό των 72 ωρών, αν και λαμβάνοντας υπόψη το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων, ενδέχεται τα δύο δείγματα να εμφανίζουν αντίστοιχη συγκέντρωση. Ωστόσο, στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι συγκριτικά με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα σε γλυκερόλη, στα εκχυλίσματα συμβατικής εκχύλισης σε αιθανόλη η ανάδευση κατά την παρασκευή τους ήταν πολύ πιο αποτελεσματική, γεγονός που αιτιολογεί τις αυξημένες τιμές τους. Από την άλλη, το εκχύλισμα που προέκυψε από τη μέθοδο υποβοηθούμενη από μικροκύματα στους 60°C παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις. Τα συμπεράσματα αυτά, επιβεβαιώνονται και από τις εκάστοτε τιμές TPC των δειγμάτων.

1.2.2. Αντιοξειδωτική δράση - Δοκιμή DPPH (Antioxidant activity)



Διάγραμμα 33: Μεταβολή συγκέντρωσης DPPH με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων.



Διάγραμμα 34: Αναστολή % σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων.

Μέθοδος / Περιεκτικότητα		Γ.Τ. ΔC_{DPPH}	Γ.Τ. %Inhibition	IC ₅₀
Conventional	24h	$y = 1,2786x - 0,1376$ $R^2 = 0,9469$	$y = 18,249x - 1,9635$ $R^2 = 0,9469$	2,85
	72h	$y = 1,3929x - 0,4329$ $R^2 = 0,9828$	$y = 19,881x - 6,179$ $R^2 = 0,9828$	2,83
Microwave Assisted	60°C	$y = 0,5977x - 0,0279$ $R^2 = 0,964$	$y = 8,5309x - 0,3988$ $R^2 = 0,964$	5,91
Ultrasonic Assisted	40%	$y = 1,0179x + 0,7459$ $R^2 = 0,8707$	$y = 14,529x + 10,646$ $R^2 = 0,8707$	2,71

Πίνακας 19: Γραμμές τάσης μεταβολής συγκέντρωσης DPPH και % Αναστολής, IC₅₀.

Σχολιασμός

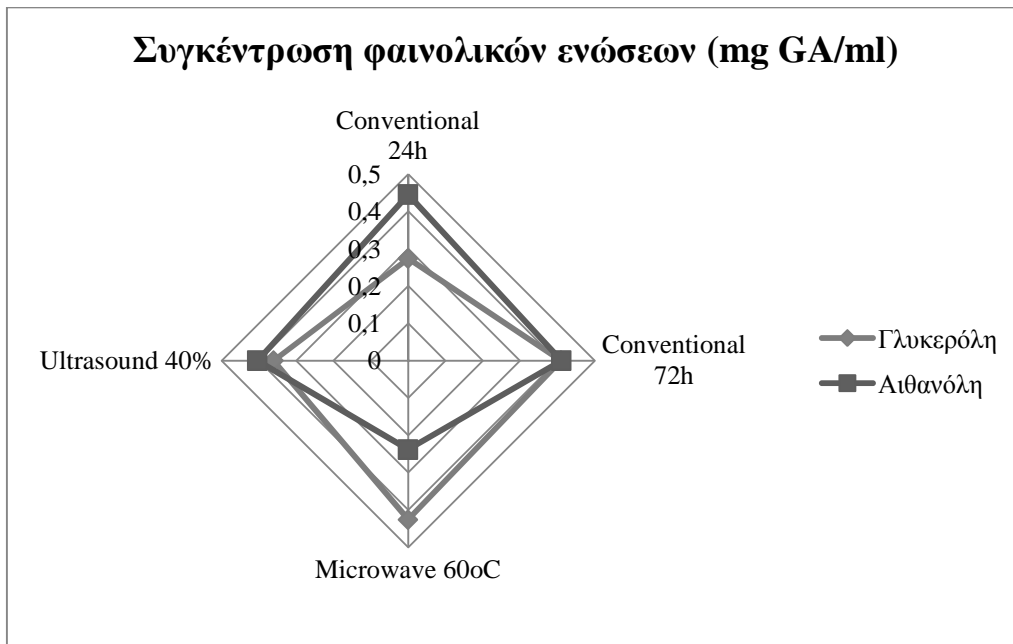
Όπως είναι εμφανές από τα παραπάνω διαγράμματα, τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων των εκχυλίσμάτων, επιβεβαιώνονται και από την ανάλυση της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους εμφανίζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα, γεγονός που υποδηλώνεται τόσο από την κλίση της γραμμής τάσης ΔC_{DPPH} -%C_{antiox.}, δηλαδή το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο αντιοξειδωτικού, όσο και από τις τιμές IC₅₀, όπως αυτές αναγράφονται στον πίνακα 19.

1.3. Σύγκριση εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη και αιθανόλη

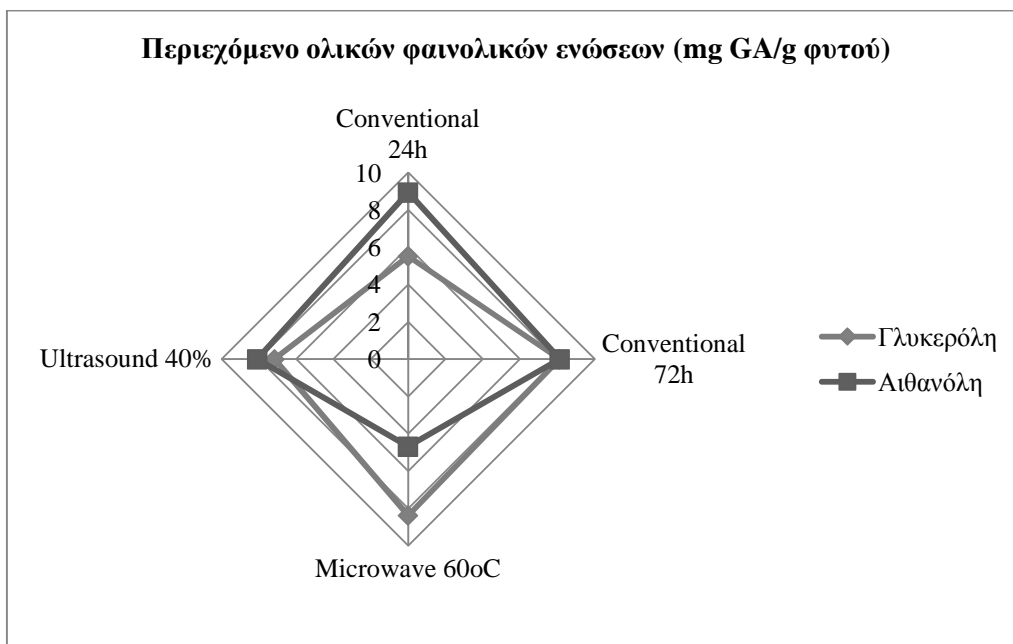
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαινολικών ενώσεων για τα εκχυλίσματα σε διαλύτη γλυκερόλη και αιθανόλη.

Δείγμα		Εκχυλίσματα σε γλυκερόλη		Εκχυλίσματα σε αιθανόλη	
		C (mg GA/ml) εκχυλίσματος	TPC (mg GA/g φυτού)	C (mg GA/ml) εκχυλίσματος	TPC (mg GA/g φυτού)
Conventional 24h	5%	0,2735 ± 0,0091	5,516 ± 0,183	0,445 ± 0,032	8,934 ± 0,650
Conventional 72h	5%	0,4095 ± 0,0087	8,114 ± 0,172	0,411 ± 0,009	8,138 ± 0,182
Microwave 60oC	5%	0,4258 ± 0,0958	8,379 ± 1,884	0,238 ± 0,034	4,687 ± 0,667
Ultrasonic 40%	5%	0,3606 ± 0,0350	7,158 ± 0,695	0,404 ± 0,0035	8,085 ± 0,065

Πίνακας 20: Συγκριτικός πίνακας φαινολικών ενώσεων εκχυλισμάτων γλυκερόλης και αιθανόλης.



Διάγραμμα 35: Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.



Διάγραμμα 36: Περιεχόμενο ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.

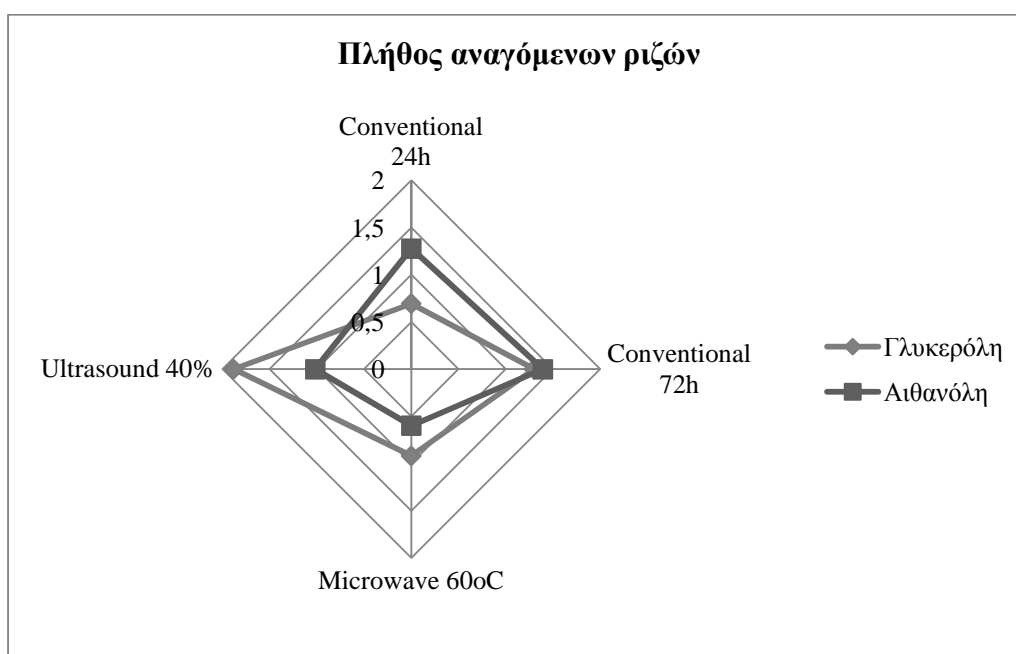
Σχολιασμός

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 20 και τα διαγράμματα 35 και 36, τα εκχυλίσματα που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση ανάλογα με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση είναι αυτά που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση 24 ωρών και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα στους 60°C. Το πρώτο, παρουσιάζει μια σαφή βελτίωση κατά την εκχύλιση του σε αιθανόλη, γεγονός που, όπως προαναφέρθηκε, ενδεχομένως να οφείλεται στην αποτελεσματικότερη ανάδευση κατά την εκχύλιση, η οποία οδηγεί σε αύξηση των φαινομένων μεταφοράς και διάχυσης του διαλύτη στο φυτό και άρα αυξημένη απόδοση της διεργασίας. Αντίθετα, το δείγμα που παρασκευάστηκε με εκχύλιση υποβοηθούμενη από

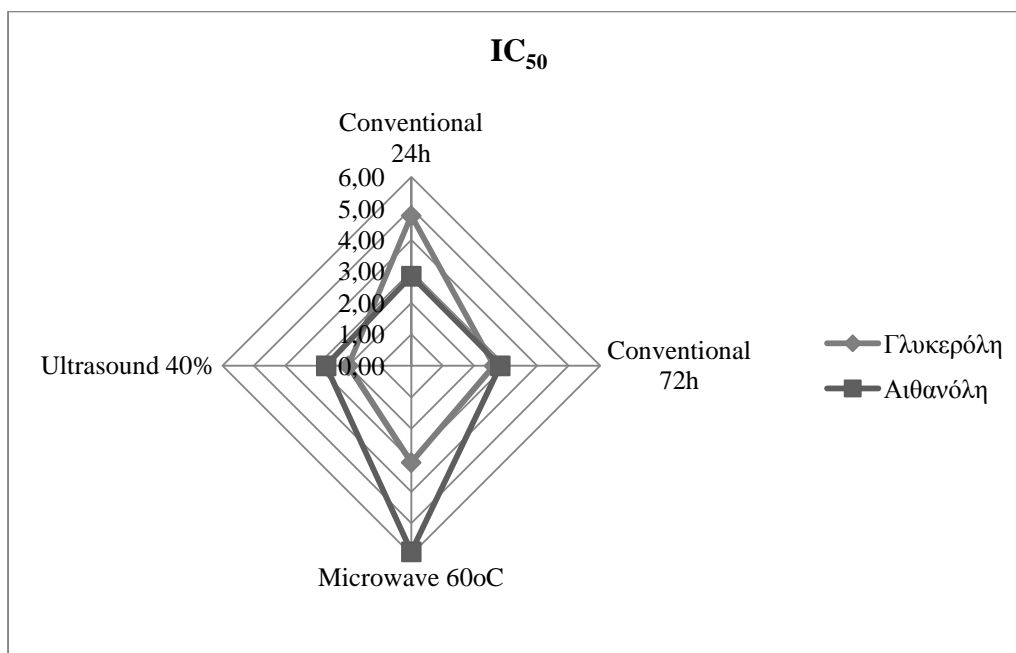
μικροκύματα, προέκυψε σημαντικά πιο φτωχό σε φαινολικές ενώσεις. Μια πιθανή αιτία, θα μπορούσε να είναι η μεγαλύτερη αύξηση της εκχυλισιμότητας των φαινολικών ενώσεων με την αύξηση της θερμοκρασίας σε διαλύτη γλυκερόλη, απ'ότι στην αιθανόλη. Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (Conventional 72h & Ultrasound Assisted) παρουσιάζουν πολύ μικρές διαφορές ανάλογα με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλισή τους.

Δείγμα	Εκχυλίσματα σε γλυκερόλη		Εκχυλίσματα σε αιθανόλη	
	Πλήθος αναγόμενων ριζών	IC ₅₀	Πλήθος αναγόμενων ριζών	IC ₅₀
Conventional 24h 5%	0,6943	4,77	1,2786	2,85
Conventional 72h 5%	1,3017	2,63	1,3929	2,83
Microwave 60oC 5%	0,9184	3,07	0,5977	5,91
Ultrasound 40% 5%	1,8807	2,00	1,0179	2,71

Πίνακας 21: Συγκριτικός πίνακας αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων γλυκερόλης και αιθανόλης.



Διάγραμμα 37: Πλήθος αναγόμενων ριζών εκχυλισμάτων με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.



Διάγραμμα 38: IC₅₀ εκχυλισμάτων με γλυκερόλη και αιθανόλη συγκριτικά.

Σχολιασμός

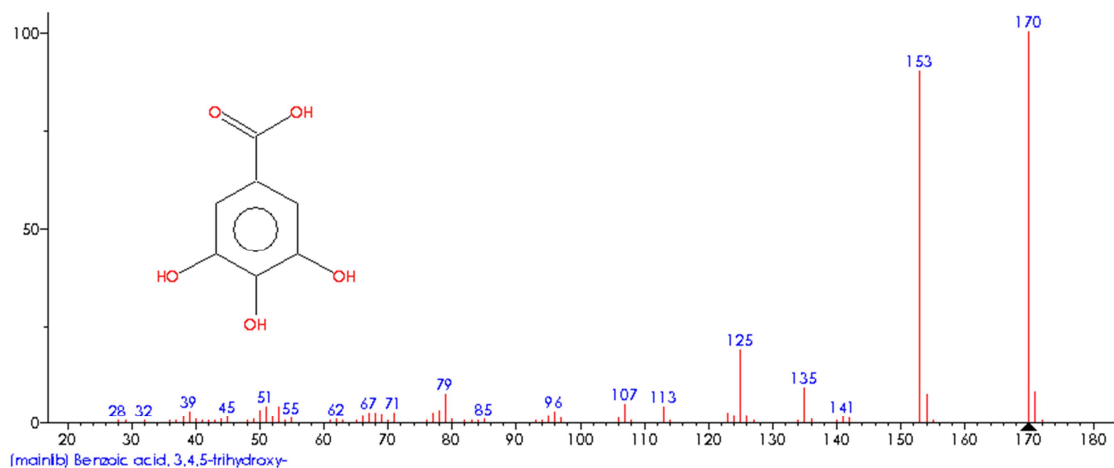
Όσον αφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, σύμφωνα με το διάγραμμα 37, ενώ το εκχύλισμα συμβατικής εκχύλισης 72 ωρών δεν εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση με μεταβολή του διαλύτη, τόσο το εκχύλισμα με τη μέθοδο υποβοηθούμενη από μικροκύματα, όσο και αυτήν υποβοηθούμενη από υπερήχους παρουσιάζουν εμφανή μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας εκφρασμένης σε πλήθος αναγόμενων ριζών σε διαλύτη αιθανόλη. Αντιθέτως, το εκχύλισμα συμβατικής εκχύλισης 24 ωρών προκύπτει πιο ισχυρό σε αντιοξειδωτική δράση κατά την εκχύλισή του σε αιθανόλη. Ανάλογα συμπεράσματα προκύπτουν και από τις τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων, μιας και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας οδηγεί σε μείωση του δείκτη IC₅₀.

2. Ανάλυση προφίλ με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

2.1. Δοκιμή με γαλλικό οξύ

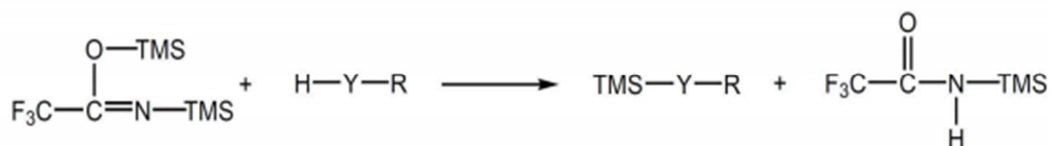
Πριν από τη χρήση του GC-MS για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη που παρασκευάστηκαν, έγινε δοκιμή σε πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος έπειτα από παραγωγή για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της αντίδρασης και της επάρκειας του αντιδραστηρίου BSTFA.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το φάσμα μάζας του γαλλικού οξέος (μη συλλιωμένου) με βάση τη βιβλιοθήκη φασμάτων NIST Spectral Library.

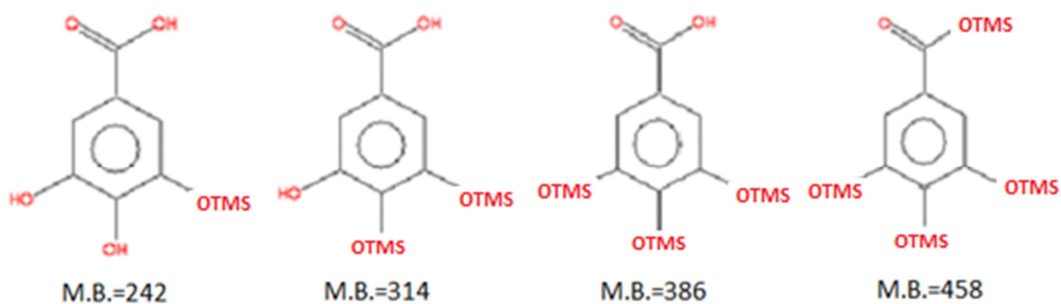


Εικόνα 17: Φάσμα μάζας γαλλικού οξέος (NIST Spectral Library)

Κατά την αντίδραση της παραγωγοποίησης, όπως φαίνεται και στην παρακάτω αντίδραση, κάθε υδροξύλιο του γαλλικού οξέος μπορεί να αντικατασταθεί με μια ομάδα TMS και συνεπώς προκύπτουν 4 πιθανά σιλυλιωμένα παράγωγα της αρχικής ένωσης του γαλλικού οξέος.

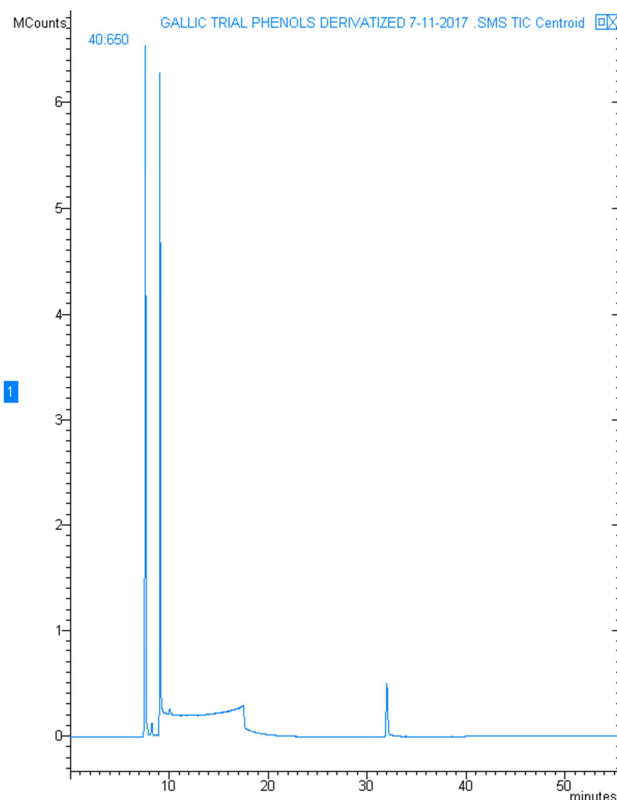


Εικόνα 18: Αντίδραση παραγωγοποίησης με BSTFA.



Εικόνα 19: Σιλυλιωμένα παράγωγα γαλλικού οξέος και τα μοριακά τους βάρη.

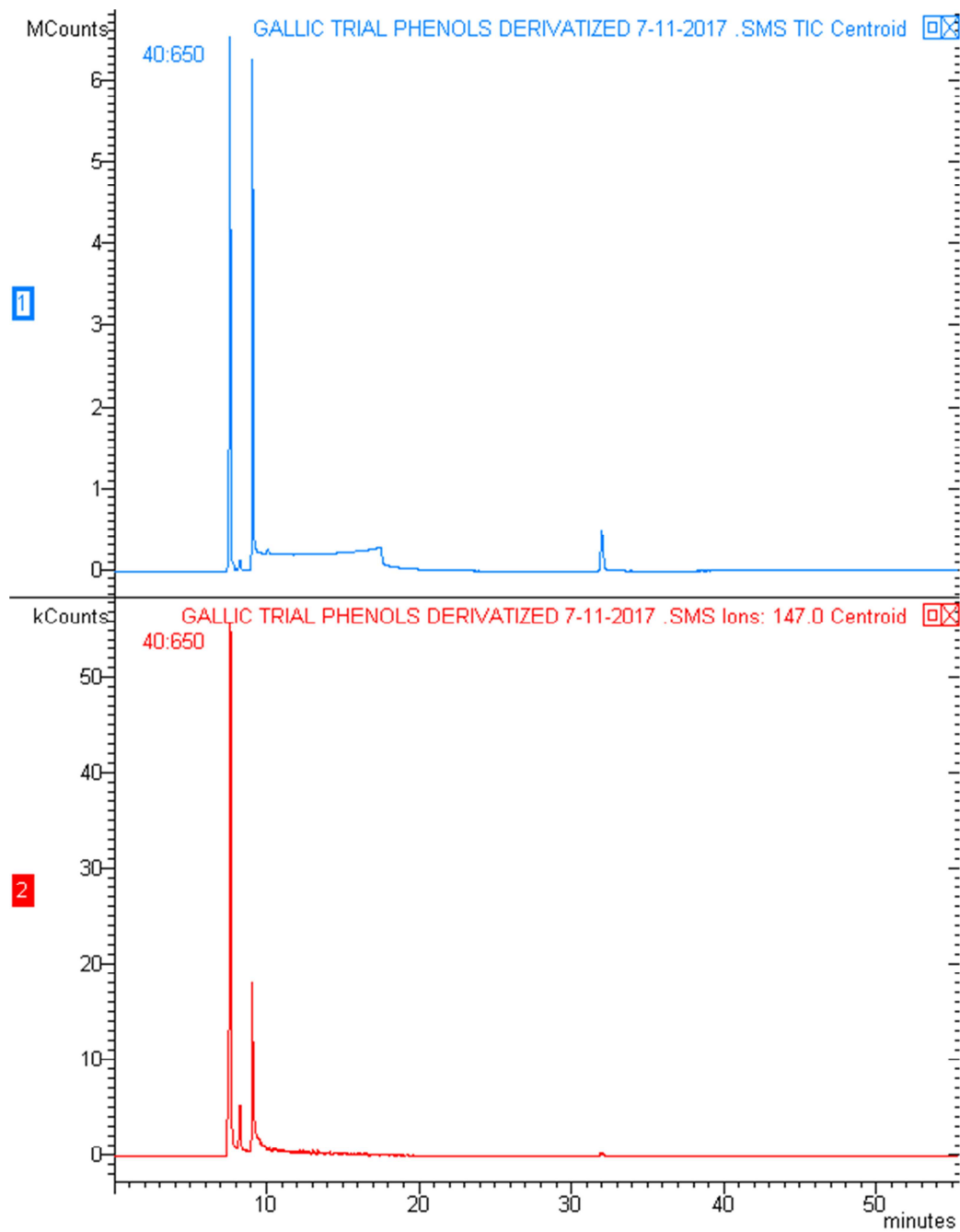
Το χρωματογράφημα που προκύπτει για το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος μετά την αντίδραση της παραγωγοποίησης παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος.

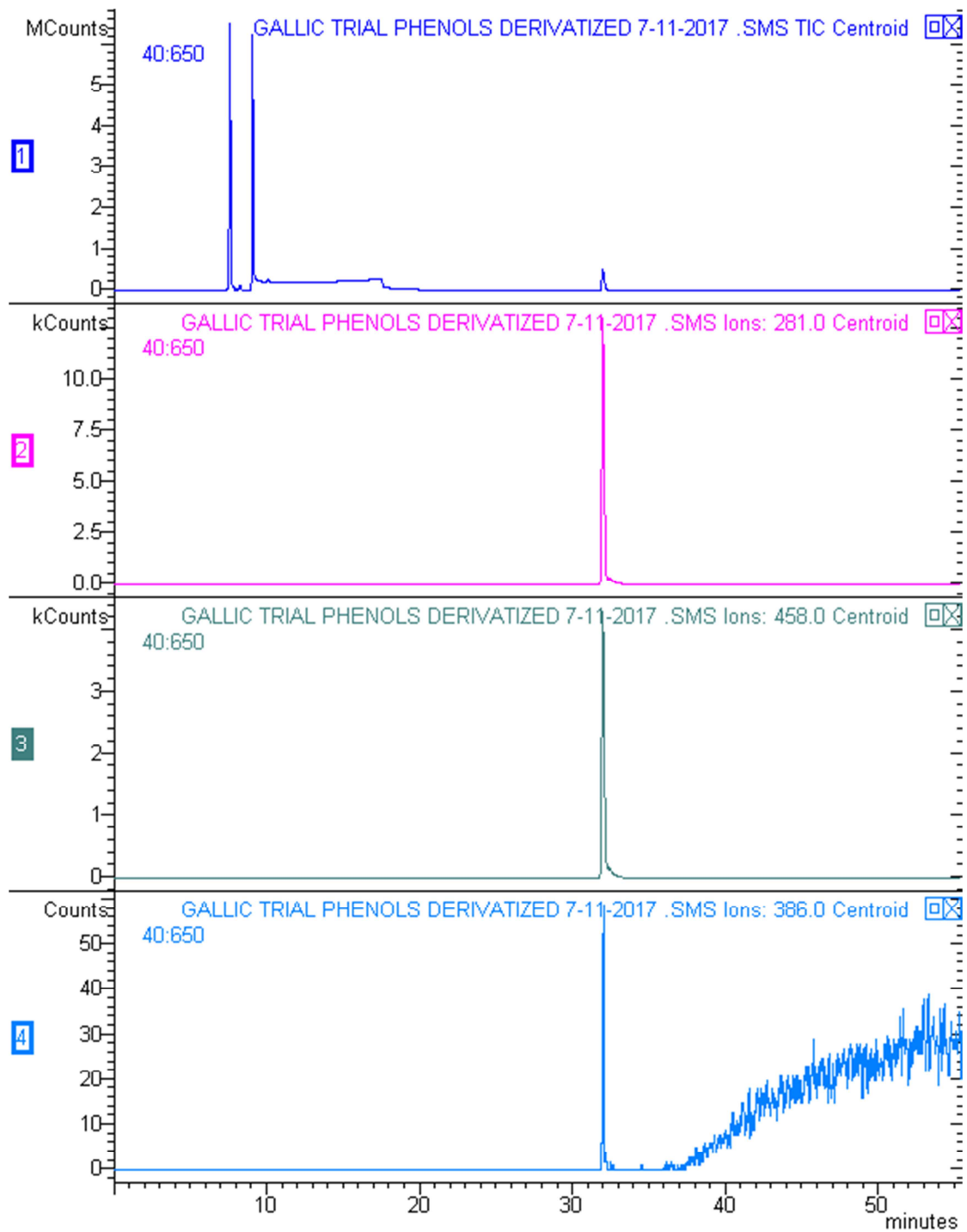
Για το γαλλικό οξύ, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η κύρια οδός θραυσματοποίησης παράγει μια κυρίαρχη [M-177] κορυφή. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αναφορές που να περιγράφουν την προέλευση αυτού του θραύσματος για φαινολικά οξέα. Επίσης, βασική κορυφή στα φάσματα μάζας σιλυλιωμένων προϊόντων είναι το θραύσμα με $m/z=73$, που αντιπροσωπεύει την ομάδα TMS. Ακόμα, η παρουσία του θραύσματος $m/z=147$ που αντιστοιχεί στη δομή $[(CH_3)_2Si = O - Si(CH_3)_3]^+$, υποδηλώνει την ύπαρξη δύο ή περισσότερων ομάδων TMS στο μόριο. (Proestos et al. , 2013)

Στην προκειμένη περίπτωση, από τις κορυφές που προκύπτουν, μεγαλύτερη ένταση παρουσιάζουν οι κορυφές στα 7,6 και 9 λεπτά έκλουσης όπως επίσης και η κορυφή που εμφανίζεται στα 32 λεπτά. Οι κορυφές που βρίσκονται πριν τα πρώτα 10 λεπτά έκλουσης, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα οφείλονται στο θραύσμα με λόγο $m/z=147$, δηλαδή στο βασικό παραπροϊόν της αντίδρασης της παραγωγοποίησης και συγκεκριμένα στο ιόν $[(CH_3)_2Si = O - Si(CH_3)_3]^+$. Συνεπώς, η κορυφή που συσχετίζεται με το γαλλικό οξύ είναι εκείνη που εμφανίζεται στα 32 λεπτά έκλουσης.



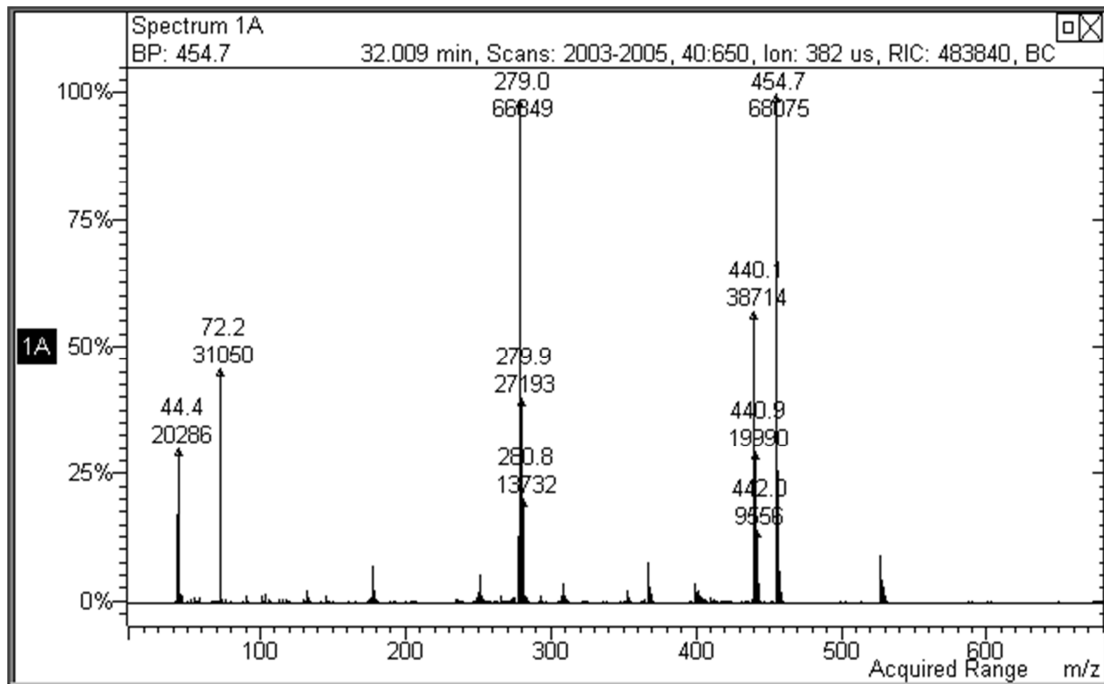
Εικόνα 21: Κορυφές παραπροϊόντος της αντίδρασης παραγωγοποίησης.

Η συσχέτιση της κορυφής που αντιστοιχεί στα 32 λεπτά έκλυσης με το γαλλικό οξύ, επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση, στον ίδιο χρόνο, των βασικών θραυσμάτων που αναμένονται με βάση τη βιβλιογραφία (Proestos et al. ,2013) και συγκεκριμένα αυτών με λόγο $m/z=458$, $m/z=386$ και $m/z=281$.



Εικόνα 22: Βασικά θραύσματα παραγωγοποιημένου γαλλικού οξέος.

Το φάσμα μάζας που προκύπτει για την κορυφή που ταυτοποιήθηκε και αποδόθηκε στο γαλλικό οξύ παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.

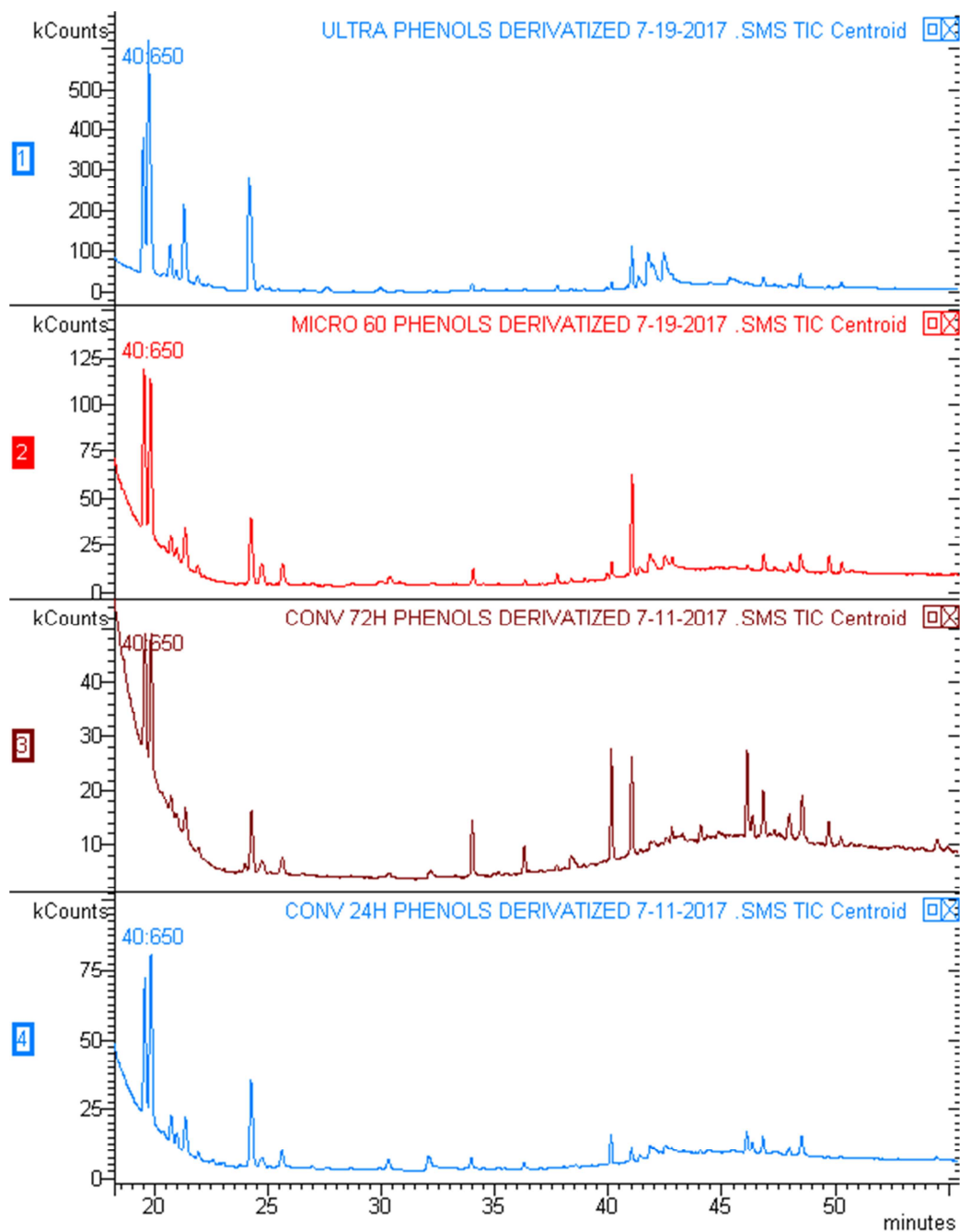


Εικόνα 23: Φάσμα μάζας γαλλικού οξέος μετά την παραγωγοποίηση.

2.2. Εκχυλίσματα σε αιθανόλη

Λόγω της μεθόδου της παραγωγοποίησης που πραγματοποιήθηκε, όπως επίσης και της ίδιας της σύστασης του φυτού, η ανάλυση των εκχυλισμάτων δεν μπορεί να βασιστεί σε πρότυπες βιβλιοθήκες, μιας και οι προκύπτουσες ενώσεις δεν είναι πρότυπες, αλλά αντιθέτως πρόκειται για σιλυλωμένα παράγωγα και γλυκοζιωμένες ενώσεις. Συνεπώς, η ανάλυση στηρίχτηκε αρχικά στην ταυτοποίηση ορισμένων κορυφών, με βάση δεδομένα που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία, προηγούμενες δηλαδή μελέτες των εκχυλισμάτων του εξεταζόμενου φυτού όπως επίσης και στη σύγκριση της ποικιλίας και της έντασης των κορυφών αυτών στα 4 εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν.

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των εκχυλισμάτων σε αιθανόλη παρουσιάζονται συγκριτικά στην παρακάτω εικόνα.

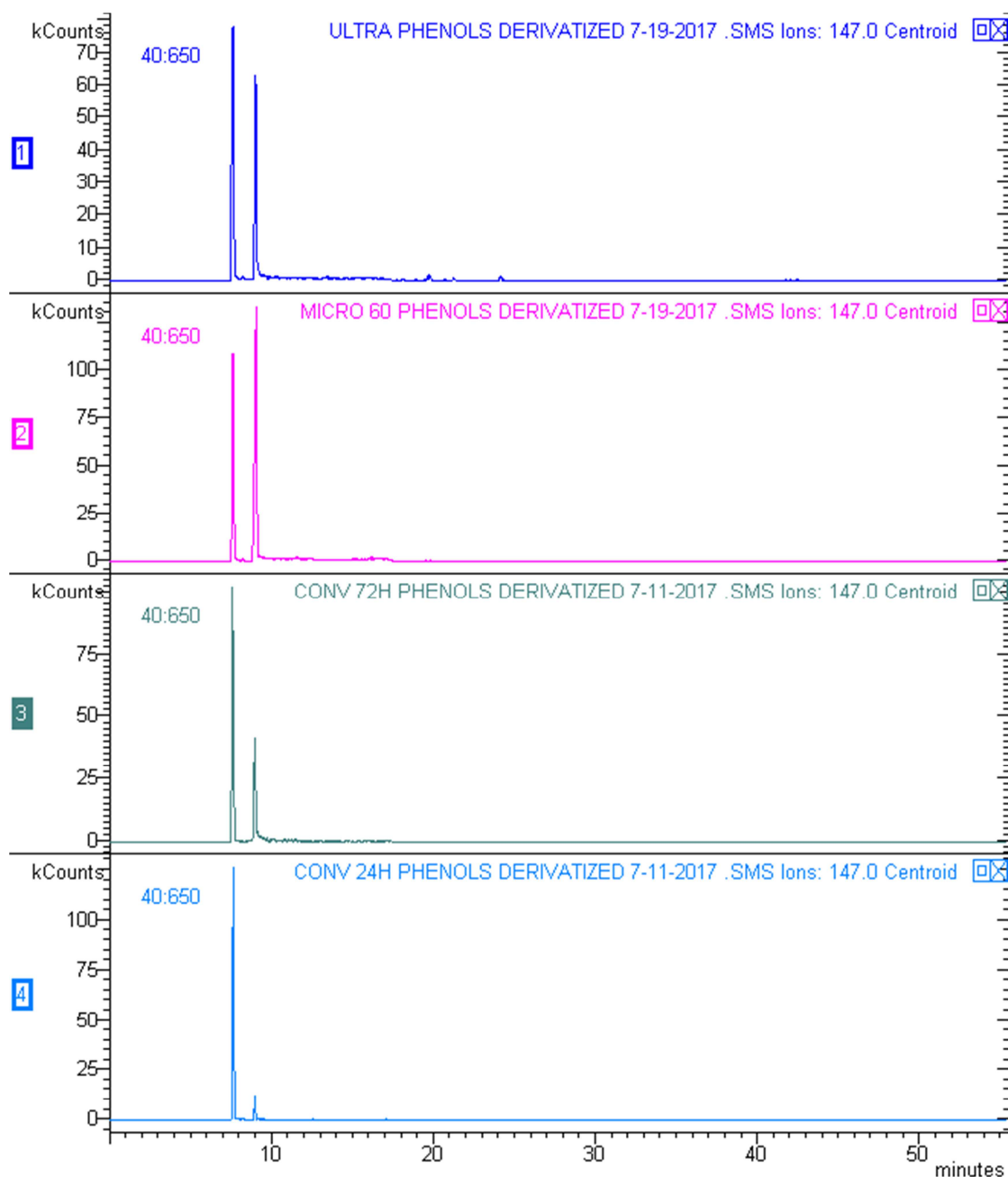


Εικόνα 24: Προφίλ εκχυλισμάτων σε αιθανόλη.

Αρχικά, όπως είναι εμφανές τα φάσματα που λαμβάνονται διαφοροποιούνται τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς την εμφάνιση ορισμένων κορυφών. Το προφίλ των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους παρουσιάζουν πιο πλούσιο προφίλ με σημαντικά μεγαλύτερες εντάσεις κορυφών, άρα και περιεκτικότητες εκχυλισμένων ενώσεων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αύξηση της εκχυλισιμότητας των φαινολικών ενώσεων μέσω των συγκεκριμένων μεθόδων.

Όπως και στην περίπτωση του πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος, έτσι και στα εκχυλίσματα του φυτού εμφανίζονται οι κορυφές που αποδίδονται στα παραπροϊόντα της

αντίδρασης παραγωγοποίησης με λόγο $m/z=147$ και χρόνους έκλυσης 7,6 και 9 λεπτά, οι οποίες παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



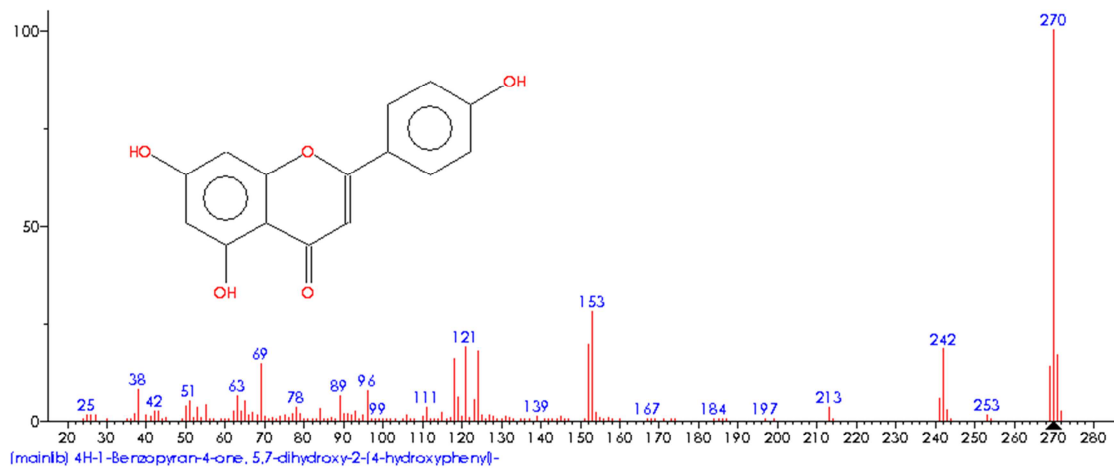
Εικόνα 25: Παραπροϊόν αντίδρασης παραγωγοποίησης στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη.

Με βάση τη δημοσίευση των Vasilopoulou et al. (2011) στα εκχυλίσματα του φυτού *Sideritis clandestina* ταυτοποιήθηκαν συνολικά δεκαεπτά (17) συστατικά, που ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες φυτοχημικών: όπως κινικό οξύ, ιριδοειδή, φαινυλοπροπανοειδή και παράγωγα φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, ο λεπτομερής κατάλογος των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν βρίσκεται στον παρακάτω πίνακα.

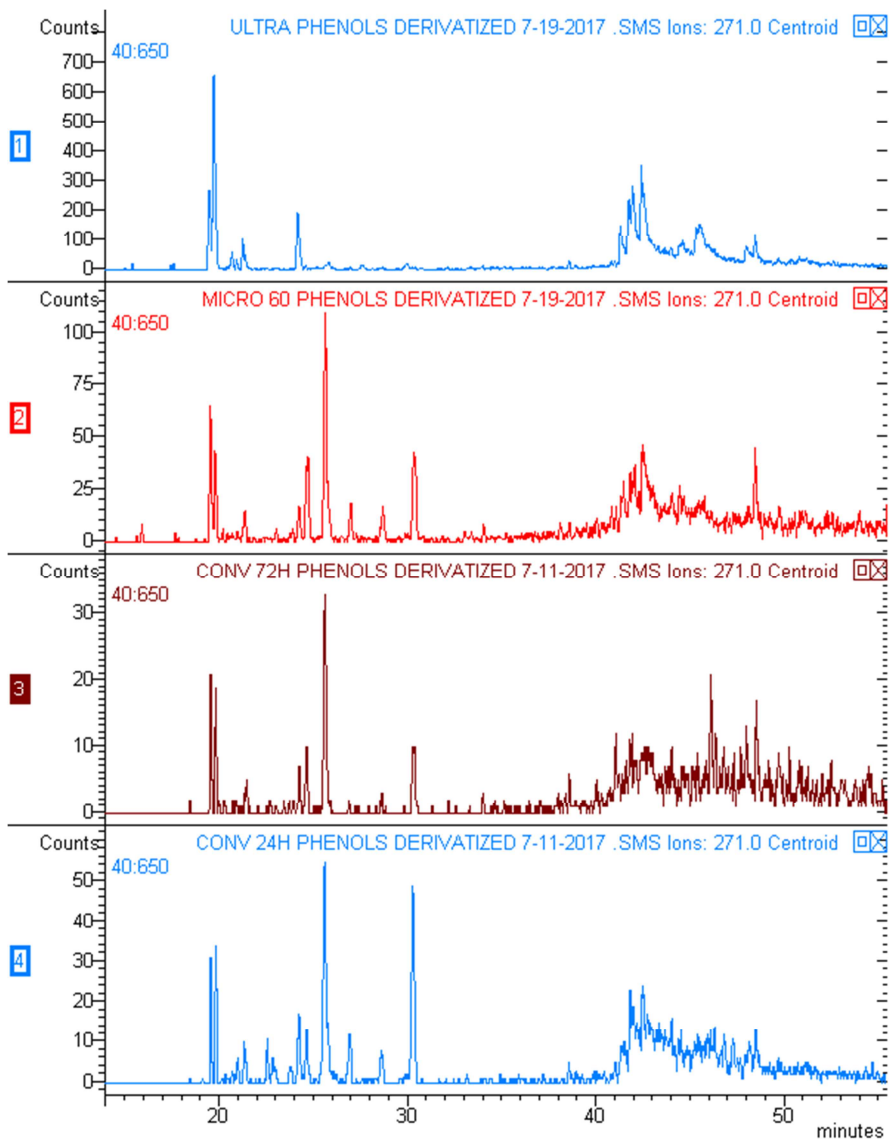
Peak	R_t (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	$-MS^2 [M-H]^-$ (m/z) (%)	$-MS^3$ [base peak] $^-$ (m/z) (%)	Compounds
1	4.2	421	191 (100)	389 (100), 127 (17), 173 (14)	Quinic acid derivative
2	4.2	533	191 (100)	173 (100), 127 (64), 150 (67)	Quinic acid derivative
3	5.9	654, 583, 523	523 (100), 179(6), 565 (8)	179 (100), 361 (30), 343 (24), 463 (11)	Melittoside derivative
4	11.9	583, 523, 665	523 (100), 565 (17), 179 (8)	179 (100), 343 (29), 361 (24), 463 (14)	Melittoside derivative
1'	26.7	449	389 (100), 167 (16), 329 (11)	329 (100), 161 (30), 179 (15), 251 (11)	Unknown
5	27.1	639	621 (100), 459 (8)	459 (100), 179 (13)	β -Hydroxyverbascoside or β -hydroxyisoverbascoside
2'	28.8	579	339 (100), 327 (44)	324 (100), 161 (30), 179 (15)	Unknown
6	29.3	593	269 (100), 431 (21)	269 (100)	Apigenin 7- <i>O</i> -allosyl(1 \rightarrow 2) glucoside,
7	29.8	651	609 (100), 285 (4)	285 (100), 447 (28)	Isoscutellarein 7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acetyl]-allosyl(1 \rightarrow 2)glucoside
8	30.7	635	593 (100), 269 (7)	269 (100), 431 (24)	Apigenin 7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acetyl]-allosyl(1 \rightarrow 2)glucoside
9	31.9	431, 635	269 (100), 593 (51), 515 (8), 431 (7)	269 (100), 431 (26)	Apigenin 7- <i>O</i> -[6''- <i>O</i> -acetyl]-allosyl(1 \rightarrow 2)glucoside
3'	32.1	783, 665	607 (100), 651 (53), 737 (41)	329 (100)	Unknown
10	33.6	651	475 (100), 505 (31), 457 (18)	161 (100), 329 (84)	Martynoside
11	34.1	693	651 (100), 633 (59)	285 (100), 489 (58), 609 (14)	Isoscutellarein 7- <i>O</i> -[2''', 6'''- <i>O</i> -diacetyl]-allosyl(1 \rightarrow 2) glucoside
4'	34.5	595	269 (100), 474 974), 513 (19)	269 (100)	Unknown
5'	35.4	733	698 (100), 714 (92), 634 (39)	714 (100), 673 (59)	Unknown
12	36.5	677	635 (100), 269 (63)	269 (100), 593 (31), 473 (67)	Apigenin 7- <i>O</i> -[2'', 6'''- <i>O</i> -diacetyl]-allosyl(1 \rightarrow 2) glucoside
13	37.6	781	739 (100), 721 (69), 269 (53), 635 (40), 575 (12)	269 (100), 593 (64), 577 (16), 431 (14)	Apigenin 7- <i>O</i> -acetyl-coumaroyl-allosyl(1 \rightarrow 2)glucoside
14	38.7	577	269 (100), 431 (1), 413 (1)	225 (100), 269 (71), 149 (59), 117 (26)	Apigenin 7- <i>O</i> -(coumaroyl) glucopyranoside
15	39.2	577	269 (100)	225 (60), 269 (100), 149 (43)	Apigenin 7- <i>O</i> -(coumaroyl) glucopyranoside
16	40.4	577	269 (100)	225 (100), 269 (64), 149 (43)	Apigenin 7- <i>O</i> -(coumaroyl) glucopyranoside
17	42.5	577	269 (100), 431 (15), 413 (15)	225 (42), 269 (43), 149 (100)	Apigenin 7- <i>O</i> -(coumaroyl) glucopyranoside

Πίνακας 22: Σύσταση εκχυλισμάτων *Sideritis clandestina* (Vasilopoulou et al., 2011)

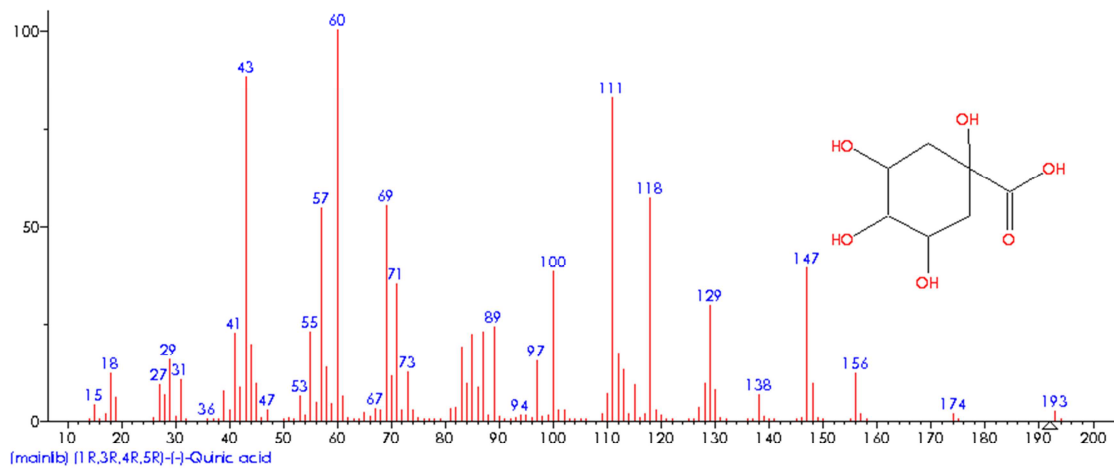
Με βάση την παραπάνω δημοσίευση, στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η εμφάνιση των 17 αυτών συστατικών με κριτήριο τους λόγους m/z των συστατικών του δείγματος. Βρέθηκαν δύο κορυφές με λόγους $m/z=193$ και $m/z=271$ που θα μπορούσαν να αποδοθούν στο κινικό οξύ και μια γλυκοζωμένη μορφή της απιγενίνης αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση περισσότερων ενώσεων λόγω της πολυπλοκότητας των συστατικών των δειγμάτων και της έλλειψης επιθυμητής βιβλιογραφίας επί του συγκεκριμένου θέματος. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα πρότυπα φάσματα μάζας των ενώσεων της απιγενίνης και του κινικού οξέος αντίστοιχα, όπως βρέθηκαν στην πρότυπη βιβλιοθήκη φασμάτων NIST Spectral Library, όπως επίσης και τα χρωματογραφήματα των τεσσάρων εκχυλισμάτων συγκριτικά με στοχευμένες τις κορυφές που αντιστοιχούν στους λόγους m/z των ενώσεων που βρέθηκαν.



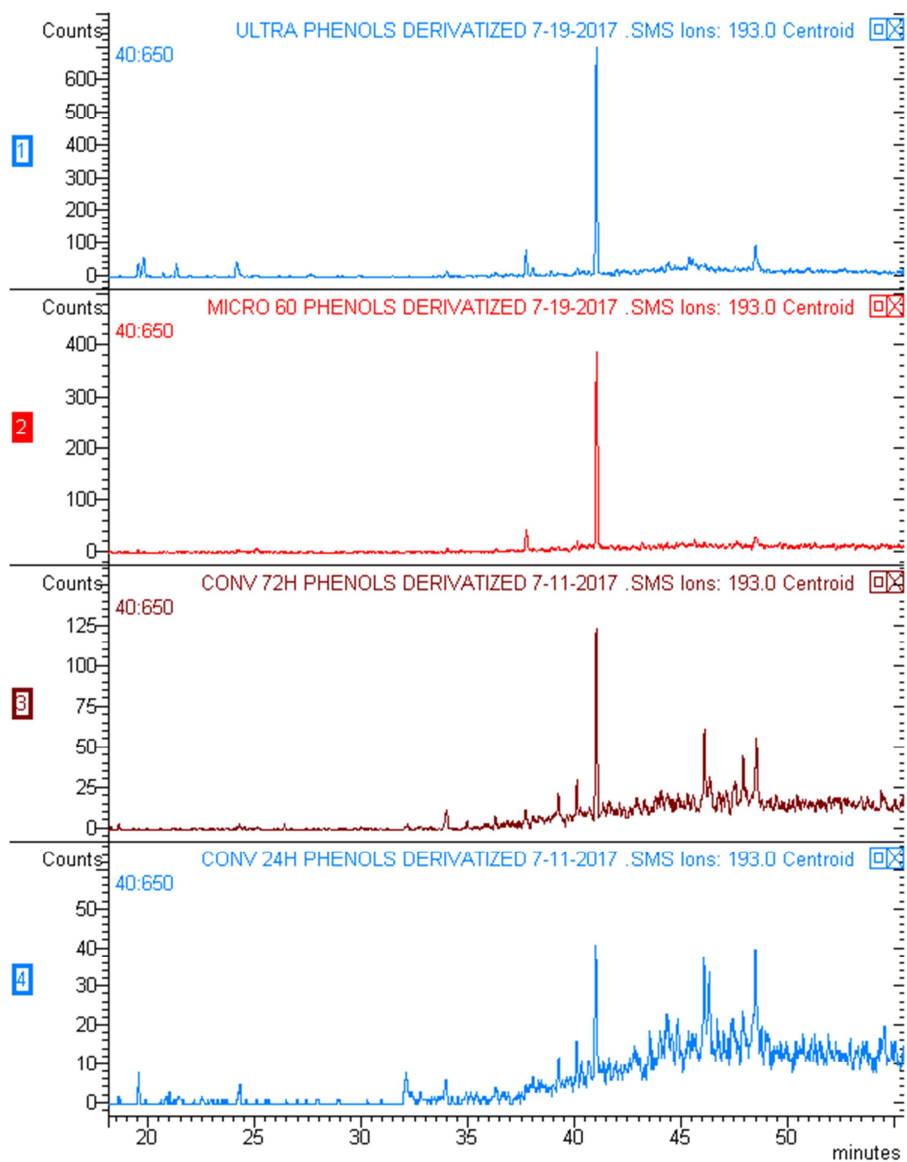
Εικόνα 26: Φάσμα μάζας απιγενίνης (NIST Spectral Library).



Εικόνα 27: Ταυτοποίηση απιγενίνης στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη.



Εικόνα 28: Φάσμα μάζας κινικού οξέος (NIST Spectral Library).



Εικόνα 29: Ταυτοποίηση κινικού οξέος στα εκχυλίσματα σε αιθανόλη.

Συμπεράσματα-Προοπτικές

Αρχικά, όσον αφορά στη σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης που δοκιμάστηκαν, το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει από τις φωτομετρικές αναλύσεις είναι καταρχήν η επικράτηση των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν με συμβατική εκχύλιση 72 ωρών και με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους έναντι όλων των υπολοίπων, τόσο στο περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά συστατικά, ολικά φλαβονοειδή, ολικές συμπυκνωμένες τανίνες, όσο και στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Σε ότι αφορά τις επιμέρους περιεκτικότητες των εκχυλισμάτων, αν και στις περισσότερες αναλύσεις στα πιο πλούσια εκχυλίσματα υποδηλώνεται γραμμική συσχέτιση περιεκτικότητας εκχυλίσματος και βιοδραστικότητας, σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση, τα εκχυλίσματα περιεκτικότητας 5% προέκυψαν ισοδύναμα ή και ισχυρότερα αυτών του 7,5%.

Επιπλέον, ως προς τη θερμοκρασιακή μελέτη κατά τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, σχεδόν όλες οι αναλύσεις, εκτός από τον προσδιορισμό των ολικών συμπυκνωμένων τανινών, η οποία οδηγεί σε επισφαλή αποτελέσματα, αποδεικνύουν την ανάλογη σχέση της θερμοκρασίας εκχύλισης και βιοδραστικότητας. Υποδηλώνεται, δηλαδή, από τις μετρήσεις, ότι με αύξηση της θερμοκρασίας της εκχύλισης, αυξάνεται η εκχυλισσιμότητα των δραστικών συστατικών του φυτού και προκύπτουν εκχυλίσματα αυξημένου περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και αντιοξειδωτικά.

Παράλληλα, όσον αφορά στην εξάρτηση της δραστικότητας του προκύπτοντος εκχυλίσματος από το διαλύτη που χρησιμοποιείται, η σημαντική διαφοροποίηση εντοπίζεται στα δείγματα συμβατικής εκχύλισης 24 ωρών και εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα στους 60°C. Στην πρώτη περίπτωση, και με επιλογή διαλύτη την αιθανόλη, τα αποτελέσματα είναι μακράν πιο ικανοποιητικά και σχεδόν ισοδύναμα με αυτά του εκχυλίσματος 72 ωρών. Αντιθέτως, στη δεύτερη περίπτωση, η επιλογή της αιθανόλης ως διαλύτη εκχύλισης οδηγεί σε λιγότερο δραστικό εκχύλισμα.

Αναφορικά με την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS), αρχικά, επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της αντίδρασης παραγωγοποίησης με δοκιμή ανάλυσης γαλλικού οξέος ως πρότυπο δείγμα. Οι κορυφές που προέκυψαν ταυτίστηκαν με τις αναμενόμενες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για τα σιλυλιωμένα παράγωγα του γαλλικού οξέος. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων σε αιθανόλη, η ταυτοποίηση των κορυφών που προέκυψαν καθίσταται ιδιαίτερα απαιτητική, καθώς πρόκειται για σιλυλιωμένα παράγωγα γλυκοζιωμένων ενώσεων, των οποίων τα φάσματα δεν μπορούν να βρεθούν σε πρότυπες βιβλιοθήκες, ενώ ταυτόχρονα η βιβλιογραφία και οι έρευνες που βρέθηκαν σχετικά με αυτά ήταν περιορισμένες. Ωστόσο, αν και η εξαγωγή των συμπερασμάτων μπορεί να γίνει μόνο στο πλαίσιο των πιθανών υποθέσεων, σε όλα τα εκχυλίσματα βρέθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε παράγωγα κινικού οξέος και απιγενίνης. Παράλληλα, από τα φάσματα που λήφθηκαν κατά τη χρωματογραφία, συμπεραίνεται ότι τα εκχυλίσματα που προέκυψαν μέσω των μεθόδων εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα και από υπερήχους παρουσιάζουν πιο πλούσιο προφίλ με αυξημένες εντάσεις κορυφών, το οποίο αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη αυξημένης περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σε αυτά.

Σε κάθε περίπτωση, για το σχηματισμό πληρέστερης εικόνας σχετικά με το προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis clandestina* υπάρχουν πολλές προοπτικές έρευνας ως προς

τη σύνθεση και τη δραστικότητα του, οι οποίες θα μπορούσαν να καθιερώσουν την ευρύτερη χρήση του στη βιομηχανία των καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων.

Αναφορές

- Abdel-Sattar A., Bankova V., Spassov S. (1993) Flavonoid glycosides from *Sideritis* species. *Fitoterapia*, LXIV (3), pp. 278-279
- Aboutabl E.A., Nassar M.I., Elsakhawy F.M., Maklad Y.A., Osman A.F. and El-Khrisy E.A.M. (2002). Phytochemical and pharmacological studies on *Sideritis taurica*, *Journal of Ethnopharmacology*, 82, pp. 177-184
- Ak T and Gulcin I. (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.*, 174 pp. 27–37.
- Alupului, A., Călinescu, I. and Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B* 74
- Amarowicz R., (2007) Tannins: the new natural antioxidants?, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (6), pp.549-551
- Andreea Maria I., Culea M., Gherman C. and Cozar O. (2009). Characterization of some plant extracts by GC-MS. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 267, pp. 338-342
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N. and Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117 (4), pp. 426-436
- Azwanida NN. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4 (3)
- Baba S.A. and Malik S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume, *Journal of Taibah University for Science*, 9 (4), pp. 449-454
- Barba, Francisco & Zhu, Zhenzhou & Koubaa, Mohamed & Sant'Ana, Anderson & Orlie, Vibeke. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 49
- Barber J.C., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Turner K.G and Jansen R.K. (2002). Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23 (3), pp. 293-306
- Bhaigyabati Th., Grihanjali Devi P. and Bag GC (2014). Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Aqueous Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5) pp. 970-976
- Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(2–3), pp. 157–177

- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT-Food Sci Technol. LWT - Food Science and Technology*, 28, pp. 25-30
- Broadhurst R. and Jones W.T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 29, pp. 788 - 794
- Butnariu M. and Samfira I. (2012) Free Radicals and Oxidative Stress. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* 4, doi: 10.4172/jbb.10000e13
- Cabresa E., Garcia-Grandos A., Quecuty M.A.(1988) Terpenoids from *Sideritis varoi*. *Phytochemistry*, 27, pp. 183-185
- Chandra, A. K., & De, N. (2010). Goitrogenic/Antithyroidal potential of green tea extract in relation to catechin in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), pp. 2304–2311.
- Chandra, A. K., De, N., & Roy Choudhury, S. (2010). Effect of different doses of unfractionated green & black tea extracts on thyroid physiology. *Human & Experimental Toxicology*, doi: 10.1177/0960327110382563.
- Chang C, Yang M, Wen H and Chern J (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analysis*, 10, pp. 178-182
- Cherdsheewasart, W., Subtang, S., & Dahlan, W. (2007). Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(2), pp. 428–434.
- Costa R. and Santos L. (2017). Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants, *Powder Technology*, doi:10.1016/j.powtec.2017.07.086
- Cravottoa, G., Boffaa, L., Mantegnaa, S., Peregob, P., Avogadro, M. and Cintasc, P., (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (5), pp. 898–902.
- Dairam A, Fogel R, Daya S, et al. (2008) Antioxidant and iron-binding properties of curcumin, capsaicin, and S-allylcysteine reduce oxidative stress in rat brain homogenate. *J Agric Food Chem.*, 56 pp. 3350–6.
- Dantas Fernandes A.J, Assunção Ferreira M.R., Perrelli Randau K., Pereira de Souza T. and Lira Soares L.A. (2012). Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *ScientificWorldJournal*. Published online 2012 Jun 4. doi: 10.1100/2012/923462
- De Las Heras B., Vivas J.M., Villar A. (1990) Anti-inflammatory activity of *Sideritis Javalambrensis* in rats. *Planta Medica*, 56, pp. 58-659
- Diaz R. M., Garcia-Granados A., Morenot E., Parra A., Quevedo-Sarmiento J., Sáenz de Buruaga A., and Sáenz de Buruaga J. M. (1987) Studies on the Relationship of Structure to Antimicrobial Properties of Diterpenoid Compounds from *Sideritis*. *Planta Medica* 1988, 54 (4), pp. 301-304

- Dincer C., Torun M., Tontul I., Topuz A., Sahin-Nadeem H., Gokturk R.S., Tugrul-Ay S. and Ozdemir F. (2017). Phenolic composition and antioxidant activity of *Sideritis lycia* and *Sideritis libanotica* subsp. *linearis*: Effects of cultivation, year and storage, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 5, pp. 26-32
- European Medicines Agency, (2016). *Assessment report on Sideritis scardica Griseb.; Sideritis clandestina (Bory & Chaub.) Hayek; Sideritis raeseri Boiss. & Heldr.; Sideritis syriaca L., herba*, London pp. 4-7
- Ezer N., Vila R., Canigüeral S. and Adzet T. (1996). Essential oil composition of four Turkish species of *Sideritis*. *Phytochemistry*, 41, pp. 203-205
- Farid, R., Rezaieyazdi, Z., Mirfeizi, Z., Hatf, M. R., Mirheidari, M., Mansouri, H., et al. (2010). Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. *Nutrition Research*, 30(9), pp. 601–606.
- Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D and Guo Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*, 63(6), pp. 965–981.
- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, et al. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem.*, 47 pp. 1035–40.
- Folin O. (1927) Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol Chem.*, 73 pp. 649–673.
- Fraga B.M., Hernadez M.G, Santana J.M.H. and Arteaga G.M. (1991) Diterpenes from *Sideritis ferrensis* *Phytochemistry*, 30, pp. 913-915
- Fraser A.D., Bryan W., Fisher A. (1991) Urinary Screening Formidazolam and its Major Metabolites with the Abbott ADx and TDx Analyzers and the EMIT d.a.u. Benzodiazepine Assay with Confirmation by GC-MS *J. Anal. Toxicol.*, 15 (1), pp. 8-12.
- Gallo A.A, Liang Y. and Walters F.H. (1995). Volatile BSTFA Derivatives of Amino Acid Hydroxamates *Anal.-Lett.*, 28 (4), pp. 697-701
- Garcia-Granados A., Martinez A., Molina A. and Onorato M.E. (1986). Terpenoids from *Sideritis varoi* subsp. *oriensis*. *Phytochemistry*, 25, pp. 2171-2173
- Gergis V., Spiliotis V., Polous C. (1990) Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, *Pharmazie*, 45 (41), p. 70
- Godoy A, De Las Heras B, Vivas J.M., Villar A. (2000) Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, pp. 1193-1197
- Godoy A., De Las Heras B., Vivas J.M., Villar A. (2000) Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis* *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, pp. 1193-1197

- González-Burgos E., Carretero M.E. and Gómez-Serranillos M.P. (2011). Sideritis spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities—A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), pp. 209-225
- Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N, Ritchard N.T., Hartzfeld P.W. and Riechel T.L (1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (5), pp. 1887-1892
- Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K.P., Fraser P.D. and Bramley P.M. (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS, *Journal of Experimental Botany*, 56 (410), pp. 219–243
- Han, K. K., Soares, J. M., Jr., Haidar, M. A., de Lima, G. R., & Baracat, E. C. (2002). Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstetrics and Gynecology*, 99(3), p. 389.
- Hässig A., Linag W.X., Schwabl H. and Stampfli K. (1999) Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical Hypotheses* , 52 (5), pp. 479 – 481
- Iijima Y., Saegusa K., Ito T., Anjo T., Matsuki Y., Nambara T. (1992) Simultaneous Determination of Anabolic Compounds in Beef by Capillary GC-MS Hatano Res. Inst., *Food and Drug Saf. Centre, Kanagawa* 257
- Joshi LS and Pawar HA (2015). Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. *Natural Products Chemistry & Research* 3:170. doi: 10.4172/2329-6836.1000170
- Kadam, Shekhar & Brijesh kumar, Tiwari & O'Donnell, Colm. (2013). Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61
- Kalita Pallab, Barman Tapan K., Pal Tapas K., Kalita Ramen (2013). Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum Sensitivum*, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3 (4)
- Kang HS, Kim KR, Jun EM, et al. (2008) Cyathuscavins A, B, and, new free radical scavengers with DNA protection activity from the Basidiomycete *Cyathus stercoreus*. *Bioorg Med Chem Lett.*, 18 pp. 4047–50.
- Kris-Etherton, P. M., & Keen, C. L. (2002). Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current Opinion in Lipidology*, 13(1), 41.
- Kumar S. (2005). Exploratory analysis of global cosmetic industry: major players, technology and market trends. *Technovation*, 25, pp. 1263-1272
- Kupeli E., Pinar Sahin F., Calis I., Yesilada E. and Ezer N., (2007). Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities, *Journal of Ethnopharmacology*, 112 (2), pp. 356-360
- Lallianrawna S., Muthukumaran R., Ralte V., Gurusubramanian G. and Senthil Kumar N. (2013). Determination of total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity of *Ageratina adenophora*. *Science Vision*, 13 (4), pp.149-156

Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Zhang, Z., Shan, Q., et al. (2010). Quercetin activates AMP activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol induced neurotoxicity. *The Journal of Pathology*, 222(2), pp. 199–212.

Majumdar, S., & Srirangam, R. (2010). Potential of the bioflavonoids in the prevention/treatment of ocular disorders. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(8), pp. 951–965.

Mandal V., Mohan Y. and Hemalatha S. (2007). Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1), pp.7-18

Manez S., Alcaraz M.J., Paya M., Rios J.L. and Hancke J.L. (1990) Selected extracts from medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Planta Medica*, 56, p. 656

Manthey, J. A., Guthrie, N., & Grohmann, K. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8(2), pp. 135–153.

Mennen, L. I., Sapinho, D., de Bree, A., Arnault, N., Bertrais, S., Galan, P., et al. (2004). Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women. *The Journal of Nutrition*, 134(4), pp. 923–926.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), pp. 673–751.

Molever K. (1993) Quantitative Determination of Sodium Lauroyl Sarcosinate By Gas Chromatography *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70 (1) pp. 101-103

Moosmann, B., & Behl, C. (2002). Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(10), pp. 1407–1435.

Navarro A., De Las Heras B., Villar A. (2000) Immunomodulating properties of the diterpene andalusol, *Planta Medica*, 66 (3), pp. 289-291

Ncube N.S., Afolayan A. J. and Okoh A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7 (12), pp. 1797-1806

Orata F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Dr. Mustafa Ali Mohd (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/33098. Available from: <https://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis>

Palomino O.M., Gomez-Serranillas P., Carretero E. and Villar A. (1996) High performance liquid chromatography of flavonoids from *Sideritis* species. *Journal of Chromatography A*, 731, pp. 103-108

- Pena A. and Sandra P. (1995) Chemotaxonomic Characterization of Yeast Cells, *J. Chromatogr. Sci.*, 33 (3), pp. 116-122
- Pietrogrande M.C., Bacco D and Mercuriali M. (2009). GC–MS analysis of low-molecular-weight dicarboxylic acids in atmospheric aerosol: comparison between silylation and esterification derivatization procedures, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2), pp. 877–885
- Pietta P-G. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7), pp. 1035-1042
- Portet-Koltalo F. and Machour N. (2013). Analytical Methodologies for the Control of Particle-Phase Polycyclic Aromatic Compounds from Diesel Engine Exhaust, Diesel Engine - Combustion, Emissions and Condition Monitoring, Dr. Saiful Bari (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53725. Available from: <https://www.intechopen.com/books/diesel-engine-combustion-emissions-and-condition-monitoring/analytical-methodologies-for-the-control-of-particle-phase-polycyclic-aromatic-compounds-from-diesel>
- Praveen Kumar Asho and Kumud Upadhyaya (2012). Tannins are Astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1 (3), pp. 45-50
- Price M.L., Van Scoyoc S. and Butler L.G (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (5) pp. 1214-1218
- Prior R, Wu X and Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53 pp. 4290–4302.
- Proestos C. and Komaitis M. (2013). Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods*, 2 (1), pp. 90-99
- Ribeiro A. S., Estanqueiro M., Oliveira B. and Sousa Lobo J.M. (2015). Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics*, 2 (2), pp. 48-65
- Rios J.L., Manez S., Paya M., Alcaraz M.J. (1992) Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, 31 (6), pp. 1947-1950
- Ross M.S.F., (1997). Microcolumn chromatography as an aid to the gas chromatographic analysis of volatile oils, *J. Chromatogr A*, 106 (2), pp. 392-394
- Routray W. and Orsat V. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2), pp. 409–424
- Satish Balasaheb Nimse and Dilipkumar Palb (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry* DOI: 10.1039/C4RA13315C Available online: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c4ra13315c>
- Schummer C., Delhomme O., Appenzeller B.M.R., Wennig R. and Millet M.(2009). Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis, *Talanta* 77 (4), pp. 1473-1482

- Singleton V and Rossi J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* , 16 pp. 144–158.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, pp. 152-178.
- Stanoeva J. P., Stefova M., Stefkov G., Kulevanova S., Alipieva K., Bankova V., Aneva I. and Evstatieva L. N.(2015). Chemotaxonomic contribution to the *Sideritis* species dilemma on the Balkans, *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, pp. 477-487
- Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo, Dev Dutt Rakesh Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, *International centre for science and high technology*, Trieste 2008.
- Talal A. and Feda M. N. (2003) Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, 17, pp. 987–1000
- Tomas-Barberan F.A., Lopez-Gomez C., Villar A. and Tomas-Lorente F. (1986) Inhibition of lens aldose reductase by Labiatae flavonoids *Planta Medica*, 52, pp. 239-240
- Tomas-Barberan F.A., Rejdali M., Harborne J.B., Heywood V.H. (1988) External and vacuolar flavonoids from IBERO-NORTH AFRICAN *Sideritis* species. A chemosystematic approach. *Phytochemistry*, 27, pp. 165-170
- Vasilopoulou C.G., Kontogianni V.G., Linardaki Z.I., Iatrou G., Lamari F.N., Nerantzaki A.A. , Gerothanassis I.P., Tzakos A.G. and Margaritis M. (2013). Phytochemical composition of ‘‘mountain tea’’ from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *European Journal of Nutrition*, 52 pp. 107-116
- Veena Dhawan (2014) Chapter 2: Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations in: *Studies on Respiratory Disorders* pp. 27-47
- Villar A., Gasco M.A. and Alcaraz M.J. (1984) Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin 8-glucoside, a novel plant flavonoid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36, pp. 820-823
- Villena C., Vivas J.T. and Villar A.M. (2000) Suppression of croton oil-induced rabbit corneal edema by *Sideritis javalambrensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71 (1–2), pp. 301-305
- Vinatoru and Mircea (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8 pp. 303-13
- Wang L. and Weller C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), pp. 300-312
- Wenclawiak B.W., Jenson T.E., Reichert J.F.O. (1993) GC-MS-FID Analysis of BSTFA Derivatized Polar Components of Diesel Particulate Matter (NBS SRM 1650) Extract. *Fresenius’-J. Anal. Chem*, Jun-Jul, 346 (6-9), pp. 808-812.

Yesilada E. and Ezer N. (1989) The anti-inflammatory activity of some *Sideritis* species growing in Turkey. *International Journal of Crude Drug Research*, 27, pp. 38-40

Ανάσης Ε., Τα φαρμακευτικά βότανα της Ελλάδας: ονομασία, ιστορία, βοτανικοί χαρακτήρες, χρησιμότητες, φαρμακευτικές ιδιότητες, καλλιέργεια. Μακρής, 1976.

Θανασούλια Β., Σιατής Ν., Περί βοτάνων: πλήρης οδηγός βοτάνων, μορφολογία, ιδιότητες, τρόποι χρήσης. Αγγελάκη, 2008.

Παράρτημα

Conventional 24h 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,7087					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,1097	0,1075	1,0875	5,92	84,48
		2	80	20	0,1661	0,1628	1,6465	5,36	76,50
		3	60	40	0,287	0,2814	2,8450	4,16	59,39
		4	50	50	0,3861	0,3785	3,8274	3,18	45,37
		5	40	60	0,4066	0,3986	4,0306	2,98	42,47
		6	20	80	0,5381	0,5275	5,3342	1,67	23,86
Conventional 72h 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,7087					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,1336	0,1310	1,3244	5,68	81,10
		2	80	20	0,1983	0,1944	1,9657	5,04	71,94
		3	60	40	0,3187	0,3125	3,1593	3,85	54,91
		4	50	50	0,3935	0,3858	3,9008	3,11	44,32
		5	40	60	0,4208	0,4125	4,1714	2,83	40,46
		6	20	80	0,5487	0,5379	5,4392	1,57	22,36
Microwave 20°C 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6199					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,1978	0,2222	2,2472	4,76	67,93
		2	80	20	0,2738	0,3076	3,1106	3,90	55,60
		3	60	40	0,3564	0,4004	4,0490	2,96	42,21
		4	50	50	0,3413	0,3835	3,8775	3,13	44,66
		5	40	60	0,3976	0,4467	4,5171	2,49	35,53
		6	20	80	0,5518	0,6200	6,2690	0,74	10,52

Πίνακας 23: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 2,5% (1)

Microwave 40°C 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6199					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,0839	0,0943	0,9532	6,05	86,39
		2	80	20	0,1478	0,1661	1,6791	5,33	76,03
		3	60	40	0,2529	0,2842	2,8732	4,13	58,99
		4	50	50	0,2673	0,3003	3,0368	3,97	56,66
		5	40	60	0,3151	0,3540	3,5798	3,43	48,90
		6	20	80	0,4903	0,5509	5,5703	1,44	20,49
Microwave 60°C 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6199					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,0485	0,0545	0,5510	6,46	92,14
		2	80	20	0,0863	0,0970	0,9804	6,03	86,01
		3	60	40	0,2067	0,2322	2,3483	4,66	66,48
		4	50	50	0,2383	0,2678	2,7073	4,30	61,36
		5	40	60	0,3334	0,3746	3,7877	3,22	45,94
		6	20	80	0,5528	0,6211	6,2803	0,73	10,36
Microwave 100°C 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6199					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,0795	0,0893	0,9032	6,10	87,11
		2	80	20	0,1621	0,1821	1,8416	5,16	73,71
		3	60	40	0,2854	0,3207	3,2424	3,76	53,72
		4	50	50	0,3209	0,3606	3,6457	3,36	47,96
		5	40	60	0,414	0,4652	4,7034	2,30	32,87
		6	20	80	0,536	0,6022	6,0895	0,92	13,08
Ultrasonic (40%) 2,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,8233					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,6	4,4	1	100	0	0,0552	0,0468	0,4730	6,53	93,25
		2	80	20	0,0666	0,0564	0,5707	6,44	91,85
		3	60	40	0,2041	0,1730	1,7489	5,26	75,04
		4	50	50	0,3086	0,2615	2,6443	4,36	62,26
		5	40	60	0,3784	0,3207	3,2424	3,76	53,72
		6	20	80	0,5822	0,4934	4,9888	2,02	28,79

Πίνακας 24: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 2,5% (2)

Conventional 24h 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6131					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,4660	0,4124	4,1698	2,84	40,48
		2	80	20	0,4990	0,4416	4,4650	2,54	36,27
		3	60	40	0,5670	0,5018	5,0735	1,93	27,58
		4	50	50	0,6040	0,5345	5,4046	1,60	22,86
		5	40	60	0,6430	0,5690	5,7536	1,25	17,88
		6	20	80	0,7050	0,6239	6,3083	0,70	9,96
Conventional 72h 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6131					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,1910	0,1690	1,7091	5,30	75,61
		2	80	20	0,3160	0,2796	2,8276	4,18	59,64
		3	60	40	0,4210	0,3726	3,7671	3,24	46,23
		4	50	50	0,4790	0,4239	4,2861	2,72	38,82
		5	40	60	0,5400	0,4779	4,8319	2,17	31,03
		6	20	80	0,6620	0,5858	5,9236	1,08	15,45
Microwave 20°C 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6131					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,4300	0,3805	3,8476	3,16	45,08
		2	80	20	0,4690	0,4150	4,1966	2,81	40,10
		3	60	40	0,5340	0,4726	4,7782	2,23	31,80
		4	50	50	0,5790	0,5124	5,1809	1,83	26,05
		5	40	60	0,6110	0,5407	5,4672	1,54	21,96
		6	20	80	0,6280	0,5558	5,6193	1,39	19,79

Πίνακας 25: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 5% (1)

Microwave 40°C 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6131					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,2269	0,2578	2,6071	4,40	62,79
		2	80	20	0,3033	0,3447	3,4849	3,52	50,26
		3	60	40	0,3842	0,4366	4,4145	2,59	36,99
		4	50	50	0,4014	0,4561	4,6121	2,39	34,17
		5	40	60	0,4411	0,5013	5,0683	1,94	27,66
		6	20	80	0,5298	0,6020	6,0874	0,92	13,11
Microwave 60°C 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6131					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,2557	0,2906	2,9380	4,07	58,06
		2	80	20	0,2752	0,3127	3,1621	3,84	54,87
		3	60	40	0,3530	0,4011	4,0560	2,95	42,11
		4	50	50	0,3707	0,4213	4,2594	2,75	39,20
		5	40	60	0,4203	0,4776	4,8293	2,18	31,07
		6	20	80	0,5078	0,5770	5,8346	1,17	16,72
Microwave 100°C 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,6131					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,0464	0,0527	0,5331	6,47	92,39
		2	80	20	0,1320	0,1500	1,5167	5,49	78,35
		3	60	40	0,2406	0,2734	2,7645	4,24	60,54
		4	50	50	0,3509	0,3988	4,0319	2,97	42,45
		5	40	60	0,3669	0,4169	4,2157	2,79	39,83
		6	20	80	0,4957	0,5633	5,6956	1,31	18,70
Ultrasonic (40%) 5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,793					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,0452	0,0452	0,4570	6,55	93,48
		2	80	20	0,0519	0,0519	0,5248	6,48	92,51
		3	60	40	0,2415	0,2415	2,4419	4,56	65,15
		4	50	50	0,3029	0,3029	3,0627	3,94	56,29
		5	40	60	0,4699	0,4699	4,7513	2,25	32,18
		6	20	80	0,5909	0,5909	5,9747	1,03	14,72

Πίνακας 26: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 5% (2)

Conventional 24h 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,705					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,1	0,9	1	100	0	0,0623	0,0623	0,6299	6,38	91,01
		2	80	20	0,1166	0,1166	1,1790	5,83	83,17
		3	60	40	0,2448	0,2448	2,4752	4,53	64,67
		4	50	50	0,3111	0,3111	3,1456	3,86	55,10
		5	40	60	0,3795	0,3795	3,8372	3,17	45,23
		6	20	80	0,5602	0,5602	5,6643	1,34	19,15
Conventional 72h 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,705					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,1	2,4	1	100	0	0,0604	0,0604	0,6107	6,40	91,28
		2	80	20	0,0937	0,0937	0,9474	6,06	86,48
		3	60	40	0,2411	0,2411	2,4378	4,57	65,20
		4	50	50	0,2839	0,2839	2,8706	4,14	59,03
		5	40	60	0,3328	0,3328	3,3650	3,64	51,97
		6	20	80	0,5088	0,5088	5,1446	1,86	26,57
Microwave 20°C 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,9458					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,4	4,6	1	100	0	0,1754	0,1280	1,2945	5,71	81,52
		2	80	20	0,2747	0,2005	2,0274	4,98	71,06
		3	60	40	0,4472	0,3264	3,3005	3,70	52,89
		4	50	50	0,4958	0,3619	3,6592	3,35	47,77
		5	40	60	0,5404	0,3945	3,9884	3,02	43,07
		6	20	80	0,7517	0,5487	5,5479	1,46	20,81

Πίνακας 27: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 7,5% (1)

Microwave 40°C 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,9458					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,4	4,6	1	100	0	0,1229	0,0897	0,9071	6,10	87,05
		2	80	20	0,1283	0,0936	0,9469	6,06	86,48
		3	60	40	0,2931	0,2139	2,1632	4,84	69,12
		4	50	50	0,3915	0,2858	2,8894	4,12	58,76
		5	40	60	0,5043	0,3681	3,7220	3,28	46,88
		6	20	80	0,6847	0,4998	5,0534	1,95	27,87
Microwave 60°C 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,9458					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,1	2,4	1	100	0	0,3304	0,2412	2,4385	4,57	65,19
		2	80	20	0,4788	0,3495	3,5338	3,47	49,56
		3	60	40	0,5866	0,4282	4,3294	2,68	38,21
		4	50	50	0,6127	0,4472	4,5220	2,48	35,46
		5	40	60	0,6729	0,4912	4,9663	2,04	29,11
		6	20	80	0,7792	0,5688	5,7509	1,26	17,92
Microwave 100°C 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,9458					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,1802	0,1315	1,3300	5,68	81,02
		2	80	20	0,2556	0,1866	1,8864	5,12	73,07
		3	60	40	0,403	0,2942	2,9743	4,03	57,55
		4	50	50	0,4744	0,3463	3,5013	3,50	50,02
		5	40	60	0,5791	0,4227	4,2740	2,73	39,00
		6	20	80	0,7096	0,5180	5,2372	1,77	25,25
Ultrasonic (40%) 7,5%									
Standar		ABS _{DPPH}		0,9458					
Όγκος εκχ. (ml)	Όγκος MeOH (ml)	Αραίωση	Όγκος Standar (μl)	Όγκος MeOH (μl)	ABS	ABS Corr	C _{DPPH} fin	ΔC _{DPPH}	% Inhibition
0,2	4,8	1	100	0	0,0758	0,0553	0,5594	6,45	92,01
		2	80	20	0,2057	0,1501	1,5182	5,49	78,33
		3	60	40	0,3577	0,2611	2,6400	4,37	62,32
		4	50	50	0,4380	0,3197	3,2326	3,77	53,86
		5	40	60	0,5399	0,3941	3,9847	3,02	43,12
		6	20	80	0,7287	0,5319	5,3781	1,63	23,24

Πίνακας 28: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σε γλυκερόλη 7,5% (2)