



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ  
ΑΞΙΑΣ ΑΠΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΡΟΔΑΚΙΝΟΥ  
(*PRUNUS PERSICA*)**



**ΖΕΡΒΑ ΕΥΓΕΝΙΑ**

ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:

Απομόνωση – Ανάπτυξη – Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος εργασίας:

Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας για την ανάκτηση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας απο βιομηχανικά απόβλητα ροδάκινου (*Prunus persica*)

Φοιτήτρια:

Ζέρβα Ευγενία

A.M.: 1003-12

Επιβλέπων Καθηγητής:

Επίκουρος καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον πρόεδρο του τμήματος Φαρμακευτικής και Διευθυντή του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.
- Τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση του θέματος και τις ευκαιρίες επιστημονικής κατάρτισης που μου παρείχε.
- Τον Επίκουρο καθηγητή κ. Νικόλαο Φωκιαλάκη, υπεύθυνο της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την επιλογή του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράστασή του.
- Τον Επίκουρο καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη για το συνεχές ενδιαφέρον και τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την βοήθεια του.
- Την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Τραβασάρου για την αμέριστη συμπαράστασή της, τόσο σε πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Την ευχαριστώ για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε και για τις διορθώσεις κατά τη συγγραφή της εργασίας.
- Το μεταδιδάκτορα Διονύση Αμπάτη, για την αρχική μας συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά του στα πλαίσια της πιλοτικής κλίμακας της μελέτης.
- Τη μεταδιδάκτορα Κατερίνα Τερμεντζή για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS, τη διδάκτορα Ειρήνη Κουλούρα για τη λήψη φασμάτων μάζας HR-ESI-MS και τον υποψήφιο διδάκτορα Job Tchoum Tchoua για την βοήθειά του στην επεξεργασία των φασμάτων αυτών.
- Τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Παπαευσταθίου για την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία του ενδοσπέρμιου του ροδάκινου με τη μέθοδο της εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό.
- Την κοινοπραξία αγροτικών συνεταιριστικών οργανώσεων ΑΛ.Μ.ΜΕ. για το ενδιαφέρον που έδειξε για την παρούσα εργασία και για την παραχώρηση της πρώτης ύλης ροδάκινου που χρησιμοποιήθηκε.
- Όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές στο εργαστήριο για την υποδοχή και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε το χρειαζόμουν και για το υπέροχο κλίμα που δημιουργήθηκε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα

Αποστολή Αγγελή για τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς και τους Τάνια, Μίνα, Νικολά, Εύα Ν., Περικλή, Τζένη, Εύα Κ., Αλεξάνδρα και Έμη για τη στήριξη και τη φιλία τους.

- Την οικογένειά μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει και την υποστήριξή τους σε κάθε μου βήμα, τους φίλους μου και τον Σταμάτη για την υπομονή και τη στήριξή τους καθ' όλη την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

## Συντομεύσεις

$^{13}\text{C}$ NMR	Πείραμα NMR πυρήνων άνθρακα 13
1D NMR	Πειράματα NMR μίας διάστασης
$^1\text{H}$ NMR	Πείραμα NMR πρωτονίου μιας διάστασης
2D NMR	Πειράματα NMR δύο διαστάσεων
ACN	Ακετονιτρίλιο
br	Ευρεία κορυφή σε φάσματα NMR πρωτονίου
c-Hex	Κυκλοεξάνιο
COSY	Πείραμα 2D NMR ομοπυρηνικού συσχετισμού $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ( $^2J$ , $^3J$ )
DCM	Διχλωρομεθάνιο
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Αιθανόλη
$\text{H}_2\text{O}$	Νερό
HMBC	2D NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $^2J$ , $^3J$ )
HSQC	2D NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $^1J$ )
$J$	Σταθερά σύζευξης πρωτονίου πρωτονίου
m	Πολλαπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
MeOH	Μεθανόλη
MPLC	Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Prep HPLC	Παρασκευαστική Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης
Semi-Prep HPLC	Ημι-παρασκευαστική Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης
Prep TLC	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
RP	Αντίστροφης φάσης
s	Απλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
d	Διπλή κορυφή σε φάσματα NMR πρωτονίου
t	Τριπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας





## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	11
Abstract.....	12
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	13
A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
A.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	14
A.3 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΤΟΥ <i>PRUNUS PERSICA</i> (ROSACEAE).....	15
A.4 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>PRUNUS</i> ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ .....	16
A.4.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ .....	16
Φλαβανόνες .....	21
Φλαβονόλες .....	21
Διυδροφλαβονόλες.....	22
Διφλαβόνες και διφλαβανόλες.....	23
Προανθοκυανιδίνες.....	23
Ανθοκυανίνες.....	24
A.4.2 ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΑ .....	25
A.4.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ .....	27
A.4.4 ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ .....	29
A.4.5 ΓΙΒΒΕΡΙΜΙΝΕΣ .....	33
A.4.6 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	35
A.4.7 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ .....	40
A.5 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>PRUNUS</i> .....	41
A.6 ΛΑΪΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΟΥ <i>PRUNUS PERSICA</i> .....	41
A.7 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>PRUNUS</i> .....	42
A.8 ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΑΞΙΑ ΡΟΔΑΚΙΝΟΥ ΣΤΗ ΧΩΡΑ ΜΑΣ .....	43
A.9 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ .....	46
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	49
B.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	51
B.1.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΤΕΧΝΙΚΕΣ .....	51
B.1.1.1 Μέθοδοι εκχύλισης .....	51
Εκχύλιση με Υπερκρίσιμο Ρευστό (SFE).....	51
Εκχύλιση σε πιλοτική κλίμακα.....	52
B.1.1.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι .....	52

Χρωματογραφία επί Λεπτής Στοιβάδας (TLC) .....	52
Υγρή Χρωματογραφία Κενού (VLC) .....	52
Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού .....	53
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	53
Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC) .....	54
Χρωματογραφικά Αντιδραστήρια .....	54
Χρωματογραφία Προσρόφησης (Ρητίνες XAD) .....	54
B.1.1.3 Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	55
Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	55
Φασματομετρία Μάζας (MS) .....	56
B.1.2 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΤΟΥ <i>PRUNUS PERSICA</i> .....	56
B.1.2.1 Συλλογή της πρώτης ύλης.....	56
B.1.2.2 Επιλογή κατάλληλου τρόπου εκχύλισης και επεξεργασίας της πρώτης ύλης.....	56
B.1.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ ΣΕ ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ .....	59
B.1.3.1 Πολτός ροδάκινου - Εκχύλιση με κυκλοεξάνιο .....	59
B.1.3.2 Πολτός ροδάκινου - Εκχύλιση με νερό .....	60
B.1.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ .....	61
B.1.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΟΥ ΤΟΥ ΡΟΔΑΚΙΝΟΥ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟ ΡΕΥΣΤΟ (SFE)	
.....	69
B.1.5.1 Παραλαβή του εκχυλίσματος με υπερκρίσιμο CO <sub>2</sub> .....	69
B.1.5.2 Απόδοση του εκχυλίσματος με υπερκρίσιμο CO <sub>2</sub> .....	70
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
B.2.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΛΤΟ.....	73
B.2.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΛΗΦΘΗΚΕ ΜΕ SFE.....	102
B.2.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	103
B.2.4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	103
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105

## Περίληψη

Κάθε χρόνο, στην Ελλάδα, πάνω από 300.000 τόνοι φρούτων ροδάκινου (*Prunus persica*), χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χυμών και κονσερβοποιημένων προϊόντων. Κατά συνέπεια, χιλιάδες τόνοι αποβλήτων του φρούτου απορρίπτονται, επιδεινώνοντας κάθε χρόνο το περιβάλλον με 3 εκατομμύρια m<sup>3</sup> υγρών και 23,000 τόνους στερεών αποβλήτων συνολικά. Τα στερεά και υγρά απόβλητα του ροδάκινου είναι πλούσια σε φυτοχημικές ενώσεις, όπως οι φαινόλες και τα καροτενοειδή, που έχουν υψηλή οικονομική προστιθέμενη αξία, λόγω της αξιοσημείωτης βιολογικής τους δράσης. Οι ενώσεις αυτές βρίσκουν πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών βιομηχανιών.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε μια μέθοδος για την ανάκτηση των πολυφαινολών με φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση. Η μεθοδολογία αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα και στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε πιλοτική κλίμακα. Η όλη διαδικασία στηρίχτηκε κυρίως στην τεχνολογία ρητινών προσρόφησης και σε πιλοτική κλίμακα, 220 kg πολτού ροδάκινου εκχυλίστηκαν και επεξεργάστηκαν με ρητίνη τύπου XAD4, προκειμένου να γίνει ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων. Με μερικά απλά βήματα διαχωρισμών απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν αρκετές φαινολικές ενώσεις που ανήκουν σε φλαβονοειδή είτε ως γενίνες είτε ως γλυκοσίδες (π.χ. λουτεολίνη, προυνίνη, ταξιφολίνη), φαινολικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ), λακτόνες (π.χ. δ-δεκαλακτόνη) και τριτερπένια (π.χ. 3-επιμασλινικό οξύ). Όλα τα μόρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού 1D & 2D NMR, καθώς και με φασματοσκοπία μάζας.

Επιπλέον, ο πυρήνας του ροδάκινου που αποτελεί άλλο ένα παραπροϊόν της βιομηχανίας υποβλήθηκε με επιτυχία σε εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) και παρελήφθη, σε καλές αποδόσεις, το έλαιο του πυρήνα που είναι επίσης γνωστό ως "περσικό έλαιο" και έχει υψηλή προστιθέμενη εμπορική αξία στην βιομηχανία καλλυντικών.

Η ταυτοποίηση των συστατικών του πραγματοποιήθηκε με χρήση της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Τα προϊόντα που ανιχνεύτηκαν σε καλά επίπεδα ήταν οι αιθυλεστέρες λινολεϊκού και ολεϊκού οξέος, ενώ το σκουαλένιο βρέθηκε σε ίχνη.

## Abstract

Every year, in Greece, more than 300.000 tones of peach fruit (*Prunus persica*), are used to produce juices and canned products. Consequently, thousands tones of fruit waste are discarded, aggravating annually the environment by a total of 3 million m<sup>3</sup> of liquid and 23.000 tones of solid waste. Peach solid and liquid wastes are rich in phytochemicals like phenolics and carotenoids that have high economic added value, due to their remarkable biological activities that find many applications in food, cosmetic and pharmaceutical industries.

Within this project, a method for the recovery of polyphenols has been developed and applied with eco friendly approach. The methodology has been designed and improved in lab scale and then was applied in pilot scale. The whole process was based on the absorption resin technology and in pilot scale 220 kg peach pulp were extracted and treated with resin XAD4 type in order to recover polyphenolic compounds. Using a few simple steps of separations we have isolated and identified several phenolic compounds that belong to flavonoids either genins or glycosides (e.g. luteolin, prunigen, taxifolin), phenolic acids (e.g. caffeic acid), lactones (e.g.  $\delta$ -decalactone) and triterpenes (e.g. 3-epi maslinic acid). All the isolated molecules were identified by Nuclear Magnetic Resonance 1D & 2D NMR and Mass Spectroscopy.

In addition, the peach kernel that is another by-product of the industry has been submitted successfully to Super Critical Fluid extraction and we have obtained, in good yields, the kernel oil that is also known as “persic oil” and has commercially high added value in cosmetic industry.

For the identification of the constituents, samples were investigated with GC-MS, where it was found that linoleic and oleic acid ethyl esters are produced in good yields. Another product that was detected in traces was squalene.

***A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βιοδραστικές ενώσεις στα φυτά είναι ενώσεις που παράγονται από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες και έχουν φαρμακολογικές ή τοξικολογικές επιδράσεις στον άνθρωπο και τα ζώα (Bernhoft, 2010).

Η βοτανική ταξινόμηση με βάση τις οικογένειες και τα γένη των φυτών είναι σημαντική, καθώς συγγενικά είδη φυτών παράγουν πιο συχνά βιοδραστικές ενώσεις, ίδιας ή παρόμοιας χημικής δομής. Ωστόσο, υπάρχουν και παραδείγματα όπου είδη, που γενετικά σχετίζονται λιγότερο μεταξύ τους παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην ίδια χημική κατηγορία (Bernhoft, 2010).

Η ροδακινιά, *Prunus persica*, είναι ένα φυλλοβόλο δέντρο, που καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Κίνα. Φέρει ένα εδώδιμο ζουμερό καρπό που ονομάζεται ροδάκινο (Christopher, 1985). Το είδος *Prunus persica* είναι ένα είδος του γένους *Prunus* και το όνομα του είδους σχετίζεται με την εκτεταμένη καλλιέργειά του στην Περσία, από όπου και μεταφυτεύθηκε στην Ευρώπη.

## A.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το βοτανικό όνομα της ροδακινιάς (*Prunus persica* (L.) Batsch) αναφέρεται στην υποτιθέμενη χώρα προέλευσης της, την Περσία (σημερινό Ιράν) όπου πρώτος ο Λινναίος (1758) ονόμασε το είδος (*Amygdalus persica*) με βάση την πεποίθηση ότι προέρχεται από εκεί. Όμως, κατά τον 19ο αιώνα, αναγνωρίστηκε ως γεωγραφική προέλευση του είδους, η Άπω Ανατολή (δυτική Κίνα) (De Candolle, 1883; Hedrick, 1917; Vavilov, 1951). Γραπτές μαρτυρίες και αρχαιολογικά στοιχεία χρονολογούν την ύπαρξη της ροδακινιάς τουλάχιστον από το 3000 π.Χ. (Li, 1984).

Η μετακίνηση του ροδάκινου προς τα δυτικά το έφερε στην Περσία (Ιράν) τον 2ο με 1ο αιώνα π.Χ., λίγο πριν από την άφιξη του ρωμαϊκού στρατού. Παλαιοί Λατίνοι μελετητές αναφέρουν την ύπαρξη των ροδάκινων στην Ιταλία από τον 1ο αιώνα π.Χ. Τα «γαλατικά» ροδάκινα, που περιγράφονται ως γαλλικής προέλευσης, μπορεί να ευθύνονται για μια πιθανή δεύτερη, ανεξάρτητη εισαγωγή του δέντρου στην Ευρώπη. Έτσι, το ροδάκινο θα μπορούσε να φτάσει στη Γαλλία μέσω της βαλκανικής οδού, σχεδόν ταυτόχρονα με την άφιξη του στην Ιταλία, που έγινε από την περιοχή του ποταμού Δούναβη και της Μαύρης Θάλασσας (Werneck, 1956). Επιπλέον, κατά τον Μεσαίωνα, η Γαλλία έγινε κατά πάσα πιθανότητα το δεύτερο πιο σημαντικό σημείο προέλευσης μετά την Κίνα, σύμφωνα με πολλά γραπτά κείμενα.

Το ροδάκινο εισήχθη στην Αμερικανική ήπειρο σε δύο διαφορετικά κύματα. Το πρώτο ξεκίνησε με τους Ισπανούς, αρχής γενομένης από την Κεντρική Αμερική κατά το πρώτο μισό του 16ου αιώνα. Στη βόρεια Αμερική, τα ροδάκινα καλλιεργήθηκαν αργότερα από τους αυτόχθονες λαούς και πολλαπλασιάστηκαν με σπόρους. Το δεύτερο κύμα εισαγωγής

του ροδάκινου στις ΗΠΑ, ήταν με την άμεση εισαγωγή του από την Κίνα στα μέσα της δεκαετίας του 1850 (Okie et al, 1985; Scorza et al, 1985).

Λαμβάνοντας υπόψη τη μακρά ιστορία της καλλιέργειας αυτού του είδους και τον αυξανόμενο ρόλο του σε πολλές χώρες κατά τη διάρκεια των αιώνων, πολλοί μελετητές έχουν προσπαθήσει την ταξινόμηση των κατώτερων ειδών και συναφών μορφών του.

Για παράδειγμα, παλιά κείμενα αναφέρονταν στο αμύγδαλο και στο ροδάκινο ως διαφορετικά υποείδη, αλλά αργότερα ταξινομήθηκαν ως ξεχωριστά είδη (De Candolle, 1883). Για αυτήν την υπόθεση μπορεί να ευθύνεται η στενή τους γεωγραφική προέλευση: ενώ το ροδάκινο είναι εγγενές στη λεκάνη Ταρίμ βόρεια των βουνών Κουν Λουν, το αμύγδαλο είναι εγγενές στα νότια των ίδιων βουνών (δίπλα από τα βόρεια σύνορα του Αφγανιστάν και του Πακιστάν).

### **A.3 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΤΟΥ *PRUNUS PERSICA* (ROSACEAE)**

*P. persica* (L.) Batsch: Δέντρο έως 6 m με ευθεία, λεία, κοκκινωπά, γωνιακά κλαδιά. Φύλλα 5-15 x 2-4 cm επιμήκη-λογχοειδή, οξεία ως αιχμηρά, οδοντωτά και άτριχα. Λουλούδια άμισχα, ως επί το πλείστον μοναχικά. Ανθοδόχη με χνοώδη σέπαλα, πέταλα 10-20mm και χρώμα βαθύ (σπάνια χλωμό) ροζ. Καρπός 40-80 mm, στρογγυλός, βελούδινος, χρώμα κίτρινο ή ανοικτό πράσινο, κόκκινο, με ένα τόνο. Μεσοκάρπιο σαρκώδες, ανοιχτόχρωμο πράσινο ή πορτοκαλί, ενδοκάρπιο βαθιά αυλακωτό (Tutin, 1968).



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση των ανθέων και του καρπού του είδους *Prunus persica*.

**Πίνακας 1:** Συστηματική κατάταξη του είδους *Prunus persica* κατά το ITIS (Integrated Taxonomic Information System)

<b>Βασίλειο</b>	<b>Plantae</b>
<b>Άθροισμα</b>	Spermatophyta
<b>Υποάθροισμα</b>	Angiospermae
<b>Κλάση</b>	Dicotyledones
<b>Οικογένεια</b>	Rosaceae
<b>Γένος</b>	<i>Prunus</i> L.
<b>Είδος</b>	<i>P. Persica</i> (L.) Batsch

## **A.4 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ PRUNUS ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

### **A.4.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ**

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια σημαντική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από τα φυτά. Συνιστούν την πιο κοινή ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων στη διατροφή του ανθρώπου και είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Οι σημαντικότερες πηγές τους στη διατροφή είναι τα φρούτα, το τσάι και η σόγια. Το πράσινο και μαύρο τσάι έχουν περίπου 25% περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή. Άλλες σημαντικές πηγές είναι το μήλο (κερκετίνη) και τα εσπεριδοειδή (ρουτίνη και εσπεριδίνη).

Όλα τα φλαβονοειδή είναι παράγωγα της 2-φαινυλοβενζοπυρόνης ή της 3-φαινυλοβενζοπυρόνης. Διαφέρουν ως προς το επίπεδο οξείδωσης ή τους υποκαταστάτες των ετεροκυκλικών δακτυλίων τους. Τα φλαβονοειδή κατηγοριοποιούνται σε 8 μεγάλες υποομάδες: χαλκόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες, προανθοκυανιδίνες και ισοφλαβονοειδή.



Τα είδη *Prunus* είναι πλούσια σε φλαβονοειδή που παρουσιάζουν πολλές βιολογικές δραστηριότητες. Η απιγενίνη, μία φλαβόνη που εμφανίζεται σε διάφορα είδη *Prunus* είναι ένα μη τοξικό διατροφικό φλαβονοειδές με αντικαρκινικές ιδιότητες (Fang et al., 2007). Η χρυσίνη που εμφανίζεται σε αρκετά είδη *Prunus* συμπεριλαμβανομένου του *P. cerasus*, έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς δρα ως ισχυρός αναστολέας του HIF-1α και προτείνει μια νέα προσέγγιση για τους μηχανισμούς δράσης του φλαβονοειδούς για την αντιμετώπιση του καρκίνου (Fu et al., 2007). Η κερκετίνη, η κερκετίνη και η μουλτιφορίνη που έχουν απομονωθεί από *P. tomentosa* (Kim et al., 2008), παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε πειράματα DPPH.



**Πίνακας 2:** Κατάταξη φλαβονοειδών που έχουν απομονωθεί από το είδος *Prunus persica* (Poonam et al., 2011)

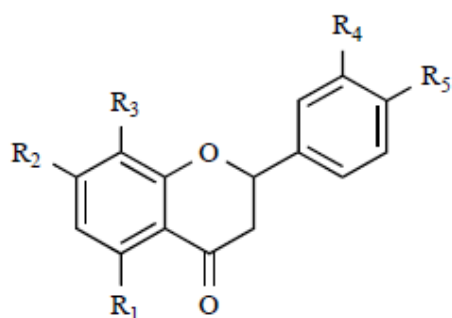
<b>Φλαβόνες</b>							
<b>Φλαβανόνες</b>	Εριοδικτυόλη (1)	Εσπεριτίνη 5-O-β-D-γλυκοσίδης (2)	Ναριγενίνη (3)	Περσικονίνη (4)	Περσικογενίνη (5)	Περσικογενίνη-3'-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (6)	Προυίνη (7)
<b>Φλαβονόλες</b>	Κεμπφερόλη-3-ραμνοσίδης (8)	Ισοκερκιτρίνη (9)	Κεμπφερόλη (10)	Κεμπφερόλη-3-γαλακτοσίδης (11)	Κεμπφερόλη-3-O-[β-D-γλυκοπυρανοσυλ-(1→4)-α-D-γαλακτοπυρανοσίδης] (12)	Κεμπφερόλη-3-γλυκοσίδης (13)	Κεμπφερόλη-3-O-α-L-ραμνοπυρανοσίδης (14)
	Κεμπφερόλη-3-O-β-L-ραμνοπυρανοσίδης (15)	Μουλτιφορίνη Α (16)	Μουλτιφορίνη Β (17)	Μουλτινοσίδης Α (18)	Κερκιτρίνη (19)	Κερκετίνη (20)	Κερκετίνη-3-διγλυκοσίδης (21)
	Ρουτίνη (22)						
<b>Διυδροφλαβονόλες</b>	Αρωμαδενδρίνη (23)	Ταξιφολίνη-7-γλυκοσίδης [24]					
<b>Διφλαβόνες/ Διφλαβανόλες</b>	Αναστολέας Prunus a (25)	Αναστολέας Prunus b (26)					
<b>Προανθοκυανιδίνες</b>	Αφζελεκίνη (27)						
<b>Ανθοκυανίνες</b>	Χρυσανθεμίνη (28)	Κυανιδίνη-3-πεντοσυλεξοσίδης (29)	Πεονιδίνη-3-γλυκοσίδης (30)	Πεονιδίνη-3-πεντοσυλεξοσίδης (31)			

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το *Prunus persica*. Είναι φανερό ότι στο συγκεκριμένο είδος έχουν βρεθεί πολλές ενώσεις που ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των φλαβονολών και φλαβονονών, ενώ δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την παρουσία φλαβονών.



## Φλαβανόνες

Έχει βρεθεί ότι τα είδη *Prunus* είναι πλούσια σε φλαβανόνες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ναριγενίνη (**3**), η οποία έχει απομονωθεί από τα περισσότερα είδη του γένους *Prunus*. Εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντιοιστρογόνο δράση και συμβάλει στη μείωση της χοληστερόλης (Bugianesi et al., 2002; Ho et al., 2001).

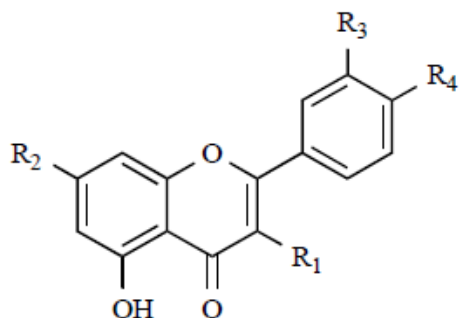


	R1	R2	R3	R4	R5
1	OH	OH	H	OH	OH
2	$\alpha$ -D-Glu	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>
3	OH	OH	H	H	OH
4	$\alpha$ -D-Glu	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>
5	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>
6	OH	OCH <sub>3</sub>	H	$\alpha$ -D-Glu	OCH <sub>3</sub>
7	OH	$\alpha$ -D-Glu	H	H	OH

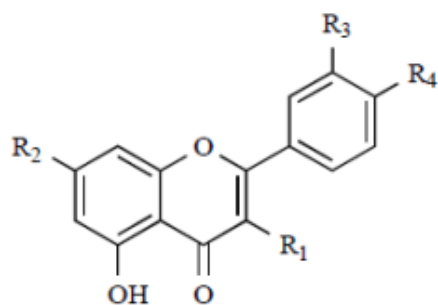
## Φλαβονόλες

Η кемπερόλη (**10**) εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι ιών του απλού έρπητα (Ilic et al., 2004). Οι Choi et al., 2002 απομόνωσαν μια σειρά από γλυκοζίτες της кемπερόλης (**8**, **11-15**) και της керκετίνης (**21**) από την *P. serrulata*, που έδειξαν *in vitro* αντιοξειδωτική δράση.

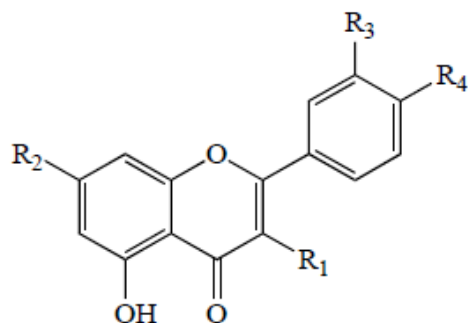
Η керκετίνη (**20**) θεωρείται ότι είναι το κυριότερο флаβονοειδές στη διατροφή. Οι άνθρωποι με την υψηλότερη πρόσληψη керκετίνης από τα τρόφιμα βρέθηκαν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα θνησιμότητας, μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης άσθματος, καρδιακών παθήσεων και καρκίνου του πνεύμονα (Mertens-Talcott et al., 2003; Woude et al., 2003; Knekt et al., 2002; Morrow et al., 2001).



	R1	R2	R3	R4
8	$\alpha$ -D-Rhamnopyranoglycosyl	OH	H	OH
9	$\alpha$ -D-Glu	OH	OH	OH
10	OH	OH	H	OH
11	O-Gal	OH	H	OH
12	O-Glc-(1 4)-gal	OH	H	OH
13	O-Glc	OH	H	OH
14	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	OH	H	OH
15	$\beta$ -L-rhamnopyranosyl	OH	H	OH



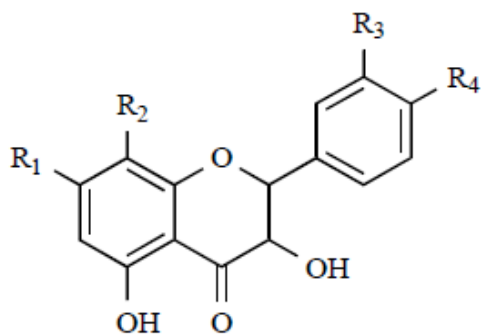
	R1	R2	R3	R4
16	rha-4 1(6-O-Acetyl)-glc	OH	H	OH
17	rha-4 1-glc	OH	H	OH
18	rha-4 1-glc	OH	OH	OH



	R1	R2	R3	R4
19	O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	OH	OH	OH
20	OH	OH	OH	OH
21	glc (1 2)- $\beta$ -glc	OH	OH	OH
22	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	OH	H	OH

## Διδροφλαβονόλες

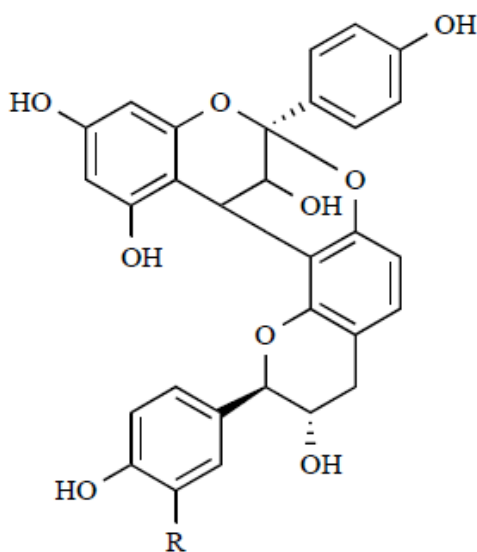
Οι *Ohmura et al.*, 2000 απομόνωσαν την αρωμαδενδρίνη (**23**) και την ταξιφολίνη από το ιαπωνικό ξύλο πεύκου. Και οι δύο ενώσεις έδειξαν υψηλή αντιτροφική δραστηριότητα κατά τερμιτών. Οι διδροφλαβονόλες μπορεί να είναι αποτελεσματικές στην πρόληψη της οσμωτικής πίεσης στην υπεργλυκαιμία.



	R1	R2	R3	R4
23	OH	H	H	OH
24	$\alpha$ -D-Glu	H	OH	OH

## Διφλαβόνες και διφλαβανόλες

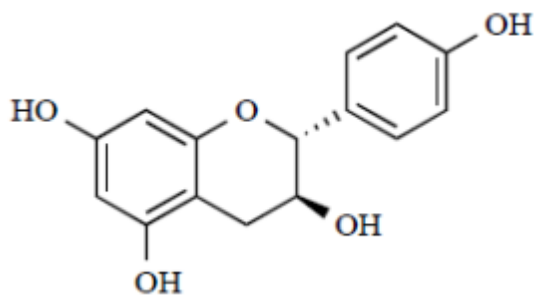
Οι διφλαβόνες και οι διφλαβανόλες εμφανίζονται πολύ σπάνια στα είδη *Prunus*. Οι Ohigashi *et al.*, 1982 απομόνωσαν δύο νέες διφλαβόνες από το *P. persica*, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του σποριόφυτου του ροδάκινου.



	R
25	H
26	OH

## Προανθοκυανιδίνες

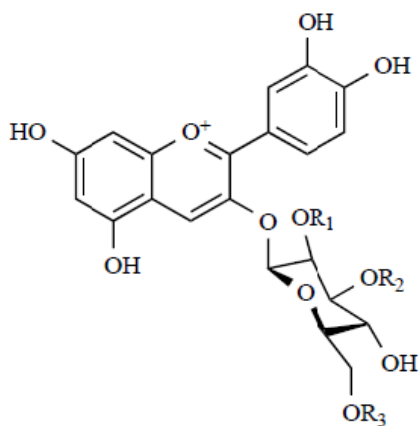
Οι προανθοκυανιδίνες είναι μια ομάδα φλαβονοειδών με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και εμφανίζονται συχνά στα είδη *Prunus*. Μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου, ενώ ορισμένες προστατεύουν από λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Steinberg *et al.*, 2003; Howell, 2002; Reed, 2002; Bagchi *et al.*, 2000; Scalbert *et al.*, 2000).



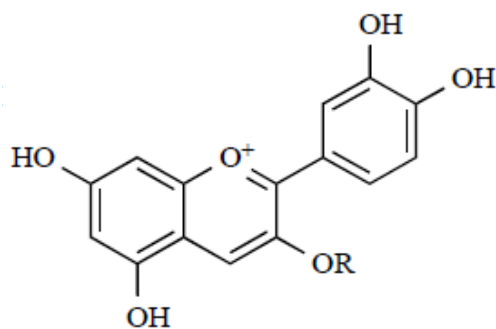
27

## Ανθοκυανίνες

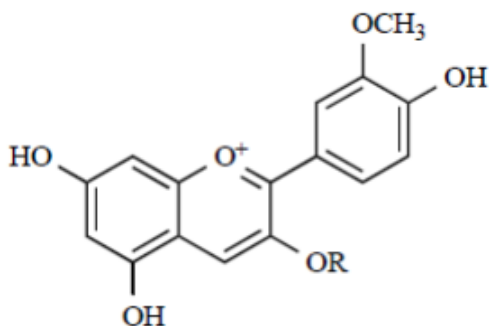
Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές φλαβονοειδών και εμφανίζουν χρώματα που ποικίλουν από κόκκινο μέχρι μπλε. Αποτελούν σημαντική ομάδα φυτικών χρωστικών που είναι ορατές στο ανθρώπινο μάτι. Έχουν ένα θετικό φορτίο στο μόριό τους, το οποίο τους επιτρέπει να απορροφούν το φως και έτσι εμφανίζουν χρώμα. Οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση.



28 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H



29 R = O-xyl (1→2)-glu



	R
30	glucosyl
31	O-xyl (1→2)-glu

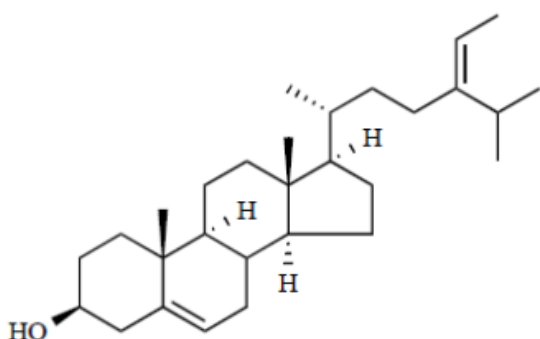


## A.4.2 ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΑ

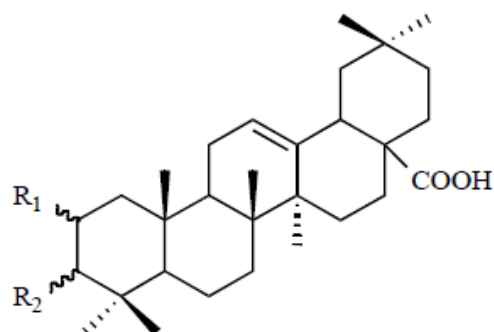
Τα στεροειδή προέρχονται βιοσυνθετικά από το σκουαλένιο, έναν άκυκλο υδρογονάνθρακα με 30 άτομα άνθρακα και συναντώνται σε αφθονία στα είδη *Prunus*. Μια σειρά από τριτερπενικά οξέα έχουν απομονωθεί από το κέλυφος του αμύγδαλου (*P. dulcis*) και έχουν μελετηθεί για την αντινεοπλασματική τους δράση (Amico et al., 2006). Από το *P. persica*, έχουν απομονωθεί επτά τριτερπενικές φυτοαλεξίνες (33, 34, 38, 39, 40, 41 και 42), οι οποίες παρουσίασαν αντιμυκητιασική δράση ενάντια στο *Colletotricum musae*.

**Πίνακας 3:** Κατάταξη στεροειδών και τερπενοειδών του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

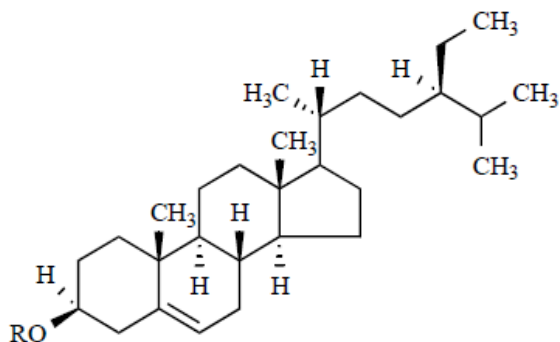
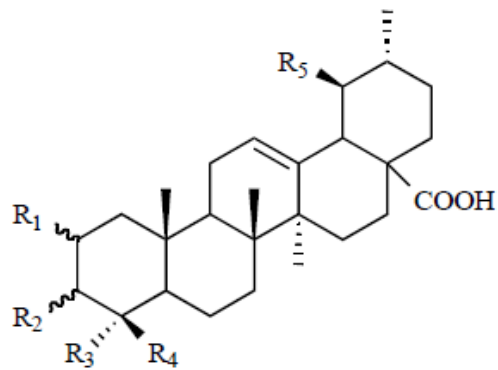
ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΑ	
Δ <sup>5</sup> -Αβεναστερόλη (32)	1β,2α,3α,24-Τετραδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (38)
2α,3α-Διυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (33)	1β,2α,3α,24-Τετραδροξουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (39)
2α,3α-Διυδροξουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (34)	2α,3α,24-Τριυδροξουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (40)
β-Σιτοστερόλη (35)	2α,3α,24-Τριυδροξυλεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (41)
β-Σιτοστερόλη-β-D-γλυκοσίδη (36)	2α,3β,24-Τριυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (42)
Στιγμαστερόλη (37)	Προυνόλη (43)



32

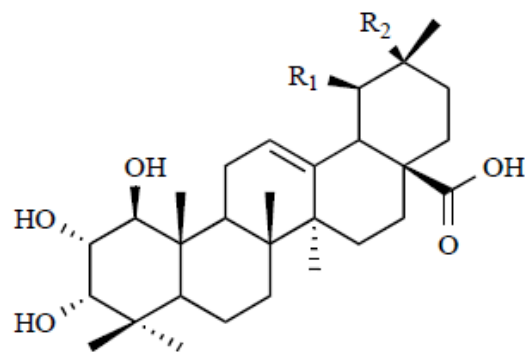
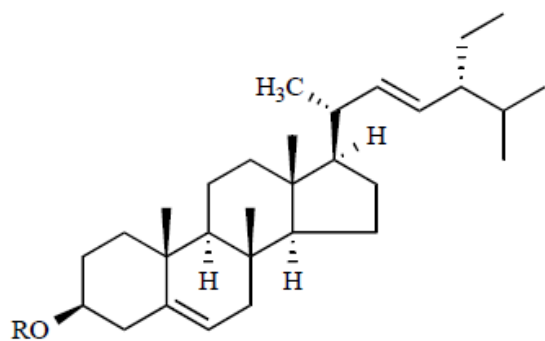


	R1	R2
33	α-OH	α-OH



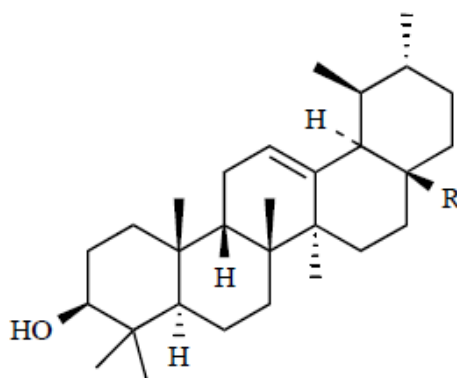
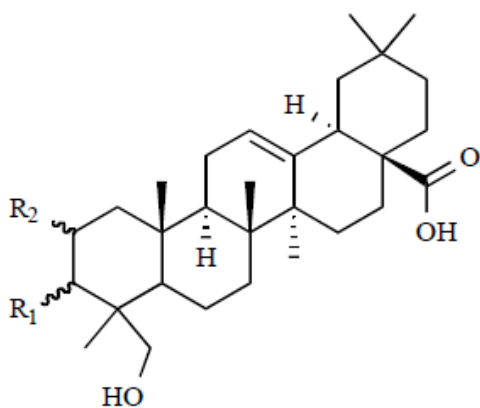
	R1	R2	R3	R4	R5
34	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
40	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>

	R
35	H
36	Glc



37 R = H

	R1	R2
38	H	CH <sub>3</sub>
39	CH <sub>3</sub>	H



43 R=COOH

	R1	R2
41	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH
42	$\alpha$ -OH	$\beta$ -OH

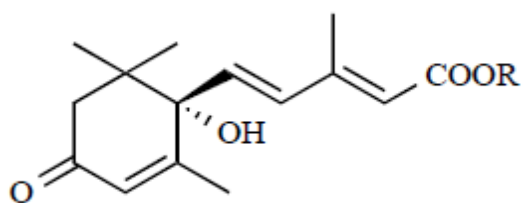
### A.4.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα υδροξυκινναμικά οξέα ανήκουν στα παράγωγα φαινυλοπροπανίου και έχουν 9 άτομα άνθρακα (βασικός σκελετός C6-C3). Βιοσυνθετικά προέρχονται από την οδό του σικιμικού οξέος και σχηματίζονται μέσω της L-φαινυλαλανίνης ή λιγότερο συχνά της L-τυροσίνης (Ibrahim R. & Barron D., 1989). Τα φαινολικά οξέα ανιχνεύονται σπάνια σε ελεύθερη μορφή, παρά μόνο όταν σχηματίζονται σαν παραπροϊόντα χημικής ή ενζυμικής υδρόλυσης κατά τη διάρκεια κατεργασίας του φυτικού υλικού. Συνήθως βρίσκονται με την μορφή εστέρων και σπανιότερα με την μορφή γλυκοσιδών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το χλωρογενικό οξύ, που είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος με το κινικό οξύ (Vickery M. L. & Vickery B., 1981). Επιπλέον, τα υδροξυκινναμικά οξέα μπορεί να είναι συνδεδεμένα με λιπίδια ή και με άλλες φαινολικές ουσίες (π.χ. με σαλικίνη) (Harborne J. B., 1994).

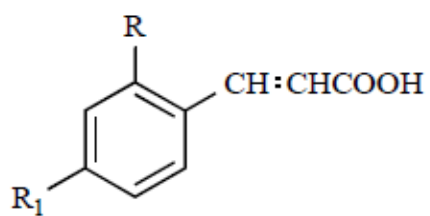
Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι ενώσεις από τις οποίες προέρχονται πολλές άλλες κατηγορίες φυσικών προϊόντων όπως κουμαρίνες, ακετοφαινόνες, φλαβονοειδή. Οι βιολογικές τους δράσεις είναι κυρίως αντιοξειδωτικές και αντιτροφικές (Harborne J. B., 1995). Επίσης παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καθώς αναστέλλουν την 5-λιποξυγενάση (Nishizawa M. et al., 1988), ενώ έχει βρεθεί ότι κάποια παράγωγα του καφεϊκού οξέος έχουν πιθανή αντισπασμωδική δράση αφού προκαλούν *in vivo* αναστολή των σπασμών που προκαλούνται σε πειραματόζωα με ηλεκτρικά μέσα (Capasso A. et al., 1997).

**Πίνακας 4:** Κατάταξη φαινολικών οξέων του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

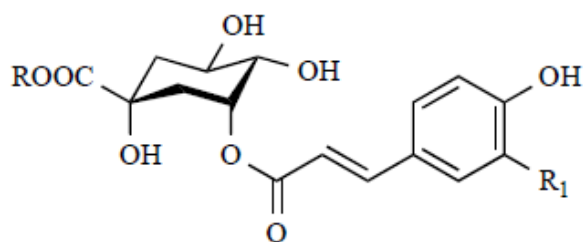
ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ
<i>cis, trans</i> (+) Αμπσκισικό οξύ (44)
p-Κουμαρικό οξύ (45)
Χλωρογενικό οξύ (46)
3,5-Διυδροξυ κινναμικό οξύ (47)
Φερουλικό οξύ (48)
Υδροξυμεθοξυ κινναμικό οξύ (49)
Σαλικυλικός μεθυλεστέρας (50)



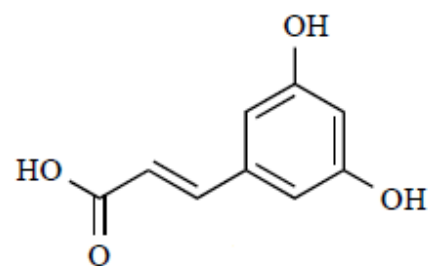
44 R = H



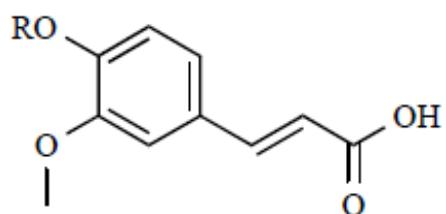
	R	R1
45	H	OH



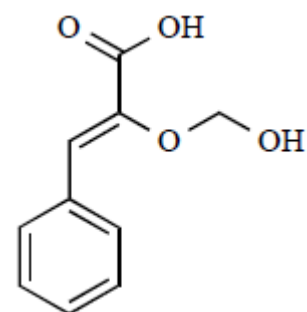
	R	R1
46	H	OH



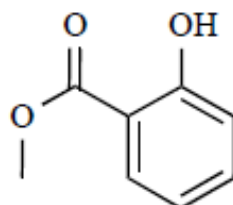
47



48 R = H



49



50

#### **A.4.4 ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ**

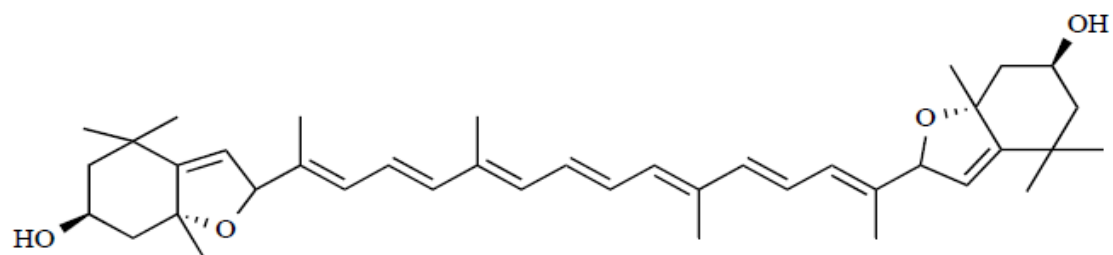
Τα καροτενοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών λιποδιαλυτών χρωστικών που συναντώνται κυρίως στα φυτά, τα φύκια και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια και διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στις διαδικασίες φωτοσύνθεσης. Τα καροτενοειδή είναι υπεύθυνα για πολλά από τα κόκκινα, πορτοκαλί και κίτρινα χρώματα των φύλλων των φυτών, φρούτων και λουλουδιών.

Τα καροτενοειδή ασκούν αντιοξειδωτική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό και ορισμένα από αυτά μετατρέπονται σε βιταμίνη Α και παίζουν ρόλο στην δραστηριότητα της βιταμίνης Α σε κάποιο επίπεδο. Τα καροτενοειδή που επηρεάζουν την δράση της βιταμίνης Α, είναι γνωστά ως "προβιταμίνη Α", με πιο κοινά να αποτελούν το β-καροτένιο και α-καροτένιο.

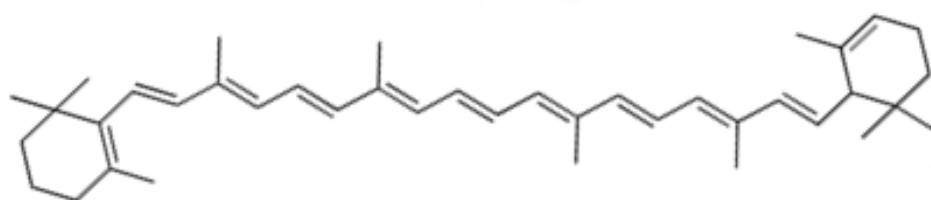
Υπάρχουν πολλές μελέτες που παρουσιάζουν ισχυρούς συσχετισμούς μεταξύ της ύπαρξης καροτενοειδών και της βελτίωσης του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης μερικών εκφυλιστικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καταρράκτης και ο εκφυλισμός της ωχράς κοιλίδας (Cooper, 2004; Krinsky & Johnson, 2005).

**Πίνακας 5:** Κατάταξη καροτενοειδών του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

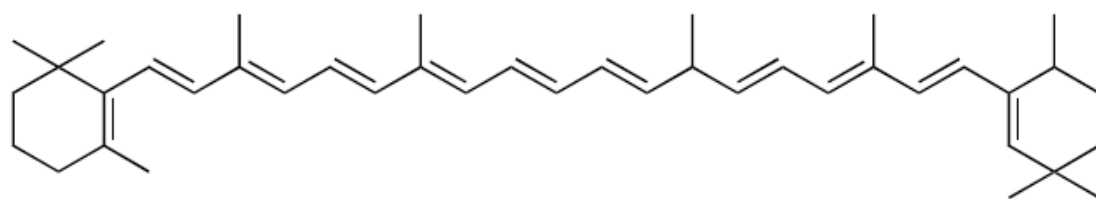
<b>ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ</b>	
<i>trans</i> -Χρυσοξανθίνη (51)	<i>neo</i> -β-Κρυπτοξανθίνη (59)
α-Καροτένιο (52)	Λουτεΐνη (60)
β-Καροτένιο (53)	<i>trans</i> -Λουτεΐνη (61)
9- <i>cis</i> -β-Καροτένιο (54)	<i>trans</i> -Μουτατοξανθίνη (62)
13- <i>cis</i> -β-Καροτένιο (55)	Περσικαξανθίνη (63)
<i>trans</i> -β-Καροτένιο (56)	Βιολαξανθίνη (64)
Κρυπτοξανθίνη (57)	Ζεαξανθίνη (65)
<i>trans</i> -β-Κρυπτοξανθίνη (58)	<i>trans</i> -Ζεαξανθίνη (66)



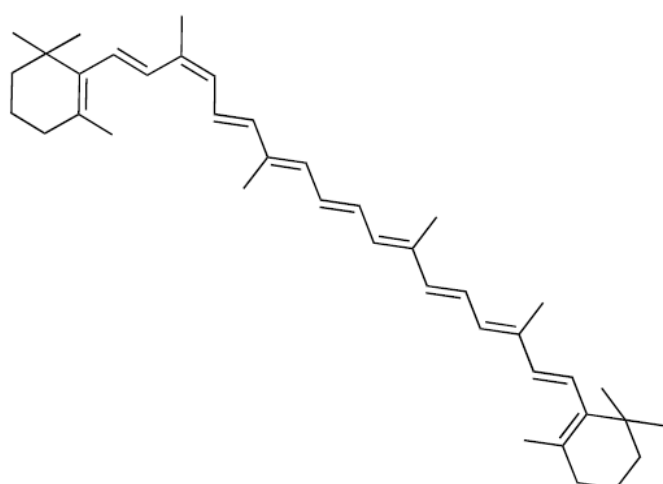
51



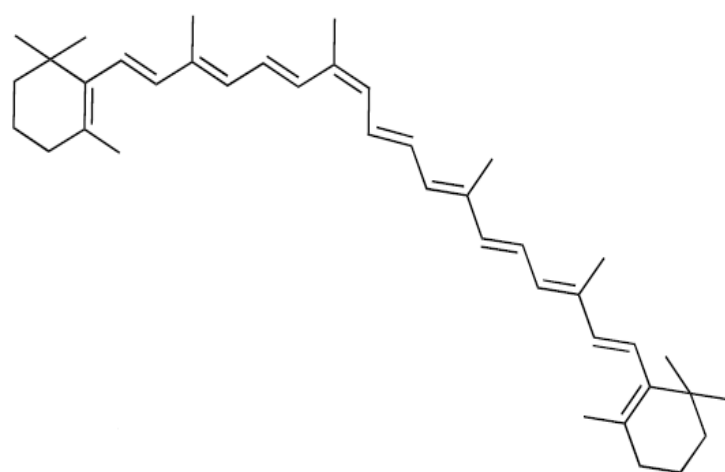
52



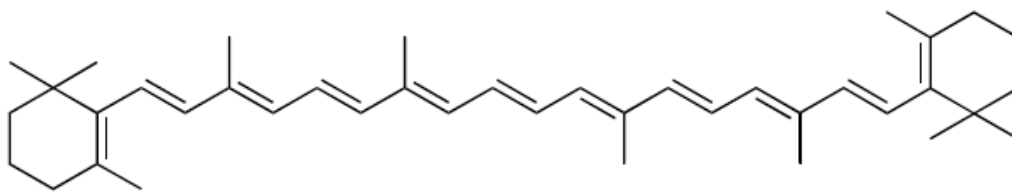
53



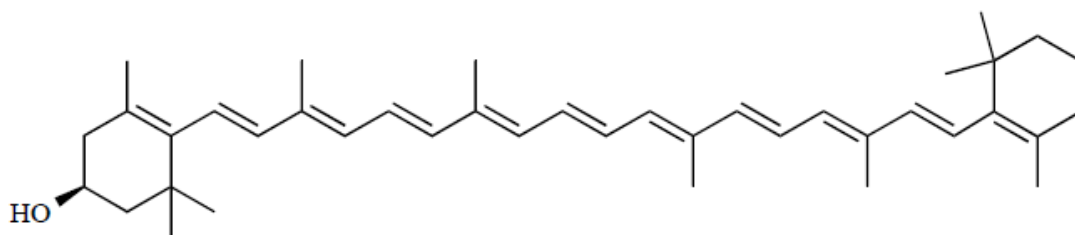
54



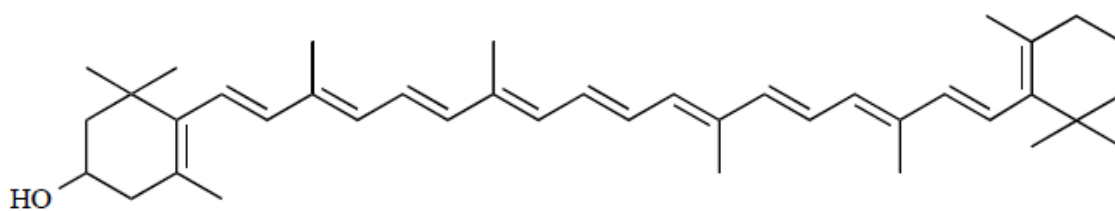
55



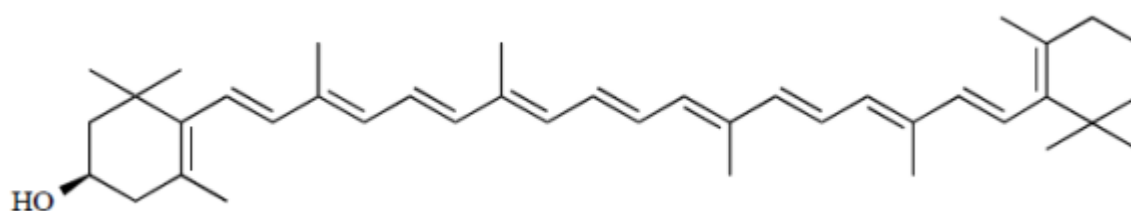
56



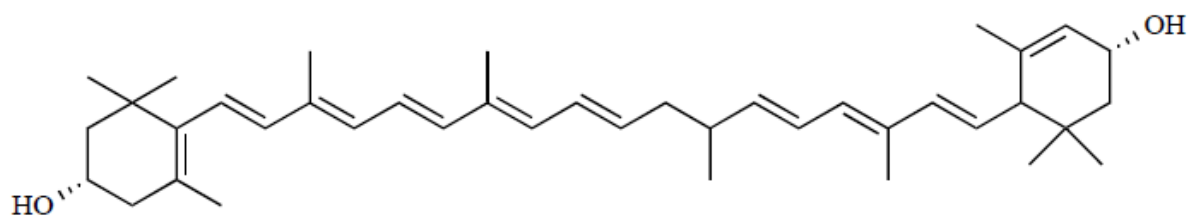
57



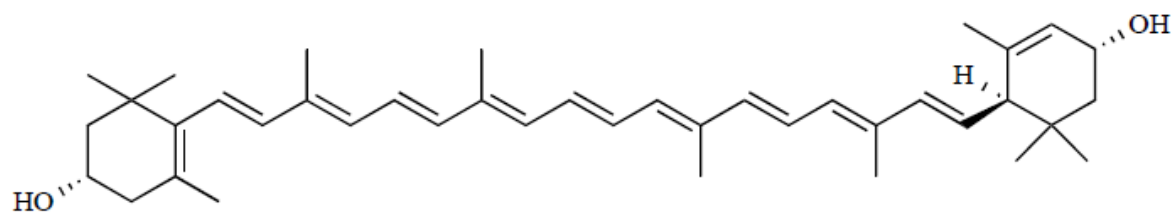
58



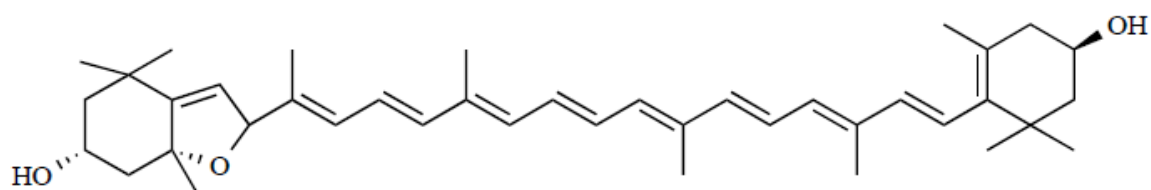
59



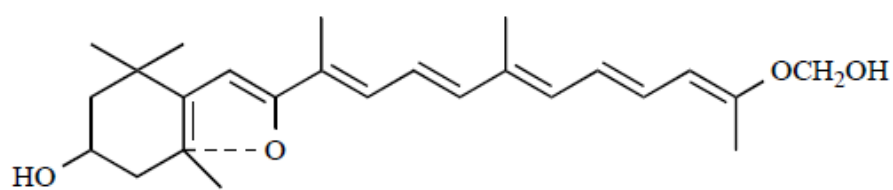
60



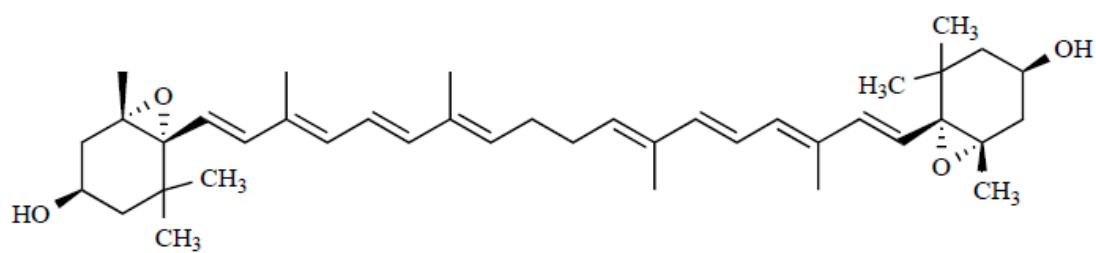
61



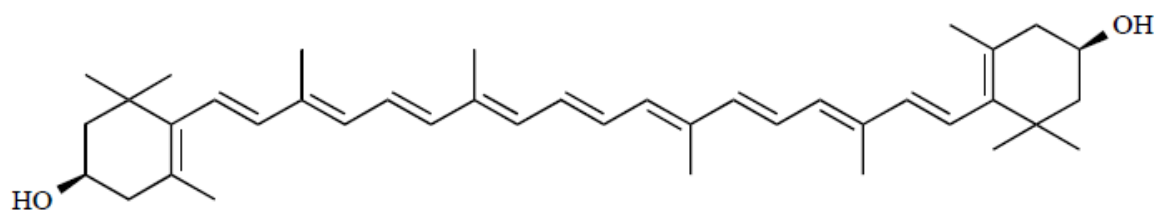
62



63

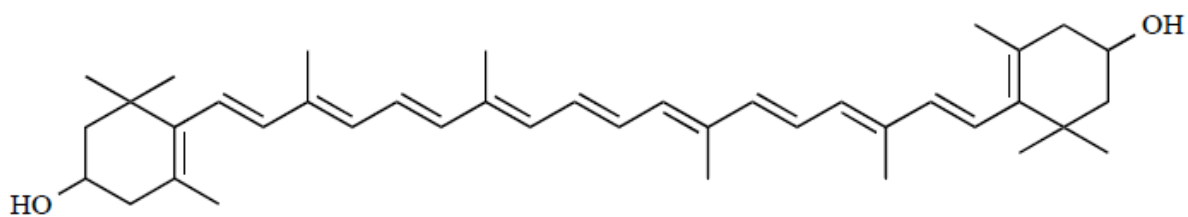


64



65





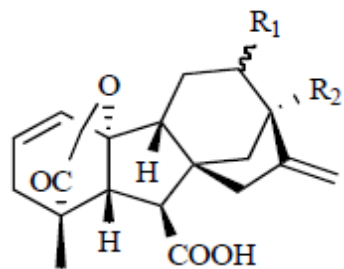
66

#### A.4.5 ΓΙΒΒΕΡΙΛΙΝΕΣ

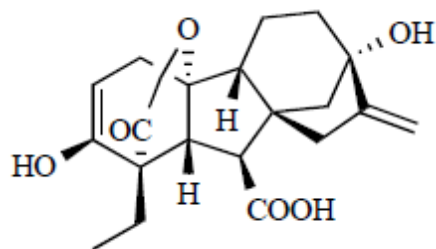
Οι γιββεριλλίνες (GAs) είναι μια ομάδα διτερπενικών οξέων που λειτουργούν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών και επηρεάζουν μια σειρά από αναπτυξιακές διαδικασίες στα ανώτερα φυτά, συμπεριλαμβανομένων της επιμήκυνσης στελέχους, τη βλάστηση, το λήθαργο, την ανθοφορία, την έκφραση φύλλου, την έκθεση των φύλλων, την ενζυμική επαγωγή και τη γήρανση φρούτων (Poonam et al., 2011).

**Πίνακας 6:** Κατάταξη γιββεριλλινών του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

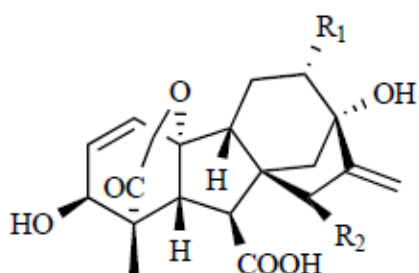
ΓΙΒΒΕΡΙΛΙΝΕΣ	
Γιββεριλλίνη A3 (67)	Γιββεριλλίνη GA86 (78)
Γιββεριλλίνη A5 (68)	Γιββεριλλίνη GA87 (79)
Γιββεριλλίνη A9 (69)	Γιββεριλλίνη GA95 (80)
Γιββεριλλίνη A17 (70)	Γιββεριλλίνη GA97 (81)
Γιββεριλλίνη A19 (71)	Γιββεριλλίνη GA118 (82)
Γιββεριλλίνη A30 (72)	Γιββεριλλίνη GA119 (83)
Γιββεριλλίνη A32 (73)	Γιββεριλλίνη GA120 (84)
Γιββεριλλίνη A32 ακετονίδιο (74)	Γιββεριλλίνη GA121 (85)
Γιββεριλλίνη A44 (75)	Γιββεριλλίνη GA122 (86)
Γιββεριλλίνη A61 (76)	Γιββεριλλίνη GA123 (87)
Γιββεριλλίνη A63 (77)	



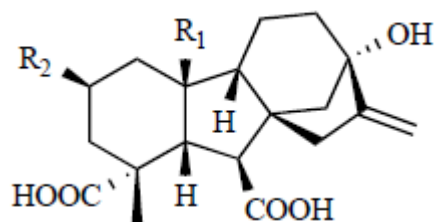
	R1	R2
67	H	H
73	OH	OH
79	OH	H



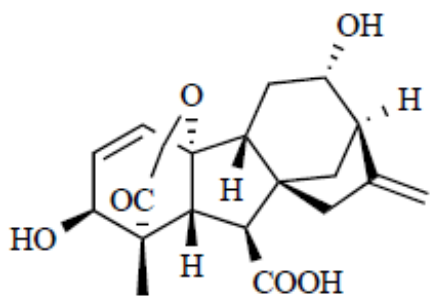
68



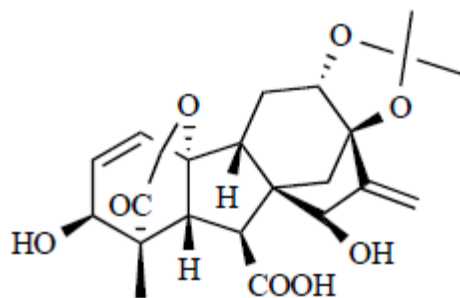
	R1	R2
69	H	H



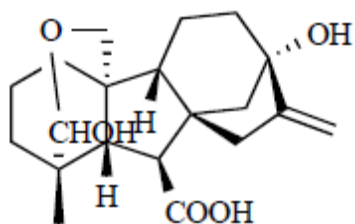
	R1	R2
70	COOH	H
71	CHO	H
81	CH3	OH



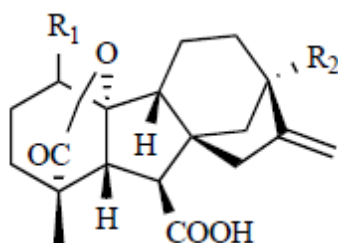
72



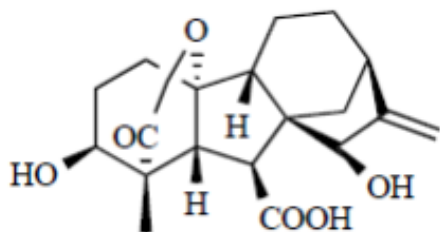
74



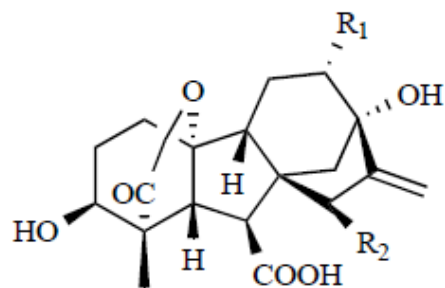
75



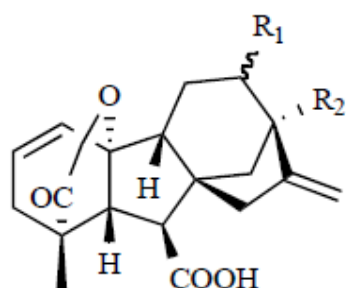
	R1	R2
76	$\beta$ -OH	H
82	$\alpha$ -OH	OH
83	$\alpha$ -OH	H



77



	R1	R2
78	OH	OH



	R1	R2
80	H	OH
84	H	H
85	$\alpha$ -OH	H
86	$\beta$ -OH	H
87	$\alpha$ -OH	OH

#### A.4.6 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

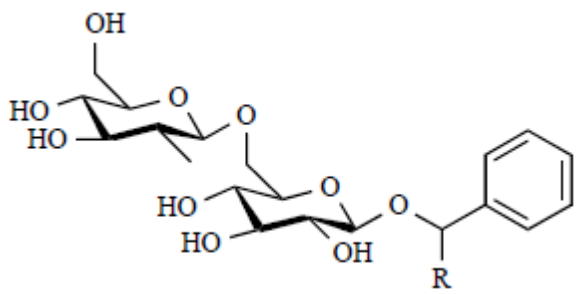
Τα σπέρματα του ροδάκινου περιέχουν σχεδόν 50% κ.β. έλαια. Τα κύρια λιπαρά οξέα (FA) που βρίσκονται στο έλαιο του σπέρματος του ροδάκινου είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό 58%, το λινολεϊκό οξύ με 32% και το παλμιτικό οξύ με 8% (Kamel *et al.*, 1992). Το λινολεϊκό οξύ είναι ένα παράδειγμα των βασικών λιπαρών οξέων που είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο μεταβολισμό και δεν μπορούν να συντεθούν από το ανθρώπινο σώμα. Πρωταρχικά λιπαρά οξέα εμπλέκονται στο σχηματισμό των υγιών κυτταρικών μεμβρανών, τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφαλικού και νευρικού συστήματος και την παραγωγή ουσιών τύπου ορμονών, που ονομάζονται εικοσανοειδή. Αυτές οι ουσίες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και του ιξώδους, την αγγειοσυστολή και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Sánchez-Vicente *et al.*, 2009).

Εκτός από την περιεκτικότητα σε έλαια και τη σύνθεση λιπαρών οξέων, τα σπορέλαια είναι συχνά άριστες πηγές δραστικών ενώσεων βιταμίνης E, όπως τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες και η πλαστοχρωμανόλη-8. Οι δραστικές ενώσεις της βιταμίνης E δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά ενάντια στην οξειδωτική υποβάθμιση του ελαίου, αλλά επίσης και ως βιταμίνη E στην ανθρώπινη διατροφή (Timmermann, 1990; Sies και Murphy, 1991; Nagaoka *et al.*, 1992). Είναι σε θέση να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών

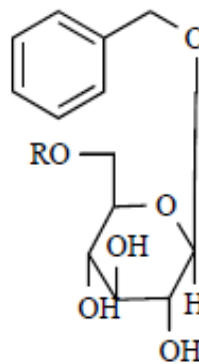
παθήσεων και καρκίνου και να καθυστερήσουν την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Léger, 2000).

**Πίνακας 8:** Κατάταξη διαφόρων ενώσεων του είδους *Prunus persica* (Poonam et al., 2011)

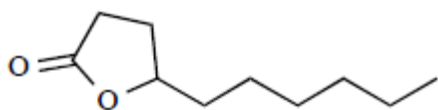
<b>ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b>			
Οξικό οξύ	(2E,6Z)-3,7-Διμεθυλ-2,6-οκταδιεν-1,8-διόλη (99)	(E)-2 Εξεν-1-όλη	Λιναλοόλη (112)
Αμυγδαλίνη (92)	2,7-Διμεθυλ-2E,4E-οκταδιενεδιοϊκό οξύ (100)	trans-2-Εξενάλη	(Z)-οξείδιο λιναλοόλης, πυρανοϊδικό (113)
Βενζαλδεΰδη	γ-Δοδεκαλακτόνη (101)	trans-3-Εξεν-1-όλη	(E)-οξείδιο λιναλοόλης, πυρανοϊδικό (114)
Βενζοϊκό οξύ	Δοδεκανοϊκό οξύ	Εξανοϊκό οξύ	d1-Μανδελικό οξύ (115)
Βενζυλική αλκοόλη	Δομεστικοσίδη (102)	4-Υδροξυακετοφαινόνη	Αμυγδαλιτικό οξύ (116)
Βενζυλ-β-γεντιοβιοσίδη (93)	1-Δοτριάκοντανόλη	3-Υδροξυ-2-βουτανόνη	Μανδελικό οξύ β-D-γλυκοσίδη (117)
Βουτανοϊκό οξύ	Εξαδεκανοϊκός αιθυλεστέρας	3-Υδροξυ-β-δαμασκόνη (105)	γ-Οκταλακτόνη (118)
Κινναμυλ-αλκοόλη	Ευγενόλη (103)	4-Υδροξυ-β-δαμασκόνη (106)	Περσικασίδη (119)
Κυκλοδοδεκύνη	Γερανιόλη (104)	3-Υδροξυ-7,8-διυδρο-β-ιονόλη (107)	Σκουαλένιο (120)
γ-Δεκαλακτόνη (94)	Εικοσιενάνιο	3-Υδροξυ-7,8-διυδρο-β-ιονόνη (108)	α-Τερπινεόλη (121)
Διυδροβομιφολιόλη (95)	Τριακονταενάνιο	3-Υδροξυ-5,6-επόξυ-β-ιονόνη (109)	Τυροσόλη (122)
(6S)-Διυδροβομιφολιόλη (96)	Τριακονταενόλη	3-Υδροξυ-β-ιονόλη (110)	α-Τοκοφερόλη (123)
1,2-Διυδρο-1,1,6-τριμεθυλναφθαλένιο (97)	Εξαδεκανοϊκό οξύ	3-Υδροξυ-β-ιονόνη (111)	Προυνασίνη (124)
2,6-Διμεθυλ-1,8-οκτανεδιόλη (98)	Εξανόλη	4-(4-Υδροξυφαινυλ)-2-βουτανόνη	Μαρμελολακτόνη I (125)
Ολεϊκό οξύ	Λινολεϊκό οξύ	Σορβιτόλη	Μαρμελολακτόνη II (126)



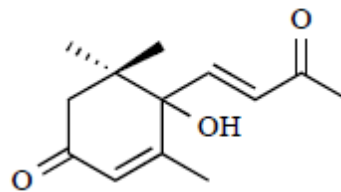
92 R =CN



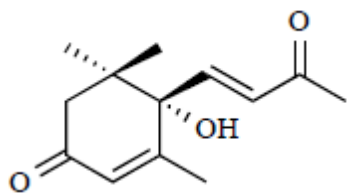
93 R= $\beta$ -D-glc



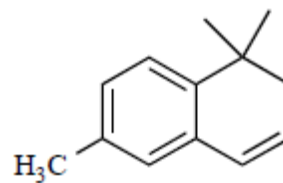
94



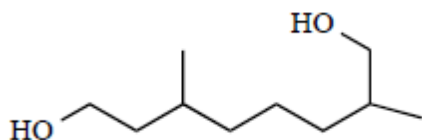
95



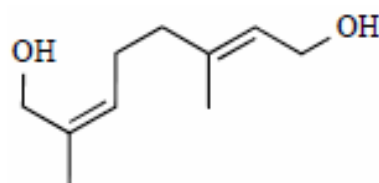
96



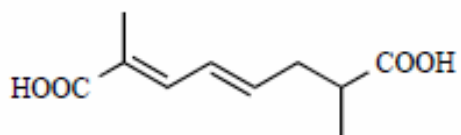
97



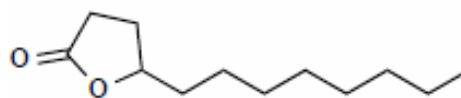
98



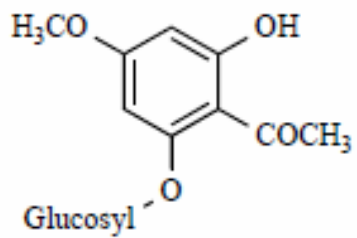
99



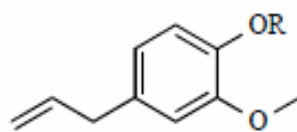
100



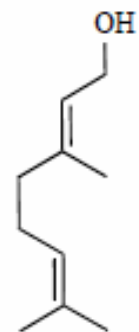
101



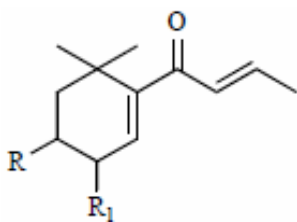
102



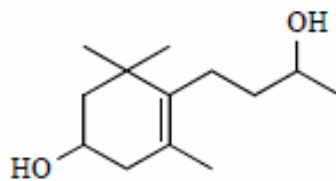
103 R = H



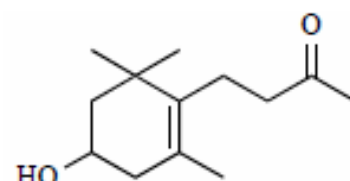
104



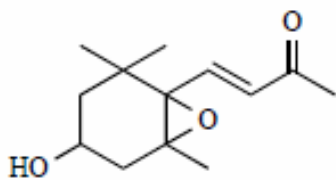
	R	R1
105	OH	H
106	H	OH



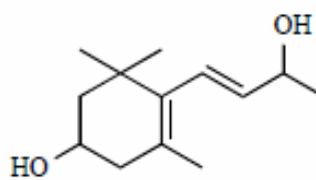
107



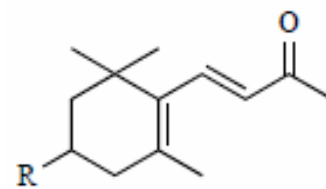
108



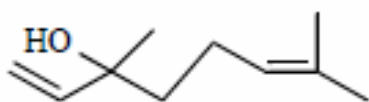
109



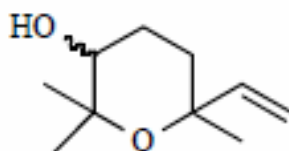
110



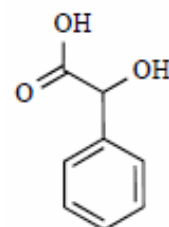
111 R = OH



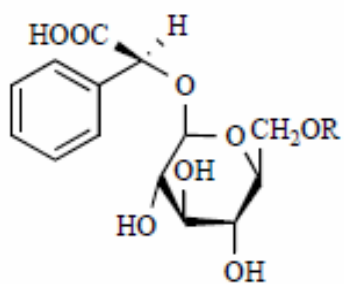
112



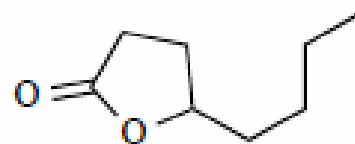
113/114



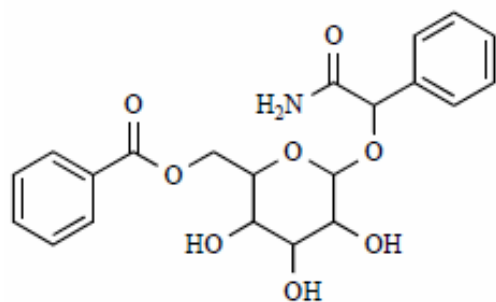
115



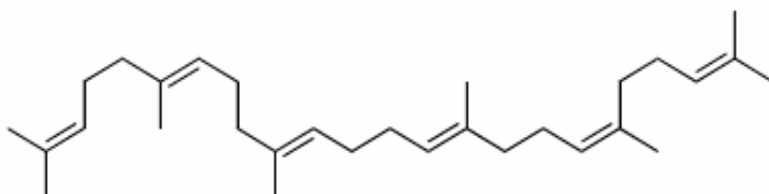
	<b>R</b>
<b>116</b>	$\beta$ -D-glucopyranosyl
<b>117</b>	H



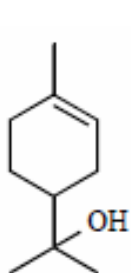
118



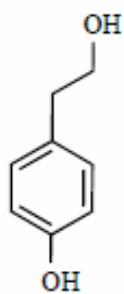
119



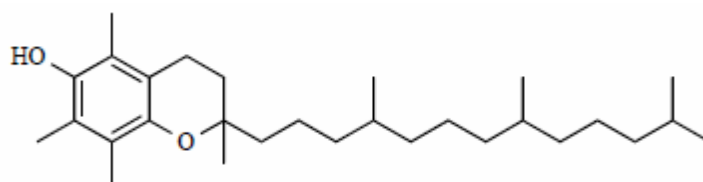
120



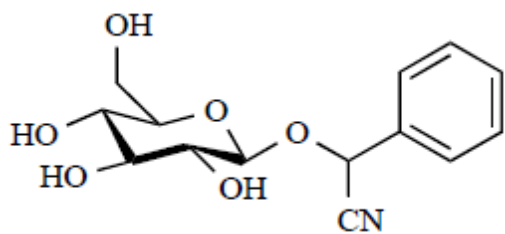
121



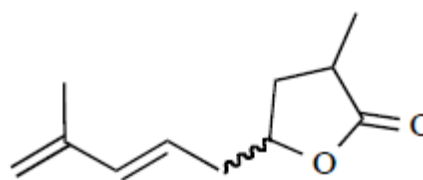
122



123



124



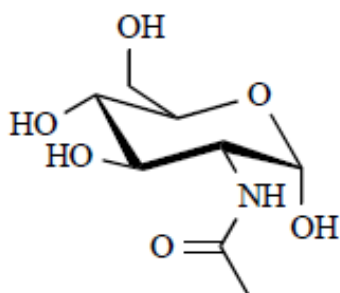
125/126

### A.4.7 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

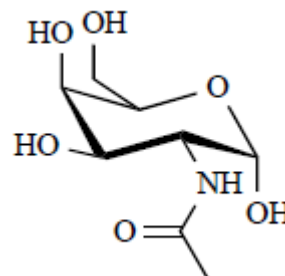
Οι υδατάνθρακες είναι τα πιο άφθονα βιολογικά μόρια και παίζουν πολλούς βασικούς ρόλους στους ζωντανούς οργανισμούς, όπως η αποθήκευση και η μεταφορά της ενέργειας (άμυλο, γλυκογόνο) και των δομικών στοιχείων (κυτταρίνη στα φυτά, χιτίνη στα ζώα). Επιπλέον, οι υδατάνθρακες και τα παράγωγά τους παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τη γονιμότητα, την παθογένεια, την πήξη του αίματος και την ανάπτυξη (Poonam et al., 2011).

**Πίνακας 7:** Κατάταξη υδατανθράκων του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	
<i>N</i> -ακετυλγλυκοζαμίνη (88)	6-Ο-(β-D-Γλυκουρονοπυρανοσυλ)-D-γαλακτόζη (90)
<i>N</i> -ακετυλγαλακτοζαμίνη (89)	Ινοσιτόλη
Αραβινόζη	6-Ο-(4-Ο-Μεθυλ-β-D-γλυκουρονο-πυρανοσυλ)-D-γαλακτόζη (91)
L-Αραβινόζη	L-Ραμνόζη
Φρουκτόζη	Σουκρόζη
D-Γαλακτόζη	D-Ξυλόζη
Γλυκόζη	

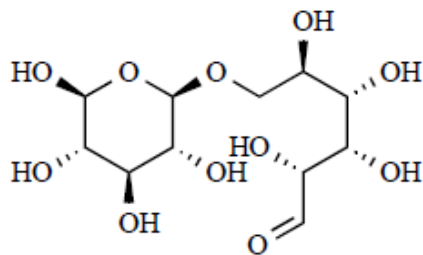


88

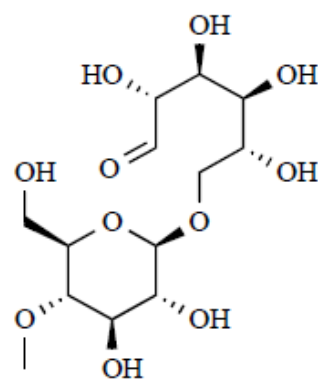


89





90



91

## A.5 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PRUNUS*

Αρκετά είδη *Prunus* είναι ευρέως διαδεδομένα λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους και βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην ιατρική (Chopra et al., 1956). Τα φύλλα και τα άνθη του *P. spinosa* θεωρούνται λιθοτριπτικά και διουρητικά και συμπεριλαμβάνονται στη διατροφή ανθρώπων που υποφέρουν από πεπτικό έλκος (Makarov, 1972). Στελέχη των *P. avium* και *P. cerasus* είναι χρήσιμα στη θεραπεία ορισμένων καρδιακών παθήσεων (Karlik, 1962). Ο καρπός του *P. salicina* χορηγείται για την αντιμετώπιση της αρθρίτιδας (Willis, 1969).

Το υδατικό εκχύλισμα από μικρά κλαδιά του *P. cerasoides* χορηγείται εσωτερικά για την πρόληψη της αποβολής εμβρύου (Kirtkar et al., 1975). Η έγχυση των φύλλων και του φλοιού του, χορηγείται για την αντιμετώπιση κοκκύτη, άσθματος, δυσπεψίας και διάρροιας. Τα φύλλα και τα άνθη του φυτού χρησιμοποιούνται επίσης για την αντιμετώπιση της πέτρας στα νεφρά και της ψαμμίασης (Kirtkar et al., 1975; Chopra et al., 1956). Το *P. cerasoides* θεωρείται εύπεπτο και γι' αυτό χορηγείται στη διατροφή για την αντιμετώπιση του έλκους, ενώ η καρδιά του ξύλου χρησιμοποιείται σε όσους πάσχουν από αίσθημα καύσου (*pitta*), και για την αντιμετώπιση διαστρέμματος και τον αποχρωματισμό του δέρματος (Vaidyaratnam et al., 1995).

## A.6 ΛΑΪΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΟΥ *PRUNUS PERSICA*

Το είδος *Prunus persica* (L.) Batsch, χρησιμοποιείται από τη φυλή Amaharas στην περιοχή της Αιθιοπίας στην Αφρική ως θεραπευτικό φυτό. Συγκεκριμένα, το σπέρμα του δέντρου χρησιμοποιείται per os κατά της μαλάριας σε συνδυασμό με τα φύλλα της *Otostegia integrifolia* και του *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*, το σπέρμα του *Schinus molle* και τον καρπό του *Capsicum annuum* (Giday et al., 2007).

Στο Πακιστάν, το είδος *Prunus persica* (L.) Batsch, γνωστό με την ονομασία Aru, χρησιμοποιείται για τις θεραπευτικές ιδιότητες των φύλλων του σε πληγές και εγκαύματα. Πιο συγκεκριμένα, τα φρέσκα φύλλα συνθλίβονται και εφαρμόζονται απευθείας στην πληγή. Τα φύλλα χρησιμοποιούνται επίσης και στους λεκέδες του δέρματος που εμφανίζονται σε παλάμες και πόδια (Abbasi et al., 2010). Επιπλέον, το έλαιο από το σπέρμα

του ροδάκινου (persic oil), βρίσκει ποικίλες εφαρμογές καθώς περιέχει φυτοχημικές ουσίες, όπως η β-σιτοστερόλη και το σκουαλένιο (*Bhattacharjee, 2000*).

Επιπρόσθετα, η παρουσία στα φύλλα του ροδάκινου, δύο συστατικών με χολινομιμητική και ανταγωνιστική δράση του ασβεστίου, είναι πιθανόν να ευθύνονται για τις καθαρτικές ιδιότητές του, όπως αναφέρεται και στην παραδοσιακή ιατρική (*Gilani et al., 2000*).

Τα *Prunus persica* (L.) Batsch και *Prunus armeniaca* Linn. (Rosaceae) – γνωστά στην Ινδία ως aaru και khurmani αντίστοιχα, χρησιμοποιούνται από τις φυλές Kumaon και Garhwal για το λάδι που παραλαμβάνεται κατόπιν σύνθλιψης του σπέρματος του καρπού και χρησιμοποιείται τόσο ως βρώσιμο έλαιο όσο και για την αντιμετώπιση της κεφαλαλγίας και δερματικών παθήσεων (*Shah, 1982*).

Στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική, στο σπόρο του είδους *Prunus persica* (L.) Batsch αποδίδονται αντιπηκτικές ιδιότητες (*Wang et al., 2006*). Στην Υεμένη, τα φύλλα του ροδάκινου (firsik) βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία κατά της ακμής (*Fleurentina et al., 1982*).

Οι σπόροι του *Prunus persica* (L.) Batsch, χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική στην Κίνα, την Ιαπωνία και άλλες ασιατικές χώρες ως συστατικά σε μια ποικιλία συνταγών Κάμπο (κινεζική ιατρική) για τη θεραπεία ασθενειών που πλήττουν τις γυναίκες.

## **A.7 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PRUNUS***

Το γένος *Prunus* ανήκει στην οικογένεια Rosaceae και την υποοικογένεια Pruneeae και αποτελείται από περίπου 430 είδη (κατανέμεται ανάμεσα σε πέντε υπογένη και συγκεκριμένα στα *Padus*, *Amygdalis*, *Cerasus*, *Prunophora* και *Laurocerasus*). Περιλαμβάνει φυλλοβόλα, αειθαλή δέντρα και θάμνους που απαντώνται κυρίως στις εύκρατες περιοχές του Βόρειου ημισφαιρίου (*Willis, 1969*). Περίπου δεκαεννέα είδη *Prunus* φύονται στην Ινδία στις περιοχές των Ιμαλαΐων (*Willis, 1969*), η πλειοψηφία των οποίων έχουν μεγάλη σημασία στην κηπευτική. Πολλά από αυτά καλλιεργούνται για τους εδώδιμους σπόρους και καρπούς τους, ιδιαίτερα τα *P. amygdalus* (αμύγδαλα), *P. domestica* (δαμάσκηνα), *P. persica* (ροδάκινα), *P. cerasus* (κεράσια) και *P. armeniaca* (βερίκοκα). Ένας μεγάλος αριθμός από αυτά τα είδη είναι επίσης αξιόλογα ως διακοσμητικά λόγω των ανθέων τους.

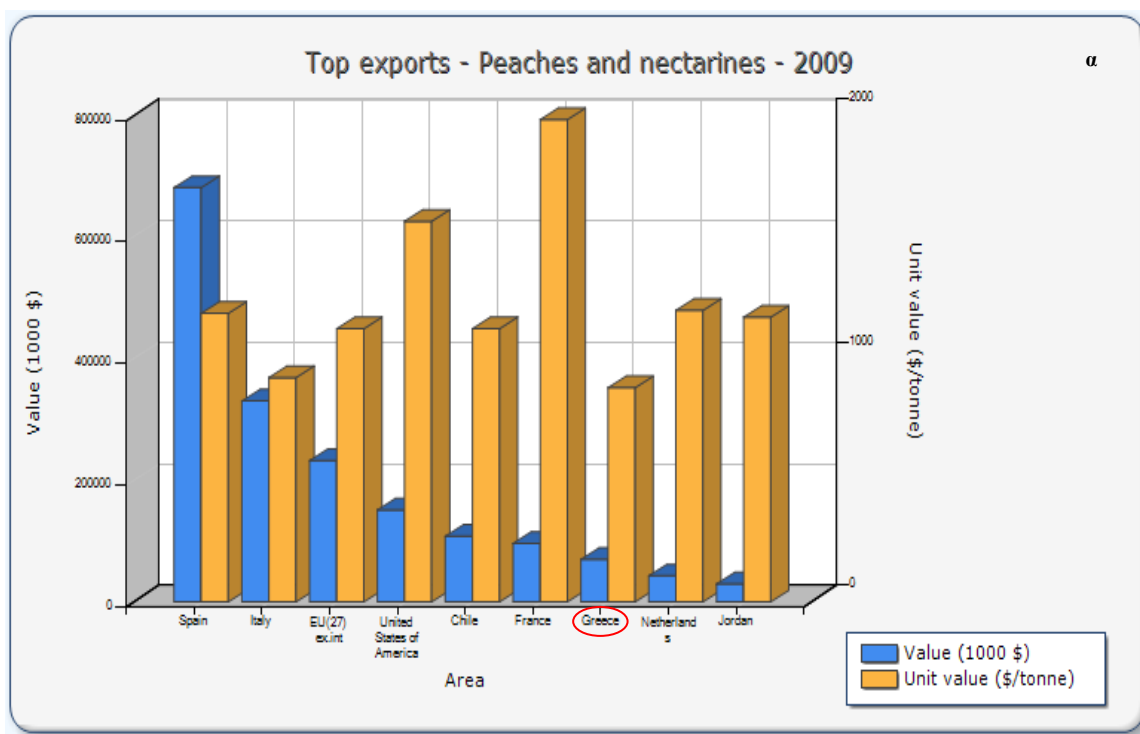
Τα ξύλα πολλών ειδών *Prunus* χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς. Συγκεκριμένα, το ξύλο του *P. avium* χρησιμοποιείται στην κατασκευή επίπλων υψηλής ποιότητας, το ξύλο του *P. puddum* χρησιμοποιείται για την κατασκευή μαστουριών και βάσεων ομπρέλας, η καρδιά του ξύλου του *P. domestica* βρίσκει χρήση στα γραφεία εργασίας και τα ψηφιδωτά, ενώ του *P. amygdalus* σε μηχανουργεία και μαρκετερί. Επιπλέον, οι καρδιές των ξύλων ορισμένων ειδών, όπως των *P. puddum* και *P. persica* είναι αρκετά σκληρές και χρησιμοποιούνται στην κατασκευή κτιρίων καθώς είναι ανθεκτικά στους μύκητες και επεξεργάζονται με ευκολότερο τρόπο (*Poonam et al., 2011*).

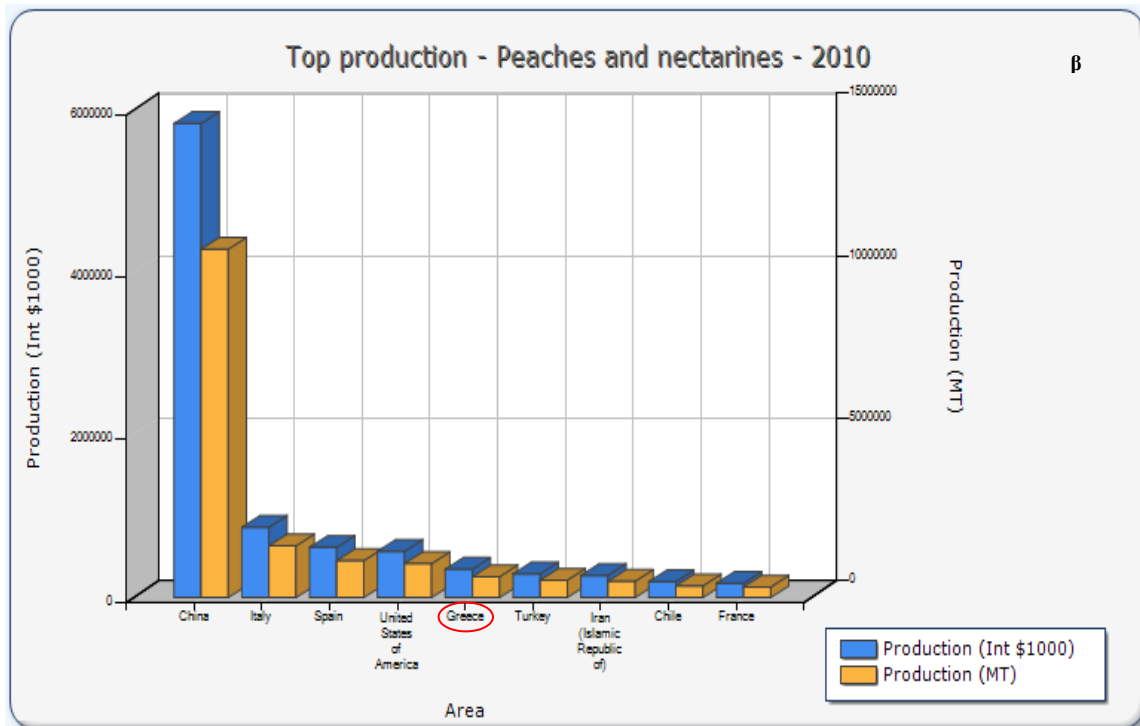
## A.8 ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΑΞΙΑ ΡΟΔΑΚΙΝΟΥ ΣΤΗ ΧΩΡΑ ΜΑΣ

Τα ελληνικά αγροκτήματα καλλιέργειας ροδάκινου, είναι συνήθως τεσσάρων ή πέντε εκταρίων, πολύ μικρότερα από το μέσο μέγεθος στην ΕΕ και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Αν και δεν υπάρχουν επίσημα στατιστικά στοιχεία, τα ροδάκινα καλλιεργούνται σε περίπου 23.900 εκτάρια σε έξι περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας. Υπάρχουν περίπου 17 μεταποιητικές μονάδες ροδάκινων στην Ελλάδα, σε σύγκριση με τέσσερις που υπάρχουν στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι περισσότεροι Έλληνες επεξεργαστές ροδάκινου βρίσκονται στην Κεντρική Μακεδονία και ιδιαίτερα στις περιοχές της Πέλλας και της Ημαθίας.

Η ελληνική βιομηχανία κονσερβοποίησης ροδάκινου στηρίζεται στην εγχώρια παραγωγή νωπών ροδάκινων για την παροχή της πρώτης ύλης. Από τους 280.000 τόνους ροδάκινων που συγκομίζονται και αγοράζονται από τους επεξεργαστές, 160.000 τόνοι παρέχονται στη βιομηχανία για κονσερβοποίηση, 80.000 τόνοι είναι σε μορφή πουρέ (για χυμοποίηση), 20.000 τόνοι κομμένοι σε κύβους (για μίγματα) και 20.000 τόνοι παραμένουν κατεψυγμένοι.

Η Ελλάδα είναι ο μεγαλύτερος εξαγωγέας των κονσερβοποιημένων ροδάκινων στον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το ένα τρίτο των εν λόγω παγκόσμιων εξαγωγών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ότι η Ελλάδα είναι ο τρίτος σε σειρά μεγαλύτερος εξαγωγέας αυτού του προϊόντος προς τις Ηνωμένες Πολιτείες.





**Πίνακας 9:** α) Χώρες εξαγωγής ροδάκινου παγκοσμίως για το 2009 και β) Χώρες παραγωγής ροδάκινου παγκοσμίως για το 2010 (Πηγή: FAO, <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>)

Δυστυχώς το μερίδιο αγοράς της χώρας μας από τις εισαγωγές ροδάκινου στις ΗΠΑ μειώθηκε από 24% σε 9% στο διάστημα 2006 - 2008, λόγω της ραγδαίας αύξησης του όγκου των εισαγωγών από την Κίνα. Ωστόσο, οι Ηνωμένες Πολιτείες αποτελούν ένα μικρό εμπορικό εταίρο για την Ελλάδα, εκπροσωπώντας μόλις το 0,34% των ελληνικών εξαγωγών κονσερβοποιημένων ροδάκινων. Η πλειοψηφία του 75% των ροδάκινων πηγαίνουν σε άλλες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ο πίνακας 10 παρουσιάζει στοιχεία για τις ελληνικές εξαγωγές κονσερβοποιημένων ροδάκινων, κατά τη διάρκεια του 2007 και το 2008, ενώ ο πίνακας 12 δείχνει τα στοιχεία εξαγωγών για το πρώτο εξάμηνο του 2009 (Barmore et al., 2010).

**Πίνακας 10:** Στατιστικά στοιχεία για τις ετήσιες εξαγωγές κονσερβοποιημένων ροδάκινων για την Ελλάδα για τα έτη 2007/2008

<b>Ετήσιες εξαγωγές κονσερβοποιημένων ροδάκινων για την Ελλάδα</b>				
<b>Χώρες Εξαγωγής</b>	<b>2007</b>		<b>2008</b>	
	<b>USD</b>	<b>Ποσότητα (MT)</b>	<b>USD</b>	<b>Ποσότητα (MT)</b>
Γερμανία	83,591,460	74,775	88,401,964	69,479
Ηνωμένο Βασίλειο	35,751,285	22,669	31,519,754	20,017
Ιταλία	20,666,640	20,796	27,018,948	21,972
Γαλλία	14,876,055	13,273	23,776,329	20,016
Ρωσία	18,876,582	17,539	18,289,730	13,468
Πολωνία	16,973,015	20,481	16,418,948	17,378
Αυστρία	10,549,359	9,128	15,006,929	11,541
Ταϊλάνδη	16,749,175	18,678	9,712,928	9,054

Ουγγαρία	7,302,241	8,522	8,881,611	10,065
Ολλανδία	8,574,662	8,345	8,583,119	7,158
Η.Π.Α.	6,923,404	7,856	1,132,315	1,352
<b>World</b>	<b>317,760,111</b>	<b>297,407</b>	<b>330,817,443</b>	<b>274,692</b>

Πηγή: Άτλας Παγκόσμιου Εμπορίου

Πίνακας 11: Στατιστικά στοιχεία παραγωγής, αποθεμάτων και ζήτησης κονσερβοποιημένων ροδάκινων για τα έτη 2008/2009, 2009/2010 και 2010/2011

<b>Ελλάδα: Παραγωγή, Αποθέματα και Ζήτηση Κονσερβοποιημένων Ροδάκινων</b>			
	2008/2009	2009/2010 (εκτίμηση)	2010/2011 (πρόβλεψη)
<b>Παράδοση σε μεταποιητές</b>	250,000	170,000	150,000
<b>Αρχικά Αποθέματα</b>	62,800	81,600	92,000
<b>Παραγωγή</b>	275,000	216,750	191,250
<b>Εισαγωγές</b>	700	700	700
<b>Συνολικές Προμήθειες</b>	338,500	299,050	283,950
<b>Εξαγωγές</b>	246,400	197,050	190,000
<b>Οικιακή Κατανάλωση</b>	10,500	10,000	10,000
<b>Τελικά Αποθέματα</b>	81,600	92,000	83,950
<b>Συνολική Διανομή (MT)</b>	338,500	299,050	283,950

Figures are unofficial Post estimates

Πίνακας 12: Στατιστικά στοιχεία εξαγωγών 1<sup>ου</sup> εξαμήνου κονσερβοποιημένων ροδάκινων για την Ελλάδα για τα έτη 2008/2009

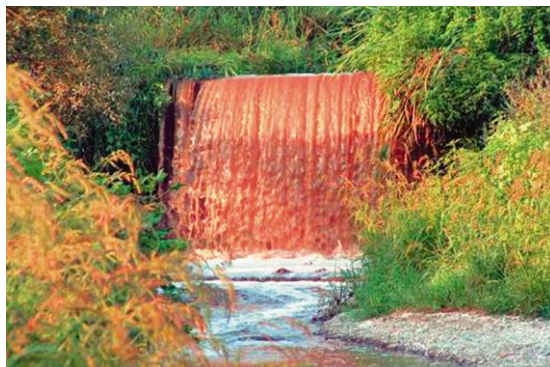
<b>Εξαγωγές κονσερβοποιημένων ροδάκινων 1<sup>ου</sup> εξαμήνου για την Ελλάδα</b>				
Χώρες εξαγωγής	1 <sup>ο</sup> εξάμηνο 2008		1 <sup>ο</sup> εξάμηνο 2009	
	USD	Ποσότητα (MT)	USD	Ποσότητα (MT)
Γερμανία	46,812,552	35,596	42,161,797	32,942
Ηνωμένο Βασίλειο	16,205,700	10,150	13,286,019	8,443
Γαλλία	10,600,684	8,494	11,651,723	11,709
Ιταλία	11,872,403	10,230	8,390,072	7,562
Αυστρία	8,008,808	5,998	6,881,813	5,857
Πολωνία	7,649,931	7,711	5,479,987	6,577
Ολλανδία	3,393,199	2,849	4,834,447	3,800
Ρωσία	13,551,316	8,826	4,670,271	4,879
Ουγγαρία	5,127,242	5,729	2,869,890	3,473
Σαουδική Αραβία	3,711,289	2,490	2,578,587	2,675
Η.Π.Α.	92,901	123	1,019,605	1,161
<b>World</b>	<b>175,090,179</b>	<b>140,150</b>	<b>129,532,731</b>	<b>113,789</b>

Πηγή: Άτλας Παγκόσμιου Εμπορίου

## Α.9 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Στη χώρα μας, κατά την επεξεργασία του ροδάκινου προκύπτουν παραπροϊόντα, τα οποία θεωρούνται απόβλητα και έως σήμερα απορρίπτονται στο περιβάλλον με συνέπεια τη μόλυνσή του. Χιλιάδες τόνοι αποβλήτων παράγονται ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και της επεξεργασίας.

Ειδικότερα, τα υγρά απόβλητα της κονσερβοποίησης των φρούτων, αποτελούνται από τις φλούδες μετά από επεξεργασία των αποβλήτων και απορρίπτονται στο κοντινό ποταμό Αλιάκμονα, σε μια περιοχή γνωστή και ως «τάφος 66». Ως στερεά απόβλητα νοείται ο πουρές που αποτελείται από τα στερεά κομμάτια του εσωτερικού των φρούτων (συμπιεσμένα και κοσκινισμένα) και ότι απομένει από την επεξεργασία των αποβλήτων και συνολικά απορρίπτεται στο πλησιέστερο χώρο υγειονομικής ταφής. Ο πυρήνας του φρούτου είναι το μοναδικό παραπροϊόν που αξιοποιείται καθώς χρησιμοποιείται ως καύσιμη ύλη. Συνολικά υπολογίζεται ότι η μόλυνση της περιοχής ανέρχεται σε 3.000.000 κυβικά μέτρα υγρών και 23.000 τόνους στερεών αποβλήτων.



Εικόνες 2, 3, 4: Μόλυνση της περιοχής του Αλιάκμονα από βιομηχανικά απόβλητα ροδάκινου  
(Πηγή: <http://www.ethnos.gr/article.asp?catid=23106&subid=2&pubid=1342561>)

Το οργανικό φορτίο των στερεών αποβλήτων αποτελείται από βιοενεργές ενώσεις με αντιμικροβιακή και φυτοτοξική δράση. Αυτό οδηγεί σε υποβάθμιση της διαδικασίας αποικοδόμησης και αύξηση της μόλυνσης του περιβάλλοντος.

Τα γεωργικά απόβλητα αποτελούν πηγή βιοδραστικών ενώσεων καθώς είναι πλούσια σε φαινολικές ουσίες και καροτενοειδή που είναι προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας λόγω των βιολογικών τους δράσεων. Παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό και εμπορικό ενδιαφέρον καθώς βρίσκουν πολλές εφαρμογές στις φαρμακοβιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες συμπληρωμάτων διατροφής και καλλυντικών.





***B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***



## **B.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **B.1.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

Για την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές και συσκευές για τον ποιοτικό έλεγχο, το διαχωρισμό, την ποσοτική παραλαβή και την απόδοση της δομής των μεταβολιτών.

#### **B.1.1.1 Μέθοδοι εκχύλισης**

##### **Εκχύλιση με Υπερκρίσιμο Ρευστό (SFE)**

Οι εκχυλίσεις με SFE πραγματοποιήθηκαν σε πιλοτικής κλίμακας συσκευής SFE-1-2 No 4218 (SEPAREX F 54250 CHAMPIGNEULLES), η οποία είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να είναι δυνατή η μελέτη της διεργασίας σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα προσθήκης συνδιαλύτη, δύο δοχεία εκχύλισης συνολικής χωρητικότητας 1500 ml και τρεις διαχωριστήρες για δυνατότητα κλασμάτωσης του εκχυλίσματος.



**Εικόνα 5:** Συσκευή Υπερκρίσιμης Εκχύλισης SFE-1-2 No 4218

### **Τεχνικά Χαρακτηριστικά:**

- Μέγιστη πίεση λειτουργίας → 350 bar
- Θερμοκρασιακό εύρος θέρμανσης → 24 - 200°C
- Δυνατότητα ροής διαλύτη → 2.5-10kg/h
- Θερμοκρασιακό εύρος λειτουργίας ψύξης → -25 έως 40°C
- Υλικά κατασκευής → 316 L ανοξείδωτος χάλυβας PTFE

### **Εκχύλιση σε πιλοτική κλίμακα**

Η εκχύλιση σε πιλοτική κλίμακα πραγματοποιήθηκε σε ανοξείδωτο εκχυλιστήρα χωρητικότητας 1 τόνου. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με ανάδευση και θέρμανση του εκχυλιστήρα στους 35 °C.

### **B.1.1.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι**

#### **Χρωματογραφία επί Λεπτής Στιβάδας (TLC)**

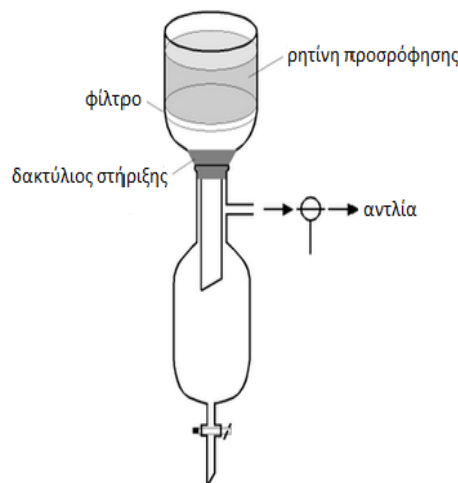
Για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών ουσιών χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatograph, TLC), που πραγματοποιήθηκε σε πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης πυριτίου και πάχος στιβάδας 0.1mm (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck) και σε πλάκες αλουμινίου αντίστροφης φάσης (RP-TLC) τύπου RP-18 F<sub>254</sub>.

Για την απομόνωση και το διαχωρισμό μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (preparative TLC) σε υάλινες πλάκες με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου κανονικής φάσης (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck).

Για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας χρησιμοποιήθηκε το CAMAG TLC Visualizer στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

#### **Υγρή Χρωματογραφία Κενού (VLC)**

Η κλασμάτωση του αρχικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε με χρήση της υγρής χρωματογραφίας κενού. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (Silica gel) διαμέτρου 0.04-0.06 mm (flash) και ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί διαλύτες διαφορετικής ανά περίπτωση πολικότητας. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό κενό.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της υγρής χρωματογραφίας κενού

### Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού

Για την κλασμάτωση και το διαχωρισμό των μεταβολιτών, έγινε χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20 (γέλη υδροξυλιωμένης δεξτράνης με μέγεθος κόκκων 25-100  $\mu\text{m}$ ). Πριν τη χρήση, η ρητίνη αφήνεται να διογκωθεί με το διαλύτη έκλυσης για 24 ώρες. Αρχικά η στήλη «πακετάρεται» χωρίς τη χρήση εξωτερικής παροχής αέρα και στη συνέχεια ακολουθεί διέλευση του διαλύτη έκλυσης με χρήση αέρα. Σημαντικοί παράγοντες για καλύτερο διαχωρισμό, αποτελούν η σωστή πλήρωση της στήλης και η αποφυγή δημιουργίας κενών αέρα.

### Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan που αποτελείται από: αντλία SpectraSystem P4000, απαιρωτή SpectraSystem 1000, αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000 και ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής πολλαπλής διόδου (PDA), SpectraSystem UV6000LP. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC και πριν τη χρησιμοποίησή τους πραγματοποιήθηκε διήθηση σε ειδική συσκευή υπό κενό και με ηθμό 0.45  $\mu\text{m}$ .

Συγκεκριμένα για τον έλεγχο των ολικών εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών προϊόντων πραγματοποιήθηκε αναλυτική χρωματογραφία HPLC με χρήση στήλης Supelco RP18, Discovery HS-C18, 25 cm, 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  και ανίχνευση με UV/vis-PDA.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Μέθοδος A: κινητή φάση  $\text{H}_2\text{O}$  (A) /ACN (B), βαθμιδωτή έκλυση 98% A και 2% B σε 2% A και 98% B για 80 min, ροή 1 mL/min

Μέθοδος Β: κινητή φάση H<sub>2</sub>O (A) /MeOH (B), βαθμιδωτή έκλυση 98% A και 2% B σε 2% A και 98% B για 80 min, ροή 1 mL/min

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και παρακολούθηθηκε στα 220, 260 και 365nm.

Για την ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική HPLC ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν:

Μέθοδος Γ: κινητή φάση H<sub>2</sub>O (A) /ACN (B), βαθμιδωτή έκλυση 98% A και 2% B σε 2% A και 98% B για 80 min, ροή 3 mL/min

Μέθοδος Δ: κινητή φάση H<sub>2</sub>O (A) /MeOH (B), βαθμιδωτή έκλυση 90% A και 10% B σε 10% A και 90% B για 60 min, ροή 3 mL/min

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και παρακολούθηθηκε στα 220, 260 και 365 nm, αν και η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου επιτρέπει τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis. Για την απομόνωση μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η ημιπαρασκευαστική στήλη Supelcosil LC-18, Supelco, 5 μm, 25 cm x 10mm και η παρασκευαστική στήλη Supelcosil LC-18, Supelco, 5 μm, 25 cm x 21.2 mm και ανίχνευση με UV/vis-PDA.

### **Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC)**

Για την κλασμάτωση και το διαχωρισμό των μεταβολιτών με τη μέθοδο της MPLC έγινε χρήση συστήματος Buchi που αποτελείται από αντλία Pump Module C-605, συσκευή ελέγχου Control Unit C-620 και αυτόματο συλλέκτη C-660. Πλήρωση στήλης Cartidge PP 12/75 με silica gel κανονικής φάσης (20-40μm).

Μέθοδος: κινητή φάση c-Hex (A) /EtOAc (B), βαθμιδωτή έκλυση 90% A και 10% B σε 10% A και 90% B για 360 min, ροή 15 mL/min

### **Χρωματογραφικά Αντιδραστήρια**

Ο έλεγχος των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε ως προς την απορρόφηση με έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία σε μήκη κύματος 254 και 365 nm και στη συνέχεια ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και κατόπιν παρατήρηση στο ορατό. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο:

- Διάλυμα A: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη
- Διάλυμα B: π. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% σε μεθανόλη

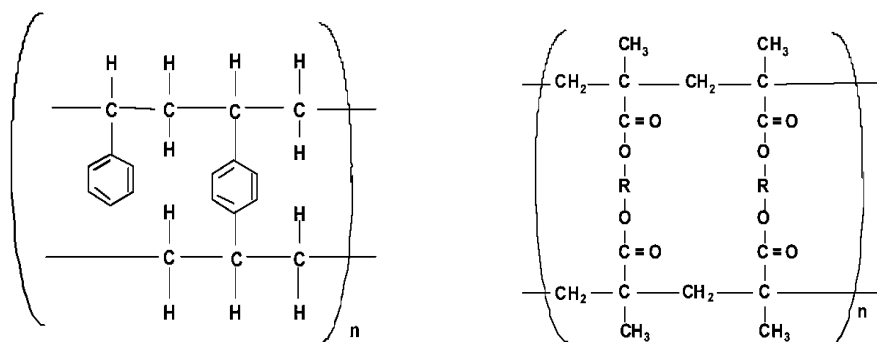
Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5 min στους 105°C.

### **Χρωματογραφία Προσρόφησης (Ρητίνες XAD)**

Μια καινοτόμος προσέγγιση φιλική προς το περιβάλλον για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων είναι η Τεχνολογία Ρητίνης Προσρόφησης (ART). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην

προσρόφηση των συγκεκριμένων ενώσεων σε στατική φάση και μπορεί να επιτρέψει την απομόνωση των επιθυμητών ενώσεων χωρίς την ανάγκη για επαναλαμβανόμενες κλασικές τεχνικές χρωματογραφίας (Shieber *et al.*, 2003).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές προτείνονται οι πολυμερικοί προσροφητές τύπου XAD. Η τεχνολογία ρητίνης προσρόφησης έχει εφαρμοστεί σε αρκετές περιπτώσεις, για την ανάκτηση των πολυφαινολών από τα απόβλητα της γεωργίας (Agalias *et al.*, 2007), για τον εμπλουτισμό εκχυλισμάτων φλαβονοειδών από χυμό μήλου και την επιλεκτική δέσμευση των φλαβονοειδών (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).



Εικόνα 7: Διάφοροι τύποι ρητινών προσρόφησης

Για το διαχωρισμό και την απομόνωση των φαινολικών συστατικών του αρχικού υδατικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη προσρόφησης XAD4. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της ρητίνης, με διαδοχική έκπλυση με H<sub>2</sub>O-EtOH- H<sub>2</sub>O, ώστε να μπορέσει να εκδηλωθεί η προσροφητική της δράση. Το δείγμα διαλύεται σε νερό. Η ρητίνη πακετάρεται σε διαχωριστική χοάνη και πραγματοποιείται διέλευση του υδατικού διαλύματος χωρίς τη χρήση παροχής αέρα. Κατόπιν, πραγματοποιείται διέλευση οργανικού διαλύτη (EtOH) με αποτέλεσμα τα προσκολλημένα μόρια στη ρητίνη να εκλούνται.

### **B.1.1.3 Φασματοσκοπικές μέθοδοι**

Για την απόδοση της δομής των φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής φασματοσκοπικές τεχνικές:

#### **Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)**

Για τη λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν οι φασματογράφοι Advance III 600 MHz (Bruker) και Bruker DRX 400. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη λήψη φασμάτων ήταν: δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm για <sup>1</sup>H-NMR και 77.0 ppm για <sup>13</sup>C-NMR) και δευτεριωμένη μεθανόλη MeOD (3.33 ppm για <sup>1</sup>H-NMR και 49.0 ppm για <sup>13</sup>C-NMR).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε  $\delta$  (ppm) και οι σταθερές σύζευξης  $J$  σε Hertz (Hz). Τέλος, η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως: s= απλή, d= διπλή, t= τριπλή, dd= διπλή διπλή και m= πολλαπλή.

Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης,  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$ , καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων, COSY (Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) και DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy).

### **Φασματομετρία Μάζας (MS)**

Τα φάσματα μάζας GC-MS ελήφθησαν σε φασματογράφο Hewlett-Packard 6890-5973, ενώ τα φάσματα μάζας APCI και ESI ελήφθησαν σε υβριδικό φασματογράφο LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany).

## **B.1.2 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΤΟΥ *PRUNUS PERSICA***

### **B.1.2.1 Συλλογή της πρώτης ύλης**

Η πρώτη ύλη αποτελείται από στερεά απόβλητα της βιομηχανίας κομποστοποίησης και χυμοποιίας ροδάκινου, που συλλέχθηκαν τον Αύγουστο και Σεπτέμβριο του 2011 στη Βέροια της Κεντρικής Μακεδονίας από την κοινοπραξία αγροτικών συνεταιριστικών οργανώσεων ΑΛ.Μ.ΜΕ.

Τον Αύγουστο του 2011 παρελήφθη υλικό διαχωρισμένο σε φλοιό (~4 kg) από την αποφλοιώση του ροδάκινου της γραμμής παραγωγής κομπόστας και σε πολτό (~8.5 kg) σε ημιστερεή κατάσταση που προήλθε από τη γραμμή παραγωγής χυμού και φυλάχθηκε στην κατάψυξη μέχρι την εκχύλισή του.

Το Σεπτέμβριο του 2011 παρελήφθησαν 220kg πολτού από τη γραμμή παραγωγής χυμού, με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία του σε πιλοτική κλίμακα. Από αυτό το υλικό κατόπιν απομάκρυνσης μέρους του καρπού και ξήρανόσής του, διαχωρίστηκε το ενδοσπέρμιο (καθαρό βάρος 550 gr) το οποίο στη συνέχεια επεξεργάστηκε με χρήση της εκχύλισης υπερκρίσιμου ρευστού.

### **B.1.2.2 Επιλογή κατάλληλου τρόπου εκχύλισης και επεξεργασίας της πρώτης ύλης**

Για την επιλογή της πιο κατάλληλης πρώτης ύλης και την εύρεση του κατάλληλου τρόπου εκχύλισης για την πιλοτική κλίμακα έγινε επεξεργασία των δειγμάτων σε εργαστηριακή κλίμακα με τα εξής πρωτόκολλα:



## 1<sup>η</sup> προσέγγιση

Επεξεργασία του πολτού:

- 150 gr πολτού εκχυλίζονται με 750 ml H<sub>2</sub>O σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 45°C χωρίς κενό.
- 150 gr πολτού εκχυλίζονται με 750 ml διαλύματος 90% H<sub>2</sub>O και 10% EtOH σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 45°C χωρίς κενό.

Επεξεργασία του φλοιού:

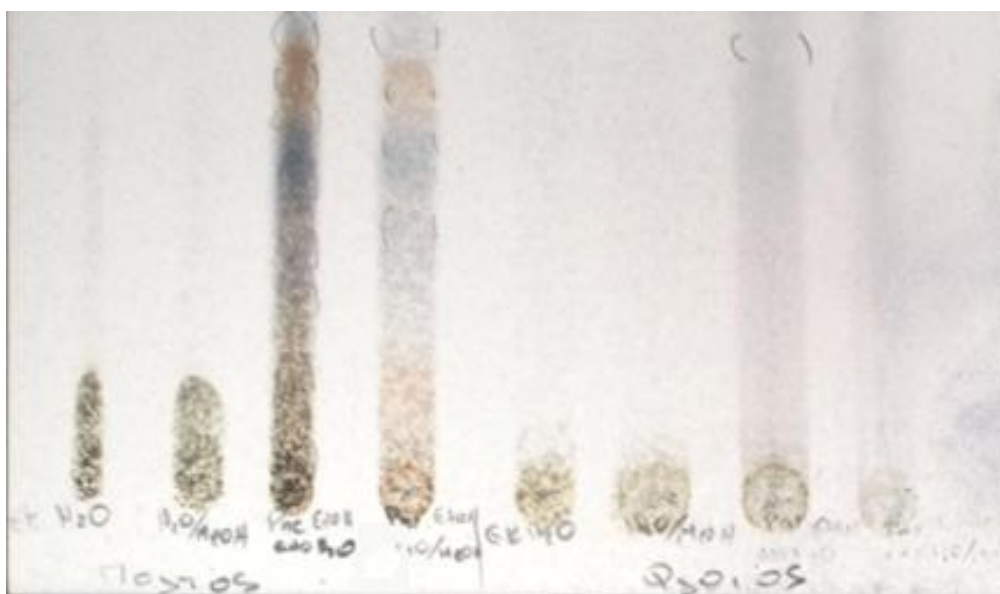
- 150 gr φλοιού εκχυλίζονται με 750 ml H<sub>2</sub>O σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 45°C χωρίς κενό.
- 150 gr φλοιού εκχυλίζονται με 750 ml διαλύματος 90% H<sub>2</sub>O και 10% EtOH σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 45°C χωρίς κενό.

Ακολούθησε διήθηση των δειγμάτων υπό κενό, εκ των οποίων 50 ml από το κάθε διήθημα συμπυκνώθηκε χωρίς άλλη επεξεργασία, ενώ το υπόλοιπο από κάθε δείγμα επεξεργάστηκε με ρητίνη τύπου XAD4.

Επεξεργασία με ρητίνη τύπου XAD4:

Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με ρητίνη προσρόφησης τύπου XAD4. Κατόπιν, το υλικό προσρόφησης ξεπλένεται με H<sub>2</sub>O κι έπειτα προστίθεται EtOH, με στόχο την παραλαβή των προϊόντων που συγκράτησε η ρητίνη. Το αιθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώνεται σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) στους 40°C σε 23 bar.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται χρωματογραφία επί λεπτής στοιβάδας (TLC) κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 80/20, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα που η λήψη της έγινε με τη χρήση του οργάνου CAMAG-Visualizer.



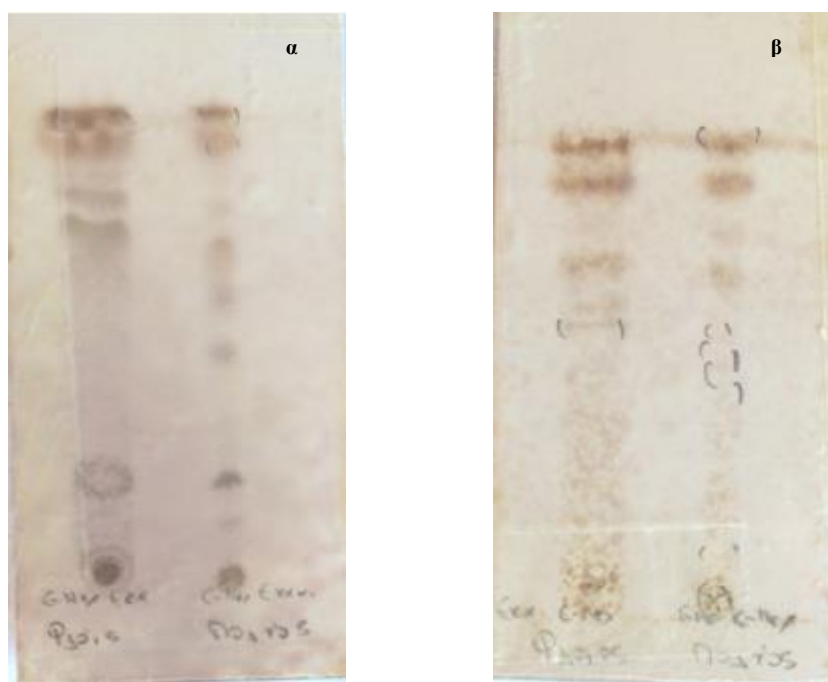
Εικόνα 8: TLC κανονικής φάσης στα συστήματα ανάπτυξης DCM/MeOH : 80/20

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας προκύπτει ότι καταρχάς πιο πλούσιο εκχύλισμα σε πολυφαινολικές ενώσεις είναι αυτό του πολτού και όχι αυτό του φλοιού που αναμενόταν σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Αυτό οφείλεται κυρίως στην επεξεργασία με NaOH που έχει υποστεί ο φλοιός κατά την διάρκεια της βιομηχανικής επεξεργασίας. Από τα εκχυλίσματα του πολτού χωρίς την επεξεργασία με ρητίνη δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές, ενώ στα δείγματα που επεξεργάστηκαν με ρητίνη πιο πλούσιο σε μεταβολίτες είναι το 100% υδατικό εκχύλισμα.

## 2<sup>η</sup> προσέγγιση:

- 150 gr πολτού εκχυλίζονται με 450 ml c-Hex σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) για 2 ώρες στους 45°C χωρίς κενό.
- 150 gr φλοιού εκχυλίζονται με 450 ml c-Hex σε συμπυκνωτήρα κενού (Rota) για 2 ώρες στους 45°C χωρίς κενό.

Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) κανονικής φάσης στα συστήματα ανάπτυξης: α) DCM/MeOH : 98/2 και β) DCM 100%, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 9: TLC κανονικής φάσης στα συστήματα ανάπτυξης: α) DCM/MeOH : 98/2 και β) DCM 100%

Από τα χρωματογραφικά αποτελέσματα προκύπτει και πάλι ότι το εκχύλισμα του πολτού εμφανίζει πιο πλούσιο μεταβολικό προφίλ σε σύγκριση με το αντίστοιχο εκχύλισμα του φλοιού και κρίθηκε ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη.

Από τις παραπάνω προσεγγίσεις, αποφασίστηκε ότι μόνο το βιομηχανικό παραπροϊόν του πολτού θα μελετηθεί σε πιλοτική κλίμακα στα επιλεγμένα συστήματα εκχύλισης (100% κυκλοεξάνιο, 100% νερό και επεξεργασία του εκχυλίσματος με προσροφητική ρητίνη).

## **Β.1.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ ΣΕ ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ**

### **Β.1.3.1 Πολτός ροδάκινου - Εκχύλιση με κυκλοεξανίο**

Εκχύλιση 220 kg πολτού ροδάκινου με c-Hex (διάρκεια 3 ημέρες) σε εκχυλιστήρα βιομηχανικής κλίμακας με στόχο την παραλαβή των καροτενοειδών που περιέχονται στην πρώτη ύλη. Η αναλογία πολτού:διαλύτη ορίστηκε ως 1:5 σύμφωνα με τα πρότυπα που ακολουθούνται στη βιομηχανία και τα αποτελέσματα της εργαστηριακής εκχύλισης.



**Εικόνα 10:** Αντιδραστήρας ανάμειξης με το εκχύλισμα πολτού ροδάκινου - κυκλοεξανίου

Το εκχύλισμα κυκλοεξανίου συλλέγεται και συμπυκνώνεται σε μεγάλους περιστρεφόμενους συμπυκνωτήρες κενού. Κατόπιν, το συμπύκνωμα των καροτενοειδών ζυγίζεται (~300 gr) και φυλάσσεται στο ψυγείο.



**Εικόνα 11:** Περιστροφικός εξατμιστήρας συμπύκνωσης (Rota)

### **B.1.3.2 Πολτός ροδάκινου - Εκχύλιση με νερό**

Ο πολτός εκχυλίζεται σε μεγάλο καζάνι ανάμειξης με 750 L νερό υπό ανάδευση, στους 40° C, για 4 ώρες. Για ευκολότερη διαχείριση του υλικού τα επόμενα στάδια επεξεργασίας πραγματοποιήθηκαν ανά 50 L σε μικρότερο καζάνι ανάμειξης. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε 50 L υλικού προστέθηκαν 200 L νερού και 25 kg ρητίνης τύπου XAD4 υπό ανάδευση. Ακολούθησε απομάκρυνση του υδατικού διαλύματος με απόχυση και προσθήκη περίπου 80L EtOH για έκπλυση της ρητίνης για 24h υπό ανάδευση. Στόχος ήταν η αποδέσμευση των πολυφαινολικών ενώσεων που είχαν προσροφηθεί στη ρητίνη και η παραλαβή τους στο αιθανολικό εκχύλισμα.

Το αιθανολικό εκχύλισμα συλλέγεται με ειδική αντλία κενού και συμπυκνώνεται σε μεγάλο περιστρεφόμενο συμπυκνωτήρα κενού. Το βάρος του συμπυκνώματος είναι 279.29 gr. Ακολουθεί υγρή – υγρή εκχύλιση του συμπυκνώματος σε διαχωριστική χοάνη σε σύστημα διαλυτών H<sub>2</sub>O/EtOAc με στόχο την απομάκρυνση των υπολειμμάτων πούλπας και τη δέσμευση των φαινολικών ενώσεων.



**Εικόνα 12:** Διαχωριστική χοάνη σε σύστημα διαλυτών H<sub>2</sub>O/EtOAc

Πρόέκυψαν δύο φάσεις:

**Υδατική φάση:** Πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση για την απομάκρυνση του νερού

**Φάση EtOAc:** Το συμπύκνωμα αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τη μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών

Η επεξεργασία του συμπυκνώματος της φάσης EtOAc έγινε με την *υγρή χρωματογραφία κενού* από την οποία παρελήφθησαν 65 κλάσματα.

## Υγρή Χρωματογραφία Κενού:

Πίνακας 13: Συνενώσεις κλασμάτων της υγρής χρωματογραφίας κενού και αναλογίες διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν

Κλάσματα Shot		
	Κλάσματα	Διαλύτης
A	1-15	DCM : 100%
B	17-20	DCM/MeOH : 99,5/0,5
C	21-25	DCM/MeOH : 99/1
D	26-32	DCM/MeOH : 98/2
E	33-35	DCM/MeOH : 96,5/3,5
F	36-43	DCM/MeOH : 95/5
G	44-49	DCM/MeOH : 90/10
H	50-56	DCM/MeOH : 80/20
I	57-59	DCM/MeOH : 70/30
J	60-62	DCM/MeOH : 50/50
K	63-64	DCM/MeOH : 20/80
L	65	MeOH : 100%

Παραλήφθηκαν κλάσματα των 250 ml και κατόπιν εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και πραγματοποιήθηκε συνένωση των κλασμάτων με παρόμοιο χημικό προφίλ.

### B.1.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Τα κλάσματα τα οποία προέκυψαν από τη στήλη υγρής χρωματογραφίας κενού, επεξεργάστηκαν με σκοπό την απομόνωση καθαρών δευτερογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα:

**Κλάσμα G:** Το κλάσμα αυτό που περιείχε τα συνενωμένα κλάσματα 42-47, βάρους 2.72 gr, κλασματώθηκε εκ νέου με χρήση της υγρής χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC) σε silica gel κανονικής φάσης (20-40 μm).

Η απόφαση αυτή στηρίχτηκε στη ικανοποιητική ποσότητα αρχικού δείγματος και στον πετυχημένο διαχωρισμό που παρατηρήθηκε σε δοκιμαστικές μελέτες σε χρωματογραφήματα λεπτής στιβάδας. Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν το κυκλοεξάνιο και ο οξικός αιθυλεστέρας. Η γραμμική βαθμιδωτή έκλουση που ακολουθήθηκε καθώς και η αντιστοιχία των κλασμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα 14. Η ανάλυση είχε διάρκεια 6 ώρες με σκοπό το βέλτιστο διαχωρισμό.

Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Cartidge PP 40/150 και η ροή ρυθμίστηκε σε 15 mL/min. Από τη διαδικασία προέκυψαν 21 συνενωμένα κλάσματα, MPLC\_1 - MPLC\_21.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 14:** Συνενώσεις κλασμάτων της υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης και αναλογίες διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν

c-Hexane	EtOAc	Κλάσματα	Όγκος (mL)
90	10	1-30	1350
70	30		
70	30	31-40	450
70	30	41-60	900
60	40		
60	40	61-80	900
50	50		
50	50	81-90	450
40	60		
40	60	91-100	450
30	70		
30	70	101-120	900
10	90		

Η πορεία της κλασμάτωσης παρακολούθηθηκε με τη χρήση της χρωματογραφίας επί λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα ανάπτυξης διαλυτών c-Hex/EtOAc σε αναλογία 50/50.

Τα κλάσματα συνενώνονται με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις TLC και οι συνενώσεις των κλασμάτων παρατίθενται στον επόμενο πίνακα:

**Πίνακας 15:** Συνενώσεις κλασμάτων MPLC, κωδικοί και αντίστοιχα βάρη

Κλάσματα MPLC		
	Κλάσματα	Βάρος (mg)
MPLC_1	1-3	35.0
MPLC_2	4-14	10.5
MPLC_3	15	1.2
MPLC_4	16-20	2.6
MPLC_5	21-24	4.9
MPLC_6	25	2.2
MPLC_7	26-30	9.5
MPLC_8	31-35	34.9
MPLC_9	36-39	73.6
MPLC_10	40-43	63.8
MPLC_11	44-47	119.3

MPLC_12	48-51	106.5
MPLC_13	52-55	66.1
MPLC_14	56-60	50.0
MPLC_15	61-65	35.0
MPLC_16	66-73	75.1
MPLC_17	74-77	59.9
MPLC_18	78-89	172.8
MPLC_19	90-96	75.0
MPLC_20	97-110	128.4
MPLC_21	111-120	176.0
<b>Συνολικά</b>		1290.0
<b>Απόδοση</b>		52.2%

Το κλάσμα **MPLC\_3** περιείχε σε καθαρή μορφή το **μεταβολίτη 5** (EZP\_4).

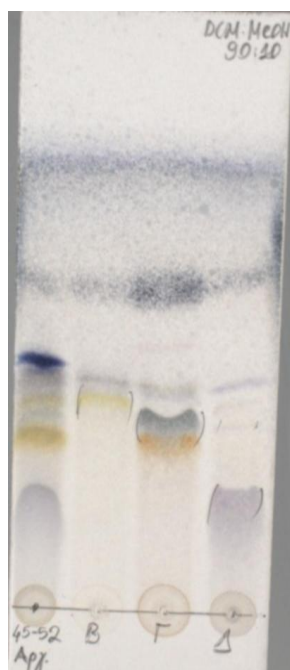
Τα κλάσματα από τη παραπάνω χρωματογραφική ανάλυση επεξεργάστηκαν περαιτέρω με σκοπό την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών.

**MPLC\_12:** Το κλάσμα αυτό (10.65 mg), υπεβλήθη σε χρωματογραφία στήλης silica flash με διαλύτες έκλουσης DCM/MeOH. Η στήλη είχε μήκος 30 cm και διάμετρο 1.2 cm. Ο συνολικός όγκος της κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 120 mL, ενώ κάθε κλάσμα είχε όγκο περίπου 1 mL. Η ροή ρυθμίστηκε σε 0.4 mL/min. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν 10 συνεχόμενα κλάσματα Stili1\_1 έως Stili1\_10, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 16:** Συνενώσεις κλασμάτων Στήλης 1, κωδικοί και αντίστοιχα βάρη

<b>Κλάσματα Στήλης 1</b>		
	<b>Κλάσματα</b>	<b>Βάρος (mg)</b>
Stili1_1	1-33	1.1
Stili1_2	34-44	26.2
Stili1_3	45-52	19.5
Stili1_4	53-59	7.4
Stili1_5	60-69	9.8
Stili1_6	70-74	5.7
Stili1_7	75-83	7.9
Stili1_8	84-100	7.4
Stili1_9	101-114	10.6
Stili1_10	115-119	1.1
<b>Συνολικά</b>		96.7
<b>Απόδοση</b>		98%

**Stili1\_3:** Το κλάσμα αυτό υποβλήθηκε σε ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (semi-prep HPLC) με χρήση στήλης Supelcosil LC-18, Supelco, 5 μm, 25 cm x 10mm και η ροή ρυθμίστηκε σε 3 mL/min. Χρήση της μεθόδου Γ και μελέτη του χρωματογραφήματος στα 220, 254, 320 nm. Τα κλάσματα αυτά οδήγησαν στην απομόνωση των καθαρών **μεταβολιτών 1** (EZP\_9), **2** (EZP\_11) και **10** (EZP\_10). Η χρωματογραφική απεικόνιση (TLC) των μεταβολιτών αυτών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 13:** Κλάσματα semi prep-HPLC σε σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH : 90/10

**Κλάσμα Η:** Πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέρους του κλάσματος αυτού (0.67g) με χρήση της παρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (prep - HPLC), στήλης Supelco με τη μέθοδο Γ και η ροή ρυθμίστηκε σε 5 mL/min.

Η επαρκής ποσότητα αρχικού υλικού καθώς και η ενδιαφέρουσα χρωματογραφική εικόνα σε αναλυτικό επίπεδο HPLC, οδήγησαν σε επιλογή της εν λόγω μεθόδου ανάλυσης.

Από την επεξεργασία αυτού του κλάσματος, απομονώθηκε ο **μεταβολίτης 3** (EZP\_16), βάρους 0.21mg. όπως παρουσιάζεται στην επόμενη χρωματογραφική πλάκα (TLC).

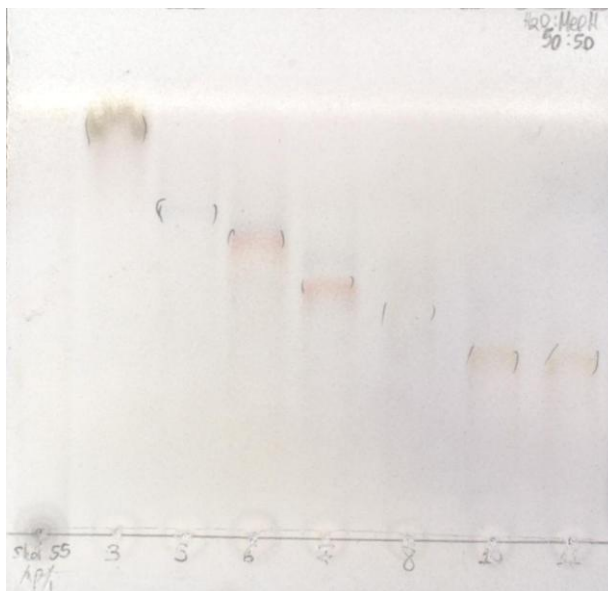


**Εικόνα 14:** Κλάσματα prep-HPLC σε RP-TLC με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών H<sub>2</sub>O/MeOH : 50/50



Μέρος του υπολοίπου **κλάσματος Η** (0.01g), επεξεργάστηκε με τη μέθοδο της ημιπαρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (semi-prep HPLC) με χρήση της στήλης Supelcosil LC-18, και ροή σε 3 mL/min. Έγινε χρήση της μεθόδου Δ και μελέτη του χρωματογραφήματος στα 220, 254, 320 nm.

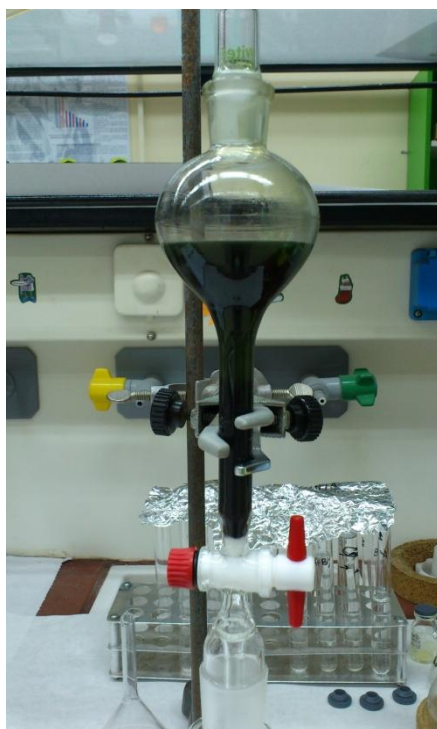
Παρελήφθησαν 7 κλάσματα που μελετήθηκαν με χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Τα αποτελέσματα της TLC φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 15:** Κλάσματα semi prep-HPLC σε RP-TLC με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών H<sub>2</sub>O/MeOH : 50/50

Από τη χρωματογραφική ανάλυση απομονώθηκαν οι καθαροί **μεταβολίτες 7 (EZP\_47), 8 (EZP\_48), 9 (EZP\_44) και 11 (EZP\_42)**.

**Κλάσμα F:** Το κλάσμα αυτό (5.61g), επεξεργάστηκε σε στήλη ενεργού άνθρακα, με στόχο την απομάκρυνση των χλωροφυλλών και την περαιτέρω απομόνωση μεταβολιτών.



**Εικόνα 16:** Στήλη ενεργού άνθρακα για δέσμευση χλωροφυλλούχων ενώσεων

Μετά την κατεργασία με τη στήλη άνθρακα, το δείγμα που προέκυψε (βάρους 4.6g) επεξεργάστηκε με υγρή - υγρή εκχύλιση με σύστημα διαλυτών MeOH/c-Hex 50/50 και διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις.

Το μεθανολικό εκχύλισμα (290 mg) υπεβλήθη σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Η στήλη είχε μήκος 35 cm και διάμετρο 1.2 cm. Χρήση συνολικά 60 ml κινητής φάσης και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 ml με ροή 0.4 ml/min. Συνολικά, προέκυψαν 9 συνενωμένα κλάσματα (Seph\_1 έως Seph\_9) κατόπιν μελέτης τους με TLC (εικόνα 17), όπως φαίνεται και στον πίνακα 17.



**Εικόνα 17:** Κλάσματα Sephadex σε TLC με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH : 95/5

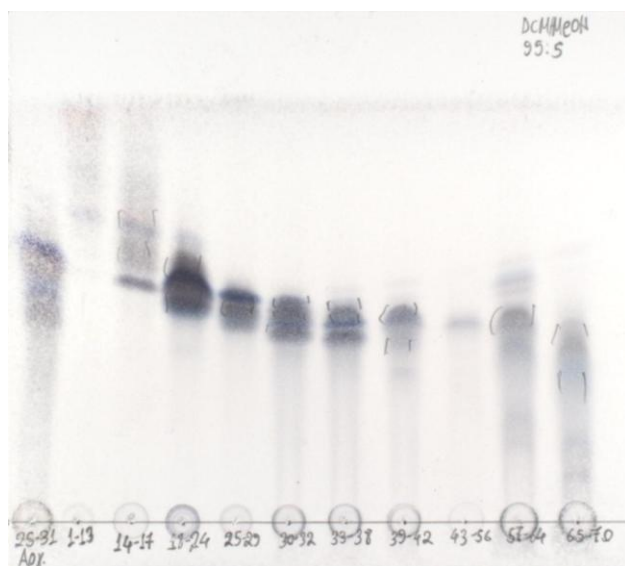
Πίνακας 17: Συνενομήνα κλάσματα Sephadex, κωδικοί και αντίστοιχα βάρη

<b>Κλάσματα Sephadex</b>		
	Κλάσματα	Βάρος (mg)
Seph_1	1-16	2.2
Seph_2	17-20	13.8
Seph_3	21-22	6.3
Seph_4	23-24	12.4
Seph_5	25-31	105.7
Seph_6	32-34	35.7
Seph_7	35-36	10.6
Seph_8	37-47	18.4
Seph_9	48-56	0.8
<b>Συνολικά</b>		205.9
<b>Απόδοση</b>		71%

**Seph\_5:** Το κλάσμα αυτό (105.7 mg) υπεβλήθη σε χρωματογραφία στήλης silica flash με απεσταγμένους διαλύτες έκλουσης DCM/MeOH. Η στήλη είχε μήκος 32 cm και διάμετρο 1.2 cm. Ο όγκος της κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 80 mL, ενώ κάθε κλάσμα είχε όγκο περίπου 1 mL. Η ροή ρυθμίστηκε σε 0.4 mL/min. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν 10 συνενομήνα κλάσματα Stili2\_1 έως Stili2\_10.

Πίνακας 18: Συνενομήνα κλάσματα Στήλης 2, κωδικοί και αντίστοιχα βάρη

<b>Κλάσματα Στήλης 2</b>		
	Κλάσματα	Βάρος (mg)
Stili2_1	1-13	1.7
Stili2_2	14-17	1.6
Stili2_3	18-24	38.7
Stili2_4	25-29	10.0
Stili2_5	30-32	5.9
Stili2_6	33-38	6.9
Stili2_7	39-42	2.5
Stili2_8	43-56	2.0
Stili2_9	57-64	3.4
Stili2_10	65-70	3.5
<b>Συνολικά</b>		76.2
<b>Απόδοση</b>		72%



Εικόνα 18: Κλάσματα Στήλης 2 σε TLC με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH : 95/5

**Stili2\_3:** Το κλάσμα αυτό επεξεργάστηκε με τη μέθοδο της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (preparative TLC) με σύστημα ανάπτυξης EtOAc/c-Hex/Acetone (60/40/0.25), με αποτέλεσμα να απομονωθεί σε καθαρή μορφή οι **μεταβολίτες 4** (EZP\_24), βάρους 4.8 mg, **12** (EZP\_25) και **13** (EZP\_27).

**Κλάσμα J:** Το κλάσμα αυτό περιέχει το κλάσμα 60 (43 mg), το οποίο επεξεργάστηκε με χρήση της ημιπαρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (semi-prep HPLC) με στήλη Supelcosil LC-18 και ροή 3 mL/min. Έγινε χρήση της μεθόδου Δ και μελέτη του χρωματογράφηματος στα 220, 254, 320 nm.

Από την ανάλυση αυτή απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ο καθαρός **μεταβολίτης 6** (EZP\_46).



Εικόνα 19: Κλάσματα semi prep-HPLC σε RP-TLC με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών H<sub>2</sub>O/MeOH : 50/50

## **B.1.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΟΥ ΤΟΥ ΡΟΔΑΚΙΝΟΥ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟ ΡΕΥΣΤΟ (SFE)**

Για την παραλαβή του ελαίου από το ενδοσπέρμιο του *Prunus persica*, εφαρμόστηκε η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό και πιο συγκεκριμένα με CO<sub>2</sub>. Στόχος ήταν η παραλαβή των μη πολικών συστατικών του κουκουτσιού όπως λιπαρά οξέα, κηροί, τερπένια και άλλα φαινολικά παράγωγα. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι πολύ φιλική προς το περιβάλλον καθώς δε χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες και δεν αφήνει υπολείμματα.

### **B.1.5.1 Παραλαβή του εκχυλίσματος με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>**

Αποξηραμένη πρώτη ύλη (αποξηραμένος καρπός) επεξεργάζεται για την απομάκρυνση του περικαρπίου και στην συνέχεια αλεσμένη ποσότητα από το ενδοσπέρμιο εκχυλίστηκε στη συσκευή υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή των συνθηκών έγιναν με βάση τις βιβλιογραφικές πηγές (Mezzomo et al., 2010).

**Ποσότητα προς εκχύλιση:** 250 g

**Διάρκεια εκχύλισης:** 7 h

**Συνθήκες:** Πίνακας 19

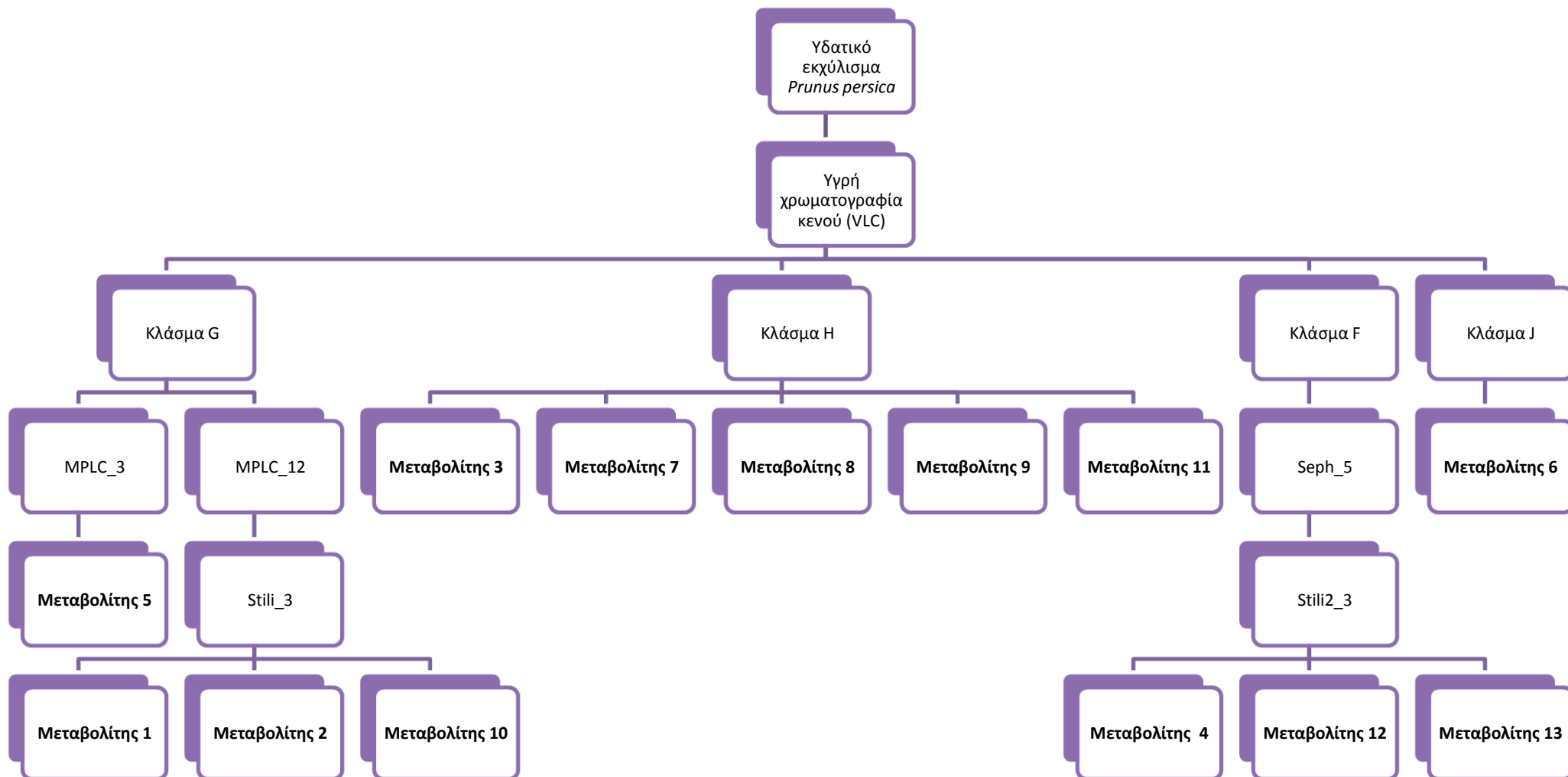
**Πίνακας 19:** Παράμετροι και συνθήκες Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Δείγμα	Θερμοκρασία εκχυλιστήρα (°C)	Πίεση εκχυλιστήρα (bar)	Χρόνος (min)	Ροή (Kg/h)	Αιθανόλη (%)	Θερμοκρασία διαχωριστήρων (°C)	Πίεση διαχωριστήρων
1	50	300	30	5	-	40	70
2	50	300	30	5	-	30	70
3	50	300	30	5	-	30	70
4	50	300	30	5	-	30	70
5	50	300	30	5	-	40	70
6	50	300	30	5	-	40	70
7	50	300	30	5	-	40	70
8	50	300	30	5	-	40	70
9	50	300	30	5	-	50	70
10	50	300	30	5	-	50	70
11	50	300	30	5	-	50	70
12	50	300	30	5	-	50	70
13	50	300	30	5	-	50	70

Το πρωτόκολλο της εκχύλισης περιλάμβανε την εκχύλιση του ενδοσπέρματος με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>, χωρίς χρήση συνδιαλύτη σε σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας (50 °C, 300 bar) με στόχο την παραλαβή του φυτικού ελαίου.

### **B.1.5.2 Απόδοση του εκχυλίσματος με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>**

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε παρείχε πολύ καλά αποτελέσματα για το συγκεκριμένο έλαιο. Ειδικότερα, το εκχύλισμα που συλλέχθηκε είχε απόδοση που αγγίζει το 32%, την υψηλότερη που έχει υπάρξει συγκριτικά με τις βιβλιογραφικές πηγές (*Mezzomo et al., 2009*).



Εικόνα 20: Διαγραμματική απεικόνιση της παραλαβής δευτερογενών μεταβολιτών από τα εργοστασιακά απόβλητα του *Prunus persica*





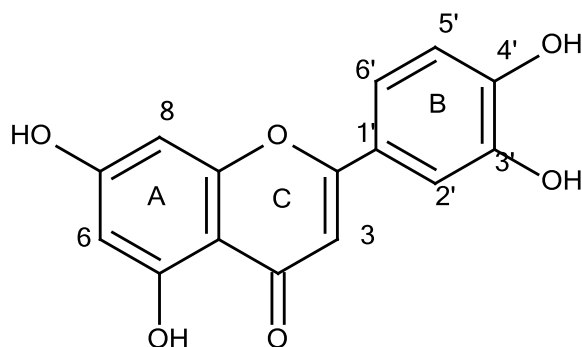
## B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### B.2.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΛΤΟ

Από την πιλοτική κλίμακα επεξεργασίας του πολτού απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 13 μεταβολίτες, οι δομές και τα φάσματα των οποίων παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω:

#### Μεταβολίτης 1: *Λουτεολίνη*

Ο μεταβολίτης 1 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως κίτρινου χρώματος από το κλάσμα EZP\_9.



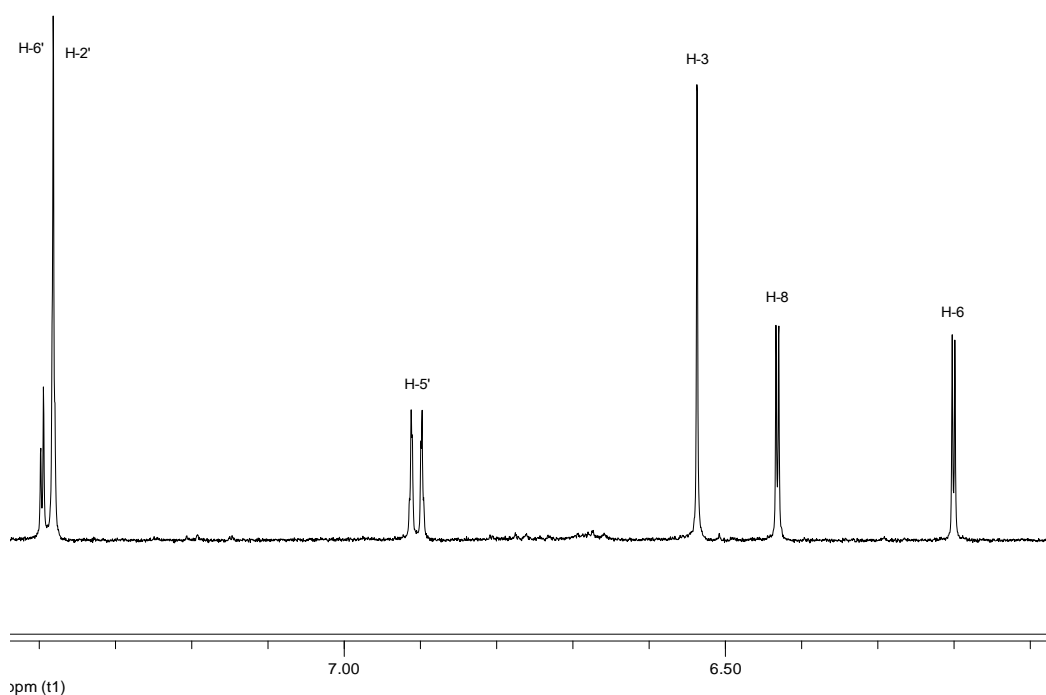
Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπικών δεδομένων και πρόκειται για το φλαβονοειδές *λουτεολίνη* (3',4',5,7 τετραυδροξύ φλαβόνη).

Από το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , διαφαίνεται η ύπαρξη μιας φλαβόνης. Τα πρωτόνια H-2' (7.38 ppm), H-5' (6.9 ppm) και H-6' (7.39 ppm) αντιστοιχούν σ' ένα τρισυποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο. Επιπλέον, η ύπαρξη δύο διπλών κορυφών με *meta* σύζευξη μεταξύ τους αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-6 (6.2 ppm) και H-8 (6.43 ppm) του αρωματικού δακτυλίου A, ενώ η απλή κορυφή στα 6.53 ppm ανήκει στο πρωτόνιο H-3.

Λουτεολίνη	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (200MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm)*
2	-	166.1
3	6.53 (1H, s)	103.9
4	-	183.9
5	-	163.2
6	6.20 (1H, d, $J=2.1$ )	100.1
7	-	166.4

8	6.43 (1H, d, $J=2.1$ )	95.0
9	-	159.4
10	-	105.3
1'	-	123.7
2'	7.38 (1H, d, $J=2.2$ )	114.2
3'	-	147.1
4'	-	151.0
5'	6.90 (1H, d, $J=8.5$ )	116.1
6'	7.39 (1H, dd, $J=8.5/2.2$ )	120.3

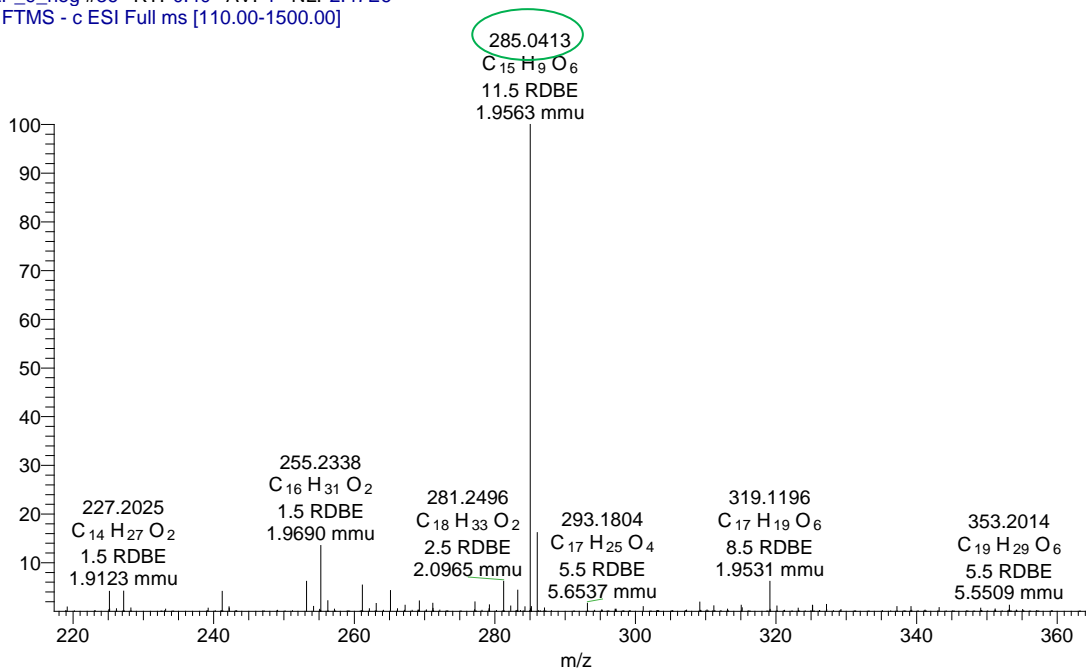
\*Οι τιμές  $^{13}\text{C-NMR}$  αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Nguyen et al., 2006).



**Εικόνα 21:** Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  και χημική δομή του μορίου της λουτεολίνης

Στο φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν  $[\text{M-H}]^-$   $m/z=285.0413$  που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$  με βαθμό ακορεστότητας 11.

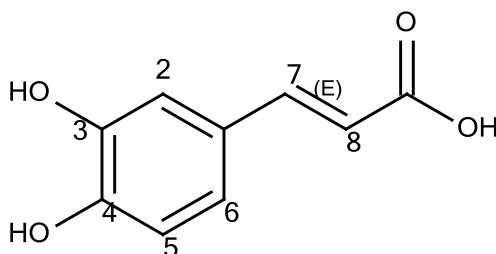
EZP\_9\_neg #36 RT: 0.40 AV: 1 NL: 2.47E6  
T: FTMS - c ESI Full ms [110.00-1500.00]



Η λουτεολίνη είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές που εμφανίζεται σε πολλά είδη του γένους *Prunus*. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι κατέχει ευρείς φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξιογόνες (Lv *et al.*, 2009), αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές. Η ικανότητα της λουτεολίνης να αναστέλλει την αγγειογένεση, να διεγείρει την απόπτωση, να προλαμβάνει την καρκινογένεση σε ζωικά μοντέλα, να μειώνει την ανάπτυξη όγκων *in vivo* και να ευαισθητοποιεί καρκινικά κύτταρα στην κυτταροτοξική δράση ορισμένων αντικαρκινικών φαρμάκων υποδηλώνει ότι έχει χημειοπροληπτική και χημειοθεραπευτική δυναμική κατά του καρκίνου (López-Lázaro, 2009). Διατροφικές πηγές της λουτεολίνης συνιστούν τα καρότα, οι πιπεριές, το σέλινο, το ελαιόλαδο, η μέντα, το θυμάρι, το δενδρολίβανο και η ρίγανη.

## Μεταβολίτης 2: **Καφεϊκό οξύ**

Ο μεταβολίτης 2 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως καφέ χρώματος από το κλάσμα EZP\_11.

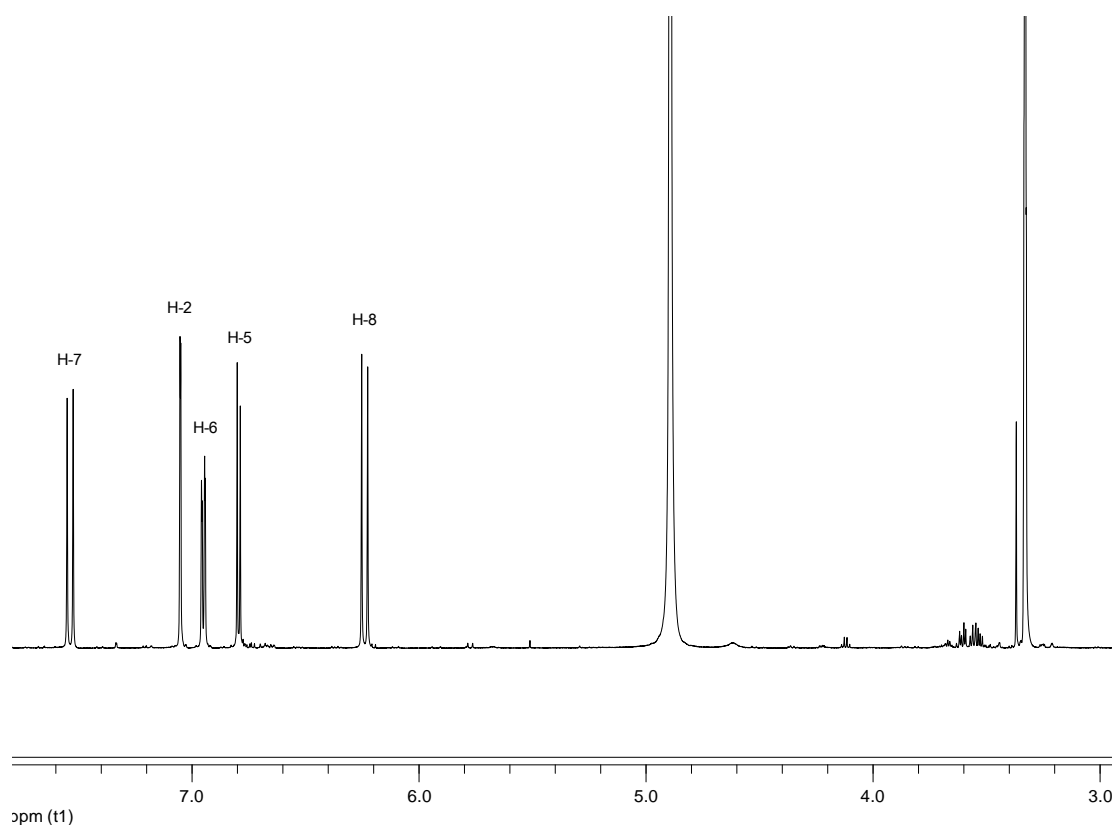


Το μόριο ταυτοποιήθηκε με χρήση φάσματος <sup>1</sup>H-NMR όπου είναι χαρακτηριστική η παρουσία τρισυποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου λόγω ύπαρξης κορυφών στην αρωματική περιοχή. Επιπλέον, είναι χαρακτηριστική η πλευρική αλυσίδα η οποία φέρει

έναν διπλό δεσμό όπου τα πρωτόνια H-7 και H-8 αφενός είναι σε trans διαμόρφωση λόγω της σταθερά σύζευξης (15.8 Hz) και αφετέρου το πρωτόνιο H-7 είναι αποθωρακισμένο λόγω της ύπαρξης της γειτονικής καρβοξυλομάδας (–COOH).

Καφεϊκό οξύ	<sup>1</sup> H NMR (600MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, J σε Hz)	<sup>13</sup> C NMR (200MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm)*
1	-	128.1
2	7.05 (1H, d, J=2.1)	115.2
3	-	146.7
4	-	149.4
5	6.79 (1H, d, J=8.2)	116.6
6	6.94 (1H, dd, J=8.2/2.1)	122.8
7	7.54 (1H, d, J=15.8)	146.9
8	6.24 (1H, d, J=15.8)	116.3
9	-	171.5

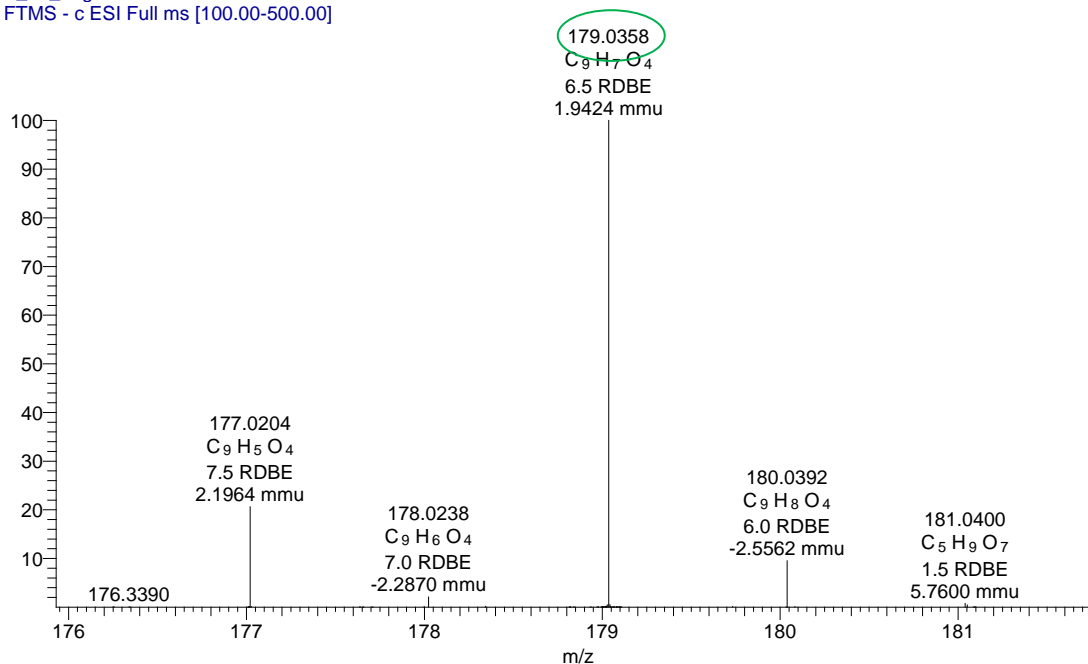
\*Οι τιμές <sup>13</sup>C-NMR αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Nousis et al., 2005).



Εικόνα 22: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR και χημική δομή του μορίου του καφεϊκού οξέος

Στο φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν [M-H]<sup>-</sup> m/z=179.0358 που αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub> και ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε σε 6.

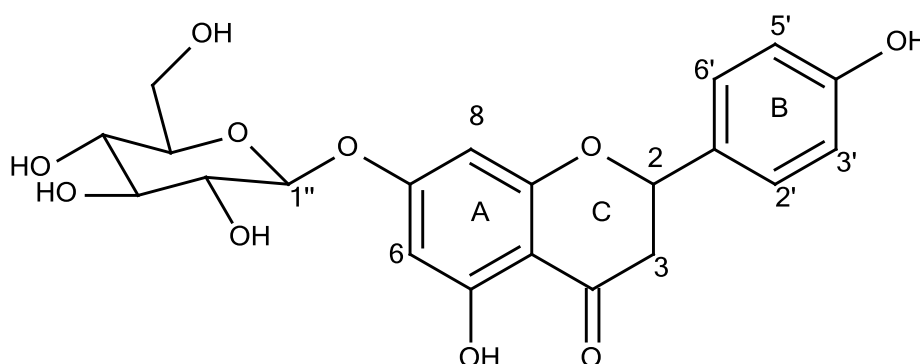
EZP\_11\_neg #36 RT: 0.42 AV: 1 NL: 4.72E6  
T: FTMS - c ESI Full ms [100.00-500.00]



Το καφεϊκό οξύ εμφανίζει δράση κατά της αφλατοξίνης (*Campbell et al., 2001*) αλλά και κατά της νόσου Πάρκινσον ως προστατευτικός παράγοντας των νευρικών αγγείων (*Tsai et al., 2011*). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση (*Tsai et al., 2011*).

### Μεταβολίτης 3: *Προυνίνη*

Ο μεταβολίτης 3 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως κίτρινου χρώματος από το κλάσμα EZP\_16.



Το μόριο αυτό ταυτοποιήθηκε φασματοσκοπικά με τη χρήση του 1D και 2D διαστάσεων NMR και με τη βοήθεια των φασμάτων μάζας HR-MS και πρόκειται για τη φλαβανόνη, *προυνίνη*.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ , η ύπαρξη δύο διπλών κορυφών που αντιστοιχούν στα χημικά ισοδύναμα πρωτόνια H-2'/H-6' (7.34 ppm) και H-3'/H-5' (6.83 ppm) και ανήκουν σ' ένα δυσποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.

Επιπλέον, η ύπαρξη μιας διπλής διπλής κορυφής στα 3.19 ppm και μιας πολλαπλής στα 2.77 ppm αντιστοιχούν σε δυο μεθυλικά πρωτόνια που ανήκουν στον ίδιο άνθρακα C-3 (44.2 ppm), όπως επιβεβαιώνεται από το φάσμα HSQC-DEPT. Οι κορυφές αυτές ανήκουν στα πρωτόνια H-3a και H-3b αντίστοιχα και είναι χαρακτηριστικές της ύπαρξης σκελετού φλαβονόνης. Η εμφάνιση πρωτονίου στον C-2, το οποίο εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 79.3 ppm, επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC, όπου παρατηρείται η  $^3J$  σύζευξη μεταξύ του πρωτονίου H-2 με τους άνθρακες C-2'/C-6' και C-4.

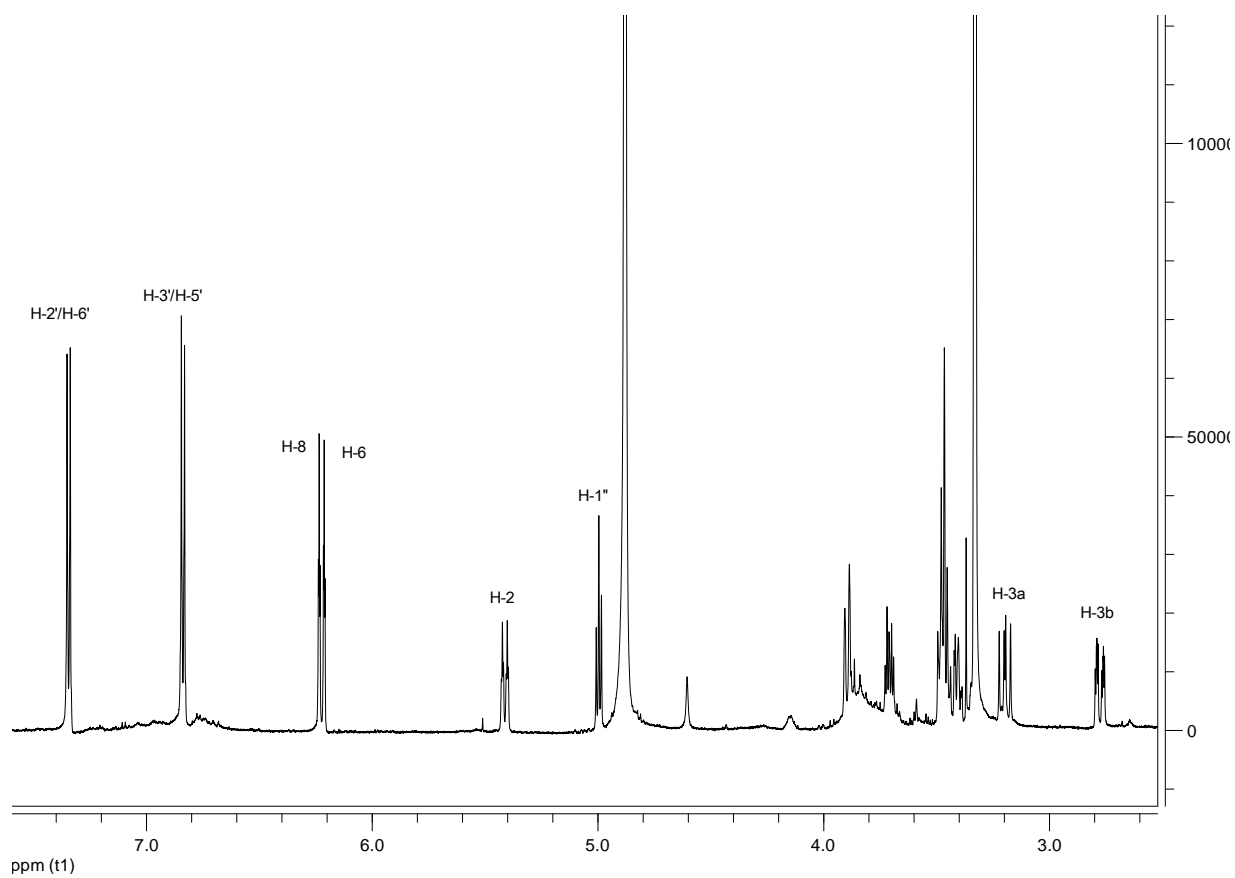
Η εμφάνιση δύο διπλών κορυφών με meta σύζευξη μεταξύ τους στα 6.20 ppm και 6.22 ppm, αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-6 και H-8 του αρωματικού δακτυλίου A.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρούνται στην οξυγονωμένη περιοχή, χαρακτηριστικά σήματα τα οποία αντιστοιχούν σε ένα σάκχαρο και πιο συγκεκριμένα σε μια γλυκόζη όπου το ανωμερικό πρωτόνιο συντονίζεται στα 4.99 ppm ως μια διπλή κορυφή με  $J=6.9$  Hz. Από το φάσμα HMBC, παρατηρείται ότι το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1'') παρουσιάζει  $^3J$  σύζευξη με τον οξυγονωμένο C-7 (165.3 ppm) του φλαβονοειδούς και άρα το σάκχαρο βρίσκεται στην θέση 7 της γενίνης.

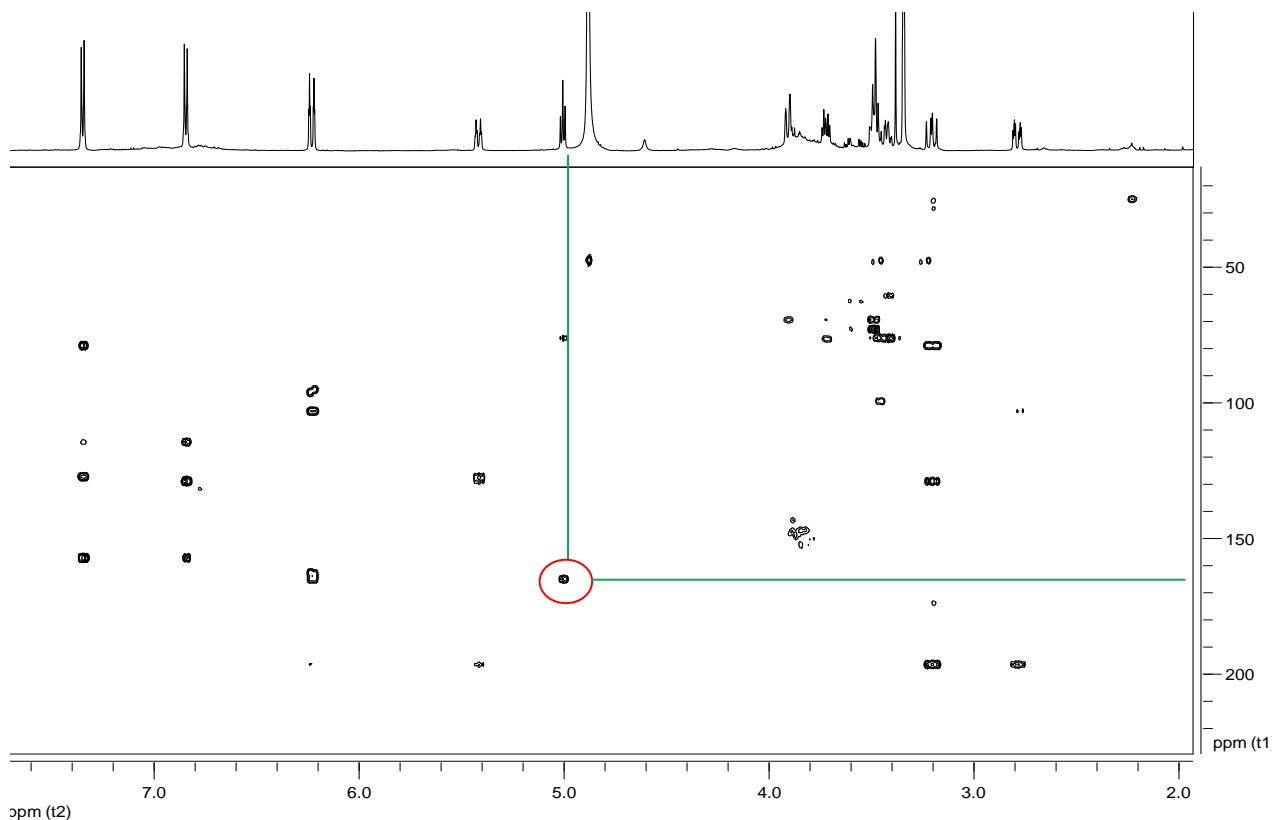
Προσυνή	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (200MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm)
1	-	-
2	5.4 (1H, dt, $J=12.9/2.8$ )	79.3
3	Ha 3.19 (1H, dd, $J=17.1/13.0$ )	44.2
	Hb 2.77 (1H, m)	
4	-	197.1
5	-	163.6
6	6.20 (1H, d, $J=2.1$ )	96.4
7	-	165.3
8	6.22 (1H, d, $J=2.1$ )	95.4
9	-	163.2
10	-	103.6
1'	-	128.9
2'	7.34 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	127.3
3'	6.83 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	114.9
4'	-	157.5
5'	6.83 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	114.9
6'	7.34 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	127.3
1''	4.99 (1H, d, $J=6.9$ Hz)	99.7

2''	3.44 (1H, m)	73.6
3''	3.46 (1H, m)	78.3
4''	3.41(1H, m)	69.9
5''	3.49 (1H, m)	76.9
6a''	3.90 (1H, m)	60.7
6b''	3.70 (1H, m)	

Στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και HMBC του μορίου της προυίνης:



**Εικόνα 23:** Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  του μορίου της προυίνης

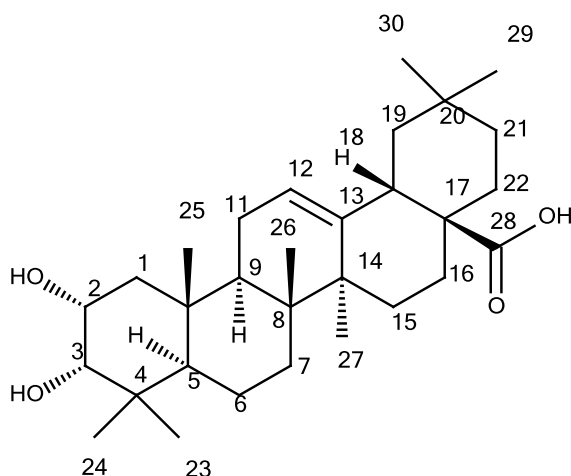


Εικόνα 24: Φάσμα 2D-NMR HMBC του μορίου της προυνίνης

Η προυνίνη εμφανίζει ισχυρή αντιμυκητιακή δράση ως αναστολέας της πατουλίνης, που είναι ένα είδος μυκοτοξίνης (Salas *et al.*, 2012). Επίσης, έχουν γίνει μελέτες που δείχνουν ότι δρα και ως αναστολέας της ανάπτυξης των σιτηρών (Erez *et al.*, 1969).

#### Μεταβολίτης 4: 3-επιμασλινικό οξύ

Ο μεταβολίτης 4 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως λευκού χρώματος από το κλάσμα EZP\_24.





Με συνδυασμό φασματοσκοπικών δεδομένων και σε σύγκριση με βιβλιογραφικές αναφορές, ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως το 3-επιμασλινικό οξύ, που ανήκει στην κατηγορία των τριτερπενίων.

Συγκεκριμένα, στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , εμφανίζεται στα 5.24 ppm το ολεφινικό πρωτόνιο H-12 ως τριπλή κορυφή (t,  $J=3.2$  Hz) λόγω ύπαρξης μεθυλενίου στη θέση 11 και της μεταξύ τους σύζευξης. Με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT, παρατηρείται η ύπαρξη του ολεφινικού άνθρακα C-12 στα 122.3 ppm.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα στα 3.99 και 3.42 ppm, συντονίζονται τα H-2 και H-3, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 68.5 και 83.7 ppm. Η αποθωράκιση των ανθράκων αυτών επιβεβαιώνει την ύπαρξη υδροξυλομάδων στις θέσεις C-2 και C-3.

Επιπλέον, στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρούνται επτά απλές κορυφές που αντιστοιχούν σε μεθυλομάδες και συντονίζονται στα 0.70, 0.80, 0.87, 0.90, 0.90, 0.99 και 1.1 ppm. Οι άνθρακες των μεθυλίων αυτών συντονίζονται στην ευρύτερη περιοχή των 15-30 ppm στο φάσμα HSQC-DEPT.

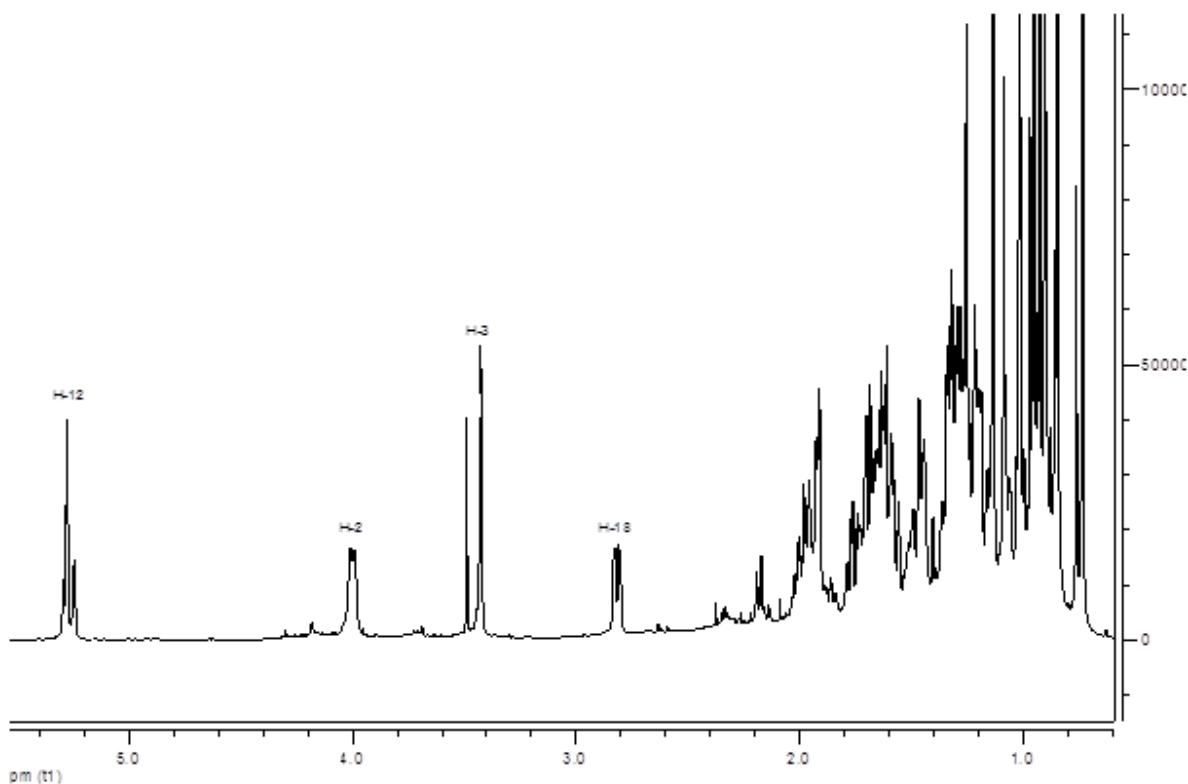
Το γεγονός ότι στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  το πρωτόνιο H-3 εμφανίζεται ως σχεδόν μια απλή ευρεία κορυφή (brs) στα 3.42 ppm, υποδηλώνει ότι το H-3 βρίσκεται στην ίδια κατεύθυνση με το πρωτόνιο της θέσης 2. Συνεπώς πρόκειται για το επιμασλινικό οξύ, καθώς στο μασλινικό οξύ το H-3 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με  $J=9.2$  Hz, όπως αποδεικνύεται από τις βιβλιογραφικές πηγές (Huang *et al.*, 2009), γεγονός που επιβεβαιώνει την axial-equatorial διεύθυνση των πρωτονίων H-2/H-3.

3-επιμασλινικό οξύ	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm)*
1a	1.30	47.6
1b	2.23	
2	3.99	68.5
3	3.42 (1H, brs)	83.7
4	-	39.7
5	1.02	55.8
6a	1.42	18.7
6b	1.53	
7a	1.32	33.1
7b	1.52	
8	-	39.7
9	1.82	48.0
10	-	38.4
11a	2.05	23.6
11b	2.05	
12	5.24 (1H, t, $J=3.2$ )	122.3
13	-	144.7
14	-	42.1

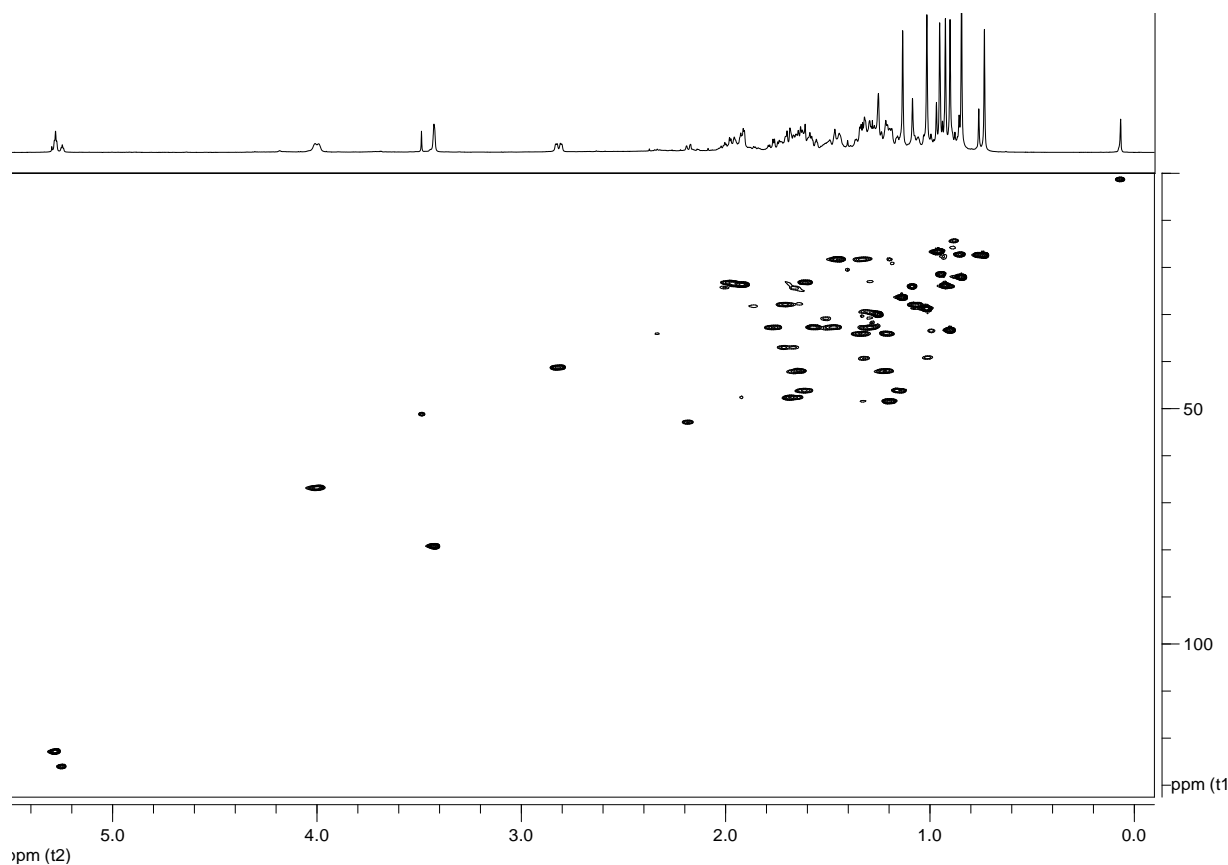
15a	1.22	28.2
15b	1.22	
16a	1.98	23.8
16b	1.98	
17	-	46.5
18	3.27	41.9
19a	1.30	46.3
19b	1.80	
20	-	30.8
21a	1.20	34.1
21b	1.45	
22a	1.82	33.1
22b	2.04	
23	1.25	29.2
24	1.06	17.6
25	0.96	16.7
26	0.99	17.3
27	1.24	26.0
28	-	180.1
29	0.92	33.1
30	0.98	23.6

\*Οι τιμές  $^{13}\text{C-NMR}$  αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Huang *et al.*, 2009) για το μασλιτικό οξύ.

Παρακάτω παρατίθενται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του 3-επιμασλικού οξέος:



Εικόνα 25: Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  του μορίου του 3-επιμασλικού οξέος

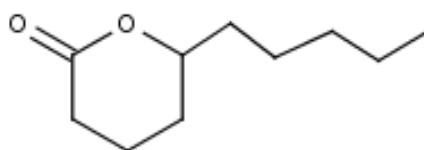


Εικόνα 26: Φάσμα 2D-NMR HSQC του μορίου του 3-επιμασλινικού οξέος

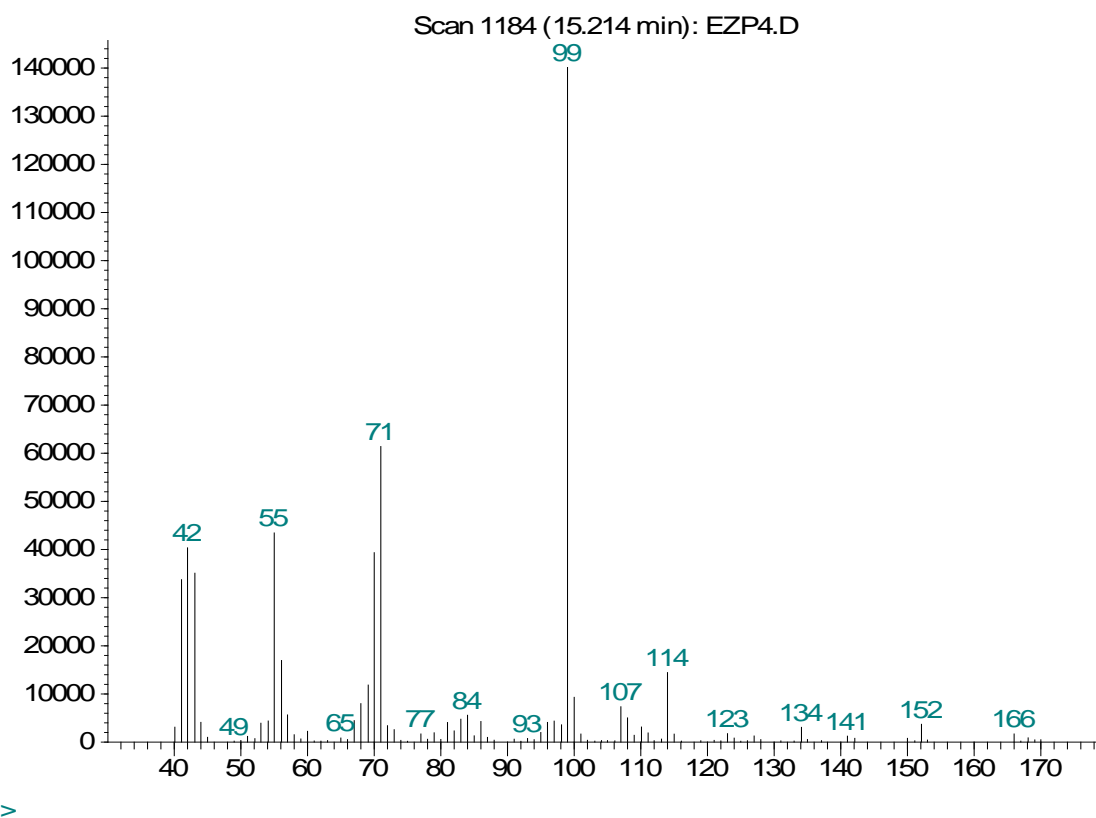
Το 3-επιμασλινικό οξύ είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο και αποτελεί στερεοϊσομερές του μασλινικού οξέος. Εμφανίζει δράση ως αναστολέας του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*Jin et al., 2009*). Δράσεις που εντοπίζονται στο μασλινικό οξύ είναι αυτές του αναστολέα της πρωτεάσης του ιού HIV (*Harput et al., 2004*) και αντιφλεγμονώδης δράση (*Rice-Evans et al., 1996*).

### Μεταβολίτης 5: *δ*-Δεκαλακτόνη

Ο μεταβολίτης 5 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως λευκού χρώματος από το κλάσμα EZP\_4. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS) και βρέθηκε ότι είναι η *δ*-δεκαλακτόνη.



Abundance

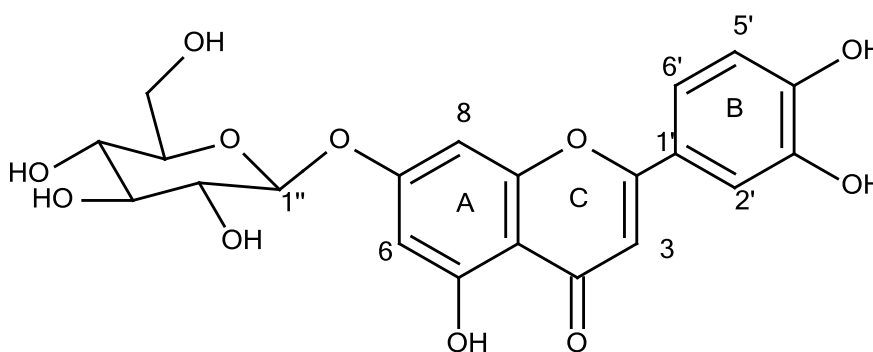


Εικόνα 27: Φάσμα μάζας από GC-MS και χημική δομή της δ-δεκαλακτόνης

Η δ-δεκαλακτόνη έχει τη χαρακτηριστική οσμή της καρύδας (*Keeney et al., 1956*) και είναι υπεύθυνη μαζί με άλλες πτητικές ενώσεις για το άρωμα του ροδάκινου (*Jiaa et al., 2005*).

### Μεταβολίτης 6: *Λουτεολίνη-7-γλυκοσίδης*

Ο μεταβολίτης 6 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως κίτρινου χρώματος από το κλάσμα EZP\_46.



Ανάλυση των δεδομένων από φάσματα 1D και 2D διαστάσεων NMR και φασμάτων μάζας HR-MS, σε συνδυασμό με τις βιβλιογραφικές πηγές, έδειξε ότι ο μεταβολίτης ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και πρόκειται για τον 7-γλυκοσίδη της λουτεολίνης.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ , η ύπαρξη δύο διπλών κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2' (7.42 ppm,  $J=2.1$  Hz) και H-5' (6.92 ppm,  $J=8.3$  Hz) και μιας διπλής διπλής κορυφής που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6' (7.45 ppm,  $J=8.3/2.1$  Hz). Οι κορυφές αυτές ανήκουν σ' ένα τρισυποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , διαφαίνεται η ύπαρξη μιας φλαβόνης, λόγω της χαρακτηριστικής απλής κορυφής που εμφανίζεται στα 6.63 ppm και αντιστοιχεί στο H-3. Η αποθωράκιση των δύο διπλών κορυφών με meta σύζευξη μεταξύ τους που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-6 (6.52 ppm) και H-8 (6.83 ppm) του αρωματικού δακτυλίου A, υποδεικνύει την ύπαρξη ενός υποκαταστάτη στον C-7. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μια γλυκόζη όπου το ανωμερικού H-1'' συντονίζεται στα 5.09 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή με σύζευξη  $J=7.3$  Hz.

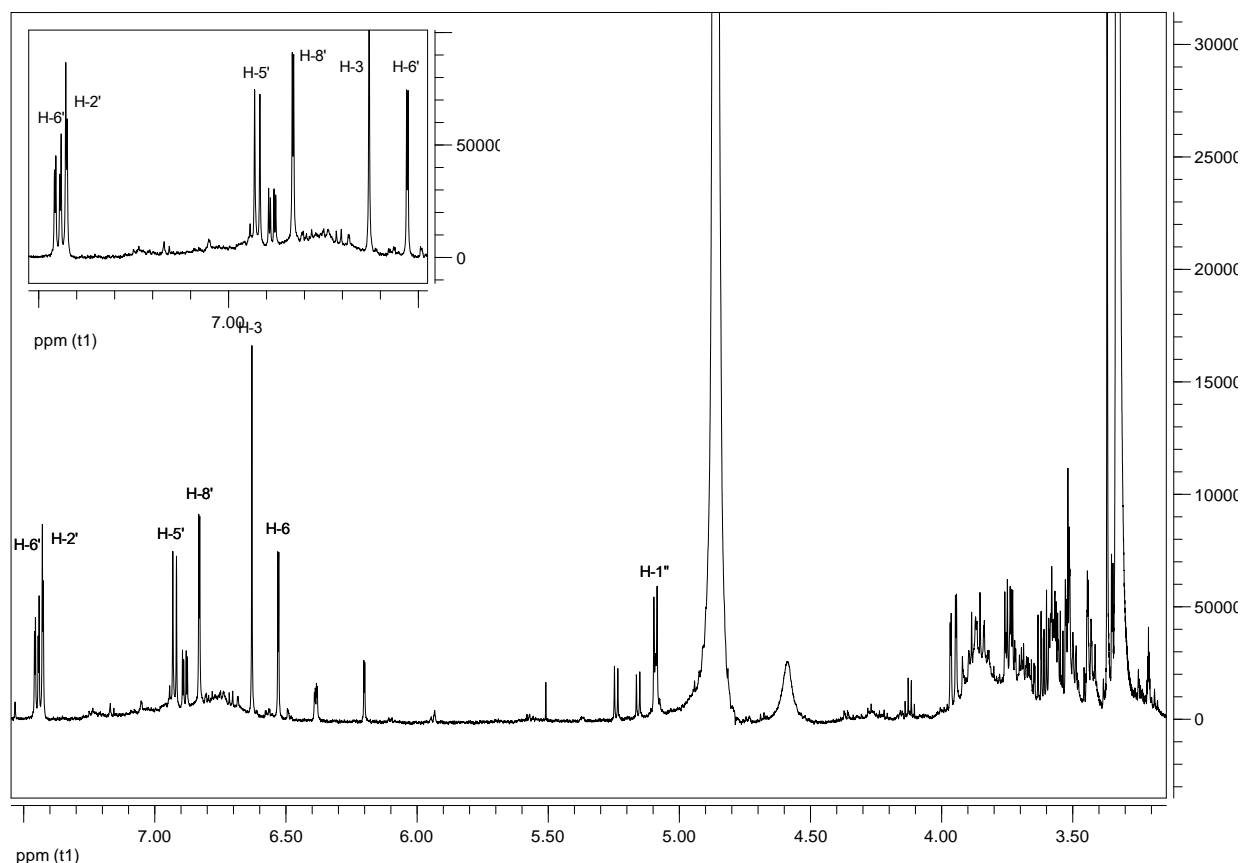
Το γεγονός ότι ο γλυκοσίδης βρίσκεται στη θέση 7 και όχι στη θέση 5 του αρωματικού δακτυλίου A, στηρίζεται σε βιβλιογραφικά δεδομένα που έρχονται σε συμφωνία με τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αν ο γλυκοσίδης συνδεόταν στη θέση 5, θα εμφανιζόταν μεγαλύτερη αποθωράκιση στο H-6 σε σχέση με την αποθωράκιση που παρουσιάζει όταν βρίσκεται στον άνθρακα C-7 (Jung et al., 2012).

Λουτεολίνη-7-γλυκοσίδης	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (200MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm)*
2	-	164.5
3	6.63 (1H, s)	103.5
4	-	181.8
5	-	161.1
6	6.52 (1H, d, $J=2.1$ )	99.8
7	-	163.1
8	6.83 (1H, d, $J=2.1$ )	95.0
9	-	157.0
10	-	105.6
1'	-	121.7
2'	7.42 (1H, d, $J=2.1$ )	113.9
3'	-	145.8
4'	-	149.8
5'	6.92 (1H, d, $J=8.3$ )	116.2
6'	7.45 (1H, dd, $J=8.3/2.1$ )	119.3
1''	5.09 (1H, d, $J=7.3$ )	100.3
2''	3.50 (1H, m)	74.2

<b>3''</b>	3.51	77.6
<b>4''</b>	3.42	70.8
<b>5''</b>	3.43	77.4
<b>6a''</b>	3.94	61.8
<b>6b''</b>	3.57	

\*Οι τιμές  $^{13}\text{C-NMR}$  αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (*Jung et al., 2012*).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη 6:



**Εικόνα 28:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μορίου της λουτεολίνης-7-γλυκοσίδη.

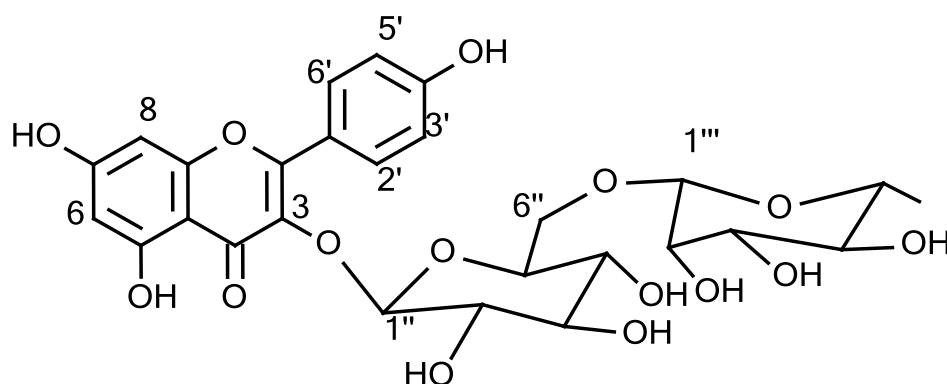
Η λουτεολίνη-7-γλυκοσίδη μπορεί να αναστείλει τα προφίλ μεταγραφής των επιπέδων έκφρασης mRNA της ιντερλευκίνης IL-4, IL-5 και IL-13 στο μυϊκό μοντέλο άσθματος, όπως προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) (*Jin, 2009*).

### Μεταβολίτης 7: **Καιμπερόλη-3-ρουτινοσίδη (Νικοτιφλορίνη)**

Ο μεταβολίτης 7 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως υποκίτρινου χρώματος από το εκχύλισμα EZP\_47.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ουσίας είναι εμφανής η παρουσία μιας φλαβονόλης, λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών της στην αρωματική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται δύο ευρείες απλές κορυφές που συντονίζονται στα 6.19 και 6.39 ppm και

αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A της γενίνης. Οι δυο διπλές κορυφές ( $J=8.2$  Hz) στα 8.08 και 6.90 ppm αντιστοιχούν στα ισοδύναμα πρωτόνια H-2'/H-6' και H-3'/H-5' του B δακτυλίου αντίστοιχα.



Μελετώντας την οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  συμπεραίνουμε την ύπαρξη δύο σακχάρων. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται δυο ανωμερικά πρωτόνια σε  $\delta$  5.12 και 4.53, όπου το πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο αντιστοιχεί στο σάκχαρο που συνδέεται απευθείας με τη γενίνη, ενώ το άλλο, στο σάκχαρο που συνδέεται με την εξόζη.

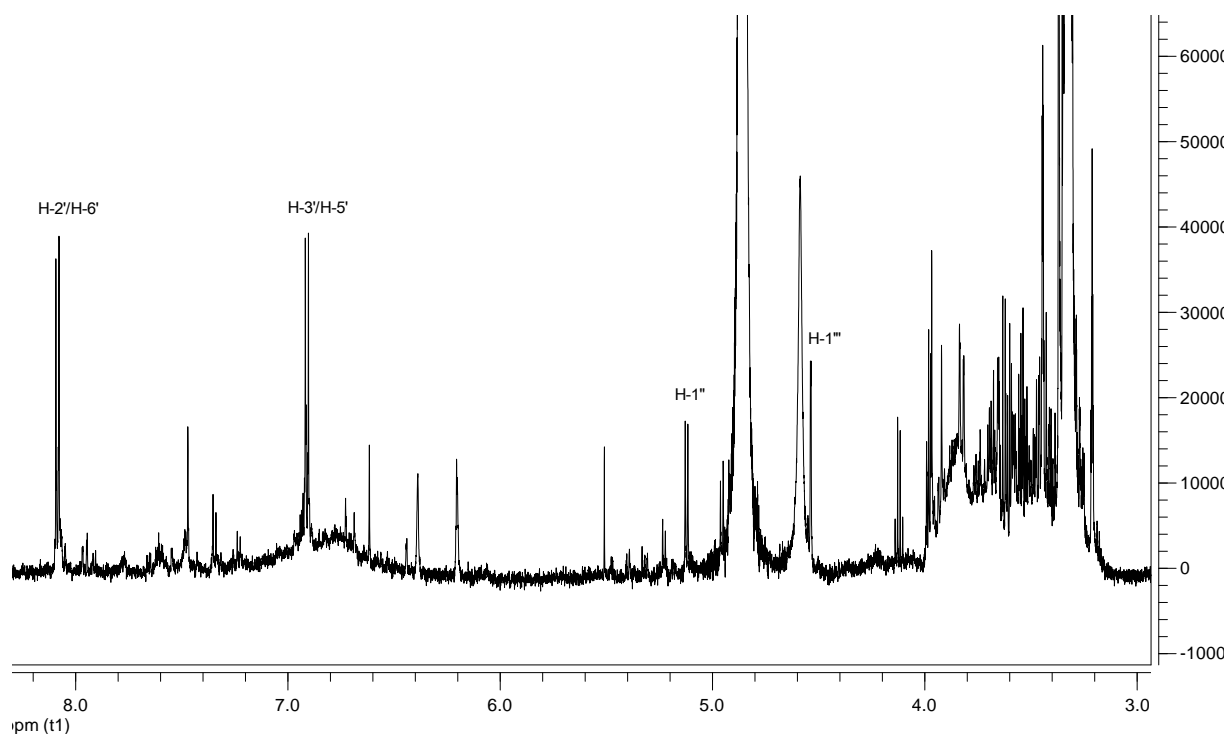
Από τη μελέτη φασμάτων μιας και δύο διαστάσεων πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του πρώτου σακχάρου ως  $\beta$ -γλυκόζη με το δεύτερο σάκχαρο να συνδέεται στη θέση C-6''. Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται από την τυπική αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων της θέσης H-6'', τα οποία συντονίζονται στα 3.81 και 3.38 ppm, όσο και του αντίστοιχου άνθρακα που συντονίζεται στα 68.8 ppm. Το δεύτερο σάκχαρο προσδιορίστηκε ως  $\alpha$ -L-ραμνόζη, καθώς το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή (brs), αλλά και από την παρουσία της μεθυλομάδας που συνδέεται στη θέση C-5''', τα πρωτόνια της οποίας συντονίζονται στα 1.14 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Καιμπφερόλη-3-ρουτινοσίδης	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm)*
1	-	-
2	-	156.56*
3	-	Overlapped*
4	-	177.11*
5	-	161.18*
6	6.19 (1H, s)	100.15
7	-	164.27*
8	6.38 (1H, s)	94.99
9	-	156.20*
10	-	103.71*
1'	-	120.38*

2'	8.08 (1H, d, $J=8.9$ )	132.22
3'	6.90 (1H, d, $J=8.9$ )	115.94
4'	3.31 (1H, m)	159.61
5'	6.90 (1H, d, $J=8.9$ )	115.94
6'	8.08 (1H, d, $J=8.9$ )	132.22
1''	5.11 (1H, d, $J=7.4$ )	104.34
2''	3.45 (1H, dd, $J=9.5/7.4$ )	75.49
3''		74.51*
4''	3.90 (1H, brs)	69.86
5''	3.34 (1H, m)	77.07
6a''	3.81 (1H, brd, $J= 11.1$ )	
6b''		68.57
1'''	4.53 (1H, d, $J=1.5$ )	102.25
2'''	3.64 (1H, brs)	71.79
3'''	3.53 (1H, dd, $J= 9.6/2.3$ )	71.95
4'''		72.40*
5'''	3.44 (1H, m)	68.10
6'''	1.14 (1H, d, $J=6.2$ )	17.04

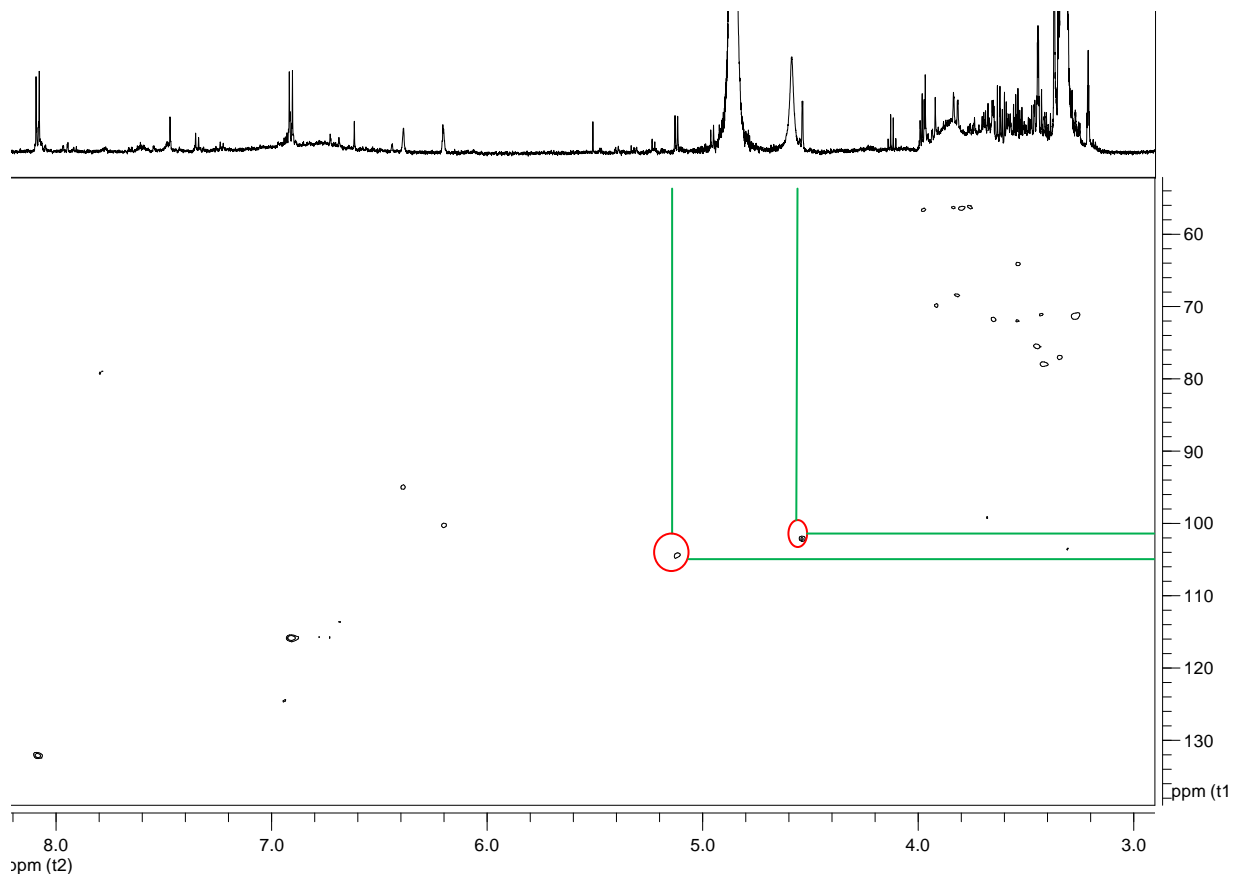
\*Οι τιμές  $^{13}\text{C}$ -NMR αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Deliorman Orhan et al., 2007).

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται το φάσμα της αρωματικής περιοχής του  $^1\text{H}$ -NMR και το φάσμα HSQC-DEPT της περιοχής των σακχάρων του μορίου:



Εικόνα 29: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μορίου της νικοτιφλορίνης.



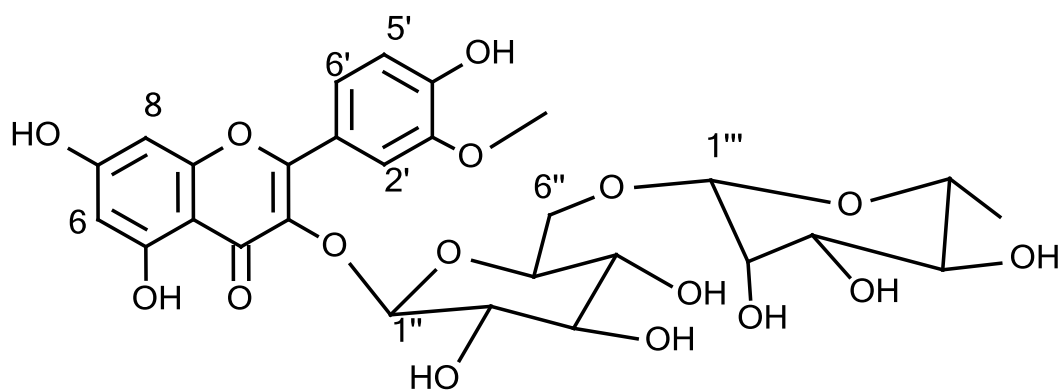


Εικόνα 30: Φάσμα 2D-NMR HSQC του μορίου της νικτιφλορίνης.

Έχει γίνει αξιολόγηση της νικτιφλορίνης σε συστήματα ανάλυσης που έδειξαν ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση (*Deliorman Orhan et al., 2007*), καθώς και δράση σε διάφορες εγκεφαλικές βλάβες.

### Μεταβολίτης 8: *Ισοραμνετίνη-3-O-ρουτινοσίδης*

Ο μεταβολίτης 8 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως υποκίτρινου χρώματος από το εκχύλισμα EZP\_48.



Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε φασματοσκοπικά με τη χρήση του 1D και 2D διαστάσεων NMR και με τη βοήθεια των φασμάτων μάζας HR-MS και πρόκειται για το μόριο *ισοραμνετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδης*.

Από το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ουσίας είναι εμφανής η παρουσία μιας φλαβονόλης, λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών της στην αρωματική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται δύο μικρές διπλές κορυφές που συντονίζονται στα 6.18 και 6.37 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A της γενίνης. Οι δυο διπλές κορυφές στα 7.96 και 6.93 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2' ( $J=2.0$  Hz) και H-5' ( $J=8.4$  Hz) του δακτυλίου B. Η διπλή διπλή κορυφή στα 7.65 ppm ανήκει στο πρωτόνιο H-6' ( $J=8.4/2.0$  Hz) του ίδιου δακτυλίου.

Μελετώντας την οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  συμπεραίνουμε την ύπαρξη δύο σακχάρων. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται δυο ανωμερικά πρωτόνια σε  $\delta$  5.2 και 4.54 ppm, όπου το πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο αντιστοιχεί στο σάκχαρο που συνδέεται απευθείας με το βασικό σκελετό του φλαβονοειδούς, ενώ το άλλο, στο σάκχαρο που συνδέεται με την εξόζη.

Αξιολογώντας τα φάσματα μιας και δύο διαστάσεων πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του πρώτου σακχάρου, που είναι η  $\beta$ -γλυκόζη με το δεύτερο σάκχαρο να συνδέεται στη θέση C-6''. Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται από την αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων της θέσης H-6'', τα οποία συντονίζονται στα 3.84 και 3.41 ppm, όσο και του αντίστοιχου άνθρακα που συντονίζεται στα 68.0 ppm.

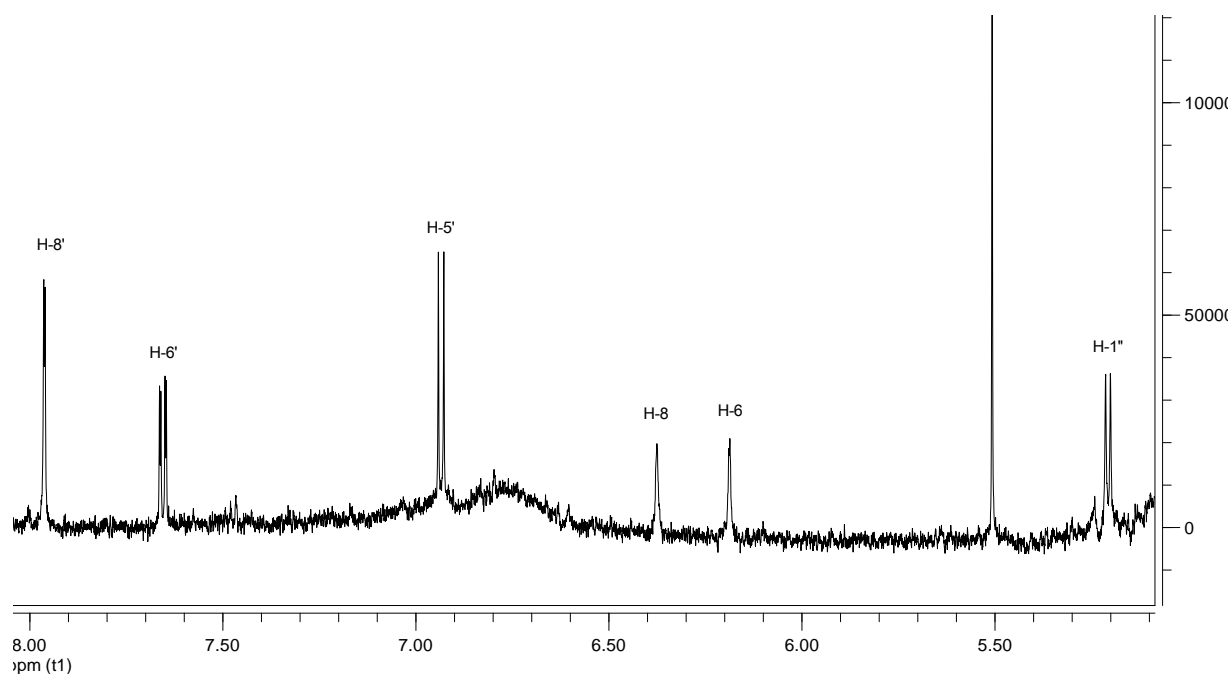
Από τη μελέτη του φάσματος HMQC προσδιορίστηκε ότι το δεύτερο σάκχαρο είναι η  $\alpha$ -L-ραμνόζη παρατηρήθηκε η ύπαρξη οξυγονωμένου άνθρακα στα 102.6 ppm που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο και εμφανίζεται ως επικαλυπτόμενη κορυφή στα 4.54 ppm. Επιπλέον, η ύπαρξη της μεθυλομάδας που συνδέεται στη θέση C-5''', τα πρωτόνια της οποίας συντονίζονται στα 1.12 ppm, είναι χαρακτηριστική του μορίου της ραμνόζης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ισοραμνετίνη-3-ρουτινοσίδης	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm)*
1	-	-
2	-	156.4
3	-	133.3
4	-	179.6
5	-	162.0
6	6.18 (1H, d, $J=1.7$ )	98.7
7	-	164.0
8	6.37 (1H, d, $J=1.7$ )	93.9
9	-	156.2
10	-	105.0
1'	-	122.4
2'	7.96 (1H, d, $J=2.0$ )	112.6

3'	-	148.5
3'-OMe	3.97 (3H, s)	56.8
4'	-	135.1
5'	6.93 (1H, d, $J=8.4$ )	114.5
6'	7.65 (1H, dd, $J=8.4/2.0$ )	124.0
1''	5.20 (1H, d, $J=7.4$ )	105.0
2''	3.48 (1H, m)	76.0
3''	3.37 (1H, m)	77.4
4''	3.28 (1H, m)	71.7
5''	3.44 (1H, m)	78.3
6a''	3.84(1H, d, $J= 1.7$ )	68.6
6b''	3.41(1H, m)	
1'''	4.54 (1H, επικαλύπτεται)	102.6
2'''	3.63 (1H, m)	72.2
3'''	3.51 (1H, m)	72.3
4'''	3.28 (1H, m)	73.9
5'''	3.42 (1H, m)	69.8
6'''	1.12 (1H, d, $J=6.2$ Hz)	17.9

\*Οι τιμές  $^{13}\text{C}$ -NMR αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (*Rice-Evans et al., 1996*).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το φάσμα της αρωματικής περιοχής του  $^1\text{H}$ -NMR:



**Εικόνα 31:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της αρωματικής περιοχής του μορίου της ισοραμνετίνης-3-Ο-ρουτινοσίδη.

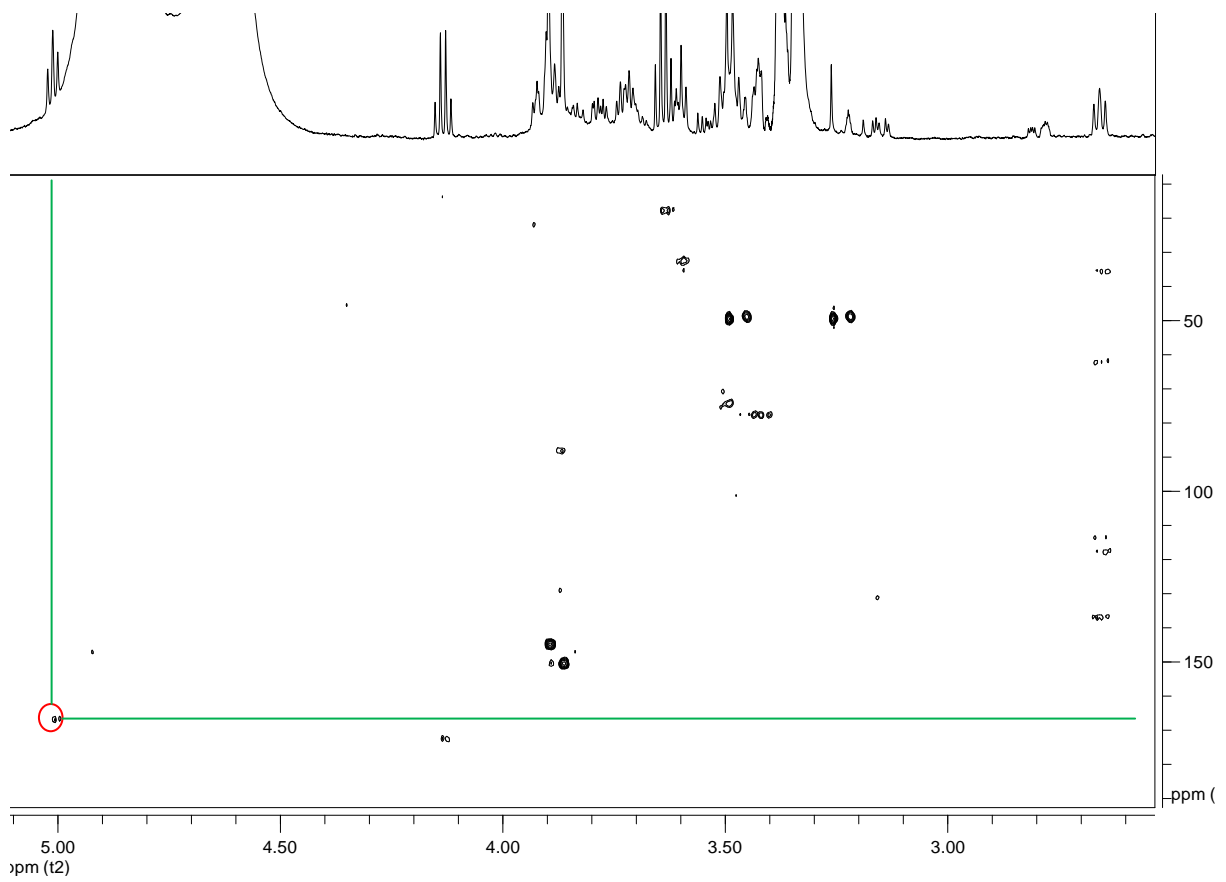
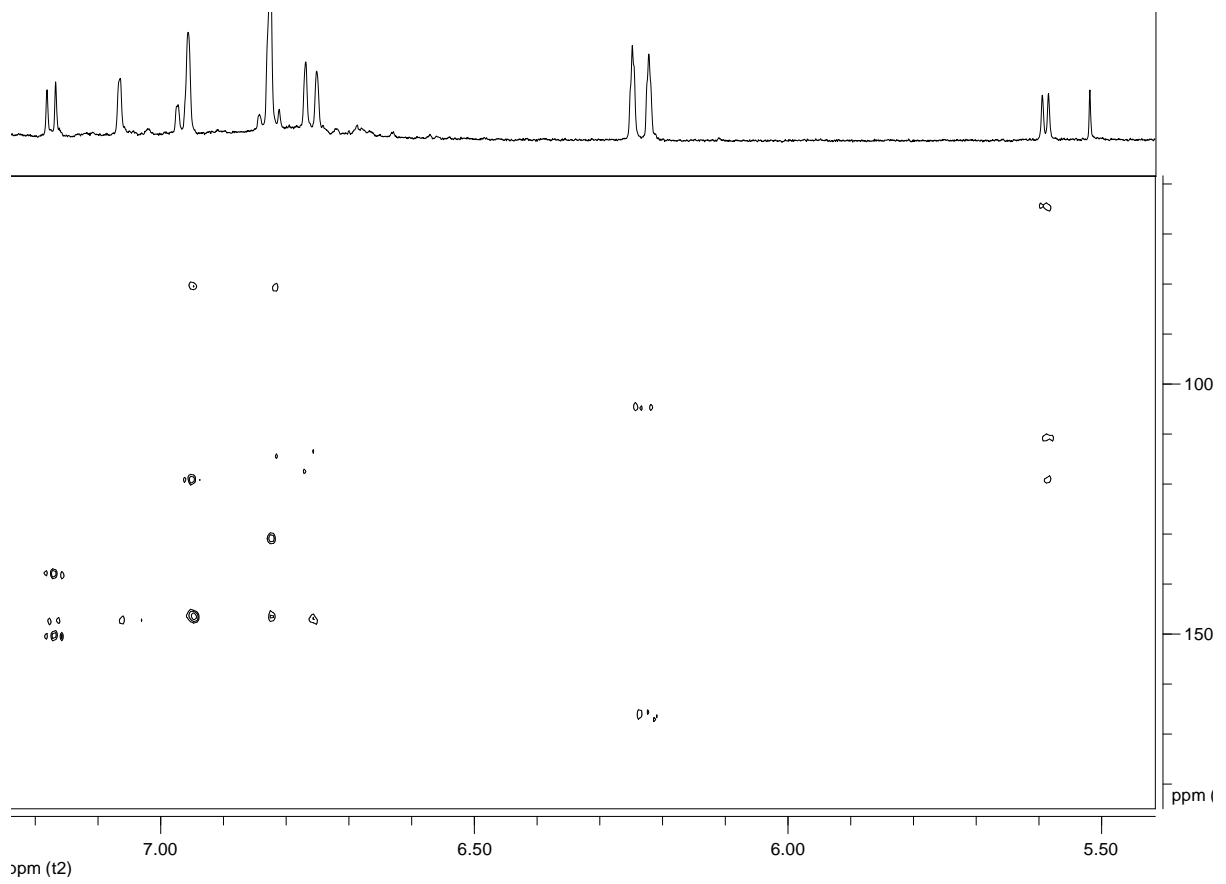
Η ισοραμνετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη εμφανίζει αντιοξειδωτική αλλά και ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυτταρικών σειρών (*Salem et al., 2011*).



Εριοδικτούλη-7-O- γλυκοσίδης	<sup>1</sup> H NMR (600MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, J σε Hz)	<sup>13</sup> C NMR (200MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm)*
<b>2</b>	5.34 (1H, m)	80.4
<b>3a</b>	2.80 (1H, dd, J=17.1/3.0)	43.9
<b>3b</b>	3.15 (1H, dd, J=17.1/12.6)	
<b>4</b>	-	198.6*
<b>5</b>	-	164.9*
<b>6</b>	6.21 (1H, d, J=2.1)	97.7
<b>7</b>	-	165.9
<b>8</b>	6.23 (1H, d, J=2.1)	96.6
<b>9</b>	-	164.6*
<b>10</b>	-	104.5
<b>1'</b>	-	131.0
<b>2'</b>	6.81 (1H, dd, J=8.0/2.1)	116.1
<b>3'</b>	6.81 (1H, d, J=8.0)	119.0
<b>4'</b>	-	147.0*
<b>5'</b>	-	146.6*
<b>6'</b>	6.94 (1H, d, J=2.1)	114.6
<b>1''</b>	4.99 (1H, d, J=6.8)	100.9
<b>2''</b>	3.46 (1H, m)	74.5
<b>3''</b>	3.41 (1H, m)	77.9
<b>4''</b>	3.40 (1H, m)	70.8
<b>5''</b>	3.47 (1H, m)	77.7
<b>6a''</b>	3.89 (1H, m)	62.1
<b>6b''</b>	3.70 (1H, m)	

\*Οι τιμές <sup>13</sup>C-NMR αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Negishi,2003).

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα φάσματα 2D HMBC της αρωματικής περιοχής του μορίου και της περιοχής των σακχάρων:



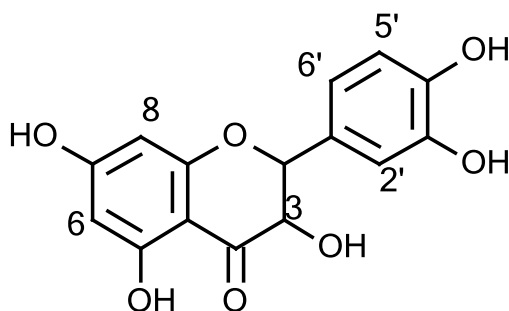
Εικόνες 32-33: Δισδιάστατα φάσματα HMBC του μορίου της εριοδικτύολης-7-Ο-γλυκοσίδη.

Η εριοδικτυόλη-7-O-γλυκοσίδη, είναι ανάμεσα στις πιο ισχυρές ουσίες που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Ο προστατευτικός ρόλος της εριοδικτυόλης-7-O-γλυκοσίδη στην επαγόμενη τοξικότητα της σισπλατίνης μελετήθηκε στην ανθρώπινη νεφρική μεσαγγειακή κυτταρική γραμμή (HRMC). Συνθεραπεία των κυττάρων HRMC με εριοδικτυόλη-7-O-γλυκοσίδη βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των κυττάρων που εκτίθενται σε σισπλατίνη (Hu et al., 2012).

Η σισπλατίνη είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στην θεραπεία των στερεών κακοηθειών. Ωστόσο, ορισμένες σοβαρές παρενέργειες της σισπλατίνης, όπως η νεφροτοξικότητα, η νευροτοξικότητα και η ωτοτοξικότητα, παρεμποδίζουν σημαντικά την χημειοθεραπευτική αποτελεσματικότητά του (Fram, 1992). Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί από τις παρενέργειες που επάγονται από σισπλατίνη δεν έχουν αποσαφηνιστεί, όπως στο οξειδωτικό στρες, η παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) εμπλέκεται στην εξέλιξη ορισμένων παρενεργειών (Dilliogluligil et al., 2005; Kopke et al., 1997; Schaaf et al., 2002).

### Μεταβολίτης 10: Ταξιφολίνη

Ο μεταβολίτης 10 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως κίτρινου χρώματος από το κλάσμα EZP\_10.



Κατόπιν αξιολόγησης του μορίου με χρήση των μονοδιάστατων και δυσδιάστατων φασματοσκοπικών δεδομένων του NMR, καθώς και με τη βοήθεια των φασμάτων μάζας HR-MS, πρόκειται για το μόριο ταξιφολίνη.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ουσίας διαφαίνεται η ύπαρξη μιας φλαβανόλης, λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών του δακτυλίου C στην οξυγονωμένη περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές ( $J=11.4\text{ Hz}$ ) που συντονίζονται στα 4.93 και 4.52 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-3 του δακτυλίου C του φλαβονοειδούς. Δεδομένου της σταθεράς σύζευξης που παρατηρείται τα πρωτόνια βρίσκονται σε trans συσχέτιση μεταξύ τους. Από τη αξιολόγηση των φασμάτων HMBC, επιβεβαιώνεται η  $^2J$  σύζευξη του H-2 με τον άνθρακα C-3 (72.5 ppm) του ίδιου δακτυλίου και η  $^3J$  σύζευξη με τον C-2' του δακτυλίου B που υποδηλώνει ότι αρωματικός δακτύλιος B συνδέεται στη θέση C-2 του δακτυλίου C.

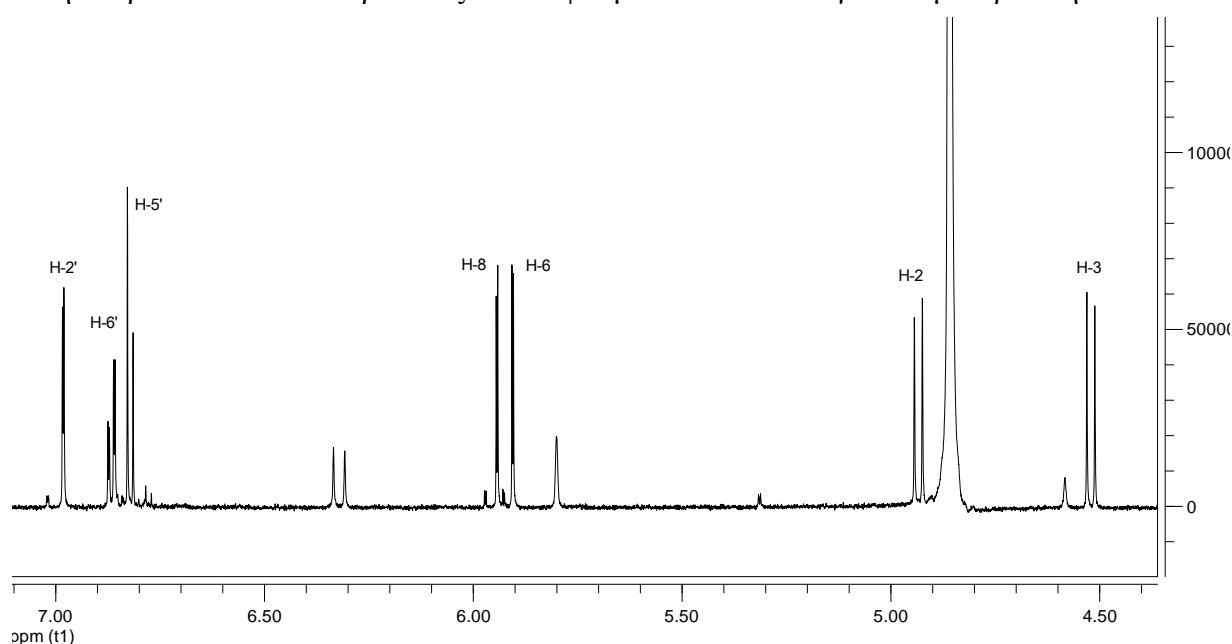
Οι δυο διπλές κορυφές με  $J=2.1$  Hz που συντονίζονται στα 5.90 και 5.94 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A αντίστοιχα.

Η εμφάνιση δυο διπλών κορυφών στα 6.98 και 6.82 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2' ( $J=2.0$  Hz) και H-5' ( $J=8.1$  Hz) του δακτυλίου B. Επιπλέον, παρατηρείται μια διπλή διπλή κορυφή στα 6.86 ppm που ανήκει στο πρωτόνιο H-6' ( $J=8.1/2.0$  Hz) του ίδιου δακτυλίου, ο οποίος είναι τρισυποκατεστημένος. Με βάση το φάσμα HMBC, φαίνεται η ύπαρξη  $^3J$  συζεύξεων του H-6' με τους C-4' και C-2' αντίστοιχα, του δακτυλίου B. Το H-5' εμφανίζει συζεύξεις  $^3J$  με το C-1' (128.5 ppm) και τον C-3' (145.4 ppm).

Ταξιφολίνη	$^1\text{H}$ NMR (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (200MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm)*
2	4.93 (1H, d, $J=11.4$ )	83.7
3	4.52 (1H, d, $J=11.4$ )	72.5
4	-	198.4*
5	-	165.3*
6	5.90 (1H, d, $J=2.1$ )	94.7
7	-	168.7*
8	5.94 (1H, d, $J=2.1$ )	95.9
9	-	164.5*
10	-	100.1
1'	-	128.5
2'	6.98 (1H, d, $J=2.0$ )	114.4
3'	-	145.4
4'	-	145.0
5'	6.82 (1H, d, $J=8.1$ )	114.4
6'	6.86 (1H, dd, $J=8.1/2.0$ )	119.4

\*Οι τιμές  $^{13}\text{C}$ -NMR αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Jin et al., 2009).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το φάσμα του  $^1\text{H}$ -NMR για τον μεταβολίτη 10:



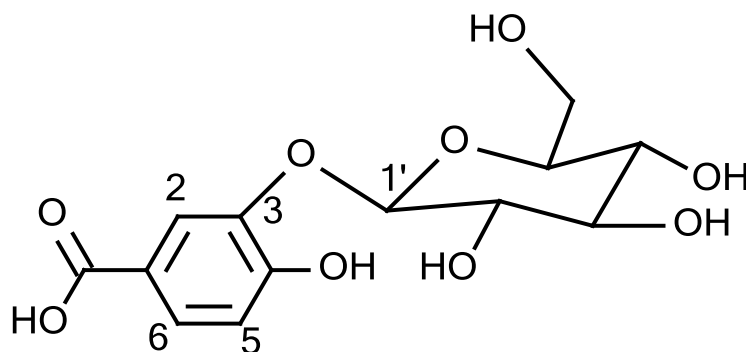
Εικόνα 34: Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR του μορίου της ταξιφολίνης.



Εκτός από την αντιοξειδωτική της δράση, η ταξιφολίνη εμφανίζει δραστικότητα στην προστασία επαναδιάχυσης της εγκεφαλικής ισχαιμικής βλάβης, την αναστολή της σύνθεσης των τριγλυκεριδίων και δρα ως αντιμικροβιακό (Rice-Evans et al., 1996; Theriault et al., 2000; Wang et al., 2006; Young et al., 2007). Η ταξιφολίνη και ο γλυκοζίτης της εμφανίζονται σε διάφορα είδη *Prunus* και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως η ανασταλτική δράση κατά της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αναγωγάσης της αλδόζης (Haraguchi et al., 1997). Επίσης, η ταξιφολίνη αναστέλει τη συσσώρευση σορβιτόλης σε ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια.

### Μεταβολίτης 11: *Πρωτοκατεχικό οξύ 3-O-β-D γλυκοκυρανοσίδης*

Ο μεταβολίτης 11 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως καφέ χρώματος από το εκχύλισμα EZP\_42. Πρόκειται για τον 3-O-γλυκοκυρανοσίδη του πρωτοκατεχικού οξέους.



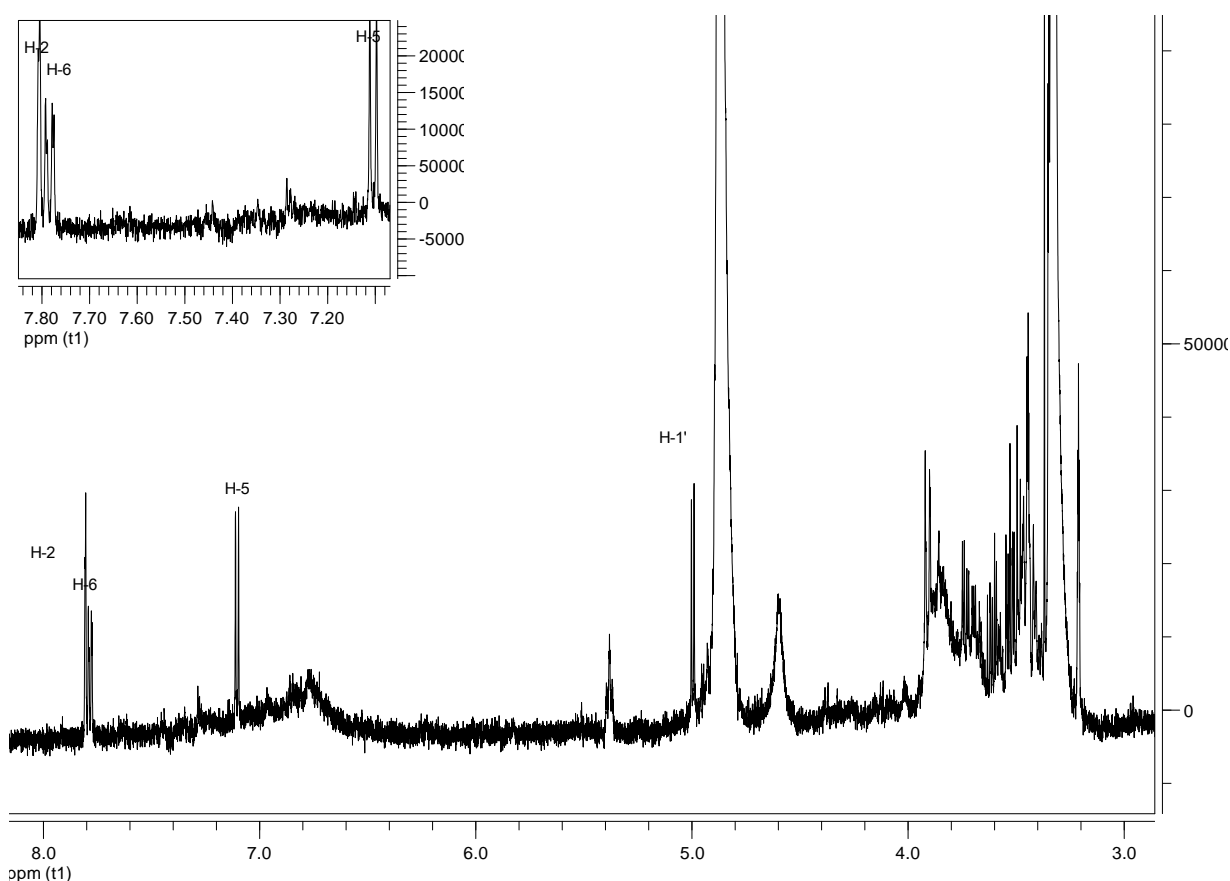
Το μόριο ταυτοποιήθηκε με χρήση φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  όπου είναι χαρακτηριστική η παρουσία τρισυποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου λόγω ύπαρξης κορυφών στην αρωματική περιοχή. Είναι ιδιαίτερος σημαντική η ύπαρξη καρβοξυλίου ( $-\text{COOH}$ ) που συνδέεται στον άνθρακα C-1 (123.2 ppm) του φαινολικού δακτυλίου. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του συγκεκριμένου μεταβολίτη είναι σε πλήρη ταύτιση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Yamanaka et al., 1995).

Πρωτοκατεχικό οξύ 3-O-β-D γλυκοκυρανοσίδης	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ (200MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO} + \text{D}_2\text{O}$ , $\delta$ ppm)*
1	-	123.2
2	7.80 (1H, d, $J=2.1$ )	119.1
3	-	145.9
4	-	152.4
5	7.10 (1H, d, $J=8.5$ )	116.8
6	7.78 (1H, dd, $J=8.5/2.1$ )	126.9
-CO	-	169.4
1'	4.99 (1H, d, $J=7.3$ )	102.9
2'		74.1

3'		77.5
4'	3.35-3.55 (4H, m)	70.5
5'		76.7
6a'	3.73 (1H, dd, $J=12.1/5.1$ )	61.8
6b'	-	

\*Οι τιμές  $^{13}\text{C}$ -NMR αντιστοιχούν στις τιμές της βιβλιογραφίας (Yamanaka et al., 1995).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το φάσμα του  $^1\text{H}$ -NMR για τον μεταβολίτη 11 με μεγέθυνση της αρωματικής περιοχής του φάσματος:



**Εικόνα 35:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μορίου του πρωτοκατεχικού οξέος 3-O-β-D γλυκοπυρανοσίδη.

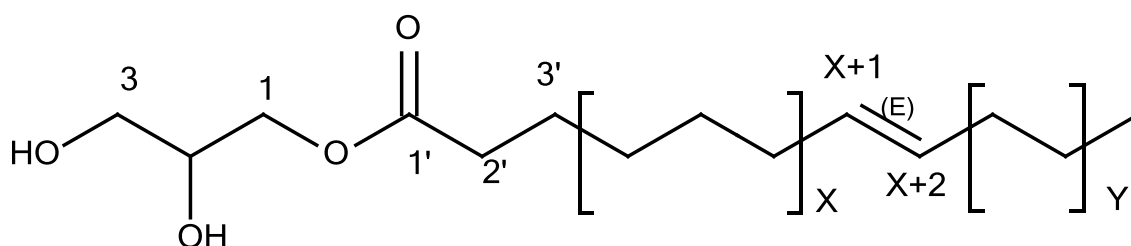
Έρευνες που διεξήχθησαν κατά τα τελευταία χρόνια δείχνουν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συμβατική ιατρική για την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων και κατά του καρκίνου (Masella et al., 1999; Masella et al., 2004; Stagos et al., 2005; Tanaka et al., 1995). Ο μηχανισμός της προληπτικής δράσης του πρωτοκατεχικού οξέος βασίζεται στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, οι οποίες συνιστούν την αναστολή της παραγωγής των ελεύθερων ριζών, καθώς και την ικανότητά τους να δεσμεύουν και να αυξάνουν την καταλυτική δράση των ενδογενών ενζύμων που εμπλέκονται στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Tanaka et al., 2011).

Το πρωτοκατεχικό οξύ προωθεί τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστοκυττάρων και μειώνει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση της

κασπάσης-3 υπό κανονικές συνθήκες. Συνεπώς, το πρωτοκατεχικό οξύ μπορεί να είναι ένας δυνητικός επαγωγέας ανάπτυξης και αναστολέας απόπτωσης για τα νευρικά βλαστοκύτταρα (Guan *et al.*, 2009).

### Μεταβολίτης 12: *Μονογλυκερίδιο 1*

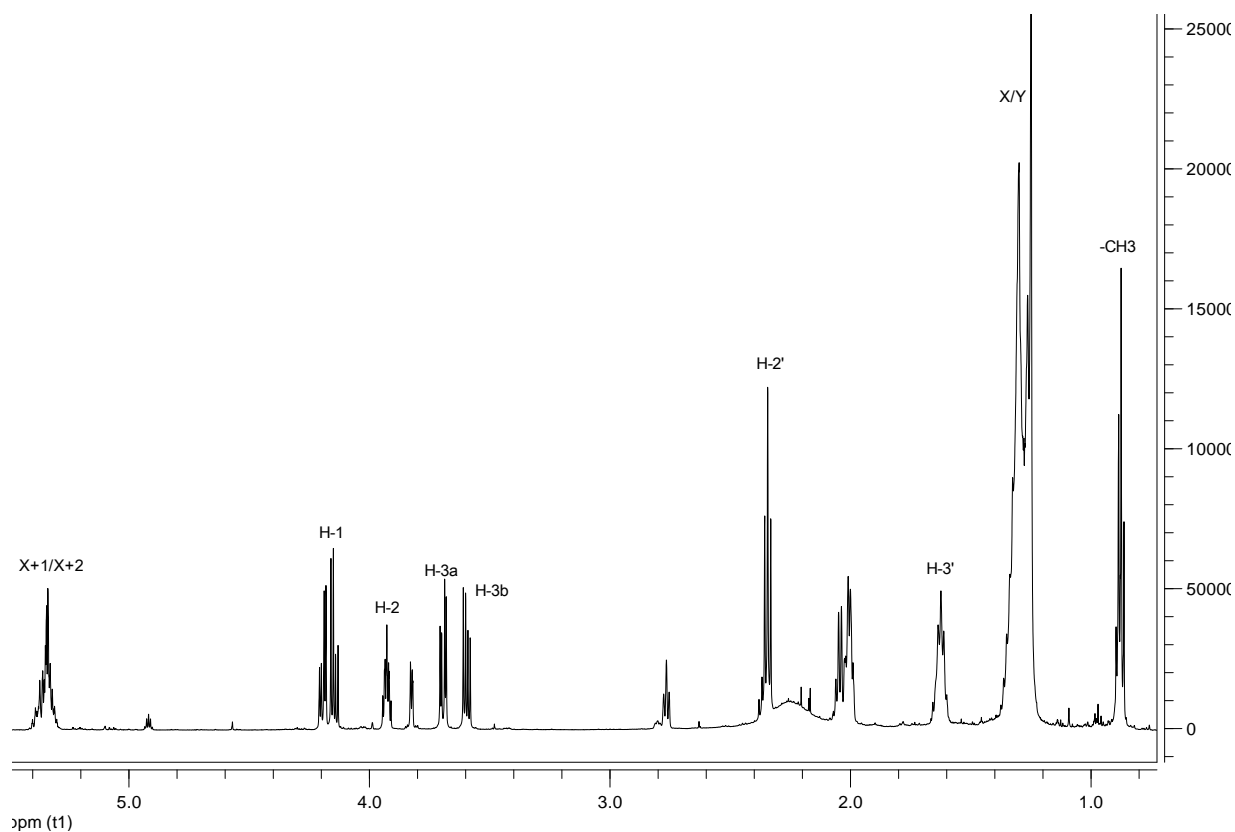
Ο μεταβολίτης 12 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως υποκίτρινου χρώματος από το κλάσμα EZP\_25.



Το μόριο αυτό ταυτοποιήθηκε μερικώς με χρήση των φασματοσκοπικών μεθόδων  $^1\text{H-NMR}$  στο οποίο φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές ενός εστεροποιημένου γλυκεριδίου στη θέση 1 με μια πλευρική αλυσίδα. Η αλυσίδα αυτή φέρει διπλό δεσμό αλλά το μήκος της αλυσίδας όσο και η θέση του διπλού δεσμού δεν έγινε εφικτό να προσδιοριστούν με χρήση φασματομετρίας μάζας (ESI-HR MS).

Μονογλυκερίδιο 1	$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)
<b>1a</b>	4.24 (1H, dd, $J=11.3/4.4$ )
<b>1b</b>	4.20 (1H, dd, $J=11.3/6.0$ )
<b>2</b>	3.96 (1H, m)
<b>3a</b>	3.72 (1H)
<b>3b</b>	3.63 (1H)
<b>1'</b>	-
<b>2'</b>	2.40 (2H, t, $J=7.0$ )
<b>3'</b>	1.65 (2H, m)
<b>X/Y</b>	1.26-1.40 ( $X*2\text{H}$ , m)
<b>X+1/X+2</b>	5.20 (2H, m)
<b><math>\text{CH}_3</math></b>	0.90 (3H, t, $J=7.0$ )

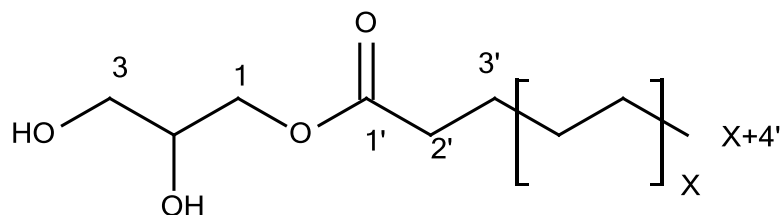
Στην εικόνα που ακολουθεί παρατίθεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μονογλυκεριδίου όπου διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου:



Εικόνα 36: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μορίου του εστεροποιημένου μονογλυκεριδίου.

### Μεταβολίτης 13: *Μονογλυκερίδιο 2*

Ο μεταβολίτης 13 απομονώθηκε σε μορφή κόνεως υποκίτρινου χρώματος από το κλάσμα EZP\_27.

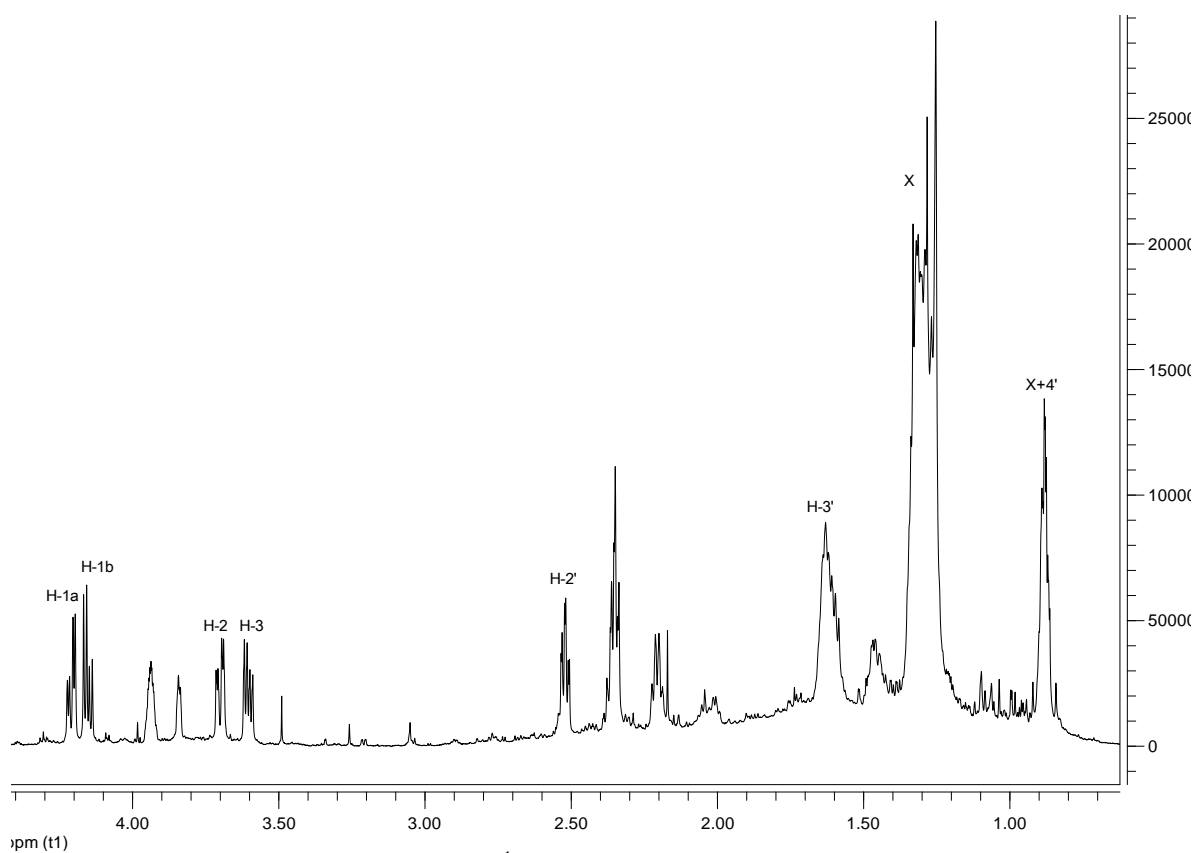


Η ταυτοποίηση του μορίου αυτού έγινε μερικώς με χρήση των φασματοσκοπικών μεθόδων  $^1\text{H}$ -NMR στο οποίο φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές ενός εστεροποιημένου γλυκεριδίου στη θέση 1 με μια πλευρική αλυσίδα. Δεν έγινε εφικτό να προσδιοριστούν με χρήση φασματομετρίας μάζας (ESI-HR MS).

Μονογλυκερίδιο 2	$^1\text{H}$ NMR (600MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm, $J$ σε Hz)
<b>1a</b>	4.14 (1H, dd, $J=11.3/4.4$ )
<b>1b</b>	4.05 (1H, dd, $J=11.3/6.0$ )

2	3.82 (1H, m)
3	3.55 (2H, m)
1'	-
2'	2.60 (2H, t, $J=7.0$ )
3'	1.63 (2H, m)
X	1.28-1.38 (X *2H, m)
X+4'	0.90 (3H, t, $J=7.0$ )

Στην παρακάτω εικόνα παρατηρούμε το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μονογλυκεριδίου και οι χαρακτηριστικές κορυφές του:

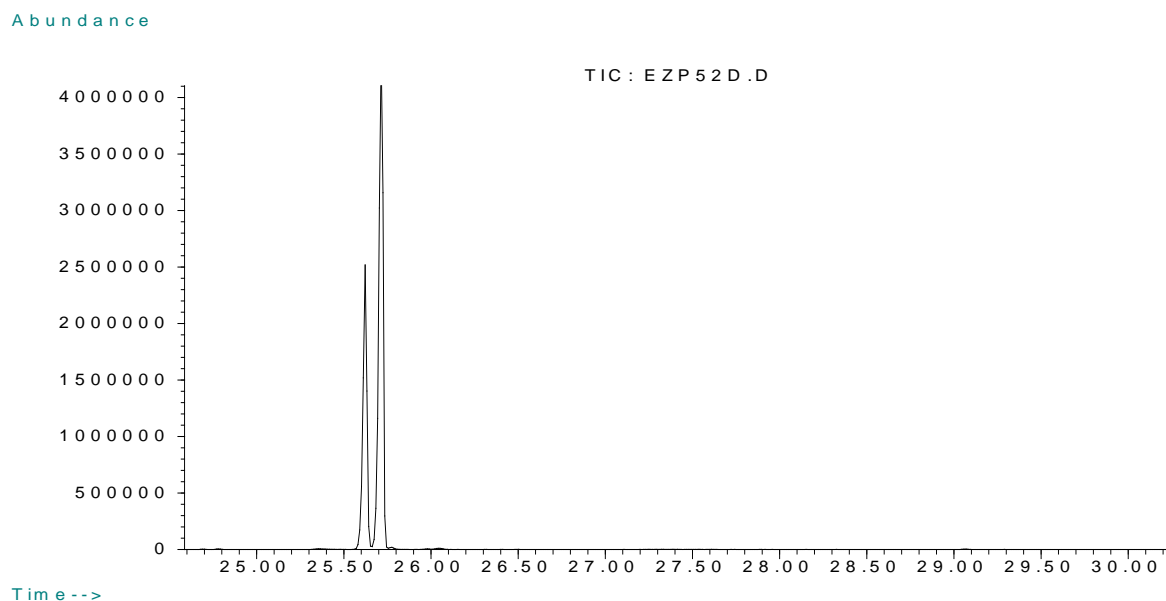


Εικόνα 37: Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  του μορίου του μεταβολίτη 13.

Τα μονογλυκερίδια εμφανίζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως αντιβακτηριακή δράση ενάντια στο *Helicobacter pylori* (Sun et al., 2003). Τα μονογλυκερίδια είναι μη τοξικά, βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα και εμφανίζουν καλή χημική και φυσική σταθερότητα των ενσωματωμένων φαρμάκων και ειδικά στα μακρομοριακά φάρμακα (π.χ. πρωτεΐνες) (Norling et al., 1992; Appel et al., 1994). Μία ευρεία ποικιλία φαρμάκων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες έχουν ενσωματωθεί σε συστήματα παροχής φαρμάκου βασισμένα στα μονογλυκερίδια.

## B.2.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΛΗΦΘΗΚΕ ΜΕ SFE

Για την ταυτοποίηση των συστατικών του ελαίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αέριας χρωματογραφίας – φασματομέτρημα μάζας (GC-MS). Βρέθηκε ότι οι αιθυλεστέρες λινελαϊκού και ελαϊκού οξέος παράγονται σε ποσοστό 33% και 66% αντίστοιχα ενώ σε ποσοστό μόλις της τάξης του 2% ανιχνεύτηκε η ύπαρξη του σκουαλενίου. Το χρωματογράφημα του ελαίου με τη χρήση GC-MS παρατίθεται στην εικόνα 24 και είναι εμφανές ότι τα εν λόγω οξέα αποτελούν τους κύριους μεταβολίτες του εκχυλίσματος.



**Εικόνα 38:** Χρωματογράφημα GC εκχυλίσματος αιθερίου ελαίου που συλλέχθηκε με τη μέθοδο SFE.

### B.2.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Μελετήθηκε το σύνολο των βιομηχανικών παραπροϊόντων του καρπού του *Prunus persica*, το οποίο χωρίστηκε σε φλοιό, πολτό και σπέρμα.
- Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη του φλοιού με τον πολτό, με δύο διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης και βρέθηκε ότι το πιο πλούσιο εκχύλισμα σε δευτερογενείς μεταβολίτες ήταν εκείνο του πολτού.
- Έγινε σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, όπου βρέθηκε ότι η εκχύλιση με 100% νερό ήταν η πιο αποτελεσματική και η πιο φιλική προς το περιβάλλον.
- Η παραπάνω μέθοδος που ήταν πιο αποδοτική χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών του πολτού και σε πιλοτική κλίμακα.
- Με σχετικά απλά βήματα απομονώθηκαν 13 μεταβολίτες εκ των οποίων φλαβόνες όπως η λουτεολίνη (μεταβολίτης 1) και ο 7-γλυκοσίδης της λουτεολίνης (μεταβολίτης 6), φλαβανόνες όπως η προυνίνη (μεταβολίτης 3) και η εριοδουκτιόλη-7-O-γλυκοσίδης (μεταβολίτης 9), φλαβονόλες όπως η καιμπφερόλη-3-ρουτινοσίδης (μεταβολίτης 7) και η ισοραμεντίνη-3-O-ρουτινοσίδης (μεταβολίτης 8), φλαβονόλες όπως η ταξιφολίνη (μεταβολίτης 10), τριτερπένια όπως το 3-επί μασλινικό οξύ (μεταβολίτης 4), φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ (μεταβολίτης 2) και το πρωτοκατεχικό οξύ-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (μεταβολίτης 11), λακτόνες όπως η δ-δεκαλακτόνη (μεταβολίτης 5) αλλά και μονογλυκερίδια (μεταβολίτες 12-13).
- Το ενδοσπέρμιο εκχυλίστηκε με την τεχνολογία των υπερκρίσιμων ρευστών και παρελήφθη το γνωστό και ως «περσικό έλαιο», σε πολύ ικανοποιητικό ποσοστό, το οποίο περιείχε αιθυλεστέρες λινελαϊκού και ελαϊκού οξέος σε ποσοστό 33% και 66% αντίστοιχα.

### B.2.4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

- ✓ Στους μελλοντικούς μας στόχους είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων που απομονώθηκαν από τα απόβλητα, ώστε να μπορέσει να γίνει μελέτη σκοπιμότητας για την αξιοποίησή τους.
- ✓ Η διεξαγωγή μελέτης του εκχυλίσματος των καρποτενοειδών με χρήση χρωματογραφίας υπερκρίσιμων ρευστών (Supercritical Chromatography).





## BIBΛIOΓPAΦIA:

- A) Li A., Z. Quanxing Z. Gencheng C. Jinlong F. Zhenghao. *Chemosphere* **2002**, 47(9): 981-989.; B) Li A., Zhang Q., Chen J., Fei Z., Long C. and Li W. *Reactive and Functional Polymers* **2001**, 49(3): 225-233.
- Abbasi A. M., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Jahan S., Sultana S., Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan, *J Ethnopharmacol* **2010**, 128, 322–335.
- Agalias A.; Magiatis P.; Skaltsounis Al.; Mikros E.; Tsarbopoulos A.; Gikas E., T. *J. Agric. Food Chem* **2007**, 55, 2671-2676.
- Amico, V.; Barresi, V.; Condorelli, D.; Spatafora, C.; Tringali, C. Antiproliferative terpenoids from almond hulls (*Prunus dulcis*): Identification and structure-activity relationships. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 810-814.
- Appel L., Engel K., Jensen J., Rejewski L., Zenter G., An in-vitro model to mimic in-vivo subcutaneous monoolein degradation, *Pharm. Res.* **1994**, 11, 217–225.
- Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S.J.; Das, D.K.; Ray, S.D.; Kuszynski, C.A.; Joshi, S.S.; Pruess, H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, **2000**, 148, 187-197.
- Barmore C., Canned deciduous fruit annual, **2010**, USDA Foreign Agricultural Service.
- Bernhoft A., A brief review on bioactive compounds in plants - Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals, **2010**, Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters.
- Bhattacharjee S.K., Hand Book of Aromatic Plants, 1st ed. *Popular Offset Service Pvt. Ltd.*, Jodhpur, India, **2000**, pp. 119–471.
- Bugianesi Catasta, R.G.; Spigno, P.; D'Uva, A.; Maiani, G.; Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *J. Nutr.*, **2002**, 132, 3349-3352.
- Campbell B. C. and Kim J. H., Agricultural Research Reprint: Western Regional Research Center Research Highlights **2001-2007**.
- Capasso A., Biondi A., Palagiano F., Bonina F.P., Montenegro L., de Caprariis P., Pistorio E., Sorrentino L., Anticonvulsive activity of a new GABA mimetic drug, *European Neuropsychopharmacology* **1997**, 7, 57–63.
- Choi, J.S.; Jung, H.A.; Kim, A.R.; Chung, H.Y., *In vitro* antioxidant activity of some selected *Prunus* species in Korea. *Arch. Pharm. Res.* **2002**, 25, 865- 872.
- Chopra, R.N.; Handa, K.L.; Kapoor, L.D.; Singh, T. *Ind. J. Agric. Sci.*, **1956**, 26, 415.
- Chopra, R.N.; Nayar, S.L.; Chopra, I.C. Glossary of Indian Medicinal Plants (CSIR, New Delhi), **1956**, 205.
- Cooper, D. A. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J Nut*, **2004**, 134(1), 2215–2245.
- De Candolle, A. L'origine delle piante coltivate. Fratelli Dumolard, **1883**, Milan, Italy.

- Deliorman Orhan D., Ergun F., Yeşilada E., Tsuchiya K., Takaishi Y., Kawazoe K., Antioxidant activity of two flavonol glycosides from *Cirsium Hypoleucum* DC. through bioassay guided fractionation, *Turkish J. Pharm. Sci.*, **2007**, 4 (1) 1-14.
- Dillioglugil, M.O., Maral Kir, H., Gulkac, M.D., Ozon Kanli, A., Ozdogan, H.K., Acar, O., Dillioglugil, O., Protective effects of increasing vitamin E and a doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. *Urol. Int.* **2005**, 75, 340–344.
- Erez A. and Lavee S., Prunin Identification, Biological Activity and Quantitative Change in Comparison to Naringenin in Dormant Peach Buds, *Plant Physiol.* **1969**, 44, 342-346.
- Fang, J.; Zhou, Q.; Liu, L.Z.; Xia, C.; Hu, X.; Shi, X.; Jiang, B.H. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression. *Carcinogenesis*, **2007**, 28, 858-864.
- Fleurentina J. and Pelt J.-M., Repertory of drugs and medicinal plants of Yemen, *J Ethnopharmacol*, **1982**, 6, 85 – 108.
- Fram, R.J., Cisplatin and platinum analogues: recent advances. *Curr. Opin. Oncol.* **1992**, 4, 1073–1079.
- Fu, B.; Xue, J.; Li, Z.; Shi, X.; Jiang, B.H.; Fang, J. Chrysin inhibits expression
- Fukuda T., Ito H., Mukainaka T., Tokuda H., Nishino H. and Yoshida T., Anti-tumor Promoting Effect of Glycosides from *Prunus persica* Seeds, *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, 26(2) 271—273.
- Giday M., Teklehaymanot T., Animut A., Mekonnen Y., Medicinal plants of the Shinasha, Agew-awi and Amhara peoples in northwest Ethiopia, *J Ethnopharmacol* **2007**, 110, 516–525.
- Gilani H. A., Aziz N., Ali M. S., Saeed M., Pharmacological basis for the use of peach leaves in constipation, *J Ethnopharmacol*, **2000**, 73, 87–93.
- Guan S., Ge D., Liu T.-Q., Ma X.-H., Cui Z.-F., Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells, *Toxicol in Vitro* **2009**, 23, 201–208.
- Haraguchi, H.; Ohmi, I.; Fukuda, A.; Tamura, Y.; Mizutani, K.; Tanaka, O.; Chou, W.H. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, 61, 651-654.
- Harborne, J.B. (Ed.), 1994. The Flavonoids, Advances in Research since 1986. Chapman & Hall, London.
- Harborne, J.B., Plant polyphenols and their role in plant defence mechanisms. In: Anon (Ed.), Polyphenols 94. INRA, Paris, **1995**, pp. 19±26.
- Hedrick, U.P. The Peaches of New York. J.B. Lyon Company Printers, Albany, New York, **1917**.
- Ho, P.C.; Saville, D.J.; Wanwimolruk, S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2001**, 4, 217-227.
- Howell, A.B. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2002**, 42, 273-278.

- Hu Q., Zhang D. D., Wang L., Lou H., Ren D., Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity, *Food Chem Toxicol* **2012**, 50, 1927–1932.
- Huang Y., Aisa H. A. and Isaev M. I., Isoprenoids of euphorbia sororia. i. Triterpenoids, *Chem Nat Compd*, **2009**, Vol. 45, No. 6.
- Hui-Juan Jiaa *et al.*, Postharvest Biol. Tec., **2005**, 35, 61–68.
- Ibrahim R. and D. Barron.. Phenylpropanoids. *in* P. M. Dey and J. B. Harborne, eds. Methods in plant biochemistry, **1989**, vol. I. Academic Press, San Diego, p 75-111.
- Iliæ, S.B.; Konstantinoviæ, S.S.; Todoroviæ, Z.B. *Series: Physics, Chemistry and Technology*, **2004**, 3, 73.
- Jin M., Yang J.H., Lee E., Lu Y., Kwon S., Son K.H., Son J.K., Chang H.W., Antiasthmatic activity of luteolin-7-O-glucoside from *Ailanthus altissima* through the downregulation of T helper 2 cytokine expression and inhibition of prostaglandin E2 production in an ovalbumin-induced asthma model, *Biol Pharm Bull.* **2009** Sep; 32(9):1500-3.
- Jin Z. H., Chen G., Li F. X., Shen H. Y., Yan K. S., Zhang L., Yang M. and Zhang D. W., *Flavonoids from Rhododendron decorum*, *Chem Nat Compd*, **2009**, Vol. 45, No. 1.
- Jung H. A., Jin S. E., Min B.-S., Kim B.-W., Choi J. S., Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside, *Food Chem Toxicol* **2012**, 50, 2171–2179.
- Kamel B.S., Kakuda Y., Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarine, peach and plum, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, 69,492–494.
- Karlik, L. *Chem. Abst.*, **1962**, 56, 11716.
- Kim, S.K.; Kim, H.J.; Choi, S.E.; Park, K.H.; Choi, H.K.; Lee, M.W. Antioxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (cox-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* thunberg. *Arch. Pharm. Res.*, **2008**, 31, 424-428.
- Kirtkar, K.R.; Basu, B.D. *Indian Medicinal Plants*, M/s Periodicals, New Delhi, **1975**, 2, 959.
- Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2002**, 76, 560-568.
- Kopke, R.D., Liu, W., Gabaizadeh, R., Jacono, A., Feghali, J., Spray, D., Garcia, P., Steinman, H., Malgrange, B., Ruben, R.J., Rybak, L., Van de Water, T.R., Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am. J. Otol.* **1997**, 18, 559–571.
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*, **2005**, 26, 459–516.
- Léger, C.-L. La vitamine E: Etat actuel des connaissances, rôle dans la prevention cardiovasculaire, biodisponibilité. *Ol. Corps Gras. Lipides* **2000**, 7, 235–265.
- Li, Z. Peach germplasm and breeding in China. *HortScience* **1984**, 19, 348–351.
- López-Lázaro M., Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2009**, 9, 31-59.

- Lv P.-C., Li H.-Q., Xue J.-Y., Shi L., Zhu H.-L., Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents, *Eur J Med Chem*, **2009**, 44, 908-914.
- Makarov, V.A. *Chem. Abst.*, **1972**, 76, 138196.
- Masella R, Cantafora A, Modesti D, Cardilli A, Gennaro L, Bocca A, Coni E., Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep* **1999**; 4:113-21.
- Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B., Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr* **2004**; 134:785-91.
- Mertens-Talcott, S.U.; Talcott, S.T.; Percival, S.S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *J. Nutr.*, **2003**, 133, 2669-2673.
- Mezzomo N., Martinez J., Ferreira S.R.S., Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: kinetics, mathematical modeling and scale up. *J Supercritic Fluid* **2009**, 51, 10–16.
- Mezzomo N., Mileo B. R., Friedrich M.T., Martinez J., Ferreira S. R.S., Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition, *Bioresource Technol* **2010**, 101, 5622–5632.
- Ministry of Health and Welfare, “The Japanese Pharmacopoeia 14<sup>th</sup> Edition,” ed. by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan, **2001**, pp. D-803-806.
- Morrow, D.M.; Fitzsimmons, P.E.; Chopra, N.; McGlynn, H. Dietary supplementation with the anti-tumour promoter quercetin: its effects on matrix metalloproteinase gene regulation. *Mutat. Res.*, **2001**, 480-481, 269-276.
- Nagaoka, S., Sawada, K., Fukumoto, Y., Nagashima, U., Katasumata, S. and Mukai, K. Mechanism of prooxidant reaction of vitamin E: Kinetic, spectroscopic, and ab initio study of proton-transfer reaction. *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 6663–6668.
- Nawwar M. A. M., El-Mousallamy A. M. D., Barakat H. H., Buddrus J. and Linscheid M., Flavonoid lactates from leaves of marrubium vulgare, *Phytochem*, 1989, Vol. 28, No. 11, pp. 3201-3206.
- Negishi O., Ozawa T. and Mun'im A., Antioxidative Compounds from *Crotalaria sessiliflora*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **2003**, 67 (2), 410–414.
- Nguyen T. and Nguyen V., “Bioactive principles of the Vietnamese *Eclipta alba* (L.) Hassk (*Asteraceae*)”, *J Chem*, **2006**, 44 (6), 777-781.
- Nishizawa M., Yamagami T., Ohsawa K., (). "Complete nucleotide sequence of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 gene and its inducible promoter". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, 527 (1 Vasoactive In): 87–102.
- Norling T., Lading P., Engstrom S., Larsson K., Krog N., Nissen S.S., Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontol disease, *J Clin Periodontol* **1992**, 19, 687–692.
- Nouis L., Doulias P., Aligiannis N., Bazios D., Agalias A., Galaris D. & Mitakou S., “DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide”, *Free Rad Res*, July **2005**, 39 (7): 787–795.
- Ohigashi, H.; Minami, S.; Fukui, H.; Koshimizu, K.; Mizutani, F.; Sugiura, A.; Tomana, T. Flavanols, as plant growth inhibitors from roots of peach, *Prunus persica* Batsh. cv. 'Hakuto'. *Agric. Biol. Chem.*, **1982**, 46, 2555-2561.

- Ohmura, W.; Doi, S.; Aoyama, M.; Ohara, S. Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *J. Wood Sci.*, **2000**, *46*, 149-153.
- Okie, W.R., Ramming, D.W. and Scorza, R. Peach, nectarine, and other stone fruit breeding by the USDA in the last two decades. *HortScience* **1985**, *20*, 633–641.
- P.G. Keeney and Stuart Patton, *J Dairy Science*, **1956**, Vol.39, 8, 1104–1113.
- Poonam V., Raunak, Kumar G., Reddy L. C.S., Jain R., Sharma S.K., Prasad A.K. and Parmar V.S., Chemical Constituents of the Genus *Prunus* and their Medicinal Properties, *Cur Med Chem*, **2011**, *18*, 3758-3824.
- Reed, J. flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2002**, *42*, 301-316.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.
- Salas M. P., Reynoso C. M., Céliz G., Daz M., Resnik S. L., Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination, *Food Res Intern* **2012**.
- Salem J. H., Chevalot I., Harscoat-Schiavo C., Paris C., Fick M., Humeau C., Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives, *Food Chem* **2011**, *124*, 486–494.
- Sánchez-Vicente Y., Cabañas A., Renuncio J. A.R., Pando C., Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol, *J Supercrit Fluid* **2009**, *49*, 167–173.
- Scalbert, A.; Deprez, S.; Mila, I.; Albrecht, A.M.; Huneau, J.F.; Rabot, S. Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors*, **2000**, *13*, 115-120.
- Schaaf, G.J., Maas, R.F., de Groene, E.M., Fink-Gremmels, J., Management of oxidative stress by heme oxygenase-1 in cisplatin-induced toxicity in renal tubular cells. *Free Radic Res* **2002**, *36*, 835–843.
- Scorza, R., Mehlenbacher, S.A. and Lightner, G.W. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the eastern United States and implications for peach germplasm improvement. *J Am Soc Hortic Sci* **1985**, *110*, 547–552.
- Shah N. C., Herbal folk medicines in Northern India, *J Ethnopharmacol*, **1982**, *6*, 293 – 301.
- Shieber et al., *Innov Food Sci Emerg Technol*, **2003**, *4*, 99-107.
- Sies, H. and Murphy, M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B: Biol.* **1991**, *8*, 211–224.
- Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D., Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* **2005**; *15*:1013-22.
- Steinberg, F.; Bearden, M.M.; Keen, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids
- Sun C.Q, O’Connor C. J, Roberton A. M., Antibacterial actions of fatty acids and against *Helicobacter pylori*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, Vol 36, 1–2, 15 May **2003**, p 9–17.
- Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Mori H. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer* **1995**; *75*: 1433-9.

- Tanaka T., Tanaka T., Tanaka M., Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid, *J Exp Clin Med* **2011**; 3(1):27-33.
- Thacker Christopher, The history of gardens, Berkeley: University of California Press. **1985**, p. 57. ISBN 9780520056299
- Theriault A., Wang Q., Iderstine Van S.C., Adeli, K.F., Modulation of hepatic lipoprotein synthesis and secretion by taxifolin, a plant flavonoid. *J Lipid Res* **2000**, 41, 1969–1979.
- Timmermann, F. Tocopherole – Antioxidative wirkung bei fetten und ölen. *Fat Sci Technol* **1990**, 92, 201–206.
- Tsai S.-J., Chao C.-Y., Yin M.-C., Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice, *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, 670, 441–447.
- Tutin TG., Flora Europaea, **1968**, Vol. 2 - *Rosaceae to Umbelliferae*. Cambridge: C.U.P.
- Vaidyaratnam, P.S.; Varier, P.S.; Nambiar, V.P.K. Indian Medicinal Plants, Orient Longman, **1995**, IV.
- Vavilov, N.I. The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. Selected Writings of N.I. Vavilov. Chronica Botanica Company, **1951**, Waltham, Massachusetts.
- Vickery, M. L. & Vickery, B. Secondary Plant Metabolism. **1981**, *The Macmillan Press Ltd.*, Hong Kong.
- Wang K-H, Lin R-D, Hsu F-L, Huang Y-H, Chang H-C, Huang C-Y, Lee M-H, Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines, *J Ethnopharmacol* **2006**, 106, 353–359.
- Wang, Y.H., Wang, W.Y., Liao, J.F., Liou, K.T., Sung, Y.J., Ko, H.C., Chen, C.F., Hou, Y.C., Chou, Y.C., Shen, Y.C., Protection against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through anti-inflammatory and anti-oxidative effects by taxifolin. *J Biomed Sci* **2006**, 13, 127–141.
- Werneck, H.L. Romischer und vorromischer Wein- und Obstbau in Ostereichischer Donaauraum. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen-Gesellschaft*, **1956**, Wien.
- Willis J.C., *The Wealth of India, Raw Materials*, "A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products" Publications and Importance Directorate-CSIR, New Delhi (India), **1969**, VIII, 264, A dictionary of flowering plants and ferns, revised by H.K. Airyshaw (Cambridge press, 1966).
- Woude, H. van der; Gliszczynska-Swiglo, A.; Struijs, K.; Smeets, A.; Alink, G.M.; Rietjens, I.M. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.*, **2003**, 200, 41-47.
- Yamanaka M., Shimomura K., Sasaki K., Yoshihira K. and Ishimaru K., Glucosylation of phenolics by hairy root cultures of *Lobelia Sessilifolia*, *Phytochem*, **1995**, Vol. 40, No. 4, pp. 1149-1150.
- Young, L.K., Seok, L.K., Hwan, L.C., Antioxidative and antimicrobial effects of taxifolin isolated from a *Cactus Cheonnyeoncho (Opuntia humifusa)*. *Faseb J* **2007**, 21, 844.
- Zhou, Q.; Yan, B.; Hu, X.; Li, X.B., Zhang, J.; Fang, J. Luteolin inhibits invasion of prostate cancer PC3 cells through E-cadherin. *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, 8, 1684-1691.

