

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΛΕΝΑ ΤΡΟΥΛΛΙΔΟΥ

**ΠΡΟΠΟΛΗ: Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων της
και αξιολόγηση ενθυλακωμένων μορφών της σε
βιοπολυμερή, με έμφαση στις αντιοξειδωτικές και
αντιμικροβιακές ιδιότητές της και την απελευθέρωσή της**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΒΑΪΟΣ
ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΜΥΛΩΝΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2007

*Αφιερωμένη στους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε κάθε όμορφη και δύσκολη στιγμή της
ζωής μου,*

*στην αγαπημένη μου γιαγιά, Κυριακή Λοϊζου, που βρίσκεται πάντα μέσα στην καρδιά μου,
στους γονείς μου,
Αλεξάνδρα, που η δύναμη της ψυχής της με βοηθά να ξεπερνά κάθε εμπόδιο,
και Βασίλη, για την στήριξη που μου προσφέρει, σε κάθε μου επιλογή,
στον Χάρη.*

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2006-2007 στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων, υπό την επίβλεψη του δρ. Βάϊου Καραθάνου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τον καθηγητή μου δρ. Βάϊο Καραθάνο, για την πολύτιμη βοήθεια του και την ηθική στήριξη και συμπαράσταση που μου προσέφερε απλόχερα, σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Νικόλαο Ανδρικόπουλο, διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων στο οποίο διεξήχθει η πτυχιακή μελέτη.

Τις θερμότερες μου ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον δρ. Νικόλαο Καλογερόπουλο για το αμείωτο ενδιαφέρον του και την βοήθειά του, σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Θεωρώ ότι η συμβολή του, συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω επίσης και στην δρ. Αναστασία Μυλωνά για τη σημαντική βοήθεια και τη συμπαράστασή της κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την δρ. Αντωνία Χίου για το αμέριστο ενδιαφέρον της, την υποστήριξη και τη συμπαράστασή της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Ιωάννη Μουρτζίνο, υποψήφιο διδάκτορα, για την πολύτιμη βοήθειά του, κατά την οργάνωση του θεωρητικού μέρους και κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη στήριξη που μου προσέφερε και την υπομονετική διάθεση που επέδειξε. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στον δρ. Σπύρο Κοντελέ, για την σημαντική βοήθεια του κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους.

Για την προμήθεια των δειγμάτων πρόπολης, που παραχώρησαν αφιλοκερδώς θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Δημήτρη Παπακώστα, Μιχάλη Μαραθιάνο, Δημήτρη Νεράντζη, Στάθη Αναστασόπουλο, Γεώργιο Σταματίου, Κώστα Ντούλια και Σπύρο Κοντελέ.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου που ήταν πρόθυμο να με βοηθήσει σε ότι πρόβλημα προέκυπτε.

Ευχαριστώ επίσης το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου και την παραχώρηση των οργάνων για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην πολύ καλή μου φίλη Μαρία Ιωάννου για την στήριξη και τη συντροφιά της, στην Αριστέα Γκιοζάρη, στην Έφη Παραμέρα, στην Λουΐζα Χατζημάρκου, στην Κυριακή Ηροδότου και στην Άντρη Παντελίδου, για το ενδιαφέρον και την στήριξή τους.

Έλενα Τρουλλίδου

Περιεχόμενα

	Σελ.
ΣΤΟΧΟΙ	1
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΠΡΟΠΟΛΗ	
A. 1. Εισαγωγή	4
A. 2. Προέλευση	5
A. 3. Συλλογή υλικού από τις μέλισσες	6
A. 4. Η χρήση της πρόπολης από τις μέλισσες	7
A. 5. Παραλαβή και παραγωγή	7
A. 6. Επεξεργασία της πρόπολης	10
A. 7. Αποθήκευση	11
A. 8. Ποιοτικός έλεγχος	12
A. 9. Μειονεκτήματα πρόπολης	13
A. 10. Τα χαρακτηριστικά μιας καλής ποιότητας πρόπολης	14
A. 11. Χημική σύνθεση της πρόπολης	14
A. 12. Τα είδη της πρόπολης και η γεωβοτανική τους προέλευση	18
A. 13. Επιδράσεις των φλαβονοειδών που ανευρίσκονται στην πρόπολη, στον ανθρώπινο οργανισμό	20
A. 14. Νέα συστατικά απομονωμένα από πρόπολη η οποία συλλέχθηκε από εύκρατα κλίματα	21
A. 15. Μέθοδοι προσδιορισμού χαρακτηριστικών συστατικών που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης διαφορετικής προέλευσης	22
A. 15. 1. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Λατινική Αμερική	22
A. 15. 1. 1. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από την Βραζιλία	22
A. 15. 1. 2. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από τη Χιλή	25
A. 15. 2. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Ευρώπη και τη Μεσόγειο	25

A. 15. 2. 1. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από την Πολωνία	25
A. 15. 2. 2. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από την Ελλάδα	26
A. 15. 2. 3. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Τουρκία	27
A. 15. 2. 4. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Τυνησία	27
A. 15. 3. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Ωκεανία	28
A. 15. 3. 1. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Νέα Ζηλανδία	28
A. 15. 4. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από Ευρώπη, Αμερική, Ασία και Αφρική και σύγκριση των δειγμάτων	29
A. 16. Νέα συστατικά από πρόπολη με προέλευση από την τροπική ζώνη	30
A. 16. 1. Φλαβονοειδή	30
A. 16. 2. Πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα και ακετοφαινόνες	30
A. 16. 3. Λιγνάνες και άλλα φαινολικά συστατικά	30
A. 16. 4. Δι- και τρι-τερπένια	30
A. 16. 5. Πτητικές ενώσεις	31
A. 16. 6. Σάκχαρα	31
A. 16. 7. Υδρογονάνθρακες	31
A. 16. 8. Μέταλλα	31
A. 16. 9. Βιολογικές δράσεις των νέων συστατικών	31
A. 17. Χημική σύσταση γεωπρόπολης	32
A. 18. Γενικές ιδιότητες της πρόπολης	32
A. 18. 1. Αντιβακτηριακή δράση της πρόπολης	34
A. 18. 2. Αντιμυκητιακή δράση της πρόπολης	35
A. 18. 3. Αντιπαρασιτική δράση της πρόπολης	36
A. 18. 4. Αντιϊική δράση της πρόπολης	37
A. 18. 5. Αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης	40
A. 18. 6. Αντικαρκινικές ιδιότητες	44

A. 18. 7. Επουλωτική δράση της πρόπολης	46
A. 18. 8. Ηπατοπροστατευτική δράση πρόπολης	46
A. 18. 9. Αναισθητική δράση της πρόπολης	47
A. 18. 10. Αντιφλεγμονώδης δράση της πρόπολης	48
A. 18. 11. Η δράση της πρόπολης στο Σακχαρώδη Διαβήτη	48
A. 19. Αλλεργικά φαινόμενα	49
A. 20. Τοξικότητα της πρόπολης	49
A. 20. 1. Μελέτες οξείας τοξικότητας πρόπολης	49
A. 20. 2. Μελέτες τοξικότητας μέσω πολλαπλών δόσεων πρόπολης	50
A. 21. Συνταγές χρήσης της πρόπολης	50
A. 22. Προϊόντα με πρόπολη	52
A. 23. Χρήσεις της πρόπολης στην Ιατρική	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΚΥΡΙΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΡΟΠΟΛΗΣ

B. 1. Κύρια δραστικά συστατικά πρόπολης και πιθανές δράσεις τους	56
B. 1. 1. Πολυφαινόλες	56
B. 1. 2. Φλαβονοειδή	57
B. 2. Χαρακτηριστικά των κυριότερων ενώσεων που απαντούν στην Ελληνική πρόπολη	57
B. 2. 1. Καφεϊκό οξύ (Caffeic acid)	57
B. 2. 2. Χρυσίνη (Chrysin)	59
B. 2. 3. Απιγενίνη (Apigenine)	60
B. 2. 4. Ναριγκενίνη (Naringenin)	62
B. 2. 5. Καμφερόλη (Kaempferol)	63
B. 3. Τερπενικά οξέα	65

B. 3. 1. Αβιετικό οξύ (Abietic acid)	65
--------------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

Γ. 1. Εισαγωγή	67
Γ. 2. Τεχνικές μικροενθυλάκωσης	68
Γ. 2. 1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)	69
Γ. 2. 1. 1. Θεωρία της ξήρανσης με ψεκασμό	69
Γ. 2. 1. 2. Εφαρμογές της ξήρανσης με ψεκασμό	71
Γ. 2. 2. Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη	72
Γ. 2. 2. 1. Θεωρία της λυοφιλίωσης	72
Γ. 2. 2. 2. Τύποι ξηραντηρίων λυοφιλίωσης	74
Γ. 2. 2. 3. Επίδραση της λυοφιλίωσης στα τρόφιμα	75
Γ. 2. 2. 4. Διαφορές λυοφιλίωσης με ξήρανσης με αέρα	76
Γ. 3. 1. Μέσα ενθυλάκωσης	77
Γ. 3. 1. 1. Εισαγωγή	77
Γ. 4. Τροποποιημένο άμυλο	78
Γ. 4. 1. Χημική τροποποίηση του αμύλου	82
Γ. 4. 2. Φυσικο-χημικές Ιδιότητες τροποποιημένου αμύλου	85
Γ. 4. 3. Μορφολογικές Ιδιότητες τροποποιημένου αμύλου	85
Γ. 4. 4. Θέρμανση τροποποιημένου αμύλου	85
Γ. 4. 5. Διατροφική και Τοξικολογική ανάλυση τροποποιημένου αμύλου	87
Γ. 4. 6. Εφαρμογές τροποποιημένου αμύλου ως μέσο ενθυλάκωσης	88
Γ. 4. 7. Οκτενυλολεκτρικό τροποποιημένο άμυλο	89
Γ. 5. Κυκλοδεξτρίνες	90
Γ. 5. 1. Παράγωγα κυκλοδεξτρινών	95

Γ. 5. 2. Διαλυτότητα κυκλοδεξτρινών	97
Γ. 6. Ζελατίνη	98
Γ. 6. 1. Κύριες τεχνικές χρήσεις	100
Γ. 6. 2. Διατροφική ανάλυση	101
Γ. 6. 3. Θέματα ασφάλειας κατά τη χρησιμοποίηση ζελατίνης	102
Γ. 6. 4. Εφαρμογές ζελατίνης ως μέσο ενθυλάκωσης	102
Γ. 7. Νέα Βιοπολυμερή	105
Γ. 7. 1. Χιτοζάνη	105
Γ. 7. 2. Ζελάνη	105
Γ. 7. 3. Ξανθάνη	105

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Δ. 1. Εισαγωγή	106
Δ. 2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	106
Δ. 3. Θερμικές Τεχνικές	110
Δ. 3. 1. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	110
Δ. 4. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματοσκοπία Μάζας (GC- MS)	113
Δ. 5. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)	114
Δ. 6. Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry)	114

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ε. 1. Γενικά Υλικά εργαστηρίου	115
Ε. 2. Απομάκρυνση κηρών από τα δείγματα πρόπολης και παρασκευή αιθανολικών εκχυλισμάτων	115

E. 3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη (Balsam)	116
E. 4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE)	117
E. 4. 1. Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)	118
E. 5. Παρασκευή των συμπλόκων PE με βιοπολυμερή	121
E. 5. 1. Παρασκευή συμπλόκων PE με τροποποιημένο άμυλο	121
E. 5. 2. Παρασκευή συμπλόκων PE με β- κυκλοδεξτρίνη (β- CD)	122
E. 5. 3. Παρασκευή συμπλόκων PE με υδρόξυ-πρότυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD)	122
E. 5. 4. Παρασκευή συμπλόκων PE με ζελατίνη	123
E. 5. 5. Μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων πρόπολης με β-CD, HP-β-CD και τροποποιημένο άμυλο με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)	126
E. 5. 6. Έλεγχος εγκλεισμού συστατικών που περιέχονται στο αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης	127
E. 5. 6. 1. Παρασκευή των συμπλόκων εγκλεισμού αβιετικού οξέος, καμφερόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης, χρυσίνης και απιγενίνης. Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων με τη μέθοδο DSC	127
E. 5. 6. 2. Παρασκευή φυσικών μιγμάτων των πρότυπων πολυφαινόλων με β-κυκλοδεξτρίνης	130
E. 5. 6. 3. Μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων με β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο DSC	130
E. 5. 6. 4. Μελέτη σταθερότητας των συστατικών και των συμπλόκων εγκλεισμού τους σε β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο DSC	131
E. 6. Μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (Καλάβρυτα) σε β-κυκλοδεξτρίνη με τη χρήση υπερήχων. Επιλεκτική απομόνωση φαινολικών συστατικών	132
E. 7. Μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (Καλάβρυτα) σε τροποποιημένο άμυλο (Σ 2)	133

E. 8. Μελέτη διαλυτότητας καθαρής πρόπολης	134
E. 9. Μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συμπλόκων πρόπολης (Καλάβρυτα) σε β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, τροποποιημένο άμυλο και ζελατίνη, έναντι του <i>Staphylococcus aureus</i>	136
E. 10. Διερεύνηση βέλτιστης αναλογίας μάζας πρόπολης : μέσο εγκλεισμού, με φασματοφωτομετρικές μεθόδους	141
E. 11. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη (Καλάβρυτα) με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων PE με τροποποιημένο άμυλο, σε υδατικό διάλυμα και ρυθμιστικά διαλύματα	142
E. 11. 1. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ2) σε σχέση με το χρόνο, σε υδατικό διάλυμα	143
E. 11. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ4-Σ12) σε υδατικό διάλυμα	144
E. 11. 3. Μελέτη διαλυτότητας των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη από τα Καλάβρυτα	145
E. 11. 4. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ2), σε σχέση με το χρόνο σε pH= 1,2 και pH=8	146
E. 12. Μελέτη προσδιορισμού του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	147
E. 12. 1. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των PE	148
E. 12. 2. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των συμπλόκων Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12	149
E. 12. 3. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ 2) σε σχέση με το χρόνο	149
E. 12. 4. Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12	150

E. 12. 5. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των συστατικών καθαρής πρόπολης που διαλύονται στο νερό εξαιτίας της παρουσίας της β-κυκλοδεξτρίνη	150
E. 13. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH)	151
E. 13. 1. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των PE ανάλογα με την προέλευση	151
E. 13. 2. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12	152
E. 13. 3. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ 2), σε σχέση με το χρόνο	152
E. 13. 4. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12	152
E. 14. Μελέτη της αναγωγικής δύναμης (PR: reducing power) με βάση την αναγωγική/αντιοξειδωτική δύναμη του σιδήρου (ferric reducing/antioxidant power: FRAP)	154
E. 14. 1. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των PE	154
E. 14. 3. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ 2) σε σχέση με το χρόνο	155
E. 14. 4. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12	155

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας ΣΤ. 1. Περιεκτικότητα της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη	158
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤ. 2. Περιεκτικότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης σε πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)	159

Σχήμα ΣΤ. 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος	163
Πίνακας ΣΤ. 3. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocaltaeu	163
Πίνακας ΣΤ. 4. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των δειγμάτων των συμπλόκων Σ4-Σ12 υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocaltaeu	164
Πίνακας ΣΤ. 5. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 σε υδατικό διάλυμα	164
Πίνακας ΣΤ. 6. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2 σε υδατικό διάλυμα, σε σχέση με το χρόνο, υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocaltaeu	165
ΣΤ. 3. 1. Μελέτη διαλυτότητας της πρόπολης	166
Πίνακας ΣΤ. 7. Προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών που περιέχονται υδατικό διάλυμα πρόπολης με β-CD μετά από παραμονή υπό ανάδευση στους 25 °C	166
Πίνακας ΣΤ. 8. Προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών που περιέχονται υδατικό διάλυμα πρόπολης με β-CD μετά από παραμονή υπό ανάδευση στους 35 °C	166
Πίνακας ΣΤ. 9. Προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών που περιέχονται υδατικό διάλυμα πρόπολης με β-CD μετά από παραμονή υπό ανάδευση στους 45 °C	167
Σχήμα ΣΤ. 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox	168
Πίνακας ΣΤ. 10. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα PE από διάφορες περιοχές στην Ελλάδα και στην Κύπρο, με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH	169
Πίνακας ΣΤ. 11. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων των συμπλόκων Σ4-Σ12	170
Πίνακας ΣΤ. 12. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ4-Σ12 σε υδατικό διάλυμα	170

Πίνακας ΣΤ. 13. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ2) σε υδατικό διάλυμα, σε σχέση με το χρόνο	171
Σχήμα ΣΤ. 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος	172
Πίνακας ΣΤ. 14. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης στα PE από διάφορες περιοχές στην Ελλάδα και στην Κύπρο	173
Πίνακας ΣΤ. 15. Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης των συμπλόκων Σ4-Σ12	173
Πίνακας ΣΤ. 16. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 σε υδατικό διάλυμα	174
Πίνακας ΣΤ. 17. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2 σε υδατικό διάλυμα, σε σχέση με το χρόνο	175
Πίνακας ΣΤ. 18. Περιεκτικότητα των συμπλόκων πρόπολης σε πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)	176
Πίνακας ΣΤ. 19. Συστατικά που περιέχονται στο σύμπλοκο πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνη και προσδιορίστηκαν με GC/MS	177
Πίνακας ΣΤ. 20. Απελευθέρωση συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων, με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων, σε διάφορους χρόνους (GC/MS)	179
Πίνακας ΣΤ. 21. Απελευθέρωση συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων, με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων (GC/MS)	181
Πίνακας ΣΤ. 22. Απελευθέρωση συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης Καλαβρύτων σε τροποποιημένο άμυλο, σε pH= 1,2, σε διάφορους χρόνους, (GC/MS)	183
Πίνακας ΣΤ. 23. Απελευθέρωση συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης Καλαβρύτων σε τροποποιημένο άμυλο, σε pH= 8, σε διάφορους χρόνους, (GC/MS)	184
Πίνακας ΣΤ. 24. 1. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο	185

Πίνακας ΣΤ. 24. 2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο, τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη Tween-80	186
Πίνακας ΣΤ. 24. 3. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο	187
Πίνακας ΣΤ. 24. 4. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης	188
Πίνακας ΣΤ. 24. 5. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης	189
Πίνακας ΣΤ. 24. 6. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/ζελατίνης τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη Tween-80	190

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ζ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Z. 1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη (Balsam)	191
Z. 2. Ποσοτική ανάλυση των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE)	192
Z. 3. Ανάλυση Ομαδοποίησης των PE από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου	196
Z. 4. Ποιοτική ανάλυση των συστατικών των PE από διάφορες περιοχές Ελλάδας και Κύπρου	198
Z. 5. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού συνολικού φαινολικού περιεχομένου, αντιοξειδωτικής δράσης και αναγωγικής δύναμης των PE	200
Z. 5. 1. Σύσχέτιση αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων με την ανάλυση μέσω GC-MS	204
Z. 6. Επιβεβαίωση της μικροενθυλάκωσης του PE στη β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο	206
Z. 6. 1. Μακροσκοπική εικόνα των συμπλόκων πρόπολης με β-κυκλοδεξτρίνη, τροποποιημένο άμυλο, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και ζελατίνη	207
Z. 6. 2. Μελέτη της σταθερότητας της πρόπολης	208
Z. 6. 2. 1. Μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων πρόπολης με τροποποιημένο άμυλο, β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο DSC	208

Z. 6. 2. 2. Μελέτη σταθερότητας της ακατέργαστης πρόπολης στο χρόνο	211
Z. 6. 3. Μελέτη εγκλεισμού PE (Καλάβρυτα) σε β- κυκλοδεξτρίνη (GC-MS)	213
Z. 6. 4. Μελέτη εγκλεισμού πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο (GC-MS)	217
Z. 6. 5. Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων εγκλεισμού αβιετικού οξέος, καμφερόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης, χρυσίνης με τη μέθοδο DSC	220
Z. 6. 5. 1. Μακροσκοπική εικόνα των συμπλόκων αβιετικού οξέος, καμφερόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης, χρυσίνης με τροποποιημένο άμυλο και β-κυκλοδεξτρίνη	220
Z. 6. 5. 2. Μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων με β-κυκλοδεξτρίνη, με DSC	220
Z. 6. 5. 2. 1. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου αβιετικού οξέος με β-κυκλοδεξτρίνη	220
Z. 6. 5. 2. 2. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου καμφερόλης με β-κυκλοδεξτρίνη	222
Z. 6. 5. 2. 3. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου καφεϊκού οξέος με β-κυκλοδεξτρίνη	223
Z. 6. 5. 2. 4. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου ναριγκενίνης με β-κυκλοδεξτρίνη	225
Z. 6. 5. 2. 5. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου χρυσίνης με β-κυκλοδεξτρίνη	226
Z. 6. 6. Μελέτη διαλυτότητας καθαρής πρόπολης	228
Z. 7. Μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συμπλόκων πρόπολης έναντι του <i>Staphylococcus aureus</i>	231
Z. 8. Διερεύνηση βέλτιστης αναλογίας μάζας πρόπολης:μέσο εγκλεισμού, μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων	235
Z. 8. 1. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων για τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4 - Σ 12	239
Z. 9. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη – Απομίμηση συνθηκών παρασκευής τροφίμου	241

Z. 9. 1. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων	242
Z. 9. 1. 1. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης /τροποποιημένου αμύλου (Σ2) σε υδατικό διάλυμα, σε σχέση με το χρόνο	242
Z. 9. 1. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ4-Σ12	244
Z. 9. 2. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, μέσω GC-MS	244
Z. 9. 2. 1. Μελέτη διαλυτότητας των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη	244
Z. 9. 2. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης /τροποποιημένου αμύλου (Σ2) σε υδατικό διάλυμα, σε σχέση με το χρόνο	245
Z. 9. 2. 3. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4 – Σ 12 σε υδατικό διάλυμα	248
Z. 9. 3. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου σε όξινο και αλκαλικό pH – Απομίμηση συνθηκών πεπτικού σωλήνα	251
Z. 9. 3. 1. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ2) σε pH= 1,2, σε σχέση με το χρόνο	252
Z. 9. 3. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ2) σε pH=8, σε σχέση με το χρόνο	253
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	256
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	263
SUMMARY	266
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	268
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	272

Στόχοι της ερευνητικής μελέτης

Η πρόπολη χρησιμοποιείται ευρέως στην εναλλακτική ιατρική, στην κοσμετολογία και στη βιομηχανία τροφίμων για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής, ποτών, στοματικών διαλυμάτων κ.α. Θεωρείται ότι εκδηλώνει ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού ενώ παράλληλα παρεμποδίζει την εκδήλωση νόσων όπως καρκίνου, καρδιαγγειακών, φλεγμονών (Banskota *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2007). Δεν παρουσιάζει παρενέργειες ενώ ενισχύει, συνήθως, και την επίδραση των συμβατικών φαρμάκων.

Η χημική σύνθεση της πρόπολης εμφανίζει σημαντική συσχέτιση με τη χλωρίδα της περιοχής από την οποία έχει συλλεχθεί. Η Ελληνική και Κυπριακή χλωρίδα παρουσιάζουν μεγάλη βιοποικιλότητα που οφείλεται στην αυξημένη παρουσία ενδημικών φυτών. Μέχρι σήμερα, έχει μελετηθεί η εκατοστιαία αναλογία των πτητικών ενώσεων που περιέχονται σε πρόπολη Ελληνικής προέλευσης, με βάση τη βόρεια και κεντρική Ελλάδα (Χαλκιδική, Άνδρος, Αγρίνιο, Άρτα, Πρέβεζα) (Melliou & Chinou, 2006).

Παρόλα αυτά, δεν έχει διερευνηθεί η ποιοτική και ποσοτική σύσταση δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές στην Ελλάδα (Καρδίτσα, Μεσσηνία, Πελοπόννησο, Κρήτη, Τήνο, Σκόπελο), ενώ η χημική σύσταση δειγμάτων πρόπολης από την Κύπρο δεν έχει μελετηθεί καθόλου.

Με βάση τα όσα έχουν αναφερθεί, ένας από τους βασικούς στόχους της ερευνητικής μελέτης, ήταν ο χαρακτηρισμός δειγμάτων πρόπολης από περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου, που πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά, μέσω ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των συστατικών που περιέχονται στα δείγματα με τη χρήση της μεθόδου αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS) και η συγκριτική παράθεση των συγκεντρώσεων των κυριότερων πολυφαινολών ανάλογα με την προέλευση.

Επιπλέον στόχο αποτέλεσε επίσης ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων αυτών, με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

Η πρόπολη είναι ένα προϊόν που περιέχει υδρόφοβα συστατικά και έχει σχετικά δυσάρεστη οσμή και γεύση. Επομένως, μέσω της παρασκευής συμπλόκων πρόπολης με β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, τροποποιημένο άμυλο και ζελατίνη, εξασφαλίζεται η δυνατότητα ενσωμάτωσης σε υδατικά διαλύματα και διάφορα τρόφιμα αφού με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται και απόσπηση. Μέσω του εγκλεισμού στις διάφορες δομές διασφαλίζονται επίσης οι ευεργετικές επιδράσεις και θεραπευτικές ιδιότητες της πρόπολης (αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, επουλωτικές κ.α.) και παρέχεται η δυνατότητα εκμετάλλευσής της, κατά βάση από τις βιομηχανίες τροφίμων, προς παραγωγή λειτουργικών και καινοφανών τροφίμων. Επομένως η παρασκευή συμπλόκων και η επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της πρόπολης, καθώς και η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της πρόπολης μετά την ενσωμάτωση στις δομές της β-κυκλοδεξτρίνης, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης και του τροποποιημένου αμύλου, αποτέλεσαν τα κύρια σημεία εστίασης κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής έρευνας. Επίσης, για τον έλεγχο του εγκλεισμού των συστατικών του εκχυλίσματος πρόπολης, μελετήθηκε η ενθυλάκωση μεμονωμένων συστατικών της πρόπολης (αβιετικό οξύ, καμφερόλη, καφεϊκό οξύ, ναριγκενίνη, χρυσίνη) στις δομές της β-κυκλοδεξτρίνης και του τροποποιημένου αμύλου. Ένα ακόμη στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση της βέλτιστης αναλογίας (α) συγκεντρώσεων πρόπολης και (β) μέσου ενθυλάκωσης για την παρασκευή του συμπλόκου.

Η πρόπολη θεωρείται μια σύνθετη φυσική πηγή για τον έλεγχο και την αναστολή της δράσης των μικροοργανισμών. Επομένως η μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας που επιδεικνύει η εγκλεισμένη πρόπολη στις δομές της β-κυκλοδεξτρίνης, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, τροποποιημένου αμύλου και ζελατίνης, έναντι του *Staphylococcus aureus*, είχε εξαιρετικό ενδιαφέρον, όχι μόνο για την έμμεση διερεύνηση της επίτευξης εγκλεισμού, αλλά και για την αναζήτηση του βέλτιστου μέσου ενθυλάκωσης ως προς τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας και τη συσχέτιση της δραστηριότητας με την αντιοξειδωτική ικανότητα που εκδηλώνουν τα σύμπλοκα.

Η πρόπολη αποτελεί μια πολύ σταθερή ουσία ως έχει, επομένως η μικροενθυλάκωσή της στις παραπάνω υδρόφιλες ενώσεις μπορεί να μην έχει ως αποτέλεσμα περεταίρω αύξηση της σταθερότητάς της. Με το μηχανισμό αυτό όμως, τα παραγόμενα σύμπλοκα θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά

συντηρητικά που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή τροφίμων για την αύξηση του χρόνου ζωής και αποθήκευσής του.

Για τον σκοπό αυτό, μελετήθηκε η απελευθέρωση των εγκλεισμένων συμπλόκων σε σχέση με τον χρόνο, σε υδατικό διάλυμα, που αποτελεί το περιβάλλον παρασκευής των περισσότερων τροφίμων στα οποία μπορεί να ενσωματωθεί η πρόπολη, με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε αντιοξειδωτικές ενώσεις (πολυφαινόλες) όπως χυμοί, ενώ προσδιορίστηκε επίσης και το αυξημένο πολυφαινολικό περιεχόμενου εις βάθος χρόνου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα περισσότερα συστατικά του εκχυλίσματος της πρόπολης είναι βιοδραστικά, ένας επιπλέον στόχος ήταν και η μελέτη της απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων συστατικών της πρόπολης, σε συνθήκες που προσομοιάζουν το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα, ώστε να διερευνηθεί ο χρόνος και το σημείο απελευθέρωσης, με βάση το pH, στον πεπτικό σωλήνα, μετά από κατανάλωση τροφίμου εμπλουτισμένου με πρόπολη. Συγκεκριμένα για την μελέτη της απελευθέρωσης επιλέχθηκε απελευθέρωση σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=1,2 για την απομίμηση των συνθηκών του στομάχου και ρυθμιστικό διάλυμα με pH=8 για την απομίμηση των συνθηκών του εντέρου.

Κεφάλαιο Α

ΠΡΟΠΟΛΗ

Α. 1. Εισαγωγή

Η λέξη «πρόπολη» (propolis) ετυμολογικά σημαίνει «προ της πόλεως». Οι μέλισσες τη χρησιμοποιούν υπό μορφή επικάλυψης, σαν γενική μορφή προστασίας. Εξυπηρετεί στο να καλύπτει όλες τις τρύπες και τα κενά, που έχει μέσα η κυψέλη. Επιτρέπει όχι μόνο να επιδιορθωθούν οι καταστροφές εντός της κυψέλης, αλλά επίσης στους ψυχρούς ή πολύ θερμούς τόπους μειώνει το μέγεθος της εισόδου της, έτσι ώστε να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό η πρόσβαση κρύου ή θερμού αέρα και των δυνητικών εχθρών. Επίσης εξυπηρετεί στο να καθυστερεί την εξέλιξη των ασθενειών, λειτουργώντας, ως μέσο προφύλαξης για τις εργάτριες μέλισσες στην είσοδο της κυψέλης. Ως εκ τούτου προσφέρει μια «μπάρα προστασίας» σε βακτήρια και ιούς. Η χρήση της πρόπολης έχει θεμελιώδη σημασία στην αποικία των μελισσών, αν αναλογισθούμε ότι στην κυψέλη, σε 50 λίτρα χώρο, ζουν 40.000 με 50.000 μέλισσες και σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 35-38 °C, με την αντίστοιχη υγρασία να βρίσκεται στο 70% και με την υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη, δηλαδή ιδεώδεις συνθήκες για μικροβιακή ανάπτυξη (Burdock, 1998).

Ήδη από την αρχαιότητα παρατηρήθηκε ότι οι μέλισσες, θανατώνουν ζώα (ποντίκια, βατράχια κ.α.), τα οποία είχαν εισχωρήσει μέσα στην κυψέλη τους και στη συνέχεια τα σκεπάζουν με ένα ειδικό ρητινώδες υλικό, με αποτέλεσμα το πτώμα του θανατωμένου ζώου να μένει άφθαρτο στο πέρασμα του χρόνου, σαν μούμια. Με τον τρόπο αυτό το μελίσι αποτρέπει την εμφάνιση δυσοσμίας και την ανάπτυξη βακτηριακής χλωρίδας, που συνοδεύουν τη σήψη του πτώματος του εισβολέα.

Στις παλιές γραφές, η πρόπολη ονομαζόταν «μαύρο κερί». Οι Έλληνες, οι Πέρσες οι Ρωμαίοι, οι Αιγύπτιοι, οι Άραβες και οι Ίνκας τη χρησιμοποιούσαν για τις βιολογικές της ιδιότητες. Ο Ιπποκράτης συνιστούσε την επάλειψη με πρόπολη για την επούλωση των πληγών. Στη Ρώμη, όπου μια ολόκληρη εποχή ήταν αφιερωμένη στη μέλισσα και στα προϊόντα της, η πρόπολη πουλιόταν πιο ακριβά από το μέλι. Κάθε Ρωμαίος

λεγεωνάριος την είχε μαζί του κατά τη διάρκεια των στρατιωτικών εκστρατειών. Ακόμη, στους πολέμους, τη χρησιμοποιούσαν για τη θεραπεία κατά της γάγγραινας. Πλήθος άλλων εφαρμογών έχουν αναφερθεί, για παράδειγμα ότι, ο Stradivarius ενσωμάτωνε πρόπολη στο βερνίκι του βιολιού του, γνωρίζοντας ότι ήταν καλό προστατευτικό του ξύλου. Για τους Αιγυπτίους, η μέλισσα είχε μεγάλη θρησκευτική σημασία και συμβόλιζε τη γενναιότητα, ενώ στη Μινωική εποχή τη γονιμότητα, με το γνωστό σήμα της μέλισσας των Μαλλίων. Η πρόπολη χρησιμοποιούνταν στην θεραπευτική από τους ιερείς, σε μεγάλη ποικιλία ασθενειών καθώς επίσης στην ταρίχευση πτωμάτων. Ο διάσημος ιατροφιλόσοφος Αβικένας, τον 11^ο αιώνα είχε παρατηρήσει ότι η πρόπολη δρα αποτελεσματικά στους τραυματισμούς από βέλη τόξων κατά τη διάρκεια πολεμικών επιχειρήσεων. Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, στη Ρωσία και στη Γερμανία, η αγορά ήταν γεμάτη από πρόπολη. Ήταν γνωστή για τη χρήση της στη θεραπεία των μολύνσεων και για την επούλωση πληγών, όπως επίσης και ως αντιφλεγμονώδες, με τη μορφή αλοιφής και εμπλάστρου.

Κατά τα τέλη του 19^{ου} με τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, οι φαρμακευτικές ιδιότητες των παραπάνω προϊόντων είχαν ξεχαστεί. Μέχρι το 1960 δεν υπάρχει καμιά αναφορά στην πρόπολη σε φαρμακευτικά εγχειρίδια (Januzzi 1993).

Οι σημερινές χρήσεις της πρόπολης στην ιατρική έχουν μεταφερθεί στις μέρες μας από γενιά σε γενιά. Τις τελευταίες δεκαετίες στην Ανατολική Ευρώπη, Ασία και κυρίως στην Ιαπωνία, η σύγχρονη ιατρική κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η πρόπολη πρέπει να πάρει τη θέση που της αξίζει, όπως αποδείχτηκε μετά από πολυετή έρευνα (Χαριζάνης, 1992; Januzzi, 1993).

A. 2. Προέλευση

Υπάρχουν δυο θεωρίες για την προέλευση της πρόπολης. Σύμφωνα με τον Kuestenmacher (1912), η πρόπολη αποτελεί προϊόν των μελισσών και είναι το υπόλοιπο της γύρης που το μετατρέπουν σε ένα είδος ρητίνης, εμπλουτισμένο με διάφορα ένζυμα και βιολογικά προϊόντα του στομάχου τους.

Σύμφωνα με τη θεωρία του Resch (1927), οι μέλισσες συλλέγουν την πρώτη ύλη για τη σύνθεση της πρόπολης από τους οφθαλμούς, την επιφάνεια των καρπών, το φλοιό

των φυτών και τα άνθη. Αυτό το υλικό λέγεται «χυμός των φυτών», «βλέννα», «προστατευτική έκκριση» ή «έκκριση οφθαλμών». (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).

Η σημερινή άποψη συνδυάζει και τις δυο θεωρίες. Οι μέλισσες κυρίως παράγουν την πρόπολη, ξεκινώντας από φυτικές ρητίνες που εκκρίνονται από τους οφθαλμούς των φυτών και από το φλοιό ορισμένων δέντρων, κυρίως από τις λεύκες, τα κωνοφόρα και την ιτέα. Συλλέγουν τις ρητίνες, τις οποίες προσροφούν και αναμειγνύουν με τα ένζυμα της σιέλου τους. Αφού τη μεταφέρουν μέσα στην κυψέλη, με τις τρίχες των ποδιών τους, επικαλύπτουν τα εσωτερικά και εξωτερικά μέρη της κυψέλης με την πρόπολη, η οποία ισχυροποιεί την αποικία των μελισσών και της παρέχει ένα υγιέστερο περιβάλλον. Ακόμη, η μέλισσα αλείφει το σώμα της με αυτή την ουσία, για να προστατέψει τον εαυτό της από τους φυσικούς εχθρούς (Χαριζάνης, 1992; Januzzi, 1993).

A. 3. Συλλογή υλικού από τις μέλισσες

Έχει παρατηρηθεί ότι οι μέλισσες ξύνουν τις προστατευτικές ρητίνες από τα άνθη και τους οφθαλμούς με τις σιαγόνες τους και τις τοποθετούν σε υποδοχές των πίσω ποδιών τους. Κατά τη διαδικασία αυτή οι ρητίνες αναμειγνύονται με το σάλιο του στόματός τους και άλλες εκκρίσεις τους, όπως και με κερί και γύρη. Η διαδικασία απόσπασης παίρνει αρκετό χρόνο ενώ το πακετάρισμα διακόπτεται από επισκέψεις στην κυψέλη όχι για μεταφορά της αλλά για γεύματα εάν δεν υπάρχει τροφή στο μέρος όπου συλλέγεται. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει μια κολλώδης ουσία, η οποία μεταφέρεται στην κυψέλη.

Όταν η μέλισσα τελικά πετά προς την κυψέλη φορτωμένη με την πρόπολη ίσως περάσουν ώρες μέχρι να την ξεφορτώσει περιμένοντας σε απομακρυσμένο μέρος της κυψέλης τις άλλες μέλισσες για να την ξεφορτώσουν.

Το είδος της μέλισσας που συλλέγει το υλικό από το οποίο παράγεται η πρόπολη είναι η μέλισσα *Apis mellifera*. Τα Ασιατικά είδη *Apis* δεν παράγουν πρόπολη (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).

A. 4. Η χρήση της πρόπολης από τις μέλισσες

Όπως προαναφέρθηκε, η πρόπολη δεν επιτρέπει την ανάπτυξη μικροβίων και δυσοσμίων. Οι μέλισσες τη χρησιμοποιούν για να επιχρίουν τα εσωτερικά τοιχώματα της κυψέλης. Επιχρίουν, επίσης, τα κελιά των κηρηθρών μετά την εκκόλαψη των μελισσών για να τα αποστειρώσουν, ώστε αυτά να είναι έτοιμα, για την ωοτοκία της Βασίλισσας. Ακόμη, οι μέλισσες επιχρίουν το εσωτερικό των κελιών με ελαιώδες επίχρισμα που συλλέγουν από τη γύρη, γνωστό ως βάλσαμο γύρης (pollenbalsam).



Εικόνα 1: Οι μέλισσες χρησιμοποιούν συχνά τη πρόπολη για να μειώσουν το μέγεθος της εισόδου στις κερήθρες, ώστε να αμύνονται καλύτερα.

A. 5. Παραλαβή και παραγωγή

Η πιο παλιά αλλά και επίπονη μέθοδος συλλογής της πρόπολης, που χρησιμοποιείται όμως ακόμη και σήμερα, είναι η απόξεση μικρών κομματιών της κολλητικής αυτής ουσίας από οποιοδήποτε σημείο της κυψέλης. Ο μελισσοκόμος συλλέγει την πρόπολη ξύνοντας εσωτερικά τοιχώματα κυψελών, καπάκια και πλαίσια, όπου την εναποθέτουν. Η συλλογή γίνεται μόνο σε ζεστό καιρό όταν αυτή είναι εύπλαστη, γι' αυτό είναι προτιμότερο η συλλογή να γίνεται το καλοκαίρι. Μεταξύ των μελισσών του ίδιου μελισσοκομείου παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στην ποσότητα

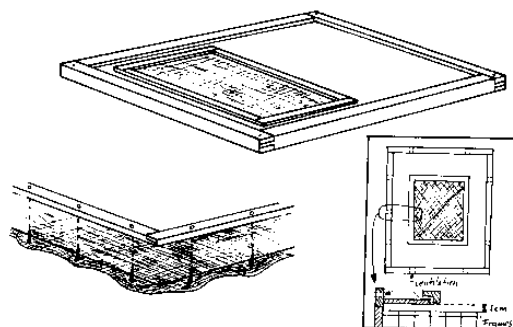
συλλογής και αυτό δίνει τη δυνατότητα στο μελισσοκόμο να επιλέξει τα μελίσσια εκείνα τα οποία θα χρησιμοποιήσει για τη συλλογή.

Οι μέλισσες έχουν την τάση να καλύπτουν εκτός από τα τοιχώματα και τα καπάκια, κάθε ανεπιθύμητο σώμα, που θα εισέλθει στην κυψέλη. Εκμεταλλευόμενοι αυτή την ιδιότητα των μελισσών, οι μελισσοκόμοι τοποθετούν πλαστικό πλέγμα στο επάνω μέρος των πλαισίων, το οποίο καλύπτεται από τις μέλισσες με πρόπολη, και αργότερα το μαζεύουν. Στη συνέχεια, το τοποθετούν στην κατάψυξη, όπου ψύχεται, και κατόπιν τινάζουν το πλαίσιο, από το οποίο παραλαμβάνουν καθαρή πρόπολη (Warren, 1990).



Εικόνα 2. Πλέγμα που χρησιμοποιείται για τη συλλογή της πρόπολης

Εκτός από τα διάφορα πλέγματα υπάρχουν και ξύλινες ή πλαστικές παγίδες συλλογής της πρόπολης. Η περισσότερο διαδεδομένη παγίδα στην Αμερική είναι μια ξύλινη κατασκευή με πλάτος 8,9 εκατοστά και μήκος όσο το μήκος της κυψέλης. Η παγίδα αυτή έχει 8 επιμήκειες σχισμές, τοποθετείται με βίδες στην πλευρά του γονοθαλάμου, σε κυψέλη που προηγούμενα είχε αποσπασθεί το αντίστοιχο κομμάτι ξύλου. Η παγίδα αυτή γεμίζει σε χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων περίπου και η απόδοσή της είναι από 15-20 γραμμάρια όταν γεμίσουν όλες οι σχισμές. Μειονεκτήματα της παγίδας αυτής είναι η ανάμειξη της πρόπολης με τεμαχίδια από ξύλο και η αναγκαστική κοπή μέρους της κυψέλης για την τοποθέτηση της παγίδας (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).



Εικόνα 3. Παγίδες που χρησιμοποιούνται στη συλλογή πρόπολης

Στην αγορά σήμερα υπάρχει πληθώρα κατασκευών που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή πρόπολης. Ο μελισσοκόμος πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα ακόλουθα:

1. Οι πλαστικές παγίδες είναι καλύτερες επειδή είναι εύκαμπτες και μπορούν να τοποθετηθούν στο ψυγείο. Το υλικό κατασκευής τους δεν πρέπει να αφήνει υπολείματα στην πρόπολη.
2. Η ξύλινη παγίδα πρόπολης είναι αρκετά σκληρή με αποτέλεσμα ακίδες από ξύλο να ενσωματώνονται στη πρόπολη.
3. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται λαδομπογιά στις παγίδες γιατί οι μέλισσες αναμιγνύουν τη πρόπολη με αυτήν.
4. Η παγίδα πρέπει να τοποθετείται προς τη βόρεια πλευρά της κυψέλης.
5. Η παγίδα πρέπει να εφαρμόζει ακριβώς στην κυψέλη ώστε οι μέλισσες να μην την χρησιμοποιούν σαν πέρασμα.

Μετά την συλλογή της, η πρόπολη πλάθεται σε μικρές μπάλες και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος. Με αυτό τον τρόπο η πρόπολη διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσει τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Η συνολική ποσότητα πρόπολης στην κυψέλη κυμαίνεται μεταξύ 150 και 300 γραμμαρίων ανά μελισσοκομική περίοδο (Χαριζάνης, 1992; Januzzi, 1993).

A. 6. Επεξεργασία της πρόπολης

Η πρόπολη λόγω της χρήσης της ως φαρμακευτική ουσία θα πρέπει να περάσει από μια σειρά διαδικασιών, ώστε να διασφαλιστεί τόσο η χρησιμότητα όσο και η μη τοξικότητα στον άνθρωπο.

Βήμα 1: Απομάκρυνση ξένων σωματιδίων. Το πιο σημαντικό στάδιο κατά την προετοιμασία της πρόπολης για πώληση είναι ο καθαρισμός και η απομάκρυνση των κομματιών πέτρας, ακίδων ξύλου, τμημάτων εντόμων, κομματιών κεριού, λαδομπογιás και άλλων ξένων ουσιών. Αρχικά τα ξύσματα χωρίζονται και ταξινομούνται ανάλογα με την καθαρότητά τους. Στη συνέχεια τοποθετούνται σ' ένα δοχείο με κρύο νερό ανακατεύονται και απομακρύνονται οι ξένες ύλες, οι οποίες επιπλέουν στην επιφάνεια. Το πλύσιμο αυτό γίνεται επανειλημμένα με νερό μέχρι το νερό να γίνει εντελώς καθαρό. Έπειτα τα υπολείμματα ξηραίνονται και κάθε κομμάτι πρόπολης εξετάζεται προσεκτικά μήπως περιέχει κάποιο ξένο υλικό (Χαριζάνης, 1992).

Βήμα 2: Απομάκρυνση κηρών από την πρόπολη. Αξιολογείται το υλικό και αν περιέχει αυξημένες ποσότητες κεριού, θα πρέπει να καθαριστεί με κρύο νερό και ακολούθως το εξωτερικό κερί να αφαιρεθεί. Οι μη-υδατοδιαλυτές ουσίες, επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού και απομακρύνονται. Στη συνέχεια η καθαρή πρόπολη τοποθετείται σε βραστήρα με διπλά τοιχώματα με νερό όπου η στάθμη βρίσκεται 5 εκατοστά πάνω από την επιφάνεια της πρόπολης. Το περιεχόμενο θερμαίνεται στους 70°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 2-3 λεπτά, το δοχείο μετακινείται και αφήνεται να κρυώσει. Το κερί που έχει λιώσει, σχηματίζει κρούστα στην επιφάνεια και αφαιρείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να απαλλαγεί η πρόπολη από όλο το κερί που περιείχε.

Βήμα 3: Συσκευασία και διατήρηση της πρόπολης. Η πρόπολη μετά τον καθαρισμό της από ξένες ύλες ξηραίνεται και υποβάλλεται σε ένα τελευταίο έλεγχο για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων. Τα μεγάλα κομμάτια πρόπολης μπορούν να σπάσουν αφού διατηρηθούν στο ψυγείο για όλη τη νύχτα. Στην συνέχεια συσκευάζεται πρώτα σε πλαστικές σακούλες οι οποίες αργότερα τοποθετούνται σε βάζα και διατηρείται σε ξηρό και δροσερό περιβάλλον μέχρι να χρησιμοποιηθεί ή να διατεθεί. Η πρόπολη δεν θα

πρέπει να τοποθετείται απ' ευθείας σε περιέκτες με πολύ σκληρό περιτύλιγμα (Jannuzzi, 1983).

Βήμα 4: Παρασκευή διαλύματος πρόπολης («βάμμα» πρόπολης). Πρόπολη από την οποία απομακρύνθηκε το κερί με την παραπάνω διαδικασία, ξαναθερμαίνεται μέχρι να σχηματιστεί πηχτό σιρόπι. Στη συνέχεια προστίθεται ίση ποσότητα αιθανόλης με συνεχή ανάδευση. Όταν το μίγμα είναι έτοιμο, φιλτράρεται για να ληφθεί το «βάμμα» πρόπολης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προσωπική χρήση (Burdock, 1998; Χαριζάνης, 1992).

Γενικά η πρόπολη διατηρείται σε ερμητικώς κλειστά βάζα, μακριά από το φως και την υψηλή θερμοκρασία. Η χρήση της όταν είναι φρέσκια, μας βοηθάει στο να επωφεληθούμε το μέγιστο των ιδιοτήτων της.

Η πρόπολη, επίσης, μπορεί να κονιοποιηθεί και να φυλαχθεί στο ψυγείο ως σκόνη. Η διαδικασία αυτή γίνεται καλύτερα με αναμείκτη, στη συνέχεια απαιτείται καλό κοσκίνισμα από λεπτή σίτα, αναμειγνύεται με απλή βάση πούδρας σε αναλογία 1:2 για να δώσει τη πρόπολη-πούδρα, η οποία χρησιμοποιείται στις πληγές (Χαριζάνης, 1992).



Εικόνα 4. Δείγμα ακατέργαστης πρόπολης

A. 7. Αποθήκευση

Αν και η πρόπολη είναι σχετικά σταθερή ουσία, η σωστή αποθήκευσή της είναι κρίσιμης σημασίας. Τόσο η πρόπολη όσο και τα εκχυλίσματά της θα πρέπει να φυλάσσονται σε αεροστεγή δοχεία στο σκοτάδι σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C-12°C, μακριά από πηγές θερμότητας. Μέσω της σωστής συντήρησης η πρόπολη μπορεί να διατηρείται για περισσότερο από 12 μήνες, χωρίς να χάνει τις περισσότερες

αντιβακτηριακές ιδιότητες που εκδηλώνει. Αναφέρεται επίσης ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα μπορούν να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Μέσω της λυοφιλίωσης του εκχυλίσματος πρόπολης, αναφέρεται ότι διατηρούνται τα χαρακτηριστικά αντιβακτηριακής δράσης, όμως δεν έχει διερευνηθεί πλήρως η επίδραση της μακροπρόθεσμης αποθήκευσης.

Η διάρκεια ζωής των προϊόντων που περιέχουν πρόπολη, εξαρτάται από τη χημική τους σύνθεση και θα πρέπει να προσδιορίζεται σε κάθε περίπτωση. Όσο πιο επιδεκτικά στην αποσύνθεση ή οξείδωση είναι τα υπόλοιπα συστατικά (πλην αυτών της πρόπολης), τόσο μικρότερη διάρκεια ζωής θα έχει και το προϊόν. Παρόλα αυτά η πρόπολη και τα εκχυλίσματά της μπορούν να δράσουν ως ήπια συντηρητικά εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους και έτσι μπορεί να αυξήσουν το χρόνο ζωής των προϊόντων αυτών (FAO, 2007)

A. 8. Ποιοτικός έλεγχος

Δεν υπάρχουν ακριβείς συστάσεις για τον ποιοτικό έλεγχο της πρόπολης κυρίως εξαιτίας της ποικιλίας στο χρώμα, οσμή και σύνθεση. Τα περισσότερα φρέσκα δείγματα πρόπολης διαθέτουν ένα ευχάριστο άρωμα. Αναφέρεται ότι το περιεχόμενο σε κηρούς καθώς και εμφανή ξένα σώματα θα πρέπει να περιορίζονται στο ελάχιστο.

Επίσημες συστάσεις για την ποιότητα της πρόπολης υπάρχουν σε πολλές χώρες της ανατολικής Ευρώπης (Ρουμανία και Πρώην Σοβιετική Ένωση) (Crane, 1990), αλλά τα περισσότερα κριτήρια αφορούν στην καθαρότητα και τη νόθευση του ακατέργαστου προϊόντος και σε μερικές περιπτώσεις, των εκχυλισμάτων. Επίσης έχουν τεθεί μέγιστα και ελάχιστα όρια για συγκεκριμένες χημικές ομάδες, όμως υπάρχουν πολύ λίγες τυποποιημένες δοκιμές για τον προσδιορισμό των βιολογικών δράσεων των διάφορων συστατικών. Οι Tikhonov *et al.* (1978) αναφέρουν ότι οι μέσες συγκεντρώσεις των κύριων συστατικών της πρόπολης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά πρότυπα σύγκρισης για την ακατέργαστη πρόπολη (**Πίνακας 1**).

Ποικίλες βακτηριολογικές δοκιμές μπορούν να διεξαχθούν και τα αποτελέσματά τους συγκρίνονται με αυτά πρότυπων δειγμάτων με γνωστή προέλευση και γνησιότητα. Αυτές οι δοκιμές όμως δεν μπορούν να ανιχνεύσουν όλες τις ευεργετικές ιδιότητες της πρόπολης. Καμιά από αυτές τις δοκιμές δεν έχει γίνει ευρέως αποδεκτή ως έγκυρη αξιολόγηση της ολικής ποιότητας της πρόπολης ή των εκχυλισμάτων της (FAO, 2007).

Πίνακας 1. Περιεκτικότητα πρόπολης σε διάφορα συστατικά μετά από εισήγηση των Tikhonov *et al.*, (1978) και ανώτατα και κατώτερα όρια όπως έχουν εγκατασταθεί από τα Russian Regional Standards (RSFSR, 1977).

Ποιοτικός Έλεγχος	Περιεκτικότητα +/- SD (Tikhonov <i>et al.</i> , 1978)	Περιεκτικότητα +/- SD (RSFSR, 1977)
Ενώσεις που μπορούν να υποστούν εκχύλιση	21,93 % +/- 2,22	-
Βαθμός οξείδωσης	17,08 % +/- 5,52	< 22,0%
Ρητίνες – αρωματικές ενώσεις	46,18 % +/- 1,15	-
Κεριά	27,11% +/- 7,68	< 30,0%
Πολυφαινόλες	14,66 % +/- 2,34	> 20,0%
Πολυσακχαρίτες	2,26 % +/- 0,32	-
Αριθμός Ιωδίου	-	> 35,0

(πηγή FAO, 2007).

A. 9. Μειονεκτήματα πρόπολης

Εκτός από τα πλεονεκτήματα που αναφέρονται παρακάτω και θα εξεταστούν στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, υπάρχουν μερικά μειονεκτήματα στη χρήση της πρόπολης. Αυτά είναι η έντονη και δυσάρεστη γεύση και οσμή καθώς και η υψηλή

συγκέντρωση αιθανόλης, όταν παρασκευάζεται το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης, που αποτελεί την κυριότερη και πιο εύχρηστη μορφή διαλύματος. Τα μειονεκτήματα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα δυσκολίες στη φύλαξη, τη μεταφορά και τη μετατροπή σε άλλη μορφή για επεξεργασία (Burdock, 1998).

A. 10. Τα χαρακτηριστικά μιας καλής ποιότητας πρόπολης

Μια χρήσιμη και καλής ποιότητας πρόπολη πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Να είναι φρέσκια, όχι μεγαλύτερη των 2 ετών.
2. Να είναι καθαρή.
3. Να μην περιέχει ξένα σώματα, όπως ξύλα, μπογιές κυψελών, πίσσα, κτλ.
4. Να περιέχει ρητίνες

Ο μελισσοκόμος μπορεί εύκολα να ελέγξει τους 3 πρώτους παράγοντες. Η περιεκτικότητα όμως σε ρητίνες εξαρτάται τόσο από τις μέλισσες όσο και από άλλους ανεξάρτητους παράγοντες όπως: η τοποθεσία, η εποχή και το είδος των δένδρων. Η ρητίνη αποτελεί το βασικό συστατικό των ιατρικών παρασκευασμάτων γι' αυτό όσο ψηλότερη είναι, τόσο καλύτερη είναι η ποιότητα της πρόπολης (Januzzi, 1993).

A. 11. Χημική σύνθεση της πρόπολης

Η σύνθεση της πρόπολης διαφέρει, ανάλογα με την βοτανική και γεωγραφική της προέλευση καθώς και από την εποχή συλλογής της. Ωστόσο είναι εύκολο να αναγνωριστούν ορισμένα από τα 150 διαφορετικά συστατικά, όπως πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους), τερπενοειδή, στεροειδή και αμινοξέα. Μερικές από τις βιολογικές της ιδιότητες που παρατηρούνται, πιθανόν να αποδίδονται σε χημικά συστατικά που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και σχετίζονται με την υψηλή περιεκτικότητα της πρόπολης σε φλαβονοειδή.

Αξίζει να σημειωθεί η παρουσία πάνω από 40 φλαβονοειδών, αλειφατικών αρωματικών οξέων, φαινολικών στοιχείων, αρωματικών αλδεϋδών, αμινοξέων, σακχάρων και πολλών βιταμινών.

Συγκεκριμένα, οι κύριες κατηγορίες ενώσεων που περιέχονται στη πρόπολη, ως ποσοστιαία αναλογία είναι τα ακόλουθα:

- 50 με 55% πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα και εστέρες τους)
- 20 με 35% κηροί (ένα μίγμα από πράσινο κερί φυτικής προέλευσης, και το προστιθέμενο κερί των μελισσών) και λιπαρά οξέα
- 2 με 10% αιθέρια έλαια
- 5% γύρη (πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα)
- 5% από άλλες, οργανικές ουσίες και ιχνοστοιχεία (**Πίνακας 2**).

Η πιο χαρακτηριστική χημική σύσταση πρόπολης είναι αυτή της "*propolis*" δηλαδή προερχόμενης από λεύκες, η οποία περιέχει κυρίως: πινοσεμπρίνη, πινομπανκσίνη και τον 3-Ο-αίθυλ-εστέρα της, χρυσίνη, γκαλαγκίνη, πρενυλιωμένους εστέρες του καφεϊκού και φερουλικά οξέα (Bankova, 2002).

Πίνακας 2. Χημική σύνθεση πρόπολης

Τάξη Συστατικών	Κατηγορία- Ομάδα	Περιεκτικότητα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Πολυφαινόλες	Φλαβονοειδή	45 – 55 %	Bankova et al., 1987- Βουλγαρία Omar, 1989- Αίγυπτος
	Φαινολικά οξέα και εστέρες		Nagy et al., 1985- Ουγγαρία Bankova et al., 1992- Βουλγαρία, Μογγολία.
Κηροί	Λιπαρά Οξέα Τα περισσότερα προέρχονται από το κερί των μελισσών, αρκετά όμως έχουν φυτική προέλευση	25 – 35 %	Papay et al., 1987 – Ουγγαρία
Αιθέρια Έλαια	Πτητικά συστατικά	10 %	Petri et al., 1988- Ουγγαρία
Γύρη	Πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα (αα)	5 % 16 αα περιέχονται σε συγκέντρωση >1% των ολικών αα από τα οποία η αργινίνη και η προλίνη αποτελούν το 45,8 % της σύστασης	Gabrys et al., 1986- Πολωνία

Τάξη Συστατικών	Κατηγορία- Ομάδα	Περιεκτικότητα	Βιβλιογραφικές αναφορές
		και 8 από αυτά ανευρίσκονται σε ίχνη	
Άλλα μέταλλα και οργανικά συστατικά	14 ιχνοστοιχεία από τα οποία τα πιο κοινά είναι ο Fe και Zn ενώ περιέχονται επίσης: Au, Ag, Cs, Hg, La, Sb	5 %	Scheller et al., 1989 – Πολωνία
	Κετόνες		
	Λακτόνες		Bankova et al., 1987- Βουλγαρία
	Κινόνες		Cuellas and Rojas, 1987- Κούβα
	Στεροειδή		Cuellas and Rojas, 1987- Κούβα
	Βενζοϊκά οξέα και εστέρες		Cuellas and Rojas, 1987- Κούβα
	Βιταμίνες		Greenway et al., 1987- Ηνωμένο Βασίλειο
	Σάκχαρα		Greenway et al., 1987- Ηνωμένο Βασίλειο

(πηγή FAO, 2007)

Σε όλους τους τύπους πρόπολης ως βασικές ουσίες ανευρίσκονται οξέα και ακόρεστες ενώσεις και η αναλογία τους μεταβάλλεται ανάλογα με την περιοχή, την εποχή και τη φυλή της μέλισσας. Η μέθοδος προσδιορισμού της αναλογίας αυτής αποτελεί έλεγχο ποιότητας μέσω της οποίας είναι δυνατό να διαπιστωθούν τόσο οι περιπτώσεις νοθείας στη σύσταση όσο και μολυσματικές βλαβερές ουσίες για τον άνθρωπο (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).

Οι κυριότερες ενώσεις, με πιθανό ενδιαφέρον σε θέματα υγείας, που έχουν ανιχνευθεί σήμερα στην πρόπολη είναι:

- **Αμινοξέα:** έχει ανιχνευθεί το πυρογλουταμινικό οξύ
- **Αλειφατικά οξέα και εστέρες τους:** έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 22 οξέα (βουτυρικό οξύ, παλμιτικό οξύ, στεατικό οξύ, ελαϊκό οξύ, φουμαρικό οξύ, λινελαϊκό οξύ, ισοβουτυρικό οξύ, ακετοξικό οξύ, μυριστικό οξύ, λιγνοκερικό

οξύκ.α.). Τα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας προέρχονται από το κερί ενώ τα μικρής αλυσίδας και οι εστέρες τους από τη ρητίνη.

• **Αρωματικά οξέα και οι εστέρες τους:** ανιχνεύθηκαν πάνω από 40 ενώσεις οι οποίες περιέχονται στις ρητίνες (βενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ κ.α.). Αρκετά εμφανίζουν μυκητοκτόνες και βακτηριοκτόνες δράσεις.

• **Αλκοόλες:** ανιχνεύθηκαν οι υδροκινόνη, βενζυλική αλκοόλη, πρενυλική αλκοόλη, ισοβουτενόλη, φαιναιθύλ- αιθανόλη, α και β- γλυκεροφωσφατάση, γλυκερόλη, κινναμική αλκοόλη. Από αυτές, εκτός από τις α- και β- γλυκεροφωσφατάση που παράγεται από την μέλισσα και τη γλυκερόλη που περιέχεται στο κερί, όλες οι άλλες περιέχονται στις ρητίνες.

• **Αλδεΐδες:** οι p-υδρόξυβενζαλδεΐδη, βανιλίνη, ισοβανιλίνη περιέχονται στις ρητίνες.

• **Φλαβονόλες:** μαζί με τις φλαβόνες τους αποδίδονται αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ταυτοποιήθηκαν οι: πινοστρομπίνη, πινοσεμπρίνη, 3-O-αίθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, πινομπανκσίνη, ναριγκενίνη κ.α.

• **Φλαβόνες:** ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις τεκτοχρυσίνη, 7-4'- διμέθυλ- εστέρας της καμφορόλης, χρυσίνη, 3-μέθυλ- αιθέρας της γκαλαγκίνης, 7-μέθυλ-αιθέρας της απιγενίνης, γκαλαγκίνη, κερκετίνη, καμφορόλη, 3-μέθυλ- αιθέρας της καμφορόλης, κ.α. στις περισσότερες από αυτές αποδίδονται αντιμικροβιακές ιδιότητες.

• **Υδρογονάνθρακες:** βρέθηκαν υδρογονάνθρακες με περιττό αριθμό ανθράκων C21- C33. Οι C25 και C27 περιέχονται στις ρητίνες αλλά παράγονται και προστίθενται στη πρόπολη από τη μέλισσα.

• **Κετόνες:** έχουν ανιχνευθεί η ακετοφαινόνη και η p-ακετοφαινόλη.

• **Τερπενοειδή και άλλα συστατικά:** ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις βενζόλιο, μέθυλο-κυκλοεξάνιο, αιθυλένιο, φαινυλ-εξανολακτόνη, 4-μενθάνιο, 1,8-επόξυ-ναφθαλένιο, αλκοόλες σεσκιτερπενίων κ.α.

• **Βιταμίνες:** βιταμίνες B1 (θειαμίνη), B5 (νικοτινικό οξύ) και προβιταμίνη A.

Η ποσοτική σύνθεση της πρόπολης παρουσιάζει μεγάλες διαφορές. Για παράδειγμα τα καφεϊκά οξέα και οι εστέρες τους, που παίζουν σημαντικό ρόλο στις

αντιμικροβιακές και τις αλλεργικές ιδιότητες της πρόπολης συμμετέχουν κατά 20% στα διαλύματα πρόπολης που μαζεύονται από την περιοχή του ζωολογικού κήπου στην Οξφόρδη και μόνο κατά 2% στα διαλύματα που συλλέγονται από το Πανεπιστημιακό μουσείο της ίδιας πόλης που απέχει 400 μέτρα. Η ποσοτική διαφοροποίηση της πρόπολης εξαρτάται από την περιοχή, την εποχή και τη φυλή της μέλισσας (Magucci, 1995).

Εξαιτίας γεωγραφικών διαφορών, δείγματα πρόπολης από την Ευρώπη, Νότια Αμερική και Βραζιλία έχουν διαφορετική χημική σύσταση. Η πρόπολη από την Ευρώπη και την Κίνα περιέχει κυρίως φλαβονοειδή και εστέρες φαινολικών οξέων (Bankova *et al.*, 2000). Από την άλλη, τα κύρια συστατικά στη βραζιλιάνικης προέλευσης πρόπολη είναι τερπενοειδή και φαινολικά παράγωγα των *p*-κουμαρικών οξέων. Επίσης, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή των δειγμάτων πρόπολης, παρουσιάζονται και διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. Οι Kujumgiev *et al.*, (1999) ανέφεραν ότι τα δείγματα πρόπολης από διαφορετική προέλευση εκδηλώνουν διαφορετικά επίπεδα αντιμικροβιακής δράσης.

Οι Nieva Moreno *et al.* (2000) βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ολικών φλαβονοειδών και της δράσης ενάντια στις ελεύθερες ρίζες σε εκχύλισμα πρόπολης από την Αργεντινή. Γενικά η σύσταση της πρόπολης σχετίζεται άμεσα με τις εκκρίσεις των βλαστών από τα διάφορα δέντρα, οι οποίες συλλέγονται από τα μέλισσα: από λεύκες (*Populus spp.*), βετούλια (*Betula alba*), οξιά (*Fagus sylvatica*), αγριοκαστανιά (*Aesculus hippocastanum*), σημύδα (*Alnus glutinosa*) και από διάφορα κωνοφόρα.

A. 12. Τα είδη της πρόπολης και η γεωβοτανική τους προέλευση

Η πρόπολη συλλέγεται από τις μέλισσες κυρίως από φυτά, δέντρα και μπουμπούκια δέντρων. Στην Ευρώπη και στις άλλες περιοχές με εύκρατα κλίματα, τα δέντρα αυτά είναι: οι λεύκες, καστανιές, αρωματικά φυτά, βελανιδιές. Ανάλογα της βοτανικής προελεύσεως έχουμε διάφορους τύπους πρόπολης, με μικρές διακυμάνσεις στη σύστασή της (**Πίνακας 3, Πίνακας 4**). Οι μέλισσες, όπου δεν υπάρχουν δέντρα, όπως σε νησιά, για να συλλέξουν την πρόπολη, μαζεύουν ακατάλληλες ουσίες, π.χ. πίσσα και υπολείμματα χρωμάτων. Η πρόπολη, που προέρχεται από τέτοιες ουσίες είναι επικίνδυνη για το ίδιο το μελίσι, αλλά και για τον άνθρωπο, αν χρησιμοποιηθεί για

θεραπευτικούς σκοπούς. Γι' αυτό χρειάζεται προσοχή κατά την επιλογή της πρόπολης, που προορίζεται για θεραπευτική χρήση, ώστε να μην προκληθούν αλλεργίες, μολύνσεις και ερεθισμοί του δέρματος (Bankova, 2005)

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά συστατικά που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές

Χαρακτηριστικά συστατικά που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές		
Γεωγραφική προέλευση	Φυτική πηγή	Τυπικά- κύρια συστατικά
Ευρώπη, Ασία, Βόρεια Αμερική	<i>Populus spp.</i> (poplar) – λεύκα	Πινοσεμπρίνη, πινομπανκσίνη, 3-O-αιθυλεστέρας πινομπανκσίνης, χρυσίνη, γκαλαγκίνη, καφεϊκά άλατα
Βόρεια Ρωσία	<i>Betula verrucosa</i> (birch) – σημύδα	Ακακετίνη, απιγενίνη, ερμανίνη, ραμνοσιτρίνη, α-ακετόξυβετουλινόλη
Βραζιλία	<i>Baccharis spp.</i> <i>Araucaria spp.</i>	Πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα και ακετοφαινόνες, διτερπενικά οξέα
Κανάριοι Νήσοι	Άγνωστο	Φουροφουρανικές λιγνάνες

(πηγή Bankova, 2005)

Πίνακας 4. Βοτανικές πηγές πρόπολης (πηγή Burdock, 1998)
Βοτανικές πηγές πρόπολης

<i>Populus nigra</i>	Βουλγαρία	Bankova et al., 1983,
<i>Populus nigra</i>	Αλβανία	Bankova et al., 1994,
<i>Populus tremula</i>	Βουλγαρία	Marcucci, 1995,
<i>Populus suaveolens</i>	Μογγολία	Bankova et al., 1994,
<i>Populus fremontii</i>	ΗΠΑ (κέντρο)	Marcucci, 1995,
<i>Populus acuminata</i>	ΗΠΑ (νησιά Χαβάης)	Marcucci, 1995,
<i>Populus euramericana</i>	Ηνωμένο Βασίλειο	Marcucci, 1995,
<i>Populus Betula, Pinus spp.</i>	Ουγγαρία	Marcucci, 1995,
<i>Betula, Alnus spp.</i>	Πολωνία	Marcucci, 1995,
<i>Delchampia spp.</i>	Περιοχές Ισημερινού	Marcucci, 1995,
<i>Clusia spp.</i>	Περιοχές Ισημερινού	Bankova et al., 1994,
<i>Clusia minor</i>	Βενεζουέλα	Marcucci, 1995,
<i>Xanthorrhoea</i>	Αυστραλία	Ghisalberti, 1979,
<i>Poplar, birch, elm, alder, beech</i>	Βόρεια εύκρατη ζώνη	Ghisalberti, 1979.

A. 13. Επιδράσεις των φλαβονοειδών που ανευρίσκονται στην πρόπολη, στον ανθρώπινο οργανισμό

Τα φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από διαφορετικά είδη πρόπολης, συσχετίζονται με αυτά που υπάρχουν στα φυτά από τα οποία οι μέλισσες είχαν συλλέξει τη πρόπολη. Οπότε είναι πιθανό ότι οποιαδήποτε παρατηρούμενη μετατροπή των φλαβονοειδών κατά την συλλογή, να οφείλεται στη δράση των ενζύμων από τη σίελο των μελισσών (Ghisalberti, 1978).

Ο Havsteen (1983) διαχώρισε τις βιοχημικές επιδράσεις των φλαβονοειδών που περιέχονται στη πρόπολη, στα ζώα σε 4 κατηγορίες:

1. στην τάση σύνδεσης με τα βιολογικά πολυμερή
2. στη σύνδεσή τους με ιόντα βαρέων μετάλλων
3. στην κατάλυση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και
4. στην δράση τους στην απομάκρυνση- δέσμευση των ελεύθερων ριζών

Ο Havsteen παραθέτει αρκετά παραδείγματα αναστολής διαφόρων ενζύμων από τα φλαβονοειδή όπως των υδρολασών και της αλκαλικής φωσφατάσης. Η πρόπολη επίσης αναστέλλει τις γλυκοζυλ-τρανσφεράσες του βακτηρίου *Streptococcus*, τη δραστηριότητα της μυελο-υπεροξειδάσης στη φλεγμονή, την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, τη λιποοξειγενάση, την πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης και το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Εμφάνισε, επίσης, ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες όταν χορηγήθηκε σε ζώα πριν από τη χορήγηση τετραχλωράνθρακα καθώς και παρακεταμόλης. Οι έρευνες αυτές υποδεικνύουν όχι μόνο την επίδραση της πρόπολης στην αναστολή του μεταβολισμού των μικροσωμάτων αλλά και αντιοξειδωτική δράση.

Αν και δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις στη βιβλιογραφία ως προς τη δράση της πρόπολης στη σύνδεσή τους με ιόντα βαρέων μετάλλων και στην κατάλυση της μεταφοράς ηλεκτρονίων, η δράση των φλαβονοειδών στην απομάκρυνση- δέσμευση των ελεύθερων ριζών πιθανώς να εξηγεί την αντιφλεγμονώδη επίδραση της πρόπολης (Havsteen, 1983). Για παράδειγμα μικρά ποσά φαιναιθύλ-εστέρα του καφεϊκού οξέος (caffeic acid phenylethyl-ester (CAPE)), πιθανώς να βελτιώνουν τη φλεγμονώδη

απάντηση που προκαλείται από μια ένωση που ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό ογκοκυττάρων (12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Bankova *et al.*, 2000).

Πίνακας 5. Δραστικά συστατικά που περιέχονται σε διαφορετικά είδη πρόπολης

Δραστικά συστατικά που περιέχονται σε διαφορετικά είδη πρόπολης						
Είδη πρόπολης ανάλογα με την προέλευση	Αντιβακτηριακή δράση	Αντιφλεγμονώδης δράση	Αντικαρκινική δράση	Ηπατο-προστατευτική δράση	Αντιοξειδωτική δράση	Πρόκληση αλλεργιών
Ευρώπη (είδος <i>poplar</i>)	Φλαβανόνες, φλαβόνες, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους	Φλαβανόνες, φλαβόνες, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους	Φαιναιθύλ-εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE)	Καφεϊκό οξύ, φερρουλικό οξύ, φαιναιθύλ-εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE)	Φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους	3,3-dimethylallyl caffeate
Βραζιλία (είδος <i>Baccharis</i>)	Πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα, διτερπένια	Δεν έχει ταυτοποιηθεί	Πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα, διτερπένια, βενζοφουράνια	Κινικό οξύ	Πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα, φλαβονοειδή	Δεν έχει δοκιμαστεί
Κούβα	Πρενυλιωμένες βενζοφαινόλες	Δεν έχει δοκιμαστεί	Πρενυλιωμένες βενζοφαινόλες	Δεν έχει ταυτοποιηθεί	Πρενυλιωμένες βενζοφαινόλες	Δεν έχει δοκιμαστεί
Ταϊβάν	Δεν έχει δοκιμαστεί	Δεν έχει δοκιμαστεί	Πρενυλιωμένες φλαβανόνες	Δεν έχει δοκιμαστεί	Πρενυλιωμένες φλαβανόνες	Δεν έχει δοκιμαστεί

(πηγή Bankova, 2005)

A. 14. Νέα συστατικά απομονωμένα από πρόπολη η οποία συλλέχθηκε από εύκρατα κλίματα

Στην εύκρατη ζώνη, συμπεριλαμβανομένων της Ευρώπης, Ασίας και Βόρειας Αμερικής, τα δείγματα πρόπολης χαρακτηρίζονται από παρόμοια χημική σύσταση, και τα κύρια συστατικά τους είναι: μη-γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή, αρωματικά οξέα και οι εστέρες τους. Σε δείγμα πρόπολης από την Αίγυπτο, εκτός από τα συνήθη συστατικά πρόπολης από λεύκα, ταυτοποιήθηκαν και εστέρες καφεϊκού οξέος και λιπαρές αλκοόλες μακράς αλύσου (δωδεκανόλη, τετραδεκανόλη, τετραδεκενόλη, εξαδεκανόλη) (Bankova *et al.*, 2000).

A. 15. Μέθοδοι προσδιορισμού χαρακτηριστικών συστατικών που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης διαφορετικής προέλευσης

Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός δειγμάτων πρόπολης διαφορετικής προέλευσης μπορεί να γίνει με βάση τα κύρια συστατικά που περιέχει, τα οποία απομονώνονται και προσδιορίζονται. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι δείγματα πρόπολης με προέλευση από την Ευρώπη και την Κίνα, περιλαμβάνουν αυξημένες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών και εστέρων των φαινολικών οξέων. Ενώ, τα κύρια συστατικά που περιέχονται σε πρόπολη από τη Βραζιλία είναι κυρίως τερπενοειδή και παράγωγα των πρενυλιωμένων *p*-κουμαρικών οξέων (Ahn, *et al.*, 2007). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των συστατικών της πρόπολης ήταν η αέρια χρωματογραφία, η χρωματογραφία στήλης, η υγρή χρωματογραφία, η πυρηνική μαγνητική φασματοσκοπία μάζας και άλλες που αναλύονται διεξοδικά στη συνέχεια.

Παρόλα αυτά, η απομόνωση των βιοδραστικών συστατικών της πρόπολης, είναι μια δύσκολη διαδικασία λόγω της πολυπλοκότητας στη χημική της σύσταση.

A. 15. 1. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Λατινική Αμερική

Αναφέρεται ότι τα κυριότερα είδη φυτών που χρησιμοποιούν οι μέλισσες για τη σύνθεση πρόπολης, σε χώρες της Λατινικής Αμερικής όπως η Βραζιλία, η Αργεντινή και η Χιλή, είναι τα: *Baccharis*, *Clusia minor*, *Clusia major*, *Araucaria heterophylla*, *Vernonia*, *Diclenia*, *Hyptis*, *Myrcia*, *Schinus* και *Weinmania*.

A. 15. 1. 1. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από την Βραζιλία

Για τον προσδιορισμό των χημικών συστατικών πρόπολης του είδους *Baccharis*, με προέλευση από τη Βραζιλία, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel, και βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης CHCl₃-MeOH. Ως διαλύτης εκχύλισης του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και για την απομάκρυνση του αδιάλυτου μέρους του εκχυλίσματος, πραγματοποιήθηκε διήθηση. Ακολουθεί μερική εξάτμιση του διηθήματος και λυοφυλίωση. Το αδιάλυτο μέρος εκχυλίστηκε με μεθανόλη και ακολούθως με

CHCl₃. Το μεθανολικό εκχύλισμα με το αδιάλυτο μέρος του υδατικού διαλύματος πρόπολης, διαχωρίστηκε περαιτέρω σε διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα. Μέσω της χρωματογραφίας στήλης του διαλυτού κλάσματος, ταυτοποιήθηκαν 7 κλάσματα από τα οποία το ένα περιείχε λιπαρή ουσία και μέσω επανάληψης της χρωματογραφίας στήλης και προπαρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας TLC, προσδιορίστηκαν τα 22 συστατικά (Banskota *et al.*, 1998).

Τα παράγωγα του κινικού οξέος, 4-ferruoyl quinic και 5-ferruoyl quinic οξέα, τα οποία για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν σε δείγματα πρόπολης που παρήχθη από φυτά του είδους *Citrus* sp., καθώς και άλλες φαινολικές ενώσεις ποσοτικοποιήθηκαν σε 13 δείγματα από τη Βραζιλία μέσω της αναλυτικής μεθόδου HPLC.

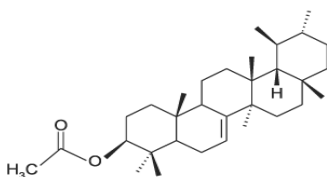
Για την παρασκευή εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης η αιθανόλη και ακολούθησε ανάμιξη με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό κενό και παρασκευάστηκε διάλυμα με μεθανόλη. Το σχηματιζόμενο ίζημα απομακρύνθηκε με διήθηση και το διήθημα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συστατικών μέσω της υγρής χρωματογραφίας.

Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα δείγματα πρόπολης του είδους *Citrus* sp., διαθέτουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παράγωγα του κινικού οξέος (11,0 μέχρι 58,4 mg/mg ξηρού ακατέργαστου υδρο-αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης) (Pereira, *et al.*, 2003).

Για την απομόνωση των σημαντικότερων φλαβονοειδών που περιέχονται σε δείγμα πρόπολης, του είδους *Baccharis dracunculifolia*, με προέλευση από την περιοχή Minas Gerais στη Βραζιλία, χρησιμοποιήθηκε μια εκλεκτική μέθοδος διαχωρισμού των αρωματικών ενώσεων, μέσω της χρησιμοποίησης της β-κυκλοδεξτρίνης ως μέσο εγκλεισμού. Η μέθοδος περιλαμβάνει προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος του δείγματος πρόπολης σε υδατικό διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης και ανάμιξη με τη χρησιμοποίηση υπερήχων. Ακολούθως το αδιάλυτο μέρος απομακρύνθηκε με διήθηση και το διήθημα συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ώστε να ληφθεί το σύμπλοκο συστατικών πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης, στο οποίο προστέθηκε αιθανόλη και ακολούθησε ανάδευση. Το αδιάλυτο μέρος απομακρύνθηκε και το διήθημα

συμπυκνώθηκε. Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του τελικού εκχυλίσματος πρόπολης έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (Naefady *et al.*, 2003).

Μέσω ενός ασυνήθιστου δείγματος πρόπολης από την ίδια περιοχή (Minas Gerais) στη νοτιοανατολική Βραζιλία, όπου το κυριότερο είδος είναι η «πράσινη» πρόπολη, απομονώθηκε το συστατικό πεντακυκλικό τριτερπένιο, το bauer-7-en-3β-yl acetate. Ως διαλύτες εκχύλισης του δείγματος πρόπολης, χρησιμοποιήθηκαν η μεθανόλη και το χλωροφόρμιο, μέσω της συσκευής Soxhlet. Το εκχύλισμα χλωροφορμίου συμπυκνώθηκε, μετά από εξάτμιση, και το υπόλειμμα επεξεργάστηκε με θερμή μεθανόλη. Στο διάλυμα που προέκυψε έγινε άμεσα διήθηση και κατά την επανασύνταξη δημιουργήθηκαν λευκοί κρύσταλλοι οι οποίοι διαχωρίστηκαν με διήθηση. Μέσω της μεθόδου προσδιορισμού, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με τη χρησιμοποίηση silica gel, ανιχνεύθηκε ότι οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι αντιστοιχούσαν σε ένα τριτερπενοειδές. Μέσω της αέριας χρωματογραφίας αποκαλύφθηκε ότι η ένωση που προσδιορίστηκε αποτελείται από ένα και μόνο συστατικό το οποίο ταυτοποιήθηκε ως bauer-7-en-3β-yl acetate (bauerenyl acetate) και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και μέσω της χρησιμοποίησης των μεθόδων EIMS, IR, ^1H και ^{13}C NMR φασματοσκοπίας (Teixeira, *et al.*, 2006).



Σχήμα 1. Δομή bauer-7-en-3β-yl acetate

Το *p*-κουμαρικό οξύ επιλέχθηκε ως το συστατικό αναφοράς για την αξιολόγηση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης, επειδή βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε πρόπολη με προέλευση από τη Βραζιλία, κυρίως από βορειοανατολικές περιοχές. Ο προσδιορισμός του πραγματοποιήθηκε μετά από εκχύλιση του δείγματος με μεθανόλη.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του συστατικού μέσω της μεθόδου προσδιορισμού HPLC (Marquele, *et al.*, 2006).

A. 15. 1. 2. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από τη Χιλή

Η πρόπολη με προέλευση από τη Χιλή έχει διαφορετική βοτανική προέλευση από αυτή που προέρχεται από περιοχές του βόρειου Ημισφαιρίου. Αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερη χλωρίδα που ευδοκιμεί στην Χιλή και η οποία αναπτύχθηκε ως αποτέλεσμα της γεωγραφικής απομόνωσης της Χιλής ανάμεσα στον Ειρηνικό ωκεανό και την οροσειρά των Άνδεων. Η χλωρίδα της Χιλής αποτελείται κυρίως από διάφορα ενδημικά είδη φυτών. Αναφέρεται επίσης ότι οι λεύκες δεν ευδοκούν στη Χιλή γι' αυτό και το είδος *poplar* δεν ανιχνεύεται.

Για τη διερεύνηση των συστατικών που περιέχονται σε δείγμα πρόπολης από την κεντρική Χιλή, παρασκευάστηκε εκχύλισμα με τη χρησιμοποίηση μεθανόλης. Ακολούθως έγινε διήθηση του διαλύματος και το εναπομείνων εκχύλισμα εξατμίστηκε, επαναδιαλύθηκε σε νερό και εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο. Από την οργανική φάση του εκχυλίσματος απομονώθηκαν 17 φαινολικά συστατικά. (Valcic, *et al.*, 1999).

A. 15. 2. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Ευρώπη και τη Μεσόγειο

Αναφέρεται ότι το κυριότερο είδος φυτών που χρησιμοποιούν οι μέλισσες για τη σύνθεση πρόπολης, σε χώρες της Ευρώπης, είναι το: *Poplar sp.*. Παρόλα αυτά δείγματα πρόπολης από τις Άλπεις στη Σουηδία, ήταν πλούσια σε φαινολικά γλυκερίδια και δείγμα από την Σικελία, περιλάμβανε περιορισμένες συγκεντρώσεις σε φαινολικά συστατικά και αυξημένες σε διτερπενικά οξέα.

A. 15. 2. 1. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από την Πολωνία

Σε δείγμα πρόπολης με προέλευση από την Πολωνία, απομονώθηκαν 10 φλαβονοειδή μέσω προπαρασκευαστικής χρωματογραφίας στήλης. Η φασματοσκοπία του δείγματος αυτού, συγκρίθηκε με γνωστά φάσματα. Ως αποτέλεσμα, ταυτοποιήθηκαν διάφορα φλαβονοειδή: τεκτοχρυσίνη, πινοσεμπρίνη, χρυσίνη, γκαλαγκίνη, απιγενίνη,

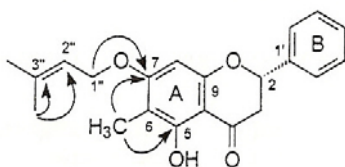
καμφερόλη, 5-υδροξύ-4',7-δι-μεθόξυ-φλαβόνη και η χαλκόνη της πινοστρομπίνης (Wieslawa, 2001).

A. 15. 2. 2. Προσδιορισμός συστατικών πρόπολης από την Ελλάδα

Γενικά τα διτερπένια θεωρούνται συστατικά που χαρακτηρίζουν την τροπική πρόπολη. Για πρώτη φορά απομονώθηκαν και από πρόπολη Ευρωπαϊκής προέλευσης. Η ανάλυση της Ελληνικής πρόπολης (μέσω ανάλυσης γύρης), έδειξε ότι ένα ποσοστό 90% προερχόταν από κωνοφόρα δένδρα, του είδους *Pinus sp.* Ωστόσο το είδος *Populus sp.* το οποίο θεωρείται ως η κυριότερη πηγή Ευρωπαϊκής πρόπολης δεν ανιχνεύεται ούτε σε ίχνη, αποκαλύπτοντας έτσι την ιδιαίτερη φύση του Ελληνικού δείγματος.

Οι δομές των απομονωμένων ενώσεων καθορίστηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων, κυρίως μέσω εφαρμογής των 1D, 2D NMR τεχνικών και της φασματοσκοπίας μάζας. Το υπό μελέτη δείγμα και οι ενώσεις που απομονώθηκαν εξετάστηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι σε Gram (+/-) βακτήρια και μύκητες, και 5 από αυτά εκδήλωσαν ισχυρές ιδιότητες.

Μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης δείγματος πρόπολης, το οποίο συλλέχθηκε από την Πρέβεζα, ταυτοποιήθηκε ένα νέο παράγωγο 2,3-διυδροφλαβανόνης, η 7- O-prenylstrobopinin, και 25 γνωστά διτερπένια και φαινολικές ενώσεις από διάλυμα πρόπολης με n-βουτανόλη. Αναφέρεται ότι για πρώτη φορά απομονώθηκαν διτερπένια από πρόπολη Ευρωπαϊκής προέλευσης, ενώ 6 γνωστές ενώσεις παρουσιάζονται ως συστατικά της πρόπολης (Melliou & Chinou 2004).



Σχήμα 2. Δομή 7- O-prenylstrobopinin

A. 15. 2. 3. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Τουρκία

Η χημική σύσταση πρόπολης, η οποία συλλέχθηκε από διάφορες περιοχές της Τουρκίας, προσδιορίστηκε μέσω των μεθόδων χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) και αέριας χρωματογραφίας με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) καθώς και με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των σημαντικότερων ενεργών συστατικών.

Μέσω της TLC μεθόδου, τα περισσότερα δείγματα πρόπολης βρέθηκε ότι περιλάμβαναν ταξινομικά χαρακτηριστικά από πρόπολη με φυτική πηγή *poplar*, τα οποία αποτελούνται από παρόμοιο περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά και φλαβονοειδή. Μέσω των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την ποσοτική ανάλυση GC-MS επιβεβαιώνεται η σημαντικότητα των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη και συμβάλουν στην αντιμικροβιακή της δράση καθώς και η σπουδαιότητα του είδους πρόπολης *P. nigra*, το οποίο αναφέρεται ότι συμβάλει στην προστασία της κυψέλης έναντι στους μικροοργανισμούς.

Δείγμα πρόπολης από την περιοχή των Αδάνων (νότια Τουρκία), μέσω της μεθόδου GC-MS, ταυτοποιήθηκε ότι περιέχει διτερπενικά οξέα και αυξημένη συγκέντρωση κινναμυλ- κινναμικό, ενώ δείγμα από το Erzurum (βορειοανατολική Τουρκία), βρέθηκε ότι αποτελείται από σημαντικά ποσά υδρόξυ-λιπαρών οξέων και τριτερπενικών αλκοολών. Δείγμα από το Artvin (συνοριακή περιοχή βορειοανατολικής Τουρκίας), περιέχει φαινολικά γλυκερίδια, χαρακτηριστικά των εκκρίσεων του βλαστού *Populus euphratica* Oliv. (Popova *et al.*, 2005)

A. 15. 2. 4. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Τυνησία

Για τον προσδιορισμό των κυριότερων φλαβονοειδών που περιέχονται σε πρόπολη από την Τυνησία, χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από το Menzel mhiri (βόρεια Τυνησία) και την La Alcarria (Ισπανία).

Το διάλυμα πρόπολης παρασκευάστηκε μέσω εκχύλισης με μεθανόλη, με τη χρησιμοποίηση της συσκευής Soxhlet, μέχρι τον αποχρωματισμό του εκχυλίσματος. Η απομάκρυνση των κηρών πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντριση του εκχυλίσματος. Η διαλυτή φάση συμπυκνώνεται σε συσκευή απόσταξης χαμηλής πίεσης, μέχρι να δημιουργηθεί ένα παχύρευστο διάλυμα πρόπολης, το οποίο επαναδιαλύεται σε πυκνό NaOH και παρασκευάζεται απόσταγμα με διαίθυλ-αιθέρα. Ακολούθως αυξήθηκε η

οξύτητα του υδατικού κλάσματος του διαλύματος, μέσω της προσθήκης HCl, σε pH 3 και επανα-εκχυλίστηκε με διέθυλ-αιθέρα. Τα флаβονοειδή προσδιορίστηκαν μέσω της μεθόδου HPLC από το δεύτερο εκχύλισμα με διέθυλ-αιθέρα.

Αναφέρεται ότι προσδιορίστηκε ένα νέο флаβονοειδές: ο 3,7,4',5'- τετραμέθυλ-αιθέρας της μυρισετίνης, που θεωρείται χαρακτηριστικό της ποικιλίας φυτών *Cistus spp.* Ακόμη ένα συστατικό το οποίο ανιχνεύθηκε σε αυξημένες συγκεντρώσεις ήταν ο 3,7,3'-τριμέθυλ-αιθέρας της κερκετίνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι σε συννοριακές περιοχές όπως είναι η Τυνησία, όπου οι λεύκες δεν είναι πάντα διαθέσιμες για την παρασκευή πρόπολης, χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποικιλίες φυτών (Martos *et al.*, 1997)

A. 15. 3. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Ωκεανία

A. 15. 3. 1. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από την Νέα Ζηλανδία

Αναφέρεται ότι τα σημαντικότερα οργανικά συστατικά πρόπολης με προέλευση από τη Νέα Ζηλανδία, ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά, μέσω του συνδυασμού των μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC και αέριας χρωματογραφίας με φασματοσκοπία μάζας GC-MS. Η μέθοδος HPLC αναφέρεται ως η μέθοδος προτίμησης για την ανάλυση των флаβονοειδών εξαιτίας των παραγόντων χαμηλής απόκρισης κατά τη χρησιμοποίηση της μεθόδου GC-MS. Τα επίπεδα των флаβονοειδών, κυμαίνονταν από 30 μέχρι 40 mg/ ml αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των флаβονοειδών που περιέχονται στη πρόπολη με προέλευση από τη Νέα Ζηλανδία είναι το ασυνήθιστα αυξημένο ποσοστό σε διϋδροφлаβονοειδή (περίπου 70%), όπως: πινοσεμπρίνη, πινομπανκσίνη και 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης.

Μέσω της μεθόδου αυτής, προσδιορίστηκαν και τα μη-φлаβονοειδή συστατικά της πρόπολης, τα οποία αποτελούνται από αρωματικές ενώσεις (3-7.5 mg/ ml), καθώς και από χαμηλά επίπεδα λιπαρών οξέων (0.25-0.78 mg/ ml) (Markham *et al.*, 1996).

A. 15. 4. Ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πρόπολης από Ευρώπη, Αμερική, Ασία και Αφρική και σύγκριση των δειγμάτων

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός διαχωρισμός και προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης, το οποίο χρησιμοποιείται για παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων, έχει ερευνηθεί μέσω χρωματογραφίας on-line HPLC–ESI/MS και επίσης δημιουργήθηκε ένας συγκεκριμένος τρόπος ταυτοποίησης για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Η μέθοδος προσδιορισμού HPLC-ESI/MS αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των περισσότερων συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη.

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από την Αργεντινή, την Ιταλία και την Ισπανία εμφανίζουν σχεδόν το ίδιο χρωματογραφικό προφίλ ολικών ιόντων (TIC), το οποίο αποδίδεται στην παρουσία ίδιων μοριακών ουσιών (species), τα οποία ανιχνεύθηκαν μέσω αρνητικής ESI–MS. Από την άλλη, τα δείγματα από το Αρζεμπαϊζάν, την Κίνα, την Αιθιοπία και την Κένυα εμφανίζουν περίεργα προφίλ.

Μέσω της χρησιμοποίησης πρότυπων φλαβονοειδών και πρότυπων βαθμονομημένων καμπυλών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,05 (5 µg/ml) μέχρι 5 µg (500 µg/ml), επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός διαφόρων δραστικών συστατικών από τα δείγματα πρόπολης. Σε δείγματα πρόπολης με προέλευση από την Αργεντινή, την Ιταλία και την Ισπανία, βρέθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πινοσεμπρίνης (περίπου 49%, 48% και 39% των ολικών αναγνωρισμένων- ταυτοποιημένων φλαβονοειδών, αντίστοιχα) και ποικίλα αλλά παρόμοια ποσοστά από άλλα συστατικά. Από την άλλη, σε δείγματα πρόπολης με προέλευση από την Κίνα, το Αρζεμπαϊζάν και την Αιθιοπία βρέθηκαν αυξημένα ποσά πινοσεμπρίνης (περίπου 63%, 46% και 62%, αντίστοιχα) αλλά απουσίαζαν η γενιστεΐνη, η καμπερόλη, η απιγενίνη και η χρυσίνη στο δείγμα από την Κίνα, η γενιστεΐνη, η καμπερόλη, η ακακετίνη και η χρυσίνη στο δείγμα από το Αρζεμπαϊζάν και η καμπερόλη και η ακακετίνη στο δείγμα της Αιθιοπίας. Στο αιθανολικό εκχύλισμα δείγματος πρόπολης από την Κένυα δεν ταυτοποιήθηκαν οποιαδήποτε φλαβονοειδή. Τέλος, αναφέρεται ότι μέσω του προσδιορισμού των ολικών

φλαβονοειδών σε όλα τα δείγματα πρόπολης, βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα από την Αργεντινή, την Ιταλία και την Ισπανία είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα από το Αρζεμπαϊζάν, την Κίνα, την Αιθιοπία και την Κένυα (Volpi & Bergonzini 2006).

A. 16. Νέα συστατικά από πρόπολη με προέλευση από την τροπική ζώνη

A. 16. 1. Φλαβονοειδή

Οι Wollenweber & Buchmann (1997), ανίχνευσαν μη-γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή τα οποία τυπικά παραλαμβάνονται μετά από εκχύλιση φύλλου *Ambrosia deltoidea*, και είναι τα: 5,7,4'-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavone και sideritiflavone (Bankova *et al.*, 2000).

A. 16. 2. Πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα και ακετοφαινόνες

Τα πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα και οι ακετοφαινόνες, αποτελούν μια καινούργια αναγνωρισμένη τάξη φαινολών σε πρόπολη από Βραζιλία. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες σε είδη φυτών τύπου *Baccharis* από την Νότια Αμερική, τα οποία θεωρούνται συνήθη συστατικά τους (Bohlmann, 1981).

A. 16. 3. Λιγνάνες και άλλα φαινολικά συστατικά

Οι Valcic *et al.*, 1998 απομόνωσαν 4 νέες λιγνάνες από πρόπολη Χιλής: ένα τριμερές και δυο διαστρεοεισομερή διμερή καθώς και το διϋδροβενζοφουράνιο.

A. 16. 4. Δι- και τρι-τερπένια

Ανιχνεύθηκαν διτερπενικά οξέα με ευεργετικές βιολογικές δράσεις: ένα παράγωγο clerodane με αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς και ενώσεις με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Μερικές τριτερπενικές αλκοόλες όπως η β-αμυρίνη, ανιχνεύθηκαν από πρόπολη Αιγύπτου και Βραζιλίας (Bankova *et al.*, 2000).

A. 16. 5. Πτητικές ενώσεις

Οι πτητικές ενώσεις βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στη πρόπολη, παρόλα αυτά το άρωμα και οι βιολογικές τους δράσεις είναι σημαντικά για το χαρακτηρισμό της. Ανιχνεύθηκαν μόνο- και σεσκιτερπένια. Οι πτητικές ενώσεις: ledol, spatulenol, germacrene, που περιέχονταν στη πρόπολη από τροπικές περιοχές, δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα από την εύκρατη ζώνη (Bankova *et al.*, 2000).

A. 16. 6. Σάκχαρα

Σε δείγματα πρόπολης από τις Κανάριες Νήσους, ανιχνεύθηκε σημαντικός αριθμός σακχάρων και αλκοολών, τα οποία κατά πλειοψηφία θεωρούνται ως νέα συστατικά της πρόπολης. Οι ενώσεις αυτές ταυτοποιήθηκαν μέσω της μεθόδου GC-MS, ενώ το υψηλό ποσοστό ανίχνευσής τους, υποδηλώνει ότι μπορεί να προέρχονται από κόμμεα που θεωρούνται πηγή πρόπολης (Bankova *et al.*, 1998).

A. 16. 7. Υδρογονάνθρακες

Οι υδρογονάνθρακες και οι μονοεστέρες που ανιχνεύθηκαν σε δείγμα πρόπολης από την Βραζιλία, βρέθηκαν όμοιοι με αυτούς σε Ευρωπαϊκά δείγματα. Συμφωνά με αυτή τη μελέτη, η σύνθεση της πρόπολης είναι όμοια με αυτή της κερήθρας, οπότε προτείνεται από τους ερευνητές, η θεωρία ότι η πρόπολη εκκρίνεται από τις μέλισσες παρά ότι προέρχεται από τα φυτά. (Negri, 1998)

A. 16. 8. Μέταλλα

Πρόσφατες μελέτες που αφορούν στα μεταλλικά στοιχεία που εμπεριέχονται στη πρόπολη, βρέθηκε ότι τα Ca, Mg, K, Na, Fe and Zn αποτελούν συστατικά σε δείγματα από τα Σκόπια και τα Fe, Mn, Zn, Cu σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από την Κούβα (Bankova *et al.*, 2000).

A. 16. 9. Βιολογικές δράσεις των νέων συστατικών

Μερικά από τα πρενυλιωμένα p-κουμαρικά οξέα διαθέτουν αντιβακτηριακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες. Τα παράγωγα του καφεόυλο-κινικού οξέος επέδειξαν ανοσοδιεγερτικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες.

Οι φουροφουρανικές λιγνάνες επέδειξαν βακτηριοστατική δράση. Τα διτερπενικά οξέα που απομονώθηκαν από δείγμα πρόπολης από τη Βραζιλία έδειξαν κυτταροτοξικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες.

Η γνώση της χημικής σύστασης της πρόπολης, των δραστικών βιολογικών μορίων και των βασικών φυτικών πηγών πρόπολης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά βοηθητικά μέσα, στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δημιουργία μιας «φόρμουλας» που να προσδιορίζει το χημικό τύπο δειγμάτων πρόπολης (Bankova *et al.*, 2000).

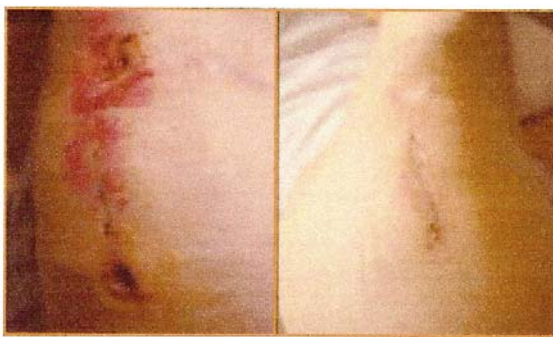
A. 17. Χημική σύσταση γεωπρόπολης

Στην τροπική δυτική Αμερική υπάρχουν εγχώρια είδη μελισσών χωρίς κεντρί (*Meliponinae*), οι οποίες συλλέγουν τα ρητινώδη συστατικά από τα φυτά και τα αναμειγνύουν με κερί και χώμα για τη δημιουργία της γεωπρόπολης. Οι Tomas-Barberan *et al.*, (1993), διερεύνησαν τα φαινολικά συστατικά της πρόπολης και γεωπρόπολης από τη Βενεζουέλα μέσω της μεθόδου HPLC και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πρενυλιωμένες βενζοφαινόνες αποτελούν κυρίαρχα συστατικά σε αυτά τα δείγματα. Οι Bankova *et al.*, (1998α), μελέτησαν τη χημική σύσταση της γεωπρόπολης από 3 είδη μελισσών χωρίς κεντρί από τη Βραζιλία μέσω της μεθόδου GC-MS και βρέθηκε ότι η σύσταση ποικίλει ανάλογα με την τοποθεσία και τα είδη μελισσών και διαφέρει από τη γεωπρόπολη της Βενεζουέλα. Τα κύρια συστατικά από αυτά τα δείγματα είναι διτερπενικά οξέα και τριτερπένια (αλκοόλες και κετόνες) (Bankova *et al.*, 2000).

A. 18. Γενικές ιδιότητες της πρόπολης

Η πρόπολη και ορισμένα από τα συστατικά της έχουν πολλές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Οι βακτηριοστατικές ιδιότητές τους είναι πιθανώς ισοδύναμες με αυτές των αντιβιοτικών. Πράγματι, το επικάλυμμα της πρόπολης, που είναι πολύ λεπτό και καλύπτει το εσωτερικό του μελισσιού, έχει αποδειχτεί αρκετό για να εμποδίσει τη διάβρωση του ξύλου, για την οποία υπεύθυνο είναι το βακτήριο *Bacillus larvae*. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και η αυξημένη συγκέντρωση σε αρωματικά συστατικά αποτελούν την βάση της αντιβακτηριακής δράσης της πρόπολης. Οι αντιβακτηριακές και μυκητοκτόνες ουσίες που περιέχονται στην πρόπολη και δρουν επιλεκτικά, μπορούν να επιδρούν στα παθογόνα βακτήρια και τους τοξικούς μύκητες, χωρίς να είναι επιβλαβείς για τον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, λοιπόν, δεν επηρεάζεται η φυσική μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου. Επίσης δεν παρουσιάζει παρενέργειες (εκτός από σπάνιες περιπτώσεις αλλεργίας), και η χρησιμοποίησή της δεν οδηγεί σε εθισμό, δηλαδή σχηματισμό ανθεκτικών στελεχών. Επίσης ενισχύει, συνήθως, και την επίδραση των φαρμάκων.

Η πρόπολη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία δερματοπάθειας, οιδήματος και τραυμάτων. Στην εικόνα 5. παρουσιάζεται η θεραπευτική επίδραση της πρόπολης σε βαθύ τραύμα μετά από 30 ημέρες νοσηλείας που εφάρμοσε ο ιατρός Franco Feraboli, στο νοσοκομείο της Cremona στο τμήμα Ορθοπεδικής και Τραυματολογίας.



Εικόνα 5. Θεραπεία με πρόπολη σε βαθύ τραύμα

Η πρόπολη παρεμποδίζει τη σήψη, γεγονός που εξηγεί την ταρίχευση των μικρών εισβολέων μετά από κάλυψή τους με αυτή. Τόσο οι αντικαρκινικές ιδιότητες, όσο και οι προστατευτικές δράσεις που εκδηλώνει η πρόπολη έναντι της πρόκλησης καρδιαγγειακών νοσημάτων, αποδίδονται κυρίως στα φλαβονοειδή και στα άλλα φαινολικά συστατικά που περιέχει (Ahn *et al.*, 2007).

Διαθέτει χαρακτηριστικά τοπικού αναισθητικού, χάρη στα αιθέρια έλαια, και είναι, σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, 3 φορές ισχυρότερη από τα αναισθητικά. Επουλώνει τις πληγές και βοηθάει στην ανάπλαση των ιστών (σχετικά με εγκαύματα δευτέρου βαθμού, εκζέματα κτλ). Είναι επίσης, πολύ αποτελεσματική στην διατήρηση της υγιεινής της στοματικής κοιλότητας, υπό μορφή οδοντοπλυμμάτων, όπου καταπολεμά τις διάφορες λοιμώξεις και την κακοσμία. Βοηθάει στη θεραπεία κρυολογημάτων, πονόλαιμων, χρόνιων φαρυγγίτιδων, άφθων, γαστρεντερίτιδας, κολίτιδας.

Παρέχει επίσης προστασία από τις βιολογικές συνέπειες της ραδιενέργειας, και είναι δραστική στις παθήσεις του ουροποιητικού συστήματος και του προστάτη, σε ανωμαλίες του ενδοκρινικού συστήματος και σε τοπικούς πόνους όπως για παράδειγμα ο πονόδοντος. Σε πειράματα που έγιναν σε ζώα η πρόπολη δεν προκάλεσε καρκινογένεση,

αντίθετα μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις προκάλεσε συρρίκνωση του όγκου. Όλοι οι τύποι πρόπολης έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Αναφέρεται επίσης ότι η πρόπολη είναι φυτο-αναστολέας, παρεμποδίζοντας έτσι το φύτρωμα (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).

Στις ενότητες που ακολουθούν περιγράφονται αναλυτικά οι θεραπευτικές ιδιότητες της πρόπολης.

A. 18. 1. Αντιβακτηριακή δράση της πρόπολης

Η πρόπολη καταπολεμά μεγάλο φάσμα βακτηρίων. Η παράλληλη χορήγηση της πρόπολης με τα αντιβιοτικά, μειώνει τις βλάβες, που προκαλούν τα τελευταία στον οργανισμό. Μέσω της προσθήκης αιθανολικού διαλύματος πρόπολης σε γνωστά αντιβιοτικά, βρέθηκε δραστική αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης της αμπικιλίνης, της γενταμικίνης και της στρεπτομικίνης, καθώς και μέτρια αύξηση στη δραστικότητα της χλωραμφενικόλης, του ceftriaxon και της βανσομικίνης (Scazzocchio *et al.*, *in press*). Η πρόπολη είναι δραστική έναντι των ειδών των γενών *Staphylococcus* και *Streptococcus*, που είναι υπεύθυνα για μολύνσεις της στοματικής κοιλότητας.

Η αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης, οφείλεται στα περιεχόμενα συστατικά της που εξαρτώνται από τη χημική της σύνθεση και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την περιοχή και την εποχή. Τα κύρια συστατικά τα οποία εκδηλώνουν αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι τα φλαβονοειδή, το κινναμικό οξύ, ορισμένα αρωματικά συστατικά και οι εστέρες φαινολικών οξέων. Οι Kujumgiev *et al.*, (1999) βρήκαν ότι η πρόπολη από τροπικές περιοχές αν και δεν περιέχει τα αναφερόμενα συστατικά, παρόλα αυτά επέδειξε παρόμοια αντιμικροβιακή δράση και ως εκ τούτου υποδηλώνεται ότι είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των περιεχόμενων συστατικών. Από την άλλη οι Kedzia *et al.*, (1990), αναφέρουν ότι ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνεται η αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης είναι περίπλοκος και μπορεί να αποδοθεί στη συνέργεια των υδρόξυ-οξέων των φλαβονοειδών και των σεσκιτερπενίων. Η θερμοκρασία και η ενεργός οξύτητα (pH) επηρεάζουν σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης έναντι του *S. aureus*, με την ισχυρότερη επίδραση να εκδηλώνεται σε pH 5,0 και σε θερμοκρασία 37°C. Μέσω της μελέτης των αποτελεσμάτων εξάγεται το

συμπέρασμα ότι το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό. Οι μηχανισμοί που προκαλούν το θάνατο των βακτηρίων δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί, αλλά Ιάπωνες ερευνητές έδειξαν ότι η πρόπολη μπορεί και αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη, προκαλώντας τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριδίου και εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη διαίρεση-πολλαπλασιασμό του κυττάρου. (Lu *et al.*, 2007).

Μερικοί ερευνητές αναφέρουν ότι το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι σημαντικός παράγοντας ελέγχου μικροβιακών μολύνσεων. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η ανάπτυξη της *Salmonella* παρεμποδίζεται μέσω της *in vitro* παραγωγής NO. Έχει αναφερθεί ότι η πρόπολη με προέλευση από τη Βραζιλία είναι περισσότερο αποτελεσματική ως προς την παραγωγή NO, σε σχέση με πρόπολη από τη Βουλγαρία (Orsia *et al.*, 2005).

Μέσω μελέτης των συστατικών δείγματος Ελληνικής πρόπολης από Πρέβεζα, οι: 7-Ο-πρένυλ-στρομπονίνη, 7-Ο-πρένυλ-πινοσεμπρίνη, πινοσεμπρίνη και χρυσίνη βρέθηκε ότι επιδεικνύουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Η πινοσεμπρίνη έδειξε να έχει την ισχυρότερη δράση έναντι των παθογόνων *S. mutans* και *S. viridans* (Melliou & Chinou, 2004).

A. 18. 2. Αντιμυκητιακή δράση της πρόπολης

Η πρόπολη αποδεικνύεται αποτελεσματική εναντίον των προσβολών της επιδερμίδας από παθογόνους μύκητες. Στη δερματολογία και στην κοσμετολογία, εξασφαλίζει τη λάμψη και τη στιλπνότητα του δέρματος, μειώνοντας τη συγκέντρωση των μυκήτων του γένους *Candida* και *Microsporum*. Φαίνεται ότι η πρόπολη ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα που παράγει μεγαλύτερο αριθμό μακροφάγων, απαραίτητων για την εξολόθρευση των μυκήτων και των βακτηρίων (Januzzi, 1993).

Μια μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε 1) πρόπολη από την Τουρκία με φυτική προέλευση από πεύκο (*Pinus spp.*), 2) πρόπολη από μέλι μελισσών (*Apis mellifera*) το οποίο συλλέχθηκε από την Κεμαλπάσα (δυτικά της Ανατολίας), 3) σκόνη πρόπολης

(Sigma, Germany) (P-8904), 4) πρόπολη από την Αυστραλία: Nature's Goodness, Narellean, Australia και 5) πρόπολη από τις ΗΠΑ: GloryBee Foods, Inc., OR, USA, αποδείχθηκαν αποτελεσματικά ως διαλύματα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις στην παρεμπόδιση της δράσης των *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* και *Candida krusei*. Τα διαλύματα αυτά δεν προκάλεσαν τοξικότητα, μετά από χορήγηση, στους ινοβλάστες της στοματικής κοιλότητας. Το συμπέρασμα που προκύπτει, είναι ότι η πρόπολη μπορεί να θεωρηθεί φυσικό προϊόν με ισχυρή αντιμυκητιασική δράση (Kirilmazb *et al.*, 2005).

Σε Ελληνική πρόπολη από την Πρέβεζα, βρέθηκε ότι η χρυσίνη η οποία είναι γνωστή για την αντιφλεγμονώδη της δράση, έδειξε ισχυρή δράση έναντι παθογόνων μυκήτων (όπως *P. aeruginosa*) (Melliou & Chinou, 2004).

A. 18. 3. Αντιπαρασιτική δράση της πρόπολης

Η πρόπολη είναι αποτελεσματική και στην αναστολή των παρασίτων, όπως Τριχομονάδες, Τρυπανοσώματα κτλ. Η αντιπαρασιτική της δράση οφείλεται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Έχει αναφερθεί η μελέτη των αντιπαρασιτικών ιδιοτήτων της πρόπολης έναντι των: *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis* και του κοκκίτη. Σε μια κλινική μελέτη καταγράφηκε η δράση της κατά των παρασίτων του γένους *Giardia* και η *in vitro* παρεμπόδιση της ανάπτυξης των *G. duodenalis* trophozoites (Freitas *et al.*, 2006).

A. 18. 4. Αντιϊική δράση της πρόπολης

Τα βιοφλαβονοειδή που περιέχονται στη πρόπολη παρουσιάζουν και αντιϊική δράση, μέσω του εγκλεισμού τους στο πρωτεϊνικό τους κάλυμμα, αντί της συμβατικής τους αντιμετώπισης αφού έχουν ήδη επιμολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μόλυνσης και την καταστροφή του DNA/RNA του ιού. Στην εκδήλωση της αντιϊικής δράσης της πρόπολης, μπορεί να εμπλέκονται και άλλα συστατικά όπως το καφεϊκό οξύ και οι εστέρες του.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η πρόπολη εκδηλώνει τις αντιϊκές τις ιδιότητες στα CD4⁺ λεμφοκύτταρα, έχει αναφερθεί ότι αφορά στην παρεμπόδιση της εισόδου του ιού. Αν και η πρόπολη εμφανίζει επιπρόσθετες αντιϊκές επιδράσεις στη δράση του αναστολέα της ανάστροφης τρανσκριπτάσης, ζιδοβουζίνης, δεν έχει αναφερθεί οποιαδήποτε εμφανής επίδραση στον αναστολέα της πρωτεάσης ιντιναβίρης. Συμπεραίνεται ότι χρειάζεται να γίνουν περισσότερες έρευνες (κλινικές δοκιμές), ώστε να διαπιστωθεί η συνεισφορά της πρόπολης ή των περιεχόμενων συστατικών της στη θεραπεία της HIV-1 λοίμωξης (Gekker *et al.*, 2005).

Αναφέρεται επίσης ότι η πρόπολη εξαιτίας της αντιϊκής της δράσης, δρα προφυλακτικώς στη γρίπη, την ηπατίτιδα Β και τον έρπητα ζωστήρα. Οι Serkedjieva *et al.* (1992) έδειξαν ότι ο φερουλικός ισοπεντυλ-εστέρας ανέστειλε την μολυσματική δράση του ιού της γρίπης virus A/Hong Kong (H₃N₂). Οι Debiaggi *et al.* (1990) εξέτασαν τη δράση διαφόρων φλαβονοειδών που ανευρίσκονται στη πρόπολη (ακακετίνη, καμφερόλη, χρυσίνη, κερκετίνη και γκαλαγκίνη). Δυο από αυτά, η χρυσίνη και η καμφερόλη, είχαν ισχυρή ανασταλτική δράση εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων ερπητοϊών, αδενοϊών και ενός ροταϊού. Αναφέρεται επίσης ότι η ακακετίνη και η γκαλαγκίνη δεν εκδήλωσαν ισχυρή αντιϊκή δράση, ενώ η κερκετίνη ήταν η λιγότερο αποτελεσματική.

Έχει αναφερθεί ότι η πρόπολη μπορεί να επιδείξει ισχυρότερη δράση στην θεραπεία του έρπητα γεννητικών οργάνων, από ότι η αντιϊκή φαρμακευτική αγωγή με ακυκλοβίρη και υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίηση της πρόπολης στη θεραπεία του HIV (De Clercq, 2000).

Η πρόπολη επίσης επιδρά ως ανοσοδιεγερτική ουσία μέσω μεταβολής της οδού παραγωγής και απελευθέρωσης των κυτοκινών (χημικοί διαβιβαστές που επιτρέπουν την επικοινωνία των ανοσοκυττάρων). Μέσω της μεταβολής του συστήματος των κυτοκινών, διεγείρεται το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε τα αντιγόνα να μπορούν να δράσουν άμεσα και αποτελεσματικά. Επίσης τα βιοφλαβονοειδή διεγείρουν την παραγωγή ιντερφερονών. Αυτή η μεταβολή στα συστήματα των κυτοκινών και ιντερφερονών έχει ως αποτέλεσμα την αντιμετώπιση ασθενειών και τη διατήρηση της υγείας του οργανισμού, μέσω της

χρησιμοποίησης της πρόπολης ως συμπλήρωμα διατροφής για πρόληψη ασθενειών (Vynograd *et al.*, 2000; De Clercq, 2000).

Στον Πίνακα 6 παρατίθενται οι μικροοργανισμοί έναντι των οποίων δείγματα ή εκχυλίσματα πρόπολης επέδειξαν θετική δράση.

Πίνακας 6. Μικροοργανισμοί στόχοι δειγμάτων πρόπολης

Μικροοργανισμός - στόχος	Σχόλια	Βιβλιογραφικές αναφορές
Βακτηριοκτόνος Δράση		
<i>Bacillus larvae</i>	Προκαλεί στις μέλισσες τη μόλυνση American foul brood	Meresta & Meresta, 1988
<i>B. subtilis</i> και άλλα είδη		Meresta & Meresta, 1985, 1986
<i>Bacillus de koch</i>	Προκαλεί φυματίωση	Karimova, 1975
<i>Staphylococcus species</i>	Συσχετίστηκε με την πρόκληση πνευμονίας	Chernyak, 1973
<i>Staphylococcus aureus</i>	Αναφέρεται συνεργιστική δράση με 13 αντιβιοτικά έναντι 10 ειδών	Meresta and Meresta, 1988
<i>Streptococcus</i>		Rojas and Cuetara, 1990
<i>Streptomyces</i>		Simuth et al., 1986
<i>S. sobrinus, mutans & cricetus</i>	Προκαλούν τερηδόνα σε αρουραίους	Ikeno et al., 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Μαγιά (brewer's yeast)	Petri et al., 1988
<i>Escherichia coli</i>		Simuth et al., 1986
<i>Salmonella</i> και <i>Shigella</i>	Γενικά	Ghisalberti, 1979
<i>Salmonella</i>	Πιθανή χρήση στην θεραπεία της σαλμονέλλωσης Μείωση των παθολογικών μεταβολών που προκαλούνται μετά από μόλυνση από <i>Salmonella</i> , σε ποντίκια	Okonenko, 1986 Okonenko, 1988
112 αναερόβια είδη	Δραστικότητα έναντι στα περισσότερα είδη	Kedzia, 1986
<i>Giardia Lambia</i>		Olariu et al., 1989
<i>Bacteroides nodosus</i>	Μείωση σήψης σε αρουραίους	Munoz, 1989
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Dimov et al., 1991
Μυκητοκτόνος Δράση		
<i>Candida albicans</i>	Αναφέρεται μειωμένη δράση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης ενώ το υδατικό εκχύλισμα χαρακτηρίζεται αδρανές Μεγαλύτερη in vitro δράση	Valdes et al., 1987 Petri et al., 1988

Μικροοργανισμός - στόχος	Σχόλια	Βιβλιογραφικές αναφορές
	Το αιθανολικό εκχυλίσμα πρόπολης εκδηλώνει ισχυρότερη δράση, όταν συγκρίνεται με 10 αντιβιοτικά, σε συνέργεια με την ναταμυκίνη και φλουκυτοσίνη	Holderna and Kedzia, 1987
<i>Aspergillus niger</i>		Petri et al., 1988
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>in vitro</i> μυκητοκτόνος δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης και μη στατιστικά σημαντική <i>in vivo</i> δράση	La Torre et al., 1990
<i>Ascosphaera apls</i>		Kedzia, 1986 & Ross, 1990
Σε 6 μύκητες που προσβάλλουν τον άνθρωπο	Η αντιμυκητιασική δράση της πρόπολης διαφέρει ανάλογα με τα δείγματα πρόπολης που χρησιμοποιούνται	Millet- Clere et al., 1987
Γενικά	Αναφέρεται αύξηση της αντιμυκητιασικής δράσης της πρόπολης υπό την παρουσία προπυλένογλυκερόλης	Millet- Clere et al., 1987
Αντιϊκή Δράση		
Έρπητας	Δράση έναντι του έρπητα 1 και 2	Sosnowski, 1984
Ιός πατάτας	Αποτελεσματική δράση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης, μειωμένη δράση υδατικού εκχυλίσματος	Fahmy and Omar, 1989
Γρίπη	Αναφέρθηκε μειωμένη θνησιμότητα από τον ιό της γρίπης σε ποντίκια μέσω ενδοφλέβιας και εκ στόματος χορήγησης εκχυλίσματος πρόπολης	Neychev et al., 1988
Νόσος Newcastle		Maksimova-Todorova et al., 1985
Δράση έναντι Παρασίτων (νηματώδεις σκώληκες)		
<i>Ascaris suum</i>	Αποτελεσματική δράση μέσω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, όταν χορηγείται στον εντερικό σωλήνα ινδικών χοιριδίων	Bankova et al., 1989

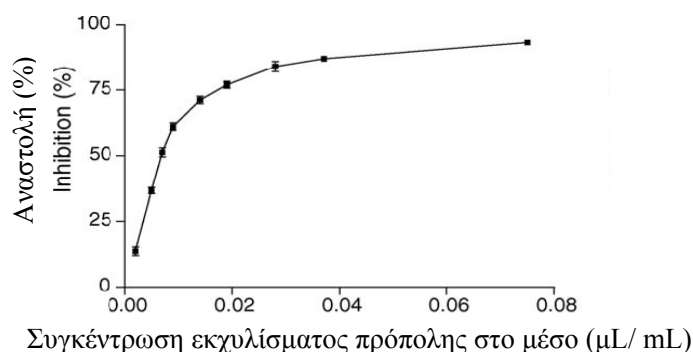
(πηγή FAO, 2007)

A. 18. 5. Αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης

Λαμβάνοντας υπόψη τις βιολογικές δράσεις της πρόπολης, αξίζει να επικεντρωθούμε ιδιαίτερα στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που εκδηλώνει, μέσω των οποίων αναφέρεται ότι μπορεί να προστατεύσει ή και να θεραπεύσει βλάβες που εμφανίζονται στο δέρμα μέσω της επίδρασης των ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species, ROS). Το δέρμα βρίσκεται σε συνεχή έκθεση στις ελεύθερες ρίζες οι οποίες παράγονται μέσω της εξελικτικής διαδικασίας γήρανσης καθώς και μέσω εξωτερικών ερεθισμάτων όπως ιονίζουσας και υπεριώδους ακτινοβολίας. Είναι ευρέως γνωστό ότι η ηλιακή ακτινοβολία, σε συνδυασμό με άφθονη παροχή οξυγόνου (το οποίο μεταβολίζεται σε ROS), προκαλεί ανεπιθύμητες και επιβλαβείς επιπτώσεις στο δέρμα μέσω του οξειδωτικού στρες (ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών σε βάρος των δευτέρων), καθιστώντας τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα ανεπαρκή. Επομένως, η ανάπτυξη ενός σκευάσματος για τοπική χρήση που να περιλαμβάνει εκχύλισμα πρόπολης θεωρείται απόλυτα δικαιολογημένη και χρηστική. Ο μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να εκδηλώσει τη δραστηριότητά του ένα φαρμακευτικό σκεύασμα, το οποίο εφαρμόζεται τοπικά στο δέρμα, αναφέρεται ότι επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης ενός δραστικού παράγοντα από το μόριο φορέα, πριν έρθει σε επαφή με την επιδερμική επιφάνεια και μέσω της διείσδυσης στο κερατινώδες και τα κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας. Στην πρόπολη υπάρχουν μεγάλες ποσότητες συστατικών τα οποία μπορούν να απελευθερωθούν από το παρασκεύασμα (Marquele *et al.*, 2006).

Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Βραζιλία έδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση σε μια σειρά δοκιμών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης μπορεί να συγκριθεί με διάφορα εκχυλίσματα φυτών, ακόμη και με γνωστά αντιοξειδωτικά συστατικά που έχουν απομονωθεί. Μέσω της δοκιμής αναστολής της προ-οξειδωτικής δράσης του λίπους το εκχύλισμα πρόπολης επέδειξε αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία προσδιορίστηκε μέσω της συγκέντρωσης εκχυλίσματος που προκάλεσε 50 % αναστολή της οξειδωτικής δράσης του χρησιμοποιούμενου συστήματος (IC₅₀), της τάξεως του 0.016 $\mu\text{L/mL}$, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα της *Glycyrrhiza glabra* προσδιορίστηκε στα 0.070 $\mu\text{L/mL}$, του *Ginkgo biloba* στα 0.05 $\mu\text{L/mL}$, της Isoflavin Beta[®] στα 0.033 $\mu\text{g/mL}$, του Red clover 0.032 $\mu\text{g/mL}$, της καθαρής κερκετίνης

στα 0.34 $\mu\text{g/mL}$ και της καθαρής α -τοκοφερόλης στα 1 $\mu\text{g/mL}$. Ανάμεσα στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης της πρόπολης, είναι η αναστολή της οξείδωσης του λίπους, η αποικοδόμηση της δεοξυριβόζης, η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH και της δοκιμής χημειοφωταύγειας μέσω της χρησιμοποίησης του συστήματος H_2O_2 /λουμινόλης/HRP και της αναστολής εκπομπής φωτός στη δοκιμή χημειοφωταύγειας μέσω του συστήματος ξανθίνης/λουμινόλης/οξειδάσης της ξανθίνης (Σχήμα 3), η οποία έδειξε και τη μεγαλύτερη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα αποτελεσμάτων (Marquele *et al.*, 2006).



Σχήμα 3. Αναστολή εκπομπής φωτός μέσω της επίδρασης εκχυλίσματος πρόπολης στο σύστημα ξανθίνης/ λουμινόλης/ οξειδάσης της ξανθίνης

Μέσω της σύγκρισης δειγμάτων πρόπολης με προέλευση από την Κίνα, την Ιαπωνία, τη Βραζιλία και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, στην εκδήλωση παρεμποδιστικής δράσης έναντι στην αυτοοξείδωση του μεθυλ- λινελαϊκού οξέος, απομονώθηκε το βενζυλ- καφεϊκό ως ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά, από το δείγμα πρόπολης από την Κίνα (Ahn *et al.*, 2007).

Σε μια μελέτη, η οποία αφορούσε στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης της πρόπολης, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα πρόπολης με νερό και μεθανόλη από 9 διαφορετικά δείγματα πρόπολης από τη Βραζιλία, το Περού, την Κίνα και την Ολλανδία. Τα υδατικά εκχυλίσματα πρόπολης από τη Βραζιλία και την Κίνα επέδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα, όπως

μετρήθηκε μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Από την άλλη τα μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από το Περού και την Ολλανδία επέδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από ότι τα εκχυλίσματα νερού. Ένα ευρέως γνωστό αντιοξειδωτικό συστατικό της πρόπολης είναι το καφεϊκό οξύ (Banskota *et al.*, 2000).

Πίνακας 7. Τιμές ED₅₀ (μg/ mL) διαφόρων εκχυλισμάτων πρόπολης
Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων πρόπολης βασισόμενη στη δέσμευση της 1,1- διφαινύλο-2-πικρύλοϋδραζύλο ελεύθερης ρίζας (DPPH)

Προέλευση δείγματος πρόπολης	Υδατικό εκχύλισμα	Μεθανολικό εκχύλισμα
Βραζιλία B-1	9.9	6.2
Βραζιλία B-2	9.7	5.9
Βραζιλία B-3	10.3	6.3
Βραζιλία B-4	12.8	12.2
Βραζιλία B-5	8.5	5.9
Βραζιλία B-6	13.1	9.3
Περού	82.3	94.9
Ολλανδία	6.0	14.6
Κίνα	14.2	7.0

B-1: μείγμα πρόπολης από διάφορες περιοχές της Βραζιλίας

B-2: πράσινη πρόπολη από Βραζιλία

B-3: πράσινη πρόπολη από το Minas Gerais Βραζιλία (καλή ποιότητα)

B-4: καφέ χρώματος από Βραζιλία

B-5: πράσινη πρόπολη από το Minas Gerais Βραζιλία (καλή ποιότητα)

B-6: πράσινη πρόπολη από το Prana Βραζιλία

(πηγή Banskota *et al.*, 2000)

Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι όταν χορηγείται η πρόπολη ως συμπλήρωμα διατροφής, ρυθμίζει τη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (AOE) και

οδηγεί σε μείωση της υπεροξειδωσής του λίπους στο πλάσμα, το ήπαρ, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο των πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκαν. Η επίδραση αυτή είναι δοσο-εξαρτώμενη. Σε μια μελέτη όπου η κατώτερη δόση πρόπολης ήταν 100 mg/kg ΣΒ και η μέγιστη δόση ήταν 300 mg/kg ΣΒ, βρέθηκε ότι με την πρόσληψη της μικρότερης δόσης, εκδηλώνονταν προστατευτική δράση, παρεμποδίζοντας την οξείδωση του πλάσματος, ενώ η πρόσληψη της μεγαλύτερης δόσης είχε ως αποτέλεσμα προ-οξειδωτική δράση. Στην ίδια ερευνητική εργασία, αναφέρεται ότι η πρόπολη είχε και προστατευτική δράση στους πνεύμονες παρεμποδίζοντας την υπεροξυγόνωση, μέσω διέγερσης της δράσης της καταλάσης (CAT). Αυτό έχει μεγάλη σημασία, αφού οι πνεύμονες των ενθλίκων είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στην πρόκληση οξειδωτικού στρες εξαιτίας της ανικανότητας να αυξήσουν την δραστικότητα των ΑΟΕ.

Εξαιτίας, λοιπόν, αυτών των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που διαθέτει, η φυσική πρόπολη μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως αντιοξειδωτικό όχι μόνο υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και σε περιπτώσεις που απαιτούν για αυξημένο χρονικό διάστημα, αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (Sobocyanec *et al.*, 2006).

Τα δείγματα πρόπολης που εκδηλώνουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, είναι αυτά που περιέχουν, σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού GC-MS, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες. Σύμφωνα με τους Ahn *et al.* (2007) το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις σε καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και φαιναιθύλ-εστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE). Η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης μπορεί να προσδιοριστεί και μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων, όπως ο αποχρωματισμός της ρίζας ABTS^{•+}, καθώς και μέσω του συστήματος β-καροτενίου- λινελαϊκού οξέος, με εκδήλωση αποχρωματισμού του β-καροτενίου. Τα συστατικά που εκδηλώνουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και κατέχουν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση οξείδωσης των λιπαρών οξέων, είναι οι φαινολικές ενώσεις και κυρίως τα φλαβονοειδή (Ahn *et al.*, 2007).

A. 18. 6. Αντικαρκινικές ιδιότητες

Η πρόπολη και τα περιεχόμενα φλαβονοειδή της, έχουν αναφερθεί ότι εκδηλώνουν αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Δείγμα πρόπολης με προέλευση από την Ολλανδία, βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Οι Banskota *et al.*, (1998) απομόνωσαν από το δείγμα αυτό τα ενεργά συστατικά: φαιναιθυλ-εστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE) και 2 εστέρες γλυκερόλης με παράγωγα του κινναμικού οξέος.

Επίσης οι Usia *et al.* (2002) απομόνωσαν από Κινέζικη πρόπολη ένα αριθμό συστατικών, υπεύθυνων για την αναστολή πολλαπλασιασμού ογκοκυττάρων. Τα περισσότερα από αυτά είναι γνωστά ως συστατικά 'propag propolis' δηλ. συστατικά πρόπολης από λεύκα και μεταξύ αυτών υπήρχαν 2 νέα φλαβονοειδή η 2-μέθυλ-βουτυρόλ-πινομπανκσίνη και η 6-κινναμυλ-χρυσίνη.

Έχει αναφερθεί ότι το CAPE είναι κυτταροτοξικό ως προς τα καρκινικά κύτταρα και τα μεταλλαγμένα από ιό κύτταρα αλλά μη-κυτταροτοξικό ως προς τα φυσιολογικά κύτταρα μέσω δοκιμών σε CD-1 and SENCAR ποντικών (Banskota *et al.*, 1998).

Ένα νέο πρενυλιωμένο παράγωγο του χρωμανίου, απομονώθηκε από τροπική πρόπολη με προέλευση τη Βραζιλία, ενώ βρέθηκαν και 22 γνωστές ενώσεις. Εξετάστηκαν όλα τα περιεχόμενα συστατικά ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι στο ανθρώπινο HT-1080 ινοσάρκωμα και στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου, σε 26-L5 τρωκτικά. Τα απομονωμένα συστατικά που εκδήλωσαν πιθανή κυτταροτοξικότητα ήταν η betuletol, το kaempferide και η ερμανίνη, τα οποία είχαν τιμές ED₅₀ μικρότερη ή ίση με 10 µg/mL. (Banskota *et al.*, 1998).

Η πρόπολη καθώς και το συστατικό της CAPE, έχει αναφερθεί ότι επιδεικνύουν αντικαρκινικές δράσεις, μέσω συρρίκνωσης των όγκων και επιλεκτικά καταστρέφουν και παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων διαφόρων τύπων καρκίνου. Ο Costas Koumenis, που ηγείται μια έρευνα με στόχο την διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης της πρόπολης, αναφέρει ότι μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες

που εκδηλώνουν οι ενώσεις αυτές είναι η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και όχι των φυσιολογικών.

Η γαστρική χορήγηση πρόπολης (160 mg/kg ΣΒ), 2 ώρες πριν την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση καρκινικών κυττάρων από καρκίνωμα Ehrlich (Ehrlich Ascitis Carcinoma, EAC), είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου. Το μέγεθος του όγκου μειώθηκε σημαντικά από 7 ± 0.9 ml στα ποντίκια τα οποία είχαν επιμολυνθεί με EAC, σε 1.6 ± 0.95 ml στα ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί πρόπολη ως θεραπευτικός παράγοντας. Επίσης μειώθηκαν και τα επίπεδα υπεροξειδίων, τα οποία είχαν προσδιοριστεί μέσω μέτρησης της παραγωγής μαλονδιαλδεΐδης (MDA) και ήταν 13.3 ± 1.24 nmol MDA/mg πρωτεΐνης στα επιμολυσμένα ποντίκια, τα οποία μειώθηκαν σημαντικά στα 3.3 ± 2.1 nmol MDA/mg πρωτεΐνης. Η αντικαρκινική δράση της πρόπολης συνοδεύτηκε και από αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Στα ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί πρόπολη παρατηρήθηκε αύξηση των μειωμένων επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και της S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Η επίδραση αυτή συσχετίστηκε με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και την επαγωγή απόπτωσης, που προάγεται από την πρόπολη. Αναφέρεται, επίσης ότι η χορήγηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την παραμονή των καρκινικών κυττάρων στην φάση G0/G1 και τελικά οδήγησε σε μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, του DNA, του ολικού RNA και των επιπέδων πρωτεΐνης των καρκινικών κυττάρων (El-khawaga *et al.*, 2003).

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με προηγούμενα ευρήματα των Yellin *et al.*, (1994), Sharma *et al.*, (1997) και Kimoto *et al.*, (2000).

Ακόμη μια μελέτη που αφορούσε στη χρησιμοποίηση υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης (WSDP) από την Κροατία και τη Βραζιλία, καθώς και συγκεκριμένων συστατικών που περιέχονται στο εκχύλισμα αυτό, όπως καφεϊκό οξύ, κερκετίνη, χρυσίνη και ναριγκενίνη, είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της ενδογαστρικής χορήγησης τους, στην ανάπτυξη του καρκινώματος Ehrlich (Ehrlich Ascites Tumor - EAT) σε ποντίκια. Τα συστατικά αυτά χορηγήθηκαν 2 h πριν από την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση του EAT σε αναλογία 50 mg/ kg σε 2×10^6 κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τόσο το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης, όσο και τα περιεχόμενα συστατικά του, ανέστειλαν αποτελεσματικά την ανάπτυξη όγκου και τον πολλαπλασιασμό του EAT, όταν χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση στον όγκο του

ασκητικού υγρού καθώς και στον ολικό αριθμό των κυττάρων που βρίσκονταν στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Η χορήγηση των συστατικών αυτών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων (PMN) και μείωση του αριθμού των μακροφάγων στην περιτοναϊκή κοιλότητα των πειραματόζων. Οι αντικαρκινικές επιδράσεις του υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης αποδείχθηκαν σημαντικότερες, υποδεικνύοντας ότι τα συστατικά που περιέχονται στη πρόπολη δρουν συνεργιστικά (Oršolić & Bašić, 2005).

A. 18. 7. Επουλωτική δράση της πρόπολης

Η πρόπολη επιταχύνει την επούλωση των κατεστραμμένων ιστών, επίδραση που οφείλεται κυρίως στα περιεχόμενα αιθέρια έλαια. Μελέτες έχουν αποδείξει την προστατευτική δράση της πρόπολης στους ιστούς, που έχουν υποβληθεί σε ραδιενέργεια. Η αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης έχει μεγάλη επίδραση στην αναγέννηση κατεστραμμένων κυττάρων, η οποία οφείλεται στα φλαβονοειδή που περιέχει και τα οποία δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Marquele *et al.*, 2006).

A. 18. 8. Ηπατοπροστατευτική δράση πρόπολης

Οι Basnet *et al.*, (1996) αναφέρουν ότι η ηπατοπροστατευτική δράση ενός αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης όπως χρησιμοποιήθηκε σε αρουραίους, αποδίδεται σε 2 ενώσεις τον μέθυλ- 3,4-δι-Ο-καφεύλ- εστέρα του κινικού οξέος και το 3,4-δι-Ο-καφεύλ-κινικό οξύ, οι οποίες απομονώθηκαν μέσω χημικής ανάλυσης. Τα δικαφεόλ-κινικά οξέα είναι πιθανοί και εκλεκτικοί αναστολείς της ιντεγκράσης του ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) και αναφέρεται επίσης ότι εμποδίζουν την αντιγραφή του HIV-1 σε μη-τοξικές συγκεντρώσεις (King *et al.*, 1999; Basnet *et al.*, 1996).

Αναφέρεται επίσης ότι παράγωγα του κινικού οξέος συμπεριλαμβανομένων και των 4-φερρουύλ-κινικών και 5- φερρουύλ-κινικών οξέων τα οποία για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν σε δείγματα πρόπολης, και άλλες φαινολικές ενώσεις ποσοτικοποιήθηκαν σε δείγματα πρόπολης από τη Βραζιλία, μέσω ανάλυσης HPLC. Τα αποτελέσματα

υποδηλώνουν ότι το δείγμα πρόπολης με βοτανική προέλευση *Citrus sp.*, έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παράγωγων του κινικού οξέος και ως εκ τούτου πιθανών εκδηλώνει μεγαλύτερη ηπατοπροστατευτική δράση (Pereira *et al.*, 2003)

Επίσης αναφέρεται ηπατοπροστατευτική δράση μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων πρόπολης από τη Βραζιλία, το Περού, την Κίνα και την Ολλανδία, όπως παρατηρήθηκε μέσω της επαγωγής κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από ποντίκια, μέσω της επίδρασης των εκχυλισμάτων πρόπολης μετά από επώαση με D- γαλακτοζαμίνη/ TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων). Μετά από σύγκριση της δραστηριότητας των μεθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης με τα υδατικά, βρέθηκε ισχυρότερη προστατευτική δράση των πρώτων έναντι των δεύτερων (Banskota *et al.*, 2000).

A. 18. 9. Αναισθητική δράση της πρόπολης

Οι αναισθητικές ιδιότητες της πρόπολης οφείλονται στα πτητικά της έλαια (αιθέρια έλαια) και συνιστάται για τοπική αναισθητική χρήση, π.χ. για δήγματα εντόμων. Έχει αναφερθεί ότι μερικά από τα συστατικά που περιέχονται στη πρόπολη εκδηλώνουν αναισθητική δράση 3 φορές ισχυρότερη από αυτή που επιδεικνύει η κοκαΐνη και 52 φορές μεγαλύτερη από την προκαΐνη, όταν εισήχθηκαν στον κερατοειδή χιτώνα λαγών. Τα σημαντικότερα συστατικά που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση αναισθησίας είναι η πινοσεμπρίνη, το καφεϊκό οξύ και η πινοστρομπίνη. Εξαιτίας αυτής της επίδρασης, η πρόπολη χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες στη θεραπεία στοματικών ερεθισμών και πονόλαιμου. Επίσης χρησιμοποιείται και ως αλοιφή στην οδοντιατρική (Januzzi, 1993)

A. 18. 10. Αντιφλεγμονώδης δράση της πρόπολης

Είναι επίσης πολύ αποτελεσματική για την αντιμετώπιση και τη θεραπεία φλεγμονών. Η αντιφλεγμονώδης δράση της καλύπτει τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τις φλεγμονές της τραχείας και του λάρυγγα κ.α. ενώ όταν χρησιμοποιείται εσωτερικά, η πρόπολη έχει αντιρευματικές ιδιότητες (Januzzi, 1993). Μια πιθανή εξήγηση για την

εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης της πρόπολης είναι η αναστολή της σύνθεσης της προσταγλανδίνης, που είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση της φλεγμονής.

Η πρόπολη χρησιμοποιείται ευρέως από το καταναλωτικό κοινό ως θεραπευτικός παράγοντας για την αντιμετώπιση της αρθρίτιδας. Αυτό οφείλεται στις πιθανές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που διαθέτουν τα περιεχόμενα συστατικά της πρόπολης και ιδιαίτερα ο φαιναιθύλ- εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE), ο οποίος αναφέρεται ότι ασκεί τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη διαφόρων φλεγμονωδών νόσων (Marquez *et al.*, 2004).

A. 18. 11. Η δράση της πρόπολης στο Σακχαρώδη Διαβήτη

Έχουν αναφερθεί οι επιδράσεις τόσο του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (εκχύλιση 30 g δείγματος σε 80% αιθανόλη στους 80 °C για 12 h) με δόση 15 mg/ml, από την βόρεια Κίνα, όσο και του υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης (εκχύλιση 30 g δείγματος στους 80 °C για 12 h) με δόση 100 mg/ml, στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης, λιπιδίων και ελεύθερων ριζών στο αίμα αρουραίων με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Τα κύρια συστατικά των ακατέργαστων δειγμάτων πρόπολης ήταν τα φλαβονοειδή: fagopyrol, κερκετίνη, καμφερόλη, ισοραμεντίνη. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι και τα 2 εκχυλίσματα, είχαν ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων γλυκόζης αίματος (FBG), φρουκτοζαμίνης (FRU), μαλονδιαλδεΐδης (MDA), μονοξειδίου του αζώτου (NO), συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (NOS), ολικής χοληστερόλης (TC), τριγλυκεριδίων (TG), LDL- χοληστερόλης (LDL-C), VLDL- χοληστερόλης (VLDL-C) στον ορό αρουραίων σε νηστεία. Επίσης ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα HDL- χοληστερόλης (HDL -C) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η πρόπολη μπορεί να επιδράσει στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης καθώς και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων αίματος, που έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη οξείδωση λιπιδίων και μείωση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, στα εξεταζόμενα πειραματόζωα.

Μέσω των πειραματικών δοκιμών βρέθηκε, επίσης, ότι τα εισαγόμενα διαλύματα πρόπολης στα πειραματόζωα, προστατεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων

μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την νευρωνική τοξικότητα. Η πρόπολη επιδεικνύει τις φαρμακολογικές τις δράσεις μέσω μείωσης της δράσης των NO και PGE₂ καθώς και παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης στο μοντέλο του Σακχαρώδη Διαβήτη και της καρκινογένεσης (Fulianga *et al.*, 2005).

A. 19. Αλλεργικά φαινόμενα

Η πρόπολη πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή, εάν υπάρχει ένδειξη αλλεργικής αντίδρασης. Ο αριθμός των αλλεργικών ατόμων στην πρόπολη είναι 1 στους 2000. Στην επιδερμίδα αυτό φαίνεται με την εμφάνιση κόκκινων κηλίδων εκεί όπου η είναι λεπτή ή/και ευαίσθητη. Βέβαια οι κηλίδες αυτές εξαφανίζονται μέσα σε μερικές μέρες. Όταν γίνεται εσωτερική χρήση της πρόπολης η εμφάνιση αλλεργικής αντίδρασης είναι πιο σπάνια. Σ' αυτή την περίπτωση εμφανίζονται μικρές κόκκινες κηλίδες στο στήθος και μια ελαφρά φαγούρα. Για τους παραπάνω λόγους, η πρόπολη θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μικρές συγκεντρώσεις στην αρχή και σε μεγαλύτερες αργότερα (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).

A. 20. Τοξικότητα της πρόπολης

A. 20. 1. Μελέτες οξείας τοξικότητας πρόπολης

Σε μια μελέτη οι Dobrowolski *et al.* (1991) χορήγησαν περίπου 700 mg πρόπολης/kg ΣΒ από το στόμα σε ομάδες 10 ποντικών και τα παρακολουθούσαν για 48 ώρες μετά τη δόση. Ανέφεραν ότι τα εκχυλίσματα πρόπολης ήταν γενικώς ανεκτά και δεν παρατηρήθηκε κανένας θάνατος κατά την περίοδο παρακολούθησης.

Ο Havsteen (1983) αναφέρει ότι τα φλαβονοειδή έχουν LD₅₀ από 2.000 μέχρι 10.000 mg/ζώο (8.000 με 40.000 mg/kg ΣΒ για ένα αρουραίο 250 g). Αν κάποιος αναλογιστεί ότι τα φλαβονοειδή είναι το κύρια βιοδραστικά συστατικά του εκχυλίσματος της πρόπολης, αναμένεται ότι η πρόπολη θα επιδείξει αμελητέα τοξικότητα, αφού τα φλαβονοειδή εμφανίζουν μειωμένη τοξικότητα ως έχουν. Για παράδειγμα, η πινοσεμπρίνη, που αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό σε διάφορα εκχυλίσματα

πρόπολης, δεν εκδήλωσε τοξικότητα όταν χορηγήθηκε από το στόμα σε ποντίκια σε συγκέντρωση 1.000 mg/kg ΣΒ.

Ακόμη, οι Arvouet-Grand *et al.* (1993) ανέφεραν ότι η εφαρμογή τόσο εκχυλίσματος πρόπολης όσο και υπό μορφή αλοιφής σε λαγούς δεν ήταν ερεθιστική.

A. 20. 2. Μελέτες τοξικότητας μέσω πολλαπλών δόσεων πρόπολης

Αιώρημα που παρασκευάστηκε από αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Βραζιλία και την Κίνα, χορηγήθηκε σε ποντίκια σε δόσεις 2230 με 4000 mg/kg ΣΒ. Μετά από 2 εβδομάδες θεραπείας, δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι, το βάρος των ποντικών αυξήθηκε κανονικά και δεν βρέθηκαν ανωμαλίες κατά τη νεκροψία. (Burdock, 1998).

Σε μελέτη από τους Hollands *et al.* (1991) χορηγήθηκε σε αρουραίους, πρόπολη σε πόσιμο νερό για να δημιουργηθεί μια χορηγούμενη δόση 1400 mg πρόπολης/kg/ημέρα για 90 ημέρες καθώς και 2470 mg πρόπολης/kg/ημέρα για 60 ημέρες. Σε αυτά τα επίπεδα δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις. (Burdock, 1998).

A. 21. Συνταγές χρήσης της πρόπολης

Η ανεπεξέργαστη πρόπολη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη φυσική της μορφή, σε κομμάτια. Ζεσταίνεται και μαλακώνει στο στόμα και μετά τοποθετείται με πίεση στο μέρος όπου υπάρχει πόνος π.χ. στο δόντι. Ακολούθως διαλύεται με το σάλιο και απορροφάται από τον οργανισμό. Η πρόπολη που χρησιμοποιείται με αυτό τον τρόπο για φλεγμονές ή έλκη στο στόμα, το λαιμό ή το λάρυγγα, είναι πολύ αποτελεσματική, καθώς διεισδύει την εσωτερική μεμβράνη αμέσως. Επίσης καταπραΰνει τον πόνο, χάρη στην αναισθητική της δράση. Η ανεπεξέργαστη πρόπολη μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί και σε μορφή κάψουλας που διαλύεται στο στομάχι και δρα σε ολόκληρο τον οργανισμό.

Η πρόπολη χρησιμοποιείται σε κρέμες καλλυντικών, σε γαλακτώματα καθαρισμού, για τη θεραπεία της ακμής και ως μάσκα προσώπου. Ως πούδρα χρησιμοποιείται στις πληγές καθώς και για τη θεραπεία του κρυολογήματος. Στις περιπτώσεις αυτές η σκόνη πρόπολης λαμβάνεται 3 φορές την ημέρα σε δόση 1 κουταλάκι του τσαγιού κάθε φορά (Χαριζάνης, 1992; Marucci, 1995).

Εκχυλίσματα πρόπολης σε αιθανόλη συγκέντρωσης 3-30%, μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε τραύματα, καψίματα και μερικές φορές σε επίμονα εκζέματα. Το αιθανολικό διάλυμα πρόπολης (PE) είναι πολύ χρήσιμο για εξωτερική ή εσωτερική χρήση και παρασκευάζεται ως εξής:

Τοποθετούνται 120 mL καθαρής αιθανόλης σε δοχείο με 100 γρ. ακατέργαστης πρόπολης. Στις επόμενες 8 ημέρες το δοχείο ανακινείται περιοδικά και αφήνεται για μερικές εβδομάδες ακίνητο. Στο διάστημα αυτό η πρόπολη διαλύεται στην αιθανόλη και καταβυθίζονται οι ξένες ουσίες. Το διάλυμα πρόπολης λαμβάνεται προσεκτικά από την πάνω επιφάνεια του δοχείου. Από το διάλυμα μπορούν να ληφθούν εσωτερικά 15-20 σταγόνες καθημερινά για την αποφυγή κρυωμάτων.

Τα προϊόντα πρόπολης σε αλοιφή λαμβάνονται με επιπλέον κατεργασία των υπολειμμάτων του διαλύματος πρόπολης, τα οποία τοποθετούνται σε υφασμάτινη σακούλα και βράζουν σε νερό. Το κερύ που μαζεύεται από την επιφάνεια του νερού περιέχει πρόπολη, η οποία χρησιμοποιείται για την παρασκευή αλοιφής. Η αλοιφή απαιτεί 150 γρ. του παραπάνω κεριού, 240 γρ. λανολίνης λιωμένης σε μπαιν-μαρί και 520 γρ. φυτικό έλαιο (σπορέλαιο και ελαιόλαδο). Αφού το μίγμα κρυώσει προστίθενται 90 γρ. από συμπυκνωμένο διάλυμα πρόπολης. Το νερό που προκύπτει από το βρασμό των υπολειμμάτων του διαλύματος πρόπολης, περιέχει υδατοδιαλυτά συστατικά της πρόπολης και έχει αντισηπτικές ιδιότητες. Με την προσθήκη αιθανόλης, για την καλύτερη συντήρησή του, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προστατευτικό επιδερμίδας μετά το ξύρισμα. Η λοσιόν λαμβάνεται με προσθήκη αιθέριων ελαίων (λεβάντα, μέντα) (Januzzi, 1990; Januzzi, 1993).

A. 22. Προϊόντα με πρόπολη

Στο εμπόριο η πρόπολη κυκλοφορεί σε: ταμπλέτες, κάψουλες, βάμματα, διαλύματα, καραμέλες, τσίχλες, ποτά, οδοντόπαστες και στοματικά διαλύματα

Στη βιομηχανία παρασκευής λειτουργικών τροφίμων, χρησιμοποιείται εκχύλισμα πρόπολης σε γλυκερίνη για την δημιουργία των εμπορικών μορφών της πρόπολης. Επίσης σε σκευάσματα με άλλα προϊόντα, μέλι, γύρη, βασιλικό πολτό, Echinacea, ρινικό σπρέι με θαλασσινό νερό. (Burdock, 1998)



Εικόνα 6. Προϊόντα πρόπολης

A. 23. Χρήσεις της πρόπολης στην Ιατρική

Γενικά η πρόπολη χρησιμοποιείται στους κλάδους:

- ☐ Δερματολογία: βακτηριακές και μυκητιακές λοιμώξεις, τραύματα, εγκαύματα, έλκη, ψωρίαση, έκζεμα
- ☐ Ωτορινολαρυγγολογία: Στοματολογία: καταπολέμηση ουλίτιδας, στοματίτιδας
- ☐ Γαστεντερολογία: παράσιτα
- ☐ Ρευματολογία
- ☐ Μετεγχειρητικά προβλήματα
- ☐ Ουρολογία: προστάτης, υπερπλασία, λοιμώξεις ουροποιητικού. Η πρόπολη

κυκλοφορεί σε ορισμένες Ευρωπαϊκές χώρες, ως φαρμακευτικό παρασκεύασμα για την καταπολέμηση της υπερπλασία του προστάτη (Pereira *et al.*, 2002).

Στον Πίνακα 8 παρατίθενται οι κυριότερες εφαρμογές της πρόπολης στην καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών.

Πίνακας 8. Εφαρμογές – Χρήσεις της πρόπολης

Εφαρμογές	Σχόλια	Βιβλιογραφική αναφορά
Προστασία από τον ερεθισμό	Σε ποντίκια μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης Μέσω της δέσμευσης ελευθέρων ριζών	Scheller et al., 1989 Scheller et al., 1990
Αντικαρκινική δράση	Ανασκόπηση της αντικαρκινικής, αντιϊκής, ενδοκρινολογικής δράσης του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του, που ανευρίσκονται σε εκχύλισμα πρόπολης. Στο καρκίνωμα Ehrlich Κντταροτοξική δράση σε καλλιέργειες ανθρώπινων και ζωικών καρκινικών κυττάρων.	Konig, 1988 Scheller et al., 1989 Grumberger et al., 1988
Σε έλκη	Από ιστορικά ασθενών Εκδηλώνει ευεργετικές ιδιότητες σε έλκη στομάχου και δωδεκαδακτύλου	Makarov, 1972 Gueorguivena and Vassilev, 1990
Στη λέπρα	Δραστικότητα έναντι της λέπρας	Grange, 1990
Στην αναγέννηση κυττάρων στα θηλαστικά	Αναφέρεται η δραστικότητα της πρόπολης στην ενεργοποίηση του κυκλοφορικού συστήματος, διαφόρων ενζυμικών συστημάτων, στο σχηματισμό κολλαγόνου, στην επούλωση εγκαυμάτων Επιταχύνει την επιδιόρθωση των επιθηλιακών κυττάρων σε πληγές στο δέρμα αρουραίων	Διάφορες ανασκοπήσεις Filho and Carvalho, 1990
Αναισθητική δράση	Έχει εκδηλώσει αναισθητική δράση σε μεγάλες συγκεντρώσεις, είτε ακατεργαστη είτε ως εκχύλισμα Χρησιμοποίηση ως αλοιφή στην οδοντιατρική	Crane, 1990 Sosnowski, 1984
Οδοντιατρική	Μετά από χρησιμοποίηση πρόπολης έχει ανιχνευθεί λιγότερη τερηδόνα σε αρουραίους Επικουρική θεραπεία για την καταπολέμηση της ουλίτιδας και της πλάκας Ως αντισηπτικό	Ikeno et al., 1991 Neumann et al., 1986 Gafar et al., 1986

Εφαρμογές	Σχόλια	Βιβλιογραφική αναφορά
Άλλες ιατρικές εφαρμογές	Ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης σε ποντίκια Αναφέρθηκε βελτίωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος σε 2 περιπτώσεις με τη χρησιμοποίηση ενός διαλύματος που περιείχε αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης Σε βρογχίτιδα διαπιστώθηκε καλύτερη πρόγνωση με τη χρησιμοποίηση εισπνεόμενου αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης μαζί με πρόπολη σε δισκία και δολομίτη Διαπιστώθηκε αντι-υπερτασική, ηρεμιστική δράση καθώς επίσης και προστατευτική δράση από την επίδραση τετραχλωριδίου και αιθανόλης στο ήπαρ και στην ανάπτυξη έλκους στομάχου, σε αρουραίους και ποντίκια Ενδυνάμωση τριχοειδών αγγείων Θεραπεία αγγειοκινετικής καταρροής με χρήση πρόπολης σε αλοιφή Χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία της Legg-Calve-Perthes νόσου (νόσος στην άρθρωση μηριαίου- λαγόνιου οστού), μέσω χορήγησης διαλύματος πρόπολης απευθείας στην άρθρωση	Manolova et al., 1987 Scheller et al., 1989 Scheller et al., 1989 Kedzia et al., 1988 Budavari, 1980 Zommer- Urbanska et al., 1989 Przybylski and Scheller, 1985
Χρήση στην κτηνιατρική	Παρατηρήθηκε βελτίωση στην πρόσληψη βάρους και μείωση διάρροιας σε μοσχάρια τα οποία τρέφονταν με γάλα, μέσω της χορήγησης 5 ml αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης 20%, πρωί και βράδυ. Σε μαστίτιδα, αναφέρεται επιτυχής θεραπεία ακόμη και σε φλεγμονές που ανθίστανται στη δραστηριότητα αντιβιοτικών. Σε κοκκίτη (coccidiosis) σε κουνέλια, μέσω χορήγησης αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης 3%, από το στόμα.	Gubicza and Molnar, 1987 Meresta et al., 1989 Hollands et al., 1988

Εφαρμογές	Σχόλια	Βιβλιογραφική αναφορά
	Στη θεραπεία της Eimeria (παρασιτική λοίμωξη που προσβάλλει τον εντερικό σωλήνα), με χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης 2-3%, από το στόμα για 4 εβδομάδες.	Hollands et al., 1984
Ως αντιοξειδωτικό	Ως αποτέλεσμα της συνέργειας των ποικίλων συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη. Παρουσία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε τροφή ζώων, το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης διαπιστώθηκε ότι είναι περισσότερο δραστικό από την βιταμίνη E. Στην προστασία του ηλιελαίου από την οξειδωση. Στην αντιμετώπιση της υποξίας, σε λυοφυλιωμένη μορφή των φαινολικών πολυσακχαριτών. Ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα, χωρίς επιστημονικές αποδείξεις	Yanishlieva and Marinova, 1986 Okonenko et al., 1988 Yanishlieva et al., 1986 Tikhonov and Mamontova, 1987 Διάφορες ανασκοπήσεις
Φυτοφάρμακο	Αποτελεσματική δράση σε <i>in vitro</i> πειραματικές δοκιμές έναντι του παρασίτου (που προσβάλλει τις φράουλες) <i>Botrytis cinerea</i>	La Torre et al., 1990
Παρεμπόδιση βλάστησης φυτών	Παρεμποδίζει την ανάπτυξη πατάτας, σπόρων και φυλλωδών λαχανικών	Bianchi, 1991

(πηγή FAO, 2007)

Αναφέρεται ότι η πολύπλοκη χημική σύσταση της πρόπολης αποτελεί επιθυμητό χαρακτηριστικό ως προς την συνεργιστική δράση των περιεχόμενων συστατικών, έναντι των μικροοργανισμών. Επομένως, η πρόπολη θα πρέπει να θεωρείται μια σύνθετη φυσική πηγή για τον έλεγχο και την αναστολή της δράσης των μικροοργανισμών, παρά ως ουσία που περιέχει αντιμικροβιακά συστατικά. Από αυτή τη σκοπιά, ικανοποιούνται οι προσδοκίες μιας μερίδας του καταναλωτικού κοινού που αναζητά εναλλακτικές και φυσικές μεθόδους θεραπείας και διατροφής (Salatino *et al.*, 2005).

Κεφάλαιο Β

Κύρια Συστατικά Πρόπολης

Β. 1. Κύρια δραστικά συστατικά πρόπολης και πιθανές δράσεις τους

Τα σημαντικότερα συστατικά πρόπολης από την Ελλάδα είναι οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή) και τα τερπενικά οξέα. Παρακάτω αναφέρονται οι δράσεις των κύριων βιοδραστικών συστατικών της κάθε κατηγορίας

Β. 1. 1. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Η δομή τους ποικίλει από απλή (π.χ στα φαινολικά οξέα) έως πολύπλοκη, πολυμερή δομή (ταννίνες). Οι πολυφαινολικές ενώσεις κατατάσσονται κατά τον Harborne σε 15 κύριες τάξεις:

απλές φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα (βανιλλικό), ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, υδροξυκιναμμωμικά οξέα (καφεϊκό, κουμαρικό), κουμαρίνες και ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες, νεολιγνάνες και λιγνίνες.

Από τις παραπάνω κατηγορίες η σημαντικότερη είναι αυτή των φλαβονοειδών η οποία διαιρείται περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες διαθέτοντας συνολικά περισσότερα από 5000 μέλη. Αυτές είναι οι χαλκόνες, οι διϋδροχαλκόνες, οι χρυσόνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι διϋδροφλαβονόλες, οι φλαβονόνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβανοδιόλες, οι ανθοκυανιδίνες, τα ισοφλαβονοειδή και τέλος τα διφλαβονοειδή, οι προανθοκυανιδίνες (Bruneton, 1995).

B. 1. 2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων χρωστικών που βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα φυτά και αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών φαρμάκων φυτικής προέλευσης. Στα ανώτερα φυτά, απαντώνται υπό μορφή γεννινών ή γλυκοσιδών. Επειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση συνιστούν μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων, αντικαρκινικών, αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντιβακτηριακών, αντιαλλεργικών και αντιϊικών. Χρησιμοποιούνται ως συστατικά τροφίμων και καλλυντικών. Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος παίρνει με την τροφή του 1 gr ημερησίως (Wijesekera, 1991).

B. 2. Χαρακτηριστικά των κυριότερων ενώσεων που απαντούν στην Ελληνική πρόπολη

B. 2. 1. Καφεϊκό οξύ (Caffeic acid)

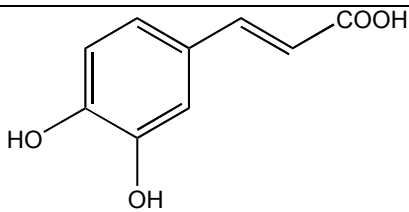
Αποτελεί φαινολικό οξύ, που απαντάται σε πολλά φρούτα, λαχανικά και βότανα, συμπεριλαμβανομένου και του καφέ, ενώ οι συγκεντρώσεις του ποικίλουν ανάλογα με τη φυτική προέλευση. Είναι διαλυτό σε ζεστό νερό και σε αιθανόλη. Έχει παρόμοια χημική δομή με το κινναμικό οξύ, με τη διαφορά ότι το καφεϊκό οξύ διαθέτει δυο επιπλέον υδροξύλια. Και τα δύο οξέα περιλαμβάνονται στην ομάδα των καρβοκυκλικών οξέων. Μπορεί να εστεροποιηθεί με το κιννικό οξύ προς σχηματισμό του χλωρογενικού οξέος. Τόσο το καφεϊκό όσο και το χλωρογενικό οξύ, ανευρίσκονται στους καρπούς του καφέ.

Το καφεϊκό οξύ, βρέθηκε ότι αναστέλλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη των όγκων σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου του δέρματος σε ζώα. Επίσης αναστέλλει τις νεοπλασματικές διηθήσεις και τις μεταστάσεις, έχει επιδείξει ανασταλτική δράση κατά της καρκινογένεσης στο ήπαρ και στη γλώσσα σε ζώα και εμπόδισε την ανάπτυξη ανθρωπίνων λευχαιμικών κυτταρικών σειρών κατά τρόπο δοσοεξαρτώμενο. Τέλος, το καφεϊκό οξύ κατέστειλε τις χημικώς προκληθείσες νεοπλασίες στον προστόμαχο ζώων. Ωστόσο δεν συμφωνούν όλες οι ερευνητικές εργασίες, όσον αφορά στις αντικαρκινικές

δράσεις του καφεϊκού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το καφεϊκό οξύ προάγει την καρκινογένεση στον προστόμαχο των ποντικών.

Το καφεϊκό οξύ είναι γνωστό αντιοξειδωτικό τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και αναφέρεται ότι συμβάλει στην πρόληψη της εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες του καφεϊκού οξέος έχει αναφερθεί ότι προστατεύουν τα κύτταρα του δέρματος όταν εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ιδιαίτερα σε UVC και UVB. Επίσης το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του εκδηλώνουν ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις. (Staniforth, Chiu & Yang, 2006).

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά Καφεϊκού Οξέος

Καφεϊκό οξύ	
	
Γενικά	
Χημική ονομασία	3-(3,4-Dihydroxyphenyl) 3,4-Dihydroxy-cinnamic acid trans-Caffeate 3,4-Dihydroxy-trans-cinnamate) 2-propenoic acid (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 3,4-Dihydroxybenzeneacrylicacid 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid
Χημικός τύπος	C ₉ H ₈ O ₄
Μοριακή μάζα	180.16 g/mol
Πυκνότητα	1.478 g/cm ³
Εμφάνιση	Κρυσταλλική κίτρινη σκόνη
Ιδιότητες	
Διαλυτότητα στο νερό	Διαλυτό σε θερμό νερό (διαλυτό σε αιθανόλη)
Σημείο τήξης	223 - 225 °C

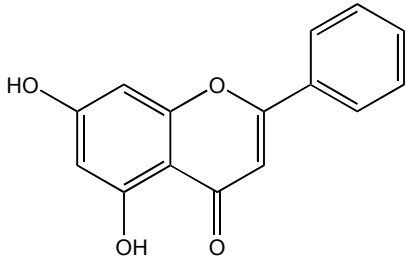
B. 2. 2. Χρυσίνη (Chrysin)

Η χρυσίνη είναι ένα ισοφλαβονοειδές που απαντάται στη φύση με τη μορφή γλυκοζιτών και παραλαμβάνεται με απόσταξη από το χρώματος κυανού φυτό *Passiflora caerulea*. Ανευρίσκεται επίσης στα είδη *Pelargonium*, *Pinaceae* και μικρά ποσά περιέχονται και στις κηρήθρες. Συχνά χρησιμοποιείται ως αναβολική ουσία σε αθλητές εξαιτίας της πιθανολογούμενης δράσης της ως αναστολέα της αρωματάσης (κατά τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα). Ο μηχανισμός δράσης είναι μέσω της δέσμευσης της χρυσίνης στον α και β υποδοχέα οιστρογόνων.

Έχει αναφερθεί ότι μπορεί να διαθέτει φυτο-οιστρογονική δράση, αντιοξειδωτικές και αγχολυτικές ιδιότητες. Η αντιοξειδωτική της δράση επιδεικνύεται μέσω της ικανότητάς της να αναστέλλει το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης και συνεπώς να παρεμποδίζει το σχηματισμό του ουρικού οξέος και μερικών δραστικών μορφών οξυγόνου. Επίσης αναστέλλει και την προ-οξειδωτική δράση του λίπους. Σε *in vitro* πειραματικές δοκιμές, έχει παρατηρηθεί ότι η χρυσίνη δεσμεύεται σε μια περιοχή του GABA_A υποδοχέα (υποδοχέας βενζοδιαζεπίνης) (Jeong *et al.*, 1999; Capasso *et al.*, 1998).

Η χρυσίνη εκδηλώνει επίσης αντικαρκινικές δράσεις, μέσω αναστολής της έκφρασης του ινσουλινο-εξαρτώμενου παράγοντα (hypoxia-inducible factor-1 α) HIF-1 α και του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του προστάτη (DU145). Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνει αυτή την δράση είναι μέσω αύξησης της προλύλ- υδροξυλίωσης του παράγοντα HIF-1 α , μειώνοντας έτσι τη σταθερότητά του. Αυτή η παρεμποδιστική δράση της χρυσίνης, στον παράγοντα HIF-1 α , έχει ως αποτέλεσμα αναστολή στην έκκριση του DU145 (Fu *et al.*, 2007).

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά Χρυσίνης

Χρυσίνη	
	
Γενικά	
Χημική ονομασία	5,7-dihydroxyflavone και 5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
Χημικός τύπος	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
Μοριακό Βάρος	254.24 g/mol
Εμφάνιση	Κίτρινη σκόνη
Ιδιότητες	
Διαλυτότητα στο νερό	Αδιάλυτο
Σημείο τήξης	284-290°C
Σταθερότητα	Σταθερό σε συνθήκες περιβάλλοντος

B. 2. 3. Απιγενίνη (Apigenine)

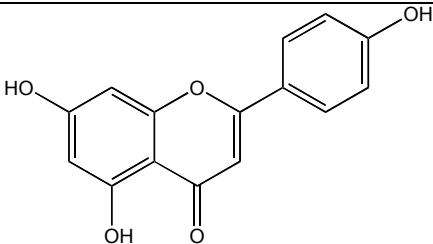
Η απιγενίνη είναι μια φλαβόνη που απομονώνεται από τον μαϊντανό, το δυόσμο και το σέλινο. Αναγνώριζεται επίσης και σε βότανα, όπως χαμομήλι, μέντα, βερβένα, μυριόφυλλο. Χρησιμοποιείται κυρίως ως βαφική ύλη μάλλινων υφασμάτων.

Μέσω της κατανάλωσης τροφίμων που περιέχουν απιγενίνη, εκδηλώνονται και οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, ενώ επίσης αναφέρεται ότι προάγει τον μεταβολισμό υδατανθράκων καθώς και ότι ρυθμίζει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Μια πιθανή δράση της απιγενίνης είναι η παρεμπόδιση του σχηματισμού ουρικού οξέος, με αποτέλεσμα η χρησιμοποίησή της από ασθενείς με ουρική αρθρίτιδα, να είναι ευεργετική.

Δεν παρουσιάζει τοξικότητα και διαθέτει αντικαρκινικές ιδιότητες, γεγονός που εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ενός νέου παράγοντα χημειοθεραπείας για τον καρκίνο. Αναφέρεται ότι η απιγενίνη παρεμποδίζει την έκφραση του αγγειακού

ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (vascular endothelial growth factor, VEGF), που συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου. Η απιγενίνη επίσης προάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων στον αυχένα, μέσω της δράσης της σε μεταβολική οδό που επηρεάζεται από το κυτόχρωμα p53. Ακόμη, παρεμποδίζει την παραγωγή της ιντερλευκίνης- 4 (IL-4) και της ιντερλευκίνης -13 (IL-13) από ενεργοποιημένα βασεόφιλα, στον ανθρώπινο οργανισμό (Fang *et al.*, 2005).

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά Απιγενίνης

Απιγενίνη	
	
Γενικά	
Χημική ονομασία	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, Naringenin chalcone, 5,7,4'-Trihydroxyflavone, 4',5,7-Trihydroxyflavone, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, 5,7-Dihydroxi-2-(4-hidroxiifenil)-4-benzopirona, 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4-benzopyrone
Χημικός τύπος	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Μοριακό Βάρος	270.23 g/mol
Εμφάνιση	Κρυσταλλική κίτρινη σκόνη
Ιδιότητες	
Διαλυτότητα στο νερό	Αδιάλυτο (ελαφρώς διαλυτό σε θερμή αιθανόλη)
Σημείο τήξης	345-350 °C
Σταθερότητα	Σταθερό σε συνθήκες περιβάλλοντος

B. 2. 4. Ναριγκενίνη (Naringenin)

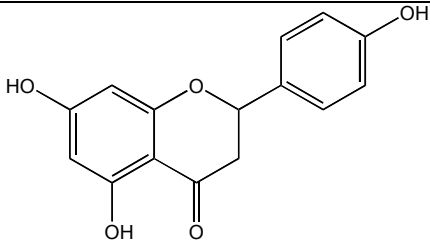
Η ναριγκενίνη αποτελεί ένα βιοφλαβονοειδές που συγκαταλέγεται στα κιτρικά φλαβονοειδή και συγκεκριμένα στις φλαβανόνες και βρίσκεται σε αφθονία στη φύση. Μέσω της κατανάλωσης λαχανικών, αποδίδονται ποικίλες από τις ευεργετικές βιολογικές επιδράσεις της. Οι κύριες πηγές πρόσληψης της ναριγκενίνης είναι τα εσπεριδοειδή και οι τομάτες (*Lycopersicum esculentum*). Στα εσπεριδοειδή, η ναριγκενίνη ανευρίσκεται ως γλυκοζίτης, ενώ στην τομάτα, όπου η συγκέντρωση της είναι αυξημένη (0,8 με 4,2 mg/100 g), ανευρίσκεται σε μη γλυκοζυλιωμένη μορφή.

Η ναριγκενίνη εκδηλώνει αντι-οιστρογονική δράση, η οποία πιθανόν να οφείλεται και για την μειωμένη επίπτωση καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που καταναλώνουν μεγάλες συγκεντρώσεις φυτο-οιστρογόνων. Επίσης, μέσω της αναστολής της σύνθεσης του εστέρα της χοληστερόλης, εκδηλώνει υποχοληστερολαιμικές επιδράσεις. Έχει αναφερθεί ότι απενεργοποιεί μερικώς την αντίδραση Fenton, αποκαθιστά την εξαρτώμενη από τη γλουταθειόνη, προστασία έναντι της υπεροξειδωσής του λίπους και αναστέλλει την παραγωγή μαλοναλδεϋδης, που επάγεται είτε μέσω οξειδωσής, ή μέσω της επίδρασης του ασκορβικού οξέος στα μιτοχόνδρια. Επομένως, η ναριγκενίνη εκδηλώνει προστατευτικές επιδράσεις στην εμφάνιση χρόνιων εκφυλιστικών νόσων. Ακόμη, ρυθμίζει το μεταβολισμό διαφόρων ξеноβιοτικών όπως φαρμάκων, καρκινογόνων ουσιών και μολυσματικών παραγόντων, μέσω του κυτοχρώματος p450 (Bugianesi *et al.*, 2002).

Διαθέτει, επίσης, αντιφλεγμονώδεις και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί ότι η πολυφαινόλη αυτή μπορεί να επιδιορθώνει τις βλάβες του DNA. Μετά από έκθεση των κυττάρων σε 80 μ moles ναριγκενίνης/λίτρο για 24 ώρες, η καταστροφή του DNA εξαιτίας υδροξυλίωσης, μειώθηκε κατά 24%. Παρόλα αυτά η απορρόφηση της φλαβανόνης δυσχεραίνεται όταν προσλαμβάνεται από το στόμα. Αναφέρεται ότι μόνο ένα ποσοστό 15% της ναριγκενίνης που καταναλώνεται, απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα. Εκδηλώνει αντικαρκινική, καρδιοπροστατευτική και αντιϋπερτασική δράση και επίσης εμφανίζει προστατευτική δράση στη νόσο Alzheimer's. Η ναριγκενίνη που προσλαμβάνεται από χυμό εσπεριδοειδών, εκδηλώνει

παρεμποδιστική δράση στην έκκριση της ακετυλοχολινεστεράσης με μια δόσοεξαρτώμενη σχέση και μετριάζει με αυτό τον τρόπο την αμνησία (Heo *et al.*, 2004).

Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά Ναριγκενίνης

Ναριγκενίνη	
	
Γενικά	
Χημική ονομασία	2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, 4,5,7-Trihydroxyflavanone; 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one
Χημικός τύπος	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Μοριακό Βάρος	272.257 g/mol
Εμφάνιση	Κρυσταλλική κίτρινη σκόνη
Ιδιότητες	
Σημείο τήξης	247-250°C
Σταθερότητα	Σταθερό σε συνθήκες περιβάλλοντος

B. 2. 5. Καμφερόλη (Kaempferol)

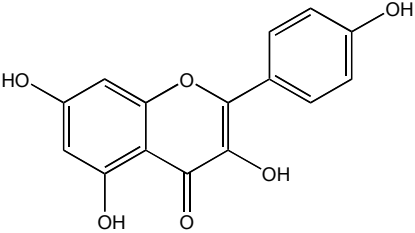
Η καμφερόλη είναι ένα флаβονοειδές που απομονώνεται από το *Delphinium*, το γκρέιπ-φρουτ και άλλα φυτικά είδη όπως μήλα, κρεμμύδια, εσπεριδοειδή, σταφύλια, το ginkgo biloba και το σπαθόχορτο (St. John's wort). Επίσης ανευρίσκεται στο πράσινο τσάι, στα μούρα καθώς και στα είδη *Brassica* και *Allium* (σκόρδο). Συγκαταλέγεται στην κατηγορία των φυτο-οιστρογόνων. Έχει αναφερθεί ότι η καμφερόλη αποτελεί την κυριότερη πηγή флаβονολών, συνεισφέροντας κατά 22–29% στην ολική πρόσληψη флаβονοειδών μέσω της διαίτας (de Vries *et al.*, 1997).

Η καμφερόλη δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό προστατεύοντας τις βλάβες που προκαλούνται στα κύτταρα, τα λιπαρά οξέα και το DNA από την επίδραση της

οξειδωσης. Φαίνεται ότι η καμφερόλη δρα και ως προληπτικό μέτρο παρεμπόδισης της αθηροσκλήρυνσης μέσω της αναστολής της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), και της συσσώρευσης αιμοπεταλίων στο αίμα. Επίσης, μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη δράση της καμφερόλης ως παράγοντα χημειοθεραπείας, αφού αναστέλλει την πρωτεΐνη MCP-1, η οποία επιδρά στα αρχικά στάδια του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας. Η καμφερόλη και η κερκετίνη αναφέρεται ότι δρουν συνεργιστικά και παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Ο μηχανισμός δράσης της καμφερόλης είναι μέσω της μείωσης της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων σε φαρμακευτική αγωγή όπως είναι η vinblastine και η paclitaxel.

Επίσης, η καμφερόλη μειώνει εκλεκτικά την απόπτωση των λείων μυικών αγγειακών κυττάρων, που προάγεται μέσω της επίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Niering *et al.*, 2005).

Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά Καμφερόλης

Καμφερόλη	
	
Γενικά	
Χημική ονομασία	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one
Χημικός τύπος	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Μοριακό Βάρος	286.23 g/mol
Εμφάνιση	Κρυσταλλική κίτρινη σκόνη
Ιδιότητες	
Σημείο τήξης	276-278 °C
Διαλυτότητα στο νερό	Αδιάλυτο (ελαφρώς διαλυτό σε θερμή αιθανόλη και στον διαίθυλ-αιθέρα)
Σταθερότητα	Σταθερό σε συνθήκες περιβάλλοντος

B. 3. Τερπενικά οξέα

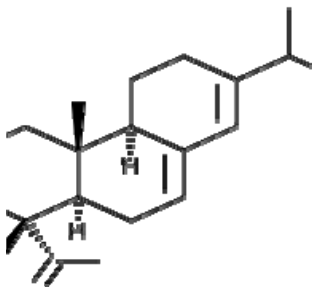
Στα τερπενικά οξέα που ανευρίσκονται στη πρόπολη, συγκαταλέγονται τα υδρόξυ-πεντακυκλικά τερπενικά οξέα (HTPA) και τα ρητινώδη οξέα (resin acids). Τα πιο συχνά απαντώμενα HTPA είναι το ουρσολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ, τα οποία εκδηλώνουν ποικίλες ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό και θεωρούνται ηπατοπροστατευτικά, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινικά, αντι-υπερλιπιδαιμικά, ενώ το ουρσολικό οξύ εμφανίζει και προστατευτική δράση έναντι του HIV ιού (Liu, 1995; Xu *et al.*, 1996). Τα πιο συχνά απαντώμενα ρητινώδη οξέα είναι τα τρικυκλικά διτερπένια τα οποία διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: τις αβιετάνες, που διαθέτουν ισοπρόπυλ-υποκατεστημένη ομάδα στον C-13, και τις πιμαράνες, που διαθέτουν μέθυλ- και βίνυλ-υποκατεστημένες ομάδες στον C-13 (Mohn, 1995). Στην κατηγορία των αβιετανών συγκαταλέγονται το αβιετικό οξύ και το δίδυδροαβιετικό οξύ, ενώ στην κατηγορία των πιμαρανών συγκαταλέγονται το πιμαρικό οξύ και το ισοπιμαρικό οξύ. Τόσο οι αβιετάνες όσο και οι πιμαράνες εκδηλώνουν αντιμυκησιακές, αντιπαρασιτικές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές δράσεις (Smith *et al.*, 2005; Mohn, 1995). Παρακάτω αναφέρονται τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του αβιετικού οξέος που αποτελεί το κύριο τερπενικό οξύ που απομονώνεται από τη πρόπολη με φυτική προέλευση από το είδος *Pinus*.

B. 3. 1. Αβιετικό οξύ (Abietic acid)

Αποτελεί την κύρια ερεθιστική ένωση του ξύλου του πεύκου και της ρητίνης του. Είναι αδιάλυτο στην ακετόνη και σε αιθέρες. Χρησιμοποιείται στην παραγωγή βερνικιών και σαπουνιών. Έχει καταταχθεί ως τοξική ουσία στο Toxic Substances Control Act. Μέσω της επαφής με το δέρμα, το αβιετικό οξύ εκδηλώνει ασθενείς αλλεργικές αντιδράσεις, ενώ τα προϊόντα της οξειδωσής του από τον αέρα, προκαλούν πιο έντονες αντιδράσεις.

Εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες όπως βρέθηκε από μελέτες που έγιναν σε οιδήματα των κάτω άκρων σε αρουραίους, μέσω αναστολής της παραγωγής της προσταγλανδίνης PGE₂ και επιδρά μερικώς στην αναστολή της παραγωγής του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α και της ιντερλευκίνης IL-1β (Grissea-Fernandez *et al.*, 2001).

Πίνακας 13. Χαρακτηριστικά Αβιετικού Οξέος

Αβιετικό οξύ	
	
Γενικά	
Συστηματική ονομασία	13-isopropylpodocarpa-7,13-dien-15-oic acid
Άλλη ονομασία	Συλβικό οξύ - Sylvic acid
Χημικός τύπος	C ₁₉ H ₂₉ COOH
Μοριακή μάζα	302.44 g/mol
Εμφάνιση	Κρυσταλλική κίτρινη σκόνη
Ιδιότητες	
Διαλυτότητα στο νερό	Αδιάλυτο
Σημείο τήξης	173 °C (446 K)
Σημείο βρασμού	250 °C (523 K) στα 9 mmHg

Κεφάλαιο Γ

Μικροενθυλάκωση

Γ. 1. Εισαγωγή

Η μικρο-ενθυλάκωση (Micro-encapsulation) είναι μια τυπική διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός άμορφου και συνεχούς στρώματος γύρω από τα διεσπαρμένα μόρια (Roos, 1995). Είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για τη μεταφορά φαρμάκων, ενώ στην τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιείται κυρίως για τη μεταφορά αρωματικών συστατικών (Schooyen, 2001). Η ενθυλάκωση, μέσω παγίδευσης αρωματικών συστατικών, επιτρέπει την παραγωγή στερεών στρωμάτων στα οποία τα διεσπαρμένα αρωματικά μόρια προστατεύονται από την απώλεια και τις ανεπιθύμητες μεταβολές, όπως η οξείδωση. Η εφαρμογή του εγκλεισμού έχει γίνει ευρέως αποδεκτή στη βιομηχανία των αρωματικών συστατικών και οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις είναι πτητικές και χημικώς ασταθείς παρουσία οξυγόνου, φωτός, νερού και θέρμανσης (Risch, 1995).

Με τη χρήση της τεχνολογίας της ενθυλάκωσης σε συστατικά των τροφίμων, επιτυγχάνονται τα εξής:

1. Ο διαχωρισμός συστατικών
2. Η μείωση την τοξικότητας ενός υλικού
3. Η αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων ενός υλικού
4. Η μείωση της ευφλεκτότητας των υγρών
5. Η αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης (χρόνου ζωής)
6. Η επικάλυψη της δυσάρεστης γεύσης συγκεκριμένων συστατικών
7. Η μείωση της υποβάθμισης και παραγωγή τοξικών προϊόντων λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων
8. Η αύξηση της διαλυτότητας συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο
9. Η μετατροπή σε στερεή σκόνη, ουσιών που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση, με αποτέλεσμα την εύκολη μεταφορά τους και προσθήκη σε μίγματα τροφίμων (Betrolini, *et al.*, 2001, Schrooyen, *et al.*, 2001).

Στην τεχνολογία της μικροενθυλάκωσης, το συστατικό που πρόκειται να ενθυλακωθεί, αναφέρεται ως πυρηνικό υλικό, ενεργή φάση, ή εσωτερική φάση (internal phase). Το υλικό που περιβάλλει το προς ενθυλάκωση συστατικό αναφέρεται ως βάση εγκλεισμού, μεταφορέας ή κάλυμμα (crust, vehicle) (Gibbs, 1999).

Γ. 2. Τεχνικές μικροενθυλάκωσης

Γενικά οι τεχνικές που οδηγούν στο σχηματισμό τοιχώματος γύρω από το εγκλεισμένο συστατικό, εγγυώνται ότι δεν παρατηρούνται διαρροές και διαβεβαιώνουν ότι οι ανεπιθύμητες ουσίες παραμένουν εκτός. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο εγκλεισμός οδηγεί σε τελικό προϊόν με τη μορφή στερεής σκόνης, αφού συνήθως η μέθοδος περιλαμβάνει σύστημα απομάκρυνσης του νερού από το διάλυμα ή το αιώρημα του συμπλόκου (Beristain *et al*, 1996).

Οι πιο γνωστές τεχνικές εγκλεισμού, που περιγράφονται στην βιβλιογραφία είναι:

- spray drying (ξήρανση με ψεκασμό)
- lyophilization or freeze-drying (λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη)
- spray cooling ή spray chilling (ψύξη με ψεκασμό)
- co-crystallization (συγκρυστάλλωση)
- absorption (απορρόφηση)
- spinning disk (περιστρεφόμενος δίσκος)
- rapid expansion of supercritical solution (ταχεία εκτόνωση υπερκρίσιμου διαλύματος)
- liposome entrapment (εγκλεισμός σε λιποσώματα)
- fluidized bed (ρευστοποιημένη κλίνη)
- extrusion (εξώθηση ή εκβολή)
- formation of inclusion complex (σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού) (Szente & Szejtli, 2004).

Παρακάτω περιγράφονται οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρύτατα, η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό και η λυοφιλίωση. Η τελευταία χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος επιλογής για την ξήρανση του διαλύματος και του γαλακτώματος του

εγκλειόμενου συστατικού, στα πλαίσια της πειραματικής εκτέλεσης αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Γ. 2. 1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

Ο όρος ξήρανση (drying) αναφέρεται κυρίως στην αφαίρεση μικρών σχετικά ποσοτήτων νερού από στερεά ή ημιστερεά υλικά. Η αφαίρεση υγρασίας από αέρια αποδίδεται κυρίως με τους όρους αφύγρανση (dehumidification) και προσρόφηση (absorption), ενώ ο όρος εξάτμιση (evaporation) αναφέρεται συνήθως στην αφαίρεση μεγάλων ποσοτήτων νερού από διαλύματα .

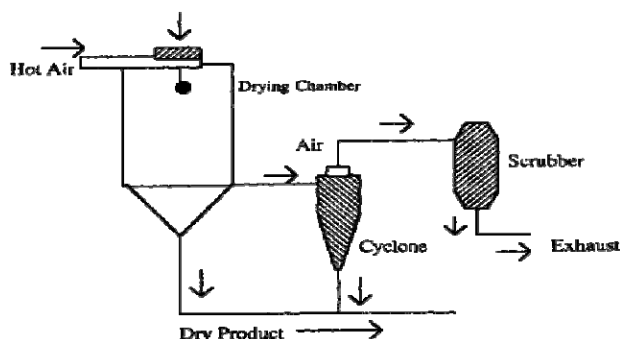
Στις διεργασίες ξήρανσης είθισται να δίνεται έμφαση στο αποξηραμένο τελικό προϊόν και, στις περισσότερες περιπτώσεις, η ξήρανση επιτυγχάνεται με αφαίρεση υγρασίας σε θερμοκρασίες κατώτερες του σημείου βρασμού, ενώ στην εξάτμιση η αφαίρεση υγρασίας γίνεται στο σημείο βρασμού του διαλύματος. Η μελέτη της ξήρανσης και οι υπολογισμοί για το απαιτούμενο μέγεθος του ξηραντήρα περιλαμβάνουν πολλών ειδών επιμέρους προβλήματα από τα πεδία της ρευστό-μηχανικής, της φυσικοχημείας επιφανειών και της δομής στερεών, καθώς και προβλήματα μεταφοράς θερμότητας και μάζας. Σε πολλές περιπτώσεις τα εκτυλισσόμενα φαινόμενα είναι αρκετά πολύπλοκα και η γνώση που υπάρχει γύρω από αυτά είναι περιορισμένη, με αποτέλεσμα οι ποσοτικές εκτιμήσεις στον σχεδιασμό του ξηραντήρα να καθίστανται πρακτικά αδύνατες.

Γ. 2. 1. 1. Θεωρία της ξήρανσης με ψεκασμό

Η ξήρανση με ψεκασμό πραγματοποιείται με τη χρήση των ξηραντήρων εκνέφωσης (spray dryers). Η πρώτη ύλη (διάλυμα, γαλάκτωμα, μέσο διασποράς ή αιώρημα) εισάγεται εντός του θαλάμου ξήρανσης υπό την μορφή λεπτών σταγονιδίων που έρχονται σε άμεση επαφή με ρεύμα θερμού αέρα για σύντομο χρονικό διάστημα. Τα σταγονίδια παράγονται με τη βοήθεια εκνεφωτή που περιστρέφεται με μεγάλη ταχύτητα. Ο χρόνος παραμονής στο θάλαμο ξήρανσης είναι 1-20 δευτερόλεπτα. Ο ξηραντήρας αποτελείται από: σύστημα θέρμανσης και κυκλοφορίας αέρα για την επίτευξη της απαιτούμενης θερμοκρασίας και ταχύτητας του εκνεφωτή για την παραγωγή υγρών σφαιριδίων, θάλαμο στον οποίο έρχονται σε στιγμιαία επαφή τα σταγονίδια με το θερμό

αέρα, σύστημα συλλογής, διαχωρισμού και μετακίνησης του προϊόντος ξήρανσης. Τα κυριότερα στάδια της ξήρανσης με ψεκασμό είναι: η είσοδος του προϊόντος, το φιλτράρισμα, η ψύξη, η αποθήκευση, η προθέρμανση στους 71-88°C, η προσυμπύκνωση, η είσοδος θερμού αέρα, ο διαχωρισμός της σκόνης από τον αέρα και η συσκευασία της σκόνης (Αρβανιτογιάννης, 2004).

Ο πιο κοινός τύπος συσκευής ξηραντήρα ψεκασμού είναι η open-cycle, co-current φαίνεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4. Open cycle, co-current spray drying layout(πηγή Barbosa-Canovas & Vega-Mercado, 1996).

Η διαδικασία ξεκινά με το σχηματισμό ενός υδατικού φορέα. Η ουσία ή το μίγμα ουσιών που θα υποστεί ξήρανση γαλακτωματοποιείται σε έναν φορέα και εισέρχεται στο θάλαμο της συσκευής, με μεγάλη πίεση θερμού αέρα, μέσω ενός εκνεφωτή που μετατρέπει το υγρό σε ασυνεχή σφαιρίδια υγρού υλικού (σταγονίδια) μεγέθους μερικών μη τα οποία θερμαίνονται άμεσα. Ακολούθως σχηματίζεται ένα φιλμ στην επιφάνεια του σταγονιδίου επιβραδύνοντας τη διάχυση των περιεχομένων δραστικών ουσιών, ενώ επιτρέπει στα μόρια ύδατος να μεταναστεύσουν γρήγορα στην επιφάνεια και να εξατμιστούν. Ελέγχοντας τη θερμοκρασία εισαγωγής, το ρυθμό εισαγωγής του γαλακτώματος και την ψύξη του εξατμιστή, η θερμοκρασία του σταγονιδίου δεν πρέπει να ξεπερνά τους 100°C. Τα σωματίδια που έχουν υποστεί ξήρανση απομακρύνονται με τρόπο που εμποδίζει την υπερθέρμανσή τους και την οξείδωσή τους.

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για ένα ιδανικό φορέα εγκλεισμού στη διαδικασία spray drying περιλαμβάνουν, υψηλό βαθμό διαλυτότητας, μειωμένο ιξώδες, ιδιότητες γαλακτωματοποίησης, ιδιότητες ξήρανσης, μη υγροσκοπικό χαρακτήρα, ήπια γεύση, να μην είναι δραστικός, και να έχει χαμηλό κόστος. Φορείς που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι:

- Τροποποιημένο άμυλο
- Αραβικό κόμμι
- Μαλτοδεξτρίνες
- Πρωτεΐνες γάλακτος
- Ζελατίνη που έχει υποστεί υδρόλυση
- Τροποποιημένες κυτταρίνες

Η συσκευή ξήρανσης με ψεκασμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μικρή ή μεγάλη παραγωγή προϊόντων ξήρανσης ανάλογα με το σχεδιασμό της. Μπορούν να επιτύχουν εξάτμιση μέχρι 7.000 kg/ώρα. Έστω και αν το κόστος του εξοπλισμού είναι αρκετά υψηλό, το κόστος συντήρησης είναι χαμηλό εξαιτίας των λιγοστών τμημάτων που αφαιρούνται και της χρησιμοποίησης ανθεκτικών υλικών. Η καθαρότητα των προϊόντων διατηρείται αφού τα τρόφιμα δεν έρχονται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του εξοπλισμού μέχρι να ξηραθούν, ελαχιστοποιώντας έτσι προβλήματα προσκόλλησης και διάβρωσης. Το σύστημα λειτουργίας είναι απλό και επίσης εξασφαλίζεται χαμηλή πυκνότητα προϊόντος (Nonhebel & Moss, 1971).

Γ. 2. 1. 2. Εφαρμογές της ξήρανσης με ψεκασμό

Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση τροφίμων ή ως απλή μέθοδος ταχείας ξήρανσης (Betrolini *et al.*, 2001).

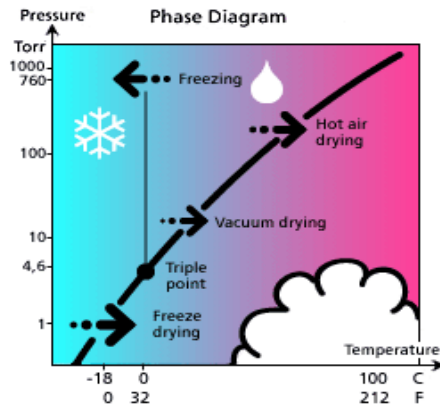
Εφαρμόζεται εκτεταμένα για την παρασκευή σκόνης γάλακτος, ορού γάλακτος, παγωτού, βουτύρου, τυριού, παιδικών τροφών με πρώτη ύλη το γάλα, καφέ, χυμών φρούτων, αλευριού και αραβοσιτού. Επίσης εξασφαλίζει την μείωση του βάρους και όγκου. Ο αριθμός των προϊόντων στα οποία εφαρμόζεται συνεχίζει να επεκτείνεται, έτσι ώστε σήμερα η ξήρανση με την τεχνική αυτή συνδέεται με πολλά προϊόντα που χρησιμοποιούμε καθημερινά. Αποτελεί και την κυρίαρχη τεχνολογική μέθοδο στον τομέα του μικροεγκλεισμού (Heinzelmann & Franke, 1999). Η μέθοδος περιλαμβάνει

εξάτμιση του νερού από μια τροφή μέσω ανάμειξης του μέσου ψεκασμού και ξήρανσης. Το μέσο ξήρανσης είναι ο αέρας. Η ξήρανση συνεχίζει μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό ποσοστό υγρασίας στα σωματίδια ψεκασμού και το προϊόν ακολούθως διαχωρίζεται από τον αέρα. Το μείγμα που υπόκειται ξήρανση μπορεί να είναι διάλυμα, γαλάκτωμα, μέσο διασποράς ή αιώρημα.

Γ. 2. 2. Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη

Γ. 2. 2. 1. Θεωρία της λυοφιλίωσης

Το πρώτο στάδιο της λυοφιλίωσης αφορά την κατάψυξη του τροφίμου με συμβατικές μεθόδους. Μικρά κομμάτια τροφίμου καταψύχονται γρήγορα για την παραγωγή μικρών κρυστάλλων πάγου, που αποσκοπεί στη μείωση της βλάβης στη κυτταρική δομή του τροφίμου. Στα υγρά τρόφιμα, η αργή κατάψυξη χρησιμοποιείται για την δημιουργία χωροπλέγματος κρυστάλλων πάγου, το οποίο παρέχει κανάλια (πόρους) για την κίνηση των υδρατμών. Το επόμενο στάδιο αφορά την αφαίρεση του νερού (πάγου) κατά την διάρκεια της ξήρανσης, δηλαδή την ξήρανση του τροφίμου. Αν η τάση ατμών του νερού στο τρόφιμο είναι κάτω από τα 4.58 Torr (610.5 Pa) και το νερό είναι παγωμένο, τότε στο τρόφιμο που θερμαίνεται ο πάγος μετατρέπεται κατευθείαν σε υδρατμό, δηλαδή έχουμε το φαινόμενο της εξάχνωσης (Σχήμα 5). Οι υδρατμοί συνεχώς απομακρύνονται από το τρόφιμο, διατηρώντας την πίεση στο ξηραντήριο κάτω από την τάση ατμών στην επιφάνεια του πάγου και εν συνεχεία συμπυκνώνονται σε ψυγείο στο οποίο κυκλοφορεί ψυκτικό ρευστό σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία ($<-30^{\circ}\text{C}$). Οι υδρατμοί λόγω της χαμηλής πίεσης, περνούν στην στερεή φάση, χωρίς να διέλθουν από την υγρή. Καθώς η διεργασία της ξήρανσης προχωρά, το μέτωπο της εξάχνωσης κινείται μέσα στο κατεψυγμένο τρόφιμο αφήνοντας πίσω του μερικώς αποξηραμένο τρόφιμο.



Σχήμα 5. Διάγραμμα φάσεων για το νερό

Η θερμότητα που απαιτείται για να κινηθεί το μέτωπο της εξάχνωσης και να εξαχνωθεί ο πάγος (λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης), είτε παρέχεται μέσα από το τρόφιμο με αγωγή ή ακτινοβολία ή παράγεται στο τρόφιμο με μικροκύματα. Οι υδρατμοί κινούνται μέσα στο τρόφιμο μέσω των πόρων που δημιουργούνται από τον εξαχνωμένο πάγο και στη συνέχεια απομακρύνονται. Τα τρόφιμα ξηραίνονται σε δυο στάδια: πρώτα με *εξάχνωση* (sublimation) μέχρι η περιεχόμενη υγρασία να φτάσει το 15% και μετά με *ξηρανση μέσω εξάτμισης* (evaporative drying) του μη κατεψυγμένου νερού μέχρι η περιεχόμενη υγρασία να φτάσει το 2%. Το δεύτερο στάδιο επιτυγχάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του ξηραντηρίου κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, διατηρώντας ταυτόχρονα την πίεση χαμηλή.

Σε μερικά υγρά τρόφιμα (για παράδειγμα: χυμοί φρούτων και συμπυκνωμένα εκχυλίσματα καφέ) η δημιουργία μιας υαλώδους κατάστασης κατά την κατάψυξη, δημιουργεί δυσκολίες στην μεταφορά των υδρατμών. Συνεπώς, το υγρό είτε καταψύχεται σαν αφρός ή ο χυμός ξηραίνεται μαζί την πούλπα στην περίπτωση χυμού φρούτων. Και οι δυο μέθοδοι δημιουργούν πόρους στο τρόφιμο για την απομάκρυνση των υδρατμών. Σε μια τρίτη μέθοδο, ο κατεψυγμένος χυμός επεξεργάζεται κατάλληλα για την δημιουργία τεμαχιδίων, που και εύκολα ξηραίνονται και υπάρχει μεγαλύτερος έλεγχος στο μέγεθος των αποξηραμένων σωματιδίων.

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι για την μετάδοση θερμότητας στο μέτωπο της εξάχνωσης:

1. Μετάδοση θερμότητας μέσω της καταψυγμένης στοιβάδας. Ο ρυθμός μετάδοσης θερμότητας εξαρτάται από το πάχος και τη θερμική αγωγιμότητα της στοιβάδας του πάγου. Καθώς προχωρά η ξήρανση, το πάχος της στοιβάδας του πάγου ελαττώνεται και ο ρυθμός μετάδοσης θερμότητας αυξάνεται. Το εύρος της θερμοκρασίας της επιφάνειας θέρμανσης περιορίζεται για την αποφυγή τήξης του πάγου.
2. Μετάδοση θερμότητας μέσω της αποξηραμένης στοιβάδας. Ο ρυθμός μετάδοσης θερμότητας στο μέτωπο της εξάχνωσης εξαρτάται από το πάχος και την επιφάνεια του τροφίμου, τη θερμική αγωγιμότητα της αποξηραμένης στοιβάδας και τη διαφορά θερμοκρασιών μεταξύ του τροφίμου και του μετώπου του πάγου. Σε σταθερή πίεση θαλάμου η θερμοκρασία του μετώπου του πάγου παραμένει σταθερή. Η αποξηραμένη στοιβάδα του τροφίμου έχει πολύ χαμηλή θερμική αγωγιμότητα (παρόμοια με αυτή που έχουν τα μονωτικά υλικά) και συνεπώς παρουσιάζει μεγάλη αντίσταση στην μετάδοση θερμότητας. Καθώς η ξήρανση προχωρεί, αυτή η στοιβάδα γίνεται πιο όλο και πιο μεγάλη και η αντίσταση μεγαλώνει. Όπως και σε άλλες διεργασίες, μια μείωση στο μέγεθος ή το πάχος του τροφίμου και μια αύξηση στην θερμοκρασιακή διαφορά, αυξάνει και το ρυθμό μετάδοσης θερμότητας. Ωστόσο στη λυοφιλίωση, η επιφανειακή θερμοκρασία περιορίζεται στους 40 – 65°C, για την αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών και άλλων χημικών αντιδράσεων που μειώνουν την ποιότητα των τροφίμων.
3. Μετάδοση θερμότητας με μικροκύματα. Η θερμότητα παράγεται στο μέτωπο του πάγου και ο ρυθμός μετάδοσης θερμότητας δεν επηρεάζεται από τη θερμική αγωγιμότητα του πάγου ή του ξηρού τροφίμου ή το πάχος της ξηρής στοιβάδας. Ωστόσο, η θέρμανση με μικροκύματα δεν ελέγχεται καλά και υπάρχει το ρίσκο της τοπικής υπερθέρμανσης, αν ο πάγος τηχθεί (Fellows, 2000).

Γ. 2. 2. 2. Τύποι ξηραντηρίων λυοφιλίωσης

Τα ξηραντήρια λυοφιλίωσης αποτελούνται από έναν θάλαμο κενού, που περιέχει δίσκους στους οποίους τοποθετείται το τρόφιμο και θερμές επιφάνειες για την παροχή της αναγκαίας λανθάνουσας θερμότητας εξάχνωσης. Ψυχρές σερπαντίνες χρησιμοποιούνται για την συμπύκνωση των υδρατμών σε πάγο (αντίστροφη εξάχνωση ή συμπύκνωση – condensation of water vapor to ice). Σ' αυτές τις σερπαντίνες έχουν τοποθετηθεί αυτόματοι μηχανισμοί απόψυξης για να διατηρήσουν την επιφάνεια ελεύθερη από πάγο, για τη συμπύκνωση των υδρατμών. Αυτό είναι σημαντικό γιατί το μεγαλύτερο μέρος της παροχής ενέργειας, χρησιμοποιείται για την ψύξη των συμπυκνωτών και οι οικονομικοί δείκτες της λυοφιλίωσης συνεπώς εξαρτώνται από την απόδοση του συμπυκνωτή, δηλαδή συμπυκνωτή του υγρού ψυκτικού (Μαύρος, 2003).

Γ. 2. 2. 3. Επίδραση της λυοφιλίωσης στα τρόφιμα

Τα τρόφιμα που έχουν αποξηρανθεί με λυοφιλίωση διατηρούν πολύ μεγάλο μέρος των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους και των θρεπτικών συστατικών τους και έχουν διάρκεια ζωής περισσότερο από 12 μήνες, εάν συσκευασθούν σωστά. Τα πτητικά αρωματικά συστατικά δεν εισέρχονται στους υδρατμούς που παράγονται κατά την εξάχνωση και μένουν παγιδευμένα μέσα στη μάζα του τροφίμου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα αρωματικά συστατικά να κατακρατούνται, πιθανότατα από 80 μέχρι και 100%. Η υφή των τροφίμων αυτών διατηρείται σε καλά επίπεδα με κάποια μικρή συρρίκνωση, χωρίς όμως την δημιουργία επιφανειακής σκληρής στοιβάδας (case hardening). Η ανοικτή πορώδης δομή ευνοεί την γρήγορη και πλήρη ενυδάτωση, αλλά ταυτόχρονα όντας εύθραυστη, απαιτεί προστασία από μηχανικές βλάβες. Κατά την λυοφιλίωση, συμβαίνουν μικρές μεταβολές στις πρωτεΐνες, στο άμυλο και σε άλλους υδατάνθρακες. Ωστόσο, η ανοικτή πορώδης δομή επιτρέπει την είσοδο του οξυγόνου, το οποίο προκαλεί οξειδωτικές αντιδράσεις στα λίπη, γι' αυτό και τα τρόφιμα συσκευάζονται σε συνθήκες αδρανούς αερίου. Έχουν παρατηρηθεί μέτριες μεταβολές στην συγκέντρωση θειαμίνης και ασκορβικού οξέος κατά την λυοφιλίωση, με σχεδόν μηδενικές απώλειες των άλλων βιταμινών (Πίνακας 9). Ωστόσο, οι απώλειες θρεπτικών συστατικών κατά την διάρκεια της προετοιμασίας του τροφίμου πριν την λυοφιλίωση,

ειδικά κατά το ζεμάτισμα των λαχανικών, επιδρούν έντονα στην τελική ποιότητα (σε θρεπτικά στοιχεία) του αποξηραμένου τροφίμου.

Πίνακας 9. Απώλειες βιταμινών κατά την λυοφιλίωση

Τρόφιμο	Απώλειες (%) Βιταμινών						
	Βιταμίνη C	Βιταμίνη A	Θειαμίνη (B ₁)	Ριβοφλαβίνη (B ₂)	Φυλλικό Οξύ	Νιασίνη	Παντοθενικό Οξύ
Φασόλια (πράσινα)	26 – 60	0 – 24	-	0	-	-	0
Αρακάς	8 – 30	5	0	-	-	10	-
Χυμός Πορτοκαλιού	3	3 – 5	-	-	-	0	10
Βοδινό	-	-	2	0	+	-	-
Χοιρινό	-	-	< 10	0	*	0	13

*Φαινομενική αύξηση

Γ. 2. 2. 4. Διαφορές λυοφυλίωσης με ξήρανσης με αέρα

Οι βασικές διαφορές της λυοφυλίωσης και της συνηθισμένης ξήρανσης με θερμό αέρα, είναι οι εξής:

1. Επιτυχής ξήρανση για τα περισσότερα τρόφιμα, αλλά πρακτικά εφαρμόσιμη γι' αυτά που είναι δύσκολο να αποξηρανθούν με άλλες μεθόδους
2. Επιτυχής ξήρανση για μαγειρεμένα και ωμά κρέατα
3. Οι θερμοκρασίες είναι κάτω από το σημείο πήξης του νερού
4. Η ξήρανση γίνεται σε ελαττωμένη πίεση (27 – 133 Pa)
5. Εξάχνωση του νερού από το στρώμα του πάγου
6. Ελάχιστη μεταφορά διαλυτών ουσιών
7. Ελάχιστες δομικές βλάβες ή συρρίκνωση
8. Γρήγορη και πλήρης αποκατάσταση μετά από ενυδάτωση
9. Τα πορώδη αποξηραμένα σωματίδια έχουν πολύ χαμηλότερη πυκνότητα από το αρχικό τρόφιμο
10. Η γεύση και η οσμή είναι συνήθως αναλλοίωτες
11. Το χρώμα είναι συνήθως κανονικό

12. Τα θρεπτικά στοιχεία διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό
13. Το κόστος είναι γενικά υψηλό, ως και 4 φορές μεγαλύτερο από τη συνηθισμένη ξήρανση (Fellows, 2000).

Γ. 3. 1. Μέσα ενθυλάκωσης

Γ. 3. 1. 1. Εισαγωγή

Ως μέσα ενθυλάκωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα υποστρώματα όπως: υδατάνθρακες και κόμμεα. Οι απαιτούμενες προϋποθέσεις που πρέπει να ικανοποιούνται, ώστε ένα συστατικό να αποτελεί μέσο εγκλεισμού είναι να διαθέτει:

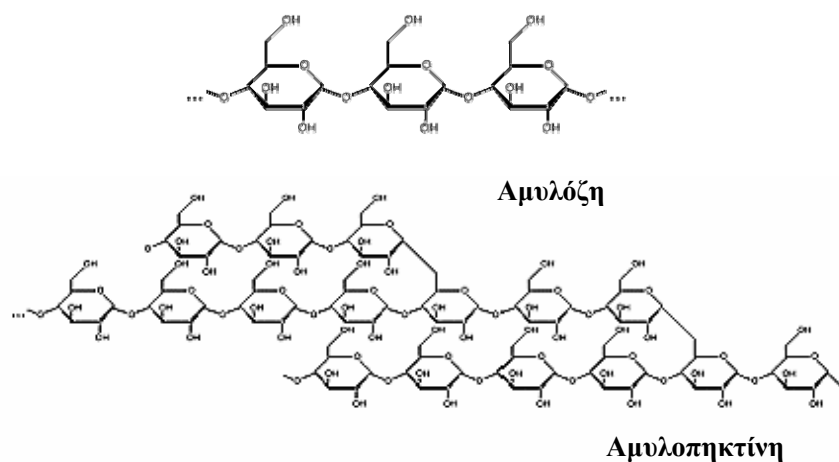
- αυξημένη διαλυτότητα στο νερό
- γαλακτωματοποιητική ικανότητα
- εύκολη απομάκρυνση νερού
- χαμηλό ιξώδες σε αυξημένες συγκεντρώσεις στερεής ένωσης.

Παρόλα αυτά, ένα και μόνο μέσο ενθυλάκωσης δεν διαθέτει όλα τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά και για αυτό έχουν γίνει προσπάθειες βελτίωσης των ιδιοτήτων του εγκλεισμού μέσω χρησιμοποίησης μίγματος υδατανθρακών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Kaushik & Roos 2006)

Σε πολλές περιπτώσεις η εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης μπορεί να ξεπεράσει τα προβλήματα που προκύπτουν από την ενσωμάτωση των συστατικών αυτών μέσα σε τρόφιμα, όπως πχ. τη σταδιακή υποβάθμισή τους ή ακόμη την πιθανότητα να καταστούν επικίνδυνα εξαιτίας της μετατροπής τους σε τοξικά προϊόντα. Ακόμη παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά που βρίσκονται στο τρόφιμο. Μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί για την ενθυλάκωση λειτουργικών συστατικών, δηλαδή συστατικών που παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό όσον αφορά στην πρόληψη και θεραπεία ασθενειών καθώς και στη βελτίωση φυσιολογικής απόδοσης του οργανισμού. Μέσω των αναφερόμενων ιδιοτήτων, μπορούν να αποτραπούν ανεπιθύμητες επιδράσεις όπως: μείωση της βιοδιαθεσιμότητας, αλλαγής του χρώματος ή της γεύσης του προϊόντος (Schooyen, 2001).

Γ. 4. Τροποποιημένο άμυλο

Το άμυλο είναι πολυσακχαρίτης και συνίσταται από αλυσίδες πολλών μορίων γλυκόζης. Υπάρχουν δύο ειδών αλυσίδες, η γραμμική αλυσίδα καλείται αμυλόζη ενώ η διακλαδισμένη αλυσίδα, καλείται αμυλοπηκτίνη. Στους κόκκους του αμύλου, η αμυλοπηκτίνη συνεισφέρει στην αύξηση του όγκου του υλικού.



Το άμυλο χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων εφόσον συμβάλλει στην διαμόρφωση της υφής τους. Είναι ταυτόχρονα πηκτοματοποιητής, σταθεροποιητής, παράγοντας ζελατινοποίησης και μέσο κατακράτησης νερού αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τον όγκο της τροφής (Singh *et al.*, 2007). Όσο το άμυλο απορροφά νερό, η αμυλόζη διηθείται και η αμυλοπηκτίνη σχηματίζει ζελέ. Άμυλα με έχουν αυξημένο περιεχόμενο αμυλοπηκτίνης και δημιουργούν σταθερότερες πηκτές από ότι αυτά που περιέχουν μεγάλη ποσότητα αμυλόζης.

Τα άμυλα χρησιμοποιούνται επίσης ως υποκατάστατα λίπους, εξαιτίας του γεγονότος ότι απορροφούν νερό και αυξάνουν τον όγκο του τροφίμου στο οποίο προστίθενται, δημιουργώντας το αίσθημα πληρότητας και κορεσμού.

Οι ανθρακικές αλυσίδες της αμυλόζης σχηματίζουν έλικες με το υδρόφοβο τμήμα να βρίσκεται στο εσωτερικό. Αυτό επιτρέπει τον εγκλωβισμό ελαίων και λίπους καθώς και αρωματικών ενώσεων, στο εσωτερικό της έλικας.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του αμύλου, καθώς και η μοναδικότητα που δίνουν στο κάθε τρόφιμο που προστίθεται, ποικίλουν ανάλογα με τη προέλευσή του. Για παράδειγμα το άμυλο από φυτικές πηγές όπως είναι το σιτάρι, η μαγιά, το ρύζι και η πατάτα έχουν ερευνηθεί εκτενώς ως προς τη δομή και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Από την άλλη υπάρχουν περιορισμοί ως προς τη χρήση του αμύλου στις εφαρμογές της βιομηχανίας τροφίμων, που αφορούν στην αντίσταση στις δυνάμεις συνάφειας, την αντίσταση στη θερμότητα, τη θερμική αποικοδόμηση και την υψηλή τάση προς αποσύνθεση.

Η τροποποίηση του αμύλου που περιλαμβάνει μεταβολές στα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του αμύλου προέλευσης στοχεύουν στη βελτίωση των λειτουργικών του ιδιοτήτων παρέχοντας τη δυνατότητα ποικίλων εφαρμογών (Hermansson & Svegmarm, 1996), καθιστώντας το κατάλληλο ως μέσο ενθυλάκωσης. Οι δεσμοί μεταξύ του εγκλειόμενου μορίου και του τροποποιημένου αμύλου είναι ηλεκτροστατικής φύσεως (δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις)

Τα τροποποιημένα άμυλα είναι λευκές ή υπόλευκες σκόνες, χωρίς γεύση και οσμή, με εμφάνιση είτε όμοια με αυτή του αμύλου προέλευσης είτε με εκείνη νιφάδων ή συσσωμάτων. Βρίσκουν πολλές εφαρμογές ως σταθεροποιητές και παχυρευστοποιητές και ιδιαίτερα σε όξινα τρόφιμα. Επίσης τα άμυλα αυτά είναι πιο ανθεκτικά στην υδρόλυση, τη διάτμηση και τη θέρμανση (Μπόσκου, 1997).

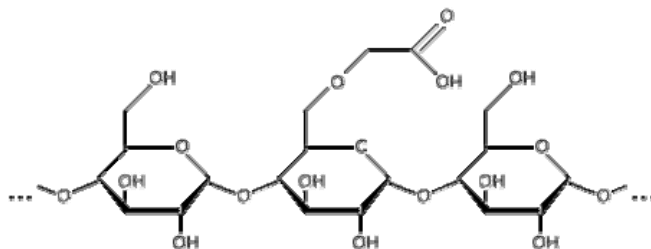
Η τροποποίηση του αμύλου γενικά επιτυγχάνεται μέσω:

1. Δημιουργίας παράγωγων μορφών όπως είναι: η δημιουργία αιθέρων, η εστεροποίηση, ο σχηματισμός σταυροειδών δεσμών και η παρεμβολή χημικών ενώσεων στη αλυσίδα του αμύλου.
2. Χημικής τροποποίησης η οποία περιλαμβάνει εισαγωγή λειτουργικών ομάδων στο μόριο του αμύλου, που έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητες όπως για παράδειγμα η ζελατινοποίηση και η συμπεριφορά του κατά τη αποσύνθεση.
3. Αποσύνθεσης: με προσθήκη οξέος ή ενζυμική υδρόλυση και οξείδωση
4. Θέρμανσης ή ενυδάτωσης (φυσική τροποποίηση).

Οι διαφορετικοί τρόποι τροποποίησης του αμύλου παρουσιάζονται στον Πίνακα **10**.

Μια συνήθης μορφή τροποποιημένου αμύλου μπορεί να προκύψει με θέρμανση του αμύλου, οπότε σπάνε οι αλυσίδες του σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους όπως δεξτρίνες, και μαλτοδεξτρίνη. Δεξτρίνη επίσης σχηματίζεται με θερμική επεξεργασία με υδροχλωρικό οξύ ή φωσφορικό οξύ και εκδηλώνει μεγαλύτερη αντοχή στη δομή της πηκτικής (Μπόσκου, 1997).

Μια μορφή τροποποιημένου αμύλου προκύπτει με ένωση των διαφορετικών αλυσίδων του και σχηματισμό μιας μορφής δικτύου (σταυροειδείς δεσμοί). Ο σχηματισμός δεσμών μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων πραγματοποιείται όταν η υδροξυλική ομάδα της μίας αλυσίδας ενώνεται με την υδροξυλική ομάδα της γειτονικής αλυσίδας. Η διαδικασία αυτή καθιστά το άμυλο πιο ανθεκτικό στη θέρμανση και στα οξέα. Τροποποιημένο άμυλο μπορεί να προκύψει με αντικατάσταση των υδρογόνων του από άλλο μόριο. Ως παράδειγμα αναφέρεται το καρβοξυμεθυλικό άμυλο που προκύπτει από την αντικατάσταση του υδρογόνου του υδροξυλίου του C6 από μια καρβοξυμεθυλική ομάδα σχηματίζοντας το καρβοξυμεθυλικό άμυλο.



Σχήμα 6. Καρβοξυμεθυλικό άμυλο

Προσθέτοντας την καρβοξυμεθυλική ομάδα το άμυλο καθίσταται λιγότερο επιρρεπές σε βλάβες οι οποίες μπορούν να προκληθούν από την θερμότητα και τα βακτήρια. Οι καρβοξυμεθυλικές ομάδες καθιστούν το άμυλο περισσότερο υδρόφιλο, και συνεισφέρουν στη ένωση των αλυσίδων. Αυτό επιτρέπει τη χρησιμοποίηση του καρβοξυμεθυλικού αμύλου για την παρασκευή της ασπιρίνης καθώς και άλλων δισκίων, κάνοντας τα να διασπώνται πιο γρήγορα.

Πίνακας 10. Διαφορετικοί τρόποι τροποποίησης του αμύλου και τεχνικές παρασκευής (Singh *et al.*, 2007)

Τροποποίηση	Είδος	Παρασκευή
Φυσική	Επεξεργασία με θέρμανση/ υγρασία	Ζελατινοποίηση-Θέρμανση του αμύλου σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από αυτή του σημείου ζελατινοποίησης με μικρή ποσότητα Ανόπτηση-Θέρμανση του αμύλου σε θερμοκρασία μικρότερη από αυτή του σημείου ζελατινοποίησης, για παρατενόμενο χρονικό διάστημα
	Προζελατινοποίηση	Παρασκευή προ-ζελέ/ αμύλου που διογκώνεται με κρύο νερό και ξήρανσης
Χημική	Μερικώς όξινη υδρόλυση	Επεξεργασία με υδροχλωρικό οξύ, ορθοφωσφορικό οξύ ή θειικό οξύ
	Μερικώς ενζυμική υδρόλυση	Επεξεργασία με υδατικό διάλυμα σε θερμοκρασία μικρότερη από αυτή του σημείου ζελατινοποίησης, με ένα ή περισσότερα αμυλολυτικά ένζυμα.
	Επεξεργασία αλκάλια	Επεξεργασία με υδροξείδιο του νατρίου ή υδροξείδιο του καλίου
	Οξειδωση	Επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου ή υποχλωριούχο νάτριο ή χλωριούχο νάτριο, ή διοξείδιο του θείου.
	Δεξτρίνοποίηση	Ξήρανση υδρολυμένου αμύλου
Δημιουργία παραγώγου	Σχηματισμός αιθέρα	Επεξεργασία με οξείδιο προπυλενίου για την παραγωγή υδρόξυπροπυλ- αμύλου.
	Εστεροποίηση	Επεξεργασία με οξικό ανυδρίτη ή βινυλικό εστέρα. Επεξεργασία με οξικό ανυδρίτη και adipic ανυδρίτη Εστεροποίηση με ανυδρίτη του οκτενυλοηλεκτρικού οξέος.
	Σχηματισμός σταυροειδών δεσμών	Εστεροποίηση με ο-φωσφορικό οξύ, ή νάτριο, ή ο-φωσφορικό κάλιο. Εστεροποίηση με τριμεταφωσφορικό νάτριο, ή οξεοχλωρικό φώσφορο. Επεξεργασία με φωσφορικό μονο-άμυλο σε συνδυασμό με φωσφορικό δι-άμυλο.
	Διπλή τροποποίηση	Εστεροποίηση με τριμεταφωσφορικό νάτριο, ή οξεοχλωρικό φώσφορο σε συνδυασμό με εστεροποίηση με οξικό ανυδρίτη ή βινυλικό εστέρα. Εστεροποίηση με τριμεταφωσφορικό νάτριο, ή οξεοχλωρικό φώσφορο σε συνδυασμό με επεξεργασία με οξείδιο προπυλενίου

Γ. 4. 1. Χημική τροποποίηση του αμύλου

Η χημική τροποποίηση του αμύλου στοχεύει κυρίως στην αύξηση της καθαρότητας, συνάφειας, της μαλακής υφής, ενώ προσδίδει σταθερότητα κατά την κατάψυξη (Perera *et al.*, 1997; Xu & Seib, 1997). Οι ιδιότητες μερικών τροποποιημένων αμύλων καθώς και οι εφαρμογές τους παρουσιάζονται στον πίνακα **11** και εξαρτώνται από την πηγή προέλευσης του αμύλου, τις συνθήκες της αντίδρασης (τη συγκέντρωση του αντιδρώντος, το χρόνο αντίδρασης, το pH και την παρουσία καταλύτη), το είδος του υποκαταστάτη, το βαθμό υποκατάστασης και τη κατανομή του υποκαταστάτη στο μόριο του αμύλου (Hirsch & Kokini, 2002). Μερικές συνηθισμένες αντιδράσεις χημικής τροποποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα **12**. Η αποτελεσματικότητα της χημικής τροποποίησης εξαρτάται από το είδος του αντιδραστήριου που χρησιμοποιείται, την προέλευση του αμύλου και από το μέγεθος και τη δομή των κόκκων (Huber & BeMiller, 2001).

Πίνακας 11. Ιδιότητες και εφαρμογές τροποποιημένου αμύλου (Singh *et al.*, 2007)

Είδος	Ιδιότητες	Εφαρμογές
Προ-ζελατινοποίηση	Διασπορά σε κρύο νερό	Σε έτοιμα για ανάλωση τρόφιμα
Μερική όξινη ή ενζυμική υδρόλυση	Μείωση του Μοριακού Βάρους των πολυμερών, μειωμένο ιξώδες, αυξημένη παλινόρθωση	Σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής και υλικά επικάλυψης τροφίμων
Οξείδωση/Λεύκανση	Μειωμένο ιξώδες, αυξημένη καθαρότητα και σταθερότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες	Σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής, βούτυρα, ως υλικά επικάλυψης, ως συγκολλητικές ύλες και για το σχηματισμό μεμβρανών, στα γαλακτοκομικά ως συστατικό που προσδίδει ειδική υφή
Πυρο-μετατροπή (δεξτρίνοποίηση)	Αυξημένη διαλυτότητα ανάλογα με την τροποποίηση, χαμηλό ιξώδες, μειωμένο περιεχόμενο σε σάκχαρα	Σε διάφορα τρόφιμα ως υλικό επικάλυψης, εξαιτίας της ικανότητας σχηματισμού μεμβρανών και ως υποκατάστατα λίπους στην αρτοποιία και κατά την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων

Είδος	Ιδιότητες	Εφαρμογές
Παραγωγή αιθέρων	Αυξημένη διαύγεια πολτού αμύλου, μεγαλύτερο ιξώδες, μειωμένη Syneresis και σταθερότητα κατά την τήξη	Σε σάλτσες και κρέμες.
Εστεροποίηση	Μειωμένη θερμοκρασία ζελατινοποίησης και παλινόρθωσης, μειωμένη τάση προς σχηματισμό ζελέ και αυξημένη διαύγεια πολτού αμύλου	Σε κατεψυγμένα τρόφιμα, ως σταθεροποιητής γαλακτωμάτων και για τον εγκλεισμό διατροφολογικών συστατικών
Δημιουργία σταυροειδών δεσμών	Μεγαλύτερη σταθερότητα των κόκκων στην επίδραση υψηλής θερμοκρασίας, στη διόγκωση, στις δυνάμεις συνάφειας και σε όξινες συνθήκες	Προσδίδει ειδική υφή σε σούπες, σάλτσες, γαλακτοκομικά προϊόντα και σε προϊόντα αρτοποιίας.
Διπλή τροποποίηση	Σταθερότητα έναντι της επίδρασης οξέος, της θερμικής και μηχανικής αποδόμησης και καθυστέρηση εκδήλωσης παλινόρθωσης κατά την αποθήκευση	Σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα, κατεψυγμένα, σάλτσες και κρέμες

Πίνακας 12. Αντιδράσεις Χημικής Τροποποίησης (Singh *et al.*, 2007)

Αιθεροποίηση με οξείδιο του αλκυλενίου	
$\text{StOH} + \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \text{---R} \xrightarrow{\text{NaOH}}$	St---O---CH---R $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{OH}$
Εστεροποίηση με οξικό βινύλιο	
$\text{StOH} + \text{H}_2\text{C}=\text{CH---C}(=\text{O})\text{---CH}_3 \xrightarrow{\text{NaOH}}$	$\text{St---O---C}(=\text{O})\text{---CH}_3$ $+ \text{H}_3\text{C---C}(=\text{O})\text{---OH}$
Εστεροποίηση με ακετοξικό ανυδρίτη	
$\text{StOH} + \text{H}_3\text{C---C}(=\text{O})\text{---O---C}(=\text{O})\text{---CH}_3 \xrightarrow{\text{NaOH}}$	$\text{St---O---C}(=\text{O})\text{---CH}_3$ $+ \text{H}_3\text{C---C}(=\text{O})\text{---OH}$
Επίδραση με ορθοφωσφορικό νάτριο	
$\text{StOH} + \text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4 \longrightarrow$	$\text{St---O---P}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}^-\text{Na}^+$
Επίδραση με χλωροξικό οξύ	
$\text{StOH} + \text{ClCH}_2\text{COOH} \longrightarrow$	$\text{St---O---CH}_2\text{COONa}$
Άμυλο με σταυροειδείς δεσμούς με επίδραση POCl₃	
$\text{StOH} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Cl---P---Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array} \xrightarrow{\text{NaOH}}$	$\text{St---O---P}(=\text{O})(\text{ONa})\text{---O---St}$
Άμυλο με σταυροειδείς δεσμούς με επίδραση με τριμεταφωσφορικό νάτριο	
$2 \text{ StOH} + \text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9 \xrightarrow{\text{NaOH}}$	$\text{St---O---P}(=\text{O})(\text{ONa})\text{---O---St}$
Άμυλο με σταυροειδείς δεσμούς με επίδραση με επιχλωρουδρίνη	
$\text{StOH} + \text{EPI} \xrightarrow{\text{NaOH}}$	$\text{EPI} + \text{St---O---CH}_2\text{---CH---CH}_2$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{OH} \quad \quad \quad \text{OSi}$

Γ. 4. 2. Φυσικο-χημικές Ιδιότητες τροποποιημένου αμύλου

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αμύλου όπως: η διαλυτότητα, η ικανότητα διαπερατότητας του φωτός και η διόγκωση, έχουν αναφερθεί ότι επηρεάζονται από τη χημική τροποποίηση. Η ακετυλίωση και η προσθήκη υδροξυπρόπυλ- ομάδας αυξάνουν την ικανότητα διόγκωσης και τη διαλυτότητα του αμύλου από διάφορες πηγές, ενώ το τροποποιημένο άμυλο με σταυροειδείς δεσμούς, ανάλογα από το είδος του αντιδραστηρίου και το βαθμό σχηματισμού των δεσμών, οδηγεί σε μείωση αυτών των ιδιοτήτων. Η εισαγωγή των ακέτυλ- ομάδων έχει ως αποτέλεσμα επαναδιοργάνωση της δομής του μορίου του αμύλου που δημιουργεί απωστικές δυνάμεις μεταξύ των αλυσίδων του αμύλου, οπότε και διευκολύνεται η διήθηση του νερού μεταξύ των άμορφων περιοχών των κόκκων και η διόγκωση (Singh *et al.*, 2007)

Γ. 4. 3. Μορφολογικές Ιδιότητες τροποποιημένου αμύλου

Η τροποποίηση του αμύλου περιλαμβάνει φυσικές, χημικές και βιοχημικές διεργασίες στην επιφάνεια των φάσεων που έρχονται σε επαφή. Σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και τον προσδιορισμό της δομής των κόκκων έπαιξε η μικροσκοπία η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση δομικών μεταβολών ως αποτέλεσμα των χημικών τροποποιήσεων (Kaur *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1992). Οι περισσότερες μορφολογικές μεταβολές μέσω της προσθήκης υδροξυπρόπυλ- ομάδας λαμβάνουν χώρα σε μια λιγότερο οργανωμένη περιοχή του πυρήνα στους κόκκους του αμύλου. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο κόκκος αμύλου είναι δομικά ετερογενής από φυσική και χημική άποψη, αφού έχει διαφορετική φυσική δομή (άμορφες και κρυσταλλικές περιοχές), καθώς και διαφορετική χημική σύνθεση σε κάθε περιοχή (Singh *et al.*, 2007).

Γ. 4. 4. Θέρμανση τροποποιημένου αμύλου

Το άμυλο βρίσκεται σε μόρια κόκκων διαστάσεων 2- 100 μ. Οι κόκκοι συνίστανται από μόρια αμύλου ακτινοειδώς διευθετημένα στο χώρο με τις γραμμικές και διακλαδισμένες αλυσίδες, και ως αποτέλεσμα αυτής της δομής, το άμυλο είναι αδιάλυτο στο κρύο νερό.

Όταν με τη θέρμανση παρέχεται ενέργεια, οι δεσμοί μεταξύ των κρυσταλλικών μυκηλίων, διασπώνται και ο κόκκος αρχίζει να ενυδατώνεται και να διογκώνεται. Μέσω της ζελατινοποίησης του αμύλου, που αναφέρθηκε πιο πάνω (θέρμανσης, ενυδάτωσης, διόγκωσης), εκδηλώνονται μη- αναστρέψιμες μεταβολές στις φυσικές ιδιότητες των κόκκων όπως: τήξη των ενδογενών κρυστάλλων, το άμυλο και κυρίως η αμυλόζη αρχίζει έτσι να διαλυτοποιείται, το ιξώδες αυξάνεται και οι κόκκοι χάνουν την διπλοδιαθλαστικότητά τους (Μπόσκου, 1997). Θεωρείται μια σημαντική λειτουργική ιδιότητα του αμύλου, και εκδηλώνεται με ποικίλες μορφές ανάλογα με:

1. τη σύσταση του αμύλου, που εξαρτάται από την αναλογία αμυλόζης – αμυλοπηκτίνης, τη συγκέντρωση φωσφόρου, λιπιδίων, πρωτεϊνών και ενζύμων.
2. τη μοριακή δομή της αμυλοπηκτίνης που διαφέρει ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας της κάθε μονάδας, το μέγεθος της διακλάδωσης, το μοριακό βάρος και την αρχιτεκτονική του κόκκου (αναλογία κρυστάλλων προς άμορφα συστατικά).
3. τη μορφολογία του κόκκου και
4. την κατανομή μεγέθους των κόκκων του αμύλου

Έχει αναφερθεί ότι η τροποποίηση του αμύλου είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των θερμοκρασιών θερμικής μετάπτωσης κατά τη μελέτη με DSC: To (onset), Tr (peak), Tc (conclusion) και DHgel (ολική ενθαλπία) και η μεταβολή αυτή σχετίστηκε με τη ζελατινοποίηση.

Μέσω της προσθήκης υδρόξυπρότυλ- ομάδας, τα ενεργά μόρια που εισάγονται στις ανθρακικές αλυσίδες του αμύλου, διακόπτουν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ και εντός των μορίων αμύλου, και με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η εισχώρηση νερού στους κόκκους που τελικά οδηγεί σε μείωση της θερμοκρασίας στην οποία εκδηλώνεται η ζελατινοποίηση. Σε όλα τα άμυλα παρατηρήθηκε ότι, αυξάνοντας το βαθμό τροποποίησης μειώνεται η DHgel, η To, η Tr και η Tc, και επίσης διευρύνεται η διακύμανση θερμοκρασιών ζελατινοποίησης (Tc-To).

Το ίδιο φαινόμενο αναφέρθηκε και μέσω της προσθήκης ακέτυλ- ομάδας, όπου παρατηρήθηκε μείωση των θερμοκρασιών To, Tr και Tc (Adebowale & Lawal, 2003). Σε άμυλα όπου ο βαθμός υποκατάστασης με ακέτυλ- ομάδα ήταν αυξημένος,

εκδηλώθηκε μεγαλύτερη μείωση στις θερμοκρασίες μετάπτωσης και στην ενθαλπία της διαδικασίας ζελατινοποίησης.

Σε τροποποιημένο άμυλο με σταυροειδείς δεσμούς, παρατηρήθηκαν διαφορές από τις χαρακτηριστικές θερμοκρασίες μετάπτωσης του αμύλου, και οι επιδράσεις αυτές εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και το είδος του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιείται, τις συνθήκες αντίδρασης και την πηγή προέλευσης του αμύλου. Στα άμυλα αυτά βρέθηκε αύξηση της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης, που αποδίδεται στη μειωμένη κινητικότητα των άμορφων αλυσίδων στους κόκκους του αμύλου, ως αποτέλεσμα του σχηματισμού ενδομοριακών γεφυρών.

Τέλος αναφέρεται ότι η προσθήκη υδρόξυπροπυλ- ομάδας σε συνδυασμό με τροποποίηση με σταυροειδείς δεσμούς, παρέχει μεγαλύτερη σταθερότητα στο άμυλο, κατά την αποθήκευση στα τρόφιμα όπου εφαρμόζεται (Singh *et al.*, 2007).

Γ. 4. 5. Διατροφική και Τοξικολογική ανάλυση τροποποιημένου αμύλου

Μεγάλος αριθμός τροποποιημένων αμύλων χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για παρασκευή προϊόντων που προορίζονται για κατανάλωση. Τα άμυλα αυτά περιέχουν μικρά ποσά υποκατεστημένων ομάδων και θεωρούνται ασφαλή πρόσθετα τροφίμων. Κατά την προσθήκη ακέτυλ- και υδρόξυπρόπυλ- ομάδας, το επίπεδο των μονοϋποκατεστημένων ομάδων που εισάγονται στο άμυλο είναι σχετικά χαμηλό.

Το μέγιστο επιτρεπτό όριο υποκατάστασης κατά την εστεροποίηση, την φωσφορυλίωση και την προσθήκη υδρόξυπρόπυλ- ομάδας, είναι 2.5, 0.4 και 10% αντίστοιχα (FAC Food Additives and Contaminants committee report on modified starches, 1980). Ασφαλή θεωρούνται επίσης και τα τροποποιημένα άμυλα με σταυροειδείς δεσμούς τα οποία περιέχουν μια υποκατεστημένη ομάδα ανά 1.000 ή περισσότερες μονάδες άνυδρης γλυκόζης. Αναφέρεται ότι η νομοθετική έγκριση για τη χρησιμοποίηση των καινοφανών παραγώγων αμύλου σε επεξεργασμένα τρόφιμα, είναι υπό συζήτηση, παρόλα αυτά παρασκευάζονται και αναλύονται διάφορα παράγωγα με πολλαπλές τροποποιήσεις.

Μερικά από τα άμυλα που έχουν υποστεί τροποποίηση είτε μερικώς είτε ολικώς ανθίστανται στα πεπτικά ένζυμα και επομένως δεν αποδίδουν θερμίδες μέσω της κατανάλωσης του τροφίμου στο οποίο περιέχονται. Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν ότι, οι φυσικές επιδράσεις των χημικώς τροποποιημένων αμύλων εξαρτώνται από το είδος της τροποποίησης (Ebihara, *et al.*, 1998). Η προσθήκη ακέτυλ- ομάδας σε άμυλο που προστίθεται σε τρόφιμο, αυξάνει την αίσθηση κορεσμού μετά το γεύμα και επίσης αναφέρεται βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης. Τα τροποποιημένα άμυλα με σταυροειδείς δεσμούς καθώς και τα φωσφορυλιωμένα, πέπτονται αργά και θεωρείται ότι πλεονεκτούν στις θρεπτικές τους ιδιότητες. Τέλος, τα τροποποιημένα άμυλα που εμφανίζουν επιβραδυνόμενη απορρόφηση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία νοσημάτων όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης και η νόσος αποθήκευσης γλυκογόνου (Singh *et al.*, 2007)

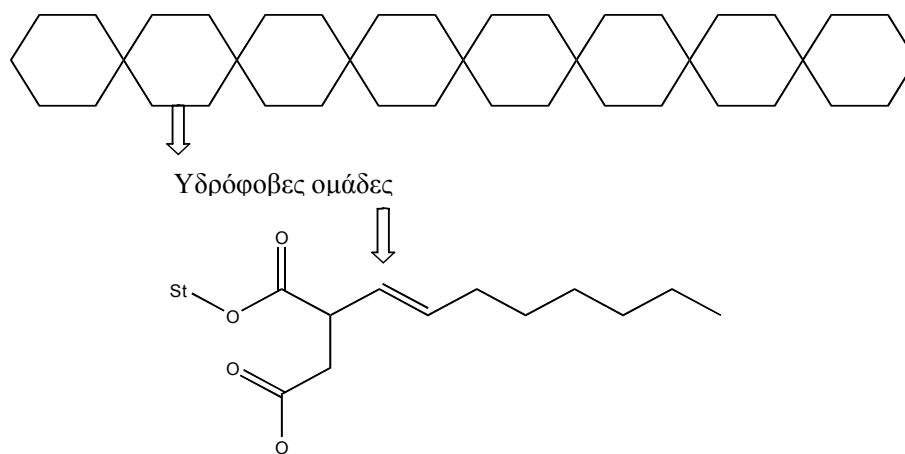
Γ. 4. 6. Εφαρμογές τροποποιημένου αμύλου ως μέσου ενθυλάκωσης

Σε πρόσφατες μελέτες αναφέρεται ότι το τροποποιημένο άμυλο παρέχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και σταθερότητα ως μέσο ενθυλάκωσης από ότι το αραβικό κόμμι (Kanakdande *et al.*, 2007).

Το τροποποιημένο άμυλο έχει χρησιμοποιηθεί ως μέσο ενθυλάκωσης για το καρύκευμα κάρδαμο και πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό. Το κάρδαμο παρουσιάζει μερικά μειονεκτήματα όπως είναι η ευαισθησία στο φως, τη θερμότητα και το οξυγόνο, τα οποία όμως μπορούν να ξεπεραστούν με την εφαρμογή της ενθυλάκωσης (Krishnan, *et al.*, 2005). Ακόμη ένα καρύκευμα όπου το τροποποιημένο άμυλο χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ενθυλάκωσης είναι το κόκκινο πιπέρι καθώς επίσης και το κύμινο όπου ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση αυτή με τη μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό (Kanakdande *et al.*, 2007). Αναφέρεται, επίσης, ότι τροποποιημένο άμυλο με τη μορφή οξειδωμένου αμύλου καλαμποκιού και οξειδωμένου αμύλου μάραθου, χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ενθυλάκωσης για τον εγκλεισμό της αρωματικής ένωσης βανιλίνης (Chattopadhyaya, 1998).

Γ. 4. 7. Οκτενυλοηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο

Στην παρούσα πειραματική έρευνα ως μέσο ενθυλάκωσης, χρησιμοποιήθηκε το οκτενυλοηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο (OSA- octenyl-succinate starch). Τα άμυλα OSA έχουν εγκριθεί από τις Ηνωμένες Πολιτείες ως πρόσθετα τροφίμων και θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση από το στόμα σύμφωνα με το νόμο 21 CFR 172.892 (εκδοθείς Απρίλης 2, 2001). Στην Ευρώπη τα OSA άμυλα έχουν κατηγοριοποιηθεί ως E1450 και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων. Τα OSA άμυλα επέδειξαν καλή ανοχή και λειτουργικές ιδιότητες μέσω της χρησιμοποίησής τους στη βιομηχανία τροφίμων. Επίσης ένα ακόμα πλεονέκτημα που διαθέτει είναι η απουσία γεύσης, σε αντίθεση με τις περισσότερες ουσίες που χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση, οι οποίες είναι πικρές και πρόσληψη αυξημένων ποσοτήτων οδηγεί σε πρόκληση εμέτου μέσω γάστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης (ΓΟΠΝ) (Kuentz, *et al.*, 2006)



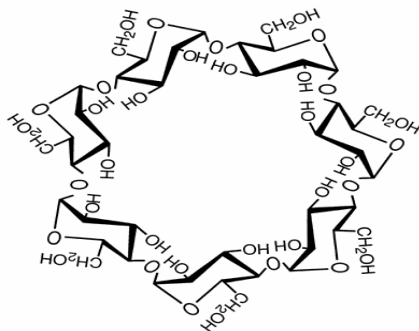
Σχήμα 7. Σχηματική παρουσίαση του οκτενυλοηλεκτρικού τροποποιημένου άμυλου (πηγή Kuentz, *et al.*, 2006)

Γ. 5. Κυκλοδεξτρίνες

Τα ενζυμικώς τροποποιημένα άμυλα θεωρούνται φυσικά προϊόντα και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι μαλτοδεξτρίνες από άμυλο καλαμποκιού ή τροποποιημένα άμυλα πατάτας και οι κυκλοδεξτρίνες. Χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα χαμηλής θερμιδικής αξίας (κρέμες, εμβάσματα σαλάτας, μαργαρίνες) επειδή δίνουν στο στόμα μια αίσθηση υφής όμοια με εκείνη του λίπους. (Καλογερόπουλος, 2006).

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικά μόρια που σχηματίζονται από ενζυματική κατεργασία του αμύλου. Το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης προέρχεται από μικροοργανισμούς ή φυτά και αποικοδομεί το άμυλο με ενδομοριακό σπάσιμο της αλυσίδας. Δεν είναι τοξικές, δεν απορροφώνται στην ανώτερη γαστρεντερική οδό και μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου.

Από χημικής άποψης οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικά oligομερή της γλυκόζης με 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης και ονομάζονται α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνες αντίστοιχα, συνδεόμενα με α - 1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Szente & Szejtli 2004; Clarot *et al*, 2000)



Σχήμα 8. Δομή β-κυκλοδεξτρίνης

Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε τρόφιμα σε επίπεδα έως 2% κυρίως ως φορείς ευαίσθητων συστατικών μετά από μοριακή ενθυλάκωση. Η β-κυκλοδεξτρίνη συγκαταλέγεται στον κατάλογο των συστατικών GRAS (Generally Regarded As Safe) από το 1998. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία η γ-κυκλοδεξτρίνη θεωρείται

πρόσθετο, ενώ για την α-κυκλοδεξτρίνη δεν έχει υπάρξει απόφαση (2005). Στην Ωκεανία η α-κυκλοδεξτρίνη χαρακτηρίζεται ως καινοφανές τρόφιμο (Καλογερόπουλος, 2006).

Η εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων είναι υδρόφοβη (Yuliani *et al*, 2005) ενώ εξωτερικά το μόριο είναι υδρόφιλο. Έτσι οι κυκλοδεξτρίνες εύκολα σχηματίζουν σύμπλοκα με μία μεγάλη ποικιλία μορίων καθώς και ιόντα μορίων. Διατροφο-δραστικά συστατικά, τα οποία συνήθως είναι λιπόφιλα, μπορούν εύκολα να εγκλεισθούν στις κυκλοδεξτρίνες (Bibby *et al*, 2000; Clarot *et al.*, 2000). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αντικατάσταση μορίων νερού που συγκρατούνται στο κέντρο της κυκλοδεξτρίνης, από μόρια του εγκλεισμένου συστατικού. Το εγκλειόμενο συστατικό αλληλεπιδρά με την κυκλοδεξτρίνη με δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η ισορροπία σχηματισμού του συμπλόκου μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και διατροφο-δραστικού συστατικού μπορεί να περιγραφεί από την χημική εξίσωση:



Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκου περιγράφεται από την εξίσωση 1

$$K_{nm} = [C_{nm}] / [N]^m [CD]^n \quad (1)$$

Η απελευθέρωση του εγκλεισμένου μορίου πραγματοποιείται όταν το σύμπλοκο τοποθετείται σε περίσσεια νερού, με αντιστροφή της θερμοδυναμικής ισορροπίας (Kant *et al.*, 2004). Το εγκλεισμένο μόριο μπορεί να δεσμευθεί σε άλλες ουσίες ως αποτέλεσμα του αυξανόμενου ρυθμού απελευθέρωσης.

Διάφορες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοσθούν για το σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ διατροφο-δραστικού συστατικού και κυκλοδεξτρίνης, μεταξύ των οποίων ο σχηματισμός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα με ή χωρίς ρύθμιση του pH, η μέθοδος της συγκαταβύθισης, η απευθείας ανάμιξη στερεής σκόνης με την παρουσία μικρής ποσότητας νερού (Hedges, 1998).

Ο σχηματισμός ενός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα μπορεί να είναι μια απλή διαδικασία. Ο απαραίτητος εξοπλισμός περιορίζεται σε ένα ποτήρι ζέσεως και μία θερμή πλάκα με αναδευτήρα (Szente, 2004). Το διατροφο-δραστικό συστατικό μπορεί να προστεθεί σε απιονισμένο και απεσταγμένο νερό που περιέχει τη κυκλοδεξτρίνη, σε μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης-διατροφοδραστικού συστατικού 1:1, 2:1, 1:2 ανάλογα με την αναλογία των δύο συστατικών που προβλέπεται να περιέχονται στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο που προκύπτει σχηματίζεται μετά από ανάμιξη των συστατικών για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία που περιγράφεται παραπάνω. Ο καθαρισμός του σχηματιζόμενου συμπλόκου περιλαμβάνει διήθηση με φίλτρο συγκεκριμένης διαμέτρου. Εναλλακτικά ο σχηματισμός μπορεί να γίνει όταν το διατροφο-δραστικό συστατικό διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε πολικό διαλύτη, και ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων. Η τρίτη διαδικασία περιλαμβάνει ανάμιξη του διατροφο-δραστικού συστατικού και της κυκλοδεξτρίνης σε μικρή ποσότητα νερού. Αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα εφαρμοστεί για εμπορική παραγωγή. Για την απομάκρυνση του νερού από το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί διήθηση, φυγοκέντριση, λυοφιλίωση ή ξηρός ψεκασμός.

Οι παραπάνω διαδικασίες δεν περιλαμβάνουν ρύθμιση του pH. Εναλλακτικά μπορεί να γίνει σχηματισμός του συμπλόκου σε συγκεκριμένη τιμή pH με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η κατάσταση ιονισμού ορισμένων μορίων (Zornoza, 1998) παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του συμπλόκου, πιθανόν λόγω του ότι η ιονισμένη μορφή του διατροφο-δραστικού συστατικού είναι λιγότερο ικανή να αντικαταστήσει τα υδατοδιαλυτά μόρια που βρίσκονται στη κοιλότητα και να σχηματίσουν πιο σταθερά μόρια. Αυτός είναι και ο λόγος που σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα, με στόχο την μετατροπή των μορίων στη μη ιονισμένη κατάσταση. Σαν παράδειγμα αναφέρεται ότι ο εγκλεισμός του κινναμικού οξέος σε κυκλοδεξτρίνες επιτυγχάνεται καλύτερα σε pH 4.

Πολλά βιοδραστικά μόρια είναι αδιάλυτα στο νερό εφόσον είναι μη πολικά. Πολλές υδρόφοβες ομάδες, όπως οι ομάδες βενζολίου βιολογικών μορίων μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν στη κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων. Ο εγκλεισμός σχετικά λιπόφιλων ουσιών σε κυκλοδεξτρίνες μεταβάλλει τη διαλυτότητά τους στο νερό, και με

τον τρόπο αυτό μετατρέπονται σε μία μορφή με την οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό τροφίμων που το κύριο συστατικό είναι το νερό. Ακόμη ο εγκλεισμός μορίων μέσα στη κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών μπορεί να αλλάξει της φυσικοχημικές ιδιότητες του εγκλεισμένου μορίου σε πολύ μεγάλο βαθμό (Clarot *et al.*, 2000).

Οι κυκλοδεξτρίνες εκτός από μεταφορείς διατροφο-δραστικών μορίων, μπορούν επίσης να προστατεύσουν τα ευπαθή μόρια από την οξείδωση, όπως η βανιλίνη (Karathanos *et al.*, 2006). Επιπλέον οι κυκλοδεξτρίνες προστατεύουν τα μόρια έναντι της αποικοδόμησης που προωθείται από το φως. Για παράδειγμα η α-τοκοφερόλη, ένα φωτοευαίσθητο μόριο, μπορεί να προστατευθεί, με το σχηματισμό συμπλόκου με β-κυκλοδεξτρίνες. Επίσης τα εγκλεισμένα μόρια προστατεύονται από αποικοδόμηση λόγω θέρμανσης και αυτός είναι ένας ακόμη λόγος που επιβάλλει τη χρησιμοποίηση των κυκλοδεξτρινών για την προστασία των δραστικών μορίων.

Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες έχει εφαρμοσθεί σε φαρμακευτικά μόρια προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα τους στο νερό. Επιπλέον, ο εγκλεισμός βελτιώνει την σταθερότητα των φαρμάκων και τη βιοδιαθεσιμότητα τους, ενώ μειώνει την τοξικότητά τους. Πολλές μέθοδοι που εφαρμόζονται στον εγκλεισμό των φαρμακευτικών ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλεισμό διατροφο-δραστικών μορίων (Καλογερόπουλος, 2006). Κατά τον εγκλεισμό των μορίων, οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητές τους τροποποιούνται και αναφέρεται επίσης ότι αυξάνεται η διαπερατότητα σε μεμβράνες και η βιοδιαθεσιμότητα των μερικών διαλυτών διατροφο-δραστικών μορίων (Szente, 2004).

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για μικροενθυλάκωση:

- υδατοδιαλυτών βιταμινών (όπως ασκορβικό οξύ),
- λιποδιαλυτών βιταμινών (βιταμίνες A, D, E, K και β-καροτένιο),
- ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων,
- αντιοξειδωτικών,
- πρόσθετων τροφίμων (όπως βανιλίνη),
- ενισχυτικών γεύσης (όπως λεμονένιο).

(Καλογερόπουλος, 2006).

Στο εμπόριο κυκλοφορούν διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες ως προς το μέγεθος του δακτυλίου και το βαθμό υποκατάστασης. Η επιλογή της πιο κατάλληλης κυκλοδεξτρίνης που θα χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό συγκεκριμένων διατροφο-δραστικών μορίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως:

- Το μέγεθος του μορίου
- Η διαλυτότητα του μορίου στο νερό
- Το κόστος της κάθε κυκλοδεξτρίνης, σε σχέση με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα
- Το τρόφιμο όπου το εγκλεισμένου μόριο πρόκειται να ενσωματωθεί
- Από την διαδικασία που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό του συμπλόκου
- Τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο ή συγγενή μόρια
- Αν επιτρέπεται η χρήση τους σε συστήματα τροφίμων
- Τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου. Σαν παράδειγμα αναφέρεται ότι η υδρόξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σχηματίζει σύμπλοκο που είναι δύσκολο να μελετηθεί ως προς τη δομή του με τη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) που χρησιμοποιείται ευρέως για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού.

Οι διαστάσεις των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών εμφανίζονται στον πίνακα **13**. Οι συγκεκριμένες κυκλοδεξτρίνες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με μια ευρεία ποικιλία οργανικών συστατικών. Το μέγεθος της κοιλότητας των κυκλοδεξτρινών επιτρέπει την εκλεκτική δέσμευση ορισμένων μορίων. Η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί το πιο συνηθισμένο μέσο εγκλεισμού εξαιτίας της υψηλής ικανότητας που έχει να σχηματίζει σύμπλοκα και λόγω χαμηλού κόστους. Η δομή της είναι κυκλική και έχει σχήμα κώνου (Yuliani *et al.*, 2006). Μεταξύ των κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιούνται συχνά, η β-κυκλοδεξτρίνη προσφέρει άριστο περιβάλλον δέσμευσης των φαινολικών δακτυλίων, που απαντάται συχνά στις δομές διατροφο-δραστικών συστατικών όπως είναι τα αντιοξειδωτικά.

Πίνακας 13. Διαστάσεις α-, β-, γ-κυκλοδεξτρίνης.

Τύπος κυκλοδεξτρίνης	Εσωτ.διάμετρος Å	Εξωτ. Διάμετρος Å	Μήκος Å
α-κυκλοδεξτρίνη	5.7	13.7	7.8
β-κυκλοδεξτρίνη	7.8	15.3	7.8
γ-κυκλοδεξτρίνη	9.5	16.9	7.8

Γ. 5. 1. Παράγωγα κυκλοδεξτρινών

Έχουν απομονωθεί και μελετηθεί μεγαλύτερου μεγέθους κυκλοδεξτρίνες (Szejtli, 1998), όπως η δ-κυκλοδεξτρίνη, η-κυκλοδεξτρίνη και θ-κυκλοδεξτρίνη, οι οποίες έχουν μεγαλύτερο μέγεθος εσωτερικής κοιλότητας. Η δ-κυκλοδεξτρίνη περιλαμβάνει εννιά μόρια γλυκόζης και έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό από την β-κυκλοδεξτρίνη, αλλά μικρότερη διαλυτότητα από την α- και γ-κυκλοδεξτρίνη. Οι μεγαλύτερου μεγέθους κυκλοδεξτρίνες δεν έχουν φυσιολογική κυλινδρική δομή και η κοιλότητα τους είναι ακόμη μικρότερη από αυτή των γ-κυκλοδεξτρινών. Από το 1997 έχει αναφερθεί η σύνθεση περισσότερων από 1500 παραγώγων κυκλοδεξτρινών. Μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το μέγεθος και το είδος της ομάδας που εισάγεται ως υποκατάστατης. Τα διάφορα παράγωγα των κυκλοδεξτρινών παρουσιάζονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14. Παράγωγα κυκλοδεξτρινών

Παράγωγα κυκλοδεξτρινών		
α-	β-	γ-
Μεθυλ-	Μεθυλ-	Μεθυλ-
	Αιθυλ-	
Βουτυλ-	Βουτυλ-	Βουτυλ-
	Υδροξυαιθυλ-	Υδροξυαιθυλ-
2-Υδροξυπροπυλ-I	2-υδροξυπροπυλ-	2-υδροξυπροπυλ-
	2-υδροξυβουτυλ-	

Ακετυλ-	Ακετυλ-	Ακετυλ-
	Προπιονυλ-	
	Βουτυρυλ-	
Σουκινυλ-	Σουκινυλ-	Σουκινυλ-
	Βενζοϋλ-	
	Παλμιτυλ-Ι	
	Τολουενεσουλφονυλ-	

Τα πιο γνωστά υποκατεστημένα παράγωγα κυκλοδεξτρινών είναι η υδρόξυπροπυλο-β-κυκλοδετρίνη (HP-β-CD), τυχαίας μεθυλίωσης α- και β-κυκλοδετρίνη, μαλτοζυλ-β-κυκλοδετρίνη, ακετυλιωμένη κυκλοδετρίνη, σουλφοβουτυλαιθερ-β-κυκλοδετρίνη (SE-b-CD). Με τη χρήση αυτών των παράγωγων κυκλοδεξτρινών επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα και μικρότερη τοξικότητα (Connors, 1997). Η τυχαία υποκατάσταση κρυσταλλικών μορίων κυκλοδετρίνης, έχει ως αποτέλεσμα το μετασχηματισμό τους σε άμορφο μίγμα ισομερών παραγώγων, τα οποία έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό (Lofsson & Masson, 2001)

Στον πίνακα 15 παρουσιάζεται η διαλυτότητα στο νερό και το κόστος των συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών. Από τον πίνακα αυτό φαίνεται ότι οι υποκατεστημένες κυκλοδετρίνες παρουσιάζουν σημαντικά αυξανόμενη διαλυτότητα.

Πίνακας 15. Κόστος διαφόρων τύπων κυκλοδεξτρινών

Κυκλοδεξτρίνες	Υποκατάσταση	MW	Υδατοδιαλυτότητα (mg/ml)	Κόστος(USD/Kg)
α-κυκλοδετρίνη		972	145	45
β-κυκλοδετρίνη		1135	18.5	5
υδρόξυπροπυλ-β-κυκλοδετρίνη	0.65	1400	>600	300
Τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδετρίνη	1.8	1312	>500	350
γ-κυκλοδετρίνη		1297	232	80

(Πηγή Magnusdottir *et al.*, 2002)

Γ. 5. 2. Διαλυτότητα κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες κρυσταλλώνονται με την συμμετοχή μορίων νερού. Η ενυδατωμένη α -κυκλοδεξτρίνη, απαντά με την μορφή $\alpha\text{-CD}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και σε δύο κρυσταλλικές μορφές I και II, αλλά μία τρίτη μορφή $\alpha\text{-CD}\cdot 7.57\text{ H}_2\text{O}$, έχει κρυσταλλοποιηθεί από διάλυμα BaCl_2 . Η β -κυκλοδεξτρίνη κρυσταλλώνεται με έντεκα ή δώδεκα μόρια νερού $\beta\text{-CD}\cdot 11\text{ H}_2\text{O}$, και ως, $\beta\text{-CD}\cdot 12\text{ H}_2\text{O}$, η ακριβής σύσταση των οποίων εξαρτάται από τη σχετική υγρασία. Η $\gamma\text{-CD}$ κρυσταλλώνεται συνήθως με οκτώ μόρια νερού αλλά μπορεί να κρυσταλλωθεί από 7-28 μόρια νερού. Η $\delta\text{-CD}$ μπορεί να κρυσταλλοποιηθεί ως $\delta\text{-CD}\cdot 13.75\text{ H}_2\text{O}$ (Connors, 1997).

Η μέγιστη διαλυτότητα των α , β και γ κυκλοδεξτρινών στους 25°C , σε γραμμάρια είναι 14.5, 1.85 και 8.19 αντίστοιχα ανά 100ml νερού. Η διαλυτότητα αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης η διαλυτότητα αυξάνει καθώς αυξάνει ο βαθμός μεθυλίωσης. Η μέγιστη διαλυτότητα επιτυγχάνεται με τη μεθυλίωση των 2/3 των υδροξυλικών ομάδων. Ωστόσο, η διαλυτότητα μειώνεται όταν η μεθυλίωση ξεπερνά τον βέλτιστο βαθμό (Loftsson & Brewste, 1996). Ο σχηματισμός συμπλόκου γενικά μεταβάλλει τη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης. Εάν το εγκλεισμένο μόριο είναι μη διαλυτό στο νερό, συχνά το σχηματισθέν σύμπλοκο έχει μικρότερη διαλυτότητα από το μόριο της κυκλοδεξτρίνης, αλλά μεγαλύτερη από το μη εγκλεισμένο διατροφo-δραστικό συστατικό.

Ο εγκλεισμός μορίων σε κυκλοδεξτρίνες μπορεί να μελετηθεί με την μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC). Οι κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν δυο κορυφές κατά τη σάρωση με την μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας. Η πρώτη είναι στους 160°C λόγω απομάκρυνσης του κρυσταλλικού νερού. Η δεύτερη παρατηρείται στους 300°C , λόγω τήξης των κρυστάλλων και της θερμική διάσπασης τους.

Γ. 6. Ζελατίνη

Η ζελατίνη είναι φυσική, διαλυτή πρωτεΐνη, η οποία παράγεται με μερική υδρόλυση του κολλαγόνου που απαντά στα οστά, το δέρμα, τους τένοντες και τα νεύρα ζώων. Αποτελεί άοσμη, άγευστη και σχεδόν άχρωμη ένωση. Είναι επίσης γνωστή και ως προσθετική ουσία E441. Η ζελατίνη τήκεται όταν θερμαίνεται και στερεοποιείται όταν ψύχεται, ενώ ανάμειξη της με νερό σχηματίζει ένα ημι-στερεό κολλοειδές ζελέ. Έχει σημείο τήξης κοντά στους 37 °C και αυτό συμβάλει στην απομίμηση της αίσθησης που προκαλεί στο στόμα η τήξη του λίπους. Έχει αναφερθεί ότι μέσω ενσωμάτωσης ζελατίνης παρασκευάστηκε επαλειφόμενο προϊόν με 5% λίπος (Καλογερόπουλος, 2006).

Τα κύρια χαρακτηριστικά που προσελκύουν τους ερευνητές για τη χρησιμοποίηση της ζελατίνης είναι το γεγονός ότι είναι ουδέτερο υλικό, η βιοσυμβατότητά της καθώς επίσης και ότι αποικοδομείται σε μη τοξικά προϊόντα.

Χημικά, η ζελατίνη περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό του αμινοξέος γλυκίνη (1 στα 3 αμινοξέα), καθώς και μεγάλο ποσοστό προλίνης και 4- υδρόξυπρολίνης. Μια τυπική χημική δομή της ζελατίνης είναι η παρακάτω που περιλαμβάνει τα αμινοξέα - Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-.



Σχήμα 9. Χημική δομή ζελατίνης

Εξαιτίας όμως της υδατοδιαλυτότητάς της, θα πρέπει να τροποποιηθεί ώστε να χρησιμοποιηθεί στη φαρμακοβιομηχανία ως μέσο μεταφοράς ουσιών. Τέτοιες

τροποποιήσεις επιτυγχάνονται μέσω της ξήρανσης, της λυοφιλίωσης κτλ. (Bruschia *et al.*, 2003).

Η ζελατίνη αποτελεί ιδανική υποψήφια ουσία για την παραγωγή μικροσφαιριδίων, αφού έχει χαμηλό κόστος, δυνατότητες παρασκευής μεμβρανών και σχηματισμού σωματιδίων και επίσης διατίθεται σε μη πυρογενές μορφή (σημαντική προϋπόθεση για ενέσιμα σκευάσματα). Αναφέρεται ότι το χαρακτηριστικό γνώρισμα της βιοσυμβατότητας της ζελατίνης, επιτρέπει την προστασία του ενεργού συστατικού-φαρμάκου, όταν χρησιμοποιείται ως φορέας, ειδικά σε συστήματα που στοχεύουν στην απελευθέρωση σε βλεννώδεις μεμβράνες όπως: στόμα, μύτη, επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και του ουροποιητικού συστήματος. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται ευρέως σε παρεντερικά διαλύματα εξαιτίας της βιοσυμβατότητάς της, βιοδιάσπασής της και της χαμηλής αντιγονικής της δράσης. Από την άλλη, διαλύματα τα οποία επικαλύπτονται εξωτερικά με ζελατίνη, θεωρούνται επιρρεπή στο σχηματισμό σταυροειδών δεσμών μεταξύ και εντός των μορίων της ζελατίνης σε μια σχέση που εξαρτάται από το χρόνο, τη θερμοκρασία και την υγρασία. Εξαιτίας αυτής της τάσης, η χρήση της ζελατίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα θεωρείται, από μερικούς ερευνητές, αμφισβητήσιμη (Saxena, *et al.*, 2005).

Έχει αναφερθεί ότι η ζελατίνη διαλύεται γρήγορα σε υδατικό περιβάλλον, οπότε δυσχεραίνεται η παραγωγή συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων στο πλάσμα στα επιθυμητά επίπεδα για περίοδο 1 με 3 μήνες. Λαμβάνοντας υπόψη το χαρακτηριστικό αυτό, συμπεραίνουμε ότι για την μείωση της διαλυτότητας του πολυμερούς, απαιτούνται διαδικασίες σχηματισμού σταυροδεσμών (π.χ. επεξεργασία με γλουταραλδεΐδη και φορμαλδεΐδη), ώστε να απελευθερώνεται η δραστική ουσία σε θερμοκρασία δωματίου μέσω του σχηματισμού αδιάλυτων δικτύων στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου. Παρόλα αυτά η δημιουργία των σταυροδεσμών, μπορεί να οδηγήσει σε τοξικές παρενέργειες (ως αποτέλεσμα του υπολείμματος του παράγοντα) ή σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις με τις ενεργές ουσίες. Επομένως, θα ήταν προτιμότερο να στραφεί η αναζήτηση στην εύρεση κατάλληλων συνθηκών θερμικής επεξεργασίας της ζελατίνης (σκλήρυνσης), ώστε να λαμβάνονται μερικώς διαλυτά ή αδιάλυτα μικροσφαιρίδια και να εξασφαλίζεται ο έλεγχος της απελευθέρωσης του φαρμάκου στον οργανισμό (Esposito, *et al.*, 1996).

Γ. 6. 1. Κύριες τεχνικές χρήσεις

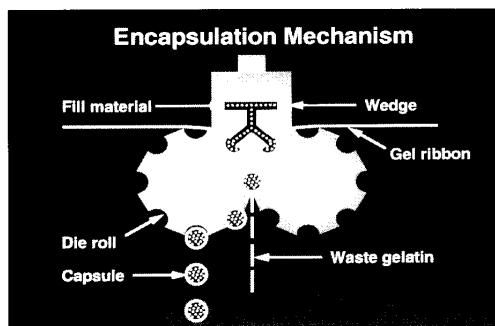
- Αποτελεί το κάλυμμα των φαρμακευτικών καψουλών ώστε να διευκολύνει την κατάποση.
- Αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την παραγωγή μικροσφαιριδίων.
- Αποτελεί επίσης καλυπτικό μέσο και υλικό σχηματισμού σωματιδίων, είναι φθηνή και διατίθεται σε μη πυρογενή μορφή.
- Χρησιμοποιείται ως μεταφορέας, μέσο επικάλυψης ή διαχωρισμού για άλλες ουσίες, όπως για παράδειγμα τη μετατροπή του β-καροτενίου σε υδατοδιαλυτή ένωση.
- Διαθέτει ικανότητα σχηματισμού τοιχωμάτων δηλαδή έμφυτη ικανότητα ενθυλάκωσης, για αιθανολικά διαλύματα ή πτητικές αρωματικές ουσίες, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό (*FDA*, 1990; *Grobbsen et al.*, 2004).
- Συμβάλλει στη διατήρηση της γεύσης και της οσμής των αρωματικών ενώσεων που εγκλείονται, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα του προϊόντος.

Μέσω της χρησιμοποίησης της τεχνολογίας καψουλών ζελατίνης, περιορίζονται σοβαρά προβλήματα μόλυνσης τροφίμων κατά την παραγωγή, μειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για καθαρισμό και δεν χρησιμοποιούνται εξειδικευμένες διατάξεις.

Με τη χρήση καψουλών ζελατίνης:

- Διευκολύνεται ο έλεγχος της μερίδας, των προστιθέμενων συστατικών και της ακρίβειας βάρους κατά τη ζύγιση. Επίσης μειώνονται τα εναπομείναντα απορρίμματα κατά την παρασκευή.
- Επιμηκύνεται ο χρόνος ζωής (αποθήκευση). Διατηρείται η φρεσκάδα και βελτιώνεται η ποιότητα του προϊόντων. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε ενθυλακωμένα συστατικά τα οποία διαφορετικά θα έπρεπε είτε να ψυχθούν, είτε να καταψυχθούν.
- Βελτιώνεται η εμφάνιση. Διατίθενται σε πληθώρα σχημάτων και χρωμάτων.

- Παρέχουν ποικιλία διαστάσεων. Συστατικά που περικλείονται σε πολύ μικρές ποσότητες όπως χρωστικές ουσίες και αρωματικές ενώσεις, ελέγχονται με μεγαλύτερη προσοχή και ευκολία σε κάψουλες και οι καταναλωτές τις χειρίζονται εύκολα.
- Διευκολύνεται η κατάποση. Μέσω του εγκλεισμού βιοδραστικών συστατικών στα μικροσφαιρίδια, βελτιώνεται η απελευθέρωση των συστατικών αυτών.
- Οι κάψουλες ζελατίνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα τροφίμων. Σε περιπτώσεις όπου τα γνήσια τρόφιμα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξαιτίας του περιορισμένου χρόνου ζωής, όπως για παράδειγμα τα φρούτα, μπορούν να αντικατασταθούν με πολτό φρούτων εγκλεισμένο σε ζελατίνη. Η τεχνική αυτή εξασφαλίζει επιμήκυνση στην αποθήκευση και διατήρηση.
- Όταν τα περισσότερα προϊόντα διατίθενται σε μορφές μη ανακυκλώσιμες, η ικανότητα της ζελατίνης να διασπάται πλήρως στον ανθρώπινο οργανισμό, θεωρείται σημαντικό πλεονέκτημα τόσο για την βιομηχανία όσο και για τον καταναλωτή (Moorhouse & Grundon, 1994).



Σχήμα 10. Πορεία ενθυλάκωσης και παραγωγής καψουλών ζελατίνης

Γ. 6. 2. Διατροφική ανάλυση

Παρόλο που η ζελατίνη αποτελείται κατά 98–99% από πρωτεΐνη (σε ξηρό βάρος), έχει χαμηλότερη διατροφική αξία από άλλες πηγές πρωτεΐνης. Εμφανίζει ασυνήθιστα αυξημένη περιεκτικότητα στα μη απαραίτητα αμινοξέα γλυκίνη και προλίνη,

ενώ στερείται στη σύσταση της τα απαραίτητα αμινοξέα. Δεν περιέχει τρυπτοφάνη και είναι ελλιπής σε ισολευκίνη, θρεονίνη και μεθειονίνη. Η % σύσταση της ζελατίνης σε αμινοξέα είναι περίπου: γλυκίνη 21 %, προλίνη 12 %, υδρόξυπρολίνη 12 %, γλουταμινικό οξύ 10 %, αλανίνη 9 %, αργινίνη 8%, ασπαρταμικό οξύ 6 %, λυσίνη 4 %, σερίνη 4 %, λευκίνη 3 %, βαλίνη 2 %, φαινυλαλανίνη 2 %, θρεονίνη 2 %, ισολευκίνη 1 %, υδροξυλυσίνη 1 %, μεθειονίνη και ιστιδίνη <1% και τυροσίνη < 0.5 %. Οι τιμές αυτές ποικίλουν, ιδιαίτερα για τα δευτερεύοντα συστατικά, ανάλογα με την πηγή προέλευσης του ακατέργαστου προϊόντος και την τεχνική επεξεργασίας.

Γ. 6. 3. Θέματα ασφάλειας κατά τη χρησιμοποίηση ζελατίνης

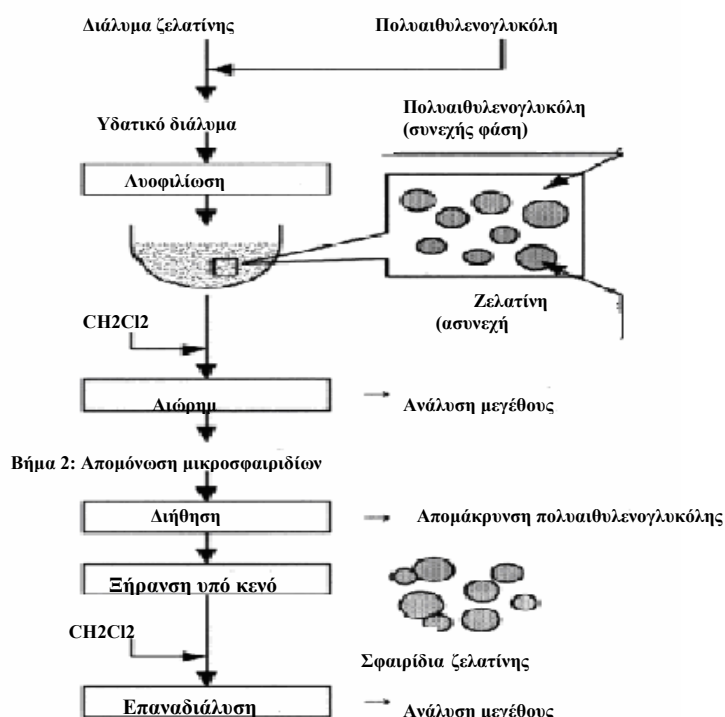
Εξαιτίας της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας και της σύνδεσής της με τη νόσο Creutzfeldt-Jakob (CJD), επικρατεί μεγάλη ανησυχία και θεωρείται απαγορευτική η χρησιμοποίηση ζελατίνης προερχόμενης από πιθανών νοσηρά μέρη βοοειδών. Παρόλα αυτά, μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2004, απέδειξε ότι μέσω της διαδικασίας παραγωγής ζελατίνης καταστρέφεται το μεγαλύτερο ποσοστό των *prions* που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας, και ανευρίσκονται στο ακατέργαστο προϊόν. Από την άλλη, πιο πρόσφατες και λεπτομερείς έρευνες στις Η.Π.Α, υπέβαλαν στον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), την επανέκδοση προειδοποιήσεων και αυστηρότερων συστάσεων σχετικά με την προέλευση και την επεξεργασία της ζελατίνης, ώστε να μειώνεται ο πιθανός κίνδυνος πρόκλησης σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας, που είχε εκδοθεί το 1997.

Γ. 6. 4. Εφαρμογές ζελατίνης ως μέσο ενθυλάκωσης

Η ζελατίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό συστατικών των τροφίμων. Η λυοφιλίωση διαλύματος ζελατίνης οδηγεί στο σχηματισμό μικροσφαιριδίων που περιέχουν στο εσωτερικό τους το εγκλεισμένο συστατικό (Takahiro *et al.*, 2001). Στο σχήμα 11 παρουσιάζεται η πορεία σχηματισμού μικροσφαιριδίων ζελατίνης, παρουσία της πολυαιθυλενογλυκόλης ως βοηθητικό συστατικό. Η αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού σχετίζεται σημαντικά με το μέγεθος των σφαιριδίων και το μέγεθος διανομής. Με αυτό τον τρόπο συμπεραίνεται ότι για να επιτευχθεί αποτελεσματικός

εγκλεισμός, απαιτούνται στερεής φάσης μικροσφαιρίδια με μέση διάμετρο μικρότερη από 5 μm και μέγιστη διάμετρο μικρότερη από 10 μm . Τα συγκεκριμένα μικροσφαιρίδια ζελατίνης θα ήταν χρήσιμα για τη μελέτη και ανάπτυξη ποικίλων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων και δραστικών ενώσεων.

Βήμα 1: Σχηματισμός μικροσφαιριδίων



Σχήμα 11. Σχηματική παρουσίαση της πορείας για την παρασκευή μικροσφαιριδίων ζελατίνης.

Τα μικροσφαιρίδια ζελατίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλεισμό όχι μόνο μορίων αλλά και ολόκληρων κυττάρων (Payne *et al.*, 2002). Αναφέρεται ότι η ζελατίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό οστεοβλαστών από κύτταρα του στρώματος του νωτιαίου μυελού αρουραίων και βρέθηκε ότι διατήρησαν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Ο προσωρινός εγκλεισμός κυττάρων σε μικροσφαιρίδια

ζελατίνης, μπορεί να λειτουργήσει και ως προστατευτικός μηχανισμός για τα κύτταρα από περιβαλλοντικές επιδράσεις.

Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα μέσα ενθυλάκωσης, με σκοπό τον αποτελεσματικότερο εγκλεισμό και μεταφορά συστατικών των τροφίμων. Έτσι η ζελατίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με σακχαρόζη, αραβικό κόμμι και άλλα μέσα υδατανθακικής φύσης. Στις περιπτώσεις αυτές απαιτείται περεταίρω διερεύνηση για την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας των δύο ή περισσότερων μέσων που οδηγούν στην επίτευξη αποτελεσματικής ενθυλάκωσης. Για παράδειγμα αναφέρεται ότι το αποτελεσματικότερο μέσο για τον εγκλεισμό του λιμονένιου, που αποτελεί την κύρια αρωματική ένωση στο έλαιο πορτοκαλιού, μέσω της εφαρμογής λυοφιλίωσης, είναι ένα μίγμα που περιέχει ζελατίνη- σακχαρόζη- αραβικό κόμμι σε αναλογίες 1:1:1 (Kaushik & Roos, 2006). Το λιμονένιο έχει ενθυλακωθεί ως μίγμα με διάφορες αρωματικές ενώσεις σε αραβικό κόμμι, άμυλο, κυκλοδεξτρίνες, κόμμι ζελάνης και σε μίγμα μαλτοδεξτρίνης με αραβικό κόμμι, μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Η μικροενθυλάκωση σε ζελατίνη χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση φαρμάκων για την επιμήκυνση του χρόνου απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας (Arida *et al.*, 2006; Changa *et al.*, 2006). Ο ρυθμός απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας που είχε υποστεί μικροενθυλάκωση, μπορεί να είναι έως 100 φορές χαμηλότερος, συγκρινόμενος με την απελευθέρωση του μη εγκλεισμένου. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι μέσω της δημιουργίας εξωτερικών πολυμερών περιβλημάτων σε κρυσταλλικές δομές της φαρμακευτικής ένωσης, μπορεί να επιτευχθεί παράταση στο χρόνο απελευθέρωσης της συγκεκριμένης ουσίας.

Η ζελατίνη έχει χρησιμοποιηθεί και για τον εγκλεισμό πρόπολης με παρασκευή μικροσφαιριδίων ζελατίνης που περιέχουν πρόπολη μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (Bruschia *et al.*, 2003). Αναφέρεται ότι διατηρήθηκε η αντιβακτηριακή δραστηριότητα της πρόπολης έναντι του *Staphylococcus aureus*. Η χρησιμοποίηση των μικροσφαιριδίων ζελατίνης με πρόπολη, θα ήταν χρήσιμη για την ανάπτυξη σκευασμάτων, τα οποία θα ήταν απαλλαγμένα από την έντονη και δυσάρεστη γεύση και οσμή του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης.

Γ. 7. Νέα Βιοπολυμερή

Σήμερα αναζητούνται νέες πηγές θρεπτικών υλών που παρασκευάζονται με τη βοήθεια της βιοτεχνολογίας. Στο κοντινό μέλλον η διατροφή του ανθρώπου θα στηρίζεται όλο και περισσότερο στη νέα γενιά τροφίμων, τα καινοφανή τρόφιμα, τρόφιμα δηλαδή που παρασκευάζονται από νέες, μη συμβατικές πηγές ή ακόμα πηγές που έχουν χρησιμοποιηθεί με μικρή απόδοση και στις οποίες εφαρμόζονται τώρα σύγχρονες, τροποποιημένες μέθοδοι επεξεργασίας.

Γ. 7. 1. Χιτοζάνη: αποτελεί το αποκετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό. Η χιτοζάνη είναι ένα κατιονικό βιοπολυμερές με πολλές δυνατότητες εφαρμογής στην παρασκευή πηκτών και σταθερών αφρών. Οι ιδιότητες των παραγόμενων χιτοζανών χαρακτηρίζονται κυρίως από δύο παράγοντες: το ιξώδες και το βαθμό ακετυλίωσης. Ο έλεγχος αυτών των παραμέτρων επιτρέπει την παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας χιτοζανών και παραγώγων της με πολλές εφαρμογές στην ιατρική και τη βιομηχανία.

Γ. 7. 2. Ζελάνη: αποτελεί ανιονικό πολυσακχαρίτη, ο οποίος ανήκει στα καινοφανή τρόφιμα. Θεωρείται ότι έχει μοναδικές ιδιότητες σχηματίζοντας θερμοαναστρέψιμες πηκτές. Παράγεται από καθαρές καλλιέργειες του βακτηρίου *Pseudomonas elodoa*, που ζεί σε λίμνες και βάλτους. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα του είναι ένας τετρασακχαρίτης αποτελούμενος από β-D-γλυκόζη, β-D-γλυκουρονικό οξύ, α-L-ραμνόζη σε αναλογίες 2:1:1. Το κόμμι ζελάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παχυντής, σταθεροποιητής, στο σχηματισμό πηκτών ή υμενίων, σε ευρύ φάσμα τροφίμων. Έχει υψηλότερη σταθερότητα από το άγαρ και μπορεί να είναι σταθερό, εύθρυπτο και όχι πάρα πολύ σκληρό. Η πηκτή αυτή μπορεί να σχηματισθεί με χαμηλές συγκεντρώσεις, επομένως με μικρότερη δαπάνη και με καλύτερη απελευθέρωση γεύσης.

Γ. 7. 3. Ξανθάνη: η τεχνική της αποκετυλίωσης μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλους πολυσακχαρίτες όπως η μικροβιακής προέλευσης ξανθάνη. Η ξανθάνη που χρησιμοποιείται ως παράγοντας πήξης (συμπύκνωσης) αλλά και ως δομικό συστατικό των τροφίμων (Καλογερόπουλος, 2006).

Κεφάλαιο Δ

Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού

Δ. 1. Εισαγωγή

Θεωρητικά, οποιαδήποτε μέθοδος, χρησιμοποιηθεί για να διαπιστωθούν οι μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητες που παρατηρούνται στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο σε σχέση με την ενεργή φάση και το μέσο εγκλεισμού, μπορεί να αξιοποιηθεί για την επιβεβαίωση του σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού και για τον καθορισμό της στοιχειομετρίας των συμπλόκων.

Οι μεταβολές που παρατηρούνται στις φυσικοχημικές ιδιότητες του φορέα και της ουσίας που θα υποστεί μικροενθυλάκωση, περιλαμβάνουν αλλαγές στη διαλυτότητα, στη χημική δραστηριότητα και σταθερότητα, στην απορρόφηση στο φάσμα του ορατού και υπεριώδους φωτός, στο φθορισμό, χημικές αλλαγές που παρατηρούνται μέσω του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), μεταβολές στην συγκράτηση του διατροφοδραστικού συστατικού (π.χ. όπως συμβαίνει στην υγρή χρωματογραφία), μεταβολές στις τιμές σταθερών ιονισμού ηλεκτρολυτών καθώς και μεταβολές κατά τις ποτενσιομετρικές μετρήσεις. Ακολουθώς αναφέρονται οι σημαντικότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού.

Δ. 2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance (NMR))

Η φασματοσκοπία NMR όταν εφαρμοστεί στην μελέτη του εγκλεισμού μορίων στην κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με:

- Το σχηματισμό του συμπλόκου λόγω μετατόπισης των κορυφών των εσωτερικών H-3 και H-5 υδρογόνων της β-κυκλοδεξτρίνης. Συνήθως το φάσμα του ελεύθερου συστατικού συγκρίνεται με το φάσμα του συστατικού παρουσία του μέσου εγκλεισμού.
- Τη στοιχειομετρία του συμπλόκου εγκλεισμού

- Τη δομή του συμπλόκου στο διάλυμα. Μέσω του φάσματος ^1H -NMR μπορούν να ληφθούν λεπτομέρειες όσον αφορά στο ποια πρωτόνια του εγκλεισμένου μορίου εντοπίζονται εσωτερικά της κοιλότητας της β -κυκλοδεξτρίνης, στην περίπτωση που το μέσο εγκλεισμού είναι η κυκλοδεξτρίνη.

Ως παράδειγμα εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη του εγκλεισμού αναφέρονται τα εξής:

Δ. 2.1. Μελέτη της απελευθέρωσης της φερομόνης (Z)-τετραδεκα-7-εν-1-άλης του παράσιτου *Prays oleae* της ελιάς μετά από εγκλεισμό σε β -κυκλοδεξτρίνη μέσω NMR φασματοσκοπίας (Yannakopoulou *et al.*, 2002).

Μελετήθηκε η συμπεριφορά του συμπλόκου ως προς τον προστατευτικό μηχανισμό που προσφέρει ο εγκλεισμός στην οξείδωση, η απελευθέρωση του μορίου που εγκλείστηκε καθώς και η δομή του συμπλόκου τόσο σε διάλυμα όσο και σε στερεή φάση. Αναφέρεται ότι μέσω του φάσματος του NMR στο υδατικό διάλυμα, βρέθηκε στοιχειομετρία 2:1 β -CD: (Z)-τετραδεκα-7-εν-1-άλης, καθώς και 2 ξεχωριστές αλλά ισοδύναμες δομές του συμπλόκου με τη μεθυλομάδα να βρίσκεται στη δευτεροταγή πλευρά της β -CD. Και στις 2 περιπτώσεις τα τελικά άκρα του μορίου εγκλεισμού εκδηλώνουν μεγάλη κινητικότητα, ενώ τα τμήματα του μορίου της φερομόνης που βρίσκονται κοντά στο *cis*-διπλό δεσμό εμφανίζονται σταθεροποιημένα στην κοιλότητα.

Δ. 2.2. Μελέτη της δομής του υδατικού διαλύματος του συμπλόκου β -CD με β -ναφθυλοξυακετικό οξύ (NOA) μέσω ^1H NMR φασματοσκοπίας.

Το NOA αποτελεί συνθετικό συστατικό το οποίο εκδηλώνει δράσεις όμοιες με τις ορμόνες των φυτών και χρησιμοποιείται στη γεωργία ως παρασιτοκτόνο. Ο εγκλεισμός του NOA στην κοιλότητα της β -CD αποδείχτηκε άμεσα μέσω του φάσματος ^1H NMR, αφού παρουσιάστηκε μετατόπιση των πρωτονίων H-3 και H-5 στην κοιλότητα σε μεγάλο βαθμό, με την αύξηση της σχετικής αναλογίας NOA προς β -CD στο υδατικό διάλυμα. Μέσω επίδρασης υψηλότερου μαγνητικού πεδίου βρέθηκε ότι τα σήματα της β -CD έγιναν λιγότερο έντονα και ιδιαίτερα αυτά των πρωτονίων κοιλότητας H-3 και H-5. Μέσω του ^1H NMR φάσματος, παρατηρήθηκε ότι το NOA μπορεί να δεσμευτεί στην κοιλότητα της β -CD είτε από το ένα, H-6, H-7, ή το άλλο, οξυακετοξικό, άκρο του άξονά

της, αφού βρέθηκε ότι και τα 2 άκρα του μορίου εκδηλώνουν αλληλεπιδράσεις με την κοιλότητα. Καταλήγοντας, αναφέρεται ότι σε υδατικό διάλυμα σχηματίζεται μείγμα συμπλόκων β-CD:NOA με στοιχειομετρία 1:1 και 2:1 (Kokkinou *et al.*, 2001).

Δ. 2. 3. Με τη χρησιμοποίηση ^1H NMR φασματοσκοπίας, μελετήθηκαν οι ιδιότητες του υδατικού διαλύματος του συμπλόκου γ-κυκλοδεξτρίνης (γ-CD) με Congo Red (CR).

Η γ-CD είναι η μεγαλύτερη και πιο υδατοδιαλυτή της οικογένειας των κυκλοδεξτρινών, στην οποία μπορούν να εγκλειστούν μεγάλα οργανικά μόρια. Η CR είναι υδατοδιαλυτή αζωτούχα βαφική ύλη, που χρησιμοποιείται για την ειδική ιστολογική ανίχνευση των σειρών β-αμυλοειδούς που σχετίζεται με εκφυλιστικές ασθένειες του εγκεφάλου όπως Alzheimer's.

Η CR έχει την τάση να συναθροίζεται και ο σχηματισμός διμερών ή μεγαλύτερων αθροισμάτων επηρεάζει την εμφάνιση του φάσματος του NMR. Η προσθήκη της γ-CD σε διάλυμα CR έχει ως αποτέλεσμα διαχωρισμό των συναθροισμάτων όπως αποδεικνύεται και από το φάσμα ^1H NMR, με σταδιακή εξαφάνιση των ασθενών κορυφών και αποκατάσταση των έντονων κορυφών. Από την άλλη όμως, προσθήκη CR στο διάλυμα της γ-CD έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση καινούριων σημάτων, τα οποία παρατηρούνται σε συχνότητες που δεν μεταβάλλονται με αλλαγή στη συγκέντρωση της CR. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι η CR αλληλεπιδρά με τη γ-CD με τέτοιο τρόπο ώστε η ανταλλαγή μεταξύ ελεύθερης και δεσμευμένης φάσης να είναι αργή στο χρόνο παρακολούθησης της NMR. Επομένως η πορεία δυναμικής ισορροπίας εκδηλώνεται μέσω της μειωμένης έντασης των αρχικών κορυφών της γ-CD και των νέων έντονων κορυφών που εμφανίζονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της CR (Mourtzis *et al.*, 2003).

Δ. 2. 4. Η NMR φασματοσκοπία, χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση του σχηματισμού ψευδοροταξανών σε υδατικά διαλύματα, οι οποίες σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση κυκλοδεξτρίνης με γραμμικών αλειφατικών α,ω-αμινοξέων καθώς και την αζωτούχα βαφική ύλη Methyl Orange (MO).

Μέσω του εγκλεισμού γραμμικών μορίων, οι κυκλοδεξτρίνες (CD) μπορούν να επάγουν την διάταξη των μακρομορίων σε μεγαλύτερες παρατάξεις είτε μέσω

δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών με το μόριο εγκλεισμού, είτε χρησιμοποιώντας τις γνωστές μορφές συσχέτισής τους για να δημιουργήσουν υπερμοριακά συστήματα που ονομάζονται ψευδοπολυροταζάνες.

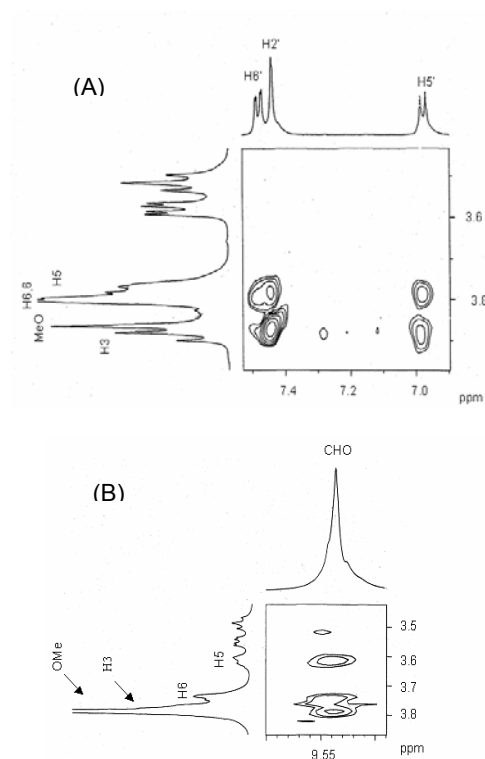
Αυτά τα γραμμικά μακρομόρια βρέθηκε ότι σχηματίζουν ταυτόχρονα, [2]- και [3] ψευδοροταζάνες με α -CD σε υδατικό διάλυμα (Eliadou *et al.*, 1999).

Το MO έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη διερεύνηση της επίδρασης της των ανιονικών ή κατιονικών αντικαταστατών στη CD με τη μέθοδο της έγχυσης για τη δημιουργία ψευδο-ροταζάνων, χρησιμοποιώντας NMR φασματοσκοπία.

Χρησιμοποιώντας το μόριο της μεγαλύτερης κυκλοδεξτρίνης γ CD, η μεγαλύτερη διαθεσιμότητα εντός της κοιλότητας οδηγεί σε δημιουργία συμπλόκων 1:2 και 2:2 MO: γ CD (Mourtzis. *et al.*, 2004).

Δ. 2. 5. Με τη χρησιμοποίησης NMR φασματοσκοπίας μπορεί να μελετηθεί ο σχηματισμός συμπλόκων μετά από εφαρμογή λυοφιλίωσης.

Ως παράδειγμα αναφέρεται η εφαρμογή της NMR φασματοσκοπίας για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου βανιλίνης/ β -CD, το οποίο αφού διαλύθηκε σε δευτεριωμένο νερό D_2O και εξετάστηκαν τα φάσματα 1H NMR μίας διάστασης αποδείχτηκε ότι η μοριακή αναλογία βανιλίνης: β -CD ήταν 1:1. Η συμπλοκοποίηση ακολούθησε το καθεστώς της γρήγορης ανταλλαγής και για το λόγο αυτό παρατηρήθηκε φάσμα μέσου χρόνου λόγω ελεύθερων και συμπλοκοποιημένων μορίων. Έτσι τα πρωτόνια της β -CD που βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας, H3 και H5, προασπίστηκαν κατά 7,1 και 9,5 Hz, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τις μετατοπίσεις του φάσματος της ελεύθερης β -κυκλοδεξτρίνης, αποδεικνύοντας την παρουσία της βανιλίνης στο εσωτερικό της κοιλότητας της β -CD. Τα εξωτερικά πρωτόνια της β -CD επηρεάζονται ελάχιστα. Επιπλέον, το φάσμα δύο διαστάσεων περιστρεφόμενου πεδίου (ROESY) έδειξε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου μεταξύ των πρωτονίων του φαινολικού δακτυλίου της βανιλίνης και των πρωτονίων της κοιλότητας της β -CD, κάτι που επιβεβαιώνει πλήρη εγκλεισμό (**Σχήμα 12**).



Σχήμα 12. Μέρη των χαρτών ROESY σε D₂O στους 300K: (A) 1:1 βCD/βανιλίνη, (B) περίσσεια βανιλίνης (Karathanos *et al.*, 2007)

Δ. 3. Θερμικές Τεχνικές

Δ. 3. 1. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry (DSC))

Μεταξύ των προαναφερόμενων τεχνικών, η μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων του συμπλόκου εξετάζεται με λεπτομέρεια. Οι θερμικές ιδιότητες μπορούν να μελετηθούν με τη μέθοδο DSC. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

- Για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού.
- Για τη μελέτη της χημικής σταθερότητας των διατροφο-δραστικών συστατικών σε συνθήκες οξείδωσης, μέσω συνεχής ροής οξυγόνου στο συστατικό (Clas *et al.*, 1999).

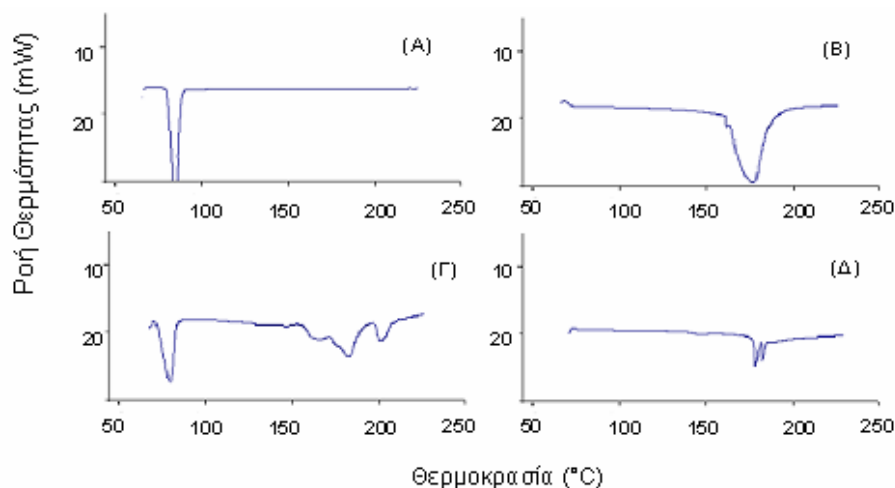
Παρέχει επίσης, ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τις εξώθερμες και ενδόθερμες αντιδράσεις καθώς και τις αλλαγές στη θερμοχωρητικότητα ως αποτέλεσμα της μεταβολής της θερμοκρασίας ή του χρόνου. Η θερμότητα που απαιτείται για τη διατήρηση του δείγματος και του δείγματος αναφοράς στην ίδια θερμοκρασία καταγράφεται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα συστατικά μπορεί να παρουσιάζουν τις παρακάτω θερμικές συμπεριφορές: τήξη, κρυστάλλωση, βρασμό, εξάχνωση, αφυδάτωση, μετάπτωση στερεού-στερεού καθώς και υαλώδης μετάπτωση.

Χρησιμοποιώντας για την ξήρανση, τεχνικές όπως η λυοφιλίωση ή η ξήρανση με ψεκασμό, το τελικό προϊόν είναι άμορφο και χαρακτηρίζεται από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Στη θερμοκρασία αυτή (T_g), τα υλικά μαλακώνουν εξαιτίας του μεγάλου εύρους συντονισμένης μοριακής κίνησης (Sootiantawat *et al.*, 2004).

Η μέθοδος DSC μπορεί να εφαρμοστεί για την επιβεβαίωση του σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού. Η εξαφάνιση των θερμικών συμβάντων στα μόρια που συμπλοκοποιούνται με εγκλεισμό, αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού. Όταν το μόριο που εγκλείεται σχηματίζει σύμπλοκο με την κυκλοδεξτρίνη, τότε δεν μπορεί να υπάρξει αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά, αφού δεν υπάρχει ξένη κρυσταλλική δομή για να απορροφήσει ενέργεια.

Μια τυπική πορεία που ακολουθείται για την επιβεβαίωση των συμπλόκων εγκλεισμού, παρουσιάζεται στο σχήμα **13**, όπου το σύμπλοκο βανιλίνης/ β -κυκλοδεξτρίνης (β -CD), μελετάται χρησιμοποιώντας σάρωση DSC (Karathanos *et al.*, 2006). Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνονται 4 θερμογραφήματα: της β -CD, της ελεύθερης βανιλίνης, του φυσικού μίγματος και του συμπλόκου εγκλεισμού. Η σάρωση της βανιλίνης μέσω DSC, παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή για το μόριο της στους 84°C , η οποία και ανταποκρίνεται στο σημείο τήξης της, το οποίο για την καθαρή βανιλίνη είναι $81\text{--}83^\circ\text{C}$. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το μείγμα βανιλίνης και β -CD (**Σχήμα 13 Γ**). Η σάρωση του φυσικού μίγματος μέσω DSC, ήταν σχεδόν ταυτόσημη με αυτή της καθαρής βανιλίνης και παρουσίασε έντονη ενδόθερμη κορυφή ξανά στους 84°C , περίπου, αποδεικνύοντας ότι μέσω αυτής της διαδικασίας δεν επιτεύχθηκε εγκλεισμός. Όπως φαίνεται στο σχήμα **13 Β** και **13 Δ**, τα θερμογραφήματα της β -CD και του συμπλόκου εγκλεισμού, δεν παρουσίασαν έντονη ενδόθερμη κορυφή, στο διερευνώμενο εύρος θερμοκρασιών. Η εξαφάνιση της ενδόθερμης κορυφής (σ.τ. της

βανιλίνης στους 84°C), (**Σχήμα 13 Δ**) υποδηλώνει ότι χρησιμοποιώντας την τεχνική της λυοφιλίωσης, παράχθηκε σύμπλοκο εγκλεισμού μεταξύ βανιλίνης και β-CD, και όχι φυσικό μίγμα.



Σχ

ήμα 13. Θερμογραφήματα: **(Α)** βανιλίνη, **(Β)** β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD), **(Γ)** φυσικό μίγμα βανιλίνης/β-CD, **(Δ)** σύμπλοκο εγκλεισμού βανιλίνης/β-CD

Με τη μέθοδο του εγκλεισμού παράγονται μόρια πιο ανθεκτικά στην οξείδωση. Για τον υπολογισμό της αυξημένης σταθερότητας των εγκλεισμένων συστατικών χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Η μέθοδος DSC (Velasco *et al.*, 2004), υπό συνθήκες οξείδωσης, όταν το φέρον αέριο είναι το οξυγόνο, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο. Μπορεί να διαπιστωθεί εάν η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης μπορεί να προστατέψει ένα μόριο από την οξείδωση ή ακόμη να αυξήσει τη σταθερότητά του. Σύμφωνα με τη μέθοδο, τα δείγματα θερμαίνονται με γρήγορο ρυθμό, προσεγγίζοντας μια θερμοκρασία όπου η οξείδωση δύσκολα συμβαίνει (κάτω από την θερμοκρασία οξείδωσης του ελεύθερου μορίου). Ακολουθώντας όταν επιτευχθεί η υψηλή αυτή θερμοκρασία, η ουσία θερμαίνεται με χαμηλό ρυθμό ώστε να παρατηρηθεί το φαινόμενο της οξείδωσης (εξώθερμη αντίδραση). Η θερμοκρασία έναρξης είναι αυτή στην οποία παρατηρείται αποσύνθεση της ουσίας που εξετάζεται επειδή ενεργοποιείται η οξείδωση (Gines *et al.*, 1996).

Χρησιμοποιώντας τη DSC σάρωση σε διαφορετικούς ρυθμούς οξείδωσης, μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με την κινητική της οξείδωσης (Cibulková *et al.*, 2005). Έχει εφαρμοστεί ως μέθοδος παρακολούθησης της οξειδωτικής σταθερότητας από πολλούς ερευνητές. Ο Cross (1970), ήταν ο πρώτος που την εφάρμοσε, χρησιμοποιώντας ισόθερμες συνθήκες με διαβίβαση οξυγόνου, για τη μελέτη της οξείδωσης των ελαίων. Η μέθοδος DSC έδειξε πολύ καλή συσχέτιση με άλλες μεθόδους επιταχυνόμενης οξείδωσης όπως είναι η μέθοδος ενεργού οξυγόνου (Cross, 1970) και η μέθοδος οξειδωτικής σταθερότητας, OSI, με την εφαρμογή του Oxidative Stability Instrument (Tan *et al.*, 2002).

Δ. 4. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματοσκοπία Μάζας (GC- MS)

Για να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των προστιθέμενων διατροφο-δραστικών συστατικών με τη μέθοδο GC συγκρίνονται οι χρόνοι κατακράτησής τους με αυτούς των καθαρών πρότυπων. Για την ποσοτικοποίηση συγκρίνεται το εμβαδό της κορυφής με το εμβαδόν της κορυφής του προτύπου. Η κατακράτηση ορίζεται ως το ποσό της εγκλεισμένης ουσίας στο σύμπλοκο μετά την επεξεργασία του προς το ποσό της ουσίας που προστέθηκε για να σχηματιστεί το σύμπλοκο (Jeon *et al.*, 2003).

Στην αέρια χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Inverse Gas Chromatography) το μέσο εγκλεισμού βρίσκεται σε μη ενεργοποιημένο υλικό επίστρωσης της στήλης το οποίο συνδέεται με τον εισαγωγέα και το σύστημα ανίχνευσης. Αυτή η μέθοδος αρχικά αναπτύχθηκε από τους Smisrod και Guillet για τη μελέτη του σημείου υαλώδους μετάπτωσης των πολυμερών. Οι Delarue και Giampaoli (2000), εφάρμοσαν τη μέθοδο αυτή ώστε να διερευνήσουν την κατακράτηση των αρωματικών ουσιών σε σχέση με τη φύση του τροφίμου.

Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας της ουσίας μέσω υπολογισμού του χρόνου σχηματισμού των προϊόντων οξείδωσης. Οι Soottitantawat *et al.* (2004), μελέτησαν την οξειδωτική σταθερότητα του D- λιμονένιου, το οποίο είχε εγκλειστεί μέσω ξήρανσης με ψεκασμό, μέσω του υπολογισμού του 1,2 εποξειδίου του λιμονενίου, με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.

Δ. 5. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης, (Reversed-phase HPLC), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ακριβή και ποσοτικό καθορισμό του ελεύθερου διατροφολογικού συστατικού (Rozou & Antoniadou, 2004). Το κλάσμα του συστατικού το οποίο απελευθερώνεται από το σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης θεωρείται σημαντική παράμετρος.

Δ. 6. Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ώστε να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός ενός συμπλόκου εγκλεισμού. Η πλήρης ανάλυση φάσματος του διαλύματος του συμπλόκου παρουσιάζει κορυφή m/z , που ανταποκρίνεται στο σύμπλοκο εγκλεισμού. Οι Naidu *et al.* (2004), επιβεβαίωσαν το σχηματισμό του συμπλόκου εγκλεισμού μελοξικάμης-κυκλοδεξτρίνης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS).

Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού είναι η φασματοσκοπία υπέρυθρου, οι ακτίνες X, η ποτενσιομετρία και οι επιδράσεις στην διαπερατότητα των συστατικών μέσω των συνθετικών μεμβρανών (Lofsson *et al.*, 2003). Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί επίσης η χρήση της Τιμής Ανισιδίνης (Anisidine Value), η οποία χρησιμοποιείται για την ποιοτική εκτίμηση του μικροεγκλεισμού, εάν η ουσία που εγκλείεται μπορεί να οξειδωθεί (Heinemann & Franke, 1999). Επίσης εφαρμόζεται η μέθοδος Light Scattering, η οποία δίνει πληροφορίες για μεγάλα συναθροίσματα (μυκήλλια) τα οποία σχηματίζονται κατά τον εγκλεισμό (Mele *et al.*, 1998). Με τη χρησιμοποίηση του Υπεριώδους Φάσματος (UV), το διατροφολογικό συστατικό παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ παρουσία του μέσου εγκλεισμού (Rozou & Antoniadou, 2004). Επίσης, μέσω της FT-IR φασματομετρίας, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του συμπλόκου εγκλεισμού (Lajos & Szejtli 2004). Και τέλος, η μέθοδος Ηλεκτρονικής Μικροσκοπησης Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy), εφαρμόζεται για τη διερεύνηση της εξωτερικής δομής της σκόνης κατά την αποθήκευση (Soottitantawat *et al.*, 2004).

Κεφάλαιο Ε

Πειραματικό Μέρος

Ε. 1. Γενικά Υλικά εργαστηρίου:

Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα, ογκομετρικοί κύλινδροι, ογκομετρικές φιάλες διαφόρων όγκων, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες διαφόρων όγκων, σιφώνια πληρώσεως των 10 mL, πιπέτες Pasteur, πλαστικά tips, vials.

Ε. 2. Απομάκρυνση κηρών από τα δείγματα πρόπολης και παρασκευή αιθανολικών εκχυλισμάτων

Αντιδραστήρια

- Αιθανόλη >99% καθαρότητας, Pro analysis, Merck

Δείγματα ακατέργαστης πρόπολης από:

1. Αχαΐα: Καλάβρυτα
2. Αρκαδία: Μεγαλόπολη
3. Μεσσηνία: Αρφαρά και Τρίκορφο
4. Ρέθυμνο: Αλοΐδες
5. Τήνος: Πύργος
6. Καρδίτσα: Λουτρό
7. Σκόπελος: Γλώσσα
8. Κύπρος: Λάρνακα.

Υλικά

- Τρίφτης (για κονιοποίηση δείγματος ακατέργαστης πρόπολης)
- Μαγνήτες
- Ηθμός
- Διηθητικό χαρτί
- Περιέκτες

Όργανα

- Μαγνητικοί αναδευτήρες (Thermolyne, cinamec 2)

Πειραματική πορεία

Δείγμα κονιοποιημένης ακατέργαστης πρόπολης, αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα, με δεκαπλάσιο όγκο αιθανόλης (90% ή 70%) επί 72 ώρες. Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης, η κωνική φιάλη που περιέχει την πρόπολη σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο για προστασία από το φως.

Στη συνέχεια το διάλυμα της πρόπολης τοποθετείται στην κατάψυξη (-40°C) επί 24 ώρες. Ακολουθεί διήθηση του διαλύματος για την απομάκρυνση κηρών και ξένων ουσιών. Τα βήματα της κατάψυξης και της διήθησης επαναλαμβάνονται μέχρι την πλήρη απομάκρυνση των κηρών.

Ε. 3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη (Balsam)

Δείγματα

- Αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης (PE) από: Πελοπόννησο: Καλάβρυτα και Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά και Τρίκορφο, Ρέθυμνο: Αλοϊδες, Τήνο: Πύργος, Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελο: Γλώσσα και Κύπρο: Λάρνακα.

Υλικά

- Κάψες πορσελάνης

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Φούρνος, Schutzart DIN 40050, Memmert, Germany.

Πειραματική πορεία

1. Ζύγιση μικρής ποσότητας του PE σε προζυγισμένη κάψα ($B_{\text{κάψας}}$, $B_{\text{κάψας}}$ και PE εκχυλίσματος)
 2. Θέρμανση κάψας στους 100°C μέχρι την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη (2 ώρες).
 3. Ζύγιση κάψας και PE αφού έχει ολοκληρωθεί η εξάτμιση ($B_{\text{κάψας}}$ και ξηρού δείγματος).
- Η % συγκέντρωση διαλυμάτων πρόπολης υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση

$$\% \text{ c PE} = (\text{B}_{\text{ξηρού δείγματος}} \times 100) / \text{B}_{\text{PE εκχυλίσματος}}$$

$$\text{Όπου } \text{B}_{\text{ξηρού δείγματος}} = \text{B}_{\text{κάψας και ξηρού δείγματος}} - \text{B}_{\text{κάψας}}$$

$$\text{Και } \text{B}_{\text{PE εκχυλίσματος}} = \text{B}_{\text{κάψας και PE εκχυλίσματος}} - \text{B}_{\text{κάψας}}$$

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο κεφάλαιο ΣΤ. στον πίνακα ΣΤ. 1.

Ε. 4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE)

Αντιδραστήρια

- Αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης (PE) από: Πελοπόννησο: Καλάβρυτα και Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά και Τρίκορφο, Ρέθυμνο: Αλοϊδες, Τήνο: Πύργος, Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελο: Γλώσσα και Κύπρο: Λάρνακα.
- Σιλυλιωτικό μέσο: BSTFA: Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Aldrich)
- Εσωτερικό πρότυπο, Internal Standard (IS): 3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη (Aldrich)
- Αέριο άζωτο (N₂)

Όργανα

- Πιπέτες Eppendorf 1000 µL και 100 µL
- Αέριος Χρωματογράφος /Φασματοσκοπία Μάζας (GC/MS)
- Υδατόλουτρο

Προετοιμασία δειγμάτων

Λαμβάνονται από το κάθε PE, κατάλληλοι όγκοι που περιέχουν 1 mg **καθαρής πρόπολης*** και μεταφέρονται σε vials. Ακολουθούν:

1. συμπίκνωση των PE υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
2. προσθήκη 50 µL εσωτερικού προτύπου (3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη) και συμπίκνωση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
3. παραγωγή των δειγμάτων με προσθήκη 250 µL συλιλιωτικού μέσου BSTFA και θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70° C για 20 λεπτά.

E. 4. 1. Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)

1 μL από το διάλυμα εισάγεται στον αεριοχρωματογράφο για ανάλυση. Ο αέριος χρωματογράφος ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγή split- splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683. Η ανίχνευση των συστατικών που περιέχονται στα αιθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων πρόπολης διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης έγινε με μια **αεριοχρωματογραφική μέθοδο σάρωσης φασμάτων μάζας (GC-MS Scan mode)** (Μέθοδος A), ώστε κάθε εκλούμενο συστατικό να ταυτοποιείται μέσω του φάσματος μαζών του, με τη βοήθεια ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών Wiley 154, Nist (1998), πρότυπων ουσιών αναφοράς και βιβλιογραφικών δεδομένων (Bankova, 2002; Bankova, 2005). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο 1 μL διαλύματος εισάγεται στον εισαγωγή θερμοκρασίας 220 $^{\circ}\text{C}$ με λόγο σχάσης (split ratio) 1: 10 και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος στον ανιχνευτή τέθηκε στους 280 $^{\circ}\text{C}$. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν μια HP-5MS (Agilent) 30 m x 0.2mm x 0.25 μm και το φέρον αέριο ήταν He υψηλής καθαρότητας, με ροή 0,7 mL/min. Ο διαχωρισμός έγινε με ένα θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 100 $^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια άνοδο της θερμοκρασίας με ρυθμό 5 $^{\circ}\text{C}$ /min μέχρι τους 310 $^{\circ}\text{C}$ όπου διατηρείται για 8 min. Με αυτή τη μέθοδο σάρωσης ιόντων (scan 50-800 amu) προσδιορίστηκαν ποσοτικά επιπλέον 7 φλαβονοειδή και τερπενικά οξέα της πρόπολης, με βάση την απόκριση όλων των μετρούμενων ιόντων για κάθε συστατικό. Τα συστατικά που προσδιορίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο ήταν: αβιετικό οξύ, διυδροαβιετικό οξύ, απιγενίνη, ισοπιμαρικό οξύ, πινοσεμπρίνη, πινομπανκσίνη και ο 3-O- αιθυλεστέρα της πινομπανκσίνης.

Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 27 επιπλέον πολυφαινολικών συστατικών της πρόπολης και 2 τερπενικών οξέων τα οποία επελέγησαν ως συστατικά – στόχοι στα αιθανολικά δείγματα πρόπολης, αναπτύχθηκε μια ευαίσθητη αεριοχρωματογραφική **μέθοδος εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring)** (Μέθοδος B). Η αεριοχρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν η HP-5MS (Agilent) 30 m x 0.2mm x 0.25 μm . Ο εισαγωγέας τέθηκε

στους 250 °C και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την αεριοχρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή MSD (MSD transfer line) στους 300 °C. Η εισαγωγή 1 μ L δείγματος έγινε με σχάση δείγματος 20: 1 (split 20:1). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ροή 0.6 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αεριοχρωματογράφου που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό ήταν:

70 °C για 5 λεπτά, 70-130 °C με ρυθμό ανόδου 15 °C / λεπτό, 130-160 °C με ρυθμό ανόδου 4 °C / λεπτό και παραμονή για 15 λεπτά και τέλος άνοδος από 160 – 300 °C με ρυθμό 10 °C / λεπτό και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 15 λεπτά.

Κατά αυτή τη μέθοδο, η ανίχνευση των συστατικών βασίζεται στην παρουσία στο δείγμα τριών χαρακτηριστικών για κάθε συστατικό ιόντων, σε χρόνο κατακράτησης (RT) + 0.05 min του αναμενόμενου χρόνου κατακράτησης των συστατικών στα πρότυπα διαλύματα και ο ποσοτικός προσδιορισμός σε ένα από τα τρία ιόντα που ορίζεται ως ιόν στόχος (**target**), ενώ επιβεβαιώνεται από τους λόγους της έντασης απόκρισης των άλλων 2 ιόντων (**qualifiers**) προς την ένταση απόκρισης του ιόντος στόχου στο δείγμα. Στον πίνακα **E. 2. 3**, φαίνονται οι χρόνοι κατακράτησης και τα χαρακτηριστικά ιόντα που επελέγησαν για τον προσδιορισμό του κάθε συστατικού με τη μέθοδο B.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου. Ως τέτοιο επελέγη η 3-(4- υδρόξυ - φαίνυλο) -1- προπανόλη. Μια σειρά προτύπων διαλυμάτων – μιγμάτων των συστατικών που προσδιορίζονται – οδήγησε στην κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς για κάθε συστατικό σε περιοχή συγκεντρώσεων από 80 –3500 ng/mL. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές με συντελεστές γραμμικής συσχέτισης $R^2 > 0.996$ για όλες τις ουσίες που προσδιορίστηκαν.

Πίνακας E. 4. 1. Χρόνοι κατακράτησης και τα χαρακτηριστικά ιόντα που επελέγησαν

A/A	ΟΝΟΜΑ	RT	Target Ion	Qualifiers
1	Βανιλίνη	17,30	194	209
2	Κινναμικό οξύ	17,47	205	220
3	Τυροσόλη	18,28	179	267, 282
4	p- υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	20,02	267	223, 193
5	p- υδρόξυ φαινυλοξικό οξύ	20,48	252	296, 281

A/A	ΟΝΟΜΑ	RT	Target Ion	Qualifiers
6	Phloretic acid	26,21	192	310
7	Βαννιλικό οξύ	26,62	297	267, 312
8	Ομοβαννιλικό οξύ	27,18	326	267, 311
9	ο- κουμαρικό οξύ	29,42	293	308, 147
10	Πρωτοκατεχικό οξύ	30,91	193	355, 370
11	3-4 διυδροξύ φαινυλοξικό οξύ	31,77	384	267, 179
12	Συριγγικό οξύ	34,83	327	342, 312
13	p- κουμαρικό οξύ	35,74	308	293, 219
14	Γαλλικό οξύ	36,69	281	458, 443
15	Φερουλικό οξύ	38,78	338	323, 308
16	καφεϊκό οξύ	39,49	396	219, 381
17	Σιναπικό οξύ	40,76	368	353, 338
18	Ρεσβερατρολη	45,06	444	445, 443
19	Χρυσίνη	45,28	383	384
20	Επικατεχίνη	46,26	368	355, 474
21	Ναριγενίνη	46,30	473	296
22	Κατεχίνη	46,46	368	355, 474
23	Γενιστεΐνη	46,98	473	
24	Καμφερόλη	48,24	559	560
25	Χλωρογενικό οξύ	48,88	345	307, 324
26	Κερκετίνη	49,57	647	559, 575
27	Μυρισετίνη	50,30	735	647, 575
28	Ολεανολικό οξύ	56,28	203	320, 482
29	Ουρσολικό οξύ	57,40	203	320, 482

* καθαρή πρόπολη αναφέρεται ως το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης μετά από εξάτμιση του διαλύτη

E. 5. Παρασκευή των συμπλόκων PE με βιοπολυμερή

Αντιδραστήρια

- β-κυκλοδεξτρίνη, Aldrich, M.B. 1135, Cat: 85.608-, Lot:S20642-054, Steinheim, Germany
- Τροποποιημένο άμυλο, Cargill, Food & Pharma Specialties, USA.
- Ζελατίνη, difco laboratories, (Detroit, Michigan), USA.
- Tween 80, Merck, Germany
- Απιονισμένο νερό
- PE από Καλάβρυτα

Υλικά

- Μαγνήτες

Όργανα

- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Διάταξη λυοφιλίωσης, TELSTAR, Model Cryodos-45, Spain, 2001, Nr 397, 220V, 50Hz, 0.525 KW
- Ομογενοποιητής Junke & Kunkel, IKA – Labortechnik, ULTRA – TURRAX .
- Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Densitometer), Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA
- Περιστρεφόμενος εξατμιστής (Rotavapor), EYELA, με υδατόλουτρο και υδραντλία κενού της ίδιας εταιρείας.
- Μαγνητικοί αναδευτήρες (Thermolyne, cimarec 2)

Πειραματική πορεία

E. 5. 1. Παρασκευή συμπλόκων PE (είτε μετά από εξάτμιση διαλύτη Σ 2 (PTM 2), είτε ως αιθανολικό εκχύλισμα), με τροποποιημένο άμυλο

Ποσότητα τροποποιημένου αμύλου, προστίθεται σε απιονισμένο νερό το οποίο παραμένει για 24 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να διαλυθεί πλήρως με τη βοήθεια αναδευτήρα. Μετά το πέρας των 24 ωρών προστίθεται

το εκχύλισμα πρόπολης καθώς και 2 σταγόνες γαλακτωματοποιητή (Tween – 80). Ακολούθως πραγματοποιείται ομογενοποίηση για 2 λεπτά στις 9500 στροφές (rpm). Το παρασκεύασμα ψύχεται στους -40°C για 24 ώρες και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Με βάση την προαναφερόμενη μέθοδο παρασκευάστηκαν 29 σύμπλοκα. Οι ποσότητες PE, τροποποιημένου αμύλου και απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον **Πίνακα Ε. 5. 1**.

Ε. 5. 2. Παρασκευή συμπλόκων PE (είτε μετά από εξάτμιση διαλύτη Σ27 (PTM 4), είτε ως αιθανολικό εκχύλισμα), με β- κυκλοδεξτρίνη (β- CD)

Παρασκευάστηκαν διάλυμα με προσθήκη β- CD σε απιονισμένο νερό τα οποία, αναμιγνύονται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για 48 ώρες ή vortex για 5 λεπτά. Στην περίπτωση που το σχηματιζόμενο διάλυμα δεν είναι διαυγές, θερμαίνεται ελαφρά (στους 35°C) για πλήρη διαλυτοποίηση. Στη συνέχεια προστίθεται το εκχύλισμα πρόπολης και ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ή ομογενοποίηση όπως στην περίπτωση του τροποποιημένου αμύλου. Το παρασκεύασμα ψύχεται στους -40°C για 24 ώρες και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Με βάση την προαναφερόμενη μέθοδο παρασκευάστηκαν 10 σύμπλοκα. Οι ποσότητες PE, β- CD και απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον **Πίνακα Ε. 5. 2**.

Ε. 5. 3. Παρασκευή συμπλόκων PE (είτε μετά από εξάτμιση διαλύτη (PTM 7), είτε ως αιθανολικό εκχύλισμα), με υδρόξυ- πρότυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD)

Για την παρασκευή των συμπλόκων αυτών ακουλούθησα ακριβώς την ίδια πορεία όπως στην περίπτωση του συμπλόκου πρόπολης/ β-CD.

Παρασκευάστηκαν 7 σύμπλοκα πρόπολης/ HP-β-CD. Οι ποσότητες PE, HP-β-CD και απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον **Πίνακα Ε. 5. 3**.

Ε. 5. 4. Παρασκευή συμπλόκων ΡΕ με ζελατίνη

Παρασκευάζεται γαλάκτωμα με προσθήκη ζελατίνης σε απιονισμένο νερό, το οποίο παραμένει για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη διαλυτοποίηση της ζελατίνης και αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Στη συνέχεια προστίθεται το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης καθώς και 2 σταγόνες γαλακτωματοποιητή (Tween – 80). Ακολούθως πραγματοποιείται ομογενοποίηση για 2 λεπτά στις 9500 στροφές (rpm). Το παρασκεύασμα ψύχεται στους – 40°C για 24 ώρες και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Με βάση την προαναφερόμενη μέθοδο παρασκευάστηκαν 9 σύμπλοκα. Οι ποσότητες ΡΕ, ζελατίνης και απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον Πίνακα Ε. 5. 4.

Πίνακας Ε. 5. 1. Παρασκευή συμπλόκων ΡΕ με τροποποιημένο άμυλο

A/A	Δείγμα	H ₂ O (ml)	Τροποποιημένο άμυλο (g)	Πρόπολη (g)	Προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween-80	Ομογενοποίηση 9500 στροφές
1	Σ 1 (PTM 1)	25	10	0,0537	X	X
2	Σ 2 (PTM 2)	50	10	0,5	X	X
3	Σ 3 (PTM 3)	30	10	1,934	X	X
4	Σ 4 (PTM 12 I)	80	0,2	0,4	-	-
5	Σ 5 (PTM 12 II)	40	0,2	0,4	-	-
6	Σ 6 (PTM 12 III)	20	0,2	0,4	-	-
7	Σ 7 (PTM 12 IV)	80	0,4	0,4	-	-
8	Σ 8 (PTM 12 V)	40	0,4	0,4	-	-
9	Σ 9 (PTM 12 VI)	20	0,4	0,4	-	-
10	Σ 10 (PTM 12 VII)	80	0,8	0,4	-	-
11	Σ 11 (PTM 12 VIII)	40	0,8	0,4	-	-
12	Σ 12 (PTM 12 IX)	20	0,8	0,4	-	-

A/A	Δείγμα	H ₂ O (ml)	Τροποποιημένο άμυλο (g)	Πρόπολη (g)	Προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween-80	Ομογενοποίηση 9500 στροφές
13	Σ 13 (PTM A)	80	0,2	0,4	X	X
14	Σ 14 (PTM B)	40	0,2	0,4	X	X
15	Σ 15 (PTM Γ)	20	0,2	0,4	X	X
16	Σ 16 (PTM Δ)	80	0,4	0,4	X	X
17	Σ 17 (PTM Ε)	40	0,4	0,4	X	X
18	Σ 18 (PTM ΣΤ)	20	0,4	0,4	X	X
19	Σ 19 (PTM Ζ)	10	0,8	0,4	X	X
20	Σ 20 (PTM Η)	2	0,8	0,4	X	X
21	Σ 21 (PTM Θ)	2	0,8	0,4	X	X
22	Σ 22 (PTM 13 Α)	2	0,8	0,4	X	X
23	Σ 23 (PTM 13 Β)	3,6	1,2	0,4	X	X
24	Σ 24 (PTM 13 Γ)	4,8	1,6	0,4	X	X
25	Σ 25 (PTM 13 Δ)	6	2	0,4	X	X
26	Σ 26 (PTM 13 Α')	2	0,8	0,4	-	X
27	Σ 27 (PTM 13 Β')	3,6	1,2	0,4	-	X
28	Σ 28 (PTM 13 Γ')	4,8	1,6	0,4	-	X
29	Σ 29 (PTM 13 Δ')	6	2	0,4	-	X

Πίνακας Ε. 5. 2. Παρασκευή συμπλόκων PE με β- CD

A/Δ	Δείγμα	H ₂ O (ml)	β-κυκλοδεξτρίνη (g)	Πρόπολη (g)	Προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween-80	Ομογενοποίηση 9500 στροφές
1	Σ 30 (PTM 4 *)	10	0,185	0,185	-	-
2	Σ 31 (PTM 5 *)	8	0,185	0,185	-	-
3	Σ 32 (PTM 6 *)	10	0,185	0,185	X	X
4	Σ 33 (PTM 14 Α)	80	0,4	0,4	-	X

A/Δ	Δείγμα	H ₂ O (ml)	β-κυκλοδεξτρίνη (g)	Πρόπολη (g)	Προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween-80	Ομογενοποίηση 9500 στροφές
5	Σ 34 (PTM 14 Β)	40	0,4	0,4	-	X
6	Σ 35 (PTM 14 Γ)	20	0,4	0,4	-	X
7	Σ 36 (PTM 14 Δ)	2	0,8	0,4	-	X
8	Σ 37 (PTM 14 Ε)	3,6	1,2	0,4	-	X
9	Σ 38 (PTM 14 ΣΤ)	4,8	1,6	0,4	-	X
10	Σ 39 (PTM 14 Ζ)	6	2	0,4	-	X

* Τα Σ 30, Σ 31, Σ 32 (PTM 4, PTM 5, PTM 6) παρασκευάστηκαν με τις ίδιες αναλογίες πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης, υπό διαφορετικές συνθήκες.

Πίνακας Ε. 5. 3. Παρασκευή συμπλόκων PE με υδρόξυ- πρότυλο- β- CD

A/A	Δείγμα	H ₂ O (ml)	υδρόξυ- πρότυλο - β- κυκλοδεξτρίνη (g)	Πρόπολη (g)	Προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween-80	Ομογενοποίηση 9500 στροφές
1	Σ 40 (PTM 7 *)	10	0,185	0,185	-	-
2	Σ 41 (PTM 8 *)	8	0,185	0,185	-	-
3	Σ 42 (PTM 9 *)	10	0,185	0,185	X	X
4	Σ 43 (PTM 15 Α)	2	0,8	0,4	-	X
5	Σ 44 (PTM 15 Β)	3,6	1,2	0,4	-	X
6	Σ 45 (PTM 15 Γ)	4,8	1,6	0,4	-	X
7	Σ 46 (PTM 15 Δ)	6	2	0,4	-	X

* Τα Σ 40, Σ 41, Σ 42 (PTM 7, PTM 8, PTM 9) παρασκευάστηκαν με τις ίδιες αναλογίες πρόπολης / υδρόξυ-πρότυλο- β-κυκλοδεξτρίνης, υπό διαφορετικές συνθήκες.

Πίνακας Ε. 5. 4. Παρασκευή συμπλόκων PE με ζελατίνη

A/Δ	Δείγμα	H ₂ O (ml)	Ζελατίνη (g)	Πρόπολη (g)	Προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween-80	Ομογενοποίηση 9500 στροφές
1	Σ 47	80	0,2	0,4	X	X
2	Σ 48	80	0,4	0,4	X	X
3	Σ 49	80	0,8	0,4	X	X
4	Σ 50	40	0,2	0,4	X	X
5	Σ 51	40	0,4	0,4	X	X
6	Σ 52	40	0,8	0,4	X	X
7	Σ 53	20	0,2	0,4	X	X
8	Σ 54	20	0,4	0,4	X	X
9	Σ 55	20	0,8	0,4	X	X

Ε. 5. 5. Μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων πρόπολης με β-CD, HP-β-CD και τροποποιημένο άμυλο με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).

Χρησιμοποιήθηκε διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA). Για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου μελετήθηκαν 11 δείγματα: καθαρή πρόπολη (μετά από εξάτμιση του διαλύτη από το PE από Καλάβρυτα), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης Σ30 (PTM4), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο Σ1 (PTM1), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο Σ2 (PTM2), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη Σ31 (PTM5), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνη Σ 32 (PTM6), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη Σ40 (PTM7), το σύμπλοκο εγκλεισμού Σ41 (PTM8) πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη Σ42 (PTM9), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο Σ25 (PTM13Δ), το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/

τροποποιημένο άμυλο Σ19 (PTMZ), σε ανοιχτά καψίδια από αλουμίνιο μεγέθους 40 μL για την διαβίβαση οξυγόνου στο δείγμα.

Η μάζα του δείγματος που ελήφθη αντιστοιχούσε σε 5 mg καθαρής πρόπολης και ζυγίστηκαν με ακρίβεια ± 0.01 mg.

Τα δείγματα θερμαίνονται από θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 90 °C με ρυθμό σάρωσης 60 °C /min. Τα δείγματα παραμένουν στους 90 °C για ένα λεπτό, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και μετά θερμαίνονται έως τους 380 °C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 10 °C /min.

E. 5. 6. Έλεγχος εγκλεισμού συστατικών που περιέχονται στο αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης

E. 5. 6. 1. Παρασκευή των συμπλόκων εγκλεισμού αβιετικού οξέος, καμφερόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης, χρυσίνης και απιγενίνης. Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων με τη μέθοδο DSC

Αντιδραστήρια

- β-κυκλοδεξτρίνη, Aldrich, M.B. 1135, Cat: 85.608, Lot:S20642-054, Steinheim, Germany
- Τροποποιημένο άμυλο, Cargill, Food & Pharma Specialties, USA.
- Tween 80, Merck, Germany
- Απιονισμένο νερό
- Αβιετικό οξύ, πρότυπο, Chembiotin
- Απιγενίνη, πρότυπο, Aldrich
- Καφεϊκό οξύ, πρότυπο, Fluka
- Ναριγκενίνη, πρότυπο, Chembiotin
- Χρυσίνη, πρότυπο, Chembiotin
- Καμφερόλη, πρότυπο, Chembiotin

Υλικά

- Μαγνήτες

- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm (PVDF, Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Όργανα

- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Διάταξη λυοφιλίωσης, TELSTAR, Model Cryodos-45, Spain, 2001, Nr 397, 220V, 50Hz, 0.525 KW
- Ομογενοποιητής Junke & Kunkel, IKA – Labortechnik, ULTRA – TURRAX .
- Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Densitometer), Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA
- Περιστρεφόμενος εξατμιστής (Rotavapor), EYELA, με υδατόλουτρο και υδραντλία κενού της ίδιας εταιρείας.
- Μαγνητικοί αναδευτήρες (Thermolyne, cinamec 2)

Πειραματική πορεία

E. 5. 6. 1. 1. Παρασκευή συμπλόκου αβιετικού οξέος/ β -κυκλοδεξτρίνης (β -CD)

Το σύμπλοκο του αβιετικού οξέος με την β -CD παρασκευάστηκε με ανάμιξή τους σε υδατικό διάλυμα και απομάκρυνση του νερού, με την μέθοδο της λυοφιλίωσης. Ποσότητα αβιετικού οξέος (0.05 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β -CD (0.185 g β -CD + 20 ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως το διάλυμα ψύχεται στους -40°C για 24 h και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

E. 5. 6. 1. 2. Παρασκευή συμπλόκου αβιετικού οξέος/τροποποιημένου αμύλου

Το σύμπλοκο του αβιετικού οξέος με το τροποποιημένο αμύλο παρασκευάστηκε με ανάμιξή τους σε υδατικό διάλυμα και απομάκρυνση του νερού, με την μέθοδο της λυοφιλίωσης. Ποσότητα αβιετικού οξέος (0.5 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα τροποποιημένου αμύλου (10 g τροποποιημένο άμυλο + 25 ml νερό). Ακολουθεί προσθήκη 2 σταγόνων γαλακτωματοποιητή (Tween 80) και ομογενοποίηση για 2 min στις 9500 στροφές (rpm). Στη συνέχεια το παρασκεύασμα ψύχεται στους -40°C για 24 h και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

E. 5. 6. 1. 3. Παρασκευή συμπλόκου καφεϊκού οξέος/ β-κυκλοδεξτρίνης

Ποσότητα καφεϊκού οξέος (0.0587 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β- CD (0.37 g β-CD + 40 ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. 20 ml από το διάλυμα που προκύπτει διηθούνται με τη βοήθεια φίλτρου. Ακολούθως τόσο το διάλυμα, όσο και το διήθημα, ψύχονται στους -40°C για 24 h και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

E. 5. 6. 1. 4. Παρασκευή συμπλόκου καφεϊκού οξέος/ τροποποιημένου αμύλου

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακολουθώντας την μέθοδο που αναφέρεται στο E. 5. 6. 1. 2.

E. 5. 6. 1. 5. Παρασκευή συμπλόκου ναριγκενίνης/ β-κυκλοδεξτρίνης

Ποσότητα ναριγκενίνης (0.0887 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β- CD (0.37 g β-CD + 20 ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. 10 ml από το διάλυμα που προκύπτει διηθούνται με τη βοήθεια φίλτρου. Ακολούθως τόσο το διάλυμα, όσο και το διήθημα, ψύχονται στους -40°C για 24 h και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

E. 5. 6. 1. 6. Παρασκευή συμπλόκου ναριγκενίνης / τροποποιημένου αμύλου

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακολουθώντας την μέθοδο που αναφέρεται στο E. 5. 6. 1. 2.

E. 5. 6. 1. 7. Παρασκευή συμπλόκου χρυσίνης/ β-κυκλοδεξτρίνης

Ποσότητα χρυσίνης (0.083 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β- CD (0.37 g β-CD + 20 ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία που ακολούθησε στη συνέχεια, αναφέρεται στο E. 5. 6. 1. 3.

E. 5. 6. 1. 8. Παρασκευή συμπλόκου χρυσίνης/ τροποποιημένου αμύλου

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακολουθώντας την μέθοδο που αναφέρεται στο E. 5. 6. 1. 2.

E. 5. 6. 1. 9. Παρασκευή συμπλόκου απιγενίνης/ β-κυκλοδεξτρίνης

Ποσότητα απιγενίνης (0.0471 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β- CD (0.185 g β-CD + 10 ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία που ακολούθησε στη συνέχεια, αναφέρεται στο E. 5. 6. 1. 3.

E. 5. 6. 1. 10. Παρασκευή συμπλόκου καμφερόλης/ β-κυκλοδεξτρίνης

Ποσότητα καμφερόλης (0.0423 g) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β- CD (0.185 g β-CD + 10 ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία που ακολούθησε στη συνέχεια, αναφέρεται στο E. 5. 6. 1. 3.

E. 5. 6. 2. Παρασκευή φυσικών μίγμάτων των συστατικών με β-κυκλοδεξτρίνη

Παρασκευάστηκαν μίγματα, τα οποία αποτελούνται από: αβιετικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ναριγκενίνη, χρυσίνη, απιγενίνη, καμφερόλη και β-CD, στις ίδιες αναλογίες με τις οποίες παρασκευάστηκαν τα πιο πάνω σύμπλοκα εγκλεισμού. Οι πρότυπες πολυφαινόλες και η β-CD αναμιγνύονται σε κάψα πορσελάνης για 5 λεπτά για το σχηματισμό ομογενούς μίγματος των δύο στερεών.

E. 5. 6. 3. Μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων με β-κυκλοδεξτρίνη, με DSC

Χρησιμοποιήθηκε διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA). Για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου μελετήθηκαν 6 δείγματα πρότυπων πολυφαινολών, τα αντίστοιχα σύμπλοκα εγκλεισμού σε β-κυκλοδεξτρίνη και τα αντίστοιχα φυσικά μίγματα με β-κυκλοδεξτρίνη: β-κυκλοδεξτρίνη, καφεϊκό οξύ, φυσικό μίγμα καφεϊκού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού καφεϊκού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, καμφερόλη, φυσικό μίγμα

καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, ναριγκενίνη, φυσικό μίγμα ναριγκενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης σύμπλοκο εγκλεισμού ναριγκενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, αβιετικό οξύ, φυσικό μίγμα αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, χρυσίνη, φυσικό μίγμα χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, απιγενίνη, φυσικό μίγμα απιγενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης σύμπλοκο εγκλεισμού απιγενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης και παρατηρήθηκαν οι διαφορές που παρουσιάζουν τα θερμογραφήματά τους. Τα δείγματα θερμαίνονται από θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 50 °C με ρυθμό σάρωσης 30 °C/ min. Τα δείγματα παραμένουν στους 50 °C για ένα λεπτό, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και μετά θερμαίνονται έως τους 400 °C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 30°C /min., με την ταυτόχρονη διαβίβαση αερίου αζώτου 30 mL/min.

Η μάζα του δείγματος που ελήφθη αντιστοιχούσε σε 5 mg του αντίστοιχου συμπλόκου (1 mg για την καμφερόλη και το αβιετικό οξύ, 0,9 mg για την απιγενίνη, την ναριγκενίνη και την χρυσίνη και 0,68 mg για το καφεϊκό οξύ), τα οποία ζυγίστηκαν με ακρίβεια ± 0.01 mg και τοποθετήθηκαν σε κλειστά καψίδια αλουμινίου χωρητικότητας 40 μ L.

Ε. 5. 6. 4. Μελέτη σταθερότητας των συστατικών και των συμπλόκων εγκλεισμού τους σε β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο DSC

Χρησιμοποιήθηκε διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA). Για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου μελετήθηκαν 12 δείγματα: 6 δείγματα πρότυπων φλαβονοειδών και τα αντίστοιχα σύμπλοκα εγκλεισμού σε β-κυκλοδεξτρίνη: καφεϊκό οξύ, σύμπλοκο εγκλεισμού καφεϊκού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, καμφερόλη, σύμπλοκο εγκλεισμού καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, ναριγκενίνη, σύμπλοκο εγκλεισμού ναριγκενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, αβιετικό οξύ, σύμπλοκο εγκλεισμού αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, χρυσίνη, σύμπλοκο εγκλεισμού χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, απιγενίνη, σύμπλοκο εγκλεισμού απιγενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης και παρατηρήθηκαν οι διαφορές που παρουσιάζουν τα θερμογραφήματά τους.

Η μάζα του δείγματος που ελήφθη αντιστοιχούσε σε 5 mg του αντίστοιχου συμπλόκου, τα οποία ζυγίστηκαν με ακρίβεια ± 0.01 mg και τοποθετήθηκαν σε ανοιχτά καψίδια από αλουμίνιο μεγέθους 40 μL με διαβίβαση οξυγόνου στο δείγμα.

Τα δείγματα θερμαίνονται από θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 120°C με ρυθμό σάρωσης $90^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Τα δείγματα παραμένουν στους 120°C για ένα λεπτό, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και μετά θερμαίνονται έως τους 400°C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

E. 6. Μελέτη εγκλεισμού PE (Καλάβρυτα) σε β -κυκλοδεξτρίνη με τη χρήση υπερήχων - Επιλεκτική απομόνωση φαινολικών συστατικών -

Αντιδραστήρια

- β -κυκλοδεξτρίνη, Aldrich, M.B. 1135, Cat: 85.608, Lot:S20642-054, Steinheim, Germany
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από Καλάβρυτα
- Αιθανόλη, >99% καθαρότητας, Pro analysis, Merck

Υλικά

- Μαγνήτης

Όργανα

- Λουτρό υπερήχων- sonicator
- Περιστρεφόμενος εξατμιστής (Rotavapor), EYELA, με υδατόλουτρο και υδραντλία κενού της ίδιας εταιρείας.
- Διάταξη λυοφιλίωσης, TELSTAR, Model Cryodos-45, Spain, 2001, Nr 397, 220V, 50Hz, 0.525 KW.
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Αέριος Χρωματογράφος / Φασματοσκοπία Μάζας (GC/MS)

Πειραματική πορεία

Δείγμα PE από Καλάβρυτα, θερμαίνεται σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα για την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη. Ακολούθως προστίθενται 0,777 g β-CD σε 6 mL απιονισμένου νερού και στο διάλυμα προστίθενται 2 g πρόπολης. Το διάλυμα αυτό, θερμαίνεται ελαφρά σε υδατόλουτρο και στη συνέχεια προστίθενται 4 ml H₂O επί 2 φορές και παραμένει για ανάδευση για 4 ώρες σε λουτρό υπερήχων (sonicator) (Naefady *et al.*, 2003).

Μετά το πέρας των 4 ωρών, πραγματοποιείται διήθηση ώστε να λάβουμε διαυγές διάλυμα και στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται στους -40°C για 24 ώρες και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης. Η λυοφιλιωμένη σκόνη προστίθεται σε 100 ml αιθανόλης (70%) και ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα που σχηματίζεται διηθείται και το διήθημα που λαμβάνεται αποστάζει στα 150 mbar για 2 ώρες ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης και το τελικό διάλυμα ψύχεται στους -40°C για 24 ώρες και το εναπομείναν νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης. Ακολουθεί μεταφορά 5 mg από τη σκόνη, που αντιστοιχούν σε 3,6 mg καθαρής πρόπολης, σε vial και προετοιμασία του δείγματος για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών μέσω της μεθόδου GC-MS (τμήμα E. 4.)

E. 7. Μελέτη εγκλεισμού PE (Καλάβρυτα) σε τροποποιημένο άμυλο (Σ 2)

Αντιδραστήρια

- Σ 2 (βλέπε Πίνακα E. 2. 4. 1.)
- Σιλυλιωτικό μέσο: BSTFA: Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Aldrich)
- Εσωτερικό πρότυπο, Internal Standard (IS): 3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη (Aldrich)
- Αέριο άζωτο (N₂)

Όργανα

- Αέριος Χρωματογράφος / Φασματοσκοπία Μάζας (GC/MS)

Πειραματική πορεία

Λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το σύμπλοκο Σ 2 (21 mg), η οποία αντιστοιχεί σε 1 mg καθαρής πρόπολης και μεταφέρεται σε vial. Ακολουθεί προετοιμασία του δείγματος για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών μέσω της μεθόδου GS-MS (τμήμα Ε. 4.)

Ε. 8. Μελέτη διαλυτότητας καθαρής πρόπολης

Αντιδραστήρια

- β-κυκλοδεξτρίνη, Aldrich, M.B. 1135, Cat: 85.608-, Lot:S20642-054, Steinheim, Germany
- Απιονισμένο νερό
- Καθαρή πρόπολη μετά από εξάτμιση διαλύτη (αιθανόλης)

Υλικά

- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm (PVDF, Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Όργανα

- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης. HEIDOLPH INKUBATORHAUBE, No.549-90030-00-0, goß, 09/99
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120

Πειραματικό μέρος

Η αυξανόμενη διαλυτότητα της πρόπολης (μετά από εξάτμιση του αιθανολικού διαλύματος πρόπολης με προέλευση από τα Καλάβρυτα), παρουσία του μέσου εγκλεισμού μελετήθηκε με βάση τη μέθοδο Folin-Ciocalteau (Ε. 12. 5.)

Η πρόπολη, εξαιτίας της πληθώρας των συστατικών που περιέχει εμφανίζει ποικίλα λ_{max} , οπότε δεν μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά με βάση τη μέθοδο των Higuchi και Connors (1965), όπως προτείνεται από τη βιβλιογραφία. Οπότε, για την εκτίμηση της ποσότητας των συστατικών που διαλύονται στο νερό εξαιτίας της

παρουσίας της β-κυκλοδεξτρίνης, προσδιορίζεται το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του διαλύματος, εφόσον τα περισσότερα συστατικά που περιέχονται στη πρόπολη είναι πολυφαινόλες.

Ποσότητα καθαρής πρόπολης (0,03 g), προστίθεται σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις της β-CD (0.000, 0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.015 M), με τη βοήθεια εργαστηριακού αναδευτήρα σε θερμοκρασίες 25°, 35°, 45° C. Οι ποσότητες παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες Ε. 8. 1., Ε. 8. 2.** και **Ε. 8. 3.** Μετά από την αποκατάσταση ισορροπίας (3 ημέρες) ακολουθεί απομάκρυνση της αδιάλυτης πρόπολης, μέσω διήθησης των διαλυμάτων με φίλτρα (0,45 μm).

Πίνακας Ε. 8. 1. Μελέτη διαλυτότητας Πρόπολης στους 25 °C

A/A Δείγματος	H ₂ O (ml)	β-κυκλοδεξτρίνη (M)	β-κυκλοδεξτρίνη (g)	Πρόπολη (g)
1	5	0,000	0,0000	0,031
2	5	0,003	0,017025	0,028
3	5	0,006	0,03405	0,033
4	5	0,009	0,06475	0,030
5	5	0,012	0,06810	0,034
6	5	0,015	0,08500	0,033

Πίνακας Ε. 8. 2. Μελέτη διαλυτότητας Πρόπολης στους 35 °C

A/A Δείγματος	H ₂ O (ml)	β-κυκλοδεξτρίνη (M)	β-κυκλοδεξτρίνη (g)	Πρόπολη (g)
1	5	0,000	0,0000	0,032
2	5	0,003	0,017025	0,029
3	5	0,006	0,03405	0,034
4	5	0,009	0,06475	0,028
5	5	0,012	0,06810	0,033
6	5	0,015	0,08500	0,032

Πίνακας Ε. 8. 3. Μελέτη διαλυτότητας Πρόπολης στους 45 °C

A/A Δείγματος	H ₂ O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	β- κυκλοδεξτρίνη (g)	Πρόπολη (g)
1	5	0,000	0,0000	0,034
2	5	0,003	0,017025	0,032
3	5	0,006	0,03405	0,035
4	5	0,009	0,06475	0,031
5	5	0,012	0,06810	0,028
6	5	0,015	0,08500	0,030

**Ε. 9. Μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συμπλόκων πρόπολης
(Καλάβρυτα) έναντι του *Staphylococcus aureus***

Δείγματα

- Σύμπλοκα PE σε τροποποιημένο άμυλο: Σ 4 – Σ 29 (**Πίνακας Ε.5.1**)
- Σύμπλοκα PE σε β-κυκλοδεξτρίνη: Σ 30 – Σ 37 (**Πίνακας Ε.5.2**)
- Σύμπλοκα PE σε υδρόξυ-πρότυλο-β-κυκλοδεξτρίνη: Σ40 – Σ46 (**Πίνακας Ε.5.3.**)
- Σύμπλοκα PE σε ζελατίνη: Σ 47 – Σ 55 (**Πίνακας Ε.5.4.**)

Υλικά

- *Staphylococcus aureus* NCTC 010357
- υπόστρωμα BHI (Brain Heart Infusion)
- γλυκερόλη
- άγαρ
- πρότυπο θολερότητας Mcfarland no 5.
- Τρυβλία Petri

Όργανα

- Πιπέτες Eppendorf 1000 µL και 100 µL
- Αναδευτήρας (vortex)

Πειραματική πορεία

Διατήρηση και ανακαλλιέργεια στελεχών

Το στέλεχος-στόχος που επιλέχθηκε για να μελετηθεί η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των εγκλεισμένων συμπλόκων πρόπολης ήταν το *Staphylococcus aureus*. Η αρχική καλλιέργεια διατηρούνταν στους -80°C σε υπόστρωμα BHI που περιείχε 20% w/v γλυκερόλη. Οι καλλιέργειες διατηρούνταν, υπό τη μορφή αποικιών, σε στερεό BHI άγαρ στους 4°C . Πριν χρησιμοποιηθεί η καλλιέργεια, ανακαλλιεργούνταν δύο φορές σε υγρό υπόστρωμα BHI στους 37°C για 48 ώρες.

Την ημέρα που επρόκειτο να πραγματοποιηθεί η αντιμικροβιακή δοκιμή η καλλιέργεια *S. aureus* είχε επωαστεί 18 ώρες πριν στους 37°C .

Αντιμικροβιακή δοκιμή

Η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των συμπλόκων πρόπολης, μελετήθηκε με την μέθοδο της διάχυσης μέσω οπών σε τρυβλία (agar-well diffusion method) όπως περιγράφηκε από τους Schillinger & Lucke (1989) με τις ακόλουθες τροποποιήσεις:

Σε τρυβλία προσθέτονταν 12 ml άγαρ και μετά την στερεοποίησή του, προσθέτονταν ακόμη 12 ml BHI άγαρ το οποίο είχε εμβολιασθεί, προηγουμένως με 0,1 ml εναιωρήματος νεαρής καλλιέργειας *S. aureus* που είχε αναπτυχθεί σε υγρό υπόστρωμα BHI για 18 ώρες, στους 37°C .

Το εναιώρημα κυττάρων είχε πληθυσμιακή πυκνότητα, περίπου, 10^6 κύτταρα/ml και ρυθμιζόταν μέσω της οπτικής πυκνότητας του προτύπου θολερότητας Mcfarland no 5. Όταν και το εμβολιασμένο, επιφανειακό, υπόστρωμα στερεοποιούνταν, (μετά από 15-20 min) ανοίγονταν στην επιφάνειά του οπές διαμέτρου 7 mm οι οποίες γεμίζονταν με 100 μl υδατικών διαλυμάτων των συμπλόκων πρόπολης των οποίων επρόκειτο να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση.

Ακολούθως, τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες. Η αντιμικροβιακή δράση καταγράφονταν ποιοτικά ως διαυγής ζώνη (άλλως) περιφερειακά των οπών και ποσοτικά μέσω της μέτρησης της διαμέτρου της διαυγούς ζώνης αναστολής σε mm. Όταν δεν υπήρχε αντιμικροβιακή δράση δεν υπήρχε διαυγής ζώνη περιφερειακά των οπών στα τρυβλίων.

Προετοιμασία των δειγμάτων:

Προκειμένου να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των παρασκευασμάτων λήφθηκαν ποσότητες από τα διαφορετικά σύμπλοκα ώστε όλα να αντιστοιχούν σε 0,05 g δραστικής ουσίας (καθαρής πρόπολης), και προστέθηκαν σε 2 ml απεσταγμένο νερό (0 αραιώση). Μετά από καλή ανάδευση του αρχικού διαλύματος ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με νερό (1:1, 1:2, 1:4, 1:8).

Στους Πίνακες Ε. 9. 1., Ε. 9. 2., Ε. 9. 3., Ε. 9. 4., παρουσιάζονται οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης και αντιστοιχούσαν σε 0,05 g δραστικής ουσίας (καθαρής πρόπολης)

Ε. 9. 1. Σύμπλοκα πρόπολης/ τροποποιημένου αμύλου

Σύμπλοκο	Αναλογία μάζας πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο	Ποσότητα συμπλόκου (g)
Σ 4 (PTM 12 I)	2:1	0,075
Σ 5 (PTM 12 II)	2:1	0,075
Σ 6 (PTM 12 III)	2:1	0,075
Σ 7 (PTM 12 IV)	1:1	0,1
Σ 8 (PTM 12 V)	1:1	0,1
Σ 9 (PTM 12 VI)	1:1	0,1
Σ 10 (PTM 12 VII)	1:2	0,15
Σ 11 (PTM 12 VIII)	1:2	0,15
Σ 12 (PTM 12 IX)	1:2	0,15
Σ 13 (PTM A)	2:1	0,075
Σ 14 (PTM B)	2:1	0,075
Σ 15 (PTM Γ)	2:1	0,075
Σ 16 (PTM Δ)	1:1	0,1
Σ 17 (PTM Ε)	1:1	0,1
Σ 18 (PTM ΣΤ)	1:1	0,1
Σ 19 (PTM Ζ)	1:2	0,15
Σ 20 (PTM Η)	1:2	0,15

Σύμπλοκο	Αναλογία μάζας πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο	Ποσότητα συμπλόκου (g)
Σ 21 (PTM Θ)	1:2	0,15
Σ 22 (PTM 13 Α)	1:2	0,15
Σ 23 (PTM 13 Β)	1:3	0,2
Σ 24 (PTM 13 Γ)	1:4	0,25
Σ 25 (PTM 13 Δ)	1:5	0,3
Σ 26 (PTM 13 Α')	1:2	0,15
Σ 27 (PTM 13 Β')	1:3	0,2
Σ 28 (PTM 13 Γ')	1:4	0,25
Σ 29 (PTM 13 Δ')	1:5	0,3

Ε. 9. 2. Σύμπλοκα πρόπολης/ β-κυκλοδεξτρίνης

Σύμπλοκο	Αναλογία μάζας πρόπολης/ β- CD	Ποσότητα συμπλόκου (g)
Σ 30 (PTM 4)	1:1	0,1
Σ 31 (PTM 5)	1:1	0,1
Σ 32 (PTM 6)	1:1	0,1
Σ 33 (PTM 14 Α)	1:1	0,1
Σ 34 (PTM 14 Β)	1:1	0,1
Σ 35 (PTM 14 Γ)	1:1	0,1
Σ 36 (PTM 14 Δ)	1:2	0,15
Σ 37 (PTM 14 Ε)	1:3	0,2
Σ 38 (PTM 14 ΣΤ)	1:4	0,25
Σ 39 (PTM 14 Ζ)	1:5	0,3

Ε. 9. 3. Σύμπλοκα πρόπολης/ υδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης

Σύμπλοκο	Αναλογία μάζας πρόπολης/ HP-β-CD	Ποσότητα συμπλόκου (g)
Σ 40 (PTM 7)	1:1	0,1
Σ 41 (PTM 8)	1:1	0,1
Σ 42 (PTM 9)	1:1	0,1
Σ 43 (PTM 15 Α)	1:2	0,15
Σ 44 (PTM 15 Β)	1:3	0,2
Σ 45 (PTM 15 Γ)	1:4	0,25
Σ 46 (PTM 15 Δ)	1:5	0,3

Ε. 9. 4. Σύμπλοκα πρόπολης/ ζελατίνης

Σύμπλοκο	Αναλογία μάζας πρόπολης/ ζελατίνης	Ποσότητα συμπλόκου (g)
Σ 47	2:1	0,075
Σ 48	2:1	0,075
Σ 49	2:1	0,075
Σ 50	1:1	0,1
Σ 51	1:1	0,1
Σ 52	1:1	0,1
Σ 53	1:2	0,15
Σ 54	1:2	0,15
Σ 55	1:2	0,15

E. 10. Διερεύνηση βέλτιστης αναλογίας μάζας πρόπολης : μέσο εγκλεισμού, μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων (Σ4-Σ12)

Προετοιμασία Δειγμάτων

E. 10. 1. 1. Από τη λυοφυλιωμένη σκόνη (βλέπε Πίνακα E. 5. 1.) λαμβάνεται μικρή ποσότητα (0,02 g), και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αρχικά προστίθεται 1 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, ώστε να σχηματισθεί διάλυμα και ακολουθεί εκχύλιση του δείγματος με αιθανόλη (9 mL) και ανάδευση σε vortex. Για τα Σ 4-Σ 6 (**PTM 12 I, II, III**), η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 0,013 g καθαρής πρόπολης, για τα Σ 7-Σ 9 (**PTM 12 IV, V, VI**), η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 0,01 g καθαρής πρόπολης και τέλος για τα Σ 9- Σ 12 (**PTM 12 VII, VIII, IX**), η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 0,00667 g καθαρής πρόπολης.

E. 10. 1. 2. Από τη λυοφυλιωμένη σκόνη (βλέπε Πίνακα E. 5. 1.) λαμβάνεται μικρή ποσότητα (0,02 g), και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια προστίθενται 10 mL απιονισμένου νερού και πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex. Ακολουθεί διήθηση σε ηθμό και παραλαβή διανγούς διαλύματος.

Ακολούθως πραγματοποιούνται οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι Folin-Ciocalteu, αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) και αναγωγικής δύναμης (FRAP), που αναφέρονται στο E. 12. 2., E. 13. 2., E. 14. 2. αντίστοιχα, για τα δείγματα που αντιστοιχούν στο τμήμα E. 10. 1. 1. και δοκιμαστικά για τα δείγματα που αντιστοιχούν στο E. 10. 1. 2.

E. 11. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη από τα Καλάβρυτα με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων PE με τροποποιημένο άμυλο, σε υδατικό διάλυμα και ρυθμιστικά διαλύματα. Απομίμηση συνθηκών τροφίμου και πεπτικού σωλήνα.

Αντιδραστήρια

- HCl, 0,1M
- K₂HPO₄, 1M
- KH₂PO₄, 1M
- Οξικός αιθυλεστέρας, Pro analysis, Merck
- Αιθανόλη, Pro analysis, Merck

Δείγματα: Σ 2, Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12

- Σιλυλιωτικό μέσο: BSTFA: Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Aldrich)
- Εσωτερικό πρότυπο, Internal Standard (IS): 3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη (Aldrich)
- Αέριο άζωτο (N₂)

Όργανα

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Φυγοκεντρικός εξατμιστήρας κενού, speed vacuum, LABCONCO (Speed Vac)
- Φυγόκεντρος, Hermle z320
- Υδατόλουτρο
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Πιπέτες Eppendorf 1000 µL και 100 µL
- Αέριος Χρωματογράφος / Φασματομετρία Μάζας (GC/MS)

Πειραματική πορεία

E. 11. 1. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο Σ2(PTM2)

(1:20 πρόπολη/τροποποιημένο άμυλο, Tween-80, ομογενοποίηση),

σε σχέση με το χρόνο

1. Λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το δείγμα (12,4 mg) που αντιστοιχεί σε 0,6 mg καθαρής πρόπολης και προστίθεται σε 7 δοκιμαστικούς σωλήνες, για τους αντίστοιχους χρόνους στους οποίους μελετάται η απελευθέρωση,
2. Ακολουθεί προσθήκη 3 mL απιονισμένου H₂O σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και
3. Παραμονή των 7 διαλυμάτων προς ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για τους χρόνους: 5, 10, 30, 60, 300, 600 και 1200 λεπτά
4. Μετά το πέρας του χρόνου παραμονής, πραγματοποιείται ανάδευση για περίπου 1 λεπτό σε vortex.
5. Ακολουθεί εκχύλιση με προσθήκη 3 mL οξικού αιθυλεστέρα
6. Φυγοκέντριση του δείγματος στις 3000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά και
7. Παραλαβή της οργανικής φάσης και μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 20 mL.
8. Τα βήματα 4, 5, 6, 7 επαναλαμβάνονται επί 5 φορές.
9. Τέλος, συμπληρώνεται η ογκομετρική φιάλη με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τον τελικό όγκο των 20 mL.

Η πειραματική πορεία επαναλήφθηκε εις διπλούν

E. 11. 1. 1. Προσδιορισμός των συστατικών που απελευθερώνονται από το Σ 2

Τα 20 mL των 9 τελικών διαλυμάτων, μεταφέρθηκαν σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες (10 ml από το αρχικό διάλυμα στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα), σύνολο 18 δοκιμαστικοί σωλήνες.

10 mL από το κάθε διάλυμα- χρόνο χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών μέσω της μεθόδου GS-MS:

4. εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα σε εξατμιστήρα (Speed Vac), στους 45°C για 90 λεπτά.

5. αφού ολοκληρωθεί η εξάτμιση, προστίθενται 5 mL αιθανόλης στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με το αντίστοιχο δείγμα.
6. ακολουθεί ανάδευση σε vortex, για παραλαβή των συστατικών της πρόπολης που απελευθερώθηκαν
7. μεταφορά 1 mL από το αιθανολικό εκχύλισμα, που αντιστοιχεί σε 0,06 mg καθαρής πρόπολης, σε 9 vials
8. συμπίκνωση των αιθανολικών εκχυλισμάτων υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
9. προσθήκη 50 μ L εσωτερικού προτύπου (3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη) και συμπίκνωση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
10. ακολουθεί παραγωγοποίηση των δειγμάτων με προσθήκη 250 μ L συλλιωτικού μέσου BSTFA και θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70° C για 20 λεπτά.

Τα υπόλοιπα 10 mL από το κάθε διάλυμα- χρόνο χρησιμοποιήθηκαν για:

1. τον προσδιορισμό του συνόλου των πολυφαινόλων που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2, μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu (**E. 12. 6.**)
2. τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται, μέσω της δοκιμής δέσμευσης της 1,1- διφαινυλο-2-πικρϋλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH) (**E. 13. 5.**) και
3. τη μελέτη της αναγωγικής δύναμης με βάση την αναγωγική/αντιοξειδωτική δύναμη του σιδήρου (FRAP) (**E. 14. 5.**)

E. 11. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 (βλέπε Πίνακα E. 5. 1.)

1. από τα δείγματα Σ 4, Σ 5, Σ 6 (PTM 12 I, II, III) λαμβάνεται ποσότητα 0,9 mg, από τα Σ 7, Σ 8, Σ 9 (PTM 12 IV, V, VI), λαμβάνεται ποσότητα 1,2 mg και από τα Σ 10, Σ 11, Σ 12 (PTM 12 VII, VIII, IX), λαμβάνεται ποσότητα 4,7 mg που αντιστοιχούν σε 0,6 mg καθαρής πρόπολης και προστίθενται σε 9 δοκιμαστικούς σωλήνες.
2. ακολουθεί προσθήκη 3 mL απιονισμένου H₂O,
3. παραμονή 9 διαλυμάτων προς ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 3 ώρες,
4. ακολουθεί εκχύλιση με προσθήκη 3 mL οξικού αιθυλεστέρα,

5. μετά το πέρας του χρόνου παραμονής, πραγματοποιείται ανάδευση για περίπου 1 λεπτό σε vortex
6. φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3000 στροφές για 5 λεπτά και
7. παραλαβή της οργανικής φάσης και μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 20 mL,
8. τα βήματα 2, 4, 5, 6 επαναλαμβάνονται επί 5 φορές.
9. τέλος, συμπληρώνεται η ογκομετρική φιάλη με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τον τελικό όγκο των 20 mL.

E. 11. 2. 1. Προσδιορισμός των συστατικών που απελευθερώνονται από τα Σ 4- Σ12

Η πειραματική πορεία που ακολούθησα για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών που απελευθερώνονται από τα δείγματα και την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους είναι ίδια με αυτή που αναφέρεται στο E. 11. 1. 1.

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αναφέρεται στο τμήμα E. 12. 6., η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) αναφέρεται στο τμήμα E. 13. 5. και η μελέτη της αναγωγικής δύναμης (FRAP) στο τμήμα E. 14. 5.

E. 11. 3. Μελέτη διαλυτότητας των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη από τα Καλάβρυτα

Αυτή η πειραματική πορεία χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος επιβεβαίωσης της παραλαβής των συστατικών που περιέχονται στην πρόπολη, σε υδατικό διάλυμα, με τη χρησιμοποίηση οργανικού διαλύτη εκχύλισης.

Αρχικά λαμβάνεται μικρή ποσότητα καθαρής πρόπολης (μετά από εξάτμιση του διαλύτη από PE με προέλευση από τα Καλάβρυτα) 26,1mg και προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια το πυκνόρευστο δείγμα πρόπολης αραιώνεται σε 5 ml αιθανόλη, ώστε η περιεκτικότητα πρόπολης στο διάλυμα (1) να αντιστοιχεί σε 5,22 mg. Από το διάλυμα (1) λαμβάνονται 100 μ L και μεταφέρονται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, ώστε η περιεκτικότητα πρόπολης στο διάλυμα (2) να ισοδυναμεί με 0,522 mg και να υπάρχει αντιστοιχία των αποτελεσμάτων προσδιορισμού των συστατικών που

απελευθερώνονται από την καθαρή πρόπολη και από τα σύμπλοκα Σ 2 και Σ 5 – Σ 11 (όπου μελετήθηκε ποσότητα συμπλόκων που αντιστοιχεί σε 0,6 mg πρόπολης).

Ακολουθεί προσθήκη 3 mL απιονισμένου H₂O και παραμονή προς ανάδευση σε αναδευτήρα 3 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου παραμονής, πραγματοποιείται ανάδευση για περίπου 1 λεπτό σε vortex.

Ακολουθεί εκχύλιση με προσθήκη 3 mL οξικού αιθυλεστέρα, φυγοκέντριση του δείγματος στις 3000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά και παραλαβή της οργανικής φάσης και μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 20 mL. Τα βήματα αυτά, επαναλαμβάνονται επί 5 φορές. Τέλος, συμπληρώνεται η ογκομετρική φιάλη με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τον τελικό όγκο των 20 mL.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται προετοιμασία του διαλύματος για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών μέσω της μεθόδου GS-MS:

1. μεταφορά 1 mL από το τελικό διάλυμα των 20 mL, σε vial
2. συμπύκνωση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
3. προσθήκη 50 μ L εσωτερικού προτύπου (3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη) και συμπύκνωση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
4. ακολουθεί παραγωγοποίηση των δειγμάτων με προσθήκη 250 μ L συλλιωτικού μέσου BSTFA και θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70°C για 20 λεπτά.

E. 11. 4. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο Σ2 (PTM 2), σε σχέση με το χρόνο σε όξινο και αλκαλικό pH

Η *in vitro* απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης μελετήθηκε με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Lee *et al.* (2006).

Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με τον ακόλουθο τρόπο:

το διάλυμα με pH=1,2, παρασκευάστηκε με τη βοήθεια διαλύματος HCl συγκέντρωσης 0,1 M και το διάλυμα με pH=8 με την βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευάστηκε με την ανάμιξη 94 mL διαλύματος K₂HPO₄ 1M με 6 mL διαλύματος KH₂PO₄, 1M.

Πειραματική πορεία

Ποσότητα της ενθυλακωμένης μορφής του εκχυλίσματος της πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο 0,006 g διαλύεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 1,5 mL ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 1,2 ή pH 8. Ο σωλήνας αναδεύεται στις 100 rpm σε θερμοκρασία 37 °C με τη βοήθεια υδρόλουτρου. Στα χρονικά διαστήματα 5, 15, 30, 60, 180 λεπτά η ανάδευση και θέρμανση διακόπτεται. Τα συστατικά της πρόπολης που έχουν απελευθερωθεί στο υδατικό διάλυμα εκχυλίζονται με προσθήκη 1,5 mL οξικού αιθυλεστέρα, φυγοκέντριση του δείγματος στις 3000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά και παραλαβή της οργανικής φάσης και μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 5 mL. Τα βήματα αυτά, επαναλαμβάνονται επί 3 φορές. Τέλος, συμπληρώνεται η ογκομετρική φιάλη με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τον τελικό όγκο των 5 mL.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται προετοιμασία του διαλύματος για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών μέσω της μεθόδου GS-MS:

1. μεταφορά 1 mL από το τελικό διάλυμα των 20 mL, σε vial
2. συμπύκνωση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
3. προσθήκη 50 μ L εσωτερικού προτύπου (3-(4-Υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη) και συμπύκνωση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού
4. ακολουθεί παραγωγοποίηση των δειγμάτων με προσθήκη 250 μ L συλλιωτικού μέσου BSTFA και θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70° C για 20 λεπτά.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ

E. 12. Μελέτη προσδιορισμού του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu's Phenol reagent
- κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 35% w/v)
- Αιθανόλη, Pro analysis, Merck

- Δείγματα:
 1. Αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης (PE) από: Πελοπόννησο: Καλάβρυτα, Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά, Τρίκορφο, Κρήτη: Ρέθυμνο, Τήνο: Πύργος, Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελος: Γλώσσα, Κύπρο: Λάρνακα.
 2. Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12
 3. τα διαλύματα από τη μελέτη απελευθέρωσης:
Σ 2 στους χρόνους: 5, 10, 30, 60, 300, 600, 1200 λεπτά (Ε. 11. 1. 1.)
Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12 στα 1800 λεπτά (Ε. 11. 2. 1.)
 4. τα διαλύματα από τη μελέτη διαλυτότητας στους 25° C, 35° C, 45° C (Ε. 8.)

Όργανα

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Φασματοφωτόμετρο, Specord 200, analytikjena (UV, VIS).
- Πιπέτες Eppendorf 1000 µL και 100 µL

Πειραματική πορεία

Ε. 12. 1. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των PE ανάλογα με την προέλευση

Προετοιμασία Δειγμάτων

Αρχικά πραγματοποιείται αραιώση όλων των δειγμάτων πρόπολης σε 1% PE:

1. Καλάβρυτα (δείγμα 1 β): 4,55%

$C1V1=C2V2 \Rightarrow V1= 2,2 \text{ ml}$ από το αρχικό δια/μα

7,8 ml αιθανόλη 90% σε 10 ml τελικού όγκου

Στη συνέχεια τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης 1%, αραιώνονται 1:10 με αιθανόλη (1 mL από το δείγμα και προσθέτουμε 9 mL αιθανόλη).

Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και η πειραματική πορεία, που αναφέρεται στο τμήμα

Ε. 12. 6. εις διπλούν.

**E. 12. 2. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των
συμπλόκων Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12**

Προετοιμασία Δειγμάτων

Από τη λυοφυλιωμένη σκόνη (βλέπε Πίνακα Ε. 5. 1.) λαμβάνεται μικρή ποσότητα (0,02 g), και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αρχικά προστίθεται 1 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, ώστε να σχηματισθεί διάλυμα και ακολουθεί εκχύλιση του δείγματος με αιθανόλη (9 mL) και ανάδευση σε vortex.

Ακολούθως πραγματοποιείται η πειραματική πορεία προσδιορισμού του συνολικού φαινολικού περιεχομένου που αναφέρεται στο Ε. 12. 6., εις διπλούν.

**E. 12. 3. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των
συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 σε σχέση με
το χρόνο**

Προετοιμασία Δειγμάτων

Από τα αρχικά διαλύματα- χρόνους (20 mL), που αναφέρονται στο τμήμα Ε. 11. 1. 1., λαμβάνονται τα 10 mL και ακολούθως πραγματοποιείται:

1. εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα σε εξατμιστήρα (Speed Vac), στους 45°C για 90 λεπτά.
2. προσθήκη 5 mL αιθανόλης στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με το αντίστοιχο δείγμα και
3. ανάδευση σε vortex, για παραλαβή των συστατικών της πρόπολης που απελευθερώθηκαν.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πειραματική πορεία Folin-Ciocalteu, που αναφέρεται στο Ε. 12. 6., εις τριπλούν.

E. 12. 4. Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12

Προετοιμασία Δειγμάτων

Η πειραματική διαδικασία που ακολούθησα είναι ακριβώς η ίδια με αυτή που αναφέρεται στον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου από τα συστατικά που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 (E. 12. 3.)

E. 12. 5. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των συστατικών της πρόπολης που διαλύονται στο νερό εξαιτίας της παρουσίας της β-CD (E. 8., μελέτη διαλυτότητας καθαρής πρόπολης)

Οι πειραματικές διαδικασίες που αναφέρονται στο **E. 12. 6.** πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για τα 6 δείγματα σε κάθε θερμοκρασία (25° C, 35° C, 45° C).

E. 12. 6. Πειραματική πορεία Folin-Ciocalteu

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL τοποθετούνται 100 μL από κάθε δείγμα και προστίθεται απιονισμένο νερό (5 mL) και αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,5 mL).
2. Ανακινούμε καλά και αναμένουμε 3 min.
3. Προστίθεται κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃, 35%w/v, 1 mL) και το όλο συμπληρώνεται μέχρι τελικού όγκου 10 mL με απιονισμένο νερό (3,4 mL απιονισμένο νερό).
4. Τα δείγματα ανακινούνται και παραμένουν στο σκοτάδι για 1 ώρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.
5. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων, τοποθέτηση σε κυψελίδες και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 725 nm, ως προς λευκό δείγμα (απιονισμένο νερό).

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο δείγμα υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέος και εκφράζεται ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid Equivalent, CAE).

E. 13. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH)

Αντιδραστήρια

- 1,1- διφαινυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα, Sigma.
- Αιθανόλη, Pro analysis, Merck
- Δείγματα:
 1. αραιωμένα PE (1:10) c:1 % από: Πελοπόννησο: Καλάβρυτα, Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά, Τρίκορφο, Κρήτη: Ρέθυμνο, Τήνο: Πύργος , Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελο: Γλώσσα , Κύπρο: Λάρνακα.
 2. Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12
 3. τα διαλύματα από τη μελέτη απελευθέρωσης:
Σ 2 στους χρόνους: 5, 10, 30, 60, 300, 600, 1200 λεπτά (E. 11. 1. 1.)
Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12 στα 1800 λεπτά (E. 11. 2. 1.)

Όργανα

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Φασματοφωτόμετρο, Specord 200, analytikjena (UV, VIS).
- Πιπέτες Eppendorf 1000 μL και 100 μL

Πειραματική πορεία

E. 13. 1. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των PE ανάλογα με την προέλευση

Προετοιμασία Δειγμάτων

Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, των 11 αραιωμένων τελικών διαλυμάτων (1:10) PE που αναφέρονται στο τμήμα E. 12. 1. Ακολουθεί η πειραματική πορεία, που αναφέρεται στο τμήμα E. 13. 5. εις τριπλούν.

E. 13. 2. Μελέτη αντιοξειδωτικής των συμπλόκων Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12

Προετοιμασία Δειγμάτων

Από τη λυοφυλιωμένη σκόνη (βλέπε Πίνακα Ε. 5. 1.) λαμβάνεται μικρή ποσότητα (0,02 g), και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αρχικά προστίθεται 1 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, ώστε να σχηματισθεί διάλυμα και ακολουθεί εκχύλιση του δείγματος με αιθανόλη (9 mL) και ανάδευση σε vortex. Ακολούθως πραγματοποιείται η πειραματική πορεία εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1- διφαινύλο-2-πικρϋλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH) που αναφέρεται στο Ε. 13. 5., εις τριπλούν

E. 13. 3. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από το Σ 2 σε σχέση με το χρόνο

Προετοιμασία Δειγμάτων

Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, των 7 δειγμάτων που περιέχουν τα 5 mL του αιθανολικού εκχυλίσματος των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2, που παρασκευάζεται στο τμήμα Ε. 12. 3., για τη μελέτη προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin Ciocalteu). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πειραματική πορεία που αναφέρεται στο Ε. 13. 5., εις διπλούν.

E. 13. 4. Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από τα Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12

Προετοιμασία Δειγμάτων

Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, των 9 δειγμάτων που περιέχουν τα 5 mL του αιθανολικού εκχυλίσματος των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα, που παρασκευάζονται στο τμήμα Ε. 12. 4., για τη μελέτη προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin Ciocalteu). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πειραματική πορεία που αναφέρεται στο Ε. 13. 5., εις διπλούν.

E. 13. 5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1- διφαινύλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH*)

1. Προετοιμασία διαλύματος DPPH 0,06 mM.: Από το πρότυπο δείγμα DPPH, ζυγίζεται ποσότητα 0,01 g και προστίθεται σε σφαιρική φιάλη 25 ml, μαζί με αιθανόλη μέχρι τη χαραγή, ώστε να παρασκευαστεί το πυκνό διάλυμα DPPH 0,001 mM. Από το πυκνό διάλυμα λαμβάνονται 3 mL και προστίθενται σε σφαιρική φιάλη 50 ml, μαζί με αιθανόλη μέχρι τη χαραγή, ώστε να παρασκευαστεί το αραιό διάλυμα DPPH 0,06 mM, το οποίο χρησιμοποιείται κατά την πειραματική πορεία.
2. Σε πλαστικά κωνικά φιαλίδια (Eppendorf), παραλαμβάνονται 25 μ L από το κάθε προς μελέτη διάλυμα. Ακολουθεί προσθήκη 975 μ L DPPH 0,06 mM και ανάδευση σε Vortex.
3. Τα δείγματα παραμένουν για 30 λεπτά στο σκοτάδι, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.
4. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε κυψελίδες. Ακολούθως φωτομετρούνται στα 515 nm.

Σημείωση: Πριν προχωρήσουμε στη φωτομέτρηση μηδενίζουμε το φωτόμετρο με δύο τυφλά δείγματα. Στα τυφλά δείγματα τοποθετούμε μόνο αιθανόλη. Αφού μηδενίσουμε, αφαιρούμε το μπροστινό τυφλό δείγμα και σε εκείνη τη θέση τοποθετούμε το δείγμα που θέλουμε να φωτομετρήσουμε. Παράλληλα γίνεται φωτομέτρηση του διαλύματος DPPH που χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (TRE: Trolox Equivalents), Με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox (ανάλογο βιταμίνης E - DPPH*)

E. 14. Μελέτη της αναγωγικής δύναμης (PR: reducing power) με βάση την αναγωγική/αντιοξειδωτική δύναμη του σιδήρου (ferric reducing/antioxidant power: FRAP)

Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα FeCl₃ (3 mM σε 5 mM κιτρικού οξέος)
2. Απεσταγμένο νερό
3. Διάλυμα TPTZ (2,4,6- tripyridyl-s-triazine) 1 mM σε 0,05 M HCl
4. Ασκορβικό οξύ
5. Δείγματα:
 1. Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12
 2. τα διαλύματα από τη μελέτη απελευθέρωσης:
Σ 2 στους χρόνους: 5, 10, 30, 60, 300, 600, 1200 λεπτά (E. 11. 1. 1.)
Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12 στα 1800 λεπτά (E. 11. 2. 1.)

Όργανα

- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Φασματοφωτόμετρο, Specord 200, analytikjena (UV, VIS).
- Πιπέτες Eppendorf 1000 µL και 100 µL
- Αναδευτήρας (vortex)
- Υδατόλουτρο στους 37°C

Πειραματική πορεία

E. 14. 1. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των PE ανάλογα με την προέλευση

Προετοιμασία Δειγμάτων

Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, των 11 αραιωμένων τελικών διαλυμάτων (1:10) PE που αναφέρονται στο τμήμα E. 12. 1. Ακολουθεί η πειραματική πορεία, που αναφέρεται στο τμήμα **E. 14. 5.** εις διπλούν

E. 14. 2. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των συμπλόκων Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12

Προετοιμασία Δειγμάτων

Από τη λυοφυλιωμένη σκόνη (βλέπε Πίνακα Ε. 5. 1.) λαμβάνεται μικρή ποσότητα (0,02 g), και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αρχικά προστίθεται 1 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, ώστε να σχηματισθεί διάλυμα και ακολουθεί εκχύλιση του δείγματος με αιθανόλη (9 mL) και ανάδευση σε vortex. Ακολούθως πραγματοποιείται η πειραματική πορεία μέτρησης της αναγωγικής δύναμης που αναφέρεται στο Ε. 14. 5., εις διπλούν.

E. 14. 3. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από το Σ 2 σε σχέση με το χρόνο

Προετοιμασία Δειγμάτων

Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, των 7 δειγμάτων που περιέχουν τα 5 mL του αιθανολικού εκχυλίσματος των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2, που παρασκευάζεται στο τμήμα Ε. 12. 3., για τη μελέτη προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin Ciocalteu). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πειραματική πορεία που αναφέρεται στο Ε. 14. 5., εις διπλούν.

E. 14. 4. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από τα Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12,

Προετοιμασία Δειγμάτων

Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex, των 9 δειγμάτων που περιέχουν τα 5 mL του αιθανολικού εκχυλίσματος των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ 4- Σ 12, που παρασκευάζεται στο τμήμα Ε. 12. 4., για τη μελέτη προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin Ciocalteu). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πειραματική πορεία που αναφέρεται στο Ε. 14. 5., εις διπλούν.

E. 14. 5. Μέτρηση της αναγωγικής δύναμης (PR: reducing power) με βάση την αναγωγική/αντιοξειδωτική δύναμη του σιδήρου (ferric reducing/antioxidant power: FRAP)

1. Τοποθετούνται 50 μL των διαλυμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθενται 50 μL FeCl_3 . Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex και παραμονή των μειγμάτων σε υδατόλουτρο 37°C για 30 min.
2. Μετά την πάροδο των 30 min, προστέθηκαν σε κάθε μείγμα 900 μL TPTZ σε 0,05 M HCl και το όλο αναδεύτηκε σε vortex.
3. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 620 nm μετά από 10 min, ως προς το λευκό δείγμα. Παρασκευάστηκε ένα τυφλό για κάθε δείγμα με την προσθήκη απεσταγμένου νερού στη θέση του χλωριούχου σιδήρου/ κιτρικού οξέος.
4. Η μείωση της αναγωγικής δύναμης υπολογίστηκε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλη ασκορβικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mM ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (AAE: Ascorbic Acid Equivalents).

Κεφάλαιο ΣΤ

Αποτελέσματα

ΣΤ. 1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη

Η περιεκτικότητα της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη (Balsam), υπολογίστηκε με βάση τις παρακάτω παραμέτρους:

το αρχικό βάρος του δείγματος της ακατέργαστης πρόπολης και τον όγκο αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό και την παρασκευή ΡΕ και την συγκέντρωση του ΡΕ μετά από την απομάκρυνση των κηρών.

Ενδεικτικά αναφέρεται ένα παράδειγμα:

Καλάβρυτα: 10% περιεκτικότητα ακατέργαστης πρόπολης σε αιθανόλη (90%). Μετά την απομάκρυνση των κηρών η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε διαλυτά συστατικά είναι 5,48%. Επομένως η περιεκτικότητα της αρχικής (ακατέργαστης) πρόπολης σε διαλυτά συστατικά στην αιθανόλη είναι 54,8 % $[(100 \cdot 5,48)/10]$.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα **ΣΤ. 1**.

Πίνακας ΣΤ. 1. Περιεκτικότητα της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη PE (%)

ΑΑ	Προέλευση	Για τον καθαρισμό της ακατέργαστης πρόπολης και την παρασκευή PE			Περιεκτικότητα ακατέργαστης πρόπολης PE Balsam (% w/v)
		Ακατέργαστη πρόπολη(g)	Αιθανόλη (mL)	Συγκέντρωση αιθανόλης (%)	
1 α	Πελοπόννησος: Καλάβρυτα	5	50	70	45,55
1 β	Πελοπόννησος: Καλάβρυτα	5	50	90	54,8
2	Πελοπόννησος: Μεγαλόπολη	5	50	70	53,2
3 α	Μεσσηνία: Αρφαρά	3,5	35	70	61,2
3 β	Μεσσηνία: Τρίκορφο	5	50	70	27
4	Ρέθυμνο: επαρχία Μυλοποτάμου: Αλοΐδες	2,5	25	70	13,89
5	Βόρεια Τήνος: Πύργος	5	50	70	16,8
6 α	Καρδίτσα: Λουτρά 2004	2,5	25	70	38,7
6 β	Καρδίτσα: Λουτρά 2006	2,5	25	90	58,57
7	Σκόπελος: Γλώσσα	2,4	24	70	27,52
8 α	Κύπρος 2005: Λάρνακα	2,5	25	70	46,85
8 β	Κύπρος 2005: Λάρνακα	2,98	30	90	40,37
9	Κύπρος 2006: Λάρνακα	4,9616	50	90	48,07

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤ. 2. Περιεκτικότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης σε πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) (Α: εκχύλιση με 70% EtOH, Β: εκχύλιση με 90% EtOH)

	Τρίκορφο	Αρφαρά	Κύπρος 2005 Α	Κύπρος 2005 Β	Κύπρος 2006	Καλάβρυτα Α	Καλάβρυτα Β	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Ρέθυμνο	Σκόπελος	Τήνος
Πολυφαινόλες (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)													
Vanilin	29,7	35,1	tr	tr	tr	19,3	14,3	205,1	970,7	35,7	2,3	45,8	tr
Cinnamic acid	312,1	215,9	103,1	50,4	39,4	1787,8	1684,9	788,0	1669,4	3999,5	47,3	145,1	37,9
Tyrosol	1,3	1,1	0,8	1,3	2,8	11,1	9,2	0,3	0,1	25,4	tr	1,3	2,1
P-oh benzoic acid	82,1	49,2	71,1	62,0	47,7	58,8	56,3	71,2	79,7	60,8	103,8	105,1	111,7
P oh phenylacetic acid	37,8	n.d.	27,1	27,7	32,9	17,8	17,3	20,3	n.d.	15,6	63,1	28,0	62,8
Homov alcohol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretic acid	82,2	90,2	171,8	116,7	42,5	35,2	34,1	76,7	75,7	45,0	187,6	73,9	284,2
Vannilic acid	47,9	46,9	43,3	51,0	40,1	60,1	59,8	48,9	78,7	72,0	52,5	55,1	52,1
Homovannilic acid	n.d.	29,8	29,7	n.d.	n.d.	n.d.	29,5	n.d.	30,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
O-coumaric acid	58,3	33,6	49,8	53,1	n.d.	34,0	35,5	n.d.	n.d.	24,7	54,7	51,9	74,4
Protocatechuic acid	97,5	67,1	172,7	93,9	104,0	52,8	49,9	63,6	82,2	60,8	125,6	328,8	74,8
3-4 di oh phenylacetic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Syringic acid	33,3	n.d.	35,7	39,4	32,8	43,2	41,9	33,8	33,5	49,1	44,3	35,3	44,0
P-coumaric acid	435,5	745,1	186,7	149,1	116,3	252,8	246,9	753,7	2183,5	311,0	71,9	671,3	80,2
Gallic acid	63,8	62,1	114,2	38,2	41,4	39,2	38,8	45,7	40,8	n.d.	39,8	66,6	40,3
Ferulic acid	460,8	713,0	131,3	333,7	101,7	842,4	786,6	1065,5	835,5	1810,4	94,0	264,7	113,9

	Τρίκορφο	Αρφαρά	Κόπρος 2005 Α	Κόπρος 2005 Β	Κόπρος 2006	Καλάβρυτα Α	Καλάβρυτα Β	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Ρέθυμνο	Σκόπελος	Τήνος
Caffeic acid	1741,6	3868,3	305,7	320,1	159,4	205,9	217,0	3550,9	3292,0	212,6	143,4	1140,0	148,6
Sinapic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	55,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42,5	n.d.	42,9
Chlorogenic acid	n.d.	77,8	96,3	n.d.	92,4	45,0	48,0	24,7	n.d.	49,8	116,3	107,7	135,5
Quercet	204,2	363,6	87,1	51,2	51,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	412,1	47,1	130,0	63,0
Chrysin	45440	87858	5943,1	801,1	238,7	100474	118526	96754	40376	145719	260,0	34770	1265,9
Epicatechin	59,2	103,2	40,8	40,1	47,3	48,4	37,4	44,3	38,0	56,3	47,4	58,4	53,9
Naringenin	305,6	593,6	279,8	111,7	70,6	601,0	636,6	439,5	380,3	944,5	218,4	576,3	130,6
Catechin	78,2	97,4	70,2	70,5	71,5	77,6	67,8	71,7	74,1	78,1	69,8	78,8	74,7
Genistein	46,9	56,9	71,6	n.d.	43,2	n.d.	n.d.	52,3	n.d.	62,9	n.d.	n.d.	n.d.
Kampherol	915,0	1741,2	1276,6	222,7	74,4	3363,1	3752,0	1731,0	1795,6	3415,5	82,2	803,3	213,7
Myricetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Apigenine	9204	15849	n.d.	n.d.	n.d.	14335	11891	12486	6629	13033	n.d.	250	n.d.
Pinocembrin	48031	33335	10252	24570	3700	44239	36903	43707	104821	51597	16473	32446	38066
Pinobanksin	3680	6212	1590	826	550	40734	33737	16593	16805	16520	323	11313	506
Pinobanksin-3-o-acetate	19983	30760	5671	5794	4288	13091	11088	37092	52183	26810	3385	21816	377
Τερπενικά οξέα (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)													
Dehydroabietic acid	14705	4055	33546	1638,6	1280,7	54700,7	49388	1092,1	805,7	40	2537,9	6828,6	3996,4
Abietic acid	3386,4	750,7	16744	642,9	11835	576315,7	564880	683,2	203,1	1012,9	5460	4105	11927

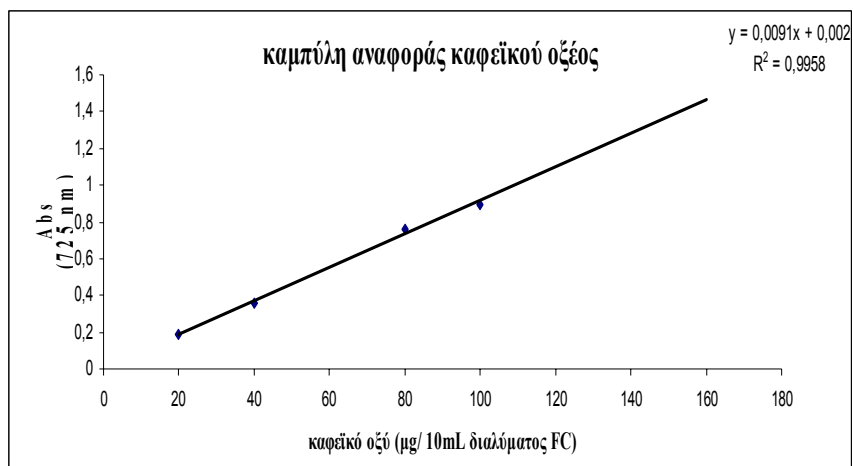
	Τρίκορφο	Αρφαρά	Κόπρος 2005 Α	Κόπρος 2005 Β	Κόπρος 2006	Καλάβρυτα Α	Καλάβρυτα Β	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Ρέθυμνο	Σκόπελος	Τήνος
Isopimaric acid	185394	77743	12459	126709	3930	2152,1	1812,1	6186,4	12179,3	3179,3	44111	150072	118787
Oleanolic acid	1260,0	905,2	1672,7	288,0	460,9	343,7	368,7	530,2	2783,0	438,7	354,8	1958,3	366,9
Ursolic acid	346,7	410,6	n.d.	n.d.	278,2	354,3	530,7	453,0	494,5	857,6	262,4	535,8	320,8
Συνολικά (mg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)													
Πολυφαινόλες	131,4	183,0	26,8	33,8	10,0	220,5	220,0	215,7	232,5	265,4	22,1	105,4	42,1
Τερπενικά οξέα	205,1	83,9	64,4	129,3	29,2	633,9	617	8,9	16,5	5,5	52,7	163,5	135,4
Γενικό σύνολο	336,5	266,9	91,2	163,1	39,2	854,4	837	224,6	249	270,9	74,8	268,9	177,5

ΣΤ. 3. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε με τη χρωματομετρική, οξειδοαναγωγική αντίδραση Folin-Ciocalteu. Το Folin-Ciocalteu είναι μίγμα μολυβδενικού νατρίου (Na_2MoO_4), βολφραιμικού νατρίου (Na_2WO_4) και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) και προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης του Folin-Ciocalteu με τα φαινολικά συστατικά είναι ένα σύμπλεγμα μολυβδενίου- βολφραμίου χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (725nm). Να σημειωθεί ότι δεν γίνεται διαχωρισμός μεταξύ μονομερών, διμερών και ανώτερων φαινολικών συστατικών.

Με βάση την ποσότητα σε μg καφεϊκού οξέος που περιείχαν τα τέσσερα πρότυπα διαλύματα και την απορρόφησή τους στα 725nm, σχηματίστηκε η ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς (σχήμα ΣΤ. 1.), με συνάρτηση $y = 0,0091x + 0,002$ και συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9958$. Τοποθετώντας στην τετμημένη την απορρόφηση των διαλυμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις, τις συγκεντρώσεις των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE), τα mg καθαρής πρόπολης στα οποία αντιστοιχούν οι εξεταζόμενες ποσότητες των συμπλόκων και για τη μελέτη απελευθέρωσης πολυφαινολών από τα σύμπλοκα, τα ισοδύναμα καφεϊκού οξέος που αντιστοιχούν στο αρχικό PE (Καλαβρύτων), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συμπλόκου, υπολογίστηκε η ποσότητα ολικών πολυφαινολών (x), στο κάθε δείγμα.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε mg ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (caffeic acid equivalents, CAE).



Σχήμα ΣΤ. 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος

Πίνακας ΣΤ. 3. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu

A/A	Προέλευση PE	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης
1	Πελοπόννησος: Καλάβρυτα	0,22	0,24	0,23	250,55
2	Πελοπόννησος: Μεγαλόπολη	0,38	0,24	0,31	338,46
3	Μεσσηνία: Αρφαρά	0,18	0,16	0,17	184,62
4	Μεσσηνία: Τρίκορφο	0,15	0,12	0,14	146,15
5	Κρήτη: Ρέθυμνο	0,09	0,06	0,08	80,22
6	Τήνος: Πύργος	0,11	0,09	0,10	107,69
7 α	Καρδίτσα: Λουτρά 2004	0,19	0,33	0,26	283,52
7 β	Καρδίτσα: Λουτρά 2006	0,31	0,28	0,30	321,98
8	Σκόπελος: Γλώσσα	0,16	0,11	0,14	146,15
9 α	Κύπρος: Λάρνακα 2005	0,20	0,06	0,13	140,66
9 β	Κύπρος: Λάρνακα 2006	0,12	0,04	0,08	85,71

Πίνακας ΣΤ. 4. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των δειγμάτων των συμπλόκων Σ4-Σ12 (PTM 12 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu

A/A	Δείγματα	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης
1	Σ 4	0,057	0,050	0,05	84,52
2	Σ 5	0,084	0,138	0,11	118,00
3	Σ 6	0,134	0,210	0,17	119,73
4	Σ 7	0,235	0,196	0,22	130,80
5	Σ 8	0,155	0,176	0,17	138,23
6	Σ 9	0,130	0,112	0,12	121,59
7	Σ 10	0,069	0,083	0,08	166,32
8	Σ 11	0,064	0,083	0,07	180,52
9	Σ 12	0,144	0,163	0,15	143,79

Πίνακας ΣΤ. 5. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 (PTM 12 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) σε υδατικό διάλυμα

A/A	Δείγματα	Χρόνος διερεύνησης απελευθέρωσης (min)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης	Απόδοση πολυφαινολικών συστατικών (%)
1	Σ 4	180	0,040	0,041	0,040	698,72	278,87
2	Σ 5	180	0,056	0,070	0,063	1113,10	444,26
3	Σ 6	180	0,060	0,061	0,060	1067,31	425,99
4	Σ 7	180	0,091	0,099	0,095	1703,30	679,82
5	Σ 8	180	0,030	0,031	0,030	521,06	207,97
6	Σ 9	180	0,122	0,125	0,124	2228,94	889,62
7	Σ 10	180	0,192	0,210	0,201	3644,69	1454,68

8	Σ 11	180	0,063	0,098	0,081	1441,39	575,29
9	Σ 12	180	0,040	0,041	0,040	1080,59	278,87

Πίνακας ΣΤ. 6. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2 (PTM 2) σε υδατικό διάλυμα

A/A	Δείγματα	Χρόνος διερεύνησης απελευθέρωσης (min)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης	Απόδοση πολυφαινολικών συστατικών (%)
1	Σ 2	5	0,058	0,027	0,0425	741,76	177,63
2	Σ 2	10	0,136	0,102	0,119	2142,86	513,16
3	Σ 2	30	0,056	0,035	0,0455	796,70	190,79
4	Σ 2	60	0,06	0,036	0,048	842,49	201,75
5	Σ 2	300	0,037	0,04	0,0385	668,50	160,09
6	Σ 2	600	0,053	0,085	0,069	1227,11	293,86
7	Σ 2	1200	0,05	0,044	0,047	824,18	197,37

ΣΤ. 3. 1. Μελέτη διαλυτότητας της πρόπολης

Πίνακας ΣΤ. 7. Προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών που περιέχονται υδατικό διάλυμα πρόπολης με β-CD μετά από παραμονή υπό ανάδευση στους 25 °C

A/A	β-κυκλοδεξτρίνη (M)	Πρόπολη (g)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης
1	0,000	0,031	0,0251	0,011	0,018	2,93
2	0,003	0,028	0,0404	0,015	0,028	4,71
3	0,006	0,033	0,0415	0,0260	0,034	5,86
4	0,009	0,030	0,0725	0,0159	0,044	7,69
5	0,012	0,034	0,0724	0,0279	0,050	8,79
6	0,015	0,033	0,0860	0,0244	0,055	9,71

Πίνακας ΣΤ. 8. Προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών που περιέχονται υδατικό διάλυμα πρόπολης με β-CD μετά από παραμονή υπό ανάδευση στους 35 °C

A/A	β-κυκλοδεξτρίνη (M)	Πρόπολη (g)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης
1	0,000	0,032	0,030	0,0198	0,02	3,30
2	0,003	0,029	0,046	0,0395	0,04	6,96
3	0,006	0,034	0,094	0,0142	0,05	8,79
4	0,009	0,028	0,090	0,0397	0,065	11,54
5	0,012	0,033	0,089	0,0432	0,067	11,90
6	0,015	0,032	0,171	0,0212	0,096	17,22

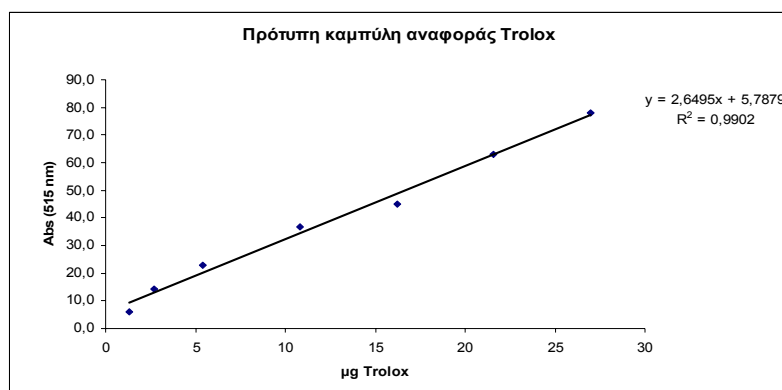
Πίνακας ΣΤ. 9. Προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών που περιέχονται υδατικό διάλυμα πρόπολης με β-CD μετά από παραμονή υπό ανάδευση στους 45 °C

A/A	β-κυκλοδεξτρίνη (M)	Πρόπολη (g)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος όρος (Abs)	mg CAE/ g καθαρής πρόπολης
1	0,000	0,034	0,0511	0,0129	0,03	5,13
2	0,003	0,032	0,0663	0,0335	0,05	8,79
3	0,006	0,035	0,0848	0,035	0,06	10,62
4	0,009	0,031	0,1241	0,02815	0,08	14,29
5	0,012	0,028	0,1418	0,0353	0,09	16,12
6	0,015	0,030	0,1491	0,0945	0,10	17,95

ΣΤ. 4. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα (antiradical activity) προσδιορίστηκε με τη χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH* (1,1- διφαινυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας). Η δέσμευση της ελεύθερης ρίζας οδηγεί σε μείωση της απορρόφησης (515 nm) λόγω του αποχρωματισμού του διαλύματος που παρατηρείται (από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο). Υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH*, παραγωγή ανοιχτόχρωμου προϊόντος και κατ' επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης.

Με βάση την ποσότητα σε μg Trolox που περιείχαν τα 7 πρότυπα διαλύματα και την απορρόφησή τους στα 515nm, σχηματίστηκε η ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς (**Σχήμα ΣΤ. 2.**) με συνάρτηση $y = 2,6495x + 5,7879$ και συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9902$. Τοποθετώντας στην τετμημένη, την απορρόφηση των διαλυμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις, τις συγκεντρώσεις των PE, τα mg πρόπολης στα οποία αντιστοιχούν οι εξεταζόμενες ποσότητες των συμπλόκων και για τη μελέτη απελευθέρωσης πολυφαινόλων από τα σύμπλοκα, τα ισοδύναμα Trolox που αντιστοιχούν στο αρχικό PE (Καλαβρύτων), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συμπλόκου, υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα (x). Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε mg ισοδύναμα Trolox.



Σχήμα ΣΤ. 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox

Πίνακας ΣΤ. 10. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης (PE) από διάφορες περιοχές στην Ελλάδα και στην Κύπρο, με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

A/A	Προέλευση PE	% μείωση DPPH (Α μέτρηση)	% μείωση DPPH (Β μέτρηση)	% μείωση DPPH (Γ μέτρηση)	Μέσος Όρος (%)	A _{AR} (mg trolox/g καθαρής πρόπολης)
1	Πελοπόννησος:Καλάβρυτα	55,45	33,17	80,05	56,22	190,36
2	Πελοπόννησος:Μεγαλόπολη	76,99	80,99	79,79	79,26	277,29
3	Μεσσηνία: Αρφαρά	16,78	28,27	81,78	42,28	137,72
4	Μεσσηνία: Τρίκορφο	28,55	23,91	83,23	45,23	148,87
5	Κρήτη: Ρέθυμνο	16,72	14,42	52,68	27,94	83,61
6	Τήνος: Πύργος	80,17	64,85	81,11	75,38	262,65
7 α	Καρδίτσα: Λουτρά 2004	77,76	67,85	80,38	75,33	262,47
7 β	Καρδίτσα: Λουτρά 2006	73,12	63,70	76,28	71,03	246,26
8	Σκόπελος: Γλώσσα	78,47	60,80	81,05	73,44	255,34
9 α	Κύπρος: Λάρνακα 2005	28,28	18,46	78,60	41,78	135,84
9 β	Κύπρος: Λάρνακα 2006	25,98	17,83	81,05	41,62	135,24

Πίνακας ΣΤ. 11. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων των συμπλόκων Σ4-Σ12 (PTM 12 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX), με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

A/A	Δείγματα	% μείωση DPPH (Α μέτρηση)	% μείωση DPPH (Β μέτρηση)	% μείωση DPPH (Γ μέτρηση)	Μέσος Όρος (%)	A _{AR} (mg trolox/g καθαρής πρόπολης)
1	Σ 4	34,42	27,16	30,60	30,73	141,12
2	Σ 5	62,29	45,50	72,18	59,99	157,36
3	Σ 6	65,72	49,60	69,61	61,64	162,16
4	Σ 7	66,66	37,62	48,72	51,00	170,65
5	Σ 8	58,27	46,37	55,48	53,37	179,59
6	Σ 9	51,73	45,69	47,81	48,41	160,86
7	Σ 10	43,32	35,05	38,22	38,86	186,78
8	Σ 11	45,92	37,13	33,33	38,80	187,16
9	Σ 12	71,40	60,72	62,80	64,97	171,83

Πίνακας ΣΤ. 12. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 (PTM 12 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) σε υδατικό διάλυμα

Δείγμα	Χρόνος διερεύνησης απελευθέρω- σης (min)	% μείωση DPPH (Α μέτρηση)	% μείωση DPPH (Β μέτρηση)	% μείωση DPPH (Γ μέτρηση)	Μέσος Όρος (%)	A _{AR} (mg trolox/ g καθαρής πρόπολης)	Απόδοση αντιοξειδω- τικής ικανότητας (%)
Σ 4	180	22,66	26,77	31,53	26,99	1333,61	541,56
Σ 5	180	30,61	30,67	47,79	36,36	1922,99	780,89
Σ 6	180	24,47	31,87	26,27	27,54	1368,20	555,60
Σ 7	180	26,61	26,98	44,11	32,57	1684,56	684,07

Δείγμα	Χρόνος διερεύνησης απελευθέρωσης (min)	% μείωση DPPH (Α μέτρηση)	% μείωση DPPH (Β μέτρηση)	% μείωση DPPH (Γ μέτρηση)	Μέσος Όρος (%)	A _{AR} (mg trolox/ g καθαρής πρόπολης)	Απόδοση αντιοξειδω- τικής ικανότητας (%)
Σ 8	180	15,63	20,54	16,99	17,72	750,51	304,77
Σ 9	180	65,29	66,01	73,67	68,32	3933,89	1597,48
Σ 10	180	94,98	95,14	96,22	95,45	5639,92	2290,27
Σ 11	180	32,44	31,51	48,4	37,45	1991,64	808,77
Σ 12	180	34,32	41,05	41,07	38,81	2077,36	843,58

Πίνακας ΣΤ. 13. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2 (PTM 2) σε υδατικό διάλυμα

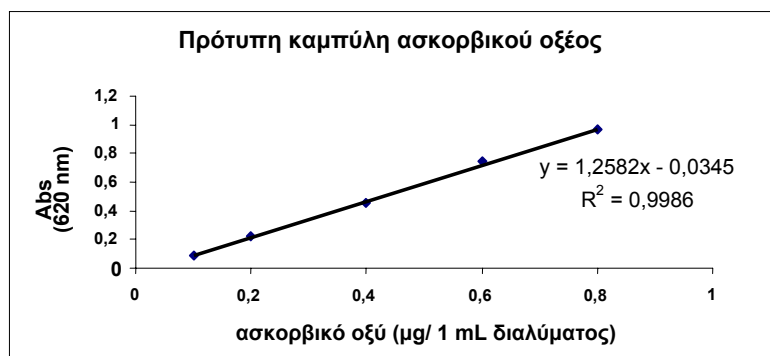
Δείγμα	Χρόνος απελευθέρωσης (min)	% μείωση DPPH (Α μέτρηση)	% μείωση DPPH (Β μέτρηση)	% μείωση DPPH (Γ μέτρηση)	Μέσος Όρος (%)	A _{AR} (mg trolox/g καθαρής πρόπολης)	Απόδοση αντιοξειδωτικής ικανότητας (%)
Σ 2	5	31,65	23,71	24,91	26,76	1341,59	544,79
Σ 2	10	16,55	9,62	10,41	12,19	409,80	166,41
Σ 2	30	9,03	6,56	7,57	7,72	123,56	50,18
Σ 2	60	8,79	4,87	6,14	6,60	51,89	21,07
Σ 2	300	10,98	7,80	9,64	9,47	235,83	95,77
Σ 2	600	33,69	29,35	30,28	31,11	1619,61	657,69
Σ 2	1200	13,90	9,89	11,07	11,62	373,13	151,52

ΣΤ. 5. Μέτρηση της αναγωγικής δύναμης (P_R)

Ο προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης των δειγμάτων έγινε με την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου που βασίζεται στην αναγωγική/ αντιοξειδωτική δύναμη του σιδήρου (FRAP). Πιο συγκεκριμένα ο Fe^{2+} που προκύπτει από την αναγωγή του Fe^{3+} δημιουργεί έγχρωμο σύμπλοκο (μπλε) με το TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) το οποίο και φωτομετράται.

Με βάση την ποσότητα σε μg ασκορβικού οξέος που περιείχαν τα 7 πρότυπα διαλύματα και την απορρόφησή τους στα 620nm, σχηματίστηκε η ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς (**Σχήμα ΣΤ 3.**), με συνάρτηση $y = 2,6495x + 5,7879$ και συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9902$. Τοποθετώντας στην τετμημένη, την απορρόφηση των διαλυμάτων και λαμβάνοντας υπόψιν τις αραιώσεις, τις συγκεντρώσεις των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, τα mg πρόπολης στα οποία αντιστοιχούν οι εξεταζόμενες ποσότητες των συμπλόκων και για τη μελέτη απελευθέρωσης πολυφαινόλων από τα σύμπλοκα, τα ισοδύναμα ασκορβικού οξέος που αντιστοιχούν στο αρχικό ΡΕ (Καλαβρύτων), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συμπλόκου, υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα (x), στο κάθε δείγμα.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμα ασκορβικού οξέος. Η αναγωγική δύναμη είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος που απαιτείται για την αναγωγή ίσης ποσότητας Fe^{3+}



Σχήμα ΣΤ. 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος

Πίνακας ΣΤ. 14. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης στα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης (PE) από διάφορες περιοχές στην Ελλάδα και στην Κύπρο

A/A	Προέλευση PE	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος Όρος	P _R (mg ασκορβικού οξέος /g καθαρής πρόπολης)
1	Πελοπόννησος:Καλάβρυτα	0,1622	0,1626	0,1624	3,13
2	Πελοπόννησος:Μεγαλόπολη	0,1761	0,1758	0,1760	3,35
3	Μεσσηνία: Αρφαρά	0,1594	0,1598	0,1596	3,09
4	Μεσσηνία: Τρίκορφο	0,1623	0,1624	0,1624	3,13
5	Κρήτη: Ρέθυμνο	0,1007	0,0998	0,1003	2,14
6	Τήνος: Πύργος	0,1384	0,1381	0,1383	2,75
7 α	Καρδίτσα: Λουτρά 2004	0,1757	0,1751	0,1754	3,34
7 β	Καρδίτσα: Λουτρά 2006	0,1691	0,1692	0,1692	3,24
8	Σκόπελος: Γλώσσα	0,1474	0,1478	0,1476	2,89
9 α	Κύπρος: Λάρνακα 2005	0,1117	0,1116	0,1117	2,32
9 β	Κύπρος: Λάρνακα 2006	0,1172	0,1174	0,1173	2,41

Πίνακας ΣΤ. 15. Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης των συμπλόκων Σ4-Σ12 (PTM 12 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX)

A/A	Δείγματα	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος Όρος	P _R (mg ασκορβικού οξέος /g καθαρής πρόπολης)
1	Σ 4	0,8985	0,8966	0,89755	1,14
2	Σ 5	0,9307	0,9277	0,9292	1,18
3	Σ 6	0,9518	0,9506	0,9512	1,21

A/A	Δείγματα	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος Όρος	P _R (mg ασκορβικού οξέος /g καθαρής πρόπολης)
4	Σ 7	0,8702	0,8693	0,86975	1,44
5	Σ 8	0,9081	0,9065	0,9073	1,50
6	Σ 9	0,9982	0,9992	0,9987	1,64
7	Σ 10	0,7679	0,7673	0,7676	1,91
8	Σ 11	0,7335	0,732	0,73275	1,83
9	Σ 12	0,7009	0,6983	0,6996	1,75

Πίνακας ΣΤ. 16. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 (PTM 12 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) σε υδατικό διάλυμα

Δείγματα	Χρόνος διερεύνησης απελευθέρωσης (min)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος Όρος	P _R (mg ασκορβικού οξέος /g καθαρής πρόπολης)	Απόδοση αναγωγικής δύναμης (%)
Σ 4	180	0,4111	0,4106	0,41085	117,99	3769,52
Σ 5	180	0,3974	0,3967	0,39705	114,33	3652,72
Σ 6	180	0,3303	0,3293	0,3298	96,51	3083,50
Σ 7	180	0,3011	0,301	0,30105	88,90	2840,15
Σ 8	180	0,2661	0,2657	0,2659	79,58	2542,64
Σ 9	180	0,5691	0,4679	0,5185	146,51	4680,69
Σ 10	180	0,3582	0,356	0,3571	103,75	3314,57
Σ 11	180	0,4111	0,4106	0,41085	117,99	3769,52
Σ 12	180	0,3974	0,3967	0,39705	114,33	3652,72

Πίνακας ΣΤ. 17. Αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ2 (PTM 2) σε υδατικό διάλυμα

Δείγματα	Χρόνος διερεύνησης απελευθέρωσης (min)	1 ^η μέτρηση (Abs)	2 ^η μέτρηση (Abs)	Μέσος Όρος	P _R (mg ασκορβικού οξέος/g καθαρής πρόπολης)	Απόδοση αναγωγικής δύναμης (%)
Σ 2	5	0,2682	0,2678	0,268	81,50	2603,81
Σ 2	10	0,2199	0,2192	0,21955	68,45	2186,77
Σ 2	30	0,3724	0,3655	0,36895	108,70	3472,75
Σ 2	60	0,235	0,2352	0,2351	72,64	2320,62
Σ 2	300	0,2846	0,2904	0,2875	86,75	2771,66
Σ 2	600	0,4317	0,4311	0,4314	125,52	4010,30
Σ 2	1200	0,39	0,3894	0,3897	114,29	3651,36

Πίνακας ΣΤ. 18. Περιεκτικότητα των συμπλόκων πρόπολης σε πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)

Συστατικά	Μελέτη εγκλεισμού συστατικών πρόπολης Καλαβρύτων σε τροποποιημένο άμυλο και β-κυκλοδεξτρίνη	
	Σύμπλοκο πρόπολης/ β-κυκλοδεξτρίνη	Σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου
Πολυφαινόλες (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)		
VANILIN	36,1	455,2
CINNAMIC	211,1	286,8
TYROSOL	7,6	n.d.
P-OH BENZOIC	42,8	71,5
P OH PHENYLACETIC	7,1	n.d.
HOMOV ALCOHOL	0,6	n.d.
PHLORETIC	53,7	91,9
VANNILIC	37,9	44,5
HOMOVANNILIC	36,1	n.d.
O-COUMARIC	10,3	n.d.
PROTOCATECHUIC	59,3	57,6
SYRINGIC	15,2	n.d.
P-COUM	228,1	572,0
GALLIC	11,2	n.d.
FERULIC	82,5	442,6
CAFFEIC	461,0	2373,1
SINAPIC	n.d.	n.d.
RESVERATROL	13,1	n.d.
CHRYSLIN	59,1	6559,21
EPICATECHIN	n.d.	53,2
NARINGENIN	43,9	205,7
CATECHIN	19,6	n.d.
KAMPHEROL	26,9	236,3
CHLOROGENIC	9,9	n.d.
QUERCET	n.d.	53,7
Τερπενικά οξέα (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)		
OLEANOLIC	125,9	1204,9
Συνολικά (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)		
Πολυφαινόλες	1599,0	11503,28
Τερπενικά οξέα	125,9	1204,9
Σύνολο	1725,0	12708,18

Πίνακας ΣΤ. 19. Συστατικά που περιέχονται στο σύμπλοκο πρόπολης/ β- κυκλοδεξτρίνη και προσδιορίστηκαν με GC/MS. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως % του συνολικού εμβαδού των χρωματογραφημάτων ολικών ιόντων.

No	Συστατικό	Rt	Σύμπλοκο πρόπολης/ β- κυκλοδεξτρίνη (%)
1.	Propanoic acid	4,74	0,59
2.	Ethyl benzoate	5,18	0,32
3.	ethylene glycol	5,77	2,77
4.	Benzenethanol (phenethyl alcohol)	6,07	0,87
5.	benzoic acid	6,42	0,86
6.	3,4-Methylenedioxycinnamic acid	6,734	1,79
7.	glycerol	6,994	1,68
8.	phenylacetic acid	7,43	7,83
9.	Thymol	7,8	0,24
10.	3 (p-OH phenyl) 1-propanol (25%) PHENYLPROPENOL	10,1	3,08
11.	Malic acid (hydroxy-butanedioic) 90%	11,67	1,50
12.	D-Glucosamine	17,06	0,53
13.	(D-fructose)	19,005	4,65
14.	Sorbose	19,1	3,28
15.	Ribitol	20,57	0,64
16.	p-coumaric acid		2,07
17.	3,4-dimethoxy cinnamic acid	22,71	4,03
18.	hexadecanoic acid	22,962	1,49
19.	ferulic acid (GBP)	23,97	1,99
20.	menthol TMS, Wiley	24,672	0,35
21.	oleic acid	26,04	2,22
22.	cinnamyl cinnamate (Bankova)	29,45	5,76
23.	abietic acid	29,5	0,98
24.	1 (M) (3E,5E,7E)-6-Methyl-8-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl)-3,5,7-octatrien-2-one	30,741	1,00
25.	cinnamic acid ester	31,15	0,45
26.	PINOCEMBRIN	31,503	1,78
27.	7,8-Dimethylbenzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene	31,69	1,91

No	Συστατικό	Rt	Σύμπλοκο πρόπολης/ β- κυκλοδεξτρίνη (%)
28.	5,10-dihydro-1,2,3,4-tetraphenylbenzocyclooctene (Wiley 45%)	32,1	7,48
29.	pinobanskin (Bankova)	32,325	4,93
30.	indole-2-acetic acid	32,82	6,84
31.	phenanthrene, ή 3,5-Di(carboethoxy)carbazole	33,306	0,57
32.	Pinobanskin-3-O-acetate (bankova)	33,574	1,94
33.	alpha.-D-Glucopyranoside,alpha-D-fructofuranosyl	33,691	0,64
34.	D-turanose	33,82	1,32
35.	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	33,93	0,97
36.	thianthrene	34,26	0,67
37.	1,3,8-Trihydroxy-6-methylanthraquinone	34,69	0,57
38.	pinobanskin isobutanoate	34,982	1,06
39.	2-(3'-Hydroxyphenylamino)-5-methyl-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine	35,33	0,32
40.	1,2,8-trihydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone	35,67	0,44

Πίνακας ΣΤ. 20. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων, με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων, σε διάφορους χρόνους που προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)

Συστατικά	Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων σε διάφορους χρόνους							
	Καθαρή πρόπολη	Σύμπλοκο καθαρής πρόπολης με τροποποιημένο άμυλο (Σ2)						
	180 min	5 min	10 min	30 min	60 min	300 min	600 min	1200 min
Πολυφαινόλες (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)								
VANILIN	n.d.	245,8	123,6	634,9	357,3	139,2	75,1	296,3
CINNAMIC	1596,55	753,1	729,0	869,7	726,1	727,3	725,8	791,9
TYROSOL	n.d.	132,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1855,1	n.d.
P-OH BENZOIC	455,17	308,1	283,7	296,9	262,4	264,1	218,0	283,1
PHLORETIC	n.d.	581,0	580,5	629,8	587,3	698,1	508,0	991,5
VANNILIC	n.d.	605,6	563,6	582,7	518,5	518,8	501,2	680,8
HOMOVANNILIC	n.d.	n.d.	501,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PROTOCATECHUIC	442,91	520,8	502,4	388,8	618,6	540,8	314,4	n.d.
P-COUM	1684,29	1400,0	1251,9	1325,4	1317,8	906,8	1150,7	1236,4
GALLIC	n.d.	n.d.	n.d.	1763,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FERULIC	2403,83	1648,0	1294,9	1313,4	1505,3	1239,0	1343,9	1324,2
CAFFEIC	2666,28	2032,4	1500,2	1578,1	2129,8	1904,2	2476,3	1654,4
RESVERATROL	2137,93	734,9	722,4	808,1	721,9	608,5	671,4	721,7
CHRYSin	n.d.	9262,0	3755,6	6381,5	6326,3	3821,0	3095,1	4414,9
EPICATECHIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	620,5	661,0	674,1	642,2
NARINGENIN	n.d.	1078,8	934,2	1015,4	976,3	977,8	876,8	1008,1
CATECHIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1154,7	1150,7	1172,9	n.d.
KAMPHEROL	n.d.	1076,6	839,5	894,7	962,7	851,0	849,3	888,1
Τερπενικά οξέα (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)								
OLEANOLIC	44662,84	5764,2	4121,2	9631,9	4043,7	6485,8	5273,9	5540,3

Συστατικά	Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων σε διάφορους χρόνους							
	Καθαρή πρόπολη	Σύμπλοκο καθαρής πρόπολης με τροποποιημένο άμυλο (Σ2)						
	180 min	5 min	10 min	30 min	60 min	300 min	600 min	1200 min
URSOLIC	n.d.	n.d.	n.d.	858,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Συνολικά (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)								
Πολυφαινόλες	11386,97	20379,7	14163,2	18483,1	18785,4	17309,5	15631,0	14933,7
Τερπενικά οξέα	44662,84	5764,2	4121,2	10490,2	4043,7	6485,8	5273,9	5540,3
Σύνολο	56049,81	26143,9	18284,4	28973,2	22829,2	21494,1	21781,7	20474,1

Πίνακας ΣΤ. 21. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων, με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων, στα 180 min που προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS).

Συστατικά	Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων στα 180 min									
	Καθαρή πρόπολη	Σύμπλοκα καθαρής πρόπολης με τροποποιημένο άμυλο								
		Σ 4	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ 12
Πολυφαινόλες (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)										
VANILIN	n.d.	2121,7	110,2	43,2	2390,2	396,8	183,3	19,2	295,3	714,0
CINNAMIC	1596,55	1920,2	1645,3	1145,0	2097,0	1148,8	1302,8	1975,7	2004,5	1675,7
TYROSOL	n.d.	49,5	7,5	n.d.	46,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P-OH BENZOIC	455,17	463,3	400,3	331,2	385,0	302,8	311,0	462,8	398,3	364,2
PHLORETIC	n.d.	960,8	1070,5	852,5	798,2	929,8	816,0	976,7	774,5	770,3
VANNILIC	n.d.	667,7	577,3	551,2	593,2	530,3	530,8	588,2	561,8	572,3
HOMOVANNILIC	n.d.	495,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	491,0	n.d.	n.d.	n.d.
PROTOCATECHUIC	442,91	531,2	558,8	441,0	450,3	449,8	581,0	466,7	458,7	542,0
P-COUM	1684,29	2321,3	1801,3	1250,7	2152,0	1343,3	1578,7	1691,7	2177,8	2043,3
GALLIC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	496,3	n.d.	n.d.	n.d.
FERULIC	2403,83	3028,7	2341,7	1277,0	2646,2	1688,3	2233,2	2005,7	2818,2	2696,5
CAFFEIC	2666,28	4781,0	2755,0	1443,8	5069,3	1795,0	2858,3	3087,3	4572,0	4416,5
RESVERATROL	2137,93	729,5	708,5	705,8	749,2	705,5	700,8	768,0	700,3	707,5
CHRYSIN	n.d.	14186,5	27176,0	3595,5	50874,3	4062,5	20859,3	2025,3	22659,0	13371,2
EPICATECHIN	n.d.	613,0	n.d.	601,8	n.d.	n.d.	600,5	604,0	n.d.	n.d.
NARINGENIN	n.d.	1207,5	1283,2	866,3	1592,8	939,8	1201,3	1102,5	1593,5	1083,2
CATECHIN	n.d.	1146,7	1145,5	1138,5	n.d.	n.d.	1133,2	n.d.	n.d.	n.d.
KAMPHEROL	n.d.	1519,0	2113,8	957,0	2726,3	949,5	1562,2	1324,0	1732,7	1357,3
QUERCET	n.d.	758,2	799,5	n.d.	868,7	n.d.	759,2	n.d.	774,7	767,8
Τερπενικά οξέα (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)										
OLEANOLIC	44662,84	7638,5	4490,7	3709,5	7914,7	2745,2	2523,8	11867,0	5273,7	3239,0
URSOLIC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2547,5	n.d.	1636,7	n.d.	n.d.	n.d.
Συνολικά (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)										
Πολυφαινόλες	11386,97	37500,8	44494,5	15200,5	73986,5	15242,5	38199,0	17097,7	41521,3	31642,0

Συστατικά	Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από καθαρή πρόπολη Καλαβρύτων στα 180 min									
	Καθαρή πρόπολη	Σύμπλοκα καθαρής πρόπολης με τροποποιημένο άμυλο								
		Σ 4	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ 12
Τερπενικά οξέα	44662,84	7638,5	4490,7	3709,5	10462,2	2745,2	4160,5	11867,0	5273,7	3239,0
Σύνολο	56049,81	45139,3	48985,2	18910,0	84448,7	17987,7	42359,5	28964,7	46795,0	34881,0

Πίνακας ΣΤ. 22. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης Καλαβρύτων σε τροποποιημένο άμυλο, σε pH= 1,2 σε διάφορους χρόνους, με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS).

Συστατικά	Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το Σ2 σε pH= 1,2 σε διάφορους χρόνους				
	5 min	15 min	30 min	60 min	180 min
Πολυφαινόλες (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)					
VANILIN	83,33	113,33	n.d.	1,17	n.d.
CINNAMIC	494,50	480,83	502,00	640,00	534,33
P-OH BENZOIC	209,50	210,00	230,33	201,50	209,00
PHLORETIC	448,17	450,00	486,00	437,17	484,50
VANNILIC	n.d.	431,67	n.d.	n.d.	n.d.
P-COUM	1473,67	1189,00	1560,67	1567,83	1392,33
FERULIC	1485,00	1389,17	1524,83	1621,33	1677,50
CAFFEIC	3638,00	3561,17	4057,00	4223,00	4747,50
CHRY SIN	1652,50	1441,17	1561,50	2148,33	1766,67
NARINGENIN	n.d.	917,83	n.d.	896,33	n.d.
KAMPHEROL	765,67	753,00	799,67	855,67	740,00
Τερπενικά οξέα (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)					
OLEANOLIC	1330,00	1848,50	3140,83	2041,50	2585,17
Συνολικά (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)					
Πολυφαινόλες	10250,33	10937,17	10722,00	12592,33	11551,83
Τερπενικά οξέα	1330,00	1848,50	3140,83	2041,50	2585,17
Σύνολο	11580,33	12785,67	13862,83	14633,83	14137,00

Πίνακας ΣΤ. 23. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης Καλαβρύτων σε τροποποιημένο άμυλο, σε pH= 8, σε διάφορους χρόνους, με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)

Συστατικά	Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το Σ2 σε pH= 8 σε διάφορους χρόνους				
	5 min	15 min	30 min	60 min	180 min
Πολυφαινόλες (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)					
VANILIN	n.d.	n.d.	n.d.	22,00	n.d.
CINNAMIC	391,50	315,67	397,67	373,33	304,50
P-OH BENZOIC	182,17	228,33	223,83	186,50	217,83
PHLORETIC	405,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P-COUM	1295,33	1298,83	1367,50	1152,17	1395,50
FERULIC	1392,67	1316,17	1425,00	1266,67	1614,00
CAFFEIC	2104,83	2388,50	2552,50	1967,50	3869,00
CHRY SIN	1201,83	820,33	1188,00	1061,50	913,83
NARINGENIN	909,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KAMPHEROL	785,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Τερπενικά οξέα (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)					
OLEANOLIC	2098,67	2481,67	3977,83	2341,50	2875,67
Συνολικά (μg/g αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης)					
Πολυφαινόλες	8668,50	6367,83	7154,50	6029,67	8314,67
Τερπενικά οξέα	2098,67	2481,67	3977,83	2341,50	2875,67
Σύνολο	10767,17	8849,50	11132,33	8371,17	11190,33

Πίνακας ΣΤ. 24. 1. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο. Η διάμετρος της διαυγούς ζώνης αναστολής μετράται σε cm

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ

		20% w/v 0,4 g														
		Συγκέντρωση τροποποιημένου άμυλου														
Α	2:1	C1					C2					C3				
		0,25%					0,5%					1%				
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 12 I					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 12 II					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 12 III				
		80 ml					40 ml					20 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.45	0.25	0.15	0.0	0.0	0.65	0.45	0.15	0.0	0.0	0.65	0.45	0.15	0.0	0.0
Β	1:1	ΔΕΙΓΜΑ: PTM12 IV					ΔΕΙΓΜΑ: PTM12 V					ΔΕΙΓΜΑ: PTM12 VI				
		80 ml					40 ml					20 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.65	0.35	0.35	0.0	0.0	0.55	0.35	0.15	0.0	0.0	0.55	0.45	0.15	0.0	0.0
Γ	1:2	ΔΕΙΓΜΑ: PTM12 VII					ΔΕΙΓΜΑ: PTM12 VIII					ΔΕΙΓΜΑ: PTM12 IX				
		80 ml					40 ml					20 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.55	0.65	0.45	0.25	0.0	0.45	0.55	0.35	0.15	0.0	0.45	0.55	0.35	0.15	0.0

Πίνακας ΣΤ. 24. 2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο, τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη Tween-80. Η διάμετρος της διαυγούς ζώνης αναστολής μετράται σε cm

		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ									
		20% w/v									
		0,4 g									
		Συγκέντρωση τροποποιημένου αμύλου									
		C1					C2				
		0,25%					0,5%				
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM A					ΔΕΙΓΜΑ: PTM B				
		80 ml					40 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM Δ									
		80 ml					40 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.15	0.0	0.0	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM Ζ									
		80 ml					40 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Πίνακας ΣΤ. 24. 3. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο (cm)

Αναλογία μάζας πρόπολης/ τροποποιημένο άμυλο		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ									
		20% w/v 0,4 g									
		Συγκέντρωση τροποποιημένου αμύλου									
		C1					C2				
		0,25%					0,5%				
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 A (tween-80)					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 A´				
		2 ml					2 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.35	0.15	0.0	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 B (tween-80)					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 B´				
		3,6 ml					3,6 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.25	0.15	0.0	0.0	0.0	0.35	0.25	0.0	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 Γ (tween-80)					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 Γ´				
		4,8 ml					4,8 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.25	0.15	0.0	0.0	0.0	0.35	0.45	0.25	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 Δ (tween-80)					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 13 Δ´				
		6,0 ml					6,0 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.25	0.15	0.0	0.0	0.0	0.45	0.50	0.35	0.25	0.10

Πίνακας ΣΤ. 24. 4. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης (cm)

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ																
Αναλογία μάζας πρόπολης/ β- CD		20% w/v 0,4 g														
		Συγκέντρωση β-κυκλοδεξτρίνης														
		C1					C2					C3				
		0,25%					0,5%					1%				
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 4					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 5					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 6				
A	1:1	10 ml					8 ml					10 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 14 Α					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 14 Β					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 14 Γ				
B	1:1	80 ml					40 ml					20 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM14 Δ														
Γ	1:2	2 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8										
		0.10	0.10	0.0	0.0	0.0										
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 14 Ε														
Δ	1:3	3,6 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8										
		0.10	0.10	0.0	0.0	0.0										

Πίνακας ΣΤ. 24. 5. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/ υδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (cm)

		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ														
		20% w/v														
		0,4 g														
		Συγκέντρωση υδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη														
		C1					C2					C3				
		0.25%					0.5%					1%				
		ΔΕΙΓΜΑ: PTM 7					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 8					ΔΕΙΓΜΑ: PTM 9 (tween-80)				
		10 ml					8 ml					10 ml				
		Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.45	0.25	0.0	0.0	0.0	0.40	0.20	0.0	0.0	0.0	0.15	0.0	0.0	0.0	0.0
Α	1:1	ΔΕΙΓΜΑ: PTM 15 Α														
		2 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.75	0.55	0.45	0.0	0.0	0.75	0.55	0.45	0.0	0.0	0.75	0.55	0.45	0.0	0.0
Β	1:2	ΔΕΙΓΜΑ: PTM 15 Β														
		3,6 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.55	0.45	0.35	0.15	0.0	0.55	0.45	0.35	0.15	0.0	0.55	0.45	0.35	0.15	0.0
Γ	1:3	ΔΕΙΓΜΑ: PTM 15 Γ														
		4,8 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.55	0.45	0.35	0.15	0.0	0.55	0.45	0.35	0.15	0.0	0.55	0.45	0.35	0.15	0.0
Δ	1:4	ΔΕΙΓΜΑ: PTM 15 Δ														
		6 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.55	0.60	0.45	0.25	0.0	0.55	0.60	0.45	0.25	0.0	0.55	0.60	0.45	0.25	0.0
Ε	1:5	ΔΕΙΓΜΑ: PTM 15 Ε														
		6 ml														
		Διαδοχικές αραιώσεις														
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
		0.55	0.60	0.65	0.35	0.20	0.55	0.60	0.65	0.35	0.20	0.55	0.60	0.65	0.35	0.20

Πίνακας ΣΤ. 24. 6. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων πρόπολης/ζελατίνης τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη Tween-80 (cm)

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ																		
Αναλογία μάζας πρόπολης/ ζελατίνης		20% w/v																
		0,4 g																
		Συγκέντρωση ζελατίνης																
		C1					C2					C3						
		0,25%					0,5%					1%						
		ΔΕΙΓΜΑ: Σ 47					ΔΕΙΓΜΑ: Σ 50					ΔΕΙΓΜΑ: Σ 53						
		80 ml					40 ml					20 ml						
A	2:1	Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις						
		0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8		
		0.50	0.45	0.35	0.25	0.0	0.50	0.40	0.25	0.15	0.0	0.50	0.35	0.25	0.15	0.0		
B		1:1		ΔΕΙΓΜΑ: Σ 48					ΔΕΙΓΜΑ: Σ 51					ΔΕΙΓΜΑ: Σ 54				
				80 ml					40 ml					20 ml				
				Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
				0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
				0.45	0.55	0.35	0.25	0.15	0.55	0.60	0.45	0.35	0.15	0.65	0.45	0.35	0.25	0.15
Γ		1:2		ΔΕΙΓΜΑ: Σ 49					ΔΕΙΓΜΑ: Σ 52					ΔΕΙΓΜΑ: Σ 55				
				80 ml					40 ml					20 ml				
				Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις					Διαδοχικές αραιώσεις				
				0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8	0	1:1	1:2	1:4	1:8
				0.55	0.45	0.65	0.45	0.35	0.55	0.60	0.35	0.30	0.25	0.45	0.55	0.40	0.30	0.25

Κεφάλαιο Z

Συζήτηση

Z. 1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ακατέργαστης πρόπολης σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη (Balsam)

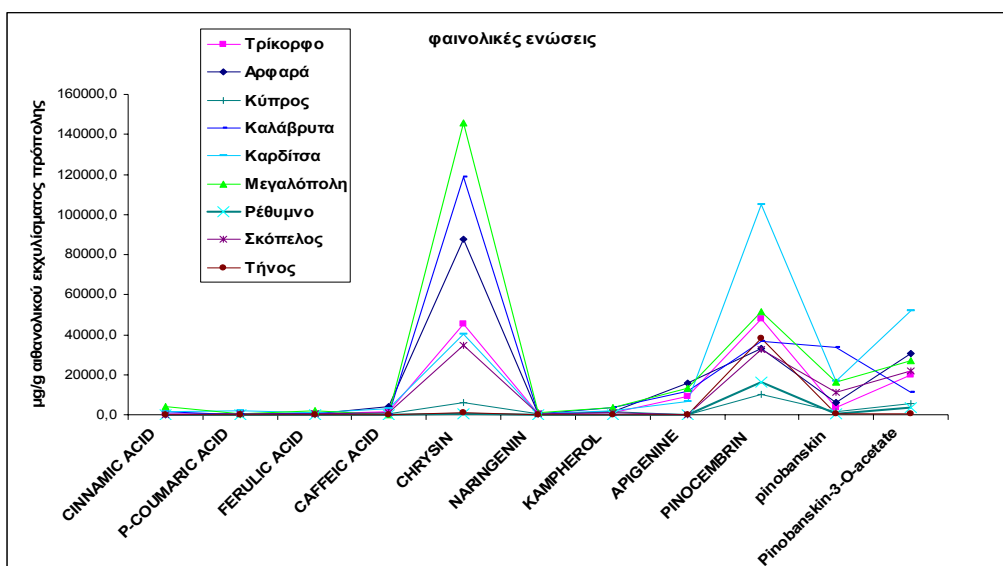
Η περιεκτικότητα της ακατέργαστης πρόπολης (αρχικού δείγματος) σε συστατικά διαλυτά στην αιθανόλη κυμάνθηκε από 13,89 μέχρι 61,2%. Το χαμηλότερο ποσοστό περιεκτικότητας ανιχνεύθηκε στο δείγμα πρόπολης από την περιοχή Πύργος στην Τήνο, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ανιχνεύθηκε στο δείγμα από την περιοχή Αρφαρά στη Μεσσηνία. **(Πίνακας ΣΤ. 1.).**

Γενικά, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο είδος και τις ποσότητες των διαλυτών συστατικών που περιέχονται στα ακατέργαστα δείγματα πρόπολης (40 – 55 % για τα περισσότερα δείγματα), με προέλευση από την Πελοπόννησο, Καρδίτσα, Κύπρο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, όπου το ποσοστό των διαλυτών συστατικών ακατέργαστης πρόπολης σε αιθανόλη, από την Βραζιλία ήταν 45,2 %, από την Κίνα 49,5% και από την Ταϊβάν, το ποσοστό αυτό κυμαινόταν σε εύρος από 24,3% μέχρι 70,9% (Lu *et al.*, 2003).

Η επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων του διαλύτη εκχύλισης (90%, 70% v/v αιθανόλης), στηρίζεται στην αναζήτηση πιθανών διαφορών στο είδος καθώς και στις συγκεντρώσεις των συστατικών που εκχυλίζονται. Φαίνεται ότι η περιεκτικότητα του διαλύτη εκχύλισης, δεν μεταβάλλει σημαντικά την ποσότητα των συστατικών που εκχυλίζονται από τα δείγματα της ακατέργαστης Κυπριακής πρόπολης, αφού με τη χρησιμοποίηση αιθανόλης 70% v/v παραλαμβάνονται 46,85 g συστατικών/100 mL εκχυλίσματος και με τη χρησιμοποίηση αιθανόλης 90% v/v παραλαμβάνονται 40,37 g συστατικών/100 mL εκχυλίσματος. Το ίδιο συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί και από τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας των συστατικών που εκχυλίζονται με τη χρησιμοποίηση αιθανόλης 70% και 90% v/v, από το δείγμα Καλαβρύτων (46,6 g συστατικών/100 mL διαλύματος και 54,8 g συστατικών/100 mL διαλύματος, αντίστοιχα).

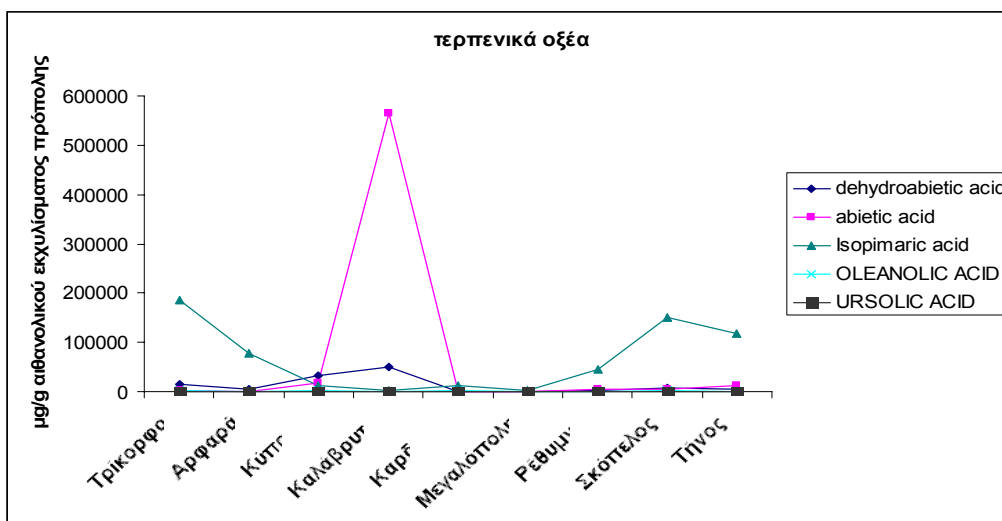
Z. 2. Ποσοτική ανάλυση των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE)

Η ανάλυση των PE από τις Αχαΐα: Καλάβρυτα, Αρκαδία: Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά και Τρίκορφο, Ρέθυμνο: Αλοΐδες, Τήνος: Πύργος, Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελος: Γλώσσα και Κύπρος: Λάρνακα με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS), οδήγησε στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 30 πολυλυφαινολικών συστατικών (SIM) και 4 επιπλέον πολυφαινολών (απιγενίνη, πινοσεμπρίνη, πινομπανκσίνη, 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης) καθώς και 3 τερπενικών οξέων (αβιετικό οξύ, δίδρο-αβιετικό οξύ και ισοπιμαρικό οξύ) (SCAN). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα **ΣΤ. 2**. Οι σημαντικότερες πολυφαινόλες που ταυτοποιήθηκαν, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων σε όλα τα PE ήταν: η χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη, ο 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, η πινομπανκσίνη, το καφεϊκό οξύ, η καμφορόλη, το φερουλλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και η ναριγκενίνη. Η χρυσίνη ήταν η σημαντικότερη πολυφαινόλη που προσδιορίστηκε στα περισσότερα χερσαία PE και στο δείγμα από τη Σκόπελο, ενώ η σημαντικότερη πολυφαινόλη που ποσοτικοποιήθηκε στα νότια νησιωτικά δείγματα και την Καρδίτσα ήταν η πινοσεμπρίνη. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χρυσίνη παρουσίαζε το δείγμα από τη Μεγαλόπολη και τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πινοσεμπρίνη, το δείγμα από την Καρδίτσα. Φαίνεται επίσης ότι η απιγενίνη απουσίαζε από τα νότια νησιωτικά δείγματα. (**Σχήμα Z. 1**).



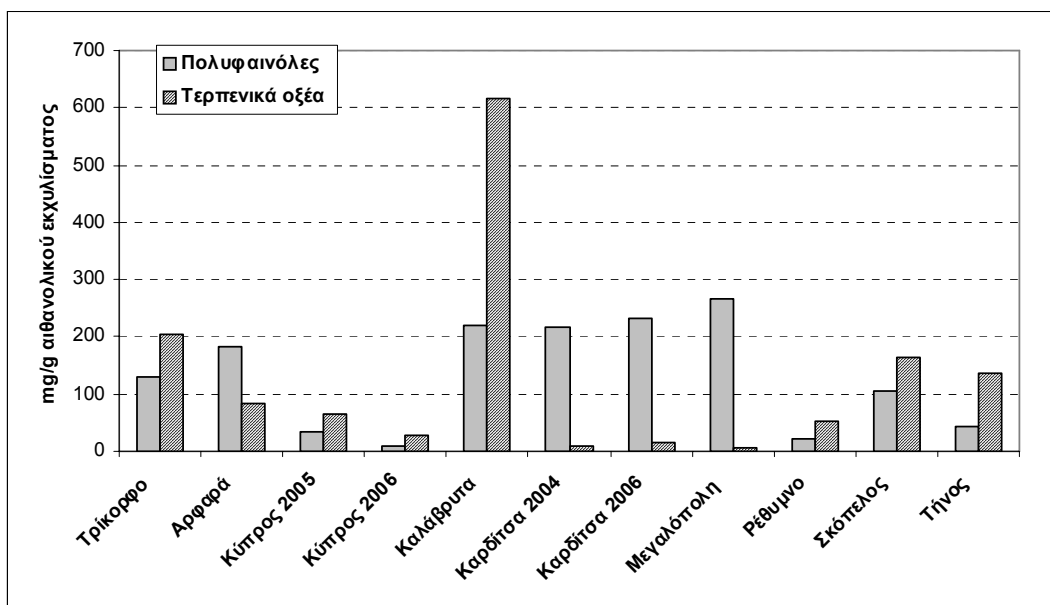
Σχήμα Z. 1. Κατανομή επιμέρους φαινολικών ενώσεων σε PE από διάφορες περιοχές Ελλάδας και Κύπρου.

Όσον αφορά στα τερπενικά οξέα, παρατηρούνται σε όλα τα PE αυξημένες συγκεντρώσεις του ολεανολικού οξέος, του δίδρο-αβιετικού οξέος και του ισοπimarικού οξέος (με εξαίρεση στο PE της Μεγαλόπολης, 40 μg δίδρο-αβιετικού οξέος/g καθαρής πρόπολης). Η συγκέντρωση του αβιετικού οξέος ήταν επίσης αυξημένη σε όλες τις περιπτώσεις και ιδιαίτερα στο PE από τα Καλάβρυτα (564880 μg/g καθαρής πρόπολης), το οποίο σε σχέση με το PE από την Καρδίτσα, είχε 278129 % μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αβιετικό οξύ (**Σχήμα Z. 2.**) Η υψηλή συγκέντρωση του PE από τα Καλάβρυτα σε αβιετικό οξύ, πιθανών να οφείλεται σε φυτογεωγραφικές παραμέτρους, όπως η ύπαρξη πεύκων (*Pinus*), αφού είναι γνωστό ότι στο ρετσίνι του πεύκου περιέχονται τερπενικά οξέα και κυρίως αβιετικό οξύ (Joye & Lawrence 1967).



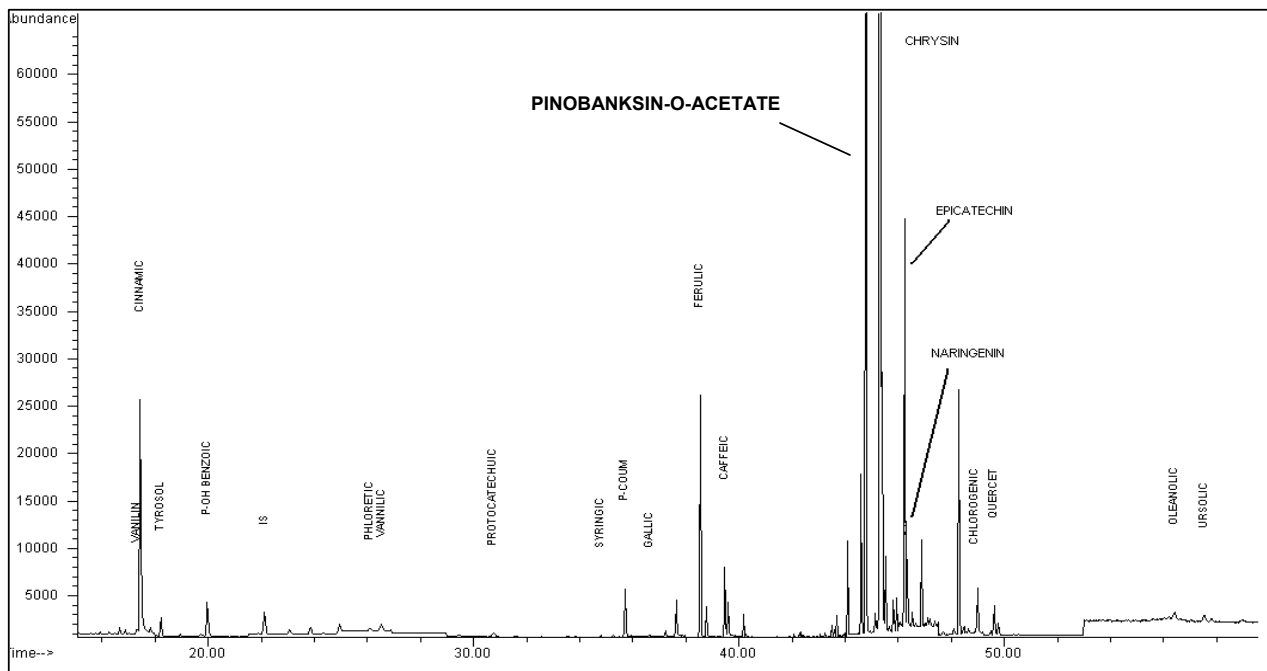
Σχήμα Ζ. 2. Κατανομή επιμέρους τερπενικών οξέων σε PE από διάφορες περιοχές Ελλάδας και Κύπρου.

Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα **Ζ. 3.**, η περιεκτικότητα των PE στις περισσότερες περιοχές, υπερτερεί σε τερπενικά οξέα (5,5- 633,9 mg/g καθαρής πρόπολης) της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (10- 265 mg/g καθαρής πρόπολης). Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προσδιορισμού των συστατικών που περιέχονται στα PE από την Ελλάδα και την Κύπρο, ως % ποσοστό του συνολικού εμβαδού των χρωματογραφημάτων ολικών ιόντων, όπου τα τερπενικά οξέα ταυτοποιήθηκαν σε ποσοστό που κυμαίνεται από 5- 40%. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η πρότυπη ένωση αβιετικού οξέος, που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αβιετικού οξέος, του δίνδρο-αβιετικού οξέος και του ισοπιμαρικού οξέος ήταν εμπορικής καθαρότητας (50%). Το γεγονός αυτό λήφθηκε υπόψη κατά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αβιετικού οξέος και συνεπώς κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό.



Ζ. 3. Κατανομή φαινολικών ενώσεων και τερπενικών οξέων σε ΡΕ από διάφορες περιοχές Ελλάδας και Κύπρου.

Στο χρωματογράφημα που παρατίθεται στη συνέχεια (**Σχήμα Ζ. 4.**) παρουσιάζονται τα κυριότερα συστατικά του ΡΕ από τα Καλάβρυτα, το οποίο εμφάνισε ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε τερπενικά οξέα και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού σε βιοπολυμερή.



Σχήμα Z. 4. Χρωματογράφημα PE από τα Καλάβρυτα

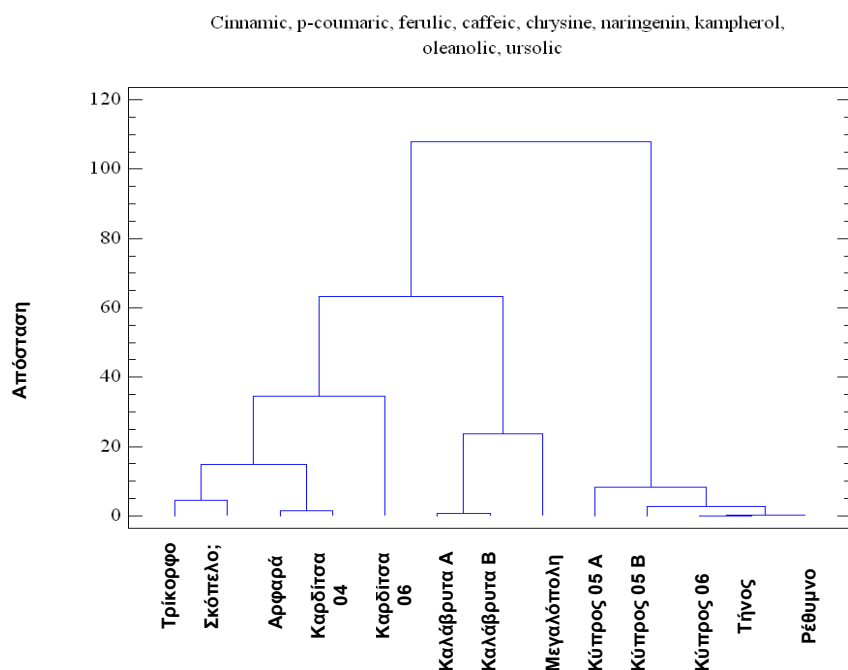
Z. 3. Ανάλυση Ομαδοποίησης των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου

Για να ελεγχθεί αν τα δείγματα πρόπολης συνιστούν ομογενή πληθυσμό ή αν τυχόν διαχωρίζονται σε ομάδες που θα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πηγές πρόπολης, εφαρμόστηκε ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης (hierarchical cluster analysis) στα αποτελέσματα των αναλύσεων των επί μέρους πολυφαινολικών ενώσεων και τερπενικών οξέων των PE. Η εφαρμογή έγινε με το λογισμικό Stat Graphics Plus for Windows 4.0 σε επιλεγμένα συστατικά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα **Z. 5**.

Για την κατάταξη των δειγμάτων χρησιμοποιείται η Ευκλείδια απόσταση, ενώ ο τρόπος σύνδεσης των ομάδων για τον σχηματισμό δένδρογράμματος ήταν συγκεντρωτικός.

Μέσω της χρησιμοποίησης όλων των παραμέτρων-συστατικών που περιέχονται στα PE, δεν προκύπτει μια ξεκάθαρη εικόνα ομαδοποίησης γι' αυτό και επιλέχθηκαν μεμονωμένα μικροσυστατικά τα οποία ήταν το κινναμικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το

φερουλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, η χρυσίνη, η ναριγκενίνη, η καμφερόλη, το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ.



Σχήμα Ζ. 5. Ανάλυση ομαδοποίησης PE

Με βάση το σχήμα **Ζ. 5.**, τα PE αρχικά κατατάσσονται σε πολλές ομογενείς ομάδες (Κρήτη -Τήνος, Κύπρος 2005 - Κύπρος 2006, Καλάβρυτα – Μεγαλόπολη, Καρδίτσα - Μεσσηνία), που στη συνέχεια ενώνονται σε όλο και λιγότερες αλλά μεγαλύτερες ομάδες, σχηματίζοντας ένα δένδρογραμμα. Η τελική ομαδοποίηση, διαχωρίζει τις περιοχές- πηγές πρόπολης σε 2 κύριες ομάδες που απαρτίζονται από τις νότιες νησιωτικές περιοχές (Κρήτη, Τήνο, Κύπρο) και τις χερσαίες περιοχές (Μεσσηνία, Καρδίτσα, Καλάβρυτα, Μεγαλόπολη) με εξαίρεση τη Σκόπελο που φαίνεται να ομαδοποιείται με τις ορεινές περιοχές, εξαιτίας της ιδιαίτερης χλωρίδας του νησιού που αποτελείται κυρίως από πεύκα.

**Z. 4. Ποιοτική ανάλυση των συστατικών των αιθανολικών εκχυλισμάτων (PE)
από διάφορες περιοχές Ελλάδας και Κύπρου**

Τα συστατικά των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης από την Ελλάδα και την Κύπρο, που προσδιορίστηκαν με GC/MS εκφρασμένα ως % του συνολικού εμβαδού των χρωματογραφημάτων ολικών ιόντων, παρατίθενται στον **Πίνακα Θ. 1.** στο παράρτημα.

Στον πίνακα κειμένου (**Πίνακας Z. 1.**), παρουσιάζονται τα κυριότερα συστατικά που περιέχονται στα PE από την Ελλάδα και την Κύπρο, σε σύγκριση με τα κυριότερα συστατικά που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης από τη Μεσόγειο.

Πίνακας Z. 1. Συγκριτική παράθεση συστατικών που περιέχονται στα PE από την Ελλάδα και την Κύπρο, σε σχέση με τα κύρια συστατικά που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης από τη Μεσόγειο

	Συστατικό	Ελλάδα ¹	Κύπρος ²	Τουρκία ³	Βουλγαρία ⁴	Αίγυπτος ⁵	Ιταλία ⁶
	Δι- και τριτερπένια						
1	isopimaric acid	0.79-7.63	1.18 - 4.16	11.17 - 26.88			53.2 διτερπενικά οξέα
2	dehydroabietic acid	0.74 - 3.45	0.01-2.85	10.61		0.14 – 1.09	
3	abietic acid	0.03 - 32.59	0.64 - 1.73	11.39		1.0	
4	isopimaric acid (ή glutaconic acid tms (2-pentenedioic acid)	1.00 - 27.99	0.88 - 5.81				
5	α-amyrin (93% wiley)	2.04 - 3.58	-			0.2 – 0.3	
	Φλαβονοειδή						
6	Pinocembrin	4.01 - 18.03	0.66 - 3.41		9.44	6.06	0.2-0.3
7	Pinobanksin (bankova)	0.40 - 6.81	0.53			0.3 – 0.8	-
8	Pinobanksin-3-O-acetate (bankova)	0.48 - 8.97	0.77 - 1.92	3.85-11.0	11.23	1.16	0.4-0.5
9	Galangin	0.36 – 1.92	3.05			0.4	0.2-0.3
10	Naringenin	0.58 - 2.64	0.41 - 1.04	1.57 – 2.51			
11	Acacetine	0.24 - 1.84	1.31				
12	Chrysin	0.50-4.50	0.63-1.35	2.22 - 3.85	2.22		0.5
13	Pinobanksin 3-	1.18-	1.26-	1.36 -	9.55		

	Συστατικό	Ελλάδα ¹	Κύπρος ²	Τουρκία ³	Βουλγαρία ⁴	Αίγυπτος ⁵	Ιταλία ⁶
	butanoate	3.17	1.49	9.85			
Ανθρακινόνες							
14	1,6-dihydroxy-3-methylanthraquinone	1.88 - 12.55	0.79				
15	1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone (Chrysophanol)	1.49 - 11.42	2.39	15.15 - 20.82			
Πολυφαινόλες και άλλα							
16	1,2,5-pentanetriol (45%)	1.38 - 18.57	0.72- 3.03				
17	p-phenylazodiphenylamine	0.33 - 5.32	-				
18	cinnamic acid ester	-	0.27- 7.46				
19	Apigenine	0.2 - 1.61	0.4				
20	p-coumaric acid	0.54- 2.95	0.61	0.41 - 0.60	0.60		
21	Caffeic acid	0.20- 1.56		2.61 - 6.87			

1: Δείγματα από Μεσσηνία, Μεγαλόπολη, Καλάβρυτα, Καρδίτσα, Ρέθυμνο, Σκόπελο, Τήνο. Παρούσα εργασία.

2: Δείγματα από Λάρνακα, Κύπρος. Παρούσα εργασία

3: Kartal *et al.*, 2002; Silici & Kutluca 2005

4: El Hady & Hegazi, 2002

5: Bankova *et al.*, 2002

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν, μέσω της συγκριτικής παράθεσης των κύριων συστατικών που περιέχονται σε δείγματα πρόπολης από τη Μεσόγειο είναι ότι στις εύκρατες περιοχές όπου υπάρχει σημαντική παρουσία των διαφόρων ειδών λεύκας (*Populus*), όπως είναι η Βουλγαρία και η Αίγυπτος, οι φαινολικές ενώσεις πινοσεμπρίνη, χρυσίνη, πινομπανκσίνη και ο 3-O αιθυλεστέρας της, γκαλανγκίνη, τετροχρυσίνη και εστέρες του καφεϊκού και φερουλικού οξέος που υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στα εκκρίματα των οφθαλμών της λεύκας, συσσωρεύονται επίσης στην πρόπολη και στα αντίστοιχα μέλια (Tomas-Barberan *et al.*, 1993a ; Bankova *et al.*, 2002).

Αντίθετα σε περιοχές όπου οι λεύκες σπανίζουν ή απουσιάζουν, όπως σε τροπικές, υποτροπικές και πολύ άνυδρες περιοχές, οι μέλισσες αναζητούν άλλες πηγές ρετσινιού για να το ενσωματώσουν στην πρόπολη και -έμμεσα- στο μέλι.

Σε περιοχές όπου υπάρχουν πολλά πεύκα (*Pinus*) θα μπορούσαμε να περιμένουμε εμπλουτισμό της πρόπολης σε τερπενικά οξέα όπως πιμαρικό, ισοπιμαρικό, αβιετικό, δίδρο-αβιετικό που είναι γνωστά ότι υπάρχουν σε ρετσίνια πεύκων (Joye & Lawrence, 1967).

Τα δείγματα πρόπολης από την Ελλάδα και την Κύπρο φαίνεται να έχουν μικτή βοτανική προέλευση, από πεύκα και λεύκες, αφού περιέχουν τόσο τις χαρακτηριστικές πολυφαινόλες που εκκρίνονται από τους οφθαλμούς της λεύκας, όσο και τα χαρακτηριστικά τερπενικά οξέα του ρετσινιού του πεύκου. Όλα τα συστατικά που ποσοτικοποιήθηκαν από τα δείγματα εκδηλώνουν ισχυρές βιολογικές δράσεις.

Επιπρόσθετα φαίνεται ότι σε περιπτώσεις που δεν είναι διαθέσιμο για τις μέλισσες κάποιο κατάλληλο ρητινούχο φυτό σε λογική απόσταση από την κυψέλη, οι μέλισσες μπορεί να επιλέξουν άλλες εναλλακτικές πηγές όπως η πίσσα οδοποιίας (Τήνος, προσωπική επικοινωνία αλλά και Martos *et al.*, 1997), οι οποίες ενσωματώνονται στην πρόπολη και τον μελισσοκηρό. Αυτό είναι ενδιαφέρον επειδή έχει αποδειχθεί ότι οι μέλισσες έχουν τη δυνατότητα να ανακαλύπτουν στο περιβάλλον τους και να χρησιμοποιούν ως πηγή πρόπολης τις καλύτερες δυνατές ουσίες για να προστατεύσουν τις κυψέλες τους από τις βακτηριακές και μυκητιασικές προσβολές.

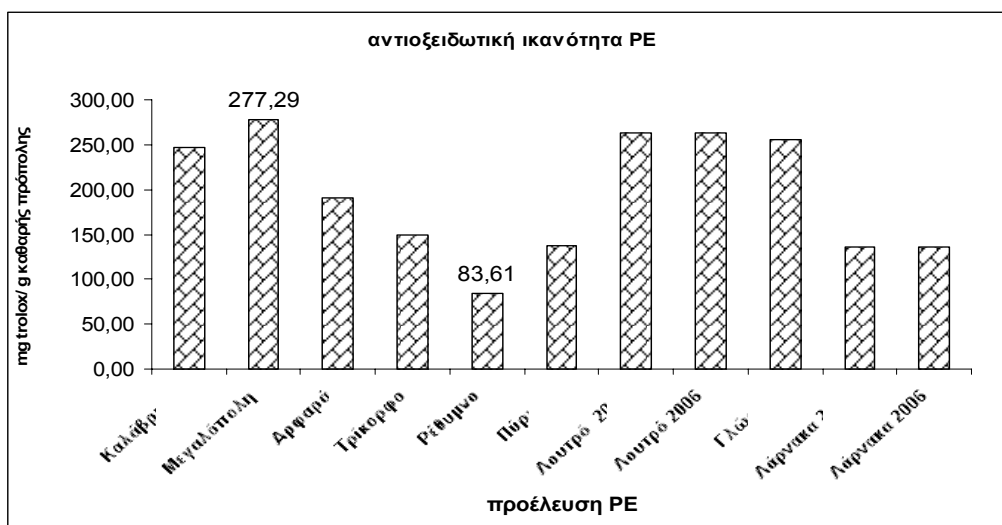
Z. 5. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού συνολικού φαινολικού περιεχομένου, αντιοξειδωτικής δράσης και αναγωγικής δύναμης των PE

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης κυμάνθηκε από 80 έως 339 mg CAE/g καθαρής πρόπολης ανάλογα με την προέλευση. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσίασε το δείγμα πρόπολης από την Πελοπόννησο (Μεγαλόπολη) και ακολούθησαν τα δείγματα από την Καρδίτσα (Λουτρό), ενώ τη μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασε το δείγμα πρόπολης από την Κρήτη (Ρέθυμνο). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα **ΣΤ. 3**.



Σχήμα Ζ. 6. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocaltaeu

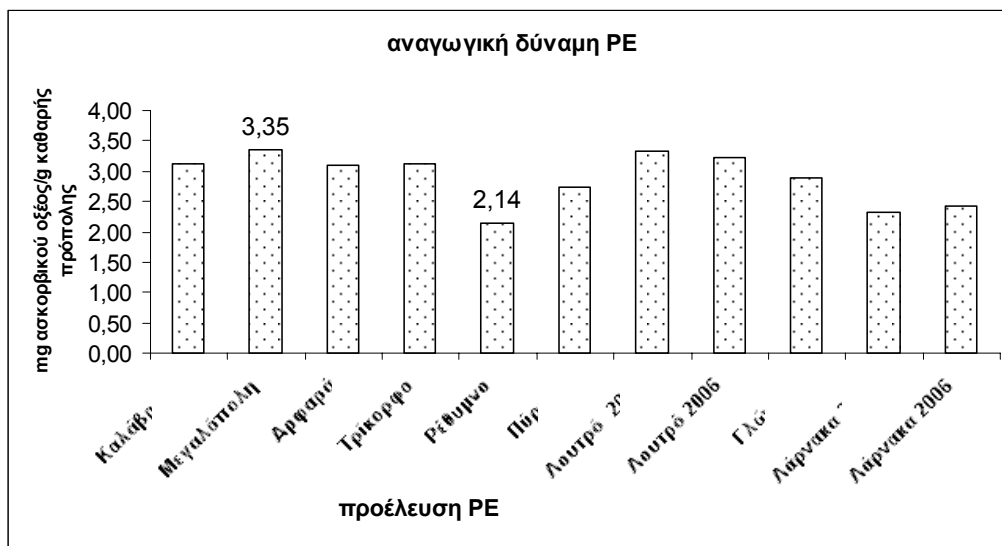
Η αντιοξειδωτική ικανότητα, των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης κυμάνθηκε από 84 έως 277 mg ισοδυνάμων Trolox /g καθαρής πρόπολης, ανάλογα με την προέλευση. Το δείγμα πρόπολης από την Πελοπόννησο (Μεγαλόπολη) παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ακολούθησαν τα δείγματα από την Τήνο (Πύργος), και την Σκόπελο (Γλώσσα), ενώ τη μικρότερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, παρουσίασε το δείγμα πρόπολης από την Κρήτη (Ρέθυμνο). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα **ΣΤ. 10**.



Πίνακας Ζ. 7. Αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Τα αποτελέσματα υπολογισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας για το δείγμα πρόπολης από την Πελοπόννησο (Μεγαλόπολη), το οποίο παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς επίσης και για το δείγμα πρόπολης από την Κρήτη (Ρέθυμνο), το οποίο επέδειξε τη μικρότερη αντιοξειδωτική δύναμη, ήταν σε αντιστοιχία με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Η αναγωγική δύναμη των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης κυμάνθηκε από 2,14 έως 3,35 mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος /g καθαρής πρόπολης, ανάλογα με την προέλευση. Το δείγμα πρόπολης από την Πελοπόννησο (Μεγαλόπολη) παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη και ακολούθησαν τα δείγματα από την Καρδίτσα (Λουτρό), ενώ τη μικρότερη ικανότητα αναγωγής του Fe^{3+} , παρουσίασε το δείγμα πρόπολης από την Κρήτη (Ρέθυμνο). Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης παρατίθενται στον πίνακα **ΣΤ. 14**.



Πίνακας Ζ. 8. Αναγωγική δύναμη των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, με τη μέθοδο αναγωγής του Fe^{3+}

Τα αποτελέσματα υπολογισμού της αναγωγικής δύναμης για το δείγμα πρόπολης από την Πελοπόννησο (Μεγαλόπολη), το οποίο παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη, καθώς επίσης και για το δείγμα πρόπολης από την Κρήτη (Ρέθυμνο), το οποίο επέδειξε τη μικρότερη αναγωγική δύναμη, ήταν σε αντιστοιχία με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu και την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Τα κύρια συστατικά που περιέχονται στο PE από τη Μεγαλόπολη, το οποίο είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις, εκδήλωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και αναγωγική δύναμη και ταυτοποιήθηκαν μέσω GC-MS, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων ήταν: η χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη, ο 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, η πινομπανκσίνη, η απιγενίνη, το κινναμικό οξύ, το ισοπιμαρικό οξύ, η καμφορόλη, το φερρουλικό οξύ και το αβιετικό οξύ. Ενώ τα κύρια συστατικά που περιέχονται στο PE από το Ρέθυμνο, το οποίο εκδήλωσε τη μικρότερη αντιοξειδωτική και αναγωγική δύναμη και ταυτοποιήθηκαν μέσω GC-MS, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων ήταν: το ισοπιμαρικό οξύ, η πινοσεμπρίνη, το αβιετικό οξύ, το δινδροαβιετικό οξύ, ο 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, το ολεανολικό οξύ και η

πινομπανκσίνη. Στο δείγμα από το Ρέθυμνο δηλαδή, υπερτερούν τα τερπενικά οξέα σε σχέση με τις ήδη μειωμένες συγκεντρώσεις των πολυφαινόλων που προσδιορίζονται.

Z. 5. 1. Συσχέτιση αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων με την ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC-MS)

Στον πίνακα **Z. 2.** παρουσιάζονται οι συντελεστές συσχέτισης (r) μεταξύ των μεθόδων που μελετήθηκαν, ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός συσχετίσεων.

Πίνακας Z. 2. Συντελεστές συσχέτισης (r) μεταξύ των μεθόδων

	<i>FC</i>	<i>DPPH</i>	<i>RP</i>	<i>PP</i>
FC	1			
DPPH	0,630	1		
RP	0,827	0,678	1	
PP	0,940	0,555	0,923	1

FC: μέθοδος Folin-Ciocalteu

DPPH: μέθοδος δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH

RP: μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

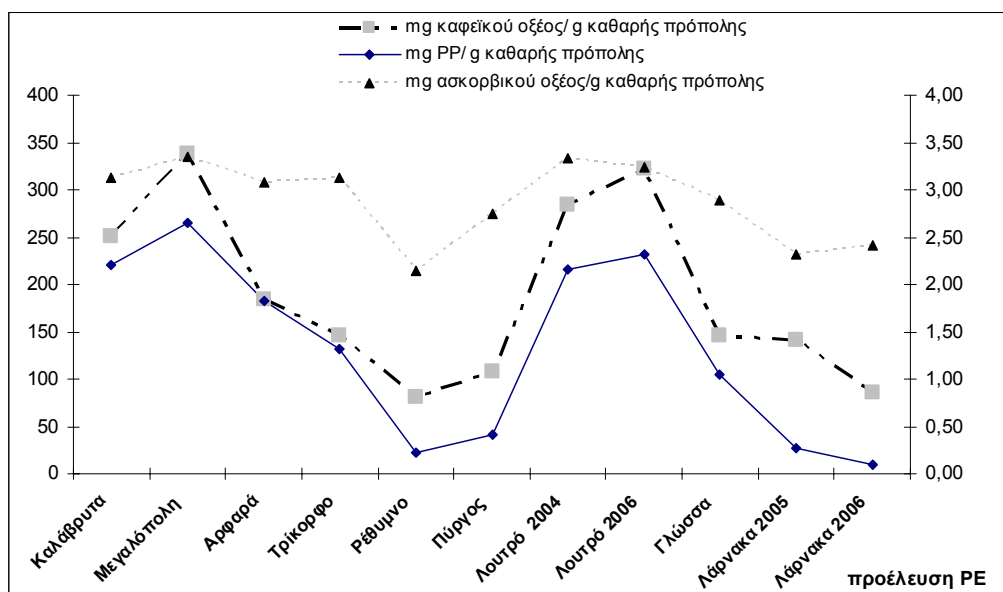
PP: ποσοτικός προσδιορισμός επιμέρους συστατικών με αέρια χρωματογραφία (GC-MS)

Με στατιστική βεβαιότητα 99,9% ($p < 0,001$), οι σημαντικότερες συσχετίσεις εντοπίστηκαν μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου GC-MS με αυτά της μεθόδου Folin-Ciocalteu και της μεθόδου προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης, με συντελεστή συσχέτισης $r = 0,94$ και $r = 0,923$, αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις εντοπίστηκαν και μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου Folin-Ciocalteu με αυτά των μεθόδων προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης και αντιοξειδωτικής ικανότητας σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,01$ και $p < 0,05$ αντίστοιχα, καθώς και με τα αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και αναγωγικής δύναμης σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Παρόλα αυτά, φαίνεται να μην υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων GC-MS και αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στο σχήμα **Z. 9.** παρουσιάζεται η

Deleted: καθώς επίσης

Deleted: μεταξύ

διακύμανση των ολικών πολυφαινολών των ΡΕ από τις διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου, όπως προσδιορίστηκαν ποσοτικά μέσω της μεθόδου GC-MS, σε σχέση με τη διακύμανσή τους, όπως προσδιορίστηκε με τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους Folin-Ciocalteu και αναγωγικής δύναμης.



Σχήμα Ζ. 9. Διακύμανση ολικών πολυφαινολών των ΡΕ, όπως προσδιορίστηκαν μέσω των μεθόδων GC-MS, Folin-Ciocalteu και αναγωγικής δύναμης

Z. 6. Επιβεβαίωση της μικροενθυλάκωσης του εκχυλίσματος πρόπολης (PE) στη β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο- β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο

Η πιστοποίηση του ποιοτικού εγκλεισμού της πρόπολης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), καθώς ο καθαρισμός της ακατέργαστης πρόπολης (προς απομάκρυνση κηρών), περιλαμβάνει την παρασκευή αιθανολικού εκχυλίσματος και επίσης μετά από εξάτμιση του διαλύτη παραλαμβάνεται μια κολλώδης πυκνόρρευστη μάζα, η οποία είναι δύσκολη στο χειρισμό και εμφανίζει ποικίλα σημεία τήξης. Ακόμη, επιβεβαίωση του εγκλεισμού με άλλες μεθόδους, όπως με τη χρήση της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), που παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ακριβή δομή και στοιχειομετρία του συμπλόκου, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί εξαιτίας της πολύπλοκης χημικής σύστασης της πρόπολης. Οπότε για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν:

1. ως έμμεση μέθοδος επιβεβαίωσης του σχηματισμού των συμπλόκων, η μέθοδος DSC σε συνθήκες οξείδωσης, αν και όπως αναφέρθηκε η πρόπολη αποτελεί μια πολύ σταθερή ουσία ως έχει, επομένως η μικροενθυλάκωσή της στις παραπάνω υδρόφιλες ενώσεις μπορεί να μην έχει ως αποτέλεσμα περαιτέρω αύξηση της σταθερότητάς της **-Μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων πρόπολης-**
2. η μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (Καλάβρυτα) σε β-κυκλοδεξτρίνη με τη χρήση υπερήχων μέσω ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών που εγκλείονται, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. **-Επιλεκτική απομόνωση φαινολικών συστατικών-**
3. η μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (Καλάβρυτα) σε τροποποιημένο άμυλο (Σ 2), με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. **-Επιβεβαίωση εγκλεισμού πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο-**
4. η παρασκευή συμπλόκων αβιετικού οξέος, καμφορόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης, χρυσίνης και απιγενίνης, που αποτελούν συστατικά που περιέχονται στο αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης, με τροποποιημένο άμυλο και β-κυκλοδεξτρίνη και η επιβεβαίωση του σχηματισμού τους με τη χρήση της με

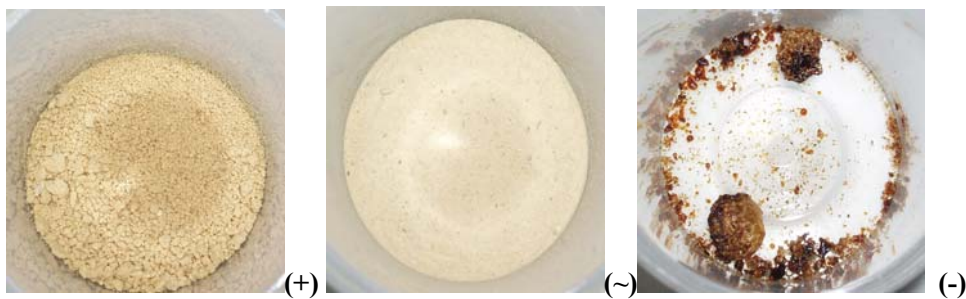
DSC, με διαβίβαση αερίου αζώτου. **-Μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων με β-κυκλοδεξτρίνη-**

5. η μελέτη διαλυτότητας της πρόπολης. **-Έμμεση απόδειξη εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνη-**

Z. 6. 1.Μακροσκοπική εικόνα των συμπλόκων πρόπολης με β- κυκλοδεξτρίνη, τροποποιημένο άμυλο, υδρόξυ- πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και ζελατίνη.

Η μακροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων των συμπλόκων εγκλεισμού της πρόπολης (είτε ως αιθανολικό εκχύλισμα, είτε μετά από εξάτμιση του διαλύτη), μπορεί να παρέχει τις πρώτες ενδείξεις που αφορούν στην επίτευξη εγκλεισμού. Για τον μακροσκοπικό έλεγχο της επιτυχίας του εγκλεισμού, τα σύμπλοκα, ανάλογα με την εικόνα που εμφάνιζαν χαρακτηρίστηκαν με τις ακόλουθες σημάνσεις: **ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού (+), αβεβαιότητα (~) και ένδειξη μη-επιτυχούς εγκλεισμού (-)**. Τα χαρακτηριστικά που ελήφθησαν υπόψη για την κατηγοριοποίηση σε **ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού** ήταν:

- Η ομοιόμορφη χρωματική απόχρωση και κατανομή της λυοφυλιωμένης σκόνης
- Η απουσία υπολειμμάτων πρόπολης (κόκκοι).



Από τον **Πίνακα Ε. 5. 1.** (Παρασκευή σύμπλοκων PE με τροποποιημένο άμυλο), τα σύμπλοκα Σ 1, Σ 2, Σ 3, Σ 4, Σ 5, Σ 6, Σ 7, Σ 8, Σ 9, Σ 10, Σ 11, Σ 12, Σ 19, Σ 25, Σ 28, Σ 29, ικανοποιούσαν τις προϋποθέσεις για την κατηγοριοποίηση σε **+ (ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού)**.

Από τον **Πίνακα Ε. 5. 2.** (Παρασκευή σύμπλοκων PE με β -CD), τα σύμπλοκα Σ 30, Σ 31, Σ 32 ικανοποιούσαν τις προϋποθέσεις για την κατηγοριοποίηση σε **+** (**ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού**).

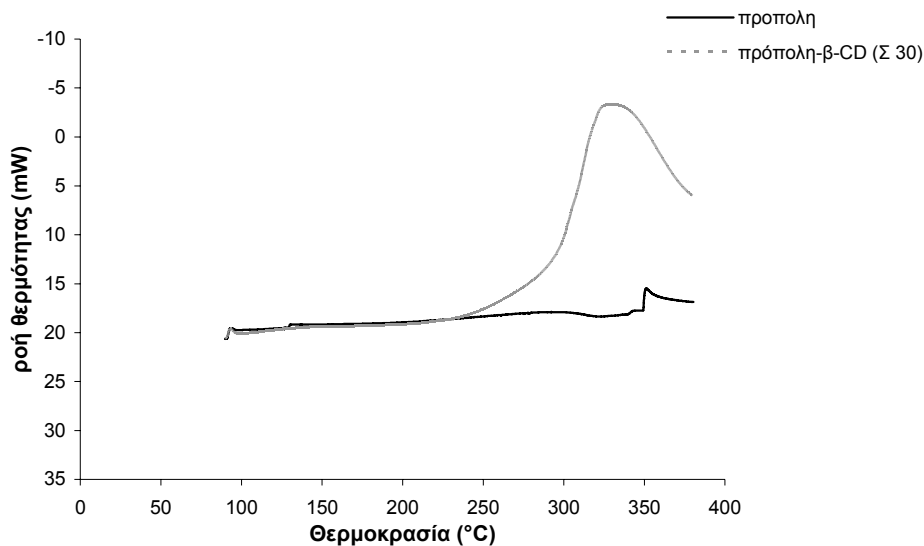
Από τον **Πίνακα Ε. 5. 3.** (Παρασκευή σύμπλοκων PE με υδρόξυ- πρότυλο- β -CD), τα σύμπλοκα Σ 40, Σ 41, Σ 42, ικανοποιούσαν τις προϋποθέσεις για την κατηγοριοποίηση σε **+** (**ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού**).

Από τον **Πίνακα Ε. 5. 4.** (Παρασκευή σύμπλοκων PE με ζελατίνη), όλα τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν, παρουσίαζαν την ίδια εικόνα, με ομοιόμορφο χρώμα και κατανομή του αιθανολικού εκχυλίσματος στο μέσο εγκλεισμού, το οποίο θεωρείται αναμενόμενο, αφού η ζελατίνη χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία, ως μέσο μικροενθυλάκωσης κατά την παρασκευή μικροσφαιριδίων ζελατίνης με πρόπολη, οπότε κατηγοριοποιείται ως **ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού (+)**.

Z. 6. 2. Μελέτη της σταθερότητας της πρόπολης

Z. 6. 2. 1. Μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων πρόπολης με τροποποιημένο άμυλο, β -κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ- πρότυλο- β -κυκλοδεξτρίνη, με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου DSC.

Στο Σχήμα **Z. 10.** παρατίθενται συγκριτικά τα διαγράμματα οξείδωσης καθαρής πρόπολης (μετά από εξάτμιση του διαλύτη από το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από Καλάβρυτα), καθώς και του συμπλόκου (Σ 30) πρόπολης / β -κυκλοδεξτρίνης (θέρμανση από 90°C – 380 °C με ρυθμό 10°C/min). Η ελεύθερη πρόπολη είναι περισσότερο σταθερή μέχρι τους 350 °C από ότι η συμπλοκοποιημένη της μορφή, ενώ όταν βρίσκεται εγκλεισμένη σε β -κυκλοδεξτρίνη, εμφανίζεται εξώθερμη απορρόφηση στους 248,17 °C λόγω αποικοδόμησης των μορίων της β -κυκλοδεξτρίνης.



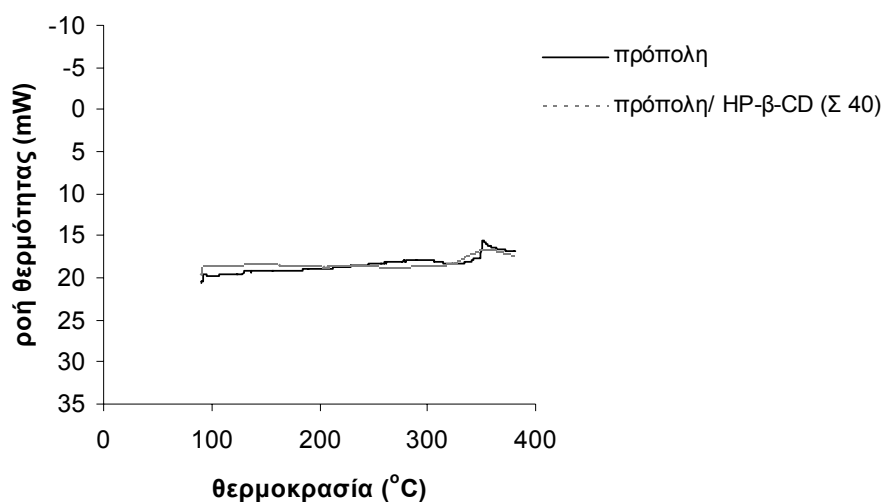
Σχήμα Ζ. 10. Καμπύλες οξείδωσης πρόπολης και συμπλόκου πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης (10 mL H₂O, 0,185 g β-κυκλοδεξτρίνης, 0,185 mL PE)

Από τη μελέτη της σταθερότητας ελεύθερης και εγκλεισμένης πρόπολης συμπεραίνεται ότι ο εγκλεισμός με τη χρησιμοποίηση β-κυκλοδεξτρίνης, δεν προσφέρει επιπρόσθετη προστασία στην οξείδωση. Παρόλα αυτά, ο εγκλεισμός εκχυλίσματος με β-κυκλοδεξτρίνη δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκλεκτική απομόνωση συγκεκριμένων συστατικών που περιέχονται στο αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης καθώς και για την αύξηση της διαλυτότητας των συστατικών της πρόπολης.

Για τους παραπάνω λόγους, ελέγχεται η σταθερότητα των συμπλόκων πρόπολης με άλλα δυο μέσα εγκλεισμού, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο.

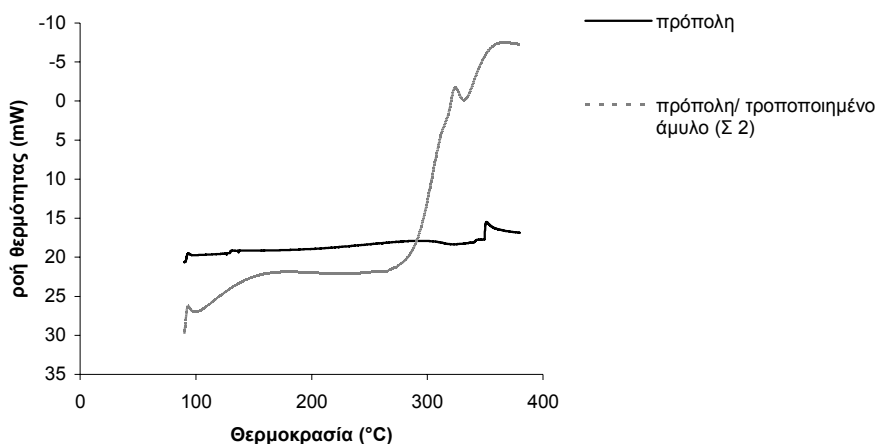
Στο Σχήμα **Ζ. 11.** παρατίθενται συγκριτικά τα διαγράμματα οξείδωσης καθαρής πρόπολης (μετά από εξάτμιση του διαλύτη από το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από Καλάβρυτα), καθώς και του συμπλόκου (Σ 40) πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (θέρμανση από 90°C – 380 °C με ρυθμό 10°C /min). Με τη χρήση της υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (παράγωγο κυκλοδεξτρίνης), αναφέρεται ότι επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα (Connors, 1997).

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του σχήματος η πρόπολη είναι σταθερή στην οξείδωση είτε σε ελεύθερη μορφή είτε βρίσκεται με τη μορφή συμπλόκου, μέχρι την θερμοκρασία των 230,83 °C. Από τους 230,83 °C μέχρι τους 331,17 °C, φαίνεται ότι η υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να παρέχει, στην ήδη σταθερή πρόπολη, επιπρόσθετη προστασία. Ακολούθως τόσο η ελεύθερη πρόπολη, όσο και η υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη εμφανίζουν εξώθερμες απορροφήσεις που αντιστοιχούν στην οξείδωση των συστατικών τους.



Σχήμα Ζ. 11. Καμπύλες οξείδωσης πρόπολης και συμπλόκου πρόπολης/υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (10 mL H₂O, 0,185 g υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, 0,185 mL PE)

Στο Σχήμα Ζ. 12. παρατίθενται συγκριτικά τα διαγράμματα οξείδωσης καθαρής πρόπολης (μετά από εξάτμιση του διαλύτη από το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από Καλάβρυτα), καθώς και του συμπλόκου (Σ 2) πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (θέρμανση από 90 °C – 380 °C με ρυθμό 10°C /min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του σχήματος τόσο η ελεύθερη πρόπολη, όσο και το σύμπλοκο της με τροποποιημένο άμυλο, είναι σταθερά στην οξείδωση μέχρι την θερμοκρασία των 271,5 °C. Στη θερμοκρασία αυτή εμφανίζεται η εξώθερμη απορρόφηση του συμπλόκου λόγω οξείδωσης και αποικοδόμησης των μορίων του τροποποιημένου αμύλου.



Σχήμα Ζ. 12. Καμπύλες οξείδωσης πρόπολης και συμπλόκου πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (50 mL H₂O, 10 g τροποποιημένου αμύλου, 0,5 g πρόπολης μετά από εξάτμιση του διαλύτη από PE)

Μέσω της σύγκρισης των διαγραμμάτων όπου παρουσιάζεται η μελέτη σταθερότητας της πρόπολης και των συμπλόκων εγκλεισμού της σε συνθήκες οξείδωσης, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρόπολη αποτελεί μια πολύ σταθερή ουσία ως έχει, επομένως η μικροενθυλάκωσή της στις παραπάνω υδρόφιλες ενώσεις δεν έχει ως αποτέλεσμα περαιτέρω αύξηση της σταθερότητάς της. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι το αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού για την πρόπολη, είναι η υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη η οποία μπορεί να παρέχει επιπρόσθετη προστασία σε υψηλές θερμοκρασίες (230 -330 °C). Όταν η πρόπολη προορίζεται για την αντικατάσταση συνθετικών συντηρητικών που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή τροφίμων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ενθυλακωμένη μορφή της με το επιπρόσθετο πλεονέκτημα της υδατοδιαλυτότητας, της απόσμισης και της μεγαλύτερης σταθερότητας.

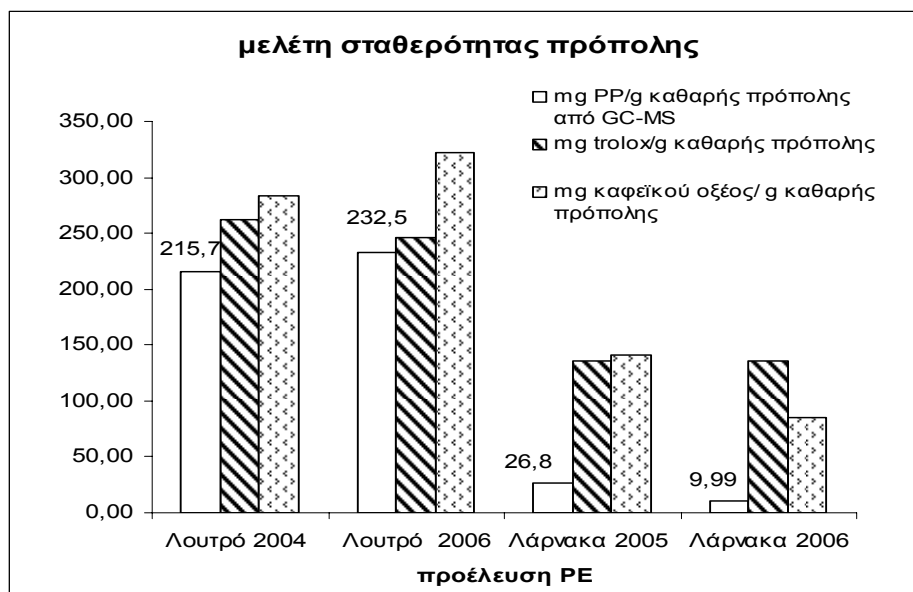
Ζ. 6. 2. 2. Μελέτη σταθερότητας της ακατέργαστης πρόπολης στο χρόνο

Λαμβάνοντας υπόψη (α) την πολύπλοκη χημική σύσταση της πρόπολης, η οποία περιέχει δεκάδες βιοδραστικά συστατικά, κυρίως πολυφαινόλες και (β) τα αποτελέσματα

από τη μελέτη οξειδωσής της, που επιβεβαιώνουν την σταθερότητά της ακόμα και σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, ο επόμενος στόχος ήταν ο έλεγχος της σταθερότητας της ακατέργαστης πρόπολης εις βάθος χρόνου.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν δυο δείγματα ακατέργαστης πρόπολης από την Καρδίτσα και την Κύπρο, τα οποία συλλέχθηκαν το 2004 και το 2005 αντίστοιχα και μελετήθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε επιμέρους και ολικές πολυφαινόλες με τις μεθόδους αέριας χρωματογραφίας, και Folin-Ciocalteu και ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα που επιδεικνύουν με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα από τις προαναφερόμενες μεθόδους παρατίθενται συγκριτικά με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προσδιορίστηκαν μέσω της μελέτης των δειγμάτων ακατέργαστης πρόπολης από την Καρδίτσα και την Κύπρο, τα οποία συλλέχθηκαν το 2006. Ο καθαρισμός των δειγμάτων και η παρασκευή αιθανολικών εκχυλισμάτων έγινε το 2007 στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Πρέπει να σημειωθεί ότι και στις δυο περιπτώσεις (Καρδίτσα, Κύπρος), τα δείγματα ελήφθησαν από τους ίδιους μελισσοπαραγωγούς και αντιπροσώπευαν την ίδια εποχή.



Σχήμα Ζ. 13. Συγκριτική παράθεση αντιοξειδωτικών και πολυφαινολικών συστατικών που περιέχονται σε δείγματα που συλλέχθηκαν σε 2 διαφορετικές χρονικές περιόδους από τις ίδιες περιοχές.

Από το σχήμα **Z. 13.** προκύπτει καταρχήν ότι τα αποτελέσματα από τις 3 μεθόδους προσδιορισμού βρίσκονταν σε συμφωνία για τα 4 αιθανολικά εκχυλίσματα (PE). Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες, όπως προκύπτει από τον ποσοτικό προσδιορισμό GC-MS και από την μέθοδο Folin- Ciocaltaeu παρουσίαζε το PE από τα Λουτρό με χρονολογία συλλογής 2006, και αμέσως μετά ακολούθησε το δείγμα από την ίδια περιοχή με χρονολογία συλλογής 2004. Τα δύο αυτά PE εκδήλωναν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα, τη μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα PE. Επίσης το PE από την Λάρνακα με χρονολογία συλλογής 2005, παρουσίαζε μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από ότι το πιο πρόσφατο δείγμα.

Τα αποτελέσματα αυτά, δεν είναι αναμενόμενα αφού στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι, η πρόπολη για να θεωρείται χρήσιμη και καλής ποιότητας, θα πρέπει να είναι φρέσκια, όχι μεγαλύτερη από 2 έτη (Januzzi, 1993). Η πρόταση αυτή μάλλον στηρίζεται σε εμπειρική εκτίμηση, αφού μέσω του ελέγχου της ποιότητας της πρόπολης με τις προαναφερόμενες μεθόδους, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από την στιγμή της συλλογής της και αφού ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την συντήρηση και αποθήκευση των ακατέργαστων δειγμάτων (αεροστεγή δοχεία στο σκοτάδι σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C-12°C, μακριά από πηγές θερμότητας), η παρέλευση του χρόνου, μέχρι τουλάχιστον 3 χρόνια, όταν μελετήθηκαν τα αναφερόμενα δείγματα, δεν προκάλεσε μείωση στην περιεκτικότητα της πρόπολης σε πολυφαινόλες, οπότε δεν είχε ως αποτέλεσμα υποβάθμιση της ποιότητας του ακατέργαστου δείγματος.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η ενεργότητα νερού (a_w) της ακατέργαστης πρόπολης ήταν 0,46, οπότε μπορεί να διατηρηθεί αναλλοίωτη για μεγάλο χρονικό διάστημα, με βάση τις συνθήκες που έχουν ήδη αναφερθεί.

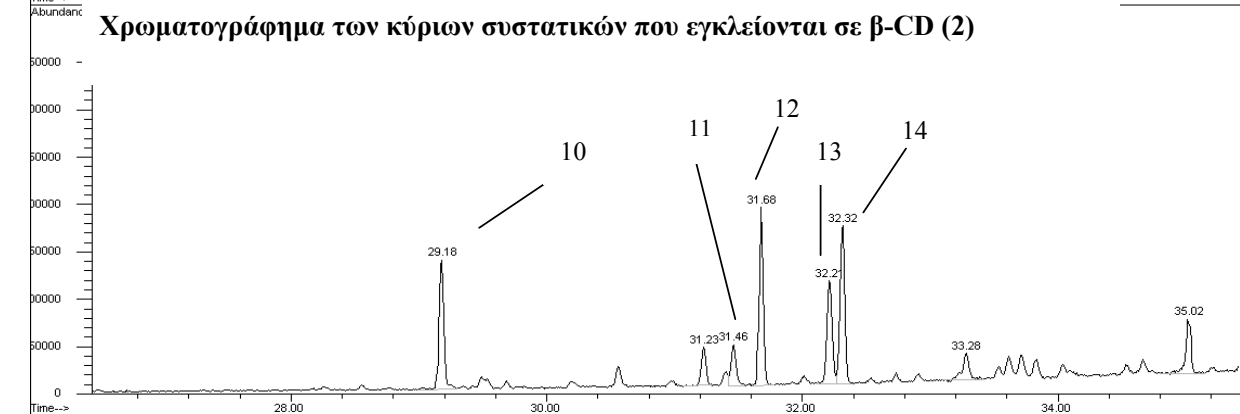
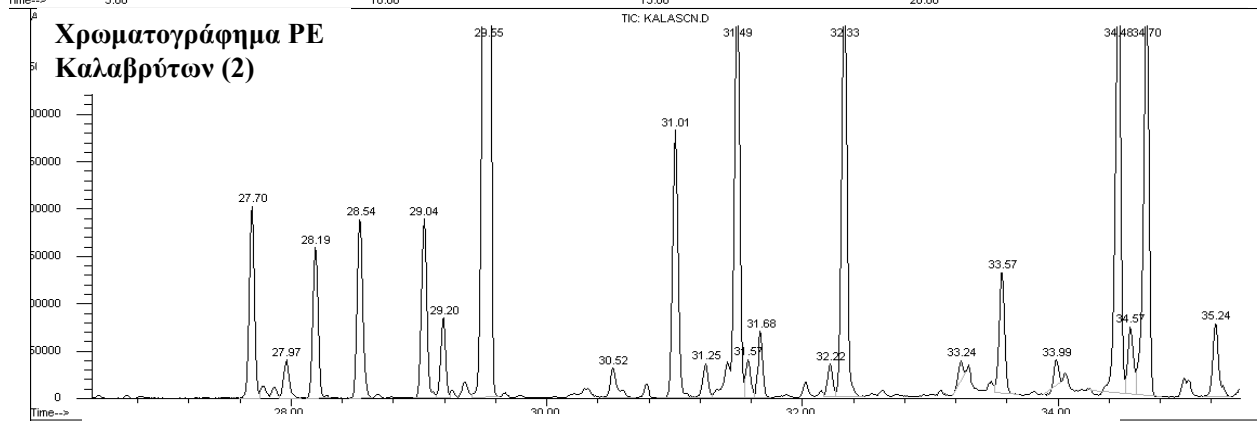
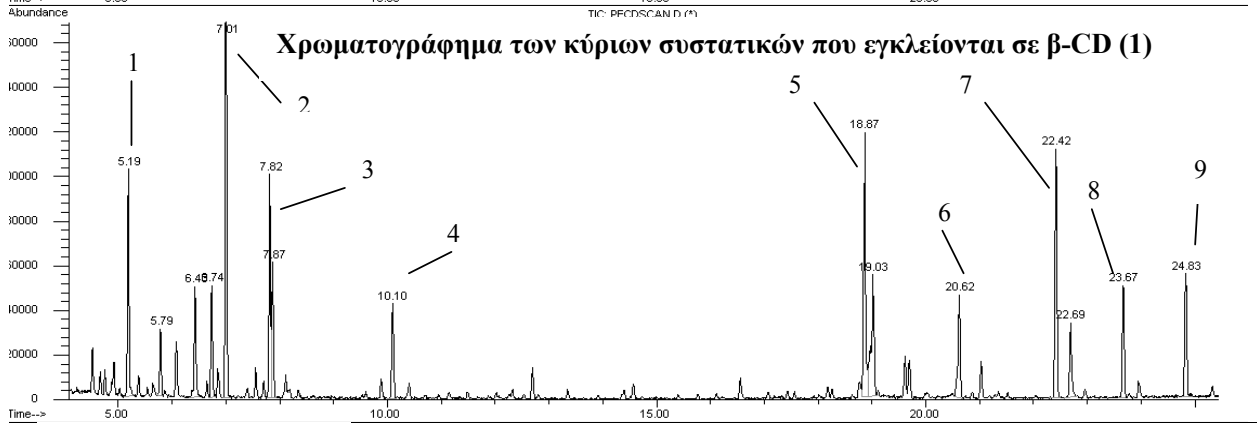
Z. 6. 3. Μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος (PE) πρόπολης (Καλάβρυτα) σε β- κυκλοδεξτρίνη με τη χρήση υπερήχων - Επιλεκτική απομόνωση φαινολικών συστατικών

Έχει ήδη αναφερθεί η πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τη χημική σύσταση της πρόπολης, από την οποία έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 200 συστατικά. Φαίνεται ότι τα σημαντικότερα συστατικά της πρόπολης είναι οι φαινολικές ενώσεις που

αποτελούν περίπου το 50% της σύστασής της. Παρόλα αυτά η απομόνωση βιοδραστικών συστατικών από την πρόπολη είναι μια δύσκολη διαδικασία.

Μέσω της χρησιμοποίησης της β-κυκλοδεξτρίνης ως μέσο εγκλεισμού, επιτεύχθηκε ο εκλεκτικός διαχωρισμός των αρωματικών ενώσεων που περιέχονται σε δείγμα πρόπολης, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με μελέτες εγκλεισμού φαρμακευτικών μορίων, που απέδειξαν ότι η β-κυκλοδεξτρίνη προσφέρει ιδανικό περιβάλλον για τη δέσμευση φαινολικών δακτυλίων. Η μέθοδος περιλαμβάνει προσθήκη δείγματος πρόπολης σε υδατικό διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης και ανάμιξη με τη χρησιμοποίηση υπερήχων (εκτενής πειραματική πορεία αναφέρεται στο τμήμα **E. 6.**).

Στα χρωματογραφήματα ολικών ιόντων που παρατίθενται στη συνέχεια παρουσιάζονται τα κυριότερα συστατικά της πρόπολης που εγκλείονται στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, σε σύγκριση με τα κυριότερα συστατικά που περιέχονται στο αρχικό αιθανολικό διάλυμα πρόπολης (Καλάβρυτα), το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του συμπλόκου, όπως αυτά προσδιορίστηκαν μέσω της αέριας χρωματογραφίας. Η κατανομή των επιμέρους φαινολικών ενώσεων που εγκλείονται στη β-κυκλοδεξτρίνη, παρουσιάζονται στον πίνακα **ΣΤ. 18**.



Οι αριθμοί που αναγράφονται στα χρωματογραφήματα των κύριων συστατικών της πρόπολης που εγκλείονται στη β-κυκλοδεξτρίνη (1) και (2), αντιστοιχούν στα:

- 1: βενζοϊκός αιθυλ-εστέρας
- 2: γλυκερίνη
- 3: θυμόλη
- 4: φαίνυλ-προπανόλη
- 5: D-φρουκτόζη
- 6: γλυκοπυρανόζη
- 7: D-γλυκόζη
- 8: φερουλικό οξύ
- 9: καφεϊκό οξύ
- 10: p-κουμαρικό οξύ
- 11: πινοσεμπρίνη
- 12: 7,8-διμέθυλ-βένζο(b)νάφθο(2,3-d)θειοφαίνιο
- 13: ισοπιμαρικό οξύ
- 14: πινομπανκσίνη

Η ανάλυση του συμπλόκου πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης με αέρια χρωματογραφία, οδήγησε στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 22 συστατικών (SIM). Οι σημαντικότερες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων ήταν: το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το κινναμικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το πρωτοκατεχονικό οξύ και η χρυσίνη, ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις εντοπίζεται και το ολεανολικό οξύ. Επίσης, τα σημαντικότερα συστατικά που προσδιορίστηκαν (SCAN), παρατίθενται στον πίνακα **ΣΤ. 19**, ως % ποσοστιαία περιεκτικότητα στο σύμπλοκο.

Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολών του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης από τα Καλάβρυτα (πίνακας ΣΤ. 2) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συμπλόκου, μέσω της ανάλυσης της αέριας χρωματογραφίας (SIM) και της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις που βρέθηκε ότι περιείχε το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/β-κυκλοδεξτρίνης (πίνακας ΣΤ. 18), εκτιμήθηκε η % απόδοση του εγκλεισμού. Οι υπολογισμοί που έγιναν ήταν:

Ολική περιεκτικότητα ταυτοποιημένων συστατικών PE Καλαβρύτων: 127,29 mg/g καθαρής πρόπολης (Α)

Ολική περιεκτικότητα ταυτοποιημένων συστατικών συμπλόκου: 1,74 mg/g καθαρής πρόπολης (Β)

% απόδοση εγκλεισμού: $(B/A) \cdot 100$

Η εκτίμηση της % απόδοσης του εγκλεισμού πρόπολης σε β-κυκλοδεξτρίνη, με βάση την μέθοδο παρασκευής του συμπλόκου (**Ε. 1. 6.**), είναι 1,36 %.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβεβαιώνεται η επίτευξη εγκλεισμού της πρόπολης στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης καθώς και η επιλεκτική απομόνωση των φαινολικών συστατικών. Η μικροενθυλάκωση της πρόπολης στην δομή της β-κυκλοδεξτρίνης, εξασφαλίζει την απομάκρυνση των συστατικών που δεν εκδηλώνουν λειτουργικές ιδιότητες.

Ζ. 6. 4. Μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (Καλάβρυτα) σε τροποποιημένο άμυλο (Σ 2) –Επιβεβαίωση εγκλεισμού πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο

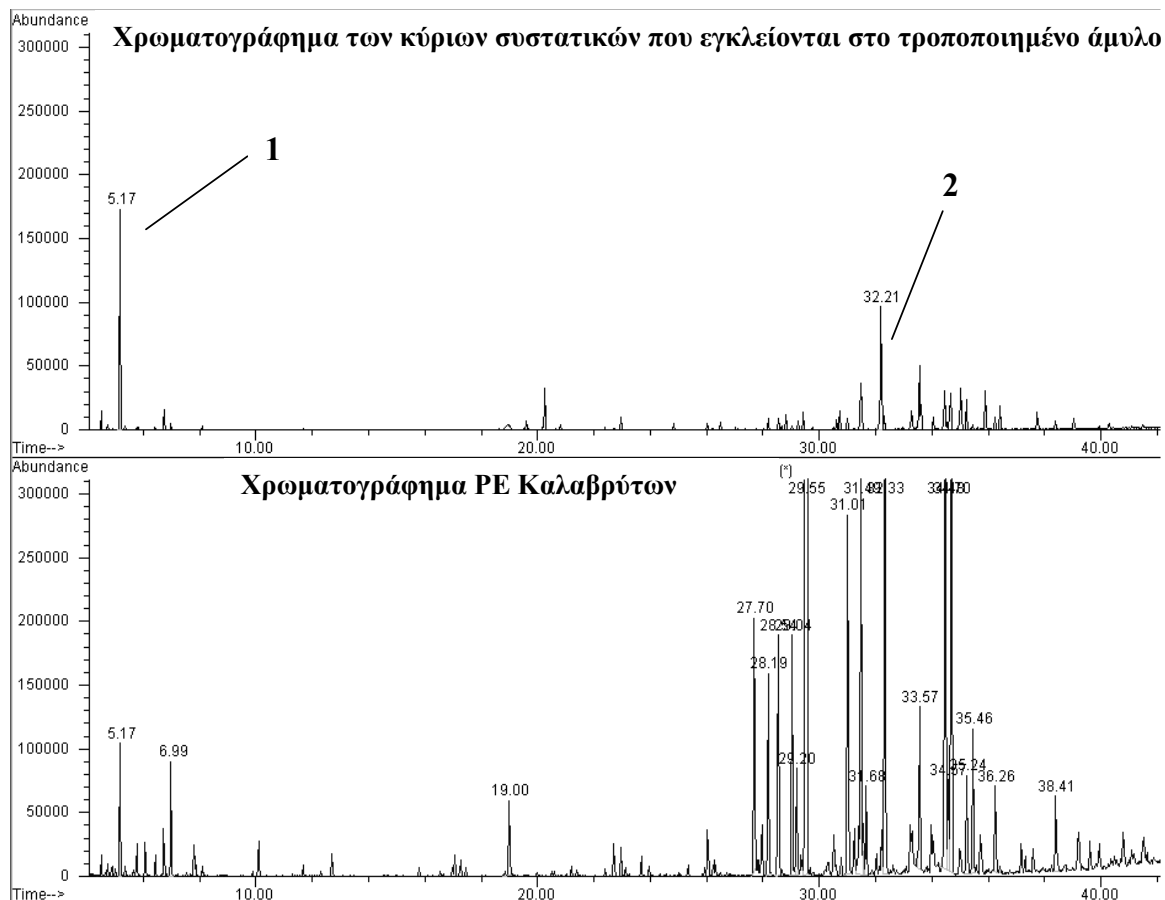
Λαμβάνοντας υπόψη, την επιβεβαίωση της επίτευξης εγκλεισμού πρόπολης στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, το επόμενο βήμα αφορούσε στην επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της πρόπολης στη δομή του οκτενυλοηλεκτρικού τροποποιημένου αμύλου (OSA- octenyl-succinate starch).

Μερικά από τα άμυλα που έχουν υποστεί τροποποίηση είτε μερικώς είτε ολικώς ανθίστανται στα πεπτικά ένζυμα και επομένως δεν αποδίδουν θερμίδες μέσω της κατανάλωσης του τροφίμου στο οποίο περιέχονται και επίσης συμβάλουν στην απόσπηση των συστατικών- ενώσεων, τα οποία ενθυλακώνονται στις δομές τους.

Για την μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (Καλάβρυτα) σε τροποποιημένο άμυλο, χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο Σ 2 (50 mL H₂O, 10 g τροποποιημένου αμύλου, 0,5 g πρόπολης μετά από εξάτμιση του διαλύτη από PE, Tween 80, ομογενοποίηση).

Στα χρωματογραφήματα ολικών ιόντων που παρατίθενται παρακάτω παρουσιάζονται τα κυριότερα συστατικά της πρόπολης που εγκλείονται στην δομή του

τροποποιημένου αμύλου, σε σύγκριση με τα κυριότερα συστατικά που περιέχονται στο αρχικό αιθανολικό διάλυμα πρόπολης (Καλάβρυτα), το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του συμπλόκου, όπως αυτά προσδιορίστηκαν μέσω της αέριας χρωματογραφίας. Η κατανομή των επιμέρους φαινολικών ενώσεων που ενθυλακώνονται στο τροποποιημένο άμυλο, παρουσιάζεται στον πίνακα **ΣΤ. 18**.



Οι αριθμοί που αναγράφονται στα χρωματογραφήματα των κύριων συστατικών της πρόπολης που εγκλείονται στο τροποποιημένο άμυλο, αντιστοιχούν στα:

- 1: βενζοϊκός αιθυλ-εστέρας
- 2: ισοπιμαρικό οξύ

Η ανάλυση του συμπλόκου πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου με αέρια χρωματογραφία, οδήγησε στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 15 συστατικών (SIM). Οι σημαντικότερες ενώσεις που προσδιορίστηκαν, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων ήταν: η χρυσίνη, που αποτελούσε το κυριότερο συστατικό με συγκέντρωση 6559,21 μg/g καθαρής πρόπολης, το καφεϊκό οξύ, το ολεανολικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, η βανιλίνη, το φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, η καμφερόλη και η ναριγκενίνη.

Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολών του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης από τα Καλάβρυτα (πίνακας ΣΤ. 2.) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συμπλόκου, μέσω της ανάλυσης της αέριας χρωματογραφίας (SIM) και της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις που βρέθηκε ότι περιείχε το σύμπλοκο εγκλεισμού πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο (πίνακας ΣΤ. 18.), εκτιμήθηκε η % απόδοση του εγκλεισμού. Οι υπολογισμοί που έγιναν ήταν:

Ολική περιεκτικότητα ταυτοποιημένων συστατικών PE Καλαβρύτων: 127,29 mg/g καθαρής πρόπολης (A)

Ολική περιεκτικότητα ταυτοποιημένων συστατικών συμπλόκου: 12,71 mg/g καθαρής πρόπολης (B)

% απόδοση εγκλεισμού: $(B/A) \cdot 100$

Η εκτίμηση της % απόδοσης του εγκλεισμού πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο, με βάση την μέθοδο παρασκευής του συμπλόκου, είναι 9,98 %.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβεβαιώνεται η επίτευξη εγκλεισμού της πρόπολης στη δομή του τροποποιημένου αμύλου. Μέσω της σύγκρισης της εκτίμησης απόδοσης του εγκλεισμού των 2 χρησιμοποιούμενων μέσων, β-κυκλοδεξτρίνης και τροποποιημένου αμύλου, υποδεικνύεται είτε ότι το τροποποιημένο άμυλο αποτελεί αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού, είτε ότι η μέθοδος παρασκευής του συμπλόκου Σ2 θεωρείται αποτελεσματικότερη ως προς την επίτευξη εγκλεισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σχηματιζόμενες έλικες της αμυλόζης μπορούν να ενθυλακώσουν μεγαλομόρια και ενώσεις όπως έλαια και λίπος (Hermansson & Svegmarm, 1996), όπως και αντίστοιχα συμπλέγματα στο τροποποιημένο άμυλο μπορούν να ενθυλακώσουν μεγάλα μόρια, μη εκλεκτικά. Αντίθετα η εσωτερική διάμετρος της β-κυκλοδεξτρίνης παρέχει την δυνατότητα δέσμευσης φαινολικών δακτυλίων. Οπότε τα αποτελέσματα που

προκύπτουν από τη διερεύνηση του εγκλεισμού στις υπό μελέτη δομές, συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

**Z. 6. 5. Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων εγκλεισμού
αβιετικού οξέος, καμφερόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης και χρυσίνης με
τη μέθοδο DSC**

**Z. 6. 5. 1. Μακροσκοπική εικόνα των συμπλόκων αβιετικού οξέος, καμφερόλης,
καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης και χρυσίνης με τροποποιημένο άμυλο
και β- κυκλοδεξτρίνη**

Η παρασκευή των συμπλόκων αναφέρεται διεξοδικά στο τμήμα **E. 5. 6**. Όλα τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν, παρουσίαζαν την ίδια εικόνα, με ομοιόμορφο χρώμα και κατανομή των πρότυπων συστατικών στο μέσο εγκλεισμού.



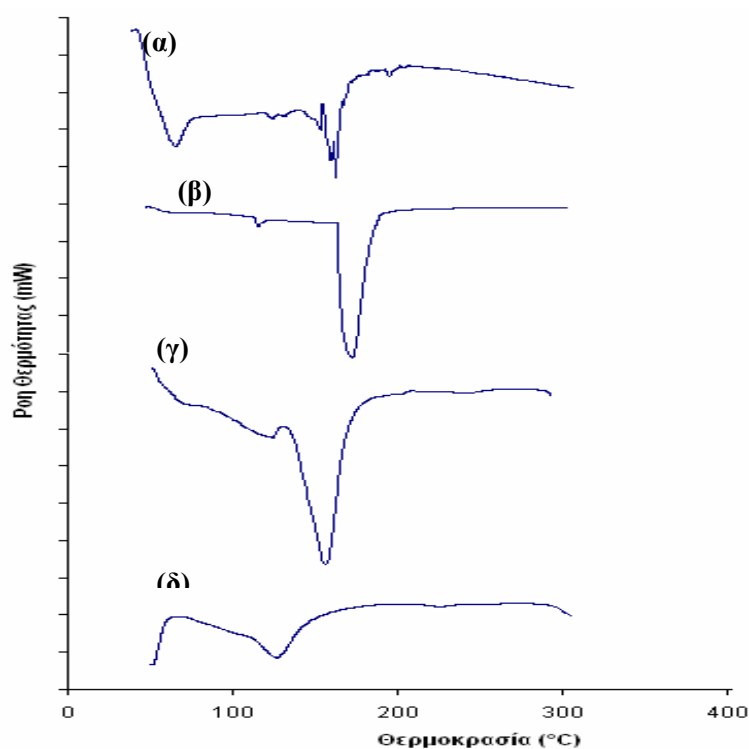
(+)

**Z. 6. 5. 2. Μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων με β-κυκλοδεξτρίνη, με τη
μέθοδο DSC**

**Z. 6. 5. 2. 1. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου αβιετικού οξέος με β-
κυκλοδεξτρίνη**

Στο Σχήμα **Z. 14**, παρουσιάζονται τα θερμογράφημα 4 διαφορετικών δειγμάτων: του αβιετικού οξέος, της β-κυκλοδεξτρίνης, του φυσικού μίγματος αβιετικού οξέος /β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της σάρωσης με DSC, στο θερμογράφημα (α), το μόριο

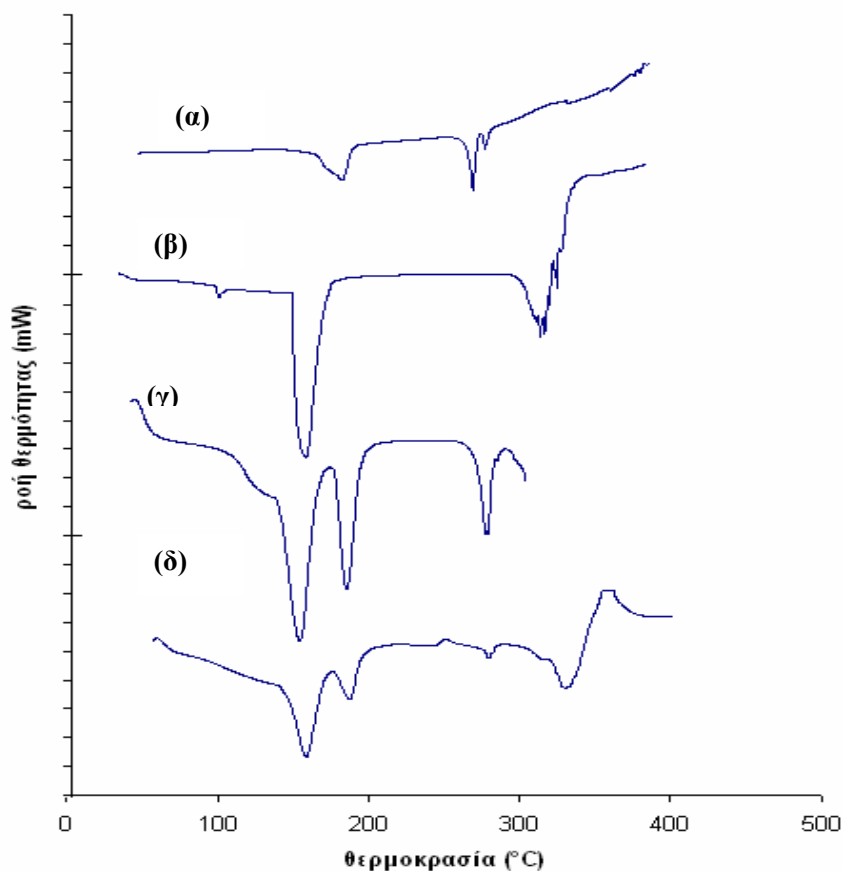
του αβιετικού οξέος παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στη θερμοκρασία 174,3 °C, το οποίο αντιπροσωπεύει το σημείο τήξης των κρυστάλλων του μορίου (173 °C). Στο θερμογράφημα της β-κυκλοδεξτρίνης (β), παρουσιάζεται μια ενδόθερμη κορυφή στους 164 °C που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού. Στο θερμογράφημα (γ), το οποίο αντιπροσωπεύει το φυσικό μίγμα αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζεται μια ενδόθερμη κορυφή στους 164,67 °C, που αντιστοιχεί στην β-κυκλοδεξτρίνη και στο αβιετικό οξύ. Τα εν λόγω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι με απλή ανάμιξη δεν μπορεί να επιτευχθεί εγκλεισμός του αβιετικού οξέος μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Στο θερμογράφημα (δ), το οποίο αντιπροσωπεύει τη συμπλοκοποιημένη μορφή του μορίου του αβιετικού οξέος, δεν εμφανίζεται απορρόφηση στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο σημείο τήξεώς του και αυτό αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού του μορίου του αβιετικού οξέος μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.



Σχήμα Z. 14. (α) Θερμογράφημα αβιετικού οξέος, (β) Θερμογράφημα β-κυκλοδεξτρίνης, (γ) Θερμογράφημα φυσικού μίγματος αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης, (δ) Θερμογράφημα συμπλόκου αβιετικού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης

Z. 6. 5. 2. 2. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου καμφερόλης με β-κυκλοδεξτρίνη

Στο Σχήμα **Z. 15.** παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα: της καμφερόλης, της β-κυκλοδεξτρίνης, του φυσικού μίγματος καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης. Στο θερμογράφημα (α) το μόριο της καμφερόλης παρουσιάζει 2 ενδόθερμες κορυφές στους 185 °C και στους 277,5 °C οι οποίες αντιστοιχούν στην τήξη των κρυστάλλων της καμφερόλης, αφού όπως παρουσιάζεται και στα θερμογραφήματα, η πρότυπη ουσία που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε προσμίξεις και μέσω ελέγχου αποκλείσθηκε η πιθανότητα ύπαρξης υγρασίας στην πρότυπη ουσία (Σημείο Τήξης καμφερόλης: 266 °C). Στο θερμογράφημα της β-κυκλοδεξτρίνης (β), παρουσιάζεται μια ενδόθερμη κορυφή στους 164 °C που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού και στο (γ), το οποίο αντιπροσωπεύει το φυσικό μίγμα καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζονται τρεις ενδόθερμες κορυφές μία στους 163,3 °C, μια στους 186 °C και μία στους 277,6 °C. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι με απλή ανάμιξη δεν μπορεί να επιτευχθεί εγκλεισμός της καμφερόλης στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Στο θερμογράφημα (δ), το οποίο αντιπροσωπεύει τη συμπλοκοποιημένη μορφή του μορίου της καμφερόλης, δεν εμφανίζεται απορρόφηση στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο σημείο τήξεώς του και αυτό αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού του μορίου της καμφερόλης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Σε μεγαλύτερη θερμοκρασία από 250° C, αρχίζει η αποικοδόμηση του μορίου της β-κυκλοδεξτρίνης και ολοκληρώνεται όταν υπερβαίνεται η θερμοκρασία των 300° C (ενδόθερμη κορυφή στους 350° C).

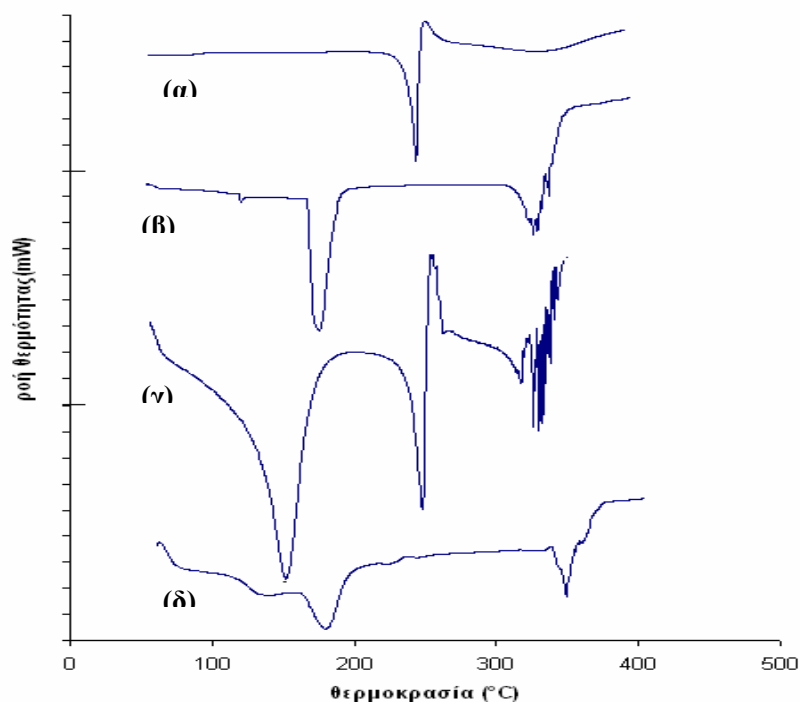


Σχήμα Z. 15. (α) Θερμογράφημα καμφερόλης, (β) Θερμογράφημα β-κυκλοδεξτρίνης, (γ) Θερμογράφημα φυσικού μίγματος καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, (δ) Θερμογράφημα συμπλόκου καμφερόλης/β-κυκλοδεξτρίνης

Z. 6. 5. 2. 3. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου καφεϊκού οξέος με β-κυκλοδεξτρίνη

Στο Σχήμα **Z. 16.** παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα: του καφεϊκού οξέος, της β-κυκλοδεξτρίνης, του φυσικού μίγματος καφεϊκού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου καφεϊκού οξέος/β-κυκλοδεξτρίνης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της σάρωσης με DSC, στο θερμογράφημα (α), το μόριο του καφεϊκού οξέος παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στη θερμοκρασία 237,5 °C, το οποίο αντιπροσωπεύει το σημείο

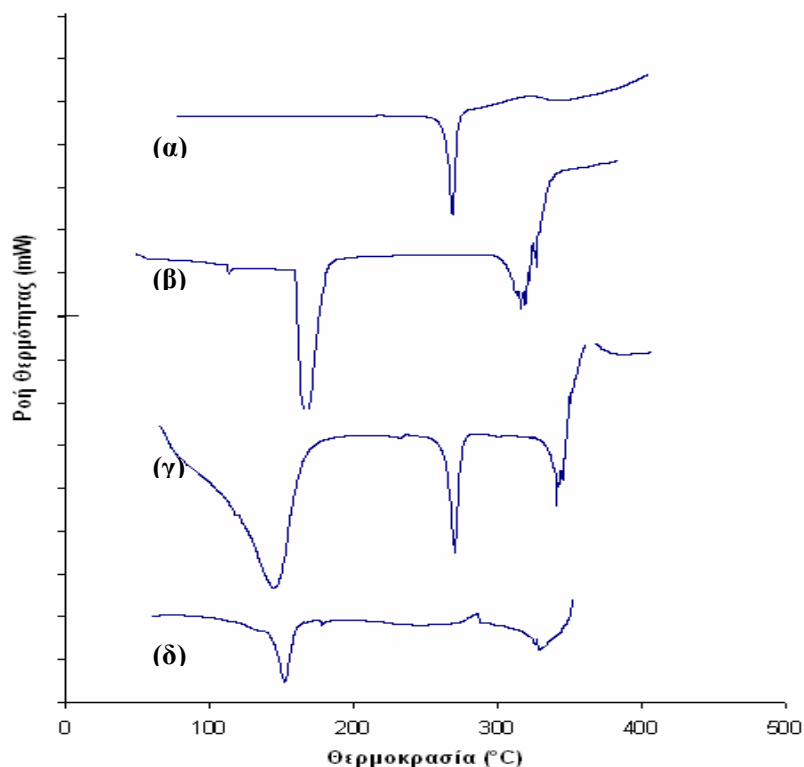
τήξης των κρυστάλλων του μορίου (225°C). Στο θερμογράφημα της β -κυκλοδεξτρίνης (β), παρουσιάζεται μια ενδόθερμη κορυφή στους 164°C που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού και μια στους 300°C που οφείλεται στη θερμική διάσπαση της β -CD, ενώ στο θερμογράφημα (γ), το οποίο αντιπροσωπεύει το φυσικό μίγμα καφεϊκού οξέος/ β -κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζονται δύο ενδόθερμες κορυφές μία στους $153,3^{\circ}\text{C}$ και μία στους $237,53^{\circ}\text{C}$. Επομένως συμπεραίνεται ότι με απλή ανάμιξη δεν μπορεί να επιτευχθεί εγκλεισμός του καφεϊκού οξέος μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Στο θερμογράφημα (δ), το οποίο αντιπροσωπεύει τη συμπλοκοποιημένη μορφή του μορίου του καφεϊκού οξέος, δεν εμφανίζεται απορρόφηση στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο σημείο τήξεώς του και αυτό αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού του μορίου του καφεϊκού οξέος μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.



Σχήμα Z. 16. (α) Θερμογράφημα καφεϊκού οξέος, (β) Θερμογράφημα β -κυκλοδεξτρίνης, (γ) Θερμογράφημα φυσικού μίγματος καφεϊκού οξέος/ β -κυκλοδεξτρίνης, (δ) Θερμογράφημα συμπλόκου καφεϊκού οξέος/ β -κυκλοδεξτρίνης

Z. 6. 5. 2. 4. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου ναριγκενίνης με β-κυκλοδεξτρίνη

Στο Σχήμα **Z. 17**, παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα: της ναριγκενίνης, της β-κυκλοδεξτρίνης, του φυσικού μίγματος της ναριγκενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου ναριγκενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της σάρωσης με DSC, στο θερμογράφημα (α), το μόριο της ναριγκενίνης παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στη θερμοκρασία 253 °C, το οποίο αντιπροσωπεύει το σημείο τήξης των κρυστάλλων του μορίου (247-250° C). Στο θερμογράφημα της β-κυκλοδεξτρίνης (β), παρουσιάζεται μια ενδόθερμη κορυφή στους 164 °C που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού και μια στους 325 °C που οφείλεται στη θερμική διάσπαση της β-CD. Στο θερμογράφημα (γ), το οποίο αντιπροσωπεύει το φυσικό μίγμα ναριγκενίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζονται 3 ενδόθερμες κορυφές μία στους 140 °C, μία στους 253°C που αντιστοιχεί στην τήξη των κρυστάλλων της ναριγκενίνης, και μία στους 330°C (θερμική διάσπαση β-CD). Τα εν λόγω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι με απλή ανάμιξη δεν μπορεί να επιτευχθεί εγκλεισμός της ναριγκενίνης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Στο θερμογράφημα (δ), το οποίο αντιπροσωπεύει τη συμπλοκοποιημένη μορφή του μορίου της ναριγκενίνης, δεν εμφανίζεται απορρόφηση στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο σημείο τήξεως της ναριγκενίνης και αυτό αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού του μορίου της ναριγκενίνης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

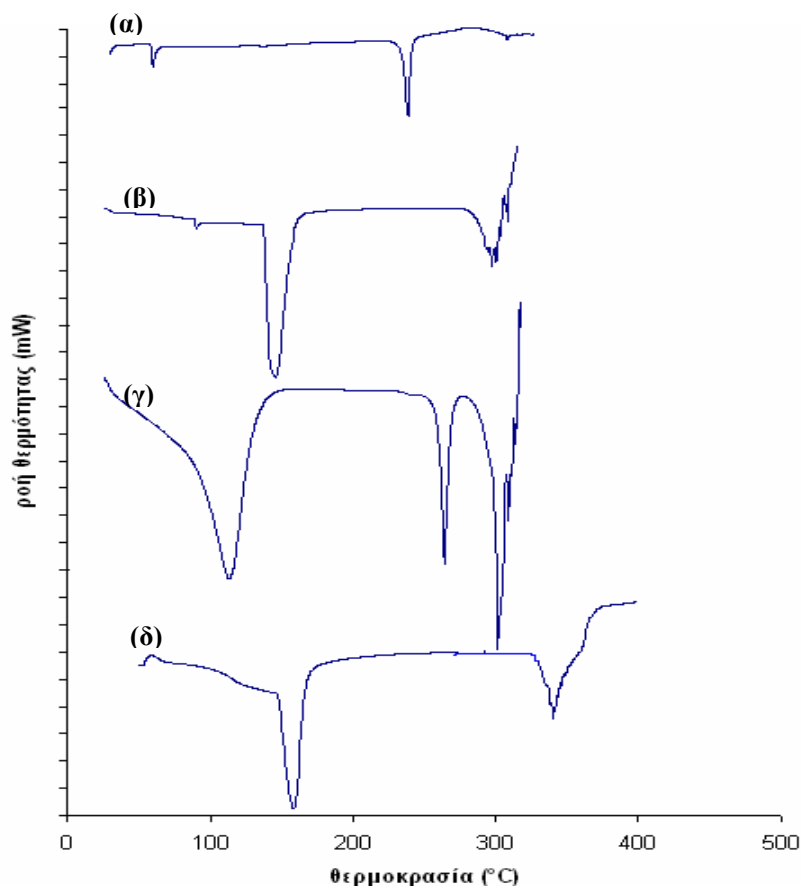


Σχήμα Z. 17. (α) Θερμογράφημα ναριγκενίνης, (β) Θερμογράφημα β-κυκλοδεξτρίνης, (γ) Θερμογράφημα φυσικού μίγματος ναριγκενίνης β-κυκλοδεξτρίνης, (δ) Θερμογράφημα συμπλόκου ναριγκενίνης β-κυκλοδεξτρίνης

Z. 6. 5. 2. 5. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου χρυσίνης με β-κυκλοδεξτρίνη

Στο Σχήμα **Z. 18.** παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα: της χρυσίνης, της β-κυκλοδεξτρίνης, του φυσικού μίγματος χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης. Στο θερμογράφημα (α), το μόριο της χρυσίνης παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στη θερμοκρασία 291 °C, το οποίο αντιπροσωπεύει το σημείο τήξης των κρυστάλλων του μορίου (284-290 °C). Στο (β), η β-κυκλοδεξτρίνη, παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στους 164 °C που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού και μία στους 300 °C που οφείλεται στη θερμική διάσπαση της β-CD. Στο (γ), το οποίο αντιπροσωπεύει το φυσικό μίγμα χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης,

παρουσιάζονται τρεις ενδόθερμες κορυφές μία στους 150 °C, μια στους 291 °C που αντιστοιχεί στην τήξη των κρυστάλλων της χρυσίνης, και μία στους 300 °C (θερμική διάσπαση της β-CD). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι με απλή ανάμιξη δεν μπορεί να επιτευχθεί εγκλεισμός της χρυσίνης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, ενώ στο θερμογράφημα (δ), το οποίο αντιπροσωπεύει τη συμπλοκοποιημένη μορφή του μορίου της χρυσίνης, δεν εμφανίζεται απορρόφηση στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο σημείο τήξεώς του και αυτό αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού του μορίου της χρυσίνης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.



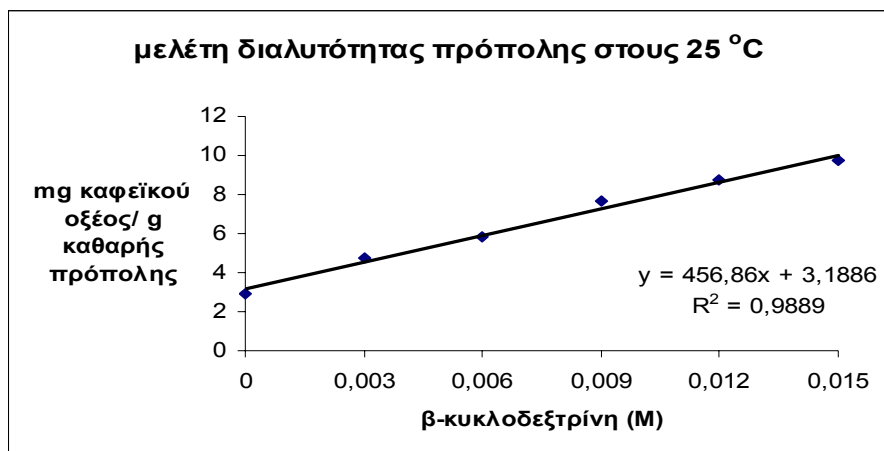
Σχήμα Z. 18. (α) Θερμογράφημα χρυσίνης, (β) Θερμογράφημα β-κυκλοδεξτρίνης, (γ) Θερμογράφημα φυσικού μίγματος χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης, (δ) Θερμογράφημα συμπλόκου χρυσίνης/β-κυκλοδεξτρίνης.

Επομένως, με τη μέθοδο DSC επιβεβαιώνεται ο εγκλεισμός και των 5 συστατικών που περιέχονται στο PE από Καλάβρυτα στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Ο εγκλεισμός του αβιετικού οξέος, της καμφερόλης και της χρυσίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη, μελετήθηκε για πρώτη φορά.

Z. 6. 6. Μελέτη διαλυτότητας καθαρής πρόπολης. -Έμμεση απόδειξη εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνη-

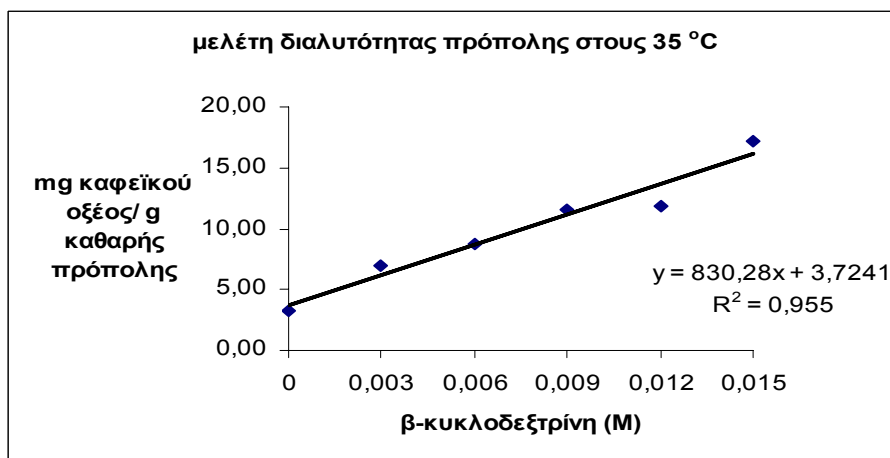
Η πρόπολη εξαιτίας της πληθώρας των συστατικών που περιέχει εμφανίζει ποικίλα $\lambda_{\max}$, οπότε δεν μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά με βάση τη μέθοδο των Higuchi και Connors (1965) όπως προτείνεται από τη βιβλιογραφία. Λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι η πρόπολη αποτελεί μη- υδατοδιαλυτή ουσία, για την εκτίμηση της ποσότητας των συστατικών που διαλύονται στο νερό εξαιτίας της παρουσίας της β-κυκλοδεξτρίνης, προσδιορίζεται το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του διαλύματος, εφόσον τα περισσότερα συστατικά που περιέχονται στη πρόπολη είναι πολυφαινόλες. Για τη μελέτη της αυξανόμενης διαλυτότητας της πρόπολης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διαλυτότητας σε 3 θερμοκρασίες, κατασκευάστηκαν καμπύλες διαλυτότητας και προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα για κάθε θερμοκρασία στην οποία μελετήθηκε η διαλυτότητα, παρουσιάζονται στους πίνακες **ΣΤ. 7, ΣΤ. 8, ΣΤ. 9**.

Στο σχήμα **Z. 19**, παρουσιάζεται το διάγραμμα μεταβολής της διαλυτότητας της πρόπολης, παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης στους 25 °C. Η μεταβολή της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος, που αποτελεί μέτρο προσδιορισμού των φαινολικών ενώσεων στο υπό μελέτη δείγμα, είναι γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9889$ και αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κυκλοδεξτρίνης. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες (9,71 mg ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος /g πρόπολης), αντιστοιχεί στην υψηλότερη συγκέντρωση β- κυκλοδεξτρίνης (0,015 M).



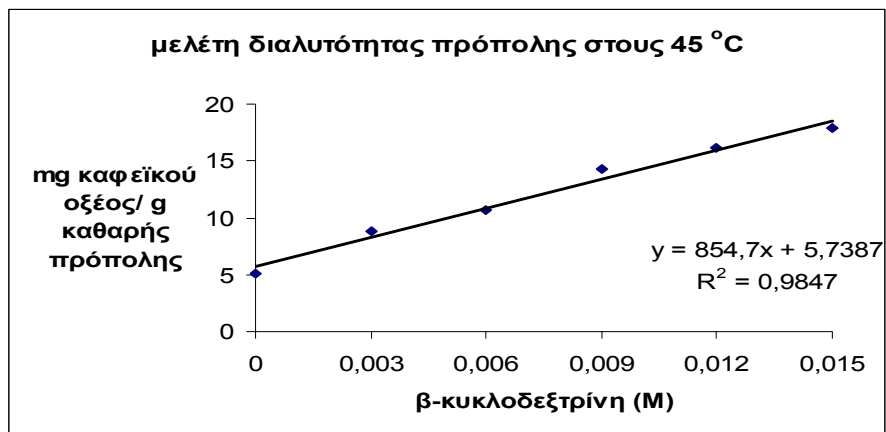
Σχήμα Z. 19. Μελέτη διαλυτότητας πρόπολης παρουσία β-CD στους 25° C

Στο σχήμα **Z. 20.** παρουσιάζεται το διάγραμμα μεταβολής της διαλυτότητας της πρόπολης, παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης στους 35° C. Η μεταβολή της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος, είναι επίσης γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9667$ και αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη κλίση (αυξητική τάση), από ότι στην περίπτωση μελέτης της διαλυτότητας στους 25° C. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες (17,22 mg ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος /g πρόπολης), αντιστοιχεί στην υψηλότερη συγκέντρωση β-κυκλοδεξτρίνης (0,015 M).



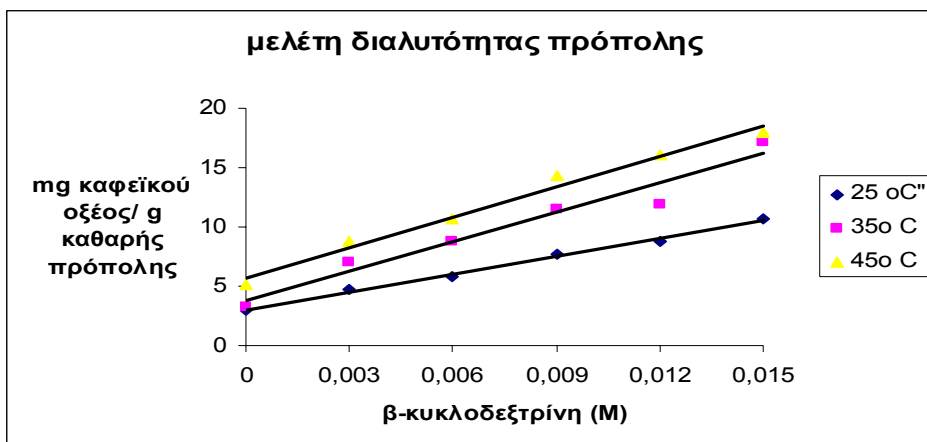
Σχήμα Z. 20. Μελέτη διαλυτότητας πρόπολης παρουσία β-CD στους 35° C

Στο σχήμα **Z. 21.** παρουσιάζεται το διάγραμμα μεταβολής της διαλυτότητας της πρόπολης, παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης στους 45° C. Και σε αυτή την περίπτωση, η μεταβολή της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος, είναι γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9847$ και αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κυκλοδεξτρίνης. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες (17,95 mg ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος /g πρόπολης), αντιστοιχεί στην υψηλότερη συγκέντρωση β-κυκλοδεξτρίνης (0,015 M).



Σχήμα Z. 21. Μελέτη διαλυτότητας πρόπολης παρουσία β-CD στους 45° C

Συγκρίνοντας τις καμπύλες διαλυτότητας της πρόπολης στις θερμοκρασίες τις οποίες εξετάστηκε, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η διαλυτότητα της πρόπολης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας αφού η μεγαλύτερη συγκέντρωση ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος υπολογισμένη ανά γραμμάριο καθαρής πρόπολης (17,95 mg/g πρόπολης), προσδιορίζεται στους 45°C. Επίσης η διαλυτότητα της πρόπολης παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($R^2 > 0,95$, για τις υπό μελέτη θερμοκρασίες 25°C, 35°C και 45°C) με τη συγκέντρωση της β-κυκλοδεξτρίνης. Επομένως, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της πρόπολης, που προστίθεται στο υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης, η επίτευξη εγκλεισμού στην β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να επιβεβαιωθεί έμμεσα, αφού η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, όπως προκύπτει μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κυκλοδεξτρίνης.



Σχήμα Ζ. 22. Μελέτη διαλυτότητας πρόπολης παρουσία β-CD στους 25, 35, 45° C.

Από τα διαγράμματα του σχήματος **Ζ. 22**, φαίνεται ότι η διαλυτότητα της πρόπολης στο νερό αυξάνεται λόγω συμπλοκοποίησης με τη β-κυκλοδεξτρίνη, έτσι η ενθυλακωμένη μορφή της, όταν βρίσκεται σε μορφή σκόνης μετά από λυοφιλίωση, μπορεί να προστεθεί σε τρόφιμα που έχουν ως βάση το νερό εξασφαλίζοντας την παρουσία της πρόπολης σε διαλυτή μορφή.

Ζ. 7. Μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συμπλόκων πρόπολης (Καλάβρυτα) έναντι του *Staphylococcus aureus*

Η μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας που επιδεικνύει η εγκλεισμένη πρόπολη στις δομές της β-κυκλοδεξτρίνης, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, τροποποιημένου αμύλου και ζελατίνης, έναντι του *Staphylococcus aureus*, αποτέλεσε εργαλείο, όχι μόνο για την έμμεση διερεύνηση της επίτευξης εγκλεισμού, αλλά και για την αναζήτηση του βέλτιστου μέσου ενθυλάκωσης ως προς τη διατήρηση της αποτελεσματικότητάς της.

Στον **Πίνακα Ζ. 24. 1**, παρουσιάζεται η αντιμικροβιακή δράση συμπλόκων PE με τροποποιημένο άμυλο. Ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έχει το παρασκεύασμα εκείνο το οποίο στην μεγαλύτερη αραίωση εξακολουθεί να έχει αντιμικροβιακή δράση.

Στην σειρά Α των δειγμάτων (PTM 12 I, PTM 12 II, PTM 12 III) όπου η αναλογία μάζας πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο ήταν 2:1 δεν υπήρχε διαφορά στην αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων η οποία όμως μετά την 1:2 αραίωση εξαφανίστηκε. Από την ίδια σειρά δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του διαλύματος τροποποιημένου αμύλου (0.25, 0.5, 1%) δεν έχει επίδραση στην τελική αντιμικροβιακή δράση του παρασκευάσματος.

Παρόμοια με τα παραπάνω ήταν και τα αποτελέσματα της Β σειράς παρασκευασμάτων όπου η αναλογία μάζας πρόπολης /τροποποιημένο άμυλο ήταν 1:1. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων των σειρών Α και Β διαπιστώνεται ότι η αντιμικροβιακή δράση δεν επηρεάστηκε, από την αναλογία μάζας πρόπολης /τροποποιημένο άμυλο.

Στην Γ σειρά δειγμάτων όπου η αναλογία τροποποιημένου αμύλου ήταν διπλάσια της προπόλης, η αντιμικροβιακή δράση των παρασκευασμάτων ήταν αυξημένη, αφού εμφανίστηκε μέχρι την 1:4 αραίωση. Στη σειρά αυτή των δειγμάτων ας σημειωθεί ότι η μέγιστη αντιμικροβιακή δράση εμφανίστηκε στην 1:1 αραίωση και όχι στην μηδενική. Αυτό, πιθανότατα, οφείλεται στην σχετική δυσδιαλυτότητα του παρασκευάσματος και στις δυσκολίες στην διάχυσή του στο άγαρ όπου πραγματοποιείται η αντιμικροβιακή μελέτη, εξαιτίας της αυξημένης ποσότητας των συμπλόκων που χρησιμοποιούνται (0,15 g). Όταν, όμως, αυξήθηκε η αραίωση του συμπλόκου (1:2), αυτό επέδειξε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Η παραπάνω σειρά δειγμάτων επαναλήφθηκε ως έχει με μοναδική διαφορά την προσθήκη Tween-80 κατά την παρασκευή των συμπλόκων (PTM A, B, Γ, Δ, E, ΣΤ, Ζ, Η). Φαίνεται ότι η προσθήκη Tween στα δείγματα είτε μείωσε σε πολύ σημαντικό βαθμό την αντιμικροβιακή δράση τους είτε την εξαφάνισε (**Πίνακας ΣΤ. 24. 2.**)

Δύο νέες σειρές δειγμάτων εξετάστηκαν όπου σταδιακά η ποσότητα τροποποιημένου αμύλου αυξάνονταν (1:2, 1:3, 1:4, 1:5) σε σύγκριση με την ποσότητα πρόπολης που ήταν σταθερή (0.4 g). Στην πρώτη σειρά δειγμάτων (PTM 13A, PTM 13B, PTM 13Γ, PTM 13Δ) είχε γίνει προσθήκη Tween 80 ενώ αντίθετα στην δεύτερη δεν είχε προστεθεί (PTM 13A', PTM 13B', PTM 13Γ', PTM 13Δ'). Στην σειρά δειγμάτων όπου είχε προστεθεί Tween η αντιμικροβιακή δράση ήταν μειωμένη, επιβεβαιώνοντας την παρατήρηση προηγούμενων δοκιμών (**Πίνακας ΣΤ. 24. 3.**)

Από την δεύτερη σειρά δειγμάτων όπου δεν υπήρχε Tween 80 ήταν ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι όσο αύξανε η ποσότητα του τροποποιημένου αμύλου τόσο αύξανε η αντιμικροβιακή δράση του δείγματος. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι ο αυξημένος αριθμός μορίων τροποποιημένου αμύλου έχει την δυνατότητα να δεσμεύει μεγαλύτερο αριθμό των δραστικών ενώσεων της πρόπολης, τα οποία σε διαφορετική περίπτωση στο υδατικό περιβάλλον θα συνενώνονταν μεταξύ τους (aggregation) και δεν θα ήταν διαθέσιμα, για να δράσουν.

Στον **Πίνακα Ε. 24. 4.** παρουσιάζεται η αντιμικροβιακή δράση συμπλόκων ΡΕ με β-κυκλοδεξτρίνη. Από τη γενική επισκόπηση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η β-κυκλοδεξτρίνη δεν αποτελεί το καλύτερο μέσο εγκλεισμού της πρόπολης, διότι τα σύμπλοκα αυτά δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους: (α) είτε ότι τα συστατικά της πρόπολης δεν συνδέονται με την β-κυκλοδεξτρίνη, είτε (β) είτε ότι συνδέονται πολύ ισχυρά αλλά δεν απελευθερώνονται μετά για να δράσουν. Οι Kedzia *et al.*, (1990), αναφέρουν ότι ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνεται η αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης είναι περίπλοκος και μπορεί να αποδοθεί στη συνέργεια των υδρόξυ-οξέων των φλαβονοειδών και των σεσκιτερπενίων. Όπως αναφέρεται στο τμήμα **Ζ. 6. 3.** (Μελέτη εγκλεισμού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης σε β-κυκλοδεξτρίνη), επιβεβαιώνεται η επίτευξη εγκλεισμού της πρόπολης στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης καθώς και η επιλεκτική απομόνωση των φαινολικών συστατικών, αν και η απόδοση του εγκλεισμού είναι χαμηλή (1,35%). Επομένως μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο εγκλεισμός των βιοδραστικών συστατικών στη β-κυκλοδεξτρίνη, ίσως να μην γίνεται σε ικανοποιητικό βαθμό ώστε να εκδηλώσει δραστηριότητα.

Στον **Πίνακα Ε. 24. 5.** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων όπου ως φορέας για την συμπλοκοποίηση της πρόπολης χρησιμοποιήθηκε β-υδροξυ-πρόπυλο-κυκλοδεξτρίνη. Στα δύο πρώτα δείγματα της σειράς Α (PTM 7, PTM 8, PTM 9) παρουσιάστηκε αντιμικροβιακή δράση, αν και ήταν μάλλον, ασθενής. Ας σημειωθεί ότι τα δείγματα αυτά δεν είχαν δεχθεί ομογενοποίηση.

Το τρίτο δείγμα της σειράς, στο οποίο είχε προστεθεί Tween 80 παρουσίασε τη χαμηλότερη αντιμικροβιακή δράση της σειράς αυτής.

Στην επόμενη σειρά δειγμάτων (B, Γ, Δ, E) στα δείγματα PTM 15 A, PTM 15 B, PTM 15 Γ, PTM 15 Δ, η αναλογία μάζας του μέσου εγκλεισμού, αύξανε κατά 2, 3, 4 και 5 φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με τη μάζα της δραστικής ουσίας. Μέσω της παρατήρησης των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στον σχετικό πίνακα, προκύπτει ότι καθώς αυξάνεται η ποσότητα του φορέα, αυξάνεται και η αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν τα δείγματα. Αξίζει δε ακόμα να σημειωθεί ότι από την σύγκριση των αποτελεσμάτων όταν χρησιμοποιήθηκε β-κυκλοδεξτρίνη και υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη ως φορέας προκύπτει ότι ο δεύτερος φορέας έδωσε σαφώς πολύ καλύτερα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και μέσω της μελέτης σταθερότητας της πρόπολης με βάση τη μέθοδο DSC, όπου φαίνεται ότι η υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί, αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού για την πρόπολη αφού παρέχει επιπρόσθετη προστασία σε υψηλές θερμοκρασίες, σε σχέση με τη β-κυκλοδεξτρίνη. Ακόμη μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η παραγωγοποίηση της β-κυκλοδεξτρίνης με την προσθήκη υδρόξυ-πρόπυλο- ομάδας αυξάνει την υδατοδιαλυτότητά της και συνεπώς την υδατοδιαλυτότητα του συμπλόκου, οπότε με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης στο υπόστρωμα.

Ως μέσο εγκλεισμού της πρόπολης, χρησιμοποιήθηκε επίσης και η ζελατίνη. Στον πίνακα **ΣΤ. 24. 6.** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν. Σε όλα τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε Tween 80 ως γαλακτωματοποιητής. Από την θεώρηση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι τα δείγματα της σειράς Γ έδωσαν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από τα αντίστοιχα της Α σειράς.

Όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση των δειγμάτων PTM 13A', PTM 13B', PTM 13Γ', PTM 13Δ', όπου το μέσο εγκλεισμού ήταν το τροποποιημένο άμυλο, έτσι και για την ζελατίνη, φαίνεται να ισχύει ότι όσο μειώνεται ο λόγος «δραστική ουσία/φορέας» τόσο αυξάνει η αντιμικροβιακή δράση της δραστικής ουσίας. Στον ίδιο πίνακα αποτελεσμάτων και για τα δείγματα της σειράς Γ, η μέγιστη αντιμικροβιακή δράση δεν

εμφανίζεται στην μικρότερη αραίωση αλλά στην (1:1 ή 1:2). Το γεγονός αυτό θα πρέπει, μάλλον, να αποδοθεί στην μειωμένη διαλυτότητα της ζελατίνης σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της (0,150 g σε 5 ml H₂O). Αντίθετα, με τις διαδοχικές αραιώσεις, αυξήθηκε η διαλυτότητα του παρασκευάσματος και συνακόλουθα η αντιμικροβιακή του δράση.

Όπως αναφέρθηκε αρχικά, κατά την παρασκευή όλων των συμπλόκων πρόπολης σε ζελατίνη, χρησιμοποιήθηκε Tween-80. Η προσθήκη αυτή όμως δεν επηρέασε την δραστηριότητα των συμπλόκων, τα οποία επέδειξαν και τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (0,65 cm κατά την 1:2 αραίωση του Σ 49- 1:2 αναλογία μάζας πρόπολης/ζελατίνης), η οποία διατηρήθηκε μέχρι και την 1:8 αραίωση (0,35 cm) σε αντίθεση με την περίπτωση όπου ως μέσο εγκλεισμού χρησιμοποιείται το τροποποιημένο άμυλο, όπου φαίνεται ότι η προσθήκη Tween (τιμή HLB=80) στα δείγματα είτε μείωσε σε πολύ σημαντικό βαθμό την αντιμικροβιακή δράση τους είτε την εξαφάνισε. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο γαλακτωματοποιητής, εκδηλώνει διαφορετική συμπεριφορά στην περίπτωση του τροποποιημένου αμύλου, παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης από το σύμπλοκο, αφού συγκρατεί τη πρόπολη δεσμευμένη στο σύμπλοκο. Από την άλλη, στην περίπτωση της ζελατίνης, η οποία είναι μια φυσική, διαλυτή πρωτεΐνη, το Tween-80 δεσμεύεται σε αυτήν και ως εκ τούτου τα συστατικά της πρόπολης μπορούν να διαχυθούν στο υπόστρωμα και να εκδηλώσουν την αντιμικροβιακή τους δράση.

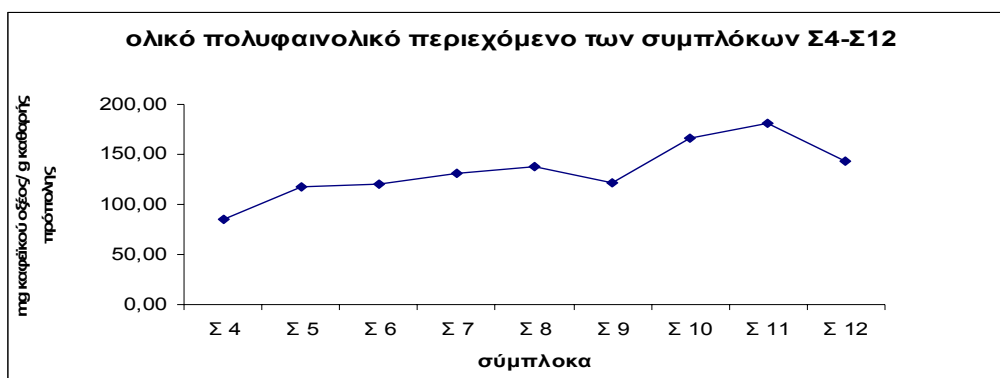
Z. 8. Διερεύνηση βέλτιστης αναλογίας μάζας πρόπολης : μέσου εγκλεισμού, μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων

Για τη διερεύνηση της βέλτιστης αναλογίας μάζας α) πρόπολης, β) μέσου ενθυλάκωσης και γ) νερού για την παρασκευή του συμπλόκου εγκλεισμού, μελετήθηκαν 3 διαφορετικές αναλογίες σε 9 σύμπλοκα, που παρουσιάζονται στον πίνακα **Z. 3**.

Πίνακας Ζ. 3. Αναλογίες μάζας πρόπολης, μέσου ενθυλάκωσης και νερού για την παρασκευή του συμπλόκου εγκλεισμού

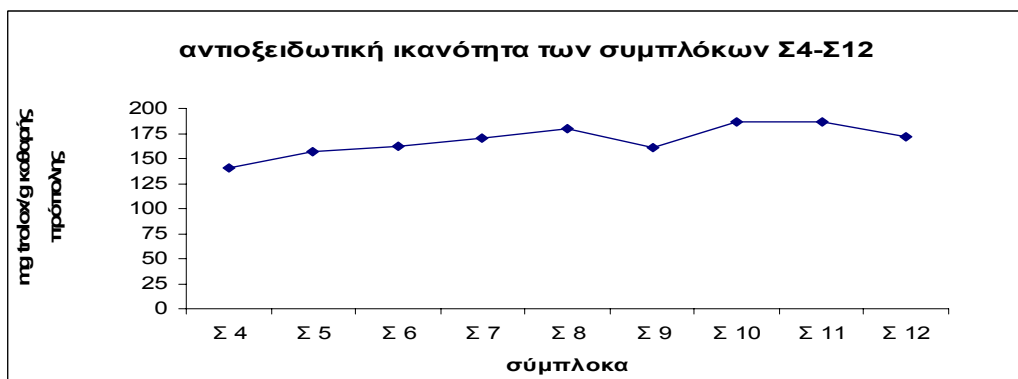
Δείγμα	H ₂ O (ml)	Τροποποιημένο άμυλο (g)	Πρόπολη (g)	Αναλογία μάζας πρόπολης/ τροποποιημένο άμυλο
Σ 4 (PTM 12 I)	80	0,2	0,4	2:1
Σ 5 (PTM 12 II)	40	0,2	0,4	2:1
Σ 6 (PTM 12 III)	20	0,2	0,4	2:1
Σ 7 (PTM 12 IV)	80	0,4	0,4	1:1
Σ 8 (PTM 12 V)	40	0,4	0,4	1:1
Σ 9 (PTM 12 VI)	20	0,4	0,4	1:1
Σ 10 (PTM 12 VII)	80	0,8	0,4	1:2
Σ 11 (PTM 12 VIII)	40	0,8	0,4	1:2
Σ 12 (PTM 12 IX)	20	0,8	0,4	1:2

Από τα αποτελέσματα της μέτρησης της περιεκτικότητας σε ολικές πολυφαινόλες, με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu (**Πίνακας ΣΤ. 4.**) προκύπτει διακύμανση από 85 έως 180 mg CAE /g καθαρής πρόπολης για τα υπό μελέτη σύμπλοκα. Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο παραμένει σχετικά σταθερό στα εξεταζόμενα σύμπλοκα, τα οποία παρασκευάστηκαν με τη χρησιμοποίηση πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο σε αναλογίες 2:1 και 1:1. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες εμφανίζεται να διαθέτει το Σ 11 (180 mg CAE /g καθαρής πρόπολης), ενώ τη μικρότερη, το Σ 4 (84 mg CAE /g καθαρής πρόπολης). (**Σχήμα Ζ. 23**).



Σχήμα Ζ. 23. Περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο, Σ 4-Σ 12, υπολογισμένες με τη μέθοδο Folin- Ciocaltaeu.

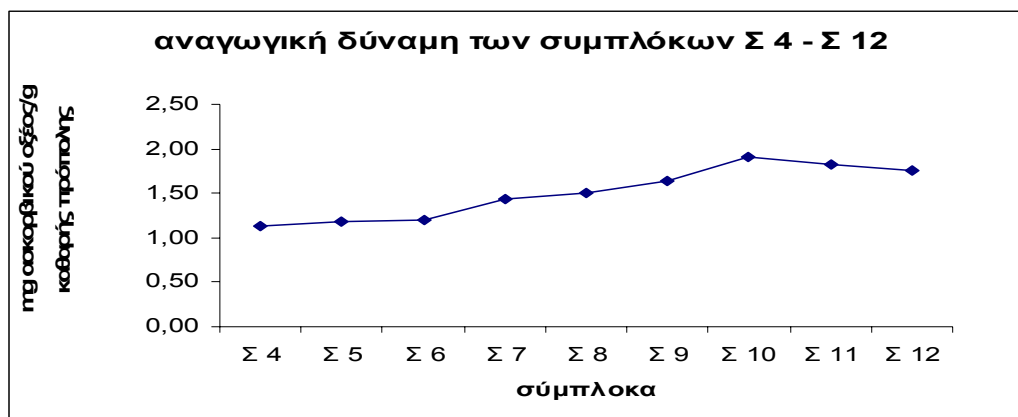
Από τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας που εκδηλώνουν τα σύμπλοκα Σ 4 - Σ 12, με τη μέθοδο δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH*, προκύπτει διακύμανση από 141 έως 187 mg TRE /g καθαρής πρόπολης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα παραμένει σταθερή στα εξεταζόμενα σύμπλοκα, τα οποία παρασκευάστηκαν με τη χρησιμοποίηση πρόπολης/ τροποποιημένο άμυλο σε αναλογίες 2:1 και 1:1. Τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα επιδεικνύουν τα σύμπλοκα Σ 10 (186,78 mg TRE /g καθαρής πρόπολης και Σ 11 (187,16 mg TRE/g καθαρής πρόπολης), ενώ τη μικρότερη, το Σ 4 (141 mg TRE/g καθαρής πρόπολης). (**Σχήμα Ζ. 24**). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα **ΣΤ. 11**.



Σχήμα Ζ. 24. Αντιοξειδωτική ικανότητα των συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο, Σ 4-Σ 12, με τη μέθοδο δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε ολικές πολυφαινόλες που προανέφερα, που θεωρείται αναμενόμενο.

Από τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αναγωγικής δύναμης που εκδηλώνουν τα σύμπλοκα Σ 4 - Σ 12, με τη μέθοδο αναγωγής του Fe^{3+} , προκύπτει διακύμανση από 1,14 έως 1,91 mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος/g καθαρής πρόπολης. Η αναγωγική δύναμη παραμένει σταθερή στα εξεταζόμενα σύμπλοκα, τα οποία παρασκευάστηκαν με τη χρησιμοποίηση πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο σε αναλογίες 2:1, ενώ εμφανίζεται μια μικρή αυξητική τάση στα σύμπλοκα Σ 7 έως Σ 9, τα οποία παρασκευάστηκαν σε αναλογίες 1:1. Τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα επιδεικνύει το σύμπλοκο Σ 10, το οποίο παρασκευάστηκε σε αναλογία 1:2 και τη μικρότερη το Σ 4, το οποίο παρασκευάστηκε σε αναλογία 2:1. (Σχήμα Ζ. 25). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα ΣΤ. 15.



Σχήμα Ζ. 25. Αναγωγική δύναμη των συμπλόκων πρόπολης/ τροποποιημένο άμυλο, Σ 4-Σ 12, με τη μέθοδο αναγωγής του Fe^{3+}

Z. 8. 1.Συσχέτιση των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων για τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου Σ 4 - Σ 12

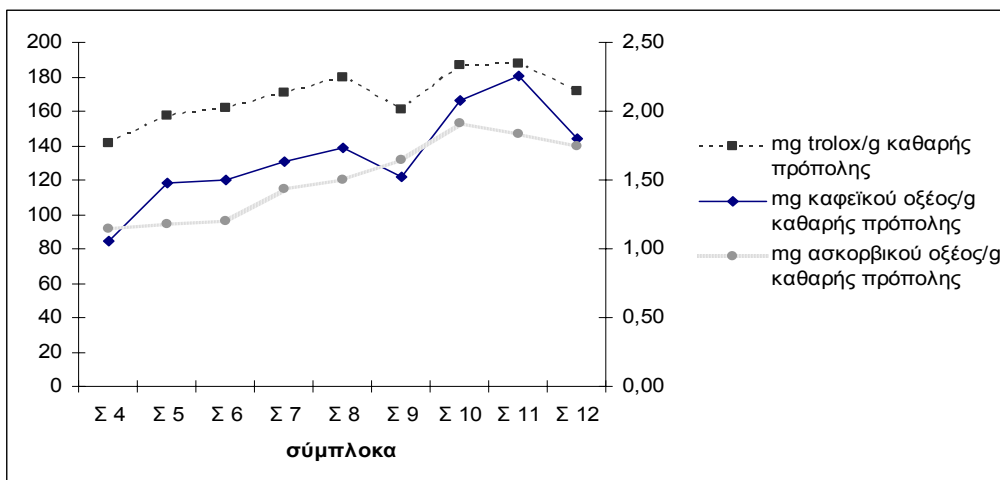
Στον Πίνακα **Z. 4.** παρουσιάζονται οι συντελεστές συσχέτισης (r) μεταξύ των μεθόδων που μελετήθηκαν, ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός συσχετίσεων.

Πίνακας Z. 4. Συντελεστές συσχέτισης (r) μεταξύ των μεθόδων

	<i>FC</i>	<i>DPPH</i>	<i>RP</i>
FC	1		
DPPH	0,960	1	
RP	0,860	0,819	1

Εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0,01$) μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 φασματοφωτομετρικών μεθόδων. Η σημαντικότερη συσχέτιση, με στατιστική βεβαιότητα 99,9% ($p < 0,001$), εντοπίστηκε μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου Folin-Ciocalteu με αυτών της μεθόδου προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στο σχήμα **Z. 26.** παρουσιάζεται η διακύμανση των ολικών πολυφαινολών των συμπλόκων όπως προσδιορίστηκαν μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, σε σχέση με τη διακύμανσή τους, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της αναγωγικής δύναμης

Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει, από όλες τις φασματοφωτομετρικές δοκιμές είναι ότι διατηρώντας σταθερή την ποσότητα πρόπολης που προστίθεται για την παρασκευή του συμπλόκου, η βέλτιστη αναλογία προστιθέμενων ποσοτήτων τροποποιημένου αμύλου προς πρόπολη, είναι 2:1, (που αντιστοιχεί στα Σ 10, Σ 11 και Σ 12).



Σχήμα Ζ. 26. Συγκριτική παράθεση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη μέθοδο Folin- Ciocalteu σε σχέση με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και την αναγωγικής δύναμη.

Συγκεκριμένα, όπου η αναλογία μάζας πρόπολης /τροποποιημένου αμύλου ήταν 2:1 δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των συμπλόκων ούτε στην αναγωγική δύναμη που εμφάνιζαν και διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του διαλύματος τροποποιημένου αμύλου (0.25, 0.5, 1 %) δεν έχει επίδραση στην τελική αντιοξειδωτική δράση του παρασκευάσματος. Παρόμοια με τα παραπάνω ήταν και τα αποτελέσματα της σειράς παρασκευασμάτων όπου η αναλογία μάζας πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου ήταν 1:1. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων των αναλογιών 1:1 και 2:1, διαπιστώνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση δεν επηρεάστηκε από την αναλογία μάζας πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο.

Για τα Σ 10, Σ 11 και Σ 12 σύμπλοκα, όπου η αναλογία τροποποιημένου αμύλου ήταν διπλάσια της προπόλης, τόσο η περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες και η αντιοξειδωτική δράση, όσο και η αναγωγική δύναμη παρουσιάζονταν αυξημένες.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται πλήρως και μέσω της μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων Σ 4 – Σ 12, έναντι του *Staphylococcus aureus*, αφού στα δείγματα όπου η αναλογία μάζας πρόπολης/τροποποιημένο άμυλο ήταν 2:1 και 1:1, δεν υπήρχε διαφορά στην αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων. Ενώ όπως

προανέφερα, στα δείγματα όπου η αναλογία τροποποιημένου αμύλου ήταν διπλάσια της πρόπολης, η αντιμικροβιακή δράση των παρασκευασμάτων ήταν αυξημένη.

Z. 9. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη με προέλευση από τα Καλάβρυτα

– Απομίμηση συνθηκών παρασκευής τροφίμου–

Λαμβάνοντας υπόψη τις βιολογικές δράσεις της πρόπολης (αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, επουλωτικές κτλ.), συμπεραίνουμε ότι η παρασκευή ενός σκευάσματος που θα περιέχει εκχύλισμα πρόπολης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας για την πρόληψη και θεραπεία της φθοράς του δέρματος, καθώς και για την επούλωση ουλών από εγκαύματα και κυρίως για την θεραπεία μικροβιακών μολύνσεων, μυκητιάσεων, αφού ο τελικός στόχος είναι να εκδηλώνει δραστηριότητα στο περιβάλλον. Ωστόσο, κατά την παραγωγή αυτού του σκευάσματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η απελευθέρωση του εκχυλίσματος από το εγκλεισμένο σύμπλοκο.

Εδώ και πολλά χρόνια έχει τεθεί ως αντικείμενο διαφωνίας, αν κατά τη μελέτη απελευθέρωσης, το μέτρο της απελευθέρωσης των εγκλεισμένων συστατικών αποτελεί και μέτρο προσδιορισμού της βιοδιαθεσιμότητάς του. Η πλειοψηφούσα γνώμη έχει καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι *in vitro* δοκιμές απελευθέρωσης μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της βιοδιαθεσιμότητας της πρόπολης και για την αρχική επιλογή των σκευασμάτων που παρήχθησαν πειραματικά. (Marquele *et al.*, 2006)

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, μελετήθηκε αρχικά, η απελευθέρωση των εγκλεισμένων συμπλόκων σε υδατικό διάλυμα, που προσομοιάζει το περιβάλλον παρασκευής των τροφίμων στα οποία μπορεί να ενσωματωθεί με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε αντιοξειδωτικές ενώσεις (πολυφαινόλες) όπως χυμοί.

Z. 9. 1. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη από τα Καλάβρυτα με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων

Z. 9. 1. 1. Μελέτη απελευθέρωσης πολυφαινόλων από το σύμπλοκο Σ2 (PTM 2) σε υδατικό διάλυμα σε σχέση με το χρόνο

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση της μεθόδου Folin-Ciocalteu, για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές, παρουσιάζονται στον πίνακα **ΣΤ. 6**. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του αρχικού PE από τα Καλάβρυτα, που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συμπλόκου Σ 2, όπως προσδιορίστηκε με την ίδια μέθοδο, ήταν 250,55 mg καφεϊκού οξέος/g καθαρής πρόπολης, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος Folin-Ciocalteu, δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο, αφού προκύπτει % απόδοση που κυμαίνεται από 160-513 %.

Η % απόδοση των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα όπως προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu, υπολογίστηκε με βάση 2 παραμέτρους:

1. την περιεκτικότητα των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα ,σε ολικές πολυφαινόλες (μg καφεϊκού οξέος), στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές που μελετάται η απελευθέρωση, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις που έχουν γίνει και τη συγκέντρωση καθαρής πρόπολης στην οποία αντιστοιχούν οι εξεταζόμενες ποσότητες των συμπλόκων
2. την περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες του αρχικού αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του αντίστοιχου συμπλόκου (Καλάβρυτα).

Απόδοση πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2
Ακολουθεί ενδεικτική παρουσίαση των υπολογισμών με βάση το δείγμα Σ 2 (5 λεπτά):

Όπως προσδιορίστηκε από τη μέθοδο Folin- Ciocalteu, με βάση το μέσο όρο απορροφήσεων και την εξίσωση πρότυπης καμπύλης καφεϊκού οξέος ($y = 0,0091x + 0,002$), η περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες της εξεταζόμενης ποσότητας του συμπλόκου που αντιστοιχεί σε 0,6 mg καθαρής πρόπολης (εκτενής περιγραφή ποσοτήτων στο πειραματικό μέρος, τμήμα **Ε. 2. 8. 2**). Τα αποτελέσματα για το σύμπλοκο Σ 2 (5 λεπτά) ήταν 445,05 mg καφεϊκού οξέος/g καθαρής πρόπολης και για το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τα Καλάβρυτα ήταν 250,55 mg καφεϊκού οξέος/ g καθαρής πρόπολης

Η % απόδοση πολυφαινολικών συστατικών από το δείγμα Σ 2 υπολογίζεται από την εξίσωση:

% απόδοση Σ 2 =

$$[\text{mg καφεϊκού οξέος/g καθαρής πρόπολης } \Sigma 2 / (\text{mg καφεϊκού οξέος/g καθαρής πρόπολης PE Καλάβρυτα})] * 100$$

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και μέσω της χρησιμοποίησης της μεθόδου δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές καθώς και από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της αναγωγικής δύναμης των συστατικών που απελευθερώνονται. (**Πίνακας ΣΤ. 13**) Συγκεκριμένα, προκύπτει εκτίμηση της απόδοσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται από το Σ 2, που κυμαίνεται από 21-658 %, σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα του αρχικού PE από τα Καλάβρυτα. Η διακύμανση της εκτίμησης της απόδοσης της αναγωγικής δύναμης των συστατικών κυμαίνεται από 2187- 4010%, σε σχέση με την αναγωγική δύναμη του αρχικού PE από τα Καλάβρυτα (3,13 mg ασκορβικού οξέος /g καθαρής πρόπολης). (**Πίνακας ΣΤ. 17**)

Z. 9. 1. 2. Μελέτη απελευθέρωσης πολυφαινολών από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση της μεθόδου Folin-Ciocaltaeu, για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα στα 180 λεπτά, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και την αναγωγική τους δύναμη, παρουσιάζονται στους πίνακες ΣΤ. 5., ΣΤ. 12., ΣΤ. 16., αντίστοιχα. Επιβεβαιώνεται, με αυτό τον τρόπο η προηγούμενη παρατήρηση που αφορά στην ακαταλληλότητα των φασματοφωτομετρικών μεθόδων Folin- Ciocaltaeu, DPPH και αναγωγικής δύναμης, για τις μελέτες απελευθέρωσης, αφού και σε αυτή την περίπτωση, προκύπτει ότι η απόδοση των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο κυμαίνεται μεταξύ 279-1455% και επίσης, η εκτίμηση της απόδοσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που απελευθερώνονται που κυμαίνεται από 304-2290 % σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα του αρχικού PE από τα Καλάβρυτα και τέλος η εκτίμηση της απόδοσης της αναγωγικής δύναμης των συστατικών που κυμαίνεται από 2543-4680 % του αρχικού PE Καλαβρύτων.

Η μελέτη των αποτελεσμάτων που προκύπτουν μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας, όπως παρατίθεται παρακάτω, αποδίδει την πραγματική σημασία των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές.

Z. 9. 2. Μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη από τα Καλάβρυτα με τη χρησιμοποίηση συμπλόκων πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, μέσω αέριας χρωματογραφίας.

Z. 9. 2. 1. Μελέτη διαλυτότητας των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη από τα Καλάβρυτα

Η πρόπολη περιέχει πληθώρα συστατικών τα οποία είναι αδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα. Για την πλήρη επιβεβαίωση της παραλαβής των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα πρόπολης, μελετήθηκε η διαλυτότητα των

συστατικών που περιέχονται σε καθαρή πρόπολη, (από PE, μετά από εξάτμιση του διαλύτη) με προέλευση από τα Καλάβρυτα, στα 180 λεπτά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα **ΣΤ. 20, ΣΤ. 21**.

Ο προσδιορισμός της κατανομής των επιμέρους συστατικών δείχνει ότι οι σημαντικότερες ενώσεις που απελευθερώνονται σε υδατικό διάλυμα είναι: το καφεϊκό οξύ, το φερρουλικό, η ρεσβερατρόλη, το p-κουμαρικό οξύ και το κινναμικό οξύ ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση εντοπίζεται η απελευθέρωση του ολεανολικού οξέος. Με βάση τις καμπύλες αναφοράς φαίνεται ότι η χρυσίνη, η ναριγκενίνη και η καμφορόλη, οι οποίες περιέχονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο PE από τα Καλάβρυτα, ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης και έτσι δεν ποσοτικοποιήθηκαν. Οι πολυφαινολικές ενώσεις αυτές είναι γνωστό και από τη βιβλιογραφία ότι δεν διαλύονται σε υδατικά διαλύματα. (πίνακες 9, 11, 12).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του αρχικού PE από τα Καλάβρυτα, όπως προκύπτει μέσω της ίδιας μεθόδου (πίνακας ΣΤ 2), το οποίο ήταν 127289,25 μg/g καθαρής πρόπολης, προσδιορίστηκε η απόδοση των συστατικών που απελευθερώνονται στο νερό από το δείγμα πρόπολης, 44,03 %.

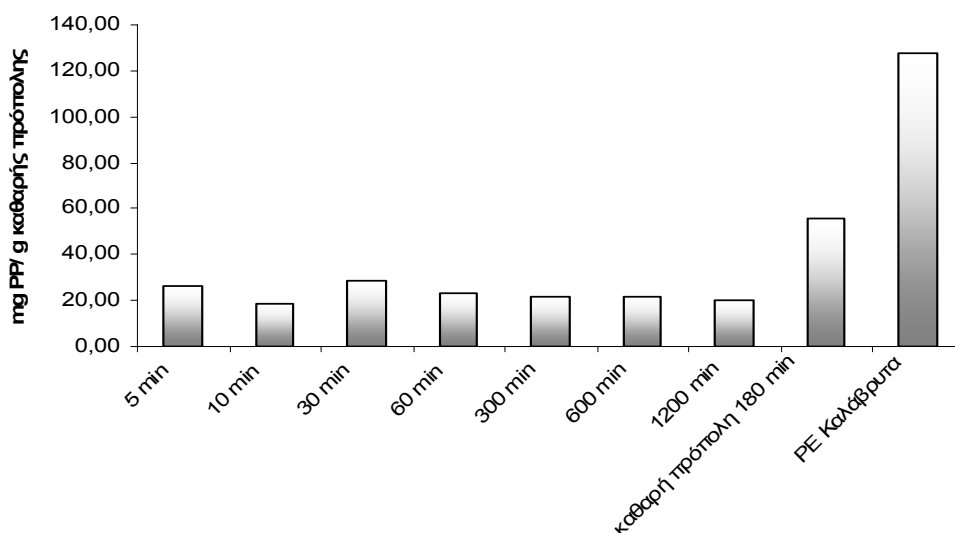
Για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη, επιχειρήθηκε η μελέτη απελευθέρωσης των συμπλόκων εγκλεισμού σε τροποποιημένο άμυλο.

Z. 9. 2. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο Σ2 σε υδατικό διάλυμα σε σχέση με το χρόνο

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση της αέριας χρωματογραφίας, για τον προσδιορισμό των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές, παρουσιάζονται στον πίνακα **ΣΤ. 20**. Ο προσδιορισμός της κατανομής των επιμέρους ενώσεων δείχνει ότι οι σημαντικότερες ενώσεις που απελευθερώνονται σε όλες τις χρονικές στιγμές είναι κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων: η χρυσίνη, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, η ναριγκενίνη, η καμφορόλη, το κινναμικό οξύ και η ρεσβερατρόλη, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντοπίζεται και η απελευθέρωση του ολεανολικού οξέος. Το

χλωρογενικό οξύ, η κερκετίνη, η μυρισετίνη, το ο-κουμαρικό οξύ, το p-OH-φαινυλακετοξικό, η ομοβανιλλική αλκοόλη, το 3-4 διυδροξύ-φαινυλακετοξικό και το σιναπικό οξύ εντοπίζονται σε σχεδόν μηδενικές συγκεντρώσεις.

Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου που απελευθερώνεται από το Σ 2, σε σχέση με το σύνολο των φαινολικών ενώσεων που απελευθερώνονται από το δείγμα καθαρής πρόπολης φαίνεται ότι η διαλυτότητα της χρυσίνης, της ναριγκενίνης και της καμφερόλης οι οποίες ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης στο υδατικό διάλυμα καθαρής πρόπολης, αυξήθηκε μέσω της συμπλοκοποίησης και η απελευθέρωση των ενώσεων αυτών ανιχνεύτηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επίσης, προκύπτει ότι η απελευθέρωση από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, περιορίζεται περίπου στο $\frac{1}{2}$ της απελευθέρωσης των φαινολικών ενώσεων από το δείγμα καθαρής πρόπολης (56,05 mg συστατικών/g καθαρής πρόπολης), ανεξάρτητα από το χρόνο διερεύνησης (**Σχήμα Ζ. 27**).



Σχήμα Ζ. 27. Προσδιορισμός ενώσεων που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, σε σχέση με την καθαρή πρόπολη και το αρχικό PE

Μια πιθανή εξήγηση για την μειωμένη συγκέντρωση των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο είναι ότι ο γαλακτωματοποιητής (Tween – 80),

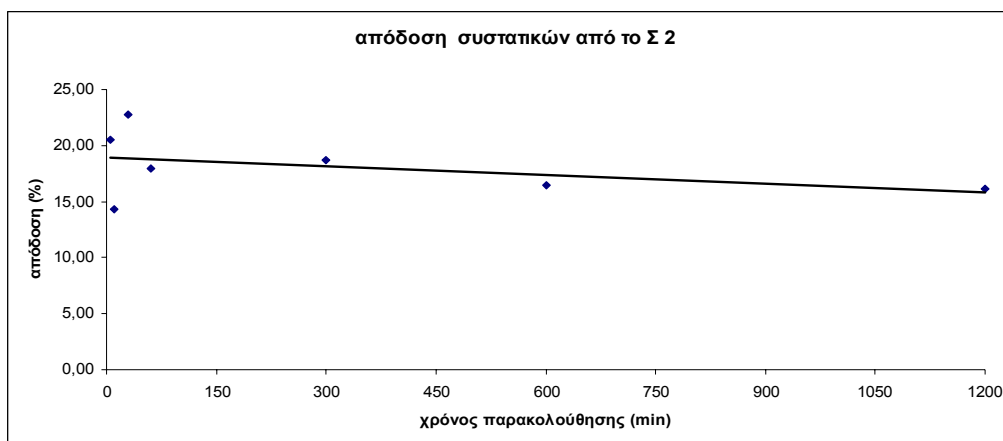
παρεμποδίζει την απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης από το σύμπλοκο, αφού συγκρατεί τη πρόπολη δεσμευμένη, όπως αναφέρεται και στο **τμήμα Ζ. 7.**, όπου φαίνεται ότι ο ισχυρός δεσμός που δημιουργεί ο γαλακτωματοποιητής με το σύμπλοκο, παρεμποδίζει την εκδήλωση αντιμικροβιακής δράσης

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενου του αρχικού ΡΕ από τα Καλάβρυτα, όπως προκύπτει μέσω της ίδιας μεθόδου (SIM) (πίνακας ΣΤ 2), το οποίο ήταν 127289,25 μg/g καθαρής πρόπολης, προσδιορίστηκε η απόδοση των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα **Ζ. 5.**

Πίνακας Ζ. 5. Απόδοση συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκο Σ 2, σε υδατικό διάλυμα, στα: 5, 10, 30, 60, 300, 600, 1200 λεπτά.

Δείγμα	Χρόνος διερεύνησης της απελευθέρωσης (min)	mg συστατικών/g καθαρής πρόπολης	Απόδοση συστατικών (%)
Σ 2	5	26,14	20,54
Σ 2	10	18,28	14,36
Σ 2	30	28,97	22,76
Σ 2	60	22,83	17,93
Σ 2	300	23,79	18,69
Σ 2	600	20,91	16,42
Σ 2	1200	20,47	16,08

Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων της εκτίμησης της απόδοσης των συστατικών που απελευθερώνονται από το Σ 2, σε σχέση με τον χρόνο προκύπτει ότι διατηρείται σχετικά σταθερή με την μέγιστη απελευθέρωση από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, να εμφανίζεται στα 30 λεπτά και έπειτα να παρουσιάζεται μια μικρή μειωτική τάση. (**Σχήμα Ζ. 28**).



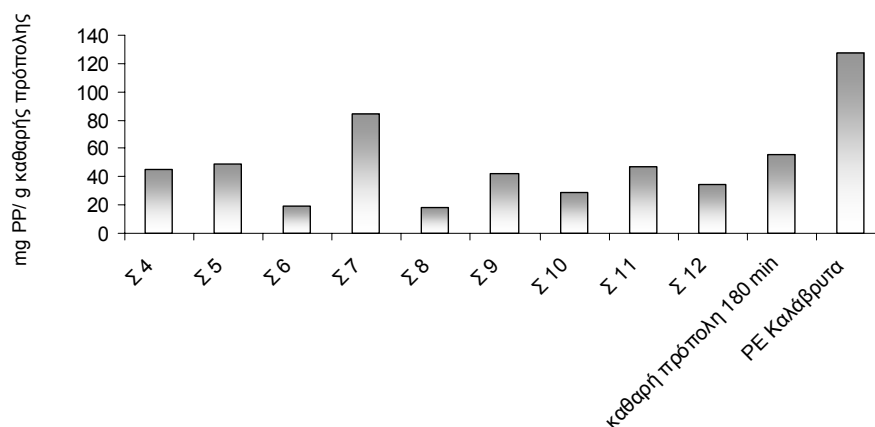
Σχήμα Ζ. 28. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο Σ 2 σε διάφορους χρόνους

Ζ. 9. 2. 3. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από τα σύμπλοκα Σ 4 – Σ 12 σε υδατικό διάλυμα

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση της αέριας χρωματογραφίας, για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα, στα 180 λεπτά, παρουσιάζονται στον πίνακα **ΣΤ. 21**. Ο προσδιορισμός της κατανομής των επιμέρους συστατικών δείχνει ότι οι σημαντικότερες ενώσεις που απελευθερώνονται από όλα τα υπό μελέτη σύμπλοκα για τη δεδομένη χρονική στιγμή, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων είναι: η χρυσίνη, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το κινναμικό οξύ, η καμφερόλη, η ναριγκενίνη, το φλωρετικό οξύ και η ρεσβερατρόλη, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντοπίζεται και η απελευθέρωση του ολεανολικού οξέος. Το χλωρογενικό οξύ, η γενιστεΐνη, η μυρισεΐνη, το o-κουμαρικό οξύ, το p-OH-φαινυλακετοξικό, η ομοβανιλική αλκοόλη, το 3,4-διυδροξύ-φαινυλακετοξικό και το σιναπικό οξύ εντοπίζονται σε σχεδόν μηδενικές συγκεντρώσεις.

Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου που απελευθερώνεται από τα σύμπλοκα Σ 4 – Σ 12, σε σχέση με το σύνολο των φαινολικών ενώσεων που απελευθερώνονται από το δείγμα καθαρής πρόπολης φαίνεται ότι η διαλυτότητα της χρυσίνης, της ναριγκενίνης, της καμφερόλης και του

φλωρετικού οξέος, τα οποία ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης στο υδατικό διάλυμα καθαρής πρόπολης, αυξήθηκε μέσω της συμπλοκοποίησης και η απελευθέρωση των ενώσεων αυτών ανιχνεύτηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επίσης προκύπτει ότι η απελευθέρωση από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, είναι περίπου ίση ή και μεγαλύτερη από αυτή που προσδιορίστηκε από το δείγμα καθαρής πρόπολης (56,05 mg PP/ g καθαρής πρόπολης), με εξαίρεση το σύμπλοκο Σ 8 που προσδιορίζεται περίπου το ½ του συνόλου των φαινολικών ενώσεων που απελευθερώνονται από το δείγμα καθαρής πρόπολης και το σύμπλοκο Σ 7 όπου προσδιορίζεται περίπου το διπλάσιο ποσό από αυτό του συνόλου των φαινολικών ενώσεων που απελευθερώνονται από το δείγμα καθαρής πρόπολης (**Σχήμα Ζ. 29**)



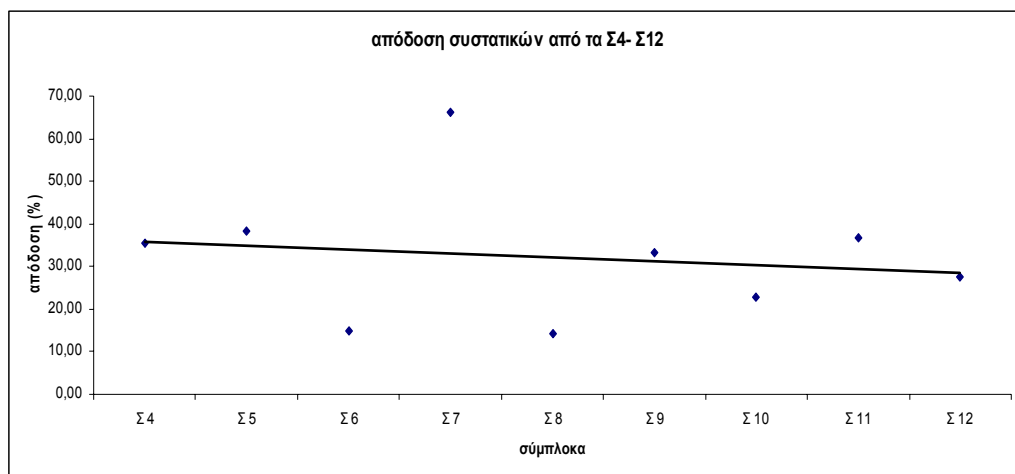
Σχήμα Ζ. 29. Προσδιορισμός ενώσεων που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ 2), σε διάφορους χρόνους, σε σχέση με την καθαρή πρόπολη και το αρχικό PE

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του αρχικού PE από τα Καλάβρυτα, όπως προκύπτει μέσω της ίδιας μεθόδου (SIM) (πίνακας ΣΤ 2), το οποίο ήταν 127289,25 μg/g καθαρής πρόπολης, προσδιορίστηκε η απόδοση των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ 4- Σ 12, στα 180 λεπτά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα **Ζ. 6**.

Πίνακας Ζ. 6. Απόδοση συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 σε υδατικό διάλυμα, στα 180 λεπτά

Δείγμα	Αναλογία μάζας πρόπολης/ τροποποιημένο άμυλο	mg συστατικών /g καθαρής πρόπολης	Απόδοση συστατικών (%)
Σ 4	2:1	45,14	35,46
Σ 5	2:1	48,99	38,48
Σ 6	2:1	18,91	14,86
Σ 7	1:1	84,45	66,34
Σ 8	1:1	17,99	14,13
Σ 9	1:1	42,36	33,28
Σ 10	1:2	26,54	22,75
Σ 11	1:2	46,09	36,76
Σ 12	1:2	34,88	27,40

Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων της εκτίμησης της απόδοσης των πολυφαινολικών συστατικών από τα Σ 4- Σ 12, σε σχέση με τις αναλογίες πρόπολης/ τροποποιημένου αμύλου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή, δεν παρουσιάστηκε συγκεκριμένη τάση απελευθέρωσης (**Σχήμα Ζ. 30.**).



Σχήμα Ζ. 30. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από τα σύμπλοκα Σ4-Σ12 στα 180 λεπτά.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη απελευθέρωσης σε υδατικό διάλυμα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η απελευθέρωση των συστατικών από τα σύμπλοκα πρόπολης/ τροποποιημένου αμύλου, είναι ανεξάρτητη από τις αναλογίες πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή και επίσης η χρησιμοποίηση του γαλακτωματοποιητή (Tween – 80), παρεμποδίζει την απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης από το σύμπλοκο, αφού συγκρατεί τη πρόπολη δεσμευμένη στο σύμπλοκο. Επίσης φαίνεται ότι η διαλυτότητα της χρυσίνης, της ναριγκενίνης και της καμφερόλης αυξήθηκε μέσω της συμπλοκοποίησης της πρόπολης και η απελευθέρωση των ενώσεων αυτών ανιχνεύτηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλα τα υπό μελέτη σύμπλοκα.

Z. 9. 3. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης/

τροποποιημένου αμύλου σε όξινο και αλκαλικό pH – Απομίμηση συνθηκών πεπτικού σωλήνα-

Τα περισσότερα συστατικά του εκχυλίσματος της πρόπολης είναι βιοδραστικά, ως αντιφλεγμονώδη αναφέρονται οι: καμφερόλη, γαλαγκίνη, κερκετίνη κ.α. Ως αντιμικροβιακά τα: p-κουμαρικό οξύ, 3-πρενύλ-4-διδυδροκινναμολόξυ-κινναμικό οξύ, πινοσεμπρίνη κ.α. Ως αντιοξειδωτικά τα: απιγενίνη, ναριγκενίνη, καφεϊκό οξύ κ.α. Ως αντικαρκινικά τα: αρτεπιλλίνη C, PMS-1 διτερπένιο (clerodane type), CAPE κ.α. (Banskota, 2001). Επομένως η μελέτη της απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων συστατικών της πρόπολης, σε συνθήκες που προσομοιάζουν το ανθρώπινο σώμα, με στόχο να διερευνηθεί ο χρόνος και το σημείο απελευθέρωσης, με βάση το pH, στον πεπτικό σωλήνα, μετά από κατανάλωση τροφίμου εμπλουτισμένου με πρόπολη, θεωρείται κρίσιμης σημασίας.

Ένας ακόμη στόχος ήταν η μελέτη της απελευθέρωσης των συστατικών που περιέχονται στο αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης σε διαφορετικό pH από αυτό των υδατικών διαλυμάτων (pH=7,84), ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της ενεργούς οξύτητας στην διαδικασία της απελευθέρωσης και στην αποδέσμευση του γαλακτωματοποιητή από το σύμπλοκο. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε (1) η διερεύνηση της απελευθέρωσης σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=1,2 προς απομίμηση των συνθηκών του

στομάχου και (2) σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=8 προς απομίμηση των συνθηκών του εντέρου.

Z. 9. 3. 1. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο Σ 2 σε σχέση με το χρόνο σε pH= 1,2

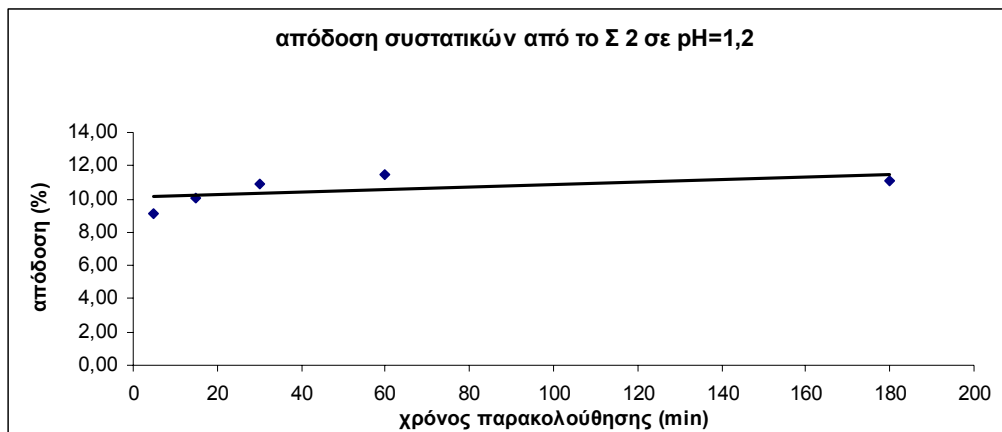
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση της αέριας χρωματογραφίας, για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 σε pH= 1,2 στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές, παρουσιάζονται στον πίνακα ΣΤ. 22. Ο προσδιορισμός της κατανομής των επιμέρους φαινολικών ενώσεων δείχνει ότι οι σημαντικότερες ενώσεις που απελευθερώνονται για όλες τις χρονικές στιγμές είναι κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων: το καφεϊκό οξύ, του οποίου οι συγκεντρώσεις αυξάνονται όσο προχωρά ο χρόνος (η μεγαλύτερη προσδιορισμένη συγκέντρωση εντοπίζεται στα 180 λεπτά), η χρυσίνη, το φερουλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, η καμφερόλη και το κινναμικό οξύ, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντοπίζεται και η απελευθέρωση του ολεανολικού οξέος.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του αρχικού ΡΕ από τα Καλάβρυτα, όπως προκύπτει μέσω της ίδιας μεθόδου (πίνακας ΣΤ 2), το οποίο ήταν 127289,25 μg/g καθαρής πρόπολης, προσδιορίστηκε η απόδοση των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα Ζ. 7.

Πίνακας Ζ. 7. Απόδοση συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 σε pH= 1,2, στα: 5, 15, 30, 60, 180 λεπτά.

Δείγμα	Χρόνος διερεύνησης της απελευθέρωσης (min)	mg συστατικών/g καθαρής πρόπολης	Απόδοση συστατικών (%)
Σ 2	5	11,58	9,10
Σ 2	15	12,79	10,04
Σ 2	30	13,86	10,89
Σ 2	60	14,63	11,50
Σ 2	180	14,14	11,11

Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων της εκτίμησης της απόδοσης των πολυφαινολικών συστατικών από το Σ 2, σε pH= 1,2 σε σχέση με τον χρόνο προκύπτει ότι διατηρείται σχετικά σταθερή. Παρατηρείται μια ελαφρά αυξητική τάση, με την μέγιστη απελευθέρωση από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, να εμφανίζεται στα 60 λεπτά (Σχήμα Ζ. 31).



Σχήμα Ζ. 31. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ 2), σε όξινο pH, σε διάφορους χρόνους

Ζ. 9. 3. 2. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο Σ2 σε σχέση με το χρόνο, σε pH=8

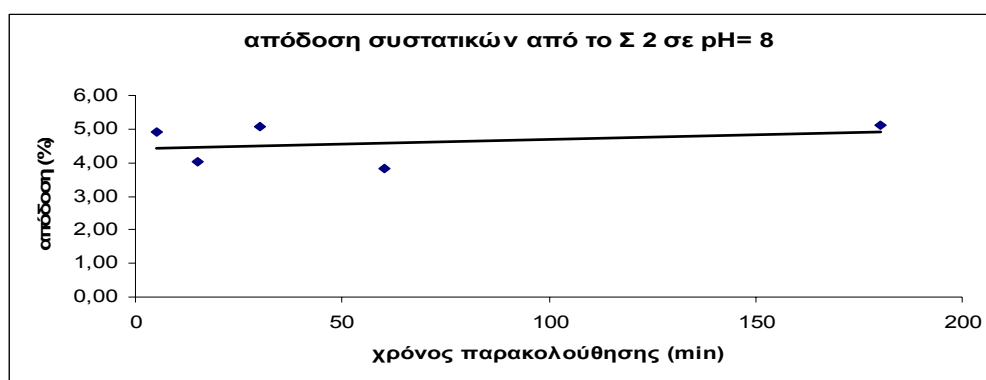
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση της αέριας χρωματογραφίας, για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 σε pH= 8, στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές, παρουσιάζονται στον πίνακα ΣΤ. 23. Ο προσδιορισμός της κατανομής των επιμέρους συστατικών δείχνει ότι οι σημαντικότερες ενώσεις που απελευθερώνονται για όλες τις χρονικές στιγμές είναι κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων: το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, η χρυσίνη, το κινναμικό οξύ και το p-OH-βενζοϊκό οξύ, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντοπίζεται και η απελευθέρωση του ολεανολικού οξέος.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του αρχικού ΡΕ από τα Καλάβρυτα, όπως προκύπτει μέσω της ίδιας μεθόδου (πίνακας ΣΤ 2), το οποίο ήταν 127289,25 $\mu\text{g/g}$ καθαρής πρόπολης, προσδιορίστηκε η απόδοση των πολυφαινολικών συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2, σε $\text{pH}=8$ στις υπό μελέτη χρονικές στιγμές και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα **Z. 8**.

Πίνακας Z. 8. Απόδοση συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 σε $\text{pH}=8$, στα: 5, 15, 30, 60, 180 λεπτά.

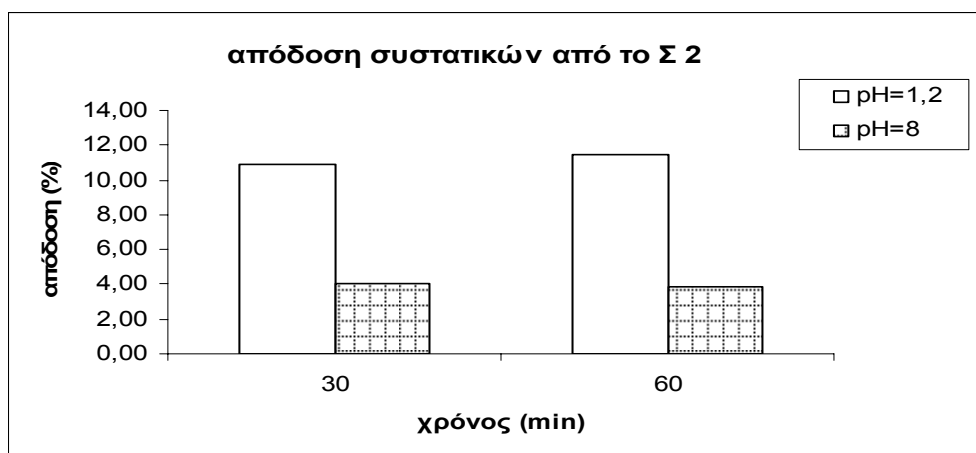
Δείγμα	Χρόνος διερεύνησης της απελευθέρωσης (min)	mg συστατικών/g καθαρής πρόπολης	Απόδοση συστατικών (%)
Σ 2	5	10,77	8,46
Σ 2	15	8,85	6,95
Σ 2	30	11,13	8,75
Σ 2	60	8,37	6,58
Σ 2	180	11,19	8,79

Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων της εκτίμησης της απόδοσης των συστατικών από το Σ 2, σε $\text{pH}=8$, σε σχέση με τον χρόνο προκύπτει ότι διατηρείται σταθερή, με γραμμική τάση, με την μέγιστη απελευθέρωση από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, να εμφανίζεται στα 180 λεπτά (**Σχήμα Z. 32**).



Σχήμα Z. 32. Μελέτη απελευθέρωσης συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου (Σ 2), σε αλκαλικό pH , σε διάφορους χρόνους.

Συγκρίνοντας την απόδοση των συστατικών που απελευθερώνονται από το σύμπλοκο Σ 2 σε σχέση με την ενεργό οξύτητα στην οποία μελετήθηκε η απελευθέρωση, προκύπτει ότι σε όξινο pH η απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη, είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται σε αλκαλικό pH και αυτό πιθανών να οφείλεται στο γεγονός ότι η αποδέσμευση του γαλακτωματοποιητή από το σύμπλοκο είναι μεγαλύτερη σε όξινο pH. (Σχήμα Z. 33).



Σχήμα Z. 33. Συγκριτική παράθεση αποδόσεων των συστατικών που απελευθερώνονται από το Σ 2 σε pH 1,2 και pH 8, σε 30 και 60 λεπτά.

Παρόλα αυτά, για την απόλυτη εξαγωγή τεκμηριωμένων συμπερασμάτων, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο εύρος ενεργούς οξύτητας και με τη χρησιμοποίηση περισσότερων συμπλόκων με διάφορες αναλογίες δραστικής ουσίας/μέσου εγκλεισμού.

Συμπεράσματα

Deleted: Η.

Πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ο χαρακτηρισμός αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης (PE) από περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου (Αχαΐα: Καλάβρυτα, Αρκαδία: Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά και Τρίκορφο, Ρέθυμνο: Αλοϊδες, Τήνος: Πύργος, Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελος: Γλώσσα και Κύπρος: Λάρνακα), μέσω ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των συστατικών που περιέχονται στα δείγματα με τη χρήση της μεθόδου αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS).

Γενικά, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο είδος και τις ποσότητες των διαλυτών συστατικών που περιέχονται στα ακατέργαστα δείγματα πρόπολης (40 – 55 % για τα περισσότερα δείγματα). Επίσης, η περιεκτικότητα του διαλύτη εκχύλισης σε αιθανόλη, δεν μεταβάλλει σημαντικά την ποσότητα των συστατικών που εκχylίζονται από τα δείγματα της ακατέργαστης πρόπολης. Επομένως φαίνεται ότι η ποιότητα της πρόπολης διατηρείται σταθερή.

Οι σημαντικότερες πολυφαινόλες που ταυτοποιήθηκαν, κατά σειρά μειούμενων συγκεντρώσεων σε όλα τα PE ήταν: η χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη, ο 3-O-αιθυλεστέρας της πινομπανκσίνης, η πινομπανκσίνη, το καφεϊκό οξύ, η καμφορόλη, το φερουλλικό οξύ και η ναριγκενίνη, ενώ το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο κυμάνθηκε από 10 μέχρι 265 mg/g καθαρής πρόπολης. Η χρυσίνη ήταν η σημαντικότερη πολυφαινόλη που προσδιορίστηκε στα περισσότερα χερσαία PE και στο δείγμα από τη Σκόπελο, ενώ η σημαντικότερη πολυφαινόλη που ποσοτικοποιήθηκε στα νότια νησιωτικά δείγματα και την Καρδίτσα, ήταν η πινοσεμπρίνη. Φαίνεται επίσης ότι η απιγενίνη απουσίαζε από τα νησιωτικά δείγματα. Όσον αφορά στα τερπενικά οξέα, παρατηρούνται σε όλα τα PE αυξημένες συγκεντρώσεις του ολεανολικού οξέος, του δίδρο-αβιετικού οξέος και του ισοπιμαρικού οξέος, με εξαίρεση το δείγμα από τη Μεγαλόπολη. Η συγκέντρωση του αβιετικού οξέος ήταν επίσης αυξημένη σε όλες τις περιπτώσεις και ιδιαίτερα στο δείγμα από τα Καλάβρυτα κάτι που πιθανώς οφείλεται σε φυτογεωγραφικές παραμέτρους, όπως η ύπαρξη πεύκων (*Pinus*), αφού είναι γνωστό ότι στο ρετσίνι του πεύκου περιέχονται

Deleted: -

Deleted: πινομπανκσίνης

Deleted: η πινομπανκσίνη

Deleted: PE

Deleted: και αυτό

Deleted: πιθανών

Deleted: να

τερπενικά οξέα και κυρίως αβιετικό οξύ. Η ολική συγκέντρωση τερπενικών οξέων κυμάνθηκε από 6 μέχρι 634 mg/g καθαρής πρόπολης.

Deleted: 50 μέχρι 1105 mg/g καθαρής πρόπολης.

Τα δείγματα πρόπολης από την Ελλάδα και την Κύπρο φαίνεται να έχουν μικτή βοτανική προέλευση, από πεύκα και λεύκες, αφού περιέχουν τόσο τις χαρακτηριστικές πολυφαινόλες που εκκρίνονται από τους οφθαλμούς της λεύκας, όσο και τα χαρακτηριστικά τερπενικά οξέα του ρετσινιού του πεύκου. Όλα τα συστατικά που ποσοτικοποιήθηκαν από τα δείγματα εκδηλώνουν ισχυρές βιολογικές δράσεις

Deleted: ΑΥΤΗ Η ΠΑΡΑΓΡΑΦΟΣ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΜΠΕΙ ΚΑΤΙ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΟΥΨ

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, για τα PE κυμάνθηκε από 80 έως 339 mg CAE/g καθαρής πρόπολης ανάλογα με την προέλευση. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσίασε το δείγμα πρόπολης από την Πελοπόννησο (Μεγαλόπολη) ενώ τη μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασε το δείγμα πρόπολης από την Κρήτη (Ρέθυμνο). σε συμφωνία με την αντιοξειδωτική ικανότητα που κυμάνθηκε από 84 έως 277 mg ισοδυνάμων Trolox /g καθαρής πρόπολης και την αναγωγική δύναμη που κυμάνθηκε από 2,14 έως 3,34 mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέως /g καθαρής πρόπολης, ανάλογα με την προέλευση. Επίσης βρέθηκε ότι με στατιστική βεβαιότητα 99,9% ($p < 0,001$), οι σημαντικότερες συσχετίσεις εντοπίστηκαν μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου GC-MS με αυτά της μεθόδου Folin-Ciocalteu και της μεθόδου προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης, με συντελεστές συσχέτισης $r = 0,940$ και $r = 0,923$, αντίστοιχα. Επομένως οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την γρήγορη και εύκολη διεξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την διακύμανση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων πρόπολης και την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Deleted: με

Deleted: και ήταν σε αντιστοιχία

Deleted:

Deleted: και

Deleted: καθώς επίσης

Deleted: μεταξύ

Deleted: συντελεστή

Μέσω της μελέτης της περιεκτικότητας των PE σε επιμέρους και ολικές πολυφαινόλες με τις μεθόδους αέριας χρωματογραφίας, και Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας που επιδεικνύουν, βρέθηκε ότι από την στιγμή της συλλογής της πρόπολης και αφού ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την συντήρηση και αποθήκευση των ακατέργαστων δειγμάτων, η παρέλευση του χρόνου, μέχρι τουλάχιστον 3 χρόνια, όταν μελετήθηκαν τα δείγματα, δεν προκάλεσε μείωση στην περιεκτικότητα της σε πολυφαινόλες, οπότε δεν είχε ως αποτέλεσμα υποβάθμιση της ποιότητας του ακατέργαστου δείγματος.

Επιχειρήθηκε, επίσης, για πρώτη φορά ο εγκλεισμός εκχυλίσματος πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο, β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και ζελατίνη. Η χρήση των κλασσικών μεθόδων επιβεβαίωσης της μικροενθυλάκωσης μεμονωμένων συστατικών (Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης DSC και φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR), δεν μπορεί να εφαρμοστεί εξαιτίας της πολύπλοκης χημικής σύστασης της πρόπολης, της δυσκολίας στο χειρισμό και της εμφάνισης ποικίλων σημείων τήξης. Για το λόγο αυτό προτάθηκαν έμμεσες μέθοδοι επιβεβαίωσης: (α) μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων πρόπολης, (β) επιβεβαίωση εγκλεισμού πρόπολης σε τροποποιημένο άμυλο και β-κυκλοδεξτρίνη μέσω ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία, (γ) μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων αβιετικού οξέος, καμφερόλης, καφεϊκού οξέος, ναριγκενίνης, χρυσίνης, που αποτελούν κύρια συστατικά του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης, με β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο DSC και (δ) μελέτη διαλυτότητας της πρόπολης.

Deleted: Μελετήθηκε

Deleted:

Deleted: ς

Deleted: ς

Deleted: που περιέχονται στο

Deleted: αιθανολικό

Deleted: εκχύλισμα

Deleted: ,

Deleted: μέ

Deleted: συμπεραίνεται

Deleted: περαιτέρω

Από τη μελέτη της σταθερότητας της ελεύθερης και εγκλεισμένης πρόπολης με DSC προέκυψε ότι η πρόπολη αποτελεί μια πολύ σταθερή ουσία ως έχει και επομένως η μικροενθυλάκωσή της στις δομές του τροποποιημένου αμύλου, β-κυκλοδεξτρίνης και υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, δεν έχει ως αποτέλεσμα περαιτέρω αύξηση της σταθερότητάς της. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι το αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού για την πρόπολη, είναι η υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη η οποία μπορεί να παρέχει επιπρόσθετη προστασία σε υψηλές θερμοκρασίες (230 -330 °C). Όταν η πρόπολη προορίζεται για την αντικατάσταση συνθετικών συντηρητικών που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή τροφίμων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ενθυλακωμένη μορφή της με το επιπρόσθετο πλεονέκτημα της υδατοδιαλυτότητας, της απόσμισης και της μεγαλύτερης σταθερότητας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης DSC έδειξαν επίσης ότι το αβιετικό οξύ, η καμφερόλη, το καφεϊκό οξύ, η ναριγκενίνη, η χρυσίνη, που αποτελούν κύρια συστατικά που περιέχονται στο PE από τα Καλάβρυτα, ενθυλακώνονται επιτυχώς στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Ο εγκλεισμός του αβιετικού οξέος, της καμφερόλης και της χρυσίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη, μελετήθηκε για πρώτη φορά.

Μέσω της ανάλυσης του συμπλόκου πρόπολης σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο με αέρια χρωματογραφία, επιβεβαιώθηκε τόσο η επίτευξη

εγκλεισμού της πρόπολης στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης όσο και στη δομή του τροποποιημένου αμύλου. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το τροποποιημένο άμυλο αποτελεί αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού. Η σύγκριση της εκτίμησης απόδοσης του εγκλεισμού των 2 χρησιμοποιούμενων μέσων, β-κυκλοδεξτρίνης και τροποποιημένου αμύλου, κατέδειξε ότι, είτε το τροποποιημένο άμυλο αποτελεί αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού, είτε ότι η μέθοδος παρασκευής του συμπλόκου είναι αποτελεσματικότερη για την επίτευξη εγκλεισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σχηματιζόμενες έλικες της αμυλόζης, στο τροποποιημένο άμυλο, μπορούν να ενθυλακώσουν μεγαλομόρια και ενώσεις όπως έλαια και λίπος, όπως και αντίστοιχα συμπλέγματα στο τροποποιημένο άμυλο μπορούν να ενθυλακώσουν μεγάλα μόρια, μη εκλεκτικά. Αντίθετα η εσωτερική διάμετρος της β-κυκλοδεξτρίνης παρέχει την δυνατότητα δέσμευσης φαινολικών δακτυλίων και την απομάκρυνση των συστατικών που δεν εκδηλώνουν λειτουργικές ιδιότητες. Οπότε τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη διερεύνηση του εγκλεισμού στις υπό μελέτη δομές, συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Deleted: '

Deleted: Μέσω της

Deleted: ς

Deleted: υποδεικνύεται

Deleted: ότι

Deleted: θεωρείται

Deleted: ως προς

Διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της πρόπολης, που προστίθεται σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης, η επίτευξη εγκλεισμού στην β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να επιβεβαιωθεί έμμεσα, αφού η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, όπως προκύπτει μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κυκλοδεξτρίνης και έτσι η ενθυλακωμένη μορφή της, όταν βρίσκεται σε μορφή σκόνης, μπορεί να προστεθεί σε τρόφιμα που έχουν ως βάση το νερό εξασφαλίζοντας την παρουσία της πρόπολης σε διαλυτή μορφή.

Deleted: (Hermansson & Svegmak, 1996), ενώ η εσωτερική διάμετρος της β-κυκλοδεξτρίνης παρέχει την δυνατότητα δέσμευσης φαινολικών δακτυλίων και την απομάκρυνση, σε μικροσκοπικό επίπεδο, των συστατικών που δεν εκδηλώνουν λειτουργικές ιδιότητες. Οπότε τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη διερεύνηση του εγκλεισμού στις υπό μελέτη δομές, συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.¶

Η μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συμπλόκων πρόπολης σε β-κυκλοδεξτρίνη, έναντι του *Staphylococcus aureus* έδειξε ότι η β-κυκλοδεξτρίνη δεν αποτελεί το καλύτερο μέσο εγκλεισμού της πρόπολης, διότι τα σύμπλοκα αυτά δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση και μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο εγκλεισμός των βιοδραστικών συστατικών στη β-κυκλοδεξτρίνη, ίσως να μην γίνεται σε ικανοποιητικό βαθμό ώστε να εκδηλώσει δραστηριότητα. Αξίζει δε ακόμα να σημειωθεί, όταν χρησιμοποιήθηκε β-κυκλοδεξτρίνη και υδρόξυ-πρότυλο-β-κυκλοδεξτρίνη ως μέσα εγκλεισμού, προέκυψε ότι ο δεύτερος φορέας έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα, αφού η προσθήκη υδρόξυ-πρότυλ- ομάδας αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης

Deleted: αποτελεί το γεγονός

Deleted: το ποσοστό εγκλεισμού

Deleted: είναι

Deleted: ό επίπεδο

Deleted: ότι από την σύγκριση των αποτελεσμάτων

Deleted: προκύπτει

και συνεπώς την υδατοδιαλυτότητα του συμπλόκου, οπότε με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών της στο υπόστρωμα.

Κατά την παρασκευή των συμπλόκων τόσο με ζελατίνη όσο και με τροποποιημένο άμυλο προστέθηκε ποσότητα του μη ιονικού γαλακτωματοποιητή Tween-80. Η προσθήκη αυτή γίνεται γιατί έχει βρεθεί ότι η δέσμευση των προς εγκλεισμό συστατικών στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο αυξάνεται με τη χρήση γαλακτωματοποιητή, επειδή η προσθήκη του σε συνδυασμό με την ακολουθούμενη ομογενοποίηση δημιουργεί μια μορφή μικρογαλακτώματος. Από τη γενική **επισκόπηση** των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι όσο αύξανε η ποσότητα του τροποποιημένου αμύλου τόσο αύξανε η αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι ο αυξημένος αριθμός μορίων τροποποιημένου αμύλου παρέχει την δυνατότητα δέσμευσης μεγαλύτερου αριθμού δραστικών ενώσεων της πρόπολης. Επίσης, φαίνεται ότι η προσθήκη Tween-80 στα σύμπλοκα είτε μείωσε σε πολύ σημαντικό βαθμό την αντιμικροβιακή δράση τους είτε την εξαφάνισε.

Στην περίπτωση που το μέσο εγκλεισμού είναι η ζελατίνη όπου η ίδια ως πρωτεΐνη έχει γαλακτωματοποιητική ικανότητα, η χρήση του γαλακτωματοποιητή δημιουργεί ένα φυσικοχημικά λιγότερο σταθερό σύμπλοκο σε σχέση με το σύμπλοκο που το μέσο εγκλεισμού είναι το τροποποιημένο άμυλο, όπου είναι δυνατή η απελευθέρωση συστατικών σε υδατικό μέσο, γι' αυτό και τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση εκδήλωσε το σύμπλοκο πρόπολης σε ζελατίνη με 1:2 αναλογία μάζας πρόπολης/ζελατίνης.

Η βέλτιστη αναλογία μάζας (α) πρόπολης και (β) μέσου ενθυλάκωσης για την παρασκευή του συμπλόκου εγκλεισμού με τροποποιημένο άμυλο μελετήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και τη μέθοδο αναγωγής του Fe^{3+} . Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει, από όλες τις φασματοφωτομετρικές δοκιμές είναι ότι διατηρώντας σταθερή την ποσότητα πρόπολης που προστίθεται για την παρασκευή του συμπλόκου (0,03 g), η βέλτιστη αναλογία προστιθέμενων ποσοτήτων τροποποιημένου αμύλου προς πρόπολη, είναι 2:1.

Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι Folin-Ciocalteu, δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης, δεν μπορούν να

Deleted: t

Deleted: (τιμή HLB=80)

Deleted: (Rabiskova *et al.*, 1998, Grassi *et al.*, 2000)

Deleted: επισκόπηση

Deleted: ,

Deleted: με την παράλληλη προσθήκη 20 ml H₂O ??σε πόση ποσότητα συμπλόκου??.

χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση προσδιορισμού των συστατικών που απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου.

Από τον αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό των συστατικών που απελευθερώνονται από καθαρή πρόπολη σε υδατικό περιβάλλον, βρέθηκε ότι το ποσοστό των συστατικών που απελευθερώνονται είναι 44,03 %, με σημαντικότερη φαινολική ένωση από πλευράς συγκεντρώσεων το καφεϊκό οξύ. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη απελευθέρωσης σε υδατικό διάλυμα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η απελευθέρωση των φαινολικών συστατικών από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, είναι ανεξάρτητη από τις αναλογίες πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή και επίσης η χρησιμοποίηση του γαλακτωματοποιητή (Tween – 80), παρεμποδίζει την απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης από το σύμπλοκο, αφού συγκρατεί τη πρόπολη δεσμευμένη. Επίσης φαίνεται ότι η διαλυτότητα της χρυσίνης, της ναριγκενίνης και της καμφερόλης αυξήθηκε μέσω της συμπλοκοποίησης της πρόπολης και η απελευθέρωση των ενώσεων αυτών ανιχνεύτηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις από όλα τα υπό μελέτη σύμπλοκα.

Deleted: Μέσω της χρησιμοποίησης αέριας χρωματογραφίας, για

Deleted: ,

Deleted: είναι

Η μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών από σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου σε όξινο και αλκαλικό pH, προς απομίμηση των συνθηκών του γαστρικού σωλήνα, έδειξε ότι σε pH= 1,2, η σημαντικότερη ένωση που απελευθερώνεται είναι το καφεϊκό οξύ, του οποίου οι συγκεντρώσεις αυξάνονται όσο προχωρά ο χρόνος. Επίσης η απόδοση των συστατικών σε σχέση με τον χρόνο διατηρείται σταθερή με την μέγιστη απελευθέρωση από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, να εμφανίζεται στα 60 λεπτά. Σε pH= 8, η απόδοση των συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη, σε σχέση με τον χρόνο, διατηρείται σταθερή, με γραμμική τάση, με την μέγιστη απελευθέρωση από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, να εμφανίζεται στα 180 λεπτά.

Deleted: γαστρεντερικού σωλήνα

Deleted: %

Deleted: προκύπτει ότι

Deleted: %

Deleted: προκύπτει ότι

Σε όξινο pH η απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη, είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται σε αλκαλικό pH και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αποδέσμευση του γαλακτωματοποιητή από το σύμπλοκο. Παρόλα αυτά, για την απόλυτη εξαγωγή τεκμηριωμένων συμπερασμάτων, χρειάζεται

Deleted: των δεσμών

περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο εύρος ενεργούς οξύτητας και με τη χρησιμοποίηση
περισσότερων συμπλόκων με διάφορες αναλογίες δραστικής ουσίας/μέσου εγκλεισμού.

Deleted: ¶
¶

Περίληψη

Η πρόπολη είναι ένα φυσικό προϊόν το οποίο παράγεται από τις μέλισσες μέσω της συλλογής φυτικών ρητινών, κυρίως από τους οφθαλμούς των φυτών, και η σύνθεσή της διαφέρει, ανάλογα με την βοτανική και γεωγραφική της προέλευση και την εποχή συλλογής της. Εκδηλώνει αντιμικροβιακές, αντισηπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, επουλωτικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες.

Deleted: μια φυσική ουσία η οποία

Deleted: που

Deleted: ,

Deleted: Εκδηλώνει

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε, για πρώτη φορά, ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών που περιέχονται στα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης (PE) από περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου (Αχαΐα: Καλάβρυτα, Αρκαδία: Μεγαλόπολη, Μεσσηνία: Αρφαρά και Τρίκορφο, Ρέθυμνο: Αλοϊδες, Τήνος: Πύργος, Καρδίτσα: Λουτρό, Σκόπελος: Γλώσσα και Κύπρος: Λάρνακα), μέσω αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS). Οι σημαντικότερες πολυφαινόλες που ταυτοποιήθηκαν, σε όλα τα PE, ήταν: η χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη, ο 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, η πινομπανκσίνη, το καφεϊκό οξύ, η καμπερόλη, το φερουλλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και η ναριγκενίνη. Το συνολικό περιεχόμενο κυμάνθηκε από 10 μέχρι 265 mg/g καθαρής πρόπολης. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αποτελεσμάτων αυτών με τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους Folin-Ciocalteu, μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας και μέτρησης αναγωγικής δύναμης, με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις, να παρουσιάζει το δείγμα πρόπολης από την Μεγαλόπολη και τη μικρότερη το δείγμα από το Ρέθυμνο. Στα περισσότερα PE, παρατηρήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις τερπενικών οξέων (ολεανολικού οξέος, δίδρο-αβιετικού οξέος ισοπιμαρικού οξέος) και ιδιαίτερα στο δείγμα από τα Καλάβρυτα. Η ολική συγκέντρωση κυμάνθηκε από 6- 634 mg/g καθαρής πρόπολης ανάλογα με την προέλευση.

Deleted: Λουτρό

Deleted: ο 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, και η πινομπανκσίνη,

Deleted: χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη, ο 3-O-αιθυλ-εστέρας της πινομπανκσίνης, η πινομπανκσίνη και το συνολικό περιεχόμενο κυμάνθηκε από 10 μέχρι 265 mg/g καθαρής πρόπολης.

Deleted: ε όλα τ

Deleted: και η

Deleted: 50 μέχρι 1105

Τα δείγματα πρόπολης από τις διάφορες περιοχές, φαίνεται να έχουν μικτή βοτανική προέλευση, από πεύκα και λεύκες, αφού περιέχουν τόσο τις χαρακτηριστικές πολυφαινόλες που εκκρίνονται από τους οφθαλμούς της λεύκας, όσο και τα χαρακτηριστικά τερπενικά οξέα του ρετσινιού του πεύκου.

Deleted: (Μήπως δεν το δώσουμε τελικά τόσο ψηλό)

Μελετήθηκε για πρώτη φορά ο εγκλεισμός εκχυλίσματος σε τροποποιημένο άμυλο, β-κυκλοδεξτρίνη, υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και ζελατίνη. Από τη μελέτη

Deleted:

της σταθερότητας ελεύθερης και εγκλεισμένης πρόπολης, μέσω της μεθόδου Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), βρέθηκε ότι η πρόπολη αποτελεί μια πολύ σταθερή ουσία ως έχει και επομένως η μικροενθυλάκωσή της στις παραπάνω υδρόφιλες δομές, δεν έχει ως αποτέλεσμα περεταίρω αύξηση της σταθερότητάς της. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι το καλύτερο προστατευτικό μέσο εγκλεισμού είναι η υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη η οποία μπορεί να παρέχει επιπρόσθετη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Μέσω αέριας χρωματογραφίας διαπιστώθηκε ότι το τροποποιημένο άμυλο αποτελεί αποτελεσματικότερο μέσο εγκλεισμού του εκχυλίσματος πρόπολης απ'ότι η β-κυκλοδεξτρίνη και η βέλτιστη αναλογία μάζας (α) πρόπολης, (β) μέσου ενθυλάκωσης για την παρασκευή του συμπλόκου εγκλεισμού με τροποποιημένο άμυλο διαπιστώθηκε ότι είναι 1:2. Παρόλα αυτά η συμπλοκοποίηση της πρόπολης με β-κυκλοδεξτρίνη εξασφαλίζει αύξηση της διαλυτότητάς της στο νερό ώστε η ενθυλακωμένη μορφή της, να μπορεί να προστεθεί σε τρόφιμα που έχουν ως βάση το νερό διασφαλίζοντας την παρουσία της πρόπολης σε διαλυτή μορφή και επίσης παρέχει την δυνατότητα δέσμευσης φαινολικών δακτυλίων και την απομάκρυνση, σε μικροσκοπικό επίπεδο, των συστατικών που δεν εκδηλώνουν λειτουργικές ιδιότητες.

Μέσω της μελέτης σχηματισμού των συμπλόκων των κύριων συστατικών που περιέχονται στο ΡΕ από τα Καλάβρυτα (αβιετικό οξύ, καμφερόλη, καφεϊκό οξύ, ναριγκενίνη, χρυσίνη), με DSC, επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής εγκλεισμός στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Η ενθυλάκωση του αβιετικού οξέος, της καμφερόλης και της χρυσίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη, μελετήθηκε για πρώτη φορά.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα από τη μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συμπλόκων πρόπολης έναντι του *Staphylococcus aureus*, έδειξαν ότι το καλύτερο μέσο εγκλεισμού της είναι η ζελατίνη με 1:2 αναλογία μάζας πρόπολης/ζελατίνης.

Deleted: Ακόμη

Η μελέτη απελευθέρωσης σε υδατικό διάλυμα, που προσομοιάζει το περιβάλλον παρασκευής των τροφίμων στα οποία μπορεί να ενσωματωθεί η πρόπολη, έδειξε ότι η απελευθέρωση των συστατικών από τα σύμπλοκα πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου, είναι ανεξάρτητη από τις αναλογίες πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή και επίσης η χρησιμοποίηση του

Deleted: φαινολικών

γαλακτωματοποιητή (Tween – 80), παρεμποδίζει την απελευθέρωση των συστατικών της πρόπολης από το σύμπλοκο, αφού συγκρατεί τη πρόπολη δεσμευμένη.

Τέλος, η μελέτη απελευθέρωσης των συστατικών από το σύμπλοκο πρόπολης/τροποποιημένου αμύλου σε όξινο και αλκαλικό pH, προς απομίμηση των συνθηκών του πεπτικού σωλήνα, έδειξε ότι σε pH= 1,2 η αποδέσμευση του γαλακτωματοποιητή από το σύμπλοκο και η απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών που περιέχονται στη πρόπολη, είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται σε pH=8.

Deleted: γαστρεντερικού

Summary

Propolis is a natural substance collected by honeybees from the exudates of certain trees and plants and its composition varies with the botanical and geographical origins and also on the season of the collection. It possesses various biological activities, such as antibacterial, antiseptic, anti-inflammatory, antioxidant, anticancer, healing and immunostimulatory properties.

In the present thesis, we determined qualitatively and quantitatively the composition of 9 different propolis ethanol extracts (PE) from different locations in Greece and Cyprus (Achaia: Kalavrita, Arcadia: Megalopolis, Messinia: Arfara and Trikorfo, Rethimno: Aloedes, Tenos: Pirgos, Karditsa: Loutro, Skopelos: Glossa and Cyprus: Larnaca), by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The major components in all of the examined PE samples were: chrysin, pinocembrin, pinobanksin 3-O-acetate, pinobanksin, caffeic acid, kaempferol, ferulic acid, p-coumaric acid and naringenin. The total polyphenol content varied from 10 to 265 mg/g propolis. There was a statistical significant correlation between these results and the results of the colorimetric methods Folin-Ciocalteu, free scavenging activity on DPPH and ferric reducing/ antioxidant power: FRAP. The sample from Megalopolis had the highest polyphenol content and the sample from Rethimno had the lowest. All samples showed high concentrations of terpenic acids (oleanolic acid, dehydroabietic acid and isopimaric acid) and the overall content varied from 6 to 634 mg/g propolis.

These samples seem to be of a mixed plant origin, from the bud exudates of poplars and also from the resin of pines. This is attributed to the fact that the determined polyphenols were characteristic from the poplar species and the terpenic acids were characteristic from the pinus species.

The molecular inclusion of the extract in modified starch, β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and gelatin, was studied for the first time. The stability of free and encapsulated propolis was examined by Differential Scanning Calorimetry. The results showed that propolis is a very stable substance and that the encapsulation in the above hydrophilic media does not offer extra protection. However, hydroxypropyl- β -cyclodextrin protects propolis from oxidation at high temperatures. Comparative studies between modified starch and β -cyclodextrin, based on the results of the quantitative

determination of the constituents that are enclosed in both media, by GC-MS, showed that the former is a better inclusion medium. This takes place when the propolis: modified starch ratio is 1:2. The encapsulation of propolis extract in β -cyclodextrin, however, increases the solubility of its constituents and the inclusion complex can be, therefore, incorporated in aqueous media and foods. Moreover, the molecular inclusion in β -cyclodextrin can be used as a method for isolation of the phenolic compounds from propolis and for the production of an extract that contains only bioactive constituents. Furthermore, the inclusion of propolis in the structure of β -cyclodextrin was confirmed by studying the encapsulation of the single substances which are the main constituents of the PE from Kalavrita (abietic acid, kaempferol, caffeic acid, naringenin and chrysin). The encapsulation of abietic acid, kaempferol and chrysin, was reported for the first time.

Antibacterial activity of propolis has been conducted by adding inclusion complexes of propolis to a broth indicative of the development of *Staphylococcus aureus*. The results of propolis to gelatin complex showed the best results when the propolis/gelatin molecular ratio was 1:2 based on the absence of the development of the bacterium.

Release experiments in aqueous media in conditions similar to those prevailing in food matrices, showed that the release of the phenolic compounds from the propolis /modified starch complexes, was not dependent on the propolis/inclusion medium ratios, used for the preparation of the encapsulated products. The use of Tween-80 as a surfactant led to the production of a physicochemical constant system, which inhibited the control release of the phenolic compounds due to the entrapment of propolis.

Finally, the release experiments in acidic or alkaline pH's in conditions similar to those prevailing in the gastrointestinal track showed that the release of the phenolic compounds from the inclusion complexes of propolis/modified starch and the enhancement of unbinding propolis from Tween-80 in pH= 1.2, was higher than that of pH= 8.

Βιβλιογραφία

- Adebowale, K. O. & Lawal, O. S. (2003). Functional properties and retrogradation behaviour of native and chemically modified starch of mucuna bean (*Mucuna pruriens*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1541–1546.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1400-1409.
- Arida, A. I. & Al-Tabakha, M. M. (2006). Encapsulation of ketoprofen for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, in press.
- Arvouet-Grand, A., Lejeune, B., Bastide, P., Pourrat, A. & Legret, P. (1993). Propolis extract. Part 6. Subacute toxicity and cutaneous primary irritation index. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 48, 165–170.
- Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C. & Popova S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis, *Z. Naturforsch*, 167–172.
- Bankova, V., Christov, R., Marcucci, C. & Popova, S. α (1998). Constituents of Brazilian geopropolis. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 53(5-6), 402-406.
- Bankova, V., Christov, R. & Delgado, T A. (1998). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, 49, 1411–1415.
- Bankova, V., De Castro, S. L. & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.-G. (2002). Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift fur Naturforschung. Journal of Biosciences*, 57(5-6), 530-533.
- Bankova V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I., Ketut, M. K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, 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.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Prasain, J. K., Matsushige, K., Saiki, I. & Kadota, S. (1998). Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *J. Nat. Prod.*, 61, 896-900.

Banskota, A. H., Tezuka, Y. & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother-Res*, 15(7), 561-71

Barbosa-Canovas, G. V., & Vega-Mercado, H. (1996). *Dehydration of Foods*, Chapman & Hall, NewYork.

Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. & Namba, T. (1996). Four Di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1479-1484.

Basnet, P., Matsuno, T. & Neidlein, R. (1997). Potent free radical scavenging activity of Propolis isolated from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch.*, 52, 828–833.

Betrolini, A.C, Siani, A.C & Grosso, R.F. (2001). Stability of monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray–Drying. *J. Agric Food Chem.*, 69, 780-785.

Bibby, D.C, Davies, N.M. & Tucker, I.G., (2000). Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 197, 1–11.

Bohlmann, F., Kramp, W., Grenz, M., Robinson, H. & King, R. (1981). Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochem.*, 20,1907–1913.

Bohlmann, F. & Grenz, M. (1970). Neue Isopentenyl-acetophenon-Derivate aus *Helianthella uniflora*. *Chem. Ber.*, 103, 90-96.

Bohlmann, F. & Zdero, C. (1976). Weitere Inhaltsstoffe aus *Baccharis conferta*. *Chem. Ber.*, 109, 1450-1452.

Bruneton, J. (1995). Pharmacognosy - Phytochemistry Medicinal plants pp. 265-311, Technique and Documentation - Lavoisier, Paris.

Bruschia, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesib, M. B. & Gremião, M. P. D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264(1-2), 45-55.

- Bugianesi, Rossana., Catasta, Giovina., Spigno, Patrizia., D'Uva, Antonio. & Maiani, Giuseppe. (2002). Naringenin from Cooked Tomato Paste Is Bioavailable in Men. *J. Nutr.*, 132, 3349-3352.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363.
- Capasso, A., Piacente, S., Pizza, C. & Sorrentino, L. (1998). Flavonoids reduce morphine withdrawal in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 561-564.
- Changa, C. P., Leung, T. K., Lin, S. M. & Hsud, C. C. (2006). Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 50, 136–140.
- Chattopadhyaya, S., Singhal, R. S. & Kulkarni, P. R. (1998). Oxidised starch as gum Arabic substitute for encapsulation of flavours. *Carbohydrate Polymers*, 37(2), 143-144.
- Chaurasia, N. & Wichtl, M. (1986). Phenylpropane und Lignane aus der Wurzel von *Urtica dioica* L. *Deut. Apoth. Z.*, 126, 1559-1563.
- Cibulková, Z., Šimon, P., Lehocký, P. & Balko, J. (2005). Antioxidant activity of p-phenylenediamines studied by DSC. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 479-486
- Clarot, D.C., Battu, S. & Cardot, P.J.P., (2000). Chromatographic of study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary phase with β -cyclodextrin as mobile phas modifier. *J. Chrom. A.*, 903, 67-76.
- Clas, S. D., Dalton, C. R. & Hancock, B. C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *PSTT* 8: 311320.
- Connors KA. (1997). The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.*, 97, 1325-1357.
- Crane, E. (1990). Bees and beekeeping, science, practice and world resources. New York: Cornell. Univ., 614.
- De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal Research Reviews*, 20(5), 323-349.

- De Vries, J.H., Hollman, P.C., Meyboom, S., Buysman, M.N., Zock, P.L., van Staveren, W.A. & Katan, M.B. (1998). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 60–65
- Debiaggi, M., Tateo, F., Pagani, L., Luini, M. & Romero, E., (1990). Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication, *Microbiologica*, 13, 207–213.
- Delarue, J. & Giampaoli, P. (2000). Study of Interaction Phenomena between Aroma compounds and Carbohydrate Matrixes by Inverse Gas Chromatography. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48, 2372-2375.
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H. & Dandiya, P. C., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 77–82.
- Ebihara, K., Shiraishi, R., & Okuma, K. (1998). Hydroxypropyl-modified potato starch increases fecal bile acid excretion in rats. *Journal of Nutrition*, 128, 848–854.
- El Hady, Abd. F. K. & Hegazi, A. G. (2002). Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Z. Naturforsch*, 57, 386-394
- El-khawaga, Om-Ali., Y., Salem, Tarek., A. & Elshal, Mohamed., F. (2003). Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chimica Acta.*, 338(1-2), 11-16.
- Eliadou, K., Yannakopoulou, K., Rontoyianni, A. & Mavridis, I. M. (1999). NMR detection of simultaneous formation of [2]- and [3]- pseudorotaxanes in aqueous solution between α - cyclodextrin and linear aliphatic α , ω - amino acids, an α , ω - diamine and an α , ω - diacid of similar length and comparison with the solid state structures. *J. Org. Chem.*, 64, 6217-6226.
- Esposito, E., Cortesi, R. & Nastruzzi, C. (1996). Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials*, 17, 2009-2020.
- FAO. (2007). Value-Added Products From Beekeeping. Chapter 5.

- Fang, J., Xia, C., Cao, Z., Zheng, J. Z., Reed, E. & Jiang, B. H. (2005). Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J.*, 19(3), 342-53.
- FDA. (1990). Modified fast: A sometime solution to a weighty problem. *Consumer magazine*: 10-17.
- Fellows, P. J. (2000). *Food Processing Technology – Principles and Practice*, 2nd ed., Woodhead Pub Ltd, Cambridge.
- Field Quellen Simon, (2006), Ingretients.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M. & Guimarães, S. (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, 13(3), 170-175.
- Fu, B., Xue, J., Li, Z., Shi, X., Jiang, B. H. & Fang, J. (2007). Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 α through reducing hypoxia-inducible factor-1 α stability and inhibiting its protein synthesis *Molecular Cancer Therapeutic*, 6, 220-226.
- Fulianga, H.U., Hepburn, H.R., Xuana, Hongzhuan., Chenc, Minli., Dayad, S. & Radloff, S.E. (2005). Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacological Research.*, 51(2), 147-152.
- Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R. & Peterson, P., K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4⁺ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 (2), 158-163
- Ghisalberti, E.L. (1978). Propolis: a review. *Bee Wld.* 60, 59–84.
- Grassi, M., Coceani, N. & Magarotto, L. (2000). Mathematical Modeling of Drug Release from Microemulsions: Theory in Comparison with Experiments. *Journal of Colloid and Interface Science*, 228, 141–150
- Greenaway, W., Scaysbrook, T. & Whatley, F.R. (1987). The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry, *Proc. R. Soc. London B*, 232, 249–272.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R. (1990). The composition and plant origin of propolis: A report of work at Oxford. *Bee World*, 71, 107-118.
- Gibbs B.F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C.N., (1999). Encapsulation in the food industry. *Int. J. F. Sci. and Nutr.*, 50, 213-224.

- Gines, J. M., Perez-Martinez, J. I., Arias, M. J., Moyano, J. R., Morillo, E., Ruiz-Conde, A. & Sanchez-Soto, P. J. (1996). Inclusion of the herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) with β -cyclodextrin by different processing methods.
- Grobbe, A. H., Steele, P. J., Somerville, R. A. & Taylor, D. M. (2004). Inactivation of the bovine-spongiform-encephalopathy (BSE) agent by the acid and alkali processes used in the manufacture of bone gelatine. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39, 329-338.
- Grisea, F., Fernandez, M. A., Tornos, M. P., Garcia M. D., De Las Heras, B., Villar, A. M. & Saenz, M. T. (2001). Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(6), 867-872
- Havsteen, B., (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141–1148.
- Hedges, A.R. (1998). Industrial applications of cyclodextrines. *Chem Rev.*, 98, 2035-2044.
- Heinzelmann, E. & Franke, E. (1999). Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 223-229.
- Heo, H. J., Kim, M. J., Lee, J. M., Choi, S. J., Cho, H. Y., Hong, B., Kim, H. K., Kim, E. & Shin, D. H. (2004). Naringenin from *Citrus junos* has an inhibitory effect on acetylcholinesterase and a mitigating effect on amnesia. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 17(3), 151-7.
- Hirsch, J. B., & Kokini, J. L. (2002). Understanding the mechanism of cross-linking agents (POCl₃, STMP, and EPI) through swelling behaviour and pasting properties of cross-linked waxy maize starches. *Cereal Chemistry*, 79, 102–110.
- Hollands, I., Vidal, A., Gra, B. & Sotolongo, M., 1991. Evaluation of the sub-chronic toxicity of Cuban propolis. [Estudio evaluativo de la toxicidad subcronica del propoleos cubano]. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 22, 91–100.
- Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (2001). Location of sites of reaction within starch granules. *Cereal Chemistry*, 78, 173–180.

- Jakupovic, J., Warning, U., Bohlmann, F. & King, R.M. (1987). New coumaric acid derivatives and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. *Rev. Latinoamer. Quim.*, 18, 75- 77.
- Jannuzzi J. (1983). Propolis: the most mysterious hive element. *Am. Bee J.*, 573-575, 631-633.
- Januzzi, J. (1990). High profits from Lowly propolis. *Am. Bee J.*, 4, 237-238.
- Januzzi, J. (1993). Propolis collectors. *Am. Bee J.*, 6, 104-107.
- Jeong, H. J., Shin, Y. G., Kim, I. H. & Pezzuto, J. M. (1999). Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Arch Pharm Res.*, 22, 309-312.
- Jeon, Y. J., Vasanthan, T., Temelli, F. & Song, B. K. (2003). The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Research International*, 36, 349-355.
- Kanakdande, D., Bhosale, R. & Singhal, R., S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers, Article in Press*.
- Karathanos, V. T., Mourtzinou, I., Yannakopoulou, K. & Andrikopoulos, N. K. (2007). Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 101 652–658.
- Kartal, M., Kaya, S. & Kurucu, S. (2002). GC-MS Analysis of Propolis Samples from Two Different Regions of Turkey. *Z. Naturforsch*, 57, 905-909
- Kaur, L., Singh, N., & Singh, J. (2004). Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 55, 211–223.
- Kaushik, Vikas. & Roos, Yrjo, H.V. (2006). Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. in press.
- Kedzia, B., Geppert, B. & Iwaszkiewicz, J. (1990). Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis, *Phytothérapie*, 6, 7–10.
- Kim, H. R., Hermansson, A. M., & Eriksson, C. E. 1992. Structural characteristics of hydroxypropyl potato starch granules depending on their molar substitution. *Starch*, 44, 111–116.

- Kimoto, T., Koya, S., Hino, K., Yamamoto, Y. & Nomura, Y. (2000). Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Pathol. Int.*, 50, 679–689.
- King P. J., Ma G., Miao W., Jia Q., McDougall B. R., Reinecke M. G., Cornell C., Kuan J., Kim T. R. & Robinson Jr. W. E. (1999). Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type I integrase and replication, *J. Med. Chem.*, 42, 497-509.
- Kirilmaz, S., SonmezLevent, Y. M., Yücel, B. & Yilmaz, B. (2005). The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 371-376.
- Kokkinou, A., Yannakopoulou, K, Mavridis, I. M. & Mentzafos, D. (2001). Structure of the complex of β -cyclodextrin with β -naphthoxyacetic acid in the solid state and in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 332, 85-94.
- Krishnan, S., Bhosale, R. & Singhal, R., S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61(1), 95-102.
- Kuentz, M., Egloff, P. & Rothlisberger, D. (2006). A technical feasibility study of surfactant-free drug suspensions using octenyl succinate-modified starches. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, 37–43.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christov, R. & Popova, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins *J Ethnopharmacol*, 64, 235–40.
- Lajos, Szente L. & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137-142.
- Le-Van, N. & Van Cuong Pham, T. (1981). An unusual m-hydroxyacetophenone and three chromanone derivatives from *Chrysothamnus viscidiflorus*. *Phytochemistry*, 20, 485-487.
- Lee, P. S., Hana, Jin-Yi, Song, T. W., Sung, J. H., Kwon Oh-Seung, Songa, S. & Chung, Y. B. (2006) Physicochemical characteristics and bioavailability of a novel

intestinal metabolite of ginseng saponin (IH901) complexed with α -cyclodextrin *International Journal of Pharmaceutics*, 316, 29–36.

Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 57-68.

Loftsson, T. & Brewster, M.E. (1996). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins Drug Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.*, 85, 1017-1025.

Loftsson, T. & Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, 225, 15-30.

Loftsson, T., Masson, M. & Brewster, M.E. (2003). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*, 93(5), 1091-1099.

Lu, L. C., Chen, Y. W. & Chou, C. C. (2003). Antibacterial and DPPH Free Radical-scavenging Activities of the Ethanol Extract of Propolis Collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(4), 277-282.

Lu, L. C., Chen, Y. W. & Chou, C. C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 213-220.

Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24(8), 1171 – 1179.

Magnusdottir, A., Masson, M. & Loftsson T. (2002). Cyclodextrines. Incl. Phenom. Macro. *Chem.*, 44, 213-218.

Marquele, F. D., Oliveira, A. R.M., Bonato, P. S., Lara, M. G. & Fonseca., M. J. V. (2006). Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2), 461-468.

Marquez, N., Sancho, R., Macho, A., Calzado, M. A., Fiebich, B. L. & Munoz, E. (2004). Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF- κ B transcription factors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3), 993-1001.

- Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., & Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42(1) 205-211.
- Marucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26, 83–99.
- egri, G., Marcucci M.C., Salatino, A. & Salatino, M.L.F. (1998). Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*, 29, 305–314.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., & Tomas-Barberan. F. A. (1997). Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *J. Agric. Food Chemistry*, 45, 2824-2829.
- Mason, N., Joye, N. M. & Lawrence, R.V. (1967). Resin acid composition of pine oleoresins. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 12, 279-282
- Meier, M., Luiz, M., Szpoganicz, B. & Soldi, V. (2001). Thermal analysis behavior of α - and β - cyclodextrin inclusion complexes with capric and caprylic acid. *Thermochimica Acta*, 375, 153-160.
- Mele, Á., Mendichi, R. & Selva, A. (1998). Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with trans- α -carotene in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 310, 261-267.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70(6), 515-519.
- Mohn, W. W. (1995). Bacteria Obtained from a Sequencing Batch Reactor that are capable of growth on Dehydroabietic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(62), 145–2150
- Moorhouse, S. & Grundon, V. (1994). Encapsulation: A New Concept for the Food Industry? *Nutrition & Food Science*, 94 (2), 17-19.
- Mourtzis, N., Cordoyiannis, G., Nounesis, G. & Yannakopoulou, K. (2003). Single and double threading of Congo Red into γ -cyclodextrin. Solution structures and thermodynamic parameters of 1:1 and 2:2 adducts, as obtained from NMR spectroscopy and microcalorimetry. *Supramolecular Chemistry*, 15(7-8), 639-649.

- Mourtzis, N., Eliadou, K. & Yannakopoulou, K. (2004). influence of host's substitution on the orientation of the guest: pseudo-rotaxanes of charged cyclodextrins with Methyl Orange in solution. *Supramolecular Chemistry*, 16(8), 587-593.
- Naefady, A. M., El-Shanawany, M. A., Mohamed, M. H., Hassanean, H. A.-H., Nohara, T., Yoshimitsu, H. (2003). Cyclodextrin-Enclosed Substances of Brazilian Propolis. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(8) 984—985.
- Naidu, N. B., Chowdary, K. P. R., Murthy, K. V. R., Satyanarayana, V., Hayman, A. R. & Becket, G. (2004). Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam–cyclodextrin binary systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 75–86.
- Niering, P., Michels, G., Wätjen, W., Ohler, S., Steffan, B., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P. & Kahl, R. (2005). Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: Implication of oxidative stress and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(2), 114-122.
- Nieva Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. & Vattuone, M. A. (2000). *J. Ethnopharmacol.*, 71, 109.
- Orsia, O. Ricardo, Sforcin, José M., Funaria, Sílvia R.C. & Bankova, V. (2005). Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against Salmonella Typhimurium. *International Immunopharmacology*, 5(2), 359-368.
- Oršolić, N. & Bašić, I. (2005). Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 37-45.
- Paynea, R. G., Yaszemskib, M. J., Yaskoc, A. W. and Mikos, A. G. (2002). Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles. *Biomaterials*, 23(22), 4359-4371.
- Pereira, D. S. A., Seixas, S. & Neto, R. F. (2002). Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova*, 25, 321–326.

- Pereira, D. S. A., Farah de Miranda A., Trugo, L. C. & Neto, F. R. (2003). Distribution of Quinic Acid Derivatives and Other Phenolic Compounds in Brazilian Propolis. *Z. Naturforsch.*, 58, 590-593.
- Perera, C., Hoover, R., & Martin, A. M. (1997). The effect of hydroxypropylation on the structure and physicochemical properties of native, defatted and heat- moisture treated potato starches. *Food Research International*, 30, 235–247.
- Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., & Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12, 221–228.
- Prytyk, E., Dantas, A. P., Salomão, K., Pereira, Dos Santos A., Bankova, V. S., De Castro, S. L. & Aquino Neto, F. R. (2003). Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 189–193.
- Rabiskova, M. & Valaskova, J. (1998). The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation. *Journal of Microencapsulation*, 15, 747-751.
- Risch, S. (1995). Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In S.J. Risch & G.A. Reineccius (Eds.), *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. (pp. 2-7). New York: ACS.
- Rozou, S. & Antoniadou-Vyza, E. (2004). Chromatographic behaviour of naproxen-cyclodextrin complexes Stationary phase C₈ alkyl chain as competitor for the drug release from cyclodextrin cavity. *Journal of Chromatography*, 1041, 187-193.
- Salatino, A., Teixeira, W. É., Negri, G. & Message, D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2(1), 33–38.
- Saxena, A., Sachin, K., Bohidar., H.B. & Verma, A. K. (2005). Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(1), 42-48.
- Scazzocchio, F., D'Auriaa, F.D., Alessandrinia, D. & Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, Article in Press, Available online 19 January
- Schrooyen P.M, Van der Meer R, De Kruif C.G., (2001). Microencapsulation:its application in nutrition. *Food Res.*, 60, 475-479.

- Serkedjieva, J., Manolova, N. & Bankova, V. (1992). Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products*, 55, 294–302.
- Sharma, S., Pillai, K.K., Husain, S.Z. & Giri, D. (1997). Protective role of propolis against alcohol–carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Indian J. Pharmacol.*, 29, 76–81.
- Singh, J., Kaur, L. & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*, 21, 1–22.
- Silici, S. & Kutluca, S. (2005) Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 69–73
- Smith, E., Williamson, E., Zloh, M. & Gibbons, S. (2005). Isopimaric Acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA Strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.*, 19, 538–542
- Sobocyanec, S., Sýverko, V., Balog, T., Šýaricā, A., Rusak, G., Likicā, S., Kusýicā, B., Katalinicā, V., Radicā, S. & Marotti, T. (2006). Oxidant/Antioxidant Properties of Croatian Native Propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8018-8026.
- Soottiantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., Forssell, P., Partanen, R., Poutanen, K. & Linko, P. (2004). Effect of Water Activity on the Release Characteristics and Oxidative Stability of D-Limonene Encapsulated by Spray-Drying. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52, 1269-1276.
- Staniforth, V., Chiu, L. & Yang, N. (2006). Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis*, 27(9), 1803-1811.
- Szente L.L. & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food. Sci. & Techn.*, 15, 137-142.
- Takahiro, M., Yuji, H., Takehiko, S. & Hiroyuki, Y. (2001). Preparation of gelatin microparticles by co-lyophilization with poly(ethylene glycol): characterization and application to entrapment into biodegradable microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 219, 127–137.

- Teixeira, W. É., Message, D., Negri, G. & Salatino, A. (2006). Bauer-7-en-3 β -yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. *Química Nova*, 29(2), 245-246
- Tikhonov, N. A. (1978). Determination of the characteristics of evaporation. *USSR Computational Mathematics and Mathematical Physics*, 18(6), 170-180.
- Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F. & Tomas-Lorente F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochem.*, 34, 191–196.
- Tomas-Barberan, F.A., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C. & Tomas-Lorente, F. (1993a). Flavonoids in honey of different geographical origin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 196, 38-44.
- Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A.-M., Avila, G., Franzblau, S., Singh, M., P., Maiese, W. M., & Timmermann, B. N. (1999). Phytochemical, Morphological, and Biological Investigations of Propolis from Central Chile. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 54, 406-416.
- Velasco, J., Andersen, M. L. & Skibsted, L. H. (2004). Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85 (4), 623-632
- Volpi, N. & Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 354–361.
- Vynograd, N., Vynograd, I. & Sosnowski, Z. (2000). A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7(1), 1-6.
- Usia, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. & Kadota, S. (2002). Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J. Nat. Prod.*, 65(5), 673-676.
- Warren, O. (1990). Propolis USA. President of beehive botanicals. *Am. Bee J.*, (4), 239-240

- Wiesława, M. (2001). Isolation of Flavonoid Aglycones from Propolis by a Column Chromatography Method and their identification by Gc-Ms and TLC Methods. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 24(8), 1171–1179.
- Wijesekera, R.O.B. (1991). The Medicine Plant Industry, pp. 115-118, CRC Press, Boca Raton Ann. Arbor Boston London.
- Wollenweber, E. & Buchmann, S.L. (1997). Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplar (*Populus* spp.), *Z. Naturforsch.*, 52, 530–535.
- Xu, A., & Seib, P. A. (1997). Determination of the level and position of substitution in hydroxypropylated starch by high- resolution ¹H-NMR spectroscopy of alpha-limit dextrans. *Journal of Cereal Science*, 25, 17–26.
- Xu, H., Zeng, F., Wan, M. & Sim, K. (1996). Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products*, 59, 643-645.
- Yannakopoulou, K., Ripemeester, J. A. & Mavridis, I. M. (2002). Release of the Prays oleae pheromone as a consequence of supramolecular structure: study of the β -cyclodextrin-(Z)-tetradec-7-en-1-al complex by X-ray crystallography and NMR spectrometry in the solid state and in solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2*, 1639-1644.
- Yellin, S., Davidson, B., Pinto, J., Sacks, P., Qiao, C. & Schantz, S. (1994). Relationship of glutathione and glutathione-S-transferase to cis platin sensitivity in human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Cancer Lett.*, 85, 223–232.
- Yuliani, S., Torley, J. P., D'Arcy, B., Nicholson, T. & Bhandari, B. (2006), Extrusion of mixtures of starch and D Limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food. Res. Int.*, 39 (3), 318-331
- Zornoza A., Martin C., Sanchez M., Velaz I. & Piquer A. (1998). Inclusion complexation of glisentide with α -, β - and γ -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, 169, 239–244.
- Zdero, C., Bohlmann, F. & Niemeyer, H. M. (1991). An unusual dimeric sesquiterpene and other constituents from Chilean *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 30, 1597-1601.
- Zdero, C., Bohlmann, F. & King, R. M. (1992). Clerodane and labdane derivatives from *Olearia teretifolia*. *Phytochemistry*, 31, 1703-1711.

Ελληνική

Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης & Συσκευασίας Τροφίμων.

Μαύρος, Π. (2003). *Στοιχεία Φυσικών Διεργασιών*. Σημειώσεις Χημικού Τμήματος ΑΠΘ, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη.

Μπόσκου Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη

Καλογερόπουλος, Νικόλαος Α. (2006). ΕΔΔ 334 Καινοτομικά (Καινοφανή και Λειτουργικά) Τρόφιμα.

Καραθάνος, Θ. Β. (2006). Σημειώσεις Φυσικοχημείας Τροφίμων, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής και Διαιτολογίας, Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων.

Χαριζάνης, Πασχάλης. (1992). Η πρόπολη και πως την παρασκευάζουμε για προσωπική χρήση. *Μελισσοκομική Επιθεώρηση*,(6), 101-104.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ Θ. 1. Συστατικά των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης από την Ελλάδα και την Κύπρο, που προσδιορίστηκαν με GC/MS. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως % του συνολικού εμβαδού των χρωματογραφημάτων ολικών ιόντων.

No	Συστατικό ²²⁵	Rt	Τρίκοφο Μεσσηνία	Μεσσηνία Αρφαρά	Κύπρος 2005 A	Κύπρος 2005 B	Κύπρος 2006	Καλάβρυτα A	Καλάβρυτα B	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Αιολίδες Ρέθυμνου	Γλώσσα Σκοπέλου	Πύργος Τήνου
1	propanoic acid	4.74				0.11									
2	ethyl benzoate	5.18						0.94	0.38						
3	ethylene glycol	5.77	0.21	0.41	0.62	0.23	0.43	0.27	0.32	0.39	0.37	0.45	0.52	0.29	0.24
4	benzenethanol (phenethyl alcohol)	6.07						0.29	0.30			0.69			
5	benzoic acid	6.42						0.20		0.57	1.99				
6	3,4-methylenedioxycinnamic acid	6.73	0.31	0.57	0.93	0.47	0.64	0.45	0.49	0.53	0.58	0.68	0.80	0.47	0.41
7	glycerol	6.99	0.61	1.43	1.12	0.69	1.62	0.94	0.86	1.41	0.45	0.26	6.80	1.42	3.21
8	phenylacetic acid (proline σε αρφαρά)	7.43		0.12											
9	butanedioic acid (succinic acid) nist 90%	7.69	0.13		0.21	0.22							0.27		0.16
10	thymol	7.80		0.11				0.18	0.10			0.36			
11	malic acid (hydroxy-butanedioic) 90%	11.67	0.10	0.05	0.06				0.09	0.34			0.48	0.26	0.32
12	cinnamic acid	12.70						0.25	0.24			0.76			
13	d-glucosamine	17.06					0.39		0.26			0.53			
14	azelaic acid	18.24				0.13							0.40		
15	d-fructose	18.85	3.66	1.82	6.51	2.67	3.79			3.31	1.82		9.99	3.76	7.05
16	(d-fructose)	19.01	2.12	1.16	5.58	2.13	2.52	0.89	0.74	3.12	4.95	2.17	7.01	2.50	4.79
17	sorbose	19.10	0.31		0.87	0.15	0.98			0.38			1.22	0.31	0.69
18	inositol	19.39			1.15									0.34	
19	glucopyranose		0.53												
20	glucofuranose	19.68	0.22	0.24	0.45	0.69	0.25			0.38	0.58		0.65		0.43
21	ribitol	20.57			0.92					0.46					
22	glucopyranose	20.61	1.30	1.20	2.21	1.94	2.14			1.85	2.60		3.37	0.90	1.74
23	p-coumaric acid										0.36				
24	dibutyl phthalate (plasticizers?)	21.40			0.52		0.53								
25	d-mannitol or d-glucitol (wiley 93%)	21.55					4.42						0.75		0.47
26	d-glucose	22.41	1.90	2.02	4.05	4.57	2.85			3.26	3.96		4.82	1.08	2.86

No	Συστατικό225	Rt	Τρίκορφο Μεσσηνία	Μεσσηνία Αρφαρά	Κύπρος 2005 A	Κύπρος 2005 B	Κύπρος 2006	Καλάβρυτα A	Καλάβρυτα B	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Αιολίδες Ρέθυμνου	Γλώσσα Σκοπέλου	Πύργος Τήνου
27	3,4-dimethoxy cinnamic acid	22.71		0.29				0.37	0.28	1.13	0.63	0.74			
28	hexadecanoic acid	22.96	0.28	0.27	1.02	0.21	0.63	0.27	0.39		0.28		0.88	0.34	0.51
29	ferulic acid (wiley)	23.68		0.18						0.34	0.32	0.63			
30	ferulic acid (gbp)	23.97		0.17						0.48					
31	menthol tms, wiley	24.67	0.46	0.25		0.29								0.42	0.29
32	caffeic acid	24.84	0.25	0.85						1.56	0.81			0.20	
33	oleic acid	26.04	0.65	0.36	1.65	0.82	0.80	0.56	0.57	0.97	0.51	0.43	1.00	1.37	0.72
34	thunbergol (74%)					0.49									0.34
35	pimaric acid (wiley 94%)	27.70						2.89	2.88	0.47					
36	methyl pimarate	27.97		0.27				0.63	0.63						
37	pimaric acid	28.03	2.45	1.42		3.12	0.11				0.60		2.23	1.33	3.10
38	isopimaric acid	28.22	7.63	6.45	4.16	5.24	1.18	2.39	2.40	0.79	1.23		3.38	5.76	4.40
39	p-coumaric acid	28.57	0.54	0.82	0.61			2.95	2.85	2.13	0.80	0.48			
40	3-methyl-2-butenyl isoferulate-tms- derivative	28.68	0.19	0.34						1.22	0.54				
41	dehydroabietic acid	29.03	0.49	0.21	3.45	0.10	0.74	2.84	2.85	0.07	0.04	0.01	0.20	0.27	0.17
42	2-methyl quinoline (quinaldine)	29.11	1.35	0.98		1.21		1.15	0.94			0.34	0.95	1.52	1.32
43	p-coumaric acid	29.27	0.25	0.91						1.68	0.39			0.13	0.06
44	cinnamyl cinnamate (bankova) nist: 3,5- dihydroxybenzoic acid	29.45	0.27	1.49		0.22				1.17	0.55			0.20	0.06
45	abietic acid	29.50	0.12	0.03	1.73	0.03	0.64	29.99	32.59	0.03		0.06	0.42	0.17	0.52
46	5-hydroxy-1,7-dipheny-3-heptanone	29.58			1.78										
47	1,2,5-pentanetriol (45%)	29.79	16.84	12.43	3.03	20.43	0.72			1.38	1.90		10.52	18.57	14.46
48	δ-9-tetrahydrocannabinol acid	30.53	0.20	0.43		0.05		0.63	0.54	0.66	0.40	1.75			0.29
49	(3e,5e,7e)-6-methyl-8-(2,6,6-trimethyl- 1-cyclohexenyl)-3,5,7-octatrien-2-one	30.74	3.79	2.52	0.90	3.04					0.40	0.30	1.62	2.73	2.40
50	naloxon tms, morphinan-6-one, 4,5- epoxy-3,14-dihydroxy-17-(2-propenyl)-, (5.alpha.)-,	30.76		1.34	0.35										

No	Συστατικό225	Rt	Τρίκορφο Μεσσηνία	Μεσσηνία Αρφαρά	Κύπρος 2005 A	Κύπρος 2005 B	Κύπρος 2006	Καλάβρυτα A	Καλάβρυτα B	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Αιολίδες Ρέθυμνου	Γλώσσα Σκοπέλου	Πύργος Τήνου
51	4-(phenylazo)diphenylamine η p-phenylazodiphenylamine 95%	31.01	0.33	0.79				4.28	4.77	2.48	1.78	5.32		0.43	
52	cinnamic acid ester	31.15			7.46	0.27	5.21								
53	chalkone (2-propen-1-one, 1,3-diphenyl-) 95%,	31.25	0.23	1.37				0.55	0.43	0.35	0.72	0.84			
54	pinocembrin	31.50	5.18	5.83	3.41	4.64	0.66	7.39	6.83	8.96	18.03	11.52	4.01	4.44	5.24
55	7,8-dimethylbenzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene	31.69			1.21	0.29		0.96	0.81			1.04	0.63		0.67
56	5,10-dihydro-1,2,3,4-tetraphenylbenzocyclooctene (wiley 45%)	32.10			4.03	0.28	2.05	0.24			0.32				0.44
57	isopimaric acid (η glutaconic acid tms (2-pentenedioic acid)	32.23	27.99	19.02	5.81	33.49	0.88	0.50	0.45	1.78	2.93	1.00	14.96	28.96	22.87
58	pinobanksin (bankova)	32.33	0.40	1.08	0.53	0.16		6.81	6.21	3.38	2.59	3.70		1.52	
59	indole-2-acetic acid	32.82			0.77	1.07	0.44				0.48		0.74		1.05
60	2-hexenedioic acid	32.96	0.52	0.33		1.34							0.41	0.70	0.47
61	phenanthrene, η 3,5-di(carboethoxy)carbazole	33.31	1.21	2.68		0.33		0.43	0.58	5.54	3.37	2.81		0.73	
62	pinobanksin-3-o-acetate (bankova)	33.57	2.16	5.35	1.92	1.09	0.77	1.95	1.96	7.61	8.97	5.84	0.79	2.94	0.48
63	alpha.-d-glucopyranoside, alpha-d-fructofuranosyl	33.69	0.76	0.52	3.59	2.24	1.24			1.51	3.46		1.36	0.55	1.41
64	d-turanose	33.82			0.82	0.82				0.32	1.03				
65	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	33.93			0.81			0.66	0.81	0.63		1.73			
66	chrysine	34.06	0.79	1.13	1.35	0.63		0.49	0.46	3.06	4.50	0.92		1.73	0.51
67	thianthrene	34.26	0.31	0.34								0.75			0.24
68	1,6-dihydroxy-3-methylantraquinone	34.48	1.88	5.08	0.79			7.05	6.87	9.93	4.83	12.55		2.36	
69	galangin	34.57	0.36	0.90	3.05			1.16	1.09	1.25	0.39	1.92		0.48	0.63
70	1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone	34.69	1.57	3.33	2.39	0.16		6.95	6.65	4.37	6.04	11.42		1.49	
71	pinobanksin isobutanoate	34.98	0.64	1.04	0.50	0.35		4.17	0.48		1.23	0.73		0.59	0.40
72	2,7-dihydroxy-5-methoxy-3-	35.24	1.18	2.31	1.49		1.26	1.27	1.26	3.17	1.56	2.05		1.30	

No	Συστατικό225	Rt	Τρίκορφο Μεσσηνία	Μεσσηνία Αρφαρά	Κύπρος 2005 A	Κύπρος 2005 B	Κύπρος 2006	Καλάβρυτα A	Καλάβρυτα B	Καρδίτσα 2004	Καρδίτσα 2006	Μεγαλόπολη	Αιολίδες Ρέθυμνου	Γλώσσα Σκοπέλου	Πύργος Τήνου
	methylanthraquinone														
73	2-(3'-hydroxyphenylamino)-5-methyl-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine	35.33	0.55				0.94								0.35
74	2,4,6-trihydroxybenzoic acid (phloroglucinic)	35.47	0.20	0.24	2.83		0.94	1.55	1.44	1.11	0.53	2.15		0.41	0.74
75	1,2,8-trihydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone (wiley 70%)	35.67			1.59			0.69	0.64		0.51	1.44	0.54	0.65	
76		36.11					6.90			0.45					0.68
77	naringenin	36.26	0.58	1.41	1.05	0.23	0.41	1.22	1.18	2.47	0.84	2.64		1.20	
78	genistein														
79		36.90					27.87								0.40
80	1,2,3-triphenyl azulene						0.57								
81	p-tert butyl phenol?	37.65					2.81				0.72	0.68			
82		38.19	1.13												
83	acacetine	38.41	0.24	0.47			1.31	0.84	0.89	1.84	1.46	1.17		0.42	
84	kaempherol	39.19						0.78	0.85			0.88			
85												0.90			
86	apigenine	39.90	0.2	0.28	0.4			0.22	0.22	0.28	0.23	1.61			
87	quercetine	39.94	0.21	0.25	0.44			0.20	0.15	0.30	0.18				
88		40.25					4.64								
89		40.80						0.66	0.67	0.75		1.03			0.29
90					1.57										
91	aristolone (wiley 70%)	42.56	0.20	1.79	0.74		0.54						2.03	0.44	1.16
92	α-amyrin (93% wiley)	43.00											3.58		2.04
93	hop-22(29)-en-3.beta.-ol (49% wiley)	43.11											5.63		2.98
94		43.81					1.40					1.03	0.40		
95	urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester	44.30			0.61		1.35						1.42		0.76

Όπου A: 70% EtOH, B: 90% EtOH

