



ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση σε εκχυλίσματα πρόπολης

Φούρκα Φρύνη

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2015

Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση σε εκχυλίσματα πρόπολης

ΦΟΥΡΚΑ ΦΡΥΝΗ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας
Τροφίμων, 57400 ΤΘ 141, Θεσσαλονίκη

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

Εισηγητής Καθηγητής: Ριτζούλης Χρήστος

1. Εισαγωγή
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση
 - 2.1. Περιεχόμενο πρόπολης σε αντιοξειδωτικά συστατικά
 - 2.1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση της πρόπολης
 - 2.1.1.1. Ευρωπαϊκή και Ελληνική πρόπολη
 - 2.1.1.2. Βραζιλιάνικη πρόπολη
 - 2.2. Αντιοξειδωτική δράση
 - 2.2.1. Εκχυλίσματα πρόπολης
 - 2.2.1.1. Εκχυλίσματα σε οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη)
 - 2.2.1.2. Εκχυλίσματα σε νερό
 - 2.3. Αυτοξειδωση των λιπαρών υλών
 - 2.3.1. Μηχανισμός της αυτοξειδωσης
 - 2.3.2. Παράγοντες που προκαλούν την οξειδωση
 - 2.3.3. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών στην επιβράδυνση της αυτοξειδωσης
 - 2.4. Αντιοξειδωτικά
 - 2.4.1. Συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά
 - 2.4.2. Φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά
 - 2.4.2.1. Τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες
 - 2.4.2.2. Φαινολικά οξέα
 - 2.4.2.3. Φαινολικά διτερπένια
 - 2.4.2.4. Φλαβονοειδή
 - 2.5. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης
 3. Σκοπός της εργασίας
 4. Πειραματικό μέρος
 - 4.1. Υλικά και μέθοδοι
 - 4.1.1. Δείγματα Πρόπολης
 - 4.1.2. Αντιδραστήρια
 - 4.1.3. Όργανα
 - 4.1.4. Προκατεργασία δειγμάτων
 - 4.1.4.1. Εκχύλιση
 - 4.1.4.1.1. Μέθοδος εκχύλισης με ανάδευση
 - 4.1.4.1.2. Μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους (ultrasonic)
 - 4.2. Μέθοδοι ανάλυσης
 - 4.2.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αντιοξειδωτικής δράσης
 - 4.2.1.1. Μέθοδος DPPH
 - 4.2.1.2. Μέθοδος FRAP(Ferric Reducing Activity Power)

4.2.2. Χρωματομετρικές μέθοδοι περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά

4.2.2.1. Μέθοδος προσδιορισμού περιεκτικότητας σε ολικά
φλαβονοειδή

4.2.2.2. Μέθοδος προσδιορισμού περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες
(Folin – Ciocalteu)

5. Αποτελέσματα

6. Βιβλιογραφία

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση σε εκχυλίσματα πρόπολης

Φούρκα Φρύνη

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 ΤΘ 141, Θεσσαλονίκη

Περίληψη

Μελετήθηκαν ποσοτικά και ποιοτικά τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται σε διάφορα δείγματα πρόπολης διαφορετικής προέλευσης και με χρήση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης (ανάδευση, υδρόλουτρο υπερήχων) και μετρήθηκε η αντιοξειδωτική δράση που παρουσίασαν με διάφορες μεθόδους.

Διαπιστώθηκε η αντιοξειδωτική δράση και στα αιθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από ανάδευση και από εκχύλιση με υπερήχους. Παρατηρήθηκαν διαφορές τόσο στη σύσταση όσο και στην δράση δειγμάτων από διαφορετικές προελεύσεις, που οφείλονται στην διαφορετική χλωρίδα που είναι η πηγή συλλογής της πρόπολης από τις μέλισσες.

Αλλά και ανάμεσα στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ευαισθησία που οφείλονται στις διαφορετικές αρχές μεθόδου.

1. Εισαγωγή

Η πρόπολη είναι μια φυσική ρητινώδης ουσία, που συλλέγεται από τις μελιτοφόρες μέλισσες (*Apis mellifera* L.) από τις αμυχές και τα φύλλα των φυτών και των δένδρων, αναμιγμένη με γύρη καθώς και με ένζυμα που εκκρίνουν οι μέλισσες (Καλογερόπουλος et al., 2009). Οι μέλισσες την χρησιμοποιούν σαν γενικής χρήσης κόλλα, σαν σφραγιστικό υλικό σε χαραμάδες και για να μικραίνουν το άνοιγμα της εισόδου της κυψέλης, για να προστατεύονται από τους εισβολείς, σύμφωνα με τους Καλογερόπουλος et al. (2009), αλλά και για να συντηρεί τα νεκρά σώματα (μελισσών και εισβολέων) προστατεύοντας έτσι την επιμόλυνση της κυψέλης (Moreira et al., 2008).

Η πρόπολη χρησιμοποιήθηκε σε πολλές χώρες στην παραδοσιακή ιατρική από τα αρχαία χρόνια. Πρόσφατα, έρευνες έχουν δείξει ότι έχει ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως αντιβακτηριακές, αντιιικές, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινικές, αντιμυκητικές, και κατά των όγκων ιδιότητες. Για τον λόγο αυτό, η πρόπολη χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε τρόφιμα και ποτά για να βελτιώσει την υγεία και να προλάβει ασθένειες όπως φλεγμονές, διαβήτη, καρδιακά νοσήματα και καρκίνο. Αυτές οι δράσεις έχουν συσχετιστεί με τα συστατικά που περιέχει και κυρίως με το υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών (Ahn et al., 2007).

Γενικά η σύσταση της πρόπολης αποτελείται από 50% ρητίνες και φυτικά βάλσαμα, 30% κερί, 10% αιθέρια και αρωματικά έλαια, 5% γύρη και 5% ποικίλες άλλες ουσίες συμπεριλαμβανομένων οργανικών καταλοίπων (Καλογερόπουλος et al. 2009). Όταν οι μέλισσες συλλέγουν την ρητινώδη ουσία από τα φυτά, την αναμιγνύουν με το ένζυμο 13-γλυκοσιδάση από το σάλιο τους που προκαλεί την υδρόλυση των γλυκοζιτικών φλαβονοειδών ή των αγλυκονικών φλαβονοειδών (Moreira et al., 2008). Έτσι η πρόπολη έχει μεγάλο περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικές ουσίες, πάνω από 150 συστατικά, όπως πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους), τερπενοειδή, στεροειδή και αμινοξέα (Ahn et al. 2007).

Η σύσταση της πρόπολης ποικίλει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή που συλλέχθηκε και την βοτανική προέλευση.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Περιεχόμενο πρόπολης σε αντιοξειδωτικά συστατικά

2.1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση της πρόπολης

Έχει βρεθεί από τους Ahn et al. (2007) ότι η πρόπολη περιέχει πάνω από 150 συστατικά, όπως πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους), τερπενοειδή, στεροειδή και αμινοξέα. Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση στις αντιδράσεις οξειδωσης, χάρη στις αναγωγικές τους ιδιότητες και έτσι λειτουργούν σαν αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, ανάγουν μέταλλα και αναστολείς ριζών οξυγόνου σύμφωνα με τους Chaillou et al. (2009) καθώς και τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος και τα φλαβονοειδή έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Gregoris et al., 2010).

Αποτελέσματα από διάφορες αναλύσεις έχουν δείξει ότι υπάρχουν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στη σύσταση δειγμάτων πρόπολης. Οι διαφορές που παρουσιάζονται στα διάφορα δείγματα είναι συνισταμένη των παρακάτω παραγόντων:

- ❖ Την πηγή, δηλ. τα εκκρίματα των φυτών από διαφορετικά δένδρα, γενικά στις εύκρατες ζώνες είναι τα είδη *populus*, στις βόρειες τα είδη *betula* και στις περιοχές του Ισημερινού τα είδη *delchampia*, τα *cluzia* στην Βενεζουέλα και *xanthorrhoea* στην Αυστραλία. Τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά των ειδών *populus* και των υβριδίων είναι τα *pinocembrin*, *pinobanksin*, *3-o-acetate*, *chrysin*, *galangin* και *caffeates* (*benzyl*, *phenylethyl*, *prenyl*) (Gregoris et al., 2010).
- ❖ Την γεωγραφική προέλευση της που είναι άμεσα συνδεδεμένη με την χλωρίδα της περιοχής (Alencar et al., 2007). Τα δείγματα πρόπολης από την Ευρώπη, την Ασία και την Νότια Αμερική διαφέρουν στη σύσταση και σαν αποτέλεσμα και στις βιολογικές τους δράσεις. Για παράδειγμα, τα δείγματα από την Βραζιλία κυριαρχούν τερπενοειδή, πρενυλικά παράγωγα και π-κουμαρικά οξέα, ενώ τα δείγματα που προέρχονται από την Κίνα και την Ευρώπη περιέχουν κυρίως πολλά είδη φλαβονοειδών και εστέρες φαινολικών οξέων (Miguel et al., 2010).
- ❖ Την μέθοδο εκχύλισης της ακατέργαστης πρόπολης, που συνήθως είναι ανάδευση, απλή εκχύλιση, απόσταξη και εκχύλιση Soxhlet. Οι μέθοδοι αυτές είναι χρονοβόρες και επίπονες, γι' αυτό πλέον χρησιμοποιείται και η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasonic) που πλεονεκτεί ως ταχύτατη και υψηλής απόδοσης (Luo et al., 2011). Στον πίνακα 1, οι τιμές IC_{50} που παρατηρήθηκαν σε αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης, δείχνουν τις διαφορές στις διαφορετικές ρίζες που αδρανοποιούν. Σε όλες τις μεθόδους υπάρχει η δυνατότητα να κατασκευαστεί αξιόπιστη καμπύλη συσχέτισης της συγκέντρωσης με την δράση, που δείχνει ότι οι μέθοδοι είναι κατάλληλες για την

μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων πρόπολης. Από τον πίνακα προκύπτει ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζεται με την μέθοδο ξανθίνης, ακολουθούμενη από την μέθοδο υπεροξειδίων, μέθοδος αδρανοποίησης ριζών υδροξυλίου και μέθοδος δεσοξυριβόζης (Marquele et al., 2005).

Πίνακας 1. Τιμές IC₅₀^a αιθανολικού εκχυλίσματος με διάφορες μεθόδους

Methodologies	EEP ^b
Lipid peroxidation assay	0.016
H ₂ O ₂ /luminal/HRP assay ^c	0.22
Xanthine/luminal/XOD assay ^c	0.005
Deoxyribose assay	0.024

(Marquele et al. 2005)

^a Συγκέντρωση που προκαλεί 50% δράση

^b Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης

^c Chemiluminescence

- ❖ Τον διαλύτη εκχύλισης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν νερό, μεθανόλη, εξάνιο και ακετόνη αλλά συνηθέστερα χρησιμοποιείται αιθανόλη, ιδιαίτερα συγκέντρωσης 70%. Η αιθανόλη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε πλούσια σε πολυφαινόλες εκχυλίσματα πρόπολης. Η μεθανόλη έχει παραπλήσια αποτελεσματικότητα με το υδροαλκοολικό εκχύλισμα όπως φαίνεται στον πίνακα 2, παρ' όλα αυτά η τοξικότητα της μεθανόλης την καθιστά ακατάλληλη για εκχυλίσματα πρόπολης. Το υδατικό εκχύλισμα παρουσιάζει την μικρότερη αποτελεσματικότητα στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών από την μεθανόλη και το μίγμα νερού-αιθανόλης. Σε αντίθεση, τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περιέχουν σημαντικά υψηλότερα ποσά ολικών φαινολών, φλαβονών και διυδροφλαβονόλες. Μόνο το περιεχόμενο των φλαβονών και φλαβονολών είναι μεγαλύτερο στα μεθανολικά εκχυλίσματα. Για το λόγο αυτό, και επειδή η αιθανόλη δεν είναι τόσο τοξική όσο η μεθανόλη, η 70% αιθανόλη κρίνεται σαν καταλληλότερος διαλύτης (Miguel et al., 2010).

Πίνακας 2. Συγκέντρωση (mg/ml) πολυφαινολών (ολικές φαινόλες, φλαβόνες και φλαβονόλες, και φλαβανόνες και διϋδροφλαβονόλες) σε διάφορα εκχυλίσματα πρόπολης από την Πορτογαλία.

Extracts	Total phenols	Flavones and flavonols	Flavanones and dihydroflavonols
Hydro-alcoholic	6.27 0.19a*	1.30 0.02b	1.78 0.05a
Methanolic	4.47 0.14b	1.63 0.04a	1.80 0.05a
Aqueous	1.75 0.04c	0.023 0.00c	0.59 0.06b

(Miguel et al. 2010)

Τιμές στην ίδια στήλη με τον ίδιο δείκτη δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τον έλεγχο Duncan ($P < 0.05$). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι έξι επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.

2.1.1.1. Ευρωπαϊκή και Ελληνική πρόπολη

Σε αντίθεση με την πρόπολη της ηπειρωτικής Ευρώπης, η ελληνική πρόπολη έχει διαφορετική βοτανική προέλευση εξαιτίας της χλωρίδας που επικρατεί στην Ελλάδα σαν συνέπεια της γεωγραφικής της θέσης. Η χλωρίδα της Ελλάδας γενικά παρουσιάζει ποικιλομορφία με υψηλά ποσοστά ενδημικών φυτών. Ο ειδικός χαρακτήρας των μη πτητικών συστατικών της ελληνικής πρόπολης έχει μελετηθεί από τους Μέλλιου & Χήνου (2004).

Στον πίνακα 3, φαίνεται ότι η πρόπολη από την Ελλάδα και την Κύπρο περιέχει φλαβονοειδή σε επίπεδα 8,8 – 182,6 mg/g PEE, με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται στο δείγμα της κεντρικής Πελοποννήσου (Μεγαλόπολη) και στα δείγματα της κεντρικής Ελλάδας (Καρδίτσα 1 και 2), ενώ τις χαμηλότερες τιμές είχαν τα δείγματα των νησιών της Κρήτης και της Τήνου. Τα φλαβονοειδή συντίθενται από τα φυτά για να προστατευτούν από το περιβαλλοντικό στρες και τις μικροβιολογικές μολύνσεις και έχουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ανάμεσα στα συστατικά που χαρακτηρίζουν την Ευρωπαϊκή πρόπολη, τα φλαβονοειδή pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin-3-O-acetate, chrysin και galangin υπήρχαν στην πλειοψηφία των δειγμάτων του πίνακα 3. Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους, οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην κυπριακή πρόπολη (Λάρνακα 1 και 2), την πρόπολη της κεντρικής Πελοποννήσου (Μεγαλόπολη) και της κεντρικής Ελλάδας (Καρδίτσα 1 και 2), ενώ οι χαμηλότερες τιμές στην πρόπολη της Κρήτης και των νησιών (Πίνακας 3). Η μέθοδος DPPH δείχνει καλή συσχέτιση ($P < 0,01$) με τις ολικές

πολυφαινόλες και επίσης δείχνει καλή συσχέτιση ($P < 0,01$) με την αναγωγική δύναμη. Η αναγωγική δράση έχει καλή συσχέτιση ($P < 0,01$) με τις ολικές πολυφαινόλες και με την μέθοδο DPPH (Καλογερόπουλος et al. 2009).

Πίνακας 3. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας DPPH· και αναγωγική δράση εκχυλισμάτων πρόπολης από την Ελλάδα και την Κύπρο.

Collection site	Total polyphenols ^a (mg CAE ^b /g PEE ^c)	DPPH scavenging capacity ^d (mmol Trolox/g PEE)	Reducing power ^e (mmol AAE ^f /g PEE)
Trikorfo	146.2 ± 7.3	0.60 ± 0.04	3.13 ± 0.16
Arfara	184.6 ± 7.4	0.55 ± 0.03	3.09 ± 0.22
Kalavryta	250.6 ± 17.5	0.76 ± 0.05	3.13 ± 0.25
Megalopolis	338.5 ± 13.2	1.11 ± 0.07	3.35 ± 0.27
Karditsa 1	283.5 ± 21.3	1.05 ± 0.04	3.34 ± 0.20
Karditsa 2	322.0 ± 13.1	0.99 ± 0.03	3.24 ± 0.13
Rethymno	80.2 ± 3.2	0.33 ± 0.03	2.14 ± 0.11
Tinos	107.7 ± 5.4	0.65 ± 0.03	2.75 ± 0.08
Skopelos	146.2 ± 10.2	0.62 ± 0.02	2.89 ± 0.14
Lesvos	136.3 ± 8.2	0.45 ± 0.02	2.66 ± 0.19
Larnaca Cyprus 1	85.7 ± 5.1	0.46 ± 0.03	2.41 ± 0.10
Larnaca Cyprus 2	100.4 ± 7.2	0.58 ± 0.03	2.63 ± 0.08

^a Total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu assay

^b CAE=caffeic acid equivalent

^c PEE=propolis ethanolic extract

^d Free radical scavenging capacity was measured with DPPH· (1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical

^e Reducing power was determined by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

^f AAE=ascorbic acid equivalent

(Kalogeropoulos et al. 2009)

Σε πολλές χώρες βρίσκονται εμπορικά σκευάσματα πρόπολης με τη μορφή χαπιών και ταμπλετών κατασκευασμένα από αιθανολικά εκχυλίσματα. Στον πίνακα 4, παρουσιάζεται η δράση διάφορων αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης. Τα δείγματα της νότιας Αφρικής, της Ταϊλάνδης και του Ουζμπεκιστάν παρουσιάζουν χαμηλές τιμές ολικών πολυφαινολών, ενώ το δείγμα από την Βραζιλία έχει χαμηλότερες τιμές από τα δείγματα της Ευρώπης και της Κίνας. Ακόμη το δείγμα από την Ουκρανία παρουσιάζει υψηλές τιμές ολικών πολυφαινολών αλλά και χαμηλό περιεχόμενο σε

φλαβονοειδή. Αυτό δείχνει ότι περιέχει μη φλαβονοειδής φαινόλες. Τέλος το δείγμα της Ταϊλάνδης παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές και σε ολικές πολυφαινόλες και σε φλαβονοειδή (Kumazawa et al., 2004).

Πίνακας 4. Μέρη συλλογής, ολικές πολυφαινόλες και φλαβονοειδή αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης.

Collection site	Total polyphenol^a (mg/g of EEP)	Flavonoids^b (mg/g of EEP)
Argentina	212 ± 9.2	130 ± 5.5
Australia	269 ± 16.3	145 ± 6.5
Brazil	120 ± 5.6	51.9 ± 2.4
Bulgaria	220 ± 2.5	157 ± 8.9
Chile	210 ± 11.1	116 ± 9.3
China (Hebei)	298 ± 8.7	147 ± 9.3
China (Hubei)	299 ± 0.5	158 ± 10.8
China (Zhejiang)	262 ± 12.6	136 ± 17.4
Hungary	242 ± 0.2	176 ± 1.7
New Zealand	237 ± 6.0	152 ± 12.6
South Africa	99.5 ± 4.4	50.8 ± 0.8
Thailand	31.2 ± 0.7	2.5 ± 0.8
Ukraine	255 ± 7.4	63.7 ± 3.2
Uruguay	187 ± 8.5	168 ± 6.4
United States	256 ± 15.7	122 ± 6.2
Uzbekistan	174 ± 6.7	94.2 ± 6.8

(Kumazawa et al., 2004)

Για τον προσδιορισμό των ολικών πολυφαινολών και φλαβονοειδών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu (βασίζεται στον αποχρωματισμό του $AlCl_3$). Τιμή ± τυπική απόκλιση.

2.1.1.2. Βραζιλιάνικη πρόπολη

Η βραζιλιάνικη πρόπολη έχει μελετηθεί ευρέως για τις βιολογικές της ιδιότητες, και έτσι έχουν χαρακτηριστεί και κατηγοριοποιηθεί σε 12 τύπους (1-12). Ένας νέος τύπος βραζιλιάνικης πρόπολης, γνωστή σαν «κόκκινη πρόπολη» παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση από εργαστηριακές έρευνες (Alencar et al., 2007). Από τις χαμηλότερες τιμές που παρουσιάζει η Βραζιλιάνικη πρόπολη από την Ευρωπαϊκή και την Κινέζικη (Πίνακας 4), προκύπτει ότι τα κύρια χαρακτηριστικά της Βραζιλιάνικης πρόπολης διαφέρουν από αυτά της Ευρωπαϊκής και της Κινέζικης. Τα κύρια συστατικά της Βραζιλιάνικης πρόπολης είναι τα πρενυλικά παράγωγα του π-κουμαρικού

οξέος και φλαβονοειδή που δεν υπάρχουν στην Ευρωπαϊκή πρόπολη. Στον πίνακα 4, φαίνεται και το χαμηλό περιεχόμενο της Βραζιλιάνικης πρόπολης σε φλαβονοειδή. (Kumazawa et al., 2004)

2.2. Αντιοξειδωτική δράση

Πρόπολη με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση περιέχει μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών συστατικών, όπως το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και ο φαινεθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος (Ahn et al., 2007).

2.2.1. Εκχυλίσματα πρόπολης

2.2.1.1. Εκχυλίσματα σε οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη)

Το περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά αιθανολικών εκχυλισμάτων από διάφορες περιοχές παρουσιάζεται στον πίνακα 5. Όλα τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση αλλά την οφείλουν σε διαφορετικές ουσίες, εξαιτίας των διαφορών στην σύσταση. Τα αντιοξειδωτικά 5-μεθυλαιθέρας της πινομπασκίνης βρέθηκε σε όλα τα δείγματα αλλά δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθεί και η πινομπασκίνη βρέθηκε επίσης σε όλα τα δείγματα σε μεγάλες ποσότητες. Ακόμη σε όλα τα δείγματα βρέθηκε το αντιπροσωπευτικό φλαβονοειδές της πρόπολης, χρυσίνη. Το δείγμα (i) περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα καφεϊκού οξέος και 3,4 διμεθοξυκινναμικού οξέος, καθώς και μεγάλη ποσότητα κινναμυλιδενεακετικού οξέος. Ενώ το δείγμα (b) περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα π-κουμαρικού οξέος και στα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά παρουσιάζει μέτριες συγκεντρώσεις. Το δείγμα (g) έχει την υψηλότερη ποσότητα φαινεθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος, που είναι αντιπροσωπευτικό αντιοξειδωτικό και βρίσκεται κατά κύριο λόγο στην πρόπολη και την υψηλότερη ποσότητα σε τεκτοχρυσίνη. Τέλος το δείγμα (m), παρόλο που παρουσιάζει μέσες συγκεντρώσεις σε αντιοξειδωτικά παρουσιάζει παρόμοια δράση με τα υπόλοιπα δείγματα (Ahn et al., 2007).

Πίνακας 5. Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (EEP)

	Content (mg/g of EEP)			
	b	g	i	m
Caffeic acid	23.1	24.6	32.2	19.4
p-Coumaric acid	52.2	7.0	11.3	8.9
Ferulic acid	3.0	1.9	3.7	3.8
3,4-Dimethoxycinnamic acid	15.5	55.5	57.4	53.2
Pinobanksin 5-methyl ether	+	+	+	+
Pinobanskin	5.8	27.7	62.5	36.6
Cinnamylideneacetic acid	-	21.2	45.4	25.2
Caffeic acid phenethyl ester	6.3	8.7	4.5	7.8
Chrysin	3.9	16.2	13.5	7.6
Pinocembrin	4.7	11.6	12.8	3.9
Galangin	3.8	7.2	6.8	5.3
Pinobanskin 3-acetate	8.3	18.2	15.6	9.0
Cinnamyl caffeate	14.1	12.6	20.9	20.2
Tectochrysin	33.8	42.7	35.9	15.5

(Ahn et al., 2007)

2.2.1.2. Εκχυλίσματα σε νερό

Με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (Πίνακας 6), τα κύρια φαινολικά οξέα που βρέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα πρόπολης είναι το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το ελλαγικό οξύ καθώς και το φλαβονοειδές

κερκετίνη που είναι επίσης κύριο χαρακτηριστικό. Εκτός από τα συστατικά αυτά, που συμφωνούν με τα συστατικά που έχουν βρεθεί και σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης, βρέθηκε και ασκορβικό οξύ που δείχνει ότι τα υδατικά εκχυλίσματα είναι σημαντικά συμπληρώματα διατροφής σαν πηγή βιταμίνης C. Ακόμη βρέθηκαν σε ελάχιστες ποσότητες τριϋδροξυ φαινόλες και πυραγκαλλόλη ενώ δεν βρέθηκαν διϋδροξυ φαινόλες και κατεχόλη. Επιπλέον βρέθηκε και α-τοκοφερόλη σε μικρή ποσότητα (Gulcin et al., 2010).

Πίνακας 6. Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο σε LAEP με συγκέντρωση σε (mg/kg) με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας. (LAEP: λυοφιλωμένο υδατικό εκχύλισμα πρόπολης).

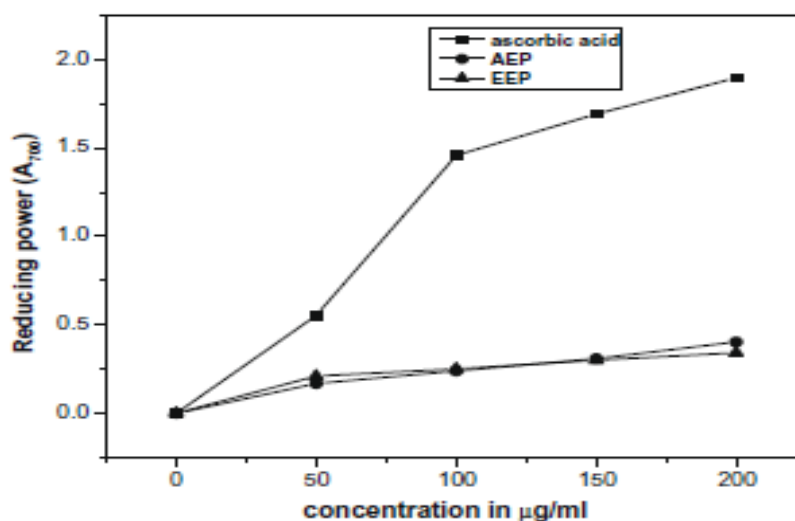
Compounds	Amount of antioxidants in the plant extracts (mg/kg)
Curcumin^b	-
Caffeic acid	5033.8
Ferulic acid	5261.8
Syringic acid	12.8
Ellagic acid	4202.7
Quercetin	3851.4
a-Tocopherol	265.5
Catechol^c	-
Pyragallo	45.3
p-Hydroxy benzoic acid	1370.9
Vanillin	400.7
p-Coumaric acid	1908.8
Gallic acid	419.1
Ascorbic acid	1098.0

(Gulcin et al. 2010)

^b Χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του οργάνου

^c Αυτές οι τιμές είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης

Η αναγωγική δράση είναι επίσης ένδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης. Στο σχήμα 1, φαίνεται η αναγωγική δράση των ΑΕΡ (υδατικό εκχύλισμα πρόπολης), ΕΕΡ (αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης) και του ασκορβικού οξέος (μάρτυρας). Αυξανόμενης της συγκέντρωσης, αυξάνεται και η αναγωγική δράση με μεγαλύτερη δράση αυτή του ασκορβικού οξέος και ακολουθούν το ΑΕΡ και το ΕΕΡ με παρόμοια δράση. Η αναγωγική δράση του ασκορβικού οξέος είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την δράση των εκχυλισμάτων αλλά στα επίπεδα συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/ml}$ τα ΑΕΡ και ΕΕΡ έχουν όμοια δράση ($P < 0,05$), ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις το ΕΕΡ παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερη δράση αλλά τελικά το ΑΕΡ έχει μεγαλύτερη αναγωγική δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών που εκχυλίστηκαν στο υδατικό. Επειδή, τα φαινολικά συστατικά είναι καλοί δότες ηλεκτρονίων, έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) και έτσι παρουσιάζουν υψηλότερη αναγωγική δράση (Laskar et al., 2010).



Σχήμα 1. Αναγωγική δράση εκχυλισμάτων πρόπολης και διαλύματος ασκορβικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

(Laskar et al. 2010)

2.3. Αυτοοξειδωση των λιπαρών υλών

Μία σειρά από φυσικά και χημικά φαινόμενα μπορούν να ξεκινήσουν την οξειδωση, η οποία συνεχίζει όσο υπάρχουν τα κατάλληλα υποστρώματα μέχρι να υπάρξει ένας μηχανισμός που θα την σταματήσει. Υποστρώματα αποτελούν το οξυγόνο, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα φωσfolιπίδια, η χοληστερόλη και το DNA. Η οξειδωση των λιπαρών υλών μπορεί να προκύψει

από τρεις διαφορετικές οδούς: (1) μη ενζυματική αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών, (2) μη ενζυματική φωτοοξειδωση και (3) ενζυματική αντίδραση. (Antolovich et al., 2000)

Η αυτοοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, που προχωρεί δια μέσου του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών, περιλαμβάνει μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων. Ο μηχανισμός αυτός είναι πολύπλοκος. Η αυτοοξειδωση εξελίσσεται αυτοκαταλυτικά και μάλιστα με ρυθμό που αυξάνεται ανάλογα με το χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης της λιπαρής ύλης. (Κυριτσάκης, 1993)

2.3.1. Μηχανισμός της αυτοοξειδωσης

Διάφορες θεωρίες προσπάθησαν να ερμηνεύσουν το μηχανισμό της αυτοοξειδωσης. Σήμερα πιστεύεται ότι όλος ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Της έναρξης (initiation),
- Της διάδοσης (propagation) και
- Του τερματισμού (termination)

Έναρξη

Ως στάδιο έναρξης (επώασης) ορίζεται η χρονική περίοδος που απαιτείται για το σχηματισμό των πρώτων ελευθέρων ριζών (R^\cdot , RO^\cdot , ROO^\cdot). είναι η περίοδος πριν από την εμφάνιση της ανεπιθύμητης οσμής και γεύσης. Στο στάδιο αυτό δεν καταναλώνεται ατμοσφαιρικό οξυγόνο.

Η διάρκεια του καθορίζεται από την σύσταση της λιπαρής ύλης σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στο ρυθμό των αντιδράσεων σχηματισμού ελευθέρων ριζών. (Κυριτσάκης, 2007)

Διάδοση

Αποτελεί το στάδιο κατά το οποίο οι ελεύθερες ρίζες τύπου R^\cdot που έχουν σχηματισθεί αρχικά αντιδρούν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προς υπερόξυ – ρίζες (ROO^\cdot), οι οποίες μετατρέπονται σε υδροϋπεροξειδία ($ROOH$) μετά την απόσπαση ατόμου υδρογόνου από το μόριο του ακόρεστου λιπαρού οξέος, στο οποίο δεν έχει αρχίσει η οξειδωση μέχρι εκείνη την στιγμή. Η ρίζα R^\cdot που προκύπτει αντιδρά με το οξυγόνο προς νέα υπερόξυ – ρίζα (ROO^\cdot) οπότε αρχίζει να επιταχύνεται η οξειδωση.

Τα υδροϋπεροξειδία είναι ασταθή και διασπώνται εύκολα με αποτέλεσμα να προκύπτουν νέες ελεύθερες ρίζες (RO^\cdot , ROO^\cdot) οι οποίες συμμετέχουν επίσης στις αντιδράσεις σχηματισμού ριζών τύπου R^\cdot και σε νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις. (Κυριτσάκης, 2007)

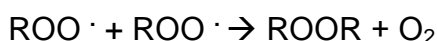
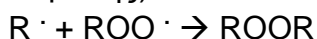
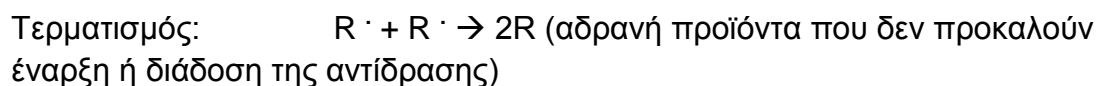
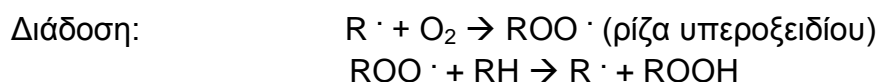
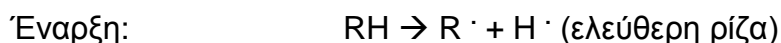
Τερματισμός

Στο στάδιο του τερματισμού σχηματίζονται σταθερά προϊόντα που δεν έχουν χαρακτήρα ελεύθερης ρίζας.

Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών (R·) που προκύπτουν λόγω απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από το μόριο ακόρεστων λιπαρών οξέων μόνο παρουσία ενός εκκινήτη ή αποικοδόμησης των υδροϋπεροξειδίων τους, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον μηχανισμό της αυτοξειδωσης. Η απαιτούμενη για τον σκοπό αυτό ενέργεια στην πρώτη περίπτωση εξασφαλίζεται από το φως. Αντίθετα η αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων προϋποθέτει μία σχετικά υψηλή θερμοκρασία ή την παρουσία ιόντων μετάλλων (Κυριτσάκης, 1993).

Ο αυτόματος τερματισμός της οξειδωσης είναι ανέφικτος, γιατί είναι απίθανο να αντιδράσουν μεταξύ τους όλες οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται προς αδρανή προϊόντα, όπως συμβαίνει στο τρίτο στάδιο (τερματισμός). Είναι δυνατόν όμως να παρεμποδιστούν οι αντιδράσεις διάδοσης, πριν προχωρήσει η οξειδωση, με προσθήκη πρωτοταγών αντιοξειδωτικών (συνθετικών ή φυσικών) τα οποία αντιδρούν με ταχύτητα με τις ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνουν. (Κυριτσάκης, 2007)

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε κάθε στάδιο φαίνονται παρακάτω:



2.3.2. Παράγοντες που προκαλούν την οξειδωση

Η οξειδωση όλων των λιπαρών υλών οφείλεται στη δράση πολλών παραγόντων, όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία, το φως, η παρουσία μετάλλων, κ.α.

(i) Οξυγόνο

Για να λάβει χώρα η οξειδωση χρειάζεται οπωσδήποτε οξυγόνο. Το οξυγόνο έρχεται σε επαφή με την λιπαρή ύλη είτε στη διαχωριστική επιφάνεια αέρα – ελαίου εντός της δεξαμενής αποθήκευσης ή του δοχείου συσκευασίας, είτε διαλυμένο σ' αυτή. Η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου ποικίλει και εξαρτάται από τη διάρκεια της επαφής του ελαίου με τον αέρα. Όσο περισσότερο χρόνο εκτίθεται το έλαιο στον αέρα τόσο μεγαλύτερη ποσότητα οξυγόνου δεσμεύεται και τόσο πιο γρήγορα οξειδώνεται.

Η αποφυγή της επαφής του ελαιολάδου με τον ατμοσφαιρικό αέρα και η συσκευασία του σε συνθήκες κενού ή σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου (άζωτο ή αργό), το οποίο αντικαθιστά τον ατμοσφαιρικό αέρα στο πάνω μέρος του δοχείου, βοηθούν αποτελεσματικά στην αποφυγή της οξειδωτικής τάγγισης. (Κυριτσάκης, 1993)

(ii) **Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα οξειδωσης του ελαιολάδου και των άλλων λιπαρών υλών. Υψηλή θερμοκρασία στο χώρο αποθήκευσης των λιπαρών υλών επιταχύνει την οξειδωση.

Πειράματα που έγιναν με καθαρούς μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων από διάφορα φυτικά έλαια, έδειξαν ότι στην περιοχή θερμοκρασιών από 15° C έως 75° C κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά 12° C περίπου έχει ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό του ρυθμού της οξειδωσης. Επίσης πειράματα με ζωικά και φυτικά μαγειρικά λίπη έδειξαν ότι ο μέσος ρυθμός οξειδωσης στους 110° C είναι 2,5 φορές μεγαλύτερος απ' ό τι στους 97,8° C.

Αποθήκευση του ελαιολάδου σε θερμοκρασία γύρω στους 10° C θεωρείται ιδανική, γιατί έτσι περιορίζεται η οξειδωση. (Κυριτσάκης, 2007)

(iii) **Μέταλλα**

Ο σίδηρος και ο χαλκός δρουν ως καταλύτες στην οξειδωτική αλλοίωση των λιπαρών υλών. Στις αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα τα μέταλλα απλώς αλλάζουν σθένος (ανάγονται και οξειδώνονται) και συνεχίζουν έτσι την καταλυτική τους δράση σύμφωνα με τις αντιδράσεις που ακολουθούν:



Σχήμα 2. Αντιδράσεις καταλυτικής οξειδωσης λιπαρών υλών από τα μέταλλα.

(Laguerre et al., 2007)

Από τα μέταλλα που έχουν ανιχνευθεί στο ελαιόλαδο σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απαντά ο σίδηρος, ο οποίος προέρχεται από τις μεταλλικές επιφάνειες των μηχανημάτων του ελαιουργείου με τις οποίες έρχεται σε επαφή κατά τις φάσεις επεξεργασίας, όταν αυτές δεν είναι ανοξειδωτες, καθώς και από τις ανάλογες επιφάνειες των μέσων αποθήκευσης (δεξαμενές, βαρέλια, κ.α.). Άλλα μέταλλα τα οποία έχουν ανιχνευθεί στο ελαιόλαδο είναι ο χαλκός και το μαγνήσιο. Το τελευταίο αποτελεί συστατικό του μορίου της χλωροφύλλης.

Το μέταλλο που δημιουργεί το σοβαρότερο πρόβλημα στο ελαιόλαδο είναι ο χαλκός. Η παρουσία του σιδήρου σε ίδια συγκέντρωση με αυτή του χαλκού, δημιουργεί μικρότερο πρόβλημα γιατί είναι λιγότερο δραστικός και παρουσιάζει μικρότερη διαλυτότητα.

Σημειώνεται ότι ακόμη και ίχνη μετάλλων είναι δυνατό να επιταχύνουν την οξειδωση. (Κυριτσάκης, 2007)

(iv) **Ελεύθερα λιπαρά οξέα**

Η οξειδωση του ελαιολάδου και των άλλων λιπαρών υλών επιταχύνεται από την παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων ακόμη και σε συγκέντρωση 0,5%. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ενδεχομένως υποβοηθούν την οξειδωση διαμέσου ενός καταλυτικού μηχανισμού. Σύμφωνα με τον Miyashita και Takagi (1986), η καρβοξυλική ομάδα των λιπαρών οξέων καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και στη συνέχεια υδροϋπεροξειδίων. Σχετικά πειράματα έδειξαν ότι η προσθήκη ελαϊκού οξέος, σε εξευγενισμένο ελαιόλαδο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντοχής του τελευταίου στην οξειδωση. Ακόμη και η δράση των μεθανολικών αντιοξειδωτικών μειώνεται αισθητά από την παρουσία των ελεύθερων λιπαρών οξέων. (Κυριτσάκης, 2007)

(v) Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. λινελαϊκό, λινολενικό, αραχιδονικό) είναι ασταθή και οξειδώνονται εύκολα. Η ευαισθησία των οξέων αυτών στην οξειδωση οφείλεται στο χαμηλό ενεργειακό επίπεδο του μορίου, λόγω της ύπαρξης των 1,4 – διπλών δεσμών, με αποτέλεσμα να χρειάζεται ελάχιστη ενέργεια για την απόσπαση ενός από τα ηλεκτρόνια της μεθυλενικής ομάδας που βρίσκεται σε α- θέση ως προς τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Kiritsakis, 1998).

(vi) Άλλοι παράγοντες

Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν, το φως και οι χρωστικές (χλωροφύλλη, φαιοφυτίνη) οι οποίες αποτελούν συστατικά των λιπαρών υλών, επιταχύνουν την οξειδωση της λιπαρής ύλης διαμέσου του μηχανισμού της φωτοοξειδωσης (Kiritsakis και Dugan, 1985).

Οι περισσότερες από τις χρωστικές αυτές εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στο ορατό φάσμα ή κοντά στο όριο του ορατού με το υπεριώδες φάσμα. Αποτέλεσμα της απορρόφησης ακτινοβολίας είναι η διέγερση των ηλεκτρονίων στο μόριό τους και η μετάπτωση σε ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση (electronically excited state).

Η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη, που είναι γνωστές ως ευαισθητοποιητές (sensitizers), απαντούν τόσο στην απλή ή διεγερμένη κατάσταση (singlet, $^1\text{sen.}$), όσο και στην τριπλή ή θεμελιώδη (βασική) κατάσταση (triplet, $^3\text{sen.}$). Το οξυγόνο απαντά όπως και οι χρωστικές, στη διεγερμένη ($^1\text{O}_2$) και στη βασική ($^3\text{O}_2$) κατάσταση που διαφέρουν ως προς την κατανομή των ηλεκτρονίων στην εξωτερική στιβάδα του μορίου τους.

Στην περίπτωση της φωτοοξειδωσης δεν απαιτείται ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών. Το $^1\text{O}_2$ προστίθεται απευθείας στο διπλό δεσμό του ακόρεστου λιπαρού οξέος με αποτέλεσμα να σχηματίζονται υδροϋπεροξειδία. Σύμφωνα με τη θεωρία των Rawls και Van Santen (1970), η οποία θεωρείται και η επικρατέστερη, η φωτοοξειδωση συνδέεται με το σχηματισμό του $^1\text{O}_2$.

Για να αρχίσει η φωτοοξειδωση, πρέπει οι ευαισθητοποιητές να έλθουν σε επαφή με το φως (άμεσο ηλιακό φως, διάχυτο φως δωματίου ή φως φθορισμού). Όταν οι ευαισθητοποιητές εκτίθενται στο φως απορροφούν ενέργεια που προκαλεί την ενεργοποίησή τους. Στη συνέχεια, η ενέργεια που

απορροφήθηκε αποδίδεται στο $^3\text{O}_2$ που μεταπίπτει στο $^1\text{O}_2$. Ο ευαισθητοποιητής επανέρχεται στην αρχική του μορφή μετά την απόδοση της ενέργειας στο $^3\text{O}_2$. (Κυριτσάκης, 2007)



Σχήμα 3. Αντιδράσεις φωτοξείδωσης

(Laguerre et al., 2007)

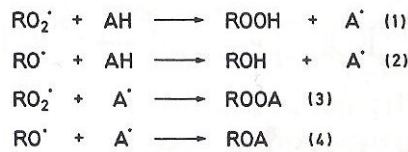
2.3.3. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών στην επιβράδυνση της αυτοξείδωσης

Δεδομένου ότι η αυτοξείδωση των ακόρεστων ακυλο-λιπιδίων οδηγεί συχνά σε υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων, καταβάλλεται προσπάθεια να μειωθεί τουλάχιστον η ταχύτητα αυτής της διαδικασίας υποβάθμισης. Οι υπεροξυ- και οξυ ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια των σταδίων διάδοσης και διακλάδωσης της ριζικής αλυσίδας στην αυτοξείδωση δεσμεύονται (scavenged) από αντιοξειδωτικά (AH). Τα αντιοξειδωτικά που περιέχουν μια φαινολική ομάδα διαδραματίζουν το σημαντικότερο ρόλο στα τρόφιμα. (Belitz et al., 2006)

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 προσδίδει 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).

Στις αντιδράσεις 1 και 2 του Σχήματος 4, σχηματίζουν ρίζες που σταθεροποιούνται από ένα σύστημα αρωματικού συντονισμού. Σε αντίθεση με τις ακυλικές υπεροξυ και οξυ ελεύθερες ρίζες, δεν είναι ικανές να αφαιρέσουν ένα άτομο H από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ και επομένως δεν μπορούν να αρχίσουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τα τελικά προϊόντα που σχηματίζονται στις αντιδράσεις 3 και 4 του Σχήματος είναι σχετικά σταθερά και κατά συνέπεια οι αλυσίδες των ριζών της αυτοξείδωσης μικραίνουν. Το σχέδιο αντίδρασης δείχνει ότι ένα μόριο αντιοξειδωτικού συνδέεται με δύο ρίζες. Επομένως, ο μέγιστος επιτεύξιμος στοιχειομετρικός παράγοντας είναι $n = 2$. Στην πράξη, η τιμή του n είναι μεταξύ 1 και 2 για τα χρησιμοποιούμενα αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά, εκτός από τον κύριο ρόλο τους ως δεσμευτές ριζών, μπορούν επίσης να ανάγουν μερικώς τα υδροϋπεροξείδια σε υδροξύ ενώσεις. (Belitz et al., 2006)



Σχήμα 4. Δραστηριότητα αντιοξειδωτικού ως μέσου δέσμευσης ριζών (όπου AH: αντιοξειδωτικό).

(Belitz et al., 2006)

Η επίδραση που έχει η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στην ταχύτητα της αυτοοξειδωσης 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 υπεροξείδια (Dorman et al., 2003).

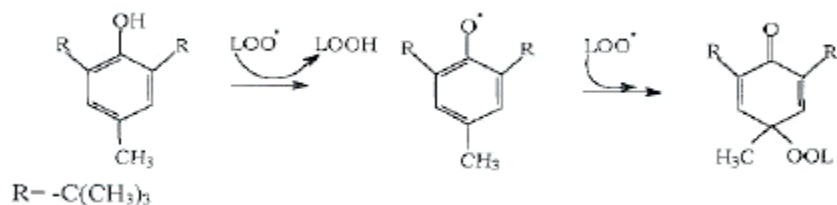
2.4. Αντιοξειδωτικά

2.4.1. Συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό, μια συνθετική ένωση πρέπει να καλύπτει τις ακόλουθες απαιτήσεις: δεν πρέπει να είναι τοξική, πρέπει να είναι ιδιαίτερα δραστική σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,01 – 0,02%) και πρέπει να επικεντρώνεται στην επιφάνεια της λιπώδους ή ελαιώδους φάσης. Επομένως, τα ισχυρώς λιπόφιλα αντιοξειδωτικά είναι ιδιαίτερα κατάλληλα. Αφ' ετέρου, τα πιο πολικά αντιοξειδωτικά είναι πολύ ενεργά στα λίπη και στα έλαια δεδομένου ότι είναι εμπλουτισμένα στην επιφάνεια του λίπους και έρχονται σε επαφή με τον αέρα. (Belitz et al., 2006)

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

- A. **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 5. Μηχανισμός δράσης του BHT

- B. **BHA**: βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη που είναι μίγμα δυο ισομερών της 2-τριπ-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και 3-τριπ-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.
- C. **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 δραστηριότητά 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.
- D. **TBHQ**: Δι-τριπ-βουτυλο-υδροκινόνη. Είναι πιο πολικό αντιοξειδωτικό και επαρκώς λιποδιαλυτή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη ή σε συνδυασμό με την BHA και το BHT 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).

2.4.2. Φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά

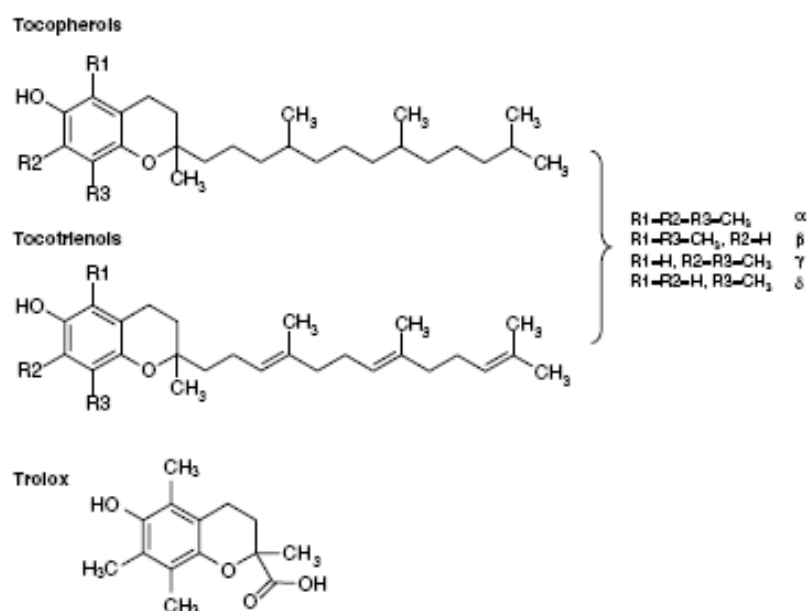
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις κύριες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Αποτελούνται από ενώσεις με μεγάλη ποικιλία όσον αφορά τη δομή και λειτουργικότητά τους. Ο γενικός ορισμός περιλαμβάνει τις ενώσεις που περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες σε ένα βενζολικό δακτύλιο. Όμως, με τον ορισμό αυτό περιλαμβάνονται και άλλες ενώσεις. Έτσι, προτιμάται ένας ορισμός με βάση τη βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων. Κάποια συστατικά όπως το κινναμωμικό οξύ αναφέρονται ως φαινολικά συστατικά, αν και δεν περιέχουν υδροξυλομάδα σε βενζολικό

δακτύλιο. Οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ δραστικές, λόγω του όξινου χαρακτήρα των υδροξυλικών ομάδων και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων. Οι φαινολικές ενώσεις κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες όπως φαίνεται στο σχήμα 6.

2.4.2.1. Τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες

Πηγή των τοκοφερολών είναι τα φυτικά έλαια. Οι τοκοφερόλες εμφανίζουν δράση βιταμίνης Ε, 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).

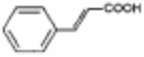
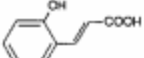


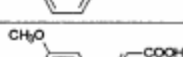
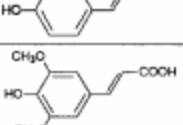

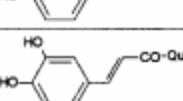
Η α-τοκοφερόλη αντιδρά με υπεροξυ-ρίζες ταχύτερα από τις άλλες τοκοφερόλες και τα συνθετικά αντιοξειδωτικά ΒΗΑ και ΒΗΤ. Η υψηλότερη ικανότητα της γ-τοκοφερόλης σε σύγκριση με την α-τοκοφερόλη βασίζεται στην υψηλότερη σταθερότητα της γ-τοκοφερόλης και στα διαφορετικά προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη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



Σχήμα 7. Χημική δομή τοκοφερολών, τοκοτριενολών και του τρόλοξ (Laguerre et al., 2007)

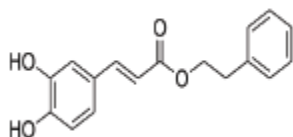
2.4.2.2. Φαινολικά οξέα

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).

Name	Structure	Source
cinnamic acid		oil of cinnamon, coca leaves
o-coumaric acid		cherry, plum
m-coumaric acid		cherry, plum
p-coumaric acid		most fruits (esp. blueberry, raspberry and pineapple) apple, tomato, grape, olive
ferulic acid		grains, nuts, tumeric, peppers, citrus fruit, tomato, cabbage, asparagus
sinapic acid		brussel sprouts, potatoes, rapeseed; trace amounts in citrus, pineapple, tomato
caffeic acid		grape, apple, plum, tomato, eggplant, cabbage, asparagus, endives, potatoes (the most abundant hydroxycinnamic acid)
chlorogenic acid		apple, pear, peach (and most fruits), tomato, coffee

Σχήμα 8. Η δομή των κυριότερων φαινολικών οξέων και οι φυσικές πηγές τους.

Ο φαιναιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE), είναι μία φαινολική 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/επαναϊμάτωση (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 ριζών του οξυγόνου και η ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων με ιόντα μετάλλων (Russo et al., 2002).



Σχήμα 9. Δομή φαιναιθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος

2.4.2.3. Φαινολικά διτερπένια

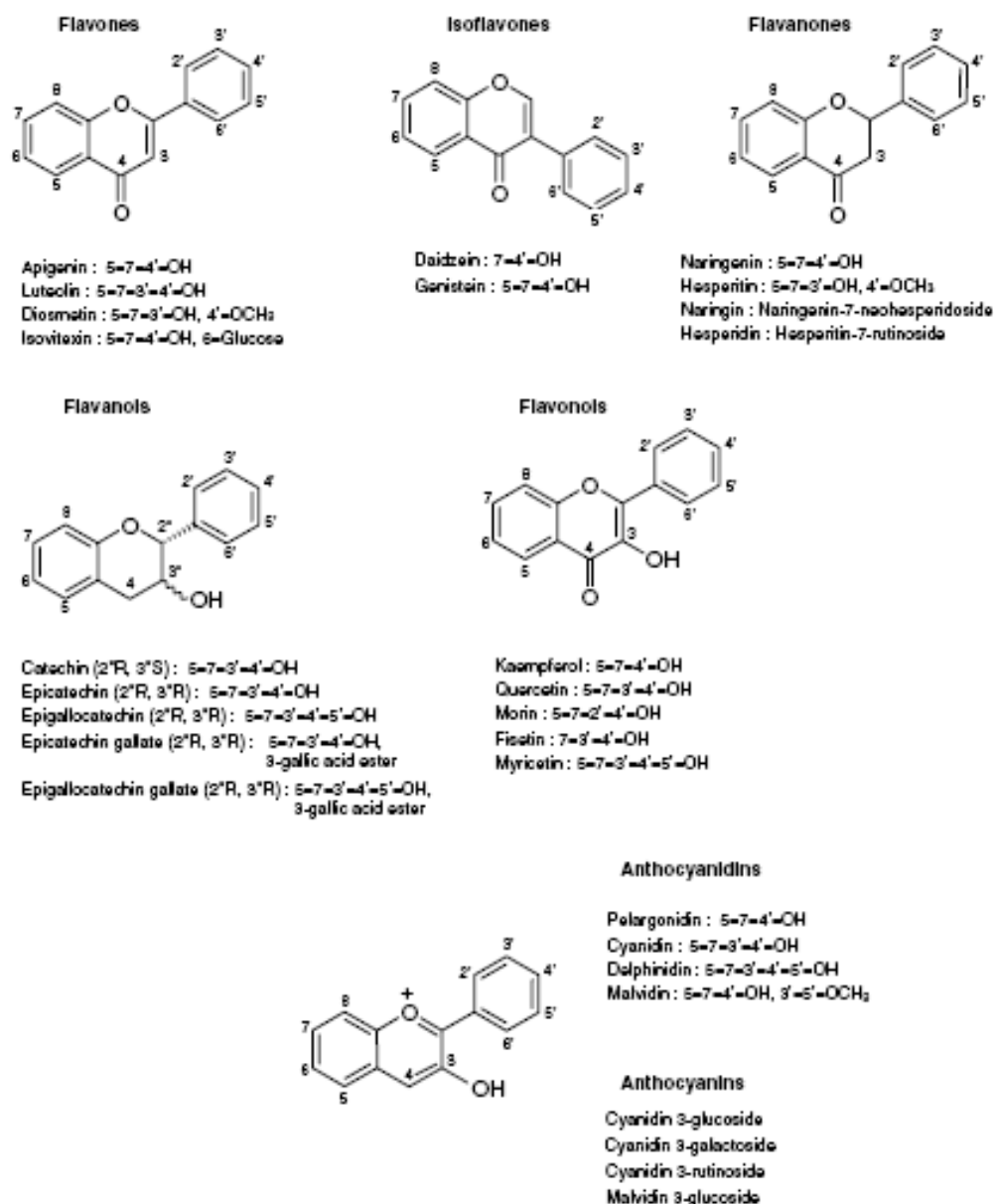
Μία μεγάλη κατηγορία ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι τα τερπένια. Τα διτερπένια είναι ενώσεις των οποίων ο ανθρακικός σκελετός αποτελείται από τέσσερις ισοπρενικές ομάδες (C₂₀).

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).

2.4.2.4. Φλαβονοειδή

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών αναγνωρίζονται ευρέως. 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).



Σχήμα 10. Κατηγορίες φλαβονοειδών και η δομή τους. (Laguette et al., 2007)

2.5. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης

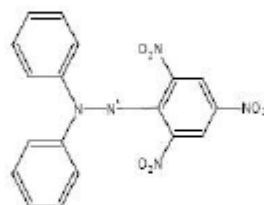
Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για να εκτιμήσουν και να συγκρίνουν την αντιοξειδωτική δράση στα τρόφιμα. Πρόσφατα, οι μέθοδοι ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (oxygen radical absorbance capacity assays) και χρωματομετρικές μέθοδοι απορρόφησης χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν την αντιοξειδωτική δράση τροφίμων, εκχυλισμάτων και βιολογικών υγρών. Αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι μετράνε την δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Οι ποικίλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης σε τρόφιμα μπορούν να δώσουν ποικίλα αποτελέσματα ανάλογα με την ελεύθερη ρίζα που θα χρησιμοποιηθεί σαν αντιδρών.

Υπάρχουν επίσης και άλλες μέθοδοι που εκτιμούν την αντίσταση των λιπαρών υλών στην οξειδωση παρουσία του εξεταζόμενου αντιοξειδωτικού. Αυτές οι μέθοδοι είναι χρονοβόρες γιατί η οξειδωση του υποστρώματος εξαρτάται από την θερμοκρασία, την πίεση κτλ. και δεν είναι πρακτικές για μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για την εξέταση φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι οι παρακάτω:

➤ Μέθοδος DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl):

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση του αντιοξειδωτικού με μεθανολικό διάλυμα της σταθερής 1,1-διφαινυλ-2-πικριλυδραζυλικής ρίζας (η οποία 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

(Liangli , 2007)

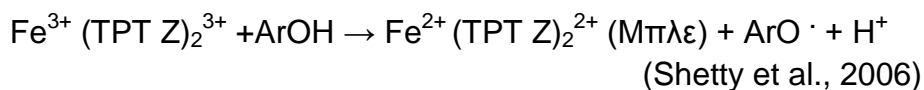
Σχήμα 11. Δομή του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

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).

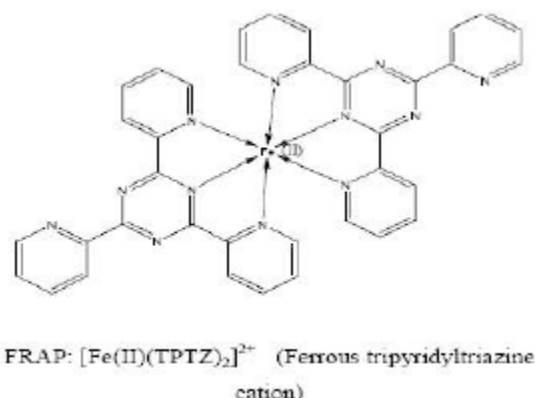
➤ Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δράσης-FRAP (Ferric Reducing Activity Power- FRAP):

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



Σχήμα 12. 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 πολυφαινόλων 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).

➤ 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.

➤ 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).

➤ Δοκιμή συζευγμένης οξειδωσης λινελαϊκού οξέος / β-καροτενίου:

Η αρχή της μεθόδου είναι η βαθμιαία εξαφάνιση του χρώματος του β-καροτενίου λόγω οξειδωσης 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 οξειδωση του λινελαϊκού οξέος δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (Marco, 1968; Miller, 1971).

➤ 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 αυτοοξειδωσης των εδωδιμων 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).

➤ Αεριοχρωματογραφική ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων:

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

3. Σκοπός της εργασίας

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης. Τα δείγματα που εξετάστηκαν προήλθαν από δύο διαφορετικές περιοχές, για να μελετηθεί η επίδραση που έχει η διαφορετική χλωρίδα της ηπειρωτικής Ελλάδας (Στερεά Ελλάδα, Δομοκός) και η νησιωτική Ελλάδα (Κως) στην αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης που συλλέχθηκε. Επίσης στην πρόπολη της Στερεάς Ελλάδας μελετήθηκε και η επίδραση της εποχής συλλογής (άνοιξη και φθινόπωρο) στην αντιοξειδωτική δράση. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με δύο διαφορετικούς τρόπους (με ανάδευση και με υπερήχους) για να εξεταστεί ποια από τις δύο είναι η καταλληλότερη μέθοδος εκχύλισης.

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Υλικά και μέθοδοι

4.1.1. Δείγματα Πρόπολης

Στα πλαίσια της πτυχιακής αυτής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρόπολης που παρελήφθησαν από την Βόρεια Φθιώτιδα (περιοχή Δομοκού) σε δύο χρονικές περιόδους, άνοιξη (Μάρτιος – Ιούνιος) και φθινόπωρο (Αύγουστος – Νοέμβριος), και από την Κω.

4.1.2. 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 (C₇H₆O₃) (Alfa Aesar, Germany)
Τριχλωριούχος Άργιλος (AlCl₃) (άνυδρο) (Sigma Aldrich, Germany)
Τριχλωριούχος Σίδηρος (FeCl₃) (Sigma Aldrich, Germany)
Φαινυλ-αιθυλ-εστέρας καφεϊκού οξέος ≥97%(CAPE) (Sigma, Switzerland)
Φερουλικό Οξύ (C₁₀H₁₀O₄) (Fluka, Germany)
Folin – Ciocalteu (Merck, Darmstadt - Germany)
DPPH (2,2diphenyl-picrylhydrazyl) 85% (Sigma Aldrich Germany)
TPTZ (2,4,6 – Tri (2-piridyl) -1,3,5-triazine) 98% (Alfa Aesar, Germany)

4.1.3. Όργανα

- 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 lighthouse optical LTD (United Kingdom) (1-G-10 mm).
- Κυκλικά διηθητικά φίλτρα φ 110 mm (Black Ribbon, Germany)

4.1.4. Προκατεργασία δειγμάτων

4.1.4.1. Εκχύλιση

Για την παραλαβή των αιθανολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε καθαρή αιθανόλη. Οι μέθοδοι εκχύλισης της πρόπολης ήταν δύο, εκχύλιση με ανάδευση και εκχύλιση με υπερήχους.

4.1.4.1.1. Μέθοδος εκχύλισης με ανάδευση

Η διαδικασία για την εκχύλιση με ανάδευση ήταν η εξής:

- Λειοτρίβηση του δείγματος της πρόπολης σε θερμοκρασία κατάψυξης.
- Συνεχής ανάδευση της πρόπολης με αιθανόλη για 24 ώρες σε αναλογία 1g πρόπολης σε 20 ml αιθανόλης.
- Διήθηση υπό κενό και παραλαβή του διηθήματος.
- Συμπύκνωση του εκχυλίσματος και απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστρεφόμενο εξατμιστή κενού στους 60° C.
- Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -18° C.

4.1.4.1.2. Μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους (ultrasonic)

Η διαδικασία για την εκχύλιση με υπερήχους ήταν η εξής:

- Λειοτρίβηση του δείγματος της πρόπολης σε θερμοκρασία κατάψυξης.
- Υδατόλουτρο υπερήχων για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διήθηση υπό κενό και παραλαβή του διηθήματος.
- Συμπύκνωση του εκχυλίσματος και απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστρεφόμενο εξατμιστή κενού στους 60° C.
- Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -18° C.

4.2. Μέθοδοι ανάλυσης

4.2.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αντιοξειδωτικής δράσης

4.2.1.1. Μέθοδος DPPH

Το σύστημα αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) είναι μια απλή μέθοδος για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων. Η αδρανοποίηση της ρίζας DPPH οφείλεται στην ικανότητα των ενώσεων να προσφέρουν ιόντα υδρογόνου (Kumazawa et al., 2004).

Όταν η ρίζα αντιδρά με ένα αντιοξειδωτικό που δίνει υδρογόνο, ανάγεται και αυτό εμφανίζεται με την αλλαγή χρώματος και μετριέται φασματοφωτομετρικά στα 517 nm. Οι τιμές IC₅₀ φαίνονται στον πίνακα, όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας DPPH (Gulcin et al., 2010).

Παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH 6·10⁻⁵ M. Σε 3 ml του διαλύματος προστέθηκαν 0,1 ml δείγματος από τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν:

- (i) Αιθανολικό εκχύλισμα Δομοκού ανοιξιότιο με εκχύλιση με ανάδευση (0,4 - 4 g/L) και με εκχύλιση με υπερήχους (1 - 5 g/L)
- (ii) Αιθανολικό εκχύλισμα Δομοκού φθινοπωρινό με εκχύλιση με ανάδευση (0,6 - 3 g/L) και με εκχύλιση με υπερήχους (0,2 - 3 g/L)
- (iii) Αιθανολικό εκχύλισμα από την Κω με εκχύλιση με υπερήχους (2 - 5 g/L)

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

- (i) BHT (0,4 - 2 g/L)
- (ii) Ασκορβικό οξύ (0,004 - 0,06 g/L)
- (iii) Α - τοκοφερόλη (0,05 - 2,5 g/L)
- (iv) CAPE (0,001 - 0,2 g/L)

Μετά από 45 min μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 517 nm.

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

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

Όπου A₀: απορρόφηση του λευκού προσδιορισμού
και A: απορρόφηση του δείγματος

Τα αποτελέσματα είναι οι μέσοι όροι των τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις τους. Επίσης από την λογαριθμική εξίσωση που προέκυψε από τη γραφική απεικόνιση της % αντιοξειδωτικής δράσης με την συγκέντρωση, υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀, για τα εκχυλίσματα της πρόπολης και τα πρότυπα αντιοξειδωτικά, η οποία μας δίνει τη συγκέντρωση (g/L) που απαιτείται για την επίτευξη του 50% της αντιοξειδωτικής δράσης.

4.2.1.2. Μέθοδος FRAP(Ferric Reducing Activity Power)

Σ' αυτή την μέθοδο μετριέται η ικανότητα αναγωγής του σιδήρου από το αντιοξειδωτικό συστατικό. Σε χαμηλό pH το μίγμα σιδήρου με την τριπυριδουλτριαζίνη (Fe^{3+} -TPTZ) δημιουργεί σύμπλοκα με μπλε χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 593 nm. Οι συνθήκες της ανάλυσης ευνοούν την αναγωγή του συμπλόκου και κατά συνέπεια την ανάπτυξη του χρώματος που δείχνει την ύπαρξη αντιοξειδωτικής ουσίας. Οι τιμές υπολογίστηκαν με βάση την αλλαγή της απορρόφησης (Mohammadzadeh et al., 2007).

Παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα TPTZ 10 mmoles/L και FeCl_3 20 mmoles/L, καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα CH_3COONa 300 mmoles/L, το οποίο ρυθμίστηκε σε pH 3,6 με CH_3COOH . Σε 2,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκαν 0,25 mL διαλύματος TPTZ, 0,25 mL διαλύματος FeCl_3 και στη συνέχεια 0,2 mL δείγματος:

- (i) Αιθανολικό εκχύλισμα Δομοκού ανοιξιάτικο με εκχύλιση με ανάδευση (0,2 - 2 g/L) και με εκχύλιση με υπερήχους (0,8 - 2 g/L)
- (ii) Αιθανολικό εκχύλισμα Δομοκού φθινοπωρινό με εκχύλιση με ανάδευση (0,4 - 3 g/L) και με εκχύλιση με υπερήχους (0,005 - 1 g/L)
- (iii) Αιθανολικό εκχύλισμα από την Κω με εκχύλιση με υπερήχους (0,2 - 1 g/L)

καθώς και 0,2 ml από τις πρότυπες ουσίες σε μεθανόλη:

- (i) BHT (0,005 - 0,4 g/L)
- (ii) Ασκορβικό οξύ (0,0002 - 0,02 g/L)
- (iii) Α - τοκοφερόλη (0,008 - 0,05 g/L)
- (iv) CAPE (0,001 - 0,04 g/L)

Μετά από 30 min παραμονής σε υδατόλουτρο στους 37° C, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 593 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως % αναγωγική δράση όπως προκύπτει από την χρήση της εξίσωσης:

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

Όπου A_0 : απορρόφηση του λευκού προσδιορισμού
και A: απορρόφηση του δείγματος

Τα αποτελέσματα είναι οι μέσοι όροι των τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις τους. Επίσης από την λογαριθμική εξίσωση που προέκυψε από τη γραφική απεικόνιση της % αναγωγικής δράσης με την συγκέντρωση, υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} , για τα εκχυλίσματα της πρόπολης

και τα πρότυπα αντιοξειδωτικά, η οποία μας δίνει τη συγκέντρωση (g/L) που απαιτείται για την επίτευξη του 50% της αντιοξειδωτικής δράσης.

4.2.2. Χρωματομετρικές μέθοδοι περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά

4.2.2.1. Μέθοδος προσδιορισμού περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 2 mL εκχυλίσματος, 0,3 mL NaNO_2 (5% w/v σε νερό) και έπειτα από 5 min προστέθηκαν 3 mL AlCl_3 (10% w/v σε νερό) και στη συνέχεια 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.

4.2.2.2. Μέθοδος προσδιορισμού περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες (Folin – Ciocalteu)

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστέθηκε 0,5 mL εκχυλίσματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Μετά από 3 min προστέθηκε 1 mL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (35%) και αποσταγμένου νερού μέχρι την πλήρωση της ογκομετρικής φιάλης. Μετά από μία ώρα μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο στα 760 nm (Tere et al., 2005). Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε ως προς γαλλικό οξύ (ppm/ $R_2=$) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/ kg ξηρής ουσίας. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις.

5. Αποτελέσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εξετάστηκαν τρία δείγματα πρόπολης, με γεωγραφική προέλευση ένα από την Κω και δύο από τον Δομοκό, με διαφορετική εποχή συλλογής το καθένα (άνοιξη και φθινόπωρο).

Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με δύο τρόπους, με ανάδευση και υπερήχους. Η αντιοξειδωτική δράση τους μετρήθηκε με τις μεθόδους DPPH και FRAP. Με τις ίδιες μεθόδους εξετάστηκαν και τα παρακάτω πρότυπα:

- 1) BHT
- 2) CAPE
- 3) ASCORBIC ACID
- 4) α-TOCOPHEROL

Αφού κατασκευάστηκαν οι καμπύλες της αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με την συγκέντρωση, από την εξίσωση που προέκυψε από την κάθε καμπύλη, υπολογίστηκαν οι τιμές IC50, δηλαδή οι συγκεντρώσεις στις οποίες εμφανίζεται το 50% της αντιοξειδωτικής δράσης. Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 7. Τιμές IC50 που μετρήθηκαν με την μέθοδο DPPH.

Δείγματα	Ανάδευση	Υπέρηχοι
Δομοκός Αν.	1,211	1,383
Δομοκός Φθ.	1,041	0,815
Κως		8,809
Πρότυπα		
BHT	2,803	
CAPE	0,011	
ASCORBIC ACID	0,015	
A-TOCOPHEROL	5,983	

Όσο πιο μικρή είναι η τιμή IC50, τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει το δείγμα. Έτσι προκύπτει από τον πίνακα 1, ότι το δείγμα Δομοκός Αν. δεν εμφανίζει μεγάλες διαφορές στις τιμές IC50 ανάμεσα στις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης. Το ίδιο συμβαίνει και στο δείγμα Δομοκός Φθ.. Ενώ το δείγμα από την Κω στην μέθοδο εκχύλισης με ανάδευση εμφάνισε τόσο μικρή δράση, που δεν ήταν δυνατό να κατασκευαστεί καμπύλη αντιοξειδωτικής δράσης. Αντίθετα για το δείγμα από την Κω που εκχυλίστηκε με υπερήχους κατασκευάστηκε καμπύλη, αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος εκχύλισης επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση και μάλιστα η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους είναι καταλληλότερη.

Από τα τρία δείγματα φαίνεται ότι ισχυρότερη δράση έχει το δείγμα Δομοκός Φθ., ακολουθεί το δείγμα Δομοκός Αν. χωρίς μεγάλη διαφορά, ενώ το δείγμα από την Κω εμφανίζει υποπολλαπλάσια δράση σε σχέση με τα δείγματα από τον Δομοκό. Τα δείγματα από τον Δομοκό έχουν μεγαλύτερη δράση από το πρότυπο αντιοξειδωτικό ΒΗΤ και από το πρότυπο α – Τοκοφερόλη, το οποίο εμφανίζει αρκετά μικρότερη δράση. Ενώ τα πρότυπα αντιοξειδωτικά CAPE και ασκορβικό οξύ εμφανίζουν μεγαλύτερη δράση και από τα τρία δείγματα. Αυτό σημαίνει ότι τα δείγματα από τον Δομοκό μπορούν να αξιοποιηθούν για την αντιοξειδωτική τους δράση, αφού η δράση τους είναι συγκρίσιμη με την δράση πρότυπων αντιοξειδωτικών.

Πίνακας 8. Τιμές IC50 που μετρήθηκαν με την μέθοδο FRAP.

Δείγματα	Ανάδευση	Υπέρηχοι
Δομοκός Αν.	0,397	1,051
Δομοκός Φθ.	3,577	1,192
Κως		2,794
Πρότυπα		
ΒΗΤ	0,033	
CAPE	0,001	
ASCORBIC ACID	0,0005	
A-TOCOPHEROL	0,004	

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 8, το δείγμα Δομοκός Αν. εμφανίζει διαφορές στις τιμές IC50 ανάμεσα στις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης. Συγκεκριμένα οι τιμές IC50 με την μέθοδο των υπερήχων είναι περίπου διπλάσιες. Το δείγμα Δομοκός Φθ. εμφανίζει περίπου διπλάσιες τιμές IC50 στην μέθοδο εκχύλισης ανάδευσης. Ενώ το δείγμα από την Κω στην μέθοδο εκχύλισης με ανάδευση εμφάνισε τόσο μικρή δράση, που δεν ήταν δυνατό να κατασκευαστεί καμπύλη αντιοξειδωτικής δράσης. Αντίθετα για το δείγμα από την Κω που εκχυλίστηκε με υπερήχους κατασκευάστηκε καμπύλη. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος εκχύλισης επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση και πιθανόν η κάθε μέθοδος εκχύλισης να διευκολύνει την εκχύλιση διαφορετικών κατηγοριών αντιοξειδωτικών. Η μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης FRAP εμφανίζει μια ιδιαιτερότητα για μερικές κατηγορίες φαινολικών αντιοξειδωτικών όπως τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και τα φλαβονοειδή, και αφορά την κινητική της αντίδρασης.

Από τα τρία δείγματα φαίνεται ότι ισχυρότερη δράση έχει το δείγμα Δομοκός Αν. με ανάδευση, ακολουθεί το δείγμα Δομοκός Αν. με υπερήχους το οποίο έχει παραπλήσια δράση με το δείγμα από τον Δομοκό Φθ με εκχύλιση με υπερήχους, ενώ το δείγμα από την Κω εμφανίζει λίγο μικρότερη δράση σε σχέση με τα προηγούμενα. Τέλος το δείγμα Δομοκός Φθ. με εκχύλιση με ανάδευση εμφανίζει την μικρότερη δράση από τα υπόλοιπα. Τα πρότυπα αντιοξειδωτικά εμφανίζουν αρκετά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτήν που εμφανίζουν τα δείγματα με την μέθοδο FRAP.

Όσον αφορά το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις φαινολών και φλαβονοειδών όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 9. Φαινολικό περιεχόμενο στα δείγματα που εκχυλίστηκαν με υπερήχους (mg γαλικού οξέος/kg).

Δομοκός Αν. 249543

Δομοκός Φθ. 151520

Κως 21602

Από τον πίνακα 9, φαίνεται ότι το δείγμα Δομοκός Αν. εμφανίζει το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο, ακολουθεί το δείγμα Δομοκός Φθ. και το μικρότερο φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζει το δείγμα Κως.

Πίνακας 10. Περιεχόμενο σε φλαβονοειδή στα δείγματα που εκχυλίστηκαν με υπερήχους (mg κερκετίνης/kg).

Δομοκός Αν. 107

Δομοκός Φθ. 41

Κως 77

Στον πίνακα 10, φαίνεται ότι το μεγαλύτερο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή εμφανίζει το δείγμα Δομοκός Αν. ακολουθεί το δείγμα Κως με μικρή διαφορά και το μικρότερο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή εμφανίζει το δείγμα Δομοκός Φθ.

6. Βιβλιογραφία

- Ahn M., Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F. and Nakayama T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383-1392.
- Alencar S.M., Oldoni T.L.C., Castro M.L., Caral I.S.R., Costa-Neto C.M., Cury J.A., Rosalen P.L. and Ikegaki M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 278-283.
- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. and Robards K. (2000). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Burcu B , Berker K. and Ozyurt D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 12, 1496-1547
- Belitz, H-D., Grosch, W., Schieberle, P. 2006. Χημεία τροφίμων. *Εκδόσεις Τζιόλας*. Θεσσαλονίκη
- Chaillou L.L. and 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
- Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M. and Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39, 756-761.
- 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 M. H., Bilsel M. and Goren A. C. (2010). Polyphenol content s and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2227-2238.
- Kalogeropoulos N., Konteles S., Troullidou E., Mourtzinis I. and Karathanos V.T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.

- Kumazawa S., Hamasaka T. and Nakayama T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- Laguerre M., Lecomte J. and Villeneuve P. (2007). *Progress in Lipid Research*, 46, 244–282.
- Laskar R.A., Sk I., Roy N. and Begum N.A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122, 233-237.
- Luo C., Zou X., Li Y., Sun C., Jiang Y. and Wu Z. (2011). Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Chemistry*, 127, 314 – 320.
- Marquele F. D., Mambro V. M., Georgetti S.R., Casagrande R., Valim Y.M.L. and Fonseca M.J.V. (2005). Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 455-462.
- Miguel M. G., Nunes S., Dandlen S. A., Cavaco A. M. and Antunes M. D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3418-3423.
- Mohammadzadeh S., Sharriatpanahi M., Hamed M., Amanzadeh Y., Ebrahimi S.E.S. and Ostad S.N. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103, 729-733.
- 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
- 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
- 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
- Κυριτσάκης, Α. 1984. Σημειώσεις τεχνολογίας λιπών και λαδίων. Τ.Ε.Ι.Θ. Τμήμα τεχνολογίας τροφίμων. Θεσσαλονίκη
- Κυριτσάκης Α. 2007. Τεχνολογία & Έλεγχος Ποιότητας Ελαιολάδου – Λιπαρών Υλών. Cory City. Θεσσαλονίκη
- Μπόσκου Δ. 2004. Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – DRRH

Πίνακας 1. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού ανοιξιάτικο με μέθοδο εκχύλισης ανάδευση.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
4	84,040	83,150	84,845	84,012	0,848
2,5	83,036	75,000	65,929	74,655	8,558
2	63,550	67,921	68,182	66,551	2,602
1,5	46,540	70,925	45,022	54,162	14,537
1	36,161	46,584	43,096	41,947	5,306
0,8	35,379	28,084	36,173	33,212	4,459
0,6	21,317	20,705	33,407	25,143	7,163
0,5	18,346	25,259	18,305	20,637	4,003
0,4	17,076	17,952	17,699	17,576	0,451

Πίνακας 2. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού ανοιξιάτικο με μέθοδο εκχύλισης υπερήχων.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
5	94,932	94,128	93,990	94,350	0,509
4,5	93,919	93,624	94,157	93,900	0,267
4	93,581	93,792	93,155	93,509	0,324
3,5	84,966	80,537	80,467	81,990	2,578
2,5	81,926	83,221	72,287	79,145	5,974
2	69,764	70,638	72,454	70,952	1,373
1,5	62,162	59,228	48,748	56,713	7,052
1	36,824	25,168	27,045	29,679	6,259

Πίνακας 3. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού φθινοπωρινό με μέθοδο εκχύλισης ανάδευση.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
3	91,823	92,061	92,150	92,011	0,169
2,4	90,119	88,514	90,102	89,578	0,922
1,8	67,973	73,818	70,819	70,870	2,923
1,5	61,670	66,385	67,747	65,267	3,189
1	41,908	47,128	44,027	44,355	2,626
0,8	34,923	39,696	38,908	37,842	2,558
0,6	27,598	31,757	32,935	30,763	2,804

Πίνακας 4. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού φθινοπωρινό με μέθοδο εκχύλισης υπερήχων.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
3	91,921	90,828	91,579	91,443	0,559
2,5	90,393	90,380	91,158	90,644	0,445
2	86,681	89,262	91,579	89,174	2,450
1,5	73,697	75,584	81,780	77,020	4,229
0,8	57,346	66,454	67,161	63,654	5,474
0,5	34,597	33,758	39,619	35,991	3,169
0,2	15,403	15,924	12,500	14,609	1,845

Πίνακας 5. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος από την Κω με μέθοδο εκχύλισης υπερήχων.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
2	14,548	16,528	14,548	15,208	1,143
2,5	19,398	21,035	19,398	19,944	0,945
3	22,575	20,367	19,064	20,669	1,775
3,5	28,428	24,374	27,759	26,854	2,173
4	30,268	-4,174	30,268	18,787	19,885
4,5	35,953	33,723	34,448	34,708	1,138
5	36,957	36,227	41,137	38,107	2,649

Πίνακας 6. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού ασκορβικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,06	96,846	97,094	84,757	92,899	7,052
0,04	81,340	69,881	94,481	81,901	12,309
0,035	88,873	77,279	81,675	82,609	5,853
0,025	68,451	74,558	72,251	71,753	3,084
0,02	34,424	43,346	51,490	43,087	8,536
0,008	24,848	25,397	29,201	26,482	2,371
0,006	23,758	22,344	25,149	23,750	1,402
0,004	15,030	14,896	18,236	16,054	1,891

Πίνακας 7. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού α – τοκοφερόλης.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
2,5	95,294	95,608	95,572	95,491	0,172
1	95,234	95,166	94,689	95,030	0,297
0,4	83,446	80,948	94,231	86,208	7,059
0,3	61,084	66,919	50,096	59,367	8,542
0,1	38,219	22,113	17,552	25,961	10,858
0,05	9,712	11,459	14,851	12,008	2,613

Πίνακας 8. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού ΒΗΤ.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
2	91,288	90,177	91,159	90,874	0,608
1	67,992	78,340	92,012	79,448	12,048
0,8	67,929	72,117	78,232	72,759	5,181
0,7	62,942	66,504	69,756	66,401	3,408
0,5	62,753	48,993	57,134	56,293	6,918
0,4	43,876	46,309	46,341	45,509	1,414

0,3	38,636	41,855	43,171	41,221	2,333
0,2	37,626	33,191	28,780	33,199	4,423

Πίνακας 9. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού CAPE.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,2	93,719	93,760	93,833	93,771	0,058
0,08	76,168	78,694	90,209	81,690	7,485
0,03	47,664	47,745	58,266	51,225	6,098
0,02	30,530	36,703	44,623	37,285	7,065
0,01	10,903	16,641	21,348	16,297	5,231
0,005	13,707	12,286	16,051	14,015	1,901
0,001	6,386	8,398	11,717	8,834	2,692

2. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – FRAP

Πίνακας 10. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού ανοιξιάτικο με μέθοδο εκχύλισης ανάδευση.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
2	89,731	80,821	77,541	82,697	6,308
1,8	86,514	79,601	79,848	81,988	3,922
1,6	86,852	78,693	77,559	81,034	5,070
1,4	85,271	77,410	75,284	79,322	5,260
1,2	86,369	75,216	71,506	77,697	7,736
1	85,140	72,242	67,531	74,971	9,116
0,8	79,668	67,672	66,898	71,413	7,160
0,6	74,872	61,207	59,423	65,167	8,452
0,4	68,522	47,917	46,889	54,443	12,204
0,2	47,122	17,582	14,947	26,550	17,864

Πίνακας 11. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού ανοιξιάτικο με μέθοδο εκχύλισης υπερήχων.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
2	66,436	69,919	69,262	68,539	1,850
1,8	64,629	67,779	66,863	66,424	1,621
1,6	60,488	64,762	63,415	62,888	2,185
1,4	57,443	61,458	61,407	60,103	2,303
1,2	53,802	57,955	56,140	55,966	2,082
1	47,854	50,224	50,441	49,506	1,435
0,8	37,047	43,223	42,308	40,859	3,333

Πίνακας 12. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού φθινοπωρινό με μέθοδο εκχύλισης ανάδευση.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
3	84,762	83,765	78,378	82,302	3,434
2,4	81,662	82,124	79,167	80,984	1,591
1,8	81,395	78,571	72,603	77,523	4,489
1,5	78,451	77,303	69,811	75,188	4,692
1,2	74,400	73,962	71,831	73,398	1,374
1	72,532	68,636	64,444	68,538	4,045
0,8	65,775	64,796	58,974	63,182	3,677
0,6	64,444	61,453	54,023	59,973	5,366
0,4	58,974	55,195	45,205	53,125	7,114

Πίνακας 13. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος Δομοκού φθινοπωρινό με μέθοδο εκχύλισης υπερήχων.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
1	85,470	86,592	87,151	86,404	0,856
0,8	85,131	84,713	85,350	85,065	0,324
0,6	83,000	83,838	81,746	82,861	1,053
0,4	78,475	81,385	77,477	79,113	2,030
0,2	76,224	68,182	73,103	72,503	4,054
0,1	65,306	54,839	59,375	59,840	5,249
0,005	17,241	25,862	16,667	19,923	5,151

Πίνακας 14. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος από την Κω με μέθοδο εκχύλισης υπερήχων.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
1	84,753	80,524	84,825	83,368	2,463
0,8	69,163	71,308	68,619	69,697	1,422
0,6	63,351	69,507	60,106	64,321	4,775
0,4	54,248	54,054	50,980	53,094	1,833
0,2	34,579	34,615	31,818	33,671	1,605

Πίνακας 15. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού ασκορβικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,02	89,806	92,271	91,574	91,217	1,271
0,015	89,706	91,906	90,986	90,866	1,105
0,01	88,355	90,000	89,866	89,407	0,914
0,005	84,964	87,970	87,411	86,782	1,599
0,001	66,942	65,385	63,107	65,145	1,929
0,0005	60,396	53,846	54,217	56,153	3,679
0,0003	43,137	42,500	50,000	45,212	4,158
0,0002	29,231	15,094	39,744	28,023	12,369

Πίνακας 16. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού α – τοκοφερόλης.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,05	89,139	91,958	89,177	90,091	1,617
0,04	85,500	89,252	87,374	87,375	1,876
0,03	82,530	85,350	86,188	84,689	1,916
0,02	76,800	74,725	77,273	76,266	1,355
0,01	73,684	74,026	73,418	73,709	0,305
0,008	53,333	59,211	66,667	59,737	6,682

Πίνακας 17. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού ΒΗΤ.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,4	87,500	87,795	88,550	87,948	0,541
0,3	83,838	84,951	89,209	85,999	2,834
0,2	80,247	80,982	82,353	81,194	1,069
0,1	71,429	72,566	70,588	71,528	0,993
0,05	50,769	59,211	62,500	57,493	6,051
0,01	25,581	22,500	26,829	24,970	2,228
0,005	15,789	24,390	26,829	22,336	5,799

Πίνακας 18. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας με τη συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού CAPE.

Συγκέντρωση (g/L)	% ικανότητα αδρανοποίησης (α)	% ικανότητα αδρανοποίησης (β)	% ικανότητα αδρανοποίησης (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,04	87,248	91,391	90,850	89,830	2,252
0,035	84,783	84,783	87,634	85,733	1,646
0,03	84,615	87,861	87,293	86,590	1,733
0,025	82,500	86,709	85,625	84,945	2,185
0,02	82,569	87,379	88,976	86,308	3,335
0,015	80,208	86,869	86,792	84,623	3,824
0,005	61,111	71,233	68,493	66,946	5,235
0,001	34,884	50,000	45,238	43,374	7,729

3. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A. FOLIN CIOCALTEAU

Πίνακας 19. Μεταβολή της απορρόφησης με την συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού γαλλικού οξέος.

Συγκέντρωση (g/L)	% απορρόφηση (α)	% απορρόφηση (β)	% απορρόφηση (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
150	0,909	0,936	0,932	0,926	0,015
100	0,77	0,795	0,75	0,772	0,023

80	0,669	0,678	0,703	0,683	0,018
60	0,594	0,646	0,629	0,623	0,027
40	0,454	0,522	0,46	0,479	0,038
20	0,365	0,384	0,389	0,379	0,013
10	0,208	0,267	0,222	0,232	0,031

Πίνακας 20. Μεταβολή της απορρόφησης με την συγκέντρωση των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης.

Εκχύλισμα πρόπολης	% απορρόφηση (α)	% απορρόφηση (β)	% απορρόφηση (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Δομοκού ανοιξιάτικο με υπέρηχους	0,885	0,909	0,764	0,853	0,078
Δομοκού φθινοπωρινό με υπέρηχους	0,615	0,624	0,632	0,624	0,009
Κως με υπέρηχους	0,274	0,327	0,374	0,325	0,050

B. ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Πίνακας 21. Μεταβολή της απορρόφησης με την συγκέντρωση του πρότυπου αντιοξειδωτικού κερκετίνης.

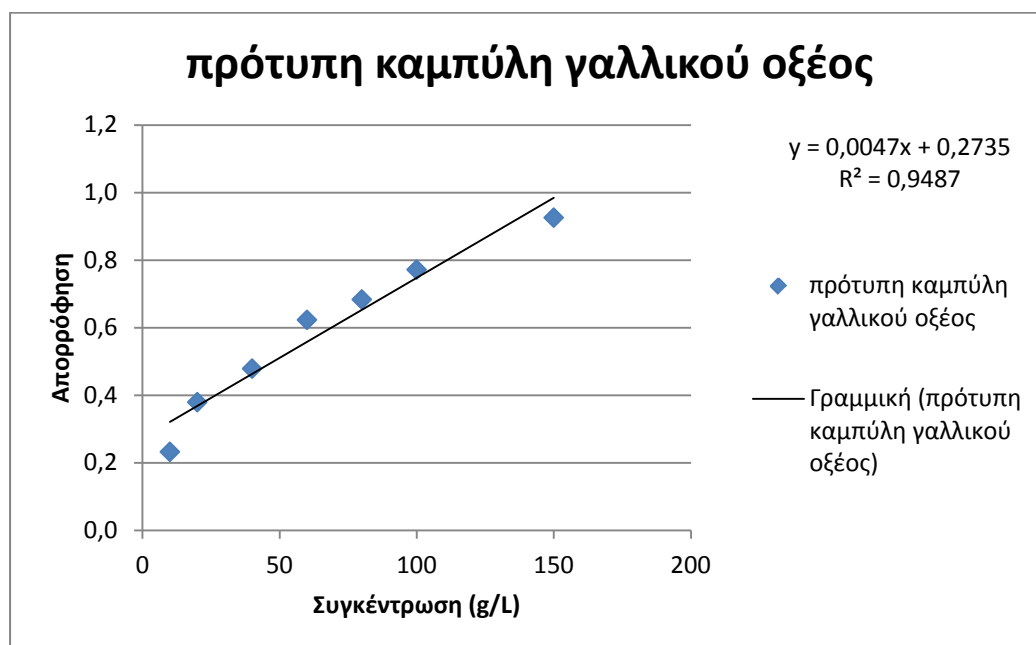
Συγκέντρωση (g/L)	% απορρόφηση (α)	% απορρόφηση (β)	% απορρόφηση (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
0,025	0,311	0,315	0,316	0,314	0,002
0,05	0,547	0,555	0,561	0,554	0,006
0,075	0,845	0,799	0,816	0,820	0,019
0,1	1,054	1,097	1,076	1,076	0,018
0,15	1,419	1,437	1,431	1,429	0,007
0,2	1,664	1,673	1,671	1,669	0,004
0,25	1,894	1,911	1,888	1,898	0,010

Πίνακας 22. Μεταβολή της απορρόφησης με την συγκέντρωση των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης.

Εκχύλισμα πρόπολης	% απορρόφηση (α)	% απορρόφηση (β)	% απορρόφηση (γ)	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Δομοκού ανοιξιάτικο με υπέρηχους	0,157	0,160	0,158	0,158	0,002
Δομοκού φθινοπωρινό με υπέρηχους	0,382	0,418	0,401	0,400	0,018
Κως με υπέρηχους	0,526	0,528	0,521	0,525	0,004

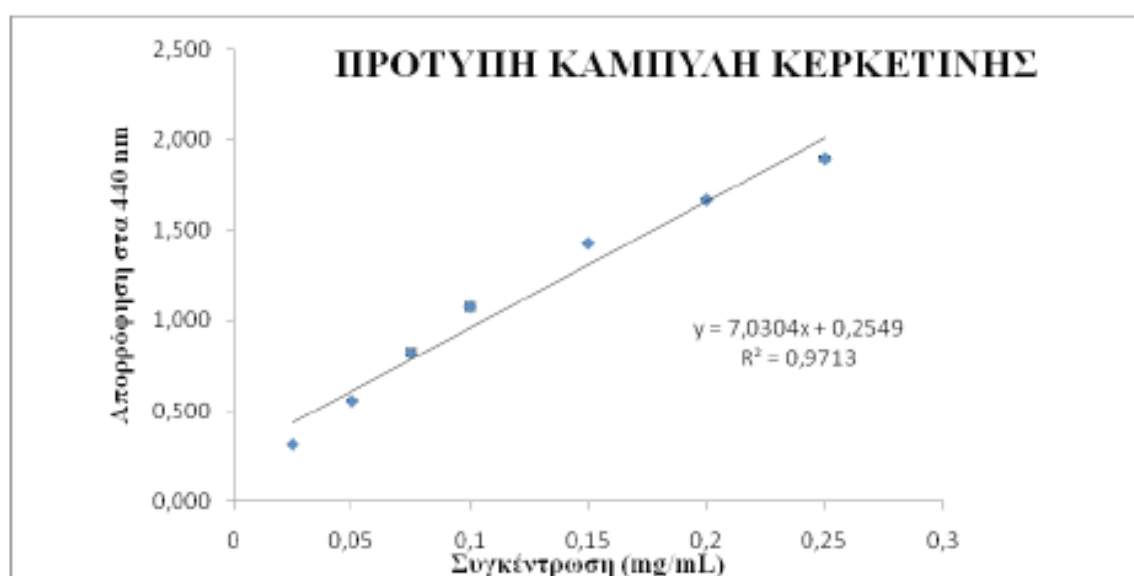
4. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A. FOLIN CIOCALTEAU



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

B. ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη κερκετίνης.