



ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ



ΚΡΥΣΤΑΛΛΗ ΦΑΝΟΥΡΙΑ

ΠΡΑΣΙΑΝΑΚΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2011

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ

ΚΡΥΣΤΑΛΛΗ ΦΑΝΟΥΡΙΑ
ΠΡΑΣΙΑΝΑΚΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

ΙΟΥΝΙΟΣ 2011

Εισηγητής Καθηγητής
ΛΑΓΟΥΡΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ

ΚΡΥΣΤΑΛΛΗ ΦΑΝΟΥΡΙΑ

ΠΡΑΣΙΑΝΑΚΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 14561

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2.1. Αυτοξείδωση των λιπαρών υλών	2
2.1.1. Μηχανισμός της αυτοξείδωσης	2
Σχήμα 1. Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης λιπαρών υλών (Nawar, 1985).	4
2.1.2. Παράγοντες που επιταχύνουν την αυτοξείδωση	4
2.1.3. Επιβράδυνση της αυτοξείδωσης με χρήση αντιοξειδωτικών	5
2.1.4. Εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης των λιπαρών υλών	6
2.1.4.1 Χημικές μέθοδοι	9
Σχήμα 2. Δομή του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	11
(Liangli , 2007)	11
Σχήμα 3. Δομή του FRAP [Fe(II)(TPTZ)2]2+ (Apak et al., 2007)	12
2.1.4.2 Φυσικές μέθοδοι	13
Σχήμα 4. Κατανομή των αναλυόμενων συστατικών στην επιφάνεια της στατικής φάσης κατά την χρωματογραφία (Macrae, 1988).	14
2.2.1 Διάταξη της HPLC	15
Σχήμα 5. Βασική διάταξη της HPLC με σταθερή παροχή διαλύτη - isocratic elution (Macrae, 1988).	16
2.3 Αντιοξειδωτικά – Μηχανισμός δράσης	16
2.3.1 Συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά	17
Σχήμα 6. Μηχανισμός δράσης του BHT	18
2.3.2. Φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά	19
2.3.2.1. Τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες	19
Σχήμα 7. Δομές τοκοφερολών-τοκοτριενολών	21
2.3.2.2. Φαινολικά οξέα	21
Σχήμα 8. Δομή φαινολικών οξέων	21
2.3.2.3. Φλαβονοειδή	23
Σχήμα 10. Δομή φλαβονοειδών.	26
2.3.2.4. Φαινολικά διτερπένια	28
2.4. Πρόπολη ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών	29
2.4.1. Γενικά για την πρόπολη	29
2.5.1. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων πρόπολης	31
2.5.2. Φαινολικά συστατικά εκχυλισμάτων πρόπολης	40
2.6.3. Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση πρόπολης	45
2.5.4. Τοξικότητα πρόπολης	47

2.6 Οξειδώσεις <i>in vivo</i> και η σημασία των φυσικών αντιοξειδωτικών στην προστασία της υγείας	47
3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	51
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
4.2.2. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων πρόπολης	55
4.2.2.1. Μέθοδος DPPH	55
4.2.2.2 Μέθοδος FRAP	57
4.2.3. Χρωματομετρικές μέθοδοι	58
4.2.3.2. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή	59
4.2.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)	60
4.2.4.1. Υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών οξέων	60
4.2.4.2. Υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός φλαβονοειδών.	60
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	62
5.1. Μέθοδοι Στατιστικής Ανάλυσης	62
5.1.1. Μέθοδος DPPH	62
5.1.2. Μέθοδος FRAP	62
5.1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών	63
5.1.5. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών οξέων με HPLC	63
5.1.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών με HPLC	64
5.2. Απόδοση εκχυλισμάτων πρόπολης	64
Σχήμα 30. Αλληλεπίδραση των παραγόντων γεωγραφική προέλευση (AREA, MAC-RHOD) και διαλύτη, μεθανόλη-μεθανόλη/νερό-νερό (SOLVENT, MEOH-80MEOH-H ₂ O) στη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση.	76
5.3.2. Μέθοδος FRAP	78
5.3.5. Προσδιορισμός φαινολικών οξέων στα εκχυλίσματα πρόπολης με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography- RP HPLC)	99
5.3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα πρόπολης με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography- RP HPLC)	105
Σχήμα 57. Χρωματογράφημα μίγματος πρότυπων φλαβονοειδών (Q: κερκετίνη, L: λουτεολίνη, A: απιγενίνη, CAPE: φαινυλαιθυλεστεράς του καφεϊκού οξέος και G: γκαλαγκίνη) στα 365 nm.	106

Σχήμα 58. Χρωματογράφημα μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας (Q: κερκετίνη, L: λουτεολίνη, A: απιγενίνη, CAPE: φαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και G: γκαλαγκίνη) στα 365 nm. -----107

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ -----112

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αντιδράσεις οξείδωσης περιορίζουν τη διάρκεια ζωής και προκαλούν αλλοίωση τροφίμων, πλούσιων σε λιπαρές ύλες. Ένας τρόπος για τον περιορισμό των αντιδράσεων οξείδωσης στα τρόφιμα είναι και η χρησιμοποίηση αντιοξειδωτικών. Δύο βασικές κατηγορίες αντιοξειδωτικών τα συνθετικά και τα φυσικά χρησιμοποιούνται ικανοποιητικά για την επιβράδυνση ή την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπαρών υλών. Στη πράξη έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους και της δυνατότητας προσθήκης σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Εμφανίστηκαν όμως και σοβαρά μειονεκτήματα από τη χρήση τους σε τρόφιμα και ιατρικά σκευάσματα είτε λόγω της αστάθειάς τους σε υψηλές θερμοκρασίες είτε και κυρίως λόγω ορισμένων τοξικών και καρκινογόνων επιπτώσεων (Sokmen et al., 2004).

Τα τελευταία χρόνια το παγκόσμιο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη φυσικών πρώτων υλών για την εξακρίβωση της παρουσίας και την αξιοποίηση συστατικών με βιολογική δράση. Η πρόπολη είναι ένα τέτοιο φυσικό προϊόν το οποίο παράγεται από τις μέλισσες μέσω της συλλογής φυσικών ρητινών κυρίως από τους οφθαλμούς των φυτών και η σύστασή της διαφέρει ανάλογα με την βοτανική και γεωγραφική της προέλευση και την εποχή συλλογής της. Εμφανίζει μια σειρά από βιολογικές δράσεις όπως αντιμικροβιακές, αντισηπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, επουλωτικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες. Σκοπός της όλης ερευνητικής δραστηριότητας είναι να διευρύνεται συνεχώς η χρήση περισσότερων φυσικών προϊόντων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά συστατικά με ιδιαίτερα ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία κυρίως σε ότι αφορά την πρόληψη και αντιμετώπιση χρόνιων παθήσεων που συνδέονται με τις διαδικασίες της οξείδωσης *in vivo* και του οξειδωτικού στρες.

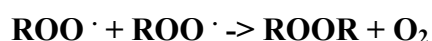
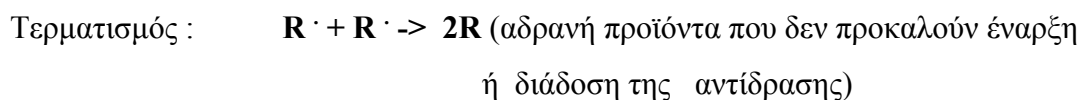
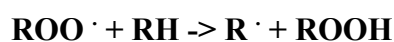
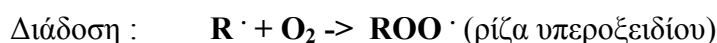
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. Αυτοξείδωση των λιπαρών υλών

Αυτοξείδωση είναι μια σειρά αντιδράσεων του μοριακού οξυγόνου με τα ακόρεστα ακυλολιπίδια των λιπαρών υλών. Λιπαρές ύλες που περιέχουν σε σημαντικές συγκεντρώσεις ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να οξειδωθούν πολύ γρήγορα προκαλώντας την αλλοίωση των τροφίμων στα οποία περιέχονται (Shahidi et al., 1992).

Η αυτοξείδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που χωρεί με τον μηχανισμό των ελεύθερων ριζών. Περιλαμβάνει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Στο στάδιο της διάδοσης κάθε σχηματιζόμενη ρίζα αντιδρά με ένα ουδέτερο μόριο και δίνει μια νέα ρίζα και στην συνέχεια η νέα αυτή ρίζα αντιδρά με ένα άλλο μόριο. Έτσι η αντίδραση συνεχίζεται από μόνη της και θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες.

2.1.1. Μηχανισμός της αυτοξείδωσης



Όπως φαίνεται από τις αντιδράσεις η έναρξη της αντίδρασης οφείλεται στο σχηματισμό των πρώτων ελεύθερων ριζών. Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της

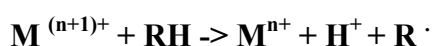
αυτοξειδωσης είναι τα υδρόξυ-υπεροξειδία. Αυτά στη συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, αλλά υδρόξυ-υπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με την σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτερο ρυθμό.

Τα υδρογόνα α- ως προς το διπλό δεσμό είναι πιο ευπαθή λόγω της ηλεκτρονικής κατανομής στο δεσμό αυτό. Έτσι στο στάδιο της διάδοσης τα υδρογόνα αυτά εύκολα αφαιρούνται και σχηματίζονται δευτεροταγή υδρόξυ-υπεροξειδία στο άτομο άνθρακα α- ως προς το διπλό δεσμό.

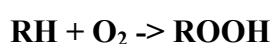
Από τα υπεροξειδία ή τα άλλα ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζεται ένα πλήθος οργανικών ενώσεων όπως οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και αλδεύδες (Μπόσκου, 2004).

Η αντίδραση 1 απαιτεί υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης (~ 35 kcal/mol), για αυτό για να ξεκινήσει η αντίδραση της διάδοσης είναι απαραίτητη η παραγωγή των πρώτων ελεύθερων ριζών (Nawar, 1985).

Αυτό μπορεί να γίνει με απευθείας αντίδραση του ακόρεστου λιπιδίου RH με ιόν μεταβατικού μετάλλου $M^{(n+1)+}$.



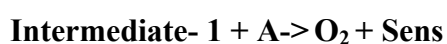
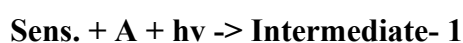
ή με διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων τα οποία σχηματίζονται κατά την αντίδραση του ακόρεστου λιπιδίου RH με το οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης O_2 (singlet oxygen).



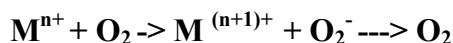
Η μετάβαση του οξυγόνου από την βασική στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση μπορεί να γίνει με την βοήθεια φυσικών χρωστικών, όπως η χλωροφύλλη α, η φαιοφυτίνη α, η μυοσφαιρίνη και η αιματοπορφυρίνη (Nawar, 1985).

Έχουν προταθεί δύο τύποι φωτοευαισθητοποιούμενης οξειδωσης :

Στον τύπο I, ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφά φως και αντιδρά με το υπόστρωμα A δίνοντας ένα ενδιάμεσο προϊόν, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με το οξυγόνο στην βασική τριπλή κατάσταση.



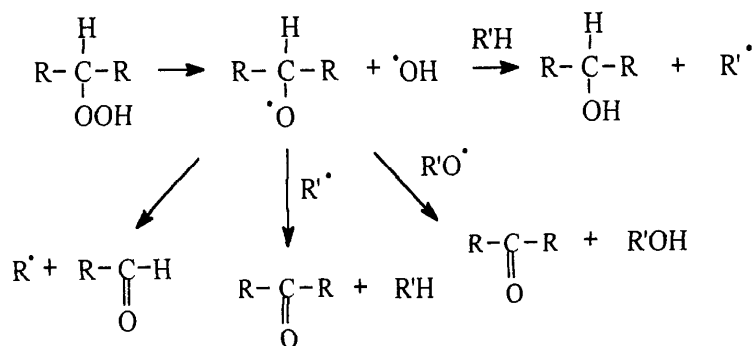
Τέλος, ιόντα μετάλλων μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά την έναρξη της αυτοξειδωσης είναι δραστικές και παίρνουν μέρος στις αντιδράσεις διάδοσης είτε με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου που βρίσκεται σε α-θέση ως προς τον διπλό δεσμό ενός ακόρεστου ακυλολιπιδίου είτε αντιδρώντας με μοριακό οξυγόνο στην βασική κατάσταση.

Η αντίδραση του σχηματισμού υπεροξειδίων είναι πολύ γρήγορη, απαιτεί ελάχιστη ενέργεια ενεργοποίησης και για αυτό το λόγο η συγκέντρωση των $ROO \cdot$ είναι υψηλότερη αυτής των $R \cdot$ (Chan, 1977).

Τα υδροϋπεροξειδία συμμετέχουν σε δευτερεύουσες αντιδράσεις από τις οποίες προκύπτουν πλήθος οργανικών ενώσεων, κυρίως αλκοόλες, αλδεΐδες και βινυλοκετόνες οι οποίες συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής (Nawar, 1985).



Σχήμα 1. Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης λιπαρών υλών (Nawar, 1985).

2.1.2. Παράγοντες που επιταχύνουν την αυτοξειδωση

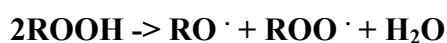
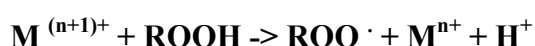
Οι κυριότεροι παράγοντες που δρουν καταλυτικά στην οξείδωση λιπών και ελαίων είναι :

1. *Ένζυμα*. Λιποξειδάσες. βρίσκονται σε όλους τους ζωικούς και φυτικούς ιστούς. Όταν ενεργοποιηθούν κάτω από ειδικές συνθήκες ενεργού οξύτητας, θερμοκρασίας και υγρασίας, καταλύουν την οξειδωτική αποικοδόμηση των πολυακόρεστων ακυλολιπιδίων.

2. *Μέταλλα*. Ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, ο σίδηρος και ο χαλκός ευνοούν το σχηματισμό νέων ριζών και έτσι δρουν ως προξειδωτικά διότι :

i) Επιταχύνουν την διάσπαση των υδροξυπεροξειδίων

ii)



iii) Αντιδρούν απευθείας με το υπόστρωμα

iv) Ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο προς οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης που διευκολύνει το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων.

3. *Θερμοκρασία*. Η οξείδωση επιταχύνεται ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 60 °C). Αύξηση της θερμοκρασίας κατά 15 °C διπλασιάζει την ταχύτητα οξείδωσης.

4. *Φώς*. Ιδιαίτερα το υπεριώδες φως επιταχύνει την οξείδωση των λιπών και ελαίων.

5. *Παρουσία αέρα*. Το οξυγόνο έρχεται σε επαφή με την λιπαρή ύλη και επιταχύνει την οξείδωση.

Η ταχύτητα της αυτοοξείδωσης εξαρτάται κυρίως από τον ακόρεστο χαρακτήρα της λιπαρής ύλης. Γι' αυτό όσο πιο ακόρεστο είναι το υπόστρωμα τόσο πιο επιδεκτικό είναι στην αυτοοξείδωση (Sherwin, 1978).

2.1.3. Επιβράδυνση της αυτοοξείδωσης με χρήση αντιοξειδωτικών

Η συσκευασία υπό κενό και η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες ή ακόμα και η συντήρηση των τροφίμων σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης μπορούν να ελαττώσουν την ταχύτητα της αυτοοξείδωσης (Cooper, 1983).

Οι τρόποι αυτοί δεν είναι πάντα αποτελεσματικοί δεδομένου ότι ελάχιστο οξυγόνο είναι σε θέση να προκαλέσει οξείδωση, ενώ δεν είναι πάντοτε οικονομικοί και πρακτικοί για την ολοκληρωτική απομάκρυνση του οξυγόνου από τα τρόφιμα.

Έτσι είναι αναγκαία εκτός των παραπάνω μεθόδων, και η χρήση πρόσθετων με αντιοξειδωτική δράση που προστίθενται στις λιπαρές ύλες ή στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρή ύλη για να επιβραδύνουν την οξείδωση των ακόρεστων ακυλολιπιδίων και να καταστήσουν τα τρόφιμα εύληπτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα αντιοξειδωτικά όμως δεν μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα ενός τροφίμου που είναι ήδη οξειδωμένο (Schuler, 1990).

Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες :

- Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
- Να μην έχει καμία βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
- Να μην προσδίνει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
- Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό
- Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου (Μπόσκου, 2004).

Η επίδραση που έχει η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στην ταχύτητα της αυτοοξείδωσης εξαρτάται από παράγοντες όπως η δομή του αντιοξειδωτικού, οι συνθήκες οξείδωσης και η φύση του υποστρώματος. Πιο αποτελεσματική είναι η δράση του αντιοξειδωτικού σε ότι αφορά την αύξηση της επαγωγικής περιόδου όταν η λιπαρή ύλη δεν έχει υποστεί οξείδωση σε μεγάλο βαθμό.

Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των λιπιδίων :

- i) Μειώνουν την συγκέντρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου
- ii) αποτρέπουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης με την δέσμευση των ελεύθερων ριζών
- iii) Δεσμεύουν τα ιόντα μετάλλων που καταλύουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης
- iv) Διασπούν υπεροξειδία (Dorman et al., 2003).

2.1.4. Εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης των λιπαρών υλών

Η οξειδωτική αποικοδόμηση των ακόρεστων ακυλολιπιδίων έχει μεγάλη σημασία για την αποδοχή και την διατροφική αξία ενός προϊόντος και για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την εκτίμηση της έκτασης της οξείδωσης. Καμία μέθοδος δεν μπορεί να συμπεριλάβει όλα τα προϊόντα της αυτοοξείδωσης, ούτε

μπορεί να εφαρμοστεί σε προϊόντα που βρίσκονται σε οποιοδήποτε στάδιο της οξειδωσης ή σε όλα τα λιπαρά υποστρώματα (Nawar, 1985).

Η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του βαθμού της οξειδωσης μιας λιπαρής ύλης εξαρτάται από την φύση του δείγματος, τον τύπο της πληροφορίας που απαιτείται, το διαθέσιμο χρόνο, τις συνθήκες του πειράματος και το γενικό κόστος της μεθόδου.

Συνήθως οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εκτίμηση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπών και ελαίων αποτελούν και την βάση των μεθόδων αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (Kochhar et al., 1988).

Οι μέθοδοι εκτίμησης της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών βασίζονται στη σύγκριση της σταθερότητας της λιπαρής ύλης πριν και μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού και κάτω από συνθήκες που ευνοούν την οξείδωση (Δοκιμές επιδεκτικότητας, susceptibility tests).

Στα αρχικά στάδια της αυτοοξειδωσης η λιπαρή ύλη ανθίσταται στην οξείδωση η οποία προχωρεί πολύ αργά. Αυτό το στάδιο ονομάζεται περίοδος επαγωγής (induction period). Σε αυτό το στάδιο η δράση του αντιοξειδωτικού είναι περισσότερο ισχυρή γιατί διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών και παρεμποδίζει τις αντιδράσεις διάδοσης (Pokorny, 1987).

Στο στάδιο που ακολουθεί την επαγωγική περίοδο η αυτοοξείδωση προχωράει πολύ πιο γρήγορα γιατί ελαττώνεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού οπότε δεν παρεμποδίζονται οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωση των υδροξυπεροξειδίων και έτσι το αντιοξειδωτικό που απομένει καταστρέφεται γρήγορα (Hamilton et al., 1963).

Η αποτελεσματικότητα του αντιοξειδωτικού εκφράζεται συνήθως με τον παράγοντα προστασίας $PF_n = T_n/T_0$ όπου T_n είναι η επαγωγική περίοδος της λιπαρής ύλης με το αντιοξειδωτικό και T_0 είναι η αντίστοιχη επαγωγική περίοδος της λιπαρής ύλης χωρίς πρόσθετο (Pokorny, 1987).

Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι για την εκτίμηση της σταθερότητας λιπών και ελαίων στα οποία έχουν προστεθεί αντιοξειδωτικά είναι οι λεγόμενες δυναμικές ή δοκιμές σταθερότητας (stability tests). Η αρχή τους βασίζεται στην επιτάχυνση της οξειδωσης της λιπαρής φάσης, είτε με αύξηση της θερμοκρασίας είτε με διοχέτευση καθαρού αέρα μέσα από το δείγμα.

Διακρίνονται σε μεθόδους που I) μετρούν την κατανάλωση του οξυγόνου στην διάρκεια δοκιμής οξείδωσης με τη βοήθεια αυτοματοποιημένων συσκευών που καταγράφουν τη μείωση της πίεσης του οξυγόνου στην φιάλη με την λιπαρή ύλη II) μετρούν άμεσα ή έμμεσα τον αριθμό υπεροξειδίων (Rossell,1989).

- i) *Schaal oven test ή δοκιμή πυριατηρίου κατά Schaal* : Το έλαιο θερμαίνεται σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (συνήθως 63 °C) ώστε να αποφεύγονται οι δευτερογενείς αντιδράσεις και να μην επηρεάζεται η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών. Η εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης μπορεί να γίνει οργανοληπτικά ή με τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων (Thompson, 1966).
- ii) *Μέθοδος ενεργού οξυγόνου (Active Oxygen method, AOM) ή δοκιμή Swift*: Το έλαιο θερμαίνεται στους 100 °C ενώ ταυτόχρονα διαβιβάζεται αέρας με σταθερή ταχύτητα. Σε τακτά χρονικά διαστήματα το δείγμα εξετάζεται οργανοληπτικά ή προσδιορίζεται ο αριθμός υπεροξειδίων (IUPAC, 1987).
- iii) *Μέτρηση του δείκτη σταθερότητας ελαίου (Oil stability index measurement OSI)*: Το έλαιο θερμαίνεται σε θερμοκρασία 110 °C ενώ ταυτόχρονα διαβιβάζεται αέρας με σταθερή ταχύτητα σε ειδική συσκευή. Τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης κυρίως χαμηλού μοριακού βάρους οξέα (μυρμηκικό και οξικό) μεταφέρονται σε ειδική φιάλη που περιέχει αποσταγμένο νερό και μετρίεται η αγωγιμότητα του διαλύματος που αυξάνεται απότομα μετά την περίοδο επαγωγής (Laubi et al., 1986).

Στην περίπτωση των AOM και OSI όπου γίνεται διαβίβαση ρεύματος αέρα μέσω της θερμαινόμενης λιπαρής ύλης μπορεί να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται αντιοξειδωτικά που είναι πτητικά στις θερμοκρασίες που εφαρμόζονται σε αυτές τις μεθόδους (Rossell, 1989).

Λόγω των φυσικοχημικών μεταβολών που προκαλούνται κατά την πορεία της αυτοοξείδωσης – επιταχυνόμενης ή μη – από τα σχηματιζόμενα πρωτογενή και δευτερογενή προϊόντα της αντίδρασης οξείδωσης, μπορούν να εφαρμοστούν και οι λεγόμενες στατικές μέθοδοι δηλαδή χημικές ή φυσικές μέθοδοι εκτίμησης του βαθμού οξείδωσης της λιπαρής ύλης με ή χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικών.

2.1.4.1 Χημικές μέθοδοι

i) Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων :

Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την εκτίμηση των οξειδωτικών μεταβολών στα αρχικά στάδια της αυτοοξειδωσης, όπου τα κύρια προϊόντα που σχηματίζονται είναι τα υδροϋπεροξειδία των ακόρεστων ακυλολιπιδίων. Βασίζεται στην αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων σε όξινο περιβάλλον και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος από το ιωδιούχο κάλιο. Το ιώδιο που ελευθερώνεται ογκομετρείται με διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου (IUPAC, 1987). Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζεται σε mg υπεροξειδικώς ενωμένου οξυγόνου / kg λιπαρής ύλης.

ii) Προσδιορισμός του αριθμού θειοβαρβιτουρικού οξέος :

Από τα ακόρεστα λιπαρά με δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς προκύπτουν ως προϊόντα αποικοδόμησης ακόρεστες αλδεΐδες (αλκενάλες και αλκαδιενάλες) καθώς και μηλονική αλδεΐδη (προϊόν αποικοδόμησης δικυκλικών υπεροξειδίων που προκύπτουν από ακόρεστα λιπαρά οξέα με τουλάχιστον τρεις διπλούς δεσμούς) που αντιδρούν με θειοβαρβουτουρικό οξύ προς έγχρωμα προϊόντα με μέγιστο απορρόφησης στα 530 nm (Sidwell et al., 1954; Marcuse & Johansson., 1973; Tarladgis et al., 1962).

iii) Προσδιορισμός των συνολικών καρβονυλικών ενώσεων :

Οι καρβονυλικές ενώσεις (αλδεΐδες και κετόνες) που προκύπτουν από την οξειδωτική αποικοδόμηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων αντιδρούν με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη προς υδραζόνες, έγχρωμα προϊόντα με μέγιστα απορρόφησης στα 430 nm και 460 nm (Henick et al., 1954).

iv) Δοκιμή Kreis :

Μια από τις πρώτες δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του βαθμού οξειδωσης αφορούσε στον σχηματισμό ερυθρών προϊόντων κατά την αντίδραση μεταξύ της φλωρογλυκινόλης ή ρεσορκινόλης και δευτερογενών προϊόντων της οξειδωσης όπως εποξυ-αλδεΐδων π.χ. της 2,3-εποξυ-προπανάλης ή ακεταλών τους (Gray, 1978).

v) Προσδιορισμός του αριθμού ανισιδίνης :

Αλδεΐδες που παράγονται από τη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων ακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 2-αλκενάλες) αντιδρούν με την π-ανισιδίνη σε όξινο περιβάλλον (IUPAC, 1987, method 2504) προς προϊόντα με χαρακτηριστικό μέγιστο απορρόφησης στα 350 nm. Προσδιορίζονται μη πτητικές και πτητικές αλδεΐδες. Οι

τελευταίες θεωρούνται υπεύθυνες για την χαρακτηριστική οσμή της οξειδωτικής τάγγισης. Ο αριθμός ανισιδίνης χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με τον αριθμό υπεροξειδίων για τον υπολογισμό του αριθμού ολικής οξείδωσης (αριθμός TOTOX = 2 x αριθ. υπεροξειδίων + αριθ. ανισιδίνης) (Rossell, 1989).

vi) Δοκιμή συζευγμένης οξείδωσης λινελαϊκού οξέος / β-καροτενίου :

Η αρχή της μεθόδου είναι η βαθμιαία εξαφάνιση του χρώματος του β-καροτενίου λόγω οξείδωσης του από τα προϊόντα αποικοδόμησης του λινελαϊκού οξέος το οποίο αποτελεί τη λιπαρή φάση ενός γαλακτώματος ελαίου σε νερό. Ο τρόπος που συνδέεται ο αποχρωματισμός του β-καροτενίου με την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (Marco, 1968; Miller, 1971).

vii) Αεριοχρωματογραφική ανάλυση πτητικών προϊόντων αποικοδόμησης των ακόρεστων ακυλολιπιδίων :

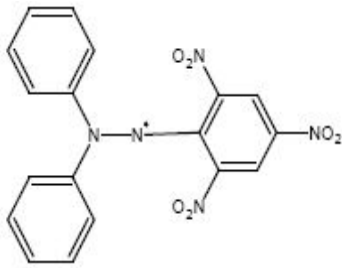
Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται αεριοχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της αυτοοξείδωσης των εδάδιμων ελαίων. Συνήθως εφαρμόζονται ειδικές τεχνικές αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης (κυρίως headspace gas chromatography) για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων πτητικών ενώσεων όπως πεντανίου, πεντανάλης ή εξανάλης (Gordon & Williamson, 1989).

viii) Αεριοχρωματογραφική ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων:

Παρακολουθείται η ελάττωση του μεθυλεστέρα του λινελαϊκού οξέος κάτω από επιταχυνόμενες συνθήκες οξείδωσης στους 110 °C παρουσία οξυγόνου (Cuvelier et al., 1990).

ix) Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης-DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl):

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση του αντιοξειδωτικού με μεθανολικό διάλυμα της σταθερής 1,1-διφαινυλ-2-πικριλυδραζυλικής ρίζας (απορροφά στα 517 nm) η οποία με την προσφορά υδρογόνου/ηλεκτρονίου ανάγεται σε υδραζίνη με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος (Kumaran et al., 2005).



DPPH radical

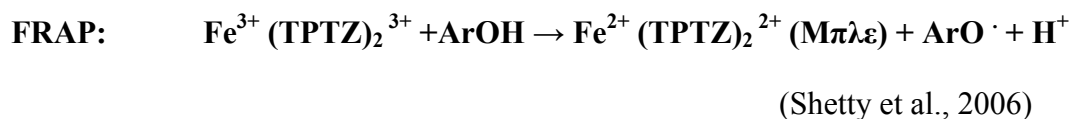
Σχήμα 2. Δομή του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

(Liangli , 2007)

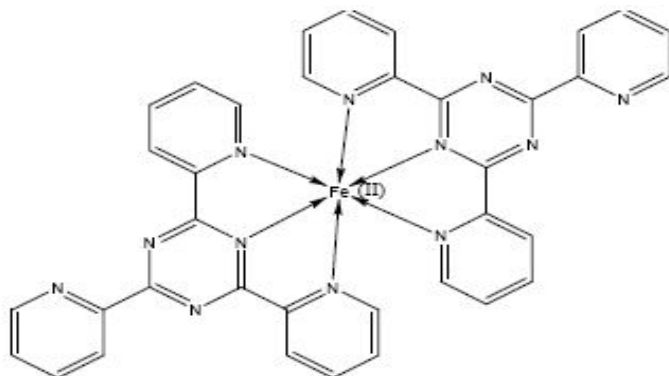
Αρκετές μελέτες περιγράφουν την δράση φυτοχημικών αντιοξειδωτικών όπως των φλαβονοειδών με αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα DPPH. Το DPPH είναι μια «σταθερή» ελεύθερη ρίζα που χρησιμοποιείται συχνά και σε ESR μελέτες. Λόγω της παρουσίας του μονήρους ηλεκτρονίου, το DPPH έχει υψηλή απορρόφηση σε αιθανολικό διάλυμα στα 517 nm. Όσο το ηλεκτρόνιο αυτό δεσμεύεται, η απορρόφηση μειώνεται και ο βαθμός αποχρωματισμού είναι στοιχειομετρικά ο αριθμός των ηλεκτρονίων που έχουν δεσμευτεί (Rahman, 1988).

x) Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δράσης-FRAP (Ferric Reducing Activity Power- FRAP):

Η μέθοδος FRAP αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Benzie και Strain (1996) για τον καθορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος του αίματος και από τότε έχει τροποποιηθεί για την χρήση της και σε άλλα φυσικά προϊόντα όπως τα φυτικά εκχυλίσματα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη (Fe^{3+} -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+} -TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm. Η αντίδραση διεξάγεται σε pH = 3,6 για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου στο διαλύτη (Dayan, 2008). Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται παρακάτω:



όπου ArOH= φαινολικό αντιοξειδωτικό, TPTZ: 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη



FRAP: $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Ferrous tripyridyltriazine cation)

Σχήμα 3. Δομή του FRAP $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Apak et al., 2007)

Λόγω της βαθμιαίας μείωσης της απορρόφησης με την πάροδο του χρόνου για μερικές κατηγορίες φαινολικών αντιοξειδωτικών όπως τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και φλαβονοειδή, θα πρέπει να επέλθει ένας συμβιβασμός ανάμεσα στις τεχνικές μέτρησης (π.χ. γρήγορη έναντι καθυστερημένης μέτρησης της απορρόφησης στους 37 °C). Έτσι οι Firuzi et al. (2008), θεωρούν ότι οι τιμές που λαμβάνονται με μέτρηση της απορρόφησης στα 593 nm σε χρόνο 4 min λαμβάνουν υπόψη την κινητική της αντίδρασης καλύτερα από τις τιμές που λαμβάνονται στα 60 min. Πρέπει επομένως στα αποτελέσματα να αντικατοπτρίζεται και η κινητική της αντίδρασης και η θερμοδυναμική αυτής ώστε να συλλέγονται χρήσιμες πληροφορίες σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών των τροφίμων.

Επιπλέον το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή με τα υψηλότερα αποτελέσματα δράσης όπως αυτά μετρήθηκαν με τη μέθοδο FRAP ήταν και τα πιο ευοξειδωτά συστατικά δηλαδή με το χαμηλότερο δυναμικό οξείδωσης/αναγωγής επιβεβαιώνει ότι η FRAP είναι μια σωστά επιλεγμένη μέθοδος μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης (Apak et al., 2007).

2.1.4.2 Φυσικές μέθοδοι

Κατά την αυτοοξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως των οξέων λινελαϊκού και λινολενικού, σχηματίζονται υδροϋπεροξειδία με συζυγείς τους διπλούς δεσμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της απορρόφησης στα 232 nm. Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως π.χ. τα οξιδιένια εμφανίζουν μέγιστο στα 268 nm. Η μέτρηση του ειδικού συντελεστή απορρόφησης ϵ 1% 1 cm στα παραπάνω μήκη κύματος χρησιμεύει στην εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης μιας λιπαρής ύλης (IUPAC, 1987).

Άλλες φυσικές μέθοδοι που εμφανίζονται για την εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης είναι η μέτρηση της απορρόφησης στο υπέρυθρο ή η μέτρηση του δείκτη διάθλασης.

Μπορούν να γίνουν και οργανοληπτικές δοκιμές για την εκτίμηση της οσμής και της γεύσης λόγω των προϊόντων που σχηματίζονται στην πορεία της οξείδωσης και συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής. Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής θα πρέπει να συσχετίζονται με εκείνα που προκύπτουν από τον προσδιορισμό των προϊόντων αυτοοξειδωσης με φυσικοχημικές μεθόδους. Αν και είναι αρκετά ακριβής η μέθοδος αυτή δεν είναι τόσο πρακτική και δεν χρησιμοποιείται συνήθως (Rossell, 1989).

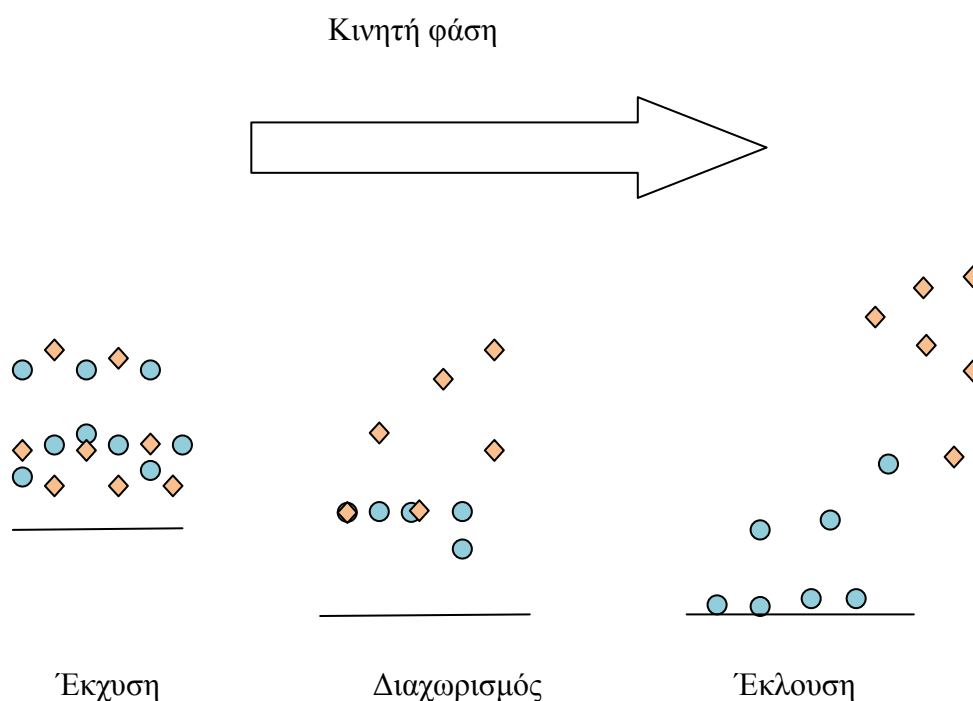
2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC)

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να οριστούν ως διαχωριστικές μέθοδοι, οι οποίες προϋποθέτουν μαζική μετακίνηση των συστατικών που ενδιαφέρουν μεταξύ μιας κινητής και μιας ακίνητης φάσης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός, γενικά βασίζεται στο φαινόμενο της διαφορετικής αντίδρασης που εμφανίζουν τα συστατικά ενός μίγματος (Macrae, 1988).

Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) χαρακτηρίζεται από τη χρήση κινητής φάσης υγρής μορφής για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος. Το προς ανάλυση μίγμα – διάλυμα διοχετεύεται υπό υψηλή πίεση, σε χρωματογραφική στήλη στην οποία διαχωρίζεται στα συστατικά

του. Το ποσοστό του διαχωρισμού είναι σημαντικό και εξαρτάται από το είδος και την έκταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ συστατικών και στατικής φάσης. Η αλληλεπίδραση των συστατικών με τα δυο είδη φάσεων εξαρτάται και καθορίζεται από τις διάφορες δυνατότητες επιλογής διαλύτη και στατικής φάσης (Macrae, 1988).

Η διαδικασία διέλευσης του μίγματος από την χρωματογραφική στήλη χωρίζεται σε τρία στάδια: έγχυση, διαχωρισμός, έκλυση (Σχ 4). Κατά την έγχυση του μίγματος τα συστατικά που ενδιαφέρουν προσροφούνται στη στατική φάση, ενώ παρασύρονται από την κινητή. Οι δύο αντίθετες δυνάμεις, που ασκούνται στα συστατικά –αντίσταση και ώθηση– έχουν ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό και τη μετακίνηση των συστατικών προς την έξοδο της στήλης (Macrae, 1988).



Σχήμα 4. Κατανομή των αναλυόμενων συστατικών στην επιφάνεια της στατικής φάσης κατά την χρωματογραφία (Macrae, 1988).

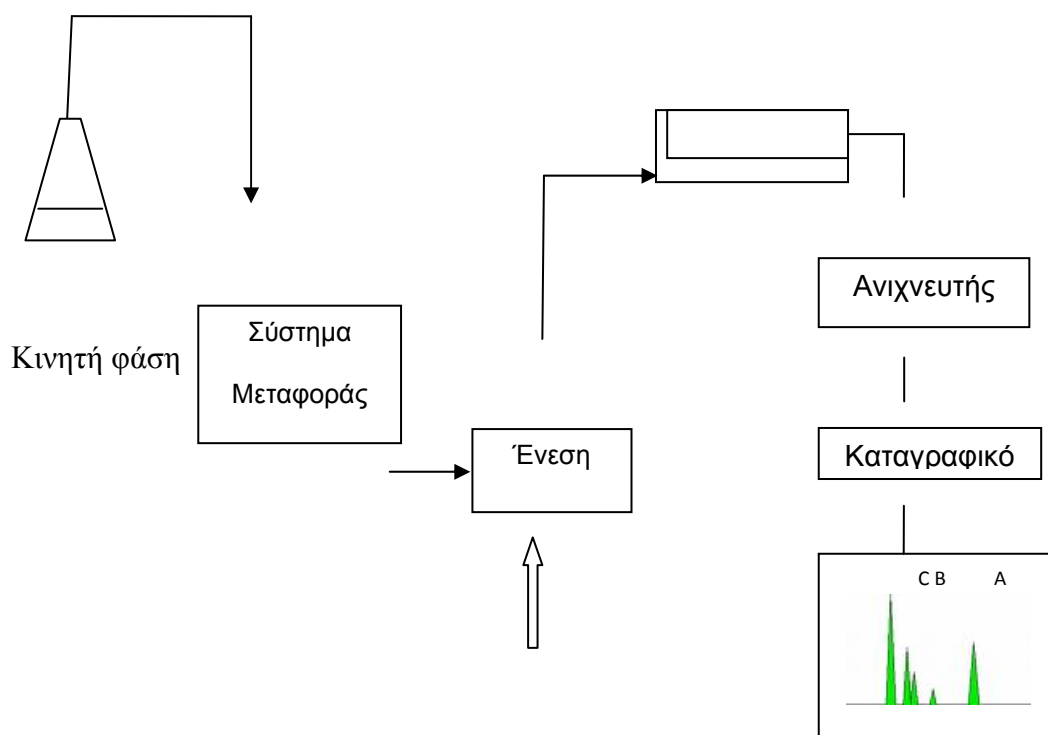
Η πολικότητα του μέσου έκλυσης (κινητή φάση) διαδραματίζει τον υψηλότερο ρόλο σε όλους τους τύπους HPLC και ανάλογα με την ροή του διακρίνονται δυο τύποι έκλυσης: σταθερής (isocratic) και μεταβαλλόμενης (gradient) ροής. Στην περίπτωση, όπου η έκλυση γίνεται υπό σταθερές συνθήκες ροής, η κινητή φάση αντλείται μέσω της στήλης διατηρώντας σταθερή ροή και σύσταση καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση, η σύσταση και η ισχύς

του εκλουστικού μέσου αλλάζουν κατά την διάρκεια της ανάλυσης (<http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC Book/index.html>, 2004).

Ο χρόνος συγκράτησης (retention time) ενός συστατικού και ο παράγοντας χωρητικότητας (capacity factor) αποτελούν χαρακτηριστικές ιδιότητες κάθε συστατικού για συγκεκριμένες συνθήκες διεξαγωγής της χρωματογραφικής ανάλυσης. Έτσι, η σύγκριση των χρόνων συγκράτησης των προσδιοριζόμενων άγνωστων συστατικών με τους γνωστούς χρόνους συγκράτησης πρότυπων ουσιών μπορεί θεωρητικά να οδηγήσει στην ταυτοποίηση των άγνωστων ουσιών. Η θεωρητική ισχύς αυτής της ταυτοποίησης περιορίζεται από το γεγονός ότι τόσο η HPLC, όσο και οι άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, δεν προσδιορίζουν την δομή των συστατικών, αλλά εντοπίζουν τα συστατικά που εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Macrae, 1988).

2.2.1 Διάταξη της HPLC

Η βασική διάταξη της HPLC περιλαμβάνει ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος, μια αντλία, μια στήλη, έναν ανιχνευτή, και ένα καταγραφικό σύστημα, συνδεδεμένα όπως φαίνεται στο Σχήμα 5 (Macrae, 1988).



Σχήμα 5. Βασική διάταξη της HPLC με σταθερή παροχή διαλύτη - *isocratic elution* (Macrae, 1988).

Καρδιά του συστήματος αποτελεί η στήλη, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Εφόσον η στατική φάση αποτελείται από πορώδες υλικό με πολύ μικρή διάμετρο σωματιδίων, απαιτείται αντλία υψηλής πίεσης, ώστε να πραγματοποιηθεί η διέλευση της κινητής φάσης μέσω της στήλης. Η διαδικασία της χρωματογραφίας ξεκινά με την έγχυση του δείγματος στην κορυφή της στήλης και ο διαχωρισμός των συστατικών συμβαίνει καθώς τα συστατικά που ενδιαφέρουν και η κινητή φάση αντλούνται διαμέσου της στήλης. Τελικά κάθε συστατικό που εκλύεται από την στήλη ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή, η απόκριση του οποίου εμφανίζεται σαν κορυφή στο καταγραφικό σύστημα. Το συνολικό αποτέλεσμα όλης της διαδικασίας στο καταγραφικό είναι γνωστό σαν χρωματογράφημα (Macrae, 1988).

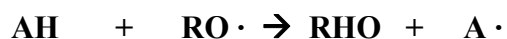
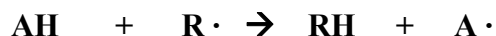
2.3 Αντιοξειδωτικά – Μηχανισμός δράσης

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που προστίθενται είτε στα λίπη είτε στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρή ύλη για να επιβραδύνουν την οξείδωση και να καταστήσουν τα τρόφιμα εύληπτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Μπόσκου, 2004).

Όπως αναφέρθηκε, κατά το στάδιο του τερματισμού, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζονται αδρανή προϊόντα. Όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους σταματά θεωρητικά η οξείδωση. Όμως, ο αυτόματος τερματισμός της οξείδωσης, είναι πολύ δύσκολο να συμβεί, αφού είναι απίθανο να αντιδράσουν μεταξύ τους όλες οι ρίζες. Είναι δυνατόν όμως, με τη προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στις λιπαρές ύλες να εμποδιστεί ή να καθυστερήσει ή εμφάνιση της οξείδωσης (Κυριτσάκης, 1984).

Η δέσμευση μιας ελεύθερης ρίζας, μπορεί να γίνει με τη προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό προς την ελεύθερη ρίζα. Γι' αυτό άλλωστε τα αντιοξειδωτικά είναι γνωστά και σαν δωρητές υδρογόνου. Με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών εμποδίζεται ο σχηματισμός των αλυσιδωτών αντιδράσεων και κατά συνέπεια διακόπτεται η πορεία της οξείδωσης.

Στις αντιδράσεις που ακολουθούν φαίνεται χαρακτηριστικά ο τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών, που οδηγεί στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών.



Όπου: (AH = αντιοξειδωτικό, R·, RO· και ROO· = ελεύθερες ρίζες, RH = λιπαρό οξύ, ROH = αλκοόλη, ROOH = υπεροξείδιο και A = ελεύθερη ρίζα αντιοξειδωτικού).

Οι ελεύθερες ρίζες αντιοξειδωτικών που σχηματίζονται, μετά την απομάκρυνση του υδρογόνου, μπορεί να σταθεροποιηθούν στη συνέχεια, είτε αντιδρώντας με άλλες ρίζες αντιοξειδωτικών, είτε με ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων (Κυριτσάκης, 1984).



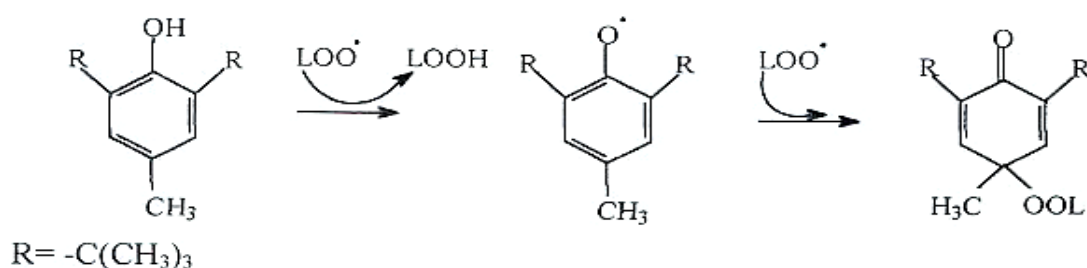
2.3.1 Συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά

Είναι συνθετικές ουσίες, φαινολικής συνήθως δομής, οι οποίες εμποδίζουν την οξείδωση με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται σε ένα λιπαρό σύστημα.

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται πρέπει να μην είναι τοξικά, να είναι σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες και να έχουν την ικανότητα να δρουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Ηλιόπουλος, 1998).

Τα κυριότερα συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται για την προστασία των λιπαρών υλών των τροφίμων είναι :

BHT: βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο ή 2,6-δι-τρι-βουτυλοπαρακρεσόλη. Το BHT είναι πιο αποτελεσματικό στην προστασία των ζωικών από ότι των φυτικών λιπών. Ο μηχανισμός δράσης του BHT φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση :



Σχήμα 6. Μηχανισμός δράσης του BHT

BHA: βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη που είναι μίγμα δυο ισομερών της 2-τρι-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και 3-τρι-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την προστασία του αρώματος και του χρώματος των αιθέριων ελαίων και εξαιρετικά αποτελεσματική για την οξειδωτική προστασία ελαίων πλούσιων σε λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας. Είναι λιποδιαλυτό και αδιάλυτο στο νερό όπως και το BHT.

PG: Εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός, ο οκτυλικός και ο δεκυλικός. Είναι από τα πιο πολικά αντιοξειδωτικά, είναι πολύ ενεργά στα λίπη και στα έλαια δεδομένου ότι είναι επλουτισμένα στην επιφάνεια του λίπους και έρχονται σε επαφή με τον αέρα. Οι εστέρες του γαλλικού οξέος και κυρίως ο προπυλικός χάνουν την δραστηριότητα τους κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την BHA και το BHT, ενώ για να παρεμποδιστεί η προοξειδωτική δράση μεταλλικών ιόντων, όπως σιδήρου και χαλκού, χρησιμοποιείται ταυτόχρονα και κιτρικό οξύ.

ΤΒΗΩ: Δι-τριτ-βουτυλο-υδροκινόνη. Είναι πιο πολικό αντιοξειδωτικό και επαρκώς λιποδιαλυτή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη ή σε συνδυασμό με την ΒΗΑ και το ΒΗΤ σε συγκεντρώσεις έως 200 ppm. Ως διφαινόλη μπορεί να αντιδράσει με υπεροξυ-ρίζες δίνοντας ημικινοειδείς ρίζες οι οποίες σταθεροποιούνται μέσω δομών συντονισμού ή παίρνουν μέρος σε άλλες αντιδράσεις παράγοντας πιο σταθερά προϊόντα (Dziedzak, 1986; Μπόσκου, 2004; Belitz et al., 2006).

2.3.2. Φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο και μια σειρά από μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες από τα απλά φαινολικά μόρια έως πολυμερείς ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις απαντώνται ως μονο- και πολυσακχαρίτες που συνδέονται με μια ή περισσότερες από τις υδροξυλομάδες τους με σάκχαρα και μπορούν επίσης να εμφανιστούν με την μορφή εστέρων και μεθυλεστέρων (Balasundram et al., 2006). Κύριες φαινολικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση είναι τόσο οι απλές μονοφαινόλες όπως η π-κρεσόλη, η 3-αιθυλοφαινόλη και η 3,4-διμεθυλοφαινόλη όσο και διφαινόλες όπως η υδροκινόνη που είναι η πιο διαδεδομένη, τα φαινολικά οξέα όπως τα υδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού, φαινυλοξικού και κινναμωμικού οξέος, τα φαινολικά διτερπένια και τα φλαβονοειδή. Μεταξύ των φαινολικών οξέων που εμφανίζονται σαν φυσικά αντιοξειδωτικά σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα τα πιο διαδεδομένα είναι το καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και το βανιλλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ έχει υψηλή δραστηριότητα συγκρίσιμη της φλαβονόλης κερκετίνης. Το φερουλικό οξύ εμφανίζεται να εμποδίζει την προοξειδωση του λινολενικού ή λινελαϊκού οξέος σε υψηλές συγκεντρώσεις (Zheng et al., 2001, Van Sumere, 1989).

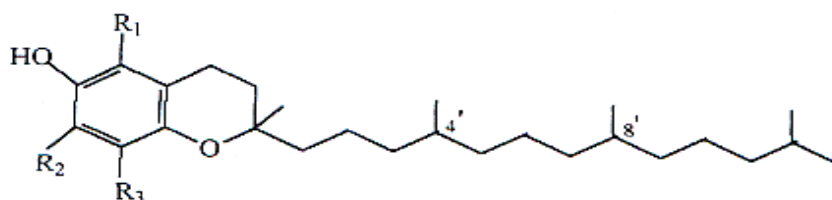
2.3.2.1. Τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες

Οι τοκοφερόλες είναι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται κυρίως στα φυτικά έλαια, σε σύγκριση με τα ζωϊκά λίπη. Έτσι οι τοκοφερόλες είναι αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά για τα ζωϊκά λίπη ενώ έχουν μικρή μόνο αντιοξειδωτική δράση όταν αυτές προστίθενται σε φυτικά έλαια. Κατά την αντιοξειδωτική τους δράση οι τοκοφερόλες οξειδώνονται προς τοκοκινόνες οι οποίες στερούνται αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Σημαντικό μειονέκτημα τους είναι ότι οι τοκοφερόλες καταστρέφονται με την θερμότητα (Ηλιόπουλος, 1998).

Οι τοκοφερόλες παραλαμβάνονται κατά την διάρκεια παραλαβής φυτικών ελαίων, εξασφαλίζουν την σταθερότητα του τελικού προϊόντος του ελαίου για αυτό και χρησιμοποιούνται για την οξειδωτική προστασία των φυτικών ελαίων. Οι τοκοφερόλες είναι μεθυλοπαράγωγα της τοκόλης ενώ οι τοκοτριενόλες είναι μεθυλοπαράγωγα της τοκοτριενόλης. Χαρακτηρίζονται ως α, β, γ, δ με βάση τον αριθμό και τη θέση των μεθυλίων στον αρωματικό δακτύλιο.

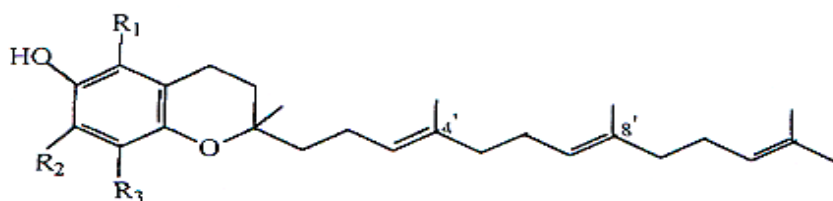
Οι τοκοφερόλες εμφανίζουν δράση βιταμίνης E, με την α-τοκοφερόλη να είναι η πιο δραστική από τα ομόλογα. Η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται από τη α- προς την δ-τοκοφερόλη. Στις τοκοφερόλες η πλευρική αλυσίδα είναι κορεσμένη, ενώ στις τοκοτριενόλες είναι ακόρεστη (Belitz et al., 2006, Dziedzak, 1986).

Η α-τοκοφερόλη αντιδρά με υπεροξυ-ρίζες ταχύτερα από τις άλλες τοκοφερόλες και τα συνθετικά αντιοξειδωτικά BHA και BHT. Η υψηλότερη ικανότητα της γ-τοκοφερόλης σε σύγκριση με την α-τοκοφερόλη βασίζεται στην υψηλότερη σταθερότητα της γ-τοκοφερόλης και στα διαφορετικά προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια αντιδράσεων οξείδωσης (Belitz et al., 2006).



Τοκόλες

5,7,8-τριμεθυλοτοκόλη	(α-τοκοφερόλη)
5,8-διμεθυλοτοκόλη	(β-τοκοφερόλη)
7,8-διμεθυλοτοκόλη	(γ-τοκοφερόλη)
8-μεθυλοτοκόλη	(δ-τοκοφερόλη)



Τοκοτριενόλες

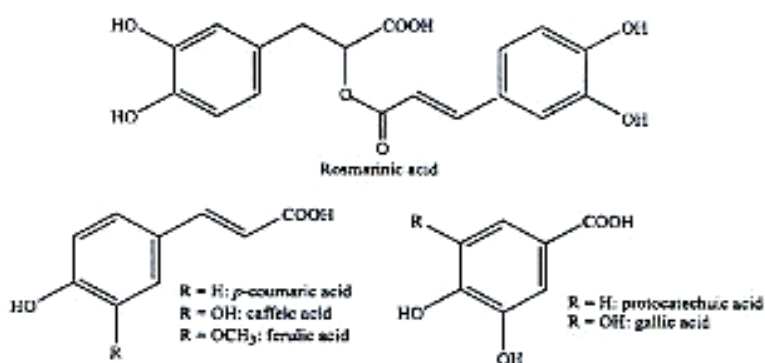
5,7,8-τριμεθυλοτοκοτριενόλη	(α-τοκοτριενόλη)
5,8-διμεθυλοτοκοτριενόλη	(β-τοκοτριενόλη)
7,8-διμεθυλοτοκοτριενόλη	(γ-τοκοτριενόλη)
8-μεθυλοτοκοτριενόλη	(δ-τοκοτριενόλη)

Σχήμα 7. Δομές τοκοφερολών-τοκοτριενολών

2.3.2.2. Φαινολικά οξέα

Οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα αρωματικά φυτά και οι κυριότερες ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών και φαινολικών διτερπενίων. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίου/υδρογόνου και παράγοντες αδρανοποίησης δραστικών μορφών οξυγόνου. Έχουν επίσης ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων με ιόντα μετάλλων και παρεμπόδισης της αντίδρασης Fenton (Proestos, et al., 2005).

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε: i) υδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C₆-C₁) και βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή καθώς και ως εστέρες ή γλυκοζίτες όπως το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το συριγλικό οξύ και το βανιλλικό οξύ, ii) σε υδροξυλιωμένα παράγωγα κινναμωμικού οξέος (C₆-C₃) κυρίως απαντούν με την μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών, όπως το καφεϊκό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Και τέλος γλυκοζιτικοί φαινολοξικοί εστέρες (Fukumoto et al., 2000, Skerget et al., 2005, Balasundram et al., 2006, Merken et al., 2000).



Σχήμα 8. Δομή φαινολικών οξέων

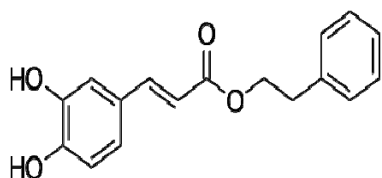
Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα είναι η πιο σημαντική κατηγορία φαινολικών ενώσεων και βρίσκονται στα φυτά και τα προϊόντα τους (Cliford 1999). Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους είναι βιοδραστικά συστατικά με αντιοξειδωτική δράση *in vitro* και ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία (Kroon & Williamson 1999).

Ειδικότερα οι ο-διφαινόλες (κατεχόλες) όπως το πρωτοκατεχικό οξύ (3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ) (PA) και καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυκιναμωμικό οξύ) (CA) παρουσιάζουν ισχυρή δράση αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών. Το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Lu & Ycar Foo 2001). Το φερουλικό οξύ (4-υδροξυ-3-μεθοξυκιναμωμικό οξύ) (FA), το μεθοξυπαράγωγο του καφεϊκού οξέος βρίσκεται ευρέως στους φυτικούς ιστούς και αποτελεί βιοδραστικό συστατικό των τροφίμων. Μια από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις του φερουλικού οξέος είναι οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Graf, 1992). Με τον τρόπο αυτό το FA προστατεύει το DNA και τα λιπίδια από την οξειδωση που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Anselmi et al., 2004, Ogiwara et al., 2002, Srinivasan et al., 2006). Έτσι το FA δρα ευεργετικά στην πρόληψη ή και θεραπεία παραγόντων που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες όπως το Alzheimer (Kim et al., 2004), ο διαβήτης (Ohnisi et al., 2004), διάφορες μορφές καρκίνου (Chang et al., 2006), υπέρταση (Suzuki et al., 2007), αθηρωμάτωση (Wang et al., 2004) και φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Ozaki 1992). Επιπλέον το φερουλικό οξύ παρεμποδίζει την φωτοοξειδωση του λινελαϊκού οξέος και μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας φωτοπροστασίας του δέρματος (Lin et al., 2005).

Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (GA), επίσης σημαντικό φαιολικό φυτοχημικό, έδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο σε γαλακτώματα όσο και σε λιπαρά υποστρώματα (Madsen & Bertelsen 1995, Nakatani 1992). Η αντιοξειδωτική του δράση ήταν παρόμοια του Trolox και πιο ισχυρή από άλλα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (AA) (Cholbi et al., 1991).

Ο φαιαιθυλεστερας του καφεϊκού οξέος (CAPE), είναι μία φαιολική ένωση η οποία βρίσκεται στην πρόπολη των μελισσών, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει πολλές βιολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής (Son and Lewis, 2002) και της αντιφλεγμονώδους δράσης (Michaluart et al., 1999). Μπορεί να συμβάλλει στην παρεμπόδιση διάφορων παθοφυσιολογικών διαδικασιών όπως της

προκαλούμενης βλάβης από ισχαιμία/επαναιμάτωση (Tan et al. 2005) και της αθηρωμάτωσης (Hishikawa et al., 2005). Το CAPE περιλαμβάνει στη δομή του έναν δακτύλιο κατεχόλης, στον οποίο οφείλεται κατά ένα μεγάλο βαθμό η δέσμευση των ελεύθερων ρίζων του οξυγόνου και η ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων με ιόντα μετάλλων (Russo et al., 2002).



Σχήμα 9. Δομή φαιναιθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος

2.3.2.3. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων και είναι παράγωγα του βενζο-γ-πυρανίου. Η δομή τους αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτύλιους τον Α και τον Β, ενωμένους από μια γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα, συνήθως σε μορφή ετεροκυκλικού δακτύλιου. Στα φλαβονοειδή συμπεριλαμβάνονται οι κατεχίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβονόνες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανίνες (Fukumoto et al., 2000, Skerget et al., 2005, Balasundram et al., 2006, Merken et al., 2000).

Οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες βρίσκονται στα φυτά με την μορφή Ο-γλυκοζιτών, κυρίως στα φύλλα και τα εξωτερικά μέρη των φυτών και στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά (Hertog et al., 1995, Rommel & Wrolstad., 1993; Bilyk & Sapers., 1985). Φλαβονοειδή έχουν βρεθεί ακόμα σε σπόρους (chia seeds), ελαιούχους καρπούς (φιστίκια), στη σόγια και στα προϊόντα της (Pratt & Miller., 1984, Taga et al., 1984; Pratt & Birac., 1979). Έχουν ανιχνευτεί πάνω από 4000 φλαβονοειδή και βρίσκονται σε φρούτα, λαχανικά, τσάι, κόκκινο κρασί και σε πολλά συμπληρώματα διατροφής ή φυτικά φάρμακα.

Είναι από τα πιο σημαντικά φαινολικά φυτοχημικά, και το ενδιαφέρον για αυτά τα συστατικά οφείλεται κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Πολλά φλαβονοειδή έχουν βρεθεί να εμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Sanchez-

Moreno et al., 2000, Nijveldt et al., 2002, Sang et al., 2003). Τα φυσικά φλαβονοειδή μπορούν να προσφέρουν μια εναλλακτική λύση για την προστασία από την οξειδωση των λιπιδίων στα τρόφιμα. Έχουν χαρακτηριστεί ως προασπιστές της υγείας, για την πρόληψη ασθενειών όπως του καρκίνου. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά αντί των ευρέως χρησιμοποιημένων συνθετικών φαινολικών αντιοξειδωτικών στις βιομηχανίες τροφίμων, και να έχουν οφέλη για την υγεία, όπως προκύπτει από επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι η κατανάλωση τροφίμων που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή μπορεί να μειώσει το κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου (Jullian, et al., 2010).

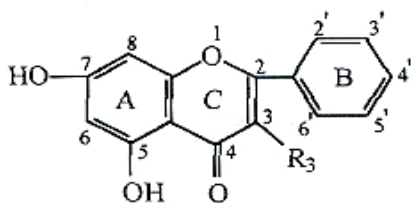
Τα περισσότερα φλαβονοειδή εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση σε λιπαρά συστήματα τροφίμων. Η δράση αυτή εξαρτάται από τη θέση και τον αριθμό των υδροξυλίων στο μόριο τους. Η υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου B συνεισφέρει σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση. Έτσι όλα τα φλαβονοειδή με υδροξύλια στις θέσεις 3 και 4 είναι δραστικά (Dziedzic & Hudson., 1983). Επίσης αναφέρεται ότι η ο-διυδροξυλίωση στον ένα αρωματικό δακτύλιο και η π-διυδροξυλίωση στον άλλον δημιουργεί ισχυρά αντιοξειδωτικά ενώ η 5,7-υδροξυλίωση στον αρωματικό δακτύλιο A δεν έχει σημαντική επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση (φισετίνη και κερκετίνη έχουν την ίδια δράση). Η παρουσία ελεύθερου υδροξυλίου στην 3-θέση και του διπλού δεσμού μεταξύ C-2 και C-3 του δακτυλίου C ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση (Das & Pereira, 1990). Ο σχηματισμός γλυκοζίτη στην 3-θέση των φλαβονοειδών με μονοσακχαρίτες ή δισακχαρίτες μειώνει την αντιοξειδωτική δράση (η ρουτίνη είναι ασθενέστερο αντιοξειδωτικό σε σχέση με την κερκετίνη).

Συνοπτικά τα δομικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση είναι : i) η παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ C-2 και C-3 και καρβονυλίου στη θέση 4 του δακτυλίου C ii) η παρουσία υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C και iii) η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου B

Πίνακας 1. Δομικά χαρακτηριστικά φλαβονών και φλαβονολών

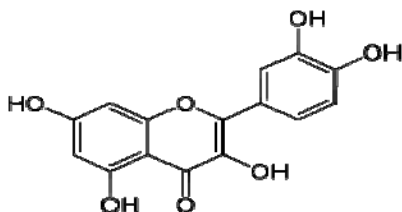
Ένωση	Δακτύλιος - C	Δακτύλιος - C
	R ₃	3' 4' 5'
Φλαβόνες Απιγενίνη	H	H OH H
Λουτεολίνη	H	OH OH H
Φλαβονόλες Κερκετίνη	OH	OH OH H
Μυρικετίνη	OH	OH OH OH
Καιμπφερόλη	OH	H OH H

Τα φλαβονοειδή δρουν με δυο μηχανισμούς ως αντιοξειδωτικά. Κυρίως διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξειδωσης δίνοντας άτομα υδρογόνου στις υπέροξυ-ρίζες, όπως όλα τα φαινολικά αντιοξειδωτικά. Επίσης σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση. Στο σχηματισμό συμπλόκων συμμετέχουν το υδροξύλιο στη θέση 3 και το καρβονύλιο στη θέση 4 των φλαβονολών ή το καρβονύλιο στη θέση 4 και ένα υδροξύλιο στη θέση 5 των φλαβονολών, των φλαβονών και των φλαβανονών (Pratt & Hudson., 1990).



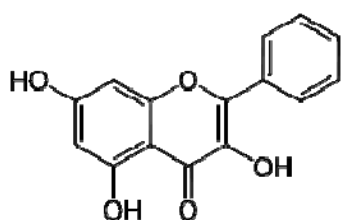
Σχήμα 10. Δομή φλαβονοειδών.

Η κερκετίνη (φλαβονόλη) βρίσκεται κυρίως στα μήλα, κρεμμύδια και το πράσινο τσάι (Scalbert & Williamson, 2000), εμφανίζεται κυρίως ως γλυκοζίτης, με σάκχαρα όπως η γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, ρουτινόζη ή ξυλόζη, τα οποία ενώνονται με μια υδροξυλομάδα της φλαβονόλης (Havsteen, B., 1983, Middleton and Kandaswami, C., 1993). Η κερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό *in vitro*. Εντός της οικογένειας των φλαβονοειδών, αδρανοποιεί ισχυρά δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (συμπεριλαμβανομένων και $O_2^{\bullet-}$) και αζώτου (RNS) (NO^{\bullet} και $ONOO^-$) (Haenen, et al., 1999, Cushnie and Lamb, 2005). Αυτές οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κερκετίνης μπορούν να αποδοθούν στη παρουσία δύο δομικών χαρακτηριστικών μέσα στο μόριο που έχουν τη βέλτιστη διάταξη για τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών, όπως η δομή της κατεχόλης στο δεύτερο δακτύλιο και η υδροξυλομάδα στη τρίτη θέση του πρώτου και τρίτου δακτυλίου (Heijnen, et al., 2002). Επίσης η κερκετίνη ενισχύει σημαντικά την ενδογενή αντιοξειδωτική προστασία λόγω της συνεισφοράς της στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος που είναι 6,024 φορές υψηλότερη από αυτή του αντιοξειδωτικού αναφοράς (Trolox), ενώ η συμβολή της βιταμίνης C και του ουρικού οξέος ουσιαστικά ισοδυναμεί με αυτή του Trolox (Arts, et al., 2004, Boots et al., 2008).



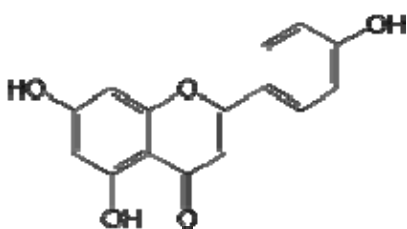
Σχήμα 11. Δομή κερκετίνης

Η γκαλαγκίνη είναι μέλος της ομάδας των φλαβονολών, βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φαρμακευτικά φυτά όπως το *Alpinia officinarum*, το μέλι και τη πρόπολη. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον αυτής της ένωσης έγκειται στις γενικές φαρμακολογικές της ιδιότητες (αντιμικροβιακή, σπασμολυτική, αντιαλλεργική, αντιφλεγμονώδη, αντική, αντικαρκινική). Παρά τις ισχύουσες βιολογικές δράσεις η θεραπευτική της χρησιμότητα και η βιοδιαθεσιμότητά της είναι περιορισμένη λόγω των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, ιδιαίτερα της μικρής της διαλυτότητας στο νερό και της χαμηλής οξειδωτικής της σταθερότητας (Heo et al., 1996, Wall et al., 1988, Cholbi et al., 1991, Imamura et al., 2000, Shih et al., 2000).



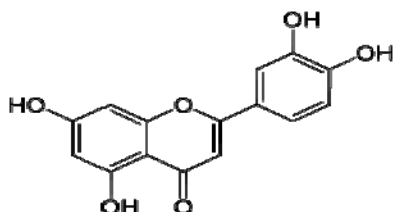
Σχήμα 12. Δομή γκαλαγκίνης

Η απιγενίνη (φλαβόνη) είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές το οποίο βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά στο μαϊντανό, μέντα, λεμόνι, στη perilla (φυτό της οικογένειας *Lamiaceae*), σε μούρα και φρούτα. Έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση για το δέρμα και ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών σε πολλά *in vitro* συστήματα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απιγενίνη έχει ιδιότητες που αναστέλλουν την ανάπτυξη πολλών καρκινικών σειρών, για παράδειγμα του μαστού, του παχέος εντέρου, του δέρματος, του θυρεοειδούς, σε κύτταρα λευχαιμίας και συμπαγή-στερεά κακοήθη καρκινικά κύτταρα (Choi, et al., 2007).



Σχήμα 13. Δομή απιγενίνης

Η λουτεολίνη (φλαβόνη) είναι ένα από τα πιο κοινά φλαβονοειδή ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο και μάλιστα σε φυτά που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική για να αντιμετωπίσουν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η λουτεολίνη έχει προληπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες, με ιδιαίτερη έμφαση στις αντικαρκινικές ιδιότητες (Miguel 2009).



Σχήμα 14. Δομή λουτεολίνης

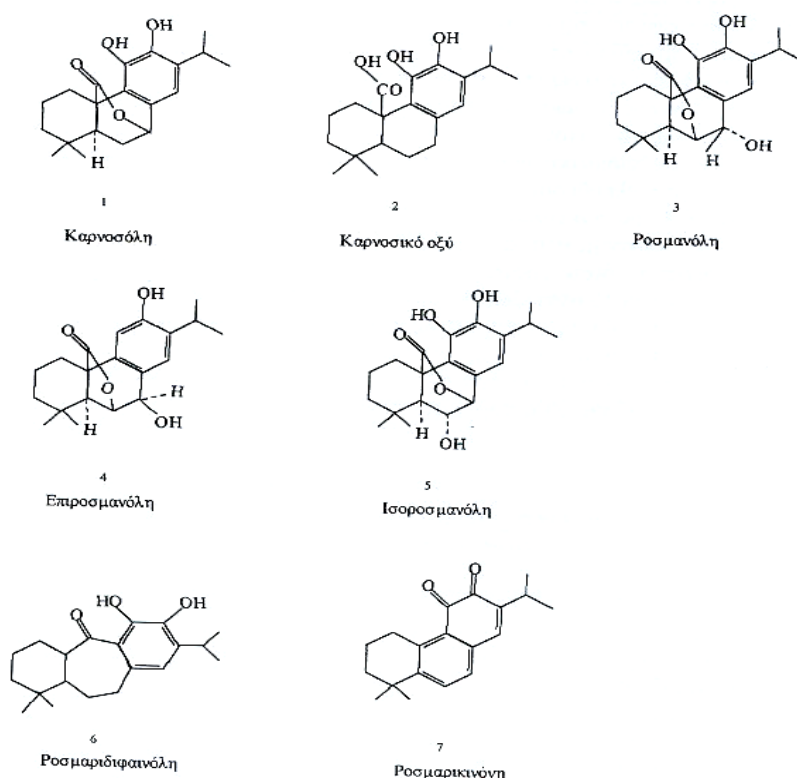
Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών αναγνωρίζονται ευρέως. Οι δύο βασικές αντιοξειδωτικές δομές που χαρακτηρίζουν τα φλαβονοειδή είναι όπως αναφέρθηκε η παρουσία του Β-δακτυλίου της κατεχόλης και τη παρουσία ενός διπλού δεσμού ανάμεσα στον C₂ και C₃ σε σύζευξη με μία καρβονυλο- ομάδα στον C₄. Το πρώτο δομικό χαρακτηριστικό χρησιμεύει ως δότης υδρογόνου/ηλεκτρονίου για τη σταθεροποίηση της ρίζας και το δεύτερο για να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Επειδή η λουτεολίνη και κάποιοι από τους γλυκοζίτες της έχουν αυτή τη δομή, δεν αποτελεί έκπληξη ότι πολλά φυτά που περιέχουν λουτεολίνη έχουν αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση της λουτεολίνης και των γλυκοζιτών της έχει συνδεθεί με την ικανότητα τους να αδρανοποιούν τις ρίζες οξυγόνου και αζώτου (Cai, et al., 1997, Odontuga, et al., 2005), να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταβατικά μέταλλα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν έναρξη της οξείδωσης μέσω της αντίδρασης Fenton (Mira, et al., 2002), ν'αναστέλλουν τα προοξειδωτικά ένζυμα και να επάγουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Sadik, et al., 2003). Η αντιοξειδωτική δράση της λουτεολίνης δεν έχει παρατηρηθεί μόνο *in vitro* αλλά και *in vivo* (Miguel López-Lázaro, 2009, Qiusheng et al., 2005).

2.3.2.4. Φαινολικά διτερπένια

Μία μεγάλη κατηγορία ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι τα τερπένια. Αυτή περιλαμβάνει ενώσεις που έχουν κοινή βιοσυνθετική προέλευση και ως βασική δομική μονάδα το μόριο του ισοπροπενίου CH₂=C(CH₃)-CH=CH₂. Τα διτερπένια

είναι ενώσεις των οποίων ο ανθρακικός σκελετός αποτελείται από τέσσερις ισοπρενικές ομάδες (C₂₀).

Διτερπένια με φαινολική δομή όπως η καρνοσόλη, το καρσονικό οξύ, η ροσμανόλη, η επιροσμανόλη, η ισοροσμανόλη, η ροσμαριδιφαινόλη και η ροσμαρικινόνη έχουν ταυτοποιηθεί κυρίως σε εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και συνεισφέρουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική τους δράση (Wu et al., 1982, Chen et al., 1992, Inatani & Nakatani., 1983, Houlihan et al., 1985, Aruoma et al., 1992).



Σχήμα 15. Φαινολικά διτερπένια

2.4. Πρόπολη ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών

2.4.1. Γενικά για την πρόπολη

Πρόπολη (κόλλα μέλισσας) είναι η γενική ονομασία για ένα κολλώδες, ρητινώδες φυσικό προϊόν, που συλλέγεται από τις μέλισσες (*Apis mellifera L.*) από διάφορες φυτικές πηγές. Ετυμολογικά, η ελληνική λέξη πρόπολη, σημαίνει πριν τη πόλη, δηλαδή υπεράσπιση της κυψέλης. Οι μέλισσες παράγουν πρόπολη συλλέγοντας

ρητίνες από τα μπουμπούκια και εκκρίσματα φυτών και από τον κορμό ορισμένων δέντρων, και στη συνέχεια τις αναμειγνύουν με τα ένζυμα του σιέλου τους. Τη πρόπολη τη χρησιμοποιούν για να κλείνουν τις τρύπες, να εξομαλύνουν τα εσωτερικά τοιχώματα της κυψέλης και να προστατεύουν από την είσοδο ενάντια στους εισβολείς (Burdock, 1998, Santos et al., 2001, Prytyk et al., 2003). Επίσης τη χρησιμοποιούν για να προστατεύουν το μελίσσι από ασθένειες λόγω των αντισηπτικών και αντιμικροβιακών της ιδιοτήτων (Santos et al., 2001, Prytyk et al., 2003, Sforcin, 2007). Το χρώμα της πρόπολης ποικίλλει από πράσινο, κόκκινο σε σκούρο καφέ (Santos et al., 2001, Prytyk et al., 2003).

Η χρήση της πρόπολης χρονολογείται από τα αρχαία χρόνια, τουλάχιστον από το 300 π.Χ, και χρησιμοποιούταν ως φάρμακο στη τοπική και λαϊκή ιατρική σε πολλές περιοχές του κόσμου. Αιγύπτιοι, Έλληνες και Ρωμαίοι ανέφεραν τη χρήση της πρόπολης για τις γενικές θεραπευτικές της ιδιότητες καθώς και για την επούλωση πληγών του δέρματος (Sforcin, 2007). Η πρόπολη έχει γίνει γνωστή για την αντιφλεγμονώδη δράση της και για την ιδιότητά της να θεραπεύει πληγές και έλκη. Η πρόπολη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες λόγω των διάφορων βιολογικών και φαρμακευτικών της ιδιοτήτων, όπως η αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιακτινική, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντιαγγειογεννητική και αντιοξειδωτική δράση (Amoros et al., 1994, Kujumgiev et al., 1999, Banskota et al., 2001, Isla et al., 2001, Hu et al., 2005, Ahn et al., 2007, Sforcin, 2007, Lima et al., 2009).

Σε γενικές γραμμές, η σύνθεση της πρόπολης είναι 30% κερί, 50% ρητίνες, 10% αιθέρια έλαια, 5% γύρη, και άλλες ουσίες. Η πρόπολη είναι ένα σύνθετο μίγμα φυσικών ουσιών και περιλαμβάνει μια ποικιλία χημικών ενώσεων, όπως είναι τα φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και εστέρες τους, φαινολικές αλδεΰδες, αλκοόλες και κετόνες, στεροειδή, κουμαρίνες, αμινοξέα και ανόργανες ενώσεις (Bankova, et al., 2000). Στις εύκρατες ζώνες, η πρόπολη από την Ευρώπη, την Ασία και τη Βόρεια Αμερική περιλαμβάνει πολλά είδη φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων (Bankova et al., 2000). Αντίθετα στις τροπικές ζώνες, τα κύρια συστατικά της πρόπολης όπως αυτής που προέρχεται από τη Βραζιλία είναι τα τερπενοειδή και φαινυλιωμένα παράγωγα του π-κουμαρικού οξέος (Marcucci et al., 1999, Gulcin et al., 2010).

Η χημική σύσταση της πρόπολης επηρεάζεται από βοτανικούς και γεωγραφικούς παράγοντες, καθώς και από την εποχή συλλογής της. Επομένως

διακυμάνσεις στην βιοδραστικότητα της πρόπολης αναμένεται να συνδέονται με την ποικιλία των συστατικών της (Moreno et al., 2000, Isla et al., 2005, Ahn et al., 2007, Sforcin, 2007, Zhou et al., 2008). Μία γενική χημική τυποποίηση θα ήταν αδύνατη, και γι αυτό το λόγο, μία λεπτομερής έρευνα για τη σύνθεση της, τη βοτανική της προέλευση και τις βιολογικές της ιδιότητες παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον (Burdock, 1997, Kosavalec et al., 2004, Sforcin, 2007, Lima et al., 2009).

Λόγω των γεωμορφολογικών χαρακτηριστικών της, η ελληνική χλωρίδα παρουσιάζει μεγάλη βιοποικιλότητα με πολλά ενδημικά φυτά κάτι που ισχύει επίσης και για τα ελληνικά νησιά, λόγω της απομόνωσης των νησιών από την ηπειρωτική Ελλάδα. Στη βιβλιογραφία, λίγα δεδομένα υπάρχουν για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ελληνικής πρόπολης (Kalogeropoulos et al., 2009) ενώ η χημική σύσταση και αντιμικροβιακή της δράση έχει μελετηθεί από τους Melliou και Chinou (Melliou&Chinou, 2004, Melliou et al., 2007) και Velikova et al. (2000).

2.5 Δράσεις της πρόπολης

2.5.1. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων πρόπολης

Οι μέθοδοι εκχύλισης της πρόπολης μπορεί να επηρεάσουν τη δράση της, δεδομένου ότι οι διαφορετικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται μπορούν να συνεισφέρουν στην διαλυτοποίηση και την παραλαβή διαφορετικών ενώσεων. Οι πιο κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση της πρόπολης είναι η αιθανόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, η μεθανόλη και το νερό. Οι μέθοδοι αντιοξειδωτικής δράσης που εφαρμόζονται για την εκτίμηση των εκχυλισμάτων της πρόπολης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές είναι κυρίως η ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας (DPPH), της αναγωγής ιόντων τρισθενούς σιδήρου (FRAP) και της συζευγμένης οξείδωσης β-καροτενίου/λινελαϊκού οξέος (β-carotene/linoleic acid). Σε πολλές μελέτες γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικών φαινολών, φλαβονοειδών, συσχετίσεις με τα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και ποιοτικοί και ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών συστατικών στα επιμέρους κλάσματα.

Οι Matsushige et al. (1995) μελέτησαν την ικανότητα 5 διαφορετικών δειγμάτων πρόπολης, τα οποία τα παρέλαβαν από τη Βραζιλία, στην αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας -DPPH. Σε σύγκριση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα και τα υδατικά έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Matsushige et al., 1995). Οι Laskar et al. (2010), μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση αιθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος ινδικής πρόπολης με τη μέθοδο DPPH όπου βρήκαν ότι το IC₅₀ για το υδατικό εκχύλισμα ήταν 0,05 mg/mL ενώ για το αιθανολικό ήταν 0,07 mg/mL. Και τα δύο IC₅₀ είναι συγκρίσιμα με αυτά του γαλλικού οξέος το οποίο βρέθηκε 0,01 mg/mL. Οι ίδιοι επίσης μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης με την αναγωγική μέθοδο FRAP όπου μέτρησαν την αναγωγική δράση του υδατικού και αιθανολικού εκχυλίσματος σε σχέση με αυτή του ασκορβικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Η αναγωγική δράση του ασκορβικού οξέος είναι φανερά υψηλότερη από τα δύο εκχυλίσματα, αλλά στη συγκέντρωση των 100 μg/mL, τα δύο εκχυλίσματα είχαν συγκρίσιμη αναγωγική δράση (p<0,05). Στη χαμηλότερη συγκέντρωση το αιθανολικό εκχύλισμα έδειξε υψηλότερη αναγωγική δράση αλλά στο σύνολο τους το υδατικό είχε μεγαλύτερη αναγωγική δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το υδατικό εκχύλισμα έχει περισσότερα ολικά φαινολικά οξέα (Laskar et al., 2010).

Υψηλά ποσοστά ολικών φαινολών και φλαβονοειδών, βρέθηκαν στα αιθανολικά εκχυλίσματα κινεζικών δειγμάτων (42,9 έως 302 mg GAE/g και 43,5-188 mg QE/g, αντίστοιχα). Η συσχέτιση μεταξύ των ολικών πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής δράσης (β-καροτένιο/ οξειδωση λινελαϊκού οξέος) ήταν σημαντική (r²=0.67). Η πρόπολη με υψηλή αντιοξειδωτική δράση είχε επίσης υψηλή αδρανοποιητική ικανότητα στη DPPH ρίζα. Η σχέση μεταξύ αδρανοποίησης της DPPH ρίζας των διαφόρων αιθανολικών εκχυλισμάτων και ολικών πολυφαινολών εξετάστηκε, και βρέθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ τους, (r²=0,762). Η πρόπολη με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, βρέθηκε να περιέχει μεγάλες ποσότητες φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως καφεϊκό οξύ (32.2 mg/g), φερουλικό οξύ (5.3 mg/g) και εστέρα καφεϊκού οξέος (8.7 mg/g). Υψηλό ποσοστό ολικών πολυφαινολών βρέθηκε επίσης σε πρόπολη από τη Κίνα (από την περιοχή του Hubei, 299 mg GAE /g), πρόπολη από τη Κορέα (από το Yeosu, με 212.7 mg/g GAE), από τη Βραζιλία (με 120 GAE mg/g) και την Ταϊλάνδη (με 31,2 GAE mg/g) (Kumazawa et al., 2004).

Οι Mohammadzadeh et al. (2006) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης από τρεις διαφορετικές περιοχές του Ιράν με τη μέθοδο FRAP. Η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων συγκρίθηκε με το Trolox ως αντιοξειδωτικό αναφοράς. Οι τιμές FRAP στα αιθανολικά εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 31,5 σε 1650 μM σε συγκεντρώσεις 100, 1000 και 2000 $\mu\text{g/ml}$ έναντι των τιμών Trolox που κυμάνθηκαν από 125,25 σε 3381,64 μM . Από τα τρία δείγματα το πρώτο είχε την καλύτερη αναγωγική δράση και φαίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά του Trolox στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p>0,05$) (Mohammadzadeh et al., 2006).

Οι Moreno et al. (2001) μελέτησαν επίσης την αδρανοποιητική δράση στη DPPH ρίζα από αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Αργεντινής. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν μας έδειξαν ότι είχαν ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας. Την υψηλότερη δραστηριότητα από τα δείγματα την είχαν τα δείγματα από την Amaicha del Valle, Tucuman και από το Santiago del Estero (7,5 $\mu\text{g/ml}$ από τα εκχυλίσματα ήταν απαραίτητα για την αδρανοποίηση του 25% της ρίζας). Η πρόπολη από την Roque Saenz Pena, από τη περιοχή του Chaco εμφανίστηκε λιγότερο δραστική σε σχέση με τα άλλα δείγματα (31,25 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος ήταν απαραίτητη για την αδρανοποίηση του 25% της ρίζας) (Moreno et al., 2001).

Οι Kalogeropoulos et al. (2009) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου με τις μεθόδους DPPH και FRAP. Με τη μέθοδο DPPH τα εκχυλίσματα της πρόπολης έδειξαν μια σημαντική δράση στην αδρανοποίηση της DPPH ρίζας, κυμαινόμενα από 0,33-1,11 mmol Trolox/g εκχυλίσματος. Υπήρχε μία τάση για υψηλότερες τιμές στη πρόπολη από τη Πελοπόννησο και τη Στερεά Ελλάδα. Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο FRAP έδειξαν ότι η αναγωγική ικανότητα στα εκχυλίσματα της πρόπολης κυμαινόταν μεταξύ 2,14 και 3,35 mmol ασκορβικού οξέος/g εκχυλίσματος, σχετικά υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στη Πελοπόννησο και στη Στερεά Ελλάδα ενώ χαμηλότερες στα νησιά και στη Κύπρο (Kalogeropoulos et al., 2009).

Επίσης οι Banskota et al. (2000) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο DPPH σε έξι διαφορετικά δείγματα πρόπολης από τη Βραζιλία, ένα από το Περού, ένα από την Ολλανδία και ένα από τη Κίνα τα οποία εκχυλίστηκαν με

μεθανόλη και με νερό. Βρήκαν ότι τα υδατικά εκχυλίσματα από τη Βραζιλία και την Κίνα είχαν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τα μεθανολικά. Οι τιμές IC_{50} από αυτά τα δείγματα κυμάνθηκαν από 5,9-14,2 $\mu\text{g/mL}$. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα από το Περού και την Ολλανδία έδειξαν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τα υδατικά. Τα υδατικά εκχυλίσματα και από τα δύο δείγματα B-2 (CPI-type) (προπόλη που συλλέχθηκε με ειδική κατεργασία) και B-5 (πράσινη πρόπολη) έδειξαν πιο ισχυρή δράση με τιμές IC_{50} 5,9 $\mu\text{g/mL}$, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα από το Περού έδειξαν τιμές 94,9 $\mu\text{g/mL}$. Το καφεϊκό οξύ το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, είχε τιμή IC_{50} 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (Banskota et al., 2000).

Οι Alencar et al. (2007) εξέτασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης με τη μέθοδο DPPH σε αιθανολικό εκχύλισμα, σε κλάσμα εξανίου και χλωροφορμίου. Το εξανικό κλάσμα έδειξε ισχυρή ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας 78%, σε αντίθεση με 57% και 55% από το αιθανολικό εκχύλισμα και το κλάσμα του χλωροφορμίου, αντίστοιχα. Επίσης οι Wang et al. (2003) μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα ακατέργαστης πρόπολης που προέρχεται από τη Βραζιλία. Αναμίχθηκε με αιθανόλη σε αναλογία 1:1 (v/v) για 24 ώρες ώστε να παραληφθεί το αιθανολικό εκχύλισμα (E). Το αιθανολικό εκχύλισμα δέχθηκε περαιτέρω κλασματοποίηση χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($SC\text{-CO}_2$) κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: 60 $^{\circ}\text{C}$ και πίεση 20, 15, 10 ή 5 MPa, σε τρεις διαχωριστές οι οποίοι λειτουργούν σε σειρά, για να αποδώσει το υπολειπόμενο (R), το κλάσμα 1 (F1), το κλάσμα 2 (F2) ή το κλάσμα 3 (F3), αντίστοιχα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η α -τοκοφερόλη. Η έρευνα έδειξε ότι η αδρανοποιητική ικανότητα του υπολείμματος ήταν υψηλότερη (93%) από την α -τοκοφερόλη (80%) και έπειτα ακολουθούσαν τα κλάσματα με τη λιγότερη δράση να την εμφανίζει το F3 (Alencar et al., 2007).

Οι Sarikaya et al. (2007) μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα δύο διαφορετικών αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης από καστανιά με τη μέθοδο FRAP καθώς και με τη μέθοδο DPPH. Τα αποτελέσματα της FRAP εκφράστηκαν σε ισοδύναμα Trolox /g δείγματος. Το εκχύλισμα Pr 1 (συλλέχθηκε από το εσωτερικό της κυψέλης) (327,76 ήταν λιγότερο δραστικό από το Pr 2 (συλλέχθηκε από την είσοδο της κυψέλης) (659,88). Η αδρανοποιητική ικανότητα της ρίζας DPPH των δειγμάτων και των προτύπων βρέθηκε ότι ήταν η ακόλουθη BHT>κατεχίνη>Trolox>Pr2>Pr1 (Sarikaya et al., 2007).

Οι Chaillou et al. (2009) εξέτασαν την αντιβακτηριδιακή, αδρανοποιητική (ARA) (DPPH) και αντιοξειδωτική (AOA) (β -carotene/LOX) δράση των αιθανολικών εκχυλισμάτων της πρόπολης από διάφορες περιοχές της Αργεντινής και οι τιμές συσχετίστηκαν με το σύνολο των επιπέδων των πολυφαινολών (92-187mg/g) και των φλαβονοειδών (6-18mg/g). Η ανάλυση των δειγμάτων παρουσίασε αξιοσημείωτη διακύμανση στην αντιοξειδωτική και αδρανοποιητική ικανότητά τους. Βρέθηκε μια μέτρια συσχέτιση ($p < 0,001$) μεταξύ της αδρανοποιητικής ARA και αντιοξειδωτικής AOA δράσης, έτσι ώστε η πρόπολη με αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε επίσης αδρανοποιητική δράση στη ρίζα DPPH. Μια παρόμοια τιμή για το συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε μεταξύ αδρανοποιητικής ικανότητας της ρίζας DPPH και των πολυφαινολών ($p < 0,001$). Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ αδρανοποιητικής ικανότητας του αιθανολικού εκχυλίσματος και του περιεχομένου των φλαβονοειδών, έδειξε ένα μέσο θετικό συντελεστή συσχέτισης ($p < 0,05$). Υπάρχει μια στατιστικά σημαντική, ισχυρή συσχέτιση μεταξύ AOA και πολυφαινολικών ενώσεων ($p < 0,01$) και μεταξύ της δράσης AOA και των ολικών φλαβονοειδών ($p < 0,05$). Η αδρανοποιητική ικανότητα στη ρίζα DPPH της πρόπολης και οι προστατευτικές της ικανότητες στην οξείδωση των λιπιδίων έχουν σχέση με τα υψηλά επίπεδα πολυφαινολών, αλλά συσχετίσεις με τα επιμέρους δραστικά συστατικά (κερκετίνη: 87mg/g, πινοσεμπρίνη: 102mg/g, χλωρογενικό οξύ: 4.19mg/g και γαλλικό οξύ: 4.8mg/g) δεν βρέθηκαν. Αυτό δείχνει ότι οι ισχυρές και σύνθετες αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ των επιμέρους συστατικών των κλασμάτων και των πολυφαινολών (Chaillou et al., 2009).

Ακόμη οι Kumazawa et al. (2003) μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από διάφορες περιοχές (Αργεντινή, Αυστραλία, Βραζιλία, Βουλγαρία, Χιλή, Ουγγαρία, Νέα Ζηλανδία, νότια Αφρική, Ταϊλάνδη, Ουκρανία, Ουρουγουάη, Ηνωμένα Έθνη, Ουζμπεκιστάν). Τα διάφορα αιθανολικά εκχυλίσματα και τα δείγματα αναφοράς ήταν σε τελική συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα από την Αυστραλία (b), Κίνα (f, g, h), Ουγγαρία (i) και Νέα Ζηλανδία (j) είχαν υψηλή αδρανοποιητική δράση πάνω από 60%. Αυτά τα αιθανολικά εκχυλίσματα είχαν υψηλό IC_{50} και ολικές πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα από τη Κίνα και την Ουγγαρία έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, όπως επίσης και στην μέθοδο του β -καροτενίου. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα από τη Νότια Αφρική (k) και το

Ουζμπεκιστάν (p), είχαν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση. Στη παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι η πρόπολη από τη Κίνα είχε υψηλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ η δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος από τη Βραζιλία ήταν μικρή (Kumazawa et al., 2003).

Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ικανότητας αδρανοποίησης της DPPH ρίζας από το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Βραζιλία και του φαινολικού της περιεχομένου (0,5-3,9g GA/100ml) έδειξε ένα μέσο θετικό συντελεστή συσχέτισης ($r=0,5$). Για τη σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης και περιεχομένου φλαβονοειδών (0,06 έως 0,65 g GA/100ml), βρέθηκε μια υψηλότερη συσχέτιση ($r=0,85$) από τη συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και των φαινολικών επίπεδων, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να μοιραστούν με τα φαινολικά οξέα ένα σημαντικό ρόλο στη συνεισφορά τους στην αντιοξειδωτική δράση (Mendes da Silva et al., 2006).

Σε μια άλλη μελέτη που σχεδιάστηκε για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αιθανολικού εκχυλίσματος από διάφορα μέρη του Ιράν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέτρησης της αναγωγικής δράσης FRAP, το συνολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών των αιθανολικών εκχυλίσματος στα δείγματα της ακατέργαστης πρόπολης κυμάνθηκε από 1,22 έως 7,79 g κερκετίνης /100g εκχ. και το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες κυμάνθηκε από 3,08 έως 8,46 g καφεϊκό οξύ /100g εκχ. Προτάθηκε ότι η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εμφανίστηκε σε δείγματα πρόπολης, με υψηλά ποσοστά σε φαινολικές ενώσεις και η ασθενής δράση με χαμηλά ποσοστά (Mohammadzadeh et al., 2006).

Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των αιθανολικών εκχυλισμάτων της ελληνικής πρόπολης κυμάνθηκε από 80,2 έως 338,5 mg GA/g αιθανολικού εκχ. και σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ($r=0,9$) και αναγωγική ικανότητα ($r=0,83$). Η DPPH αδρανοποιητική ικανότητα κυμάνθηκε από 0,33 σε 1,11 mmol Trolox/g εκχ. και οι τιμές αναγωγικής ικανότητας FRAP κυμάνθηκαν μεταξύ 2,14 και 3,35 mmol AAE/g εκχ. Σε σχέση με τις κύριες κατηγορίες των συστατικών που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα, τα φαινολικά οξέα κυμάνθηκαν από 0,75 έως 9,34 mg/g εκχ. και τα φλαβονοειδή από 8,8-182,6 mg/g εκχ., το περιεχόμενο των πολυφαινολών συσχετίστηκε με τα φαινολικά οξέα ($r=0,848$), και τα φλαβονοειδή ($r=0,957$). Επίσης οι τιμές DPPH και FRAP συσχετίστηκαν με τα φαινολικά οξέα ($r=0,838$, 0,711, αντίστοιχα) και τα φλαβονοειδή ($r=0,905$, 0,823, αντίστοιχα) (Kalogeropoulos et al., 2009).

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης συσχετίστηκαν με τα αποτελέσματα των ολικών φαινολών στα μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από δύο διαφορετικές περιοχές της Πορτογαλίας. Τα δείγματα από την περιοχή της βόρειας Bornes παρουσίασαν πολύ υψηλή συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες (329mg GA/g εκχ.) αλλά και ισχυρή αδρανοποιητική ικανότητα της DPPH ρίζας (0.006 mg/ml EC₅₀). Η συγκέντρωση των ολικών φαινολών από τη κεντρική περιοχή Fundao ήταν η μισή (151 mg GA/g εκχυλίσματος) και το EC₅₀ ήταν 0.055 δηλ. 10 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τη πρώτη τιμή. Παρόμοιες ήταν και οι EC₅₀ τιμές από την μέθοδο FRAP (0.009 mg/ml για την πρόπολη της περιοχής Bornes και 0.055 mg/ml για τα δείγματα από το Fundao). Τα εκχυλίσματα με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες παρουσίασαν χαμηλές τιμές EC₅₀ για αναγωγική δράση (Moreira et al., 2008).

Στα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρόπολης από διάφορες περιοχές της Αργεντινής το περιεχόμενο των φλαβονοειδών κυμάνθηκε μεταξύ 13 και 42.6 mg QE/g πρόπολης. Η αδρανοποιητική ικανότητα στη ρίζα DPPH σε 20 μl/ml, κυμάνθηκε μεταξύ 20 και 67,5%. Η συσχέτιση μεταξύ των φλαβονοειδών και της αδρανοποιητικής ικανότητας ήταν σημαντική ($r=0,53$, $p<0,025$) και έδειξε ότι η συγκέντρωση των φλαβονοειδών συνεισέφερε κατά το ήμισυ στη δράση. Προφανώς και άλλοι παράγοντες εμπλέκονται, εκτός από τα φλαβονοειδή (Moreno et al., 2000).

Η αδρανοποιητική ικανότητα στη ρίζα DPPH των μεθανολικών εκχυλισμάτων της πρόπολης από διάφορες περιοχές της επαρχίας του San Juan (Αργεντινή), παρουσίασαν υψηλές τιμές μεταξύ 82 και 96,6% σε 100 μg/ml. Όλα τα μεθανολικά εκχυλίσματα έδειξαν υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες (25,7 - 39,3g/100g.) και ολικά φλαβονοειδή (6,6 - 13,3g/100g). Δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αδρανοποιητικής ικανότητας DPPH και των ολικών φαινολικών ουσιών ή των ολικών φλαβονοειδών. Επιπλέον, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αδρανοποιητικής ικανότητας DPPH και μεμονωμένων φλαβονοειδών (πινοσεμπρίνη 32,7, πινομπασκίνη 23,6, χρυσίνη 38,2, γκαλαγκίνη 21.8mg/g εκχ.) (Ahn et al., 2007).

Οι Soleo de Funari et al (2006) εξέτασαν δύο διαφορετικά μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από τη Βραζιλία. Αρχικά εξέτασαν το ποσοστό των ολικών φαινολών και φλαβονοειδών. Οι ολικές φαινόλες και τα ολικά φλαβονοειδή που ποσοτικοποιήθηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα, εκφράστηκαν σε ισοδύναμα

γαλλικού οξέος και κερκετίνης ανά ακατέργαστη πρόπολη, όπου βρέθηκαν 7,39 και 2,64 (w/w), αντίστοιχα (Soleo de Funari et al., 2006).

Οι Nagai et al. (2002) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης από τη Βραζιλία. Η αξιολόγηση της αδρανοποίησης της ρίζας στο υδατικό εκχύλισμα της πρόπολης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε σχέση με το χρόνο, έδειξε ότι ήταν σχετικά δραστικά σε σχέση με το μάρτυρα. Η δραστηριότητα του 1mM ασκορβικού οξέος ήταν υψηλή, και ακολούθησαν τα δείγματα της πρόπολης. Η δραστηριότητα του υδατικού εκχυλίσματος ήταν μεταξύ 0,1 και 1mM ασκορβικού οξέος (Nagai et al., 2002).

Ακόμη οι Gulcin et al. (2010) εξέτασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα υδατικών εκχυλισμάτων πρόπολης από τη Τουρκία με τη μέθοδο θειοκυανικού σιδήρου. Η επίδραση των 30 μg/ml του υδατικού εκχυλίσματος στην παρεμπόδιση οξείδωσης των λιπιδίων βρέθηκε ότι είναι 93,2%. Από την άλλη τα πρότυπα BHT, BHA, α-τοκοφερόλη και Trolox βρέθηκε ότι έχουν 82,1, 83,3, 68,1 και 81,3% παρεμπόδιση οξείδωσης του γαλακτώματος του λινελαϊκού οξέος στην ίδια συγκέντρωση, αντίστοιχα. Η οξείδωση του λινελαϊκού οξέος χωρίς εκχύλισμα ή κάποιο πρότυπο συνοδεύεται από μια ταχύτατη αύξηση των υπεροξειδίων (Gulcin et al., 2010).

Επίσης βρέθηκε με τη μέθοδο FRAP ότι η αναγωγική δράση του υδατικού εκχυλίσματος, BHT, BHA, α-τοκοφερόλης και Trolox αυξήθηκε απότομα με αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος. Η αναγωγική ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων και των πρότυπων ήταν η ακόλουθη: BHA>BHT =α-τοκοφερόλη>Trolox> υδατικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το υδατικό εκχύλισμα είχε σημαντική αναγωγική ικανότητα ιόντων σιδήρου (Fe^{3+}). Ωστόσο, η αναγωγική ικανότητα ήταν μικρότερη από αυτή των προτύπων αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ίδιοι ερεύνησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος με τη μέθοδο DPPH, και οι τιμές IC_{50} για το υδατικό εκχύλισμα, BHA, BHT, α-τοκοφερόλη και Trolox, ήταν 31,81μg/mL, 10,97 μg/mL, 48,42 μg/mL, 13,62 μg/mL και 11,45 μg/mL, αντίστοιχα. Η αδρανοποιητική ικανότητα των δειγμάτων αυτών ήταν η εξής: BHA=Trolox>α-τοκοφερόλη> υδατικό εκχύλισμα>BHT (Gulcin et al., 2010).

Το περιεχόμενο των ολικών πολυφαινόλων των υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων ινδικής πρόπολης διαπιστώθηκε ότι ήταν 269 και 159 mg GA/g,

αντίστοιχα ενώ το περιεχόμενο των φλαβονοειδών ήταν 25,5 και 57,25 mg QE/g, αντίστοιχα. Το πολυφαινολικό περιεχόμενο των υδατικών εκχυλισμάτων ήταν υψηλότερο από εκείνο των αιθανολικών εκχυλισμάτων, αλλά το περιεχόμενο των φλαβονοειδών ήταν χαμηλότερο. Οι τιμές IC₅₀ των υδατικών εκχυλισμάτων ήταν 0.05 mg/ml ενώ των αιθανολικών ήταν 0.07 mg/ml. Και οι δύο αυτές τιμές ήταν συγκρίσιμες με το IC₅₀ του γαλλικού οξέος 0.01mg/ml. Η υψηλότερη δράση των υδατικών εκχυλισμάτων οφείλεται πιθανώς στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, αλλά και στην καλύτερη διαλυτότητα των φαινολικών συστατικών στο νερό. Σε επίπεδο συγκέντρωσης 100μg/ml το υδατικό και αιθανολικό εκχύλισμα παρουσίασαν συγκρίσιμη αναγωγική δραστηριότητα (Laskar et al., 2010).

Η αδρανοποιητική ικανότητα στη ρίζα DPPH υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης από την επαρχία Ερζερούμ της Τουρκίας προσδιορίστηκε (IC₅₀ 31,81 μg/ml) και συσχετίστηκε με τα συνολικά επίπεδα των αντιοξειδωτικών συστατικών (TP 124,3 μg GA/g εκχυλίσματος και TF 8,15 mg QE/g). Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ ολικών φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής δράσης (Guilcin et al., 2010).

Πίνακας 2. Ενδεικτικές τιμές αντιοξειδωτικής δράσης και συγκέντρωσης ολικών φαινολών και φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα πρόπολης.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ	IC ₅₀	TROLOX-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ	ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ (Banda Este)	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	DPPH	62,5 μg/ml εκχ.			39,3 mg QE/g πρόπ.	Moreno, et al., 2000
ΕΛΛΑΔΑ (ΜΕΓΑΛΟΠΟΛΗ)	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	DPPH- FRAP		1,11 mmol Trolox/g εκχ (DPPH) 3,35 mmol AO/g εκχ (FRAP)	338,5 mg CAE/g εκχ		Kalogeropoulos, et al., 2009
ΚΙΝΑ (Hebei)	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	DPPH	353 μg/ml εκχ.		298 mg GAE/g εκχ.	147 mg QE/g εκχ	Kumazawa, et al., 2004
ΚΥΠΡΟΣ (ΛΑΡΝΑΚΑ)	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	DPPH- FRAP		0,58 mmol Trolox/g εκχ (DPPH), 2,63 mmol AO/g εκχ (FRAP)	100,4 mg CAE/g εκχ.		Kalogeropoulos, et al., 2009
ΤΟΥΡΚΙΑ	ΥΔΑΤΙΚΟ	DPPH	31,81 μg/ml εκχ		124,3 μg GAE/g εκχ	8,14 mg QE/g εκχ	Gulcin, et al., 2010
ΙΝΔΙΑ	ΥΔΑΤΙΚΟ	DPPH	0,05 mg/ml εκχ		269,01mgGAE/g	25,5 mgQE/g	Laskar, et al., 2010.

2.5.2. Φαινολικά συστατικά εκχυλισμάτων πρόπολης

Η πρόπολη από την εύκρατη ζώνη όπως Ευρώπη, βόρεια Αμερική και μη τροπικές περιοχές της Ασίας, προέρχονται κυρίως από εκκρίματα των μπουμπουκιών από τα είδη *Populus* και είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους όπως το καφεϊκό οξύ (3,3 mg/g), π-κουμαρικό οξύ (27,4 mg/g), 3,4-διμεθοξυκιναμωνικό οξύ (8,6 mg/g), πινομπασκίνη (84,8 mg/g), πινοσεμπρίνη (99,7

mg/g), γκαλαγκίνη (58,2 mg/g), εστέρας του καφεϊκού οξέος (29,2 mg/g), κινναμωμικός εστέρας του καφεϊκού οξέος (20,3 mg/g), αρτεπιλίνη C (43,9 mg/g), απιγενίνη (18,4 mg/g), καιμπφερόλη (10,9 mg/g), και κερκετίνη (4,8 mg/g), ενώ η πρόπολη από τροπικές περιοχές όπου δεν υπάρχουν λεύκες και σημύδες είναι πλούσια σε πρενυλιωμένες βενζοφαινόνες, διτερπένια και φλαβονοειδή (Ahn et al., 2007).

Τα κύρια συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από διάφορες γεωγραφικές περιοχές με ανάλυση HPLC, διάταξη διόδου λυχνιών - (PDA) και φασματομετρία μάζας (MS), ήταν το καφεϊκό οξύ (3,3 mg/g), π-κουμαρικό οξύ (27,4 mg/g), 3,4-διμεθοξυκινναμωμικό οξύ (8,6 mg/g), κερκετίνη (4,8 mg/g), απιγενίνη (18,4 mg/g), καιμπφερόλη (10,9 mg/g), πινομπασκίνη (84,8 mg/g), πινοσεμπρίνη (99,7 mg/g), γκαλαγκίνη (58,3 mg/g), φαιαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος (29,2 mg/g), κινναμωμικός εστέρας του καφεϊκού οξέος (20,3 mg/g) και αρτεπιλίνη C (43,9 mg/g). Τα αιθανολικά εκχυλίσματα από την Αργεντινή, Αυστραλία, Κίνα, Ουγγαρία και Νέα Ζηλανδία είχαν σχετικά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών (31,2-299 mg/g) και φλαβονοειδών (2,5-176 mg/g) (Kumazawa et al., 2003).

Οι Gardana et al. (2007) ανέπτυξαν μία μέθοδο υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης LC-PDA-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολών και των φλαβονοειδών ακατέργαστης πρόπολης από διαφορετικές περιοχές. Βρέθηκε ότι δείγματα πρόπολης από την Ευρώπη, Κίνα και Αργεντινή χαρακτηρίζονται από την παρουσία των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών χρυσίνης (2-4%), πινοσεμπρίνης (2-4%), οξικού εστέρα πινομπασκίνης (1,6-3%) και γκαλαγκίνης (1-2%) (Gardana et al., 2007).

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των φαινολικών οξέων στα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης της Λιθουανίας, Πολωνίας και Λετονίας με HPLC ανάλυση έδειξαν ότι, τα κύρια φαινολικά οξέα που προσδιορίστηκαν ήταν το φερουλικό (461-2377 µg/ml) και κουμαρικό οξύ (4508-3075 µg/ml) και σε μικρότερο ποσοστό το καφεϊκό (68-327 µg/ml), κινναμωμικό (43-611 µg/ml), γαλλικό (44,2 µg/ml) και ροσμαρινικό οξύ (19-22 µg/ml). Τα κύρια αυτά φαινολικά οξέα μπορεί να αποτελέσουν βασικούς ποιοτικούς δείκτες της πρόπολης και των εκχυλισμάτων της (Ramanauskiene et al., 2009).

Δεκατρία διαφορετικά φαινολικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από τη βόρεια Αργεντινή με τη χρήση HPLC και στήλη RP-C18 και τα φάσματα απορρόφησης που προέκυψαν από την ανίχνευση με συστοιχία διόδων λυχνιών χρησιμοποιήθηκαν για τη ταυτοποίηση κορυφών σε σύγκριση με τα αυθεντικά πρότυπα. Αυτά τα συστατικά ήταν το κουμαρικό οξύ (0,92-16,35 mg/g πρόπολης), φερουλικό οξύ (0,51-6,42 mg/g πρόπολης), κερκετίνη (nd-2,84mg/g πρόπολης), κινναμωμικό οξύ (nd-8,26mg/g πρόπολης), πινομπασκίνη (nd-10,26 mg/g πρόπολης), καιμπερόλη (nd-1,15 mg/g πρόπολης), απιγενίνη (1,04-3,32 mg/g πρόπολης), πινοσεμπρίνη (nd-48,39 mg/g πρόπολης), 1,1-διμεθυλαλλυλοκαφεϊκό οξύ (nd-1,74 mg/g πρόπολης), χρυσίνη (nd-10,14 mg/g πρόπολης), γκαλαγκίνη (nd-9,07 mg/g πρόπολης), καιμπερίδη (nd-3,23 mg/g πρόπολης) και τεκτοχρυσίνη (nd-4,45 mg/g πρόπολης) (Isla et al., 2005). Τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από διάφορες περιοχές της Αργεντινής, βρέθηκε ότι περιέχουν φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή όπως το γαλλικό οξύ (nd-4,8 mg/g), χλωρογενικό οξύ (nd-4,19 mg/g), κερκετίνη (nd-87 mg/g), καιμπερόλη (0,02-20,3 mg/g) και πινοσεμπρίνη (0,2-102 mg/g) (Chaillou&Nazareno, 2009).

Έξι κύρια φλαβονοειδή βρέθηκαν σε μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από την περιοχή San Juan (Αργεντινή): οι φλαβανόνες 7-υδροξυ-8-μεθοξυφλαβανόνη (1,2-12,6mg/g), πινοσεμπρίνη (5,2-64mg/g), πινομπασκίνη (3-23,6mg/g), οι φλαβόνες χρυσίνη (12-56mg/g) και τεκτοχρυσίνη (3,4-14mg/g) και η φλαβονόλη γκαλαγκίνη (6-35,8mg/g) (Isla et al., 2005). Οι Kumazawa et al. (2004) οι οποίοι περιέγραψαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων της πρόπολης από διάφορες γεωγραφικές περιοχές, Ευρώπη, Ασία και Βόρεια Αμερική περιλαμβανομένης της Αργεντινής βρήκαν ότι η πρόπολη περιέχει σημαντικά ποσοστά χρυσίνης (68,5mg/g), οξικού εστέρα του κινναμωμικού οξέος (30,4mg/g), γκαλαγκίνης (32,5mg/g), πινομπασκίνης (22,5mg/g), οξικού εστέρα πινομπασκίνης (56,3mg/g), πινοσεμπρίνης (68,7mg/g) και τεκτοχρυσίνης (31,4mg/g) (Lima et al., 2009).

Η πινοσεμπρίνη, χρυσίνη, γκαλαγκίνη, εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE), καφεϊκό οξύ, 1,1-διμεθυλαλλυλεστέρας καφεϊκού οξέος (DMAC) και σε μικρότερο ποσοστό η κερκετίνη, απιγενίνη, ναριγκενίνη και καιμπερόλη αναγνωρίστηκαν ως τα κύρια πολυφαινολικά συστατικά των αιθανολικών εκχυλισμάτων από τη περιοχή της Βενετίας στην Ιταλία. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης οφείλεται

κυρίως στο καφεϊκό οξύ και στα παράγωγα του CAPE και DMAC. Η γκαλαγκίνη και σε μικρότερο ποσοστό η καιμπερόλη και η κερκετίνη χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, τα οποία βρέθηκαν σε χαμηλό ποσοστό. Από την άλλη η χρυσίνη και η πινοσεμπρίνη έδειξαν υψηλή συγκέντρωση αλλά μειωμένα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά. Η απιγενίνη και η ναριγκενίνη είχαν αμελητέα συνεισφορά, λόγω της χαμηλής τους συγκέντρωσης και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Gregoris&Stevanato, 2010).

Επίσης οι Kumazawa et al. (2004) ταυτοποίησαν τα πιο σημαντικά συστατικά με HPLC με PDA και MS ανιχνευτές. Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 33 συστατικά, από τα οποία τα 18 ήταν φλαβονοειδή, τα 4 αρωματικά καρβοξυλικά οξέα και 4 φαινολικά οξέα από την πρόπολη της Ουρουγουάης. Η επίδραση των συστατικών 1-17 στην αδρανοποίηση της DPPH ρίζας ήταν σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml όπου και σημαντικές διαφορές στην δράση τους παρατηρήθηκαν. Τα συστατικά καφεϊκό οξύ, κερκετίνη, καιμπερόλη, φαιναιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος, κινναμωμικός εστέρας του καφεϊκού οξέος και αντερπιλίνη έδειξαν ισχυρή αδρανοποιητική δράση πάνω από 60% (Kumazawa et al., 2004).

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρόπολης από διάφορες περιοχές της Κίνας βρέθηκε ότι περιέχουν σημαντικά ποσοστά από αντιοξειδωτικά συστατικά, με τη χρήση της HPLC-DAD, όπως το καφεϊκό οξύ (32,2 mg/g), π-κουμαρικό οξύ (52,2 mg/g), φερούλικό οξύ (5,3 mg/g) CAPE (8,7 mg/g) και γκαλαγκίνη (nd-8,3 mg/g) (Ahn et al., 2007). Αιθανολικά εκχυλίσματα από την Ελλάδα και τη Κύπρο βρέθηκε ότι περιέχουν περισσότερες από 100 ενώσεις όπου περισσότερες από 80 ταυτοποιήθηκαν με GC-MS. Ανάμεσα στα ταυτοποιημένα συστατικά βρέθηκαν διάφορες ενώσεις με γνωστή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση όπως τα φλαβονοειδή, τερπενοειδή, ανθρακινόνες, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους. Τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν κυμαίνονται από 0,75-9,34 mg/g αιθανολικού εκχυλίσματος: το κουμαρικό οξύ (0,07-2,18 mg/g), γαλλικό οξύ (nd-0,11mg/g), φερούλικό οξύ (0,1-1,81mg/g), καφεϊκό οξύ (0,14-6,7mg/g), χρυσίνη (0,24-145,7mg/g), ναριγκενίνη (0,07-0,94mg/g), καιμπερόλη (0,08-3,75mg/g), κερκετίνη (nd-0,36mg/g), απιγενίνη (nd-15,85mg/g), πινοσεμπρίνη (3,7-104,8mg/g) και πινομπασκίνη (0,32-33,74mg/g) (Kalogeropoulos et al., 2009).

Σύμφωνα με τα δεδομένα από τη LC-MS/MS, ως τα κύρια φαινολικά οξέα στα υδατικά εκχυλίσματα της πρόπολης από τη Τουρκία, βρέθηκαν το φερούλικό

οξύ (5261,8 mg/kg εκχυλίσματος), καφεϊκό οξύ (5033,8 mg/kg), ελλαγικό οξύ (4202,7 mg/kg), π-κουμαρικό οξύ (1908 mg/kg) και γαλλικό οξύ (419,1 mg/kg). Επίσης, η κερκετίνη (3851,4 mg/kg) είναι ένα από τα κύρια φλαβονοειδή συστατικά στη πρόπολη. Αυτό το συστατικό μπορεί να είναι υπεύθυνο για την αντιοξειδωτική ικανότητα στο υδατικό εκχύλισμα πρόπολης (Gulcin et al., 2010).

Πίνακας 3. Φαινολικά συστατικά πρόπολης που ταυτοποιήθηκαν με χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ-ΜΕΘΟΔΟΣ	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Αργεντινή, Αυστραλία, Βουλγαρία, Χίλη, Κίνα, Ουγγαρία, Ν.Ζηλανδία, Ουρουγουάη, Ην. Πολιτείες, Ουζμπεκιστάν	Αιθανόλη-HPLC με PDA και MS	Καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό, 3,4-διμεθοξυ-κινναμωμικό οξύ, κερκετίνη, 5-μεθυλαιθέρας πινομπασκίνης, απιγενίνη, καμπεφρόλη, πινομπασκίνη, χρυσίνη, πινοσεμπρίνη, γκαλαγκίνη, 3-οξικός εστέρας, πινομπασκίνης, CAPE, κινναμωμικός εστέρας του καφεϊκού οξέος, τεκτοχρυσίνη	Kumazawa et al., 2004
Βραζιλία	Αιθανόλη-HPLC με PDA και MS	Καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό, αρτεπιλλίνη C	Kumazawa et al., 2004
Νότια Αφρική	Αιθανόλη-HPLC με PDA και MS	Καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό, 3,4-διμεθοξυ-κινναμωμικό οξύ, 5-μεθυλαιθέρας πινομπασκίνης, καμπεφρόλη, πινομπασκίνη, χρυσίνη, πινοσεμπρίνη, γκαλαγκίνη, 3-οξικός εστέρας πινομπασκίνης, τεκτοχρυσίνη	Kumazawa et al., 2004
Ουκρανία	Αιθανόλη-HPLC με PDA και MS	Καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό, 3,4-διμεθοξυ-κινναμωμικό οξύ, 5-μεθυλαιθέρας πινομπασκίνης, απιγενίνη, καμπεφρόλη, πινομπασκίνη, χρυσίνη, πινοσεμπρίνη, γκαλαγκίνη, 3-οξικός εστέρας πινομπασκίνης, CAPE, κινναμωμικός εστέρας του καφεϊκού οξέος, τεκτοχρυσίνη	Kumazawa, et al., 2004
Λιθουανία, Πολωνία, Λετονία	Αιθανόλη-HPLC	Φερουλικό οξύ, κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κινναμωμικό οξύ, γαλλικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ	Gardana et al., 2007
Αργεντινή (San Juan)	Μεθανόλη-HPLC	7-υδροξυ-8-μεθοξυφλαβονόνη, πινοσεμπρίνη, πινομπασκίνη, χρυσίνη, τεκτοχρυσίνη, γκαλαγκίνη	Lima et al., 2009
Ιταλία (Βενετία)	Αιθανόλη-HPLC	Πινοσεμπρίνη, χρυσίνη, γκαλαγκίνη, CAPE, καφεϊκό οξύ, DMAC, κερκετίνη, ναριγκενίνη, καμπεφρόλη, απιγενίνη	Gregoris & Stevanato, 2010

Ελλάδα, Κύπρος	Αιθανόλη-GC-MS	Κουμαρικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χρυσίνη, ναριγκενίνη, πινομπασκίνη, απιγενίνη, κερκετίνη, καμπερόλη	Kalogeropoulos, et al., 2009
Τουρκία	Νερό-LC-MS/MS	Φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ελλαγικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, γαλλικό οξύ, κερκετίνη	Gulcin et al., 2010

2.5.3. Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση πρόπολης

Οι Kalogeropoulos et al. (2009) μελέτησαν την αντιμικροβιακή δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης από την Ελλάδα και τη Κύπρο σε 18 διαφορετικά βακτηριακά στελέχη παθογόνα και μη, καθώς επίσης και σε δύο παθογόνους μύκητες. Οι ερευνητές βρήκαν ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα αναστέλλουν όλα τα θετικά κατά Gram παθογόνα βακτήρια που εξετάστηκαν, και η ανασταλτική δράση τους στα 6 στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων ήταν πιθανά περιστασιακή. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα δεν είχαν ανασταλτική δράση στα βακτήρια *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* και *L. Plantarum*, αλλά είχαν ανασταλτική δράση στα *L. fermentum* και *L. helveticus* ενώ μόνο τα αιθανολικά εκχυλίσματα των Καλαβρύτων και της Λάρνακας (I) μπόρεσαν να αναστείλουν τα βακτήρια *L. bulgaricus* και *L. casei*. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι τα MIC όλων των αιθανολικών εκχυλισμάτων ήταν μικρότερα στα παθογόνα βακτήρια όπως *S.aureus*, *L. monocytogenes* και *B. cereus* σε σχέση με τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων εξετάστηκαν μόνο τα εκχυλίσματα των Καλαβρύτων και της Λάρνακας I, τα οποία ανέστειλαν 3 από τα 4 αρνητικά κατά Gram αρνητικά βακτήρια (Kalogeropoulos et al., 2009).

Επίσης οι Chaillou and Nazareno (2009) μελέτησαν τη δράση αιθανολικού εκχυλίσματος της πρόπολης από το Santiago del Estero της Αργεντινής στο *S. aureus* (ATCC25923). Το 77% περίπου των δειγμάτων παρουσίασε ανασταλτική ζώνη με διάμετρο μεγαλύτερη από 9mm που υποδηλώνει μια σημαντική αντιβακτηριδιακή ικανότητα. Η υψηλότερη αντιβακτηριδιακή δράση που βρέθηκε, ήταν στη πρόπολη από τις γεωγραφικές περιοχές Banda και Capital. Αυτά τα δείγματα είχαν υψηλά ποσοστά πινοσεμπρίνης το οποίο είναι ένα από τα πιο ενεργά φλαβονοειδή (Chaillou & Nazareno, 2009).

Οι Kartal et al. (2000), εξέτασαν την αντιμικροβιακή ικανότητα της πρόπολης από δύο διαφορετικά δείγματα της Τουρκίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα των δύο δειγμάτων πρόπολης έδειξαν αντιβακτηριδιακή δράση στα *S.aureus*, *S.epidermidis* και *B.subtilis*. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα από τη πρόπολη της περιοχής Kazan ήταν δραστικά στα *C.diphtheriae*, *B. catarrhalis* και *C.albicans*. ενώ δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων στα *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* και *E. faecalis*. Ανασταλτική ζώνη παρατηρήθηκε για το 70 και 96% των αιθανολικών εκχυλισμάτων της πρόπολης από τη περιοχή Kazan και για τη περιοχή Marmaris βρέθηκαν για το 30 και 50% των αιθανολικών εκχυλισμάτων. Συνεπώς, η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της πρόπολης από την περιοχή Kazan ήταν πολύ ισχυρότερη από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα πρόπολης της περιοχής Marmaris (Kartal et al., 2000).

Τέλος οι Mohammadzadeh et al. (2006) εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης από το Ιράν. Βρήκαν ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρόπολης τα οποία δοκιμάστηκαν σε θετικά κατά Gram (*S.aureus*, *S.epidermidis* και *B.subtilis*) και αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*E. Coli*, *P. aeruginosa*) και μυκητιακά στελέχη (*C.albicans*, *A. niger*) έδειξαν αναστολή στην ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών (MIC), έχοντας τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια με MIC 125 µg/mL (Mohammadzadeh et al., 2006).

Οι Agüero et al. (2010) εξέτασαν την αντιφλεγμονώδη δράση τριών δειγμάτων πρόπολης από την Αργεντινή. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των τριών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο microbroth dilution ακολουθώντας της οδηγίες των CLSI σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 250 µg/mL. Το πάνελ του μύκητα περιείχε ζύμες, *Aspergillus spp.*, και δερματόφυτα *T.mantagrophytes*, *T. rubrum* και *M. gypseum*. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι όλα τα δερματόφυτα και οι ζύμες είχαν ανασταλεί από τα διαφορετικά εκχυλίσματα με MIC μεταξύ 16-125µg/ml. Από την άλλη, τα είδη του γένους *Aspergillus* genus δεν ήταν ευαίσθητα στα εκχυλίσματα της πρόπολης. Τα εκχυλίσματα της πρόπολης δεν ήταν μόνο αντιμυκητιακά αλλά και μυκητοκτόνα, με χαμηλές τιμές MFC (Minimum Fungicidal Concentration-ελαχιστη συγκεντρωση μυκητοκτόνων) στα δερματόφυτα (16-31,2µg/ml). Και τα τρία εκχυλίσματα έδειξαν ισχυρή δράση στο δεύτερο πάνελ με MICs=16µg/ml σε 8 από τα 12 κλινικά στελέχη, 31,25 µg/ml σε επιπλέον 3 από τα 8, και μεταξύ 31,25 και 61,25 µg/ml στα υπόλοιπα στελέχη. Επίσης τα εκχυλίσματα της

πρόπολης ήταν μυκητοκτόνα ενάντια σε όλα τα στελέχη (MFC= 16-62,5 µg/ml), μία κατάσταση που εκτιμάται ιδιαίτερα στα αντιμυκητιακά φάρμακα για την αποφυγή της επανάληψης (Aguero et al., 2010).

2.5.4. Τοξικότητα πρόπολης

Οι Mohammadzadeh et al. (2006) εξέτασαν τη τοξικότητα της πρόπολης από το Ιράν, σε 20 αρσενικά ποντίκια Wistar (123±15g) τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες και 4.500, 9.000, 13000 και 20.000 mg εκχυλίσματος πρόπολης /kg σωματικού βάρους \varnothing χορηγήθηκαν από το στόμα. Τα πειραματόζωα δέχτηκαν υδατοαλκοολικό διάλυμα από το εκχύλισμα της πρόπολης και τα ζώα-μάρτυρες έλαβαν μόνο υδατοαλκοολικό διάλυμα έτσι ώστε να παρατηρηθεί η επίδραση της αιθανόλης στο διάλυμα πρόπολης. Δεν υπήρχε κάποιος θάνατος ούτε παρατηρήθηκε κάποια τοξική διαταραχή μέχρι τις 48 h, έτσι προτάθηκε ότι η πρόπολη είναι αβλαβής και η δόση των 2.000 mg/kg ως όριο μελέτης χρησιμοποιήθηκε υπό χρόνια δοκιμή (Mohammadzadeh et al., 2006).

Και οι Primon de Barros et al. (2008), εξέτασαν την τοξικότητα της πράσινης πρόπολης από τη Βραζιλία, σε 5 θηλυκά ποντίκια τα οποία δέχτηκαν τη θεραπεία από το στόμα δόσης των 2000 mg/kg καφεϊκού, φερουλικού, π-κουμαρικού ή κινναμωμικών οξέων, διαλύθηκαν σε υδατικό διάλυμα 1% Tween 80. Μετά τη χορήγηση τα ποντίκια παρακολούθηθηκαν αρχικά μία φορά μέσα στη μισή ώρα και έπειτα περιοδικά κατά τη διάρκεια των 24h, και τέλος μία φορά την ημέρα για τις επόμενες 14 ημέρες. Κανένα σημάδι τοξικότητας δεν παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση του καφεϊκού, φερουλικού, π-κουμαρικού και κινναμωμικών οξέων στη δόση των 2000mg/kg, σε όλη τη διάρκεια της εξέτασης (Primon de Barros et al., 2008).

2.6 Οξειδώσεις *in vivo* και η σημασία των φυσικών αντιοξειδωτικών στην προστασία της υγείας

Μια από τις πιο σοβαρές συνέπειες της συμμετοχής του οξυγόνου σε αντιδράσεις οξείδωσης είναι ο σχηματισμός ενεργών μορφών οξυγόνου που δρουν ως ισχυρά οξειδωτικά μέσα. Οι ενεργές μορφές του οξυγόνου μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια όπως οι υδροξυρίζες

(OH[·]) και οι υπεροξυρίζες (LOO[·]), υπάρχουν όμως και άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και το οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης (¹O₂).

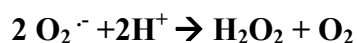
Απαντούν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και η παρουσία τους οφείλεται είτε σε εξωγενείς παράγοντες, είτε είναι αποτέλεσμα μεταβολικών διαδικασιών στις οποίες συμμετέχουν ένζυμα ή αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν ιόντα μεταβατικών μετάλλων, όπως τα ιόντα δισθενούς σιδήρου



Όταν οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν δεν είναι αδρανείς, τότε μπορούν να καταστρέψουν όλα τα είδη των κυτταρικών μακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λίπη και τα νουκλεϊνικά οξέα και να προκαλέσουν την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών.

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς για να ανενεργοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και τις άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου. Οι μηχανισμοί αυτοί συνδέονται και συμπληρώνονται μεταξύ τους γιατί ενεργούν σε διαφορετικούς οξειδωτικούς παράγοντες και σε διάφορα τμήματα του κυττάρου.

Ένας τέτοιος μηχανισμός βασίζεται σε ένα σύστημα ενζύμων το οποίο περιλαμβάνει τη δισμουτάση του υπεροξειδίου, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που καταλύουν αντίστοιχα τις παρακάτω αντιδράσεις :



Οι δισμουτάσες είναι μια οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων πολύ σημαντικών για την καταλυτική αποικοδόμηση της ρίζας σουπεροξειδίου προς

υπεροξειδίου του υδρογόνου και οξυγόνο. Η καταλάση καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου του οξυγόνου ενώ οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι μια οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων πολύ σημαντικών για την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων, κυρίως εκείνων που προέρχονται από την οξείδωση των ακόρεστων ακυλολιπιδίων.

Ένας δεύτερος μηχανισμός αμυντικής προστασίας από την δράση των ελεύθερων ριζών περιλαμβάνει χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, οι οποίες είναι προϊόντα κανονικού μεταβολισμού και δρουν ως αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, η ουβικινόλη και το ουρικό οξύ. Η ουβικινόλη είναι το μόνο μέχρι στιγμής γνωστό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που συντίθεται στα ζωικά κύτταρα. Θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τη οξείδωση.

Αλλα χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά είναι οι βιταμίνες C και E και τα καροτενοειδή που απαντούν στην καθημερινή τροφή, κυρίως στα φρούτα και λαχανικά, αλλά και σε σημαντικές ποσότητες στα υγρά του σώματος. Η βιταμίνη E περιλαμβάνει μια σειρά τοκοφερολών και τοκοτριενολών, μορίων με σημαντική βιολογική αξία. Είναι λιποδιαλυτή και ως ισχυρό αντιοξειδωτικό όλων των κυτταρικών μεμβρανών προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από την οξείδωση. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι υδατοδιαλυτή και θεωρείται ως το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό των εξωκυτταρικών υγρών, ενώ εμφανίζει και ενδοκυτταρική δραστηριότητα. Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα φυσικών χρωστικών που απαντούν κυρίως στα φυτικά τρόφιμα, αλλά και στους ζωικούς ιστούς. Μερικά από αυτά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης A.

Στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης περιέχονται και διάφορες φαινολικές ενώσεις, κυρίως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, οι οποίες αν και δεν έχουν διατροφική αξία, εντούτοις θεωρούνται σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Πρόσφατες έρευνες έχουν συνδέσει τη παρουσία των ενώσεων αυτών στα τρόφιμα με την προστασία του οργανισμού από καρκινογενέσεις ή καρδιακές παθήσεις.

Έτσι παραδείγματος χάρη, η θετική δράση της κερκετίνης μια πολύ γνωστής φλαβονόλης in vivo αποδίδεται στο ότι παρεμποδίζει:

- Την ενεργοποίηση παραγόντων που προκαλούν καρκίνο του δέρματος, των αδένων και του παχέος εντέρου στα ζώα
- Τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος
- Τη δράση της πρωτεΐνης κινάσης C

Αποτελέσματα από επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι περιορίστηκαν σημαντικά τα συμπτώματα των καρδιακών παθήσεων σε περιπτώσεις όπου αυξήθηκε σε καθημερινή βάση η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών αλλά και προϊόντων που θεωρούνται σημαντικές πηγές κερκετίνης και άλλων φαινολικών ενώσεων όπως το τσάι και το κόκκινο κρασί (Λάγουρη, 1998).

3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σε πολύπλοκα συστήματα όπως είναι τα τρόφιμα πολλοί και διαφορετικοί μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα στην πορεία των αντιδράσεων οξειδωσης και τα αντίστοιχα προϊόντα τους επιδρούν σε βασικά δομικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, και νουκλεϊνικά οξέα και μπορούν να καταστρέψουν κυτταρικά μακρομόρια προκαλώντας ακόμα και την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών. Για εφαρμογές στα τρόφιμα και γενικότερα στη διατροφή είναι χρήσιμο να αξιοποιηθούν νέες φυσικές πηγές πλούσιες σε βιολογικώς δραστικά συστατικά.

Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε σημαντικό να μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση της ελληνικής πρόπολης από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Δυτική Μακεδονία και Ρόδος), ώστε να βρεθεί σε ποια είδη και επιμέρους κλάσματα εντοπίζεται περισσότερο η αντιοξειδωτική δράση μέσω της αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών καθώς και αναγωγής ιόντων μετάλλων (Fe^{3+}) που προκαλούν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδωσης. Δεδομένου ότι τα κυριότερα συστατικά με αντιοξειδωτική δράση που απαντούν στα εκχυλίσματα της πρόπολης είναι φαινολικής δομής, θεωρήθηκε επίσης σημαντικό να γίνει μια πρώτη εκτίμηση των συγκεντρώσεων ολικών φαινολών και ολικών φλαβονοειδών καθώς και προσδιορισμός επιμέρους φαινολικών συστατικών (φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών) στα εκχυλίσματα.

Η πρόπολη μετά την εκχύλισή της με εξάνιο για την απομάκρυνση των λιπόφιλων συστατικών και κηρών, εκχυλίστηκε με πολικούς διαλύτες (μεθανόλη, 80% μεθανόλη και νερό) και μελετήθηκε α) η αντιοξειδωτική δράση (DPPH radical scavenging activity/αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας) με την χρήση της σταθερής ρίζας DPPH και β) η αντιοξειδωτική δράση (Ferric reducing antioxidant power/Αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής τρισθενούς σιδήρου) με τη χρήση του συμπλόκου TPTZ- Fe^{3+} . Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες συνθετικές και φυσικές αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Στη συνέχεια έγινε στα εκχυλίσματα της πρόπολης α) μια πρώτη ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών και ολικών φλαβονοειδών με τη χρησιμοποίηση χρωματομετρικών μεθόδων και β) ταυτοποίηση και ποσοτικός

προσδιορισμός μεμονωμένων φαινολικών οξέων και флаβονοειδών με την εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τέλος έγινε προσπάθεια συσχέτισης της αντιοξειδωτικής δράσης της πρόπολης α) με τον διαλύτη β) την γεωγραφική προέλευση και γ) τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Υλικά – Συσκευές

4.1.1. Δείγματα πρόπολης

Στα πλαίσια της πτυχιακής αυτής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρόπολης που παρελήφθησαν από τη Δυτική Μακεδονία και τη Ρόδο.

Πίνακας 4. Προέλευση δειγμάτων πρόπολης

Δείγμα	Κοινή ονομασία	Προέλευση
Resina Propoli	Πρόπολη	Δυτική Μακεδονία, Κοζάνη
Resina Propoli	Πρόπολη	Δωδεκάνησα, Ρόδος

4.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

Αιθανόλη 99,5% (C₂H₅OH) (Carlo Erba)

Ανθρακικό Νάτριο (Na₂CO₃) (άνυδρο) (Mallinckrodt, New York)

Απιγενίνη 95% (HPLC) (Neochema)

Ασκορβικό οξύ-L(+) 99,7% (Merck, Darmstadt, Germany)

BHT ≥99,0% (2,6-Di-Tert-butyl-4-methylphenol) (Fluka, Germany)

κ-Εξάνιο 97% (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany)

Γαλλικό Οξύ (C₇H₆O₅) (Fluka, Germany)

Γκαλαγκίνη 99,6% (HPLC) (Neochema)

Καφεϊκό Οξύ (C₉H₈O₄) (Sigma, Germany)

Κερκετίνη 96%(HPLC) (Neochema)

Λουτεολίνη 99,5% (HPLC) (Neochema)

Μεθανόλη 99,8% (HPLC) (Baker, Holland)

Νερό (HPLC) (Merck, Germany)

Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂) (άνυδρο) (HACH Company, USA)

Οξικό Νάτριο 99% (CH₃COONa) (Merck, Germany)

Οξικό Οξύ (CH₃COOH) 100% (Merck, Darmstadt - Germany)

Πρωτοκατεχικό Οξύ ($C_7H_6O_3$) (Alfa Aesar, Germany)
Τριχλωριούχος Άργιλος ($AlCl_3$) (άνυδρο) (Sigma Aldrich, Germany)
Τριχλωριούχος Σίδηρος ($FeCl_3$) (Sigma Aldrich, Germany)
Φαινυλ-αιθυλ-εστέρας καφεϊκού οξέος $\geq 97\%$ (CAPE) (Sigma, Switzerland)
Φερουλικό Οξύ ($C_{10}H_{10}O_4$) (Fluka, Germany)
Folin – Ciocalteu (Merck, Darmstadt - Germany)
DPPH (2,2diphenyl-picrylhydrazyl) 85% (Sigma Aldrich Germany)
TPTZ (2,4,6 – Tri (2-pyridyl) -1,3,5-triazine) 98% (Alfa Aesar, Germany)

4.1.3. Όργανα – Συσκευές

- Λυοφυλιωτής, Christ – Lmc – 2, Gamma 1 – 20, Germany
- Συμπυκνωτής, Rotavapor – R – Buchi, Greece
- Υγρός χρωματογράφος με απαιρωτή Finnigan Spectra System SCM 1000 και αντλία Spectra System P2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), ανιχνευτή UV-Vis Fasma 525 (Rigas Labs, Greece). Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης ChromQuest (ChromQuest Scientific Software, Version 4.1, Thermo Electron Co., San Jose, California).
- Φασματοφωτόμετρο Thermo-scientific Helios γ (UV-Vis) με κυψελίδες lighpath optical LTD (United Kingdom) (1-G-10 mm).
- Κυκλικά διηθητικά φίλτρα φ 110 mm (Black Ribbon, Germany)

4.2. Μέθοδοι

4.2.1. Παραλαβή των εκχυλισμάτων από την πρόπολη

Για την παραλαβή των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

Για τα μεθανολικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν: 100% μεθανόλη και μεθανόλη/νερό σε αναλογία 80/20%:

- Κατάτμηση του δείγματος της πρόπολης

- Συνεχής ανάδευση της πρόπολης διαδοχικά με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: i) εξάνιο, και ii) μεθανόλη ή ii) μίγμα μεθανόλης-νερού για 24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 10g πρόπολης σε 100 mL διαλύτη.
- Παραλαβή του διηθήματος με διήθηση υπό κενό.
- Συμπύκνωση του εκχυλίσματος και απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστρεφόμενο εξατμιστή κενού στους 60°C.
- Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -4 °C.

Για τα υδατικά εκχυλίσματα:

- Κατάτμηση του δείγματος της πρόπολης
- Συνεχής ανάδευση πρώτα με εξάνιο για 24 ώρες και στη συνέχεια με νερό για 48 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 10 g σε 100 mL διαλύτη.
- Μερική συμπύκνωση του εκχυλίσματος και απομάκρυνση μέρους του νερού σε περιστρεφόμενο εξατμιστή κενού στους 90 °C.
- Λυοφιλίωση στους -24 °C.
- Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -4 °C.

4.2.2. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων πρόπολης

4.2.2.1. Μέθοδος DPPH

Παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH $6 \cdot 10^{-5}$ M. Σε 3 mL του διαλύματος προστέθηκαν 0,1 mL από τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από το εκάστοτε σύστημα διαλυτών :

- i. 100% μεθανόλη, από τη Δυτ. Μακεδονία (0,05-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,6-2,8 g/L)
- ii. 80%-20% μεθανόλη-νερό, από τη Δυτ. Μακεδονία (0,08 – 0,1 g/L) και τη Ρόδο (0,6-2,8 g/L)
- iii. Νερό, από τη Δυτ. Μακεδονία. (0,1-0,8 g/L) και τη Ρόδο (0,5-5 g/L)

καθώς και 0,1 mL από τις εξής πρότυπες ουσίες σε μεθανόλη:

- i. Γαλλικό οξύ (0,008-0,08 g/L)
- ii. Πρωτοκατεχικό οξύ (0,008-0,5 g/L)
- iii. Καφεϊκό οξύ (0,008-0,2 g/L)
- iv. Φερουλικό οξύ (0,04-0,9 g/L)
- v. BHT (0,06-2 g/L)
- vi. Κερκετίνη (0,015-0,1 g/L)
- vii. Απιγενίνη (500 ppm)
- viii. Λουτεολίνη (500 ppm)
- ix. Γκαλαγκίνη (500 ppm)

Μετά από 45 min μετρήθηκε η απορρόφηση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 517 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως % ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας, με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\% \text{ Αντιοξειδωτική δράση} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Όπου A_0 : Απορρόφηση του λευκού προσδιορισμού

A_1 : Απορρόφηση του δείγματος

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν οι μέσοι όροι των τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις. Επίσης μέσω της λογαριθμικής εξίσωσης που προέκυψε από τη γραφική απεικόνιση % αντιοξειδωτική δράση -συγκέντρωση υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} , για τα εκχυλίσματα πρόπολης, τα πρότυπα φαινολικά οξέα και το BHT, η

οποία μας δίνει τη συγκέντρωση (g/L) που απαιτείται για την επίτευξη του 50% αντιοξειδωτικής δράσης. Επίσης, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εξής πρότυπων φλαβονοειδών στα 500 ppm:

- Απιγενίνη (1,85 mM)
- Γκαλαγκίνη (1,85 mM)
- Λουτεολίνη (1,75 mM)

4.2.2.2 Μέθοδος FRAP

Παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα TPTZ 10 mmol/L και FeCl₃ 20 mmol/L, καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COONa 300 mmol/L, το οποίο ρυθμίστηκε σε pH 3,6 με CH₃COOH.

Σε 2,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκαν 0,25 mL διαλύματος TPTZ, 0,25 mL διαλύματος FeCl₃ και στη συνέχεια 0,2 mL από τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από το εκάστοτε σύστημα διαλυτών:

- 100% μεθανόλη, από τη Δυτ. Μακεδονία (0,004-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,06-0,9 g/L)
- 80% μεθανόλη-20% νερό, από τη Δυτ. Μακεδονία (0,002-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,1-0,9 g/L)
- Νερό, από τη Δυτ. Μακεδονία (0,02-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,06-0,9 g/L)

Καθώς και 0,2 mL από τις εξής πρότυπες ουσίες σε μεθανόλη:

- Γαλλικό οξύ (0,0008-0,08 g/L)
- Πρωτοκατεχικό οξύ (0,009-0,5 g/L)
- Καφεϊκό οξύ (0,006-0,08 g/L)
- Φερουλικό οξύ (0,01-0,5 g/L)
- Ασκορβικό οξύ (0,001-0,1 g/L)
- Κερκετίνη (0,0006-0,1 g/L)
- Λουτεολίνη (500 ppm)

- xii. Γκαλαγκίνη (500 ppm)
- xiii. Απιγενίνη (500 ppm)

Μετά από 30 min παραμονής σε υδατόλουτρο στους 37°C μετρήθηκε η απορρόφηση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 593 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως % αναγωγική δράση με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης

$$\% \text{ Αναγωγική δράση} = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100$$

Όπου A₀: Απορρόφηση λευκού προσδιορισμού

A₁: Απορρόφηση του δείγματος

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις. Επίσης μέσω της λογαριθμικής εξίσωσης που προέκυψε από τη γραφική απεικόνιση % αναγωγική δράση (συγκέντρωση) υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ για τα εκχυλίσματα πρόπολης, τα πρότυπα φαινολικά οξέα και το ασκορβικό οξύ, η οποία μας δίνει τη συγκέντρωση (g/L) που απαιτείται για την επίτευξη του 50% αναγωγικής δράσης. Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου των εξής πρότυπων φλαβονοειδών:

- Απιγενίνη (1,85 mM)
- Γκαλαγκίνη (1,75 mM)
- Λουτεολίνη (1,85 mM)

4.2.3. Χρωματομετρικές μέθοδοι

4.2.3.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL προστέθηκαν 1 mg εκχυλίσματος διαλυμένο σε 5 mL μεθανόλη, στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mL αποσταγμένου νερού και 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Μετά από 3 min προστέθηκαν 5 mL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (35%) και αποσταγμένου νερού μέχρι την πλήρωση της ογκομετρικής φιάλης.

Μετά από μία ώρα μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος στα 760 nm (Tere et al., 2005). Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε ως προς γαλλικό οξύ (10-400 ppm/ $R^2=0,9948$) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/ kg ξηρής ουσίας. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις.

4.2.3.2. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή

Παρασκευάστηκαν:

- i. Εκχυλίσματα πρόπολης στις εξής συγκεντρώσεις
 - a. Μεθανολικό Δυτ. Μακεδονίας 1 g/L
 - b. Μεθανολικό/υδατικό Δυτ. Μακεδονίας 1 g/L
 - c. Υδατικό Δυτ. Μακεδονίας 2,5 g/L
 - d. Μεθανολικό Ρόδου 5 g/L
 - e. Μεθανολικό/υδατικό Ρόδου 5 g/L
 - f. Υδατικό Ρόδου 5 g/L
- ii. Διάλυμα NaNO_2 (5% β/ο) σε αιθανόλη
- iii. Διάλυμα AlCl_3 (10% β/ο) σε αιθανόλη

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 2 mL εκχυλίσματος, 0,3 mL NaNO_2 κι έπειτα από 5 min προστέθηκαν 3 mL AlCl_3 και η φιάλη συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

Η απορρόφηση του διαλύματος μετρήθηκε αμέσως στα 440 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης (0,025-0,25 mg/mL μεθανόλης, $R^2=0,9713$) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα, εκφρασμένη σε mg κερκετίνης/kg ξηρής ουσίας. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις.

4.2.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

4.2.4.1. Υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών οξέων

Για το χρωματογραφικό προσδιορισμό φαινολικών οξέων στα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα πρόπολης χρησιμοποιήθηκε στήλη Kromasil 100 C₁₈ (250x4,6 mm, 5 μm) (MZ, Analytical, Germany). Ο διαχωρισμός έγινε με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με μίγμα διαλυτών ακετονιτρίλιο/νερό-οξικό οξύ (3,5%) (23/77 v/v), ροή διαλυτη έκλουσης 1 mL/min και ενέσιμη ποσότητα 10 μL. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους στα 280 nm και ο μέγιστος χρόνος ανάλυσης ήταν τα 15 min.

Για την ανάλυση των δειγμάτων συγκέντρωσης 2,5 g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα από τη Δυτ. Μακεδονία και 5 g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα από τη Ρόδο, χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες αναφοράς με πρότυπα διαλύματα φαινολικών οξέων που ανήκουν στα υδρξυ-παράγωγα κινναμωμικών οξέων (π-κουμαρικό, καφεϊκό και φερουλικό οξύ).

- i. Για το καφεϊκό οξύ α) 10-100 ppm ($R^2=0,9995$) και β) 100-500 ppm ($R^2=0,9981$).
- ii. Φερουλικό οξύ (10-100 ppm, $R^2=0,9975$)
- iii. π-Κουμαρικό οξύ (20-100ppm, $R^2=0,9998$)

Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

4.2.4.2. Υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός φλαβονοειδών

Για το χρωματογραφικό προσδιορισμό φλαβονοειδών στα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα πρόπολης χρησιμοποιήθηκε στήλη Kromasil 100

C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5μm) (MZ, Analytical, Germany). Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού έγιναν πολλές δοκιμές όσον αφορά την αναλογία των διαλυτών και το χρόνο ανάλυσης (μεθανόλη/νερό-φωσφορικό οξύ 15/85 (v/v) και συνολικός χρόνος τα 15 min, η αναλογία 25-75 (v/v) και χρόνος τα 16 min, 30/70 (v/v) και τέλος η αναλογία 40/60 (v/v) και συνολικός χρόνος τα 45 min. Ο διαχωρισμός έγινε τελικά με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με μίγμα διαλυτών μεθανόλη/νερό φωσφορικό οξύ (0,4%) σε αναλογία 40/60 (v/v). Η ροή του διαλύτη έκλουσης επιλέχθηκε να είναι 0,8 mL/min και η ενέσιμη ποσότητα 10 μL.

Για την ανάλυση των δειγμάτων συγκέντρωσης 2,5 g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας και 5 g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα της Ρόδου χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ένωσης κερκετίνης (2,5-100 ppm, R²= 0,9907).

Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

5.1. Μέθοδοι Στατιστικής Ανάλυσης

5.1.1. Μέθοδος DPPH

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM), όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης [100% μεθανόλη (ΜΕΟΗ), 80-20/μεθανόλη-νερό (80ΜΕΟΗ), 100% νερό (H₂O)] και ii) της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία και Ρόδος), στη μεταβλητή, (αντιοξειδωτική δράση). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 15.

5.1.2. Μέθοδος FRAP

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM), όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης [100% μεθανόλη (ΜΕΟΗ), 80-20/μεθανόλη-νερό (80ΜΕΟΗ), 100% νερό (H₂O)] και ii) της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία και Ρόδος), στη μεταβλητή, (αναγωγική δράση). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 15.

5.1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών

Για τη στατιστική ανάλυση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινολικές ουσίες εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM), όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης [100% μεθανόλη (ΜΕΟΗ), 80-20/μεθανόλη-νερό (80ΜΕΟΗ), 100% νερό (H₂O)] και ii) της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία και Ρόδος), στη μεταβλητή (συγκέντρωση φαινολικών ουσιών). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 15.

5.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών

Για τη στατιστική ανάλυση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικά φλαβονοειδή εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM), όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης [100% μεθανόλη (ΜΕΟΗ), 80-20/μεθανόλη-νερό (80ΜΕΟΗ), 100% νερό (H₂O)] και ii) της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία και Ρόδος), στη μεταβλητή (συγκέντρωση φλαβονοειδών). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 15.

5.1.5. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών οξέων με HPLC

Για τη στατιστική ανάλυση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε φαινολικά οξέα εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM), όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης [100% μεθανόλη (ΜΕΟΗ), 80-20/μεθανόλη-νερό (80ΜΕΟΗ)] και ii) της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία και Ρόδος), στη μεταβλητή (περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα). Το στατιστικό

πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 15.

5.1.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών με HPLC

Για τη στατιστική ανάλυση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM), όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης [100% μεθανόλη (ΜΕΟΗ), 80-20/μεθανόλη-νερό (80ΜΕΟΗ)] και ii) της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία και Ρόδος), στη μεταβλητή (περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 15.

5.2. Απόδοση εκχυλισμάτων πρόπολης

Για τα μεθανολικά εκχυλίσματα:

Τα δείγματα πρόπολης εκχυλίστηκαν διαδοχικά με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας i) εξάνιο, ii) 100% μεθανόλη και iii) 80%μεθανόλη-20% νερό σε συσκευή ανάδευσης για 24 ώρες. Το εξάνιο χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των λιπόφιλων συστατικών και κηρών. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση και το λαμβανόμενο διήθημα οδηγήθηκε προς συμπύκνωση σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή.

Για τα υδατικά εκχυλίσματα:

Τα δείγματα πρόπολης εκχυλίστηκαν διαδοχικά με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας i) εξάνιο και ii) 100% νερό σε συσκευή ανάδευσης για 48 ώρες. Το εξάνιο χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των λιπόφιλων συστατικών και κηρών. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση και το λαμβανόμενο διήθημα οδηγήθηκε

προς μερική συμπύκνωση σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή για την απομάκρυνση μέρους του νερού και στη συνέχεια ακολούθησε λυοφιλίωση στους -24°C .

Στον πίνακα 5. φαίνεται η % απόδοση του δείγματος στον εκάστοτε διαλύτη

Πίνακας 5. Απόδοση εκχυλισμάτων πρόπολης

Πρόπολη	Μεθανόλη	Μεθανόλη/νερό (80/20)	Νερό
Δυτική Μακεδονία	24,30	43,26	14,83
Ρόδος	54,10	33,15	3,80

5.2.1 Αντιοξειδωτική δράση-Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινόλων και ολικών φλαβονοειδών-HPLC προσδιορισμός φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (μεθανόλης, μεθανόλης/νερού, νερού) της πρόπολης μελετήθηκε με τη μέθοδο i) της αδρανοποίησης της σταθερής ρίζας DPPH στα 517 nm, ii) της αναγωγής του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου-TPTZ στα 593 nm. Συνθετικά και φυσικά αντιοξειδωτικά όπως το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, η κερκετίνη, το ασκορβικό οξύ και το συνθετικό BHT χρησιμοποιήθηκαν για λόγους σύγκρισης και έκφρασης των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων (μεθανόλης, μεθανόλης/νερού, νερού) σε ολικές φαινόλες με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και ολικά φλαβονοειδή με τη μέθοδο του AlCl_3 . Τέλος έγινε στα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά (80/20) εκχυλίσματα της πρόπολης ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών με RP-HPLC.

5.3. Αποτελέσματα μεθόδων

5.3.1. Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος βασίζεται στη βαθμιαία εξαφάνιση της ιώδους απόχρωσης της σταθερής DPPH ρίζας στα 517 nm λόγω της δέσμευσής της από αντιοξειδωτικές ουσίες με ισχυρή ικανότητα αδρανοποίησης ελευθέρων ριζών.

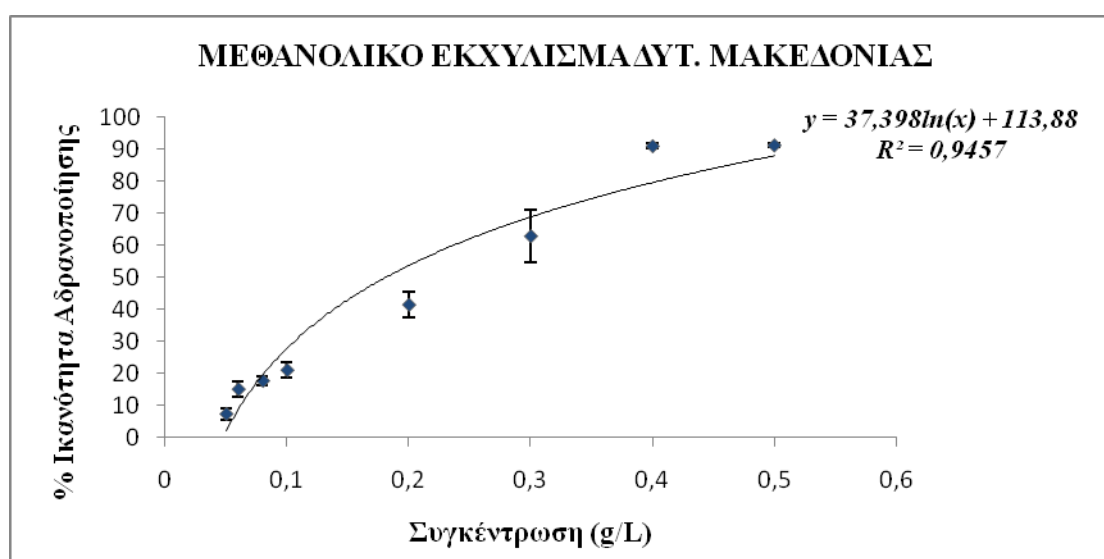
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 16-27) (αποτελέσματα στο Παράρτημα Β-Πιν. 1-12) παρουσιάζεται η % ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από τα i) μεθανολικά εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας (0,05-0,5 g/L) και της Ρόδου (0,6-2,8 g/L), ii) μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας (0,08-0,8 g/L) και της Ρόδου (1-5 g/L), iii) υδατικά εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας (0,1-0,8 g/L) και της Ρόδου (0,5-5 g/L) καθώς και από τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις i) γαλλικό οξύ (0,008-0,08 g/L), ii) καφεϊκό οξύ (0,008-0,2 g/L), iii) φερουλικό οξύ (0,04-0,9 g/L), iv) πρωτοκατεχικό οξύ (0,008-0,5 g/L) v) κερκετίνη (0,015-0,1g/L) και vi) BHT (0,06-2 g/L). Όσον αφορά το π-κουμαρικό οξύ ελέγχθηκε στη συγκέντρωση των 500 ppm και βρέθηκε αμελητέα αντιοξειδωτική δράση (4,44%)

Μέσω της λογαριθμικής εξίσωσης που προέκυψε από την γραφική απεικόνιση % αντιοξειδωτική δράση - συγκέντρωση υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ για κάθε δείγμα η οποία μας δίνει την συγκέντρωση (g/L) που απαιτείται για την επίτευξη του 50% αντιοξειδωτικής δράσης.

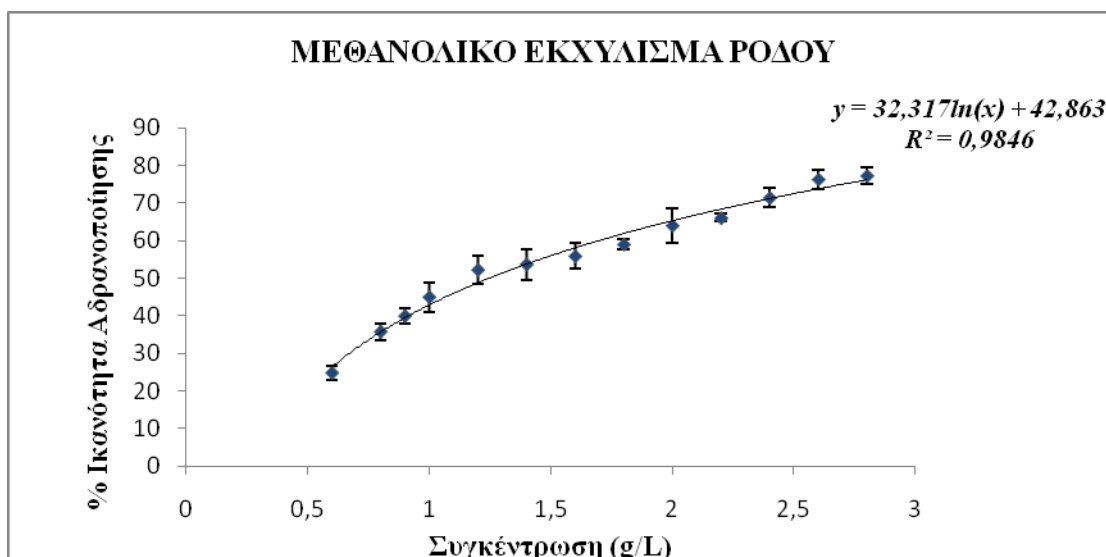
Τέλος, στο Σχήμα 28 (αποτελέσματα Παράρτημα Β, Πιν. 13) παρουσιάζεται η % ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από τα πρότυπα φλαβονοειδή i) απιγενίνη, ii) λουτεολίνη και iii) γκαλαγκίνη, στη συγκέντρωση των 500 ppm.

Πίνακας 6. Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας και Ρόδου και των πρότυπων ουσιών γαλλικού οξέος, φερουλικού οξέος, καφεϊκού οξέος, πρωτοκατεχικού οξέος και ΒΗΤ.

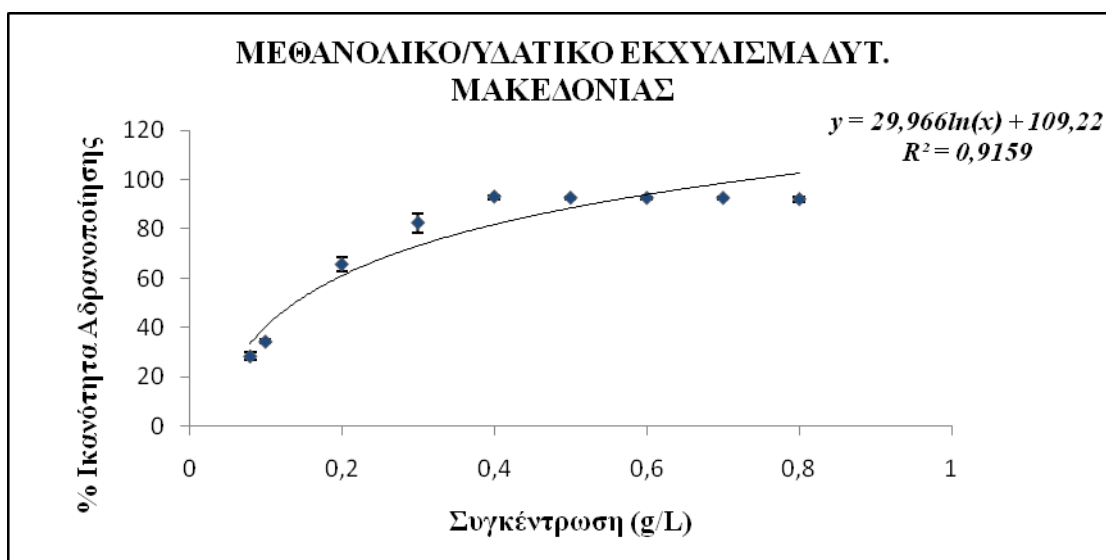
Δείγμα	IC ₅₀
Γαλλικό οξύ	0,016 ± 0,0006
Καφεϊκό οξύ	0,032 ± 0,00047
Φερουλικό οξύ	0,098 ± 0,0034
Πρωτοκατεχικό οξύ	0,028 ± 0,004
ΒΗΤ	0,207 ± 0,0045
Κερκετίνη	0,039 ± 0,0002
Μεθανολικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας	0,181 ± 0,009
Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας	0,138 ± 0,0043
Υδατικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας	0,218 ± 0,0058
Μεθανολικό εκχύλισμα Ρόδου	1,247 ± 0,0456
Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα Ρόδου	1,527 ± 0,03
Υδατικό εκχύλισμα Ρόδου	1,557 ± 0,099



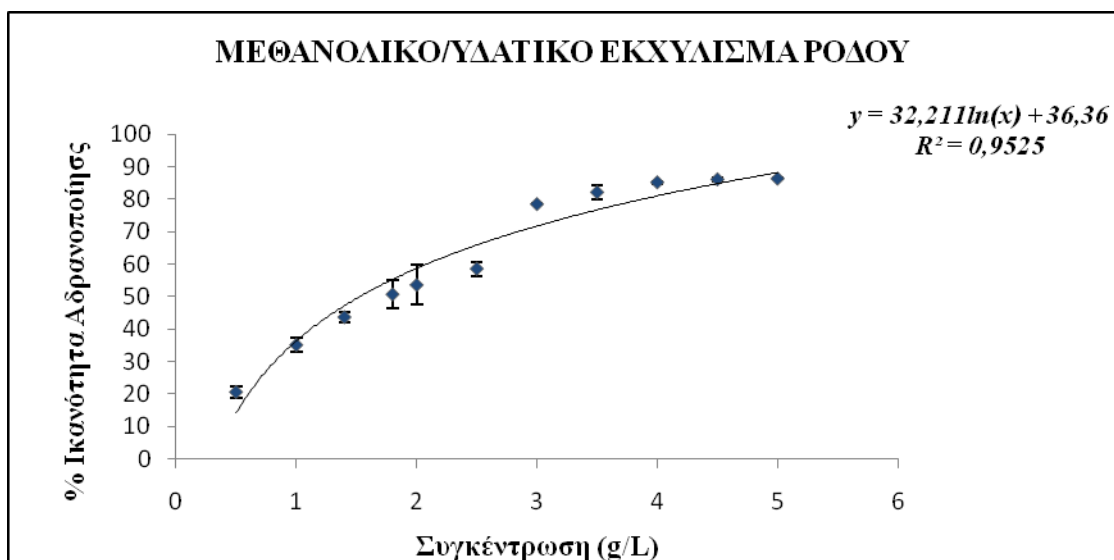
Σχήμα 16. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.



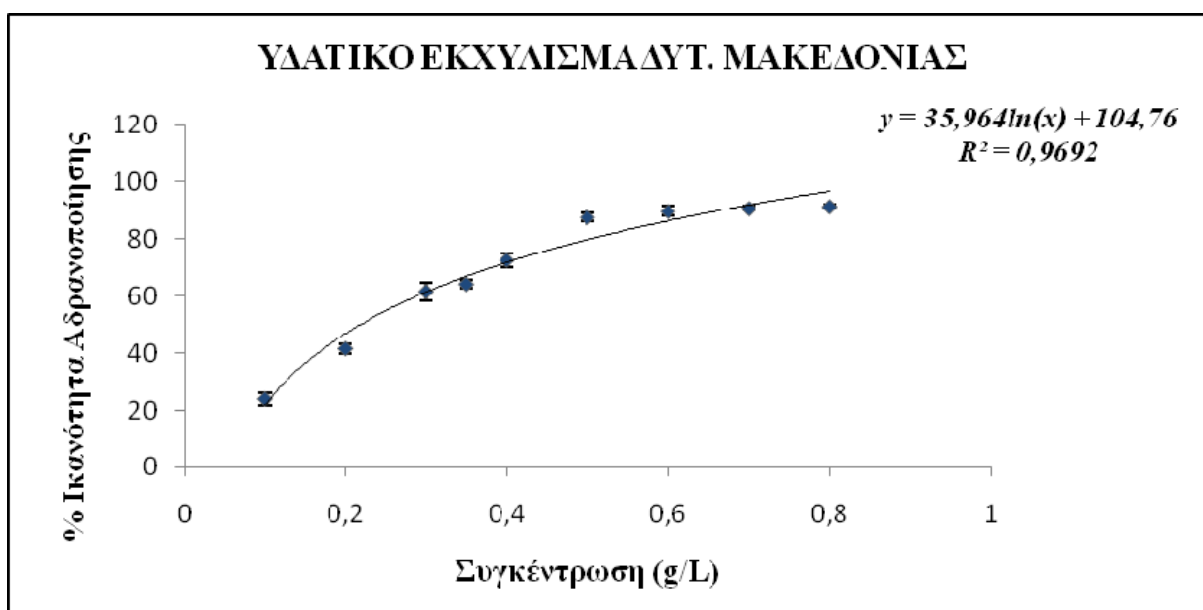
Σχήμα 17. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ρόδου



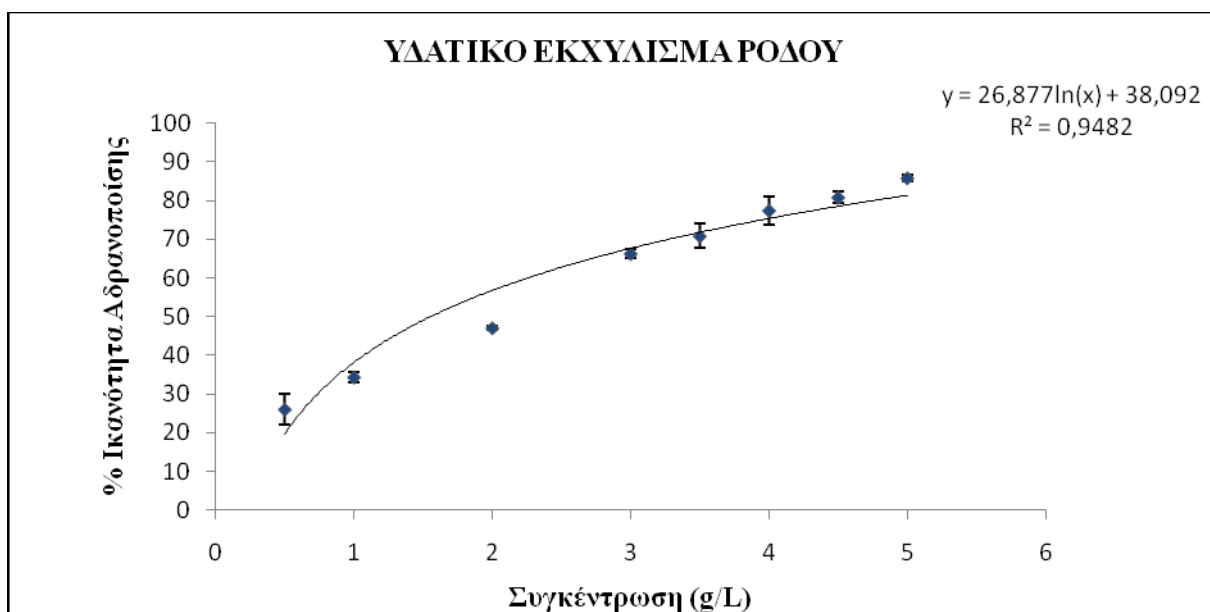
Σχήμα 18. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.



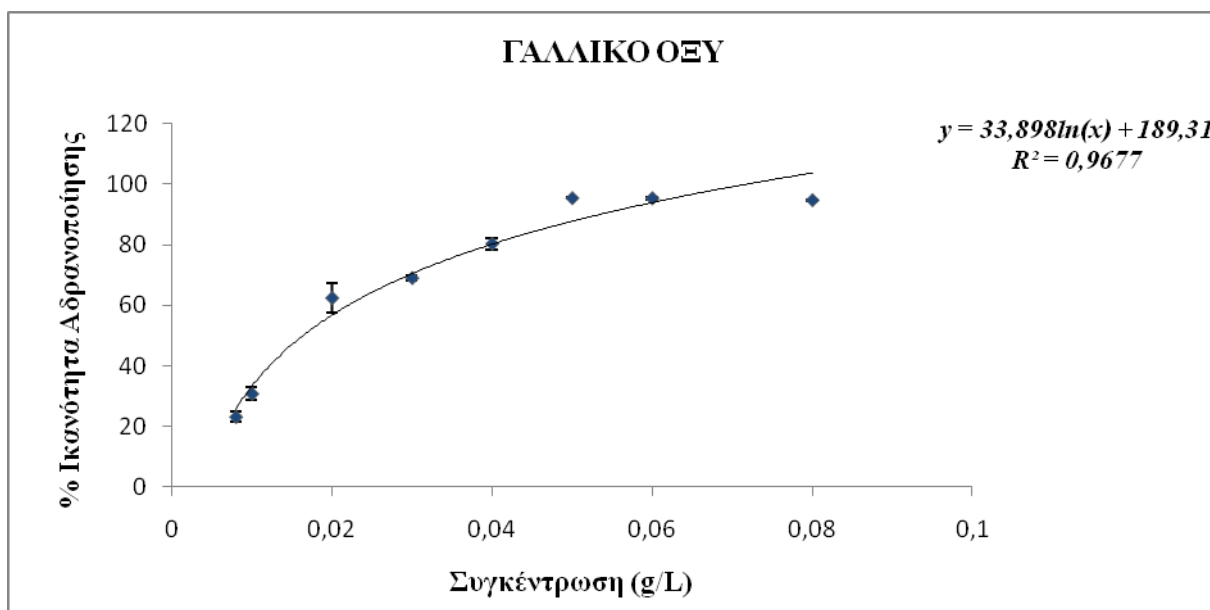
Σχήμα 19. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου



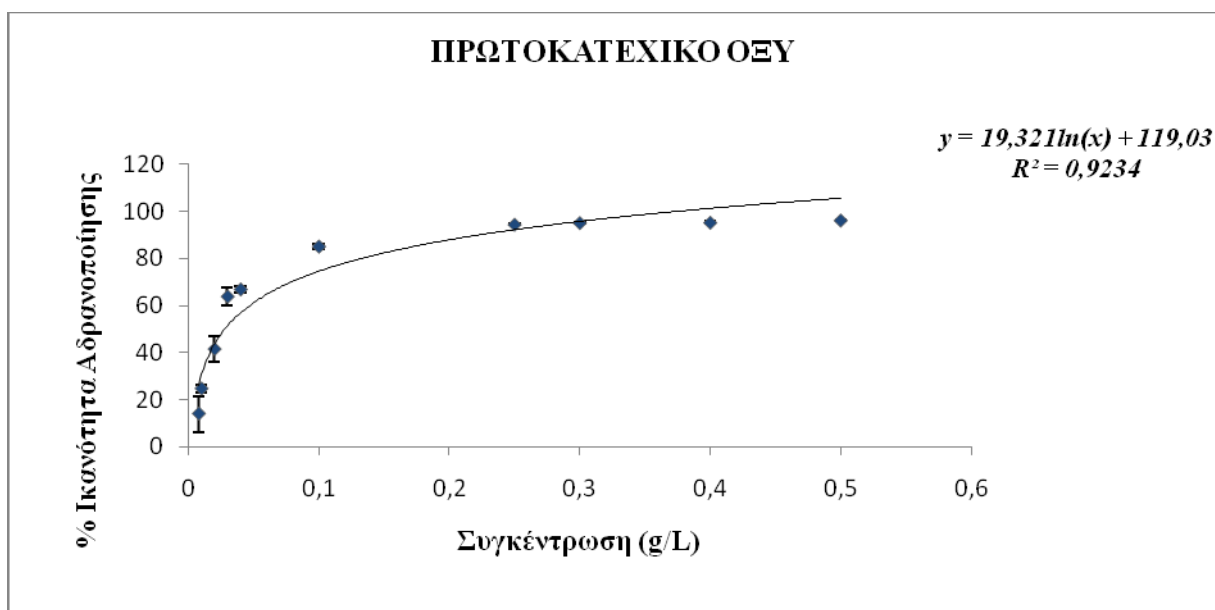
Σχήμα 20. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.



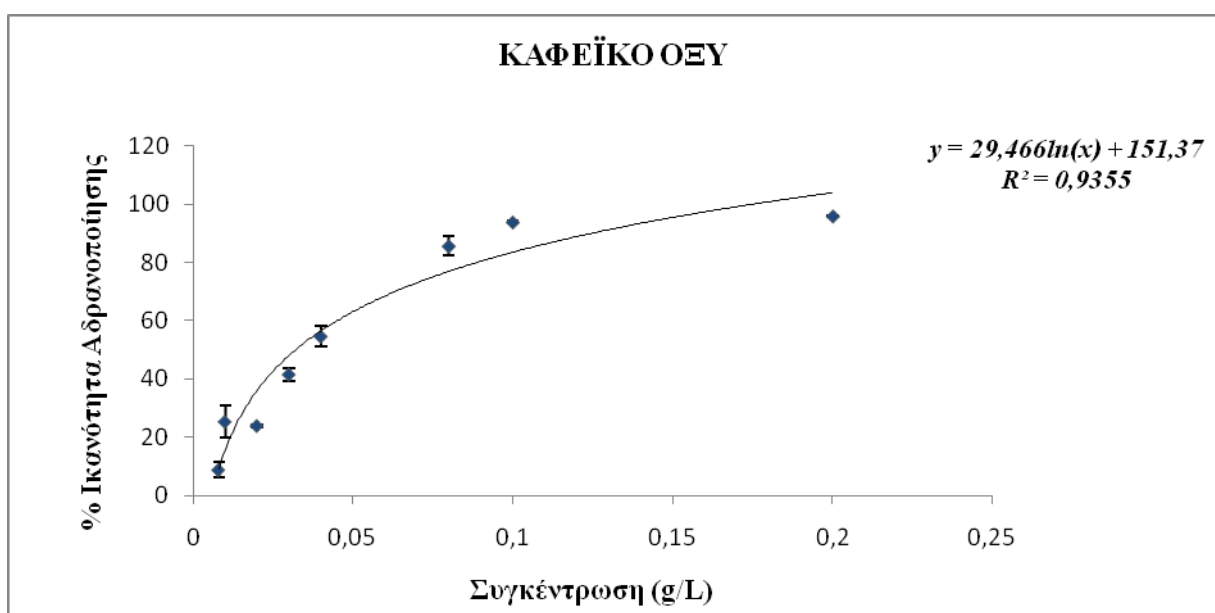
Σχήμα 21. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.



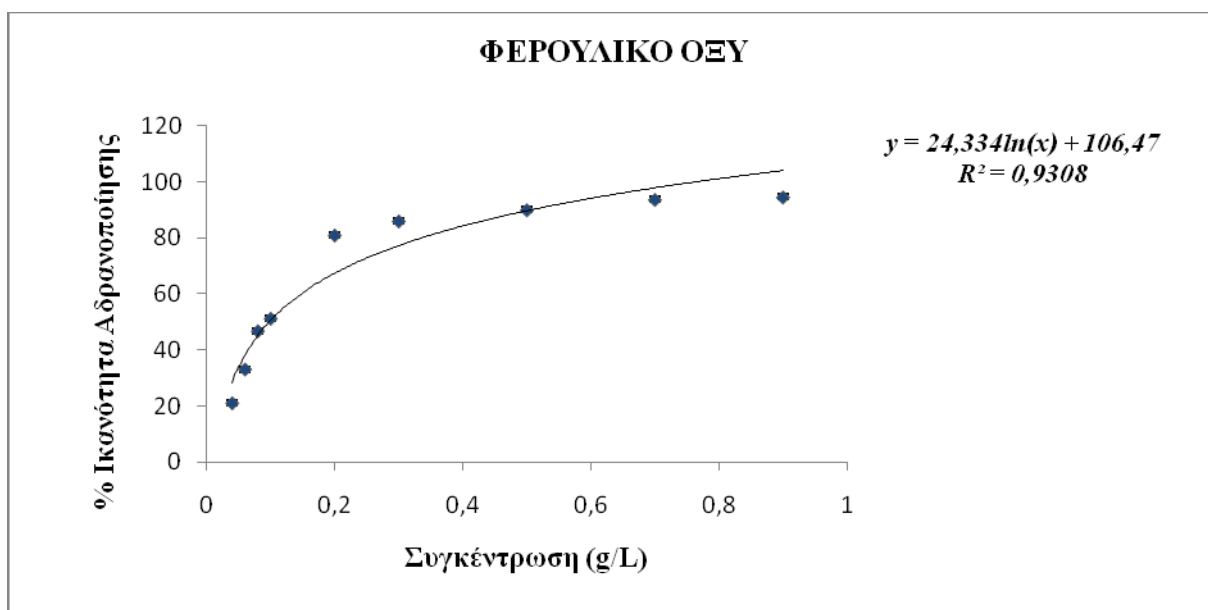
Σχήμα 22. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.



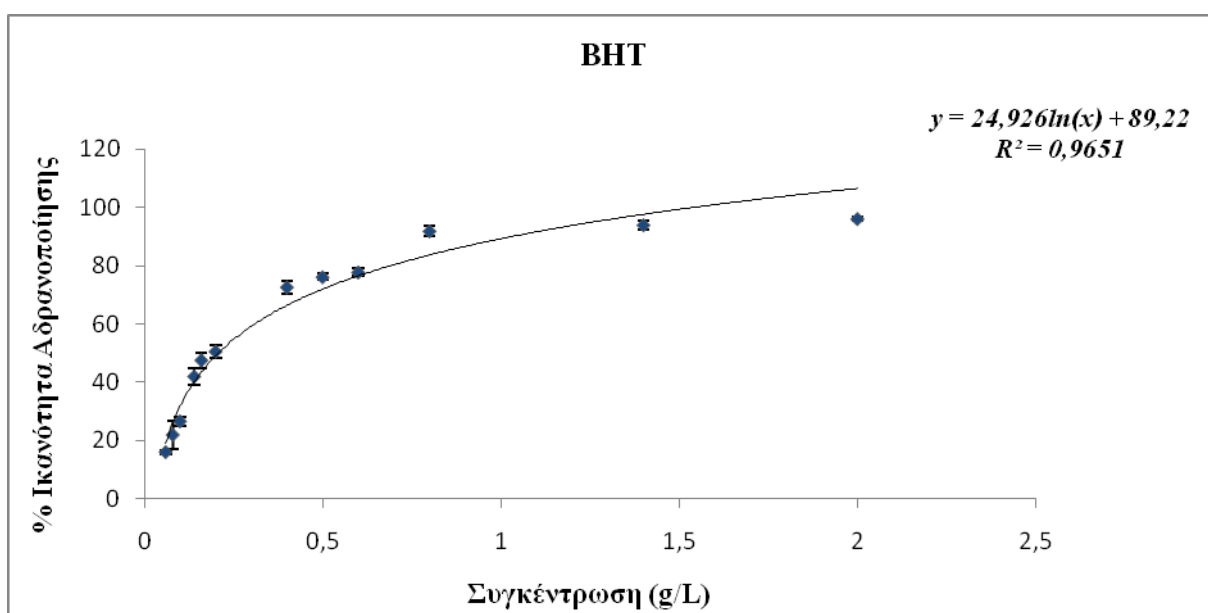
Σχήμα 23. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του πρωτοκατεχικού οξέος.



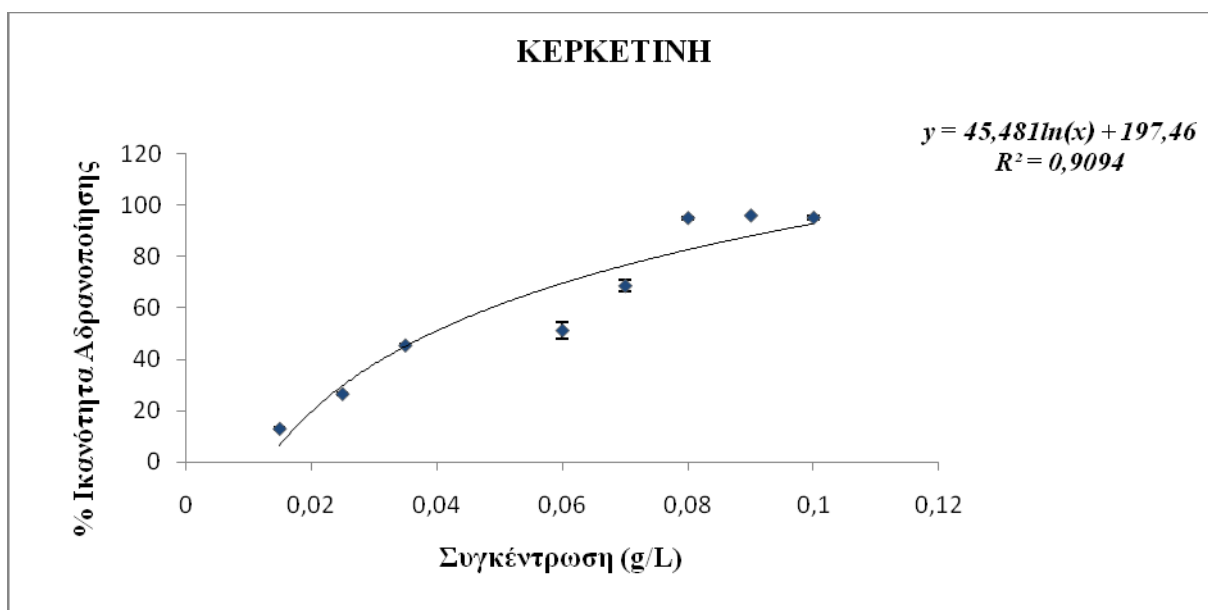
Σχήμα 24. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος.



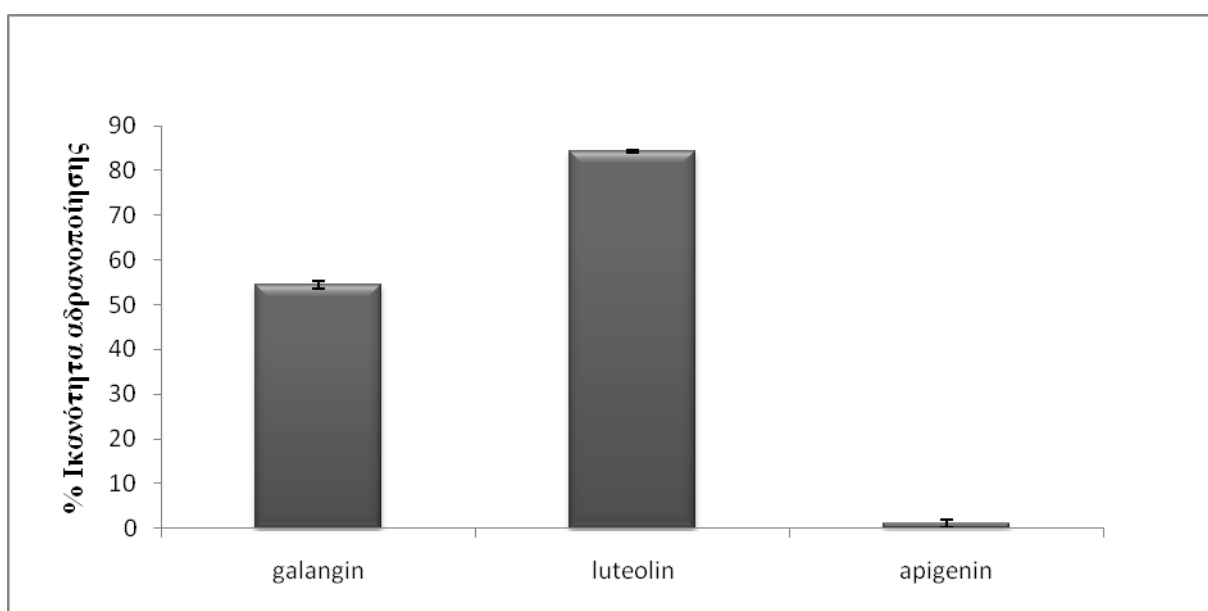
Σχήμα 25. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του φερούλικού οξέος.



Σχήμα 26. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση του BHT.



Σχήμα 27. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τη συγκέντρωση της κερκετίνης.

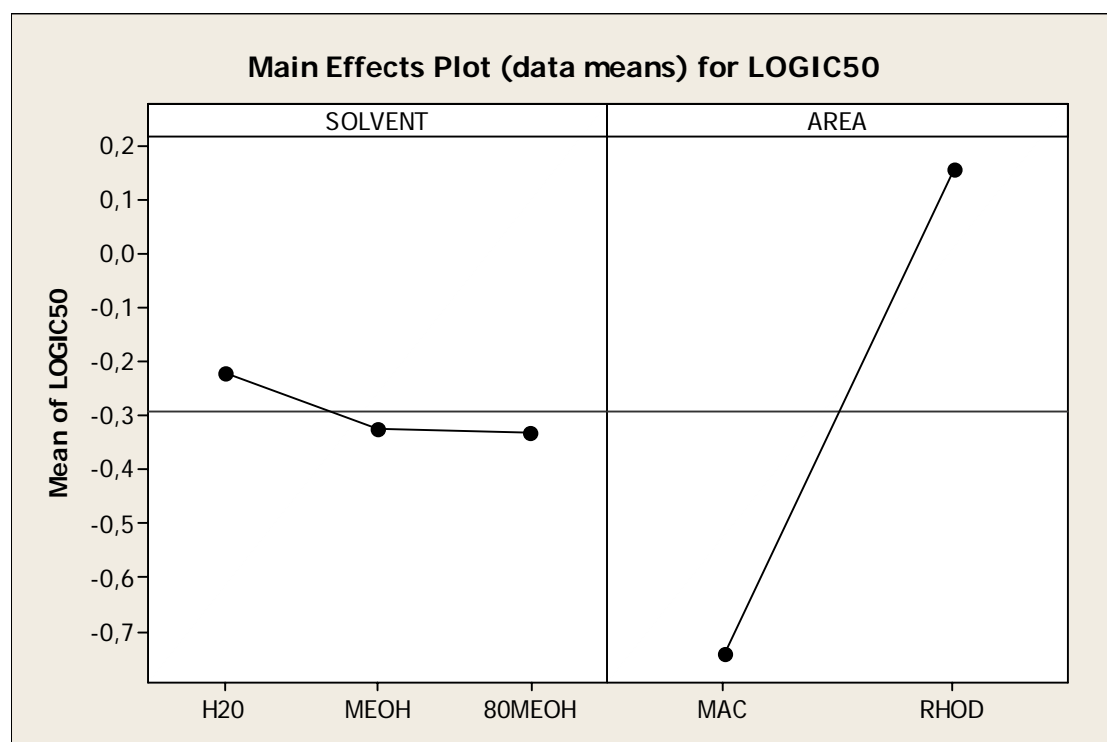


Σχήμα 28. % Ικανότητα αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH των φλαβονοειδών γκαλαγκίνη (*galangin*), λουτεολίνη (*luteolin*) και απιγενίνη (*apigenin*).

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM) με το πρόγραμμα Minitab 15 (Παράρτημα Α, Σελ. 1 –2) όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη,

μεθανόλη/νερό, νερό) και ii) της γεωγραφικής προέλευσης (Δυτ. Μακεδονία, Ρόδος) στην μετρούμενη μεταβλητή (αντιοξειδωτική δράση).

Αφού $p < 0,05$ και των δυο παραγόντων, ισχύει η εναλλακτική υπόθεση και οι μέσοι όροι δεν είναι ίσοι μεταξύ τους.



Σχήμα 29. Διάγραμμα κύριων παραγόντων i.διαλύτη (νερό(H₂O)-μεθανόλη/νερό(80MEOH)-μεθανόλη(MEOH) και ii. Γεωγραφική προέλευση (Δυτ.Μακεδονία(MAC)-Ρόδος(RHOD)) που επιδρούν στη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση.

Από το διάγραμμα κύριων παραγόντων (Main Effects Plot) (Σχ.29) παρατηρείται πως ο παράγοντας περιοχή (AREA) παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά του. Όσον αφορά τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) φαίνεται να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο το ένα από τα τρία επίπεδά του, για την ακρίβεια αυτό του νερού (H₂O), ενώ τα επίπεδα μεθανόλη (MEOH) και η αναλογία διαλυτών μεθανόλης νερού (80MEOH) φαίνονται να είναι ίσα μεταξύ τους. Επίσης, παρατηρείται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, η οποία ωστόσο είναι τόσο μικρή που μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα.

Αφού η τιμή F του παράγοντα AREA είναι μεγαλύτερη τόσο αυτής του παράγοντα SOLVENT όσο και της αλληλεπίδρασης (SOLVENT*AREA) συμπεραίνουμε ότι η περιοχή από την οποία συλλέχθηκε το εκάστοτε δείγμα πρόπολης, είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο τη μεταβλητή, αντιοξειδωτική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 2) βλέπουμε πως με βάση τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) οι μέσοι όροι, αφού αντιλογαριθμήσουμε, κατατάσσονται ως εξής:

$$\text{Νερό}(0,6010) > \text{Μεθανόλη}(0,4755) = \text{μεθανόλη-νερό}/80-20(0,4678)$$

Επειδή όμως οι τιμές IC₅₀ είναι αντιστρόφως ανάλογες με τη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση

$$\text{Μεθανόλη-νερό}/80-20(0,4678) = \text{Μεθανόλη}(0,4755) > \text{νερό}(0,6010)$$

Άρα η αναλογία των διαλυτών μεθανόλης/νερού και η καθαρή μεθανόλη είναι οι καλύτεροι διαλύτες εκχύλισης αντιοξειδωτικά δρώντων ουσιών και ακολουθεί το νερό.

Με βάση τον παράγοντα περιοχή (AREA) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

$$\text{Ρόδος}(1,4368) > \text{Μακεδονία}(0,1820)$$

Επειδή όμως οι τιμές IC₅₀ είναι αντιστρόφως ανάλογες με τη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση

$$\text{Μακεδονία}(0,1820) > \text{Ρόδος}(1,4368)$$

Άρα, το δείγμα της πρόπολης από τη Δυτική Μακεδονία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος, βλέπουμε ότι το εκχύλισμα που παραλείφτηκε από το δείγμα της Δυτικής Μακεδονίας με την προσθήκη αναλογίας διαλυτών μεθανόλης-νερού 80%-20% έχει τη μικρότερη τιμή IC₅₀ (0,1433), άρα τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση

ενώ το υδατικό εκχύλισμα που παραλήφτηκε από το δείγμα πρόπολης της Ρόδου, έχει τη μεγαλύτερη τιμή IC_{50} (1,555) άρα τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.



Σχήμα 30. Αλληλεπίδραση των παραγόντων γεωγραφική προέλευση (AREA, MAC-RHOD) και διαλύτη, μεθανόλη-μεθανόλη/νερό-νερό (SOLVENT, MEOH-80MEOH-H₂O) στη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση.

Πρότυπες φαινολικές ενώσεις

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) με το πρόγραμμα MINTAB 15, όπου μελετήθηκε η επίδραση των πρότυπων φαινολικών οξέων (γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και BHT) και της φλαβονόλης κερκετίνης στη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 3) βλέπουμε ότι οι φαινολικές ενώσεις κατατάσσονται ως εξής

BHT(0,207)>φερουλικό(0,098)>κερκετίνη(0,039)καφεϊκό(0,032)>πρωτοκατεχικό(0,028)>γαλλικό(0,016)

Επειδή οι τιμές IC_{50} , είναι αντιστρόφως ανάλογες της αντιοξειδωτικής δράσης

**Γαλλικό(0,016)> πρωτοκατεχικό(0,028)> καφεϊκό(0,032)>κερκετίνη(0,039)
φερουλικό(0,098)> ΒΗΤ(0,207)**

Όλα τα φυσικά φαινορικά οξέα και η φλαβονόλη κερκετίνη παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το συνθετικό αντιοξειδωτικό ΒΗΤ. Το γαλλικό οξύ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και ακολουθούν το πρωτοκατεχικό, το καφεϊκό και το φερουλικό. Η φλαβονόλη κερκετίνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση χαμηλότερη από αυτή του καφεϊκού οξέος. Οι πρότυπες φυσικές φαινολικές ουσίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλίσματα, αφού οι τιμές IC_{50} είναι μικρότερες αριθμητικά από αυτές των εκχυλισμάτων.

Εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα για να μελετηθεί η επίδραση του συνθετικού ΒΗΤ και των εκχυλισμάτων πρόπολης στη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο (Παράρτημα Α, σλ 5) βλέπουμε ότι τα δείγματα κατατάσσονται ως εξής:

**Μεθανολικό/υδατικό Δυτ. Μακεδονίας(0,1433)>μεθανολικό Δυτ.
Μακεδονίας(0,1813)=ΒΗΤ(0,2073)=υδατικό Δυτ. Μακεδονίας(0,2323)>
μεθανολικό Ρόδου(1,249)=υδατικό Ρόδου(1,5573)**

Παρατηρούμε ότι το μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα της Δυτ. Μακεδονίας παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το μεθανολικό της ίδιας περιοχής, το οποίο με τη σειρά του παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση ίση με αυτή του συνθετικού ΒΗΤ και του υδατικού Δυτ. Μακεδονίας. Επίσης, φαίνεται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα της Ρόδου παρουσιάζει ίση αντιοξειδωτική δράση με αυτή του υδατικού εκχυλίσματος της Ρόδου.

Πρότυπα φλαβονοειδή

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) με το πρόγραμμα MINTAB 15, όπου μελετήθηκε η επίδραση των πρότυπων φλαβονοειδών (απιγενίνη, γκαλαγκίνη, λουτεολίνη) στη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 7) βλέπουμε ότι τα φλαβονοειδή κατατάσσονται ως εξής:

Λουτεολίνη(84,228)>γκαλαγκίνη(54,243)>απιγενίνη(1,177)

Είναι φανερό ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει η φλαβονόνη λουτεολίνη και ακολουθεί η φλαβονόλη γκαλαγκίνη, ενώ η φλαβονόνη απιγενίνη παρουσιάζει αμελητέα αντιοξειδωτική δράση.

5.3.2. Μέθοδος FRAP

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη (Fe^{3+} - TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+} - TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm. Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 31-42, αποτελέσματα Παράρτημα Β, Πιν. 14-25) παρουσιάζεται η % ικανότητα αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου από τα: i) μεθανολικά εκχυλίσματα από τη Δυτ. Μακεδονία (0,004-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,06-0,9 g/L), ii) μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα από τη Δυτ. Μακεδονία (0,002-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,1-0,9 g/L), iii) υδατικά εκχυλίσματα από τη Δυτ. Μακεδονία (0,02-0,5 g/L) και τη Ρόδο (0,06-0,9 g/L) καθώς και από τις πρότυπες φαινολικές ουσίες: i) Γαλλικό οξύ (0,0008-0,08 g/L), ii) καφεϊκό οξύ (0,0006-0,08 g/L), iii) φερουλικό οξύ (0,01-0,5 g/L), iv) πρωτοκατεχικό οξύ (0,009-0,5 g/L) και v) ασκορβικό οξύ (0,001-0,1 g/L) και την φλαβονόλη κερκετίνη (0,0006-0,1 g/L). Όσον

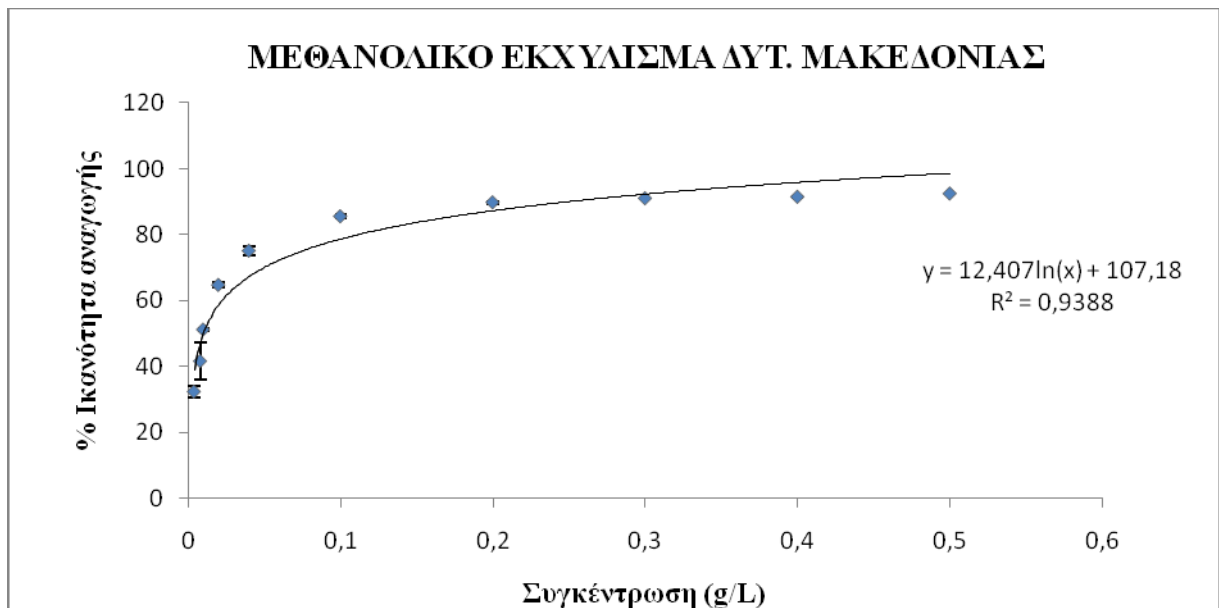
αφορά το π-κουμαρικό οξύ ελέγχθηκε στη συγκέντρωση των 500 ppm και βρέθηκε αμελητέα αναγωγική ικανότητα (7,27%)

Μέσω της λογαριθμικής εξίσωσης που προέκυψε από τη γραφική απεικόνιση % αναγωγική δράση-συγκέντρωση υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ για κάθε δείγμα, η οποία μας δίνει τη συγκέντρωση σε (g/L) του κάθε δείγματος που απαιτείται για επίτευξη του 50% της αναγωγικής δράσης.

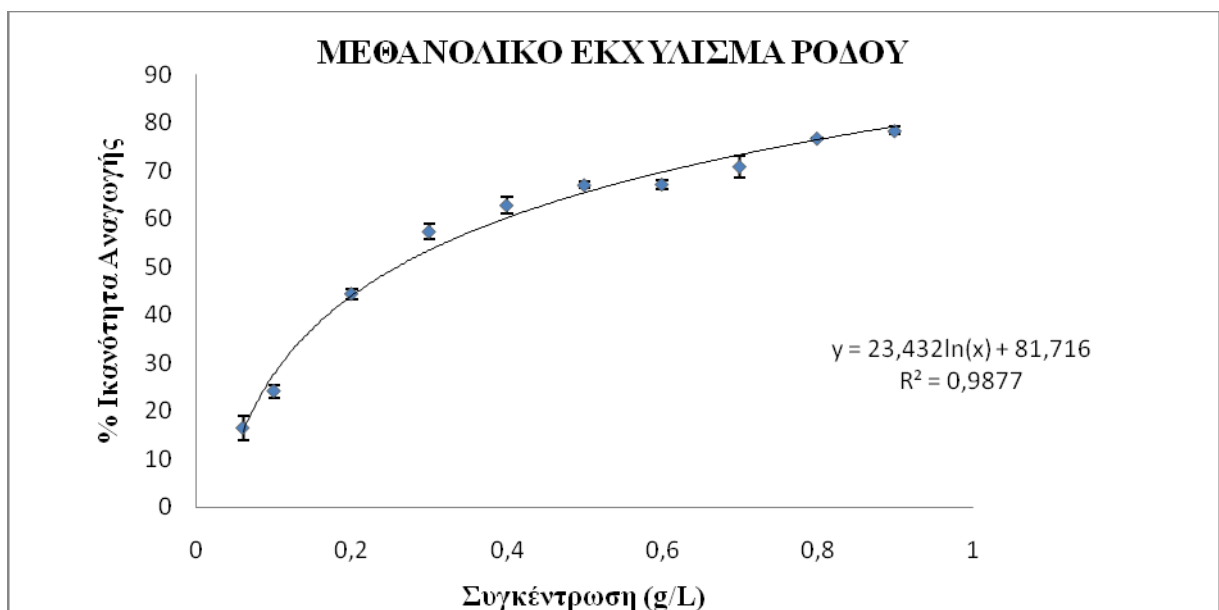
Τέλος, στο Σχήμα 43 (αποτελέσματα Παράρτημα Β, Πιν. 26) παρουσιάζεται η % ικανότητα αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου από τα πρότυπα φλαβονοειδή i) απιγενίνη, ii) γκαλγκίνη και iii) λουτεολίνη στη συγκέντρωση των 500 ppm.

Πίνακας 7. Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας και Ρόδου και των πρότυπων ουσιών γαλλικού οξέος, φερουλικού οξέος, καφεϊκού οξέος, πρωτοκατεχικού οξέος, κερκετίνης και ασκορβικού οξέος.

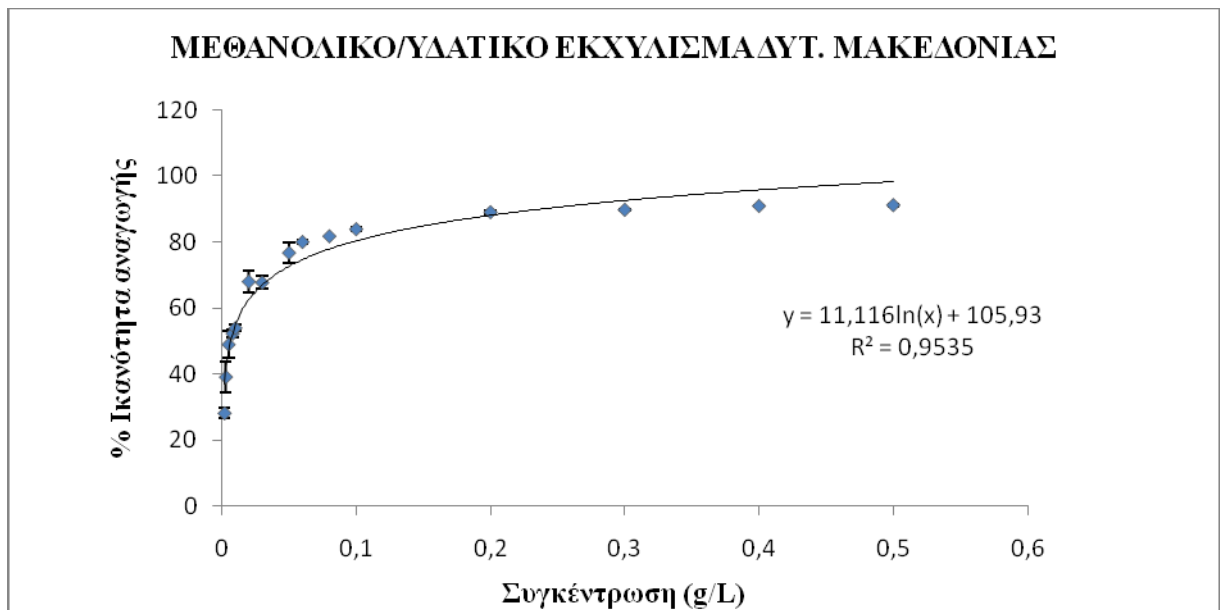
Δείγμα	IC₅₀
Γαλλικό οξύ	0,00154 ± 0,000
Καφεϊκό οξύ	0,00220 ± 0,0003
Φερουλικό οξύ	0,06010 ± 0,0055
Πρωτοκατεχικό οξύ	0,01790 ± 0,00256
Ασκορβικό οξύ	0,00229 ± 0,00043
Κερκετίνη	0,0101 ± 0,0007
Μεθανολικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας	0,00997 ± 0,00097
Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας	0,00650 ± 0,001
Υδατικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας	0,03940 ± 0,0058
Μεθανολικό εκχύλισμα Ρόδου	0,25800 ± 0,0064
Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα Ρόδου	0,18900 ± 0,0226
Υδατικό εκχύλισμα Ρόδου	0,16900 ± 0,009



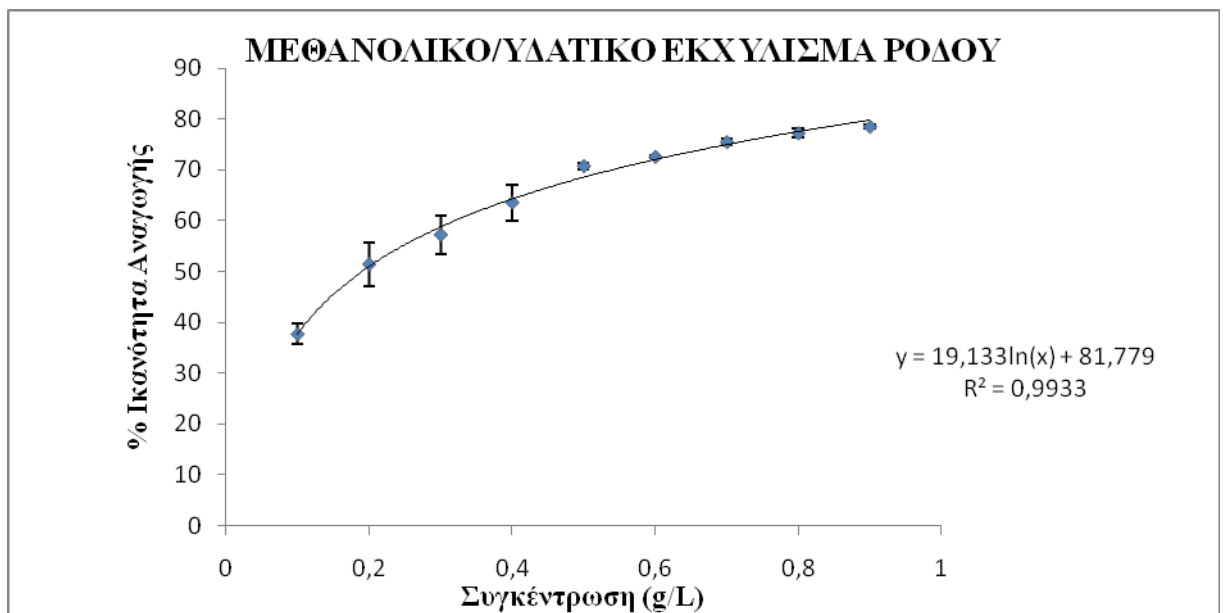
Σχήμα 31. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας



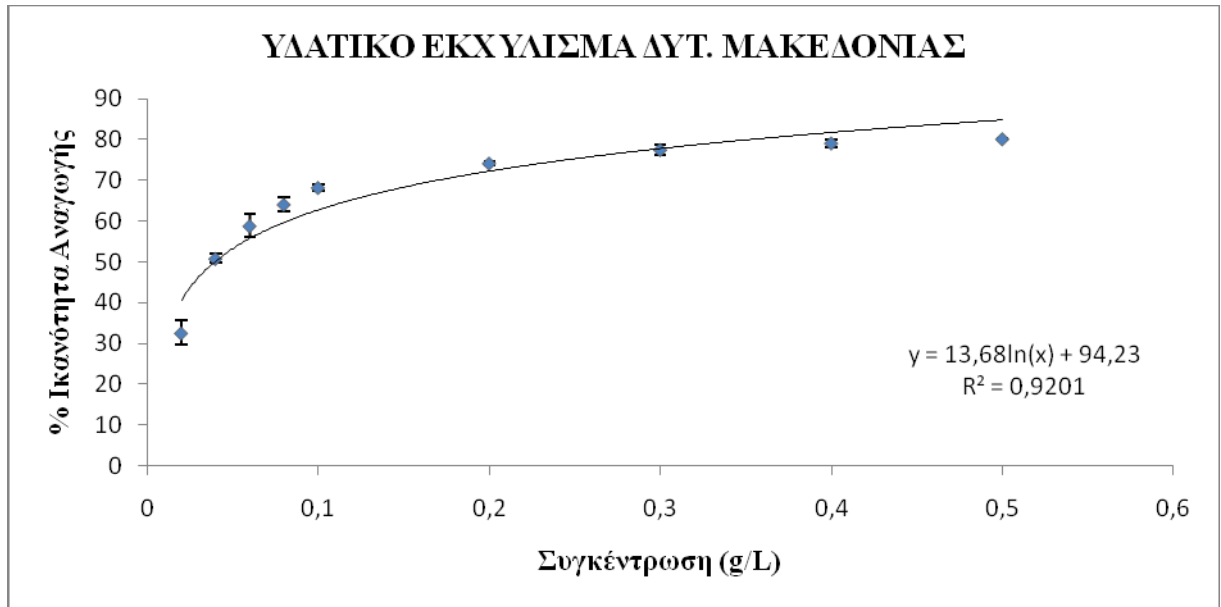
Σχήμα 32. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ρόδου.



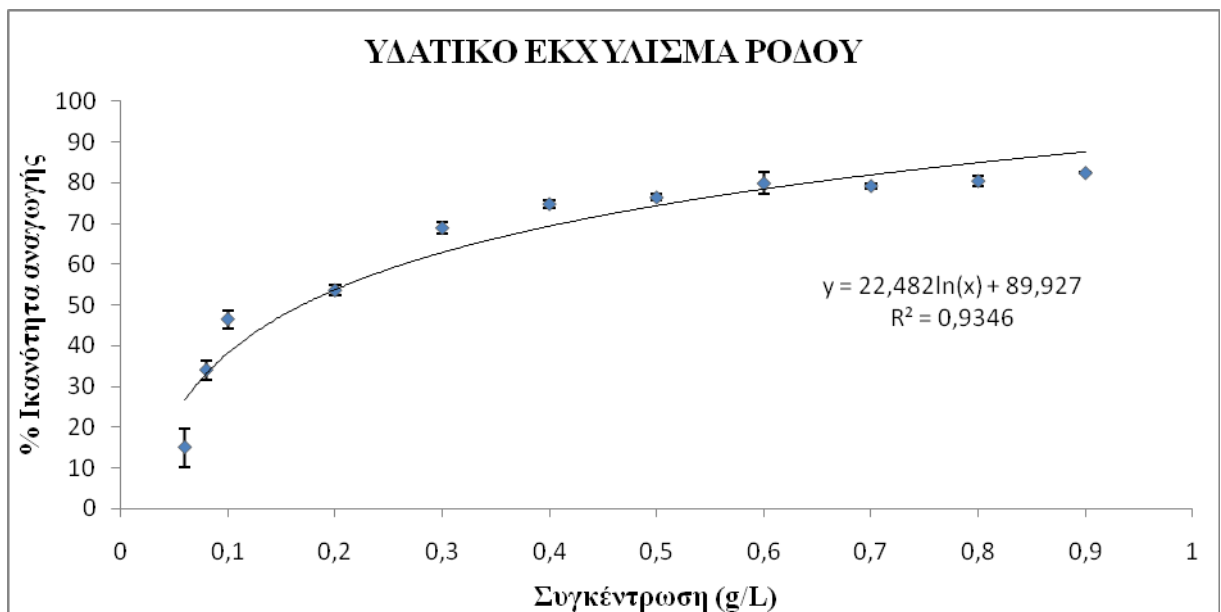
Σχήμα 33. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.



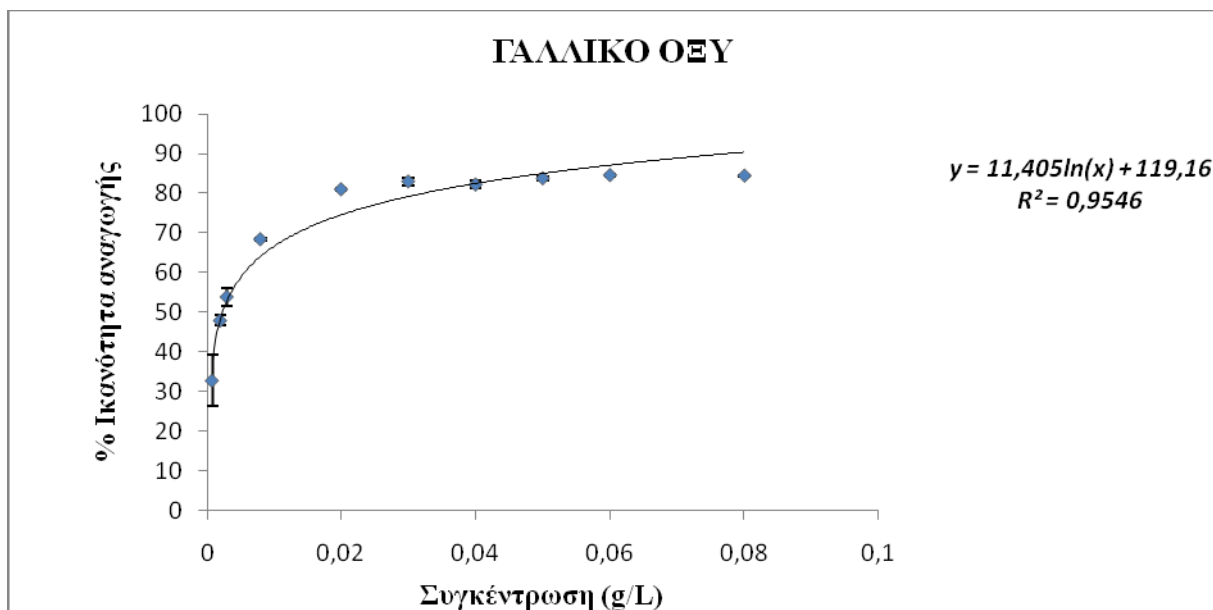
Σχήμα 34. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.



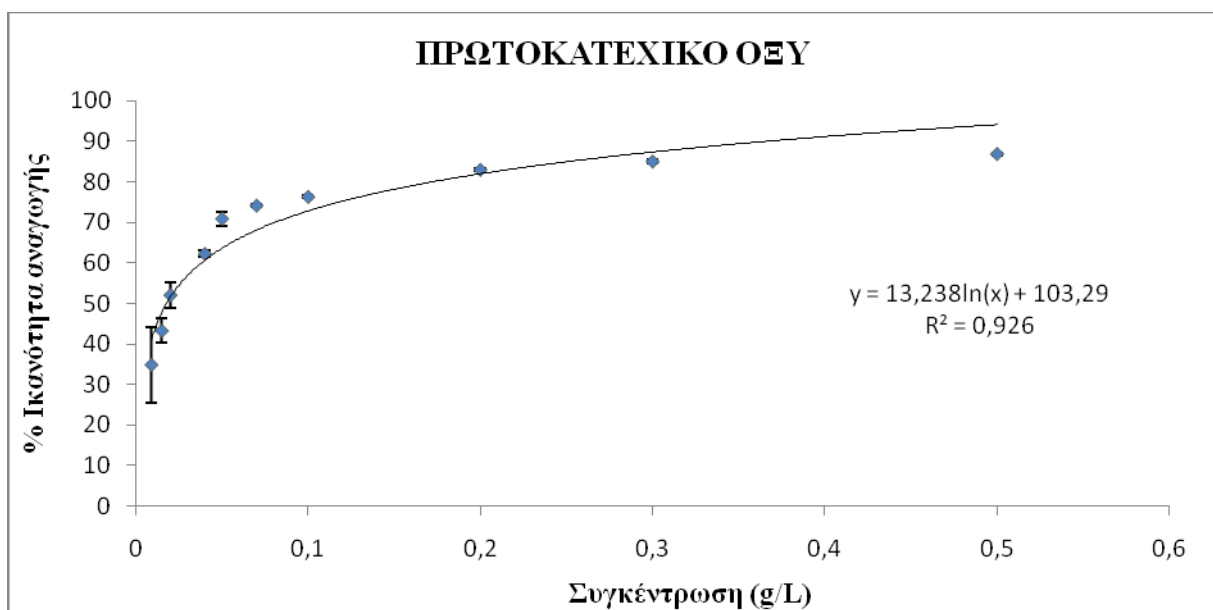
Σχήμα 35. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας



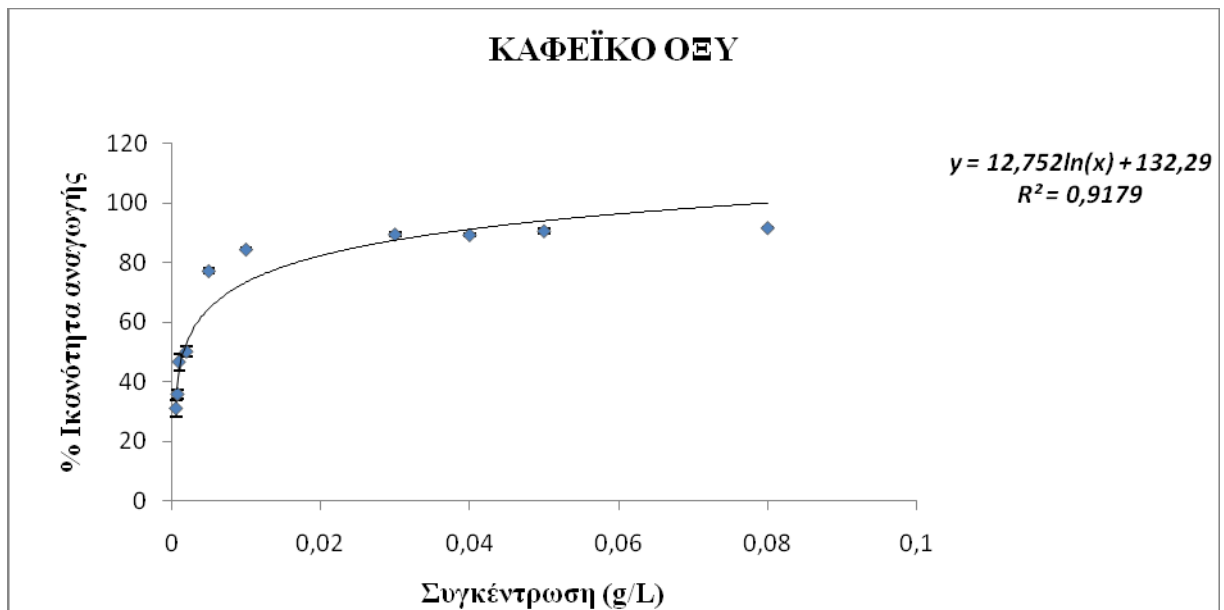
Σχήμα 36. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.



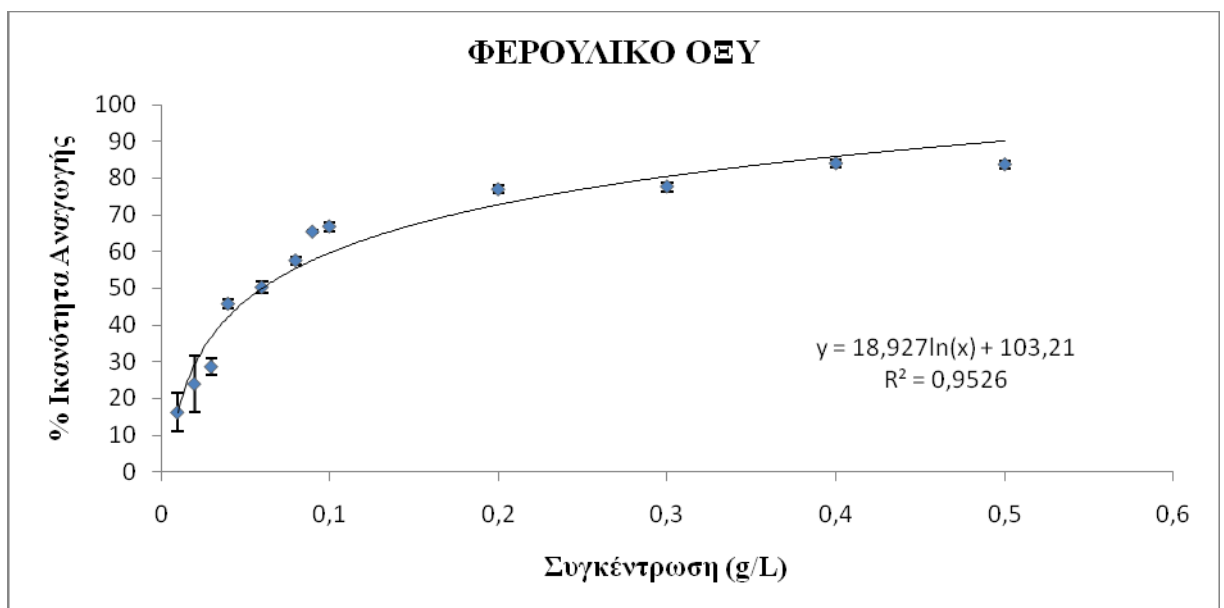
Σχήμα 37. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.



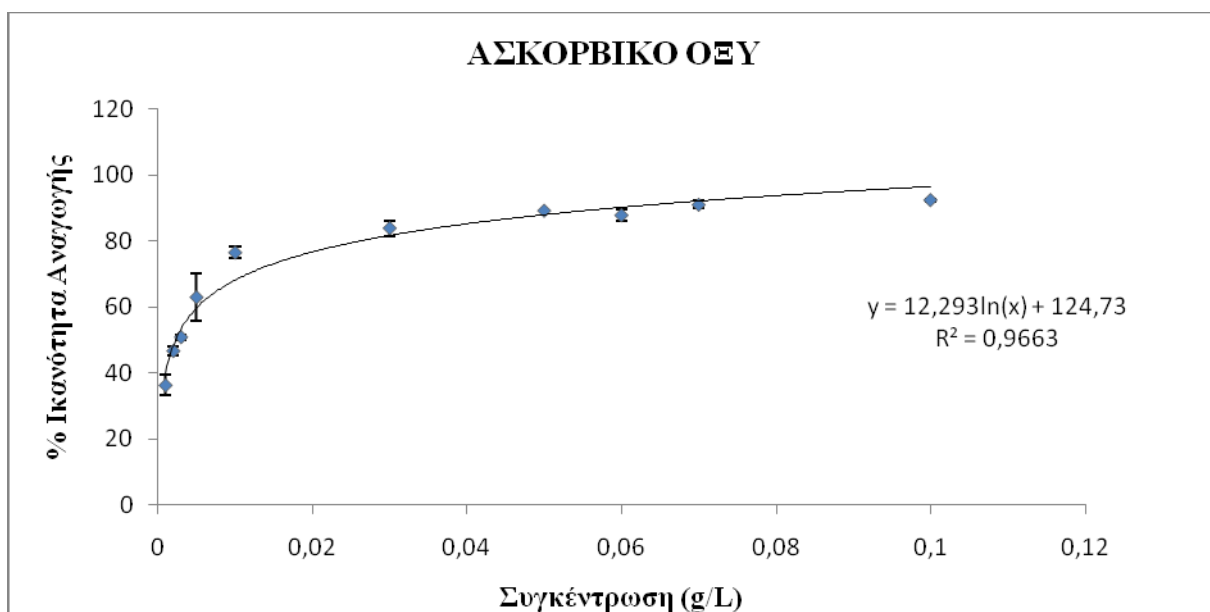
Σχήμα 38. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του πρωτοκατεχικού οξέος.



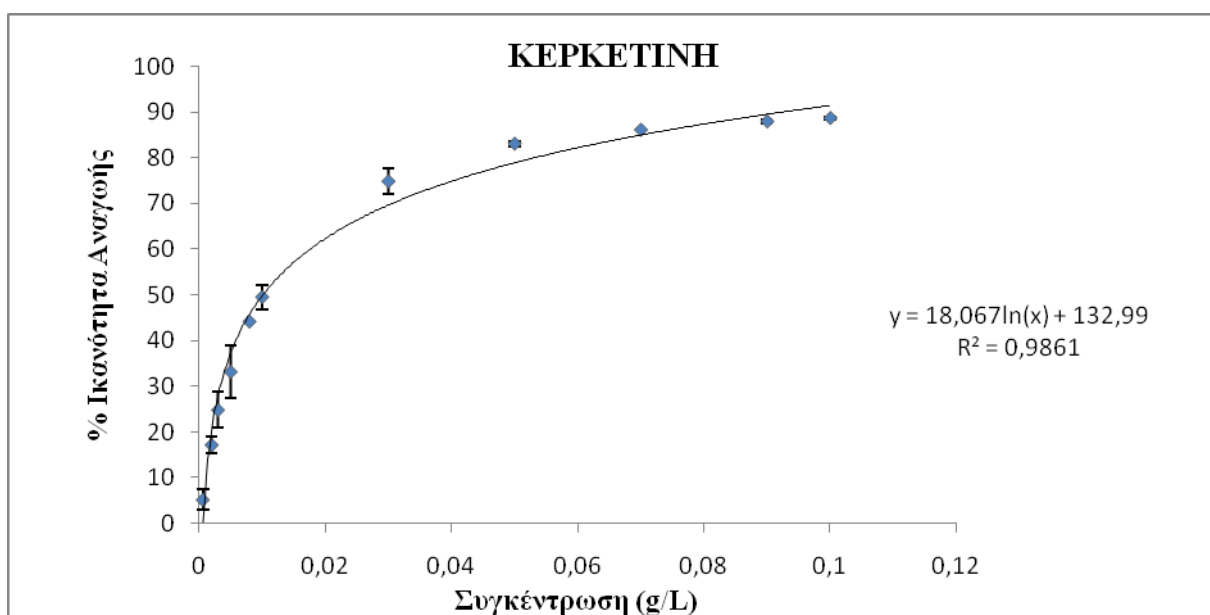
Σχήμα 39. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος.



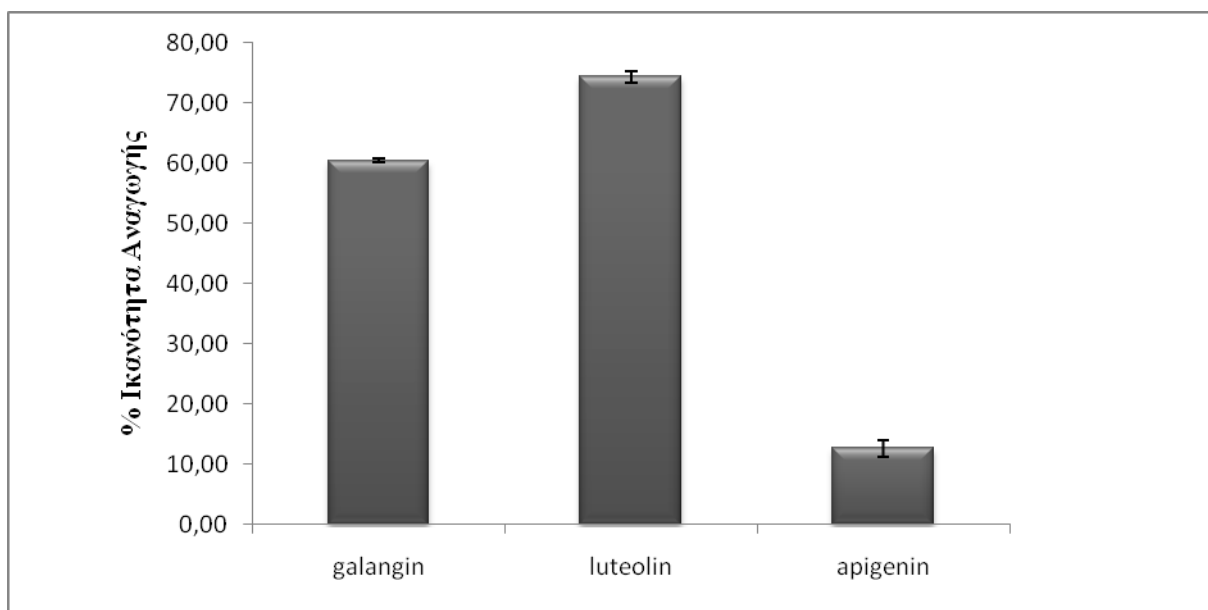
Σχήμα 40. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του φερούλικού οξέος.



Σχήμα 41. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος.



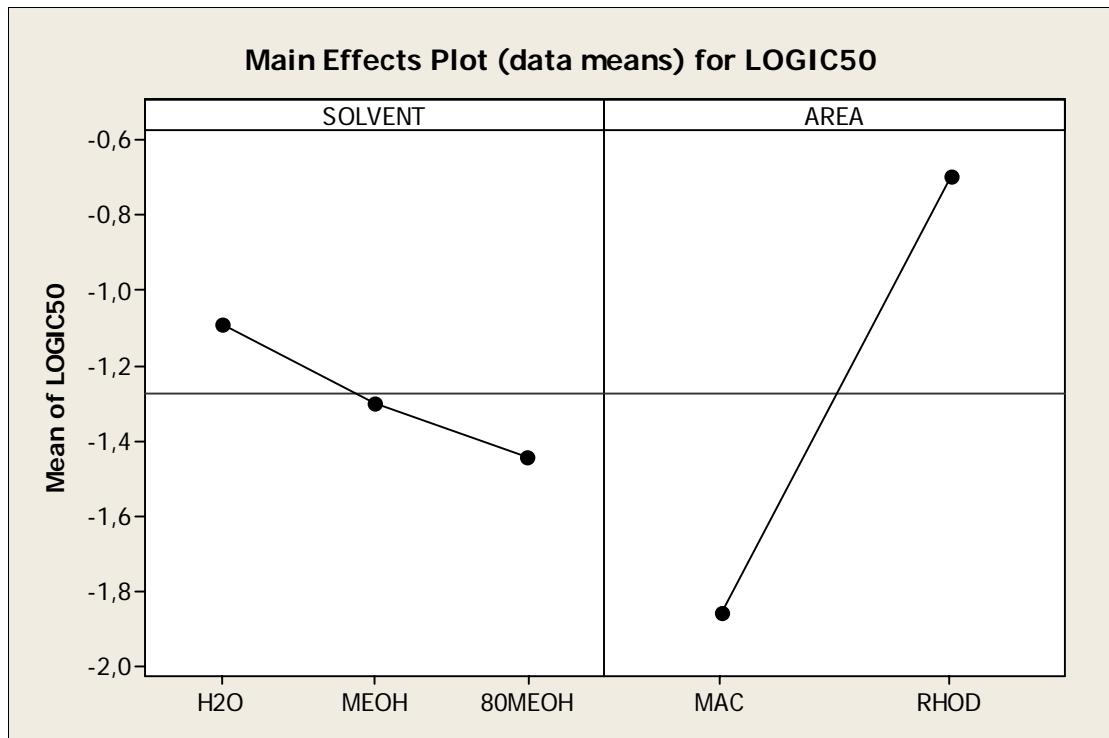
Σχήμα 42. Μεταβολή της % αναγωγικής ικανότητας με την συγκέντρωση της κερκετίνης.



Σχήμα 43. % Αναγωγική ικανότητα των πρότυπων φλαβονοειδών γκαλαγκίνη (*galangin*), λουτεολίνη (*luteolin*) και απιγενίνη (*apigenin*)

Εφαρμόστηκε η ανάλυση της διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM) με το πρόγραμμα MINITAB 15 (Παράρτημα Α, σλ 8-9) όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη, μεθανόλη/νερό, νερό) και ii) της γεωγραφικής προέλευσης (Δυτ. Μακεδονία, Ρόδος) στην μετρούμενη μεταβλητή (αναγωγική δράση).

Αφού $p < 0,05$ και των δυο παραγόντων, ισχύει η εναλλακτική υπόθεση και οι μέσοι όροι δεν είναι ίσοι μεταξύ τους.



Σχήμα 44. Διάγραμμα κύριων παραγόντων i. Διαλύτης (νερό(H₂O)-μεθανόλη(MEOH)-μεθανόλη/νερό(80MEOH)) και ii. Γεωγραφική προέλευση (Δυτ.Μακεδονία(MAC)-Ρόδος(RHOD)) που επιδρούν στη μεταβλητή αναγωγική δράση.

Παρατηρούμε πως τόσο ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) όσο και ο παράγοντας περιοχή (AREA) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους. Επίσης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων.

Αφού η τιμή F του παράγοντα AREA είναι μεγαλύτερη αυτής του παράγοντα SOLVENT αλλά και της τιμής της αλληλεπίδρασης (SOLVENT*AREA) συμπεραίνουμε ότι η περιοχή από την οποία συλλέχθηκε η πρόπολη είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο τη μεταβλητή, αναγωγική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 8-9) βλέπουμε ότι με βάση τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Νερό(0,0818)> Μεθανόλη(0,0506)>Μεθανόλη-νερό(0,036)

Επειδή, όμως οι τιμές IC₅₀ είναι αντιστρόφως ανάλογες με τη μεταβλητή αναγωγική δράση

Μεθανόλη-νερό(0,0818)> Μεθανόλη(0,0506)> Νερό(0,0818)

Άρα, το σύστημα διαλυτών μεθανόλη-νερό σε αναλογία 80-20 είναι ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης αναγωγικά δρώντων ουσιών και ακολουθούν η καθαρή μεθανόλη και το νερό.

Επίσης, με βάση τον παράγοντα περιοχή (AREA) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

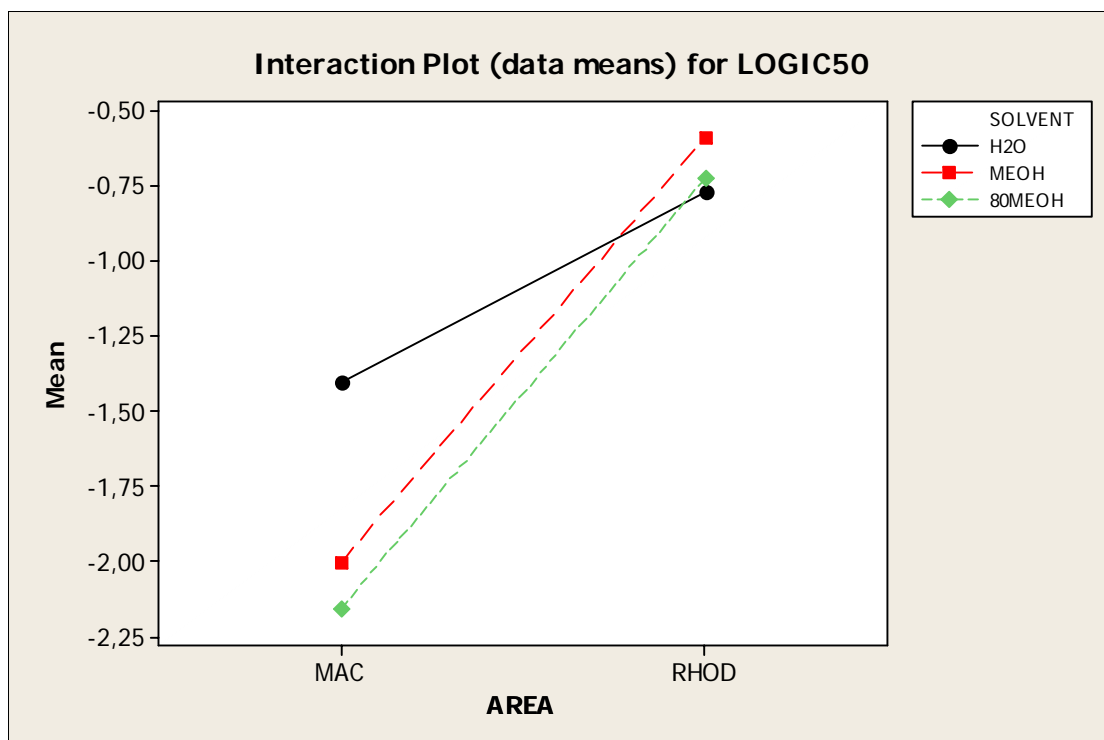
Ρόδος(0,20128)>Μακεδονία(0,0139)

Επειδή, όμως, οι τιμές IC_{50} είναι αντιστρόφως ανάλογες με τη μεταβλητή αναγωγική δράση

Μακεδονία(0,0139)> Ρόδος(0,20128)

Άρα το δείγμα της πρόπολης που συλλέχθηκε από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας παρουσιάζει μεγαλύτερη αναγωγική δράση από αυτό της Ρόδου.

Τέλος βλέπουμε ότι το εκχύλισμα από το δείγμα πρόπολης από τη Δυτική Μακεδονία που παραλήφθηκε με το σύστημα διαλυτών μεθανόλης-νερού, έχει τη μικρότερη τιμή IC_{50} (0,007), άρα τη μεγαλύτερη αναγωγική δράση, ενώ το υδατικό εκχύλισμα από τη Ρόδο έχει τη μεγαλύτερη τιμή IC_{50} (0,169), άρα τη μικρότερη αναγωγική δράση.



Σχήμα 45. Αλληλεπίδραση των παραγόντων γεωγραφική προέλευση (AREA, MAC-RHOD) και διαλύτη, μεθανόλη-μεθανόλη/νερό-νερό (SOLVENT, MEOH-80MEOH-H₂O) στη μεταβλητή αναγωγική δράση.

Πρότυπες φαινολικές ενώσεις

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) με το πρόγραμμα MINTAB 15, όπου μελετήθηκε η επίδραση των πρότυπων φαινολικών οξέων (γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και ασκορβικό οξύ) και της φλαβονόλης κερκετίνης στη μεταβλητή αναγωγική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 11) βλέπουμε ότι τα φαινολικά οξέα κατατάσσονται ως εξής

Φερουλικό(0,060067)>πρωτοκατεχικό(0,017860)>κερκετίνη(0,0101)>ασκορβικό(0,002298)=γαλλικό(0,00227)>καφεϊκό(0,001577)

Επειδή οι τιμές IC₅₀ είναι αντιστρόφως ανάλογες της μεταβλητής αναγωγική δράση

Καφεϊκό(0,001577)>γαλλικό(0,00227)=ασκορβικό(0,002298)>κερκετίνη(0,0101)> πρωτοκατεχικό(0,017860)> φερουλικό(0,060067)

Το ασκορβικό οξύ είναι γνωστό για τις ισχυρές αναγωγικές του ιδιότητες, ωστόσο το καφεϊκό οξύ παρουσιάζει ισχυρότερη αναγωγική δράση από αυτό, ενώ το γαλλικό οξύ έχει τα ίδια με αυτό επίπεδα αναγωγικής δράσης. Μετά το ασκορβικό οξύ ακολουθούν η φλαβονόλη κερκετίνη και τα φαινολικά οξέα πρωτοκατεχικό και φερουλικό οξύ. Οι πρότυπες φαινολικές ουσίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναγωγική δράση από τα εκχυλίσματα της Ρόδου αφού οι τιμές IC₅₀ είναι κατά πολύ μικρότερες από αυτές των εκχυλισμάτων.

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα για να εξεταστεί η επίδραση των πρότυπων φαινολικών ουσιών πρωτοκατεχικό οξύ, φερουλικό οξύ και κερκετίνη και των εκχυλισμάτων από τη Δυτ. Μακεδονία στη μεταβλητή, αναγωγική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Β, σλ 12) βλέπουμε ότι τα δείγματα κατατάσσονται ως εξής:

Μεθανολικό/υδατικό(0,007)=μεθανολικό(0,0097)=κερκετίνη(0,0101)>πρωτοκατεχικό οξύ(0,0179)>υδατικό(0,0396)>φερουλικό οξύ(0,0600)

Παρατηρούμε ότι τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας έχουν, τόσο μεταξύ τους όσο και με την κερκετίνη, στατιστικά ίδια επίπεδα αναγωγικής δράσης και υψηλότερα από το πρωτοκατεχικό οξύ, το υδατικό εκχύλισμα αλλά και το φερουλικό οξύ.

Πρότυπα φλαβονοειδή

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (One-way ANOVA) με το πρόγραμμα MINITAB 15 (αποτελέσματα Παράρτημα Α, σλ 13-14, όπου μελετήθηκε η επίδραση των πρότυπων φλαβονοειδών (γκαλαγκίνη, λουτεολίνη, απιγενίνη) στη μεταβλητή αναγωγική δράση.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 14) βλέπουμε ότι τα πρότυπα φλαβονοειδή κατατάσσονται ως εξής:

Λουτεολίνη(74,283)>γκαλαγκίνη(60,759)>απιγενίνη(12,71)

Συνεπώς, ενδεικτικά στη συγκέντρωση των 500 ppm (1,85 mM, 1,75 mM και 1,85 mM για τα φλαβονοειδή γκαλαγκίνη, λουτεολίνη και απιγενίνη, αντίστοιχα), τη μεγαλύτερη αναγωγική δράση παρουσιάζει η φλαβονόνη (με δομή ο-διφαινόλης) λουτεολίνη (AOA=74,28%) και ακολουθεί η φλαβονόλη γκαλαγκίνη (AOA=60,76%), ενώ η φλαβονόνη απιγενίνη παρουσιάζει τη μικρότερη αναγωγική δράση (AOA=12,71%) σε σχέση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή.

5.3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολών

(Μέθοδος Folin Ciocalteu)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu και μέτρηση της απορρόφησης στα 760 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος (10-400 ppm, $R^2=0,9948$) (Παράρτημα Β, Πιν.27-28) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/kg ξηρής ουσίας. Τα δείγματα στα οποία έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών είναι:

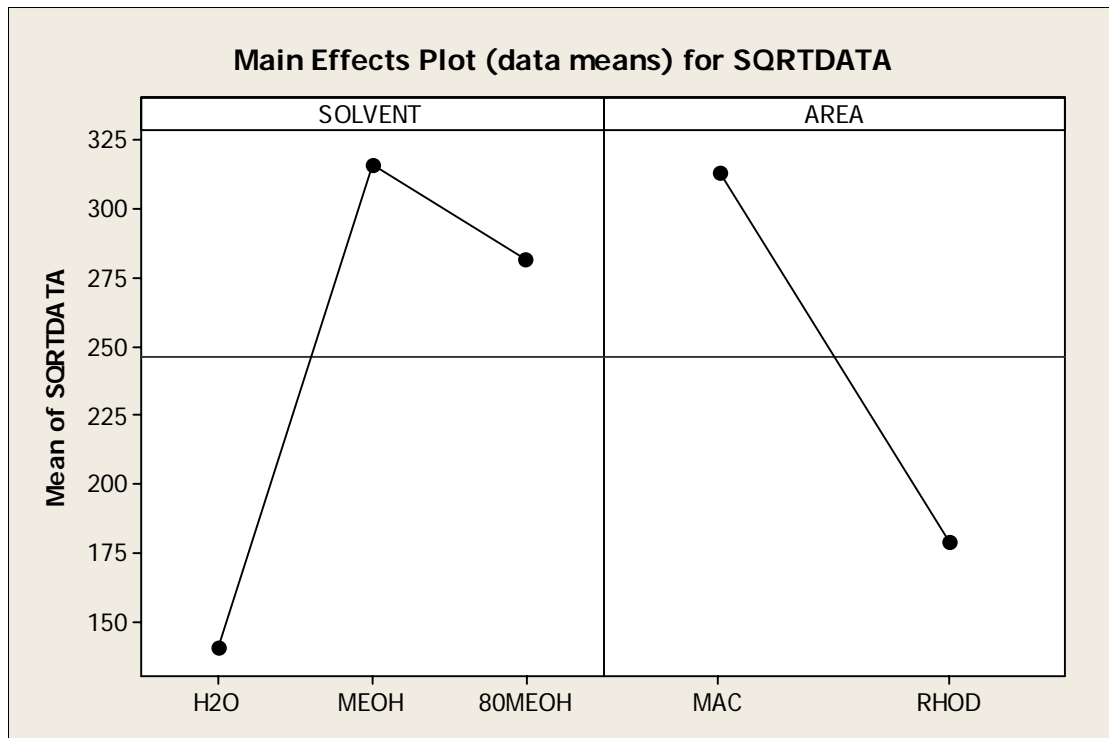
- i) Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας (3 mg)
- ii) Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας (2 mg)
- iii) Υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας (1 mg)
- iv) Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης Ρόδου (2,2 mg)
- v) Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Ρόδου (6 mg)
- vi) Υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Ρόδου (1 mg)

Πίνακας 8. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες (mg γαλλικού οξέος / kg ξηρής ουσίας).

Εκχύλισμα		Συγκέντρωση (mg/kg)
Δυτ. Μακεδονία	Μεθανολικό	77559,43±3714,21
	Μεθανολικό/υδατικό	179987,74±7663,553
	Υδατικό	58534,84±6512,173
Ρόδος	Μεθανολικό	127787,34±34279,65
	Μεθανολικό/υδατικό	21801,39±9617,47
	Υδατικό	2328,01±1510,74

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM) με το πρόγραμμα MINITAB 15 (Παράρτημα Α, σλ 15-16) όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη, μεθανόλη/νερό, νερό) και ii) η γεωγραφική προέλευση της πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία, Ρόδος) στη μετρούμενη μεταβλητή (ολικές φαινόλες).

Αφού $p < 0,05$ και των δύο παραγόντων ισχύει η εναλλακτική υπόθεση και οι μέσοι όροι των δειγμάτων δεν είναι ίσοι μεταξύ τους.



Σχήμα 46. Διάγραμμα κύριων παραγόντων i. Διαλύτης (νερό(H₂O)-μεθανόλη/νερό(80MEOH)-μεθανόλη(MEOH) και ii. Γεωγραφική προέλευση (Δυτ. Μακεδονία(MAC)-Ρόδος(RHOD))

Παρατηρούμε πως τόσο ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) όσο και ο παράγοντας περιοχή (AREA) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους. Επίσης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, χωρίς όμως το επίπεδο νερό (H₂O) του παράγοντα διαλύτης (SOLVENT) να συμμετέχει σε αυτήν.

Αφού η τιμή F του παράγοντα AREA είναι μεγαλύτερη αυτής του παράγοντα SOLVENT αλλά και της τιμής της αλληλεπίδρασης (SOLVENT*AREA) συμπεραίνουμε ότι η περιοχή από την οποία συλλέχθηκε η πρόπολη είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο τη μεταβλητή, φαινολικές ουσίες.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 15-16) βλέπουμε ότι με βάση τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) οι μέσοι όροι (αφού αντιστρέψουμε το μετασχηματισμό) κατατάσσονται ως εξής:

Μεθανόλη(99805,45)>μεθανόλη/νερό(79343,62)>νερό(19920,5)

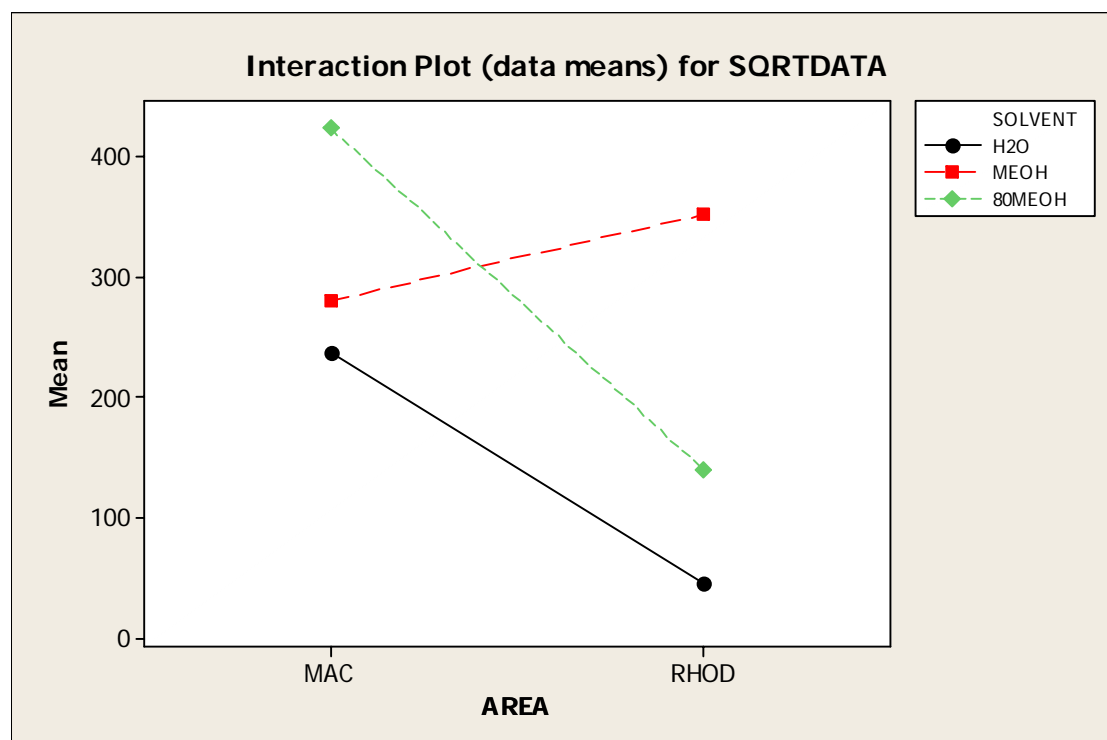
Άρα, η καθαρή μεθανόλη είναι ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης φαινολικών ουσιών και ακολουθούν το σύστημα μεθανόλη/νερό-80/20 και το νερό.

Επίσης, με βάση τον παράγοντα περιοχή (AREA) οι μέσοι όροι (αφού αντιστρέψουμε το μετασχηματισμό) κατατάσσονται ως εξής:

Δυτ. Μακεδονία(98175,69)>Ρόδος(32098,31)

Άρα το δείγμα της πρόπολης που συλλέχθηκε από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών ουσιών από αυτό της Ρόδου.

Τέλος, βλέπουμε ότι το εκχύλισμα της πρόπολης από τη Δυτ. Μακεδονία που παραλήφθηκε με μεθανόλη και νερό σε αναλογία 80/20 έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ολικών φαινολικών ουσιών (179631,81), ενώ το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Ρόδο έχει το μικρότερο (2094,89).



Σχήμα 47. Αλληλεπίδραση των παραγόντων διαλύτη, μεθανόλη-μεθανόλη/νερό-νερό (MEOH-80MEOH-H₂O) και της γεωγραφικής προέλευσης της πρόπολης, Δυτ. Μακεδονία-Ρόδος (MAC-RHOD) στη μεταβλητή ολικές φαινόλες.

5.3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών έγινε με χρωματομετρική μέθοδο όπου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 440 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης (0,025-0,25 mg/mL, $R^2=0,9713$) (Παράρτημα Β, Πιν. 29-30) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα, εκφρασμένη σε mg κερκετίνης/kg ξηρής ουσίας. Τα δείγματα στα οποία έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών είναι:

- i) Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας (1 g/L)
- ii) Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας (1 g/L)
- iii) Υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας (2,5 g/L)
- iv) Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης Ρόδου (5 g/L)
- v) Μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Ρόδου (5 g/L)
- vi) Υδατικό εκχύλισμα πρόπολης Ρόδου (5 g/L)

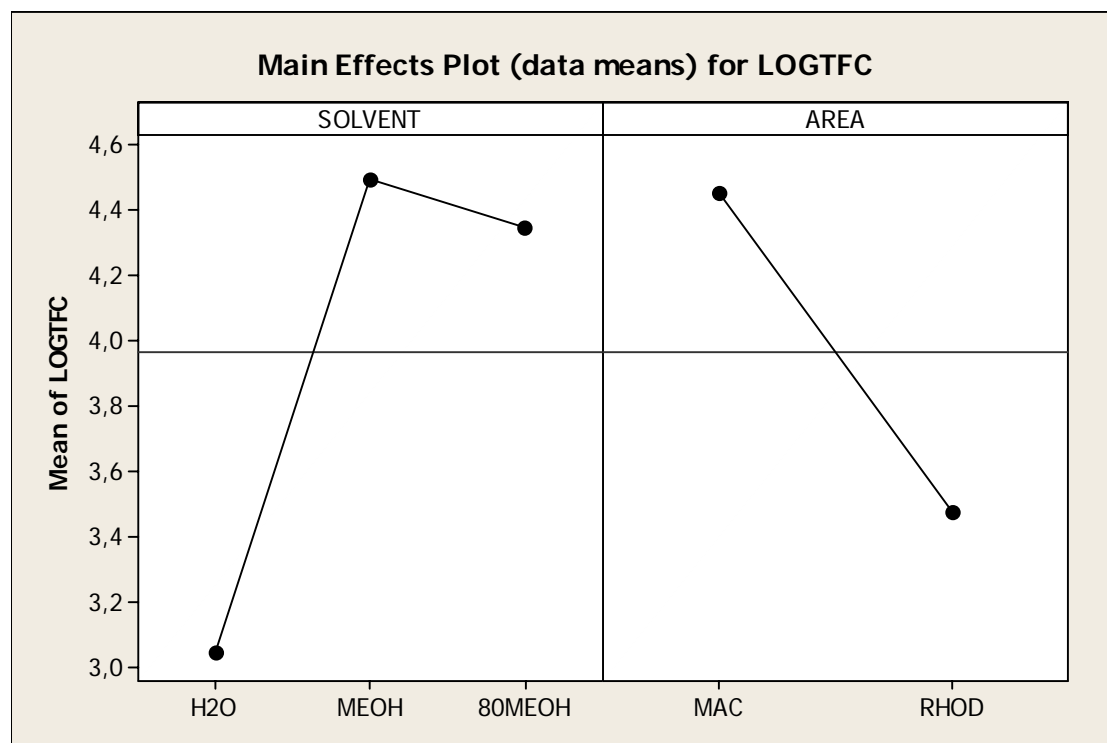
Πίνακας 9. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικά φλαβονοειδή (mg κερκετίνης / kg ξηρής ουσίας).

Εκχύλισμα		Συγκέντρωση (mg/kg)
Δυτ. Μακεδονία	Μεθανολικό	54512,19 ± 2502,23
	Μεθανολικό/υδατικό	88260,87 ± 2290,35
	Υδατικό	5046,15 ± 763,68
Ρόδος	Μεθανολικό	18392,71 ± 4579,1
	Μεθανολικό/υδατικό	5964,6 ± 855,6
	Υδατικό	247,81 ± 19,87

Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM) με το πρόγραμμα MINITAB 15 (Παράρτημα Α, σλ 17-18) όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη,

μεθανόλη/νερό, νερό) και ii) της γεωγραφικής προέλευσης της πρόπολης (Δυτ. Μακεδονία, Ρόδος) στη μεταβλητή ολικά φλαβονοειδή.

Αφού $p < 0,05$ και των δύο παραγόντων ισχύει η εναλλακτική υπόθεση και οι μέσοι όροι των δειγμάτων δεν είναι ίσοι μεταξύ τους.



Σχήμα 48. Διάγραμμα κύριων παραγόντων i. Διαλύτης (νερό(H₂O)-μεθανόλη/νερό(80MEOH)-μεθανόλη(MEOH)) και ii. Γεωγραφική προέλευση (Δυτ. Μακεδονία(MAC)-Ρόδος(RHOD))

Παρατηρούμε πως τόσο ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) όσο και ο παράγοντας περιοχή (AREA) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους. Επίσης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, χωρίς όμως το επίπεδο νερό (H₂O) του παράγοντα διαλύτης (SOLVENT) να συμμετέχει σε αυτήν.

Αφού η τιμή F παράγοντα AREA είναι μεγαλύτερη αυτής του παράγοντα SOLVENT αλλά και της τιμής της αλληλεπίδρασης (SOLVENT*AREA) συμπεραίνουμε ότι η περιοχή από την οποία συλλέχθηκε η πρόπολη είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο τη μεταβλητή, ολικά φλαβονοειδή.

Από τον πίνακα των Μ.Ο. (Παράρτημα Α, σλ 17-18) βλέπουμε ότι με βάση τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Μεθανόλη(31260,79)>μεθανόλη/νερό(22181,96)>νερό(1114,29)

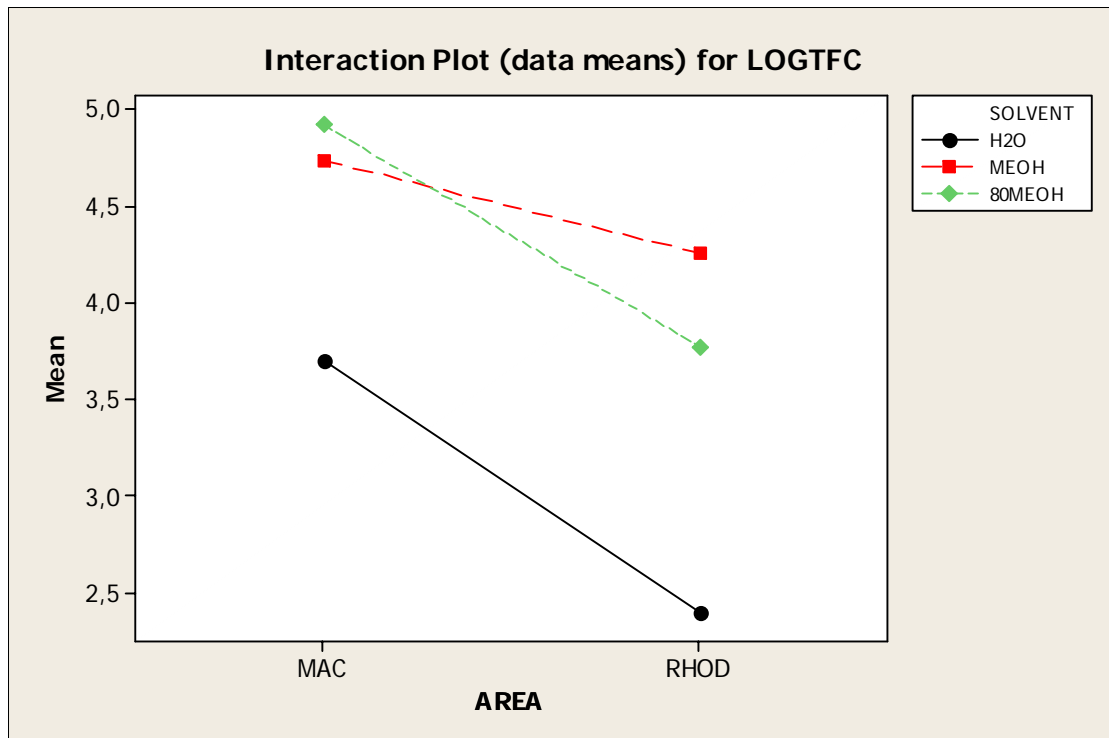
Άρα, η καθαρή μεθανόλη είναι ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης φλαβονοειδών και ακολουθούν το σύστημα μεθανόλη/νερό-80/20 και το νερό.

Επίσης, με βάση τον παράγοντα περιοχή (AREA) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Δυτ. Μακεδονία(98175,69)>Ρόδος(32098,31)

Άρα, το δείγμα της πρόπολης που συλλέχθηκε από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα φλαβονοειδών από αυτό της Ρόδου.

Τέλος, βλέπουμε ότι το εκχύλισμα της πρόπολης από τη Δυτ. Μακεδονία που παραλήφθηκε με μεθανόλη και νερό σε αναλογία 80/20 έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ολικών φλαβονοειδών (83176,38), ενώ το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Ρόδο έχει το μικρότερο (248,89).



Σχήμα 49. Αλληλεπίδραση των παραγόντων διαλύτη, μεθανόλη-μεθανόλη/νερό-νερό (MEOH-80MEOH-H₂O) και της γεωγραφικής προέλευσης της πρόπολης, Δυτ. Μακεδονία-Ρόδος (MAC-RHOD) στη μεταβλητή ολικά φλαβονοειδή.

5.3.5. Προσδιορισμός φαινολικών οξέων στα εκχυλίσματα πρόπολης με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography- RP HPLC)

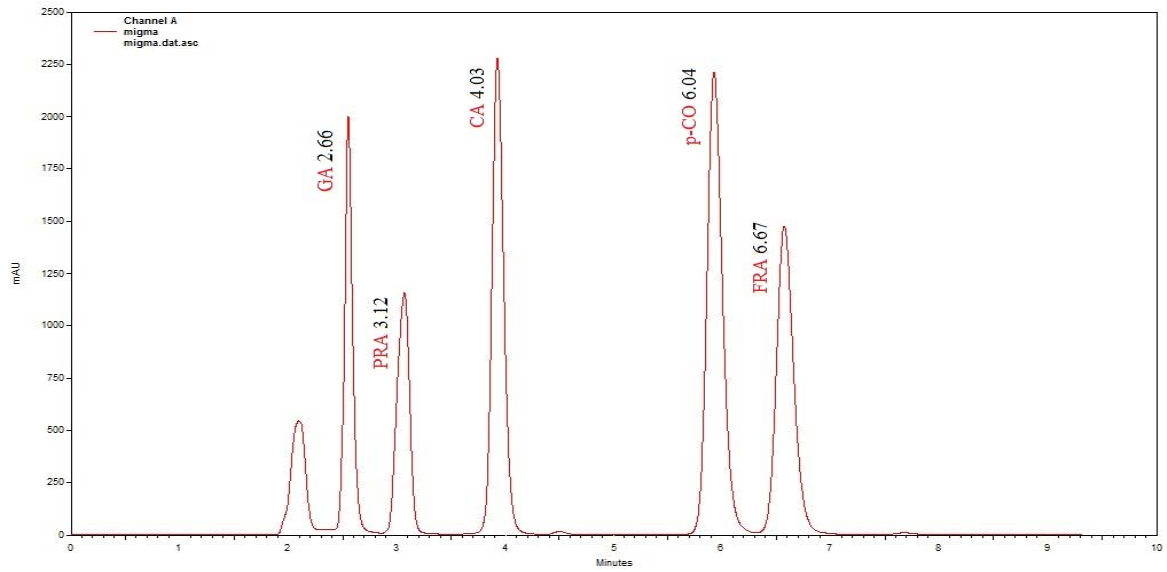
Τα δείγματα στα οποία έγινε υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών οξέων (φερουλικού, κουμαρικού και καφεϊκού οξέος) ήταν τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα από τη Δυτ. Μακεδονία και τη Ρόδο.

Ο διαχωρισμός έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) και ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με μίγμα διαλυτών ακετονιτρίλιο/νερό-οξικό οξύ (3,5%) (23/77 v/v). Η ροή διαλύτη έκλουσης ήταν 1 mL/min και ενέσιμη ποσότητα 10 μ L. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους στα 280 nm, μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν τα περισσότερα φαινολικά οξέα. Η ταυτοποίηση έγινε με βάση το χρόνο έκλουσης (retention time, RP) του κάθε ενός οξέος ξεχωριστά και με τη μέθοδο spiking (Χρωματογραφήματα στο Παράρτημα Β, σλ 18-19)

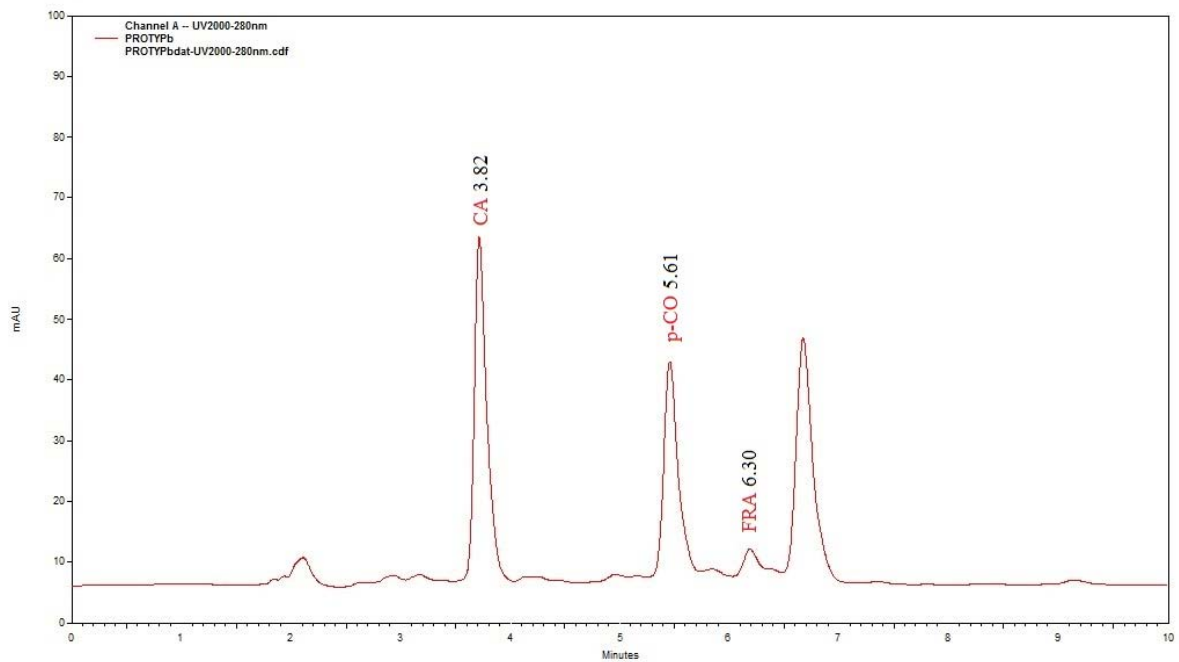
Για την ανάλυση των δειγμάτων 2,5 g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα Δυτ. Μακεδονίας και 5g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα Ρόδου χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες αναφοράς (καμπύλες αναφοράς στο Παράρτημα Β, σλ 16-17) με πρότυπα διαλύματα φαινολικών οξέων που ανήκουν στα υδροξυ-παράγωγα των κινναμωμικών οξέων (p-κουμαρικό, καφεϊκό και φερουλικό οξύ):

- i) Καφεϊκό οξύ (α) (10-100 ppm, $R^2=0,9995$, RT=3,8)
και καφεϊκό οξύ (β) (100-500 ppm, $R^2= 0,9981$, RT= 3,8)
- ii) Φερουλικό οξύ (10-100 ppm, $R^2=0,9975$, RT=6,3)
- iii) π-Κουμαρικό οξύ (20-100 ppm, $R^2=0,9998$, RT=5,5)

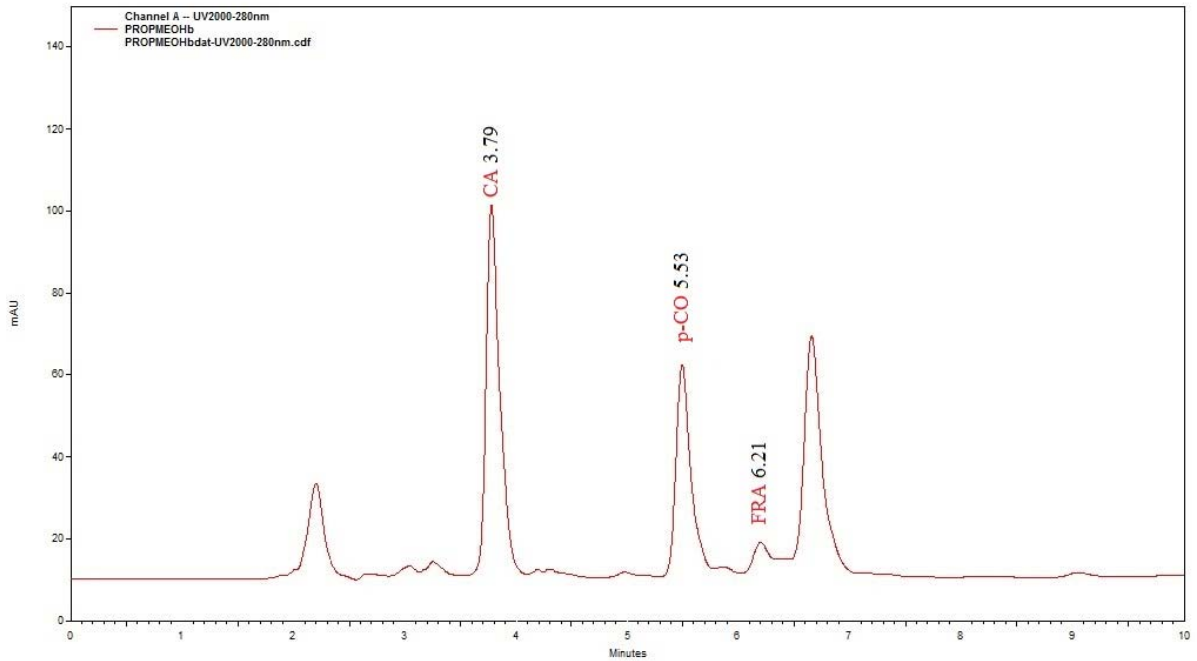
Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα.



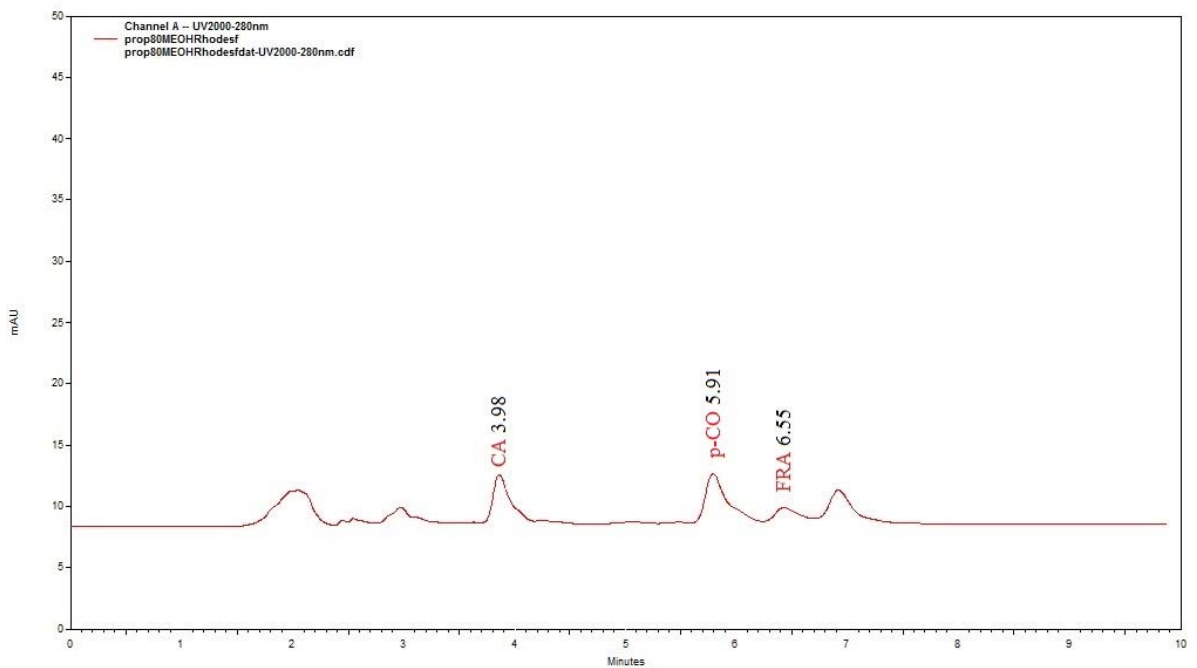
Σχήμα 50. Χρωματογράφημα μίγματος πρότυπων φαινολικών οξέων (GA: γαλλικό οξύ, PRA: πρωτοκατεχικό οξύ, CA: καφεϊκό οξύ, p-CO: π-κουμαρικό οξύ και FRA: φερουλικό οξύ)



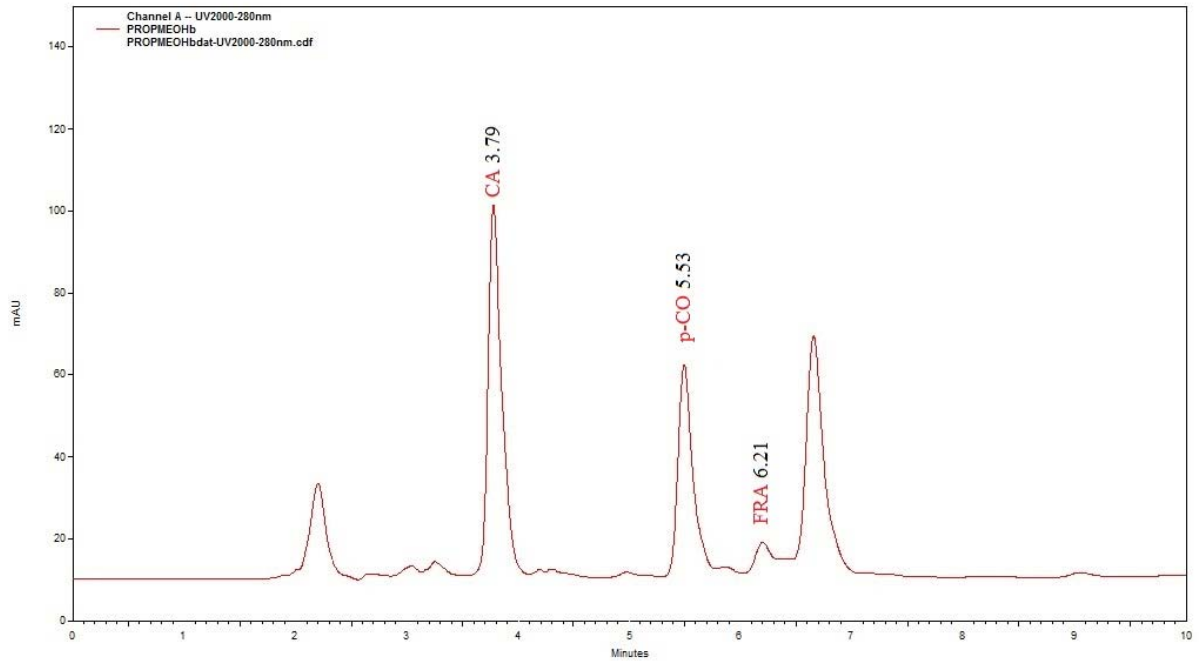
Σχήμα 51. Χρωματογράφημα μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας (CA: καφεϊκό, p-CO: π-κουμαρικό οξύ και FRA: φερουλικό) στα 280 nm.



Σχήμα 52. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας (CA: καφεϊκό, p-CO: π-κουμαρικό οξύ και FRA: φερουλικό) στα 280 nm.



Σχήμα 53. Χρωματογράφημα μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου (CA: καφεϊκό, p-CO: π-κουμαρικό οξύ και FRA: φερουλικό) στα 280 nm.



Σχήμα 54. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος Ρόδου (CA: καφεϊκό, p-CO: π-κουμαρικό οξύ και FRA: φερουλικό) στα 280 nm.

Πίνακας 10. Περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας σε φαινολικά οξέα (mg/kg ξηρής ουσίας)

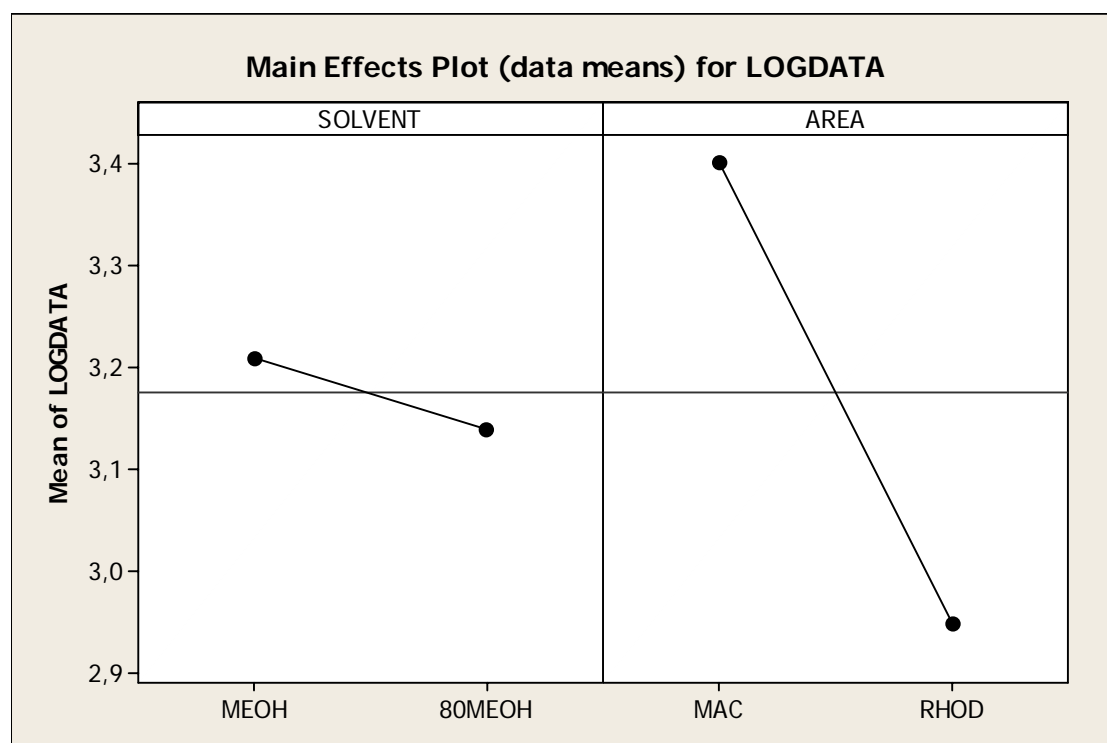
	Μεθανολικό	Μεθανολικό/υδατικό
Καφεϊκό οξύ	3880,05 ± 185,67	4172,11 ± 267,11
Κουμαρικό οξύ	1936,03 ± 355,07	3003 ± 183,61
Φερουλικό οξύ	878,29 ± 67,29	1407,62 ± 24,62
ΣΥΝΟΛΟ	2231,376 ± 150,481	2860,99 ± 148,001

Πίνακας 11. Περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων πρόπολης Ρόδου σε φαινολικά οξέα (mg/kg ξηρής ουσίας)

	Μεθανολικό	Μεθανολικό/υδατικό
Καφεϊκό οξύ	1300 ± 115,43	638,87 ± 8,56
Κουμαρικό οξύ	1344,2 ± 27,02	829,51 ± 11,6
Φερουλικό οξύ	907,54 ± 48,1	535, 79 ± 25,18
ΣΥΝΟΛΟ	1184, 781 ± 49,86	668,058 ± 11,06

Εφαρμόστηκε η ανάλυση της διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM) με το πρόγραμμα MINITAB 15 (Παράρτημα Α, σλ 19-20) όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη, μεθανόλη/νερό) και ii) της γεωγραφικής προέλευσης (Δυτ. Μακεδονία, Ρόδος) στη μετρούμενη μεταβλητή (συγκέντρωση φαινολικών οξέων).

Αφού $p < 0,05$ μόνο για τον παράγοντα AREA, καταλαβαίνουμε ότι μόνο ο παράγοντας γεωγραφική προέλευση επηρεάζει τη μεταβλητή φαινολικά οξέα ενώ ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) όχι.



Σχήμα 55. Διάγραμμα κύριων παραγόντων i. Διαλύτης (μεθανόλη(MEOH)-

μεθανόλη/νερό(80MEOH)) και ii. Γεωγραφική προέλευση (Δυτ.Μακεδονία(MAC)-Ρόδος(RHOD)) που επιδρούν στη μεταβλητή συγκέντρωση φαινολικών οξέων.

Από το διάγραμμα κύριων παραγόντων (Σχ. 55) παρατηρούμε πως ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) και ο παράγοντας γεωγραφική προέλευση (AREA) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους. Επίσης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων.

Αφού η τιμή F του παράγοντα AREA είναι μεγαλύτερη από αυτή της αλληλεπίδρασης SOLVENT*AREA, συμπεραίνουμε ότι η γεωγραφική προέλευση μόνο είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο τη μεταβλητή, συγκέντρωση φαινολικών οξέων.

Από τον πίνακα των M.O. (Παράρτημα Α, σλ 20) παρατηρούμε ότι με βάση τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Μεθανόλη(1625,55)>μεθανόλη/νερό(1380,38)

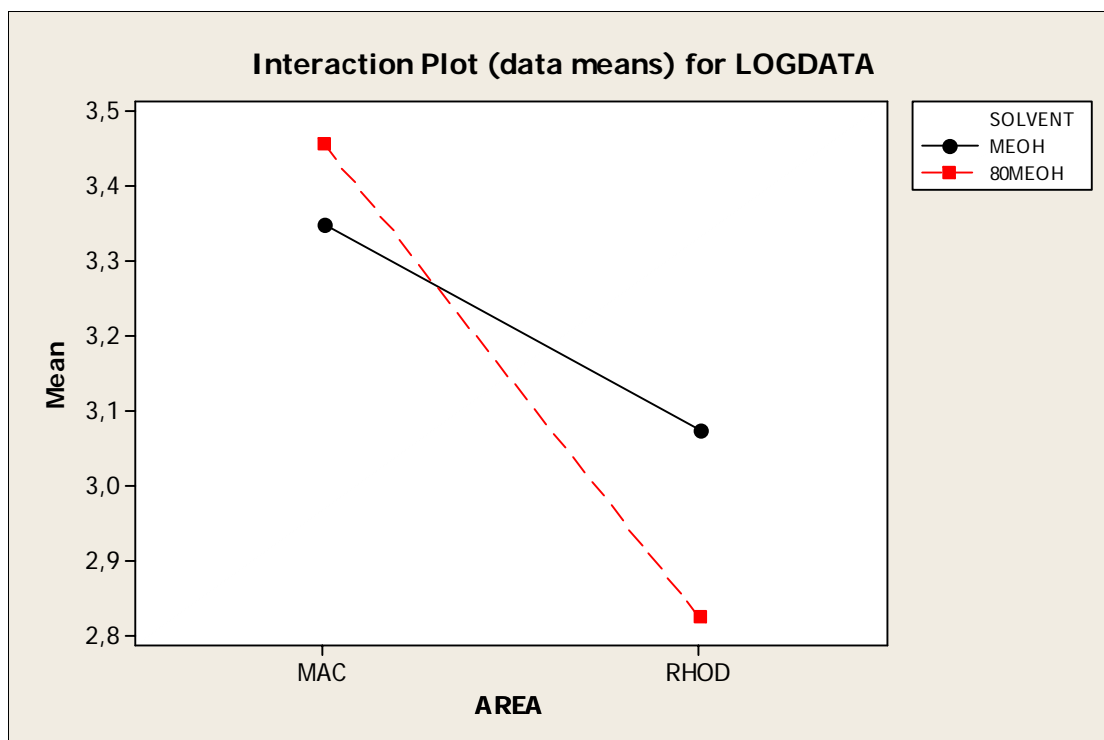
Άρα, η μεθανόλη είναι ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης φαινολικών οξέων και ακολουθούν ο συνδυασμός μεθανόλης/νερού.

Με βάση τον παράγοντα γεωγραφική προέλευση (AREA) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Δυτ. Μακεδονία(2523,48)>Ρόδος(889,2)

Άρα, στο δείγμα πρόπολης από τη Δυτ. Μακεδονία προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών οξέων που μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν σε σχέση με τη Ρόδο.

Τέλος, τη μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών οξέων έχει, με διαφορά, το μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα της Δυτ. Μακεδονίας (2857,59) ενώ τη μικρότερη με διαφορά το μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα από τη Ρόδο (668,34).



Σχήμα 56. Αλληλεπίδραση των παραγόντων διαλύτη μεθανόλη-μεθανόλη/νερό (MEOH-80MEOH) και γεωγραφικής προέλευσης Δυτ. Μακεδονία-Ρόδος (MAC-RHOD) στη μεταβλητή φαινολικά οξέα.

5.3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα πρόπολης με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography- RP HPLC)

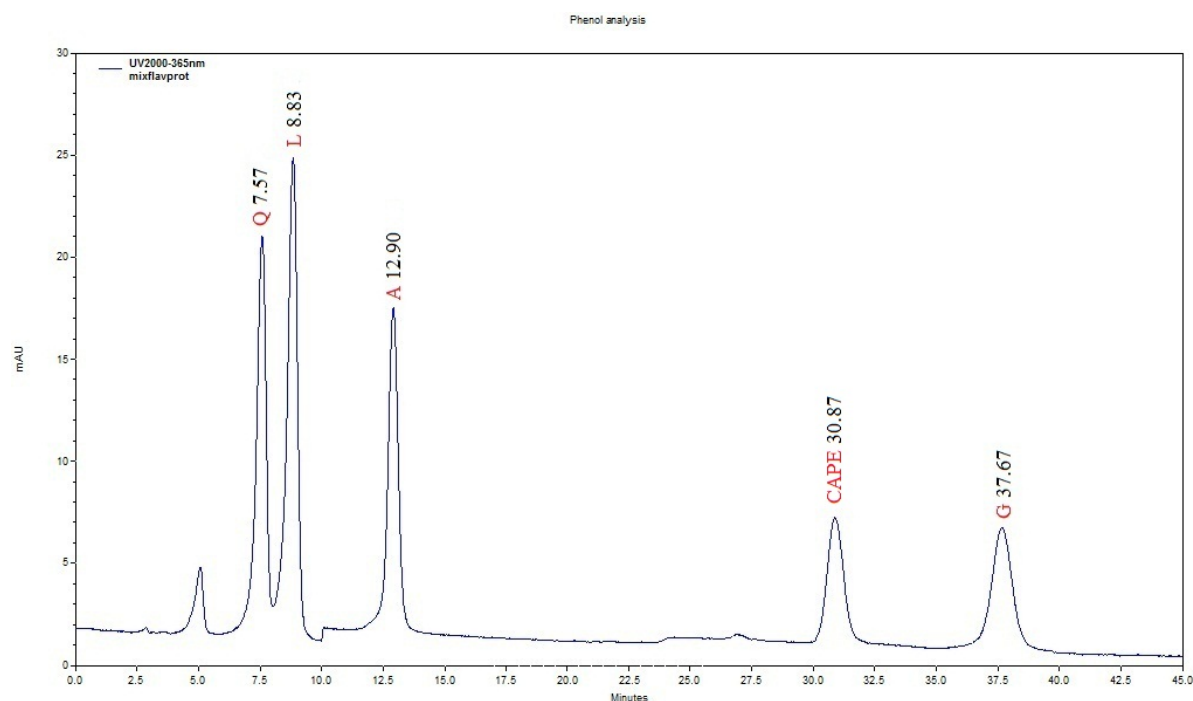
Τα δείγματα στα οποία έγινε υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός φλαβονοειδών (απιγενίνης, γκαλαγκίνης, κερκετίνης και λουτεολίνης) ήταν τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα από τη Δυτ. Μακεδονία και τη Ρόδο.

Ο διαχωρισμός έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) και ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με μίγμα διαλυτών μεθανόλη/νερό-φωσφορικό οξύ (0,4%) (60/40 v/v). Η ροή διαλύτη έκλουσης ήταν 0,8 mL/min και ενέσιμη ποσότητα 10 μL. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους στα 365 nm, μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν τα περισσότερα φλαβονοειδή. Η ταυτοποίηση έγινε με βάση το χρόνο έκλουσης (retention time, RP) του κάθε ενός φλαβονοειδούς ξεχωριστά και με

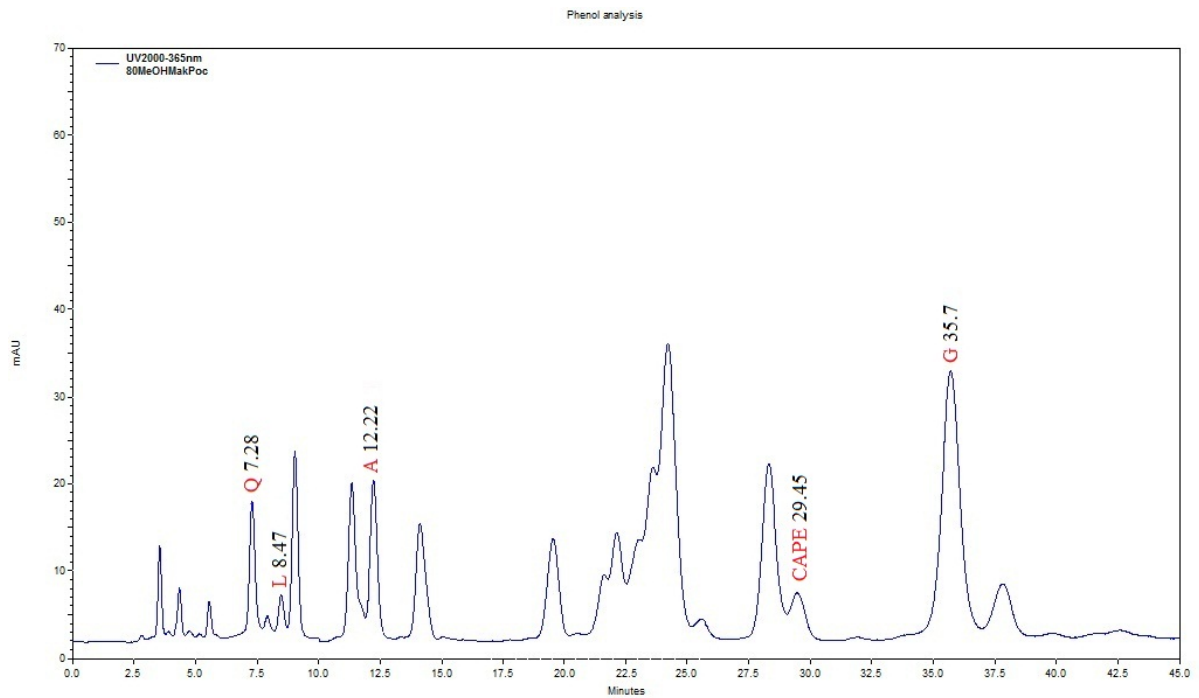
τη μέθοδο spiking. (Χρωματογραφήματα στο Παράρτημα Β, σλ 20-22). Στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες εκλούστηκε επίσης και ταυτοποιήθηκε η παρουσία του φαινυλαιθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος στα εκχυλίσματα όμως δεν ήταν οι βέλτιστες ώστε να γίνει και η ποσοτική ανάλυση.

Για την ανάλυση των δειγμάτων συγκέντρωσης 2,5 g/L και 5 g/L για τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα Δυτ. Μακεδονίας και Ρόδου, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης (καμπύλη αναφοράς Παράρτημα Β, σλ 17) στις συγκεντρώσεις 2,5-100 ppm.

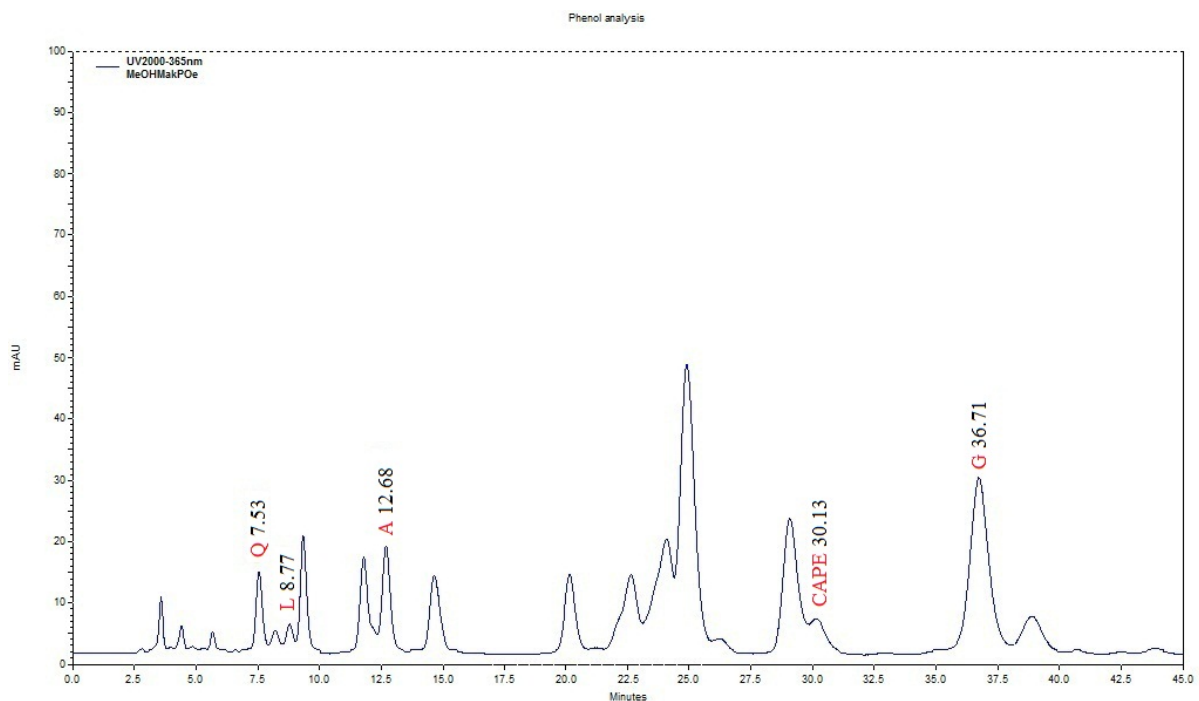
Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα.



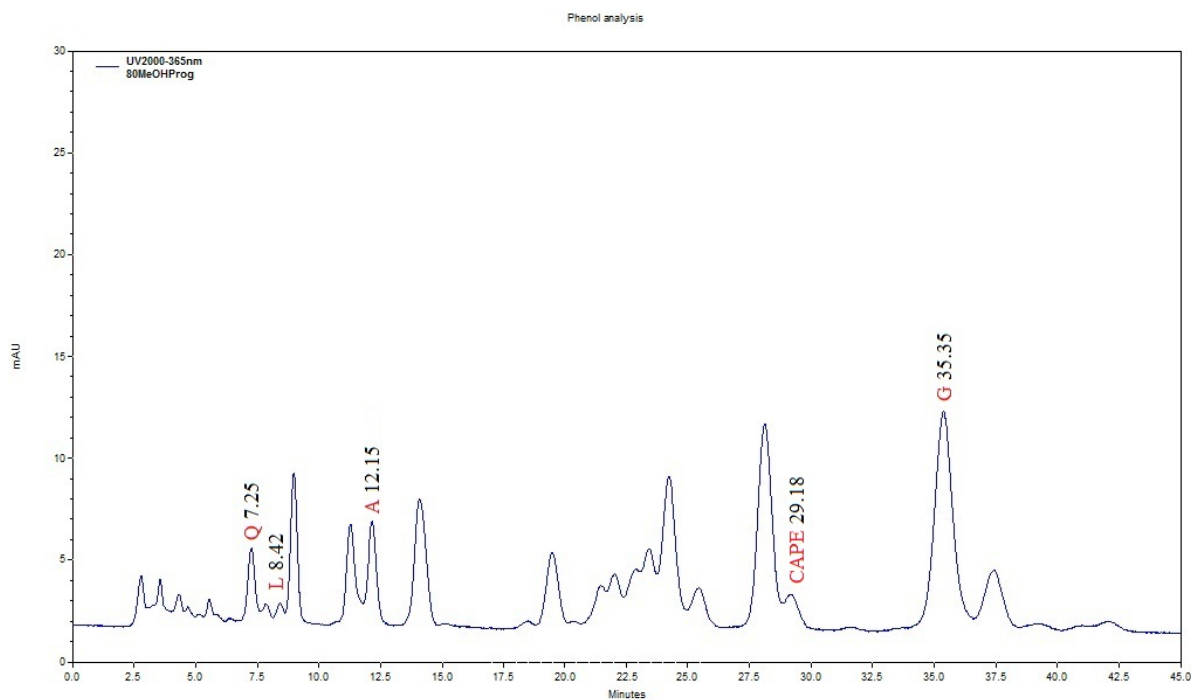
Σχήμα 57. Χρωματογράφημα μίγματος πρότυπων φλαβονοειδών (Q: κερκετίνη, L: λουτεολίνη, A: απιγενίνη, CAPE: φαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και G: γκαλαγκίνη) στα 365 nm.



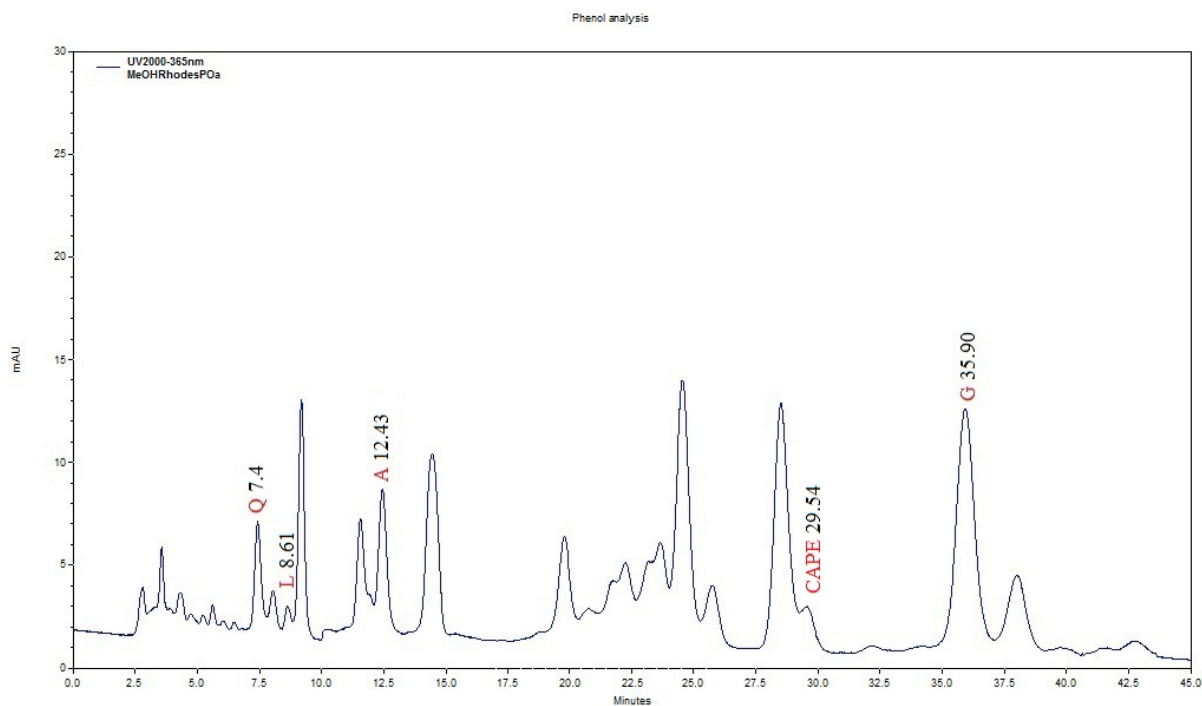
Σχήμα 58. Χρωματογράφημα μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας (*Q*: κερκετίνη, *L*: λουτεολίνη, *A*: απιγενίνη, *CAPE*: φαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και *G*: γκαλαγκίνη) στα 365 nm.



Σχήμα 59. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας (*Q*: κερκετίνη, *L*: λουτεολίνη, *A*: απιγενίνη, *CAPE*: φαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και *G*: γκαλαγκίνη) στα 365 nm.



Σχήμα 60. Χρωματογράφημα μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου (*Q*: κερκετίνη, *L*: λουτεολίνη, *A*: απιγενίνη, *CAPE*: φαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και *G*: γκαλαγκίνη) στα 365 nm.



Σχήμα 61. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος Ρόδου (Q: κερκετίνη, L: λουτεολίνη, A: απιγενίνη, CAPE: φαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και G: γκαλαγκίνη) στα 365 nm.

Πίνακας 12. Περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων πρόπολης Δυτ. Μακεδονίας σε φλαβονοειδή (mg/kg ξηρής ουσίας)

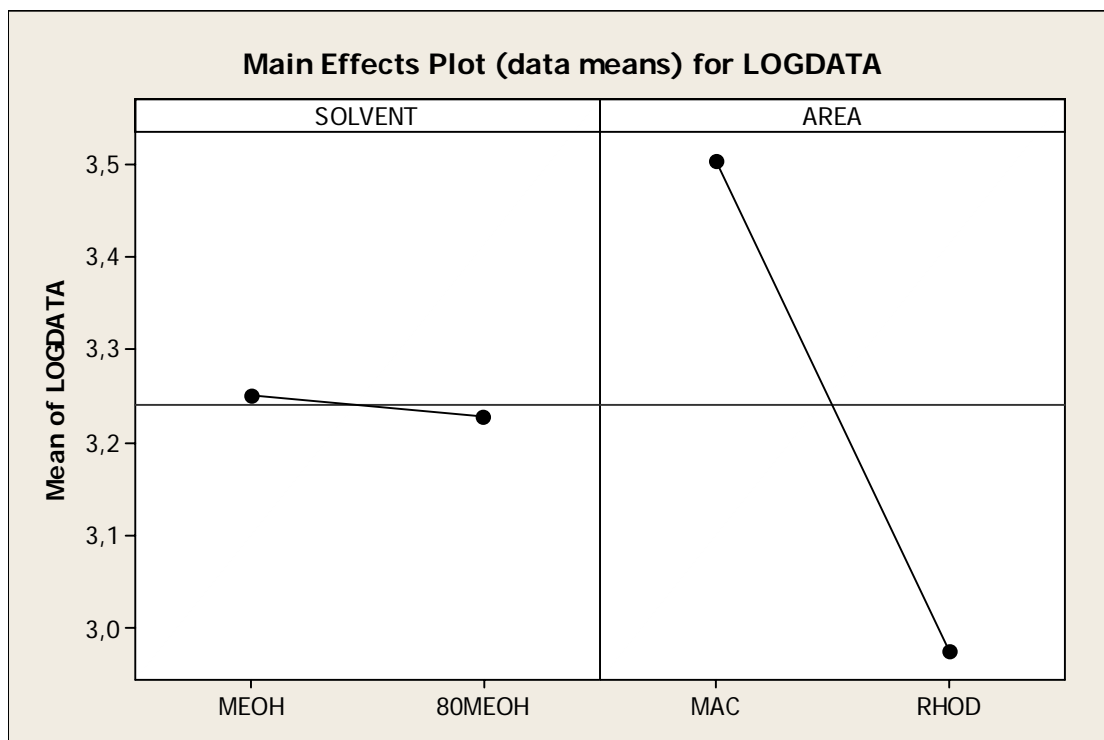
	Μεθανολικό	Μεθανολικό/υδατικό
Απιγενίνη	2116,5 ± 105,66	2741,8 ± 299
Γκαλαγκίνη	6957,26 ± 1157	8551,2 ± 643,6
Κερκετίνη	1488,5 ± 180	2086,7 ± 153,2
Λουτεολίνη	718,8 ± 118,46	1117,9 ± 251,92
ΣΥΝΟΛΟ	2820,292 ± 385,56	3624,39

Πίνακας 13. Περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων πρόπολης Ρόδου σε φλαβονοειδή (mg/kg ξηρής ουσίας)

	Μεθανολικό	Μεθανολικό/υδατικό
Απιγενίνη	953,74 ± 19,59	476,9 ± 20,48
Γκαλαγκίνη	2328,9 ± 133	1316,7 ± 133,39
Κερκετίνη	767,47 ± 17,54	417,3 ± 12,94
Λουτεολίνη	502,73 ± 6,4	295,6 ± 2,31
ΣΥΝΟΛΟ	1138,243 ± 40,37	801,627 ± 158,57

Εφαρμόστηκε η ανάλυση της διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων (General Linear Model, GLM) με το πρόγραμμα MINITAB 15 (Παράρτημα Α, σλ 21-22) όπου μελετήθηκε συγχρόνως η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη, μεθανόλη/νερό) και ii) της γεωγραφικής προέλευσης (Δυτ. Μακεδονία, Ρόδος) στη μετρούμενη μεταβλητή (συγκέντρωση φλαβονοειδών).

Αφού $p < 0,05$ μόνο για τον παράγοντα AREA, καταλαβαίνουμε ότι μόνο ο παράγοντας γεωγραφική προέλευση επηρεάζει τη μεταβλητή συγκέντρωση φλαβονοειδών ενώ ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) όχι.



Σχήμα 62. Διάγραμμα κύριων παραγόντων i. Διαλύτης (νερό(H_2O)-μεθανόλη(MEOH)-μεθανόλη/νερό(80MEOH)) και ii. Γεωγραφική προέλευση (Δυτ.Μακεδονία(MAC)-Ρόδος(RHOD)) που επιδρούν στη μεταβλητή φλαβονοειδών.

Από το διάγραμμα κύριων παραγόντων (Σχ. 62) παρατηρούμε πως ο παράγοντας διαλύτης (SOLVENT) και ο παράγοντας γεωγραφική προέλευση (AREA) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους. Επίσης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων.

Αφού η τιμή F του παράγοντα AREA είναι μεγαλύτερη από αυτή της αλληλεπίδρασης SOLVENT*AREA, συμπεραίνουμε ότι η γεωγραφική προέλευση μόνο είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο τη μεταβλητή, συγκέντρωση φλαβονοειδών

Από τον πίνακα των M.O. (Παράρτημα Α, σλ 22) παρατηρούμε ότι με βάση τον παράγοντα διαλύτη (SOLVENT) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Μεθανόλη(1786,49)>μεθανόλη/νερό(1690,42)

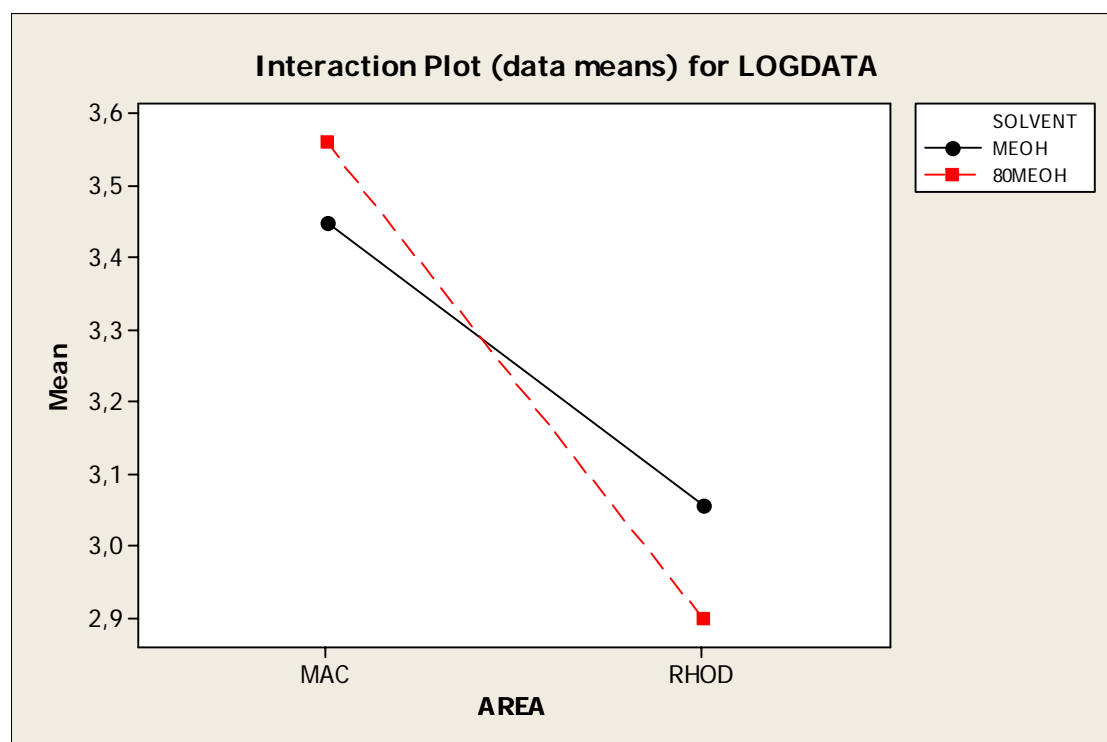
Άρα, η μεθανόλη είναι ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης φλαβονοειδών και ακολουθεί ο συνδυασμός μεθανόλης/νερού.

Με βάση τον παράγοντα γεωγραφική προέλευση (AREA) οι μέσοι όροι (αφού αντιλογαριθμήσουμε) κατατάσσονται ως εξής:

Δυτ. Μακεδονία(3184,2)>Ρόδος(948,42)

Άρα, στο δείγμα πρόπολης από τη Δυτ. Μακεδονία προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα φλαβονοειδών που μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν σε σχέση με τη Ρόδο.

Τέλος, τη μεγαλύτερη ποσότητα φλαβονοειδών έχει το μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα της Δυτ. Μακεδονίας (3622,63) ενώ τη μικρότερη, με διαφορά, το μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα από τη Ρόδο (790,68).



Σχήμα 63. Αλληλεπίδραση των παραγόντων διαλύτης μεθανόλη-μεθανόλη/νερό (MEOH-80MEOH) και γεωγραφικής προέλευσης Δυτ. Μακεδονία-Ρόδος (MAC-RHOD) στη μεταβλητή συγκέντρωση φλαβονοειδών.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε πολύπλοκα συστήματα όπως είναι τα τρόφιμα λαμβάνουν χώρα διαφορετικοί μηχανισμοί οξειδωσης, με αποτέλεσμα να παράγονται και διαφορετικά είδη δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ επιπρόσθετα και τα ιόντα μεταβατικών μετάλλων παίζουν ένα σημαντικό ρόλο, οπότε είναι σημαντικό να εξετάζονται τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται από φυσικές πηγές με διαφορετικές μεθόδους μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης. Οι ελεύθερες ρίζες που εμπλέκονται στους μηχανισμούς οξειδωσης λιπιδίων παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση χρόνιων ασθενειών και στη διαδικασία της γήρανσης.

Η σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φυτοχημικών ενώσεων και εκχυλισμάτων φυτών όπως και εκχυλισμάτων πρόπολης (Moreno et al., 2000; Derkevicius et al., 2002; Dorman et al., 2004; Kumazawa et al., 2004; Capecka et al., 2005; Wong et al., 2006; Laskar et al., 2010). Η αναγωγή ιόντων τρισθενούς σιδήρου χρησιμοποιείται επίσης συχνά ως δείκτης της ικανότητας μεταφοράς ηλεκτρονίου (electron-donating activity) (Hinneburg et al., 2006; Mohammadzadeh et al., 2006; Wong et al., 2006; Politeo et al., 2007; Sarikaya et al., 2007; Kalogeropoulos et al., 2009; Laskar et al., 2010) και θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός δράσης κυρίως των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

Οι μέθοδοι εκχύλισης της πρόπολης μπορεί να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική δράση της και οι διαφορετικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται μπορούν να συνεισφέρουν στην παραλαβή διαφορετικών ενώσεων. Οι πιο κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις περισσότερες μελέτες μέχρι τώρα για την εκχύλιση της πρόπολης ήταν κυρίως η αιθανόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, η μεθανόλη και το νερό. Οι μέθοδοι αντιοξειδωτικής δράσης που εφαρμόστηκαν για την εκτίμηση των εκχυλισμάτων της πρόπολης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ήταν κυρίως η ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας (DPPH), της αναγωγής ιόντων τρισθενούς σιδήρου (FRAP) και της συζευγμένης οξειδωσης β-καροτενίου/λινελαϊκού οξέος (β-carotene/linoleic acid).

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία επιλέχθηκαν δείγματα πρόπολης από την ηπειρωτική και την νησιωτική Ελλάδα (Δυτική Μακεδονία και Ρόδος) και ως διαλύτες εκχύλισης η μεθανόλη, μεθανόλη/νερό (80/20) και το νερό με σκοπό να γίνει εκτίμηση της αντιοξειδωτικής, της αναγωγικής δράσης και φαινολικής σύστασης των επιμέρους κλασμάτων. Ως μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να μην επηρεαστεί από τη θέρμανση η οξειδωτική σταθερότητα των δραστικών πολυφαινολικών συστατικών που βρίσκονται στα εκχυλίσματα της πρόπολης.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH στη συγκεκριμένη εργασία έδειξαν ότι τα μεθανολικά (IC_{50} 0,4755 g/ml) και μεθανολικά/υδατικά (80/20) (IC_{50} 0,4678 mg/ml) εκχυλίσματα της πρόπολης και από τις δύο γεωγραφικές περιοχές (Δυτική Μακεδονία, Ρόδος) έδειξαν υψηλότερη ικανότητα αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας από τα αντίστοιχα υδατικά εκχυλίσματα (IC_{50} 0,6010 mg/ml). Άρα η αναλογία των διαλυτών μεθανόλης/νερού (80/20) και η καθαρή μεθανόλη ήταν οι καλύτεροι διαλύτες εκχύλισης αντιοξειδωτικά δραστικών ουσιών και ακολούθησε το νερό. Το εκχύλισμα μεθανόλης/νερού (80/20) πρόπολης από τη Δυτική Μακεδονία είχε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (IC_{50} 0,14 mg/ml), ενώ το υδατικό εκχύλισμα από τη Ρόδο, είχε τη μικρότερη δράση (IC_{50} 1,56 mg/ml). Η γεωγραφική περιοχή από την οποία συλλέχθηκε η πρόπολη ήταν αυτή που επηρέασε περισσότερο τη μεταβλητή αντιοξειδωτική δράση και λιγότερο το είδος του διαλύτη. Η πρόπολη από τη Δυτική Μακεδονία συνολικά είχε την καλύτερη δράση αδρανοποίησης της ρίζας DPPH (IC_{50} 0,182 mg/ml).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου FRAP έδειξαν ότι η μεθανόλη/νερό (80/20) ήταν ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης αναγωγικά δραστικών ουσιών (IC_{50} 0,007) και ακολούθησαν η μεθανόλη (IC_{50} 0,0097) και το νερό (IC_{50} 0,0396). Το εκχύλισμα μεθανόλης/νερού (80/20) της πρόπολης από τη Δυτική Μακεδονία, είχε τη μεγαλύτερη αναγωγική δράση (IC_{50} 0.0065 mg/ml), ενώ το υδατικό εκχύλισμα από τη Ρόδο είχε τη μικρότερη δράση (IC_{50} 0.1690). Η γεωγραφική περιοχή από την οποία συλλέχθηκε η πρόπολη ήταν αυτή που επηρέασε περισσότερο τη μεταβλητή αναγωγική δράση και λιγότερο το είδος του διαλύτη. Το δείγμα της πρόπολης που συλλέχθηκε από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας (IC_{50} 0,0139 mg/ml) εμφάνισε συνολικά μεγαλύτερη αναγωγική δράση από αυτό της Ρόδου (IC_{50} 0,20128 mg/ml).

Σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική μελέτη των πρότυπων φαινολικών ενώσεων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο τα υδροξυκινναμωμικά (καφεϊκό και φερουλικό οξύ) όσο και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα φαινολικά οξέα (γαλλικό και πρωτοκατεχικό οξύ) καθώς και η φλαβονόλη κερκετίνη ήταν σημαντικοί παράγοντες αδρανοποίησης της ρίζας DPPH (IC_{50} 0,016-0,098 mg/ml). Όλες οι φυσικές φαινολικές ενώσεις παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλίσματα της πρόπολης καθώς και από το συνθετικό φαινολικό αντιοξειδωτικό BHT (IC_{50} 0,207 mg/ml). Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυ-βενζοϊκό οξύ) είχε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (IC_{50} 0,016 mg/ml) και ακολούθησαν το πρωτοκατεχικό (3,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ) (IC_{50} 0,028 mg/ml), το καφεϊκό (3,4-διυδροξυ-κινναμωμικό οξύ) (IC_{50} 0,032 mg/ml), η κερκετίνη (IC_{50} 0,039 mg/ml) και το φερουλικό οξύ (3-μεθοξυ-4-υδροξυκινναμωμικό οξύ) (IC_{50} 0,098 mg/ml).

Τα αποτελέσματα της αναγωγικής δράσης FRAP έδειξαν ότι το καφεϊκό οξύ παρουσίασε ισχυρότερη αναγωγική δράση (IC_{50} 0,00157 mg/ml) από το ασκορβικό οξύ (IC_{50} 0,002298 mg/ml), γνωστό για τις ισχυρές αναγωγικές του ιδιότητες, ενώ το γαλλικό οξύ (IC_{50} 0,00227 mg/ml) είχε τα ίδια με αυτό επίπεδα αναγωγικής δράσης. Μετά το ασκορβικό οξύ ακολούθησαν η φλαβονόλη κερκετίνη (IC_{50} 0,0101 mg/ml) και τα φαινολικά οξέα πρωτοκατεχικό (IC_{50} 0,017860 mg/ml) και φερουλικό οξύ (IC_{50} 0,060067 mg/ml).

Μετρήθηκε επίσης η ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας DPPH και η αναγωγική ικανότητα τριων πρότυπων φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών της λουτεολίνης, απιγενίνης και γκαλαγκίνης (στα 500 ppm) και βρέθηκε ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση παρουσίασε η φλαβονόνη λουτεολίνη (84,23% και 74,28% αντίστοιχα) (με δομή ο-διφαινόλης στο Β δακτύλιο) και ακολούθησε η φλαβονόλη γκαλαγκίνη (54,24% και 60,76%), ενώ η φλαβονόνη απιγενίνη (με ένα -OH στον δακτύλιο Β) είχε πολύ μικρότερη δράση (1,17% και 12,71% αντίστοιχα).

Όλα τα εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας παρουσίασαν ίση ή και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT (IC_{50} 0,207 mg/ml). Τα μεθανολικά (IC_{50} 0,0097 mg/ml) και μεθανολικά/υδατικά εκχυλίσματα (IC_{50} 0,007 mg/ml) της Δυτ. Μακεδονίας εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα αναγωγικής δράσης από τα φαινολικά οξέα πρωτοκατεχικό (IC_{50} 0,0179 mg/ml) και φερουλικό οξύ (IC_{50} 0,0600 mg/ml) και τα ίδια επίπεδα δράσης με την φλαβονόλη κερκετίνη

(IC₅₀ 0,0101 mg/ml). Το υδατικό εκχύλισμα της Δυτ. Μακεδονίας (IC₅₀ 0,0396 mg/ml) παρουσίασε μεγαλύτερη αναγωγική δράση από το φερουλικό οξύ (IC₅₀ 0,0600 mg/ml).

Σε παρόμοιες εργασίες φαίνεται καθαρά η επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος της πρόπολης που μελετήθηκε στο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα και λιγότερο η επίδραση του διαλύτη. Σε ότι αφορά την ελληνική πρόπολη οι Kalogeropoulos et al. (2009) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου με τις μεθόδους DPPH και FRAP. Με τη μέθοδο DPPH τα εκχυλίσματα της πρόπολης έδειξαν μια σημαντική δράση στην αδρανοποίηση της DPPH ρίζας, (κυμαινόμενα από 0,33-1,11 mmol Trolox/g εκχυλίσματος). Υπήρχε μία τάση για υψηλότερες τιμές στη πρόπολη από τη Πελοπόννησο και τη Στερεά Ελλάδα. Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο FRAP έδειξαν ότι (η αναγωγική ικανότητα στα εκχυλίσματα της πρόπολης κυμαινόταν μεταξύ 2,14 και 3,35 mmol ασκορβικού οξέος/g εκχυλίσματος), σχετικά υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στη Πελοπόννησο και στη Στερεά Ελλάδα ενώ χαμηλότερες στα νησιά και στη Κύπρο (Kalogeropoulos et al., 2009).

Επίσης οι Banskota et al. (2000) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο DPPH σε διαφορετικά δείγματα πρόπολης από τη Βραζιλία, Περού, την Ολλανδία και την Κίνα τα οποία εκχυλίστηκαν με μεθανόλη και με νερό. Βρήκαν ότι τα υδατικά εκχυλίσματα από τη Βραζιλία και την Κίνα είχαν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τα μεθανολικά. Οι τιμές IC₅₀ από αυτά τα δείγματα κυμάνθηκαν από 5,9-14,2 μg/mL. Ενώ τα μεθανολικά εκχυλίσματα από το Περού και την Ολλανδία έδειξαν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τα υδατικά. Τα υδατικά εκχυλίσματα και από τα δύο δείγματα B-2 (CPI-type) (πρόπολη που συλλέχθηκε με ειδική κατεργασία) και B-5 (πράσινη πρόπολη) έδειξαν πιο ισχυρή δράση με τιμές IC₅₀ 5,9 μg/mL, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα από το Περού έδειξαν τιμές 94,9 μg/mL. Το καφεϊκό οξύ το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, είχε τιμή IC₅₀ 1,9 μg/mL (Banskota et al., 2000).

Όταν εξετάστηκε η ικανότητα 5 διαφορετικών δειγμάτων πρόπολης από τη Βραζιλία, στην αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας –DPPH σε σύγκριση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα και τα υδατικά έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση

(Matsushige et al., 1995). Οι Laskar et al. (2010), μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση αιθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος ινδικής πρόπολης με τη μέθοδο DPPH όπου βρήκαν ότι το IC₅₀ για το υδατικό εκχύλισμα ήταν 0,05 mg/mL ενώ για το αιθανολικό ήταν 0,07 mg/mL. Και τα δύο IC₅₀ ήταν συγκρίσιμα με αυτά του γαλλικού οξέος το οποίο βρέθηκε 0,01 mg/mL. Οι ίδιοι επίσης μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης με την αναγωγική μέθοδο FRAP όπου μέτρησαν την αναγωγική δράση του υδατικού και αιθανολικού εκχυλίσματος σε σχέση με αυτή του ασκορβικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Η αναγωγική δράση του ασκορβικού οξέος ήταν φανερά υψηλότερη από τα δύο εκχυλίσματα, αλλά στη συγκέντρωση των 100 µg/mL, τα δύο εκχυλίσματα είχαν συγκρίσιμη αναγωγική δράση (p<0,05). Στη χαμηλότερη συγκέντρωση το αιθανολικό εκχύλισμα έδειξε υψηλότερη αναγωγική δράση αλλά στο σύνολο τους το υδατικό είχε μεγαλύτερη αναγωγική δράση.

Σε συμφωνία με άλλες μελέτες πρότυπων φαινολικών οξέων, τα φαινολικά οξέα με ο-διφαινολική δομή (δομή κατεχόλης) όπως το πρωτοκατεχικό (3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ) και το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυκιναμωμικό οξύ) παρουσίασαν ισχυρή δράση αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών. Το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Lu and Foo, 2001). Το φερουλικό οξύ (4-υδροξυ-3-μεθοξυκιναμωμικό οξύ) το μεθοξυπαράγωγο του καφεϊκού οξέος βρίσκεται ευρέως στους φυτικούς ιστούς και αποτελεί βιοδραστικό συστατικό των τροφίμων. Μια από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις του φερουλικού οξέος είναι οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Graf, 1992). Με τον τρόπο αυτό το FA προστατεύει το DNA και τα λιπίδια από την οξειδωση που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Anselmi et al., 2004, Ogiwara et al., 2002, Srinivasan et al., 2006).

Μελέτες δομής δράσης σε κινναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους έδειξαν τη σημασία που έχει η δομή της κατεχόλης στην ικανότητα αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών (Chen, J.H. and Ho, C.T., 1997). Φαινολικές ενώσεις με δύο ή και τρία υδροξύλια έδειξαν υψηλότερη ικανότητα αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών από το ασκορβικό οξύ και την α-τοκοφερόλη (Torres et al., 2007). Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (GA), έδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο σε γαλακτώματα όσο και σε λιπαρά υποστρώματα (Madsen & Bertelsen 1995, Nakatani 1992). Η αντιοξειδωτική του δράση ήταν παρόμοια του Trolox και πιο ισχυρή από

άλλα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (AA) (Cholbi et al., 1991).

Η κερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό *in vitro*. Εντός της οικογένειας των φλαβονοειδών, αδρανοποιεί ισχυρά δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) (Haenen, et al., 1999, Cushnie and Lamb, 2005). Αυτές οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κερκετίνης μπορούν να αποδοθούν στη παρουσία δύο δομικών χαρακτηριστικών μέσα στο μόριο που έχουν τη βέλτιστη διάταξη για τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών, όπως η δομή της κατεχόλης στο B δακτύλιο και η υδροξυλομάδα στη τρίτη θέση του πρώτου και τρίτου δακτυλίου (Heijnen, et al., 2002). Επίσης η κερκετίνη ενισχύει σημαντικά την ενδογενή αντιοξειδωτική προστασία λόγω της συνεισφοράς της στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος που είναι 6,024 φορές υψηλότερη από αυτή του αντιοξειδωτικού αναφοράς (Trolox), ενώ η συμβολή της βιταμίνης C και του ουρικού οξέος ουσιαστικά ισοδυναμεί με αυτή του Trolox (Arts, et al., 2004, Boots et al., 2008).

Η λουτεολίνη διαθέτει δύο βασικά δομικά χαρακτηριστικά για την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης: την παρουσία του B-δακτυλίου της κατεχόλης και τη παρουσία ενός διπλού δεσμού ανάμεσα στον C₂ και C₃ σε σύζευξη με μία καρβονυλο- ομάδα στον C₄. Το πρώτο δομικό χαρακτηριστικό χρησιμεύει ως δότης υδρογόνου/ηλεκτρονίου για τη σταθεροποίηση της ρίζας και το δεύτερο για να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Η αντιοξειδωτική δράση της λουτεολίνης και των γλυκοζιτών της έχει συνδεθεί με την ικανότητα τους να αδρανοποιούν τις ρίζες οξυγόνου και αζώτου (Cai, et al., 1997, Odontuga, et al., 2005), να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταβατικά μέταλλα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν έναρξη της οξείδωσης μέσω της αντίδρασης Fenton (Mira, et al., 2002), ν'αναστέλλουν τα προοξειδωτικά ένζυμα και να επάγουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Sadik, et al., 2003). Η αντιοξειδωτική δράση της λουτεολίνης δεν έχει παρατηρηθεί μόνο *in vitro* αλλά και *in vivo* (Miguel López-Lázaro, 2009, Qiusheng et al., 2005).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρωματομετρικής μεθόδου για την μέτρηση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα της πρόπολης (2,328-179,998 mg/g πρόπολης), βρέθηκε η μεθανόλη ως ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης φαινολικών ουσιών (99,805 mg/g πρόπολης) και ακολούθησε η μεθανόλη/νερό (80/20) (79,343 mg/g πρόπολης) και το νερό (19,920 mg/g πρόπολης). Το εκχύλισμα της πρόπολης

από τη Δυτ. Μακεδονία που παραλήφθηκε με μεθανόλη/νερό (80/20) είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών (179,631 mg/g πρόπολης), ενώ το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Ρόδο είχε τη μικρότερη (2,094 mg/g πρόπολης). Η περιοχή από την οποία συλλέχθηκε η πρόπολη ήταν αυτή που επηρέασε περισσότερο τη μεταβλητή, συγκέντρωση ολικών φαινολών. Το δείγμα της πρόπολης που συλλέχθηκε από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών (98,175 mg/g πρόπολης).

Η μεθανόλη επίσης βρέθηκε ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης ολικών φλαβονοειδών (31,260 mg/g πρόπολης), σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρωματομετρικής μεθόδου, και ακολούθησε η μεθανόλη/νερό (80/20) (22,181 mg/g πρόπολης) και το νερό (1,114 mg/g πρόπολης). Το εκχύλισμα της πρόπολης από τη Δυτ. Μακεδονία που παραλήφθηκε με μεθανόλη/νερό σε αναλογία 80/20 είχε το μεγαλύτερο ποσοστό ολικών φλαβονοειδών (83,176 mg/g πρόπολης), ενώ το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Ρόδο είχε το μικρότερο (0,248 mg/g πρόπολης). Η πρόπολη που συλλέχθηκε από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας παρουσίασε συνολικά τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών (98,175 mg/g πρόπολης).

Έχουν βρεθεί διαφορετικά αποτελέσματα στη βιβλιογραφία για τη συγκέντρωση ολικών φαινολών και φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα πρόπολης τα οποία εξαρτώνται κυρίως από τη γεωγραφική προέλευση της πρόπολης και το είδος του διαλύτη. Σε αρκετές μελέτες βρέθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ αντιοξειδωτικής ή αναγωγικής δράσης και ολικών φαινολών ή ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα της πρόπολης.

Οι Chaillou et al. (2009) εξέτασαν την αδρανοποιητική (DPPH) δράση των αιθανολικών εκχυλισμάτων της πρόπολης από διάφορες περιοχές της Αργεντινής και οι τιμές συσχετίστηκαν με το σύνολο των επιπέδων των πολυφαινολών (92-187mg/g) και των φλαβονοειδών (6-18mg/g). Μια μέτρια τιμή για το συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε μεταξύ αδρανοποιητικής ικανότητας της ρίζας DPPH και των πολυφαινολών ($p < 0,001$). Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ αδρανοποιητικής ικανότητας του αιθανολικού εκχυλίσματος και του περιεχομένου των φλαβονοειδών, έδειξε επίσης ένα μέσο θετικό συντελεστή συσχέτισης ($p < 0,05$). Η αδρανοποιητική ικανότητα στη ρίζα DPPH της πρόπολης είχε σχέση με τα υψηλά επίπεδα πολυφαινολών, αλλά συσχετίσεις με τα επιμέρους δραστικά συστατικά (κερκετίνη: 87mg/g, πινοσεμπρίνη:

102mg/g, γλωρογενικό οξύ: 4.19mg/g και γαλλικό οξύ: 4.8mg/g) δεν βρέθηκαν. Αυτό σημαίνει ότι ισχυρές και σύνθετες αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ των επιμέρους συστατικών των κλασμάτων και των πολυφαινολών.

Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ικανότητας αδρανοποίησης της DPPH ρίζας από το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Βραζιλία και του φαινολικού της περιεχομένου (0,5-3,9g GA/100ml) έδειξε ένα μέσο θετικό συντελεστή συσχέτισης ($r=0,5$). Για τη σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης και περιεχομένου φλαβονοειδών (0,06 έως 0,65 g GA/100ml), βρέθηκε μια υψηλότερη συσχέτιση ($r=0,85$) από τη συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και των φαινολικών επίπεδων, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να μοιραστούν με τα φαινολικά οξέα ένα σημαντικό ρόλο στη συνεισφορά τους στην αντιοξειδωτική δράση (Mendes da Silva et al., 2006).

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης συσχετίστηκαν με τα αποτελέσματα των ολικών φαινολών στα μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από δύο διαφορετικές περιοχές της Πορτογαλίας. Τα δείγματα από την περιοχή της βόρειας Bornes παρουσίασαν πολύ υψηλή συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες (329mg GA/g εκχ.) αλλά και ισχυρή αδρανοποιητική ικανότητα της DPPH ρίζας (0.006 mg/ml IC_{50}). Η συγκέντρωση των ολικών φαινολών από τη κεντρική περιοχή Fundao ήταν ημισή (151 mg GA/g εκχυλίσματος) και το IC_{50} ήταν 0.055 δηλ. 10 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τη πρώτη τιμή. Παρόμοιες ήταν και οι IC_{50} τιμές από την μέθοδο FRAP (0.009 mg/ml για την πρόπολη της περιοχής Bornes και 0.055 mg/ml για τα δείγματα από το Fundao). Τα εκχυλίσματα με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες παρουσίασαν χαμηλές τιμές EC_{50} για αναγωγική δράση (Moreira et al., 2008).

Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των αιθανολικών εκχυλισμάτων της ελληνικής πρόπολης κυμάνθηκε από 80,2 έως 338,5 mg GA/g αιθανολικού εκχ. και συσχετίστηκε με την αντιοξειδωτική ($r=0,9$) και αναγωγική ικανότητα ($r=0,83$). Σε σχέση με τις κύριες κατηγορίες των συστατικών που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα, τα φαινολικά οξέα κυμάνθηκαν από 0,75 έως 9,34 mg/g εκχ. και τα φλαβονοειδή από 8,8-182,6 mg/g εκχ., το περιεχόμενο των πολυφαινολών συσχετίστηκε με τα φαινολικά οξέα ($r=0,848$), και τα φλαβονοειδή ($r=0,957$). Επίσης οι τιμές DPPH και FRAP συσχετίστηκαν με τα φαινολικά οξέα ($r=0,838$, 0,711, αντίστοιχα) και τα φλαβονοειδή ($r=0,905$, 0,823, αντίστοιχα) (Kalogeropoulos et al., 2009).

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από διάφορες περιοχές της επαρχίας του San Juan (Αργεντινή), έδειξαν υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες (257 mg – 393 mg/g) και ολικά φλαβονοειδή (66 – 133 mg/g). Δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αδρανοποιητικής ικανότητας DPPH και των ολικών φαινολικών ουσιών ή των ολικών φλαβονοειδών. Επιπλέον, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αδρανοποιητικής ικανότητας DPPH και μεμονωμένων φλαβονοειδών (πινοσεμπρίνη 32,7, πινομπασκίνη 23,6, χρυσίνη 38,2, γκαλαγκίνη 21.8mg/g εκχ.) (Ahn et al., 2007).

Η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης χρησιμοποιήθηκε με κατάλληλες συνθήκες έκλουσης για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μεμονωμένων φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών στα δύο αντιοξειδωτικώς πιο δραστικά μεθανολικά/υδατικά (80/20) και μεθανολικά εκχυλίσματα της πρόπολης. Τα φαινορικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν ήταν το π-κουμαρικό (4-υδροξυκινναμωμικό οξύ), το καφεϊκό (3,4-διυδροξυκινναμωμικό οξύ) και το φερουλικό οξύ (3-μεθοξύ-4-υδροξυκινναμωμικό οξύ), τρία υδροξυκινναμωμικά οξέα που έχουν κοινή βιοσυνθετική προέλευση, και τα επίπεδα των συγκεντρώσεών τους στα εκχυλίσματα πρόπολης κυμάνθηκαν από 0,668 έως 2,861 mg/g πρόπολης. Το καφεϊκό οξύ ήταν το επικρατέστερο μεταξύ των φαινολικών οξέων που ταυτοποιήθηκαν (0,639-4,172 mg/g πρόπολης).

Οι φλαβονόλες κερκετίνη και γκαλαγκίνη, και οι φλαβόνες λουτεολίνη και απιγενίνη ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά στα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά (80/20) εκχυλίσματα της πρόπολης (0,802-3,634 mg/g πρόπολης) με επικρατέστερη την γκαλαγκίνη (1,317-8,551 mg/g πρόπολης). Στο μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα (80/20) της Δυτ. Μακεδονίας προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινορικά οξέα (2,858 mg/g πρόπολης) και φλαβονοειδή (3,622 mg/g πρόπολης).

Σε παρόμοιες μελέτες που έγιναν σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από διάφορες γεωγραφικές περιοχές μεταξύ των κύριων συστατικών που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά με ανάλυση HPLC, διάταξη διόδου λυχνιών - (PDA) και φασματομετρία μάζας (MS), ήταν το καφεϊκό οξύ (3,3 mg/g), π-κουμαρικό οξύ (27,4 mg/g), 3,4-διμεθοξυκινναμωμικό οξύ (8,6 mg/g), κερκετίνη (4,8 mg/g), απιγενίνη (18,4 mg/g), καιμπερόλη (10,9 mg/g), πινομπασκίνη (84,8 mg/g), πινοσεμπρίνη (99,7 mg/g), γκαλαγκίνη (58,3 mg/g), φαιναιθυλεστεράς του καφεϊκού

οξέος (29,2 mg/g), κινναμωμικός εστέρας του καφεϊκού οξέος (20,3 mg/g) και αρτεπλίνη C (43,9 mg/g) (Ahn et al., 2007).

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των φαινολικών οξέων στα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης της Λιθουανίας, Πολωνίας και Λετονίας με HPLC ανάλυση έδειξε ότι, τα κύρια φαινολικά οξέα που προσδιορίστηκαν ήταν το φερουλικό (461-2377 µg/ml) και κουμαρικό οξύ (4508-3075 µg/ml) και σε μικρότερο ποσοστό το καφεϊκό (68-327 µg/ml), κινναμωμικό (43-611 µg/ml), γαλλικό (44,2 µg/ml) και ροσμαρινικό οξύ (19-22 µg/ml) (Ramanauskiene et al., 2009).

Δεκατρία διαφορετικά φαινολικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από τη βόρεια Αργεντινή με τη χρήση HPLC και στήλη RP-C18 και τα φάσματα απορρόφησης που προέκυψαν από την ανίχνευση με συστοιχία διόδων λυχνιών χρησιμοποιήθηκαν για τη ταυτοποίηση κορυφών σε σύγκριση με τα αυθεντικά πρότυπα. Αυτά τα συστατικά ήταν το κουμαρικό οξύ (0,92-16,35 mg/g πρόπολης), φερουλικό οξύ (0,51-6,42 mg/g πρόπολης), κερκετίνη (nd-2,84mg/g πρόπολης), κινναμωμικό οξύ (nd-8,26mg/g πρόπολης), πινομπαस्कίνη (nd-10,26 mg/g πρόπολης), καιμπερόλη (nd-1,15 mg/g πρόπολης), απιγενίνη (1,04-3,32 mg/g πρόπολης), πινοσεμπρίνη (nd-48,39 mg/g πρόπολης), 1,1-διμεθυλαλλυλοκαφεϊκό οξύ (nd-1,74 mg/g πρόπολης), χρυσίνη (nd-10,14 mg/g πρόπολης), γκαλαγκίνη (nd-9,07 mg/g πρόπολης), καμπερίδη (nd-3,23 mg/g πρόπολης) και τεκτοχρυσίνη (nd-4,45 mg/g πρόπολης) (Isla et al., 2005).

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρόπολης από διάφορες περιοχές της Κίνας βρέθηκε ότι περιέχουν σημαντικά ποσοστά από αντιοξειδωτικά συστατικά, με τη χρήση της HPLC-DAD, όπως το καφεϊκό οξύ (32,2 mg/g), π-κουμαρικό οξύ (52,2 mg/g), φερουλικό οξύ (5,3 mg/g) CAPE (8,7 mg/g) και γκαλαγκίνη (nd-8,3 mg/g) (Ahn et al., 2007).

Σε ότι αφορά την ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών στην ελληνική πρόπολη βρέθηκε μόνο μία εργασία όπου μελετήθηκε η σύσταση αιθανολικών εκχυλισμάτων από την Ελλάδα και τη Κύπρο με GC-MS. Ανάμεσα στα ταυτοποιημένα συστατικά βρέθηκαν διάφορες ενώσεις με γνωστή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση όπως φλαβονοειδή, τερπενοειδή, ανθρακινόνες, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους. Τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν κυμάνθηκαν από 0,75-9,34 mg/g εκχυλίσματος: το κουμαρικό οξύ (0,07-2,18 mg/g), γαλλικό οξύ (nd-0,11mg/g), φερουλικό οξύ (0,1-1,81mg/g),

καφεϊκό οξύ (0,14-6,7mg/g), χρυσίνη (0,24-145,7mg/g), ναριγκενίνη (0,07-0,94mg/g), καιμπερόλη (0,08-3,75mg/g), κερκετίνη (nd-0,36mg/g), απιγενίνη (nd-15,85mg/g), πινοσεμπρίνη (3,7-104,8mg/g) και πινομπασκίνη (0,32-33,74mg/g) (Kalogeropoulos et al., 2009).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι τα μεθανολικά και μεθανολικά/υδατικά (80/20) εκχυλίσματα της πρόπολης και από τις δύο γεωγραφικές περιοχές (Δυτική Μακεδονία, Ρόδος) εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση από τα αντίστοιχα υδατικά εκχυλίσματα. Η γεωγραφική περιοχή όμως ήταν αυτή που επηρέασε περισσότερο από το είδος του διαλύτη την δράση καθώς και την συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικώς δραστικά φαινολικά συστατικά. Έτσι η πρόπολη από την περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας συνολικά εμφάνισε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση από την πρόπολη της Ρόδου. Μάλιστα όλα τα εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας παρουσίασαν ίση ή και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT. Τα μεθανολικά/υδατικά (80/20) και τα μεθανολικά εκχυλίσματα της Δυτ. Μακεδονίας έδειξαν υψηλότερα επίπεδα αναγωγικής δράσης από το πρωτοκατεχικό και φερουλικό οξύ ενώ εμφάνισαν τα ίδια επίπεδα δράσης με την γνωστή για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές και βιολογικές της ικανότητες φλαβονόλη κερκετίνη.

Επιπλέον η πρόπολη της Δυτ. Μακεδονίας -και συγκεκριμένα το μεθανολικό/υδατικό της εκχύλισμα (80/20)- παρουσίασε και με χρωματομετρική και με HPLC ανάλυση τη μεγαλύτερη ποσότητα σε φαινολικές ουσίες, φαινολικά οξέα (καφεϊκό, π-κουμαρικό, φερουλικό οξύ) και φλαβονοειδή (κερκετίνη, λουτεολίνη, γκαλαγκίνη και απιγενίνη). Η παρουσία των φαινολικών αυτών και αντιοξειδωτικά δραστικών ενώσεων στα πολικά εκχυλίσματα της πρόπολης της Δυτ. Μακεδονίας σε σημαντικές συγκεντρώσεις δείχνει ότι μπορούν να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση καθώς και ν'αποτελέσουν βασικούς ποιοτικούς δείκτες εκτίμησης της πρόπολης και των εκχυλισμάτων της.

Σε επόμενο στάδιο θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθούν τα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικής σύστασης σε δείγματα πρόπολης και από άλλες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης και μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Agüero, M.B., Gonzalez, M., Lima, B., Svetaz, L., Sanchez, M., Zacchino, S., Feresin, G.E., Schmeda-Horschmann, G., Palermo, J., Wunderlin, D., Tapia, A., 2010. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (*Caesalpinieae*) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 194-201
- ✓ Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., et al. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry* **101**, 1400-1409
- ✓ Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Caral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **113**, 278-283
- ✓ Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F., Cornier, M. 1994. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, **57**, 644-47.
- ✓ Anselmi C., Centini, M., Granata, P., Sega, A., Buonocore, A., Bernini, A. and Facino, R.M. 2004. Antioxidant activity of ferulic acid and alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight. *Journal of Agriculture and Food chemistry* **52**, 6425-32
- ✓ Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Burcu B, Berker K., Özyurt D. 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* **12**, 1496-1547
- ✓ Arts, M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H.P., Haenen, G.R.M.M., A., B., 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry* **88**, 567-570
- ✓ Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R. and Loliger, J. 1992. Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* **22**, 257-68

- ✓ Balasundram, N., Sundram, K., Sammam, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**, 191-203
- ✓ Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marcucci, M.C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **31**, 3-15
- ✓ Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. Recent progress in Pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, **15**, 561-571
- ✓ Banskota, A.H., Yasuhiro, T., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A.G., Kadota, S., 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 239-246
- ✓ Belitz, H-D., Gräsch, W., Schieperle, P. 2006. Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Τζιόλας. Θεσσαλονίκη
- ✓ Bilyk, A., Saperr, G. M. 1985. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish and red cabbage tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 226-2283
- ✓ Boots, A., W., R. M. M., G., Haenen, Aalt Bast, A., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* **585**, 325-337
- ✓ Cai, Q., Rahn R.Q., Zhang R., 1997. Dietary flavonoids quercetin, luteolin and genistein reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*, **119**, 99-107
- ✓ Chaillou, L.L., Nazareno, M.A., 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT- Food science and technology* **42**, 1422-1427
- ✓ Chan, H.W.S. 1977. Photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters: the identification of different pathways. *Journal of American Oil Chemistry Society* **54**, 100-104
- ✓ Chen, Q., Shi, H. and Ho, C-T. 1992. Effect of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *JAOCS* **69**, 999-1002

- ✓ Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food Science and Technology* **39**, 756- 761
- ✓ Choi, S.I. , Jeong, C.S., Cho, S.Y., Yong Soo Lee, Y., S., 2007. Mechanism of Apoptosis Induced by Apigenin in HepG2 Human Hepatoma Cells: Involvement of Reactive Oxygen Species Generated by NADPH Oxidase. *Archives of Pharmacal Research* **30**, 1328-1335
- ✓ Cholbi, M.R., Paya, M., Alcaraz, M.J. 1991. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl4-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* **47**, 195–199
- ✓ Clifford, M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 362-72
- ✓ Coopen, P.P. 1983. Use of antioxidants in Rancidity in Foods, edited by Allen, J.C., Hamilton, R.J. *Applied Science*, London. pp. 76-85
- ✓ Cushnie, T.P. and Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343–356.
- ✓ Das, N.P., Pereira, T.A. 1990. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationship. *Journal of American Oil Chemistry Society* **67**, 255-258
- ✓ Dayan N. 2008. Skin aging handbook: An integrated approach to biochemistry and product development. *William Andrew Inc.* 352.
- ✓ Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4563-69
- ✓ Dziejzak, J.D. 1986. Preservatives: Antioxidants. *Food Technology* **9**, 94-96
- ✓ Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3579-3604
- ✓ Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P., 2007. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **45**, 390-99
- ✓ Gordon, M., Williamson, E. 1989. A comparison of head space analysis with other methods for assessing the oxidative deterioration of edible oils . *Trends in Food Science*. **15**, 53-57
 - ✓ Graf, E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine* **13**, 435-48
 - ✓ Gray, J.I. 1987. Measurements of lipid oxidation. A review. *Journal of American Oil Chemistry Society* **55**, 539-546
 - ✓ Gregoris, E. And Stevanato, R. 2010, Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 76-82
 - ✓ Gulcin, I., Bursal, E., Sehitoglu, H.M., Bilsel, M., Goren, A.C. 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Toxicology*, 10.1016/j.fct.2010.05.053
 - ✓ Haenen, G.R.M.M. and Bast, A., 1999. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods in Enzymology* **301**, 490–503
 - ✓ Hamilton, J.W., Tappel, A.L. 1963. Evaluation of antioxidants by a rapid polarographic method. *Journal of American Oil Chemistry Society* **40**, 52-54
 - ✓ Havsteen, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* **32**, 1141–1148
 - ✓ Heijnen, C.G., Haenen, G.R.M.M., Oostveen, R.M., Stalpers, E.M., Bast, A., 2002. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radical Research* **36**, 575581
 - ✓ Heo, M.Y., Lee, J.H., Sohn, S.J., Au, W.W., 1996. Anticlastogenic effects of galangin against mitomycin C- induced micronuclei in reticulocytes of mice. *Mutation Research*. **360**, 37–41
 - ✓ Hertog, M.G.L., Kromhaut, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F.1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary-heart-

- disease and cancer in the 7 countries study. *Archives of Internal Medicine* **155**, 981-986
- ✓ Hishikawa, K., Nakaki, T., Fujita, T., 2005. Oral flavonoid supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**, 442–446.
 - ✓ Houlihan, C-M., Ho, C-T and Chang, S.S. 1984. Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol isolated from rosemary. **61**, 1036-9
 - ✓ Hu, F., Hepburn, H.R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S.E., Daya, S. 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 276-83.
 - ✓ Imamura, Y., Migita, T., Uriu, Y., Otagiri, M., Okawara, T., 2000. Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase. *Journal of Biochemistry* **127**, 653-658
 - ✓ Isla, M.I. Paredes-Guzman J.F., Nieva-Moreno, M.I., Koo, H. and Park, Y.K. 2005. Some chemical composition and biological activity of Northern Argentine propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1166-72
 - ✓ Isla, M.I., Nieva Moreno, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **76**, 165-70
 - ✓ IUPAC. Peroxide value determination 2.501. International Union of Pure and Applied Chemistry: standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th revised edition. 1987
 - ✓ Jullian, C., Alfaro, M., Zapata-Torres, G., Olea-Azar, G., 2010. Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Galangin: a Thermodynamic and Reactivity Study. *Journal of Solution Chemistry* **39** 1168–1177
 - ✓ Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinis, I., Karathanos, V.T., 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food chemistry* **116**, 452-461

- ✓ Kartal, M., Yildiz, S., Kaya, S., Kurycu, S., Topcu, G., 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* **86**, 69-73
- ✓ Kochhar, S.P., Rossel, J.B. 1988. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems in Food Antioxidants, edited by Hudson, B.J.F. *Elsevier Applied Science*, London, 19-52
- ✓ Kroon P.A. and Williamson G. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 355-362
- ✓ Kujumgiev, A., Tsvetkova, T., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 235-40.
- ✓ Kumazawa, S., Hamasaka T., Nakayama, T., 2003. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* **84**, 329-339
- ✓ Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Nakayama, T. 2007. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artemillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters* **252**, 235-243.
- ✓ Laskar, A., R., Sk, I., Roy, N., Begum, N.A. 2010. Antioxidant activity of Indian Propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry* 10.1016/j.foodchem.2010.02.068
- ✓ Laubi, M.W., Bruttel, P.A. 1986. Determination of the oxidative stability of fats and oils. Comparison between the active oxygen method and the rancimat method. *Journal of American Oil Chemistry Society* **6**, 792-795
- ✓ Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M.P., Schmeda-Hirschmann, G. and Feresin, G.E. 2009. Main flavonoids, DPPH activity and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 2691-98
- ✓ Lu, Y., Ycap Foo, L. 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* **75**, 197-202
- ✓ Macrae R. 1988. HPLC in food analysis. Academic Press, London

- ✓ Madsen, H.L. and Bertelsen, G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology* **6**, 271-77
- ✓ Marco, G.J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. . *Journal of American Oil Chemistry Society* **45**, 594-598
- ✓ Marcuse, R., Johansson, L. 1973. Studies on the TBA test for rancidity grading. TBA reactivity of different aldehyde classes. *Journal of American Oil Chemistry Society* **45**, 594-598
- ✓ Merken, H.M., Beecher, G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 577-597
- ✓ Michaluart, P., Masferrer, J.L., Carothers, A.M., Subbaramaiah, K., Zweifel, B.S., Koboldt, C., Mestre, J.R., Grunberger, D., Sacks, P.G., Tanabe, T., Dannenberg, A.J., 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. macrophages. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **290**, C1092–C1099.
- ✓ Middleton, E.J., Kandaswami, C., 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J.B. (Ed.), *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 619-652.
- ✓ Miguel López-Lázaro, 2009. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **9**, 31-59
- ✓ Miller, H.E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society* **48**, 91-93
- ✓ Mira, L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K.R., 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, **36**, 1199-208
- ✓ Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamedi, Ahmadkahaniha, R., Samadi, N., Ostad, S.N., 2006. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food chemistry* **103**, 1097-1103

- ✓ Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S., Ostad, S.N., 2006. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food chemistry* **103**, 729-733
- ✓ Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chemical Toxicology*, **46**, 3482-85
- ✓ Moreno, M.I. N., Isla, M., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* **71**,109-114
- ✓ Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2002. Preparation and the antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry* **80**, 29-33
- ✓ Nakatani, N. and Inatani, R. 1984. Two antioxidative diterpenes from rosemary and a revised structure for rosmanol. *Agricultural and Biological Chemistry*, **48**, 2081-5
- ✓ Nawar, W.W. 1985. Lipids in Food Chemistry, edited by Fennema, O.R., Marcel Dekker, New York, 139-244
- ✓ Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Noren, K., Van Leeuwen, P.A.M. 2002. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. **74**, 418–425
- ✓ Odontuga, G., Hoult, J.R., Houghton, P.J., 2005. Structure activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research*, **19**, 782-6
- ✓ Ogiwara, T., Satoh, K., Kadoma, Y., Murakami, Y., Unten, S., Atsumi, T. 2002. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Anticancer Research* **22**, 2711017
- ✓ Ozaki, Y. 1992. Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Chemical & pharmaceutical Bulletin* **40**, 954-56
- ✓ Pokorny, J. 1987. Major factors affecting the autoxidation of lipids in Autoxidation of unsaturated lipids, edited by Chan, S.H.W. *Academic Press*. London. 141-198

- ✓ Pratt, D.E., Birac, P. 1979. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. *Journal Food Science* **44**, 1720
- ✓ Pratt, D.E., Hudson, B.J.F. 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in Food Antioxidants, edited by Hudson B.J.F., *Elsevier*, Amsterdam. 171-189
- ✓ Pratt, D.E., Miller, E.E. 1984. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). *Journal of American Oil Chemical Society* **61**, 1064-1067
- ✓ Primon de Barros, M., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Faloni de Andrade, S., 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **120**, 372-377
- ✓ Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G-J.E. and Komaitis, M. 2005. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1190-1195
- ✓ Prytyk, E., Dantas, A.P., Salomao, K., Pereira, A.S., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Neto, F.R.A., 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **88**, 189-193
- ✓ Qiusheng, Z., Yuntao, Z., Rongliang, Z., Dean, G., Changling, L., (2005). Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. *Pharmazie*, **60**, 539-43
- ✓ Ramanauskiene, K. Savickas, A., Inkeniene, A., Vitkevicius, Kasparaviciene, G., Briedis, V., Amsiejus, A., 2009. Analysis of content of phenolic acids in Lithuanian propolis using high-performance liquid chromatography technique. *Medicina (Kaunas)* **45** (9)
- ✓ Rommel, A., Wrolstad, R.E. 1993. Composition of flavonols in red raspberry juice as a influenced by cultivar, processing and enviromental factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1491-1950
- ✓ Rossell, j.b. 1989. Measurement of rancidity in Rancidity in Foods, edited by Allen, J.C., Hamilton, *R.J. Elsevier Science Publishers*. London.
- ✓ Russo A., R. Longo, Vanella, A., 2002. Antioxidant activity of propolis: role of

caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 Supplement 1 S21–S29

- ✓ Sadik, C.D., Sies H., Schewe T., 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure activity relations and mode of action *Biochemical Pharmacology*, **65**, 773-81
- ✓ Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., 2000. Study of low density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Researcher* **20**, 941– 953
- ✓ Sang, S., Tian, S., Wang, H., Stark, R.E., Rosen, R.T., Yang, C.S., 2003. Chemical studies of the antioxidant mechanism of tea catechins. *Bioorganic and Medical Chemistry* **11**, 3371–3378
- ✓ Santos, F.A., Bastos, E.M.A., Uzeda, M., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Moreira, E.S.A., Braga, F.C., 2001. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* **80**,1-7
- ✓ Sarikaya, A.O., Ulusou, E., Ozturk, N., Tuncel, M., Kolayli, S.,2007. Antioxidant activity and the phenolic acid constituents of chestnut (*castania sativa mill.*) honey and propolis. *Journal of food biochemistry* **33**, 470-481
- ✓ Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S.
- ✓ Schuler, P. 1990. Natural antioxidants exploited commercially in Food antioxidants, edited by Hudson, B.J.F., *Elsevier Applied Science*, London , 130-139
- ✓ Sforcin, J.M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* **113**, 1-14
- ✓ Shahidi, F., Gamipha, P.K., Wanasundera, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32**, 67-103
- ✓ Sherwin, E.R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of American Oil Chemical Society* **55**, 809-814

- ✓ Shetty K., Paliyath G., Pometto A.L., Levin R.E. 2006. Functional foods and biotechnology. *CRC Press* 188-189.
- ✓ Shih, H., Pickwell, G.V., Quattrochi, L.C., 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 287–294
- ✓ Sidwell, C.G., Salwin, H., Benca, M., Mitchell, J.H. 1954. The use of TBA as a measure of fat oxidation. *Journal of American Oil Chemistry Society* **34**, 603-606
- ✓ Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones, flavonols in some plant materials and their antioxidants activities. *Food Chemistry* **89**, 191-198
- ✓ Soleo de Funari, C., Vincente de Oliveira Ferro, Mathor, M.B., 2006. Analysis of propolis from *accharis dracunculifolia* DC.(*Compositae*) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology* **111**, 206-212
- ✓ Son, S. and Lewis, B.A., 2002. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure–activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 468472.
- ✓ Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Pillai, K.R., Kumar, P.R., Sudhakaran, p.R. and Moon, V.P. 2006. Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Toxicology*, **228**, 249-58
- ✓ Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society* **61**, 928-931
- ✓ Tan, J., Ma, Z., Han, L., Du, R., Zhao, L., Wei, X., Hou, D., Johnstone, B.H., Farlow, M.R., Du, Y., 2005. Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia–reperfusion injury. *American Journal of Physiology* **289**, H2265-H2271.
- ✓ Tarladgis, B.G., Pearson, A.M., Dugan, L.R. 1962. The chemistry of 2-TBA acid test for the determination of oxidative rancidity in foods. Some important side reactions. *Journal of American Oil Chemistry Society* **39**, 34-39

- ✓ Thompson, J.W., Sherwin, E.R. 1966. Investigation of antioxidants for polyunsaturated edible oils. . *Journal of American Oil Chemical Society*. **43**, 683-686
- ✓ Wall, M.E., Wani, M.C., Manikumar, G., Abraham, P., Taylor, H., Hughes, T.J., Warner, J., McGiveney, R., 1988. Plant antimutagenic agents. 2. Flavonoids. *Journal of Natural Products* **51**, 1084–1091
- ✓ Wu, J.W., Lee, M.H., Ho,C.T., Chang, S.S. 1982. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *Journal of American Oil Chemistry Society* **59**, 3399-345
- ✓ Zheng, W., Wang Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5165-5170

Ελληνική Βιβλιογραφία

- ✓ Ηλιόπουλος, Γ.1998. Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Ο.Ε.Δ.Β. Θεσσαλονίκη.
- ✓ Κυριτσάκης, Α. 1984. Σημειώσεις τεχνολογίας λιπών και λαδίων. Τ.Ε.Ι.Θ. Τμήμα τεχνολογίας τροφίμων. Θεσσαλονίκη
- ✓ Λάγουρη, Β. 1998. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής σύστασης εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Lamiaceae. Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σχολή Θετικών Επιστημών
- ✓ Μπόσκου, Δ. 2004. Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη
- ✓ Σημειώσεις Θρασύβουλου, Α., Αδαμούδη, Α. Προϊόντα κυψέλης, Παραγωγή, Χημική σύσταση και χρήσεις πρόπολης των μελισσών. Εργαστήριο μελισσοκομίας- σηροτροφίας Α.Π.Θ. Σχολή Γεωπονίας

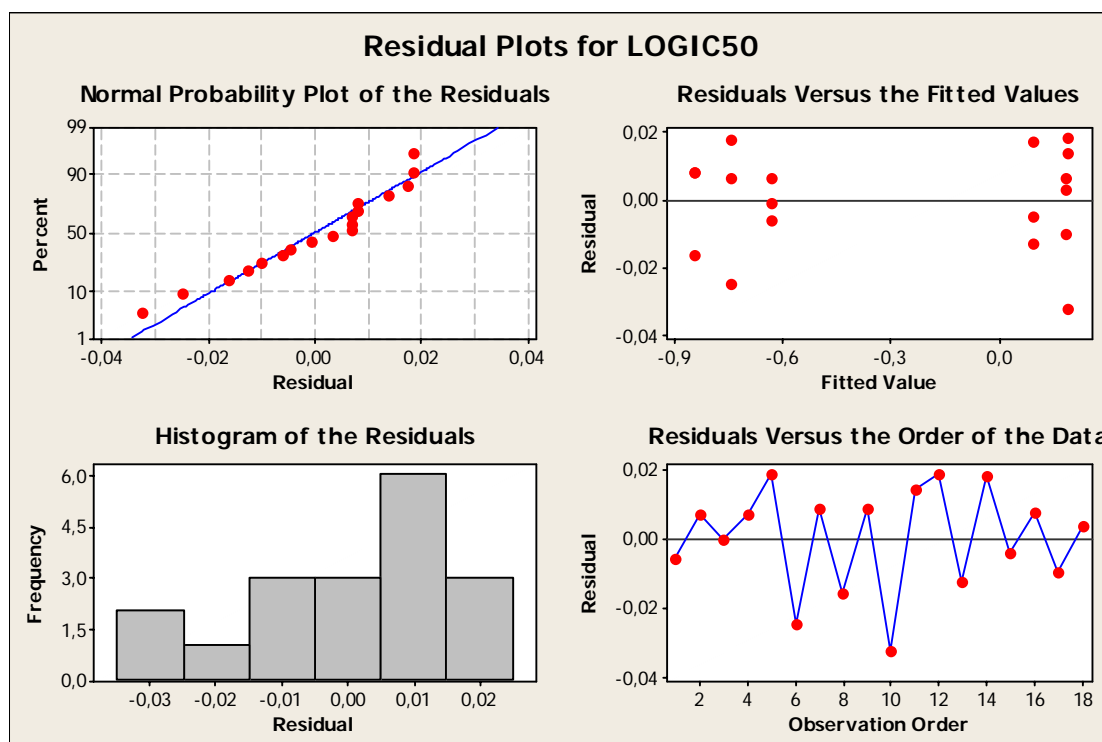
Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

- ✓ <http://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>
- ✓ <http://en.wikipedia.org/wiki/Luteolin>
- ✓ <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>
- ✓ <http://www.organic-herb.com/Product/OHI-000242.html>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων μεθόδου DPPH

Results for: DPPH



Εφόσον το διάγραμμα Residuals Versus the Fitted Values παρουσιάζει τυχαία διασπορά οι διακυμάνσεις θεωρούνται ίσες. Η ομοιογένεια επήλθε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό.

General Linear Model: LOGIC50 versus SOLVENT; AREA

Factor	Type	Levels	Values
SOLVENT	fixed	3	80MEOH; H2O; MEOH
AREA	fixed	2	MAC; RHOD

Analysis of Variance for LOGIC50, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
SOLVENT	2	0,04448	0,04448	0,02224	71,12	0,000
AREA	1	3,62276	3,62276	3,62276	11584,04	0,000
SOLVENT*AREA	2	0,03845	0,03845	0,01922	61,47	0,000
Error	12	0,00375	0,00375	0,00031		
Total	17	3,70944				

S = 0,0176844 R-Sq = 99,90% R-Sq(adj) = 99,86%

Unusual Observations for LOGIC50

Obs	LOGIC50	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
10	0,159266	0,191777	0,010210	-0,032510	-2,25 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for LOGIC50

SOLVENT		Mean	SE Mean
80MEOH		-0,3299	0,007220
H2O		-0,2211	0,007220
MEOH		-0,3228	0,007220
AREA			
MAC		-0,7399	0,005895
RHOD		0,1574	0,005895
SOLVENT*AREA			
80MEOH	MAC	-0,8438	0,010210
80MEOH	RHOD	0,1840	0,010210
H2O	MAC	-0,6339	0,010210
H2O	RHOD	0,1918	0,010210
MEOH	MAC	-0,7419	0,010210
MEOH	RHOD	0,0964	0,010210

Αφού $p < 0,05$ και των δυο παραγόντων, ισχύει η εναλλακτική υπόθεση και οι μέσοι όροι δεν είναι ίσοι μεταξύ τους.

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ – DPRH

Test for Equal Variances: RESI2 versus PHENOLS

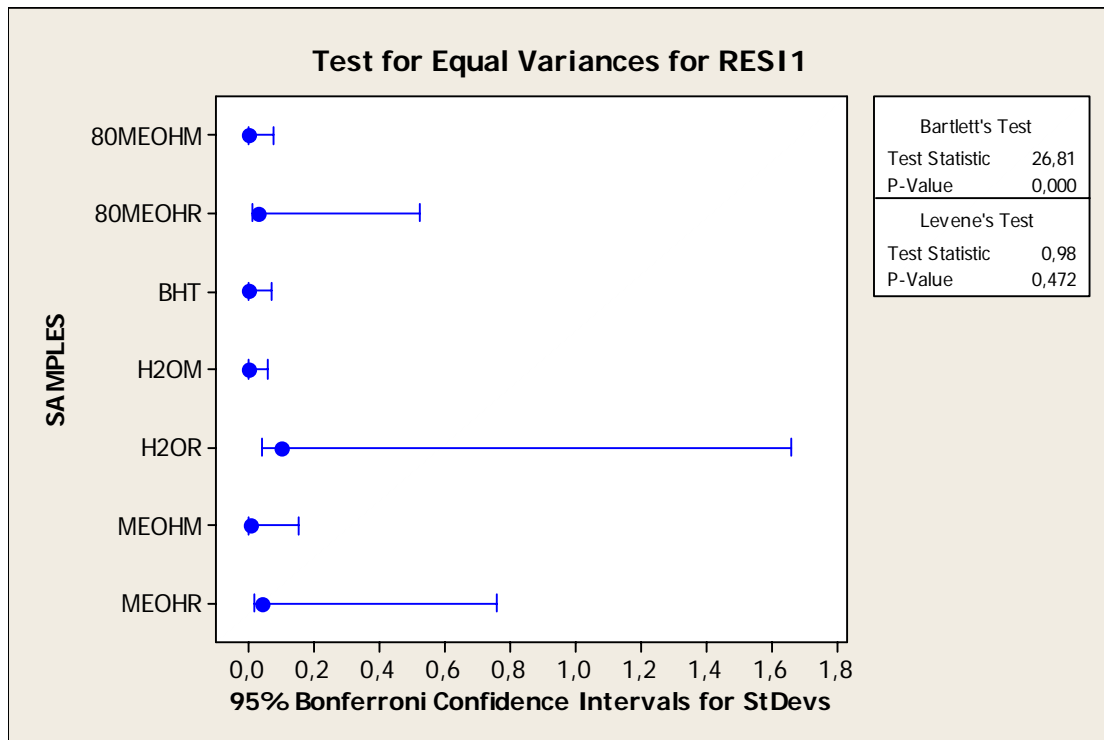
95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

FA	N	Lower	StDev	Upper
BHT	3	0,0040076	0,0093821	0,145195
CA	3	0,0026096	0,0061092	0,094544
FRA	3	0,0064440	0,0150859	0,233466
GA	3	0,0067904	0,0158968	0,246015
PRA	3	0,0270150	0,0632441	0,978751
QUERCETIN	3	0,0011958	0,0027995	0,043324

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 17,51; p-value = 0,004

Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 1,86; p-value = 0,175

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ-DPPH



Εφόσον $p > 0,05$ (Levene's Test) η οι διακυμάνσεις των δειγμάτων είναι ίσες.

Test for Equal Variances: RESI1 versus SAMPLES

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

SAMPLES	N	Lower	StDev	Upper
80MEOHM	3	0,0019458	0,0046188	0,07722
80MEOHR	3	0,0132973	0,0315647	0,52771
BHT	3	0,0018959	0,0045004	0,07524
H2OM	3	0,0014795	0,0035119	0,05871
H2OR	3	0,0418658	0,0993797	1,66145
MEOHM	3	0,0039143	0,0092916	0,15534
MEOHR	3	0,0192267	0,0456399	0,76302

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 26,81; p-value = 0,000

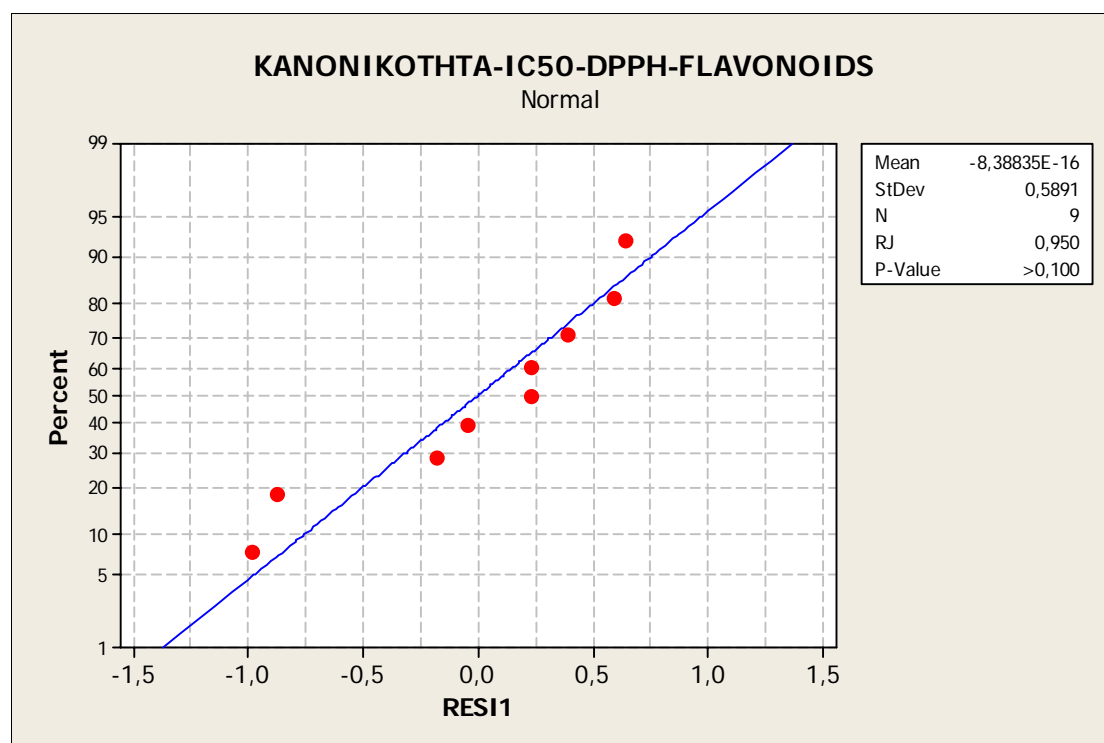
Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 0,98; p-value = 0,472

One-way ANOVA: IC50 versus SAMPLES

Source	DF	SS	MS	F	P
SAMPLES	6	8,26848	1,37808	736,61	0,000
Error	14	0,02619	0,00187		
Total	20	8,29467			

S = 0,04325 R-Sq = 99,68% R-Sq(adj) = 99,55%

ΠΡΟΤΥΠΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ-DPPH



Εφόσον $p > 0,05$ το δείγμα ακολουθεί κανονική κατανομή

Test for Equal Variances: RESI1 versus FLAVONOIDS

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

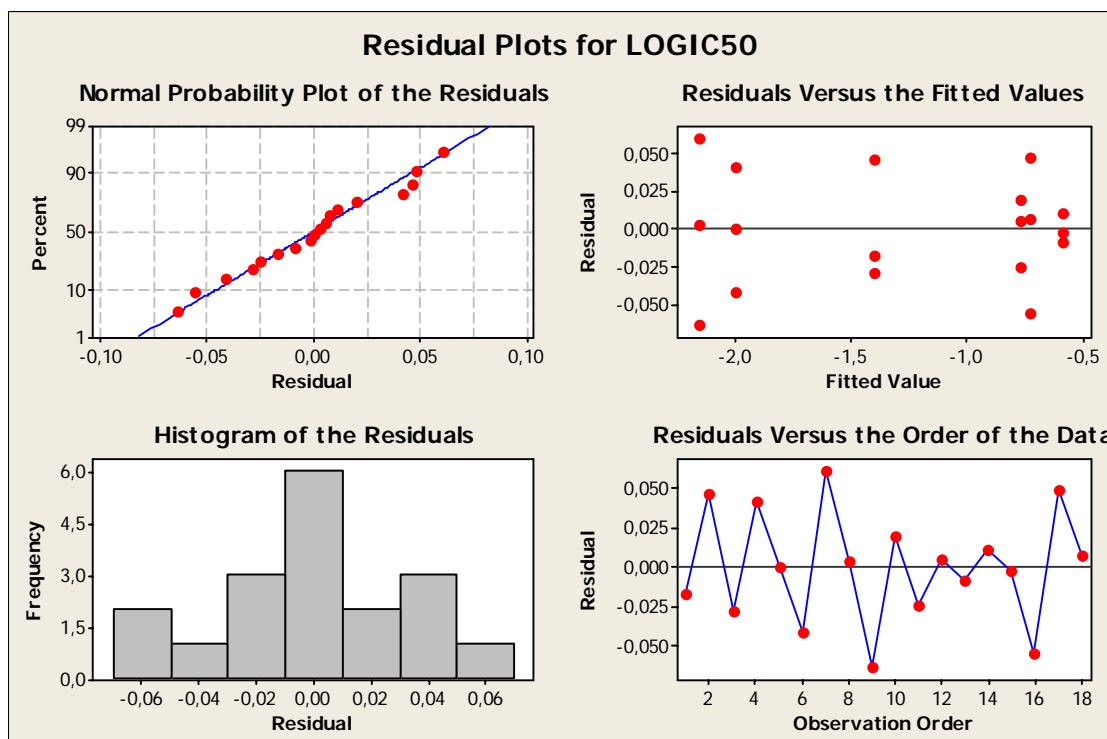
FLAVONOIDS	N	Lower	StDev	Upper
APIGENIN	3	0,390724	0,854918	9,34560
GALANGIN	3	0,357832	0,782949	8,55886
LUTEOLIN	3	0,096092	0,210253	2,29840

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 2,63; p-value = 0,268

Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 0,48; p-value = 0,640

2. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων μεθόδου FRAP

Results for: FRAP



Εφόσον το διάγραμμα Residuals Versus the Fitted Values παρουσιάζει τυχαία διασπορά οι διακυμάνσεις θεωρούνται ίσες. Η ομοιογένεια επήλθε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό.

General Linear Model: LOGIC50 versus SOLVENT; AREA

Factor	Type	Levels	Values
SOLVENT	fixed	3	H2O; MEOH; 80MEOH
AREA	fixed	2	MAC; RHOD

Analysis of Variance for LOGIC50, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
SOLVENT	2	0,3791	0,3791	0,1895	106,65	0,000
AREA	1	6,0586	6,0586	6,0586	3409,00	0,000
SOLVENT*AREA	2	0,6310	0,6310	0,3155	177,52	0,000
Error	12	0,0213	0,0213	0,0018		
Total	17	7,0900				

S = 0,0421572 R-Sq = 99,70% R-Sq(adj) = 99,57%

Least Squares Means for LOGIC50

SOLVENT		Mean	SE Mean
H2O		-1,087	0,01721
MEOH		-1,296	0,01721
80MEOH		-1,441	0,01721
AREA			
MAC		-1,855	0,01405
RHOD		-0,695	0,01405
SOLVENT*AREA			
H2O	MAC	-1,403	0,02434
H2O	RHOD	-0,772	0,02434
MEOH	MAC	-2,004	0,02434
MEOH	RHOD	-0,588	0,02434
80MEOH	MAC	-2,158	0,02434
80MEOH	RHOD	-0,724	0,02434

Αφού $p < 0,05$ και των δυο παραγόντων ισχύει η εναλλακτική υπόθεση και οι μέσοι όροι δεν είναι ίσοι μεταξύ τους.

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-FRAP

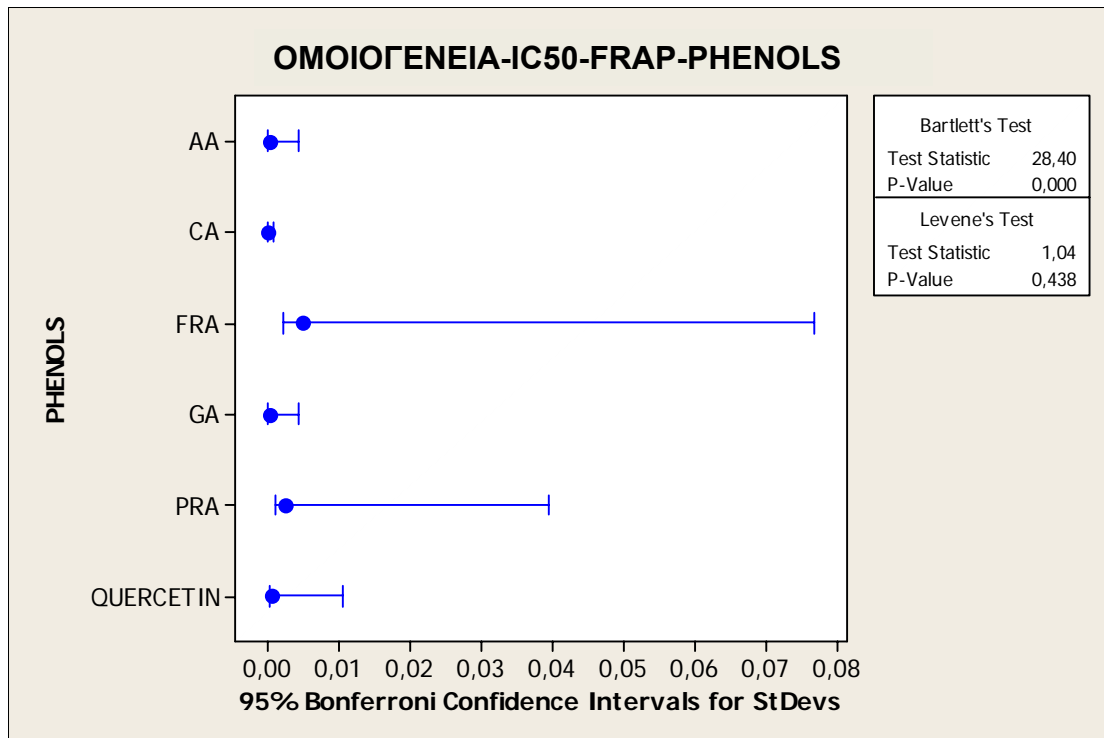
Test for Equal Variances: RESI1 versus PHENOLS

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

PHA	N	Lower	StDev	Upper
AA	3	0,0001164	0,0002724	0,0042162
CA	3	0,0000202	0,0000473	0,0007314
FRA	3	0,0021248	0,0049743	0,0769806
GA	3	0,0001202	0,0002815	0,0043562
PRA	3	0,0010918	0,0025559	0,0395542
QUERCETIN	3	0,0002883	0,0006750	0,0104462

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 28,40; p-value = 0,000

Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 1,04; p-value = 0,438



ΑΦΟΥ $P > 0,05$ (LEVEN'S TEST) ΟΙ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΙΝΑΙ ΙΣΕΣ

Test for Equal Variances: RES11 versus PHENOLS

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

PHA	N	Lower	StDev	Upper
AA	3	0,0001164	0,0002724	0,0042162
CA	3	0,0000202	0,0000473	0,0007314
FRA	3	0,0021248	0,0049743	0,0769806
GA	3	0,0001202	0,0002815	0,0043562
PRA	3	0,0010918	0,0025559	0,0395542
QUERCETIN	3	0,0002883	0,0006750	0,0104462

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 28,40; p-value = 0,000

Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 1,04; p-value = 0,438

One-way ANOVA: IC50 versus PHENOLS

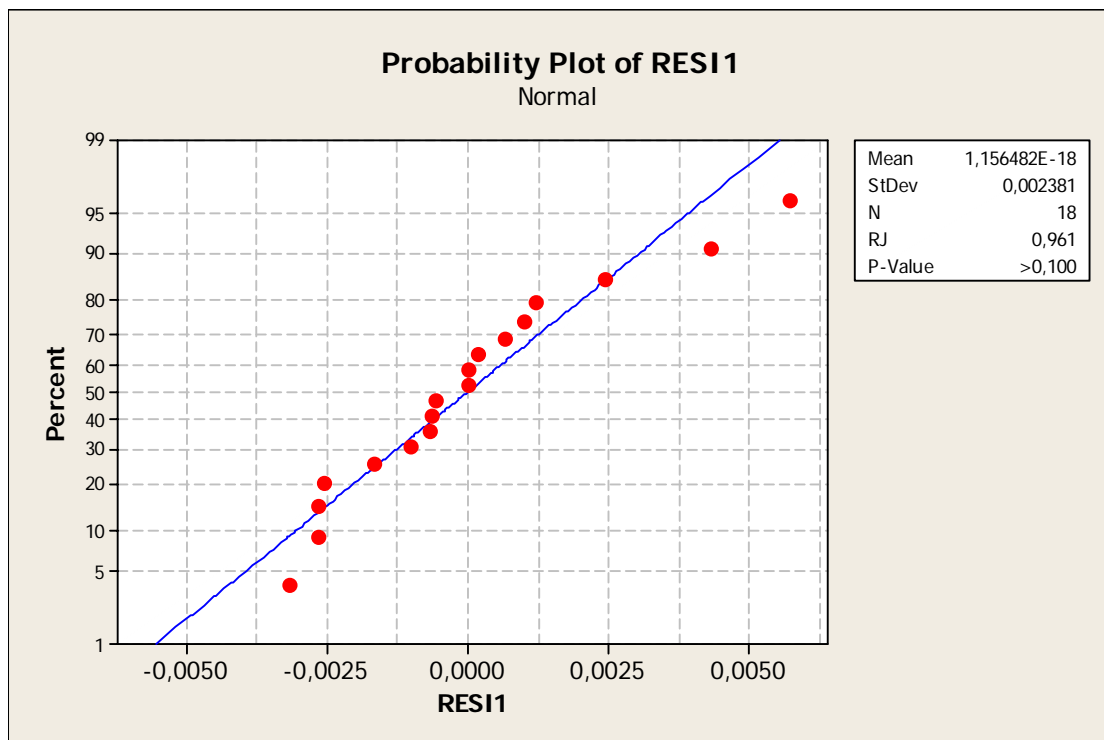
Source	DF	SS	MS	F	P
PHA	5	0,0076942	0,0015388	289,55	0,000
Error	12	0,0000638	0,0000053		
Total	17	0,0077580			

S = 0,002305 R-Sq = 99,18% R-Sq(adj) = 98,84%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
AA	3	0,002298	0,000272	(*-)
CA	3	0,001577	0,000047	(-*)
FRA	3	0,060067	0,004974	(*)
GA	3	0,002227	0,000281	(*-)
PRA	3	0,017850	0,002556	(-*)
QUERCETIN	3	0,010123	0,000675	(*-)

Pooled StDev = 0,002305

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ-ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ-FRAP



Εφόσον $p > 0,05$ τα στοιχεία ακολουθούν κανονική κατανομή.

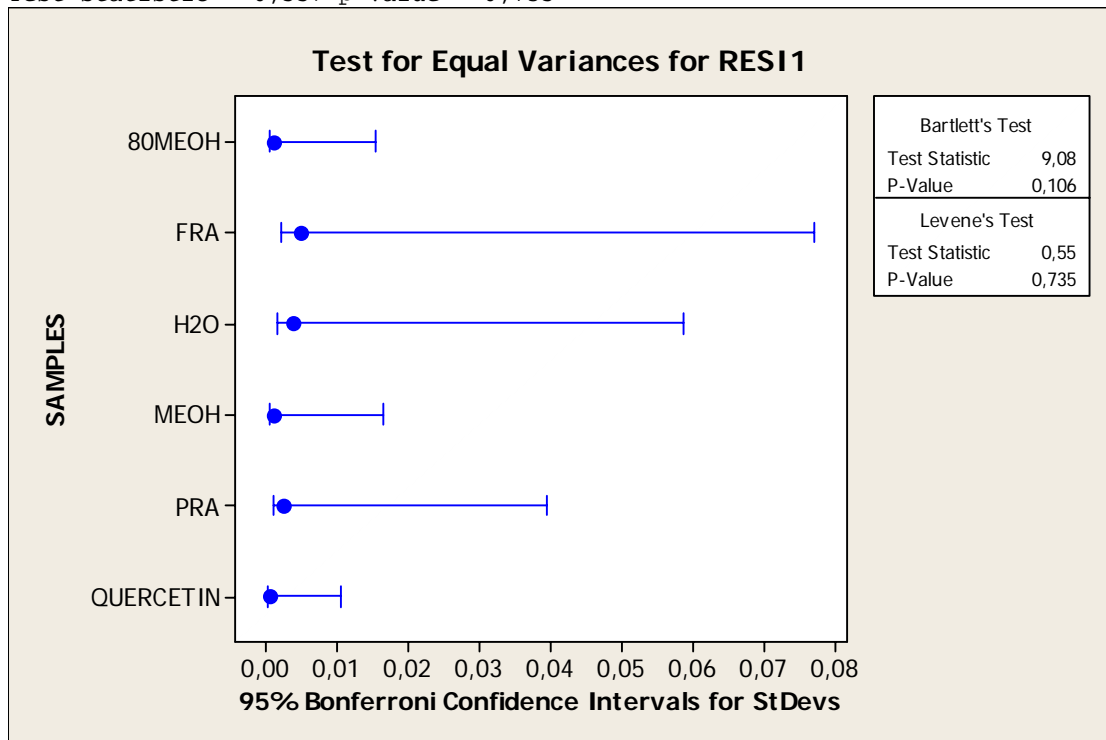
Test for Equal Variances: RESI1 versus SAMPLES

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

SAMPLES	N	Lower	StDev	Upper
80MEOH	3	0,0004272	0,0010000	0,0154758
FRA	3	0,0021248	0,0049743	0,0769806
H2O	3	0,0016172	0,0037859	0,0585903
MEOH	3	0,0004528	0,0010600	0,0164046
PRA	3	0,0010918	0,0025559	0,0395542
QUERCETIN	3	0,0002883	0,0006750	0,0104462

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 9,08; p-value = 0,106

Levene's Test (any continuous distribution)
 Test statistic = 0,55; p-value = 0,735



Εφόσον $p > 0,05$ οι διακυμάνσεις των δειγμάτων είναι ίσες.

One-way ANOVA: IC50 versus SAMPLES

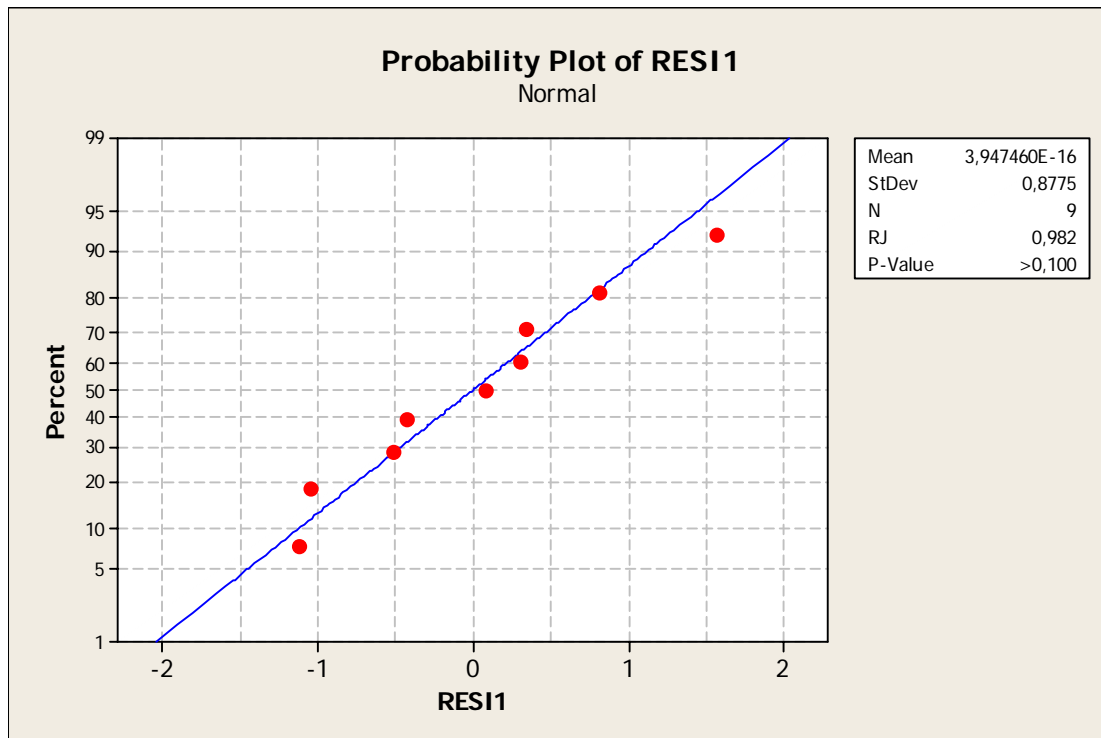
Source	DF	SS	MS	F	P
SAMPLES	5	0,0068123	0,0013625	169,64	0,000
Error	12	0,0000964	0,0000080		
Total	17	0,0069087			

S = 0,002834 R-Sq = 98,60% R-Sq(adj) = 98,02%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
80MEOH	3	0,007000	0,001000	(- * -)
FRA	3	0,060067	0,004974	(- * -)
H2O	3	0,039667	0,003786	(- * -)
MEOH	3	0,009677	0,001060	(- * -)
PRA	3	0,017850	0,002556	(- * -)
QUERCETIN	3	0,010123	0,000675	(- * -)

Pooled StDev = 0,002834

ΠΡΟΤΥΠΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ-FRAP



Αφού $p > 0,05$ τα στοιχεία ακολουθούν κανονική κατανομή.

Test for Equal Variances: RESI1 versus FLAVONOIDS

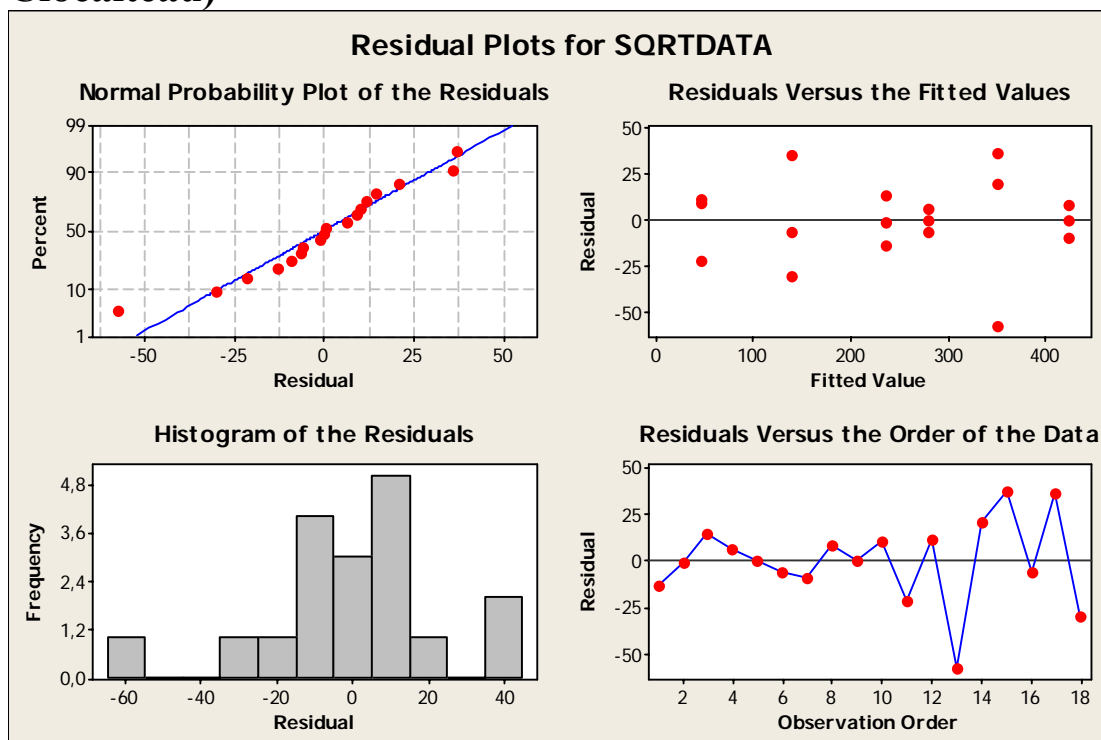
95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

FLAVONOIDS	N	Lower	StDev	Upper
APIGENIN	3	0,633100	1,38524	15,1429
GALANGIN	3	0,176777	0,38679	4,2283
LUTEOLIN	3	0,459637	1,00570	10,9939

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 2,15; p-value = 0,341

Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 0,50; p-value = 0,629

3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού ολικών φαινολών (Μέθοδος Folin-Ciocalteu)



Εφόσον το διάγραμμα Residuals Versus the Fitted Values παρουσιάζει τυχαία διασπορά οι διακυμάνσεις των δειγμάτων θεωρούνται ίσες. Η ομοιογένεια επήλθε μετά από το μετασχηματισμό της τετραγωνικής ρίζας

General Linear Model: SQRTDATA versus SOLVENT; AREA

Factor	Type	Levels	Values
SOLVENT	fixed	3	80MEOH; H2O; MEOH
AREA	fixed	2	MAC; RHOD

Analysis of Variance for SQRTDATA, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
SOLVENT	2	102944	102944	51472	71,33	0,000
AREA	1	81003	81003	81003	112,25	0,000
SOLVENT*AREA	2	102699	102699	51350	71,16	0,000
Error	12	8660	8660	722		
Total	17	295306				

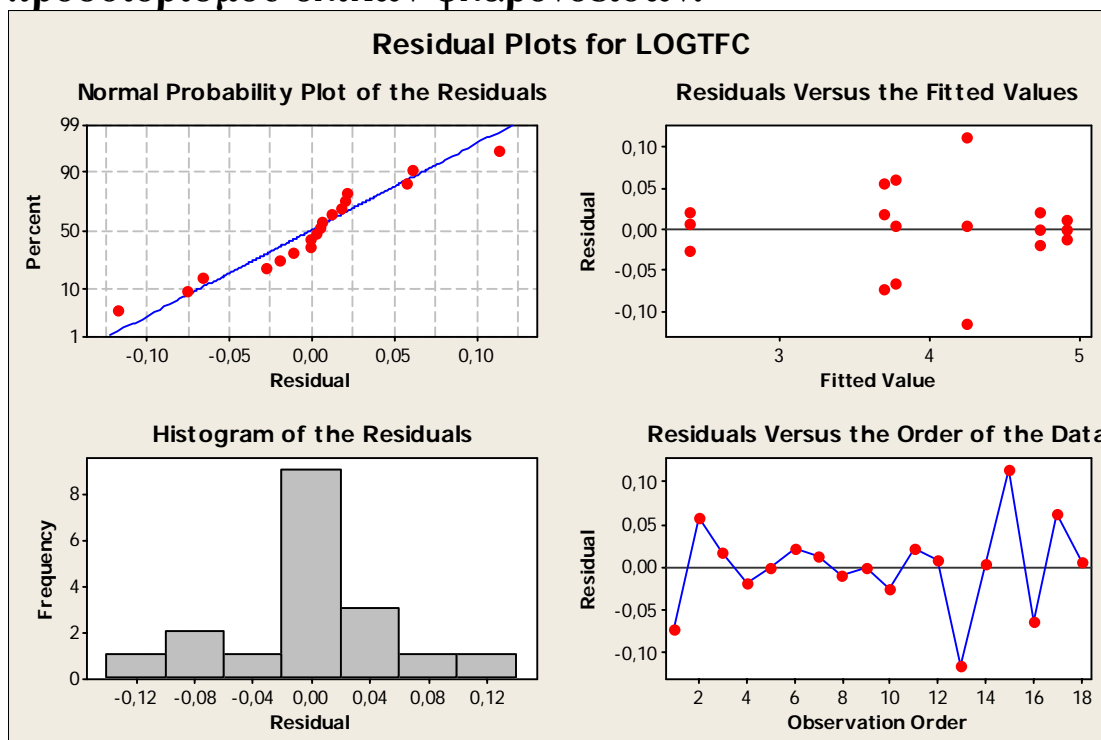
S = 26,8636 R-Sq = 97,07% R-Sq(adj) = 95,85%

Least Squares Means for SQRTDATA

SOLVENT	Mean	SE Mean
80MEOH	281,68	10,967
H2O	141,14	10,967

MEOH		315,92	10,967
AREA			
MAC		313,33	8,955
RHOD		179,16	8,955
SOLVENT*AREA			
80MEOH	MAC	423,83	15,510
80MEOH	RHOD	139,53	15,510
H2O	MAC	236,51	15,510
H2O	RHOD	45,77	15,510
MEOH	MAC	279,65	15,510
MEOH	RHOD	352,19	15,510

4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών.



Εφόσον το διάγραμμα Residuals Versus the Fitted Values παρουσιάζει τυχαία διασπορά οι διακυμάνσεις των δειγμάτων είναι ίσες. Η ομοιογένεια επήλθε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό.

General Linear Model: LOGTFC versus SOLVENT; AREA

Factor	Type	Levels	Values
SOLVENT	fixed	3	80MEOH; H2O; MEOH
AREA	fixed	2	MAC; RHOD

Analysis of Variance for LOGTFC, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
SOLVENT	2	7,6138	7,6138	3,8069	987,20	0,000
AREA	1	4,3015	4,3015	4,3015	1115,47	0,000
SOLVENT*AREA	2	0,5721	0,5721	0,2860	74,18	0,000
Error	12	0,0463	0,0463	0,0039		
Total	17	12,5337				

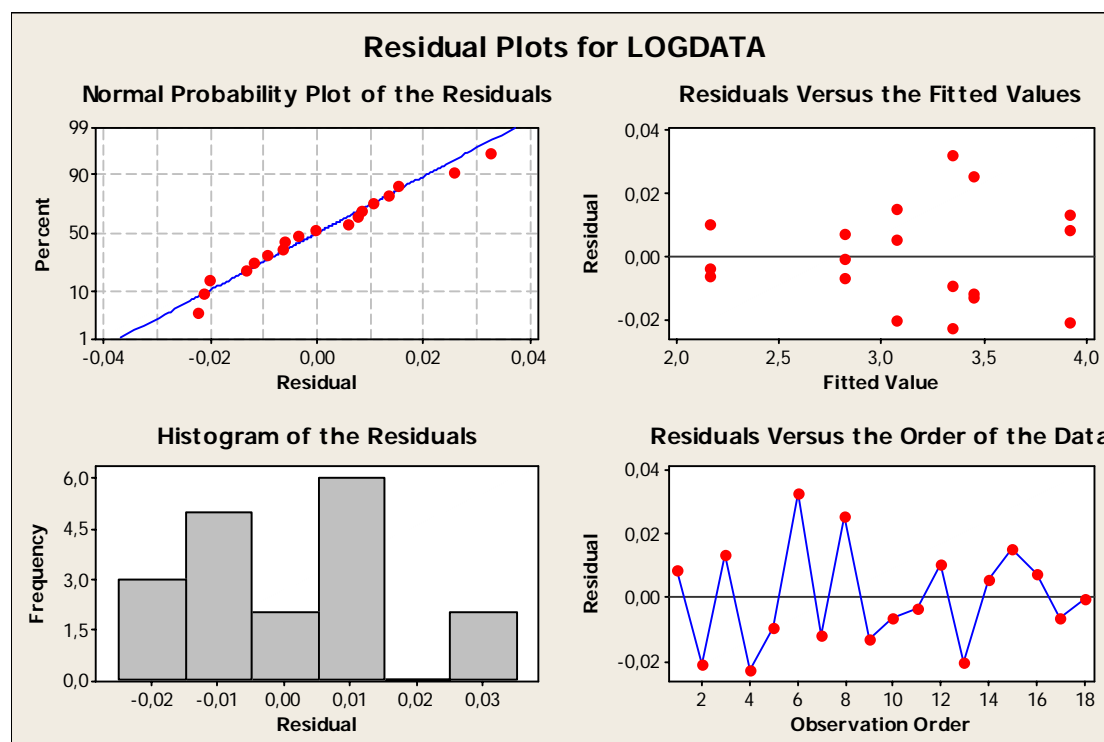
S = 0,0620988 R-Sq = 99,63% R-Sq(adj) = 99,48%

Least Squares Means for LOGTFC

SOLVENT	Mean	SE Mean
80MEOH	4,346	0,02535
H2O	3,047	0,02535
MEOH	4,495	0,02535
AREA		

MAC		4,452	0,02070
RHOD		3,474	0,02070
SOLVENT*AREA			
80MEOH	MAC	4,920	0,03585
80MEOH	RHOD	3,772	0,03585
H2O	MAC	3,699	0,03585
H2O	RHOD	2,396	0,03585
MEOH	MAC	4,736	0,03585
MEOH	RHOD	4,255	0,03585

5. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων προσδιορισμού φαινολικών οξέων με HPLC



Εφόσον το διάγραμμα Residuals Versus the Fitted Values παρουσιάζει τυχαία διασπορά οι διακυμάνσεις των στοιχείων θεωρούνται ίσες. Η ομοιογένεια επήλθε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό.

General Linear Model: LOGDATA versus SOLVENT; AREA

Factor	Type	Levels	Values
SOLVENT	fixed	3	H2O; MEOH; 80MEOH
AREA	fixed	2	MAC; RHOD

Analysis of Variance for LOGDATA, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
SOLVENT	2	0,0891	0,0891	0,0445	124,53	0,000
AREA	1	3,5578	3,5578	3,5578	9947,40	0,000
SOLVENT*AREA	2	1,8080	1,8080	0,9040	2527,59	0,000
Error	12	0,0043	0,0043	0,0004		
Total	17	5,4592				

S = 0,0189120 R-Sq = 99,92% R-Sq(adj) = 99,89%

Unusual Observations for LOGDATA

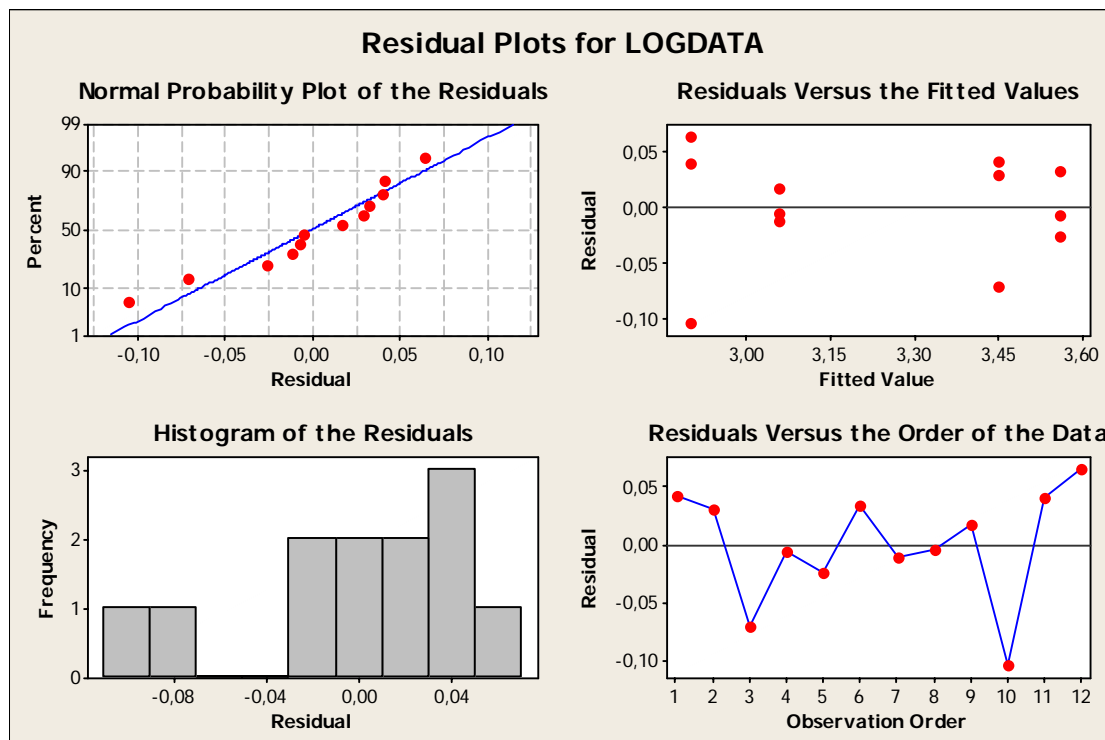
Obs	LOGDATA	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
6	3,38041	3,34793	0,01092	0,03248	2,10 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for LOGDATA

SOLVENT		Mean	SE Mean
H2O		3,039	0,007721
MEOH		3,211	0,007721
80MEOH		3,140	0,007721
AREA			
MAC		3,575	0,006304
RHOD		2,686	0,006304
SOLVENT*AREA			
H2O	MAC	3,920	0,010919
H2O	RHOD	2,158	0,010919
MEOH	MAC	3,348	0,010919
MEOH	RHOD	3,073	0,010919
80MEOH	MAC	3,456	0,010919
80MEOH	RHOD	2,825	0,010919

6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων προσδιορισμού φλαβονοειδών με HPLC



Εφόσον το διάγραμμα Residuals Versus the Fitted Values παρουσιάζει τυχαία διασπορά οι διακυμάνσεις των στοιχείων θεωρούνται ίσες. Η ομοιογένεια επήλθε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό.

General Linear Model: LOGDATA versus SOLVENT; AREA

Factor	Type	Levels	Values
SOLVENT	fixed	2	MEOH; 80MEOH
AREA	fixed	2	MAC; RHOD

Analysis of Variance for LOGDATA, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
SOLVENT	1	0,00167	0,00167	0,00167	0,50	0,500
AREA	1	0,83021	0,83021	0,83021	248,73	0,000
SOLVENT*AREA	1	0,05442	0,05442	0,05442	16,30	0,004
Error	8	0,02670	0,02670	0,00334		
Total	11	0,91301				

S = 0,0577741 R-Sq = 97,08% R-Sq(adj) = 95,98%

Unusual Observations for LOGDATA

Obs	LOGDATA	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
-----	---------	-----	--------	----------	----------

10 2,79309 2,89780 0,03336 -0,10471 -2,22 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for LOGDATA

SOLVENT		Mean	SE Mean
MEOH		3,252	0,02359
80MEOH		3,228	0,02359
AREA			
MAC		3,503	0,02359
RHOD		2,977	0,02359
SOLVENT*AREA			
MEOH	MAC	3,447	0,03336
MEOH	RHOD	3,056	0,03336
80MEOH	MAC	3,559	0,03336
80MEOH	RHOD	2,898	0,03336

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

1. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – DRRH

Πίνακας 1. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,05	9,2	5,5	7,05	7,25	1,85809
0,06	17,91	13,82	13,26	14,99667	2,53851
0,08	17,34	16,5	19,04	17,62667	1,294038
0,1	19,61	19,61	23,69	20,97	2,355589
0,2	41,18	37,52	45,7	41,46667	4,097528
0,3	56,42	60,23	72,21	62,95333	8,239747
0,4	91,54	90,41	91,53	91,16	0,649538
0,5	91,82	91,52	90,83	91,39	0,507642

Πίνακας 2. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,08	29,27	29,45	26,54	28,42	1,630613
0,1	34,91	33,27	34,91	34,36333	0,946854
0,2	62,18	68	66,73	65,63667	3,060169
0,3	80	87,09	80,18	82,42333	4,042454
0,4	93,27	92,09	93,45	92,93667	0,738738
0,5	92,36	92,09	93,09	92,51333	0,517333
0,6	93,09	92,09	92,09	92,42333	0,57735
0,7	93,09	92,09	92,09	92,42333	0,57735
0,8	93,09	91,63	91,09	91,93667	1,034666

Πίνακας 3. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,1	26,63	22,22	23,04	23,96333	2,345513
0,2	39,54	42,32	42,97	41,61	1,821895
0,3	64,412	62,479	58,132	61,67433	3,216398
0,35	65,861	62,963	64,052	64,292	1,463831
0,4	75,24	70,92	74,45	72,685	2,496087
0,5	85,95	89,05	88,07	87,69	1,58455
0,6	91,82	88,24	89,38	89,81333	1,828916
0,7	90,03	91,5	90,85	90,79333	0,736637
0,8	92,48	90,85	91,01	91,44667	0,898462

Πίνακας 4. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ρόδου

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,6	23,289	26,842	24,078	24,73633	1,865745
0,8	38,158	33,816	35,263	35,74567	2,210875
0,9	41,711	37,5	40,526	39,91233	2,171536
1	44,474	41,316	49,079	44,95633	3,903912
1,2	53,816	55	47,895	52,237	3,806598
1,4	57,632	49,474	53,947	53,68433	4,085338
1,6	56,576	52,237	58,816	55,87633	3,344841
1,8	57,368	60	59,605	58,991	1,419367
2	68,269	59,079	64,737	64,02833	4,635804
2,2	65	66,94	66,257	66,06567	0,984051
2,4	73,77	71,995	68,579	71,448	2,638376
2,6	75,956	74,044	79,098	76,366	2,551824
2,8	77,869	74,863	79,235	77,32233	2,236678

Πίνακας 5. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,5	20,62	18,66	22,26	20,51333	1,802369
1	33,55	33,88	37,64	35,02333	2,272099
1,4	43,54	45,17	42,06	43,59	1,555603
1,8	54,01	52,05	45,83	50,63	4,270878
2	51,55	60,39	48,61	53,51667	6,131308
2,5	56,63	60,88	58,1	58,53667	2,158387
3	78,72	78,23	78,4	78,45	0,248797
3,5	80,03	84,62	81,67	82,10667	2,325948
4	85,6	84,78	85,11	85,16333	0,412593
4,5	86,58	85,6	86,09	86,09	0,49
5	86,09	86,58	86,25	86,30667	0,249867

Πίνακας 6. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,5	30,41	23,42	24,25	26,02667	3,818695
1	35,62	34,38	33,07	34,35667	1,27516
2	47,67	46,71	46,85	47,07667	0,518588
3	65,07	66,99	66,85	66,30333	1,070389
3,5	74,52	68,9	69,18	70,86667	3,166975
4	80,55	78,49	73,42	77,48667	3,669364
4,5	80,96	79,45	82,19	80,86667	1,372382
5	86,57	86,03	85,07	85,89	0,759737

Πίνακας 7. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,008	21,38	24,8	23,19	23,12333	1,710974
0,01	28,88	30,46	32,98	30,77333	2,067881
0,02	59,22	60	68,15	62,45667	4,945971
0,03	68,79	70,13	68,35	69,09	0,927146
0,04	82,64	79,61	78,98	80,41	1,956758
0,05	95,33	95,78	95,33	95,48	0,259808
0,06	95,78	95,03	95,48	95,43	0,377492
0,08	95,03	94,87	94,57	94,82333	0,233524

Πίνακας 8. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,008	11,47	8,41	6,5	8,793333	2,507077
0,01	22,37	21,98	31,74	25,36333	5,525797
0,02	23,7	23,71	24,47	23,96	0,441701
0,03	42,56	43,17	39,1	41,61	2,195017
0,04	58,45	54,38	51,12	54,65	3,672451
0,08	84,93	89,21	82,89	85,67667	3,225482
0,1	93,48	94,09	94,09	93,88667	0,352184
0,2	95,88	95,88	96,08	95,94667	0,11547

Πίνακας 9. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του φερουλικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,04	21,6	20,79	20,62	21,00333	0,523673
0,06	34,31	31,88	33,1	33,09667	1,215003
0,08	47,14	46,96	46,27	46,79	0,459239
0,1	51,64	48,18	53,89	51,23667	2,876288
0,2	83,53	80,24	79,2	80,99	2,260332
0,3	86,82	85,78	85,44	86,01333	0,718981
0,5	90,98	89,95	89,08	90,00333	0,951122
0,7	93,58	93,76	93,76	93,7	0,103923
0,9	94,62	94,8	94,28	94,56667	0,264071

Πίνακας 10. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρωτοκατεχικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,008	18,9	5,1	17,39	13,79667	7,569282
0,01	26,04	24,91	22,64	24,53	1,73156
0,02	47,63	39,13	37,43	41,39667	5,464735
0,03	68,24	61,24	62	63,82667	3,840903
0,04	67,11	68,24	65,22	66,85667	1,525855
0,1	86,04	84,15	85,28	85,15667	0,951017
0,25	94,33	94,52	94,7	94,51667	0,185023
0,3	95,65	94,71	95,27	95,21	0,472864
0,4	95,84	95,08	95,08	95,33333	0,438786
0,5	95,65	96,59	96,59	96,27667	0,542709

Πίνακας 11. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του ΒΗΤ.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,06	15,79	15,41	16,54	15,91333	0,575007
0,08	27,44	18,98	19,17	21,86333	4,830469
0,1	28,38	25,56	25,56	26,5	1,628128
0,14	39,47	45,11	41,16	41,91333	2,894483
0,16	44,36	49,43	48,68	47,49	2,736476
0,2	52,44	50,75	48,3	50,49667	2,081594
0,4	73,28	74,46	70,14	72,62667	2,232876
0,5	74,85	76,62	76,82	76,09667	1,084266
0,6	76,03	78,58	78,58	77,73	1,472243
0,8	90,03	93,69	91,92	91,88	1,830328
1,4	93,23	95,68	93,04	93,98333	1,472424
2	95,86	95,68	96,8	96,11333	0,601443

Πίνακας 12. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση της κερκετίνης.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,015	12,5	13,4	13,25	13,05	0,482183
0,025	26,05	27,4	26,2	26,55	0,739932
0,035	45,03	45,78	45,48	45,43	0,377492
0,06	55,12	49,54	48,94	51,2	3,408049
0,07	71,08	66,86	67,62	68,52	2,249355
0,08	94,08	95,18	95,3	94,85333	0,672409
0,09	95,93	95,78	95,78	95,83	0,086603
0,1	93,97	95,33	95,63	94,97667	0,884609

Πίνακας 13. % Ικανότητα αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας από τα πρότυπα φλαβονοειδή στη συγκέντρωση 500 ppm

Φλαβονοειδές	(a)% ικανότητα αδρανοποίησης	(b)% ικανότητα αδρανοποίησης	(c)% ικανότητα αδρανοποίησης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Γκαλαγκίνη	54,746	53,37	54,883	54,333	0,836791
Λουτεολίνη	84,182	84,457	84,044	84,22767	0,210253
Απιγενίνη	0,196	1,569	1,765	1,176667	0,854918

2. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – FRAP

Πίνακας 14. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,004	33,929	30,189	32,727	32,28167	1,909356
0,008	35,088	43,939	45,588	41,53833	5,646672
0,01	51,316	50,667	51,316	51,09967	0,3747
0,02	63,725	65,421	64,762	64,636	0,854992
0,04	73,571	75,817	75,658	75,01533	1,253353
0,1	85,547	84,836	85,985	85,456	0,57988
0,2	89,244	89,835	90	89,693	0,397501
0,3	90,997	90,909	90,909	90,93833	0,050807
0,4	91,355	91,759	91,019	91,37767	0,37052
0,5	92,227	92,402	92,402	92,34367	0,101036

Πίνακας 15. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,002	29,032	26,667	29,032	28,24367	1,365433
0,003	35,294	38,028	44,304	39,20867	4,619578
0,005	48,837	45	53,191	49,00933	4,098218
0,008	51,648	53,684	51,648	52,32667	1,175485
0,01	53,191	53,684	55,102	53,99233	0,99211
0,02	64,228	69,917	69,917	68,02067	3,284546
0,03	69,444	68,116	65,625	67,72833	1,938789
0,05	76,719	79,956	73,494	76,723	3,231002
0,06	80,269	80,269	79,535	80,02433	0,423775
0,08	81,743	81,743	81,743	81,743	0
0,1	84,173	83,27	84,173	83,872	0,521347
0,2	88,267	89,136	89,647	89,01667	0,697696
0,3	89,647	89,815	89,781	89,74767	0,088822
0,4	90,833	90,947	90,909	90,89633	0,058046
0,5	90,717	91,698	91,039	91,15133	0,500054

Πίνακας 16. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,02	34,615	29,167	33,981	32,58767	2,979297
0,04	51,079	49,63	51,773	50,82733	1,093442
0,06	56,962	57,5	62,011	58,82433	2,772813
0,08	64,767	65,306	62,222	64,09833	1,647149
0,1	68,075	67,627	68,95	68,21733	0,672887
0,2	73,946	74,627	73,946	74,173	0,393176
0,3	76,792	76,871	78,816	77,493	1,146432
0,4	79,012	78,274	80,059	79,115	0,896946
0,5	79,882	80,403	80,117	80,134	0,260916

Πίνακας 17. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ρόδου.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,06	19,266	15,385	14,563	16,405	2,5118
0,1	24,138	25,424	22,807	24,123	1,3086
0,2	45	43,226	45	44,409	1,0242
0,3	56	56,863	59,259	57,374	1,6885
0,4	62,553	61,403	64,659	62,872	1,6512
0,5	67,765	66,54	66,917	67,074	0,6274
0,6	66,154	67,647	67,883	67,228	0,9376
0,7	71,613	68,459	72,755	70,942	2,2251
0,8	76,903	76,719	76,842	76,821	0,0937
0,9	79,048	77,494	78,589	78,377	0,7984

Πίνακας 18. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του μεθανολικού/υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,1	39,682	37,7	35,593	37,658	2,0448
0,2	55,814	47,222	51,282	51,439	4,2982
0,3	60,417	53,086	58,242	57,248	3,7652
0,4	62,376	60,825	67,521	63,574	3,5051
0,5	71,429	70,313	70,543	70,762	0,5893
0,6	72,262	72,857	72,642	72,587	0,3013
0,7	75	76,25	75,163	75,471	0,6795
0,8	76,25	77,515	77,907	77,224	0,866
0,9	78,652	78,771	78,035	78,486	0,3951

Πίνακας 19. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος Ρόδου.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,06	13,415	20,225	11,25	14,963	4,6836
0,08	31,731	33,645	36,607	33,994	2,4567
0,1	44,898	49,057	45,454	46,47	2,2579
0,2	53,846	54,622	52,212	53,56	1,2302
0,3	68,235	67,857	70,652	68,915	1,5164
0,4	73,786	75,565	75	74,784	0,909
0,5	76,106	75,893	77,215	76,405	0,7098
0,6	78,571	78,138	82,937	79,882	2,6546
0,7	79,31	78,571	79,775	79,219	0,6072
0,8	81,818	79,231	80,292	80,447	1,3004
0,9	82,524	82,295	82,468	82,429	0,1194

Πίνακας 20. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,0008	34,677	38,168	25,688	32,84433	6,438
0,002	47,402	47,059	49,375	47,94533	1,7507
0,003	51,497	54,237	55,978	53,904	2,2594
0,008	68,359	67,984	68,846	68,39633	0,4301
0,02	80,575	81,163	81,119	80,95233	0,324
0,03	83,832	83,195	81,715	82,914	1,0858
0,04	81,293	83,195	81,92	82,136	0,9672
0,05	83,897	84,055	83,16	83,704	0,4775
0,06	84,601	84,803	84,118	84,50733	0,3514
0,08	84,717	84,18	84,241	84,37933	0,2941

Πίνακας 21. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,0006	33,334	28,205	31,707	31,082	2,620998
0,0008	34,884	34,884	37,778	35,84867	1,670852
0,001	45,098	50	45,098	46,732	2,830171
0,002	52,113	48,485	50	50,19933	1,822195
0,005	76,271	77,419	78,294	77,328	1,014565
0,01	84,27	84,615	84,946	84,61033	0,338024
0,03	89,63	90,21	89,164	89,668	0,524034
0,04	90	89,164	89,272	89,47867	0,454706
0,05	89,928	91,515	90,968	90,80367	0,806161
0,08	91,997	91,716	91,86	91,85767	0,140515

Πίνακας 22. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του φερουλικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,01	10,526	17,073	20,93	16,17633	5,25964
0,02	17,073	32	22,727	23,93333	7,536263
0,03	30,612	26,087	29,167	28,622	2,311206
0,04	44,262	46,032	46,875	45,723	1,333624
0,06	48,485	51,428	50,725	50,21267	1,536937
0,08	57,5	56,41	58,536	57,482	1,063114
0,09	65,306	64,948	65,656	65,30333	0,354008
0,1	65,306	66,99	67,925	66,74033	1,32723
0,2	75,714	77,778	77,027	76,83967	1,044674
0,3	76,712	77,181	78,882	77,59167	1,141801
0,4	84,889	82,741	84,038	83,88933	1,08169
0,5	82,474	84,186	84,112	83,59067	0,967769

Πίνακας 23. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του πρωτοκατεχικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,009	28,846	30,189	45,558	34,86433	9,2853
0,015	40,332	46,377	43,077	43,262	3,026743
0,02	55	52,631	48,571	52,06733	3,251354
0,04	62,245	63	61,458	62,23433	0,771055
0,05	69,231	72,794	70,732	70,919	1,788846
0,07	74,286	73,723	74,468	74,159	0,388398
0,1	76,623	76	76,316	76,313	0,311511
0,2	82,775	83,41	82,775	82,98667	0,366617
0,3	84,874	84,81	85,425	85,03633	0,338113
0,5	87,143	87,004	86,567	86,90467	0,300573

Πίνακας 24. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,001	36,111	33,333	39,474	36,306	3,07514
0,002	48,315	45,882	45,882	46,693	1,404693
0,003	51,064	50	51,579	50,881	0,80525
0,005	54,902	68,055	65,926	62,961	7,060012
0,01	74,863	76,042	78,505	76,47	1,85834
0,03	81,749	83,512	86,309	83,85667	2,299456
0,05	89,074	89,202	89,151	89,14233	0,064439
0,06	85,933	87,634	89,755	87,774	1,914842
0,07	89,845	90,744	92,243	90,944	1,211446
0,1	91,873	92,484	92,698	92,35167	0,428124

Πίνακας 25. Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου με τη συγκέντρωση της κερκετίνης

Συγκέντρωση (g/L)	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0,0006	2,703	6,493	6,493	5,229667	2,188158
0,002	19,101	17,241	15,294	17,212	1,903666
0,003	21,739	23,404	29,411	24,85133	4,035589
0,005	26,531	37,391	35,714	33,212	5,846358
0,008	44,186	44,186	44,186	44,186	0
0,01	48,201	47,826	52,631	49,55267	2,6725
0,03	75,51	71,653	77,358	74,84033	2,910858
0,05	82,353	83,295	83,562	83,07	0,635129
0,07	85,992	86,18	86,1	86,09067	0,094347
0,09	87,797	87,586	88,424	87,93567	0,43587
0,1	88,625	88,923	88,443	88,66367	0,242325

Πίνακας 26. % Ικανότητα αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου από τα πρότυπα φλαβονοειδή στη συγκέντρωση 500 ppm

Φλαβονοειδές	(a)% ικανότητα αναγωγής	(b)% ικανότητα αναγωγής	(c)% ικανότητα αναγωγής	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Απιγενίνη	11,66	12,19	14,28	12,71	1,39
Γκαλαγκίνη	60,759	60,509	60	60,42	0,39
Λουτεολίνη	73,16	75,1	74,59	74,28	1,01

3. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A. FOLIN CIOCALTEAU

Πίνακας 27. Μεταβολή της απορρόφησης με τη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.

Συγκέντρωση (ppm)	(a) Απορρόφηση	(b) Απορρόφηση	(c) Απορρόφηση	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
10	0,011	0,007	0,007	0,01	0,00
30	0,038	0,034	0,033	0,04	0,00
50	0,067	0,081	0,059	0,07	0,01
100	0,157	0,115	0,12	0,13	0,02
150	0,175	0,193	0,194	0,19	0,01
300	0,39	0,412	0,391	0,40	0,01
400	0,472	0,505	0,457	0,48	0,02

Πίνακας 28. Μεταβολή της απορρόφησης με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων πρόπολης.

Εκχύλισμα πρόπολης	(a) Απορρόφηση	(b) Απορρόφηση	(c) Απορρόφηση	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Μεθανολικό Δυτ. Μακεδονίας	0,253	0,242	0,231	0,24	0,011
Μεθανολικό/υδατικό Δυτ. Μακεδονίας	0,201	0,218	0,21	0,21	0,0085
Υδατικό Δυτ. Μακεδονίας	0,096	0,105	0,117	0,11	0,01
Μεθανολικό Ρόδου	0,1	0,151	0,163	0,14	0,033
Μεθανολικό/υδατικό Ρόδου	0,093	0,149	0,097	0,11	0,031
Υδατικό Ρόδου	0,035	0,019	0,036	0,03	0,009

B. ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Πίνακας 29. Μεταβολή της απορρόφησης με τη συγκέντρωση της κερκετίνης.

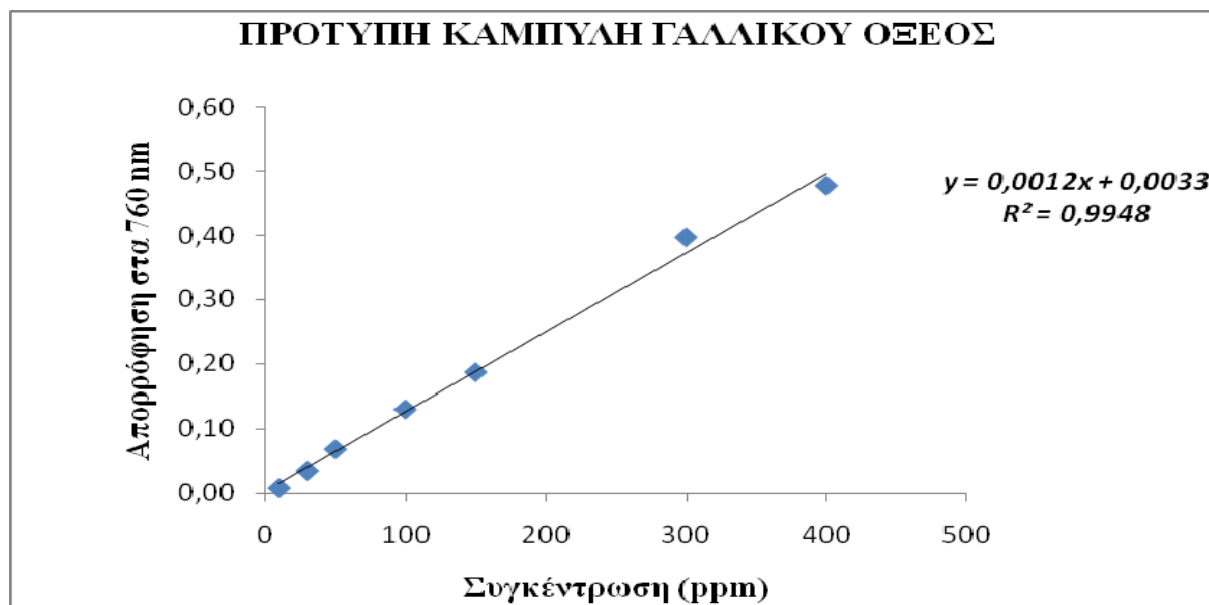
Συγκέντρωση (mg/mL)	(a) Απορρόφηση	(b) Απορρόφηση	(c) Απορρόφηση	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
0,025	0,311	0,315	0,316	0,314	0,002
0,05	0,547	0,555	0,561	0,554	0,006
0,075	0,845	0,799	0,816	0,820	0,019
0,1	1,054	1,097	1,076	1,076	0,018
0,15	1,419	1,437	1,431	1,429	0,007
0,2	1,664	1,673	1,671	1,669	0,004
0,25	1,894	1,911	1,888	1,898	0,010

Πίνακας 30. Μεταβολή της απορρόφησης με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων πρόπολης.

Εκχύλισμα πρόπολης	(a) Απορρόφηση	(b) Απορρόφηση	(c) Απορρόφηση	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Μεθανολικό Δυτ. Μακεδονίας	1,764	1,83	1,91	1,835	0,073
Μεθανολικό/υδατικό Δυτ. Μακεδονίας	1,648	1,574	1,606	1,609	0,037
Υδατικό Δυτ. Μακεδονίας	0,766	0,945	0,884	0,865	0,091
Μεθανολικό Ρόδου	1,17	1,456	1,797	1,474	0,31
Μεθανολικό/υδατικό Ρόδου	0,832	1,013	0,926	0,924	0,09
Υδατικό Ρόδου	0,486	0,521	0,513	0,507	0,018

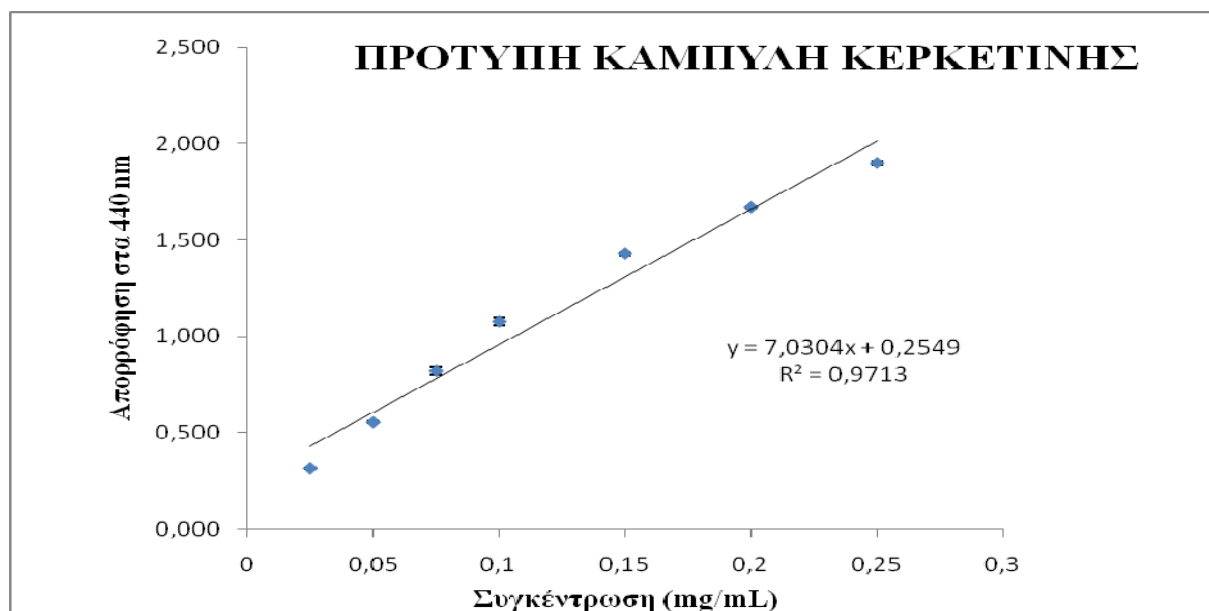
4. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A. FOLIN CIOCALTEAU



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

B. ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη κερκετίνης.

5. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ-HPLC

Πίνακας 31. Μεταβολή του εμβαδού με τη συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος (α).

Συγκέντρωση (ppm)	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
10	32051	49682	54057	45263,33	11649,44
20	368489	290385	335239	331371	39195,4
50	1024013	1053024	1018063	1031700	18705,22
100	2297013	2309385	2374824	2327074	41812,84

Πίνακας 32. Μεταβολή του εμβαδού με τη συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος (β).

Συγκέντρωση (ppm)	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
100	2297013	2309385	2374824	2327074	41812,84
200	5149556	5078434	5012304	5080098	68641,13
400	11286239	11748429	11294660	11443109	264448,1
500	14206051	13871058	13550197	13875769	327952,4

Πίνακας 33. Μεταβολή του εμβαδού με τη συγκέντρωση του φερουλικού οξέος.

Συγκέντρωση (ppm)	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
10	32051	49682	54057	45263,33	11649,44
50	1250785	1225020	1331073	1268959	55313,1
80		1941402	2028063	1984733	61278,58
100	2519399	2529521	2662622	2570514	79928,26

Πίνακας 34. Μεταβολή του εμβαδού με τη συγκέντρωση του κουμαρικού οξέος.

Συγκέντρωση (ppm)	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
20	333829	433809	400308	389315,3	50888,4
50	1582420	1643101	1556227	1593916	44563,34
70	2863021	2036741	1996147	2449881	489192,7
100	3618935	3804354		3711645	131111

Πίνακας 34. Μετρήσεις του εμβαδού και του χρόνου έκλυσης των φαινολικών οξέων στο μεθανολικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας.

Φαινολικό οξύ	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Καφεϊκό	794843	764847	858871	849984	1621,57
Κουμαρικό	205633	394327	506406	400178	65950,01
Φερουλικό	75204	37628	49561	56434	16447,88

Φαινολικό οξύ	(a) Χρόνος Έκλυσης	(b) Χρόνος Έκλυσης	(c) Χρόνος Έκλυσης	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Καφεϊκό	3,79	3,81	3,8	3,8	0,01
Κουμαρικό	5,53	5,8	5,6	5,64	0,14
Φερουλικό	6,21	6,2	6,3	6,23	0,07

Πίνακας 35. Μετρήσεις του εμβαδού και του χρόνου έκλυσης των φαινολικών οξέων στο μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας.

Φαινολικό οξύ	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Καφεϊκό	383214	453031	388645	408296,6	38835,8
Κουμαρικό	251193	310578	224319	262030	44138
Φερουλικό	24912	29557	32802	29090,3	3965,64

Φαινολικό οξύ	(a) Χρόνος Έκλυσης	(b) Χρόνος Έκλυσης	(c) Χρόνος Έκλυσης	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Καφεϊκό	3,8	3,8	3,8	3,8	0
Κουμαρικό	5,6	5,5	5,4	5,5	0,0577
Φερουλικό	6,3	6,3	6,2	6,27	0,0577

6. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ -HPLC

Πίνακας 36. Μεταβολή του εμβαδού με τη συγκέντρωση της κερκετίνης.

Συγκέντρωση (ppm)	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
2,5	71868	73501	74458	73275,67	1309,621
10	217481	191673	196694	201949,3	13683,1
25	613352	567670	570329	583783,7	25641,42
50	1660761	1584667	1365613	1537014	153235,8
70	2781451	2426543	2438264	2548753	201607,9
100	3951481	3473748	3481303	3635511	273664,4

Πίνακας 37. Μετρήσεις του εμβαδού και του χρόνου έκλυσης των φλαβονοειδών στο μεθανολικό εκχύλισμα Δυτ. Μακεδονίας.

Φλαβονοειδές	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Απιγενίνη	672666	705876	625755	668099	40255,27
Γκαλαγκίνη	2815346	2715429	2006767	2512514	440829,75
Κερκετίνη	487532	445793	353171	428832	68767,55
Λουτεολίνη	171664	150008	84945	135539	45133,80

Φλαβονοειδές	(a) Χρόνος Έκλυσης	(b) Χρόνος Έκλυσης	(c) Χρόνος Έκλυσης	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Απιγενίνη	12,664	12,467	12,87	12,67	0,20
Γκαλαγκίνη	36,658	36,377	37,2	36,75	0,42
Κερκετίνη	7,477	7,403	7,63	7,50	0,12
Λουτεολίνη	8,72	8,6	8,89	8,74	0,15

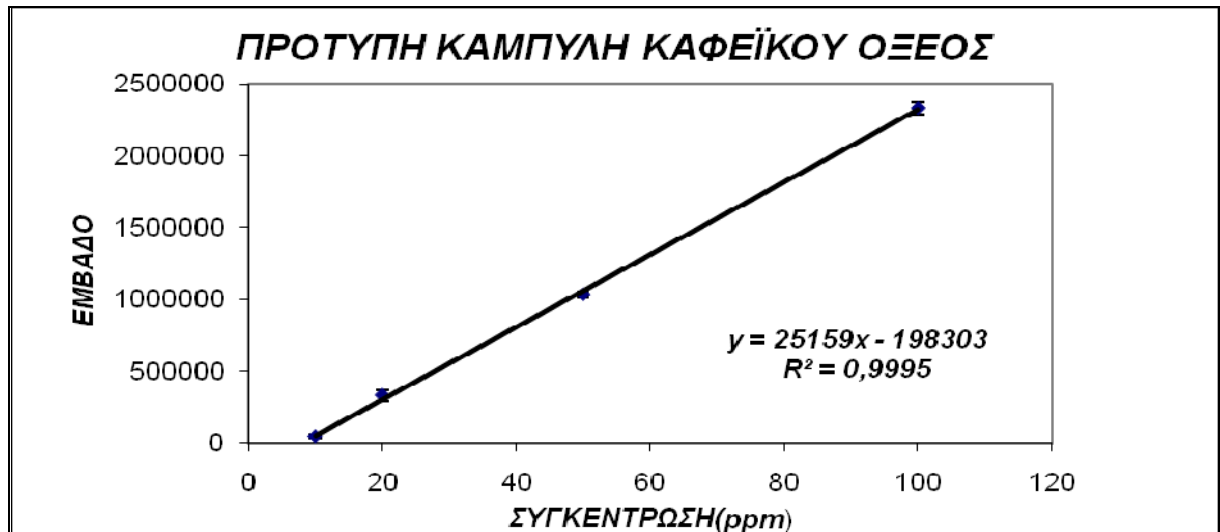
Πίνακας 38. Μετρήσεις του εμβαδού και του χρόνου έκλυσης των φλαβονοειδών στο μεθανολικό/υδατικό εκχύλισμα Ρόδου.

Φλαβονοειδές	(a) εμβαδό	(b) εμβαδό	(c) εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Απιγενίνη	415291	407719	522128	448379,3	63980,33
Γκαλαγκίνη	1714126	1543873	1816484	1691494	137707,42
Κερκετίνη	272457	315187	336908	308184	32791,22
Λουτεολίνη	90320	100590	111739	100883	10712,51

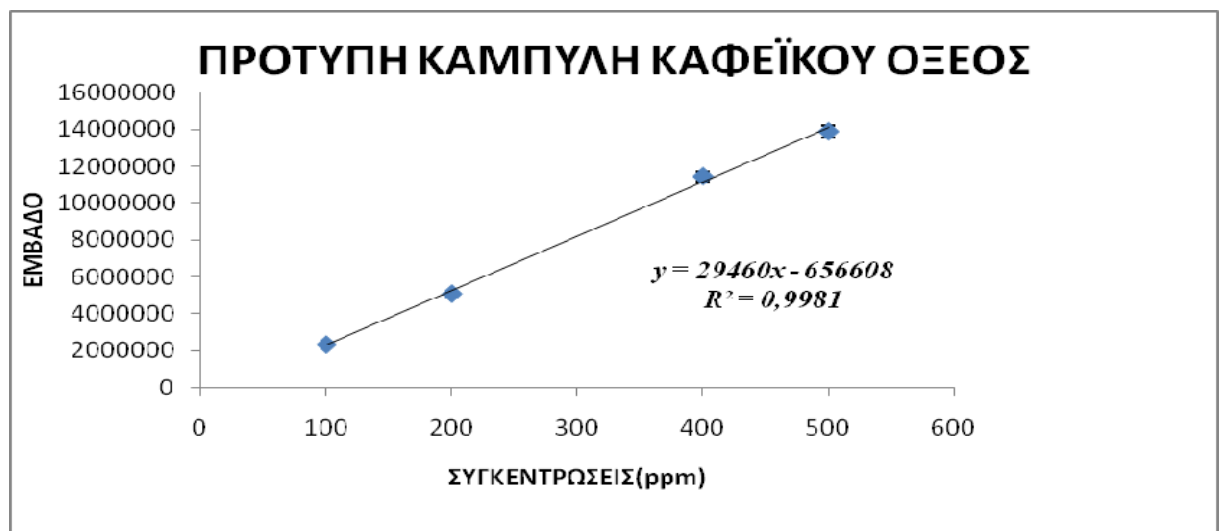
Φλαβονοειδές	(a) Χρόνος Έκλυσης	(b) Χρόνος Έκλυσης	(c) Χρόνος Έκλυσης	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Απιγενίνη	12,155	12,388	12,48	12,34	0,17
Γκαλαγκίνη	35,35	36,003	36,12	35,82	0,41
Κερκετίνη	7,25	7,37	7,43	7,35	0,09
Λουτεολίνη	8,427	8,59	8,65	8,56	0,12

7. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ -HPLC

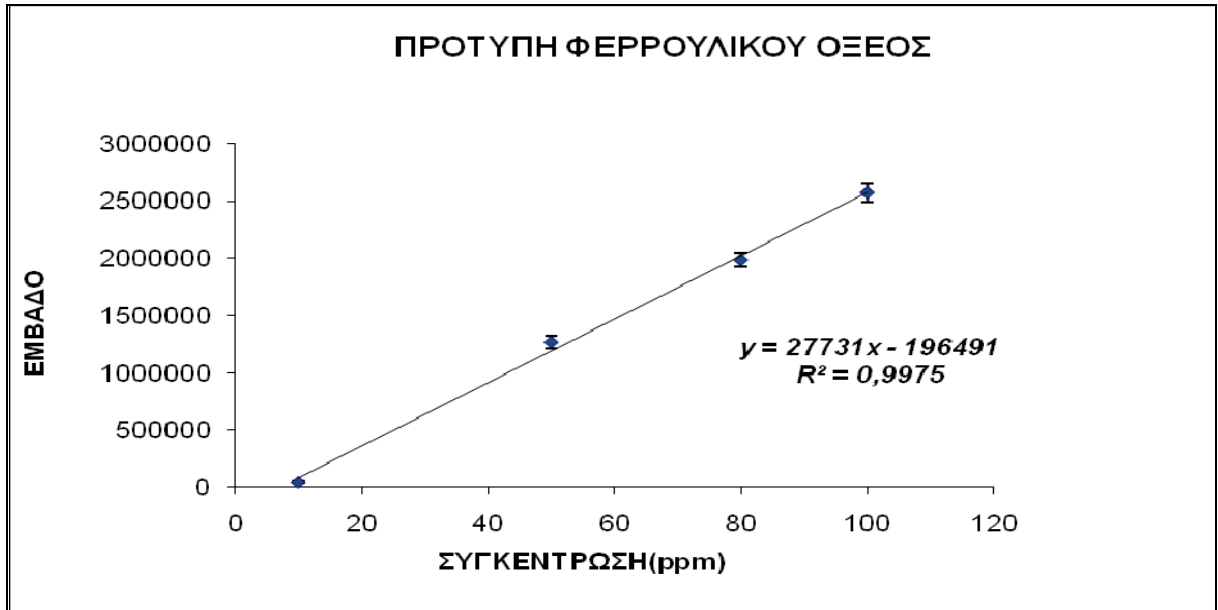
Α. ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ



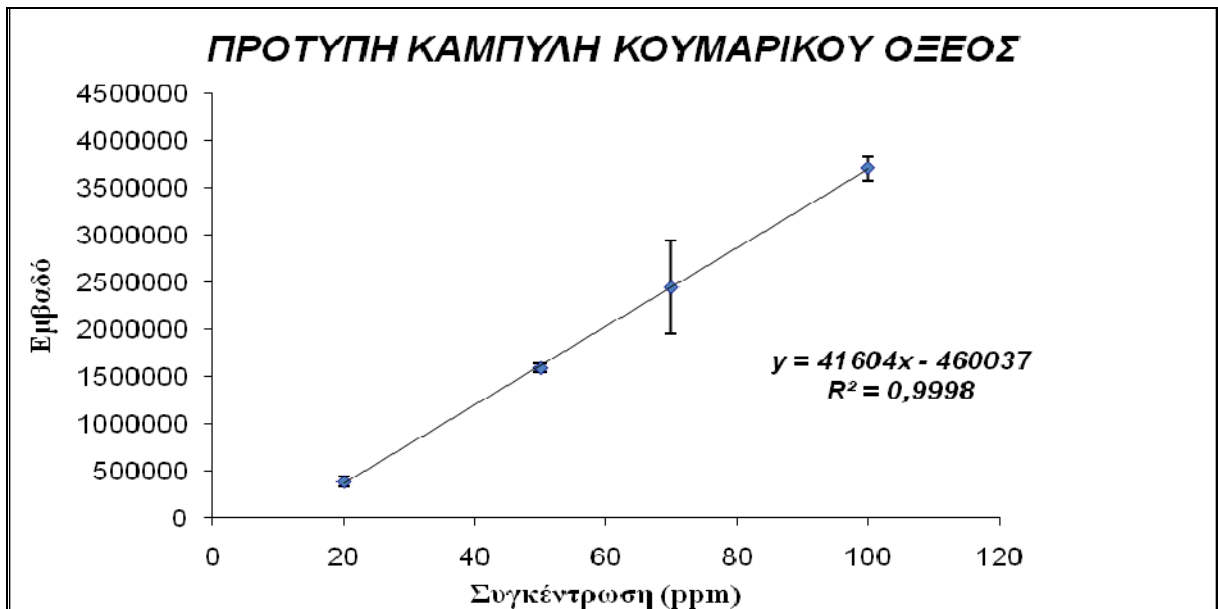
Σχήμα 3. Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος (α).



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος (β)

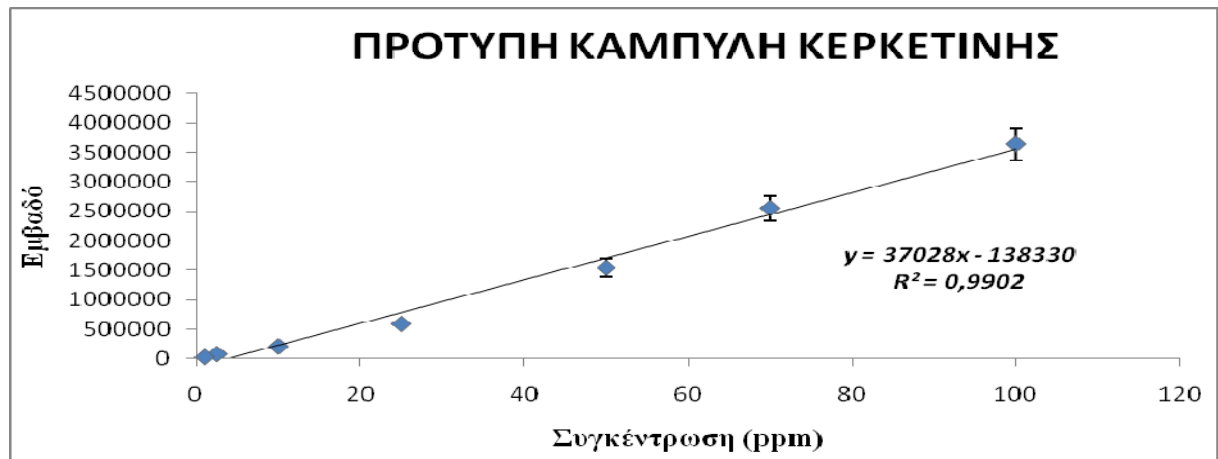


Σχήμα 5. Πρότυπη καμπύλη φερρουλικού οξέος.



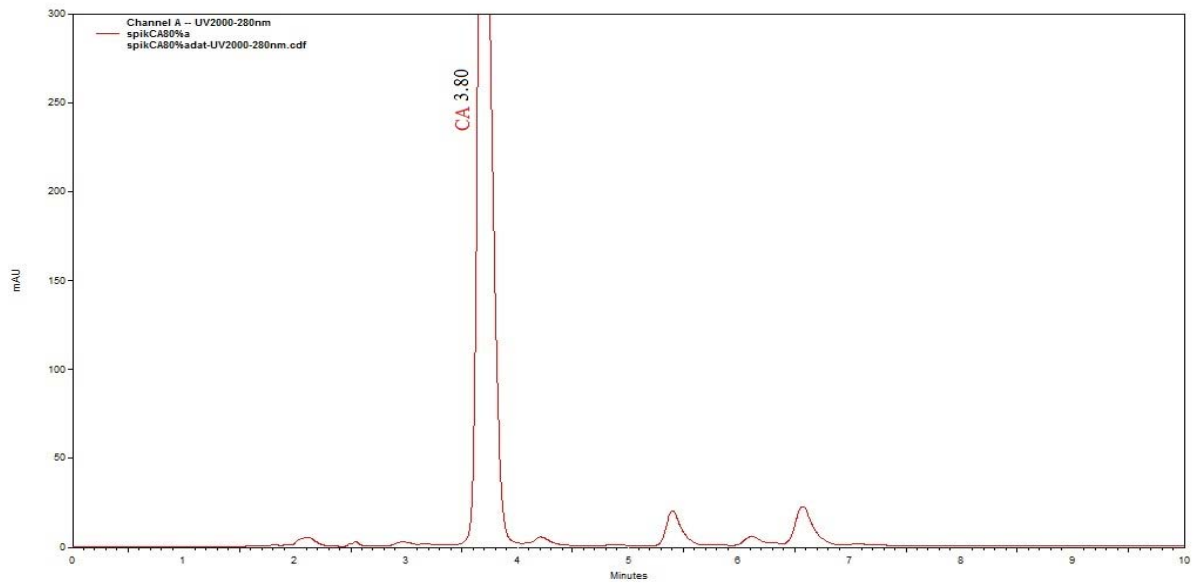
Σχήμα 6. Πρότυπη καμπύλη κουμαρικού οξέος.

Β. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

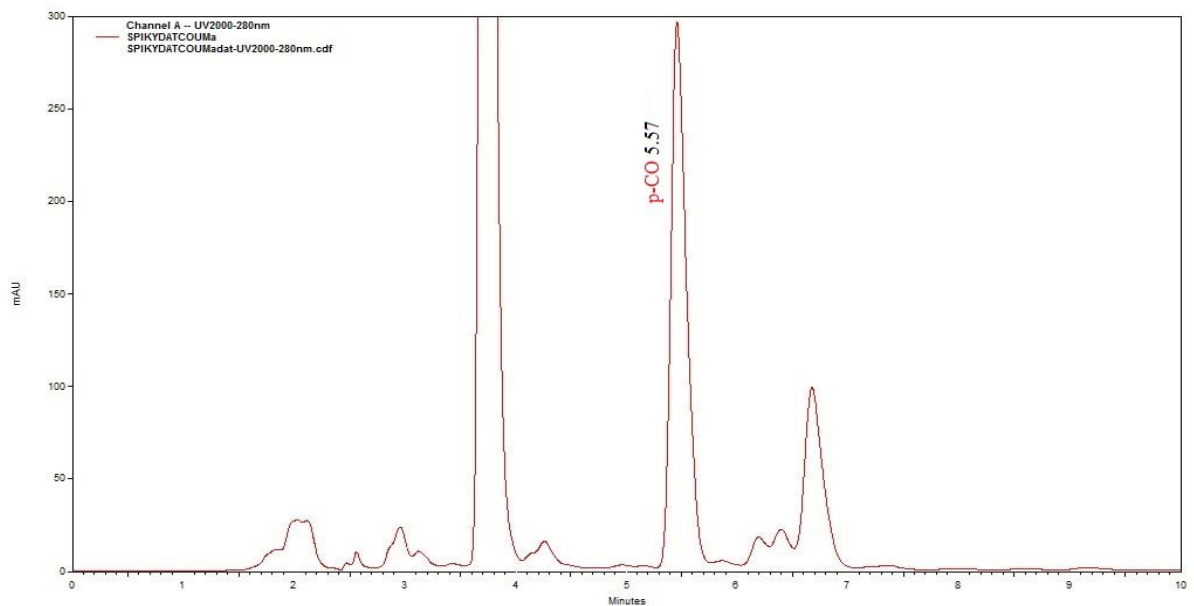


Σχήμα 7. Πρότυπη καμπύλη κερκετίνης

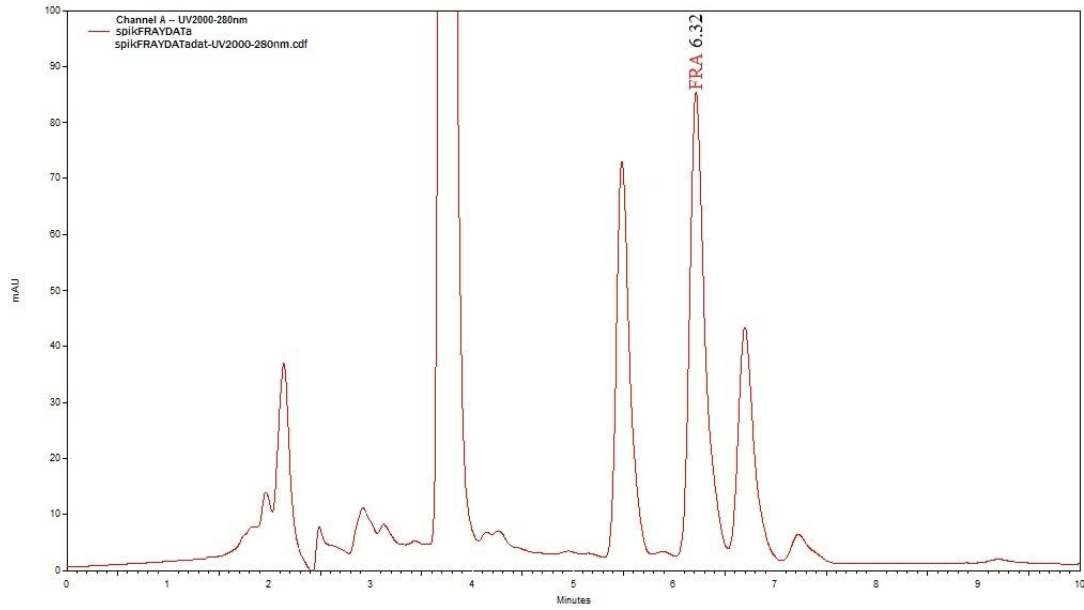
8. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ-HPLC SPIKING Α.ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ



Σχήμα 8. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Δντ. Μακεδονίας με την προσθήκη (spiking) καφεϊκού οξέος (CA: καφεϊκό οξύ)

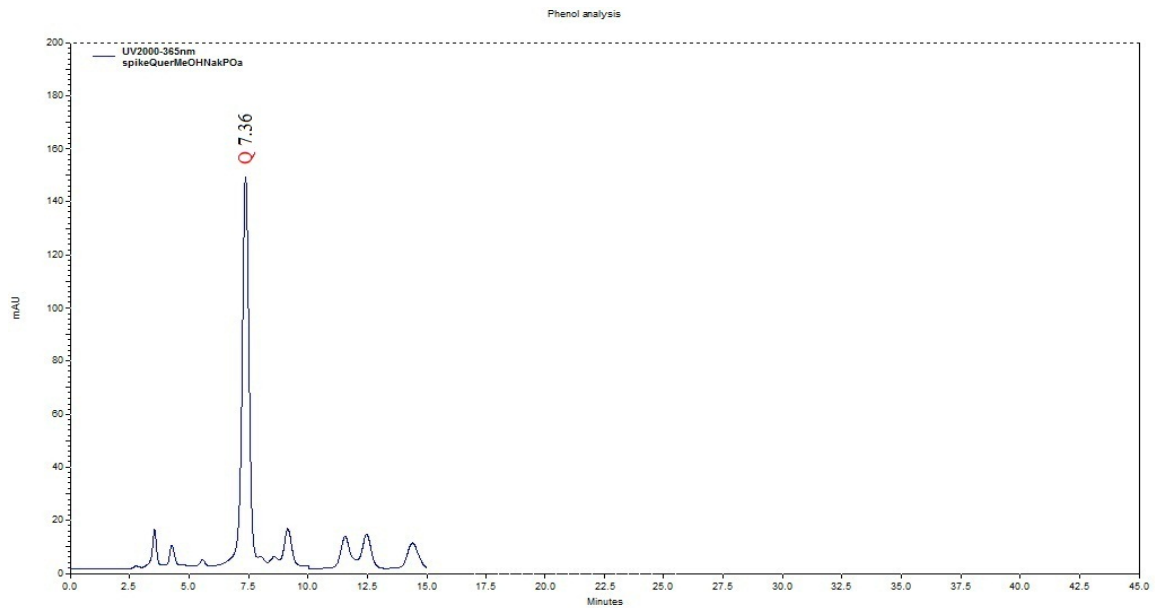


Σχήμα 9. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Δντ. Μακεδονίας με την προσθήκη (spiking) π-κουμαρικού οξέος (p-CO: π-κουμαρικό οξύ)

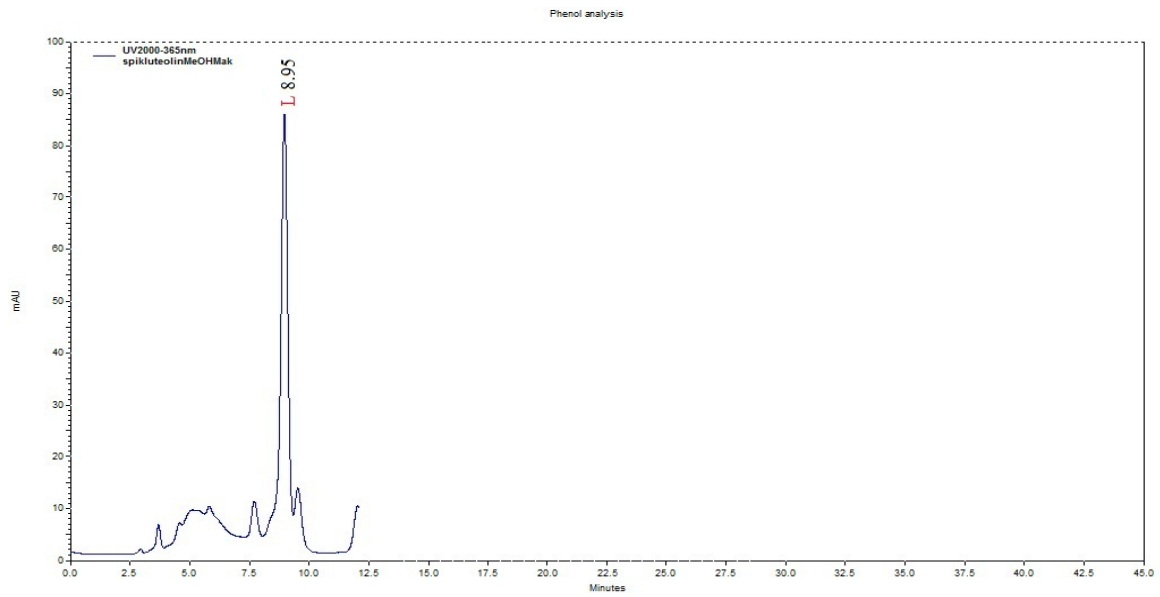


Σχήμα 10. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας με την προσθήκη (spiking) φερουλικού οξέος (FRA: φερουλικό οξύ)

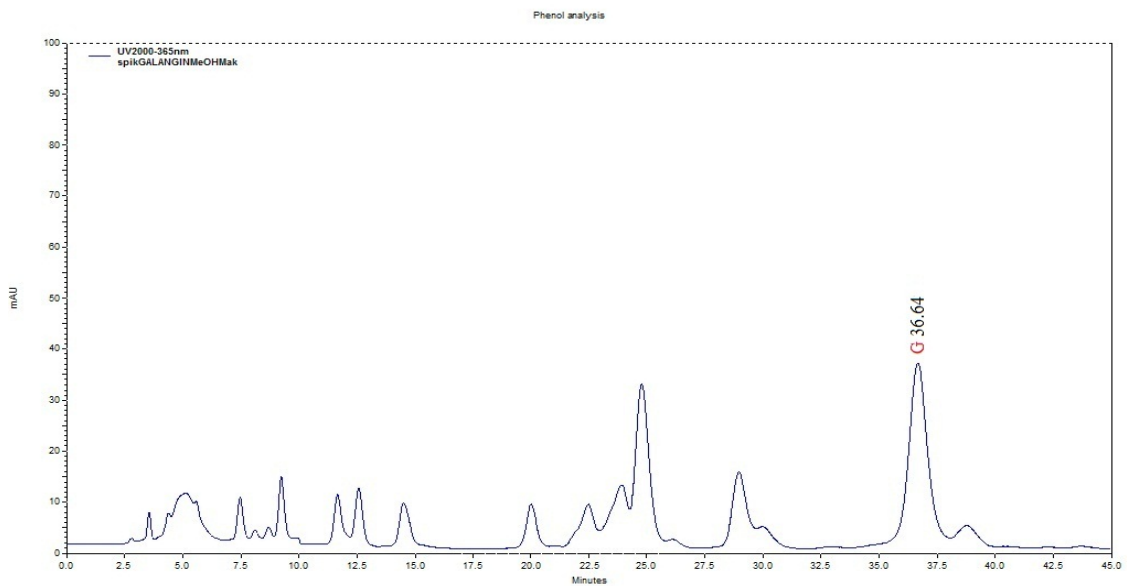
Β. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ



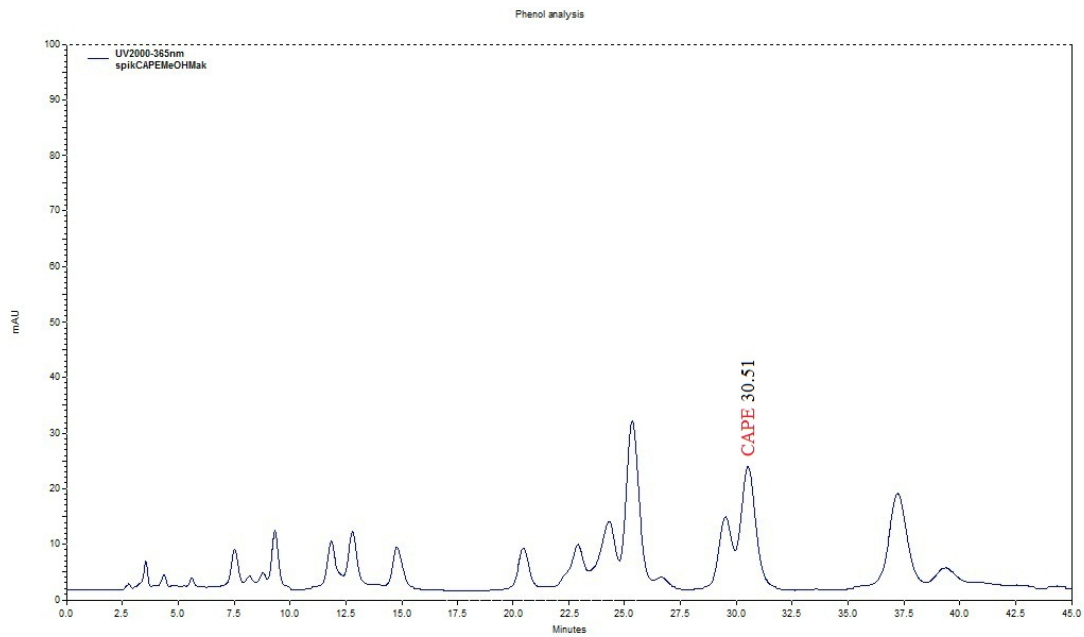
Σχήμα 11. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος Δυτ. Μακεδονίας με την προσθήκη (spiking) κερκετίνης (Q: κερκετίνη)



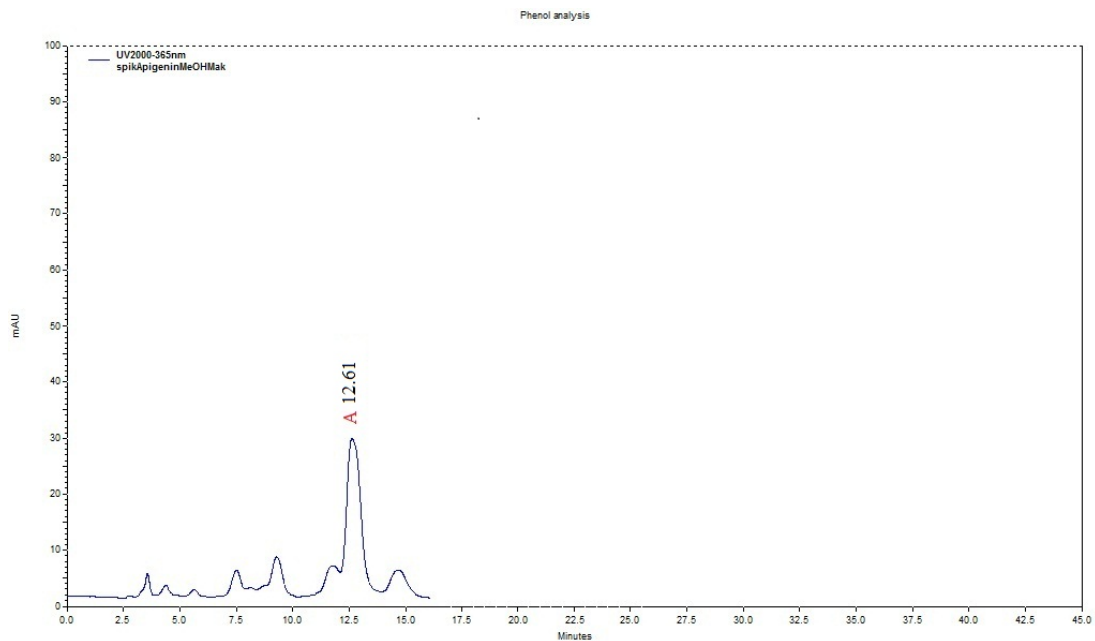
Σχήμα 12. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος *Δυτ. Μακεδονίας* με την προσθήκη (*spiking*) λουτεολίνης (*L*: λουτεολίνη)



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος *Δυτ. Μακεδονίας* με την προσθήκη (*spiking*) γκαλαγκίνης (*G*: γκαλαγκίνη)



Σχήμα 14. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος *Δυτ. Μακεδονίας* με την προσθήκη (*spiking*) φαινυλ-αιθυλεστέρα καφεϊκού οξέος (*CAPE*: φαινυλ-αιθυλεστέρας καφεϊκού οξέος)



Σχήμα 15. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος *Δυτ. Μακεδονίας* με την προσθήκη (*spiking*) απιγενίνης (*A*: απιγενίνη)