



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ

**Μελέτη φυσικών αντιοξειδωτικών και ολικών φαινολικών
σε δείγμα Δίκταμου**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**

Κιόσης Βασίλης

2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετάται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο του δείκτη Folin-Ciocalteu και η αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate) και DPPH (2,2-diphenyl-1-pic-rylhyrazyl), σε δείγμα δίκταμου.

Το εκχύλισμα του δίκταμου μελετήθηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν τον χρόνο βρασμού (1, 3, 5 λεπτά), την εμβάπτιση σε βραστό νερό (1, 3, 5 λεπτά) και την εμβάπτιση και παραμονή για 1 λεπτό σε νερό θερμοκρασίας δωματίου.

Με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Minitab απεικονίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις συγκρίσεις χρόνου βρασμού, εμβάπτισης και παραμονής σε νερό θερμοκρασίας δωματίου, καθώς και συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και προσδιορισμού ολικών φαινολικών. Οι συγκρίσεις έγιναν με την two-way ANOVA η οποία περιλαμβάνει τη σύγκριση μεταξύ δύο ή περισσότερων παραγόντων οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη μεταχείριση ενός παράγοντα.

Παρατηρούμε την αύξηση των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την αύξηση του χρόνου βρασμού, ενώ στην εμβάπτιση, παρατηρούμε την αύξηση μέχρι τα τρία λεπτά ενώ στα πέντε λεπτά παρατηρείται μικρή μείωση, τέλος η εμβάπτιση σε νερό θερμοκρασίας δωματίου οδηγεί σε τιμές πολύ χαμηλότερες από αυτές του βρασμού.

Παρατηρούμε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου προσδιορισμού ολικών φαινολικών και των μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας, με τη μέθοδο ABTS να εμφανίζει μεγαλύτερη συσχέτιση.

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
2	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	6
2.1	ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ	6
2.2	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	6
2.2.1	ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	7
2.2.2	ΔΡΟΓΟΝΕΣ	8
2.3	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ, ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, ΣΥΛΛΟΓΗ, ΞΗΡΑΝΣΗ	8
2.3.1	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ	8
2.3.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	8
2.3.3	ΣΥΛΛΟΓΗ.....	9
2.3.4	ΞΗΡΑΝΣΗ.....	10
2.4	ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ, ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ, ΕΘΝΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ	10
2.5	ΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ	11
2.5.1	ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ	11
2.5.2	ΛΙΠΑΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	13
2.5.3	ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ.....	13
2.5.4	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	13
2.5.5	ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ.....	14
2.6	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ, ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΠΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	15
2.6.1	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	15
2.6.2	ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ	16
2.6.3	ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	18
2.7	ΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ.....	19
2.8	Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	21
2.8.1	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	22
2.9	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	23
2.9.1	ΔΟΚΙΜΗ ABTS.....	23
2.9.2	ΔΟΚΙΜΗ DPPH	23
2.9.3	ΔΟΚΙΜΗ FRAP.....	23
2.9.4	ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ TLC.....	24
2.9.5	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ FOLIN – CIOCALTEU.....	24
2.9.6	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΥΠΕΡΜΑΓΓΑΝΙΚΟΥ ΚΑΛΙΟΥ (KMNO ₄).....	25
3	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
4	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
4.1	ΔΕΙΓΜΑ ΔΙΚΤΑΜΟΥ	27
4.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	27
4.3	ΟΡΓΑΝΑ	27
4.4	ΣΚΕΥΗ	28
4.5	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	28
4.5.1	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (FOLLIN – CIOCALTEU).....	28
4.5.1.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	28

4.5.1.2	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	29
4.5.1.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	29
4.5.2	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΒΤS	30
4.5.2.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	31
4.5.2.2	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ	31
4.5.2.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	32
4.5.3	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΡΡΗ.....	32
4.5.3.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	32
4.5.3.2	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΔΡΡΗ.....	33
4.5.3.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	33

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ**33**

5.1.1	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ FOLIN – CIICALTEU	33
5.1.2	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΒΤS	34
5.1.3	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΔΡΡΗ	34
5.1.4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΔΙΚΤΑΜΟΥ.....	35
5.1.4.1	ΧΡΟΝΟΣ ΒΡΑΣΜΟΥ.....	35
5.1.4.2	ΧΡΟΝΟΣ ΕΜΒΑΠΤΙΣΗΣ ΣΕ ΒΡΑΣΤΟ ΝΕΡΟ	35
5.1.4.3	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΣΕ ΝΕΡΟ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΔΩΜΑΤΙΟΥ.....	36
5.1.5	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	36
5.1.5.1	ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ	36
5.1.5.2	ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΩΝ	36

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**37**

7 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ:**37**

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....**38**

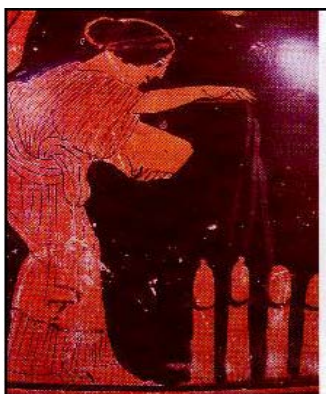
9 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**42**

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λέξη δίκταμνος είναι σύνθετη. Αποτελείται από πρώτο συνθετικό το όρος της Κρήτης, Δίκη, και από δεύτερο τη λέξη θάμνος. Ακόμα, υπάρχει και μια αρκετά εξεζητημένη εκδοχή για το δεύτερο συνθετικό, το οποίο θεωρείται ως η λέξη αμνός, λόγω του τριχωτού των φύλλων του φυτού (Θεοδοσίου, 1972).



Κατά τη Μυθολογία, ο δίκταμνος ήταν αφιερωμένος στη θεά Άρτεμη την Ειλειθυία, γιατί το φυτό, όπως και εκείνη, βοηθούσε τις γυναίκες στον τοκετό. Για το λόγο αυτό και το άγαλμα της θεάς ήταν στεφανωμένο με το φυτό αυτό. Ο Ευριπίδης σημειώνει στα “Αργοναυτικά του Ορφέως” μερικά πράγματα για το δίκταμνο, όπως και ο Όμηρος στην “Ιλιάδα” και ο Βιργίλιος (70-19 π.Χ.) στην “Αινειάδα”, όπου αναφέρουν ότι όταν πληγώθηκε ο Αινείας από βέλος, η μητέρα του η Άρτεμις, έτρεξε στην Κρήτη να αναζητήσει το φυτό που αποβάλλει τα δηλητήρια του βέλους από την πληγή και επουλώνει το τραύμα. Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Ιατρικής, γράφει για τις θεραπευτικές γυναικολογικές και άλλες ιδιότητες του φυτού. Συνήθιζε ο ίδιος να το χρησιμοποιεί για την αντιμετώπιση των φλεγμονωδών παθήσεων του δέρματος, εξελκώσεων και δοθιήνων.



Ο Αριστοτέλης αναφέρει μεταξύ των άλλων ότι οι αίγες όταν χτυπιόνταν από τα βέλη των κυνηγών αναζητούσαν το φυτό στα βουνά της Κρήτης για να το φάνε και να γιατρευτούν από το χτύπημα. Ο μαθητής του Αριστοτέλη και πατέρας της Βοτανικής, Θεόφραστος, περιγράφει το φυτό και μιλά για τις θεραπευτικές ιδιότητές του. Ο πατέρας της φαρμακογνωσίας, Διοσκουρίδης (77 μ.Χ.), αναφέρει ότι όταν το φυτό καταπίνεται, τότε εκτινάσσει τα πεθαμένα έμβρυα. Ακόμα, τονίζει ότι η μυρωδιά του διώχνει έντομα και ερπετά.

Από την αρχαιότητα ακόμα ήταν γνωστή η ιδιότητα, που είχε κυρίως το τσάι του φυτού, να προκαλεί ερωτική διέγερση και επιθυμία, κάτι που διαπιστώνεται από τις πολλαπλές σχετικές ζωγραφιές που έχουν βρεθεί κατά καιρούς σε πολλά αρχαία αγγεία κατά τις ανασκαφές. Οι Τραππιστές χρησιμοποιούσαν το δίκταμνο για την παρασκευή ενός λικέρ που έφερε το όνομά τους, τη τραππιστίνη, όπως και το λικέρ Benedictin που καθιερώθηκε από τους Βενεδεκτίνους κατά το Μεσαίωνα. Με το δίκταμνο στην αρχαιότητα ασχολήθηκαν και πολλοί άλλοι: Άρατος (305-240 π.Χ.), Ανώνυμος Βουκολικός, Κικέρων (106-43 π.Χ.), Πλούταρχος (56-127 μ.Χ.), Γαληνός (129-201 μ.Χ.), Αριστοτέλης ο Σταγειρίτης, Πλίνιος, Ορειβάσιος, Aruleius (Θεοδοσίου, 1972, Οντι Μνήμη, 1994, Ζαννετού, 2000, Σκρουμπής, 1990, Οικονομάκης, 2003).

Γενικά, το γένος *Origanum* υπάρχει σε 42 είδη που φύονται γύρω από τη μεσόγειο. Κάποια από αυτά έχουν εισαχθεί και καλλιεργηθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και σε άλλα μέρη του κόσμου. Τα περισσότερα είδη του γένους χρησιμοποιούνται ως μπαχαρικά, κάποια άλλα, παραδοσιακά, χρησιμοποιούνται για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες ενώ άλλα όπως ο δίκταμος πίνονται ως αφέψημα. (Kokkini et al., 1996)

Η παρούσα εργασία ερευνά τα ποσά φαινολικού περιεχομένου, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, που υπάρχουν σε δείγματα αφεψήματος Δίκταμου, καθώς επίσης και την αντιοξειδωτική τους δράση, με την μέθοδο του ABTS⁺. Επίσης μελετάται η μεταβολή του φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης με την πάροδο του χρόνου στα ίδια δείγματα, που έχουν παρασκευαστεί βράζοντας 2,5g δίκταμου σε 100ml νερού και, συντηρηθεί με διάφορους τρόπους όπως παραμονής το φως και στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία οικιακού ψυγείου και θερμοκρασία κατάψυξης. Τέλος, στο ψυγείο συντηρήθηκαν και μελετήθηκαν δείγματα που παρασκευάστηκαν με κλειστό και ανοιχτό βρασμό και δείγματα που αφού παρασκευάστηκαν (με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω), συμπυκνώθηκαν στο 1/3 του αρχικού όγκου τους.

2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ

Η επιστημονική βοτανική ονομασία του φυτού είναι *Origanum dictamnus* L. (= *Amaracus dictamnus*) (Lamiaceae) σύμφωνα με την Οντι Μνιμη (1994). Αρκετές φορές φέρεται και ως *Origanum creticum* Bauh., *Amaracus dictamnus* Benth., *Origanum pseudodictamnus* Sieb., *Origanum creticum*, *Latifolium tomentosum* Tournef., ενώ ως *Dictamnus creticus* όταν προορίζεται για φαρμακευτική χρήση (Πρινέας et al. 1983, Καββάδας, 1956).

Το φυτό είναι γνωστό με πάρα πολλές λαϊκές ονομασίες, κυρίως στο νησί της Κρήτης, όπου βρίσκεται ως αυτοφυές. Έτσι, αποκαλείται ως στοματόχορτο και έρωντας. Μια θεωρία είναι ότι ονομάστηκε έτσι, γιατί όταν χρησιμοποιείται προκαλεί ερωτική διέγερση, αφού πολλοί πιστεύουν πως αν ρίξουν στο ζεστό λουτρό τους φύλλα και άνθη του φυτού και μείνουν στο λουτρό μισή ώρα, τους προκαλεί το παραπάνω αίσθημα και τους διατηρεί. Επιπλέον, παίρνει ονομασίες ανάλογα με τις περιοχές στις οποίες φύεται. Κατ' αυτόν τον τρόπο το αποκαλούν Έρωντα ή Έρωτα (Λασιίθι, Ψηλορείτης, Γωνιές Μαλεβιζίου, Ασίτες, Τήλισσος κ.α.), Σταματόχορτο (Καστέλλι Κισσάμου, Σφακιά), Δίκταμνος (Μάλεσι Ιεράπετρα), Αδίχταμος (Νομός Λασιθίου) (Μπαζαίος, 1986).

2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ



ΑΘΡΟΙΣΜΑ: Spermatophyte
ΥΠΟΑΘΡΟΙΣΜΑ: Magnoliophytina
ΚΛΑΣΗ: Magnoliatae
ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Asteridae
ΤΑΞΗ: Lamiales
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Lamiaceae
(Labiatae, Χειλανθή)
ΓΕΝΟΣ: *Origanum*
ΕΙΔΟΣ: *dictamnus*
(Σκρουμπής, 1990)

2.2.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Γενικά, το φυτό ανήκοντας στην οικογένεια *Lamiaceae* παρουσιάζει τα κοινά χαρακτηριστικά της οικογένειας τα οποία είναι (Μπαμπαλώνας, Κοκκίνη, 1999):

- Ο τετράγωνος (σε εντομή) βλαστός με τα αντιθέτως φυόμενα φύλλα.
- Η διάταξη των ανθέων σε μασχαλιαίους ή ακραίους σπονδύλους όπου σχηματίζουν μονοχάσια ή διχάσια.
- Η συμπέταλη στεφάνη που αποτελείται από δύο χείλη (άνω και κάτω), κατασκευή που εξυπηρετεί τη γονιμοποίηση που γίνεται με τα έντομα (εντομογαμία).
- Ο συχνά δίχειλος, συσέπαλος κάλυκας, που περιβάλλει το σωλήνα της στεφάνης.
- Οι τέσσερις στήμονες, που είναι άνισοι και σχηματίζουν δύο ζεύγη (κοντό και μακρύ).
- Η επιφυής δικαρποφυλλική ωθήκη, που μετατρέπεται πολύ νωρίς σε τετράλοβο και παράγει 4 κάρυα μεταξύ των οποίων φύεται ο στύλος.
- Το αιθέριο έλαιο σε ειδικούς αδένες του βλαστού, των φύλλων και των ανθέων, στο οποίο οφείλεται το άρωμά του.
- Η κατασκευή των ανθέων ακολουθεί τον γενικό ανθικό τύπο $K_{(5)} \Sigma_{(5)} A_4 \Gamma_{(2)}$ (όπου K είναι ο κάλυκας, Σ η στεφάνη, A ο ανδρωνίτης και Γ ο γυναικωνίτης).

Είναι νανοφυές (~30cm ύψος (www.magdalin.com), πολυετές, αειθαλές φρύγανο. Το φυτό έχει βλαστό τετραγωνικό, πολύκλαδο σύμφωνα με το Σκρουμπή Β., (1990). Τα φύλλα του είναι ωσειδή ή σχεδόν ισοδιαμετρικά, μήκους 8-10 mm, τα οποία είναι τραχιά από την κάτω επιφάνειά τους, με πλούσια δικτυωτή νεύρωση και καλυμμένα με πυκνό άσπρο τρίχωμα, τις εριώδεις τρίχες. Άνθη ανοιχτά ρόδινα, σε κορύμβους διανθείς κεφαλιόμορφους, με μορφή ιούλων λυκίσκου, τα οποία εκφύονται από πλατιά βράκτεια με σχήμα ημικυκλικό και μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από του κάλυκα, με πυκνή δικτυωτή νεύρωση. Ο κάλυκας είναι πράσινος, μικρός, κυλινδρικός, δίχειλος με το άνω χείλος μακρύτερο και πλατύτερο από το κάτω. Η στεφάνη είναι δίχειλη, ρόδινη, με το άνω χείλος δίλοβο και το κάτω τρίλοβο. Οι στήμονες είναι τέσσερις και προεξέχουν από τη στεφάνη. Ο στύλος έχει δισχιδή μορφή. Ο καρπός είναι κάρυο με τέσσερα μελανά στίλβοντα σπέρματα όπως βλέπουμε στο σχήμα 1 (Καββαδά, 1956, Σκρουμπή, 1990).



Σχήμα 1: Ο δίκταμος σε πλήρη ανθοφορία

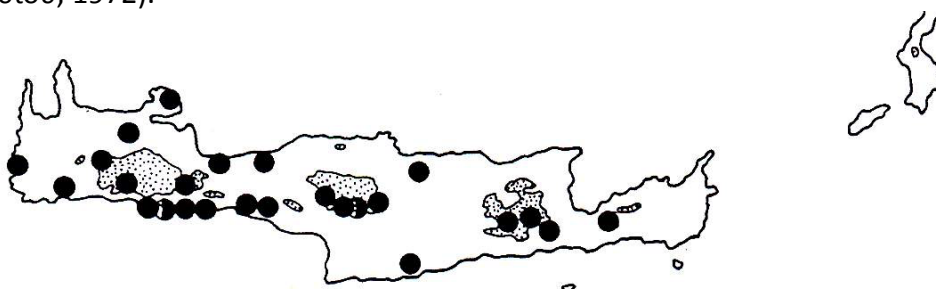
2.2.2 ΔΡΟΓΟΝΕΣ

Οι δρόγονες είναι τα χρήσιμα μέρη του φυτού, τα οποία χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς, είναι τα υπέργεια, όπως κυρίως οι ανθισμένες κορυφές του, που μαζεύονται κατά την περίοδο της άνθισης του και ξηραίνονται. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και τα φύλλα του φυτού. Και οι δύο δρόγκες φυλάσσονται σε κουτιά ή σε γυάλινα βάζα καλά σφραγισμένα, γιατί αλλιώς το φυτό χάνει τη μμυρωδιά και τις θεραπευτικές ιδιότητές του. Οι καλά αποθηκευμένες κορυφές του φυτού έχουν δυνατή μμυρωδιά σαν βάλσαμο (Πρινέας et al. 1983, Μπαζαίος, 1986).

2.3 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ, ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, ΣΥΛΛΟΓΗ, ΞΗΡΑΝΣΗ

2.3.1 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Ο Κρητικός δίκταμος αυτοφύεται σε ορεινές και λοφώδεις ασβεστολιθικές εκτάσεις, σε φαράγγια, σε γκρεμούς και βράχους των ορεινών περιοχών, κυρίως στις ανατολικές πλαγιές των βουνών Ίδης και Δίκτης της Κρήτης. Πιο συγκεκριμένα, ευρίσκεται στις βραχώδεις περιοχές του Παλαιοχωρίου Σελινίου, στα βράχια και τις απόκρημνες πλαγιές της χερσονήσου Σπάθα, στα Λευκά Όρη, τον Κίσαμο, το Σιρακάρι, Κουνένι, Σφηνάρι, Μαλεβίτσι, Κάτω Ασίτες, Ψηλορείτη, Μεσσαρά, όρος Δίχτυ, Κουρταλιώτικο, Κοτσιφού, Αγία Γαλήνη, Σπήλι, Χουδέτσι, Έμπαρος. (Θεοδοσίου, 1972).



Σχήμα 2:Εξάπλωση του φυτού σε διάφορες περιοχές της Κρήτης. (Turland,1995)

2.3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ο δίκταμος εξαιτίας της μεγάλης ζήτησής του στο εξωτερικό, αλλά και της υψηλής του τιμής, άρχισε να καλλιεργείται συστηματικά, για εμπορεία, στην Κρήτη από το 1920. Ωστόσο, σε μικρή κλίμακα, σε γλάστρες, το καλλιεργούσαν στο νησί από πολύ παλιά, και μάλιστα την εποχή της Ενετοκρατίας, άρχισε να καλλιεργείται και σε βοτανικούς κήπους του εξωτερικού. Η ετήσια παραγωγή ξηρού δίκταμου στο νομό Ηρακλείου φτάνει τους 30 τόνους ετησίως, ενώ η ποιότητα του καλλιεργούμενου είναι πολύ κατώτερη του αυτοφυούς. Το φυτό το οποίο καλλιεργείται, ευδοκίμει σε εδάφη αμμοαργιλώδη, πορώδη, καλά και βαθειά καλλιεργούμενα και άφθονα λιπαινόμενα με κοπριά, η οποία συμπληρώνεται με φωσφορικά ιόντα.

Τα εδάφη αυτά αρδεύονται δύο φορές τουλάχιστον την εβδομάδα και σκαλίζονται πολύ συχνά. Πολλαπλασιάζεται κυρίως με μοσχεύματα τα οποία πρώτα αφήνονται να ριζοβολήσουν και στη συνέχεια μεταφέρονται στον τόπο της καλλιέργειας. Τα φυτά που προκύπτουν από πολλαπλασιασμό με σπορά είναι μακροβιότερα από αυτά που προκύπτουν από τα μοσχεύματα, γιατί έχουν άφθονο και ισχυρό ριζικό σύστημα και επιπλέον έχουν μικρότερη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποια ασθένεια. Ωστόσο, από τους καλλιεργητές προτιμάται ο τρόπος με τα μοσχεύματα, επειδή η ανάπτυξη των φυτών είναι γρηγορότερη. Και στις δύο περιπτώσεις, ο πολλαπλασιασμός πρέπει να γίνεται τουλάχιστον ανά δύο χρόνια και μάλιστα από σπόρους και μοσχεύματα του αυτοφυούς φυτού. Οι ιδιότητες του φυτού μειώνονται όταν αυτό καλλιεργείται. Επιπλέον, αυτές μειώνονται ακόμα περισσότερο όταν αυτό καλλιεργείται μακριά από την Κρήτη. Η φύτευσή του στα φυτώρια γίνεται σε γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 30-60 cm και τα φυτά της κάθε γραμμής 25-35 cm (Καββάδας, 1956, Σκρουμπής, 1990, Εγκυκλοπαίδεια 'Νέα δομή' 1996, www.esoterica.gr).

Οι καλλιεργούμενοι δίκταμνοι παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ως προς το χρώμα των φύλλων, που μπορεί να είναι είτε λευκό είτε πρασινομελανί. Ακόμα, διαφέρουν και ως προς το σχήμα και το μέγεθος των φύλλων και έτσι διακρίνονται σε πλατύφυλλους, μεσόφυλλους και μικρόφυλλους. Οι πρώτοι έχουν μακριούς βλαστούς, αλλά λίγους και μεγάλα φύλλα. Οι δεύτεροι έχουν πολλούς βλαστούς ανά πυκνάδα και μεσαίου μεγέθους φύλλα, ενώ οι τρίτοι έχουν ακόμα περισσότερους βλαστούς και μικρότερα φύλλα. Από τα τρία είδη προτιμώνται οι εσώφυλλοι δίκταμνοι, γιατί τους εμπόρους τους ενδιαφέρει η ποσότητα και όχι η ποιότητα του φυτού (Καββάδας, 1956, Σκρουμπής, 1990, Εγκυκλοπαίδεια 'Νέα δομή' 1996).

Μια ομάδα ερευνητών μελέτησε τις προϋποθέσεις οι οποίες πρέπει να ισχύουν για να γίνει η βλάστηση των σπόρων του δίκταμου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο σε σταθερές θερμοκρασίες και σκοτάδι, όσο και σε συνθήκες που προσομοίαζαν αυτές που επικρατούν στο φυσιολογικό περιβάλλον του φυτού κατά την περίοδο της βλάστησής του. Παρά τις χαμηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν, φάνηκε ότι η βλάστηση του φυτού γινόταν κανονικά, αν και με ελαφρά μικρότερο ρυθμό. Επιπλέον, το φυτό έδειξε ενδιάμεση αντίδραση στο φως. Πιο συγκεκριμένα, η βλάστηση γινόταν κανονικά στο σκοτάδι, αν και ενισχυόταν σημαντικά από το κόκκινο ή λευκό φως, ιδιαίτερα σε χαμηλότερες από τις κανονικές θερμοκρασίες. Αντίθετα, βρέθηκε ότι σε φωτισμό με κόκκινο φως σε συνθήκες σκιάς, αναστέλλονταν η βλάστησή του (Thanos & Doussi, 1995).

2.3.3 ΣΥΛΛΟΓΗ

Η συλλογή του φυτού, που στην ουσία είναι η αποκοπή των βλαστών, ξεκινάει το νωρίτερο, στο δεύτερο δεκαήμερο του Μαΐου και το αργότερο, στις αρχές Ιουλίου και συνεχίζεται όλο το καλοκαίρι και μέχρι το τέλος Οκτωβρίου, διαρκεί δηλαδή, την περίοδο ανθοφορίας του φυτού. Αυτή πραγματοποιείται με ψαλίδι ή κυρτό μαχαιρίδιο και ποτέ με το χέρι για να μην τραυματιστούν οι νεότεροι βλαστοί.

Η συλλογή του αυτοφυούς φυτού είναι δύσκολη εξαιτίας της συγκεκριμένης γεωγραφικής εξάπλωσης του. Οι συλλέκτες αιωρούνται στο γκρεμό δεμένοι με σχοινιά τα οποία κρατιούνται από τους βοηθούς τους, γεγονός που είναι πολύ επικίνδυνο και έχει οδηγήσει σε πάρα πολλά ατυχήματα (Θεοδοσίου, 1972, Καββάδας, 1956, Σκρουμπής, 1990).

2.3.4 ΞΗΡΑΝΣΗ

Μετά τη συλλογή, το φυτό (βλαστοί, φύλλα, άνθη) απλώνεται για ξήρανση σε σκιερούς και καλά αεριζόμενους χώρους και μόνο όταν η ποσότητά του είναι μεγάλη και ο καιρός δροσερός εκτίθεται στον ήλιο. Η ξήρανση τελειώνει μόνο όταν η στερεή ύλη έχει το 1/3 του βάρους της συλλεχθείσας ύλης για το καλλιεργημένο φυτό και το 1/2 του βάρους για το αυτοφύες φυτό. Στη συνέχεια τοποθετείται σε σακιά από λινάτσα και είτε αποθηκεύεται σε ξηρούς χώρους, είτε προμηθεύεται στους εμπόρους, που το συσκευάζουν σε δέματα των 40-50kg, αφού απαλλαχθεί πρώτα από προσμίξεις (χώμα, λίθους, ξηρά φυτά κ.α.) (Καββάδας, 1956).

2.4 ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ, ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ, ΕΘΝΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

Το φυτό του δίκταμου από την αρχαιότητα έβρισκε πολλές χρήσεις σε αρκετά προβλήματα υγείας. Στις μέρες μας, στις ήδη γνωστές θεραπευτικές ιδιότητές του προστέθηκαν και ορισμένες ακόμα που διαπιστώθηκαν είτε από μελέτες είτε από τις αναφορές τους στη λαϊκή θεραπευτική.

Ο δίκταμος εμφανίζει επουλωτικές και στυπτικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό θεωρείται φάρμακο για το στομάχι, αλλά και για τα αποστήματα και τα σπυριά (σαν κατάπλασμα). Καταπραΐνει τους πόνους του στομάχου και των εντέρων. Για τους παραπάνω λόγους συστήνεται σε διαταραχές, κολικούς και φλεγμονές του γαστρεντερικού συστήματος. Είναι ευστόμαχο και πολύ χωνευτικό (Θεοδοσίου, 1972, Οντι Μνιμη, 1994, Πρινέας et al, 1983, Μπαζαίος, 1986, Σκρουμπής, 1990, Γκανιάτσας, 1966, www.magdalin.com, www.abio.gr/herbs/).

Σε πονοκεφάλους και πονόδοντους, κάνει καλό όταν μασάει κανείς για πολλή ώρα φύλλα δίκταμου. Καταπολεμά την κακοσμία του στόματος και βοηθάει στην αντιμετώπιση ουλίτιδων (Μπαζαίος, 1986).

Το αφέψημά του είναι διουρητικό (Μπαζαίος, 1986).

Ως εμμηναγωγό φημίζεται ότι βοηθάει σε περιπτώσεις αμηνόρροιας, που προέρχεται από εξάντληση του οργανισμού (έλλειψη περιόδου) (Πρινέας et al, 1983).

Συνιστάται σε νευρικές διαταραχές, νευρικούς πονοκεφάλους και άλλα νοσήματα του νευρικού συστήματος, εξαιτίας των καταπραϊντικών ιδιοτήτων που εμφανίζει (Οντι Μνιμη, 1994).

Για τις αντισηπτικές του ιδιότητες χρησιμοποιείται σε διαλείποντες πυρετούς, γρίπες και κρυολογήματα (Ζαννετού, 2000).

Η ρίζα του ως αλοιφή βρίσκει χρήση κατά της ισχυαλγίας, ενώ ο χυμός του καταναλώνεται μέσα σε κρασί για να θεραπεύσει τα δαγκώματα φιδιού [www.iama.gr].

Η πιο γνωστή από παλιά χρήση του ήταν να βοηθάει τις γυναίκες να γεννούν πιο εύκολα και γρήγορα (οι επίτοκες έπιναν μερικά αφεψήματα άγριου δίκταμου), ενώ συνήθως χρησιμοποιούταν και ως εκτριωτικό μέσο (Πρινέας et al, 1983).

Τέλος, χρησιμοποιείται ως αιμοστατικό (Ζαννετού, 2000 ,www.abio.gr/herbs/),

2.5 ΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ

2.5.1 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να απομονωθούν από ποικίλα μέρη των φυτών με διάφορες μεθόδους. Η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου ενός φυτού εξαρτάται από πάρα πολλούς παράγοντες, όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η εποχή συλλογής του φυτού, η διαδικασία διύγρανσης, οι συνθήκες αποθήκευσης του φυτού μέχρι την παραγωγή του αιθέριου ελαίου και οι συνθήκες παραλαβής του. Το φυτό *Origanum dictamnus* περιέχει μεγάλο πλήθος και ποικιλία χημικών συστατικών, στα οποία αποδίδονται οι διάφορες αρωματικές και θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού. Σύμφωνα με πολλές πηγές, το φυτό περιέχει αιθέριο έλαιο με κύρια συστατικά τη θυμόλη, καρβακρόλη και καμφορά, ουσίες που προσδίδουν στο φυτό τις θεραπευτικές του ιδιότητες, καθώς επίσης και πουλεγόνη, ουσία που του δίνει τις αρωματικές ιδιότητες (Daferera et al.2000, Εγκυκλοπαίδεια 'Νέα δομή' 1996)

Σύμφωνα τον Skoula (1999), στο φυτό του δίκταμου, όπως εξάλλου συμβαίνει και σε όλα τα είδη του γένους *Origanum*, είναι παρόν η βιοχημική ομάδα των αρωματικών μονοτερπενίων με πάρα πολλά μέλη της. Έτσι, στο φυτό αυτό τα αρωματικά μονοτερπένια αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα π-κυμένιο, θυμόλη, καρβακρόλη και το πρόδρομο μόριό τους, που είναι το γ-τερπινένιο. Επιπλέον, σ' αυτό υπάρχουν, σε μικρότερες βέβαια συγκεντρώσεις, τα παράγωγά τους π-κυμενένιο, π-κυμεν-8-όλη, θυμοκινόνη (π-κυμεν-2,5-διόνη), θυμοϋδροκινόνη (π-κυμεν-2,5-διόλη), αιθέρη της θυμόλης και καρβακρόλης, και πιθανότατα και 4,(1,1)-διμεθυλαιθυλ-1,2-βενζεδιόλη.

Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι το μίγμα των πτητικών συστατικών του φυτού στο σύνολό του, χαρακτηρίζεται κυρίως από την ύπαρξη σε αυτά π-κυμενίου (26.0%), θυμοκινόνη (22.9%), καρβακρόλη (6.3%), σαβινένιο (3.6%) και βορνεόλη (2.9%).

Με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μάζας (GC-MS), επιστήμονες κατάφεραν να προσδιορίσουν τα συστατικά του αιθέριου ελαίου του δίκταμου. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν, ήταν ότι η θυμόλη, η καρβακρόλη και τα πρόδρομα μόρια αυτών, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο, είναι τα κυρίαρχα συστατικά του αιθέριου ελαίου, ενώ μαζί θυμόλη και καρβακρόλη αποτελούσαν το 87.78 % του συνόλου του (Sivropoulou et al, 1996).

Ωστόσο, μελέτη που διεξήχθη με τον ίδιο ακριβώς τρόπο μερικά χρόνια αργότερα, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η θυμόλη αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου σε ποσοστό 78% (v/v). Ακόμα, σε αυτό υπάρχουν τα 3-θουγένιο (0.3%), α-πινένιο (0.3%), β-πινένιο (0.3%), α-τερπινένιο (0.9%), π-κυμένιο (10.1%), γ-τερπινένιο (7.9%), β-καρυοφυλλένιο (0.4%), λιναλοόλη (0.4%) και τερπινεν-4-όλη (0.3%). (Daferera et al. 2000).

Ενδεικτικά αναφέρω χημικά συστατικά, στον πίνακα 1, του αιθέριου ελαίου σε δείγμα καλλιεργημένου δίκταμου από μελέτη που έγινε στο Τομέα Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Φαρμακευτικού Τμήματος του Παν/μίου Αθηνών. Τα χημικά συστατικά μπορούν να ποικίλουν από το ένα δείγμα δίκταμου στο άλλο αφού εξαρτάται από τον τόπο και τον τρόπο που καλλιεργήθηκε.

Πίνακας 1: Χημικά συστατικά αιθέριου ελαίου δίκταμου (Καστρινάκης, 2002)

A/A	Συστατικό	Ποσοστό
1	Thujene	1,44
2	A-Pinene (α-πινένιο)	0,63
3	Camphene (καμφένιο)	0,15
4	Sabinene (σαβινένιο)	0,22
5	Beta-Pinene (β-πινένιο)	0,12
6	1-Octen-3-ol (1-οκτεν-3-όλη)	0,27
7	Myrcene (μυρκένιο)	1,63
8	3-Octanol (3-οκτανόλη)	0,11
9	Alpha-Phellandrene (α-φελανδρένιο)	0,33
10	Delta-3-Carene (δ-καρένιο)	0,09
11	Alpha-Terpinene (α-τερπινένιο)	2,82
12	Para-Cymene (π-κυμένιο)	8,78
13	Limonene (Λιμονένιο)	0,48
14	Trans-Beta-Ocimene (trans-β-κυμένιο)	0,10
15	Gamma-Terpinene (γ-τερπινένιο)	14,10
16	Cis-Sabinene Hydrate (cis-ένυδρο σαβινένιο)	1,07
17	Terpinolene (τερπινολένιο)	0,10
18	Linalool (λιναλοόλη)	1,10
19	Iso-Borneol (Ισοβορνεόλη)	0,42
20	Terpinen-4-ol (τερπινεν-4-όλη)	0,46
21	Cis-dihydrocarvone (cis-διυδρο-καρβόνη)	0,09
22	Trans-Dihydrocarvone (trans-διυδρο-καρβόνη)	0,11
23	Carvacrol Methyl Ether (μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης)	0,28
24	L-Carvone (L-καρβόνη)	1,52
25	Thymol (Θυμόλη)	0,13
26	Carvacrol (καρβακρόλη)	51,74
27	Dihydrocarvyl Acetate (οξικό διυδρο-καρβύλιο)	0,27
28	Alpha-Cubebene (α-κουβεβένιο)	0,38
29	Cis-Carvyl Acetate (cis-οξικό-καρβύλιο)	0,14
30	Alpha-Copaene (α-κοπαένιο)	2,24
31	Beta Bourbonene (β-βουρβονένιο)	0,19
32	Beta Cubebene (β-κουβεβένιο)	0,32
33	Caryophyllene (4,8-alpha-epoxy) (4,8-α-επόξυ-καρυοφυλένιο)	2,6
34	Alpha Humulene (α-χουμουλένιο)	0,14
35	Epi-Bicyclosesquiphellandrene (επι-δικυκλο σεσκιφελανδρένιο)	0,34
36	Germacrene D (γερμακρένιο D)	0,47
37	Beta Bisabolene (β-βισαβολένιο)	0,42
38	Delta Cadinene (δ-καδινένιο)	1,07
39	Caryophyllene oxide (οξειδίο του καρυοφυλενίου)	0,21
40	T-Cadinol (Τα-καδινόλη)	0,12

2.5.2 ΛΙΠΑΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα φύλλα του φυτού *Origanum dictamnus* έχει βρεθεί ότι είναι πλούσια σε λιπίδια. Σε μια μελέτη που διεξήχθη, χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα φύλλα του φυτού και αναλύθηκαν τα λιπίδια τους με τη βοήθεια ενός συνδυασμού χρωματογραφικών τεχνικών. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή τα λιπίδια διαχωρίστηκαν σε πολικά και άπολα. Έτσι, ως πολικά αναγνωρίστηκαν τα: μονο-, δι- και πολύ-διγαλακτοσυλ-διγλυκερίδια, σουλφολιπίδια, σερεβροσίδες, φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη, φωσφατιδυλο-σερίνη, φωσφατιδυλο-γλυκερόλη, φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, φωσφατιδυλο-χολίνη και φωσφατιδικό οξύ. Ως μη πολικά τα: στερόλες, στερυλικό εστέρες, λιπαρές αλκοόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κηροί και ίχνη τριγλυκεριδίων, τριτερπενικών οξέων και αιθέριων ελαίων. Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα που διαπιστώθηκαν ήταν το παλμιτικό, ολεϊκό και το λινολεϊκό οξύ (Revithi-Komaiti et al, 1985).

Σε παρόμοια μελέτη, αναλύθηκαν τα φρέσκα φύλλα του φυτού με τον ίδιο τρόπο και τις ίδιες τεχνικές. Τα άπολα συστατικά του λιπιδικού κλάσματος ήταν τα εξής: στερόλες, στερυλικό εστέρες, λιπαρές αλκοόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κηροί, τριγλυκερίδια, υδρογονάνθρακες, καρβακρόλη, εστέρες και τριτερπενικά οξέα. Τα πολικά συστατικά του κλάσματος ήταν: μονο-, δι- και πολύ-γαλακτοσυλ-διγλυκερίδια, σουλφολιπίδια, σερεβροσίδες, φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη, φωσφατιδυλο-σερίνη, φωσφατιδυλο-γλυκερόλη, φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, φωσφατιδυλο-χολίνη. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, δεν ανιχνεύθηκε φωσφατιδικό οξύ (Komaitis et al 1988).

2.5.3 ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ

Επιπρόσθετα, μια ομάδα επιστημόνων εκχύλισε με εξάνιο διάφορα μέρη του φυτού και στη συνέχεια σαπωνοποίησε τα εκχυλίσματα. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα που προέκυψε από την προηγούμενη κατεργασία, αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Διαπιστώθηκε ότι σε αυτό υπήρχαν οι τέσσερις γνωστές ομόλογες τοκοφερόλες, α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη. Η γ-τοκοφερόλη βρισκόταν στα δείγματα σε σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά. (Lagouri et al, 1996).

2.5.4 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Μετά από χρωματογραφική ανάλυση βαμμάτων τόσο του αυτοφυούς όσο και του καλλιεργούμενου φυτού, διαπιστώθηκε η ύπαρξη πολλών χημικών συστατικών, γνωστών και αγνώστων. Αρχικά, διαπιστώθηκε η ύπαρξη χαλκόνης στα δείγματα, η οποία ονομάστηκε δικταμνίνη, καθώς ήταν η πρώτη που ανευρέθηκε στο συγκεκριμένο φυτό. Κατά την ίδια μελέτη, κατόπιν χρωματογραφίσεως και φασματοφωτομετρικής αναλύσεως, απομονώθηκαν για πρώτη φορά, δύο φλαβονογλυκοσίδες, ένας απιγενινο-γλυκοσίδης και ένας λουτεολινο-γλυκοσίδης, που αντίστοιχα ονομάστηκαν δικταμνοσίδης Α και Β, χωρίς όμως να έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως (Θεοδοσίου, 1972).

Τέλος, από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα του αλκοολικού εκχυλίσματος των φύλλων του φυτού απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και οι παρακάτω

ουσίες: εριοδικτυολο-7-γλυκοσίδης, οριεντίνη, ισο-οριεντίνη, λουτεολινο-7-γλυκοσίδης, βιτεξίνη, ισο-βιτεξίνη και απιγενινο-7-γλυκοσίδης. Επιπλέον, από το βουτανολικό κλάσμα του αλκοολικού εκχυλίσματος απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν η βισενίνη-2 και η αισκουλίνη. (Skaltsa et al, 1987)

2.5.5 ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας προσδιορίστηκαν τα φαινολικά οξέα που περιέχονται στο δίκταμο και παρουσιάζονται στον πίνακα 2 (Ali K. Atoui et al, 2004)

Πίνακας 2: Φαινολικές ουσίες που προσδιορίστηκαν στον δίκταμο

Ένωση	k max	Προτεινόμενη Δομή
1	238, 270	Βανιλικό Οξύ
2	278, 310sh	p-Υδροξυβενζοϊκό Οξύ
3	290	2-μεθυλο-4-(2-προπενυλο)φαινόλη (ευγενόλη)
4	242, 318	Καφεϊκό Οξύ
5	238, 310	Εστέρας κουμαρικού οξέος
6	238, 290	Εστέρας Γαλλικού Οξέος
7	290, 325sh	5,7 διυδροξυ-4'-μεθοξυ ισοφλαβόνη
8	286, 330sh	Γλυκοσίδιο της ταξιφολόλης (φλαβονοειδές)
9	258, 338	Μεθυλο γλυκοσίδιο της λουτεολόλης
10	242, 330	Εστέρας καφεϊκού οξέος
11	290, 330sh	Εριοδουκτιόλη
12	238, 286, 314sh	Εστέρας κουμαρικού οξέος
13	266, 298sh, 338	6,8 διγλυκοσίδιο της απιγενόλης
14	270, 346	Πεντουλετόλη
15	282, 344	Διυδροξυ τρμέθυλο- φλαβόνη
16	262	Ξανθοξυλίνη
a [M + Na]p.		

2.6 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ, ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΠΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

2.6.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Μια από τις σημαντικότερες δράσεις που παρουσιάζει το φυτό και η οποία έχει μελετηθεί αρκετά είναι η αντιοξειδωτική του δράση. Σύμφωνα με μια μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από φυτά *Origanum dictamnus* τα οποία συλλέχθηκαν την περίοδο της άνοιξης (1gr σε 100ml). Στα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε η αντιοξειδωτική δράση των παραπάνω δειγμάτων με δύο μεθόδους. Κατά την πρώτη μέθοδο, παρουσία των δειγμάτων μειώθηκε η αποδόμηση της δεοξυριβόζης κατά περίπου 50% μετά τη έκθεσή της σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, σίδηρο και ασκορβικό οξύ.

Στη δεύτερη μέθοδο, προσδιορίστηκαν τα προϊόντα υπεροξειδωσης των λιπών, όπου βρέθηκε ότι παρουσία των εκχυλισμάτων του φυτού, μειώθηκαν σημαντικά τα ποσοστά τους. Σύμφωνα με τους συγγραφείς της μελέτης, τα αποτελέσματα αυτά πιθανότατα οφείλονται στην ύπαρξη των πολυφαινολών μέσα στα εκχυλίσματα του φυτού. Έχουν συζητηθεί διάφοροι μηχανισμοί για τη δράση των πολυφαινολών, όπως η επίδρασή τους στην LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη), που είναι παράγοντας πρόκλησης αθηρωματικών πλακών, η ένωση με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τους ενεργοποιημένους μεταβολίτες οξυγόνου, και η δέσμευση του σιδήρου που καταλύει τις οξειδωτικές αντιδράσεις. Τα παραπάνω δείχνουν, επομένως, ότι το συγκεκριμένο φυτό δρα ως αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό στον ανθρώπινο οργανισμό και μειώνει τον κίνδυνο νοσημάτων που είναι απόρροια της επίδρασης των ενεργοποιημένων μεταβολιτών. (Lionis et al, 1998)

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα του φυτού κατάφεραν να δεσμεύσουν με καλή απόδοση ρίζες υδροξυλίου που είχαν παραχθεί με διάφορους τρόπους. Πιο συγκεκριμένα, στην πραγματοποίηση της μελέτης αυτής οδήγησε το γεγονός ότι ο δίκταμνος χρησιμοποιούταν ευρέως σε βοτανικά εγχύματα, τα οποία παρασκευαζόταν πολύ εύκολα με νερό, κάτι που έδειχνε την πιθανή παρουσία σημαντικών συστατικών στα υδατικά αυτά εκχυλίσματα. Χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένα φύλλα δικτάμνου και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις αυτών με νερό, μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν σαφώς ότι τα εκχυλίσματα, που προέκυψαν με την κατεργασία των φύλλων με νερό και μεθανόλη, εμφάνιζαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, δεσμεύοντας σε μεγαλύτερο βαθμό ρίζες υδροξυλίου, από ότι αυτά με την αιθανόλη και την ακετόνη. Το αποτέλεσμα αυτό, δηλαδή η ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, αποδόθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών συστατικών που εκχυλιζόνταν με τους πρώτους διαλύτες (νερό, μεθανόλη), παρά με τους δεύτερους διαλύτες (αιθανόλη, ακετόνη). Πράγματι, πειραματικά διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση που παρουσίαζαν τα διάφορα εκχυλίσματα του φυτού, ήταν άμεσα συνδεδεμένη με τα περιεχόμενα σε αυτά φαινολικά συστατικά. Επιπλέον, με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώθηκε για άλλη μια φορά και ο σημαντικός ρόλος των φαινολικών συστατικών ως “καθαριστές-παγίδες” (scavengers) ελευθέρων ριζών. Η διαφορά στο μέγεθος της αντιοξειδωτικής δράσης των διαφόρων εκχυλισμάτων, οφειλόταν στο γεγονός ότι τα φαινολικά συστατικά του φυτού παραλαμβάνονταν σε μεγαλύτερο βαθμό με

νερό και μεθανόλη παρά με αιθανόλη και ακετόνη. (Moller et al, 1991)

Το γεγονός ότι με το πέρασμα του χρόνου οι διάφορες φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες κερδίζουν συνεχώς έδαφος στην πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων και διαφόρων ειδών καρκίνου, οδήγησε και άλλους επιστήμονες στο να ελέγξουν την αντιοξειδωτική δράση του φυτού. Η ομάδα χρησιμοποίησε υπέργεια τμήματα του φυτού, τα οποία τα συνέλεξε την άνοιξη και τα εκχύλισε με αιθανόλη. Η αρχή στην οποία στηρίχτηκαν τα πειράματά τους ήταν το γεγονός της σουπεροξειδωσης του αραχιδονικού οξέος σε μηλονική διαλδεΰδη απουσία αντιοξειδωτικών ουσιών, κάτι όμως που δεν πραγματοποιούταν παρουσία τέτοιων ουσιών. Με τη χρήση, λοιπόν, του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού διαπιστώθηκε ότι αυτό παρουσίαζε αντιοξειδωτική δράση ίδια με αυτή της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα, δηλαδή της α-τοκοφερόλης. (Couladis et al, 2003)

2.6.2 ANTIMΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Πολλαπλές είναι οι μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν με τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης του φυτού *Origanum dictamnus*.

Μία από αυτές, εξετάζει την επίδραση της παρουσίας του αιθέριου ελαίου του φυτού στην ανάπτυξη οκτώ διαφορετικών, Gram θετικών και αρνητικών, βακτηριακών κλώνων. Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ήταν δύο από τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* και ένας από τα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Rhizobium leguminosarum* και *Bacillus subtilis*. Η μέθοδος στηριζόταν στην ίδια αρχή με αυτή του αντιβιογράμματος. Επεξηγηματικά, καθένας από τους κλώνους των βακτηρίων αφέθηκε να αναπτυχθεί μέσα σε θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια οι αποικίες του επιστρώθηκαν σε ένα τρυβλίο petri. Ένα στρογγυλό χαρτάκι διαποτίστηκε με το αιθέριο έλαιο του φυτού και τοποθετήθηκε μετέπειτα και αυτό πάνω στο τρυβλίο petri. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου προσδιορίστηκε από το μήκος της ακτίνας του χώρου στο τρυβλίο petri όπου είχε ανασταλεί η ανάπτυξη των βακτηρίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφή αναστολή της ανάπτυξης των κλώνων σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από αυτή του *Pseudomonas aeruginosa*. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν κατ' αυτό τον τρόπο ορισμένα συστατικά του αιθέριου ελαίου. Έτσι, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο δεν εμφάνισαν καμία αντιμικροβιακή δράση, σε αντίθεση με τα βιοσυνθετικά προϊόντα τους, την καρβακρόλη και τη θυμόλη, που εμφάνισαν πολύ υψηλά επίπεδα αντιμικροβιακής δράσης για όλους τους κλώνους, με μόνη εξαίρεση αυτόν του *Pseudomonas aeruginosa*.

Αυτή η εξαίρεση υπάρχει, γιατί το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσιάζει αντίσταση σε πάρα πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, ενώ βρέθηκε να εμφανίζει μικρή ευαισθησία στην πουλεγόνη. Επιπλέον, τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η θυμόλη εμφανίζει συγκριτικά μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα Gram αρνητικά βακτήρια, από ότι η καρβακρόλη. Αντίθετα, η καρβακρόλη έχει αποδειχθεί ότι έχει επιπλέον αντιμηκυτιασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι διάφορα φαινόμενα ανταγωνισμού ή συνέργειας μεταξύ των συστατικών του αιθέριου ελαίου επηρέαζαν και διαμόρφωναν αναλόγως την παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση, με κυριότερο τη συνέργεια μεταξύ θυμόλης και καρβακρόλης. (Sivropoulou et al, 1996)

Σε μια άλλη μελέτη, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου σε τρεις Gram θετικούς (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* και *Micrococcus flavus*) και τρεις Gram αρνητικούς (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* και *Escherichia coli*) βακτηριακούς κλώνους. Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροδιάλυσης. Το αιθέριο έλαιο το οποίο εξετάστηκε για την αντιμικροβιακή του δράση προερχόταν είτε από βράκτια είτε από φύλλα φυτών τα οποία είχαν αναπτυχθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου στο θρεπτικό υπόστρωμά τους (5, 30 και 60 mg/L). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο, το προερχόμενο από τα βράκτια, εμφάνιζε μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από ότι το προερχόμενο από τα φύλλα.

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα φυτά που είχαν καλλιεργηθεί με φώσφορο παρουσίαζαν πολύ υψηλά ποσοστά καρβακρόλης, γεγονός που οδήγησε τους επιστήμονες να συσχετίσουν τα δύο γεγονότα και να υποθέσουν ότι η σημαντική αντιμικροβιακή δράση του φυτού είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην παρουσία της ίδιας της καρβακρόλης. (Economidou et al. 2002)

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου των φύλλων και των βρακτίων του καλλιεργημένου *Origanum dictamnus*. Οι στήλες 1, 2, 3 και 4, 5, 6 αντιπροσωπεύουν φυτά, τα οποία καλλιεργήθηκαν με την προσθήκη 5, 30 και 60 mg/L αντίστοιχα, φωσφόρου στο θρεπτικό τους υπόστρωμα. Φαίνεται η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου που απαιτείται για να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης των κλώνων. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η γνωστή αντιμικροβιακή ουσία στρεπτομυκίνη (Economidou et al. 2002).

	Φύλλα			Βράκτια			
Βακτήρια	1	2	3	4	5	6	Στρεπτομυκίνη
<i>Staphylococcus aureus</i>	500		500	250	500	600	100
<i>Bacillus subtilis</i>							100
<i>Micrococcus flavus</i>				500			100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				500	500	500	500
<i>Proteus mirabilis</i> (clinical isolates)		500	500	125	500	500	400
<i>Escherichia coli</i>		500		125	250	500	200

Από τους ίδιους ερευνητές, πραγματοποιήθηκε παρόμοια μελέτη σε φυτά των οποίων το θρεπτικό υπόστρωμα είχε διαφορετική σύσταση. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα συστατικά του υποστρώματος ήταν τα ίδια με αυτά της προηγούμενης μελέτης, εκτός του ότι υπήρχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου. Το υπόλοιπο πείραμα

πραγματοποιήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο και στη συνέχεια ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου των παραπάνω φυτών σε κλώνους των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση για όλους τους κλώνους με εξαίρεση αυτόν της *Pseudomonas aeruginosa* κατά πανομοιότυπο τρόπο με την προηγουμένως αναφερθείσα μελέτη. (Economakis et al. 1999)

Κάποιοι άλλοι επιστήμονες ασχολήθηκαν με την πιθανή αντιμυκητιασική δράση που μπορεί να έχει το αιθέριο έλαιο του δίκταμου έναντι του μύκητα *Penicillium digitatum*. Χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους το αιθέριο έλαιο του φυτού καθώς και καθαρή θυμόλη και καρβακρόλη ως θετικά δείγματα. Μετά το τέλος των πειραμάτων διαπίστωσαν ότι η μέση ανασταλτική δόση της καθαρής θυμόλης (ED_{50} , η δόση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα κατά 50%) και η ελάχιστη ανασταλτική δόση (MIC) ήταν 79 και 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, και της καθαρής καρβακρόλης 47 και 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο του φυτού οδηγούσε σε καθολική αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα στη συγκέντρωση 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συνύπαρξη στο αιθέριο έλαιο του φυτού της θυμόλης και της καρβακρόλης έχει ως συνέπεια την εμφάνιση συνεργιστικού αποτελέσματος στην αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα. (Daferera et al. 2000)

Το 2000 δημοσιεύτηκε μελέτη, η οποία εξετάζει την επίδραση που έχει η παρουσία του αιθέριου ελαίου του φυτού στην ανάπτυξη του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica*. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι προκαλούνταν μεγάλη αναστολή της ανάπτυξης του ζυμομύκητα, η οποία όμως οφειλόταν στο γεγονός ότι τα υδατικά εκχυλίσματα του φυτού δημιουργούσαν ακατάλληλο περιβάλλον για τον ίδιο το ζυμομύκητα. Επομένως, τα εκχυλίσματα δεν είχαν άμεση επίδραση στα κύτταρα του ζυμομύκητα. Αντίθετα, υποτέθηκε ότι η ιδιότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξή του προερχόταν από το γεγονός ότι τα συστατικά τους δρουν ως χηλικοί παράγοντες οι οποίοι δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα του περιβάλλοντος, τα οποία όμως είναι απαραίτητα για το ζυμομύκητα. (Karaniika et al. 2000).

Τέλος, έχει βρεθεί, ότι η χρήση του αιθέριου ελαίου του δίκταμου μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά με αποτελεσματικό και ασφαλή τρόπο για να επιμηκύνει το χρόνο αποθήκευσης της πατάτας, προστατεύοντάς την ταυτόχρονα από μικροβιακές μολύνσεις. Την άποψη αυτή τη στήριξαν σε πειράματα τα οποία έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο είχε ισχυρή αντιμικροβιακή ιδιότητα. Πιο συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι αυτό εμφάνιζε μέγιστη δράση κατά των κλώνων του *Erwinia carotovora*, αλλά και άλλων βακτηρίων που απομονώθηκαν από την επιφάνεια της πατάτας. (Vokou et al. 1993)

2.6.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Από τον Lam και τους συνεργάτες του (1991), αναφέρθηκε το γεγονός ότι όταν το αιθέριο έλαιο χορηγήθηκε σε ποντικούς, τους προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης σε πολλαπλούς ιστούς. Αυτό ήταν πολύ σημαντικό, γιατί όπως είναι ευρέως γνωστό, το συγκεκριμένο ένζυμο έχει βασικό ρόλο στο να αποτοξινώνει τον οργανισμό από τα διάφορα χημικά καρκινογόνα.

Η παραπάνω διαπίστωση, ταυτόχρονα με την αντιμικροβιακή δράση που παρουσίαζε το αιθέριο έλαιο, οδήγησε κάποιους άλλους επιστήμονες στην απόφαση να ερευνήσουν την πιθανή επίδραση αυτού σε ευκαρυωτικά, και κυρίως καρκινικά, κύτταρα. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις κυτταρικές σειρές (δύο φυσιολογικές και δύο καρκινικές) και εκτέθηκαν στο αιθέριο έλαιο για 24 ώρες, οπότε και μετρήθηκε το ποσοστό των νεκρών κυττάρων. Το συμπέρασμα που βγήκε από τη μελέτη ήταν ότι το αιθέριο έλαιο, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, προκαλούσε το θάνατο των καρκινικών κυττάρων στον ίδιο βαθμό που προκαλούσε τον θάνατο και των φυσιολογικών κυττάρων. (Sivgorouliou et al. 1996)

2.7 ΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ

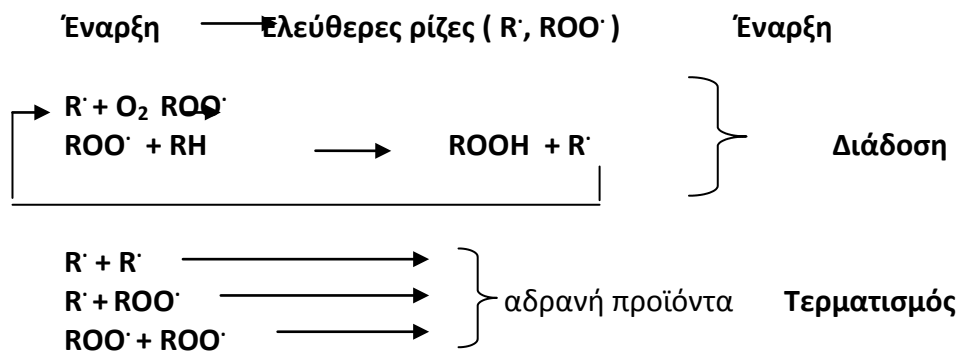
Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξείδωση των συστατικών των τροφίμων (οξειδωτικό τάγγισμα των λιπών), η οποία προκαλείται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά είναι αρωματικές ενώσεις, που διαθέτουν μια τουλάχιστον ελεύθερη υδροξυλική ή αμινική ομάδα. Οι σημαντικότερες ενώσεις που προστίθενται στα τρόφιμα ανήκουν στις πολυκυκλικές φαινόλες, με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες (Μπόσκος, 1997).

Γενικά η τάξη των αντιοξειδωτικών των τροφίμων περιέχει τις ενώσεις εκείνες που εμποδίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, που σχετίζονται με την οξείδωση των λιπιδίων. Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τους σταθεροποιητές και συμπλοκοποιητές. Τα μίγματα αυτά συντελούν στην ενεργοποίηση και τη βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης, στη διερεύνηση της εφαρμογής των αντιοξειδωτικών σε περισσότερες κατηγορίες τροφίμων, καθώς και στην ευκολότερη χρησιμοποίησή τους. (Packer et al., 1999).

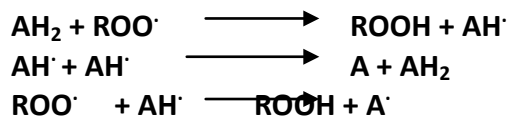
Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

- Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά: Είναι συνήθως φαινολικές ενώσεις, που οδηγούν στον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Στις αντιδράσεις αυτές παίζουν το ρόλο του δότη ηλεκτρονίων. Παραδείγματα πρωτογενών αντιοξειδωτικών αποτελούν οι φυσικές και συνθετικές τοκοφερόλες, το ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), το ΤΒΗQ (tetr-βουτυλο-υδροκινόνη), κ.α. Συνοπτικά, ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δίνεται με τις παρακάτω αντιδράσεις:

Σχήμα 3: Οι αντιδράσεις που παίρνουν μέρος στα τρία στάδια του μηχανισμού της οξείδωσης.



Σχήμα 4: Η δράση των αντιοξειδωτικών στο μηχανισμό της οξείδωσης



Όπου:

AH₂ = αντιοξειδωτική ουσία, **ROOH** = υπεροξειδίο

ROO[·] = ελεύθερη ρίζα, **AH[·]** = ελεύθερη ρίζα του αντιοξειδωτικού

(Κυριτσάκης et al,1998)

- Δευτερογενή αντιοξειδωτικά: Η δράση τους επικεντρώνεται στη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων (προϊόντα οξείδωσης), προς σταθερά τελικά προϊόντα, που δεν λαμβάνουν μέρος σε αλυσιδωτές αντιδράσεις. Τέτοια αντιοξειδωτικά είναι το διαρυλο-θειοδιπρωπιονικό οξύ και ο αντίστοιχος εστέρας (Μπόσκος, 1997).
- Ενώσεις που απομακρύνουν το οξυγόνο: Τα αντιοξειδωτικά αυτά αντιδρούν με το οξυγόνο και σχηματίζοντας ενώσεις με αυτό, εμποδίζουν την αντίδραση με τα λιπίδια που αποτελεί έναρξη της αυτοοξείδωσης. Την ικανότητα αυτή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), ο παλμιτικός εστέρας, το ερυθροβικό οξύ και τα άλατα του με νάτριο, κ.α. (Pokorny et al., 2001).
- Ενώσεις που δημιουργούν ενεργειακά σύμπλοκα (συνεργιστικές ενώσεις): Οι ενώσεις που ανήκουν σ' αυτή την κατηγορία σχηματίζουν χημικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως του χαλκού και του σιδήρου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύουν σωματίδια που δρουν ως εκκινητές της οξείδωσης. Παραδείγματα αποτελούν το κιτρικό οξύ, τα αμινοξέα, το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), κ.α. ωστόσο για να εκδηλωθεί η αντιοξειδωτική τους δράση, πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλο αντιοξειδωτικό. (Roberfroid & Calderon, 1990).

Τα αντιοξειδωτικά με βάση την προέλευση τους διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Συνθετικά αντιοξειδωτικά: Τα αντιοξειδωτικά αυτά συντίθενται βιομηχανικά.

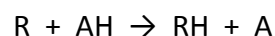
Πολλά από αυτά, αν και παρουσιάζουν ακόμη και έντονη αντιοξειδωτική δράση, εν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων, λόγω των αρνητικών επιπτώσεων τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συνθετικά αντιοξειδωτικά που επιτρέπονται ως πρόσθετα τροφίμων είναι το BHT, το BHA, το Trolox, το TBHQ, το PG (Pokorny et al., 2001).

- Φυσικά αντιοξειδωτικά: Η πλειοψηφία των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα (Pokorny et al., 2001).

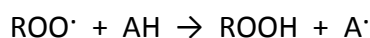
2.8 Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Η δράση των αντιοξειδωτικών στηρίζεται στην απομάκρυνση ή την εξουδετέρωση των ROO και R ελεύθερων ριζών και σε ορισμένες περιπτώσεις στην πλήρη αναστολή της οξείδωσης (στα σουλφονικά, στη διάσπαση από τα υπεροξειδία). Επειδή τα περισσότερα αντιοξειδωτικά δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, επιταχύνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών ROO και R, με τη δημιουργία μιας ανενεργού και αντιοξειδωτικής ελεύθερης ρίζας (Roberfroid & Calderon, 1990).

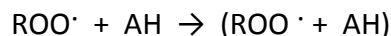
Η απενεργοποίηση και η αναστολή της δράσης της ελεύθερης ρίζας συντελεί στην άρση της αλυσιδωτής αντίδρασης και στην παραγωγή σταθερών προϊόντων, μέσω διμερισμού. Η άμεση αντίδραση του αντιοξειδωτικού (AH) με ένα υπόστρωμα ελεύθερης ρίζας R, δίνεται από την αντίδραση:



Και φαίνεται να μην έχει την παραμικρή σχέση με την αντίδραση του αντιοξειδωτικού με την ελεύθερη ρίζα ενός υπεροξειδίου ROO:



Με τον ίδιο μηχανισμό δημιουργείται και ένα σύμπλοκο μεταξύ του μορίου του αντιοξειδωτικού και της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου:



που μπορεί να δράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες και να οδηγήσει στην αναστολή της οξείδωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις (μερική πίεση ατμοσφαιρικού οξυγόνου-

θερμοκρασία δωματίου) διασπάται η αλυσίδα της ελεύθερης ρίζας και έχουμε σύγκρουση δυο ελεύθερων υπεροξειδίων ριζών



Επιγραμματικά αποδεικνύεται, πως όλοι οι αναστολείς της οξειδωσης πρέπει αφ ενός να είναι ενεργοί, ώστε να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και να διασπάζουν την αλυσίδα και αφετέρου μεταφορικά ενεργά, για να αποφευχθεί η άμεση αντίδραση του οξυγόνου με την ανταλασσόμενη ελεύθερη ρίζα. Η μεγάλη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις κατά τη φάση της διάδοσης, μπορεί για παράδειγμα να οδηγήσει στη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ως μεταφορέων και κατά συνέπεια στη δράση τους ως προοξειδωτικά (Μπόσκος, 1997).

Όλοι αυτοί οι παράγοντες καθιστούν ολοφάνερο πως, η προσθήκη των αντιοξειδωτικών πρέπει να γίνεται πολύ πριν από το στάδιο της προαγωγής (διάδοση). Αν όμως στο υπόστρωμα αυξηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών, τότε το προστιθέμενο αντιοξειδωτικό ανταποκρίνεται γρήγορα και θα καταναλωθεί, οπότε είναι πλέον αδύνατον να επιβραδυνθεί με παρεμβολή η πρόοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης (Μπόσκος, 1997).

2.8.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Όταν οι οξειδωτικοί μηχανισμοί υπερτερούν των αντίστοιχων αντιοξειδωτικών του οργανισμού τότε τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια και βρισκόμαστε μπροστά στο λεγόμενο οξειδωτικό στρες, φαινόμενο καταστρεπτικό για τους ιστούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ασθένειες που συνδέονται με την αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών (http://www.iatronet.gr/article.asp?art_id=1033)

Παχυσαρκία	Ρευματοπάθειες
Αρτηριοσκλήρυνση	Αυτοάνοσα νοσήματα
Χρόνια πολυαρθρίτιδα	Τοξινώσεως από μέταλλα
Ελκώδης κολίτιδα	Πρόωρη γήρανση
Φλεγμονές	Νόσος Parkinson
Δερματικές παθήσεις	Νόσος Alzheimer
Ισχαιμία	Σκλήρυνση κατά πλάκας
Καταρράκτης	Παγκρεατίτιδα
Καρκίνος	

2.9 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

2.9.1 ΔΟΚΙΜΗ ABTS

Η δοκιμή ABTS βασίζεται στον έλεγχο του αποχρωματισμού της ριζικού κατιόντος ABTS που παράγεται από την οξείδωση του αντιδραστηρίου 2,2 azinodis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate) (ABTS). Η οξείδωση προκαλείται από την προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει φαινολικό παράγοντα. Το ABTS παρουσιάζει μια ισχυρή απορρόφηση στα 600 – 750 nm και μπορεί να καθοριστεί εύκολα φασματοφωτομετρικά. Έλλειψη φαινολικών ουσιών,

το ABTS είναι σταθερό, αλλά όταν αντιδρά με ένα δότη χ-ατόμων, όπως οι φαινολικές ουσίες μετατρέπεται σε μια «μη χρωματισμένη» μορφή. Επομένως όταν η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών είναι μεγαλύτερη η μη χρωματισμένη μορφή του ABTS θα είναι πιο έντονη, δηλαδή θα έχουμε πιο έντονο αποχρωματισμό. Η ποσότητα του ABTS που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox ή σε ισοδύναμα Γαλλικού οξέως και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. (Villano et al, 2004)

2.9.2 ΔΟΚΙΜΗ DPPH

Είναι η παλαιότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η δοκιμή DPPH βασίζεται στην ικανότητα της σταθερής ελεύθερης ρίζας 2,2-diphenyl-1-pic-rylhyrazyl (DPPH) να αντιδρά με τους χ-δότες συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ουσιών. Σύμφωνα με αυτή ένας όγκος δείγματος αραιωμένος με μεθανόλη σε αναλογία 1:1 προστίθεται σε ένα όγκο αντιδραστηρίου 2,2-diphenyl-1-pic-rylhyrazyl. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 515 nm μετά από 60 min της αντίδρασης στους 20°C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox σε mmol/L. (Roginsky & Lissi, 2004)

2.9.3 ΔΟΚΙΜΗ FRAP

Η δοκιμή FRAP (ferricreducing antioxidant power) βασίζεται στη δυνατότητα των φαινολών να μετατρέπουν τον Fe^{+3} σε Fe^{+2} . Όταν αυτό συμβαίνει παρουσία της 2,4,6-trypyritydyl-triazine, συνοδεύεται από το σχηματισμό χρωματισμένου συμπλέγματος με Fe^{+2} . Εκφρασμένη σε ισοδύναμα ασκορβικού οξέως, η τιμή FRAP εφαρμόζεται για να καθορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ποσοστό της

μείωσης του ferrylmetmyoglobin που καθορίζεται φασματοσκοπικά στην ορατή περιοχή, προτάθηκε για να χαρακτηρίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα φλαβονοειδών. Ωστόσο, η ερώτηση για τη σχέση μεταξύ της μεθόδου FRAP και της αντιοξειδωτικής ικανότητας παραμένει ανοιχτή (Benzie & Strain, 1996)

2.9.4 ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ TLC

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού των φαινολικών συστατικών των τροφίμων είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η δεύτερη υπερέρχει επειδή επιτυγχάνονται αποτελεσματικότεροι διαχωρισμοί ώστε να είναι δυνατή μια καλύτερη ποιοτική ανάλυση. Σ' αυτή συμβάλλουν σημαντικά: α) οι χρησιμοποιούμενες στήλες silica για το διαχωρισμό μη πολικών φαινολών με ισοκρατική έκλυση και αντίστροφης φάσης για το διαχωρισμό πολικών φαινολών με τη βαθμιδωτή (gradient) έκλυση, και β) ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής υπεριώδους, αφού όλες οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν ένα ή περισσότερα μέγιστα απορρόφησης στη περιοχή από τα 230 μέχρι τα 290 nm.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι μια σημαντική τεχνική διαχωρισμού φαινολικών συστατικών και ανίχνευσης μεταξύ εκείνων που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο διαχωρισμός γίνεται σε πλάκες με στατική φάση κυτταρίνη, πολυαμίδιο και συνηθέστερα silica gel, ενώ ως σύστημα ανάπτυξης μίγματα διαφόρων διαλυτών. Για την επιλογή των καταλληλότερων από αυτά λαμβάνεται υπ όψη η πολικότητα των συστατικών των οποίων επιδιώκεται ο διαχωρισμός. Επειδή ελάχιστες φαινολικές ενώσεις είναι έγχρωμες και επομένως απ ευθείας ανιχνεύσιμες πάνω στην πλάκα, συνήθως η τελευταία παρατηρείται στο υπεριώδες φως και ψεκάζεται με διάφορα αντιδραστήρια. Η εμφάνιση φθορισμού και χαρακτηριστικών χρώσεων αποτελεί ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά ή και αντιοξειδωτική δράση (Harborne, 1997).

2.9.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ FOLIN – CIICALTEU

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ενώσεις ενός δείγματος και είναι η πλέον αποδεκτή. Αυτή, βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοροβολφραϊμικού ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφορομολυβδαινοκού οξέος ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Κατά την αντίδραση οι φαινολικές ομάδες οξειδώνονται σε ομάδες με δομή κινόνης και τα οξέα φωσφοροβολφραϊμικού και φωσφορομολυβδαινοκού ανάγονται σε οξειδία βολφραμίου (W_8O_{34}) και μολυβδαινίου (MoO_{23}) μπλε χρώματος. Γενικά οι φαινόλες που καθορίζονται από το δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Office International de la Vigne et du Vin, 1990, Σουφλερός, 1997).

2.9.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΥΠΕΡΜΑΓΓΑΝΙΚΟΥ ΚΑΛΙΟΥ ($KMnO_4$)

Όπως και η παραπάνω μέθοδος έτσι και αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ενώσεις σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το υπερμαγγανικό κάλιο, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τέλος της ογκομέτρησης σημειώνεται με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη carmin-indigo, από το κυανό σε κίτρινο. Ο δείκτης αυτός οξειδώνεται πριν από ορισμένα συστατικά του δίκταμου, αλλά μετά από τις φαινολικές ενώσεις. Η αλλαγή του χρώματος του συμπίπτει με το τέλος της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η παραπέρα κατανάλωση ($KMnO_4$) για οξείδωση άλλων διαφόρων συστατικών του δίκταμου (Σουφλερός,1997).

3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα *Dictamnus Oreganum* από την περιοχή Τυλλίσου Ηρακλείου Κρήτης με τις μεθόδους Folin – Ciocalteu, ABTS και DPPH αντίστοιχα.

Σκοπός επίσης είναι το να μελετηθούν οι μεταβολές στα ολικά φαινολικά και στην αντιοξειδωτική δράση ανάλογα με το χρόνο βρασμού, εμβάπτισης και εμβάπτισης σε νερό θερμοκρασίας δωματίου, παράλληλα θα ελεγχθεί η συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων.

4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΔΕΙΓΜΑ ΔΙΚΤΑΜΟΥ

Στην πτυχιακή εργασία εξετάστηκε δείγμα *Dictamnus Origanus*, το οποίο προήλθε από περιοχή Τυλλίσου, Ηρακλείου Κρήτης. Το προς ανάλυση δείγμα παρασκευάστηκε ως εξής: Ζυγίστηκαν 2,5g δίκταμου και βράστηκαν με 100ml απεσταγμένου νερού σε διάφορους χρόνους.

Αναλυτικά:

- Τρία δείγματα αφεψήματος δίκταμου παρασκευάστηκαν με χρόνους βρασμού 1, 3 και 5 min.
- Τρία δείγματα αφεψήματος δίκταμου παρασκευάστηκαν με χρόνους παραμονής σε βραστό νερό 1, 3 και 5 min.
- Δείγμα αφεψήματος δίκταμου παρασκευάστηκε με παραμονή σε νερό θερμοκρασίας δωματίου για ένα λεπτό.

4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ 1%
- Τρυγικό K – Na 2%
- Na_2CO_3
- NaOH
- NaH_2PO_4
- Na_2HPO_4
- Folin – Ciocalteu
- Γαλλικό οξύ (GA)
- ABTS^+
- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$
- DPPH
- Trolox ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5, \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$)

4.3 ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή ανάδευσης, Framo-geratechnik, M21/1
- Αναλυτικός ζυγός, Electronic Balance, ER-18 OA
- Μικροπιπέτες των 5-50 μl , 50-200 μl και 100-1000 μl Socorex
- Υδρόλουτρο, Grant GR ISO

- Περιστροφικός εξατμιστήρας, Rotor Heidolph, Laborata 4002 digital
- Φασματοφωτομετρο, Thermo Electron Corporation NICOLET evolution 100

4.4 ΣΚΕΥΗ

- Κωνικές φιάλες των 100 ml.
- Ογκομετρικές φιάλες των 50, 100ml και του 1lit
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Σιφώνια πληρώσεως των 1, 5, 10ml
- Ποτήρια ζέσεως των 100 και 250ml

4.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

4.5.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (FOLLIN – CIOCALTEU)

Το σύνολο των φαινολικών ενώσεων ενός εκχυλίσματος προσδιορίζεται συνήθως με χρωματομετρικές μεθόδους. Αν και κανένα αντιδραστήριο δε δίνει με τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις προϊόντα που να εμφανίζουν το ίδιο μέγιστο μήκος απορρόφησης, η μέθοδος που στηρίζεται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι η πλέον αποδεκτή.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση του συνόλου των φαινολικών συστατικών, σε αλκαλικό περιβάλλον από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από ένα μίγμα φωσφοροβολφραμικού οξέος ($H_3PW_{12}O_{40}$), το οποίο ανάγεται κατά την οξείδωση των φαινολών, σε μίγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το κυανό χρώμα που προκύπτει παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750nm, και έτσι είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Οι φαινόλες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο αυτή εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox, ή Γαλλικού Οξέος (Tsimidou et al., 1992)

4.5.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και της ανάλυσης των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Solution 1
Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος χρειαζόμαστε:
1ml διαλύματος (A)
1ml διαλύματος (B)
98ml διαλύματος (C)

(A) → $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1%

Σε ογκομετρική φιάλη των 50ml προσθέτουμε 0,5g στερεού $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

(B) → Τρυγικό Κ – Na 2%

Σε ογκομετρική φιάλη των 50ml προσθέτουμε 1,0g τρυγικού οξέος και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

(C) → Σε ογκομετρική φιάλη του 1lit προσθέτουμε 20g Na_2CO_3 και 4g NaOH. Κατόπιν συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό

- Folin – Ciocalteu

Πυκνό αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu αραιώνεται με αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1

4.5.1.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν μετά από μια σειρά υπολογισμών και δοκιμών της αντίδρασης σε δείγμα δίκταμου. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 0,5g γαλλικού οξέος ξηρής μορφής και 10ml αιθυλική αλκοόλη, ώστε να διαλυθεί το γαλλικό οξύ. Μετά από καλή ανάδευση συμπληρώθηκε η φιάλη με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

Από το πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος ελήφθησαν 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 και 2.0 ml και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml οι οποίες κατόπιν συμπληρώθηκαν με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Από αυτά τα πέντε πρότυπα αραιωμένα διαλύματα Trolox ελήφθησαν με πιπέτες ποσότητες 0,5 ml και τοποθετήθηκαν σε τέσσερις δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα. Κατόπιν προστέθηκαν 2,5 ml από το αντιδραστήριο – Ciocalteu σε κάθε σωλήνα και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Αφού πέρασαν 10min προστέθηκαν 2ml Solution 1 ακολούθησε ξανά πολύ έντονη ανάδευση.

Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 50°C για 5min μετά την παρέλευση των 5min έγινε ψύξη αυτών με κρύο νερό και συγχρόνως έντονη ανάδευση. Μετά την ψύξη ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου στα 760nm. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με τυφλό δείγμα το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω με την μόνη διαφορά ότι στη θέση του διαλύματος γαλλικού οξέος προστέθηκε ίδια ποσότητα απεσταγμένου νερού.

4.5.1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

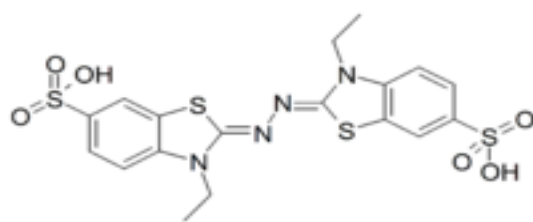
Για τη ανάλυση των δειγμάτων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: 2,5 g δίκταμου βράστηκαν σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια από το πυκνό αφέψημα που προέκυψε, πήραμε 4 ml και αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0,5ml από το αραιωμένο διάλυμα (δείγμα) και 2,5ml από το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Ακολούθησε έντονη ανάδευση. Μετά την παραμονή 10min, προστέθηκαν στο σωλήνα 2ml διαλύματος Solution 1 και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 50 °C για 5min. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων με κρύο νερό και συγχρόνως ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης αυτών στα 760nm.

Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με το τυφλό δείγμα το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι στη θέση του δείγματος προστέθηκε ίδια ποσότητα απεσταγμένου νερού.

4.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ABTS

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί λεπτομερώς η αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε τρόφιμα συμπεριλαμβανομένων και του δίκταμου και έχει αναπτυχθεί μια ευρεία ποικιλία μεθόδων για τον προσδιορισμό της. Από τις πιο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η μέθοδος ABTS.

Το αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου είναι το 2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate). Με οξείδωση αυτού του αντιδραστηρίου παράγεται κατιόν ABTS⁺, το οποίο έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα. Ο συντακτικός τύπος είναι:



Σχήμα 4: ABTS⁺

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον αποχρωματισμό του παραπάνω σχηματιζόμενου ριζικού κατιόντος ABTS⁺, ο οποίος προκαλείται με την προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει φαινολικό παράγοντα, λόγω της απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών.

Το ABTS⁺ μπορεί να παραχθεί είτε από χημική αντίδραση π.χ. με διοξείδιο του μαγγανίου (MnO₂), με υπερθεϊκό κάλιο (K₂S₂O₈) ή από ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. μεθμυοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη). Γενικά η χημική αντίδραση απαιτεί πολύ χρόνο (μέχρι και 16 ώρες για την παραγωγή υπερθεϊκού καλίου) ή υψηλές θερμοκρασίες,

ενώ οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι ταχύτερες και οι συνθήκες αντίδρασης ηπιότερες.

Η μέγιστη απορρόφηση του $ABTS^+$ αποδείχτηκε ότι είναι σε μήκη κύματος 415, 645, 734 και 815nm. Τα μήκη κύματος, τα οποία επιλέχτηκαν από τους περισσότερους ερευνητές για να ελέγξουν φασματοφωτομετρικά την αντίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και του $ABTS^+$ είναι 415 και 734nm.

Εκτός από το αντιδραστήριο Trolox έχει βρεθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το Γαλλικό Οξύ. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, τα αντιδραστήρια Trolox και Γαλλικό οξύ, σαν πρότυπα αντιδραστήρια σ' αυτή τη μέθοδο, είναι παρόμοια θεωρώντας ότι το Trolox είναι μια μονοφαινόλη και το Γαλλικό Οξύ μια τριφαινόλη (Minussi et al., 2002).

4.5.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Buffer Phosphate

Ζυγίζουμε σε αναλυτικό ζυγό 3,56g Na_2HPO_4 (μονόξινο φωσφορικό νάτριο) και 3,12g NaH_2PO_4 (δισόξινο φωσφορικό νάτριο), τα τοποθετούμε σε ογκομετρική φιάλη του 1lit, αφού τα διαλύσουμε σε λίγο νερό, και κατόπιν συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

- $ABTS^+$

Ζυγίζω στον αναλυτικό ζυγό 0,036g $ABTS^+$, το οποίο βρίσκεται στο ψυγείο, και 0,0066g $K_2S_2O_8$. Στη συνέχεια τα διαλύω με 10ml απεσταγμένο νερό σε ένα ποτήρι ζέσεως και το αναδεύω πολύ καλά. Στη συνέχεια το καλύπτουμε με ταινίες παραφίνης και το αφήνουμε στο σκοτάδι για 12 – 16 ώρες.

- Trolox

Για την παρασκευή του Trolox ζυγίζουμε 0,5g στερεό Trolox και τα αραιώνονται με 10ml αιθυλική αλκοόλη (CH_3-CH_2-OH). Τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνονται με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

4.5.2.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα Trolox.

Από το πυκνό διάλυμα Trolox, η παρασκευή του οποίου περιγράφηκε παραπάνω, ελήφθησαν 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 και 1.2ml και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml. Οι φιάλες συμπληρώθηκαν με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

Από τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα Trolox ελήφθησαν με μικροπιπέτα 50μl και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα. Έπειτα προστέθηκαν 45μl από το διάλυμα $ABTS^+$ και 3ml διαλύματος buffer-φωσφορικών. Ακολούθησε ανάδευση και αναμονή 5min. έγινε μέτρηση της απορρόφησης τους στα 734nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.

Η ποσότητα 45μl διαλύματος ABTS⁺ υπολογίστηκε σε σχέση με το τυφλό δείγμα, το οποίο στη θέση του ABTS⁺ περιείχε νερό και ήταν τέτοια ώστε στα 734nm να δίνει απορρόφηση 0,7. Δεν έγινε μηδενισμός του οργάνου, αλλά μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων μετά το τυφλό είχαμε μείωση της μετρούμενης απορρόφησης (Minussi et al., 2002).

Για την κατασκευή της καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των μg Trolox που υπάρχουν στα τρία πρότυπα διαλύματα. Έτσι λοιπόν, για τα πρότυπα διαλύματα των 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 και 1.2ml γαλλικού οξέος υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5 και 30.0g Trolox αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν πρότυπη καμπύλη με άξονα Χ τα μg Trolox και άξονα Υ τις μετρούμενες απορροφήσεις στα 734nm. Τα δείγματα και οι μετρήσεις έγιναν τρεις φορές έτσι ώστε να έχουμε μια αξιόπιστη πρότυπη καμπύλη.

4.5.2.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αφού έγιναν οι απαιτούμενες αραιώσεις σε όλα τα δείγματα του δίκταμου, ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία:

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 3ml buffer- φωσφορικών, 50μl δείγμα αραιωμένου δίκταμου και 45μl διάλυμα ABTS⁺. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 734nm μετά το πέρας 5min. (Piljac et al., 2005)

4.5.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ DPPH

Τα φαινολικά συστατικά δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και η μείωση της ελέγχεται με τη μείωση της απορρόφησης στα 517nm. Το χρώμα από μωβ στο αρχικό διάλυμα, μετατρέπεται σε κίτρινο, όταν όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευτεί από τα αντιοξειδωτικά.

4.5.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

- Παρασκευή stock-διαλύματος DPPH με αιθανόλη 12% (πυκνό διάλυμα):

Ζυγίζονται 0,0197gr DPPH με ακρίβειά 4^{ου} δεκαδικού ψηφίου και τα διαλύσαμε με αιθανόλη 12% σε ογκομετρική φιάλη των 100ml (συμπλήρωση με αιθανόλη μέχρι τη χαραγή της φιάλης). Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος DPPH είναι 0,5mM

- Παρασκευή διαλύματος DPPH με αιθανόλη 12% (αραιό διάλυμα):

Από το παραπάνω πυκνό αιθανολικό διάλυμα DPPH λαμβάνονται 5 ml και προστίθεται αιθανόλη 12% μέχρι τελικού όγκου 50ml (αραίωση 1:10) και μετράτε η απορρόφηση UV στα 517nm. Η συγκέντρωση του τελικού αραιού διαλύματος DPPH είναι 0,05mM.

4.5.3.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ DPPH

Παρασκευάστηκαν διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων από 100 έως 1200 μM (ανά 100μM).

Στη συνέχεια τοποθετήσαμε σε στατό 14 δοκιμαστικούς σωλήνες (το ένα λευκό) και ακολούθησε προσθήκη 100μl Trolox και 3,9ml αραιό αιθανολικό διάλυμα DPPH.

Αφού έγινε ισχυρή ανάδευση ,τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά και στην συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση UV στα 517nm.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν τα σημεία από 0-900μM, καθώς τα επόμενα έδωσαν μηδενική απορρόφηση και δεν ισχύει η γραμμικότητα (Νόμος του Beer).

4.5.3.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

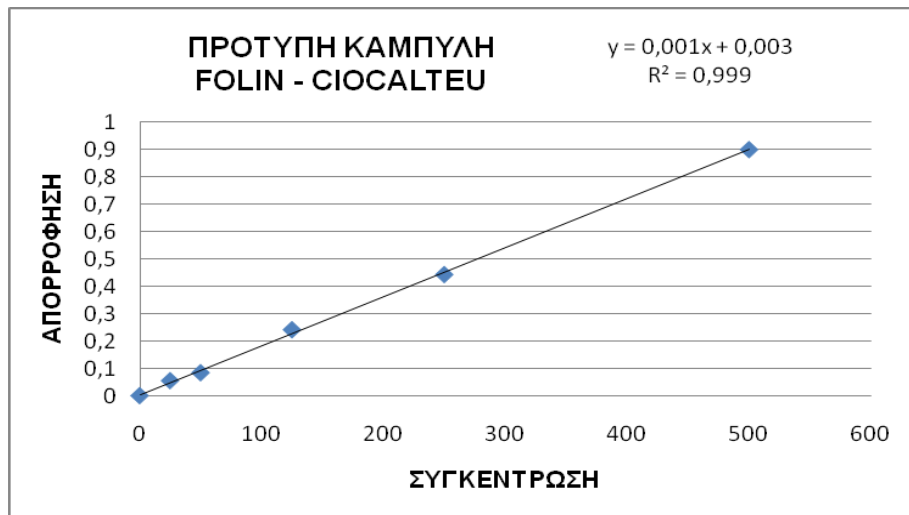
- ✦ Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 100 μl δείγματος και 3,9 ml αραιού διαλύματος DPPH.
- ✦ Ισχυρή ανάδευση με vortex και τοποθέτηση σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά.
- ✦ Μέτρηση απορρόφησης σε UV στα 517 nm.

Χρησιμοποιήθηκε λευκό δείγμα το οποίο περιείχε αιθανόλη για μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου.

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1.1 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ FOLIN – CIOCALTEU

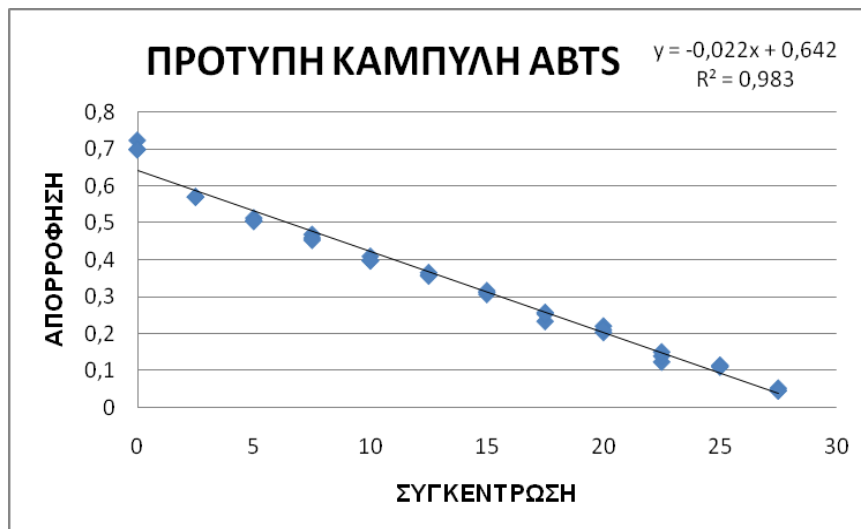
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.5.1.2., έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος στα 760 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.



Σχήμα 5: Πρότυπη καμπύλη Folin - Ciocalteu

5.1.2 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ABTS

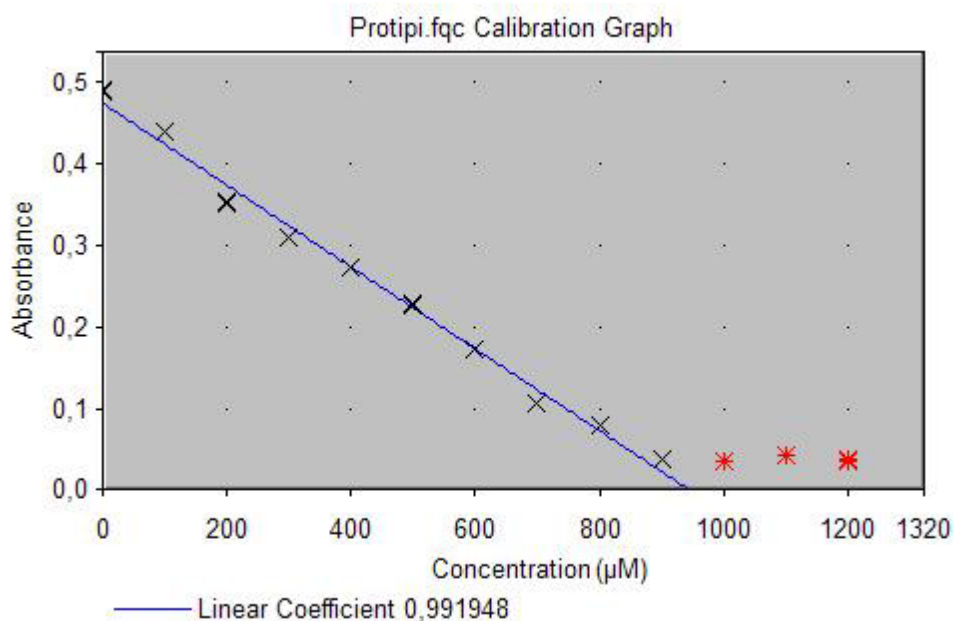
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.5.2.2., έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων Trolox στα 734 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.



Σχήμα 6: Πρότυπη καμπύλη ABTS

5.1.3 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ DRPH

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων Trolox στα 517 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.



5.1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΔΙΚΤΑΜΟΥ

Οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες είναι εκφρασμένες σε µM GA και µM Trolox και προέκυψαν από την αναγωγή των απορροφήσεων από τα αντίστοιχα διαλύματα με τη βοήθεια των πρότυπων καμπυλών.

5.1.4.1 ΧΡΟΝΟΣ ΒΡΑΣΜΟΥ

Μετα την παρασκευή των δειγμάτων όπως έχει περιγραφεί ακολούθησε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως αναφέρεται στον πίνακα 5

Δείγμα	Folin - Ciocalteu (µM GAE)	ABTS (µM TEAC)	DPPH (µM TEAC)
1min	1266.36	3129.13	1170.95
3min	1450.09	3365.78	2302.42
5min	1945.73	3664.91	2722.83

5.1.4.2 ΧΡΟΝΟΣ ΕΜΒΑΠΤΙΣΗΣ ΣΕ ΒΡΑΣΤΟ ΝΕΡΟ

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με την προσθήκη του δίκταμου σε νερό που το οποίο αποσύρθηκε από την πηγή θερμότητας μόλις έφτασε σε θερμοκρασία βρασμού και ακολούθησε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως αναφέρεται στον πίνακα 6

Δείγμα	Folin-Ciocalteu ($\mu\text{M GAE}$)	ABTS ($\mu\text{M TEAC}$)	DPPH ($\mu\text{M TEAC}$)
1min	801.56	2244.02	970.01
3min	1461	3359.08	2025.73
5min	1455.62	3216.38	1745.47

5.1.4.3 ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΣΕ ΝΕΡΟ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΔΩΜΑΤΙΟΥ

Μετα την παρασκευή των δειγμάτων όπως έχει περιγραφεί ακολούθησε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως αναφέρεται στον πίνακα 7

Δείγμα	Folin-Ciocalteu ($\mu\text{M GAE}$)	ABTS ($\mu\text{M TEAC}$)	DPPH ($\mu\text{M TEAC}$)
1min	478.94	1480.58	362.78

5.1.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος MINITAB 16.

Οι απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να ελεγχθούν πριν την εφαρμογή της ANOVA είναι:

- A. Να υπάρχει κανονικότητα. Αρχικά ο έλεγχος της κανονικότητας γίνεται για το κάθε δείγμα ξεχωριστά με τη χρήση του ελέγχου Ryan – Joiner.
- B. Οι διακυμάνσεις όλων των ομάδων θα πρέπει να είναι ίσες μεταξύ τους. Ο έλεγχος που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων, είναι ο έλεγχος του Lavene (Πετρίδης, 2000)

5.1.5.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Από τον έλεγχο της κανονικότητας Ryan – Joiner προέκυψε ότι για όλα τα στοιχεία η τιμή του ελέγχου P είναι μεγαλύτερη της τιμής 0,05 άρα ακολουθούν κανονική κατανομή

5.1.5.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΩΝ

Για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος του Levene. Ενδεικτικά παραθέτονται τα γραφήματα:

Από τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων του Levene συμπεραίνουμε ότι η τιμή P είναι παντού μεγαλύτερη από 0,05, που αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων για όλα τα δείγματα

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει και από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, η καλύτερη μέθοδος παρασκευής αφειψήματος δικάμου (σχετικά με την περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική ικανότητα) είναι ο βρασμός καθώς εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τους άλλους τρόπους παρασκευής. Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά αλλά και η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ανάλογες του χρόνου βρασμού.

Αν επιλέξουμε ως τρόπο παρασκευής, την εμβάπτιση σε βραστό νερό τότε ο βέλτιστος χρόνος είναι αυτός των τριών λεπτών, ενώ η παραμονή σε νερό θερμοκρασίας δωματίου, όπως άλλωστε αναμένεται, λόγω της ήπιας εκχύλισης οδηγεί σε αφέψημα φτωχό σε φαινολικά και αντιοξειδωτικά.

Τέλος όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων ABTS και Folin-Ciocalteu (0,929) αλλά και μεταξύ των DPPH και Folin-Ciocalteu (0,906).

7 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ:

- Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και ολικών φαινολικών συστατικών δείγματος δικάμου το οποίο προέρχεται και από άλλες περιοχές της Ελλάδας και σύγκριση αυτού με το δικάμο της Κρήτης.
- Μικροβιολογικός έλεγχος σε δείγματα δικάμου μετά την πάροδο κάποιων ημερών και προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος.
- Επέκταση της συγκεκριμένης έρευνας με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και με προσθήκη περισσότερων παραγόντων πχ σύσταση εδάφους, απόδοση ανά στρέμμα, κλιματολογικές συνθήκες,
- Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης δικάμου μαζί με άλλες ουσίες όπως πχ μέλι, ζάχαρη, προσθήκη εκχυλίσματος σε κουλουράκια.
- Προσδιορισμός του φαινολικού προφίλ με HPLC.

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γκανιάτσας Κ. 1966. *Amaracus* ή *Origanum dictamnus*. “Συστηματική Βοτανική”, Θεσσαλονίκη, 932-934, 942-944.
- Εγκυκλοπαίδεια ‘Νέα δομή’.1996. δίκταμος. *Νέα δομή*, Εκδόσεις ‘Δομή’, Εκδοτικός Οργ. Τεγόπουλου-Μανιατέα, 158.
- Ζαννετού-Παντελή Κ. 2000. *Origanum cordifolium*. “Η θεραπευτική δυνατότητα των φαρμακευτικών φυτών της Κύπρου, Ιδιότητες-Συνταγές”, Ζαννετού-Παντελή Κυριακή, Λάρνακα 2000, 331-332.
- Θεοδοσίου Π.Φ. 1972. Συμβολή εις την μελέτην των πολυφαινολικών ουσιών του Κρητικού Δικτάμνου (*Origanum Dictamnus* L.). “Αρχείων της Φαρμακευτικής”, 1-3, 21-35.
- Καββάδας Δ.. 1956. *Amaracus* ο Δίκταμος (*Amaracus Dictamnus* Benth., *Origanum dictamnus* L. *Origanum pseudodictamnus* Sieb.). *Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικό*, Αθήνα, τομ.1, 299.
- Μπαζαίος Κ. 1986. Δίκταμο. “100 βότανα 1000 θεραπείες”, Εκδ.οικ. nutri-care κέντρο μελετών-εφαρμογών διατροφής, 155-157.
- Μπαμπαλώνας Δ., Κοκκίνη Σ. 1999. Lamiales. “Συστηματική Βοτανική”, Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., 12-13, 237-239.
- Μπόσκος Δ., Χημεία Τροφίμων, 1997, 4^η Έκδοση, Κεφ. ΙΧ, σελ 230, 231-232, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη
- Οικονομάκης Δ.Κ. 2003. Άρωμα Κρήτης. “ΕΘΙΑΓΕ”, Τριμηνιαία έκδοση του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας, Τεύχος 14, 18-19.

- Οντι Μνιμη Π.. 1994. Δώδεκα Ελληνικά Βότανα, Δημοφιλή βότανα που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στην Ελλάδα από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. “Πλήρης οδηγός φαρμακευτικών βοτάνων”, Της Εταιρίας Βοτάνων (*The Herb Society's*), Εκδ.οικ. Γιαλλελής (Dorling Hershley), 186.
- Πετρίδης Δ. Εφαρμοσμένη Στατιστική με έμφαση στην επιστήμη των τροφίμων, 2000, Εκδόσεις Όμηρος, Θεσσαλονίκη.
- Πρινέας Ι.Κ., Σφακιανάκης Μ.. 1983. Δίκταμος ή Έροντας (Ορίγανον ο δίκταμος). “Βοτανοθεραπευτική”, Εκδ.οικ. Π.Δημητράκου Α.Ε., 100.
- Σκρουμπής Β. 1990. Δίκταμος. “Αρωματικά-Μελισσοτροφικά Φαρμακευτικά φυτά της Ελλάδας”, Έκδοση του Γεωτεχνικού Επιμελητηρίου, 86.
- Σουφλερός Ε. Οινολογία Επιστήμη και Τεχνογνωσία, 1997, τόμος Ι, σελ 7, 119, 122, 191-194, 197-198, 203, Τυπογραφεία Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali K. Atoui, Abdelhak Mansouri, Panagiotis Kefalas, George Boskou. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, January 2004
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J, 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Anal. Biochem*, 239, 70-76
- Couladis M., Tzakou O., Verykokidou E., Harvala C. 2003. Screening of Some Greek Aromatic Plants for Antioxidant Activity. *Phytotherapy Research*, 17, 194-195.
- Daferera J.D., Ziogas N.B., Polissiou G.M. 2000. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric.Food Chem.*, 48, 2576-2581.
- Economakis C., Demetzos C., Anastasaki T., Papazoglou V., Gazouli M., Loukis A., Thanos C., Harvala C. 1999. Volatile constituents of bracts and leaves of wild and cultivated *Origanum dictamnus*. *Planta Medica*, 65(2), 189-191.
- Economakis C., Skaltsa H., Demetzos C., Sokovic M., Thanos A.C. 2002. Effect of Phosphorus Concentration of the Nutrient Solution on the Volatile Constituents of Leaves and Bracts of *Origanum dictamnus*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6276-6280.
- Georgia Kouri, Dimitrios Tsimogiannis, Haido Bardouki, Vassiliki Oreopoulou. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum*

dictamnus, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8 (2007) 155–162, September, 2006.

- Harborne J.B., 1997, *Plant Phenolics in Methods in Plant Biochemistry*, p.p197-199, Academy Press, London
- Karanika S.M., Komaitis M., Aggelis G. 2001. Effect of aqueous extracts of some plants of Lamiaceae family on the growth of *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 175-181.
- Komaitis E.M., Revithi-Moraiti K., Evangelatos.1988. The lipid composition of fresh *Origanum dictamnus* leaves. *Food Chemistry*, 27(1), 25-32.
- Lam L.K.T.,Zweng B., Effects of Essential oils of glutathione S-transferase activity in mice.,*Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1991.
- Lionis C., Faresjo A., Skoula M., Kapsokefalou M., Faresjo T. 1998. Antioxidant effects of herbs in Crete. *The Lancet* 352, 1987-1988.
- Moller K.S.J., Madsen L.H., Aaltonen T., Skibsted H.L. 1991. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215-219.
- Packer L, Colman C, 1999, *The Antioxidant Miracle*, p.p 16-18, 175-177, INC, Canada
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, 2001, *Antioxidants in Food Practical Applications*, Woodhead Publishing Limited
- Revithi-Moraiti K., Komaitis E.M., Evangelatos G., Kapoulas V.V. 1985. Identification and quantitative determination of the lipids of dried *Origanum dictamnus* leaves. *Food Chemistry*, 16(1), 15-24.
- Roberta Re, Nikoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang and Catherine Rice-Evans, ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY, 1998
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1202-1205.
- Skaltsa H., Harvala C. 1987. Contribution a l'étude chimique d' *Origanum dictamnus* L.- 2e communication (glucosides des feuilles). *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome 21, 56-62.

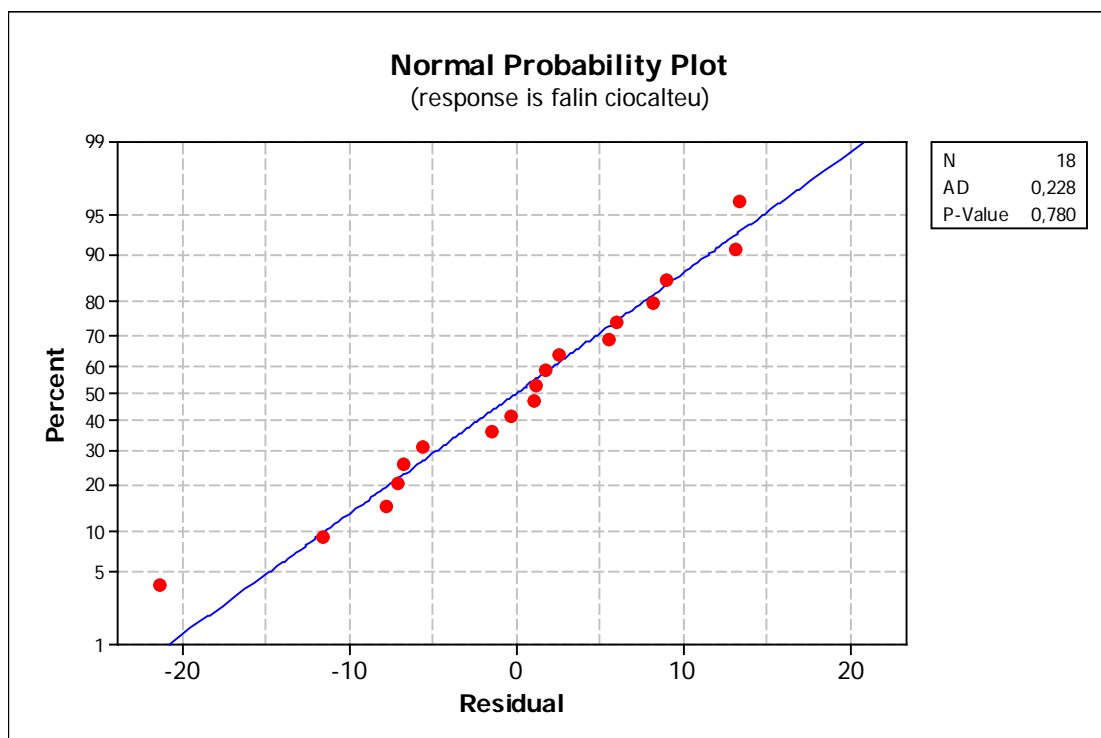
- Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G., Johnson B.C. 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and the sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry*, 52, 649-657.
- Thanos C., Doussi M. 1995. Ecophysiology of seed-germination in endemic Labiates of Crete. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(3), 227-237.
- Turland N.J. ,The Red Data Book ,pp.394-395,(ed.)Phitos D. ,Strid A. ,Snogerup S. ,Greuter W.,World Wide Fund for Nature (WWF),Athens,Greece, 1995.
- Vokou D., Varelzidou S., Katinakis P. 1993. Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 47(3), 223-235.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΔΙΑΔΥΚΤΙΟΥ

- www.iatronet.gr
- ‘Dictamus Creticus mixture’, www.iama.gr
- ‘Diktamus (Dictamus origanus) 50gr’, www.abio.gr/herbs/
- ‘DITTANY OF CRETE’, www.magdalin.com
- ‘ΔΙΚΤΑΜΟΣ’, www.esoterica.gr/articles/alt_med/plants/plants.htm

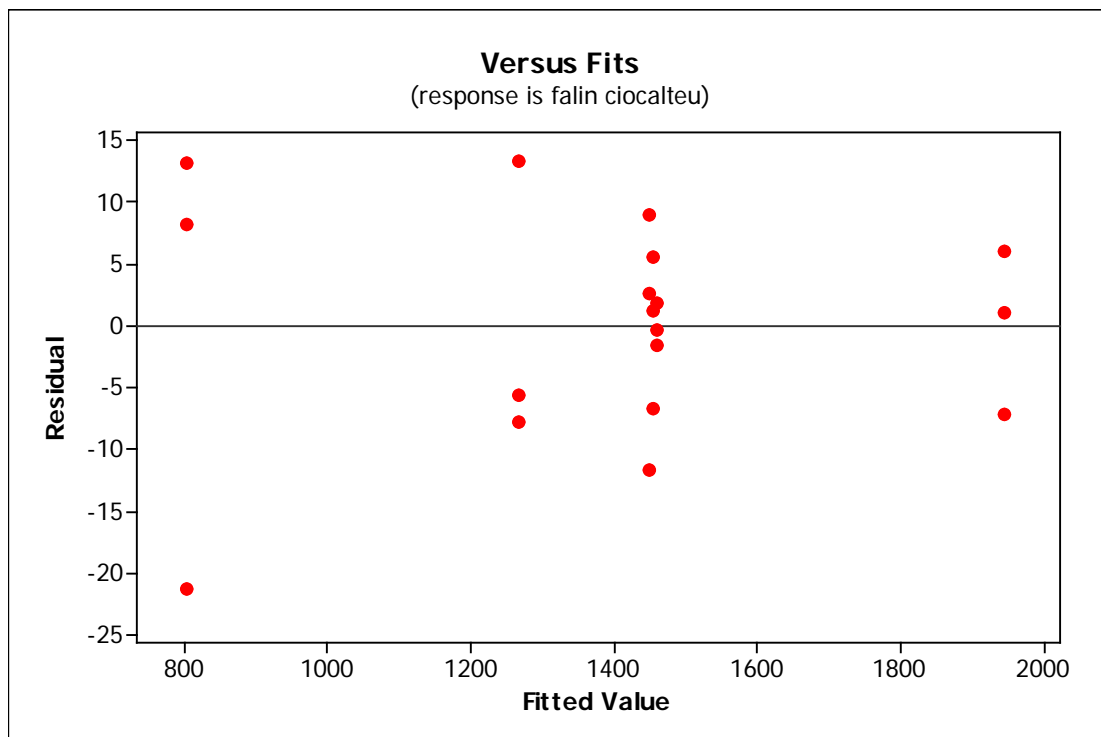
9 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Normplot of Residuals for folin ciocalteu



Σχήμα 7: Έλεγχος κανονικότητας δείγματος δίκταμου που παρασκευάστηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο του Folin – Ciocalteu

Residuals vs Fits for folin ciocalteu



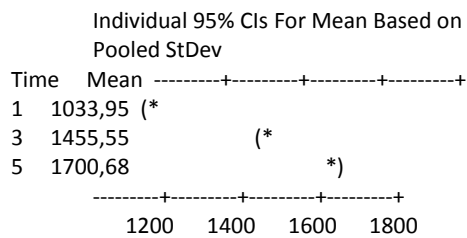
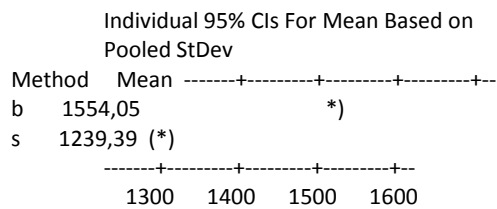
ΣΧΗΜΑ 8 . Γράφημα υπολειμάτων για την folin ciocalteu

Αποτελέσματα two-way ANOVA για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του δείγματος που αναλύθηκε με την μέθοδο FOLIN CIOCALTEU.

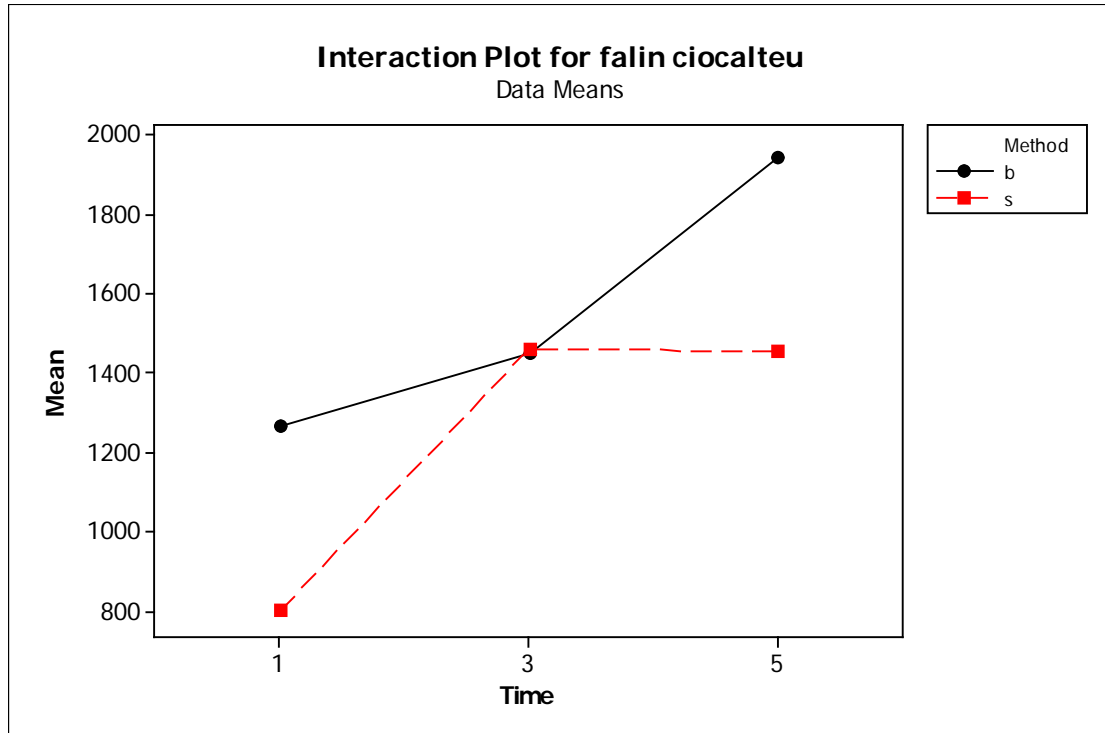
Two-way ANOVA: folin cicalteu versus Method; Time

Source	DF	SS	MS	F	P
Method	1	445549	445549	3931,90	0,000
Time	2	1364707	682353	6021,66	0,000
Interaction	2	238972	119486	1054,44	0,000
Error	12	1360	113		
Total	17	2050587			

S = 10,65 R-Sq = 99,93% R-Sq(adj) = 99,91%

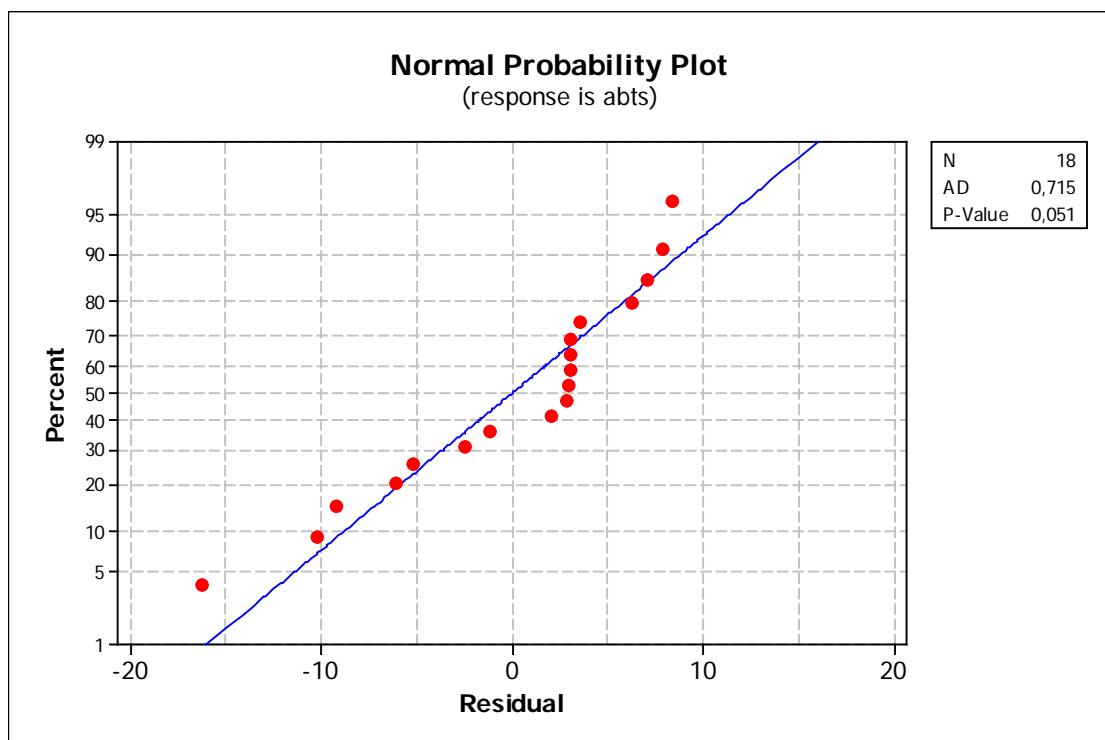


Interaction Plot for folin ciocalteu



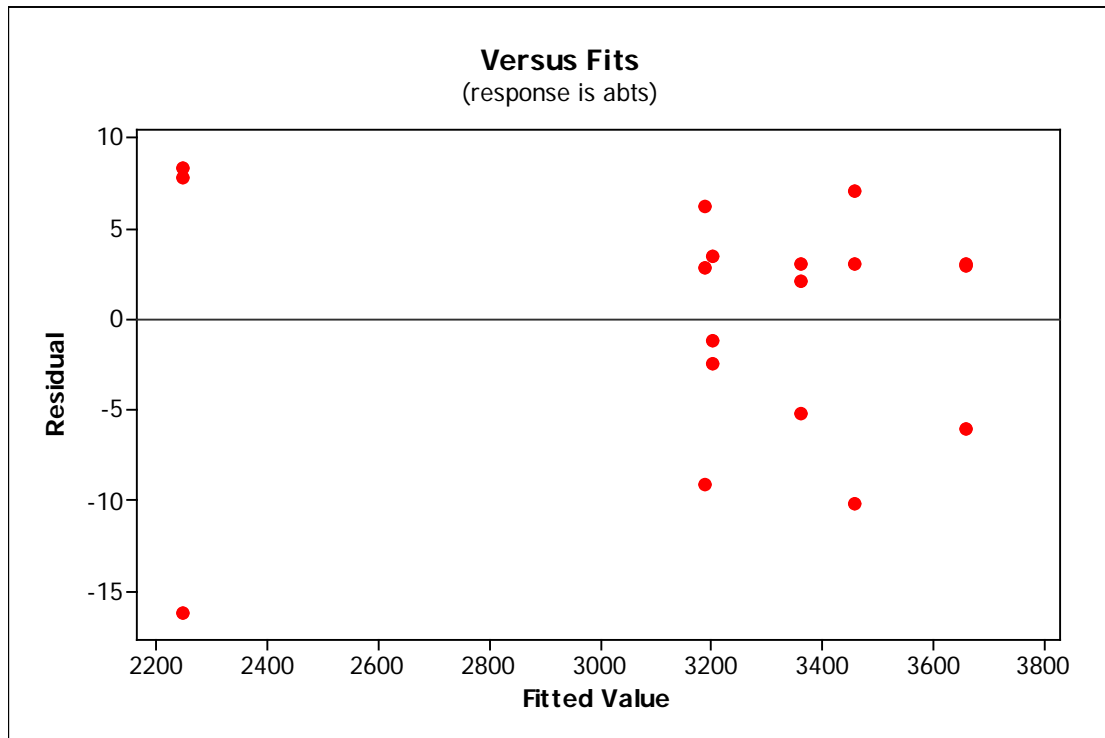
ΣΧΗΜΑ 9 Γραφημα αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρόνου και μεθόδου.

Normplot of Residuals for abts



Σχήμα 10 : Έλεγχος κανονικότητας δείγματος δίκταμου που παρασκευάστηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο του ABTS

Residuals vs Fits for abts



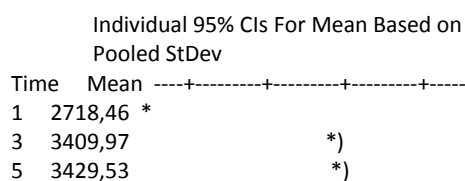
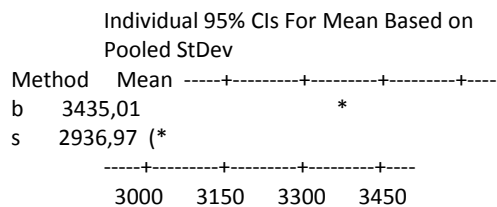
ΣΧΗΜΑ 11. Γράφημα υπολειμάτων για την ABTS

Αποτελέσματα two-way ANOVA για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του δείγματος που αναλύθηκε με την μέθοδο ABTS.

Two-way ANOVA: abts versus Method; Time

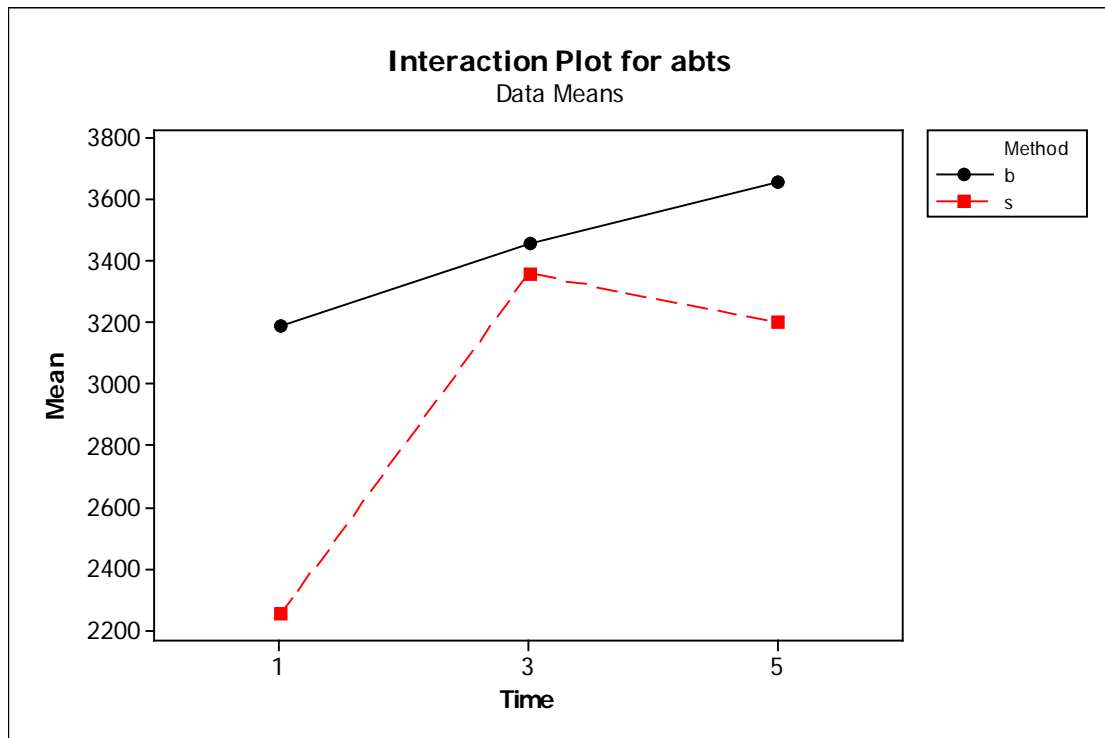
Source	DF	SS	MS	F	P
Method	1	1116182	1116182	16648,30	0,000
Time	2	1968392	984196	14679,67	0,000
Interaction	2	535595	267797	3994,30	0,000
Error	12	805	67		
Total	17	3620973			

S = 8,188 R-Sq = 99,98% R-Sq(adj) = 99,97%



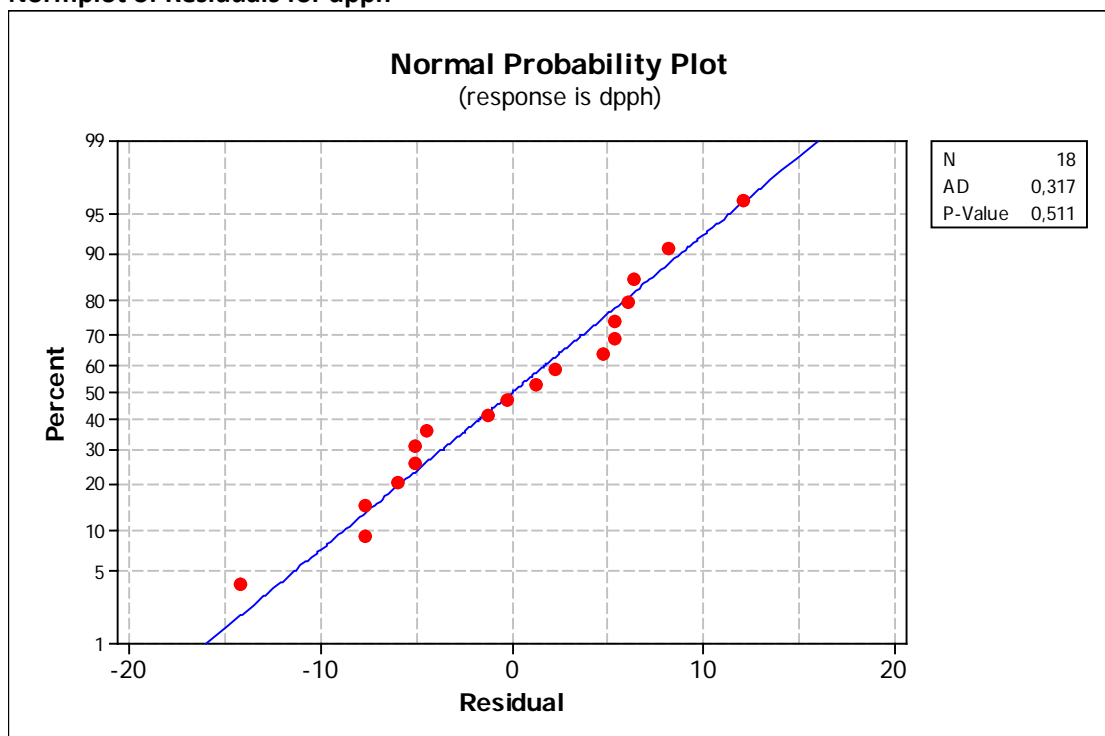
-----+-----+-----+-----+-----
 2800 3000 3200 3400

Interaction Plot for abts



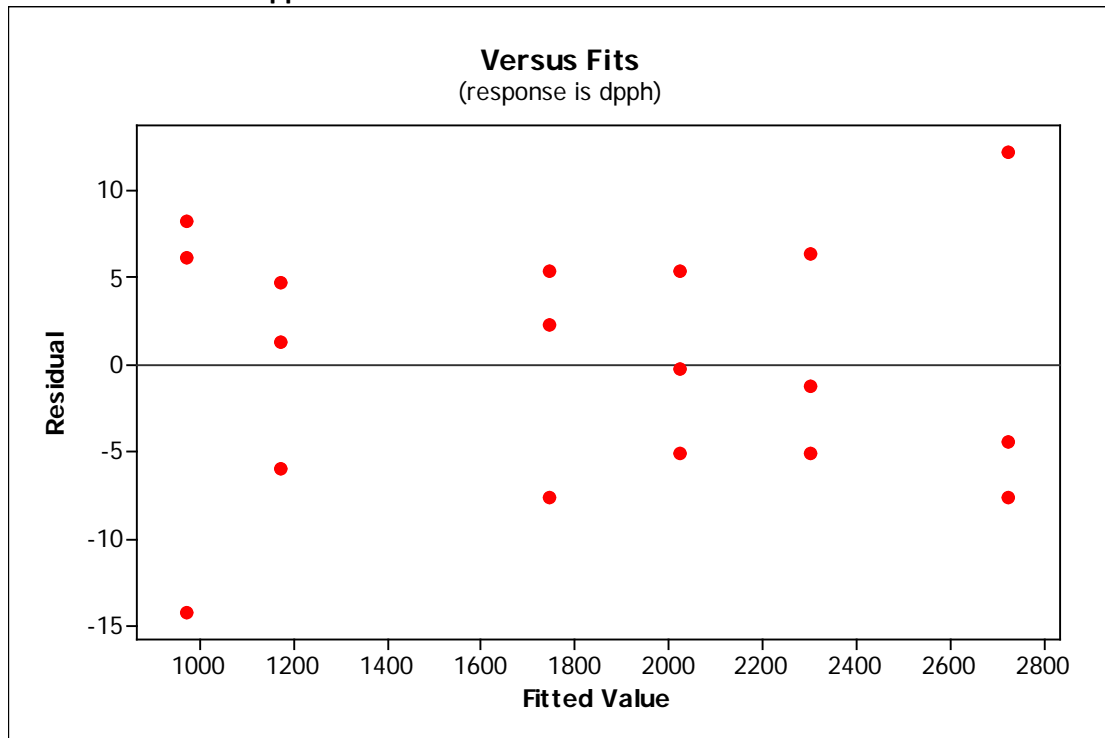
ΣΧΗΜΑ 12. Γραφημα αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρόνου και μεθόδου

Normplot of Residuals for dpph



Σχήμα 13: Έλεγχος κανονικότητας δείγματος δίκταμου που παρασκευάστηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο του DPPH.

Residuals vs Fits for dpvh



ΣΧΗΜΑ 14 Γράφημα υπολειμάτων για την DPPH

Αποτελέσματα two-way ANOVA για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του δείγματος που αναλύθηκε με την μέθοδο DPPH.

Two-way ANOVA: dpvh versus Method; Time

Source	DF	SS	MS	F	P
Method	1	1056099	1056099	15756,36	0,000
Time	2	5114133	2557067	38149,91	0,000
Interaction	2	547318	273659	4082,83	0,000
Error	12	804	67		
Total	17	6718354			

S = 8,187 R-Sq = 99,99% R-Sq(adj) = 99,98%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Method	Mean	Lower CI	Upper CI
b	2065,41	1650	2100
s	1580,96	1650	2100

(*)

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

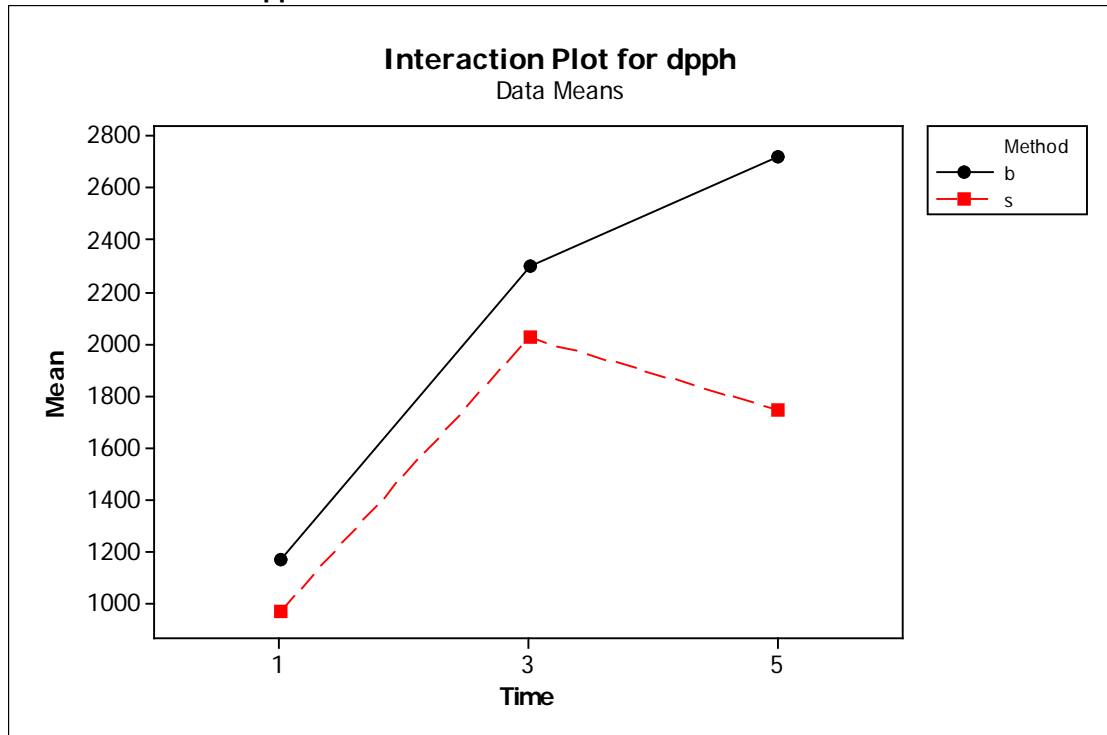
Time	Mean	Lower CI	Upper CI
1	1070,48	1650	2100
3	2164,07	1650	2100

*

5 2234,99 *)

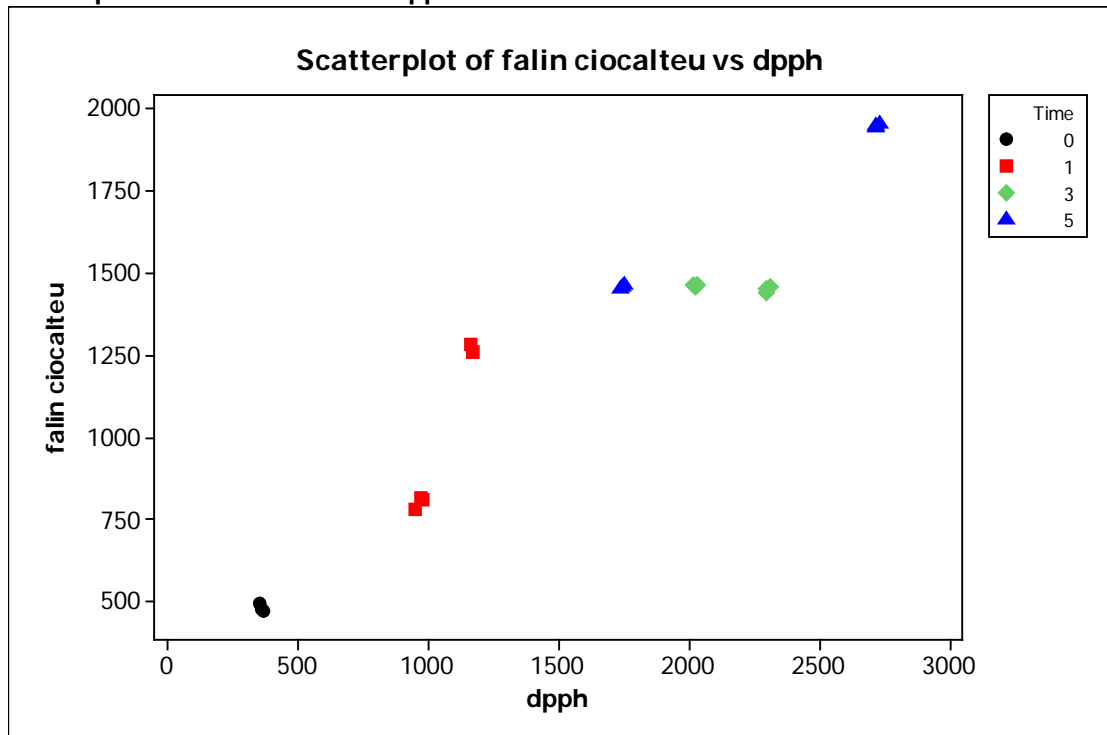
 1200 1500 1800 2100

Interaction Plot for dpph



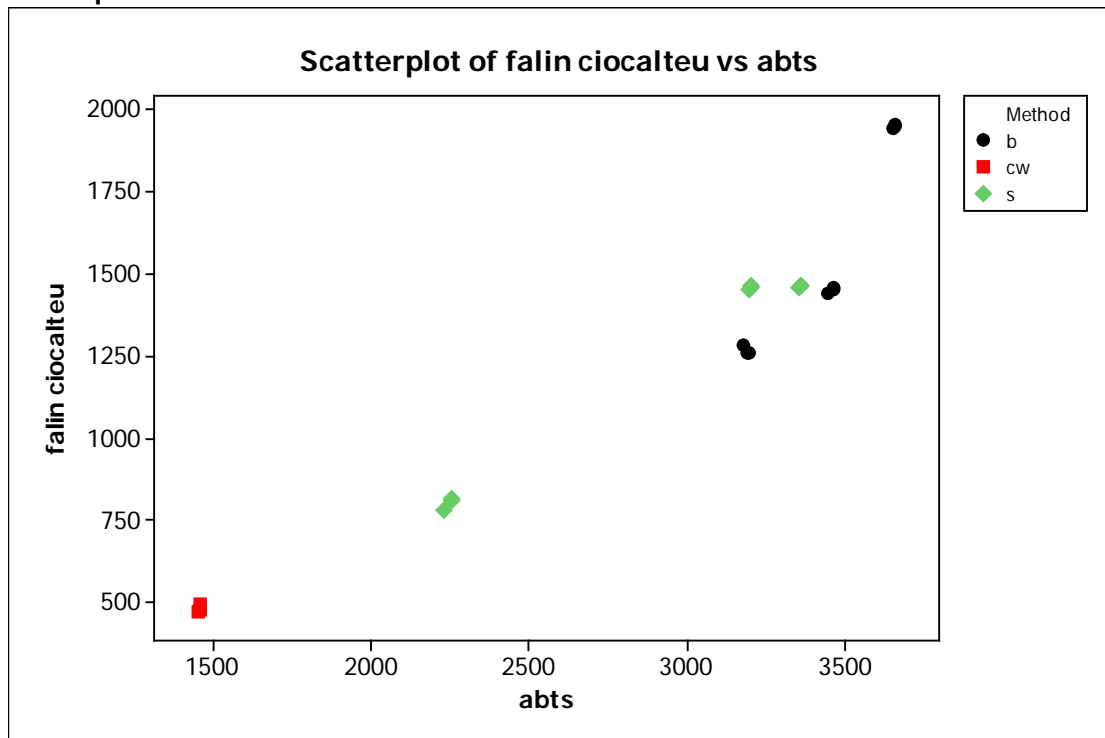
ΣΧΗΜΑ 15. Γραφημα αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρόνου και μεθόδου

Scatterplot of folin ciocalteu vs dpph



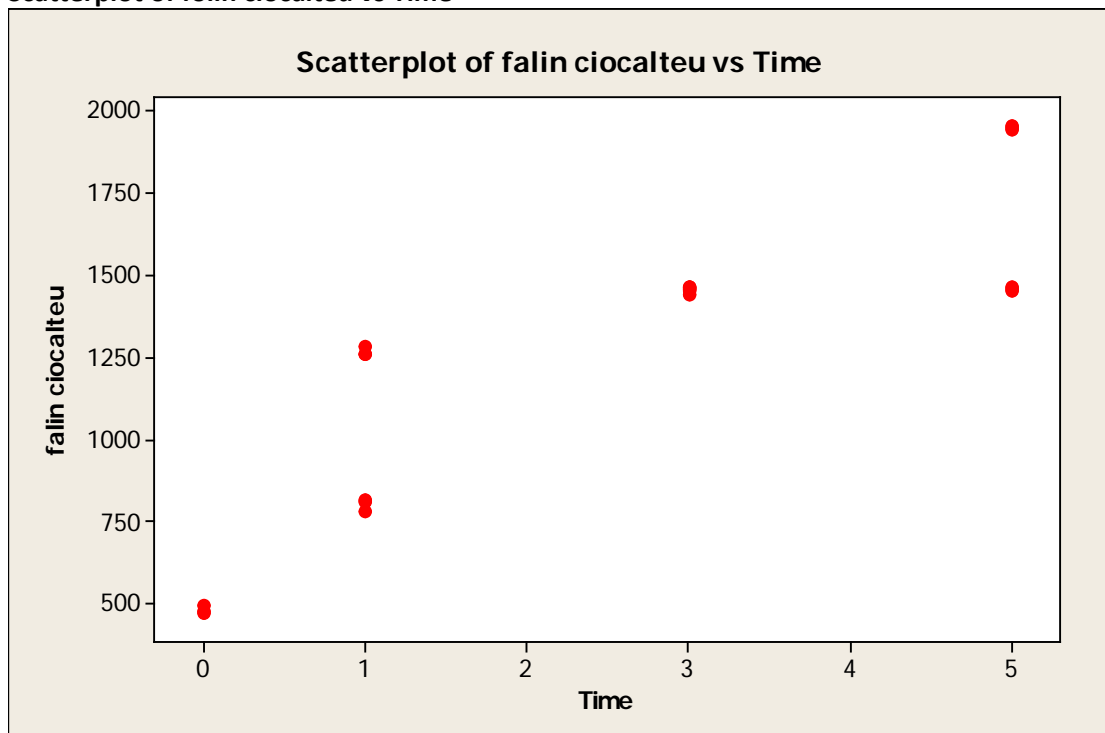
ΣΧΗΜΑ 16. Διάγραμμα διακύμανσης μεταξύ Folin και Dpph.

Scatterplot of folin ciocalteu vs abts



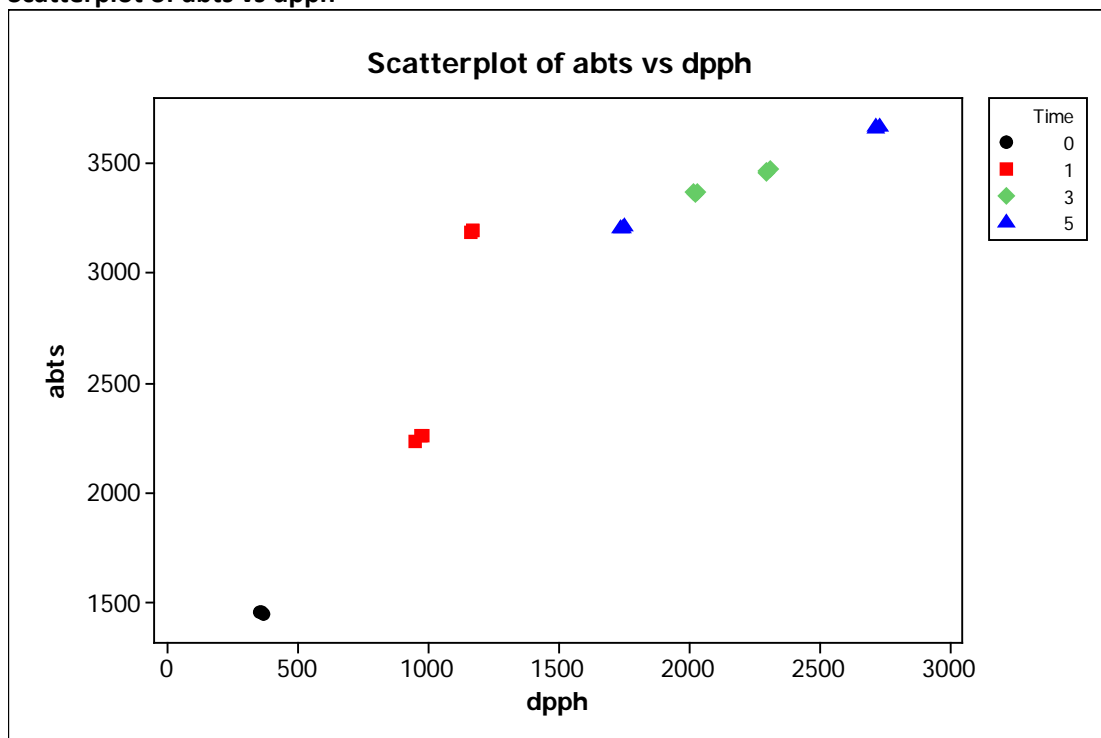
ΣΧΗΜΑ 17. Διάγραμμα διακύμανσης μεταξύ Folin και Abts.

Scatterplot of folin ciocalteu vs Time



ΣΧΗΜΑ 18 Διάγραμμα διακύμανσης μεταξύ Folin και χρόνου.

Scatterplot of abts vs dpph



ΣΧΗΜΑ 19 Διάγραμμα διακύμανσης μεταξύ Abts και Dpph.

Correlations: folin ciocalteu; abts; dpph

	folin ciocalteu	abts
abts	0,929	
dpph	0,906	0,844

Cell Contents: Pearson correlation