

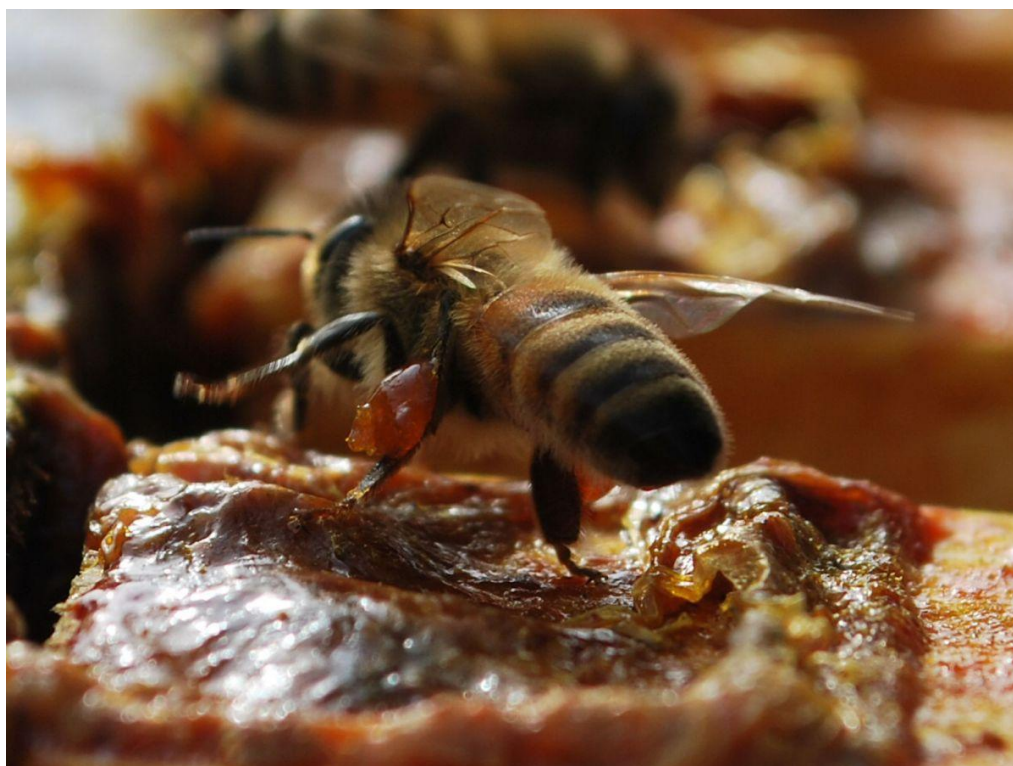
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ



HELLENIC
MEDITERRANEAN
UNIVERSITY of CRETE
SCHOOL of AGRICULTURAL
SCIENCES
DEPARTMENT of AGRICULTURE

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ»



ΦΩΤΕΙΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΡΔΑΚΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΔΡ. ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΑΛΥΣΣΑΝΔΡΑΚΗΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΡ. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΟΝΤΑΞΑΚΗΣ, ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΑΡΓΥΡΩ ΣΤΡΑΤΑΡΙΔΑΚΗ, ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΣΥΝΕΡΓΑΤΙΔΑ

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ &
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΕΛ.ΜΕ.ΠΑ.**

Πηγή Εικόνας Εξώφυλλου: <https://beeactivegr.files.wordpress.com/2017/02/propolis.jpg?w=1200>

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Παραγωγής Γεωργικών Προϊόντων & Πολλαπλασιαστικού υλικού του τμήματος Γεωπονίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του ΕΛ.ΜΕ.ΠΑ. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Αλυσσανδράκη Ελευθέριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο και απαιτητικό έργο.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική συνεργάτιδα, Αργυρώ Στραταριδάκη MSc, για την υποστήριξη που μου παρείχε, όλον αυτό τον καιρό. Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν στους συναδέλφους και φίλους, Σαββιδάκη Ελισσάβετ, Σφακιανάκη Ευαγγελία, Μαραγκουδάκη Ειρήνη, Τσιρακίδου Κατερίνα και Κουτσιανοπούλου Βάϊα, που χάρη στη συμβολή τους στο πειραματικό μέρος της διατριβής, βοήθησαν ώστε να ολοκληρωθεί ταχύτατα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	IV
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VI
ABSTRACT	VIII
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Η ΜΕΛΙΣΣΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ	1
1.1.1 Η ΜΕΛΙΣΣΑ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	1
1.1.2 ΤΑ ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΟΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥΣ	2
1.2 Η ΠΡΟΠΟΛΗ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ	7
1.2.1 ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΙΣΣΑ	7
1.2.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	10
1.2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	11
1.2.4 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ	12
1.2.5 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ	14
1.2.6 ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	19
1.3 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ	21
2.1.1 ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (MACERATION)	21
2.1.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ	24
2.1.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ	26
2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIUCALTEAU 28	
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟΪΔΡΑΖΥΛΟ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ (DPPH)	31
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΕΩΝ ΤΗΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ	34
3.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ	34
3.1.2 ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΤΗΚΑΝ	35
3.2 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΠΟΛΗΣ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	36
3.2.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	36
3.2.2 ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (MACERATION)	37
3.2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ	38
3.2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ	39
3.2.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	39
3.2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	41

3.3	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH	42
3.3.1	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	43
3.3.2	ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (MACERATION)	44
3.3.3	ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ	45
3.3.4	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ	46
3.3.5	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	46
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρόπολη είναι μια φυσική ρητινώδης ουσία και αποτελεί προϊόν της μέλισσας, *Apis mellifera*. Πρόκειται για ένα υλικό που φτιάχνουν οι μέλισσες συλλέγοντας φυτικές ρητίνες και αναμειγνύοντάς τες με κερί, γύρη, μέλι και αιθέρια έλαια από τα φυτά. Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση των κελιών στα οποία γεννάει η βασίλισσα, για να ταριχεύουν μεγάλους εχθρούς που αδυνατούν να τους αποσύρουν εκτός της κυψέλης, για να ενώνουν τμήματα της κυψέλης μεταξύ τους και να κλείνουν κάθε άνοιγμα της κυψέλης, εκτός από μία είσοδο. Επιπλέον, για τον άνθρωπο έχει ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες. Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση μεθόδων εκχύλισης της πρόπολης. Κύριος στόχος ήταν η εύρεση της ταχύτερης και ευκολότερης μεθόδου εκχύλισης, που συνδυάζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Οι μέθοδοι που επιλέχθηκαν είναι η κλασσική μέθοδος, η μέθοδος των μικροκυμάτων και η μέθοδος της ανάδευσης. Κονιορτοποιημένη πρόπολη (1 g) αναμείχθηκε με 10 mL διαλύτη (αιθανόλη:νερό 70:30) και υποβλήθηκε σε εκχύλιση με τις προαναφερθείσες μεθόδους. Σε κάθε δοκιμή, έγιναν τρεις επαναλήψεις. Κατά τη κλασσική μέθοδο, το δείγμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 3 και 7 μέρες, αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα (μερικές φορές την ημέρα). Στη μέθοδο των μικροκυμάτων, κάθε δείγμα εκχυλίστηκε για διαστήματα 10 δευτερολέπτων, με μεσοδιάστημα 2 λεπτών για να κρυώσει. Έγιναν δύο δοκιμές, στην πρώτη τα δείγματα υποβλήθηκαν στην επίδραση των μικροκυμάτων για δύο διαστήματα και στην άλλη για τρία. Στη μέθοδο της ανάδευσης, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 24 και 48 ώρες, στις 150 στροφές ανά λεπτό. Στην περίπτωση της 24ωρης ανάδευσης, έγιναν δύο δοκιμές, με διαφορετική ποσότητα πρόπολης (2 g).

Για την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων, μετρήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, ενώ για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH).

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η κλασσική εκχύλιση, είναι μια απλή και εύκολη μέθοδος, που απαιτεί αρκετό χρόνο, προσφέροντας εκχύλισμα, με μία ικανοποιητική περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά (Κα – 79,9 mg GAE / g πρόπολης), καθώς και σε αντιοξειδωτική δράση (700 mg Trolox / g πρόπολης). Επίσης, η μέθοδος των

μικροκυμάτων, αποτελεί την ταχύτερη μέθοδο εκχύλισης, δίνοντας ένα αξιοσέβαστο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά, ($M\beta - 84,3 \text{ mg GAE} / \text{g πρόπολης}$), έχοντας όμως την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ($575 \text{ mg Trolox} / \text{g πρόπολης}$). Τέλος, η μέθοδος ανάδευσης, έχει τη δυνατότητα να παράξει εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά ($A\beta - 166,5 \text{ mg GAE} / \text{g πρόπολης}$), αλλά και με πολύ μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, μέσα σε ένα ικανοποιητικό χρονικό διάστημα ($1774 \text{ mg Trolox} / \text{g πρόπολης}$). Το δείγμα $A\beta$ είχε διπλάσια ποσότητα πρόπολης, οπότε ήταν λογικό να περιέχει το εκχύλισμα περισσότερα φαινολικά συστατικά και να έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Τα δείγματα $A\alpha$ και $A\gamma$ είχαν παρόμοια περιεκτικότητα σε φαινολικά ($119,1$ και $122 \text{ mg GAE} / \text{g πρόπολης αντίστοιχα}$) και παρόμοια αντιοξειδωτική δράση (978 και $926 \text{ mg Trolox} / \text{g πρόπολης αντίστοιχα}$), που σημαίνει ότι η εκχύλιση για επιπλέον 24 ώρες στο $A\gamma$ δεν έδωσε καλύτερα αποτελέσματα.

Σαν τελικά συμπεράσματα, μπορούμε να πούμε τα εξής:

- Και οι τρεις μέθοδοι έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.
- Η μέθοδος της ανάδευσης έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε 24 ώρες.
- Ανάδευση για 48 ώρες δεν έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από τις 24 ώρες.
- Η μέθοδος των μικροκυμάτων, αν και ταχύτατη, δε δίνει ικανοποιητική ποσότητα φαινολικών στο εκχύλισμα.
- Η επίδραση των μικροκυμάτων ενδέχεται να οδηγεί σε καταστροφή φαινολικών ουσιών ή εκχύλιση κηρών.
- Χρειάζεται να συνεχιστεί η έρευνα, βελτιώνοντας τις συνθήκες των μεθόδων που μελετήθηκαν (π.χ. τροποποίηση του pH του διαλύτη) και αξιολογώντας και άλλες μεθόδους εκχύλισης (π.χ. υπερήχους).

ABSTRACT

Propolis is a natural resinous product of the honeybee, consisting of plant resin, beeswax, bee pollen, honey and plant essential oils. Inside the hive it is used to sterilize the cell for the queen to lay eggs, to embalm large enemies unable to pull outside after they are dead, and to stick together different parts of the hive. Aside from that, propolis has numerous pharmacological properties for humans.

The aim of this thesis was to evaluate different extraction procedures to isolate phenolic components from propolis. Three techniques were evaluated, the maceration technique (MAC), microwave assisted extraction (MAE) and agitation (AGI).

Crushed propolis (1 g) was mixed with 10 mL of solvent ethanolic of 70% in water prior to extraction. Three replications were made for each trial. For MAC, samples were kept in the dark for 3 or 7 days (two trials), with frequent daily manual agitation. For MAE, samples were extracted for 10 seconds and left to cool down for 2 minutes. This was repeated two or three times (two trials). For AGI, samples were agitated at 150 rpm for 24 or 48 hours, while for the 24-hour trial, two samples were extracted, the one having 2 g (instead of 1 g) of propolis. The extracts were evaluated for their total phenolic content with the Folin – Ciocalteu assay and antioxidant potential with the DPPH assay.

MAC is a simple and easy to carry procedure, yet time consuming, but still providing extracts with an adequate amount of phenolics (up to 79,9 mg GAE / g propolis) and antioxidant potential (up to 700 mg Trolox / g propolis). MAE is very fast, providing extracts with phenolic compounds up to 84,3 mg GAE / g propolis; however it showed the lowest antioxidant activity (up to 575 mg Trolox / g propolis). Finally, AGI gave the best results, leading to extracts with total phenolic compounds up to 122 mg GAE / g propolis and antioxidant activity up to 978 mg Trolox / g propolis. Utilizing double proportion of propolis led to richer extracts, but the phenolic compounds and antioxidant capacity were not doubled. Agitation for 48 hours did not increase either the phenolics or the antioxidant activity of the extracts compared to 24 hours.

Conclusively, we can say that all three methods gave adequate results. Agitation for 24 hours gave the best results, commensurate with 48-hour agitation. Microwave assisted extraction is fast, yet not effective. More research is needed to optimize the extraction conditions (e.g. pH adjustment) of the methods investigated, while also evaluating more extraction techniques such as sonication.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η μέλισσα και τα προϊόντα της

1.1.1 Η μέλισσα και η σημασία της για τον άνθρωπο

Η μέλισσα, *Apis mellifera*, είναι ένα έντομο το οποίο προσφέρει ένα πολύτιμο έργο στην ανθρωπότητα. Μία μέλισσα δεν μπορεί να επιβιώσει μόνη της, είναι απαραίτητη η συμβίωση ενός αριθμού μελισσών, ο οποίος κυμαίνεται από 10.000 έως 40.000 άτομα. Ο πληθυσμός αυτός των μελισσών ονομάζεται μελίσσι και απαρτίζεται από μία βασίλισσα, τους κηφήνες και τις εργάτριες μέλισσες (Εικ. 1). Το μελίσσι είναι ένα θαύμα της φύσης, καθώς πρόκειται για μία κοινωνία ζώντων οργανισμών, η οποία είναι απόλυτα λειτουργική και δομημένη με τέτοιο τρόπο, ώστε η κάθε μέλισσα να έχει το δικό της εξειδικευμένο ρόλο μέσα στην κυψέλη (Θρασυβούλου, 2008).



Εικόνα 1. Κηρήθρα με μέλισσες.

Ο ρόλος των μελισσών για τον άνθρωπο είναι σπουδαίος και απαραίτητος για ποικίλους λόγους. Ο κυριότερος εξ αυτών είναι η επικονίαση των φυτών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εδώδιμων καρπών και προϊόντων φυτικής προέλευσης, που προορίζονται για κάλυψη των καθημερινών, ανθρώπινων αναγκών. Η συνεισφορά της μέλισσας στην παγκόσμια οικονομία μέσω της επικονίασης εκτιμάται σε 100 φορές πολλαπλάσια της αξίας του μελιού σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (McGregor, 1976). Περίπου 1500 καλλιεργούμενα είδη χρειάζονται επικονίαση από έντομα, με αποτέλεσμα το 3-8% της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων φυτικής προέλευσης να εξαρτάται από αυτά (Hanley et al., 2015). Η αξία των τροφίμων η

παραγωγή των οποίων εξαρτάται άμεσα από τους επικονιαστές κυμαίνεται μεταξύ 235 και 577 δισεκατομμύρια δολάρια (FAO, 2016). Οι μέλισσες αποτελούν τον σημαντικότερο από αυτούς για τους εξής λόγους (Hung et al., 2018):

- Έχουν παγκόσμια κατανομή και βρίσκονται σε όλο τον πλανήτη και σε μεγάλους αριθμούς, ένεκα της εκμετάλλευσής τους από τον άνθρωπο.
- Θεωρούνται υπερ-γενικευμένοι επικονιαστές (super-generalist), εκτιμώντας ότι το 13% των φυτικών ειδών δέχεται επισκέψεις από αυτές.
- Οι πληθυσμοί των άγριων επικονιαστών μειώνονται σημαντικά σε όλον τον κόσμο, για λόγους όπως η μείωση των ενδιαιτημάτων τους, τα φυτοφάρμακα και η αλλαγή του κλίματος.

Οι εκτάσεις με καλλιεργούμενα φυτά που χρειάζονται επικονίαση αυξάνονται διαρκώς, με αποτέλεσμα ο αριθμός των μελισσών που χρειάζονται στην Ευρώπη ως επικονιαστές να έχει πενταπλασιαστεί μεταξύ 2005 και 2010 (Breeze et al., 2014).

Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις η επικονίαση επιτυγχάνεται με τις μέλισσες, καθώς επισκέπτονται τα άνθη, για να συλλέξουν την τροφή τους, την οποία αποτελούν η γύρη και το νέκταρ. Οι γυρεοσυλλέκτριες μέλισσες επισκέπτονται τους ανθήρες, ώστε να συλλέξουν τους ώριμους γυρεόκοκκους. Σχηματίζουν δύο μικρούς σβώλους γύρης, υγραίνοντάς τους, χρησιμοποιώντας το νέκταρ των φυτών ή το σάλιο τους και συμπιέζοντάς τους στα κάνιστρα, ειδικές κατασκευές στις εξωτερικές πλευρές του τρίτου ζεύγους των ποδών τους. Η επικονίαση ουσιαστικά, πραγματοποιείται με την μεταφορά γυρεοκόκκων, που έχουν προσκολληθεί στις τρίχες του εντόμου, από ένα άνθος στο άλλο (Πλακούτσης, 2006). Με αυτή την δράση τους λοιπόν, οι μέλισσες εξασφαλίζουν την τροφή τους, όμως έμμεσα, εμπλουτίζουν το ανθρώπινο διαίτολόγιο, διότι γονιμοποιούν τα άνθη δίνοντας παραγωγή και κατ' επέκταση, εισόδημα στους γεωργούς, εφόσον καλλιεργούν εντομόφιλες ποικιλίες, που απαιτούν την συμβολή των μελισσών για την επικονιάσή τους (Χαριζάνης, 2017).

1.1.2 Τα μελισσοκομικά προϊόντα και οι χρήσεις τους

Η μέλισσα, μεταξύ των ζωντανών οργανισμών, αποτελεί έναν από τους θησαυρούς της φύσης. Εργάζεται ακατάπαυστα, καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας, για να εξασφαλίσει την τροφή, την υγιεινή και την ασφάλεια, τόσο στην ίδια, όσο και σε ολόκληρο το μελίσσι. Σε αυτό το σημείο,

έχουμε την εμπλοκή του μελισσοκόμου, ο οποίος εκμεταλλευόμενος την εργατικότητα των μελισσών, αξιοποιεί τα προϊόντα τους προς όφελος της ανθρώπινης υγείας, φροντίζοντας πάντοτε να μην διαταράσσει τις ισορροπίες μέσα στην κυψέλη. Πρόκειται για προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας, κάποια από τα οποία είναι περισσότερο γνωστά, όπως για παράδειγμα, το μέλι, η γύρη, το κερί και κάποια άλλα λιγότερο, όπως το δηλητήριο της μέλισσας, ο βασιλικός πολτός και η πρόπολη. Στη συνέχεια, θα περιγραφούν τα προϊόντα αυτά εκτενέστερα, δίνοντας έμφαση στα συστατικά, τις ιδιότητες και τις χρήσεις τους, τόσο από τον άνθρωπο, όσο και από τις ίδιες τις μέλισσες.

Μέλι

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπάρχει μεγάλη γκάμα μελισσοκομικών προϊόντων και μάλιστα, με ιδιαίτερη διατροφική αξία για την ανθρώπινη διατροφή, καθώς επίσης και με πολλές, διαφορετικές χρήσεις. Το κυριότερο και πιο γνωστό μελισσοκομικό προϊόν που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος είναι το μέλι. Είναι μια τροφή ιδιαίτερα πλούσια σε συστατικά, καθώς περιέχει υδατάνθρακες, κυρίως σάκχαρα, οξέα, μεταλλικά άλατα και ιχνοστοιχεία, πρωτεΐνες, ελεύθερα αμινοξέα, ένζυμα, βιταμίνες, αιθέρια έλαια και νερό (Λιάκος, 2005).

Η παραγωγή μελιού από τις μέλισσες είναι μία περίπλοκη διαδικασία, έχοντας ως αφετηρία, την συλλογή του νέκταρος από τα άνθη το οποίο δια μέσω του οισοφάγου, καταλήγει στον πρόλοβο ή μελισσοστόμαχο. Μόλις επιστρέψει η συλλέκτρια μέλισσα από την πτήση της, αδειάζει το περιεχόμενο του προλόβου και μοιράζεται το φρεσκομαζεμένο νέκταρ στις μέλισσες που βρίσκονται εντός της κυψέλης. Λίγο αργότερα, προσροφάται εκ νέου και αυτό επαναλαμβάνεται για αρκετές φορές. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η εξάτμιση μεγάλης ποσότητας νερού και κατά συνέπεια η συμπύκνωσή του. Παράλληλα, εμπλουτίζεται με ένζυμα απαραίτητα για τη μετατροπή του σε μέλι. Το νέκταρ αποθηκεύεται στις κηρήθρες για την περαιτέρω συμπύκνωσή του και το σφράγισμα των κελιών σηματοδοτεί την ωρίμανση του μελιού από όπου έπειτα, συλλέγεται από τον μελισσοκόμο και είναι έτοιμο προς βρώση, χωρίς καμία επεξεργασία (Karl von Frisch, 1998).

Το μέλι, χρησιμοποιείται από τις εργάτριες μέλισσες ως τροφή, ώστε να εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια, για την πραγματοποίηση των εργασιών εντός και εκτός της κυψέλης.

Η πιο διαδεδομένη ανθρώπινη χρήση του, είναι η κατανάλωσή του ως βρώσιμη, γλυκαντική ουσία (Εικ. 2). Το μέλι προσφέρει στον οργανισμό, όλες εκείνες τις ουσίες που χρειάζεται για τον

μεταβολισμό των σακχάρων και την μετατροπή τους σε ενέργεια. Έτσι λοιπόν, αυξάνεται η μυϊκή δύναμη, η αντοχή και οι διανοητικές ικανότητες, καταστέλλονται καταστάσεις κόπωσης και ενισχύεται ο οργανισμός έναντι στις ασθένειες. Επίσης, έχει θεραπευτικές ιδιότητες στο έλκος στομάχου, την αϋπνία, τους πονοκεφάλους κ.ά..



Εικόνα 2. Μέλι σε κηρήθρα.

Επιπλέον, το μέλι είναι άριστο καρδιοτονωτικό και χρησιμοποιείται από φαρμακοβιομηχανίες για την παρασκευή αντιβηχικών σιροπιών και καραμελών κατά του πονόλαιμου. Το μέλι σε συνδυασμό με γύρη και πρόπολη, χρησιμοποιείται στα πλαίσια της «μελισσοθεραπείας» του πεπτικού, αναπνευστικού, καρδιαγγειακού και άλλων συστημάτων. Τέλος, είναι γνωστή η χρήση του στην παρασκευή φυσικών καλλυντικών και περιποίησης του δέρματος (Χαριζάνης, 2017).

Βασιλικός πολτός

Εκτός από το μέλι, ένα επίσης ευρέως γνωστό προϊόν των μελισσών, για τις ευεργετικές του ιδιότητες, είναι ο βασιλικός πολτός. Βρίσκεται εντός του βασιλικού κελιού και αποτελεί την τροφή της εκκολαπτόμενης βασίλισσας (Εικ. 3). Πρόκειται για μια πλούσια, ισχυρά όξινη, πρωτεϊνούχο και πολύ πολύπλοκη τροφή, με ιδιάζουσα οσμή και παχύρευστη υφή, εμπλουτισμένη με πολλά ανόργανα άλατα (κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος και



Εικόνα 3. Βασιλικός πολτός σε κελιά.

μαγγάνιο) και βιταμίνες, κυρίως του συμπλέγματος Β. Επιπλέον η χαρακτηριστική γεύση καθώς και το άρωμα του βασιλικού πολτού, οφείλονται στο χαμηλό pH (3,4 - 4,5) (Θεργιάκης, 2010). Καταναλώνεται ως συμπλήρωμα διατροφής για ενίσχυση του οργανισμού κυρίως από λεχώνες, ηλικιωμένους και αθλητές, καθώς επίσης και από ασθενείς που πάσχουν από νευρώσεις διαφόρων ειδών, από ασθένειες στομάχου, ήπατος, εντέρου και αναπνευστικού συστήματος.

Γύρη

Η συλλεχθείσα γύρη, αποτελεί ένα προϊόν μεγάλης διατροφικής και όχι μόνο αξίας. Η γύρη ουσιαστικά είναι οι αρσενικοί γαμέτες των ανθέων, τους οποίους συλλέγουν οι εργάτριες για να τους χρησιμοποιήσουν στη διατροφή των προνυμφών τους (Εικ. 4). Κατόπιν, ο μελισσοκόμος, τοποθετεί στην είσοδο της κυψέλης την γυρεοπαγίδα, για να «κλέψει» την γύρη από τα πόδια της μέλισσας. Η συλλογή της γύρης πραγματοποιείται κατά την περίοδο αυξημένης ανθοφορίας και μόνον από δυνατά μελίσσια. Η



ΠΗΓΗ: <https://katothika.gr/wp-content/uploads/2014/07/idiotites-tis-giris.jpg>

Εικόνα 4. Σβώλοι γύρης.

χημική σύνθεση της γύρης μεταβάλλεται ανάλογα με την φυτική της προέλευση, κατά κύριο λόγο όμως περιέχει έναν αυξημένο αριθμό πρωτεϊνών, βιταμινών, ανόργανων αλάτων και διάφορων ιχνοστοιχείων. Η γύρη, αποτελεί απαραίτητη τροφή για την μέλισσα, τόσο για να παράξει βασιλικό πολτό, όσο και για την επιβίωση του μελισσιού. Όσον αφορά στη σπουδαιότητά της για τον άνθρωπο, μια κουταλιά της σούπας γύρη καλύπτει μεγάλο μέρος των ημερήσιων αναγκών σε πρωτεΐνη, κάποιες βιταμίνες (προβιταμίνη Α, βιταμίνες Β2 και Β5, φολικό οξύ) και κάποια μεταλλικά στοιχεία (φωσφόρος, σίδηρος, μαγνήσιο, ψευδάργυρος). Επιπλέον, ενδείκνυται προς χρήση στην φαρμακοβιομηχανία, στην παρασκευή καλλυντικών και βέβαια για εμπλουτισμό της διατροφής του ανθρώπου. Θα πρέπει να επισημάνουμε ότι η γύρη μπορεί να προκαλέσει στομαχικές διαταραχές, ενώ υπαρκτή είναι η πιθανότητα εμφάνισης αλλεργιών που συνήθως παρουσιάζονται σε άτομα με αλλεργικές προδιαθέσεις σε συγκεκριμένα φυτά από τα οποία συλλέγεται η γύρη (Schmidt & Buchmann, 1992).

Κερί

Το φυσικό κερί μέλισσας, αποτελεί ένα μίγμα από περίπου 300 διαφορετικές ουσίες. Οι μέλισσες παράγουν το κερί σε μορφή λεπιού, μέσω των 8 κηρογόνων αδένων που βρίσκονται στην κάτω πλευρά της κοιλίας τους, καταναλώνοντας μέλι ή σιρόπι. Για την παραγωγή ενός κιλού κεριού, απαιτείται η κατανάλωση 8,5 κιλών μελιού (Χαριζάνης, 2017). Το καθαρό κερί έχει λευκό χρώμα. Το κίτρινο χρώμα της κηρήθρας, οφείλεται



Εικόνα 5. Κερί μέλισσας κιτρινισμένο από χρωστικές της γύρης.

στα λιποδιαλυτά καροτινοειδή που προέρχονται από τη γύρη (Εικ. 5). Χρησιμοποιείται συχνότερα για την παρασκευή φυσικών κηραλοιφών, σαπουνιών και φυτικών καλλυντικών, αλλά και στην φαρμακοβιομηχανία για αλοιφές, επίχρισμα χαπιών κ.λπ.. Επίσης, οι μελισσοκόμοι χρησιμοποιούν το κερί για την κατασκευή φύλλων κηρήθρας. Επιπλέον, η παρασκευή λαμπάδων, κεριών και άλλων χειροτεχνημάτων, γίνεται με τη χρήση του. Τέλος, μία όχι και τόσο διαδεδομένη χρήση του φυσικού κεριού είναι εκείνη της εγκαυστικής ζωγραφικής, η οποία ονομάζεται αλλιώς και «ζωγραφική με ζεστό κερί» (Καλλίνικος, 1969).

Δηλητήριο

Το δηλητήριο της μέλισσας είναι ένα ακόμη πολύπλοκο υλικό, με κύριο συστατικό του το πεπτίδιο μελιτίνη. Πρόκειται για ένα διαυγές υγρό, με χαρακτηριστικό άρωμα, έντονη πικρή γεύση και όξινη αντίδραση. Παράγεται από δύο αδένες που ενώνονται με το κεντρί των εργατριών μελισσών. Η μέγιστη ποσότητα του δηλητηρίου



Εικόνα 6. Κεντρί τη στιγμή που αποκολλάται από το σώμα της μέλισσας.

μέσα στον σάκο, μπορεί να φτάσει τα 0,3 mg (Χαριζάνης, 2017). Το δηλητήριο, είναι το αμυντικό μέσο των μελισσών. Μόνο τα θηλυκά μπορούν να τσιμπήσουν διότι μόνο αυτές διαθέτουν το σύστημα κεντρί-σάκος δηλητηρίου. Όταν αισθανθούν απειλή οι εργάτριες ή η βασίλισσα, τρυπούν τον ιστό του θύματος με το κεντρί τους, αφήνοντάς το εκεί, με αποτέλεσμα, μετά από λίγο να πεθαίνουν (Εικ. 6). Το κεντρί που παραμένει πάνω στον ιστό, συνεχίζει να διοχετεύει δηλητήριο για 30-60 δευτερόλεπτα, καθώς οι μυς εξακολουθούν να συσπώνται. Χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο ως θεραπευτικό για διάφορες ασθένειες, ειδικότερα από πάσχοντες ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Θρασυβούλου, 2008).

Πρόπολη



Εικόνα 7. Κομμάτια πρόπολης των μελισσών.

Η πρόπολη (Εικ.7) αποτελεί το «κύριο συστατικό» της παρούσας πτυχιακής διατριβής. Πρόκειται για ένα υλικό που φτιάχνουν οι μέλισσες συλλέγοντας φυτικές ρητίνες και αναμειγνύοντάς τες με κερί, γύρη, μέλι και αιθέρια έλαια από τα φυτά. Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση των κελιών στα οποία γεννάει η βασίλισσα, για να ενώνουν τμήματα της κυψέλης μεταξύ τους κ.λπ.. Για τον άνθρωπο έχει πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες οι οποίες θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω.

1.2 Η πρόπολη των μελισσών

1.2.1 Κυριότερα συστατικά και χρήσεις από την μέλισσα

Η πρόπολη είναι μία φυσική ρητινώδης ουσία και αποτελεί ένα μίγμα από κερί, ρητίνες (Εικ. 8) και βάλσαμα, αιθέρια έλαια και γύρη. Επίσης, έχει βρεθεί, μεταξύ των άλλων συστατικών και ίχνη λαδομπογιάς αλλά και πίσσας. Πολλές φορές, κατά την πτήση τους για την συλλογή της πρόπολης, οι μέλισσες, μπορεί να επισκεφτούν ακόμη και πρόσφατα ασφαλοστρωμένους δρόμους. Για το λόγο αυτό, η συλλεχθείσα ακατέργαστη πρόπολη, θα πρέπει να υφίσταται ειδική επεξεργασία μετά τη συλλογή της από την κυψέλη.



Εικόνα 8. Ρητίνη πεύκου.

Πρόκειται για ένα ακόμη μελισσοκομικό προϊόν, όπως προαναφέρθηκε, του οποίου η σύσταση εξαρτάται από την χλωρίδα της εκάστοτε περιοχής. Η περιεκτικότητα του καθενός από τα παραπάνω συστατικά της, δεν είναι πανομοιότυπη, διότι το κάθε φυσικό οικοσύστημα διαθέτει διαφορετικά φυτικά είδη, επομένως η σύσταση της πρόπολης διαφοροποιείται από περιοχή σε περιοχή. Σημαντικό ρόλο, διαδραματίζει και η εποχή που θα συλλεχθεί, καθώς μεταβάλλονται οι ανθοφορίες, όπως επίσης και η φυλή της συλλέκτριας

μέλισσας (Marcucci, 1995).

Σύμφωνα με τα στοιχεία που έχει παρουσιάσει ο FAO το 2007, οι κυριότερες κατηγορίες ενώσεων της πρόπολης, καθώς και οι περιεκτικότητές τους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και είναι οι εξής:

- Πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους), 45-55%
- Κηροί (μίγμα από πράσινο κερί φυτικής προέλευσης και το προστιθέμενο κερί των μελισσών) καθώς και λιπαρά οξέα, 25-35%
- Αιθέρια έλαια, 10%
- Γύρη (πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα), 5%
- Διάφορα άλλα μέταλλα και οργανικά συστατικά (ιχνοστοιχεία, κετόνες, λακτόνες, κινόνες, στεροειδή, βενζοϊκά οξέα και εστέρες, βιταμίνες και σάκχαρα), 5%.

Πίνακας 1. Χημική σύνθεση της πρόπολης.

Τάξη Συστατικών	Κατηγορία- Ομάδα	Περιεκτικότητα
Πολυφαινόλες	Φλαβονοειδή	45 – 55%
	Φαινολικά οξέα και εστέρες	
Κηροί	Λιπαρά Οξέα (κυρίως από το κερί των μελισσών, αρκετά έχουν φυτική προέλευση)	25 – 35%
Αιθέρια Έλαια	Πτητικά συστατικά	10%
Γύρη	Πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα	5% (16 αα περιέχονται σε συγκέντρωση >1% των ολικών αα, από τα οποία η αργινίνη και η προλίνη αποτελούν το 45,8% της σύστασης, 8 από αυτά σε ίχνη)
Μέταλλα και άλλα 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%
	Κετόνες	
	Λακτόνες	
	Κινόνες	
	Στεροειδή	
	Βενζοϊκά οξέα και εστέρες	
	Βιταμίνες	
	Σάκχαρα	

Οι μέλισσες, χρησιμοποιούν την πρόπολη μέσα στην κυψέλη με ποικίλους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η χρήση της ως μονωτικό υλικό, για να σφραγίσουν το καπάκι την κυψέλης, να ενώσουν τα πλαίσια μεταξύ τους, ακόμη και να κλείσουν σχισμές ώστε να εξασφαλίσουν τις άριστες συνθήκες στο εσωτερικό της κυψέλης. Αποτελεί επίσης, προϊόν απολύμανσης κελιών των κηρηθρών, ώστε

αυτά να είναι έτοιμα για να φωτοκήσει η βασίλισσα.



Εικόνα 9. *Acherontia atropos* ταριχευμένη με πρόπολη εντός της κυψέλης.

Επιπλέον, οι μέλισσες ταριχεύουν με την πρόπολη εχθρούς, όπως τρωκτικά και μεγάλα έντομα, που θανατώθηκαν στο εσωτερικό της κυψέλης και δεν ήταν σε θέση να τα μεταφέρουν έξω από αυτήν (Εικ. 9). Με αυτό τον τρόπο, σταματούν την αποσύνθεση των θανόντων οργανισμών, κρατώντας, ταυτόχρονα, καθαρό και αποστειρωμένο τον χώρο της κυψέλης. Μία από τις σπουδαιότερες για τις μέλισσες χρήσεις της πρόπολης είναι η μείωση του ανοίγματος της εισόδου, από όπου πήρε και το όνομά της, από τις ελληνικές λέξεις “προ” και “πόλις” (προ της πόλης) (Μπίκος, 2017).

1.2.2 Προέλευση

Στο πέρασμα των χρόνων, έχουν αναφερθεί διάφορες εκδοχές, ως προς την προέλευση της πρόπολης. Η πρώτη, χρονολογικά, θεωρία που καταγράφηκε ήταν του γερμανού ερευνητή Kustenmacher (1907), ο οποίος υποστήριξε πως η πρόπολη προέρχεται από τους κόκκους της γύρης. Πιο συγκεκριμένα, περιέγραψε ένα ρητινώδες κατάλοιπο, προερχόμενο από την πρώτη φάση της πέψης της γύρης, που συντελείται σε ένα όργανο μεταξύ του στομάχου και του εντέρου. Το κατάλοιπο αυτό, οι μέλισσες, το αναμιγνύουν με κερί, με διάφορα άλλα συστατικά προερχόμενα από τη γύρη και με ακαθαρσίες σε διάφορες ποσότητες (Cizmarik and Matel, 1973).

Είκοσι χρόνια αργότερα, έρχεται στο φως μία δεύτερη θεωρία για την προέλευση της πρόπολης. Σύμφωνα με τον Rosch (1927), οι μέλισσες συλλέγουν ρητίνες και εκκρίσεις από τους οφθαλμούς των φυτών και από τον φλοιό των ρητινούχων δένδρων, στην περιοχή γύρω από το μελισσοκομείο. Έπειτα, οι μέλισσες χρησιμοποιούν τα σαγόνια τους για να αφαιρέσουν ένα κομμάτι της ρητίνης ή της έκκρισης, το οποίο παράλληλα το επεξεργάζονται. Στη συνέχεια, η πρόπολη υφίσταται μία κατεργασία από το πρώτο ζεύγος ποδών, έπειτα μεταφέρεται στο δεύτερο ζεύγος, όπου τελικά θα καταλήξει σε ένα από τα κάνιστρα του τρίτου ζεύγους ποδών. Με αυτόν τον τρόπο λοιπόν, η μέλισσα δημιουργεί σβώλους πρόπολης, όπως ακριβώς κάνει και με τη γύρη (Cizmarik and Matel, 1973).

Σήμερα επικρατεί μια συνδυασμένη θεωρία των δύο προηγούμενων. Οι μέλισσες παράγουν την πρόπολη, συλλέγοντας ρητίνες και εκκρίσεις που βρίσκονται πάνω σε αιχμές, φυλλοφόρους οφθαλμούς και φύλλα δένδρων, κυρίως από τις λεύκες, τα κωνοφόρα και την ιτιά. Καθώς προσροφούν τις ρητίνες, τις αναμιγνύουν με τα ένζυμα της σιέλου τους. Αυτή η θεωρία ενισχύεται από το γεγονός ότι τα περισσότερα φλαβονοειδή, τα οποία έχουν αναγνωριστεί και απομονωθεί από την πρόπολη, βρέθηκαν ως ελεύθερα συστατικά, ως αγλυκόνες και όχι ως γλυκοζίτες, όπως βρίσκονται σε φυτικά υποστρώματα (Cizmarik and Matel, 1973, Bankova et al., 2014).

1.2.3 Συλλογή και επεξεργασία από τον άνθρωπο

Σε μία απλή επιθεώρηση των κυψελών, ο μελισσοκόμος βρίσκεται αντιμέτωπος με μια ‘μικρή ενόχληση’, η οποία λέγεται πρόπολη. Από τους πρώτους, κιόλας, χειρισμούς του πάνω από μία κυψέλη, είναι το ξεσφράγισμα του καπακιού της κυψέλης, που έχουν κολλήσει περιμετρικά οι μέλισσες. Έπειτα, ακολουθεί η αποκόλληση των πλαισίων μεταξύ τους, αλλά και μεταξύ του πλαισίου και του κορμού της κυψέλης (Εικ. 10). Έτσι λοιπόν, ο μελισσοκόμος καλείται να ξεκολλήσει την πρόπολη που βρίσκεται κολλημένη στα σημεία που προείπαμε και που δυσκολεύει το έργο του. Η πρόπολη αυτή, θεωρείται υποβαθμισμένη, διότι μπορεί να είναι πολύ παλιά (σκούρο χρώμα), αλλά και λόγω της περιεκτικότητάς της σε κερί, ξύλο, ρινίσματα κ.λπ. (Τράκα, 2012).



Εικόνα 10. Κηρήθρες κολλημένες μεταξύ τους με πρόπολη.

Για συστηματική, επαγγελματική, συλλογή της πρόπολης, υπάρχουν στο εμπόριο ειδικά πλέγματα, τα οποία τοποθετούνται στο εσωτερικό των κυψελών, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Τα πλέγματα αυτά μοιάζουν στην μορφή με το βασιλικό διάφραγμα, με την μόνη διαφορά να είναι η διάμετρος των οπών, από τις οποίες δεν χωρούν να περάσουν οι μέλισσες. Η τοποθέτησή τους είναι απλή και γίνεται πάνω από τα πλαίσια και κάτω από το καπάκι. Με το γέμισμα του πλέγματος σηματοδοτείται η ολοκλήρωση της διαδικασίας της συλλογής. Το πλέγμα αφαιρείται και τοποθετείται στην κατάψυξη, όπου η πρόπολη σκληραίνει και γίνεται εύθραυστη, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται εύκολα από αυτό. Στους 25 °C η πρόπολη είναι μαλακή και κολλάει στα χέρια, επομένως είναι δύσκολη η οποιαδήποτε μεταχείρισή της. Πριν την τοποθέτησή της στην κατάψυξη θα ήταν επιθυμητό να γίνει ένας πρόχειρος καθαρισμός από μεγάλα μόρια ξένων υλών, προς διευκόλυνση για το επόμενο στάδιο καθαρισμού της (Χαριζάνης, 2017).

Ένα από τα πλέγματα που περιγράφηκαν, είναι το πλαστικό πλέγμα, το οποίο είναι αρκετά εύκαμπτο, με επιμήκεις, λεπτές οπές (Εικ. 11). Επίσης, χρησιμοποιείται και μεταλλικό πλέγμα, με πολύ μικρές, τετράγωνες οπές, αρκετά εύκαμπτο και αυτό. Σημαντικό μειονέκτημα όμως αποτελεί το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για το γέμισμα όλου του πλέγματος, αλλά και την μειωμένη παραγωγή, σε σχέση με το πλαστικό πλέγμα. Τέλος, υπάρχει και το πλέγμα με εύκαμπτο

PVC, το οποίο διαθέτει το ίδιο μέγεθος οπών με το μεταλλικό πλέγμα, και συνεπώς τα ίδια μειονεκτήματα.

Η επεξεργασία της συλλεχθείσας πρόπολης είναι το σημαντικότερο στάδιο. Στο σημείο



ΠΗΓΗ: <https://melissokomianet.gr/wp-content/uploads/2019/05/propolis.jpg>

Εικόνα 11. Πλαστικό πλέγμα για τη συλλογή πρόπολης.

αυτό απομακρύνονται τμήματα ξύλου, πέτρας, κεριού, εντόμων,

λαδομπογιάς και άλλων ξένων σωμάτων. Αφού ολοκληρωθεί ο πρώτος καθαρισμός, η επιλεγμένη πρόπολη μεταφέρεται σε ένα δοχείο με κρύο νερό, και έπειτα από ανάδευση αφαιρούνται οι ξένες ύλες που επιπλέουν στην επιφάνεια. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου η επιφάνεια του νερού να είναι απαλλαγμένη από οποιαδήποτε ξένη ύλη. Στη συνέχεια, ξηραίνονται όλα τα κομμάτια της πρόπολης και εξετάζονται προσεκτικά για τυχόν υπολείμματα ακαθαρσιών (Τράκα, 2012).

Το επόμενο βήμα, είναι ο διαχωρισμός της πρόπολης από το κερί. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να τοποθετηθεί η πρόπολη σε μπεν μαρί, με την στάθμη του νερού να βρίσκεται 5 εκατοστά πάνω από την επιφάνεια της πρόπολης. Το νερό θερμαίνεται στους 70 °C και συγχρόνως αναδεύεται. Με το πέρας 2-3 λεπτών, αφαιρείται το δοχείο και αφήνεται να κρυώσει. Το λιωμένο κερί σχηματίζει κρούστα στην επιφάνεια, και κατόπιν αφαιρείται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να απομακρυνθεί όλο το κερί από την πρόπολη (Χαριζάνης, 2017).

1.2.4 Χημική σύνθεση

Η πρόπολη, όπως έχουμε ήδη πει, δεν διαθέτει την ίδια σύνθεση, καθώς εξαρτάται από την βοτανική προέλευση, την εποχή και την περιοχή από την οποία προέρχεται. Πέρα από τα κυριότερα συστατικά που αναφέραμε παραπάνω (1.2.1.), η πρόπολη περιέχει περίπου 150 διαφορετικά συστατικά που έχουν αναγνωρισθεί, όπως: λιπαρά και φαινολικά οξέα και οι εστέρες τους, τερπενοειδή, στεροειδή, αρωματικές αλδεΐδες, αλκοόλες, σεσκιτερπένια, αμινοξέα, φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, διυδροφλαβονόλες, χαλκόνες), παράγωγα ναφθαλενίου και στιλβενίου (Greenaway et al., 1991, Aga et al., 1994). Συνέπεια της ύπαρξης των πολυφαινολών

αποτελούν οι ποικίλες βιολογικές ιδιότητες που προσφέρουν τα εκχυλίσματα της πρόπολης, οι οποίες σχετίζονται με την υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (Trusheva et al., 2006, Τρουλλίδου, 2007).

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν ένα ιόν υδροξυλίου, συνδεδεμένο με έναν αρωματικό δακτύλιο, και αποτελούν μία από τις κύριες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών (Καραμανώλη, 2014). Αυτές, ομαδοποιούνται σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες. Η ομάδα φαινολικών, με την οποία θα ασχοληθούμε εκτενώς στην παρούσα πτυχιακή διατριβή, είναι αυτή των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις που βρίσκονται στα ανώτερα φυτά και είναι υπεύθυνα για τους χρωματισμούς στη φύση. Διακρίνονται σε διαφορετικές ομάδες, οι οποίες είναι οι εξής: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβανόνες, αουρόνες, καλκόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες και φλαβανοδιόλες (Μπόσκος, 2004). Οι φλαβόνες, προσδίδουν κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα στα άνθη, τα φύλλα και τους καρπούς, ευθύνονται όμως σε ένα βαθμό και για το χρωματισμό του εκχυλίσματος της πρόπολης (Εικ. 12).



Εικόνα 12. Εκχύλισμα πρόπολης με το χαρακτηριστικό χρώμα.

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντοχή σε υψηλές εντάσεις φωτός, και μάλιστα έχουν την ικανότητα να απορροφούν την UV ακτινοβολία. Έτσι λοιπόν, σε συνθήκες υψηλής ακτινοβολίας, τα φλαβονοειδή συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα, όπου με αυτόν τον τρόπο προστατεύουν τους ιστούς του οργανισμού στον οποίον βρίσκονται. Επιπλέον, είναι γνωστή η αντιοξειδωτική τους δράση, παρεμποδίζοντας τα οξειδωτικά ένζυμα, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, δημιουργώντας χηλικές ενώσεις με μέταλλα, και τέλος ανάγοντας την άλφα τοκοφερόλη (Καραμανώλη, 2014).

Όσον αφορά την σύσταση της ελληνικής πρόπολης, βρέθηκε από μελέτες και πειράματα που έχουν διεξαχθεί ότι είναι πλούσια σε τερπενοειδή, ειδικότερα σε ά-πινένιο (a-pinene) (Melliou et al., 2007). Επιπλέον, ερευνητές της Χώρας μας έχουν γνωστοποιήσει στο κοινό εξειδικευμένες ομάδες ενώσεων, οι οποίες λαμβάνονται από συγκεκριμένα φυτικά είδη, όπως για παράδειγμα:

- Λεύκες: πολυφαινόλες
- Κωνοφόρα - πουρνάρια - μαστιχόδενδρα: τριτερπένια
- Λαδανιά: διτερπένια (Τράκα, 2012).

Σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί σε πανεπιστήμια της Κίνας, μετρήθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους, εκχυλίσματα πρόπολης, με προέλευση χώρες εκτός Ευρώπης (Βραζιλία, Κίνα κ.ά.) και ταυτοποιήθηκαν 15 διαφορετικά φλαβονοειδή. Πιο συγκεκριμένα, από τις φλαβόνες βρέθηκαν: η χρυσίνη, η απιγενίνη και η λουτεολίνη. Από τις φλαβονόλες, ταυτοποιήθηκε η ρουτίνη, η μορίνη, η κβερκετίνη, η μυρικετίνη, η καμπερόλη και η γκαλανγκίνη. Ακόμη, στις φλαβανόνες σημειώθηκε η ναριγκίνη, η ναριγκενίνη και η εσπερετίνη. Τέλος, γίνεται αναφορά για την δαϊδεζίνη και την γενιστεΐνη, οι οποίες ανήκουν στις ισοφλαβόνες (Chang et al., 2002).

Πέρα από τα φλαβονοειδή, υπάρχει και η κατηγορία των φαινολικών οξέων, η οποία ανήκει και αυτή στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Σε εκχυλίσματα τούρκικης πρόπολης, ταυτοποιήθηκαν επτά διαφορετικά φαινολικά οξέα, με το καφεϊκό οξύ να εμφανίζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Επιπλέον βρέθηκαν, το φερουλικό οξύ, το κινναμμικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, και τέλος το βανιλλικό οξύ, κατά φθίνουσα σειρά σε σχέση με την περιεκτικότητα που εντοπίστηκαν (Ristivojenic et al., 2018).

1.2.5 Ιδιότητες της πρόπολης

Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρόπολη έχει ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές, αντιιικές, αντιοξειδωτικές, ηπατοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές (Marcucci, 1995). Οι βακτηριοστατικές ιδιότητες της πρόπολης, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ισοδύναμες με την δράση των αντιβιοτικών, αν ληφθεί υπόψη ότι το λεπτό επικάλυμμα πρόπολης, στο εσωτερικό της κυψέλης, έχει αποδειχθεί αρκετό, για να εμποδίσει την διάβρωση του ξύλου, από το βακτήριο *Bacillus larvae*, το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για τέτοιου είδους καταστροφές (Lindenfelser, 1968). Επιπλέον, οι αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ουσίες που βρίσκονται στην πρόπολη, δρουν ενάντια στα παθογόνα βακτήρια και τους τοξικούς μύκητες, χωρίς αυτό να σημαίνει, ότι είναι επιβλαβείς για τον ανθρώπινο οργανισμό (Burdock, 1998). Ακόμη μία σημαντική δράση είναι η αναστολή της ανάπτυξης του μελανώματος (melanoma) και των κακοήθων νεοπλασματικών κυττάρων (carcinoma tumor cells), καθώς και η αντιδιαβητική και σπασμολυτική δράση της (Missima et al., 2010). Συνοψίζοντας, τόσο η εσωτερική, όσο και η εξωτερική η χρήση της πρόπολης, δεν επηρεάζει την φυσική μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου, δεν παρουσιάζει παρενέργειες (πέραν από ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις αλλεργιών) και η χρήση της δεν προκαλεί εθισμό, δηλαδή σχηματισμό ανθεκτικών στελεχών. Αντιθέτως, ενισχύει τα τριχοειδή αγγεία, βοηθάει σε περιπτώσεις αναπνευστικής

ανεπάρκειας, προσδίδει πλούσιες ευεργετικές ιδιότητες στον ανθρώπινο οργανισμό, ενισχύοντας παράλληλα την θετική επίδραση των φαρμάκων (Marcucci et al., 2001).

Αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πρόπολη έχει αποδεδειγμένα αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή ιδιότητα. Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα στα οποία εξετάστηκε η αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση της πρόπολης, έναντι στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* (Orsi et al., 2005), στο πρωτόζωο *Trypanosoma cruzi*, καθώς και στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus faecalis* (Marcucci et al., 2001, Popova et al., 2005). Ωστόσο, η αντιβακτηριακή ιδιότητα της πρόπολης, λέγεται πως οφείλεται στη δράση των φλαβονοειδών, των αρωματικών οξέων και των εστέρων τους, των πρενυλιωμένων κουμαρικών οξέων και των διτερπενίων που περιέχονται στη φυτική ρητίνη (Bankova, 2005, Bankova et al., 1996).

Σε πείραμα που εφαρμόστηκε σε τραυματισμένους διαβητικούς ποντικούς, στην Βραζιλία, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα κόκκινης πρόπολης και διαπιστώθηκε πως η αντιβακτηριακή ιδιότητά της συνέβαλλε στην επούλωση των διαβητικών πληγών. Κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία αυτή φαίνεται να είχε η ένωση της φορμονετίνης (Picolotto et al., 2019).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, έπειτα από ανάλυση δειγμάτων πρόπολης από την Πρέβεζα, βρέθηκε ότι οι ουσίες 7-O-πρένυλ-στρομπονίνη, 7-O-πρένυλ-πινοσεμπρίνη, πινοσεμπρίνη και χρυσίνη, επιδεικνύουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Μάλιστα, η πινοσεμπρίνη έδειξε να διαθέτει ισχυρότερη δράση έναντι του βακτηρίου *Streptococcus mutans*, υπεύθυνο για την δημιουργία της πλάκας στα δόντια και του *Streptococcus viridians*, το οποίο προκαλεί λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα (Melliou & Chinou, 2004).

Όσον αφορά την αντιμυκητιακή δράση της πρόπολης, έχουν βρεθεί ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα. Έχει πραγματοποιηθεί έρευνα με διάφορα είδη του μύκητα *Candida*, και αποδείχθηκε πως καταστέλλει την δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι καλλιέργειες των μυκήτων εκτέθηκαν σε εκχυλίσματα πρόπολης, παρουσίασαν μια ευαισθησία ως προς αυτά (Ota et al., 2001). Επιπλέον, βάμμα πρόπολης, χρησιμοποιείται κατά τη λαϊκή ιατρική για την καταπολέμηση της μυκητιακής στοματίτιδας (κοινώς άφθα ή άφτρα). Αίτιο για τη δημιουργία της συγκεκριμένης μυκητίασης είναι ο μύκητας *Candida albicans*, που προσβάλλει και την στοματική κοιλότητα.

Αντιική δράση

Τα φλαβονοειδή που περιέχονται στην πρόπολη, έχει αποδειχθεί πως έχουν και αντιική ιδιότητα, πέραν των υπολοίπων δράσεων. Αυτό συμβαίνει μέσω του εγκλεισμού τους στο πρωτεϊνικό τους κάλυμμα. Εδώ και αρκετά χρόνια, έχει διαδοθεί η χρήση της πρόπολης για την καταπολέμηση του επιχείλιου έρπητα. Η επιστήμη όμως, ήρθε να μας γνωστοποιήσει τις ακριβείς ουσίες της πρόπολης, που δρουν ενάντια του συγκεκριμένου ιού. Γερμανοί ερευνητές, εφάρμοσαν εκχυλίσματα πρόπολης έναντι του ιού του έρπητα τύπου 1 (HSV-1) και οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, η χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη και η γκαλανγκίνη, καταστέλλουν τη δράση του ιού (Amoros et al., 1992, Schnitzler et al., 2010).

Ορισμένοι ερευνητές υποστήριζαν πως η αντιική ιδιότητα της πρόπολης οφείλεται τόσο στα κύρια συστατικά, όσο και στα δευτερεύοντα, όπως για παράδειγμα το 3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο καφεϊκό οξύ και το 3-μεθυλοβουτυλο φερουλικό οξύ (Marcucci, 1995). Επιπλέον, έχει διερευνηθεί η επίδραση της πρόπολης στον ιό της πολυομυελίτιδας, όπου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό του. Τέλος, εκτός από την επίδραση στον πολλαπλασιασμό των ιών, σημειώθηκε και η ιοκτόνος δράση στον ιό της φυσαλιδώδους στοματίτιδας (VSV) (Amoros et al., 1992).

Αντιοξειδωτική δράση

Η πρόπολη, ως υλικό πλούσιο σε φλαβονοειδή, είναι λογικό να παρουσιάζει ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες της πρόπολης είναι αυτή της αντιοξειδωτικής. Οι ελεύθερες ρίζες (Reactive oxygen species, ROS), είναι παραπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων και είναι υπεύθυνες για βλάβες του δέρματος. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά την έκθεση του δέρματος σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως ακτινοβολίες, υπεριώδες φως ή ακτίνες X, αλλά και μέσω της εξελικτικής διαδικασίας της γήρανσης. Η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, σε συνδυασμό με το άπλετο οξυγόνο που υπάρχει στην ατμόσφαιρα, οδηγεί στον σχηματισμό των ROS. Κατά αυτόν τον τρόπο, προκαλούνται ανεπιθύμητες και επιβλαβείς επιπτώσεις στο δέρμα, λόγω της ανισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών, σε βάρος των αντιοξειδωτικών. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως οι ROS συμβάλλουν στην οξείδωση των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα πρόπολης και που καθιστούν απόλυτα χρηστική, την δημιουργία προϊόντων πρόπολης (Gulcin et al., 2010).

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μία από τις κυριότερες ομάδες ενώσεων, οι οποίες εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, με σημαντικότερο το καφεϊκό οξύ (Banskota et al., 2000). Σε άλλες έρευνες, έχουν αναφερθεί ως σημαντικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, πέρα από το καφεϊκό οξύ και το κουμαρικό οξύ, το 3,4-διμεθοξυκινναμωμικό οξύ, η κβερκετίνη, η πινομπανξίνη, η απιγενίνη, η καμπφερόλη, η χρυσίνη, η πινοσεμπρίνη και η γκαλανγκίνη (Marcucci et al., 2001, Kumazawa et al., 2004).

Σύμφωνα με τους Ahn et al. (2007), το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης, που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος, φερουλικού οξέος και του φαιναιθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE). Όσον αφορά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ιδιότητας της πρόπολης, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων, όπως για παράδειγμα με τον αποχρωματισμό της ρίζας ABTS ή DPPH. Τα συστατικά τα οποία εκδηλώνουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και κατέχουν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση οξείδωσης των λιπαρών οξέων, είναι οι φαινολικές ενώσεις και ειδικότερα τα φλαβονοειδή (Ahn et al., 2007, Gulcin et al., 2010).

Αντικαρκινική δράση

Μία από τις πλέον σημαντικές, ιδιότητες της πρόπολης, αποτελεί η αντικαρκινική της δράση. Εδώ και αρκετά χρόνια, γίνονται συνεχείς έρευνες και πειράματα, με εκχυλίσματα πρόπολης, εξετάζοντας την συγκεκριμένη ιδιότητά της. Η πρόπολη μπορεί να δράσει τόσο προληπτικά, όσο και θεραπευτικά, κατά των διάφορων μορφών καρκίνου. Οι ερευνητές έχουν οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης της πρόπολης περιλαμβάνει την απόπτωση (κυτταρικός θάνατος), την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την παρεμβολή της μεταστατικής διαδικασίας (Watanabe et al., 2011). Επιπλέον, αναφέρεται πως μια από τις σημαντικότερες δράσεις που εκδηλώνουν οι ουσίες που βρίσκονται στην πρόπολη, είναι η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και όχι των φυσιολογικών (Koumenis et al., 2004).

Το CAPE έχει βρεθεί, πως διαθέτει αντικαρκινική δράση, διότι οδηγεί σε συρρίκνωση των όγκων και, δρώντας επιλεκτικά, καταστρέφει και παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων, διαφόρων τύπων καρκίνου. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με πρόπολη από το Ισραήλ, σε ανθρώπινα και ζωικά καρκινικά κύτταρα με μελάνωμα, καρκίνο του μαστού, καρκίνο του εντέρου και καρκίνωμα των νεφρών, τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά λόγω της κυτταροτοξικής δράσης του CAPE (Grunberger et al., 1988). Έχει ερευνηθεί επίσης και η δράση της χρυσίνης, η οποία έχει ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες (Watanabe et al., 2011). Οι Kim

et al. (2008), έχουν δοκιμάσει την δράση υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης, για την θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος, με ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα.

Υπάρχουν μελέτες, που έχουν δείξει κυτταροτοξικές και κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, αλλά και του σαρκώματος σε ποντίκια (Ross, 1990). Επίσης, μία ακόμη ουσία της πρόπολης, η αρτεπιλίνη C, έχει κι αυτή, κυτταροτοξική δράση, ενάντια στο γαστρικό καρκίνωμα και τον καρκίνο των πνευμόνων (Chan et al., 2012, Kimoto et al., 1998). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η αποτελεσματικότητα των συστατικών της πρόπολης είναι μεγαλύτερη όταν χορηγούνται όλα μαζί, παρά μεμονωμένα. Σύμφωνα με έρευνα που έχει διεξαχθεί, όταν τα συστατικά της πρόπολης με αντικαρκινική δράση, χορηγήθηκαν μεμονωμένα, βρέθηκε μειωμένη αποτελεσματικότητα στον έλεγχο της εκδήλωσης μεταστάσεων, από ότι όταν δίδονται με την πρόπολη. Πιο συγκεκριμένα, ποντίκια χωρίς θεραπεία, εκδήλωσαν κατά μέσο όρο 62 μεταστάσεις. Με την χορήγηση ενέσεων καφεϊκού οξέος, ο μέσος όρος των μεταστάσεων μειώθηκε στο 43, ενώ με την λήψη πρόπολης, ο μέσος όρος έφτασε τις 22 μεταστάσεις. Αυτή η δράση οφείλεται στη συνέργεια ανάμεσα στα διαφορετικά συστατικά της πρόπολης, αναφέρουν ερευνητές. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι εάν η αγωγή λαμβάνεται προληπτικά, δηλαδή πριν την εμφάνιση κάποιας μορφής καρκίνου, τα αποτελέσματα είναι ακόμη πιο ενθαρρυντικά (Τράκα, 2012).

Αντιφλεγμονώδης δράση

Μια ακόμη ευεργετική ιδιότητα της πρόπολης είναι η αντιφλεγμονώδης δράση της, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται συχνά για τη θεραπεία φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων (Marcucci, 1995). Επίσης, η αντιφλεγμονώδης δράση της πρόπολης, όταν χρησιμοποιείται εξωτερικά, επιδρά θετικά στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τις φλεγμονές της τραχείας και του λάρυγγα κ.ά., ενώ αν χρησιμοποιηθεί εσωτερικά, έχει αντιρευματικές ιδιότητες. Τέλος, σύμφωνα με τους Banskota et al. (2001), η αντιφλεγμονώδη δράση της πρόπολης, οφείλεται στα φλαβονοειδή και στον φαιναιθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος, λόγω κυρίως της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Επούλωτική δράση

Από τις πιο διαδεδομένες δράσεις της πρόπολης είναι αυτή της επούλωσης των κατεστραμμένων ιστών του δέρματος, επίδραση που οφείλεται κυρίως στα αιθέρια έλαια που περιέχει. Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για την προστατευτική της δράση, ως προς τους ιστούς

που έχουν υποβληθεί σε ραδιενέργεια. Ως εκ τούτου, η αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης έχει πολύ ισχυρή επίδραση στην αναγέννηση των κατεστραμμένων κυττάρων και η οποία οφείλεται στην περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Marquele et al., 2006).

Αντιπαρασιτική δράση

Πέρα από όλες τις άλλες δράσεις της, η πρόπολη είναι αποτελεσματική και στην αναστολή των παρασίτων, όπως Τρυπανοσώματα, Τριχομονάδες κ.ά.. Αιτία της αντιπαρασιτικής της δράσης είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Έχει μελετηθεί η αντιπαρασιτική ιδιότητα της πρόπολης, ενάντια στο *Trypanosoma cruzi*, στο *Trichomonas vaginalis* και στον κοκκίτη. Επίσης, η πρόπολη χαρακτηρίζεται ως καλό αντικοκκιδιακό, ενάντια στο *Chilomonas paramecium* (Marcucci, 1995, Freitas et al., 2006).

Τοξικότητα της πρόπολης

Πέρα από τις ευεργετικές ιδιότητές της, η πρόπολη διαθέτει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα η τοξική της δράση. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε ποντίκια, η μέγιστη ημερήσια ποσότητα που καταναλώθηκε, χωρίς να εμφανιστεί κάποια αρνητική επίδραση, ήταν 1440 mg/kg. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η συλλέκτρια μέλισσα μπορεί να συλλέξει πίσσα από ασφαλτο δρόμου που έχει μόλις στρωθεί, λαδομπογιές κ.λπ.. Ομοίως, έχουν ανιχνευτεί σε κουβανική πρόπολη, διάφορα μέταλλα όπως, σίδηρος (Fe), ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu) και μαγγάνιο (Mn)· ακόμη και βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος (Pb) σε πρόπολη Βραζιλίας (Banskota et al., 2001).

1.2.6 Χρήσεις από τον άνθρωπο

Η πρόπολη είναι ένα διαδεδομένο μελισσοκομικό προϊόν, το οποίο κυκλοφορεί στο εμπόριο σε διάφορες μορφές και για διάφορες χρήσεις (εσωτερική και εξωτερική). Μπορεί να την συναντήσει κάποιος, εντελώς ανεπεξέργαστη, χρησιμοποιώντας την ως μασώμενη. Επίσης, ο καταναλωτής, εύκολα μπορεί να βρει βάμμα πρόπολης, κάψουλες, καραμέλες, ταμπλέτες, αλλά και συνδυασμένα μελισσοκομικά προϊόντα, όπως πρόπολη με μέλι, με γύρη, με βασιλικό πολτό κ.ά.. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ιδιαιτέρως ρινικά σπρέι και σπρέι για το λαιμό, που περιέχουν πρόπολη, για την βελτίωση του αναπνευστικού συστήματος και παθήσεις του φάρυγγα. Η βιολογική αξία της πρόπολης, αλλά και των συνδυασμένων προϊόντων, έχει περιγραφεί εκτενώς

παραπάνω και αποτελούν μια νέα τάση επιλογής των καταναλωτών.

Όσον αφορά την εξωτερική χρήση της πρόπολης, οι καταναλωτές χρησιμοποιούν το βάμμα της για την θεραπεία διαφόρων δερματολογικών προβλημάτων. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ευρέως προϊόντα περιποίησης που περιέχουν στα συστατικά τους την πρόπολη, όπως κηραλοιφές προσώπου ή χεριών, αντηλιακές κρέμες, οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα, σαπούνια, σαμπουάν, κραγιόν και τσίχλες.

1.3 Σκοποί της Πτυχιακής Εργασίας

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση των μεθόδων εκχύλισης της πρόπολης. Κύριο στόχο αποτελεί η εύρεση της ταχύτερης και ευκολότερης μεθόδου εκχύλισης, σε συνδυασμό με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών, όπως επίσης και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εκχύλιση της πρόπολης

Στο πλαίσιο του πειραματικού μέρους της διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα υαλικά σκεύη, αντιδραστήρια και όργανα, τα οποία αναγράφονται παρακάτω. Για την εκτέλεση των εκχυλίσεων, την πρώτη ύλη, αποτέλεσε δείγμα ακατέργαστης καστανής πρόπολης, από την περιοχή της Κοζάνης. Η πρόπολη αρχικά, ήταν μικροτεμαχισμένη, όπως ακριβώς αφαιρέθηκε από το πλέγμα συλλογής της. Πριν χρησιμοποιηθεί στην πειραματική διαδικασία, κονιοροτοποιήθηκε



Εικόνα 13. Κονιοροποιημένη πρόπολη.

πολύ καλά (Εικ. 13). Πραγματοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι εκχύλισης, οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια.

2.1.1 Κλασική μέθοδος (maceration)

Υλικά (Εικ. 14)

- Κωνικές φιάλες των 50 mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 25 mL
- Υάλινα σωληνάρια με πόμα των 30 mL
- Υάλινες πιπέτες των 10 mL
- Υάλινα χωνιά
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου, Biopette των 100-1000 μ L
- Διηθητικό χαρτί



Εικόνα 14. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κλασική μέθοδο εκχύλισης.

- Parafilm
- Αλουμινόχαρτο
- Πλαστικό στατώ

Διαλύτες

- Αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$, Honeywell
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Καταψύκτης

Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της κλασικής μεθόδου εκχύλισης, δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μετά από 3 και 7 ημέρες. Παρασκευάστηκαν συνολικά έξι δείγματα, τρία για κάθε δοκιμή, έχοντας υποστεί την ίδια επεξεργασία και με την ίδια ακριβώς περιεκτικότητα σε διαλύτη και πρόπολη.

Αναλυτικότερα, ζυγίστηκε 1 g σκόνης πρόπολης σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και τοποθετήθηκε μέσα σε υάλινο σωληνάριο των 30 mL. Έπειτα, παρασκευάστηκαν 10 mL διαλύτη αιθανόλη/νερό 70/30 και τοποθετήθηκαν και αυτά στο υάλινο σωληνάριο. Στη συνέχεια, το σωληνάριο ανακινήθηκε καλά, σφραγίσθηκε με parafilm για να αποφευχθεί η εξάτμιση και βιδώθηκε με το πώμα του. Τέλος, το σωληνάριο καλύφθηκε εξωτερικά με αλουμινόχαρτο, ώστε να αποφευχθεί πιθανή οξείδωση του διαλύματος από το φως και τοποθετήθηκε σε πλαστικό στατώ, σε σκοτεινό σημείο, σε συνθήκες δωματίου. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για την παρασκευή και των υπόλοιπων πέντε δειγμάτων και δόθηκαν οι εξής κωδικές ονομασίες: Κα1, Κα2, Κα3 και Κβ1, Κβ2, Κβ3. Όλα τα δείγματα δέχονταν ήπια ανάδευση 4 έως 5 φορές ημερησίως.

Με την συμπλήρωση 72 ωρών, τα δείγματα Κα1, Κα2 και Κα3 φιλτραρίστηκαν. Τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί μέσα στο υάλινο χωνί και αυτό, μέσα στο σωληνάριο. Αφού διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις, τοποθετήθηκαν τα 2 mL του διαλύτη μέσα στο παλιό σωληνάριο, όπου γινόταν η εκχύλιση, «ξεπλένοντάς» το με αυτόν τον τρόπο, ούτως ώστε να παρθούν και τα συστατικά που τυχόν έμειναν σ' αυτό ή επάνω στο διηθητικό χαρτί (Εικ. 15). Ακολούθως, το σωληνάριο σφραγίζεται με parafilm εκ νέου, βιδώνεται, τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και

τοποθετείται στην κατάψυξη, στους -18°C , για ένα εικοσιτετράωρο. Κατόπιν, υφίσταται και δεύτερο φιλτράρισμα, με τελικό στόχο την βέλτιστη διαύγεια του εκχυλίσματος. Σε χαμηλή θερμοκρασία, διαχωρίζονται τα συστατικά που έχουν χαμηλή διαλυτότητα και που μπορεί να πέρασαν από το διηθητικό χαρτί όταν το δείγμα ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φιλτραρισμένα εκχυλίσματα, σφραγίζονται με parafilm, βιδώνονται, τυλίγονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται και πάλι στην κατάψυξη. Τα δείγματα Κβ1, Κβ2, Κβ3, απομακρύνονται και φιλτράρονται και αυτά με τον ίδιο τρόπο με την συμπλήρωση μίας εβδομάδας από την ημέρα που παρασκευάστηκαν. Όλα τα εκχυλίσματα, σφραγίστηκαν με parafilm, βιδώθηκαν, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.



Εικόνα 15. Διαδικασία διήθησης των εκχυλισμάτων.

2.1.2 Μέθοδος μικροκυμάτων

Υλικά (Εικ. 16)

- Κωνικές φιάλες των 50mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 25mL
- Ογκομετρικές φιάλες των 50mL
- Υάλινα σωληνάρια με πώμα των 30mL
- Υάλινες πιπέτες των 10mL
- Υάλινα χωνιά
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου, Biopette των 100-1000μL
- Διηθητικό χαρτί
- Parafilm
- Αλουμινόχαρτο



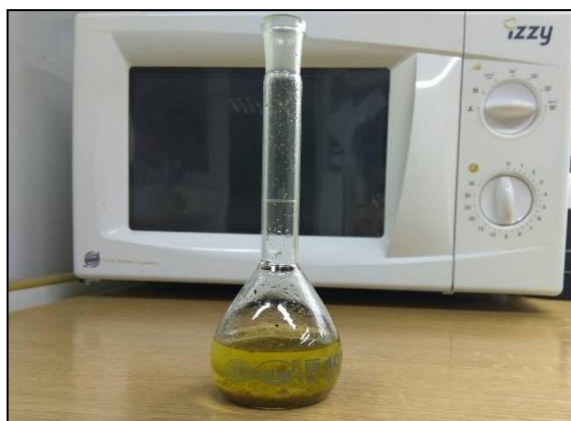
Εικόνα 16. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση με τη βοήθεια φούρνου μικροκυμάτων.

Διαλύτες

- Αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$, Honeywell
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων, μάρκα izzy, ισχύος 800watt (Εικ. 17)
- Κατάψυξη

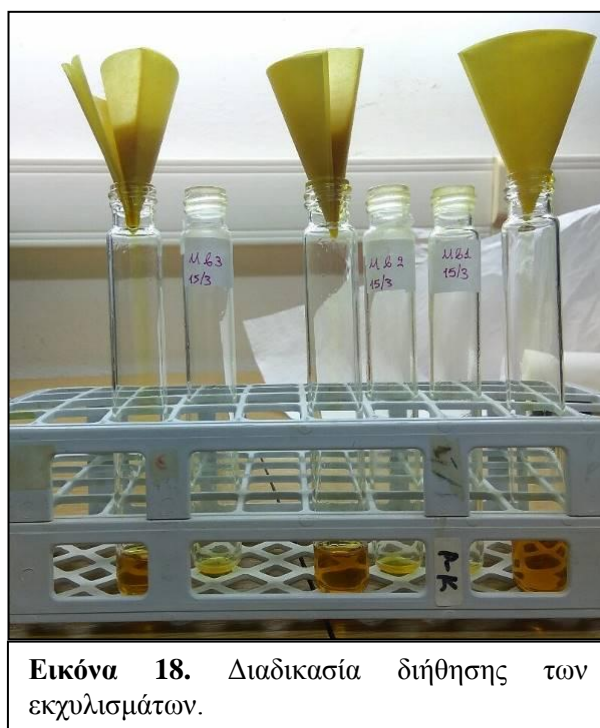


Εικόνα 17. Φούρνος μικροκυμάτων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Πειραματική διαδικασία

Κατά την εκχύλιση της πρόπολης με την μέθοδο των μικροκυμάτων, παρασκευάστηκαν συνολικά έξι δείγματα, δύο τριάδες με μικρή παραλλαγή. Για την 1^η τριάδα, ζυγίστηκε 1 g σκόνης πρόπολης σε ηλεκτρονικό ζυγό, το οποίο τοποθετήθηκε εντός μίας ογκομετρικής φιάλης των 50 mL. Έπειτα, παρασκευάστηκαν 10 mL διαλύτη, αποτελούμενα από αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$ και απιονισμένο νερό σε αναλογία 70/30 v/v αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν και αυτά στην ίδια ογκομετρική φιάλη. Αμέσως μετά, ανακινήθηκε ελαφρώς και τοποθετήθηκε στον φούρνο μικροκυμάτων, σε ισχύ 800 watt, όπου υπέστη θερμική επεξεργασία για 10 δευτερόλεπτα. Με την συμπλήρωση του χρόνου, αφαιρέθηκε από το φούρνο, αναδεύτηκε ελαφρώς και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά, ούτως ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε εκ νέου στο φούρνο για άλλα 10 δευτερόλεπτα. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για άλλα δύο δείγματα. Με το πέρας της δεύτερης θερμικής επεξεργασίας, σηματοδοτήθηκε η λήξη της διαδικασίας εκχύλισης των τριών πρώτων δειγμάτων, με κωδική ονομασία Ma1, Ma2, Ma3. Ακολούθησε η διαδικασία καθαρισμού με φιλτράρισμα σε διηθητικό χαρτί, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.1.

Με την παραλλαγή της μεθόδου δημιουργήθηκαν τα δείγματα με κωδικό Mb1, Mb2, Mb3. Τα δείγματα αυτά, διαφοροποιούνται μόνο ως προς την θερμική επεξεργασία που υπέστησαν. Η ποσότητα και η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων είναι πανομοιότυπη με αυτή των Ma1, Ma2 και Ma3. Έτσι λοιπόν, αφού ετοιμάστηκαν οι τρεις ογκομετρικές φιάλες, με 1 g σκόνης πρόπολης και 10 mL διαλύτη, τοποθετήθηκαν μία προς μία στο φούρνο μικροκυμάτων, αρχικά για 10 δευτερόλεπτα. Μόλις συμπληρώθηκε ο χρόνος, η φιάλη αφαιρέθηκε, ανακινήθηκε ελαφρώς και τέθηκε σε ηρεμία για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, επαναλήφθηκε θέρμανση 10 δευτερολέπτων και ακολούθως απομάκρυνση του δείγματος από το φούρνο μικροκυμάτων για 3 λεπτά αυτή τη φορά, ούτως ώστε να μειωθεί αρκετά η θερμοκρασία του διαλύματος διότι ακολουθήθηκε και τρίτη θέρμανση, στον ίδιο χρόνο. Ολοκληρώνοντας την τριπλή θέρμανση



Εικόνα 18. Διαδικασία διήθησης των εκχυλισμάτων.

των παρασκευασμάτων, τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και υποβάλλονται σε φιλτράρισμα, όπως προηγουμένως (Εικ. 18). Όλα τα εκχυλίσματα σφραγίζονταν, τα πόματα βιδώνονταν πολύ καλά, τυλίγονταν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύονταν στην κατάψυξη (-18 °C).

2.1.3 Μέθοδος ανάδευσης

Υλικά

- Κωνικές φιάλες των 50 mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 25 mL
- Υάλινα σωληνάρια με πόμα των 30 mL
- Υάλινες πιπέτες των 10 mL
- Υάλινα χωνιά
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου, Biopette των 100-1000 μ L
- Διηθητικό χαρτί
- Parafilm
- Αλουμινόχαρτο
- Πλαστικό στατώ

Διαλύτες

- Αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$, Honeywell
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Μηχάνημα ανάδευσης, Heidolph, Unimax 1010
- Κατάψυξη

Πειραματική διαδικασία

Η τελευταία μέθοδος εκχύλισης που πραγματοποιήθηκε, ήταν αυτή, της ανάδευσης. Παρασκευάστηκαν συνολικά εννέα δείγματα, σε τρεις τριάδες, οι οποίες διέφεραν τόσο στο χρόνο εκχύλισης, όσο και στις συγκεντρώσεις της πρόπολης.

Αρχικά, ετοιμάστηκαν έξι δείγματα με τον ίδιο τρόπο όπως προηγουμένως. Στα δείγματα αυτά, δόθηκαν οι εξής κωδικοί: Αα1, Αα2, Αα3 και Αγ1, Αγ2, Αγ3. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τα δείγματα Αβ1, Αβ2 και Αβ3, στα οποία είχαμε διπλάσια ποσότητα πρόπολης στο δείγμα. Ζυγίστηκαν 2 g πρόπολης και τοποθετήθηκαν σε υάλινα σωληνάρια των 30 mL, όπου προστέθηκαν 10 mL διαλύτη 70/30 v/v. Αφού ανακινήθηκαν ελαφρώς, σφραγίστηκαν με parafilm, βιδώθηκαν και έπειτα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο.

Όλα τα δείγματα προσαρμόστηκαν σε πλαστικό στατώ και τοποθετήθηκαν πάνω στη βάση του μηχανήματος ανάδευσης (Εικ. 19). Έπειτα ρυθμίστηκε για συνεχή ανάδευση με 150 στροφές το λεπτό, για 24 ώρες. Με την συμπλήρωση των πρώτων 24 ωρών, αφαιρέθηκαν τα δείγματα Αα1, Αα2, Αα3 και Αβ1, Αβ2, Αβ3 και το μηχάνημα ρυθμίστηκε αμέσως, για την συνέχιση της ανάδευσης, για



Εικόνα 19. Δείγματα στο στατώ πριν την ανάδευση.

επιπλέον 24 ώρες, στις ίδιες στροφές. Μετά το πέρας της ανάδευσης, τα δείγματα, υποβλήθηκαν σε ένα πρώτο φιλτράρισμα, με τη γνωστή διαδικασία. Ακολουθήθηκε σφράγισμα των σωληναρίων με parafilm, βίδωμα των πωμάτων, τύλιγμα με αλουμινόχαρτο και αποθήκευση στην κατάψυξη. Με την πάροδο και του δεύτερου εικοσιτετράωρου, αφαιρέθηκαν τα δείγματα Αγ1, Αγ2, Αγ3 και πραγματοποιήθηκε το πρώτο φιλτράρισμα, ομοίως με τα προηγούμενα. Έπειτα σφραγίστηκαν με parafilm, βιδώθηκαν, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη για ένα εικοσιτετράωρο. Την επόμενη ημέρα, αφαιρέθηκαν όλα τα δείγματα από την κατάψυξη και υποβλήθηκαν σε δεύτερο φιλτράρισμα, σφραγίστηκαν με parafilm, βιδώθηκαν με τα πώματά τους, καλύφθηκαν πλήρως με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.

2.2 Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Υλικά (Εικ. 20)

- Κωνικές φιάλες των 50 mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 mL
- Ογκομετρικές φιάλες των 25 mL
- Ογκομετρικές φιάλες των 200 mL
- Υάλινα σωληνάρια των 10 mL
- Υάλινα χωνιά
- Υάλινα σιφόνια των 10 mL
- Ποτήρι ζέσεως 250 mL
- Διηθητικό χαρτί
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου, Biopette των 100-1000 μ L
- Parafilm
- Αλουμινόχαρτο



Εικόνα 20. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu.

Διαλύτες - Αντιδραστήρια

- Αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης
- Αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$, Honeywell
- Απιονισμένο νερό
- Αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 20% w/v)
- Γαλλικό οξύ

Όργανα

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους (Shimadzu / UV-1700)
- Vortex
- Θερμαινόμενη εστία

Τρόπος δράσης του Folin - Ciocalteu

Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, είναι ένα μείγμα μολυβδενικού νατρίου (Na_2MoO_4), βολφραμικού νατρίου (Na_2WO_4) και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4), το οποίο προκαλεί οξειδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης του Folin – Ciocalteu με τις φαινολικές ενώσεις, είναι ένα σύμπλεγμα μολυβδενίου-βολφραμίου, με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που απορροφά στο ορατό φώς (725 nm). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν πραγματοποιείται διαχωρισμός μεταξύ μονομερών, διμερών και ανώτερων φαινολικών συστατικών.

Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος

Για την πραγματοποίηση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος με τις εξής συγκεντρώσεις σε mg/mL: 0, 0,1, 0,2, 0,3 και 0,4. Αρχικά, παρασκευάστηκε η μέγιστη συγκέντρωση γαλλικού οξέος, που ήταν 1 mg/mL. Πιο συγκεκριμένα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας, ζυγίστηκε 1 mg γαλλικού οξέος και τοποθετήθηκε σε υάλινο σωληνάριο των 10 mL, όπου προηγουμένως είχε προστεθεί 1 mL αιθανόλης καθαρότητας $\geq 98\%$. Αφού διαλύθηκε το γαλλικό οξύ, συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την πλήρωση των 10 mL. Το διάλυμα αυτό, θεωρήθηκε ως πυκνό και χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των αραιώσεων που προαναφέρθηκαν.

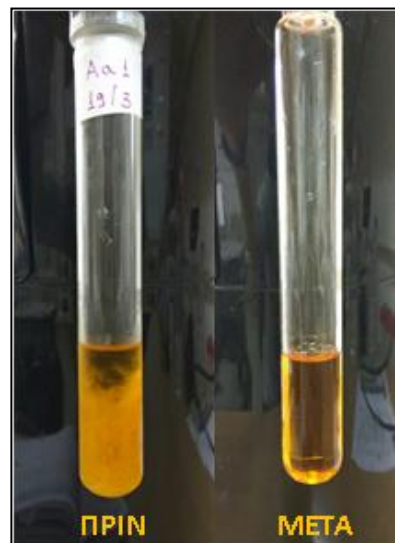
Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται παρακάτω (πειραματική διαδικασία), εις διπλούν για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις. Από τις τιμές των απορροφήσεων που λήφθηκαν, σχηματίστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάστηκε κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 20% w/v). Ζυγίστηκαν 40 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε ζυγό ακριβείας και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL. Έπειτα, προστέθηκαν 200 mL απιονισμένου νερού και το μείγμα αναδεύτηκε με ταυτόχρονη θέρμανση σε θερμαινόμενη εστία, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Τέλος, τοποθετήθηκε σε υάλινη ογκομετρική φιάλη των 200 mL με πώμα και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, τα αποθηκευμένα εκχυλίσματα που βρίσκονταν στην κατάψυξη στους -18°C , δέχθηκαν ένα τρίτο και τελευταίο φιλτράρισμα διότι παρατηρήθηκε πως τα εκχυλίσματα ήταν

ελαφρώς θολωμένα, λόγω των στερεών που περιείχαν (Εικ. 21). Η διαδικασία ήταν η ίδια με αυτή του δεύτερου παγωμένου φιλτραρίσματος που περιγράφηκε στην κλασική μέθοδο εκχύλισης (1.2.1). Με την ολοκλήρωση του φιλτραρίσματος, όλα τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 50 mL και αραιώθηκαν με τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε κατά την διαδικασία των εκχυλίσεων (70/30), μέχρι τα 50 mL. Στην πορεία, μία ποσότητα από τα αραιωμένα εκχυλίσματα πρόπολης, αραιώθηκε εκ νέου, κατά 50 φορές, ώστε να δημιουργηθεί ένα πολύ αραιό εκχύλισμα των 10 mL για την κάθε μέθοδο. Οι μεγάλες αυτές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν, ώστε οι απορροφήσεις που θα προκύψουν από τη φωτομέτρηση, να είναι εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος.



Εικόνα 21. Εκχυλίσματα πριν και μετά το 3^ο φιλτράρισμα.



Εικόνα 22. Δείγματα με Folin – Ciocalteu πριν τη διαδικασία της επώασης

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL τοποθετήθηκαν 6 mL απιονισμένο νερό, 0,1 mL από κάθε δείγμα και 0,5 mL αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Αναδεύτηκε σε vortex και η φιάλη τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο. Μετά από 3 λεπτά προστέθηκε 1,5 mL κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 20% w/v), συμπληρώθηκε 1,9 mL απιονισμένο νερό ανακινήθηκε μία ακόμη φορά στο vortex και σημειώθηκε η ώρα (Εικ. 22). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υάλινα σωληνάρια με πάμα των 10 mL, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η οξείδωση τους από το φως και τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου. Με την συμπλήρωση των 2 ωρών ακολουθεί ελαφριά ανάδευση των δειγμάτων, τοποθέτηση σε κυψελίδες και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 760 nm, ως προς τυφλό δείγμα (70% αιθανόλη / 30% απιονισμένο νερό). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε δύο φορές για το κάθε δείγμα.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος και εκφράστηκε ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

2.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH)

Υλικά

- Ογκομετρικές φιάλες με πώμα των 150mL
- Ογκομετρικές φιάλες των 10mL
- Υάλινα σωληνάρια με πώμα των 10mL
- Ποτήρι ζέσεως των 100mL
- Πιπέτα μεταβλητού όγκου, Biopette των 10-100μL
- Πιπέτα μεταβλητού όγκου, Biopette των 100-1000μL
- Αλουμινόχαρτο

Διαλύτες - Αντιδραστήρια

- Αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης
- Αιθανόλη καθαρότητας $\geq 98\%$, Honeywell
- Απιονισμένο νερό
- 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα (DPPH)
- Trolox

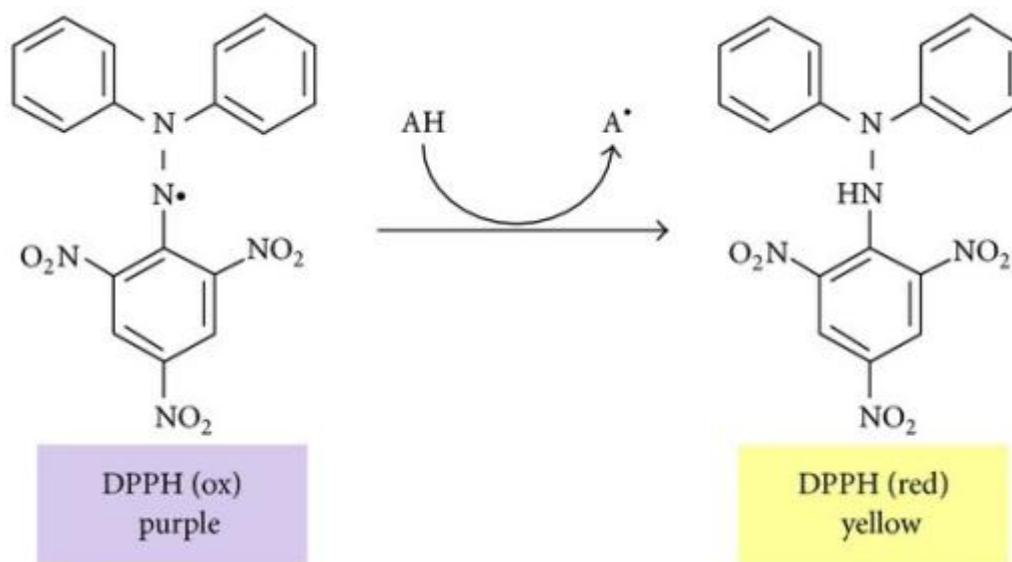
Όργανα

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Φασματοφωτόμετρο
- Vortex

Τρόπος δράσης του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδράζυλο (DPPH)

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH, βασίζεται στην δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας από το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του δείγματος. Η δέσμευση αυτή, σηματοδοτείται με τον αποχρωματισμό της ελεύθερης ρίζας, που στην περίπτωση του DPPH έχει ως αρχικό χρώμα, σκούρο μωβ (Εικ. 23). Η μέθοδος αυτή, αποτελεί μία *in vitro* τεχνική και έχει το πλεονέκτημα του ότι, η δέσμευση των ελεύθερων ριζών του DPPH από τις πολυφαινόλες του δείγματος, καθώς και η φασματοφωτομέτρηση του συνολικού

διαλύματος αντίδρασης, δεν είναι χρονοβόρες διαδικασίες. Η μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας DPPH, με την παρουσία των πολυφαινόλων, γίνεται αντιληπτή με την μείωση της απορρόφησης από τις ελεύθερες ρίζες στα 515 nm. Με αυτό τον τρόπο οδηγούμαστε στην εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης του κάθε δείγματος.



Εικόνα 23. Αντίδραση οξείδωσης της ρίζας DPPH και αλλαγή του χρώματος από μωβ σε κίτρινο.

(https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/266/3730368/PMC3730368_BMRI2013-251754.sch.001.png?keywords=spar).

Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox

Για την πραγματοποίηση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκέντρωση σε μM (0, 4, 8, 12, 16). Για τον σκοπό αυτό, σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL τοποθετήθηκαν 5 mg Trolox και διαλύθηκαν με 70% αιθανόλη. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε, ήταν αυτό με τη μέγιστη συγκέντρωση Trolox (16 μM), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πυκνό διάλυμα, ώστε να υλοποιηθούν οι άνωθεν αραιώσεις. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικώς παρακάτω (πειραματική διαδικασία DPPH), εις διπλούν για καθεμία από τις συγκεντρώσεις. Οι τιμές των απορροφήσεων που λήφθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

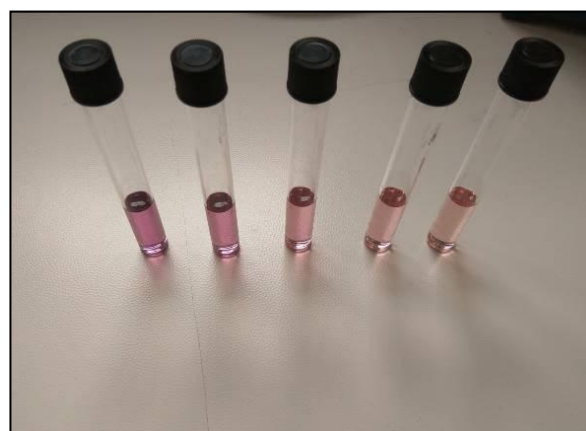
Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάστηκε το διάλυμα DPPH 60 μM , ποσότητας 150 mL. Ζυγίστηκαν 3,54 mg DPPH μέσα σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας. Έπειτα, σταδιακά τοποθετήθηκε μέσα στο ποτήρι ζέσεως, η μισή περίπου, ποσότητα της αιθανόλης (70%),

δηλαδή 70 mL και αναδεύτηκε πολύ καλά. Αφού διαλύθηκε πλήρως το DPPH, μεταγγίστηκε σε μια ογκομετρική φιάλη με πόμα των 150 mL και γεμίστηκε με αιθανόλη μέχρι την χαραγή. Η φιάλη καλύπτεται με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η οξείδωση του διαλύματος από το φώς.

Στη συνέχεια, αραιώθηκαν τα δείγματα πρόπολης. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει και στον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών (πειραματική διαδικασία), μετά από το τρίτο, φιλτράρισμα, ακολουθήθηκε αραιώση των εκχυλισμάτων, κατά 50 φορές. Για τον προσδιορισμό όμως, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί επιπλέον αραιώση, κατά 10 φορές. Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα 500 φορές αραιωμένα, ώστε οι τιμές των απορροφήσεων να βρίσκονται εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης Trolox.

Σε υάλινο σωληνάριο με πόμα, τοποθετήθηκαν 30 μ L από το κάθε, προς μελέτη, δείγμα. Ακολούθως, προστέθηκαν 3 mL DPPH 60 μ M και αναδεύτηκαν στο Vortex (Εικ. 24). Όλα τα σωληνάρια καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και επώαστηκαν για 30 λεπτά, στο σκοτάδι, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Με τη λήξη του χρόνου επώασης, τα δείγματα αναδεύτηκαν εκ νέου, τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες και φωτομετρήθηκαν στα 515 nm. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε εις διπλούν, για κάθε δείγμα.



Εικόνα 24. Δείγματα πριν τη διαδικασία της επώασης.

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της φωτομέτρησης, πραγματοποιήθηκε μηδενισμός με 70% αιθανόλη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox, με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Μέθοδοι εκχύλισεων της πρόπολης

Για την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής διατριβής εκτελέστηκε η κλασσική μέθοδος, η μέθοδος μικροκυμάτων και η μέθοδος ανάδευσης. Τέθηκαν προς αξιολόγηση, κοινές μέθοδοι, όπως για παράδειγμα η κλασσική, παραδοσιακή μέθοδος εκχύλισης, που χρησιμοποιείται και οικιακά. Έτσι, δημιουργήθηκαν ορισμένα ερωτήματα, ως προς την επίδραση κάποιων συνθηκών στη διαδικασία εκχύλισης της πρόπολης. Έχοντας ως γνώμονα αυτό, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων στο τελικό αποτέλεσμα. Τέτοιες παράμετροι ήταν η θερμοκρασία, η ανάδευση, ο όγκος του διαλύτη, η ποσότητα της πρόπολης που εκχυλίζεται, καθώς και ο χρόνος εκχύλισης. Με αυτό τον τρόπο, οδηγηθήκαμε στις τρεις προαναφερθείσες μεθόδους εκχύλισης που συνδυάζουν όλα τα παραπάνω.

3.1.1 Προετοιμασία πειραματικής διαδικασίας

Πριν την εκκίνηση του πειραματικού μέρους, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες δοκιμές, ώστε να οδηγηθούμε σε μία συγκεκριμένη μεθοδολογία. Έτσι λοιπόν, έγιναν ορισμένες δοκιμαστικές εκχυλίσεις, για την μέθοδο των μικροκυμάτων συγκεκριμένα, διότι ήταν η νεότερη και λιγότερο διαδεδομένη μέθοδος, με ελάχιστες επιστημονικές αναφορές. Με αυτό τον τρόπο, οδηγηθήκαμε σε ένα πλάνο το οποίο περιείχε όλες τις μεθόδους, με τις ποσότητες και την περιεκτικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, τις ποσότητες της πρόπολης, τον χρόνο εκχύλισης, αλλά και τον αριθμό των επαναλήψεων της κάθε μεθόδου ξεχωριστά. Παρά τις φιλότιμες προσπάθειες που έγιναν, για την δημιουργία αυτής της τυποποιημένης πειραματικής διαδικασίας, όπως φάνηκε και στην πορεία, κατέστη αδύνατη, καθώς βρέθηκαν μπροστά μας αρκετές δυσκολίες, με αποτέλεσμα το αρχικό πλάνο, να τροποποιηθεί επανειλημμένες φορές.

3.1.2 Δυσκολίες που εντοπίστηκαν

Αρχικά, παρατηρήθηκε πως οι δοκιμαστικές εκχυλίσσεις που περιείχαν πρόπολη με πολύ λεπτή μορφή (σκόνη), είχαν εντονότερο χρωματισμό από εκείνες που περιείχαν πολύ μικρά τεμαχίδια (Εικ. 25). Για αυτό το λόγο, κονιορτοποιήθηκε η πρόπολη πριν την χρήση της, καθώς θεωρήθηκε πως το έντονο αυτό χρώμα, πιθανόν οφείλεται στα φαινολικά συστατικά που εκχυλίστηκαν. Έπειτα, δημιουργήθηκε μια «αποθήκη» ώστε να φυλάσσονται με ασφάλεια τα εκχυλίσματα πρόπολης, για να μην υπάρχει πιθανότητα οξείδωσης, καθώς και εξάτμισης του διαλύτη. Έτσι λοιπόν, σφραγίστηκαν με parafilm, όλα τα σωληνάρια που περιείχαν τα εκχυλίσματα και κατόπιν καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για να προφυλαχθούν από το φως. Έπειτα, τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη, στους -18°C και φυλάχθηκαν εκεί μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 25. Κονιορτοποιημένη πρόπολη πριν την εκχύλιση.

Κατά τη διαδικασία της μεθόδου προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών, χρειάστηκε να αραιωθούν όλα τα δείγματα. Οι δοκιμαστικές αραιώσεις που έγιναν αρχικά, ήταν 100, 200 και 500 φορές. Με την εκτέλεση της φωτομέτρησης όμως, αποδείχθηκαν πολύ μικρές οι αραιώσεις αυτές κι έτσι τα τελικά δείγματα αραιώθηκαν 2.500 φορές. Βγάζοντας τα δείγματα από την κατάψυξη για να πραγματοποιηθούν οι αραιώσεις, παρατηρήθηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα ήταν θολωμένα, ενώ είχαν υποστεί και δεύτερο φιλτράρισμα για την απομάκρυνση των στερεών που είχαν περάσει από το διηθητικό χαρτί, κατά το πρώτο φιλτράρισμα. Για αυτό τον λόγο, κρίθηκε αναγκαίο και τρίτο φιλτράρισμα, πριν την αραιώση των δειγμάτων, ώστε τα τελικά εκχυλίσματα να είναι απόλυτα διαυγή.

3.2 Περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων πρόπολης σε φαινολικά συστατικά

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η περιεκτικότητα των συνολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της πρόπολης, προσδιορίζεται από τον μέσο όρο των απορροφήσεων των δειγμάτων. Οι τιμές των απορροφήσεων, αντιστοιχίζονται στην πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος και έτσι προκύπτει η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του κάθε δείγματος ως ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic acid equivalents, GAE), εκφρασμένα σε mg/mL.

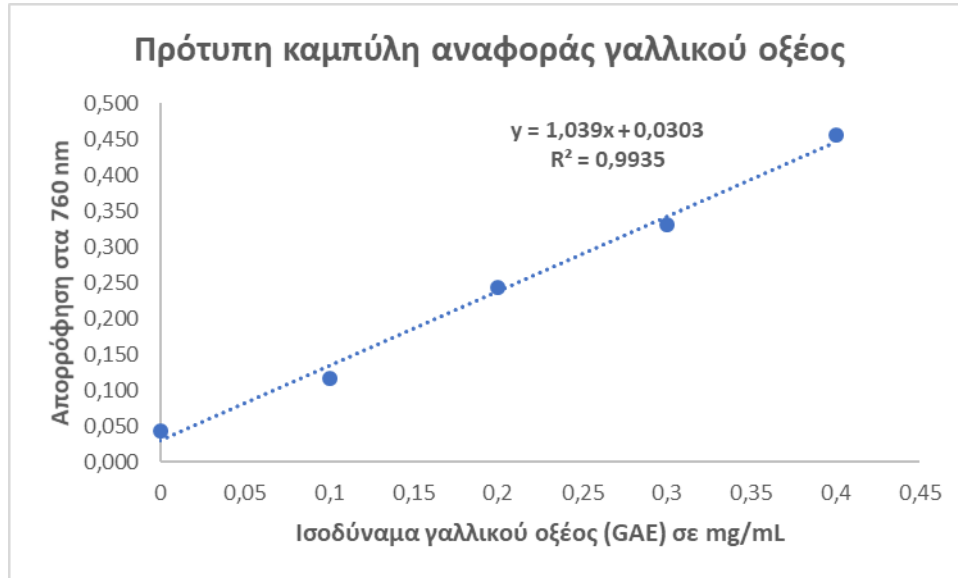
3.2.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Αρχή όλων, αποτελεί η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας ένα οποιοδήποτε φαινολικό συστατικό, με απαραίτητη προϋπόθεση, να περιέχεται στη χημική σύσταση του δείγματος που πρόκειται να φωτομετρηθεί. Έτσι λοιπόν, στην περίπτωση της πρόπολης, είναι φανερό ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλία φαινολικών συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Τα πιο συνήθη είναι το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ.

Στην περίπτωσή μας χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ, όπου παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος με τις εξής συγκεντρώσεις σε mg/mL: 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 (Πίνακας 2, Γράφημα 1). Η κάθε συγκέντρωση ακολουθήθηκε και από μία επαναληπτική, ώστε ο μέσος όρος των απορροφήσεών τους να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή της καμπύλης. Βλέπουμε ότι η καμπύλη έχει ικανοποιητική γραμμικότητα ($R^2=0,9935$), ενώ από την εξίσωση που περιγράφει την καμπύλη θα γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών καθενός από τα δείγματα, εκφρασμένος σε mg GAE / g πρόπολης.

Πίνακας 2. Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος.

GA (mg/mL)	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	MO
0	0,042	0,044	0,043
0,1	0,118	0,116	0,117
0,2	0,246	0,242	0,244
0,3	0,334	0,328	0,331
0,4	0,456	0,455	0,456



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

3.2.2 Κλασσική μέθοδος (*maceration*)

Στην κλασσική μέθοδο εκχύλισης, παρασκευάστηκαν 3 δείγματα με κωδική ονομασία Κα1, Κα2, Κα3, τα οποία αποτελούν τα διαλύματα που εκχυλίστηκαν για 72 ώρες, και άλλα 3 δείγματα με τους κωδικούς Κβ1, Κβ2, Κβ3, που εκχυλίστηκαν σε διάρκεια μιας εβδομάδας. Ακολουθώντας την διαδικασία της μεθόδου του Folin-Ciocalteu, τελικώς, πάρθηκαν οι απορροφήσεις που αναγράφονται στον πίνακα 3, με τους μέσους όρους τους. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης, υπολογίστηκε η ποσότητα των φαινολικών στο κάθε δείγμα.

Πίνακας 3. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων με την κλασσική μέθοδο.

Κωδικός δείγματος	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	ΜΟ	mg GAE / g πρόπολη
Κα1	0,064	0,054	0,059	69,1
Κα2	0,041	0,096	0,069	91,9
Κα3	0,073	0,053	0,063	78,7
Κα				79,9
Κβ1	0,066	0,071	0,069	91,9
Κβ2	0,065	0,053	0,059	69,1
Κβ3	0,044	0,058	0,051	49,8
Κβ				70,3

Στον Πίνακα 3 βλέπουμε τις απορροφήσεις και την περιεκτικότητα των φαινολικών

συστατικών, εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο πρόπολης. Στην περίπτωση της εκχύλισης για 3 ημέρες, η μέση περιεκτικότητα ήταν 79,9 mg GAE / g πρόπολης, ενώ στις 7 ημέρες ήταν 70,3 mg GAE / g πρόπολης.

Παρόλα αυτά, η περιεκτικότητα όλων των εκχυλισμάτων, σε φαινολικά συστατικά, είναι παρόμοια. Μπορούμε να εντοπίσουμε ορισμένες διαφορές όμως, τόσο ανάμεσα στα δείγματα του Κα και Κβ, όσο και μεταξύ του μέσου όρου των δειγμάτων του Κα και Κβ. Οι διαφορές αυτές, πιθανόν να οφείλονται στην ανομοιομορφία των τεμαχιδίων, της ζυγισμένης πρόπολης, που χρησιμοποιήθηκε. Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι, όσο πιο λεπτή μορφή έχει η πρόπολη, τόσο πιο έντονο χρωματισμό αποκτά, επομένως τόσα περισσότερα φλαβονοειδή εκχυλίστηκαν. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί πως, η πρόπολη είναι ένα υλικό με μεγάλη παραλλακτικότητα. Τα διάφορα συστατικά της, βρίσκονται διασκορπισμένα και βέβαια είναι πολλά και διαφορετικά. Έτσι λοιπόν, θα μπορούσαμε να πούμε ότι, κάθε κομμάτι πρόπολης, έχει διαφορετική χημική σύνθεση και περιέχει ουσίες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Πάντως, η σύγκριση των μέσων όρων, των δύο δοκιμών που έγιναν, δηλαδή της κλασσικής εκχύλισης για 3 ημέρες (Κα) και 7 ημέρες (Κβ) δεν έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p=0,526$). Αυτό σημαίνει ότι η ποσότητα των φαινολικών ουσιών που εκχυλίζονται σε 3 ημέρες, δεν διαφέρει από αυτή σε 7 ημέρες, οπότε μπορεί να περιοριστεί ο χρόνος που χρειάζεται για να παρασκευαστεί οικιακό βάμμα πρόπολης, σε 3 ημέρες.

3.2.3 Μέθοδος μικροκυμάτων

Για την μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα, έγιναν δύο δοκιμές. Κατά την πρώτη με κωδικό Μα, τα δείγματα υπέστησαν θερμική επεξεργασία για 10 δευτερόλεπτα, για δύο φορές. Στη δεύτερη δοκιμή με κωδικό Μβ, τα δείγματα θερμάνθηκαν για 10 δευτερόλεπτα, όμως εις τριπλούν. Όλα τα δείγματα της συγκεκριμένης μεθόδου φωτομετρήθηκαν και λήφθηκαν οι απορροφήσεις του Πίνακα 4.

Παρατηρώντας τις περιεκτικότητες των δειγμάτων, σε ολικά φαινολικά, βλέπουμε πως δεν υπάρχουν πολύ μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Η δοκιμή Μβ (τρεις φορές από 10 sec) παρουσιάζεται με μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαινολικών (84,3 mg GAE / g πρόπολης) από τη Μα (δύο φορές από 10 sec), όπου η περιεκτικότητα ήταν 71,4 mg GAE / g πρόπολης. Δεν είναι όμως αρκετή, ώστε να θεωρήσουμε την αύξηση της θερμοκρασίας, απαραίτητη για την επίτευξη μιας επιτυχημένης εκχύλισης πρόπολης, καθώς η στατιστική επεξεργασία δεν έδειξε σημαντική διαφορά

των μέσων όρων ($p=0,265$).

Πίνακας 4. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων με τη μέθοδο των μικροκυμάτων.

<i>Κωδικός δείγματος</i>	<i>1^η μέτρηση</i>	<i>2^η μέτρηση</i>	<i>ΜΟ</i>	<i>mg GAE / g πρόπολη</i>
Μα1	0,058	0,057	0,058	65,4
Μα2	0,057	0,073	0,065	83,5
Μα3	0,055	0,060	0,058	65,4
Μα				71,4
Μβ1	0,064	0,070	0,067	88,3
Μβ2	0,060	0,080	0,070	95,5
Μβ3	0,054	0,064	0,059	69,1
Μβ				84,3

3.2.4 Μέθοδος ανάδευσης

Στην περίπτωση της μεθόδου εκχύλισης με ανάδευση, παρασκευάστηκαν τρία δείγματα με αναλογία 1 g πρόπολης / 10 mL διαλύτη, που αναδεύτηκαν για 24 ώρες, στις 150 στροφές με κωδική ονομασία Αα1, Αα2, Αα3. Επίσης, είχαμε τρία δείγματα με διπλάσια ποσότητα πρόπολης (2 g / 10 mL διαλύτη), που υπέστη εξίσου την ίδια ανάδευση, με κωδικό Αβ1, Αβ2, Αβ3. Τέλος, παρασκευάστηκαν ακόμη τρία δείγματα με αναλογία 1 g πρόπολης / 10 mL διαλύτη, με διάρκεια ανάδευσης 48 ώρες στις 150 στροφές, με κωδικό Αγ1, Αγ2, Αγ3. Οι τιμές των απορροφήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 5.

Στον πίνακα 5, βλέπουμε ευδιάκριτες διαφορές, περισσότερο μεταξύ των εκχυλισμάτων Αβ με Αα και Αγ, παρά των Αα και Αγ μεταξύ τους. Παρατηρούμε λοιπόν ότι τα δείγματα Αβ, παρουσιάζουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στην μέθοδο της ανάδευσης, αλλά και σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους. Στατιστικά, όμως, δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των τριών δοκιμών ανάδευσης ($p=0,135$).

3.2.5 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης

Κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των δοκιμαστικών εκχυλίσεων, της μεθόδου των μικροκυμάτων, παρατηρήθηκε ότι τα τελικά εκχυλίσματα που λαμβάνονταν είχαν αρκετά σκούρο χρωματισμό. Έτσι λοιπόν, υπήρχε αρχικά η εντύπωση πως η εκχύλιση με την μέθοδο αυτή, θα είναι

και η καλύτερη, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Επίσης θεωρήθηκε πως η κλασσική μέθοδος, ως διαδικασία με τις λιγότερες επιδράσεις (χωρίς θέρμανση, ανάδευση, μεγαλύτερη ποσότητα πρόπολης κ.ά.), θα είχε τη μικρότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Τέλος, η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου ανάδευσης, ήταν ανέφικτο να προσδιοριστεί.

Πίνακας 5. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της ανάδευσης.

<i>Κωδικός δείγματος</i>	<i>1^η μέτρηση</i>	<i>2^η μέτρηση</i>	<i>ΜΟ</i>	<i>mg GAE / g πρόπολη</i>
Aα1	0,089	0,091	0,090	143,6
Aα2	0,066	0,074	0,070	95,5
Aα3	0,073	0,086	0,080	118,4
Aα				119,1
Aβ1	0,091	0,089	0,090	143,6
Aβ2	0,108	0,117	0,113	197,8
Aβ3	0,090	0,102	0,096	158,1
Aβ				166,5
Aγ1	0,071	0,075	0,073	102,7
Aγ2	0,173	0,077	0,125	107,6
Aγ3	0,110	0,080	0,095	155,7
Aγ				122

Η μέθοδος των μικροκυμάτων βρέθηκε να έχει σχεδόν ίδια περιεκτικότητα ολικών φαινολικών συστατικών με την κλασσική μέθοδο, η οποία είχε αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα. Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος ανάδευσης, αποτέλεσε την έκπληξη, καθώς στην περίπτωση των εκχυλισμάτων Αβ1, Αβ2, Αβ3, εμφάνισε την διπλάσια περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών, από την μέθοδο μικροκυμάτων και ακόμη μεγαλύτερη από την κλασσική μέθοδο.

Όσον αφορά το χρώμα που απέκτησαν τα εκχυλίσματα της μεθόδου των μικροκυμάτων, μετά το τέλος της, φαίνεται να οφείλεται στην θερμική επεξεργασία που υπέστη. Τα δείγματα Μβ1, Μβ2, Μβ3, είχαν εντονότερο χρωματισμό από τα Μα1, Μα2, Μα3, εξαιτίας της θέρμανσης των επιπλέον 10 δευτερολέπτων. Ωστόσο η διαφορά μεταξύ τους, ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, ήταν αμελητέα, αποδεικνύοντας ότι η αύξηση της θερμοκρασίας, δεν διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εκχύλιση της πρόπολης. Επιπρόσθετα, η επίδραση των μικροκυμάτων ενδέχεται να καταστρέφει δομικά, κάποια φαινολικά συστατικά. Παρόλο αυτά, η μέθοδος των μικροκυμάτων έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα, που δεν γίνεται να μην συνυπολογιστεί. Πρόκειται για την

ταχύτερη μέθοδο εκχύλισης, όπου μέσα σε λίγα μόλις δευτερόλεπτα, δημιουργεί εκχύλισμα, ίδιας φαινολικής περιεκτικότητας με άλλα, μεγαλύτερης χρονικής επεξεργασίας, όπως για παράδειγμα τα εκχυλίσματα της κλασσικής μεθόδου.

Από την άλλη πλευρά, η κλασσική μέθοδος, εμφάνισε μια ικανοποιητική περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ήταν σχεδόν ισόποση με αυτή των μικροκυμάτων. Αποδείχθηκε πως ούτε ο παράγων χρόνος, μπορεί να καθορίσει ουσιαστικά την εκχύλιση της πρόπολης, καθώς τα εκχυλίσματα Κα1, Κα2, Κα3, συγκριτικά με τα Κβ1, Κβ2, Κβ3, είχαν παρόμοιες συγκεντρώσεις.

Με την μέθοδο της ανάδευσης, είχαμε τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών, κυρίως στα εκχυλίσματα Αβ. Μεταξύ των δειγμάτων της συγκεκριμένης μεθόδου, παρατηρήθηκε πως αυτό που σημείωσε την διαφορά, ήταν η ποσότητα πρόπολης. Τα Αβ1, Αβ2, Αβ3 δείγματα, είχαν 2 g πρόπολης, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα που είχαν την μισή ποσότητα. Αυτή η αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών, έγινε ορατή πριν την διαδικασία προσδιορισμού του Folin – Ciocalteu, καθώς τα δείγματα αυτά είχαν το εντονότερο χρώμα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα (Εικ. 26). Και σε αυτή την περίπτωση, ο χρόνος εκχύλισης δεν επηρέασε την αποτελεσματικότητά της ενώ μπορούμε πλέον να πούμε με βεβαιότητα ότι, η ανάδευση έχει καθοριστικό ρόλο στην εκχύλιση των φλαβονοειδών της πρόπολης.



Εικόνα 26. Σύγκριση χρώματος μεταξύ των Αα - Αβ - Αγ.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι μεγάλο ενδιαφέρον θα έχει η ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων, όπου ενδεχομένως να φανεί ότι κάποια μέθοδος εκχυλίζει καλύτερα συγκεκριμένες φαινολικές ουσίες.

3.2.6 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Τα δεδομένα από όλες τις δοκιμές υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία με Ανάλυση της Διασποράς (ANOVA) (Πίνακας 6). Πριν την ανάλυση, έγινε έλεγχος της ομοιογένειας των διασπορών με το τεστ του Levene, το οποίο έδειξε ότι ήταν ομοιογενείς ($p=0,375$). Η ανάλυση της διασποράς έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των 7

δοκιμών που έγιναν ($F=8,593$, $p<0,001$). Εφαρμόζοντας το post hoc τεστ του Duncan, διαπιστώθηκε ότι με τη δοκιμή Αβ απομονώθηκαν τα περισσότερα φαινολικά συστατικά σε σχέση με τις υπόλοιπες δοκιμές, ενώ τα Αα και Αγ περιείχαν στατιστικά περισσότερες φαινολικές ουσίες συγκριτικά με τα Κα, Κβ και Μα. Οι μέσες περιεκτικότητες κάθε δοκιμής δίνονται παραστατικά ως ραβδόγραμμα στο Γράφημα 2.

Πίνακας 6. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών των 7 δοκιμών του πειράματος.

Δοκιμή ομοιογένειας των διασπορών	Levene statistic = 1,172				Sig. = 0,375		
ANOVA	F = 8,593				Sig. < 0,001		
Post hoc test (Duncan)							
Κωδικός δοκιμής	Κα	Κβ	Μα	Μβ	Αα	Αβ	Αγ
Μέση περιεκτικότητα σε φαινολικά (mg GAE / g πρόπολη)	79,9α	70,3 ^a	71,4α	84,3αβ	119,2β	166,5γ	122,0β



Γράφημα 2. Μέση περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά των υπό εξέταση δειγμάτων.

3.3 Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH

Για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων της πρόπολης υπολογίστηκε από

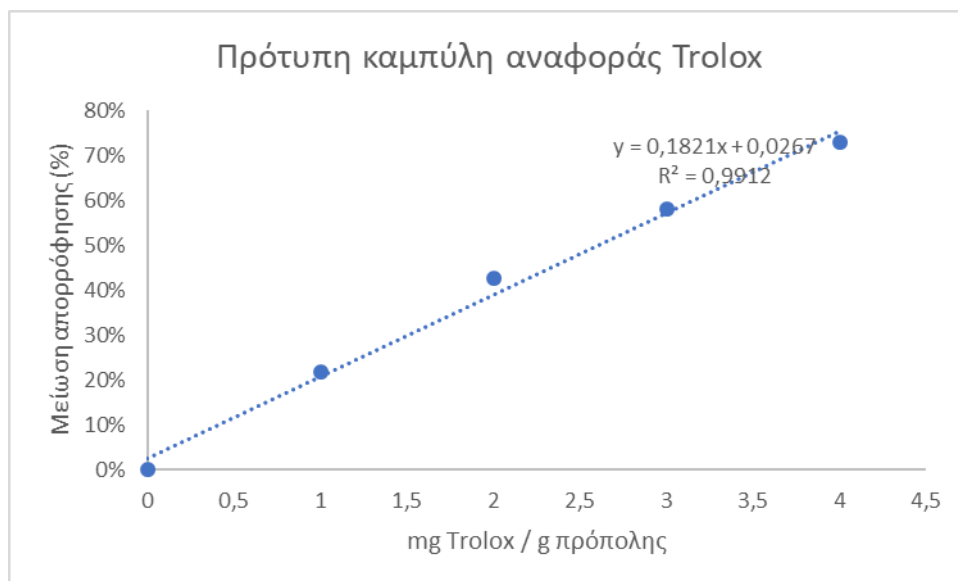
τον μέσο όρο δύο απορροφήσεων κάθε δείγματος. Οι τιμές των απορροφήσεων, αντιστοιχίζονται στην πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox, κι έτσι προκύπτει η ποσότητα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε δείγματος.

3.3.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο DPPH, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Trolox. Παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκέντρωση 0, 4, 8, 12, 16 μM , τα οποία αντιστοιχούν σε 0, 1, 2, 3 και 4 mg Trolox / g πρόπολης (Πίνακας 6, Γράφημα 3). Για τη δημιουργία της καμπύλης χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό μείωσης της απορρόφησης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, εκφράζεται σε mg Trolox / g πρόπολης. Η πρότυπη καμπύλη έχει ικανοποιητική γραμμικότητα ($R^2=0,9912$).

Πίνακας 7. Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων Trolox.

<i>Trolox</i> (mg/mL)	<i>I</i> ^η μέτρηση	<i>2</i> ^η μέτρηση	<i>ΜΟ</i>	<i>Μείωση της</i> <i>απορρόφησης (%)</i>
0	0,558	0,557	0,558	0
1	0,434	0,439	0,437	21,7
2	0,314	0,324	0,319	42,8
3	0,228	0,239	0,234	58,1
4	0,153	0,150	0,152	72,8



Γράφημα 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.

3.3.2 Κλασσική μέθοδος (*maceration*)

Ακολουθώντας την διαδικασία της μεθόδου του DPPH, λήφθηκαν οι απορροφήσεις των εκχυλισμάτων της κλασσικής μεθόδου, οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα 6, με τους μέσους όρους τους. Τοποθετώντας στον άξονα των τετμημένων την απορρόφηση των ανωτέρων δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση που τους υποβάλαμε στην αρχή (500 φορές), υπολογίστηκε η ποσότητα της αντιοξειδωτικής ικανότητας, για το κάθε δείγμα ξεχωριστά.

Πίνακας 8. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων και αντιοξειδωτική δράση με την κλασσική μέθοδο.

<i>Κωδικός δείγματος</i>	<i>1^η μέτρηση</i>	<i>2^η μέτρηση</i>	<i>ΜΟ</i>	<i>mg Trolox / g πρόπολη</i>
Κα1	0,495	0,485	0,490	587
Κα2	0,486	0,479	0,483	652
Κα3	0,463	0,454	0,459	861
Κα				700
Κβ1	0,484	0,489	0,487	617
Κβ2	0,481	0,484	0,483	648
Κβ3	0,461	0,469	0,465	804
Κβ				690

Παρατηρώντας τον Πίνακα 8, διακρίνουμε πως τα εκχυλίσματα Κα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα Κβ αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό, θα μπορούσαμε να το αποδώσουμε σε πιθανή οξείδωση των εκχυλισμάτων Κβ από το φως που κατάφερε να εισέλθει, καθώς τα συγκεκριμένα δείγματα εκχυλίστηκαν για μία εβδομάδα, σε αντίθεση με τα δείγματα Κα, τα οποία εκχυλίστηκαν για τρεις ημέρες. Πάντως, η στατιστική επεξεργασία δεν έδειξε διαφορά μεταξύ των μέσων όρων ($p=0,923$).

3.3.3 Μέθοδος μικροκυμάτων

Σύμφωνα με τον Πίνακα 9, βλέπουμε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα εκχυλίσματα της μεθόδου των μικροκυμάτων, τα οποία έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό φάνηκε και από τη στατιστική επεξεργασία ($p=0,350$).

Πίνακας 9. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων και αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο των μικροκυμάτων.

<i>Κωδικός δείγματος</i>	<i>1^η μέτρηση</i>	<i>2^η μέτρηση</i>	<i>ΜΟ</i>	<i>mg Trolox / g πρόπολη</i>
Μα1	0,480	0,482	0,481	543
Μα2	0,494	0,488	0,491	578
Μα3	0,503	0,493	0,498	527
Μα				546
Μβ1	0,480	0,494	0,487	613
Μβ2	0,495	0,496	0,496	539
Μβ3	0,497	0,486	0,492	574
Μβ				575

3.3.4 Μέθοδος ανάδευσης

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 10), παρατηρούμε τις μεγαλύτερες τιμές αντιοξειδωτικής δράσης που συναντήσαμε έως τώρα. Τα εκχυλίσματα Αβ εμφάνισαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, που πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα δείγματα αυτά είχαν την διπλάσια ποσότητα πρόπολης κατά την εκχύλιση. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι η μέση αντιοξειδωτική δράση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στο Αβ, σε σχέση με τα Αα και Αγ ($p=0,009$).

Πίνακας 10. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων και αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο της ανάδευσης.

<i>Κωδικός δείγματος</i>	<i>1^η μέτρηση</i>	<i>2^η μέτρηση</i>	<i>ΜΟ</i>	<i>mg Trolox / g πρόπολη</i>
Aα1	0,472	0,470	0,471	752
Aα2	0,460	0,466	0,463	822
Aα3	0,400	0,402	0,401	1361
Aα				978
Aβ1	0,331	0,326	0,329	1991
Aβ2	0,350	0,348	0,349	1813
Aβ3	0,386	0,380	0,383	1517
Aβ				1774
Aγ1	0,466	0,460	0,463	822
Aγ2	0,449	0,453	0,451	926
Aγ3	0,440	0,438	0,439	1030
Aγ				926

3.3.5 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Όπως και στην περίπτωση των ολικών φαινολικών, τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία με Ανάλυση της Διασποράς (ANOVA) (Πίνακας 11). Πριν την ανάλυση, έγινε έλεγχος της ομοιογένειας των διασπορών με το τεστ του Levene, το οποίο έδειξε ότι οι διασπορές δεν ήταν ομοιογενείς ($p=0,013$). Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκε το τεστ του Welch (αντί της ANOVA), το οποίο έδειξε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των 7 δοκιμών (Sig. = 0,004). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε το post hoc test του Duncan, το οποίο έδειξε ότι το

εκχύλισμα της δοκιμής Αβ είχαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (Πίνακας 11, Γράφημα 4). Οι δύο δοκιμές με τα μικροκύματα έδειξαν τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση, παρόλο που δεν έχουν τη μικρότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά. Εξάλλου, ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης ήταν σχετικά χαμηλός ($R^2 = 0,617$).

Πίνακας 11. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της αντιοξειδωτικής δράσης των 7 δοκιμών του πειράματος.

Δοκιμή ομοιογένειας των διασπορών	Levene statistic = 4,158				Sig. = 0,013		
Welch test	Statistic = 12,789				Sig. = 0,004		
Post hoc test (Duncan)							
Κωδικός δοκιμής	Κα	Κβ	Μα	Μβ	Αα	Αβ	Αγ
Αντιοξειδωτική δράση (mg Trolox / g πρόπολη)	700αβ	690αβ	546α	575α	978β	1774γ	926β



Γράφημα 4. Μέση αντιοξειδωτική δράση των υπό εξέταση δειγμάτων.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή, έγινε μια προσπάθεια αξιολόγησης τριών μεθόδων εκχύλισης της πρόπολης των μελισσών. Χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα πρόπολης από την περιοχή της Κοζάνης. Οι μέθοδοι που επιλέχθηκαν είναι η κλασσική μέθοδος, η μέθοδος των μικροκυμάτων και η μέθοδος της ανάδευσης. Η πρόπολη (1 g) εκχυλίστηκε με 10 mL διαλύτη (αιθανόλη:νερό 70:30) και υποβλήθηκε σε εκχύλιση. Σε κάθε δοκιμή, έγιναν τρεις επαναλήψεις. Κατά τη κλασσική μέθοδο, το δείγμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 3 και 7 μέρες, αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα (μερικές φορές την ημέρα). Στη μέθοδο των μικροκυμάτων, κάθε δείγμα εκχυλίστηκε για διαστήματα 10 δευτερόλεπτα, με μεσοδιάστημα 2 λεπτών για να κρυώσει. Έγιναν δύο δοκιμές, στην πρώτη τα δείγματα υποβλήθηκαν στην επίδραση των μικροκυμάτων για δύο διαστήματα και στην άλλη για τρία. Στη μέθοδο της ανάδευσης, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 24 και 48 ώρες, στις 150 στροφές ανά λεπτό. Στην περίπτωση της 24ωρης ανάδευσης, έγιναν δύο δοκιμές, με διαφορετική ποσότητα πρόπολης (2 g). Για την αξιολόγηση των μεθόδων εκχύλισης, συγκρίθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH.

Ως πρώτη παρατήρηση, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε την παραλλακτικότητα που παρουσίασαν τα εκχυλίσματα πρόπολης, της κλασσικής μεθόδου (Κα και Κβ). Τα δείγματα Κα εκχυλίστηκαν για 3 ημέρες και εμφάνισαν μέση περιεκτικότητα 79,9 mg GAE / g πρόπολης, σε αντίθεση με τα Κβ, που εκχυλίστηκαν για 7 ημέρες και σημείωσαν 70,3 mg GAE / g πρόπολης. Παρατηρούμε λοιπόν ότι, ο χρόνος εκχύλισης των δειγμάτων, δεν οδηγεί στην εκχύλιση περισσότερων φαινολικών συστατικών. Ακόμη, κάθε τεμαχίδιο πρόπολης, έχει διαφορετική χημική σύσταση και περιέχει φαινολικές ουσίες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, το οποίο γίνεται αντιληπτό από τις διαφορετικές περιεκτικότητες που παρουσιάζονται μεταξύ των τριών επαναλήψεων της ίδιας διαδικασίας. Επίσης, μεγάλο ρόλο έχει και η μορφή της πρόπολης που πρόκειται να εκχυλιστεί. Όσο πιο λεπτή μορφή έχει, τόσο περισσότερα φαινολικά συστατικά εκχυλίζονται. Για αυτό το λόγο λοιπόν, το δείγμα πρόπολης πριν την εκχύλιση θα πρέπει να κονιορτοποιηθεί και να αναδευτεί πολύ καλά. Πάντως, όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση των παραπάνω εκχυλισμάτων, φάνηκε ότι δεν σημείωσαν κάποια διαφορά μεταξύ των μέσων όρων τους ($p=0,923$), κρατώντας τόσο την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών, όσο και την

αντιοξειδωτική τους δράση, σε παρόμοια επίπεδα.

Επιπλέον, αποδείχθηκε πως η αύξηση της θερμοκρασίας, αλλά και τα επιπλέον 10 δευτερόλεπτα εκχύλισης, δεν έδρασαν θετικά στην εκχύλιση περισσότερων φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο των μικροκυμάτων. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι, η εμφάνιση σκούρου χρώματος στα εκχυλίσματα αυτά, δεν σημαίνει πάντοτε ότι οφείλεται στον χρωματισμό λόγω ύπαρξης αυξημένου αριθμού φαινολικών σε αυτά. Αυτό, αποδεικνύεται από τη στατιστική επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε, η οποία δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των δειγμάτων της μεθόδου εκχύλισης με μικροκύματα ($p=0,265$). Φαίνεται επίσης και από την σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων της κλασσικής, με αυτά της μεθόδου με τα μικροκύματα (Κα - 79,9 mg, Κβ - 70,3 mg, Μα - 71,4 mg και Μβ - 84,3 mg GAE / g πρόπολης). Η αντιοξειδωτική δράση όμως των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο των μικροκυμάτων, ήταν η μικρότερη από όλα τα δείγματα, όλων των μεθόδων, παρόλο που δεν είχε την μικρότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά.

Από την άλλη πλευρά, υπήρξε η θετική επίδραση της ανάδευσης, αλλά και του διπλασιασμού της ποσότητας πρόπολης, που χρησιμοποιήθηκε κατά την διαδικασία εκχύλισης με τη μέθοδο ανάδευσης. Τα αποτελέσματα του μέσου όρου αυτών των εκχυλισμάτων, μας το αποδεικνύουν, παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών φαινολικών, αλλά και αντιοξειδωτικής ικανότητας (Αβ - 1774 mg Trolox / g πρόπολης και 166,5 mg GAE / g πρόπολης).

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε ότι η κλασσική μέθοδος, είναι μια απλή και εύκολη διαδικασία, που απαιτεί αρκετό χρόνο ώστε να δώσει μία ικανοποιητική περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά, καθώς και αντιοξειδωτική δράση. Από την άλλη, έχουμε την μέθοδο με τη βοήθεια του φούρνου μικροκυμάτων, που αποτελεί την ταχύτερη μέθοδο εκχύλισης, δίνοντας ένα ικανοποιητικό περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά, όμως με μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τέλος, υπάρχει η μέθοδος ανάδευσης, η οποία έχει τη δυνατότητα να παράξει εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά αλλά και με πολύ μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, μέσα σε ένα ικανοποιητικό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί ότι, δεν υπάρχει σε όλες τις περιπτώσεις συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης με το περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά σε ένα εκχύλισμα.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Aga H., Shibuya T., Sugimoto T., Kurimoto M. and Nakajima S., 1994. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(5): 945-946. Available online: <https://doi.org/10.1271/bbb.58.945> [accessed 05/04/2019].
- 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): 1383-1392. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.045> [accessed 09/04/2019].
- Amoros M., Sauvager F., Girre L., Cormier M., 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23(3): 231-240. Available online: <https://doi.org/10.1051/apido:19920306> [accessed 05/04/2019].
- Bankova V., Marcucci M.C., Simova S., Nikolova N., Kujumgiev A. and Popov S., 1996. Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. *Journal of Biosciences*, 51(5-6): 277-280. Available online: <https://doi.org/10.1515/znc-1996-5-602> [accessed 21/02/2019].
- Bankova V., 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1): 29-32. Available online: <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh059> [accessed 09/12/2018].
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B., 2014. Propolis volatile compounds : chemical diversity and biological activity : a review. *Chemistry Central Journal*, 8(28): 270-290. Available online: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28> [accessed 16/01/2019].
- Banskota A. H., Tezuka Y., Adnyana I K., Midorikawa K., Matsushige K., Message D., Huertas A. A. G., Kadota S., 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2): 239-246. Available online: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00252-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00252-X) [accessed 21/02/2019].
- Breeze T.D., Vaissière B.E., Bommarco R., Petanidou T., Seraphides N., Kozák L., et al., 2014. Agricultural Policies Exacerbate Honeybee Pollination Service Supply-Demand Mismatches

- Across Europe. PLoS ONE 9(1): e82996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082996> [accessed 15/06/2019].
- Burdock G. A., 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). Food and Chemical Toxicology, 36(4): 347-363. Available online: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2) [accessed 27/03/2019].
- Chan G. C. F., Cheung K. W., Sze D. M. Y., 2012. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. Springer Science and Business Media, 44(3): 262-273. Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12016-012-8322-2> [accessed 05/04/2019].
- Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182. Available online: www.elsevier.com/locate/jfda [accessed 28/02/2019].
- Cizmarik J., Matel I., 1973. Examination of the Chemical Composition of Propolis 2. Isolation and Identification of 4-Hydroxy-3-Methoxycinnamic Acid (Ferulic Acid) from Propolis. Journal of Apicultural Research, 12(1): 52-54. Available online: <https://doi.org/10.1080/00218839.1973.11099729> [accessed 11/2/2019].
- FAO, 2007. Value-Added Products From Beekeeping. Chapter 5 [accessed 18/04/2019].
- Freitas S. F., Shinohara L., Sforcin J. M., Guimaraes S., 2006. In vitro effects of propolis on Giardia duodenalis trophozoites. Phytomedicine, 13(3): 170-175. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.008> [accessed 24/04/2019].
- Greenaway W., May J., Scaysbrook T. and Whatley F.R., 1991. Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150 Compounds in Propolis. Department of Plant Sciences, University of Oxford. Zeitschrift für Naturforschung C, 46(1-2): 111-121. Available online: <https://doi.org/10.1515/znc-1991-1-218> [accessed 24/04/2019].
- Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E. M., Efros L., Caldwell M., Estevez V., Nakanishi K., 1988. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia, 44(3): 230-232. Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01941717> [accessed 25/04/2019].
- Gulcin I., Bursal E., Sehitoglu M. H., Bilsel M., Goren A. C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. Food and Chemical Toxicology, 48(8-9): 2227-2238. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053> [accessed 09/03/2019].

- Hanley N., Breeze T.D., Ellis C. and Goulson D., 2015. Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. *Ecosystem Services*, 14: 124-132. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2014.09.013> [accessed 15/06/2019].
- Hung K.-L.J., Kingston J.M., Albrecht M. Holway D.A. and Kohn J.R., 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B*, 285: 20172140. Available online: <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140> [accessed 15/06/2019].
- Kim D. M., Lee G. D., Aum S. H., Kim H. J., 2008. Preparation of Propolis Nanofood and Application to Human Cancer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(9): 1704-1710. Available online: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1704> [accessed 05/04/2019].
- Kimoto T., Arai S., Kohguchi M., Aga M., Nomura Y., Micallef MJ., Kurimoto M., Mito K., 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Journal of Cancer Detection and Prevention*, 22(6): 506-515. Available online: <https://doi.org/10.1046/j.1525-1500.1998.00020.x> [accessed 10/06/2019].
- Koumenis C., Naczki C., 2004. Method of using caffeic acid phenethyl ester and analogs thereof as radiation sensitizers. Wake Forest University. Available online: <https://patents.google.com/patent/US6689811B2/en> [accessed 25/04/2019].
- Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3): 229-239. Available online: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4) [accessed 19/04/2019].
- Lindenfelser L.A., 1968. In Vivo activity of propolis against *Bacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12(1): 129-131. Available online: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(68\)90252-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(68)90252-8) [accessed 24/04/2019].
- Marcucci M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Biological Chemistry Laboratory, Chemical Institute of Universidade Estadual de Campinas. Apidologie*, 26(2): 83-99. Available online: <https://doi.org/10.1051/apido:19950202> [accessed 05/03/2019].
- Marcucci M.C., Ferreres F., Garcia-Viguera C., Bankova V. S., De Castro S.L., Dantas A.P., Valente P.H.M., Paulino N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethno-Pharmacology*, 74(2): 105-112. Available online: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00326-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00326-3) [accessed 05/03/2019].

- 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. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.022> [accessed 20/04/2019].
- McGregor S.E., 2009. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. USDA, originally published in 1976. Available online: <https://www.ars.usda.gov/ARSEUserFiles/20220500/OnlinePollinationHandbook.pdf> [accessed 15/06/2019].
- Melliou E., Chinou I., 2004. Chemical Analysis and Antimicrobial Activity of Greek Propolis. *Planta Medica*, 70(6): 515-519. Available online: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2004-827150> [accessed 12/03/2019].
- Melliou E., Stratis E., Chinou I., 2007. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103(2): 375-380. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.033> [accessed 12/03/2019].
- Missima F., Pagliarone A. C., Orsatti C.L., Araujo Jr J.P. and Sforcin J.M., 2010. The Effect of Propolis on Th1/Th2 Cytokine Expression and Production by Melanoma-bearing Mice Submitted to Stress. *Phytotherapy Research*, 24(10): 1501-1507. Available online: <https://doi.org/10.1002/ptr.3142> [accessed 05/03/2019].
- Orsi R. O., Sforcin J. M., Funari S. 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. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.10.003> [accessed 05/04/2019].
- Ota C., Unterkircher G., Fantinato V., Shimizu M. T., 2001. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *University Pharmacy School. Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, 44(9-10): 375-378. Available online: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x> [accessed 12/03/2019].
- Picolotto A., Pacheco G., Gomes K., Barud S., Roesch-ely M., Henrique M., & Tasso L., 2019. Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112: 108-640. Available online:

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108640> [accessed 11/03/2019].
- Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V., 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3): 221-228. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007> [accessed 21/02/2019].
- Ristivojević P., Dimkić I., Guzelmeric E., Trifković J., Knežević M., Berić T., Stanković S., 2018. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*, 95: 367-379. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.063> [accessed 25/02/2019].
- Schnitzler P., Neuner A., Nolkemper S., Zundel C., Nowack H., Sensch K. H., Reichling J., 2010. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research*, 24(51): 520-528. Available online: <https://doi.org/10.1002/ptr.2868> [accessed 04/03/2019].
- Sekhran N., 2016. Pollinators vital to our food supply under threat. FAO. Available online: <http://www.fao.org/news/story/en/item/384726/icode/> [accessed 15/06/2019].
- Trusheva B., Popova M., Bankova V., Simova S., Marcucci M.C., Miorin P.L., da Rocha Pasin F., Tsvetkova I., 2006. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(2): 249-254. Available online: <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nel006> [accessed 22/12/2018].
- Watanabe M. A. E., Amarante M. K., Conti B. J., Sforcin J. M., 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11): 1378-1386. Available online: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x> [accessed 03/05/2019].

Ελληνική βιβλιογραφία

- Καραμανώλη Α. 2014. Δευτερογενείς μεταβολίτες: βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος. Κεφ. 3: Φαινολικές ενώσεις. Ανοικτά ακαδημαϊκά μαθήματα, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://opencourses.auth.gr/courses/OCRS510/> [accessed 18/06/2019].
- Θεργιάκης Β., 2010. Βασιλικός πολτός σύσταση, παραγωγή, διάθεση και χρήσεις του από τον άνθρωπο. Πτυχιακή Διατριβή, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Ηράκλειο. Σελ. 71.
- Θρασυβούλου Α., 2008. Πρακτική Μελισσοκομία. Εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Ν. Παππάς, Θεσσαλονίκη. Σελ. 255.
- Καλλίνικος Κ. 1969. Ο Χριστιανικός Ναός και τα Τελούμενα εν Αυτώ. Έκδοση Τρίτη. Εκδόσεις Κασσάνδρα Μ. Γρηγόρη, Αθήνα. Σελ. 648.
- Λιάκος Β., 2005. Επιχειρηματική Μελισσοκομία. Εκδόσεις του ιδίου, Θεσσαλονίκη. Σελ. 758.
- Μπίκος Θ., 2001. Πρόπολις, το θαύμα των μελισσών. Εκδόσεις του ιδίου, Αθήνα. Σελ. 132.
- Μπόσκος Δ., 2004. Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη. Σελ. 130.
- Πλακούτσης Α., 2006. Μελισσοκομικά φυτά. Εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Ν. Παππάς, Θεσσαλονίκη. Σελ. 230.
- Τράκα Χ., 2012. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης σε πρόπολη διαφόρων περιοχών της Ελλάδος. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο, Αθήνα. Σελ. 150.
- Τρουλλίδου Ε., 2007. Πρόπολη: Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων της και αξιολόγηση ενθυλακωμένων μορφών της σε βιοπολυμερή, με έμφαση στις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές της και την απελευθέρωσή της. Μεταπτυχιακή διατριβή, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα. Σελ. 283.
- Von Frisch K., 1999. Από τη ζωή των μελισσών. Εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Ν. Παππάς, Θεσσαλονίκη. Σελ. 214.
- Χαριζάνης Π., 2017. Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική. Εκδ. Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Ειρ. Παππά, Θεσσαλονίκη. Σελ. 263.