



+ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. Λ. ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘ. Ι.ΧΗΝΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ  
ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ (ΦΑΡΜΑΚΑ, ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ, ΕΙΔΙΚΑ  
ΠΡΟΙΟΝΤΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΕΣ)

---

**ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗΣ  
ΠΡΟΠΟΛΗΣ (CAMEROON & CONGO). ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ  
ΔΡΑΣΕΙΣ**



**ΠΑΠΑΧΡΟΝΗ ΔΑΝΑΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

## ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της συγκριμένης ερευνητικής μελέτης αποτέλεσε η χημική ανάλυση (απομόνωση, καθορισμός δομής χημικών συστατικών) τεσσάρων δειγμάτων Αφρικανικής πρόπολης από τις περιοχές **CAMEROON & CONGO** και οι βιολογικοί τους έλεγχοι. Η επιλογή του συγκεκριμένου θέματος έγινε για τους παρακάτω λόγους.

- Η Καθ. Ι. Χήνου και η ερευνητική της ομάδα, μελετούν εκτενώς τους δευτερογενείς μεταβολίτες μελισσοκομικών προϊόντων, ανάμεσα στα οποία και πρόπολη, καθώς και τις βιολογικές της δράσεις (σε επίπεδο πτυχιακών και μεταπτυχιακών εργασιών), με δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε περιοδικά και διεθνή Συνέδρια στην Ελλάδα και το εξωτερικό [Stratis *et al.*, 2002; Chinou, 2004; 2005; 2006; 2007; Melliou & Chinou, 2003; 2004; Μέλλιου, 2005; Στρατής 2005; Melliou *et al.*, 2007; Dania *et al.*, 2008; Σκάρλος, 2008; Popova *et al.*, 2008; 2009i; 2009ii; 2010; Pratsini *et al.*, 2010; Graïkou *et al.*, 2010; 2012; Knapp *et al.*, 2010; 2012; Μάρκος 2010; Κατραμάνου, 2012; Parachroni *et al.*, 2013].
- Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, η χημική σύσταση της πρόπολης από το Cameroon είχε μελετηθεί μόνο μια φορά [Talla *et al.*, 2013], ενώ πολύ πρόσφατα αποτέλεσε και ένα από τα δείγματα μελέτης μιας νέας προσέγγισης για τον προσδιορισμό του χημικού προφίλ της πρόπολης της Αφρικής γενικότερα [Zhang *et al.*, 2014]. Συνεπώς αποτελεί ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα για περαιτέρω χημική μελέτη.
- Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία είναι η πρώτη φορά που μελετάται πρόπολη από το Congo.
- Η πρόπολη γενικά αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ζωικής προέλευσης φυσικά προϊόντα, λόγω των χρήσεων της στη θεραπευτική και στη κοσμετολογία.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που δέχθηκε να κρίνει την εργασία μου:

Καθηγήτρια Σκαλτσά Ελένη

Επίκουρος καθηγητής Μαγιάτης Προκόπιος

Καθηγήτρια Χήνου Ιωάννα (Επιβλέπουσα)

Ευχαριστώ θερμά

- Την Καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου, για την επιλογή του θέματος, την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και υποστήριξη κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, που μου άνοιξε νέους επιστημονικούς δρόμους.
- Την Δρα κα Κωσταντία Γκραίκου, για την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, και τις υποδείξεις της στο εργαστήριο.
- Τον Δρα Δαμιανάκο Χαρίλαο για τις υποδείξεις του στο χειρισμό του οργάνου NMR, καθώς και την σημαντική βοήθεια του στο εργαστήριο.
- Τον Καθηγητή Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου του Ζάγκρεμπ, Κροατίας Ivan Kosalec για τη συνεργασία και την αποστολή των δειγμάτων.
- Την Δρα Ingram Verina, από το Πανεπιστήμιο του Άμστερνταμ, για την συλλογή των δειγμάτων στην Αφρική.
- Τον καθηγητή κ. Αλέξανδρο-Λέανδρο Σκαλτσούνη που έκανε δεκτή την αίτηση μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα του τομέα της Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Τους Καθηγητές του Μεταπτυχιακού προγράμματος του Τομέα της Φαρμακογνωσίας για τις γνώσεις, που μου παρείχαν κατά το πρώτο έτος σπουδών μου.
- Τη μητέρα μου Μαίρη Λάμπρη και τον πατέρα μου Ιωάννη Παπαχρόνη για την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.
- Το Δημήτρη Γκιούρο που με στήριξε σημαντικά και τις φίλες μου Μαριάννα Ορφανού και Έμη Αθανασοπούλου για τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΓΕΝΙΚΟ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	6-48
1.1 ΜΕΛΙΣΣΑ	6-8
1.2 ΠΡΟΠΟΛΗ	9-10
1.2.1 ΔΡΟΓΟΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	10-11
1.2.2 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	11
1.2.3 ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ	12
1.2.4 ΕΙΔΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΥΣΤΑΣΗ	12-27
1.2.5 ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗ ΠΡΟΠΟΛΗ	28-35
1.2.6 ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ	36-42
1.2.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ&ΧΡΗΣΕΙΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ	43
1.3 CAMEROON & CONGO	44-48
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.ΓΕΝΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	49-51
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	49
2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	49
2.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ	50
2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (GC-MS)	50-51
2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)	51
<b><u>2.6ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CONGO (ΔΕΙΓΜΑ1)</u></b>	52-71
2.6.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	52
2.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	53
2.6.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΥΠΕΝΟΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.3)	54-58
2.6.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ β ΑΜΥΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.8-11)	58-61
2.6.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΓΧΟΚΑΡΠΟΛΗΣ Α (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.29)	62-65
2.6.2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 6,8 ΔΙΠΡΕΝΥΛ-ΕΡΙΟΔΙΚΤΥΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.63-64)	66-71
<b><u>2.7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CAMEROON ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΟΚΥ (ΔΕΙΓΜΑ 2)</u></b>	72-85
2.7.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	72
2.7.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	73
2.7.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ Ψ-ΟΞΙΚΗΣ ΤΑΡΑΞΑΣΤΕΡΟΛΗΣ, ΟΞΙΚΗΣ ΤΑΡΑΞΑΣΤΕΡΟΛΗΣ & 3-Ο-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ M6)	74-79
2.7.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΑΝΟΣΤΕΡΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ M13)	80-82
2.7.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 3α-ΥΔΡΟΞΥ-ΟΛΕΑΝ-12-ΕΝ-30-ΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ M22)	83-85

<b><u>2.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CAMEROON ΠΕΡΙΟΧΗΣ NGAOUNDAL (ΔΕΙΓΜΑ 3)</u></b>	86-99
2.8.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	86
2.8.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	87
2.8.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ α-ΑΜΥΡΟΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.5)	88-90
2.8.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ α-ΑΜΥΡΙΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.10)	90-93
2.8.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ α-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.14)	93-96
2.8.2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 1,8-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.20)	96-99
<b><u>2.9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CAMEROON ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΕΚΕΛ (ΔΕΙΓΜΑ 4)</u></b>	100-124
2.9.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	100-102
2.9.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	103
2.9.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ β-ΑΚΕΤΟΞΥ-ΑΜΥΡΙΝΗΣ & ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΠΑΛΜΙΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ΚΛΑΣΜΑ Ε5)	103-106
2.9.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΠΑΧΑΡΑ-12,21-ΔΙΕΝ-3β-ΟΛΗΣ ΚΑΙ ΜΠΕΤΟΥΛΙΝ-ΑΛΔΕΥΔΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ Ε14)	107-113
2.9.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΡΥΘΡΟΔΙΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ Α4)	114-116
2.9.2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 6,8-ΔΙΠΡΕΝΥΛ-ΑΡΟΜΑΔΕΝΔΡΙΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ Α7)	117-120
2.9.2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΕΣΠΕΝΤΕΖΑΦΛΑΒΑΝΟΝΗΣ C (ΚΛΑΣΜΑ Α10)	120-122
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123-124
<b><u>2.10 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ &amp; ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΠΟΛΗΣ</u></b>	125-139
2.10.1 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ	125-132
2.10.2 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΚΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ	132-133
2.10.3 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 1)	134-135
2.10.4 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 2)	135-136
2.10.5 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 3)	136-137
2.10.6 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 4)	138-139
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	139
<b><u>2.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIUCALTEU</u></b>	140-147
2.11.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	140
2.11.1.1 ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	140-142
2.11.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	143-147
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ</u></b>	148-149
ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ & ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	148
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	149

ΠΕΡΙΛΗΨΗ  
SUMMARY  
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

150-153  
154-155  
156-174

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΕΝΙΚΟ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1. ΜΕΛΙΣΣΑ

Οι μέλισσες διακρίνονται σε βασίλισσα, εργάτρια και κηφήνα. Μια τυπική κυψέλη περιέχει μια βασίλισσα, περίπου 60.000 εργάτριες μέλισσες (μη αναπαραγωγικά θηλυκά) και 1000 κηφήνες (αρσενικές μέλισσες) [Δερματόπουλος, 1984]. Πιθανολογείται, ότι το είδος της *Apis mellifera*, πρωτοεμφανίστηκε στην Τροπική Αφρική και ακολούθως στην Νότιο Αφρική, στην Ινδία και την Κίνα και από εκεί στην Ανατολική και Βόρεια Ευρώπη. Η μέλισσα ζει στη Γη περίπου 15 εκατομμύρια χρόνια και θεωρείται από τους πιο παλαιούς κατοίκους που εξακολουθεί να υπάρχει μέχρι σήμερα. Είναι από τα ελάχιστα είδη των εντόμων που ο άνθρωπος προσπάθησε και πέτυχε να εκμεταλλευτεί και να έχει οικονομικό όφελος. Τα τελευταία χρόνια άρχισε η συστηματική διασταύρωση των μελισσών για να δημιουργηθεί ένας νέος τύπος μέλισσας, που θα έχει μέσο μέγεθος, θα είναι πολύ εργατική και θα πολλαπλασιάζεται σχετικά εύκολα την άνοιξη [Κατραμάνου, 2012]. Οι μέλισσες είναι κοινωνικά έντομα που ζουν σε κοινωνίες (κυψέλες) χιλιάδων ατόμων (σμήνος). Συλλέγουν 10 έως 1000 φορές πιο πολύ γύρη από ότι τα άλλα έντομα και έχουν χαρακτηριστεί ως τα πιο σημαντικά έντομα επικονιαστές [Payette, 1996]. Στο είδος της μέλισσας της μελιτοφόρου *Apismellifera*, όπως ονομάζεται η μέλισσα, ανήκουν 3 βασικές ομάδες, Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις μέλισσες της ανατολικής Ασίας, η δεύτερη ομάδα είναι η Ευρωπαϊκή και η τρίτη ομάδα είναι η Αφρικανική [Ruttner, 1988]. Κάθε ομάδα περιέχει ορισμένα υποείδη.

Τα διαφορετικά υποείδη της *Apismellifera* οφείλονται στην αναγκαστική προσαρμογή σε νέο περιβάλλον και στην μακρόχρονη παραμονή τους σε αυτό [Ruttneretal., 1978]. Σύμφωνα με τις μορφομετρικές μελέτες [Al-Ghamdi et al., 2013], τα υποείδη της *Apismellifera* ειδικά στην Αφρικανική ήπειρο είναι:

- *Apismellifera adansonii*
- *Apismellifera scutellata*
- *Apismellifera lamarckii*
- *Apis mellifera monticola*
- *Apis mellifera intermissa*
- *Apismellifera capensis*
- *Apismellifera jemenitica*
- *Apis mellifera litorea*
- *Apis mellifera sahariensis*
- *Apis mellifera unicolor*



Εικόνα1.Ενδεικτικός χάρτης εξάπλωσης Αφρικανικής μέλισσας

### ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ

Βασίλειο(Kingdom)	Animalia
Φύλλο(Phylum)	Arthropoda
Κλάση (Classis)	Insecta
Τάξη (Ordo)	Hymenoptera
Οικογένεια(Familia)	Apiidae
Γένος(Genus)	<i>Apis</i>
Είδος (Species)	<i>Apis mellifera</i>
Υποείδη (Subspecies)	<i>Apis mellifera adansonii</i> , <i>Apis mellifera scutellata</i>



### ***Apismellifera adansonii* (Latreille)**

Το συγκεκριμένο υποείδος της μέλισσας της μελιτοφόρου, χαρακτηρίζεται από μεγάλη επιθετικότητα γι' αυτό και οι μελέτες που έχουν γίνει σε αυτό είναι λίγες. Η συμπεριφορά της είναι παρόμοια με αυτήν της *Apismellifera scutellata*, ενώ πολλές φορές αυτά τα δυο υποείδη (*adansonii* και *scutellata*) συγχέονται από τους επιστήμονες [Winston, 1991]. Η *Apismellifera adansonii* ζει και αναπαράγεται στην Κεντρική Αφρική και συγκεκριμένα στις χώρες: Nigeria, Burkina-Faso και Cameroon. Εμφανίζει μια ιδιαίτερη προτίμηση για συλλογή νέκταρος στα γένη των φυτών *Eucalyptus* sp., *Coffea* sp., *Bidens* sp. και *Terminalia* sp. [Dongock et al., 2007] αλλά και στα φυτικά είδη *Combretum nigricans*, *Erythrina sigmoidea*, *Lannea kerstingii* και *Vernonia amygdalina* [Fohouo et al., 2010].

### ***Apismellifera scutellata* (Lepeletier)**

Η *Apismellifera scutellata* είναι γνωστή και ως δολοφόνος μέλισσα λόγω της επιθετικότητάς της. Στην Αφρική τη συναντάμε κυρίως στην περιοχή της Λαϊκής Δημοκρατίας του Congo. Μορφολογικά μοιάζει με την κοινή Ευρωπαϊκή μέλισσα, αλλά είναι μικρότερη σε μέγεθος [Kaplan, 2004]. Το χρώμα της είναι κίτρινο, με έντονες μαύρες ραβδώσεις και εμφανίζει τις εξής διαφορές σε σχέση με τη μέλισσα που συναντάται σε εύκρατα κλίματα [Schneider & McNally, 1992]:

- Αναπαράγεται 6 έως 12 φορές το χρόνο, σε αντίθεση με τα είδη της μέλισσας σε εύκρατα κλίματα που αναπαράγονται 1 έως 3 φορές το χρόνο και μόνο κατά την περίοδο του χειμώνα.
- Εμφανίζει έντονα την τάση μετανάστευσης προς άλλα μέρη (έλλειψη φαγητού, επίθεση άλλων ζώων, εποχικοί λόγοι).
- Αποθηκεύει ελάχιστη ποσότητα φαγητού, ανάλογα με την εποχή, σε αντίθεση με τα άλλα είδη μέλισσας σε εύκρατα κλίματα.



**Εικόνα 2. *Apis mellifera adansonii* & *Apis mellifera scutellata***

## 1.2 ΠΡΟΠΟΛΗ

Η πρόπολη είναι κολλώδης ουσία, που παράγουν οι μέλισσες, από τη συλλογή ρητινώδων εκκρίσεων από τους φλοιούς φυτών τις οποίες εμπλουτίζουν με κερί, γύρη και ένζυμα. Η ονομασία της δόθηκε από τους αρχαίους Έλληνες. Η λέξη Πρόπολη αποτελείται από την πρόθεση προ και το ουσιαστικό πόλις. Η πρόπολη τοποθετείται προ της πόλεως, δηλαδή στην είσοδο της κυψέλης [Ghisalberti,1979]. Οι μέλισσες τη χρησιμοποιούν σαν δομικό υλικό για να προστατέψουν την κυψέλη. Εκείνο που επιτυγχάνεται με τη χρήση της πρόπολης από τη μέλισσα, είναι η απόλυτη οχύρωση και αποστείρωση της κυψέλης.

### **Τρόπος παραγωγής πρόπολης**

Οι εργάτριες για να παρασκευάσουν την πρόπολη, συλλέγουν ενεργά εκκρίματα φυτών ή εκκρίματα που έχουν δημιουργηθεί έπειτα από κάποιο τραυματισμό του φυτού (λιπόφιλες ύλες στα φύλλα, κολλώδεις εκκρίσεις, κόμμεα, ρητίνες, κτλ). Οι μέλισσες χρησιμοποιούν τις γνάθους τους για την συλλογή αυτών των υλών, ενώ ταυτόχρονα τις αναμειγνύουν με σάλιο, κηρούς και άλλα ενζυματικά εκκρίματα. Όλα τα είδη λεύκας (*Populus* sp.), σημύδας (*Betula* sp.), ιτιάς (*Salix* sp.), βελανιδιάς (*Quercus* sp.), ιπποκαστανιάς (*Aesculus* sp.), ευκαλύπτου (*Eucalyptus* sp.) και όλα τα κωνοφόρα (*Pinus*, *Cupressus*, *Abies*), είναι κυρίως εκείνα που «προσφέρουν» ρητίνες που χρησιμεύουν στην παρασκευή πρόπολης από την μέλισσα [Κατραμάνου, 2012]. Η πρόπολη που παρασκευάστηκε με αυτήν την διαδικασία, μεταφέρεται στη συνέχεια στη κυψέλη σε μορφή μικρών σταγόνων, μέσα σε ειδικούς υποδοχείς που έχουν οι εργάτριες μέλισσες στα πίσω τους πόδια [Castaldo *et al.*, 2002]. Ακόμη η ίδια η μέλισσα αλείφει το σώμα της με αυτήν την ουσία, για να προστατέψει τον εαυτό της από τους φυσικούς της εχθρούς [Χαριζάνης, 1992; Januzzi, 1993]. Το είδος της μέλισσας που συλλέγει το υλικό από το οποίο παράγεται η πρόπολη είναι η *Apis mellifera*. Τα Ασιατικά είδη *Apis* δεν παράγουν πρόπολη. Επίσης έχει αναφερθεί ότι το είδος *Meliponine*, ή μέλισσες χωρίς κεντρί, παράγει μία παρόμοια ρητινώδη ουσία. Αξίζει να αναφερθεί ότι στη Βενεζουέλα καθώς και στις τροπικές περιοχές της νότιας Αμερικής υπάρχουν γηγενείς μέλισσες που συλλέγουν ρητινώδεις ύλες από τα φυτά και τις αναμειγνύουν με κερί και χόμα για να παράγουν ένα άλλο είδος πρόπολης, τη γεωπρόπολη [Bankova *et al.*, 1998ii; Castaldo *et al.*, 2002; Σκάρλος, 2008; Μάρκος, 2010].

## **Ρόλος της πρόπολης στη κυψέλη**

Οι μέλισσες χρησιμοποιούν την πρόπολη για τους εξής λόγους:

- Για την προστασία της εισόδου της κυψέλης από εισβολείς [όπως: κηρόσκωροι, πεταλούδες, σφήκες, σαλιγκάρια ακόμη και ποντίκια].
- Για τη σφράγιση σχισμών της κυψέλης.
- Για θερμορύθμιση της κυψέλης
- Για λείανση επιφανειών και προστασία των φτερών της μέλισσας από κοψίματα- σχισίματα.
- Για «βαλσάμωμα» του πτώματος οποιουδήποτε «εισβολέα» της κυψέλης, που οι μέλισσες μπορεί να σκοτώσουν αμυνόμενες, αλλά δεν θα μπορούν να τον μεταφέρουν έξω. Το βαλσάμωμα είναι τόσο τέλει ώστε το σώμα-πτώμα παραμένει ανέπαφο χωρίς να αποσυντίθεται για τουλάχιστον 5 χρόνια.
- Για αντισηψία της κυψέλης. Με πρόπολη γίνεται η επίχριση όλων των κελιών του γόνου, πριν περάσει η βασίλισσα και τοποθετήσει τα αυγά της. Επίσης με ένα λεπτό στρώμα πρόπολης καλύπτονται όλα τα εσωτερικά τοιχώματα της κυψέλης ή της οποιασδήποτε κοιλότητας [Bankova *et al.*, 2000i].

### **1.2.1 ΔΡΟΓΟΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Η πρόπολη χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο, από την αρχαιότητα, ως αντισηπτικό, αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες φυσικό προϊόν. Οι θεραπευτικές ιδιότητες της έχουν καταγραφεί από πλήθος αρχαίων λαών. Στις γραφές αναφέρεται τόσο η πρόπολη, όσο και το μέλι για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες από τον προφήτη Ιερεμία. (1700π.Χ). Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι με τη σειρά τους γνώριζαν τις αντισηπτικές ιδιότητες της πρόπολης και τη χρησιμοποιούσαν για την ταρίχευση πτωμάτων (μούμιες). Έμμεση είναι η αναφορά της σε Αιγυπτιακά χειρόγραφα ως «μαύρο κερί» (1550π.Χ) [Kuropatnicki *et al.*, 2013] ενώ αναφέρεται για πρώτη φορά η χρήση της για παθήσεις στομάχου και ήπατος από τον Αλέξανδρο τον Τραλλιανό τον 6<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. [Golder, 2004]. Ο Ιπποκράτης (460-377π.Χ) συνιστούσε την επάλειψη με πρόπολη για την επούλωση των πληγών, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστές οι μέθοδοι συλλογής της. Στο βιβλίο «Περί ζώων ιστορίας» (IX) που γράφτηκε την περίοδο 344-342π.Χ πιθανότατα από κάποιο μαθητή του Αριστοτέλη, αναφέρεται η έννοια «μύτις», που θεωρείται ότι ήταν η πρόπολη, ως θεραπευτικός παράγοντας για μελανιές και για πληγές. Με βάση το Ρωμαίο φιλόσοφο Varro (116 π.Χ), η πρόπολη χρησιμοποιούνταν από φυσιδίφες για την παρασκευή καταπλάσμάτων, γι' αυτό και ήταν και

πιο ακριβή από το μέλι [Kuropatnicki *et al.*, 2013]. Ο Κορνήλιος Κέλσος, τον 1<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ, ανέφερε στο έργο του *De Medicina* τη χρήση της πρόπολης για τη θεραπεία αποστημάτων [Spencer, 1971]. Επιπλέον σε Περσικά χειρόγραφα η πρόπολη χαρακτηρίζεται ως φάρμακο κατά εκζεμάτων, μυαλγιών και ρευματικών παθήσεων [Kuropatnicki *et al.*, 2013]. Ο Ρωμαίος φιλόσοφος Πλίνιος (23-79μ.Χ), στο έργο του «Φυσική ιστορία», αναφέρει ότι οι γιατροί χρησιμοποιούσαν την πρόπολη ως καταπραυντικό πόνων, επουλωτικό πληγών, και ως αντιφλεγμονώδες. Η θεραπευτική της χρήση ήταν γνωστή στο Διοσκουρίδη (40-90μ.Χ) καθώς και στο Γαληνό (130-200μ.Χ) [Κατραμάνου, 2012].

Ο διάσημος ιατροφιλόσοφος Αβικέννας, τον 11ο αιώνα είχε παρατηρήσει ότι η πρόπολη δρα αποτελεσματικά σε τραυματισμούς από βέλη τόξων κατά τη διάρκεια πολεμικών επιχειρήσεων. Οι Ίνκας χρησιμοποιούσαν την πρόπολη ως αντιπυρετικό. Η χρήση της ως αντισηπτικός, επουλωτικός, αντιπυρετικός και απολυμαντικός, για τη στοματική κοιλότητα, παράγοντας, διατηρήθηκε μέχρι και τα χρόνια του Μεσαίωνα. Κατά τη διάρκεια του 17<sup>ου</sup> και 18<sup>ου</sup> αιώνα οι Άγγλοι φαρμακοποιοί είχαν την πρόπολη στη λίστα των τότε γνωστών φαρμάκων με «πρώιμη αντιβιοτική» δράση [Toret *et al.*, 2013]. Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, στη Ρωσία και στη Γερμανία, η αγορά ήταν γεμάτη από πρόπολη, ενώ ήταν γνωστή για τη χρήση της σε θεραπείες μολύνσεων, επούλωσης πληγών, αλλά και ως αντιφλεγμονώδες υπό μορφή αλοιφής και εμπλάστρου.

### **1.2.2 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

Το χρώμα της πρόπολης ποικίλει από κίτρινο, πράσινο, πορτοκαλί, κόκκινο έως και σκούρο καφέ, που εξαρτάται από τη φυτική της προέλευση, από τις προσμειξείς κεριού και γύρης αλλά και από τον χρόνο παραμονής της στην κυψέλη. Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και ύπαρξη ακόμη και διαφανούς πρόπολης [Coggs *et al.*, 1984]. Σε θερμοκρασίες από 25<sup>ο</sup>C έως 45<sup>ο</sup>C η πρόπολη είναι μαλακή, εύπλαστη και κολλώδης. Σε θερμοκρασία μικρότερη των 15<sup>ο</sup>C και συγκεκριμένα όταν ψύχεται γίνεται σκληρή και εύθρυπτη ενώ όταν φτάνει τους 45<sup>ο</sup>C αρχίζει σιγά-σιγά και γίνεται κολλώδης και γομώδης. Σε ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες (60-70<sup>ο</sup>C) γίνεται υγρή, ενώ για ορισμένα δείγματα πρόπολης το σημείο τήξεως είναι υψηλότερο των 100<sup>ο</sup>C. Είναι ευδιάλυτη σε οργανικούς διαλύτες και λιγότερο στο νερό.

### **1.2.3 ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ**

Η χημική σύσταση της πρόπολης, μπορεί να ποικίλει σημαντικά και αποτελεί συνάρτηση της περιοχής προελεύσεως του δείγματος και της τοπικής χλωρίδας της εκάστοτε γεωγραφικής περιοχής. Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η χρονική περίοδος συλλογής του δείγματος από την κυψέλη καθώς και η συσχέτιση της με την ανθοφορία της συγκεκριμένης περιόδου [Bankova*et al.*, 2000ii]. Η χημική σύσταση της πρόπολης προσδιορίζεται από: 50 -55% ρητίνες, 20-35% κερί (ένα μίγμα από πράσινο κερί φυτική προέλευσης και κερί των μελισσών), 5-10% αιθέρια έλαια, 5% γύρη και 5% από άλλες, οργανικές και ανόργανες ουσίες [Mitamura*et al.*, 1996] όπως: φλαβονοειδή, τερπένια, φαινολικές και αρωματικές ενώσεις και ιχνοστοιχεία. Περιέχει ακόμη ένζυμα, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιταμίνες και μέταλλα. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω από 300 χημικά συστατικά σε πρόπολες ανά τον κόσμο [Bankova*et al.*, 2000ii]. Η μέθοδος προσδιορισμού της αναλογίας αυτής αποτελεί έλεγχο ποιότητας μέσω της οποίας είναι δυνατό να διαπιστωθούν τόσο οι περιπτώσεις νοθείας στη σύσταση, όσο και επικίνδυνες χημικές ουσίες για τον άνθρωπο [Januzzi, 1990; 1993].

Η πρώτη εμπειρισταωμένη μελέτη δημοσιεύθηκε από τον Ghisalberti το 1978 σαν μια προσπάθεια συλλογής των πιο σημαντικών πληροφοριών, περί πρόπολης από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα [Bankova*et al.*, 2000i; 2000ii]. Η πρώτη ευρεσιτεχνία που καταχωρήθηκε ποτέ στο περιοδικό Chemical Abstracts περιγράφηκε το 1904 στην Αμερική και είχε σαν τίτλο «Composition for treating pins and piano strings» και αφορούσε τη χρήση μίγματος πρόπολης, λινελαίου και κεριού μέλισσας για την απομάκρυνση σκουριάς από χορδές πιάνου. Έναν αιώνα αργότερα ο αριθμός των δημοσιεύσεων για την πρόπολη έχει φτάσει τις 3880 σε περιοδικά και τις 2884 σε ευρεσιτεχνίες [Toret*et al.*, 2013].

### **1.2.4 ΕΙΔΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΥΣΤΑΣΗ**

Η σύνθεση της πρόπολης διαφέρει ανάλογα με τη βοτανική και τη γεωγραφική της προέλευση, καθώς και από την εποχή συλλογής της. Η κατηγοριοποίηση της πρόπολης αποτελεί μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία, ωστόσο, η πρώτη χημική κατάταξη έγινε με βάση τη γεωγραφική προέλευση, την κύρια φυτική πηγή και τη χημική σύσταση της κάθε πρόπολης [Bankova*et al.*, 2000i; 2005]. Σε πιο πρόσφατη μελέτη [Sforcin & Bankova, 2011] η ταξινόμηση αυτή παραμένει σχεδόν αμετάβλητη, ενώ έχει προταθεί και μία ακόμη κατηγορία, εκείνη της Μεσογείου [Porrova*et al.*, 2010], όπως φαίνεται παρακάτω:

ΕΙΔΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΚΥΡΙΑ ΦΥΤΙΚΗ ΠΗΓΗ
<b>1. Πρόπολη τύπου λεύκας (Poplartype)</b>	Κεντρική και Β.Ευρώπη, Β.Αμερική και μη τροπικές περιοχές Ασίας	<i>Populus</i> sp.
<b>2. Μεσογειακού τύπου (Mediterraneantype)</b>	Ελλάδα, Σικελία, Κύπρος, Μάλτα	<i>Pinus</i> sp, <i>Abies</i> sp. (Conifer)
<b>3. Πρόπολη σημύδας (Birchtype)</b>	Β.Ρωσία	<i>Bettula verrucosa</i> Ehrh.
<b>4. Πράσινος τύπος Βραζιλίας (Alecrimtype)</b>	Βραζιλία	<i>Baccharis</i> sp.
<b>5. Κόκκινος τύπος (Red type)</b>	Κούβα, Βραζιλία, Μεξικό	<i>Dalbergia</i> sp.
<b>6. Πρόπολη τύπου <i>clusia</i> (<i>Clusia</i> type)</b>	Κούβα, Βενεζουέλα	<i>Clusia</i> sp.
<b>7. Τύπου Ειρηνικού Ωκεανού (Pacific type)</b>	Οκινάουα, Ταιβάν, Ινδονησία	<i>Macaranga</i> sp.
<b>8. Πρόπολη Καναρίων Νήσων (Canarytype)</b>	Κανάρια νησιά	Άγνωστη

### 1. Πρόπολη τύπου λεύκας (Poplartype)

Στην κεντρική και Βόρεια Ευρώπη αλλά και σε άλλες περιοχές με εύκρατα κλίματα όπως Β. Αμερική, Νέα Ζηλανδία και στις μη τροπικές ζώνες της Ασίας, τα δέντρα από τα οποία συλλέγεται πρόπολη είναι κυρίως: λεύκες, καστανιές, αρωματικά φυτά, βελανιδιές, ενώ το χρώμα της είναι **καφέ**.

Σήμερα, είναι πλέον τεκμηριωμένο ότι στην Ευρώπη, η κύρια πηγή της πρόπολης είναι οι ρητινώδεις εκκρίσεις από τους οφθαλμούς (νεαρούς βλαστούς) της λεύκας (γένος *Populus*) [Greenaway *et al.*, 1990; Bankova *et al.*, 2002]. Πολλές έρευνες επιβεβαιώνουν ότι οι μέλισσες προτιμούν το είδος *Populus nigra*, (μαύρη λεύκα), το οποίο είναι το πιο διαδεδομένο είδος λεύκας στην Ευρώπη αλλά και στις μη τροπικές

περιοχές της Ασίας [Zhouetal., 2008]. Αυτή η προτίμησή τους είναι τόσο προφανής, που κάποιοι ερευνητές, προτείνουν ότι οι μέλισσες και οι λεύκες ανέπτυξαν μια παράλληλη εξελικτική πορεία, ενώ η τάση να συλλέγουν τις εκκρίσεις της λεύκας είναι γενετικά καθοριζόμενη [Koenig, 1985]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πρόπολης τύπου μαύρης λεύκας στην Ευρώπη αποτελούν η Πολωνική πρόπολη [Poronaetal., 2008; Σκάρλος, 2008], η Γερμανική πρόπολη [Greenawayetal., 1990], η πρόπολη Αλβανίας [Toretietal., 2013], η πρόπολη της κεντρικής Ιταλίας (Μπολόνια) [Papottietal., 2012] αλλά και η Ιρανική πρόπολη [Trushevaetal., 2010]. Σε μελέτη που έγινε σε 12 δείγματα που συλλέχθηκαν από την εύκρατη και τροπική ζώνη της Κίνας, διαπιστώθηκε πως τα κύρια συστατικά ήταν φαινολικά παράγωγα και φλαβονοειδή, χαρακτηριστικά του τύπου της μαύρης Λεύκας [Guoetal., 2011]. Σε πρόπολη από άλλες χώρες της Ευρώπης όπως στη Βουλγαρία, έχει αναφερθεί ως κύρια φυτική πηγή το είδος *Populustremula*, ενώ σε πρόπολη από το Ηνωμένο Βασίλειο το είδος *Populuseuramericana* [Toreti et al., 2013]. Στην Β.Αμερική και συγκεκριμένα στον Καναδά, ως κύρια φυτική πηγή πρόπολης χαρακτηρίστηκε το είδος *Populustrichocarpa* [Christovetal., 2005]. Γι' αυτό το λόγο πρόπολη από αυτές τις περιοχές, περιέχει τα χαρακτηριστικά συστατικά των «οφθαλμών λεύκας»: άγλυκα φλαβονοειδών (φλαβόνες και φλαβανόνες), φαινολικά οξέα και εστέρες τους. Οι κυριότερες φλαβόνες που έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί από πρόπολη τύπου λεύκας είναι οι: χρυσίνη, τεκτοχρυσίνη, γαλανγκίνη, καιμπερόλη, καθώς και διάφοροι μεθυλεστέρες της καιμπερόλης: ισοραμνετίνη, ραμνετίνη και κερκετίνη. Οι φλαβανόνες που συναντώνται αρκετά συχνά είναι: πινοσεμπρίνη, πινοστρομπίνη, πινομπασκίνη, 3-O-οξική πινομπασκίνη, εστέρες της πινομπασκίνης και ο 3-μεθυλ-αιθέρας της πινομπασκίνης [Shietal., 2012]. Εμφανίζουν επίσης μεγάλη περιεκτικότητα σε καφεϊκό, φερουλικό και p-κουμαρικό οξύ και στους βενζυλ-, φαινυλαιθυλ-, κινναμοϋλ- και πρενυλ- εστέρες τους [Garcia-Vigueraetal.,1992; Hegazi&Faten,2001; Bankovaetal., 2002]. Ο συνδυασμός αυτός των φαινολικών ενώσεων είναι μοναδικός και χαρακτηριστικός για τις εκκρίσεις Λεύκας .

Επιπλέον πηγές πρόπολης, ευρωπαϊκής προέλευσης, αποτελούν τα παρακάτω φυτικά είδη: *Betula* sp., *Salix* sp., *Pinus* sp, *Abies* sp., *Quercus* sp., *Ulmus* sp., *Fraxinus* sp.[Κατραμάνου, 2012; Migueletal., 2013].



**Εικόνα 3. *Populus nigra***

## **2. Μεσογειακού τύπου (Mediterraneantype)**

Αν και πολλές Μεσογειακές χώρες ανήκουν στην Ευρώπη, έχει διαπιστωθεί ότι η χημική σύσταση πρόπολης πολλών Μεσογειακών χωρών είναι τελείως διαφορετική από εκείνη χωρών της υπόλοιπης Ευρώπης. Αυτό διότι κύρια φυτική πηγή αποτελούν τα κωνοφόρα δέντρα που είναι αυτοφυή σε όλες τις παραμεσόγειες χώρες (Ελλάδα, Μάλτα, Σικελία, Ιταλία κλπ), ενώ ελλείπουν από την υπόλοιπη κεντρική και βόρεια Ευρώπη. Το χρώμα της Μεσογειακού τύπου πρόπολης είναι επίσης **καφέ**.

Στα Ελληνικά δείγματα πρόπολης ανάλογα με την προέλευση εμφανίζεται αυξημένη περιεκτικότητα σε διτερπένια και λιγότερο ποσοστό σε φλαβονοειδή και εστέρες αρωματικών οξέων όπως και σε λιπαρά. Το υψηλό ποσοστό των διτερπενίων σε δείγματα Ελληνικής πρόπολης διαπιστώθηκε επιστημονικά για πρώτη φορά το 2004 σε πρόπολη που συλλέχθηκε από την Πρέβεζα [Melliou&Chinou, 2004]. Ως κύρια φυτική πηγή θεωρήθηκαν κωνοφόρα δέντρα του γένους *Pinus*. Άλλα παραδείγματα πρόπολης με αυξημένη περιεκτικότητα σε διτερπένια αποτέλεσαν Ελληνικά δείγματα με προέλευση την Πελοπόννησο, την Κρήτη, την Κύπρο [Melliouetal., 2007; Poronaetal., 2009ii;2010; Μάρκος, 2010, Κατραμάνου, 2012] αλλά και πρόπολη με προέλευση τη Σικελία [Trushevaetal., 2003]. Τα κυριότερα διτερπένια που ταυτοποιήθηκαν ήταν: το ισοκουπρεσσικό οξύ, το κομμουνικό οξύ, το ιμβρिकाτολοϊκό οξύ, το πιμαρικό οξύ, η 13-επι-τορουλοσόλη, η 13-επι-τορουλοσάλη και η 13-επι-μανοόλη. Από την Κρήτη απομονώθηκαν για πρώτη φορά σε πρόπολη και δύο τριτερπένια τύπου κυκλοαρτενίων [Porona et al., 2009ii]. Παρόμοιο χημικό προφίλ εμφανίζει και η πρόπολη Μάλτας με κύρια συστατικά διτερπένια καθώς και μονο-πρενυλ- και σεσκι-πρενυλ-εστέρες βενζοϊκού οξέος [Poronaetal.,2011; 2012], με κύρια φυτική πηγή των διτερπενίων το κυπαρίσσι *Cupressussempevirens* [Poronaetal., 2012].

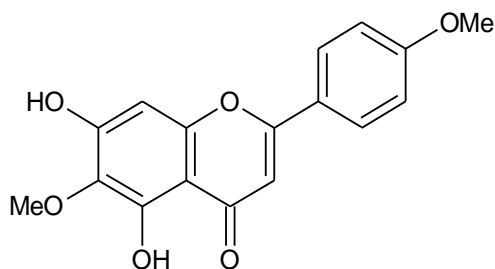




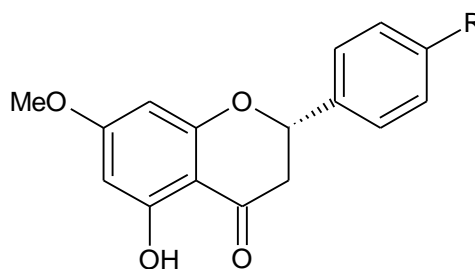
**Εικόνα 4. Καφέ πρόπολη & *Cupressus sempervirens***

### 3. Πρόπολη σημύδας (Birch type)

Ο τύπος της πρόπολης αυτής προέρχεται από το φυτό *Betula verrucosa* Ehrh. [Bankova *et al.*, 2000i; 2000ii] και το χρώμα της είναι **καφέ**. Σε πρόσφατη μελέτη πρόπολης με προέλευση τη Β.Δ. Ρωσία διαπιστώθηκε πως εκτός από την *Betula verrucosa* σημαντική φυτική πηγή αποτελεί και η λευκή σημύδα (*Betula pubescens* Ehrh.) Κύρια συστατικά είναι τα φλαβονοειδή: 5-υδροξύ-4',7-διμεθοξυφλαβανόνη, σακουρανετίνη και πεκτολιναρινγκενίνη και τα σεσκιτερπένια: μπιρκενάλη και το 6-υδρόξυ-β-καρνοφυλάνιο [Isidorov *et al.*, 2014].

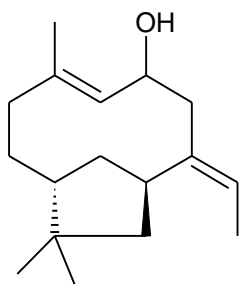


**Πεκτολιναρινγκενίνη**

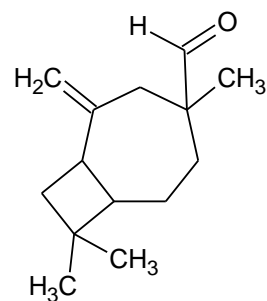


**R=OH: Σακουρανετίνη**

**R=H: 5-υδροξύ 4',7 διμεθοξυ-φλαβανόνη**



**6-υδροξυ-β-καρυοφυλένιο**



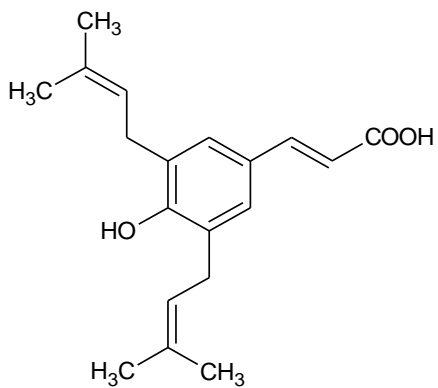
**Μπιρκενάλη**



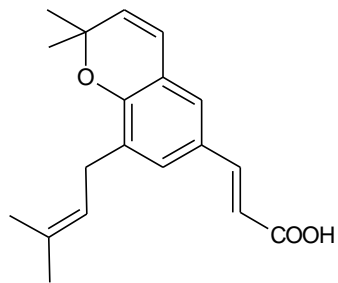
**Εικόνα 5. *Betula verrucosa* & *Betula pubescens***

#### **4.Πράσινος τύπος Βραζιλίας (Alecrimtype)**

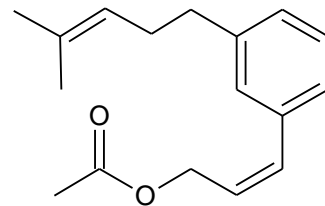
Ο τύπος της πρόπολης αυτής προέρχεται από το φυτό *Baccharis dracunculifolia* DC. [Park *et al.*, 2002; Toreti *et al.*, 2013]. Συνολικά, πάνω από 100 ουσίες έχουν ταυτοποιηθεί από την πρόπολη Βραζιλίας μέχρι τώρα [Marcucci & Bankova, 1999]. Πολλές από αυτές είναι φαινολικά παράγωγα και παρουσιάστηκαν σημαντικά διαφορετικές από αυτές της πρόπολης τύπου Λεύκας. Ανάμεσα στις κύριες τάξεις ενώσεων που βρέθηκαν στην πράσινη πρόπολη Βραζιλίας, συμπεριλαμβάνονται πρενυλιωμένα παράγωγα p-κουμαρικού οξέος, φαινολικά οξέα με κυριότερη την αρτεπιλλίνη C, διτερπένια όπως το ισοκουπρεσσικό οξύ και σεσκιτερπένια όπως η σπαθουλενόλη και η παλουστρόλη [Bankova *et al.*, 1998; Nunes & Guerreiro, 2012; Rai *et al.*, 2012; Salatino & Salatino, 2012]. Επιπλέον από πράσινη πρόπολη έχουν απομονωθεί και τριτερπένια όπως: προκρίμη α και β, λανοστα-7,24-διεν-3β-όλη, λουπεόλη και α και β αμυρίνη [Furukawa *et al.*, 2002].



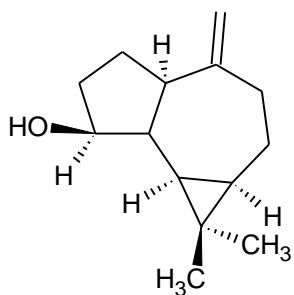
Αρτεπιλλίνη C



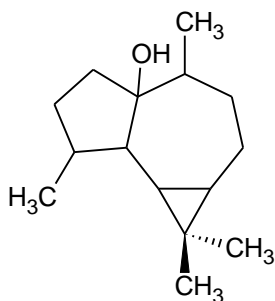
2,2 διμεθυλ-8-πρενυλ-χρωμένιο



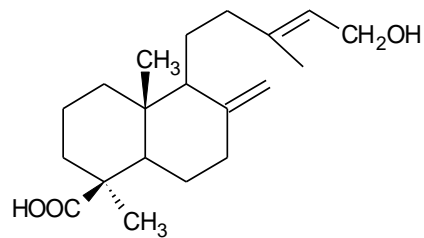
3-πρενυλ-κινναμωμικό εστέρας



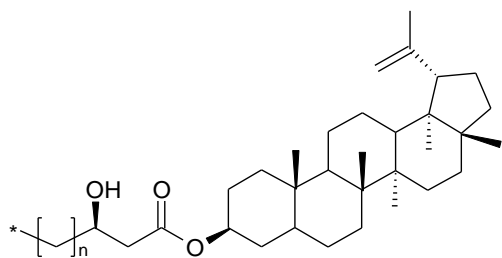
Σπαθουλενόλη



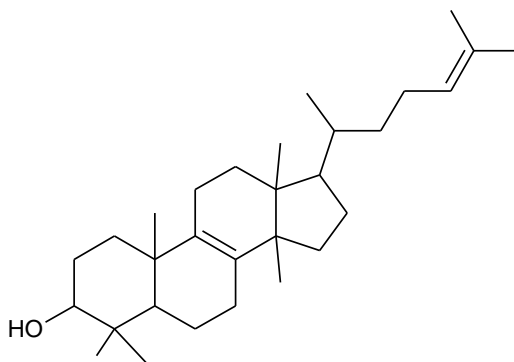
Παλουστρόλη



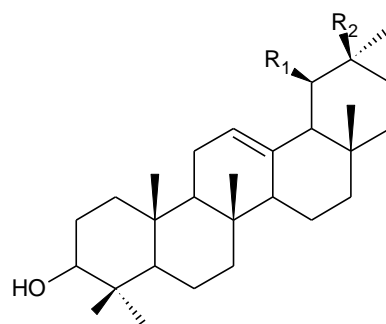
Ισοκουπρεσσικό οξύ



Προκρίμη α, n=12  
Προκρίμη β, n=14



Λανοστα-7,24-διεν-3β-όλη



R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>=H: α-αμυρίνη

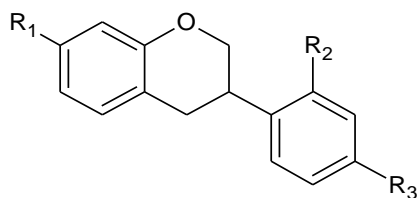
R<sub>1</sub>= H R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>: β-αμυρίνη



**Εικόνα 6. Πράσινη πρόπολη & *Baccharis dracunculifolia* DC.**

### **5.Κόκκινος τύπος (Redtype)**

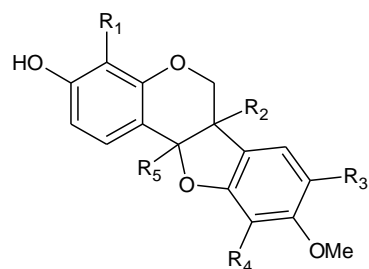
Ο κόκκινος τύπος πρόπολης με χαρακτηριστικό **κόκκινο** χρώμα, περιέχει ως κύρια χημικά συστατικά τα ισοφλαβονοειδή και μέχρι σήμερα έχει βρεθεί στη Βραζιλία, την Κούβα και το Μεξικό [Marcucci&Bankova,1999; Trushevaetal.,2004; Sforcinetal., 2011]. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2007 σε κόκκινη πρόπολη από την Β.Α.Βραζιλία, διαπιστώθηκε ότι η πρόπολη αυτή περιέχει κυρίως ισοφλαβονοειδή και πτεροκαρπάνια και ειδικότερα το 3-υδροξυ-8,9-διμεθοξυ-πτεροκαρπάνιο και τη μεντικαρπίνη. Για πρώτη φορά σε πρόπολη τροπικής προέλευσης (Βραζιλία) αναφέρεται ως κύρια φυτική πηγή το φυτικό είδος *Dalbergiaecastophyllum*L.Taub [Silvaetal., 2008]. Τα υψηλά ποσοστά των ισοφλαβονοειδών επιβεβαιώθηκαν και σε κόκκινη πρόπολη με προέλευση την Κούβα, με κυριότερα την βεστιτόλη, την 7-Ο-μεθυλβεστιτόλη και τη μεντικαρπίνη [Camboetal., 2008]. Η κόκκινη πρόπολη με προέλευση το Μεξικό, εμφανίζει και αυτή το ίδιο χημικό προφίλ με κύριο ισοφλαβονοειδές επίσης τη βεστιτόλη, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η κόκκινη πρόπολη συνδέεται με φυτά γένους *Dalbergia*[Lottietal., 2010].



$R_1 = R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{OCH}_3$  **Βεσσιτόλη**

$R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{OH}$  **Ισοβεσσιτόλη**

$R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{OCH}_3$  **7-O-μεθυλβεσσιτόλη**



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ , **μεντικαρπίνη**

$R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OEt}$ , **3-υδροξυ-8,9-διμεθοξυπτεροκαρπάνιο**

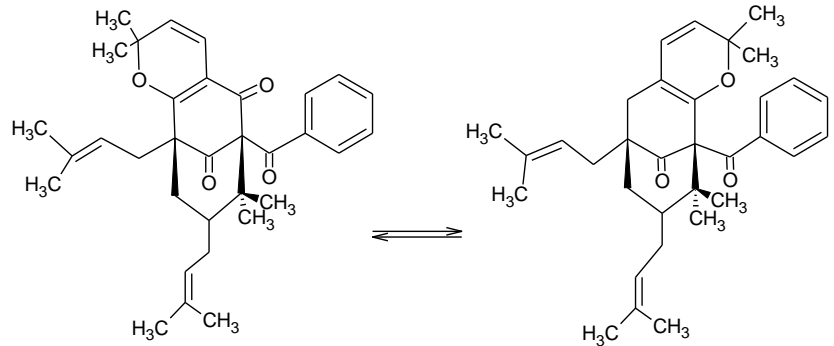


**Εικόνα 7. Κόκκινη πρόπολη & *Dalbergia ecastophyllum* L.Taub.**

## **6. Πρόπολη τύπου *Clusia* (*Clusia* type propolis)**

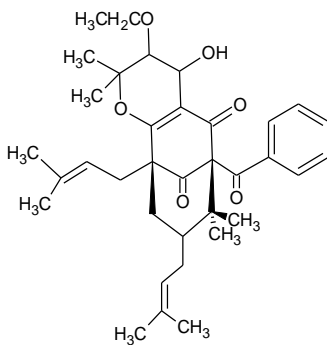
Η πρόπολη αυτής της κατηγορίας, περιέχει ως κύρια χημικά συστατικά πρενυλιωμένες βενζοφαινόνες και είναι αντιπροσωπευτική των φυτών του γένους *Clusia* (*Clusiamajor*, *Clusiaminor*) της οικογένειας Guttiferae. Μέχρι σήμερα σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν η καφέ πρόπολη Κούβας και Βενεζουέλας [Raietal.,2012]. Το 1993 ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά πρενυλιωμένες βενζοφαινόνες σε πρόπολη τροπικής προέλευσης (Βενεζουέλα). Τα συστατικά αυτά ανιχνεύτηκαν σε υψηλά ποσοστά και στα 38 δείγματα που αναλύθηκαν [Raietal., 2012]. Αργότερα απομονώθηκαν από πρόπολη Βενεζουέλας οι σκρομπικουταλόνες Α και Β καθώς και δύο νέες πρενυλιωμένες βενζοφαινόνες οι: 18-αιθυλοξυ-17-υδροξυ-17,18-διυδροξυ-σκρομπικουλατόνη Α και Β [Trushevaetal., 2004]. Από καφέ πρόπολη Κούβας απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν επίσης οι πρενυλιωμένες βενζοφαινόνες: γκαρσινιελιπτόνη Ε

ξανθοχυμόλη, γκουττιφερόνη Ε προπολόνη Α-Δ και η νεμοροσόνη. Η νεμοροσόνη βρέθηκε και στις δυο ταυτομερείς της μορφές σε υψηλό ποσοστό και είναι ένας από τους κύριους δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού *Clusiarsea* Jacq. [Cuesta-Rubio *et al.*, 2001; 2002; 2007, Marin *et al.*, 2008; Hernandez *et al.*, 2005].

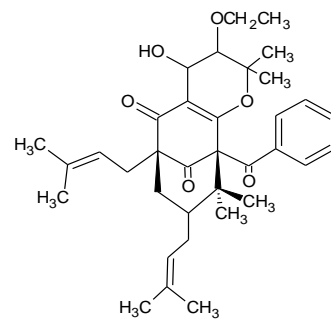


**σκρομπικουταλόνη Α**

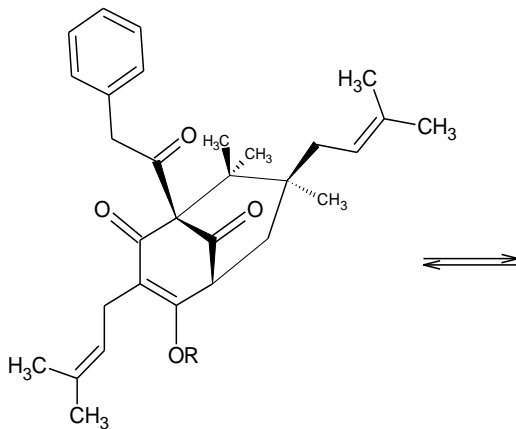
**σκρομπικουταλόνη Β**



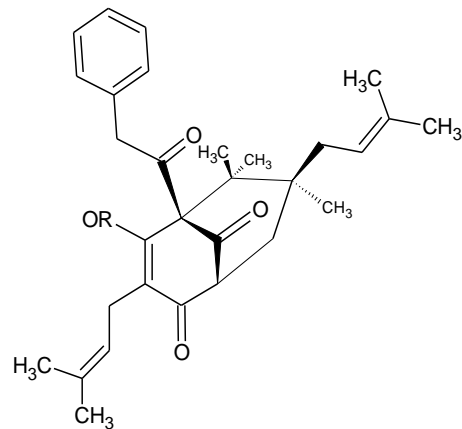
**18-αιθυλοξυ-17-υδροξυ-17,18-διυδροξυ-  
σκρομπικουλατόνη Α**



**18-αιθυλοξυ-17-υδροξυ-17,18-διυδροξυ-  
σκρομπικουλατόνη Β**

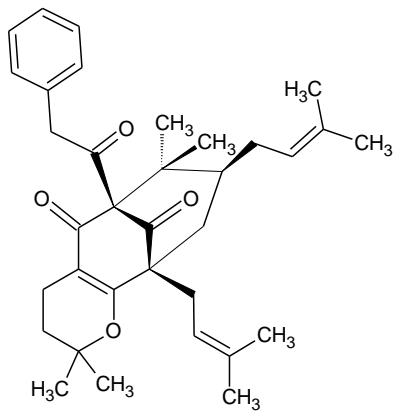


**α.R=H, νεμοροσόνη**  
**β.R=Me, νεμοροσόνη II**

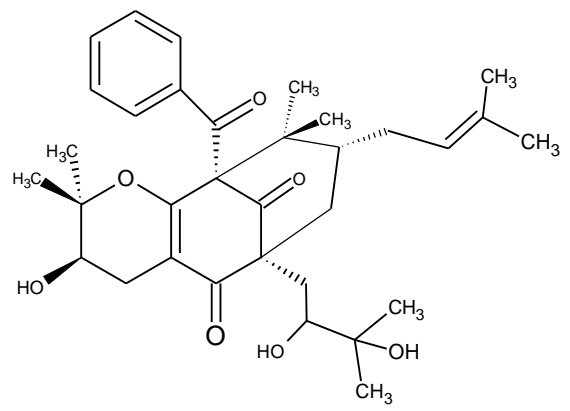


**α.R=H, νεμοροσόνη**  
**β.R=Me, νεμοροσόνη II**

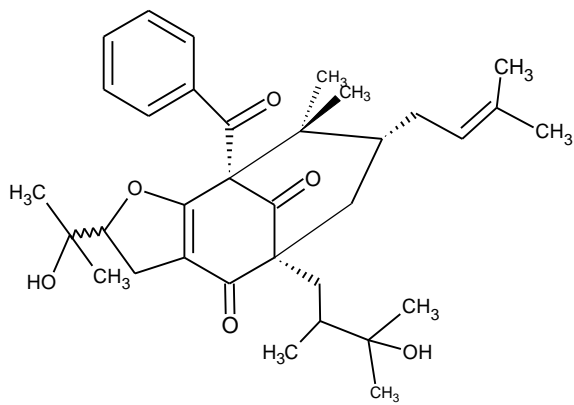
**Ταυτομερείς μορφές νεμοροσόνης: α, β**




**Προπολόνη Α**

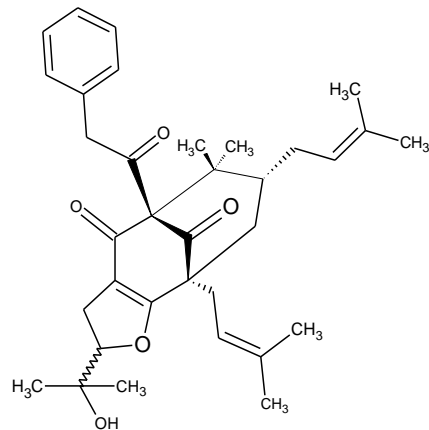



**Προπολόνη Β**



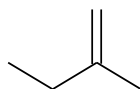
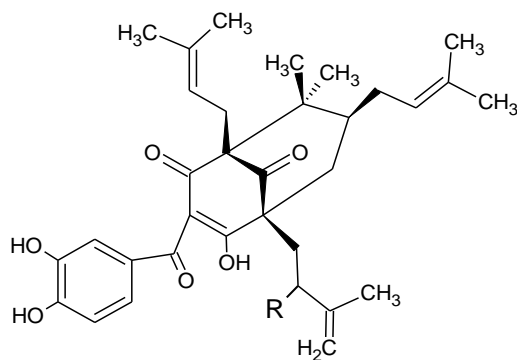
$\alpha.R=$   :Προπολόνη C

$\beta.R=$   :Προπολόνη D



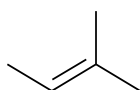
$\alpha.R=$   :Υπεριβόνη Β

$\beta.R=$   :Γκαρσινιελλιπτόνη Ε



$\alpha.R=$

ξανθογυμόλη



$\beta.R=$

γκουττιφερόνη E

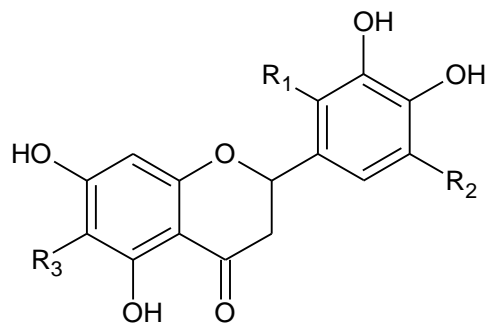


**Εικόνα 8. *Clusia rosea* Jacq.**

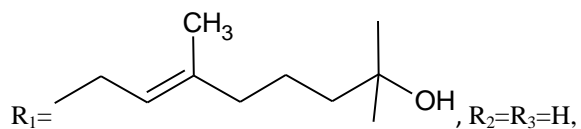
### 7. Τύπου Ειρηνικού Ωκεανού (Pacifictype):

Μελετήθηκαν 34 δείγματα πρόπολης από 9 διαφορετικές περιοχές της Ταϊβάν, τα οποία με βάση το χρώμα τους, χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: **πράσινη, καφέ και σκούρα καφέ**. Κύρια συστατικά και των τριών ήταν οι πρενυλοφλαβονόνες όπως η προπολίνη Α και Β και η 5,7,3',5' τετραμεθόξυ-8-С-πρενυλ-φλαβόνη [Chen *et al.*, 2004; 2007; 2008; Kumazawa & Nakamura, 2008; Whengetal., 2007]. Αν και η Ιαπωνία δεν ανήκει στην τροπική ζώνη εντούτοις σε πρόπολη της Οκινάουα ταυτοποιήθηκαν πρενυλιωμένα φλαβονοειδή (νυμφαόλη Α, Β, С και ισονυμφαόλη-В). Η παρουσία των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών ήταν έντονη και σε πρόπολη από την Ινδονησία [Trusheva *et al.*, 2011]. Κύρια φυτική πηγή αποτελούν τα φρούτα του φυτού *Macaranganarius* L., φυτού που προέρχεται από την Ινδονησία, την Ταϊβάν και την Οκινάουα [Petrova *et al.*, 2010].

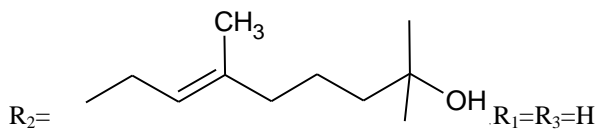




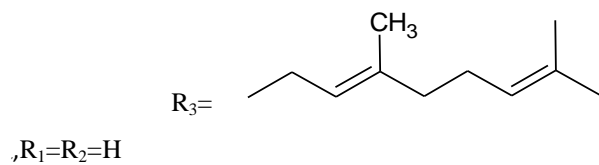
**Εικόνα 9. *Macaranga tanarius* L.**



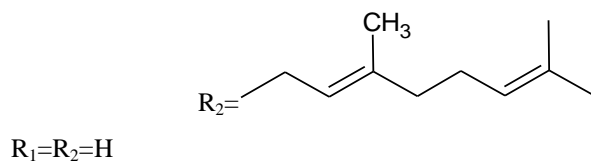
**ΠροπολίνηΑ**



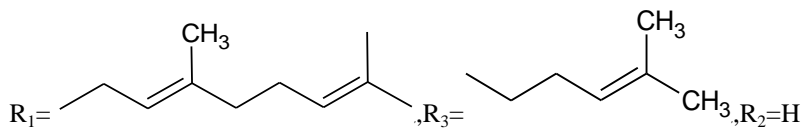
**ΠροπολίνηΒ**



**ΝυμφαόληΑήΠροπολίνη C**



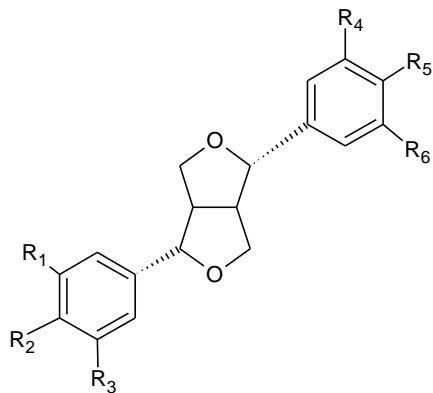
**ΙσονυμφαόληΒ**



**Νυμφαόλη C**

## 8. Πρόπολη Καναρίων Νήσων (Canarytype)

Η πρόπολη με προέλευση τα Κανάρια Νησιά έχει μελετηθεί μόνο δυο φορές μέχρι σήμερα. Αποτελεί ξεχωριστό είδος πρόπολης, λόγω των ιδιαίτερων χημικών συστατικών της που εμφανίζονται να είναι φουρο-φουρανολιγνάνια όπως: ασαντίνη, σεαρτεμίνη, σεσαμίνη και γιαγκαμπίνη. Η βοτανική τους προέλευση παραμένει μέχρι τώρα άγνωστη. [Bankova *et al.*, 1998; Christov, 1999].



**Ασαντίνη:**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OMe}$ ,  $R_4 = R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$

**Γιαγκαμπίνη:**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$

**Σεαρτεμίνη:**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_6 = \text{OMe}$ ,  $R_4 = R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$

**Σεσαμίνη:**  $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $R_3 = R_6 = \text{H}$

### Άλλα είδη πρόπολης

Μέχρι τώρα έγινε μια αναφορά στα είδη της πρόπολης που έχουν ταξινομηθεί ως διαφορετικά είδη με βάση τη γεωγραφική προέλευση, τη χημική σύσταση και την κύρια φυτική πηγή. Ωστόσο υπάρχουν και άλλα είδη πρόπολης τα οποία δεν ανήκουν επίσημα στην παραπάνω κατάταξη.

Για την πρόπολη Κούβας έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα δύο είδη, η κόκκινη με κύρια φυτική πηγή φυτά γένους *Dalbergia* και η καφέ με κύρια φυτική πηγή φυτά γένους *Clusia*. Υπάρχει όμως ακόμα ένα είδος πρόπολης με προέλευση την Κούβα και αυτή είναι η **κίτρινη** πρόπολη με άγνωστη μέχρι σήμερα βοτανική προέλευση. Από τη GC-MS ανάλυση που έγινε σε 19 δείγματα κίτρινης πρόπολης Κούβας αυτή ταξινομείται στις παρακάτω υποκατηγορίες [Marquez & Cuesta-Rubio, 2010, Κατραμάνου 2012]:

- τύπος **A**: έχει ως κύρια συστατικά τριτερπένια (λανοστερόλη,  $\alpha$ - και  $\beta$ -αμυρίνη, κυκλοαρτενόλη λουπεόλη κλπ) ενώ ανιχνεύονται και πολυμεθοξυλιωμένα φλαβονοειδή αλλά σε μικρότερα ποσοστά για τα οποία όμως δεν δίνονται περισσότερες πληροφορίες.
- τύπος **B**: πλούσιος σε ακετοξυ παράγωγα τριτερπενίων ( $\beta$ -ακετοξυ αμυρίνη & ακετοξυ λανοστερόλη)



**Εικόνα 10. Κίτρινη πρόπολη**

Ως κύρια πρόπολη Βραζιλίας έχει αναφερθεί μέχρι τώρα η πράσινη πρόπολη, με κύρια φυτική πηγή το φυτό *Baccharisdracunculifolia*DC και η κόκκινη πρόπολη με κύρια φυτική πηγή το φυτό *Dalbergiaecastaphylum*. Ωστόσο σε δείγματα πρόπολης με προέλευση τη Νότια και τη Βορειοανατολική Βραζιλία κύρια φυτική πηγή έχει θεωρηθεί η αργυρόφυλλος λεύκα (*Populusalba*) και το φυτό *Hyptisdivaricate*[Kumazawaetal.; Parketal., 2002].



**Εικόνα 11. *Populusalba* & *Hyptisdivaricate***

Πρόπολη από την περιοχή της Χαβάης έχει ως κύρια φυτική πηγή τα φυτικά είδη *Plumeria acuminata* και *Plumeria acutifolia*, ενώ πρόπολη με προέλευση στην Αυστραλία έχει ως κύρια φυτική πηγή φυτά του γένους *Xanthorrhoea* [Toret *et al.*, 2013], ενώ τέλος η Αφρικανική πρόπολη δεν ανήκει σε καμία από τις παραπάνω ταξινομήσεις και οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα είναι λίγες και περιγράφονται αναλυτικά στην επόμενη ενότητα..



**Εικόνα 12. *Plumeria acuminata* & *Plumeria acutifolia***

### 1.2.5 ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗ ΠΡΟΠΟΛΗ

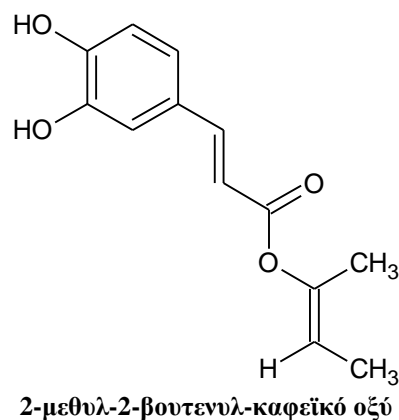
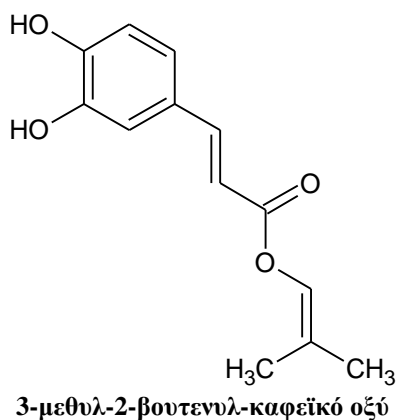
Η Αφρικανική ήπειρος χωρίζεται κλιματολογικά σε δυο ζώνες, την τροπική και την εύκρατη. Στην εύκρατη ζώνη ανήκουν οι βόρειες χώρες της Αφρικής όπως το Μαρόκο, η Τυνησία, η Αλγερία, η Λιβύη, ένα μέρος της Αιγύπτου αλλά και χώρες της Ν. Αφρικής όπως Δημοκρατία της Νότιας Αφρικής, η Ζουαζιλάνδη και η Λεσότο [Raietal., 2012]. Η υπόλοιπη ήπειρος ανήκει στην τροπική ζώνη. Αυτή η κλιματική διαφορά επηρεάζει σημαντικά τη σύσταση της χλωρίδας της και κατά συνέπεια την σύσταση της πρόπολης της Αφρικανικής Ηπείρου. Διαπιστώνονται ορισμένες ομοιότητες, αλλά πολύ περισσότερες διαφορές ως προς το είδος και την αναλογία των συστατικών της Αφρικανικής πρόπολης, συγκρινόμενη με πρόπολες άλλων γεωγραφικών προελεύσεων. Τα δείγματα πρόπολης από την Αφρική που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα έχουν χρώμα **καφέ** και είναι τα παρακάτω:

- **Πρόπολη Αιγύπτου**
- **Πρόπολη Αιθιοπίας**
- **Πρόπολη Αλγερίας**
- **Πρόπολη Κένυας**
- **Πρόπολη Μαρόκου**
- **Πρόπολη Τυνησίας**
- **Πρόπολη Καμερούν**
- **Πρόπολη περιοχών της Κεντρικής και Νοτίου Αφρικής**

#### **Πρόπολη Αιγύπτου**

Η μελέτη της Αιγυπτιακής πρόπολης ξεκίνησε το 1993, με τη χρήση GC-MS [Hegazi&Faten,2001]. Οι κύριοι μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν ήταν αλειφατικά οξέα, αρωματικά οξέα και εστέρες τους καθώς και σάκχαρα φλαβονοειδή, διτερπένια και τριτερπένια, ενώ για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν και κυκλοαρτενόλη σε πρόπολη [Christovetal.,1998]. Αργότερα μελετήθηκαν τρία άλλα δείγματα Αιγυπτιακής πρόπολης, όπου διαπιστώθηκε ότι το δείγμα από την Ντακάχλια (Β.Α.Αίγυπτος) παρουσίασε τυπικό προφίλ πρόπολης τύπου λεύκας με κύρια συστατικά φαινολικά οξέα όπως: κινναμωμικό οξύ, trans-p-κουμαρικό οξύ, 3-μεθυλ-3-βουτενυλ καφεϊκό οξύ, 3-μεθυλ-2-βουτενυλ καφεϊκό οξύ, 2-μεθυλ-2-βουτενυλ καφεϊκό οξύ και δυο ακετοφαινόνες, τις 2'- και 3'-υδροξυ-ακετοφαινόνες. Επίσης ήταν πλούσιο στα φλαβονοειδή πινοσεμπρίνη, πινοστρομπίνη, πινομπασκίνη, χρυσίνη και γαλανγκίνη. Στο ίδιο δείγμα αλλά σε μικρότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν και τα τριτερπένια: λουπεόλη, κυκλοαρτενόλη, α- και β-αμυρίνη. Το δείγμα από την περιοχή Ματρό (Β.Δ.Αίγυπτος) ήταν πλούσιο σε εστέρες φερούλικών οξέων και σε φουρο-φουρολιγνάνια όπως σεσαμίνη και ισοσεσαμίνη ενώ το δείγμα από τη Σίβα (Ν.Αίγυπτος) είχε ως κύρια συστατικά

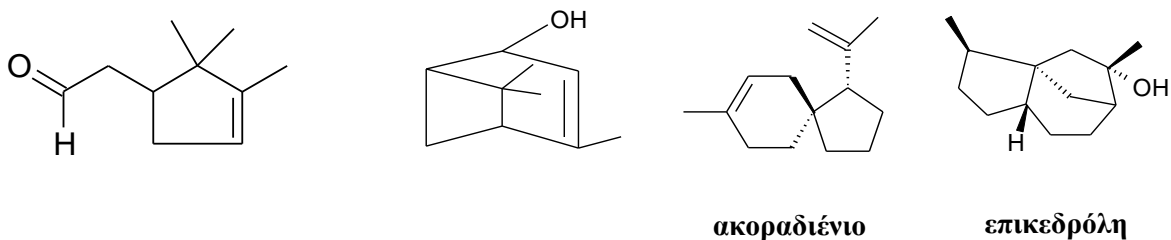
διπρενυλ-διωδρόξυ κουμαρικά οξέα, βενζοφουρανικά λιγνάνια και παράγωγα πεντανοϊκών οξέων [Hegazi *et al.*, 2007].



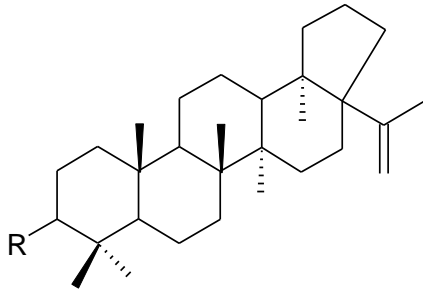
### Πρόπολη Αιθιοπίας

Η πρώτη μελέτη που έγινε σε δείγμα πρόπολης από την Αιθιοπία ήταν το 2006 όταν εξετάστηκε μέσω HPLC-MS η περιεκτικότητά της σε φλαβονοειδή, και διαπιστώθηκε ότι περιείχε κυρίως την πινοσεμπρίνη [Volpi & Bergonzini, 2006]. Αργότερα, μελετήθηκαν και τα πτητικά συστατικά της με κυριότερα: οξυγονωμένα μονοτερπένια (α-καμφολενάλη και *cis*-βερμπενόλη) και οξυγονωμένα σεσκιτερπένια (ακοραδιένιο και επικεδρόλη) σε μικρά ποσοστά. Πρόσφατα ανιχνεύθηκαν μέσω GC-MS ότι κύρια συστατικά της είναι τριτερπένια όπως α- και β- αμυρίνη, α- και β- αμυρόνη, α- και β-ακετόξυ αμυρίνη, λουπεόλη, μορετενόλη και ακετόξυ-μορετενόλη. Τα φυτά *Croton macrostachys* και *Cordia africana* αποτελούν την κύρια χλωρίδα της περιοχής συλλογής των δειγμάτων χωρίς να διευκρινίζεται αν αποτελούν φυτική πηγή για την πρόπολη [Rushdi *et al.*, 2014].

Το φυτικό είδος *Croton macrostachys* είναι μελιτοφόρο φυτό που φύεται επίσης και στο Cameroun [Πίνακας 1] και έχει ως βασικά συστατικά τριτερπένια όπως β-σιτοστερόλη, λουπεόλη και μπετουλίνη [Tala *et al.*, 2013] και είναι πιθανόν να αποτελεί φυτική πηγή των τριτερπενίων που ανιχνεύθηκαν στην πρόπολη της Αιθιοπίας ενώ για την *Cordia africana* δεν έχει δημοσιευθεί μέχρι σήμερα κάποια μελέτη.



**α-καμφολενάλη**



**cis-βερμπενόλη**



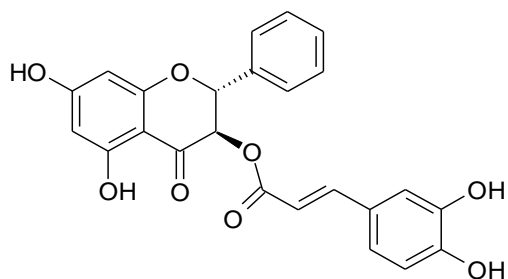
**Εικόνα 13. *Croton macrostachys* & *Cordia africana***

R= OH: μορετενόλη

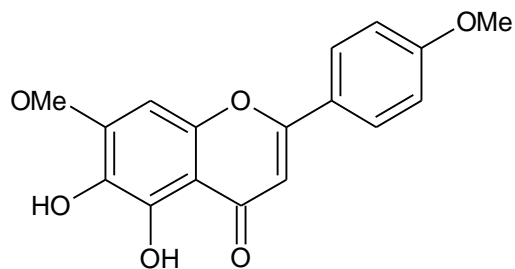
R= OAc: ακετοξυ-μορετενόλη

### Πρόπολη Αλγερίας

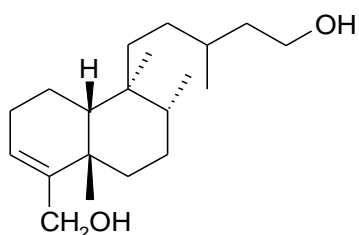
Πρόπολη με προέλευση την Β. Α. Αλγερία διαπιστώθηκε ότι ήταν πλούσια στα флаβονοειδή: απιγενίνη, γαλανγκίνη, καιμπερόλη, πινομπασκίνη, 3-ακετοξυ-πινομπασκίνη, χαλκόνη της πινοστρομπίνης, πεκτολιναριγκενίνη, λαντανεΐνη, 3(E)-καφεουλ-πινομπασκίνη και σε παράγωγα καφεικού οξέος όπως 2-μεθυλ-2-βουτενυλ-καφεϊκό οξύ, 3-μεθυλ-3-βουτενυλ-καφεϊκό οξύ και φαινυλ-αιθυλ-καφεϊκό οξύ [Seguenietal., 2013]. Σε πρόπολη από τη Β. Αλγερία ανιχνεύθηκαν μέσω GC-MS τα διτερπένια: αγκαθαδιόλη, κουπρεσσικό οξύ, ισοκουπρεσσικό οξύ, ιμβρικατολοϊκό οξύ, τορουλοσόλη, τορουλοσάλη, κισταδιόλη και 18-υδροξυ-cis-κλερονταν-3εν-18-ικό οξύ. Η 3-(E)-καφεουλ-πινομπασκίνη, η πεκτολιναριγκενίνη, η λαντανεΐνη, η κισταδιόλη και το 18-υδροξυ-cis-κλερονταν-3εν-18-ικό οξύ απομονώθηκαν για πρώτη φορά από πρόπολη. Για το πρώτο δείγμα κύρια φυτική πηγή είναι η Λεύκα ενώ για τη δεύτερο φυτά γένους *Cistus* [Seguenietal.; Piccinellietal., 2013].



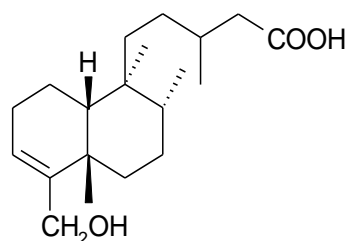
**3-(E)-καφεοϋλ-πινομπασκίνη**



**Λαντανεΐνη**



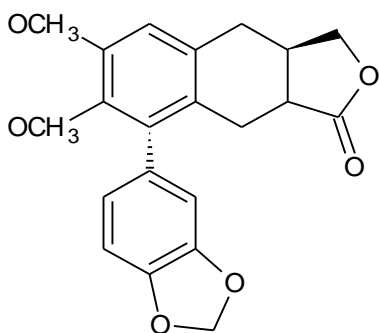
**Κισταδιόλη**



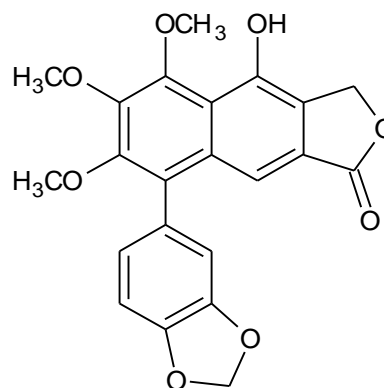
**18-υδροξυ-cis-κλερονταν-3-εν-18-ικό οξύ**

### Πρόπολη Κένυας

Σε πρόσφατη μελέτη πρόπολης από την Κένυα απομονώθηκαν για πρώτη φορά δυο νέα αρυλ-ναφθαλεν-λιγνάνια: η τετραϋδρο-ζουστισιδίνη B και η 6-μεθοξυ-διφυλλίνη καθώς και τέσσερα γνωστά φαινολικά παράγωγα: διφυλλίνη, φυλλαμυρικήνηC, η γερανυλ-φλαβόνη μακαρανγκίνη και δυο γερανυλ-στυλβένια: σβεΐνφουρθίνη A και σβεΐνφουρθίνη B [Petrova&Porona, 2010]. Κύρια φυτική πηγή φαίνεται να αποτελούν οι ρητινώδης εκκρίσεις του φυτού *Macaranga schweinfurthii* [Salatino&Salatino,2012].

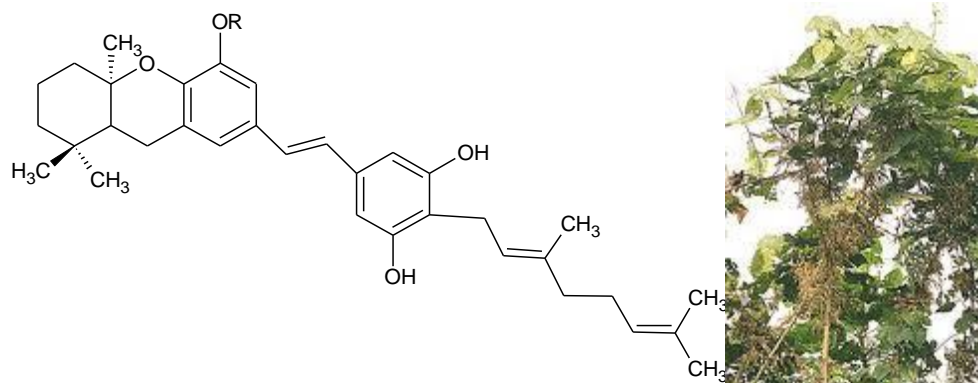


**τετραϋδρο-ζουστισιδίνη B**



**6-μεθοξυ-διφυλλίνη**





R=H, σβεΐνφουρθίνηΑ, R=OCH<sub>3</sub>: σβεΐνφουρθίνη Β Εικόνα 14. *Macaranga schweinfurthii*

### Πρόπολη Μαρόκου

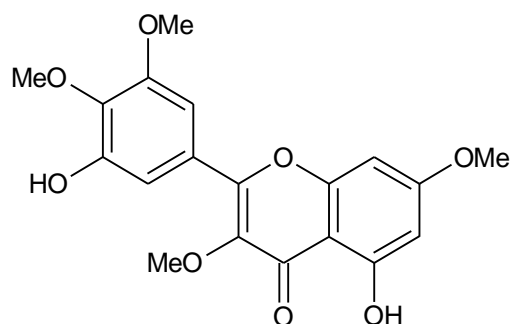
Σε πρόσφατη μελέτη σε δείγματα πρόπολης του Μαρόκου, απομονώθηκαν ως κύρια χημικά συστατικά, τα φλαβονοειδή ραμνετίνη, ισοραμνετίνη, λουτεολίνη, λουτεολινο-7-Ο-γλυκοσίδης και ως κύριες φυτικές πηγές θεωρούνται η ελιά *Olea europaea* και η χαρουπιά *Ceratonia siliqua* που αποτελούν την κύρια χλωρίδα των περιοχών συλλογής των δειγμάτων πρόπολης. [Mouse et al., 2012]. Ωστόσο η πρόταση αυτή είναι αμφισβητήσιμη μιας και ούτε η ελιά ούτε η χαρουπιά παράγουν ρητίνες, που δυνητικά να μπορεί να συλλέξει και να χρησιμοποιήσει στη παραγωγή πρόπολης η μέλισσα. Σε μεταγενέστερη αναφορά για την πρόπολη από το Μαρόκο, στη κύρια χλωρίδα της χώρας εκτός από την *Olea europaea* και *Ceratonia siliqua* προτάθηκαν και τα κωνοφόρα δένδρα *Pinus* sp. και *Juniperus* sp. καθώς και τα φυτικά γένη *Quercus* sp., *Pistacia* sp., *Lavandula* sp. και *Rosmarinus* sp., χωρίς ωστόσο να διευκρινίζεται, αν αυτά αποτελούν φυτική πηγή για την πρόπολη [Miguel et al., 2014].



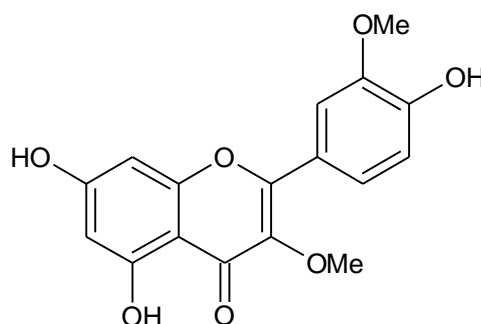
Εικόνα 15. *Pinus* sp. & *Juniperus* sp.

## Πρόπολη Τυνησίας

Σε πρόπολη από την Τυνησία απομονώθηκαν ένα νέο φλαβονοειδές: ο 3,7,4',5'-τετραμεθυλαιθέρας της μυρικετίνης (5,3'-διυδροξυ-3,7,4',5'-τετραμεθοξυ-φλαβόνη) και ο 3,7,3'τριμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (5,4'-διυδροξυ-3,7,4'-τριμεθοξυ-φλαβόνη). Τα δύο αυτά φλαβονοειδή είναι χαρακτηριστικά φυτών του γένους *Cistus* [Martos *et al.*, 1997]. Επιπλέον απομονώθηκαν και φλαβόνες όπως: χρυσίνη, γαλανγκίνη και φλαβανόνες (πινοσεμπρίνη και πινομπασκίνη) χαρακτηριστικές για πρόπολη τύπου λεύκας. Συνεπώς για την πρόπολη από την περιοχή της Τυνησίας ως κύριες φυτικές πηγές θα μπορούσαν να θεωρηθούν η Λεύκα και φυτά του γένους *Cistus*.



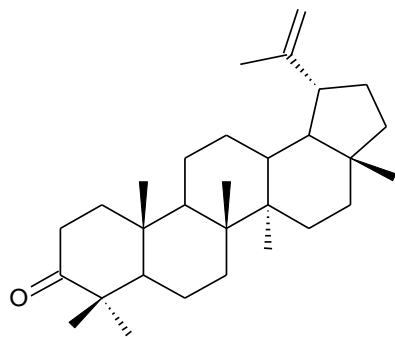
3,7,4',5'-τετραμεθυλ-αιθέρας της μυρικετίνης



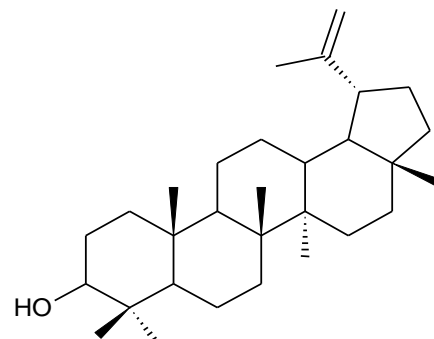
3,7,3'τριμεθυλ-αιθέρας της κερκετίνης

## Πρόπολη Καμερούν

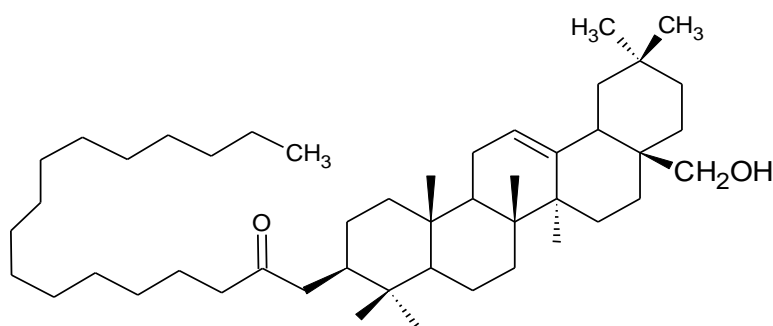
Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, η χημική σύσταση της πρόπολης από το Καμερούν έχει μελετηθεί δυο φορές μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε πρόπολη από την πόλη Μειγκανγκά στην περιοχή της Ανταμάουα (Β.Α.Καμερούν), με την απομόνωση τεσσάρων τριτερπενίων, της λουπενόνης, λουπεόλης, της παλμιτικής ερυθροδιόλης και της 18-ισο-ολεαν-12εν-3,11διόνης.[Talla *et al.*, 2013]. Επίσης αποτέλεσε μέρος μιας πρόσφατης μελέτης για τον προσδιορισμό του χημικού προφίλ της Αφρικανικής πρόπολης, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω[Zhan *et al.*, 2014].



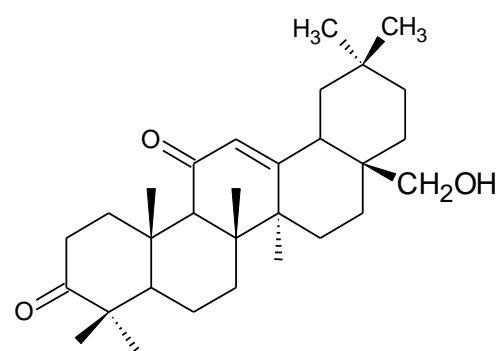
Λουπενόνη



Λουπεόλη



παλμιτική ερυθροδιόλη



18-ισο-ολεαν-12εν-3,11διόνης

### Επισκόπηση αναλύσεων πρόπολης22 γεωγραφικών περιοχών της Κεντρικής και Νοτίου Αφρικής

Σε μια προσπάθεια προσδιορισμού του χημικού προφίλ Αφρικανικής πρόπολης, εξετάστηκαν 22 δείγματα από τις χώρες : Ουγκάντα (5), Νιγηρία (3), Γκάμπια (1), Ζάμπια (2), Τανζανία (1), Μαλάουι (1), Κένυα (2), Καμερούν (2) και της Ν. Αφρικής (5) [Zhang *et al.*, 2014]. Οι χημικές αναλύσεις έγιναν με χρήση των μεθόδων LC-HRMS και GC-MS και τα δείγματα ανάλογα με τη χημική τους σύσταση χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες:

- Πρόπολη τύπου λεύκας (τρία δείγματα από τη Ν.Αφρική) με κύρια συστατικά τα φλαβονοειδή: πινοσεμπρίνη, πινομπασκίνη, χρυσίνη, γαλανγκίνη, 3-ακετοξυ-πινομπασκίνη και 5-μεθυλ αιθέρας της πινομπασκίνης.
- Πρόπολη **προτεινόμενη ως Μεσογειακού τύπου** (τα δείγματα από την Κένυα και δυο δείγματα από τη Ν. Αφρική) με κύρια συστατικά τους διτερπενικά οξέα για τα οποία δεν δίνονται περισσότερες πληροφορίες.

- Πρόπολη **προτεινόμενη ως Αφρικανικού τύπου** (από τις περιοχές Ουγκάντα, Τανζανία, Καμερούν, Ζάμπια και δυο δείγματα πρόπολης από τη Νιγηρία) με κύρια συστατικά τριτερπένια όπως η λουπεόλη και παράγωγα αμυρίνης

Η πρόπολη από το Μαλάουι και ένα από τα δείγματα με προέλευση τη Νότια Νιγηρία ξεχώρισαν για την υψηλή περιεκτικότητα τους σε πρενυλιωμένα ισοφλαβονοειδή (μακαρανγκίνη και ισομακαρανγκίνη) και βενζοφαινόνες για τις οποίες δεν δίνονται επιπλέον πληροφορίες και παρουσίασαν ομοιότητες με την κόκκινη πρόπολη της Βραζιλίας. Στην πρόπολη από τη Νότια Νιγηρία αναγνωρίστηκαν ανάμεσα στα βασικά της συστατικά και στυλβένια χωρίς αυτά να έχουν προσδιοριστεί περισσότερο [Zhangetal.,2014]. Ως κύρια φυτική πηγή των στυλβενίων, φαίνεται να είναι το φυτικό είδος *Macaranga schweinfurthii*, ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα η φυτική προέλευση δεν προσδιορίστηκε [Zhangetal.,2014].



**Εικόνα 16. Συνολικός χάρτης μελετημένων δειγμάτων Αφρικανικής πρόπολης.**

### 1.2.6 ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ

Η πρόπολη εμφανίζει πλήθος βιολογικών δράσεων και χρήσεων στη λαϊκή θεραπευτική. Σύγχρονες έρευνες πιστοποιούν πολλές από αυτές καθιστώντας την πρόπολη ως ένα ευρύτατα διαδεδομένο φυσικής προέλευσης θεραπευτικό προϊόν. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

#### Αντιμικροβιακή δράση

Η πρόπολη εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών δράσεων έναντι διάφορων Gramθετικών και αρνητικών βακτηρίων, όπως *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, *B. deKoch*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* sp., *S. sobrinus*, *S. mutans* & *S. cricetus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* [Kroletal., 1996; Parketal., 1998; Marcucci & Bankova 1999; Sforcinetal., 2000; Melliou & Chinou 2004; Awawdehetal., Popovaetal., 2009ii].

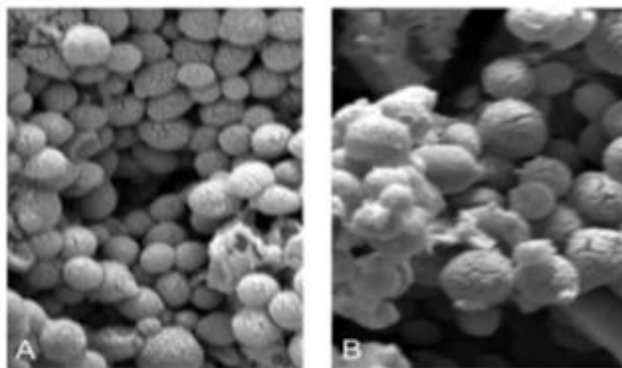
Από τις δοκιμές που έχουν δημοσιευτεί έχει διαπιστωθεί πως *in vitro* η πρόπολη μπορεί να δράσει απευθείας στον παθογόνο μικροοργανισμό ενώ *in vivo* μπορεί να ενεργοποιήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος (ενισχύοντας τη δράση των μακροφάγων και την παραγωγή αντισωμάτων) [Januzzi, 1993]. Η θερμοκρασία και η ενεργός οξύτητα επηρεάζουν σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης με την ισχυρότερη επίδραση για τον *S. aureus* να εμφανίζεται σε pH=5.0 και  $\theta=37^{\circ}\text{C}$  [Τρουλλίδου, 2007].

Οι αντιβακτηριακές δράσεις, αποδίδονται κυρίως στα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρόπολης, ενώ παράλληλη χορήγηση της με αντιβιοτικά φαίνεται να μειώνει τις παρενέργειες που αυτά προκαλούν στον οργανισμό. Η συνεργιστική αυτή δράση έχει αποδειχθεί από τον Chernyak και τους συνεργάτες του όταν συγχορήγησαν εκχύλισμα πρόπολης με αντιβιοτικά [Chernyak, 1973]. Μέσω παράλληλης λήψης αιθανολικού διαλύματος πρόπολης με γνωστά αντιβιοτικά βρέθηκε αύξηση της δράσης της αμικιλλίνης, της γενταμικίνης και της στρεπτομυκίνης καθώς και μέτρια αύξηση της δραστηριότητας της χλωραμφενικόλης, κεφτριαξόνης και βανκομυκίνης [Scazzocchioetal., 2006]. Ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνεται αυτή η συνεργιστική δράση είναι περίπλοκος, ωστόσο μπορεί να αποδοθεί στη συνέργεια των υδροξυ-οξέων των φλαβονοειδών και των σεσκιτερπενίων [Kedziaetal., 1990]. Σε μελέτη Ελληνικής πρόπολης (από την Πρέβεζα) διαπιστώθηκε ότι η 7-O-πρενυλ-στρομποπινίνη, η 7-O-πρενυλ-πινοσεμπρίνη, η πινοσεμπρίνη, η τοταρόλη, η κοπαλόλη και η χρυσίνη είναι εκείνα τα συστατικά που εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση [Melliou & Chinou, 2004]. Η πινοσεμπρίνη έδειξε να έχει την ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των παθογόνων *S. mutans* και *S. viridans* [Melliou & Chinou, 2004]. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε και η αντιμυκητιασική τους δράση έναντι των μυκήτων *C. albicans*, *C. tropicalis* και *C. glabrata*, με ισχυρότερη εκείνη της χρυσίνης.

Η αντιμικροβιακή δράση της Ελληνικής πρόπολης επαληθεύτηκε ξανά με ισχυρή αντιμυκητιασική δράση κυρίως έναντι των μυκήτων *E.coli* και *E.cloaceae*[Melliouetal.,2007]. Έναντι του *S.aureus* εμφάνισαν ισχυρή δράση γερανυλ-στιλβένια από πρόπολη Κένυας [Petrona&Porona,2010] αλλά και μονοτερπενικοί και σεσκιτερπενικοί εστέρες του βενζοϊκού οξέος από πρόπολη του Ιράν [Trushevaetal., 2010]. Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Σλοβενία παρουσίασε έντονη αντιβακτηριακή δράση κυρίως έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων (*S.aureus,S.pyogenes,E.faecalis*) και ενός Gram-αρνητικού βακτηρίου του γένους *Campylobacter*. Η δράση του εκχυλίσματος αποδόθηκε στις φαινολικές ενώσεις που περιείχε με κυρίαρχες: το φερούλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τη λουτεολίνη [Mavrietal., 2012].

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αντιβακτηριακές ιδιότητες της πρόπολης από τη Βραζιλία έχουν αποδοθεί στο υψηλό ποσοστό της σε δυο διτερπενικά οξέα (ισοκουπρεσσικό και ιμβρिकाτολοϊκό οξύ)[Bankovaetal., 1996]. Επίσης αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από την Κρήτη, εμφάνισε ισχυρότατη αντιμικροβιακή δράση η οποία αποδόθηκε στα συστατικά τοταρόλη και η τοταρολόνη. Εξίσου υψηλή αντιβακτηριακή δράση εμφάνισαν και δυο τριτερπενικά οξέα της κατηγορίας των κυκλαρτενίων[Poronaetal.,2009ii].

Σε καλλιέργεια του μύκητα *Candida albicans* (Εικόνα μικροσκοπίου 17A) παρατηρήθηκε καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος μετά από χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος πράσινης πρόπολης (Εικόναηλεκτρονικού μικροσκοπίου 17B) [Santos, 2012].



**Εικόνα 17. Επίδραση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης στο κυτταρικό τοίχωμα της *Candidaalbicans***

### **Αντιϊκή δράση**

Έχει μελετηθεί διεξοδικά η δράση της πρόπολης έναντι πολλών διαφορετικών ιών [Gekkeretal., 2005; Bufaloetal., 2009; Sforcinetal., 2001]. Έχει διαπιστωθεί η ανασταλτική δράση φλαβονοειδών που βρίσκονται στην πρόπολη έναντι διαφόρων τύπων ερπητοϊών, αδενοϊών και ενός ροταϊού. Ισχυρότερη δράση αποδείχθηκε ότι εμφανίζουν τα φλαβονοειδή χρυσίνη και καιμπερόλη [Debiaggiatal., 1990]. Η πρόπολη, λόγω της αντιϊκής της δράσης, δρα προφυλακτικά έναντι εμφάνισης κοινής γρίπης, ηπατίτιδας Β ακόμη και έρπητα ζωστήρα. Ωστόσο η αντιϊκή της δράση δεν οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στα φλαβονοειδή αλλά και σε άλλα συστατικά μικρής περιεκτικότητας όπως είναι τα παράγωγα καφεϊκού οξέος που θεωρείται ότι δρουν συνεργικά. Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι ο φερουλικός ισοπεντυλ-εστέρας ανέστειλε τη μολυσματική δράση του ιού της γρίπης virus A/HongKong(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) [Serkedjievatal., 1992]. Ακόμη έχει μελετηθεί η *in vitro* δράση έναντι του ιού *Herpes simplex* του συστατικού 3-μεθυλ-βουτ-2-ενυλεστέρα του καφεϊκού οξέος [Amorosetal., 1994].

Επιπλέον παρατηρήθηκε *in vitro* θεραπευτική δράση παραγώγων του μορονικού οξέος κατά του ιού του HIV-1, σε τεστ που πραγματοποιήθηκε σε H9 λεμφοκύτταρα [Itoetal., 2001]. Ένα χρόνο αργότερα δημοσιεύθηκε και η αντιϊκή δράση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης από το ανατολικό Δέλτα του Νείλου, στην Αίγυπτο, έναντι του ιού IBDV [Fatenetal., 2002].

Η δράση της πρόπολης κατά του ιού HIV-1 διαπιστώθηκε και το 2005 όπου παρατηρήθηκε αναστολή της έκφρασης του ιού σε CD4(+) λεμφοκύτταρα [Gekkeretal., 2005]. Κόκκινη πρόπολη από την Κούβα εμφάνισε και αυτή αυξημένη δραστηριότητα έναντι του ιού του HIV και αλλά και του ιού HPV [Ahnetal., 2007].

### **Αντιπαρασιτική δράση**

Η πρόπολη είναι αποτελεσματική επίσης έναντι των παρασίτων Τριχομονάδας (*Trichomonas vaginalis*) και Τρυπανοσώματος (*Trypanosomacruzi*), με τη δράση της να οφείλεται στην αναστολή κυρίως της πρωτεϊνοσύνθεσης τους. Σε κλινική μελέτη μάλιστα παρατηρήθηκε η δράση της και εναντίον των παρασίτων του γένους *Giardia* καθώς και η *in vitro* παρεμπόδιση ανάπτυξης της *G. duodenalis* [Freitasetal., 2006].

### **Αντιοξειδωτική δράση**

Αντιοξειδωτικές δράσεις είναι εκείνες που μπορούν να προστατεύσουν ή/και να θεραπεύσουν βλάβες που προκαλούνται μέσω της επίδρασης των ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species, ROS). Το 1994

δημοσιεύθηκε μελέτη σχετικά με τις αντιοξειδωτικές δράσεις αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης από δύο περιοχές της Κούβας και διαπιστώθηκε ότι εμφάνισαν 50 % αναστολή του ενζύμου ξανθινοοξειδάση με προσθήκη 5 μg/ml και 9,5 μg/ml πρόπολης αντίστοιχα [Pascualetal., 1994].

Έχει επίσης διαπιστωθεί η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση πέντε διαφορετικών δειγμάτων πρόπολης Βραζιλίας με μεθόδους (DPPH) και (XOD) [Matsushigeetal., 1995], όπως και εκχυλισμάτων πρόπολης από Κίνα, Αυστραλία, Ν. Ζηλανδία και Ιαπωνία. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν, ότι επειδή η α-τοκοφερόλη υπήρχε σε όλα τα δείγματα της μελέτης, η αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης συσχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη της [Oyaizuetal., 1999]. Αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης Αιγυπτιακής προελεύσεως [Hegazieta., 2001] εμφάνισαν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε νεώτερες μελέτες σε πρόπολη Κούβας επίσης εμφανίσθηκε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, που αποδόθηκε στην παρουσία βενζοφαινονών και συγκεκριμένα στη νεμοροσόνη [Cuesta-Rubioetal. 2002].

Μελέτες αντιοξειδωτικής δράσης σε εννέα δείγματα πρόπολης από τη Βραζιλία, το Περού, την Ολλανδία και τη Κίνα έδειξαν ότι τα υδατικά εκχυλίσματα Βραζιλιάνικης και Κινέζικης πρόπολης είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα μεθανολικά εκχυλίσματα με τιμές ED<sub>50</sub> από 5,9 έως 14,2 μg/ml, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα πράσινης πρόπολης Βραζιλίας έδειξαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση με τιμή ED<sub>50</sub> = 5,9 μg/ml [Banskotaetal., 2000].

Σε *invivo* πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες αρουραίων με έλλειψη στην βιταμίνη E, όπου στην μία από τις δύο ομάδες χορηγούσαν πρόπολη. Οι ερευνητές παρατήρησαν, στην ομάδα αρουραίων που έπαιρνε πρόπολη, υψηλή συγκέντρωση της βιταμίνης C σε ιστούς, όπως στα νεφρά και στο στομάχι. Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα αυτά προτείνεται ότι η πρόπολη περιέχει ορισμένα χημικά συστατικά που απορροφώνται από το αίμα και λειτουργούν ως λιποφιλικά αντιοξειδωτικά προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο την βιταμίνη C [Sunetal., 2000].

Σύμφωνα με τους Ahnetal, το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις σε καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και εστέρες καφεϊκού οξέος (CAPE) [Ahnetal., 2007]. Αντιοξειδωτική δράση έδειξαν επίσης δείγματα Ελληνικής πρόπολης με την μέθοδο Rancimat, που αποδίδεται στην υψηλή συγκέντρωση των δειγμάτων σε φλαβονοειδή [Μάρκος 2010, Κατραμάνου 2012].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί και η προστατευτική δράση της πρόπολης σε κύτταρα που έχουν υποστεί ακτινοβολήση με ακτίνες γ. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε, *invivo* σε ποντίκια, διαπιστώθηκε πως αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες που προκαλεί



η ακτινοβόληση [Schelleretal.,1989]. Η ικανότητα της πρόπολης να προστατεύει από τη ραδιενεργό ακτινοβολία γ και να βοηθά στην αναγέννηση των κατεστραμμένων από την ακτινοβολία κυττάρων, επιβεβαιώθηκε σε νεώτερη έρευνα, που αποδόθηκε στα αιθανολικά και μεθανολικά εκχυλίσματα, αλλά και στους δευτερογενείς μεταβολίτες κερκετίνη, ναριγγενίνη, χρυσίνη και καφεϊκό οξύ. Χαρακτηριστικά μεγαλύτερη δραστικότητα εμφάνισε το φλαβονοειδές κερκετίνη [Orsoliceetal.,2007].

### **Αντιφλεγμονώδης δράση**

Μία από τις παραδοσιακές φαρμακευτικές ιδιότητες της πρόπολης είναι η αντιφλεγμονώδης της δράση. Συνήθως, η πρόπολη χρησιμοποιείται για την θεραπεία φλεγμονών του δέρματος καθώς έχει την ικανότητα να διεγείρει την κινητικότητα των μακροφάγων κυττάρων και να καταστέλλει ένζυμα που επιτρέπουν σε μια φλεγμονή να αναπτυχθεί [Marcucci,1995]. Η αντιφλεγμονώδης δράση της πρόπολης αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό, στην αντιοξειδωτική της δράση και συνεπώς στις φαινολικές της ενώσεις [Kroletal., 1996].Την ίδια χρονιά αναφέρθηκε ο φαινυλ-αιθυλ-εστέρας του καφεϊκού οξέως ως ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας, ο οποίος φαίνεται να εμπλέκεται στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέως [Mirzoeva&Calder,1996].Αργότερα μελετήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση 14 εμπορικών αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, σε φλεγμονές σε αυτιά ποντικών και παρατήθηκαν ποικίλες διαβαθμίσεις στις δράσεις. Τα διαλύματα 20% και 40% πρόπολης (95% EtOH) εμφάνισαν δόσο-εξαρτώμενη αντιφλεγμονώδη δράση [Menezesetal., 1999]. Σε μια άλλη μελέτη εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδης δράση πρόπολης σε τραύμα,*in vivo*, στα μάτια κουνελιών και βρέθηκε ότι η πρόπολη περιόριζε την φλεγμονή τόσο ισχυρά, όσο η δεξαμεθαζόνη [Ozturketal., 2000].

### **Αναλγητικήδράση**

Η αναλγητική δράση της πρόπολης έχει αποδοθεί στα φλαβονοειδή και στα φαινολικά παράγωγα που περιέχει [Dulcettietal.,2004]. Ωστόσο σε εξέταση της αναλγητικής δράσης τεσσάρων τριτερπενίων που απομονώθηκαν από πρόπολη του Cameroon: της λουπενόνης, της λουπεόλης, της παλμιτικής ερυθροδιόλης και της 18-ισο-ολεαν-12εν-3,11διόνης, διαπιστώθηκε ότι προκάλεσαν δόσο-εξαρτώμενη αναλγησία με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της δράσης των οπιοειδών[Tallaetal., 2013].

### **Αντιασθματική δράση**

Έχει αναφερθεί ότι η πρόπολη έχει αντι-ασθματική δράση [Donadieu, 1979], ενώ πρόσφατα εμφανίσθηκε σημαντική μείωση των κρουσμάτων κρίσης άσθματος και βελτίωση της αναπνοής μετά από χορήγηση υδατικού διαλύματος πρόπολης 13% ημερησίως για δύο μήνες σε ασθματικούς ασθενείς [Kayyaetal.,2003].

### **Αντιδιαβητική δράση**

Σε μελέτες δειγμάτων Ελληνικής πρόπολης, *in vivo*, τα αιθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων εμφάνισαν ισχυρή υπογλυκαιμική δράση της τάξης του 30-40% (μείωση του επιπέδου γλυκόζης) στο αίμα διαβητικών ποντικών [Daniaetal.,2008].

### **Αντι-υπερτασική δράση**

Η αντιυπερτασική δράση της πρόπολης διαπιστώθηκε επιστημονικά για πρώτη φορά το 1988, όπου παρατηρήθηκε μείωση της πίεσης του αίματος κατά την χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (σε συγκεντρώσεις 100-500 mg) *in vivo*, σε αρουραίους και ποντίκια [Kedziaetal., 1988]. Αργότερα σεμελέτη σε δείγματα Βραζιλιάνικης πρόπολης η αντι-υπερτασική της δράση αποδόθηκε στην παρουσία των καφεοϋλκινικών οξέων [Mishimaetal., 2005].

### **Επουλωτική δράση**

Όπως έχει αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες, η πρόπολη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία τραυμάτων, δερματοπάθειας, οιδημάτων και εγκαυμάτων δευτέρου βαθμού [Khachaturon&Gudkon,1969]. Η επουλωτική δράση της πρόπολης ήταν εμφανής στην περίπτωση μολυσμένων μετεγχειρητικών τραυμάτων σε παιδιά στην Κούβα [DeCastro, 2001], που έλαβαν μαζί με την πρόπολη και τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Η επουλωτική δράση της πρόπολης μελετήθηκε και στην περίπτωση του έλκους του δωδεκαδάκτυλου, όπου φαίνεται ότι κύρια φαινολικά συστατικά Βραζιλιάνικης πρόπολης (φερουλικό, καφεϊκό, p-κουμαρικό και κινναμωμικό οξύ) έδρασαν προστατευτικά και άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μετά από περισσότερα πειράματα ως θεραπευτικοί παράγοντες σε περιπτώσεις γαστρικού έλκους [Barrosetal., 2007].

### **Κυτταροτοξική δράση**

Οφαινυλαιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέως, έχει εμφανίσει σημαντική κυτταροτοξικότητα, έναντι πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών [Grunbergeretal., 1988]. Επιπλέον σε μια σειρά διαφορετικών πειραμάτων εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξική δράση σε διάφορες κυτταρικές σειρές από όγκους [Burdock 1998; Banskotaetal., 2001]. Η ανοσοποιητική δράση υδατικών εκχυλισμάτων Βραζιλιάνικης πρόπολης εξετάστηκε σε συνδυασμό με αντικαρκινικά φάρμακα σε ποντίκια που έφεραν όγκο Ehrlich [Suzuki<sup>etal.</sup> 1996]. Οι πιο σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις στον όγκο Ehrlich παρατηρήθηκαν όταν το υδατικό εκχύλισμα χορηγήθηκε ενέσιμα, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ακόμη και εξαφάνιση των όγκων.

Κατά την ενέσιμη ημερήσια χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης σε συνδυασμό με αντικαρκινικά φάρμακα, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της παραγωγής των λεμφοκυττάρων και βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος των ποντικών [Takai *et al.*, 1996].

Δείγμα πρόπολης από την Ολλανδία βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, ενώ τα κύρια χημικά συστατικά που απομονώθηκαν από αυτό το δείγμα ήταν ο φαιναιθυλ-εστέρας του καφεϊκού οξέος και δύο εστέρες γλυκερόλης με παράγωγα κινναμωμικού οξέος [Banskota *et al.*, 1998]. Σε νεώτερες μελέτες που έγιναν με πράσινη πρόπολη από τη Βραζιλία, φαίνεται πως τόσο το υδατικό εκχύλισμα της πρόπολης όσο και ορισμένα από τα απομονωμένα συστατικά της (κερκετίνη, CAPE, καφεϊκό οξύ) μείωσαν τον αριθμό καρκινικών οζιδίων στους πνεύμονες ποντικών. Υψηλότερη αντι-μεταστατική δράση όμως παρατηρήθηκε, όταν χορηγήθηκε ολικό εκχύλισμα πρόπολης, οδηγώντας τους επιστήμονες στο συμπέρασμα ότι η αντιμεταστατική δράση οφειλόταν σε συνέργεια πολλών συστατικών [Orsolice *et al.*, 2004].

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με μεθανολικό εκχύλισμα κόκκινης πρόπολης από τη Βραζιλία, βρέθηκε ότι χορήγηση συγκέντρωσης των 10mg/ml εκχυλίσματος ήταν ικανή να σκοτώσει στο 100% το PANC-1. Μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα εμφάνισε η 6aR,11aR-3,8-διυδροξυ μεθοξυ-πτεροκαρπάνη [Suresh *et al.*, 2008].

Σε δείγματα Ελληνικής πρόπολης, εξετάστηκε η κυτταροτοξική δράση του βουτανολικού εκχυλίσματος και απομονωμένων διτερπενίων, έναντι καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HT-29). Τόσο το εκχύλισμα όσο και τα διτερπένια, εμφάνισαν ισχυρή κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων χωρίς ωστόσο να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα [Pratsinis *et al.*, 2010]. Επιπλέον δραστηριότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων HT-29 αλλά και των MCF και Caco-2 εμφάνισε πρόπολη Ινδικής προέλευσης. [Choudhari *et al.*, 2013].

### **Εφαρμογή σε αυτοάνοσα νοσήματα**

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια αυτοάνοση πάθηση του δέρματος. Σε πρόσφατη δημοσίευση χορηγήθηκε εξωτερικά αλοιφή πρόπολης, *peros* κάψουλες πρόπολης και ενδοδερμικά δηλητήριο μέλισσας σε μια σειρά ασθενών με ψωρίαση. Μελετήθηκε η απόκριση με βάση τη περιοχή ψωρίασης και το δείκτη σοβαρότητας (Psoriasis Area and Severity Index) μετρώντας τα επίπεδα ιντερλευκίνης 1-β πριν τη θεραπεία και τρεις μήνες μετά τη θεραπεία. Συμπερασματικά, βρέθηκε πως και στις τρεις περιπτώσεις χορήγησης υπήρξε θετική ανταπόκριση με ελάχιστες παρενέργειες ενώ η μεγαλύτερη δραστηριότητα εμφάνιστηκε σε ασθενείς που τους χορηγήθηκε ενδοδερμικά δηλητήριο και τοπικά πρόπολη [Hegazi *et al.*, 2013].

## **1.2.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ&ΧΡΗΣΕΙΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ**

### **Εμπορικές μορφές πρόπολης**

Εξαιτίας των παραπάνω δράσεών της, η πρόπολη χρησιμοποιείται σε σκευάσματα στη θεραπευτική, κυρίως στη δερματολογία, χειρουργική, οδοντιατρική, ωτορινολαρυγγολογία και στη γυναικολογία είτε αυτούσια είτε ως συστατικό μιγμάτων σκευασμάτων [Takaisi&Schilcher,1994;DeCastro 2001]. Δερματολογικές και καλλυντικές εφαρμογές είναι σήμερα οι πιο κοινές χρήσεις της πρόπολης [Lejeune*et al.*, 1988; Στρατής, 2002]. Στο εμπόριο κυκλοφορεί επίσης υπό μορφή σιροπιού ή σπρέι βοηθώντας αποτελεσματικά στη διατήρηση της υγιεινής της στοματικής κοιλότητας, όπου καταπολεμά τις μικροβιακές μολύνσεις και την κακοσμία. Επίσης κυκλοφορεί υπό την μορφή σκόνης, πάστας, αλοιφής, οδοντόκρεμας, γαλακτωμάτων, αλκοολικών ή γλυκολικών βαμμάτων, αλοιφών, ελαίων, χαπιών και κρεμών. Σκευάσματα πρόπολης μπορούν να συνδυαστούν και με άλλα προϊόντα της μέλισσας, (γύρη, μέλι) ή και με άλλα ανοσο-ενισχυτικά φυτικά φάρμακα όπως η εχινάκεια και ο πάναξ [Κατραμάνου, 2012].

### **Τεχνολογία τροφίμων**

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες της πρόπολης βρίσκουν εφαρμογή στην τεχνολογία τροφίμων και ειδικότερα στη χρήση της ως συντηρητικού [Donadieu, 1979], όπου σε αντίθεση με άλλα συντηρητικά τροφίμων, έχει μια γενικότερη θετική επίδραση στην υγεία των καταναλωτών [Tosi*et al.*, 2007]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2013 και είχε σαν αντικείμενο τη χρήση της πρόπολης ως συντηρητικό για τη διατήρηση μεγάλης ποσότητας πατάτας για χρονικό διάστημα τεσσάρων μηνών. Αποδείχθηκε ότι η πρόπολη εμπόδισε αποτελεσματικά την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών [Bahtiti, 2013].

### **Κτηνιατρική χρήση**

Σε πείραμα που διεξάχθηκε στην Ιαπωνία, η προσθήκη μόλις 30ppm πρόπολης στις μερίδες τροφής των ορνίθων οδήγησε σε ενίσχυση της παραγωγής αυγών, αλλά και του βάρους των ίδιων των πουλερικών [Ghisalberti, 1979]. Επιπλέον μελέτη Αιγυπτιακής πρόπολης απέδειξε την ισχυρή ανασταλτική της δράση, έναντι του *Fasciolagigantica* ενός παράσιτου που προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις σε μηρυκαστικά ζώα, σε συγκέντρωση 200μg/ml έως 800μg/ml [Hegazi*et al.*, 2007].

### 1.3 CAMEROON&CONGO

Το **Cameroon** (επίσημα **Δημοκρατία του Καμερούν**) είναι κράτος της κεντρικής και δυτικής Αφρικής. Συνορεύει με τη Νιγηρία στα δυτικά, το Τσαντ στα βορειοανατολικά, την Κεντροαφρικανική Δημοκρατία στα ανατολικά και την Ισημερινή Γουινέα, τη Γκαμπόν και τη Δημοκρατία του Congo στα



νότια. Το Cameroon χαρακτηρίζεται από μεγάλη μορφολογική αλλά και πολιτισμική ποικιλότητα. Στην επικράτειά του υπάρχουν παραλίες, έρημοι, βουνά, τροπικά δάση και σαβάνες και ζουν πάνω από 200 διαφορετικές εθνικές και γλωσσικές ομάδες. Πρωτεύουσα είναι η Γιαουντέ και μεγαλύτερη πόλη η Ντουάλα.

Η ενασχόληση με τη μελισσοκομία σε δασικές περιοχές έχει παράδοση αιώνων για το Cameroon συνεισφέροντας κατά μέσο όρο στο 52% των εσόδων των νοικοκυριών των μελισσοκόμων της σαβάνας της Adamaoua αλλά και των Β.Δ. βουνών του Cameroon. Παρόλα αυτά οι οικονομικές απολαβές αγγίζουν τα όρια της φτώχειας. Η πρόπολη της περιοχής του

Cameroon είναι το λιγότερο σε ποσότητα εξαγωγίμο μελισσοκομικό προϊόν και το πιο ακριβό από το μέλι και το κερί. Για τους παραπάνω λόγους ιδρύθηκε και ο οργανισμός GuidingHope , δρώντας ως οδηγητής υποστηρίζοντας τον τομέα της μελισσοκομίας με σκοπό να βελτιώσει αυτήν την κατάσταση και να αναγεννήσει την οικονομία της χώρας[Ingram,2011i].

### ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

#### **Μέλι**

Στο Cameroon το μέλι χρησιμοποιείται ως υψηλής ενέργειας και διατροφικής αξίας τρόφιμο αλλά και ως θεραπευτικός παράγοντας (σε περιπτώσεις έντονου βήχα και δερματικών παθήσεων). Λόγω αυτής της εκτίμησης, σε πολιτισμικό επίπεδο , χρησιμοποιείται ακόμη και ως δώρο.

#### **Κερί**

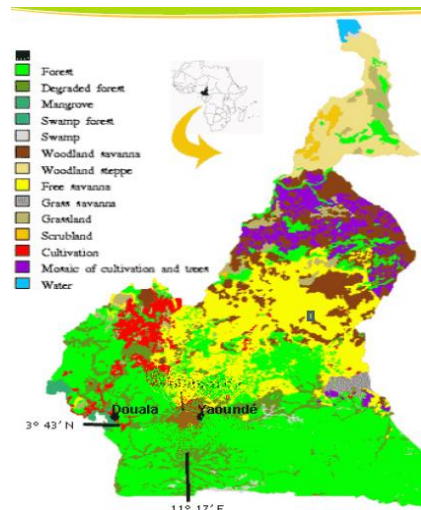
Το κερί χρησιμοποιείται στην κατασκευή κεριών, στην κοσμετολογία και στον τομέα των φαρμακευτικών προϊόντων ιδίως για τις ενυδατικές και τις γαλακτοματοποιητικές του ιδιότητες. Στην απλή καθημερινότητα έχει αναφερθεί και η χρήση του για την κατασκευή καλουπιών.

## Πρόπολη

Η πρόπολη εμφανίζει υψηλή φαρμακευτική αξία. Χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή Αφρικανική θεραπευτική και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αυξανόμενη ζήτηση της από Ευρωπαϊκές και Αμερικάνικες φαρμακευτικές εταιρείες.

## Οικονομία

Στο σύνολό τους αυτά τα μελισσοκομικά προϊόντα είτε ανεπεξέργαστα είτε επεξεργασμένα αποτελούν αντικείμενο διαπραγματεύσεων τόσο σε τοπικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Το πιο εξαγωγίμο σε ποσότητα είναι το μέλι, ακολουθεί το κερύ και τέλος η πρόπολη. Για έναν μέσο μελισσοκόμο οι ποσότητες μελιού ανά κυψέλη κυμαίνονται μεταξύ 10,5 λίτρων μέλι (περιοχή Adamawa) με 12,5 λίτρα (για τις Β.Δ περιοχές). Η τιμή για το λίτρο είναι κυμαινόμενη ανά περιοχή και ανά ποσότητα παραγωγής με συνολικό κέρδος για τον παραγωγό της τάξης των 315-484 ευρώ ετησίως. Το υψηλής ποιότητας κίτρινο κερύ (σε αντίθεση με το πιο φθινό μαύρο κερύ) φτάνει να πωλείται σε τιμή 3,8 ευρώ το κιλό. Το πιο ακριβό μελισσοκομικό προϊόν είναι η πρόπολη με τιμή που κυμαίνεται από 6,8 έως 15,24 ευρώ το κιλό μιας και ετησίως εξάγονται μόλις 30 κιλά. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 2010 εξήχθησαν 22 τόνοι από πιστοποιημένο μέλι Αφρικής στην Ευρώπη [Ingram,2011i].



**Εικόνα 18.Χαρτης αγροτικής ανάπτυξης  
Cameroon**



## Congo

Το Congo (επίσημα **Λαϊκή Δημοκρατία** ή **Λαοκρατική Δημοκρατία του Congo**) είναι μια πρώην γαλλική αποικία της Κεντρικής Αφρικής. Πήρε το όνομά της από τον ποταμό Congo ο οποίος διασχίζει ολόκληρη τη χώρα. Συνορεύει με την Αγκόλα στα νότια, με το Cameroon, την Κεντροαφρικανική Δημοκρατία και τη Γκαμπόν στα βόρεια και τη Δημοκρατία του Congo στα ανατολικά. Πρωτεύουσα είναι η Κινσάσα. Η χώρα είναι αραιοκατοικημένη, με τον πληθυσμό να συγκεντρώνεται κυρίως στο νοτιοδυτικό τμήμα της χώρας, αφήνοντας τις τεράστιες περιοχές της τροπικής ζούγκλας του βορρά σχεδόν ακατοίκητες. Χαρακτηρίζεται από βουνά, τροπικά δάση και σαβάνες.

### ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Σε αντίθεση με το Cameroon η ενασχόληση με τη μελισσοκομία είναι μικρής κλίμακας με περίπου 60 παραγωγούς. Το 22% της συνολικής συγκομιδής προέρχεται από άγριες αποικίες μελισσών. Η συνολική παραγωγή σε μέλι, κερύ και πρόπολη είναι περίπου 500 λίτρα ετησίως και αποφέρει εισόδημα στους τοπικούς εμπόρους της τάξης των 172 ευρώ ετησίως. Τα μελισσοκομικά αυτά προϊόντα χρησιμοποιούνται κυρίως στην λαϊκή θεραπευτική και στην κοσμετολογία. Η ενασχόληση με τη μελισσοκομία έχει ενισχυθεί από ειδικούς οργανισμούς όπως ο Mamru Cooperative στην προσπάθεια ενίσχυσης της τοπικής οικονομίας [Ingram, 2011 iii].

## ΜΕΛΙΤΟΦΟΡΑ ΦΥΤΑ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΥΨΙΠΕΔΩΝ CAMEROON & CONGO

Ως **μελιτοφόρα** χαρακτηρίζονται εκείνα τα φυτά που συνθέτουν τις ουσίες που μπορούν να συλλέγονται από τα έντομα και να μετατραπούν σε μέλι. Πολλά φυτά είναι μελιτοφόρα, αλλά μόνο ορισμένα φυτά έχουν τη γύρη και το νέκταρ που μπορούν να συλλέγονται από μέλισσες.

Με σύγχρονες μεθόδους μελέτης έχει γίνει ταξινόμηση των φυτικών οικογενειών των μελιτοφόρων φυτών του Cameroon και του Congo. Τα πλέον προτιμώμενα φυτά από τις μέλισσες ήταν: *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae), *Coffea arabica*, *Coffea robusta* (Rubiaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae), *Helichrysum* sp. (Asteraceae) και *Terminalia macroptera* (Combretaceae) [Dongok et al., 2007; Ingram, 2011ii]. Στις τροπικές ζώνες, οι μέλισσες φαίνεται να επιλέγουν τα πιο ελκυστικά από τα μελιτοφόρα φυτά που βρίσκονται κοντά στην κυψέλη τους και με ιδιαίτερη προτίμηση στον ευκάλυπτο [Lobreau-Callen & Damblon, 1994].

Γυρεολογικός έλεγχος των προς μελέτη δειγμάτων πρόπολης, έδειξε την ύπαρξη των παρακάτω φυτικών ειδών της χλωρίδας του Cameroon και του Congo, που χαρακτηρίζονται ως μελιτοφόρα (ιθαγενή φυτά και εξωτικές καλλιέργειες) [Ingram, 2011ii].

ΙΘΑΓΕΝΗ ΦΥΤΑ		ΕΞΩΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	
Επιστημονική ονομασία	Οικογένεια	Επιστημονική ονομασία	Οικογένεια
<i>Acanthus ilicifolius</i>	Acanthaceae	<i>Albizia gummifera</i> <i>A. adianthifolia</i>	Fabaceae- Mimosoideae
<i>Aframomum</i> sp.	Zingiberaceae	<i>Aleurites moluccana</i>	Euphorbiaceae
<i>Aspilia africana</i>	Asteraceae	<i>Bombax pentandrum</i> L	Bombacaceae
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	<i>Boswellia neglecta</i>	Burseraceae
<i>Coreopsis</i> sp.	Asteraceae	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae
<i>Croton macrostachyus</i>	Euphorbiaceae	<i>Callistemon viminalis</i> , <i>C.</i> <i>rigidus</i>	Myrtaceae
<i>Diospyrus rubra</i> Lec	Ebenaceae	<i>Cicer arietinum</i>	Leguminosae
<i>Elais guineensis</i>	Arecaceae	<i>Citrus medica</i>	Rutaceae
<i>Elateriospermum</i> sp.	Euphorbiaceae	<i>Coffea arabica</i> , <i>C. robusta</i>	Rubiaceae
<i>Erythrina senegalensis</i>	Leguminosae/ Papilionoideae	<i>Croton moluccanus</i> , <i>C. macrostachys</i>	Euphorbiaceae



<i>Ficus pandurata</i> <i>F.sur</i>	Moraceae	<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitaceae
<i>Hibiscus asper</i>	Malvaceae	<i>Dacryodes edulis</i>	Burseraceae
<i>Hypericum lanceolatum</i> , <i>H. revolutum</i>	Hypericaceae	<i>Dorstenia manii</i>	Moraceae
<i>Mimosa invisa</i>	Mimosoideae	<i>Eucalyptus resinifera</i> , <i>E.pellita</i> , <i>E.saligna</i>	Myrtaceae
<i>Monotes engleri</i> , <i>M.africanus</i>	Dipterocarpaceae	<i>Helicrysum</i> <i>gymnocephalum</i>	Asteraceae
<i>Phyllanthus polyanthus</i>	Phyllanthaceae	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Malvaceae
<i>Sechium edule</i>	Cucurbitaceae	<i>Hypeastrum equestre</i>	Liliaceae
<i>Solanum nigrum</i> , <i>S.tuberosum</i> <i>S.macrocarpum</i>	Solanaceae	<i>Maesa lanceolata</i>	Myrsinaceae
<i>Tectona grandis</i>	Verbanaceae	<i>Morus mesozygia</i>	Moraceae
<i>Vepris louisii</i>	Rutaceae	<i>Pinus sp.</i>	Pinaceae
<i>Vernonia amygdalina</i> , <i>V.conferta</i>	Asteraceae	<i>Thevetia nerifolia</i>	Apocynaceae
<i>Vigna cylindrical</i> <i>V.mungo</i>	Leguminoseae	<i>Vitellaria paradoxa</i>	Sapotaceae

Πίνακας 1. Μελιτοφόρα φυτά που φύονται σε Cameroon&Congo

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΓΕΝΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Συνολικά μελετήθηκαν ένα δείγμα από την περιοχή Mamru (Plateaubateke) της Δημοκρατίας του Congo (Δείγμα 1) και τρία δείγματα από το Cameroon: Oku (Δείγμα 2), Ngaoundal (Δείγμα 3) και Tekel (Δείγμα 4). Η προέλευση των δειγμάτων φαίνεται στην **Εικόνα 20**.



**Εικόνα 19. Χάρτης συλλογής δειγμάτων**

### **2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Η εργαστηριακή μελέτη των δειγμάτων περιλαμβάνει τα εξής στάδια επεξεργασίας:

- Καθαρισμός από προσμίξεις
- Ζύγιση των δειγμάτων .
- Εκχύλιση των δειγμάτων με 70% αιθανόλη σε νερό. Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε 3 φορές προκειμένου να παραληφθεί ποσοτικά το σύνολο των συστατικών για κάθε δείγμα.
- Τα εκχυλίσματα του κάθε δείγματος συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού με χρήση συμπυκνωτή υπό κενό RotavaporBüchiR-200 σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο BüchiHeatingBathB-490 στους 35-40°C.

### 2.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ

- Σε συγκεκριμένη ποσότητα ανά δείγμα πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικοί διαχωρισμοί τύπου VLC και ανοιχτής στήλης υπό κενό, με στατική φάση silica gel MERCK 60H και silica gel MERCK 230-400 mesh ASTM και οργανικούς διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) με σκοπό την κλασμάτωση των εκχυλισμάτων.
- Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck) και διάφορα συστήματα ανάπτυξης. Μετά την ανάπτυξη των πλακών ακολούθησε η παρατήρησή τους σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκη κύματος 254nm και 366nm και στη συνέχεια ο ψεκασμός αυτών με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης (50/50, βανιλίνη σε MeOH 95% / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε MeOH 95%) και σύντομη θέρμανση του πλακιδίου σε ~300°C.
- Τέλος για όσα κλάσματα κρίθηκε απαραίτητο πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε γυάλινη πλάκα των 20cmx20cm με επίστρωση σίλικας 60F254 σε θαλάμους ανάπτυξης με διάφορα συστήματα οργανικών διαλυτών για την απομόνωση επιλεγμένων ζωνών.

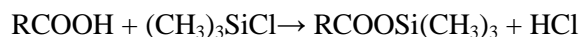
### 2.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (GC-MS)

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 6890, συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο μάζας Hewlett-Packard 5973 πρόσπτωσης ηλεκτρονίων (electronimpact, EI) με ενέργεια ιονισμού 70eV. Ο αέριος χρωματογράφος είναι εξοπλισμένος με έναν split/splitless εγχυτήρα με λόγο διαχωρισμού 1/10 και με τριχοειδή στήλη DP5 μήκους 30m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25mm και πάχους 0,25μm. Η θερμοκρασία στο θάλαμο εισαγωγής δείγματος ήταν 200<sup>0</sup>C, και το φέρον αέριο ήταν He. Η ταυτοποίηση έγινε με χρήση της βιβλιοθήκης Wiley275 και με βιβλιογραφικά δεδομένα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- **Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I:** Η αρχική θερμοκρασία ήταν 100°C [όπου παραμένει για 2 min] και στη συνέχεια αυξάνεται με ρυθμό 5°C/min ώσπου να φτάσει τη θερμοκρασία (300° C) την οποία διατηρεί σταθερή για τα επόμενα 15 min οπότε και ολοκληρώνεται το πρόγραμμα. Συνολικός χρόνος ανάλυσης t=57 min.

## ΣΥΛΛΙΩΣΗ

Η συλλίωση πριν από την ανάλυση οποιουδήποτε δείγματος χρησιμοποιείται γενικά για αύξηση της απόκρισης του ανιχνευτή, της διαχωριστικότητας των κορυφών και της πτητικότητας των ενώσεων. Επιλέχθηκε για τη μελέτη των εκχυλισμάτων αλλά και επιλεγμένων απομονωμένων ουσιών, καθώς όπως προκύπτει βάση βιβλιογραφικής έρευνας, οι περισσότερες πολικές ενώσεις της πρόπολης γενικά περιέχουν τις ενεργές ομάδες OH και COOH. Μικρή ποσότητα δείγματος υποβάλλεται σε διαδικασία συλλίωσης προκειμένου τα περιεχόμενα συστατικά να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα και να μπορέσουν να εισέλθουν για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Αυτό επιτυγχάνεται με εισαγωγή ομάδων  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$   $-\text{SiH}(\text{CH}_3)_2$  σε ενεργά H ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}$ ,  $-\text{SH}$ ). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: σε ποσότητα 5 mg ξηρού δείγματος προστίθενται 50μL άνυδρης πυριδίνης και 75 μLBSTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] και ακολουθεί θέρμανση στους 80° C για 20 min. Ακολουθεί η αντίδραση της συλλίωσης:



## 2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)

Τα απομονωμένα προϊόντα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR λήφθηκαν σε όργανο Bruker AC 200 (50 MHz). Φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), και HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) λήφθηκαν σε όργανο Bruker DRX 400 (400 MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε τιμές δ (ppm) με εσωτερικό πρότυπο TMS, ενώ οι σταθερές σύζευξης  $J$  σε Hz.

## **2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ CONGO (ΔΕΙΓΜΑ1)**

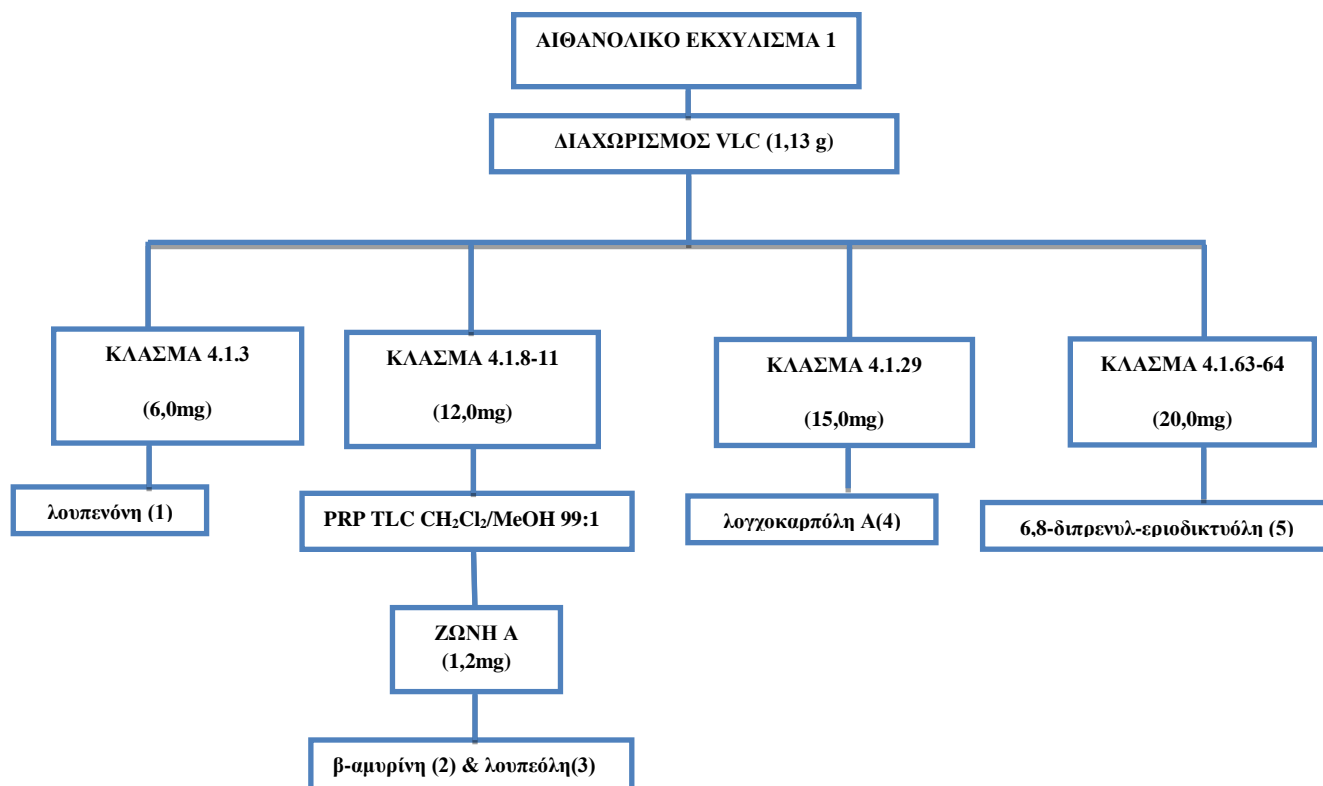
### **2.6.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ**

Ποσότητα 1,13g από το αιθανολικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό VLC με στατική φάση silicagel 60H και κινητή φάση τους διαλύτες κυκλοεξάνιο/διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Από αυτόν το διαχωρισμό προέκυψαν 80 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα δεδομένα έκλουσης:

<b>ΚΛΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ Δ/ΤΩΝ(ml)</b>
<b>4.1.1</b>	Cyclohexane 100%	250
<b>4.1.2-16</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 70/30	750
<b>4.1.17-24</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50/50	250
<b>4.1.25-28</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30/70	250
<b>4.1.29-60</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	310
<b>4.1.61-80</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 99/1	190

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες αλουμινίου (TLC). Όσα κλάσματα εμφάνισαν ίδια χρωματογραφική εικόνα συνενώθηκαν όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>W(mg)</b>	<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>W(mg)</b>
<b>4.1.2</b>	3,0	<b>4.1.13-14</b>	6,0
<b>4.1.3</b>	6,0	<b>4.1.15-18</b>	17,1
<b>4.1.4</b>	12,8	<b>4.1.19-27</b>	30,4
<b>4.1.5-6</b>	6,4	<b>4.1.28</b>	4,9
<b>4.1.7</b>	3,8	<b>4.1.29</b>	15,0
<b>4.1.8-11</b>	14,0	<b>4.1.30-62</b>	10,0
<b>4.1.12</b>	5,3	<b>4.1.63-64</b>	20,0

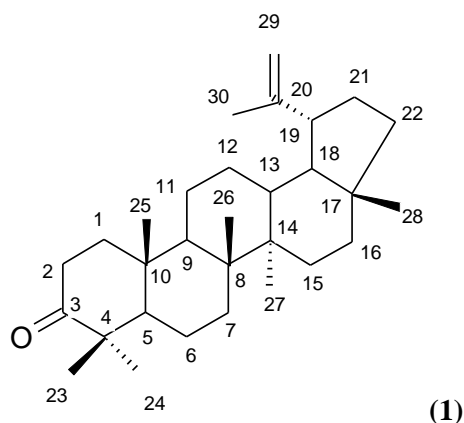


Πορεία γημικής ανάλυσης αιθανολικού εκχυλίσματος.

### 2.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Από τα παραπάνω κλάσματα επιλέχθηκαν για μελέτη μέσω GC-MS (Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I) τα κλάσματα **4.1.3** και **4.1.8-11**. Για την ταυτοποίησή τους λήφθηκαν φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$ . Επίσης μελετήθηκαν τα κλάσματα **4.1.29** και **4.1.63-64** τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  και φασμάτων δυο διαστάσεων. Ακολουθεί η φασματοσκοπική μελέτη για κάθε κλάσμα.

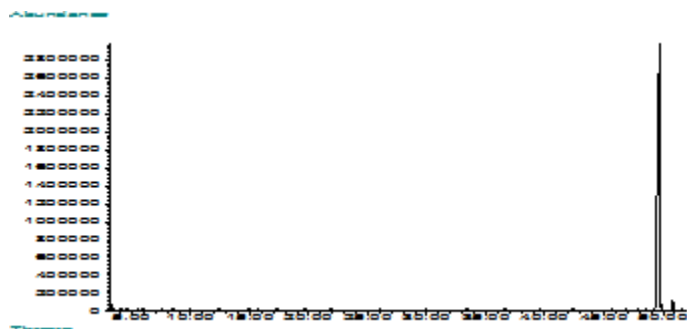
### 2.6.2.1.ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΥΠΕΝΟΝΗΣ(ΚΛΑΣΜΑ 4.1.3)



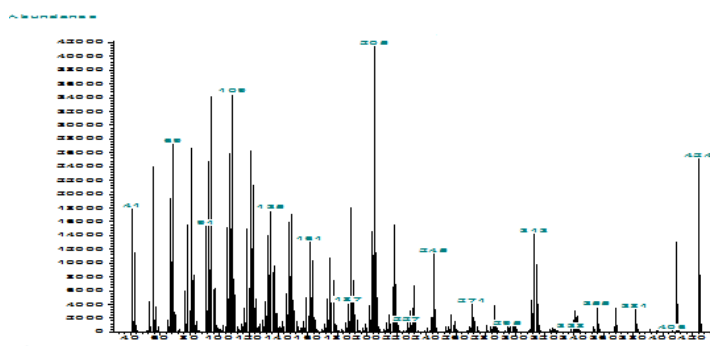
Το κλάσμα 4.1.3 μελετήθηκε με GC-MS και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα μάζας η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε την **λουπενόνη** ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ ) με μοριακό βάρος 424 και κυριότερα θραύσματα: 424[ $\text{M}^+$ ],409,313,245,232,218,205(100%),189,149,109,95.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρήθηκαν δυο απλές κορυφές στα 4,57 και 4,69ppm που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν σε δυο πρωτόνια εξωκυκλικού μεθυλενίου. Στο ίδιο φάσμα οι κορυφές των μεθυλίων εμφανίζονται οι 6 από τις 7 στην περιοχή 0,79 έως 1,02ppm ενώ πιο αποθωρακισμένο στα 1,70ppm εμφανίζεται το μεθύλιο που έχει σύνδεση με τον άνθρακα του διπλού δεσμού.
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  φαίνονται οι 30 κορυφές που αντιστοιχούν στους άνθρακες του τριτερπενικού σκελετού. Από αυτές οι πιο χαρακτηριστικές ήταν οι κορυφές των ανθράκων του διπλού δεσμού οι οποίες εμφανίζονται στα 109,3 και στα 150,8ppm καθώς επίσης και μια κορυφή στα 218,1ppm που αντιστοιχεί σε άνθρακα καρβονυλίου.

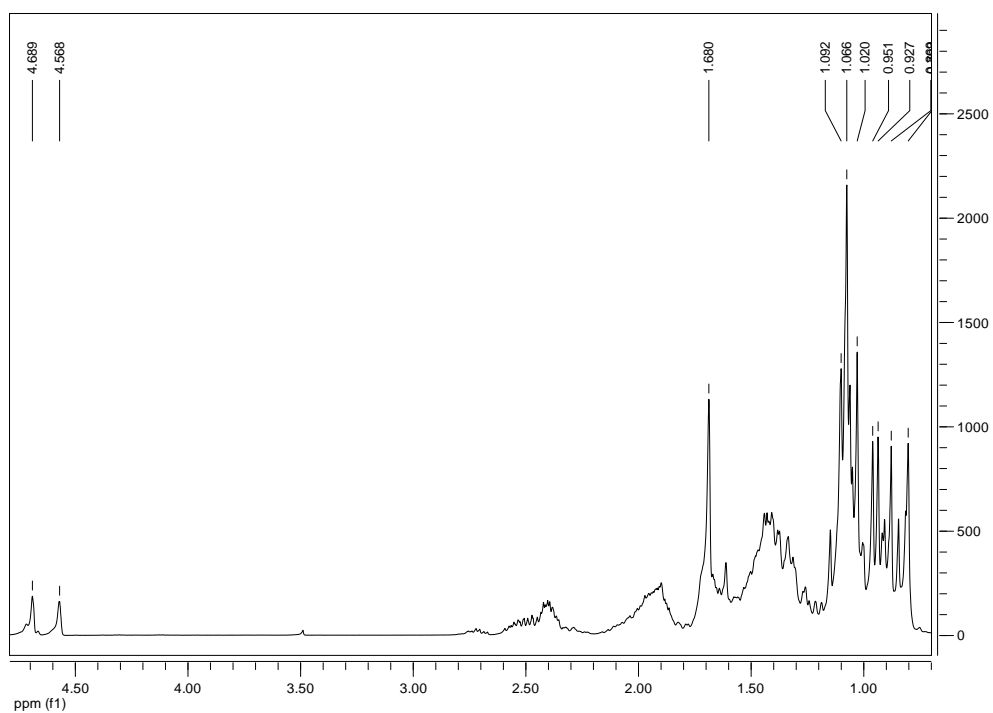
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (4.1.3)



### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΛΟΥΠΗΝΟΝΗΣ (RT=49,68min)



### ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR

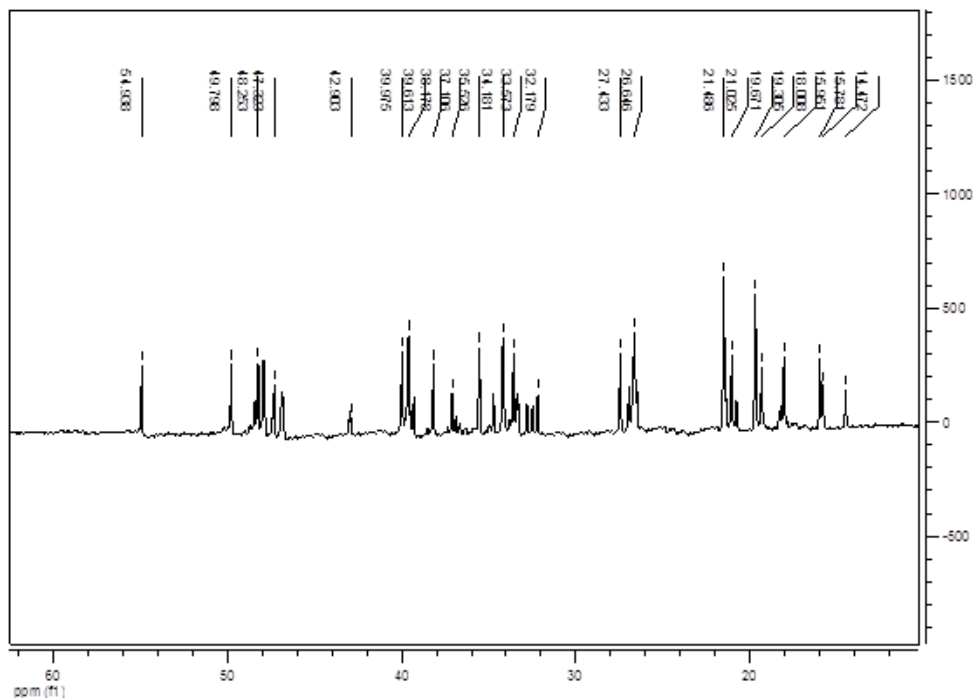


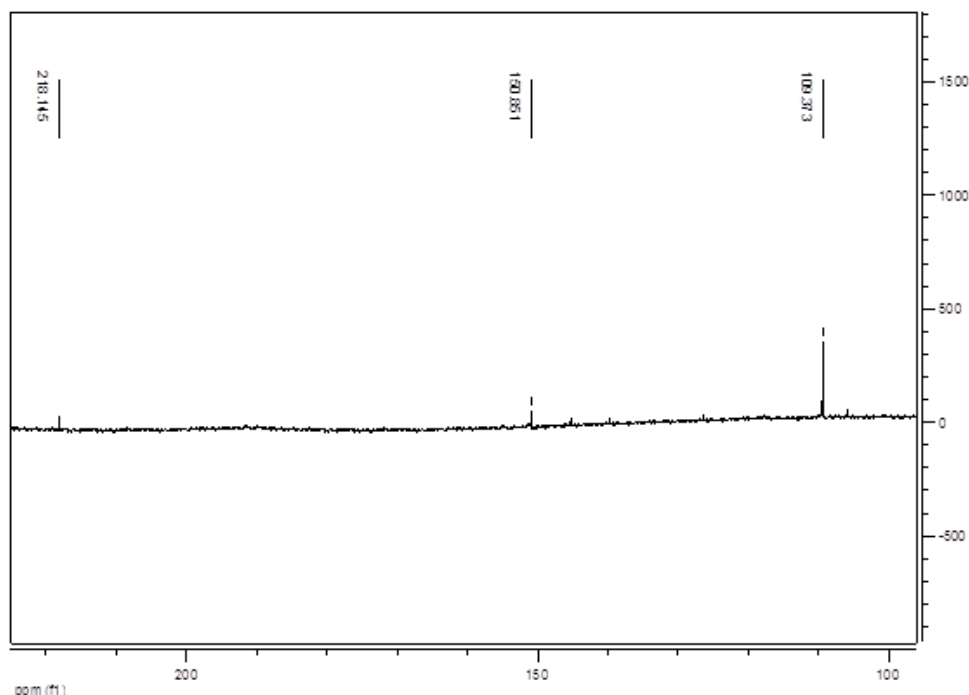


Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα	Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα
<b>19</b>	2,32-2,52(1H, m)	<b>27</b>	0,95 (3H, s)
<b>21</b>	1,84-2,00 (2H, m)	<b>28</b>	0,82 (3H, s)
<b>23</b>	1,06 (3H, s)	<b>29a</b>	4,57 (1H, brs)
<b>24</b>	1,02 (3H, s)	<b>29b</b>	4,69 (1H, brs)
<b>25</b>	0,87 (3H, s)	<b>30</b>	1,70 (3H, s)
<b>26</b>	0,92 (3H, s)		

### ΦΑΣΜΑ $^{13}\text{C-NMR}$





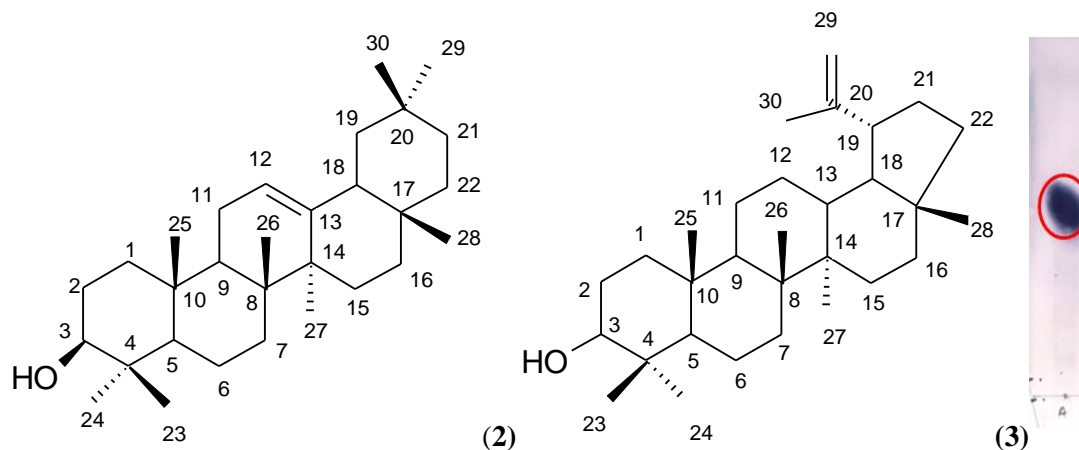
Η πλήρης απόδοση του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΑτομοC	$\delta$ (ppm)	ΑτομοC	$\delta$ (ppm)	ΑτομοC	$\delta$ (ppm)
<b>1</b>	39,6	<b>11</b>	21,4	<b>21</b>	32,1
<b>2</b>	34,2	<b>12</b>	26,6	<b>22</b>	39,9
<b>3</b>	218,1	<b>13</b>	38,1	<b>23</b>	26,6
<b>4</b>	47,3	<b>14</b>	42,9	<b>24</b>	21,0
<b>5</b>	54,9	<b>15</b>	27,4	<b>25</b>	15,9
<b>6</b>	19,7	<b>16</b>	35,5	<b>26</b>	15,8
<b>7</b>	33,5	<b>17</b>	42,9	<b>27</b>	14,5
<b>8</b>	39,9	<b>18</b>	48,9	<b>28</b>	18,0
<b>9</b>	49,7	<b>19</b>	47,9	<b>29</b>	109,3
<b>10</b>	37,1	<b>20</b>	150,8	<b>30</b>	19,2

Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά δεδομένα καθώς και μελέτη της βιβλιογραφίας [Mahato&Kundu 1994; Jamaletal., 2009; Prachayasittikuletal., 2010] αποδείχθηκε ότι στο κλάσμα 4.1.3 αντιστοιχεί η δομή της **λουπενόνης**, που έχει απομονωθεί από πρόπολη κυρίως τροπικών χωρών

όπως η Βραζιλία [Trushenaetal., 2004; 2006] και από την Αφρική από το Cameroon [Tallaetal., 2013]. Επίσης αποτελεί βασικό δευτερογενή μεταβολίτη του φυτικού είδους *Albizia gummifera* [Makana&Thomas, 2006; Kueteetal., 2013] και του *Phyllanthus polyanthus* [Ndelebeetal., 2008] δυο μελιτοφόρων φυτών που φύονται στο Congo [Πίνακας 1].

### **2.6.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ $\beta$ -ΑΜΥΡΙΝΗΣ & ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.8-11)**

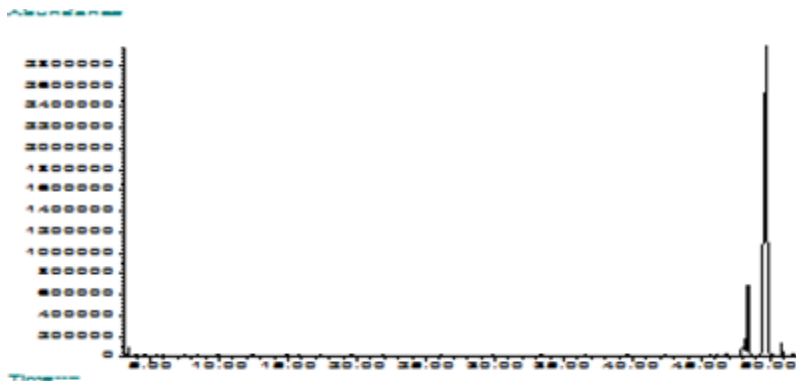


Το κλάσμα 4.1.8-11 μελετήθηκε με GC-MS και κατόπιν πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 99/1, από την οποία και κόπηκε η ζώνη Α βάρους 1,2mg στην οποία λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ . κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

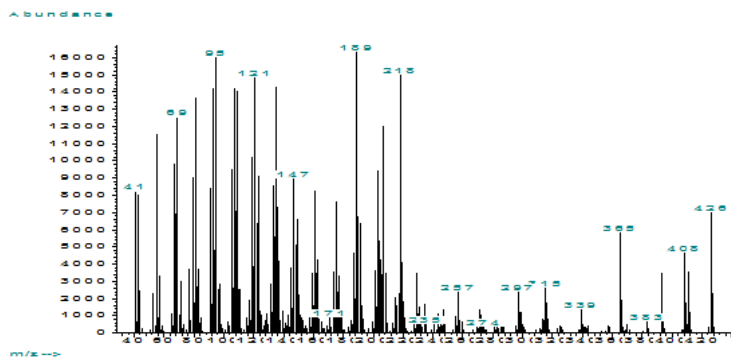
- Στο χρωματογράφημα GC-MS διαπιστώθηκε η ύπαρξη 2 τριτερπενίων για τα οποία η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε στο ένα τη δομή της  $\beta$ -αμυρίνης ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) ενώ στο δεύτερο έδινε φάσμα μάζας το οποίο αντιστοιχούσε στη λουπεόλη ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ). Η αναλογία των δυο αυτών βασικών μορίων βάση του ποσοστού επί τοις εκατό των κορυφών τους ήταν 70% λουπεόλη έναντι 30%  $\beta$ -αμυρίνη.
- Στο φάσμα μάζας της λουπεόλης παρατηρήθηκαν τα εξής θραύσματα: 426[ $\text{M}^+$ ], 411, 408, 393, 365, 315, 218, 207, 189 (100%), 175, 161, 147, 95.
- Στο φάσμα μάζας της  $\beta$ -αμυρίνης παρατηρήθηκαν τα εξής θραύσματα: 426[ $\text{M}^+$ ], 408, 393, 218 (100%), 203, 189, 171, 147, 119, 95, 69, 41.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  χαρακτηριστική κορυφή είναι η τριπλή που δίνει το H της θέσης 12 της  $\beta$ -αμυρίνης στα 5,18ppm και οι δυο ευρείες διπλές κορυφές του εξωκυκλικού δεσμού της λουπεόλης που συντονίζονται στα 4,56 και στα 4,68ppm αντίστοιχα.

- Στο ίδιο φάσμα οι κορυφές των μεθυλίων εντοπίζονται στην περιοχή από 0,76 έως 1,02ppm ενώ το H της θέσης 3 τόσο της β-αμυρίνης όσο και της λουπεόλης δίνει χαρακτηριστική κορυφή διπλής-διπλών στα 3,18ppm με σταθερά σύζευξης  $J=4,8/11,0\text{Hz}$  για την β-αμυρίνη και  $J=10,9/5,3\text{Hz}$  για τη λουπεόλη.

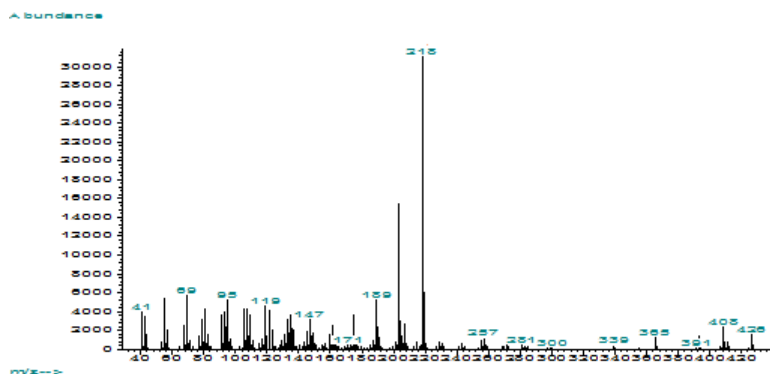
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (4.1.8-11A)



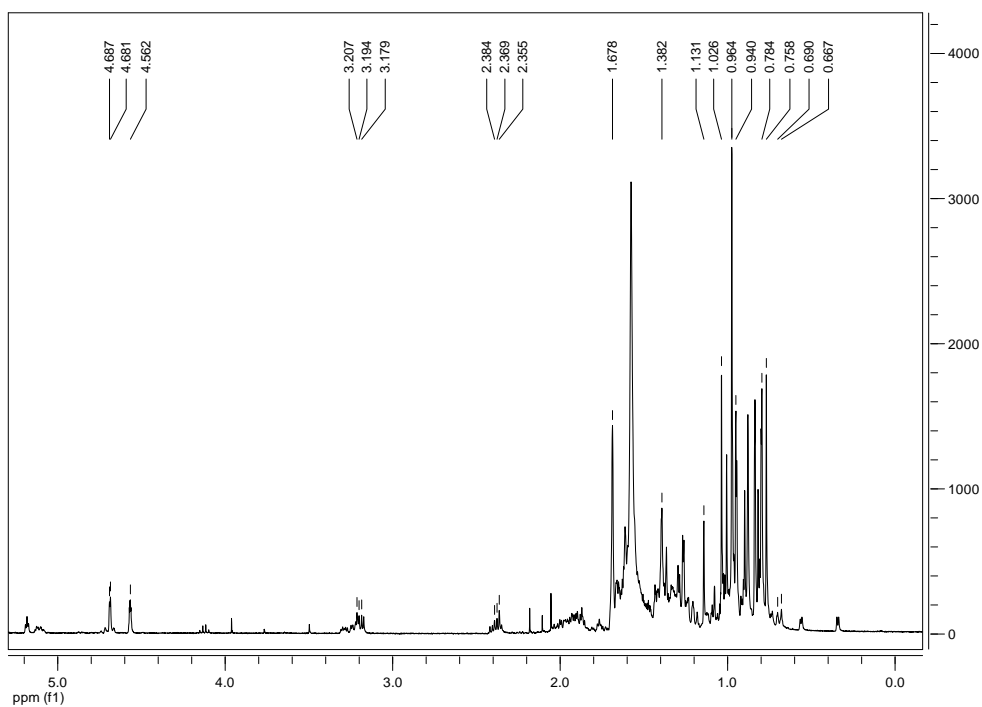
### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ (RT=51,20min)



### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ (RT=49,0min)



## ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR:



Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR που αντιστοιχούν στο τριτερπένιο με ποσοστό 30% φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)	Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)
<b>3</b>	3,20 (1H, dd, J=4,8/11,0)	<b>26</b>	0,78 (3H, s)
<b>12</b>	5,18 (1H, t, J=3,6)	<b>27</b>	1,00 (3H, s)
<b>23</b>	0,94 (3H, s)	<b>28</b>	0,99 (3H, s)
<b>24</b>	0,87 (3H, s)	<b>29</b>	0,97 (3H, s)
<b>25</b>	0,83 (3H, s)	<b>30</b>	0,97 (3H, s)

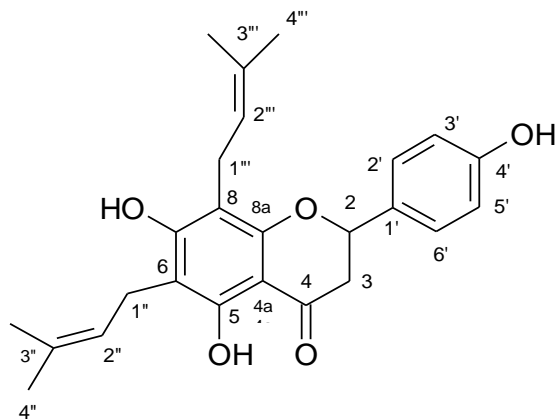
Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και περαιτέρω αναζήτηση σε βιβλιογραφία στο τριτερπένιο με την αναλογία 30% αποδόθηκε η δομή της **β-αμυρίνης (2)** [Kushiro*et al.*, 1998; Barros*et al.*, 2011; Khajista*et al.*, 2011] που έχει απομονωθεί από πρόπολη της Βραζιλίας [Marcucci&Bankova 1999; Furukawa*et al.*, 2002; Trusheva*et al.*, 2006], της Κούβας [Marquez*et al.*, 2010] και από την Αφρική .σε δείγμα πρόπολης της Αιγύπτου [Hegazi*et al.*, 2007]. Επίσης έχει απομονωθεί και από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Congo όπως *Bidens pilosa*, *Aleurites moluccana* και *Maesalanceolata* [DaSilva 2012; Quintão*et al.*, 2012; Manguro*et al.*, 2003; 2012; Bartolome*et al.*, 2013] [**Πίνακας 1**].

Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  που αντιστοιχούν στο τριτερπένιο με ποσοστό 70% φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)	Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
<b>3</b>	3,17 (1H, dd, $J=5,3/10,9$ )	<b>26</b>	0,99 (3H, s)
<b>5</b>	0,66 (1H, d, $J=9,2$ )	<b>27</b>	0,93 (3H, s)
<b>19</b>	2,35 (1H, dt, $J=5,3/10,8$ )	<b>28</b>	0,76 (3H, s)
<b>21</b>	1,85-2,00 (1H, m)	<b>29α</b>	4,55 (1H, brs)
<b>23</b>	0,94 (3H, s)	<b>29β</b>	4,68 (1H, brs)
<b>25</b>	0,80 (3H, s)	<b>30</b>	1,65 (3H, s)

Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και βιβλιογραφικά δεδομένα στο τριτερπένιο με την αναλογία 70% αποδόθηκε η δομή της **λουπεόλης (3)** [Prachayasittikul*et al.*, 2010], που έχει απομονωθεί από Βραζιλιάνικη, Κουβανέζικη και στην Αφρική σε πρόπολη από το Cameroon [Furukawa*et al.*, 2002; Salatino&Teixeira, 2005; Marquez&Cuesta-Rubio, 2010; Talla*et al.*, 2013]. Επιπλέον έχει απομονωθεί και από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Congo όπως *Vepris louisii* και *Albizia adiantifolia*. [Matu*et al.*, 1992; Tamokou*et al.*, 2012] [**Πίνακας 1**].

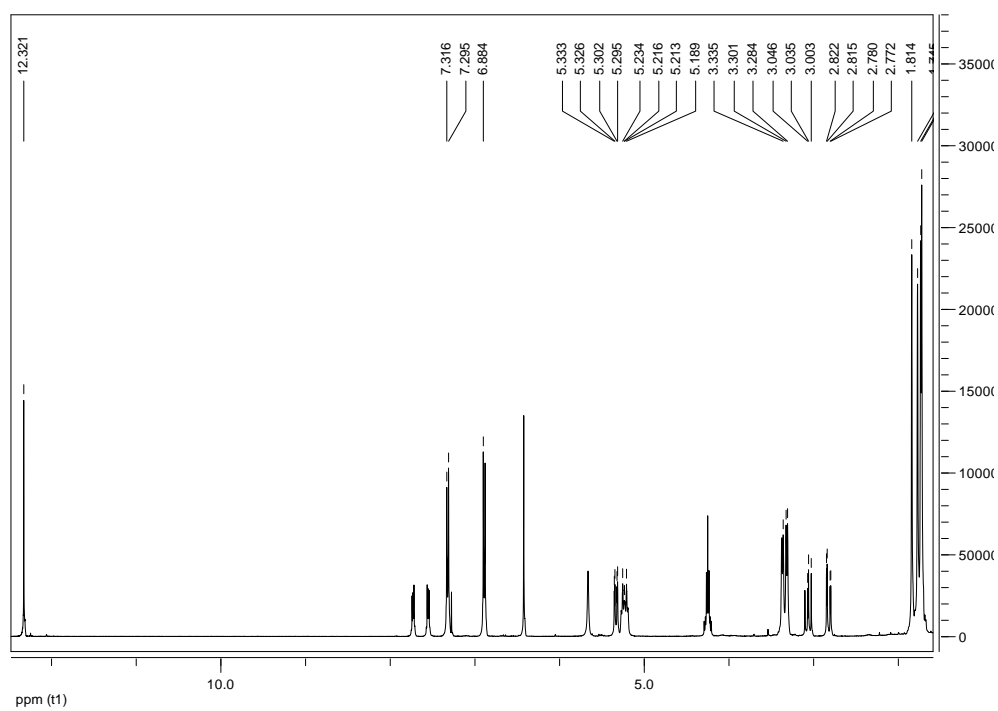
### 2.6.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΓΧΟΚΑΡΠΟΛΗΣ-Α (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.29)



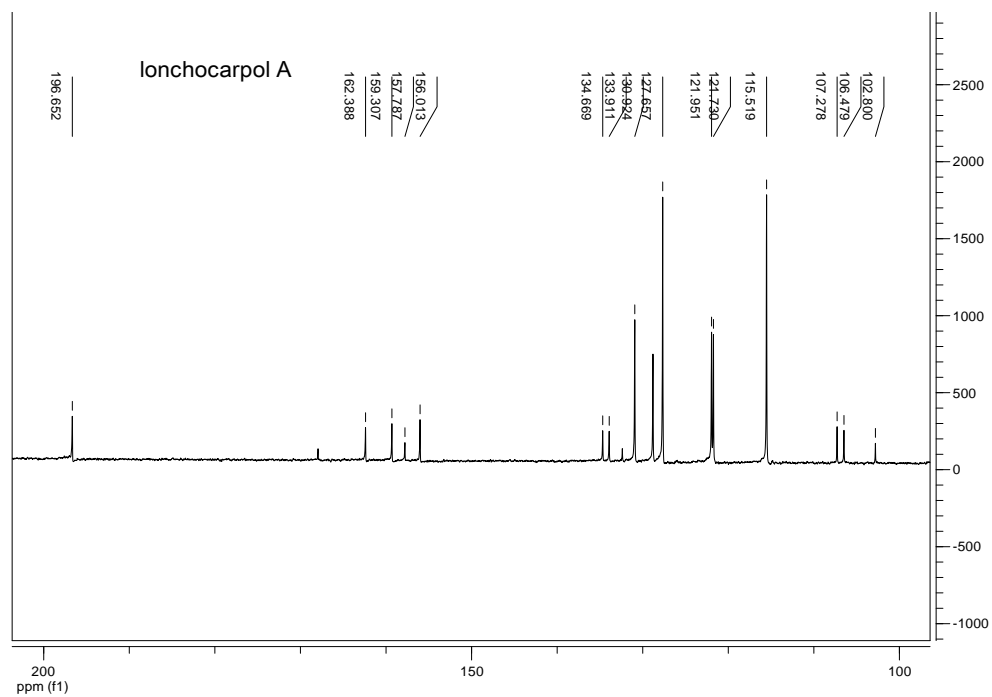
Στο κλάσμα 4.1.29 λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων σε  $\text{CDCl}_3$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  διακρίνονται δυο διπλές κορυφές στα 7,31 και στα 6,85ppm με  $J=8,0\text{Hz}$ , που χαρακτηρίζουν ένα πάρα-υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.
- Στο ίδιο φάσμα εξίσου σημαντικές είναι οι δυο διπλές κορυφές στα 3,30 και 3,35ppm με  $J=6,9\text{Hz}$  καθώς και οι δύο τριπλές στα 5,18 και 5,23ppm σε συνδυασμό με τις κορυφές των μεθυλίων που δείχνουν την ύπαρξη δυο πρενύλ-ομάδων. Επιπλέον διακρίνεται και η παρουσία ενός OH στα 12,30ppm το οποίο διακρίνεται λόγω του δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο.
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  παρατηρήθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε δυο διπλούς δεσμούς (121,7/122,0 και 133,9/134,6ppm) καθώς και κορυφές που αντιστοιχούν σε αρωματικούς δακτυλίους (102,8-159,3ppm).
- Στο φάσμα COSY οι κυριότερες συσχετίσεις που προέκυψαν είναι μεταξύ των κορυφών που αντιστοιχούν σε αρωματικούς δακτυλίους (7,31-6,88ppm) και μεταξύ των κορυφών στα 5,33ppm με αυτές στα 3,06 και 2,82ppm που επιβεβαιώνουν τη δομή μιας φλαβανόνης.

## ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$



## ΦΑΣΜΑ $^{13}\text{C-NMR}$

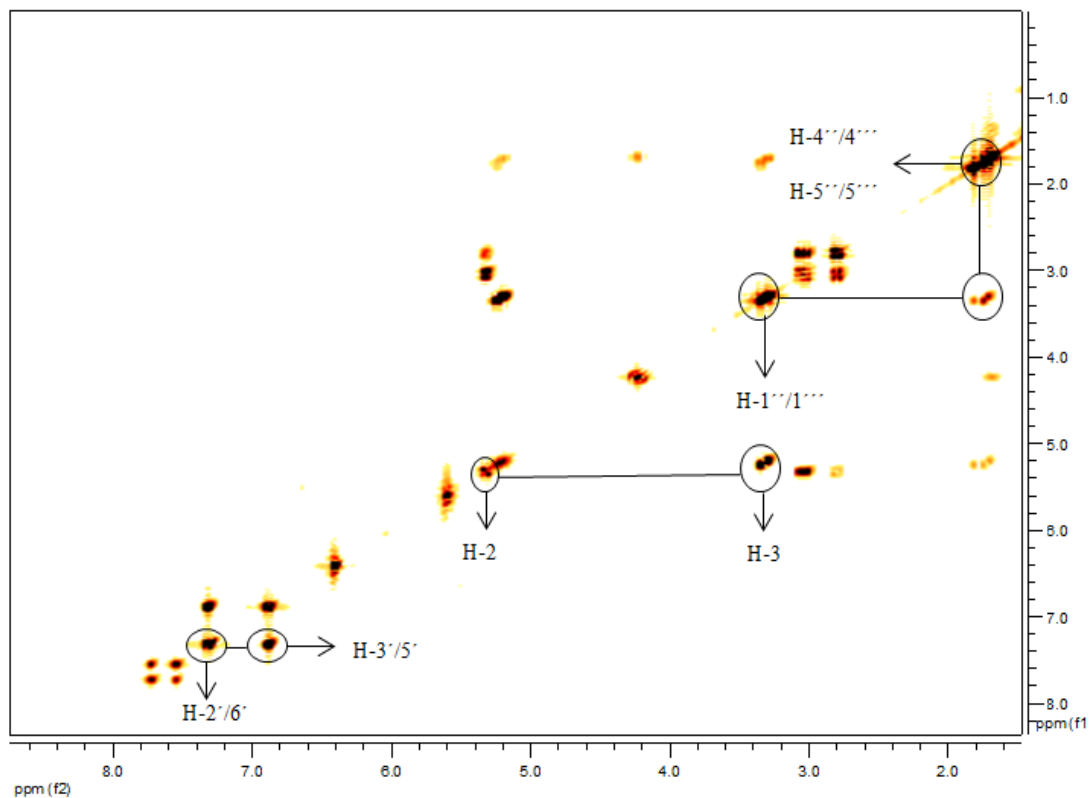




Η απόδοση των κορυφών των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

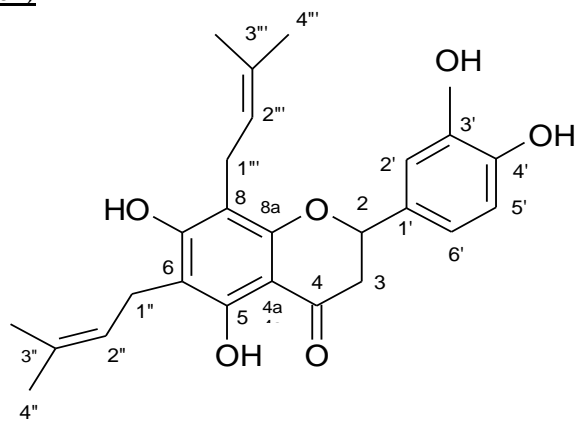
Θέση	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$ , Πολλαπλότητα, $J(\text{Hz})$	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Θέση	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$ , Πολλαπλότητα, $J(\text{Hz})$	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	5,33 (dd, $J=3,0/12,5$ )	78,5	3'	6,88 (d, $J=8,5$ )	115,5
3	3,06 (dd, $J=3,0/17,0$ )	43,2	4'	-	162,4
3	2,82 (dd, $J=12,5/17,0$ )	43,2	5'	6,88 (d, $J=8,5$ )	115,5
4	-	197,0	6'	7,31 (d, $J=8,5$ )	127,6
4a	-	102,8	1''	3,35 (d, $J=6,9$ )	25,8
5	-	156,0	1'''	3,30 (d, $J=6,9$ )	25,8
6	-	107,2	2''	5,23 (t, $J=6,9$ )	122,0
7	-	157,8	2'''	5,18 (t, $J=6,9$ )	121,7
8	-	106,5	3''	-	134,6
8a	-	159,3	3'''	-	133,9
1'	-	130,9	4''/4''' 5''/5'''	1,69 (s), 1,74 (s), 1,79 (s), 1,81 (s)	17,7, 17,8 21,8, 23,2
2'	7,31 (d, $J=8,5$ )	127,6	<b>OH-5</b>	12,30 (s)	-

## ΦΑΣΜΑ COSY



Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά και βιβλιογραφικά δεδομένα [Roussis&Stephen 1987; Meragelman 2001] στο κλάσμα 4.1.29 αποδόθηκε η δομή της **λογγοκαρπόλης Α** ( $C_{25}H_{28}O_5$ ), μιας πρενύλ-φλαβανόνης που απομονώνεται για **πρώτη φορά από πρόπολη**. Επιπλέον έχει απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Congoόπως *Erythrina senegalensis* και *Citrus medica* [Wandji *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2010] [**Πίνακας 1**].

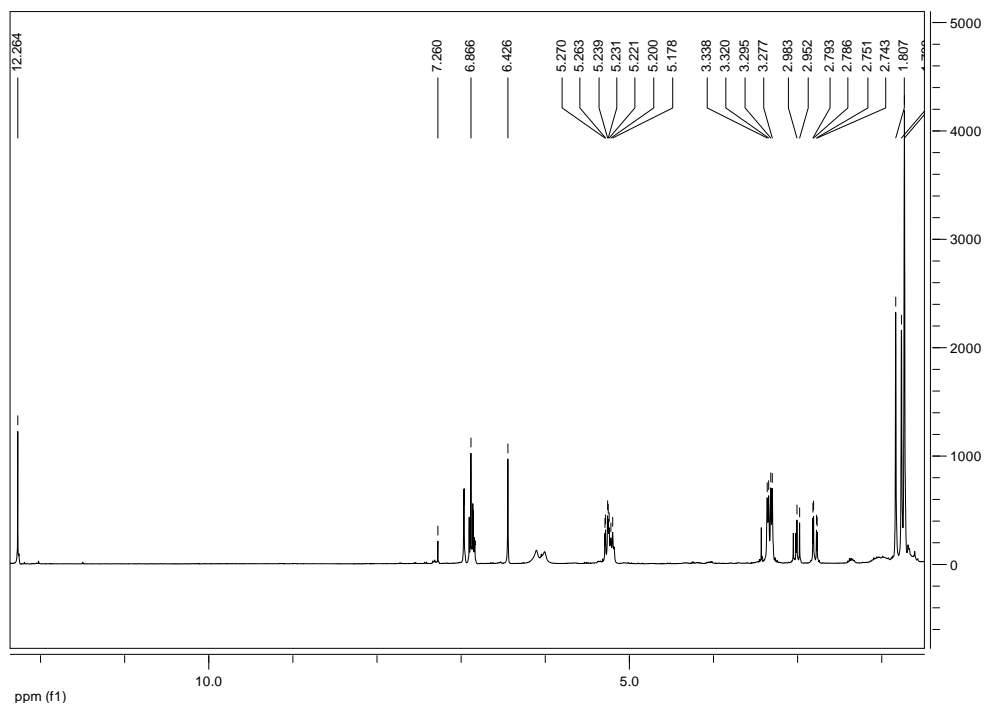
#### 2.6.2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 6,8-ΔΙΠΡΕΝΥΛ-ΕΡΙΟΔΙΚΤΥΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 4.1.63-64)



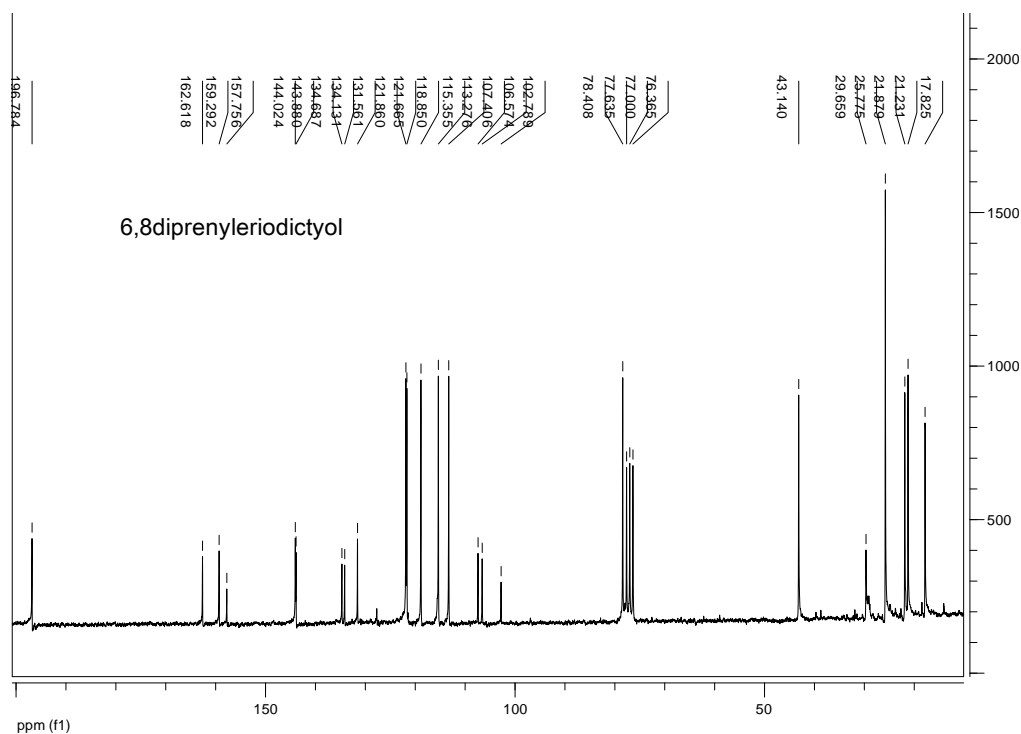
Στο κλάσμα 4.1.63-64 λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  καθώς και φάσμα δυο διαστάσεων COSY και HMQC. Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Το φάσμα αυτό είχε πολλές ομοιότητες με αυτό της λογγοκαρπόλης A με διαφορές που εντοπίζονται στην ύπαρξη ενός ακόμα υποκαταστάτη στον αρωματικό δακτύλιο.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρούμε κορυφές που αντιστοιχούν σε αρωματικό δακτύλιο όπως μια διπλή κορυφή στα 6,87ppm με  $J=8\text{Hz}$ , άλλη μια διπλή κορυφή στα 6,94ppm με  $J=2\text{Hz}$  καθώς και μια διπλή-διπλώνστα 6,83ppm με  $J=2/8\text{ Hz}$ .
- Επίσης παρατηρούνται κορυφές που δείχνουν την ύπαρξη δυο πρενύλ-ομάδων στα 5,18 και 5,22ppm με  $J=7,5\text{Hz}$  και δυο διπλές κορυφές στα 3,30 και 3,40ppm με  $J=6,9/16,8\text{Hz}$ .
- Χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος ήταν και μια διπλή διπλών στα 5,26ppm με  $J=3/13\text{Hz}$  καθώς και στα 3,00ppm με  $J=12/17\text{Hz}$  και στα 2,80ppm με  $J=3/17\text{Hz}$  που δείχνουν δομή φλαβανόνης. Τέλος στα 12,30ppm διαπιστώθηκε κορυφή που αντιστοιχεί σε OH το οποίο διακρίνεται λόγω του δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο.
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  παρατηρήθηκαν οι κορυφές των δυο διπλών δεσμών (121,7/122,0ppm) καθώς και αυτές των αρωματικών δακτυλίων (103,0-162,0ppm).
- Στο φάσμα COSY οι κυριότερες συσχετίσεις που προέκυψαν είναι μεταξύ των πρωτονίων στα 5,25ppm και αυτών στα (3,00/2,80ppm) που επιβεβαιώνουν τη δομή της φλαβανόνης.
- Στο φάσμα HMQC επιβεβαιώνεται ότι τα πρωτόνια που συντονίζονται στα 2,80 και 3,00ppm ανήκουν στον ίδιο άνθρακα που συντονίζεται στα 41,3ppm, το πρωτόνιο στα 5,26ppm ότι ανήκει σε οξυγονωμένο άνθρακα που συντονίζεται στα 78,4ppm, τα πρωτόνια που συντονίζονται στα (6,83/6,85ppm) ανήκουν στους άνθρακες 115,0 και 118,0ppm και το πρωτόνιο στα 5,18ppm ανήκει στον άνθρακα που συντονίζεται στα 121,7ppm.

# ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR



## ΦΑΣΜΑ <sup>13</sup>C-NMR

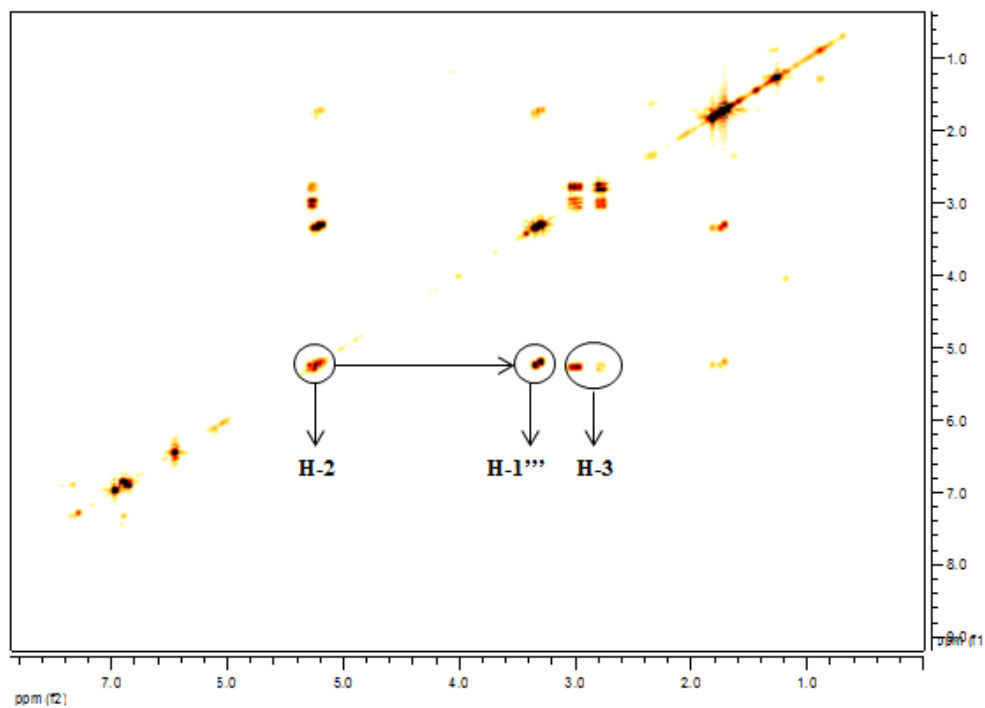


Η απόδοση των κορυφών των φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

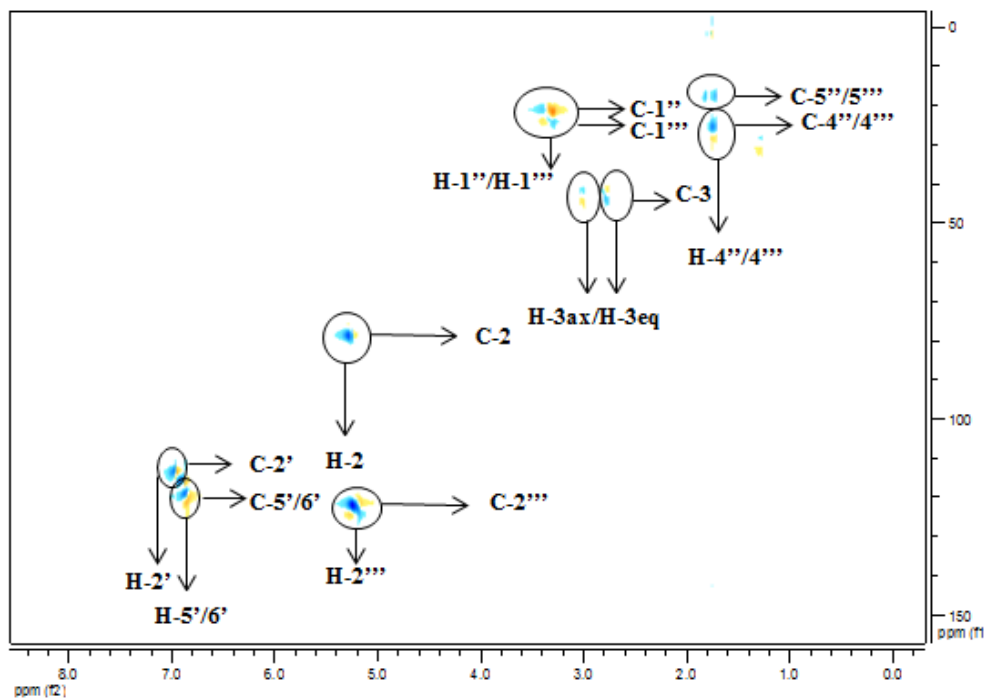
Θέση	$\delta$ <sup>1</sup> H, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	Θέση	$\delta$ <sup>1</sup> H, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
<b>2</b>	5,25 (dd, <i>J</i> =3,0/13,0)	78,4	<b>3'</b>	-	144,0
<b>3</b>	3,00 (dd, <i>J</i> =12,0/17,0)	43,1	<b>4'</b>	-	144,0
<b>3</b>	2,80 (dd, <i>J</i> =3,0/17,0)	43,1	<b>5'</b>	6,87 (d, <i>J</i> =8,0)	115,0
<b>4</b>	-	197,0	<b>6'</b>	6,83 (d, <i>J</i> =2,0/8,0)	118,0
<b>4a</b>	-	-	<b>1''</b>	3,40 (dd, <i>J</i> =6,9/16,8)	21,9
<b>5</b>	-	159,3	<b>1'''</b>	3,30 (dd, <i>J</i> =6,9/16,8)	21,2
<b>6</b>	-	107,0	<b>2''</b>	5,22 (brt, <i>J</i> =7,5)	121,9
<b>7</b>	-	162,0	<b>2'''</b>	5,18 (brt, <i>J</i> =7,5)	121,7
<b>8</b>	-	106,0	<b>3''</b>	-	134,7
<b>8a</b>	-	158,0	<b>3'''</b>	-	134,1

<b>1'</b>	-	131,0	<b>4''/4'''</b> <b>5''/5'''</b>	1,70-1,80 (s)	17,8 25,6
<b>2'</b>	6,94 (d, $J=2,0$ )	113,0	<b>OH-5</b>	12,30 (s)	

**ΦΑΣΜΑ COSY**

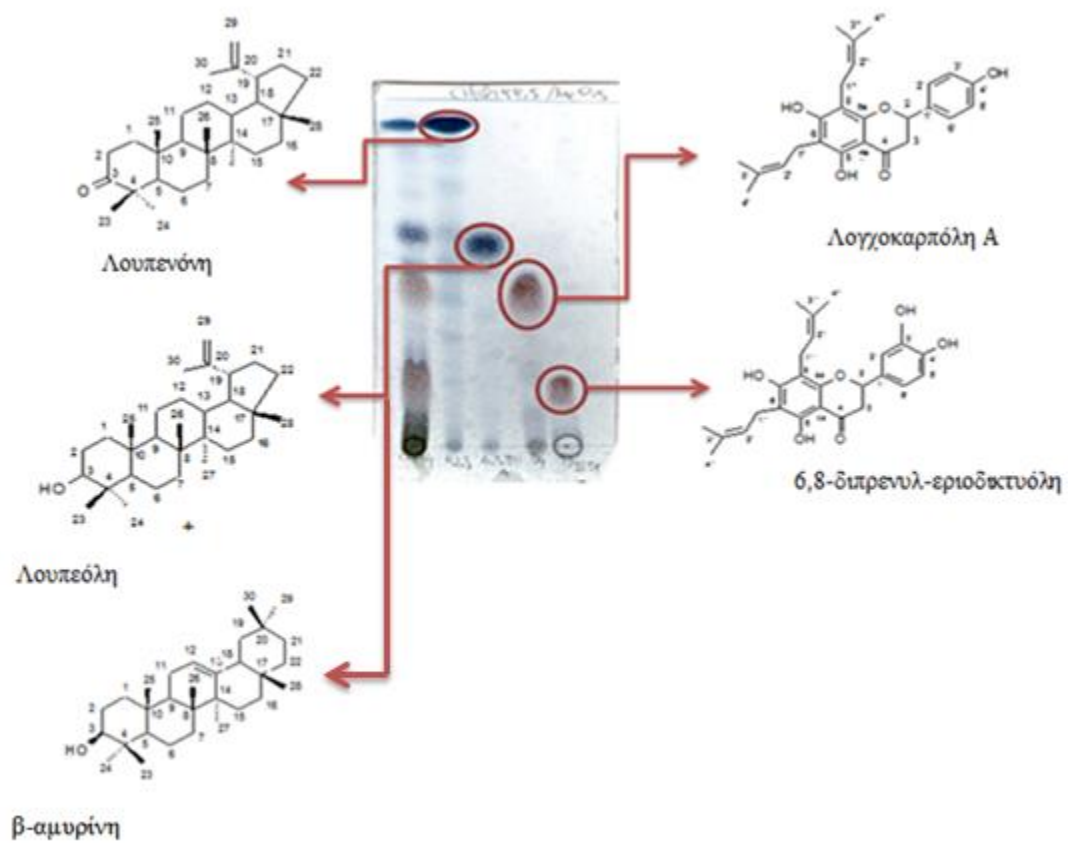


## ΦΑΣΜΑ ΗΜQC



Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά και βιβλιογραφικά δεδομένα [Haborneetal.,1993; Ngadjuietal., 1998] στο κλάσμα 4.1.63-64 αποδόθηκε η δομή της **6,8-διπρενυλ-εριοδικτυόλης** (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>) μιας γνωστής πρενυλ-φλαβονόνης, η οποία απομονώνεται για **πρώτη φορά από πρόπολη**. Έχει απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Congoόπως *Monotesengleri* και *Dorsteniamanii* [Seoetal., 1997] [Πίνακας 1].

Στο TLC που ακολουθεί διακρίνονται τα πέντε απομονωμένα μόρια:





## **2.7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CAMEROON ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΟΚΥ (ΔΕΙΓΜΑ 2)**

### **2.7.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ**

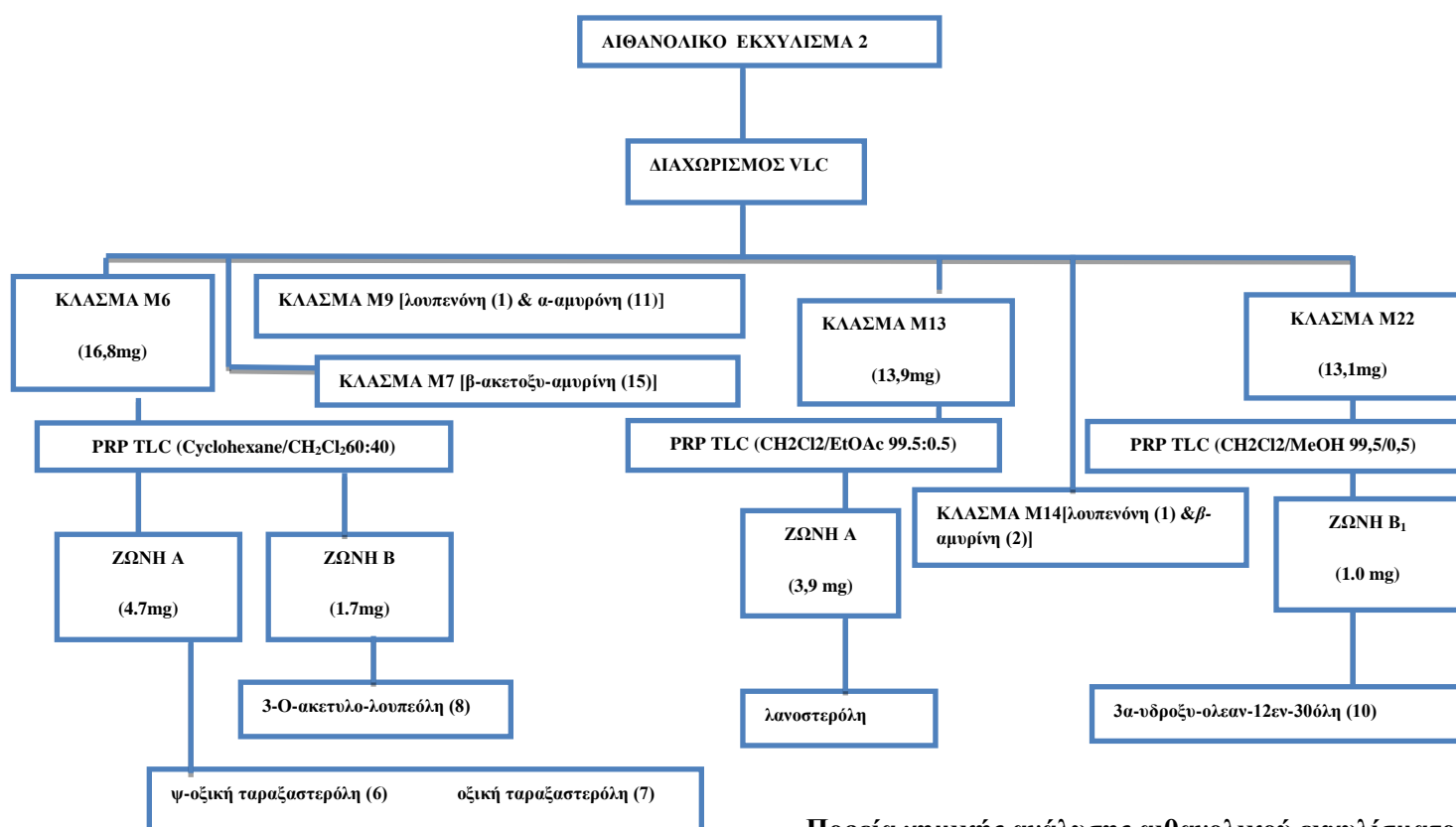
Ποσότητα 1,4g υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό VLC με στατική φάση silicagel 60Η και κινητή φάση τους διαλύτες κυκλοεξάνιο/διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Από αυτόν το διαχωρισμό προέκυψαν 310 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα δεδομένα έκλουσης:

<b>ΚΛΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ Δ/ΤΩΝ(ml)</b>
<b>1-12</b>	Cyclohexane 100%	175
<b>13-122</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90/10	1100
<b>123-155</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 85/15	1300
<b>156-180</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 80/20	1500
<b>181-200</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 70/30	1000
<b>201-240</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 60/40	1000
<b>241-260</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50/50	1000
<b>261-280</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 40/60	1200
<b>281-310</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20/80	1000

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Όσα κλάσματα εμφάνισαν ίδια χρωματογραφική εικόνα συνενώθηκαν, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΙ</b>	<b>W(mg)</b>	<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΙ</b>	<b>W(mg)</b>
<b>1-6</b>	M1	3,2	<b>124-155</b>	M12	17,6
<b>7-10</b>	M2	0,4	<b>156-180</b>	M13	13,9
<b>11-18</b>	M3	1,2	<b>181-190</b>	M14	25,2
<b>19-26</b>	M4	1,2	<b>191-200</b>	M15	25,0
<b>27-30</b>	M5	0,7	<b>201-204</b>	M16	11,1
<b>31-52</b>	M6	16,8	<b>205-219</b>	M17	14,0

53-56	M7	3,7	220-230	M18	4,0
57-90	M8	12,8	231-264	M19	11,7
91-103	M9	8,4	265-280	M20	9,0
104-111	M10	4,5	281-292	M21	15,5
112-123	M11	6,2	293-310	M22	13,1



Πορεία χημικής ανάλυσης αιθανολικού εκχυλίσματος.

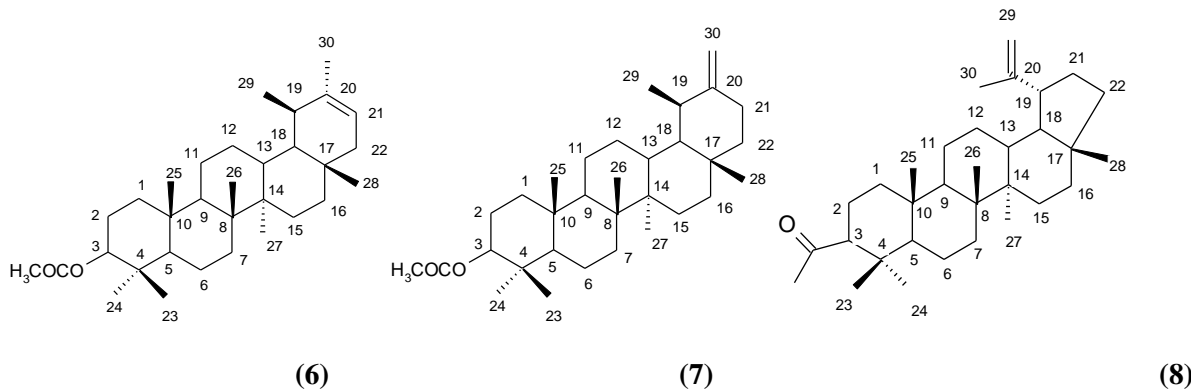
## 2.7.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Από τα ανωτέρω κλάσματα επιλέχθηκαν για μελέτη με GC/MS (Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I) και λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  τα κλάσματα: **M6**, **M7**, **M9**, **M12**, **M13**, **M14** και **M22**. Ακολουθεί η φασματοσκοπική μελέτη για κάθε κλάσμα.

- Το κλάσμα **M7** μελετήθηκε με GC-MS και η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τη **β-ακετοξυ-αμυρίνη(15)** που έχει απομονωθεί από το δείγμα 3 (Ngaoundal) και περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.9.2.1.

- Το κλάσμα **M9** μελετήθηκε με GC-MS και η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τη λουπενόνη (**1**) που έχει απομονωθεί από το δείγμα 1(Congo) και την  $\alpha$ -αμυρόνη (**11**) που έχει απομονωθεί από το δείγμα 3(Ngaoundal), όπως περιγράφονται αναλυτικά στις ενότητες 2.6.2.1 και 2.8.2.1 αντίστοιχα.
- Το κλάσμα **M12** μελετήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  από το οποίο προέκυψε η λανοστερόλη (**9**) που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.
- Το κλάσμα **M14** μελετήθηκε με GC-MS και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα προέκυψαν οι δομές της λουπενόνης (**1**) και της  $\beta$ -αμυρίνης (**2**) που απομονώθηκαν από το δείγμα 1(Congo) και περιγράφονται αναλυτικά στις ενότητες 2.6.2.1 και 2.6.2.2.
- Τα κλάσματα **M6, M13** και **M22** προχώρησαν σε περαιτέρω καθαρισμό και λήψη φασμάτων GC-MS και  $^1\text{H-NMR}$  όπως περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω.

### 2.7.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ Ψ-ΟΞΙΚΗΣ ΤΑΡΑΞΑΣΤΕΡΟΛΗΣ. ΟΞΙΚΗΣ ΤΑΡΑΞΑΣΤΕΡΟΛΗΣ & 3-Ο-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ M6)



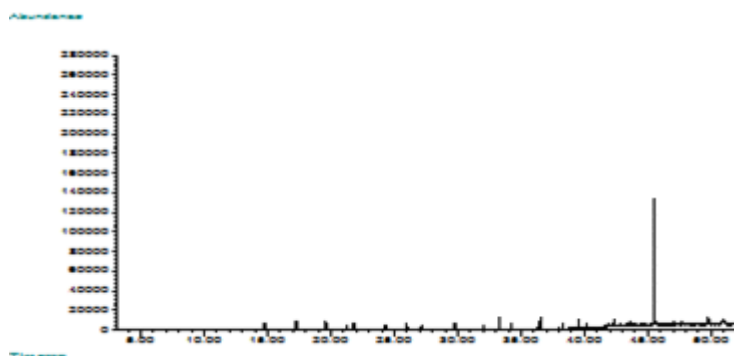
Το κλάσμα M6 μελετήθηκε με GC-MS και κατόπιν πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών Cyclohexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  60/40 όπου απομονώθηκαν η ζώνη A βάρους 4,7mg και η ζώνη B βάρους 1,7mg και λήφθηκε  $^1\text{H-NMR}$  για κάθε ζώνη. Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο χρωματογράφημα του κλάσματος από τη βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνωρίστηκε μίγμα της οξικής ταραξαστερόλης, της  $\psi$ -οξικής ταραξαστερόλης και της 3-Ο-ακετυλο-λουπεόλης με κοινό μοριακό τύπο ( $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ ). Από τα αντίστοιχα φάσματα μάζας τα κυριότερα θραύσματα για τα δυο ισομερή της ταραξαστερόλης είναι: 468[ $\text{M}^+$ ], 408, 365, 189(100), 161, 121. Τα κυριότερα θραύσματα για την 3-Ο-ακετυλο-λουπεόλη είναι: 468[ $\text{M}^+$ ], 396(100), 218, 189, 91.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  που λήφθηκε για τη ζώνη A παρατηρήθηκαν οι κορυφές των μεθυλίων των δυο παραγώγων της ταραξαστερόλης να συντονίζονται στην ίδια περιοχή από 0,85-1,02ppm ενώ

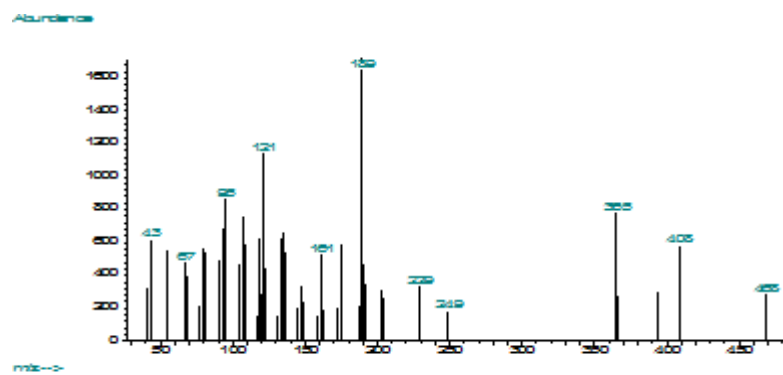
και τα δυο μόρια δίνουν κορυφή στα 2,04ppm η οποία και αντιστοιχεί στην ακετόξυ ομάδα της θέσης 3.

- Στο ίδιο φάσμα στα 4,50ppm υπάρχει μια ddμεσταθερά σύζευξης  $J=6,5/9,6\text{Hz}$  η οποία είναι χαρακτηριστική των πρωτονίων του άνθρακα που φέρει η ακετόξυ-ομάδα. Επίσης στην περιοχή 4,48-4,52ppm εντοπίζονται και δυο διπλές κορυφές με μικρή σταθερά σύζευξης,  $J=1\text{Hz}$  χαρακτηριστική για πρωτόνια εξωκυκλικού διπλού δεσμού. Τέλος σημαντική είναι και η brd κορυφή στα 5,13ppm με  $J=6,4\text{Hz}$ , η οποία είναι χαρακτηριστική για το H-21 της ψ-οξικής ταραξαστερόλης.
- Για το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ζώνης Β παρατηρήθηκαν οι κορυφές εξωκυκλικού διπλού δεσμού οι οποίες συντονίζονται στα 4,57 και 4,68ppm αντίστοιχα δίνοντας από δύο διευρυμένες απλές κορυφές καθώς και αυτές των μεθυλίων τα οποία συντονίζονται στην περιοχή 0,85-1,68ppm
- Στο ίδιο φάσμα σημαντική είναι και η κορυφή της ακέτυλο-ομάδας η οποία συντονίζεται στα 2,04ppm καθώς και η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του άνθρακα που φέρει την ακέτυλο-ομάδα η οποία συντονίζεται στα 4,44ppm δίνοντας μια διπλή-διπλών μεσταθερά σύζευξης  $J=5,6/10,8\text{Hz}$ .

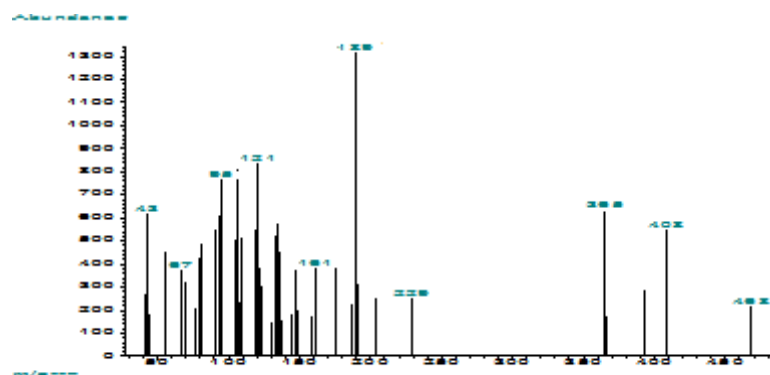
#### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (M6)



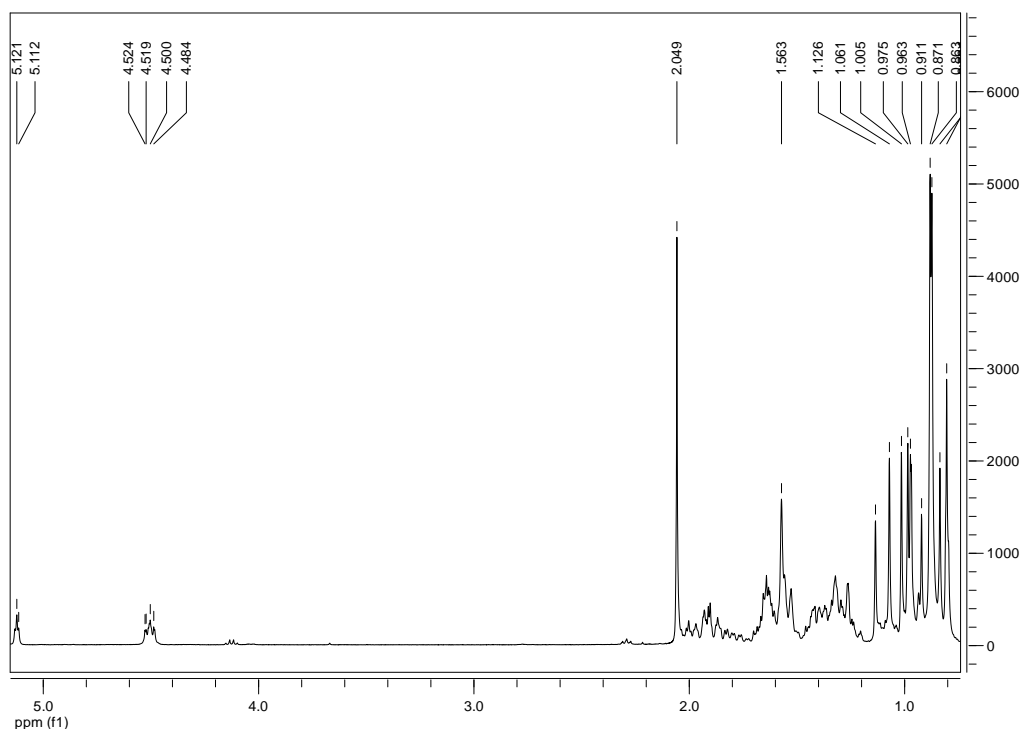
**ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ Ψ-ΟΞΙΚΗΣ ΤΑΡΑΞΑΣΤΕΡΟΛΗΣ (RT=47,35 min)**  
**& ΟΞΙΚΗΣ ΤΑΡΑΞΑΣΤΕΡΟΛΗΣ (RT=47,37 min)**



**ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ 3-Ο-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΔΟΥΠΕΟΛΗΣ (RT=47,40 min)**



## ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR ΖΩΝΗ Α



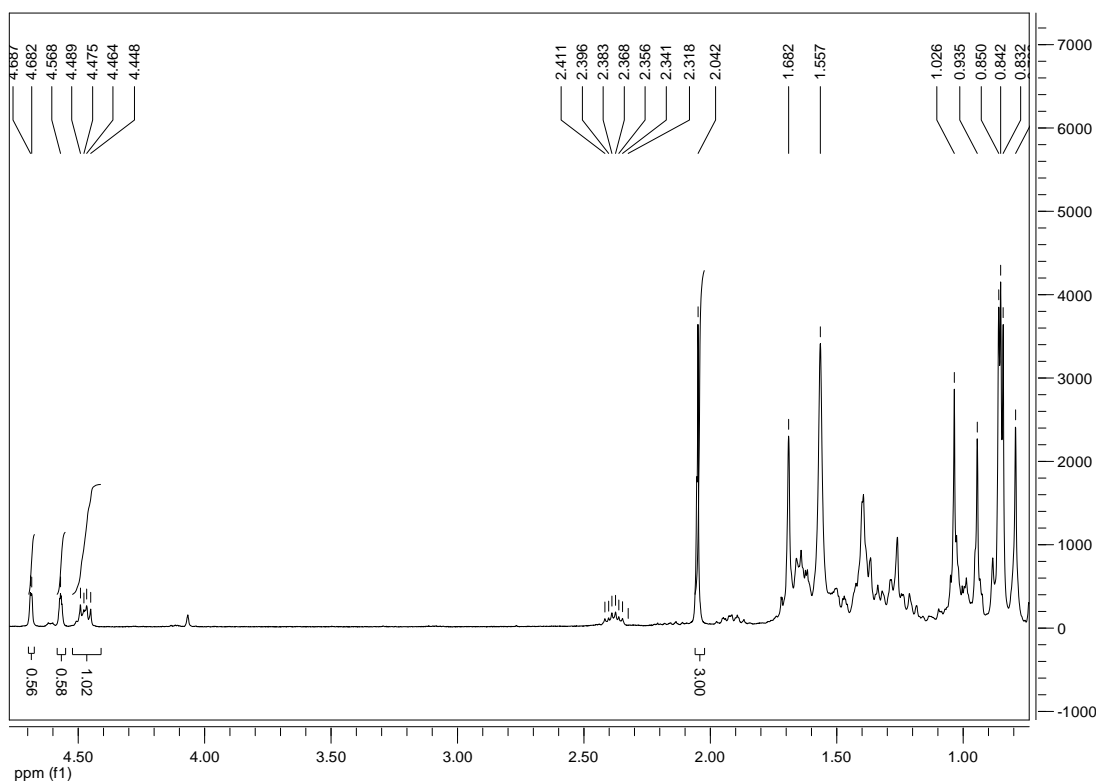
Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR για τη ζώνη Α φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Ψ-οξική ταραξαστερόλη		Οξική ταραξαστερόλη	
Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)	Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)
<b>3</b>	4,50 (1H, dd, J=6,5/9,6)	<b>3</b>	4,50 (1H, dd, J=6,5/9,6)
<b>21</b>	5,13 (1H, brd, J=6,4)	<b>23</b>	0,86 (3H, s)
<b>23</b>	0,83 (3H, s)	<b>24</b>	0,86 (3H, s)
<b>24</b>	0,86 (3H, s)	<b>25</b>	0,87 (3H, s)
<b>25</b>	0,87 (3H, s)	<b>26</b>	1,02 (3H, s)
<b>26</b>	1,05 (3H, s)	<b>27</b>	0,92 (3H, s)
<b>27</b>	0,96 (3H, s)	<b>28</b>	0,86 (3H, s)

<b>28</b>	0,80 (3H, s)	<b>29</b>	1,00 (3H, s)
<b>29</b>	0,97 (3H, d, $J=6,8$ )	<b>30<sup>α</sup></b>	4,48 (1H, d, $J=1$ )
<b>30</b>	1,56 (3H, s)	<b>30<sup>β</sup></b>	4,52 (1H, d, $J=1$ )
<b>CH<sub>2</sub>COO</b>	2,04 (3H, s)	<b>CH<sub>2</sub>COO</b>	2,04 (3H, s)

Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά δεδομένα και περαιτέρω αναζήτηση σε βιβλιογραφία [Reynolds 1986;Μέλλιου 2005] αποδείχθηκε ότι στη ζώνη Α του κλάσματος Μ6 αντιστοιχεί η δομή της **ψ-οξικής παραξαστερόλης (6)** και της **οξικής παραξαστερόλης (7)**. Πρόκειται για δύο γνωστά τριτερπένια τα οποία απομονώνονται για **πρώτη φορά από πρόπολη** ενώ έχουν απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Cameroon όπως *Calendula officinalis* [Zitter et al., 1997] και *Elaeagnus argentea* [Ling et al., 2006] [Πίνακας 1].

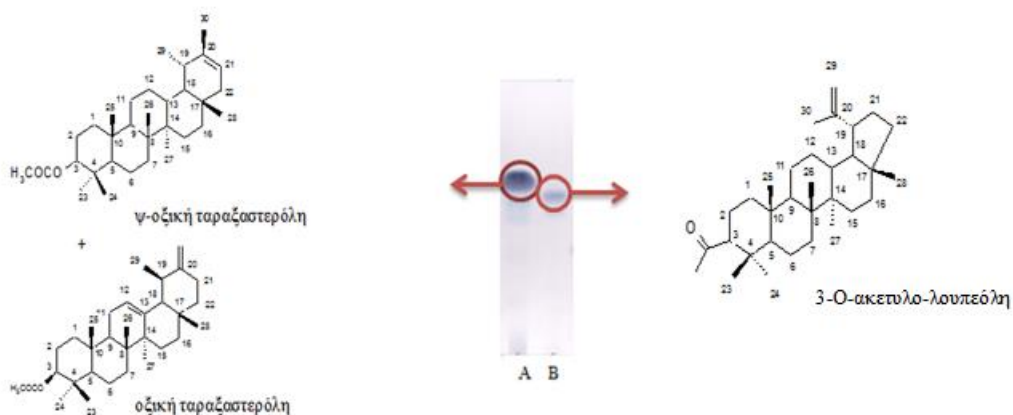
### ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR ΖΩΝΗ Β



Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR για το φάσμα της ζώνης Β φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

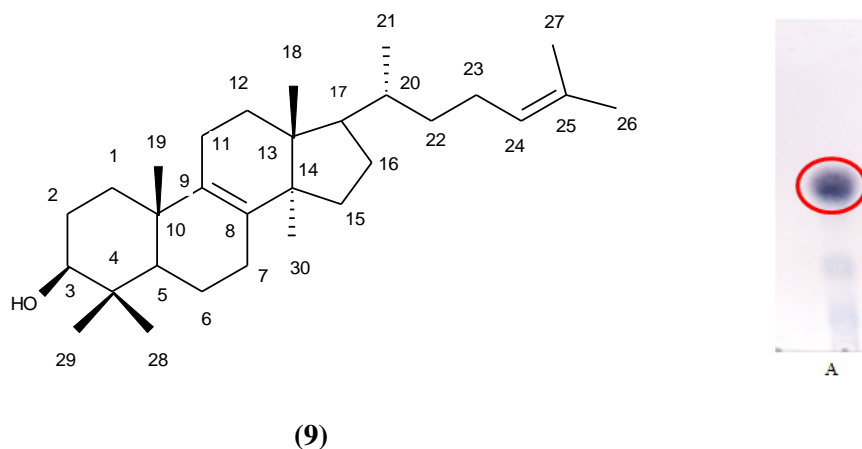
Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
<b>3</b>	4,47 (1H, dd, $J=5,6/10,8$ )
<b>19</b>	2,36(1H, dt, $J=4,8/5,2$ )
<b>23-24-25</b>	0,85 (3H, s)
<b>26</b>	1,02 (3H, s)
<b>27</b>	0,94 (3H, s)
<b>28</b>	1,55 (3H, s)
<b>29<math>\alpha</math></b>	4,57 (1H, brs)
<b>29<math>\beta</math></b>	4,68 (3H, brs)
<b>30</b>	1,68 (1H, s)
<b><u>CH<sub>3</sub>COO</u></b>	2,04 (3H, s)

Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και περαιτέρω βιβλιογραφικά δεδομένα [Prachayasittikul *et al.*, 2010] στη ζώνη Β αποδόθηκε η δομή της **3-Ο-ακετυλο-λουπεόλης (8)** που έχει απομονωθεί από μόνον από δείγμα πρόπολης της Βραζιλίας [Pereira *et al.*, 2003], αλλά και από το μελιτοφόρο φυτό *Diospyros rubra* που φέεται στο Cameroon [Prachayasittikul *et al.*, 2010] [Πίνακας 1].





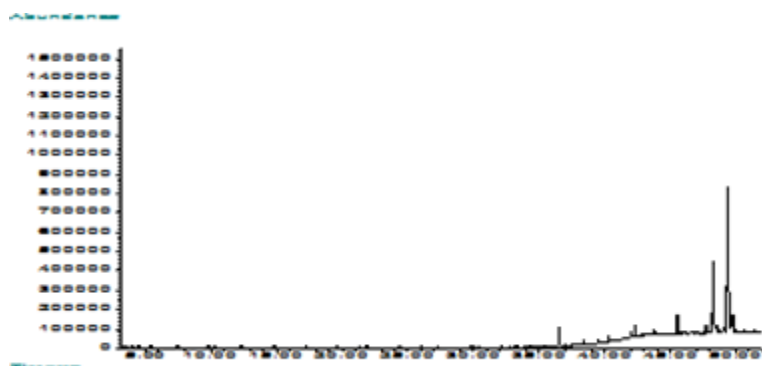
### 2.7.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΑΝΟΣΤΕΡΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ M13)



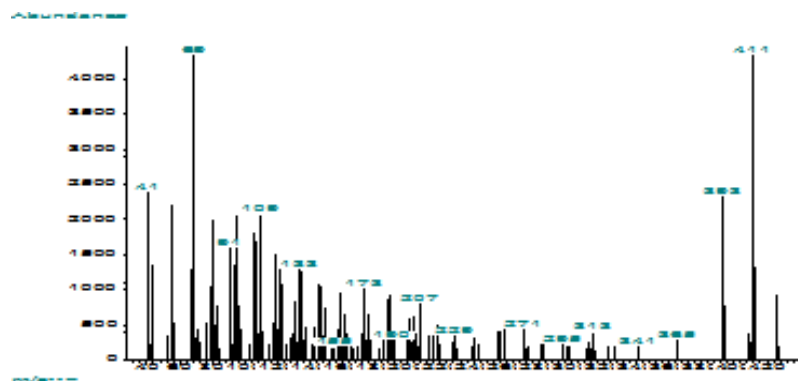
Το κλάσμα M13 μελετήθηκε με GC-MS και κατόπιν πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ : 99,5/0,5 όπου απομονώθηκε η ζώνη A βάρους 3,9mg στην οποία λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο χρωματογράφημα του κλάσματος η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τη λανοστερόλη ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) με μοριακό βάρος 426 και κυριότερα θραύσματα: 426 $[\text{M}^+]$ , 411(100), 393, 69
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ζώνης Ατα μεθύλια συντονίζονται στην περιοχή (0,82-1,67ppm). Είναι αξιοσημείωτο ότι δυο μεθύλια εμφανίζονται σημαντικά αποθωρακισμένα γεγονός που επαληθεύει ότι βρίσκονται πάνω σε διπλό δεσμό (1,60-1,67ppm).
- Χαρακτηριστική είναι και η ddστα 3,24ppm η οποία ανήκει σε H που βρίσκεται σε οξυγονωμένο άνθρακα καθώς και η brt κορυφή στα 5,12ppm η οποία έχει σταθερά σύζευξης  $J=6\text{Hz}$  και ανήκει σε H διπλού δεσμού.

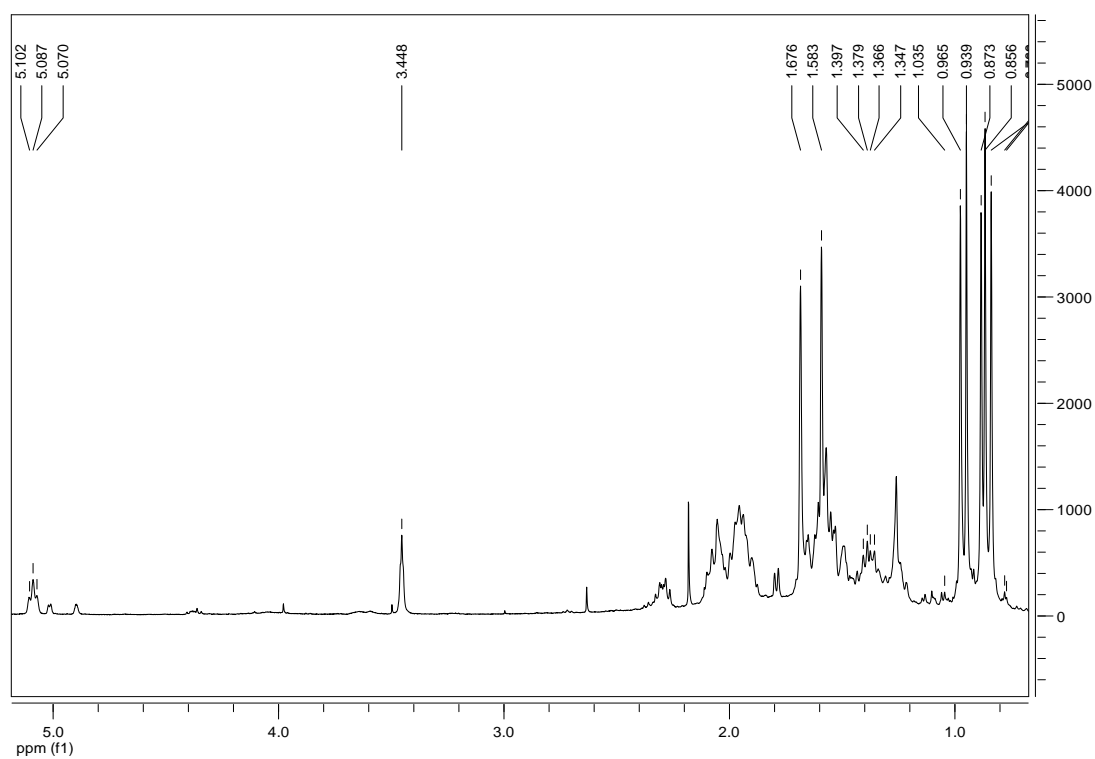
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (M13)



### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΛΑΝΟΣΤΕΡΟΛΗΣ (RT=49,05min)



### ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$

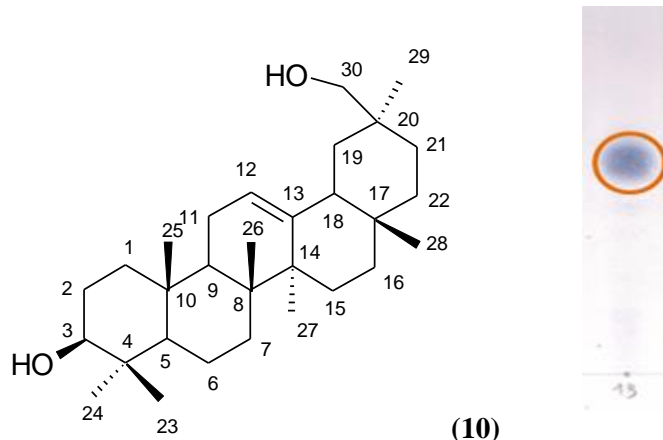


Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
<b>3</b>	3,44 (1H, dd, $J=4,8/10,7$ )
<b>5</b>	2,36(1H, m)
<b>17</b>	1,05(1H, m)
<b>19</b>	0,97 (3H, s)
<b>24</b>	5,12(1H, brt, $J=6,0$ )
<b>26</b>	1,67 (3H, s)
<b>27</b>	1,60 (3H, s)
<b>28</b>	0,94 (3H, s)
<b>29</b>	0,82 (3H, s)
<b>30</b>	0,87 (3H, s)

Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά δεδομένα και σύγκριση με τη βιβλιογραφία [Emmons*et al.*, 1989] αποδείχθηκε ότι στο κλάσμα M13A αντιστοιχεί η δομή της **λανοστερόλης**( $C_{30}H_{50}O$ ) που έχει απομονωθεί από πρόπολη τροπικών χωρών (Βραζιλία, Κούβα) και από τη Αφρική από πρόπολη από την Αίγυπτο [Furukawa*et al.*, 2002; Marquez&Cuesta-Rubio, 2010, Christov*et al.*, 1998] αλλά και από τα φυτά *Actaea asiatica* και *Garcinia prainiana* που φύονται στην Κεντρική και Ν. Α. Ασία αντίστοιχα [Susanti*et al.*, 2013]. Από μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η λανοστερόλη σε κάποιο φυτικό είδος που να φύεται στο Cameroon.

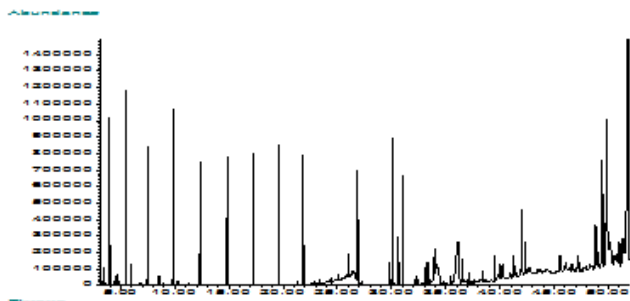
### 2.7.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 3α-ΥΔΡΟΞΥ-ΟΛΕΑΝ-12-ΕΝ-30-ΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ M22)



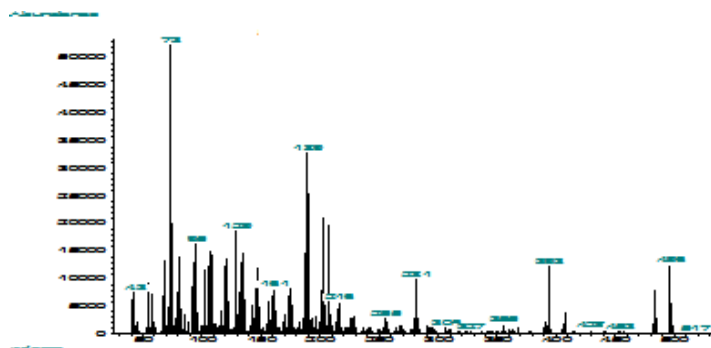
Το κλάσμα M22 μελετήθηκε με GC-MS, αφού προηγήθηκε σιλυλίωση όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4. Ακολούθησε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}$ : 99,5/0,5, από την οποία και απομονώθηκε η ζώνη B1 βάρους 1,0mg στην οποία λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Το φάσμα μάζας έδειξε μόριο τριτερπενικού σκελετού με ψευδομοριακό ιόν 517 και κυριότερα θραύσματα:  $[\text{M}^+]$ (517), 496, 393, 281, 216, 203(100), 190, 175, 161, 147, 129, 95, 73.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρήθηκε δομή που αντιστοιχούσε σε τριτερπενική αλκοόλη κατηγορίας β-αμυρίνης με χαρακτηριστική την τριπλή κορυφή στα 5,14ppm. Στην περιοχή από 3,18 έως 3,52ppm οι δύο διπλές κορυφές καθώς και η απλή κορυφή στα 3,41ppm είναι αντιπροσωπευτικές των υδροξυμεθυλ-ομάδων αυτής της δομής. Στο ίδιο φάσμα η κορυφή στα 1,56ppm οφείλεται στην υγρασία.

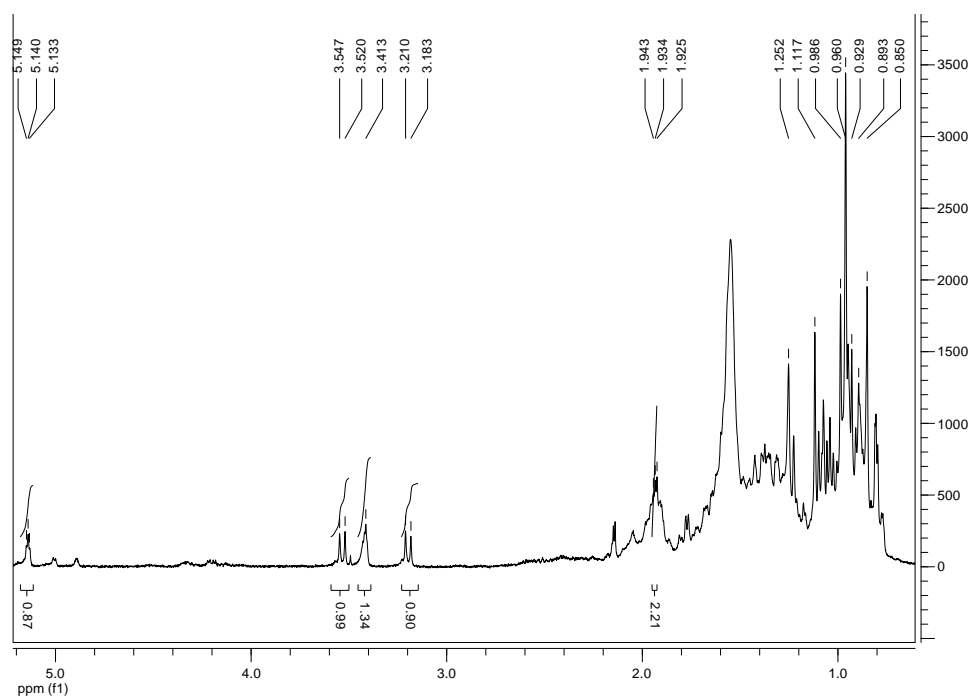
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (M22)



### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ (3α-ΥΔΡΟΞΥ-ΟΛΕΑΝ-12-ΕΝ-30-ΟΛΗΣ (RT=49,42 min))



### ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR



Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)
<b>3</b>	3,41 (1H, s)
<b>12</b>	5,14 (1H, t, J=3,6)
<b>18</b>	1,94 (1H, m)
<b>19</b>	1,09/1,72 (2H, s)

<b>23</b>	0,96 (3H, s)
<b>24</b>	0,85 (3H, s)
<b>25</b>	0,96 (3H, s)
<b>26</b>	0,93 (3H, s)
<b>27</b>	1,12 (3H, s)
<b>28</b>	0,89 (3H, s)
<b>29</b>	1,25 (3H, s)
<b>30α,β</b>	3,18/3,52 (2H, d, $J=11,3$ )

Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά δεδομένα και σύγκριση με τη βιβλιογραφία [Chienetal., 2012] στο κλάσμα M22B1 αποδόθηκε η δομή της **3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλης** (C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>2</sub>), μιας τριτερπενικής αλκοόλης που απομονώνεται **για πρώτη φορά από πρόπολη**. Απομονώθηκε πρόσφατα για πρώτη φορά, από το φυτό *Liquidambarformosana*Hance, ένα δέντρο που φύεται στην Ταϊβάν [Chienetal., 2012], ενώ δεν έχει καταγραφεί φυτική πηγή αυτού του δευτερογενούς μεταβολίτη στην Αφρική.

## **2.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CAMEROON ΠΕΡΙΟΧΗΣ**

### **NGAOUNDAL(ΔΕΙΓΜΑ3)**

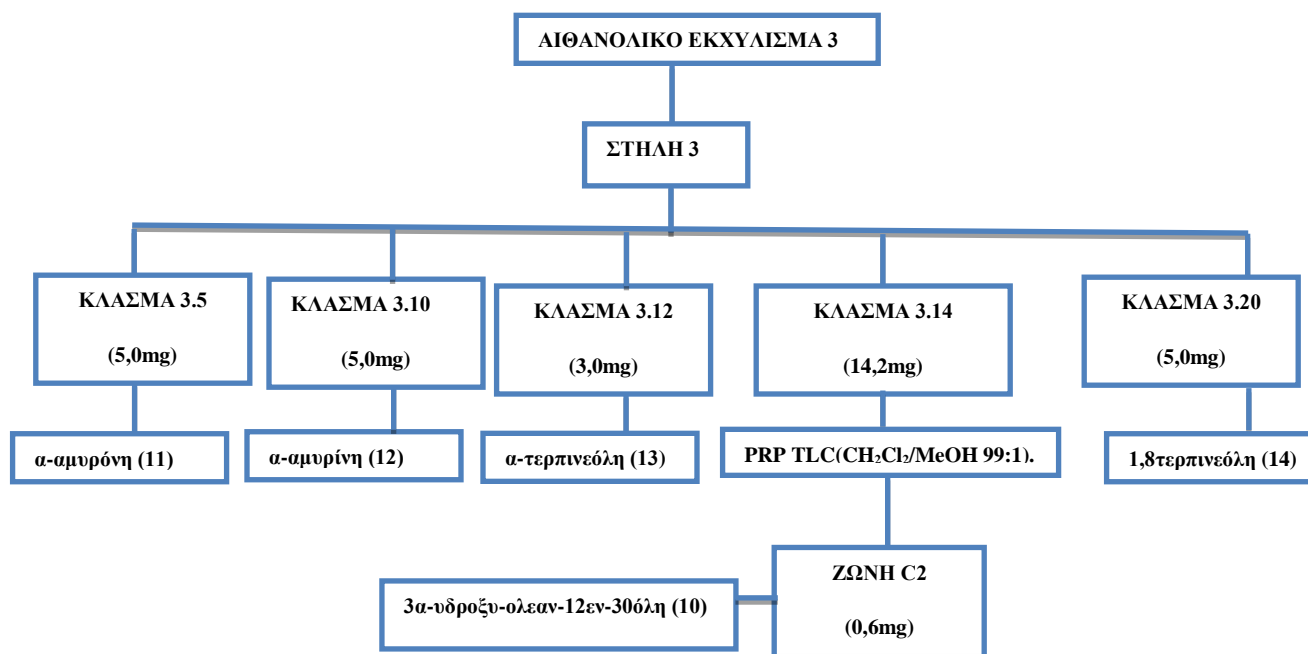
#### **2.8.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ**

Ποσότητα 1.19g υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό ανοιχτής στήλης (3cm) υπό πίεση με στατική φάση silicagel και κινητή φάση τους διαλύτες κυκλοεξάνιο/διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Από τον χρωματογραφικό αυτό διαχωρισμό προέκυψαν 139 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα δεδομένα έκλουσης:

<b>ΚΛΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ Δ/ΤΩΝ(ml)</b>
<b>1-22</b>	Cyclohexane 100%	270
<b>23-40</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50/50	1880
<b>41-50</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 40/60	220
<b>51-60</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30/70	1440
<b>61-70</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20/80	420
<b>71-82</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 10/90	520
<b>83-94</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	200
<b>85-110</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 99/1	1280
<b>111-139</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 98/2	1480

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Όσα κλάσματα εμφάνισαν ίδια χρωματογραφική εικόνα συνενώθηκαν όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΙ</b>	<b>W(mg)</b>	<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΙ</b>	<b>W(mg)</b>
<b>1-15</b>	3.1	2,0	<b>83-86</b>	3.11	8,4
<b>16-36</b>	3.2	1,9	<b>87-90</b>	3.12	3,0
<b>37-40</b>	3.3	1,6	<b>91-100</b>	3.13	8,8
<b>41-48</b>	3.4	7,8	<b>101-105</b>	3.14	14,2
<b>49-52</b>	3.5	5,0	<b>106-110</b>	3.15	2,7
<b>53-55</b>	3.6	8,2	<b>110-119</b>	3.16	1,5
<b>56-64</b>	3.7	5,1	<b>120-122</b>	3.17	1,0
<b>65-74</b>	3.8	7,8	<b>123-128</b>	3.18	4,5
<b>75-77</b>	3.9	8,9	<b>129-133</b>	3.19	15,3
<b>78-82</b>	3.10	5,0	<b>134-139</b>	3.20	5,0



### Πορεία γημικής ανάλυσης αιθανολικού εκχυλίσματος.

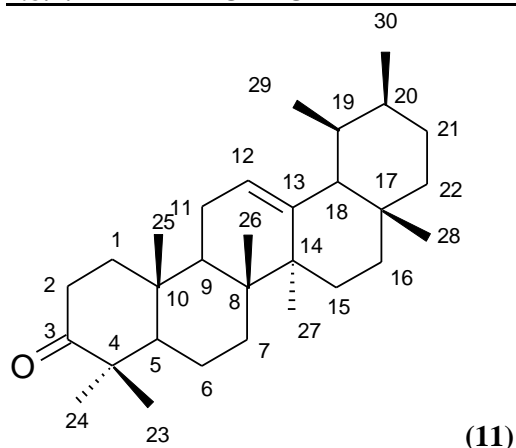
#### 2.8.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Από τα παραπάνω κλάσματα επιλέχθηκαν για μελέτη μέσω GC-MS (Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I ) τα κλάσματα **3.5**, **3.10**, **3.12**, **3.14** και **3.20**. Επιπλέον για την ταυτοποίησή τους λήφθηκαν φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$ .

- Στο κλάσμα 3.14 έγινε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99:1 από την οποία και απομονώθηκε η ζώνηC2 (0,6mg). Η ζώνηC2 μελετήθηκε με GC-MSκαι η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε μόριο τριτερπενικού σκελετού με θραυσματοποίηση ταυτόσημη με αυτήν του κλάσματος M22 (δείγμα 2), που περιγράφεται αναλυτικότερα στην ενότητα 2.7.2.3. Κατά συνέπεια στο κλάσμα 3.14αποδόθηκε η δομή της **3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλης (10)**.
- Η φασματοσκοπική μελέτη για τα κλάσματα **3.5**, **3.10**, **3.12** και **3.20** περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



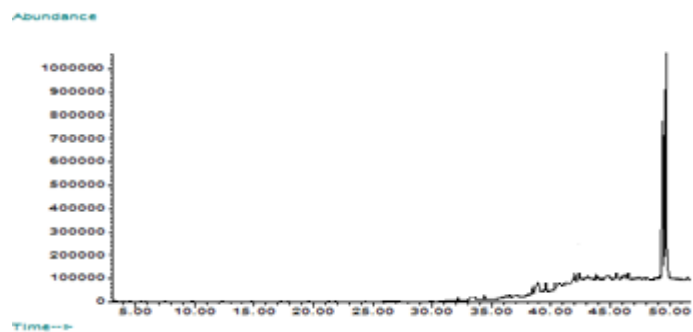
### 2.8.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ $\alpha$ -ΑΜΥΡΟΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.5)



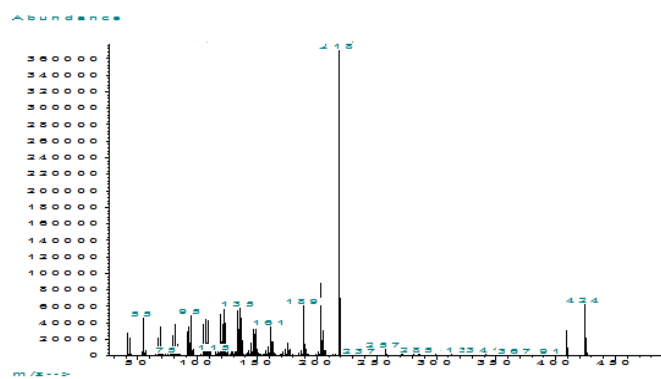
Το κλάσμα 3.5 μελετήθηκε με GC-MS και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ , το οποίο και έδειξε δομή μορίου με τριτερπενικό σκελετό παρόμοιο με εκείνον της  $\alpha$ -αμυρίνης. Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα μάζας η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε την  **$\alpha$ -αμυρόνη** ( $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}$ ) ένα μόριο τριτερπενικού σκελετού με μοριακό βάρος 424. Τα κυριότερα θραύσματα που παρατηρήθηκαν ήταν τα εξής: 424[ $\text{M}^+$ ], 409, 218(100), 203, 189.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  χαρακτηριστικό είναι το πρωτόνιο που συντονίζεται στα 5,12ppm δίνοντας τριπλή κορυφή με  $J=3,6\text{Hz}$  και αντιστοιχεί σε δ.δ στον σκελετό του τριτερπενίου της κατηγορίας της  $\alpha$ -αμυρίνης καθώς και τα επτά μεθύλια που συντονίζονται στην περιοχή από 0,79-1,14ppm.
- Τα μεθύλια των θέσεων 29 και 30 δίνουν από μια διπλή κορυφή στα 0,94 ppm και στα 0,96 ppm με σχέση  $J=5,6\text{Hz}$  και  $J=6,5\text{Hz}$  αντίστοιχα.
- Στο ίδιο φάσμα η απουσία της dd της  $\alpha$ -αμυρίνης που συντονίζεται στα 3,22 ppm οδηγεί στο συμπέρασμα, μαζί με τα δεδομένα του φάσματος μάζας και την αντίστοιχη βιβλιογραφία, ότι η δομή δεν είναι αυτή της  $\alpha$ -αμυρίνης αλλά ενός παραπλήσιας δομής τριτερπενίου.
- Η παρουσία μιας κορυφής στα 3,40ppm οφείλεται σε υπολείμματα του διαλύτη μεθανόλη.

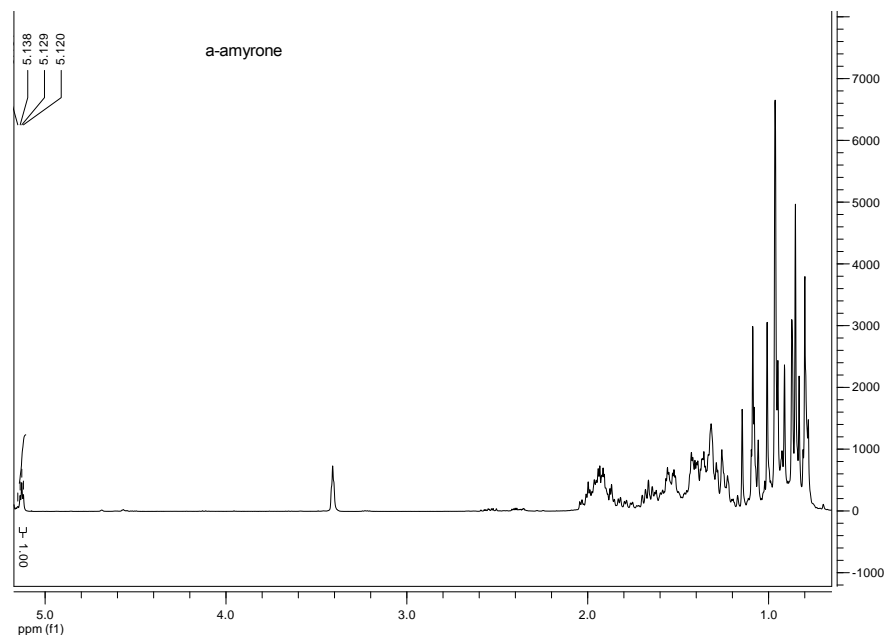
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (3.5)



### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ α-ΑΜΥΡΟΝΗΣ (RT=49,50min)



### ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR

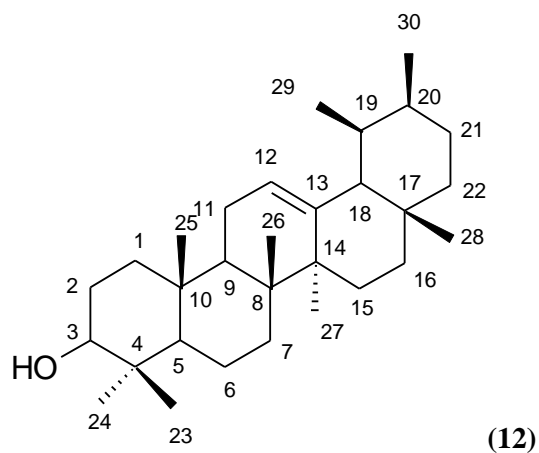


Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm)
Σταθερά σύζευξης $J$ (Hz)	
<b>12</b>	5,12 (1H, t, $J=3,6$ )
<b>23</b>	1,07 (3H, s)
<b>24</b>	0,87 (3H, s)
<b>25-28</b>	0,79-1,00 (12H, s)
<b>29</b>	0,94 (3H, d, $J=5,6$ )
<b>30</b>	0,96 (3H, d, $J=6,5$ )

Επειδή η  **$\alpha$ -αμυρόνη** είναι ένα γνωστό τριτερπένιο η ταυτοποίηση έγινε με βάση το φάσμα μάζας και το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  συγκρινόμενα με τη βιβλιογραφία [Dekeboetal., 2002]. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία έχει ανιχνευθεί (χωρίς να απομονωθεί), μέσω GC-MS, σε πρόπολη από την Αιθιοπία [Rushdietal., 2014]. Η  **$\alpha$ -αμυρόνη** έχει απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Cameroon, όπως *Dorsteniamanii* [Vilegasetal.,1997] και *Boswellianeglecta* [Dekeboetal., 2002] **[Πίνακας 1]**.

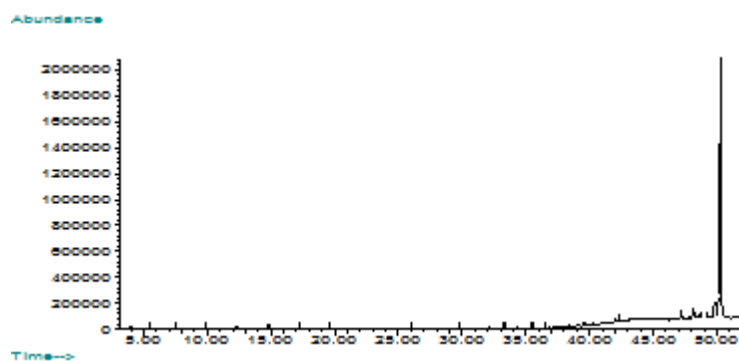
### 2.8.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ $\alpha$ -ΑΜΥΡΙΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.10)



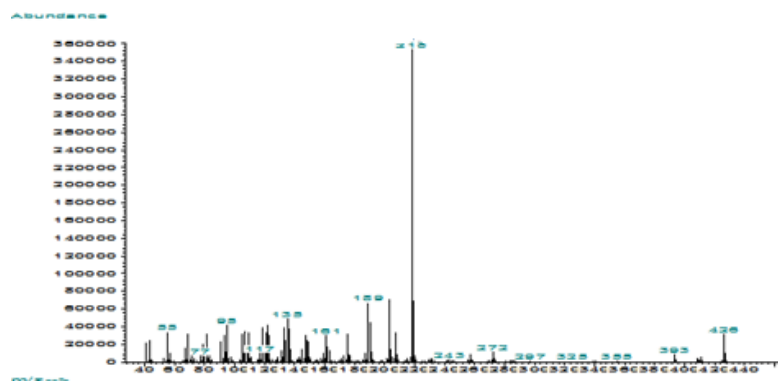
Στο κλάσμα 3.10 λήφθηκε φάσμα μάζας GC-MS και φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  σε ( $\text{CDCl}_3$ ). Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα μάζας η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε την  **$\alpha$ -αμυρίνη**( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) με μοριακό βάρος 426. Τα κυριότερα θραύσματα είναι: 426[ $\text{M}^+$ ], 218(100), 203, 189.
- Συγκρινόμενο και με το προηγούμενο φάσμα της  **$\alpha$ -αμυρόνης** παρατηρούμε ότι στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  εντοπίστηκαν οι κορυφές των 7 μεθυλίων στην περιοχή (0,79-1,06ppm). ΤοH του διπλού δεσμού δίνει τριπλή κορυφή που συντονίζεται στα 5,12ppm και τα μεθύλια των θέσεων 29 και 30 δίνουν από μια διπλή κορυφή στα 0,94ppm και στα 0,96ppm με χαρακτηριστική σχάση.
- Εξίσου σημαντική είναι και η dd στα 3,22ppm που αντιστοιχεί σε πρωτόνιο που βρίσκεται σε οξυγονωμένο άνθρακα.

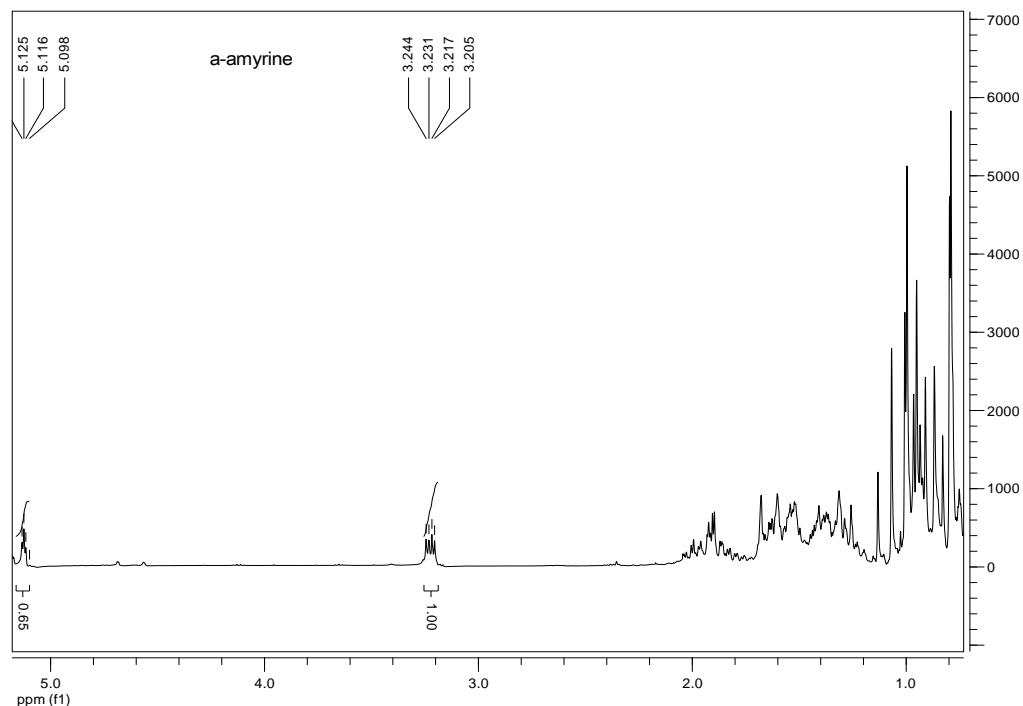
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (3.10)



### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ $\alpha$ -ΑΜΥΡΙΝΗΣ (RT=50,05min)



## ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR



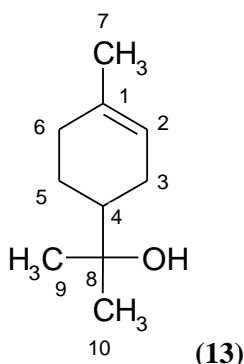
Επειδή η ***α-αμυρίνη*** είναι ένα γνωστό τριτερπένιο η ταυτοποίηση έγινε με βάση το φάσμα μάζας και το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR συγκρινόμενα με την βιβλιογραφία [Ahmed *et al.*, 2006; Barrosetal., 2011].

Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)
<b>3</b>	3,22 (1H,dd, J=5,6/11,0)
<b>12</b>	5,12 (1H, t, J=3,6)
<b>23</b>	0,87 (3H, s)
<b>24</b>	0,79 (3H, s)
<b>25-28</b>	0,83-1,00 (12H, s)
<b>29</b>	0,94 (3H, d, J=5,6)
<b>30</b>	0.96 (3H, d, J=6,5)

Η  **$\alpha$ -αμυρίνη** είναι ένα τριτερπένιο που έχει απομονωθεί από πρόπολη της Βραζιλίας [Marcucci&Bankova, 1999;Furukawaetal, 2002; Trushevaetal., 2006] καθώς και από μελιτοφόρα φυτά του Cameroon όπως: *Acanthusilicifolius* [Phanetal., 2008], *Mimosainvisa* [Nanaetal., 2012], *Vernoniaconfertaka*και*Vernonia.amygdalina* [Toyang&Verpoorte 2013] [Πίνακας 1].

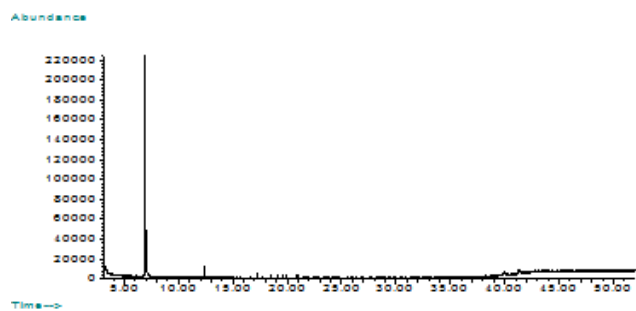
### **2.8.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ $\alpha$ -ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.14)**



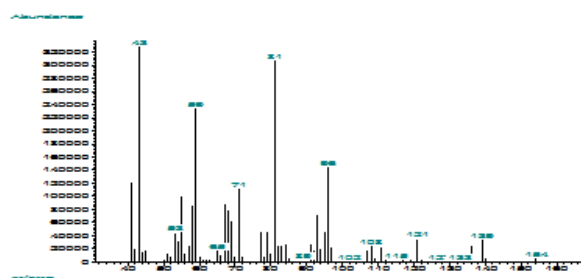
Στο κλάσμα 3.14 λήφθηκε φάσμα μάζας GC-MS,  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα μάζας η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε την  **$\alpha$ -τερπινεόλη**, μια μονοτερπενική αλκοόλη ( $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$ ) με μοριακό βάρος 154 και κυριότερα θραύσματα:154[ $\text{M}^+$ ], 136, 121, 93, 81(100), 67, 59, 43.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  εμφανίζεται ένα αποθωρακισμένο μεθύλιο στα 1,65ppm και άλλα δυο μεθύλια στα 1,17 και 1,18ppm. Επίσης εμφανίζεται ένα H στα 5,38ppm που αντιστοιχεί σε πρωτόνιο διπλού δεσμού και επτά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 1,30-2,03ppm.
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  φαίνονται 10 κορυφές που αντιστοιχούν σε δομή μονοτερπενίου με έναν οξυγονωμένο τεταρτοταγή άνθρακα στα 72,7ppm και 2 άνθρακες διπλού δεσμού οι οποίοι συντονίζονται στα 120,5ppm και στα 134ppm.

## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (3.14)

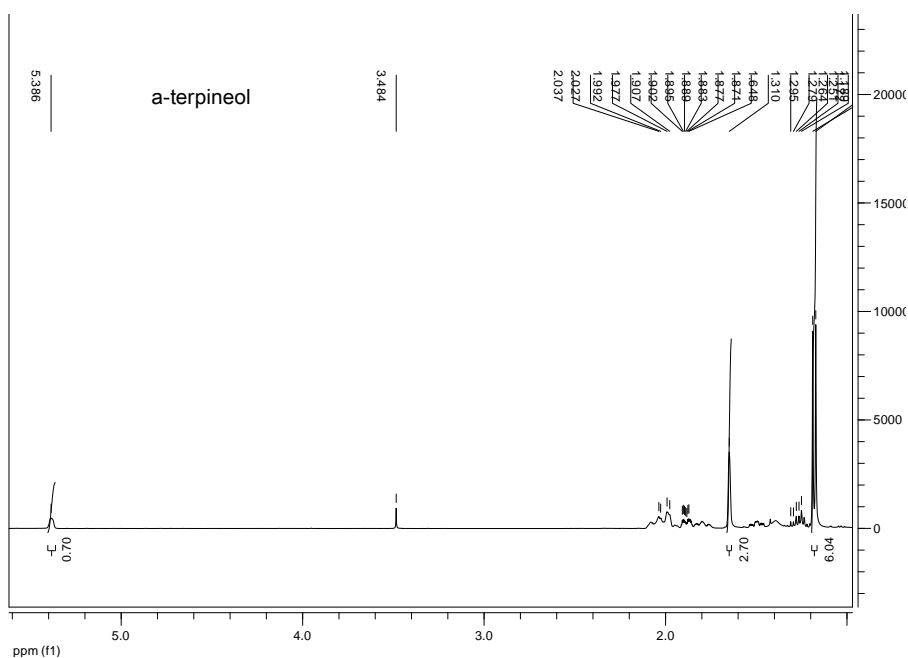


## ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ α-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗΣ (RT=7,31min)

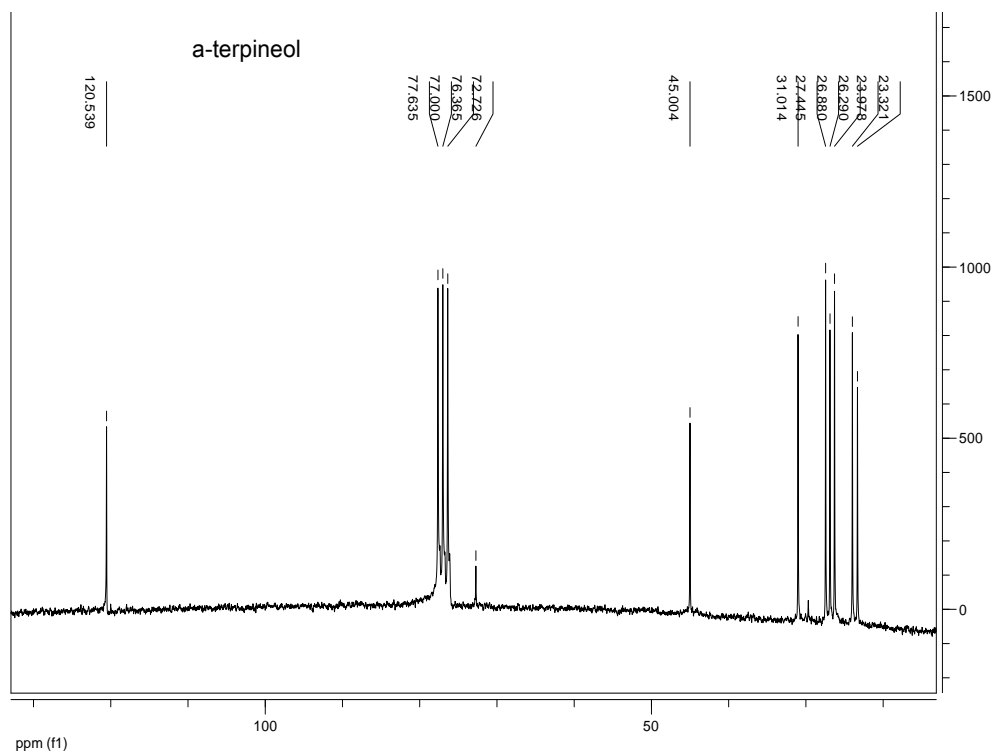


Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα καθώς και με μελέτη της βιβλιογραφίας [Skaskovskii *et al.*, 2006] στο κλάσμα 3.14 αποδόθηκε η δομή της **α-τερπινεόλης**.

## ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR



## ΦΑΣΜΑ <sup>13</sup>C-NMR



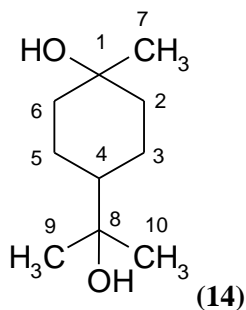
Η απόδοση των κορυφών των φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Θέση	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
<b>1</b>	-	133,9
<b>2</b>	5,38 (1H, brs)	120,5
<b>3</b>	1,30-2,03 (2H, m)	26,8
<b>4</b>	1,30-2,03(1H, m)	45,0
<b>5</b>	1,30-2,03(2H, m)	23,9
<b>6</b>	1,30-2,03(2H, m)	31,0
<b>7</b>	1,65 (3H, s)	23,3
<b>8</b>	-	72,7
<b>9</b>	1,18(3H, s)	27,4
<b>10</b>	1,17(3H, s)	26,2



Ηα-τερπινεόλη έχει αναγνωρισθεί μέσω GC-MS σε Ελληνική και Ιταλική πρόπολη [Melliou *et al.*, 2007; Pellati *et al.*, 2013]. Επίσης έχει αναφερθεί ύπαρξή της σε πολλά μελιτοφόρα φυτά του Καμερόν όπως τα κωνοφόρα δέντρα γένους *Pinus*, *Eucalyptus saligna* [Bignell *et al.*, 1997; Pino *et al.*; Hill & Johnson, 2002] και το φυτό *Helicrysum gymnocephalum* [Afolous *et al.*, 2011] [Πίνακας 1].

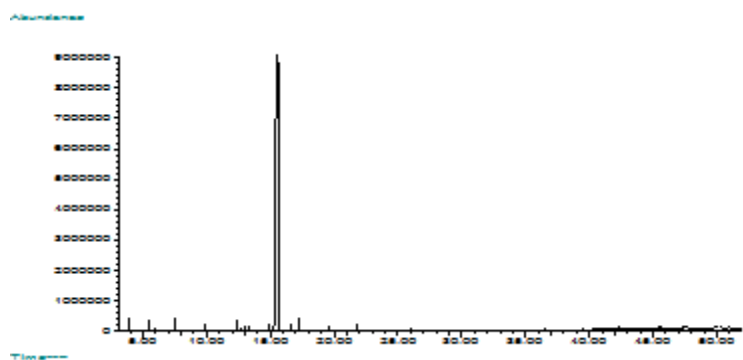
#### 2.8.2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 1,8 ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ 3.20)



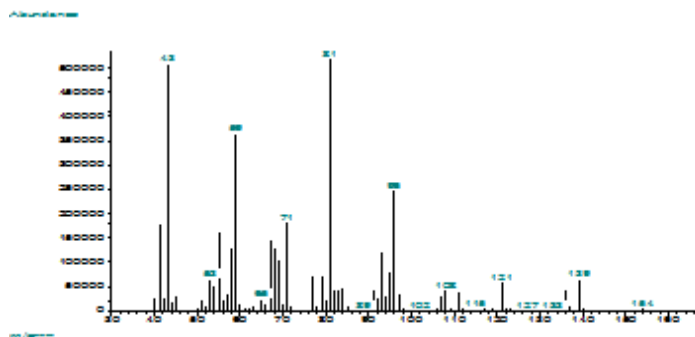
Στο κλάσμα 3.20 μελετήθηκε με GC-MS και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  σε  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διαπιστώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα μάζας η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε την **1,8-τερπινεόλη** ( $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$ ), μια μονοτερπενική αλκοόλη με μοριακό βάρος 154 και κυριότερα θραύσματα: 154[ $\text{M}^+$ ], 139, 121, 96, 81(100), 59, 43.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  υπάρχει μεθύλιο που συντονίζεται στα 1,17ppm και φαίνεται ως πιο αποθωρακισμένο από τα άλλα δύο μεθύλια στα 1,10ppm. Στο ίδιο φάσμα διακρίνεται και η απλή κορυφή της μεθανόλης στα 4,84ppm
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  χαρακτηριστικές είναι οι 10 κορυφές των ανθράκων ενός μονοτερπενίου με μία κορυφή άνθρακα να συμπίπτει εντός της επταπλής κορυφής της μεθανόλης.

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (3.20)

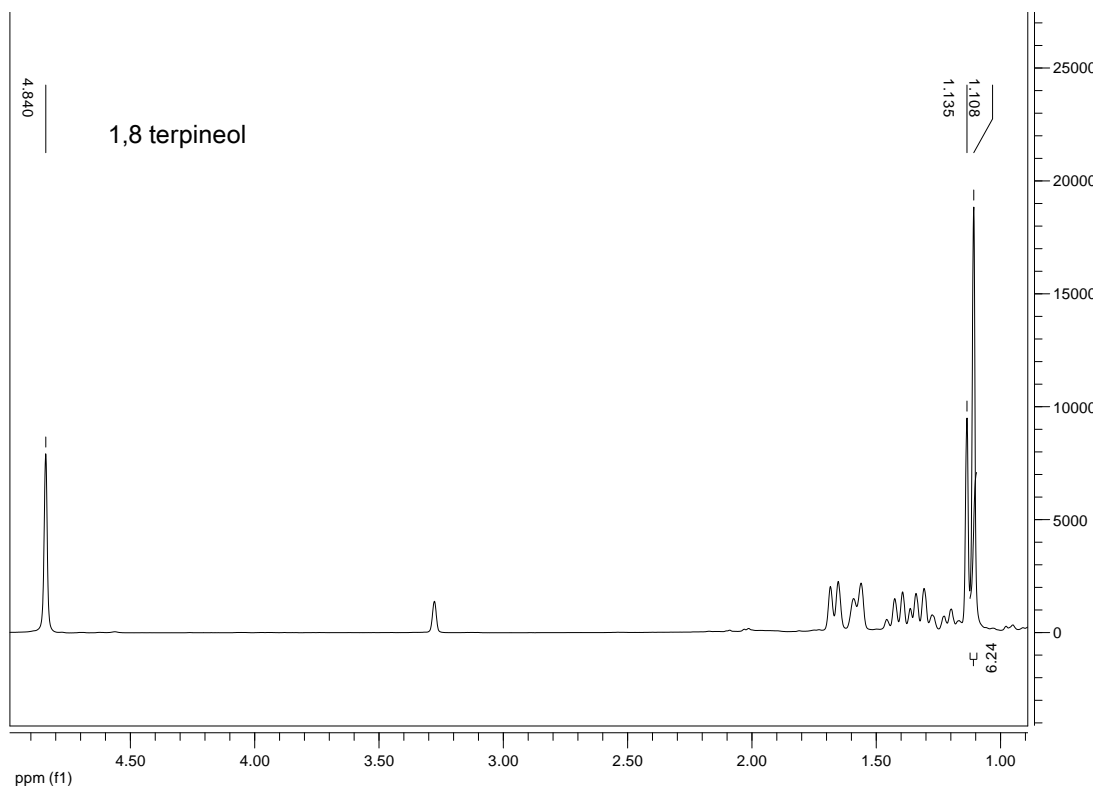


### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ 1,8-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗΣ (RT=14,40min)

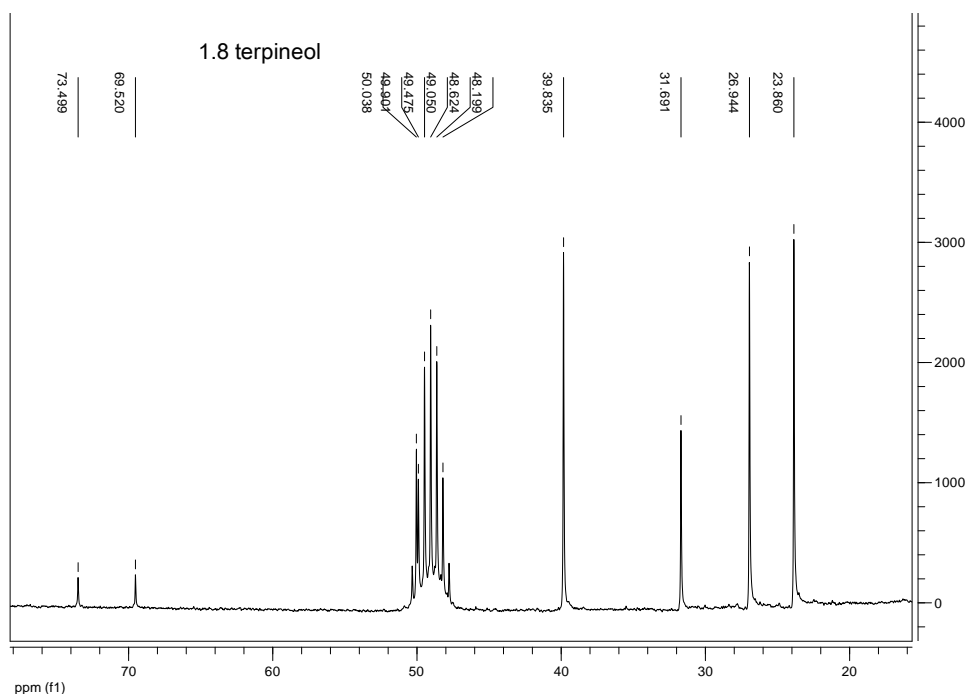


Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα καθώς και με μελέτη της βιβλιογραφίας [Mahmoud, 1985] στο κλάσμα 3.20 αποδόθηκε η δομή της **1,8-τερπινεόλης**.

## ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$



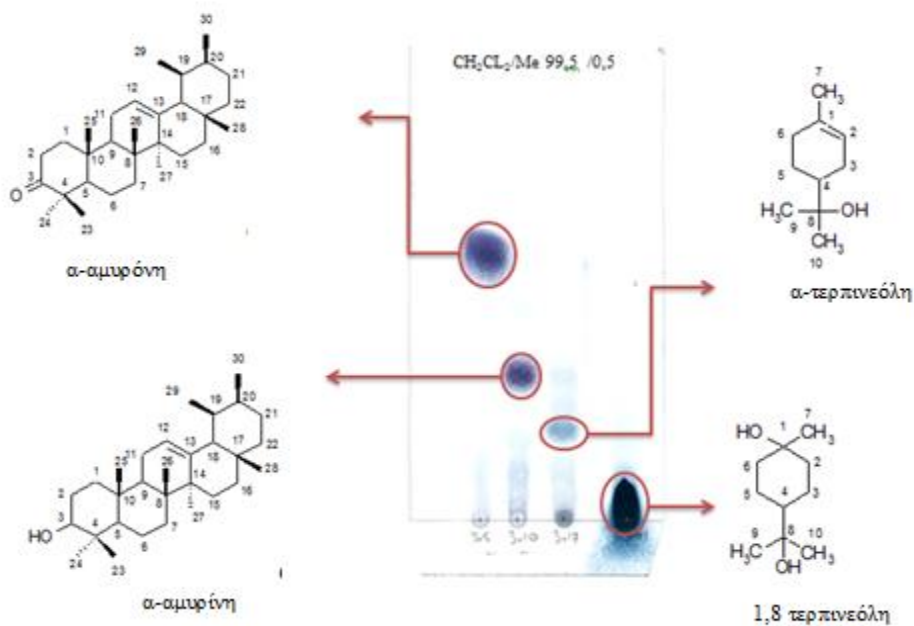
## ΦΑΣΜΑ $^{13}\text{C-NMR}$



Η απόδοση των κορυφών των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Θέση	$\delta$ $^1\text{H}$ , Πολλαπλότητα, $J(\text{Hz})$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
<b>1</b>	-	73,4
<b>2,6</b>	1,19-1,68 (4H, m)	39,8
<b>3,5</b>	1,19-1,68 (4H, m)	23,8
<b>4</b>	1,19-1,68 (1H, m)	50,0
<b>7</b>	1,17 (3H,s)	31,6
<b>8</b>	-	69,5
<b>9,10</b>	1,10 (6H,s)	26,8

Η **1,8-τερπινεόλη** είναι μια μονοτερπενική αλκοόλη που έχει απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά του γένους *Pinus* και *Eucalyptus saligna* που φύονται στο Cameroon [Bignell *et al.*, 1997; Pino *et al.*, 2002; Hakkie *et al.*, 2010], [Πίνακας 1] αλλά **όχι από πρόπολη**. Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) που ακολουθεί, διακρίνονται τα τέσσερα απομονωμένα μόρια:



## **2.9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ CAMEROON ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΕΚΕΛ (ΔΕΙΓΜΑ 4)**

### **2.9.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ**

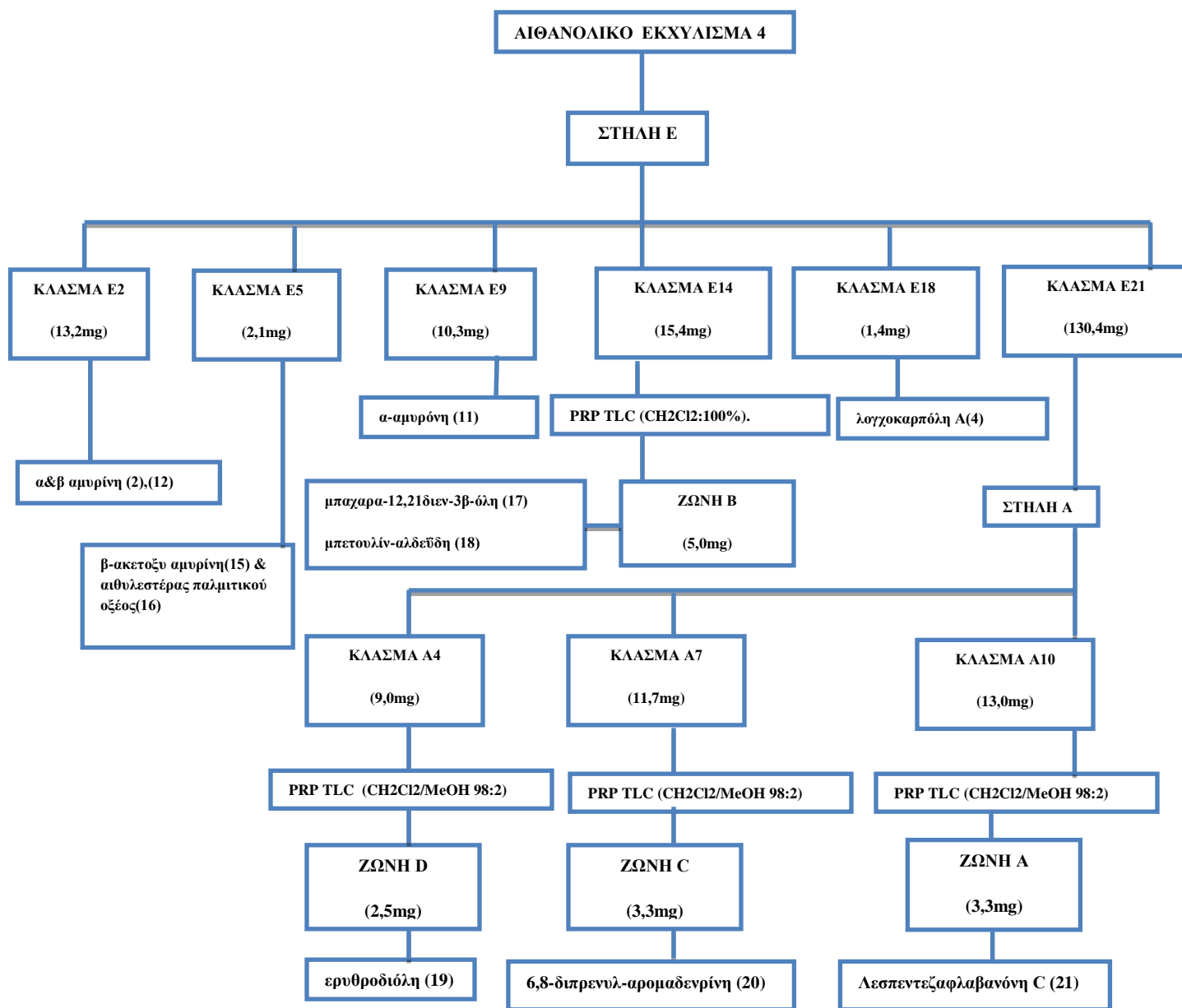
Ποσότητα 1,19g υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό ανοιχτής στήλης υπό κενό με στατική φάση silicagel και κινητή φάση τους διαλύτες κυκλοεξάνιο/διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Από τον χρωματογραφικό αυτό διαχωρισμό προέκυψαν 270 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα δεδομένα έκλουσης:

<b>ΚΛΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ Δ/ΤΩΝ(ml)</b>
<b>1-30</b>	Cyclohexane 100%	1050
<b>31-56</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90/10	240
<b>57-65</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 80/20	1160
<b>66-80</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 70/30	1640
<b>81-97</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 60/40	1660
<b>98-112</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50/50	640
<b>113-125</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 40/60	320
<b>126-137</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30/70	420
<b>138-147</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20/80	210
<b>148-156</b>	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 10/90	640
<b>157-168</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	1020
<b>169-177</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 99/1	1000
<b>178-195</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 98/2	600
<b>196-210</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 95/5	400
<b>211-230</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH90/10	400
<b>231-250</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH80/20	400
<b>251-270</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH70/30	1800

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες αλουμινίου (TLC). Όσα κλάσματα εμφάνισαν ίδια χρωματογραφική εικόνα συνενώθηκαν όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΙ</b>	<b>W(mg)</b>	<b>ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΙ</b>	<b>W(mg)</b>
<b>1-20</b>	E1	5,5	<b>103-105</b>	E12	1,1
<b>21-50</b>	E2	13,2	<b>180-189</b>	E13	0,8
<b>51-56</b>	E3	4,6	<b>190-200</b>	E14	15,4
<b>57-60</b>	E4	5,1	<b>201-213</b>	E15	5,6
<b>61-72</b>	E5	2,1	<b>214-220</b>	E16	0,8
<b>72-78</b>	E6	1,9	<b>221-225</b>	E17	0,6
<b>79-83</b>	E7	5,3	<b>226-230</b>	E18	1,1
<b>84-88</b>	E8	0,9	<b>231-236</b>	E19	0,3
<b>89-93</b>	E9	3,7	<b>237-240</b>	E20	3,4
<b>94-97</b>	E10	10,3	<b>241-270</b>	E21	130,4
<b>98-102</b>	E11	2,3			

Η συνένωση E21 βάρους 130,4mg προχώρησε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό ανοιχτής στήλης υπό κενό διαμέτρου 1,2cm με στατική φάση silicagel και κινητή φάση τους διαλύτες κυκλοεξάνιο/διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Σκοπός της δεύτερης στήλης ήταν η απομόνωση και ο προσδιορισμός των πιο πολικών συστατικών. Από τον χρωματογραφικό αυτό διαχωρισμό προέκυψαν 80 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα δεδομένα έκλυσης:



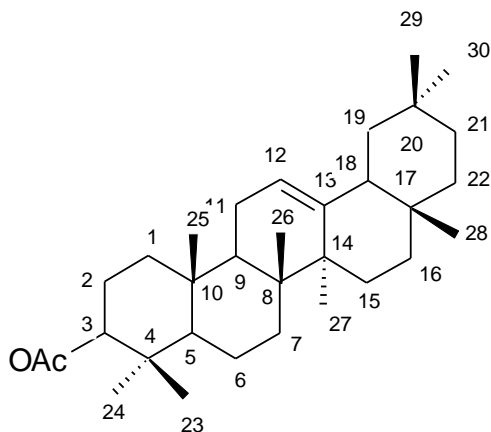
Πορεία χημικής ανάλυσης αιθανολικού εκχυλίσματος.

## 2.9.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

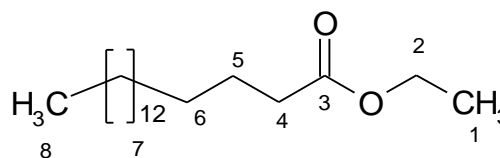
Από τα παραπάνω κλάσματα επιλέχθηκαν για μελέτη μέσω GC-MS (Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I) τα κλάσματα **E2**, **E5**, **E9**, **E14** και **A4**. Για την ταυτοποίησή τους λήφθηκαν φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$ . Επίσης μελετήθηκαν τα κλάσματα **A7** και **A10** τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  και φασμάτων δυο διαστάσεων. Ακολουθεί η φασματοσκοπική μελέτη για κάθε κλάσμα.

- Το κλάσμα **E2** μελετήθηκε με GC-MS και η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τη  **$\beta$ -αμυρίνη (2)** που απομονώθηκε από το δείγμα 1 (Congo) και την  **$\alpha$ -αμυρίνη (12)** που απομονώθηκε από το δείγμα 3 (Ngoundal). Η φασματοσκοπική μελέτη των δυο μορίων περιγράφεται αναλυτικά στις ενότητες 2.6.2.2 και 2.8.2.2.
- Το κλάσμα **E5** μελετήθηκε με GC-MS και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Η φασματοσκοπική του μελέτη περιγράφεται παρακάτω στην ενότητα 2.9.2.1.
- Το κλάσμα **E9** μελετήθηκε με GC-MS και λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  όπου σε σύγκριση με το κλάσμα 3.5 (δείγμα 3) αποδόθηκε η δομή της  **$\alpha$ -αμυρόνης (11)**. Η φασματοσκοπική μελέτη της περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.8.2.1.
- Στο κλάσμα **E18** έγινε λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  όπου σε σύγκριση με το φάσμα του κλάσματος **4.1.29** (δείγμα 1) αποδόθηκε η δομή της **λογχοκαρπόλης Α**. Η φασματοσκοπική μελέτη της περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.6.2.3.
- Τα κλάσματα **E14**, **A6**, **A7** και **A10** προχώρησαν σε περαιτέρω καθαρισμό με παρασκευαστική χρωματογραφία. Η φασματοσκοπική τους μελέτη περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

### 2.9.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ $\beta$ -ΑΚΕΤΟΞΥ-ΑΜΥΡΙΝΗΣ & ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΠΑΛΜΙΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ΚΛΑΣΜΑ E5)



(15)



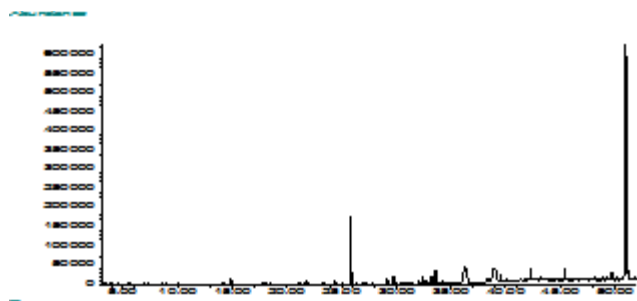
(16)



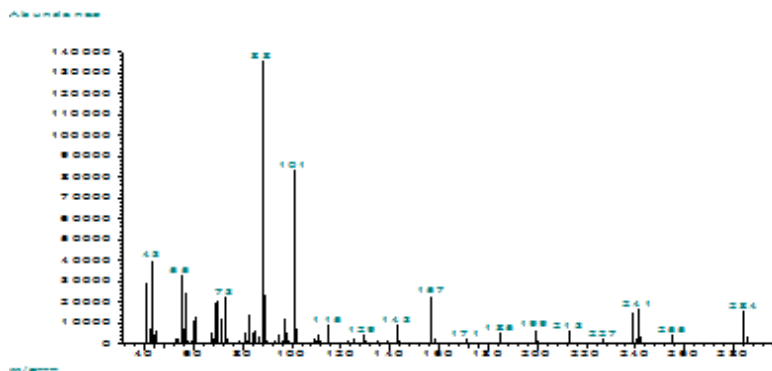
Το κλάσμα E5 μελετήθηκε με GC-MS και λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν:

- Στο φάσμα μάζας η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τη  **$\beta$ -ακετοξυ-αμυρίνη** ένα μόριο τριτερπενικού σκελετού με μοριακό βάρος 468 ( $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ ) και κυριότερα θραύσματα: 468 [ $\text{M}^+$ ], 453, 408, 393, 365, 218 (100), 203, 189 και τον **αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος** με μοριακό βάρος 284 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ ) και κυριότερα θραύσματα :284 [ $\text{M}^+$ ], 255, 241, 157, 101, 88(100), 70, 55, 43. Η αναλογία των 2 αυτών βασικών μορίων βάση του ποσοστού επί τοις εκατό των κορυφών τους ήταν 80%  $\beta$ -ακετοξυ-αμυρίνη έναντι 20% αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρείται η κλασική δομή της  $\beta$ -αμυρίνης ακετυλιωμένη όμως στην θέση 3.
- Στο ίδιο φάσμα οι κορυφές στην περιοχή 1,05 έως 1,53ppm και η διπλή διπλών στα 4,12ppm και ανήκουν στον αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος.
- Η κορυφή στα 2,17ppm ανήκει σε υπολείμματα ακετόνης.

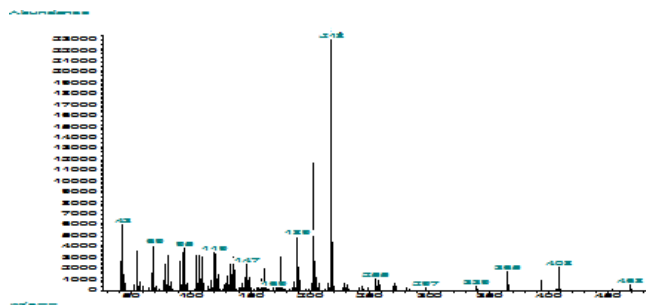
#### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (E5)



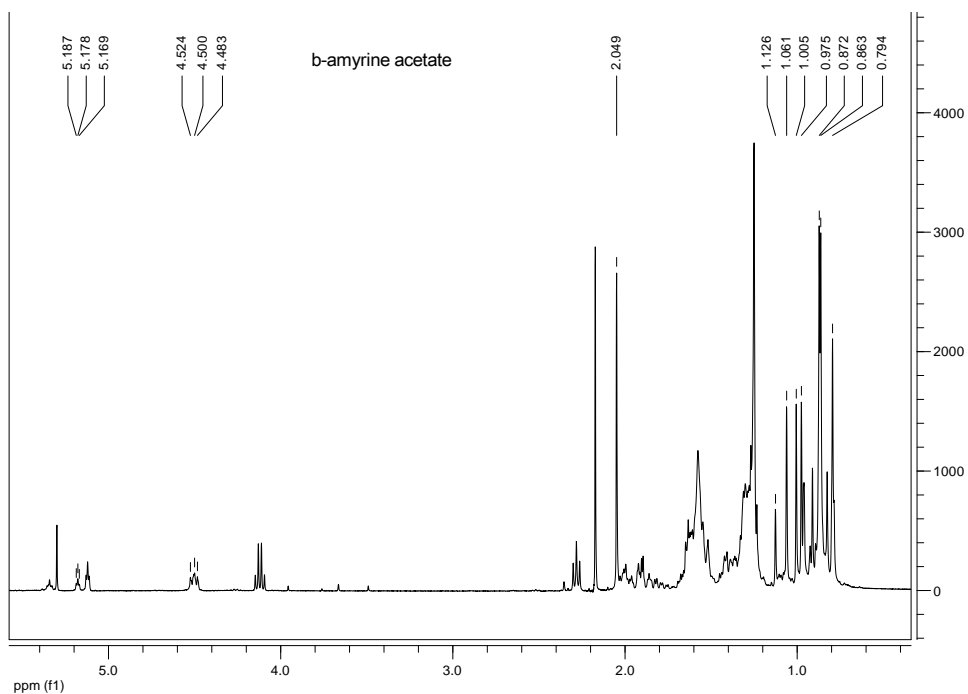
#### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΠΑΛΜΙΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (RT=28,82 min)



**ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ β-ΑΚΕΤΟΞΥ ΑΜΥΡΙΝΗΣ (RT=49,9min)**



**ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR**



Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR για το τριτερπένιο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)
<b>3</b>	4,50 (1H,brdd, J=6,0/9,2)
<b>12</b>	5,18 (1H, t, J=3,3)
<b>23</b>	0,87 (3H, s)
<b>24</b>	0,87 (3H, s)
<b>25</b>	0,97 (3H, s)

<b>26</b>	0,97 (3H, s)
<b>27</b>	1,13 (3H, s)
<b>28</b>	0,79 (3H, s)
<b>29</b>	0,87 (3H, s)
<b>30</b>	0,87 (3H, s)
<b><u>Me</u>C=O</b>	2,05 (1H, s)

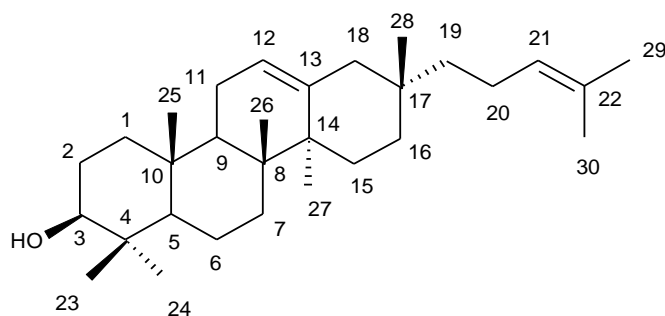
Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και αναζήτηση στην βιβλιογραφία [Ageta&Arai, 1983, Ramadan, 2009] στο κλάσμα E5, στο μόριο με την αναλογία 80%, αποδόθηκε η δομή της **β-ακετοξυ αμυρίνης (15)** η οποία έχει απομονωθεί από πρόπολη Κούβας [Fidalgoetal., 2011] αλλά και από μελιτοφόρα φυτά του Cameroon όπως *Ficuspandurata*[Ramadan, 2009] και *Ficussur*[Feleke&Brehane, 2005][Πίνακας 1].

Η απόδοση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR για τον αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

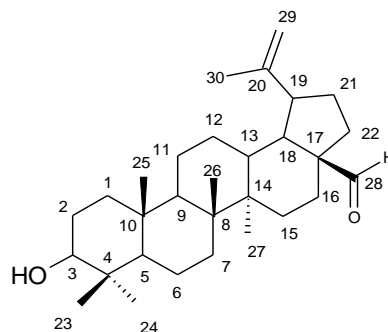
<b>Πρωτόνιο</b>	<b>δ (ppm), Πολλαπλότητα, J(Hz)</b>
<b>2</b>	4,09-4,12 (2H, 2d, J=6,8/7,3)
<b>3</b>	2,28 (2H, t, J=7,2)
<b>6</b>	1,05-1,53 (48H, m)

Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και αναζήτηση στην βιβλιογραφία [Joshietal; Kawsaretal., 2009] στο κλάσμα E5, στο μόριο με την αναλογία 20%, αποδόθηκε η δομή του **αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος (16)** ο οποίος έχει ανιχνευθεί μέσω GC-MS, χωρίς να απομονωθεί, από πρόπολη Αιγύπτου [Abozid&Ahmed, 2013]. Επιπλέον έχει απομονωθεί και από μελιτοφόρα φυτά του Cameroon όπως *Elaisguineensis*[Opute, 1975] και *Solanummacrocarpum* [Sodipoetal., 2010] [Πίνακας 1].

### 2.9.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΠΑΧΑΡΑ-12,21ΔΙΕΝ-3β-ΟΛΗΣ & ΜΠΕΤΟΥΛΙΝ-ΑΛΔΕΥΔΗΣ (ΚΛΑΣΜΑ Ε14)



(17)



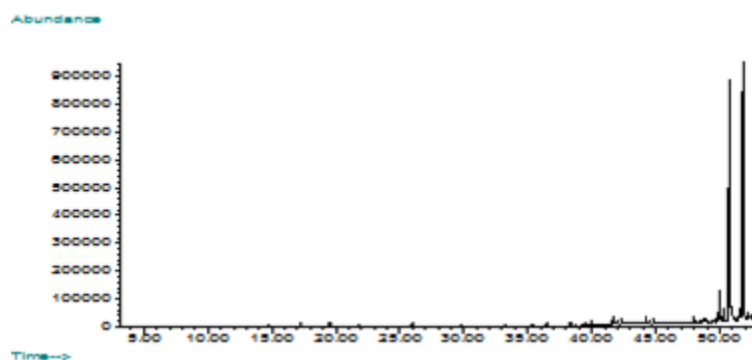
(18)

Στο κλάσμα Ε14 πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :100% από την οποία και απομονώθηκε η ζώνη Β (5,0mg). Στη ζώνη Β πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος GC-MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  και φασμάτων δυο διαστάσεων σε  $\text{CDCl}_3$ . Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

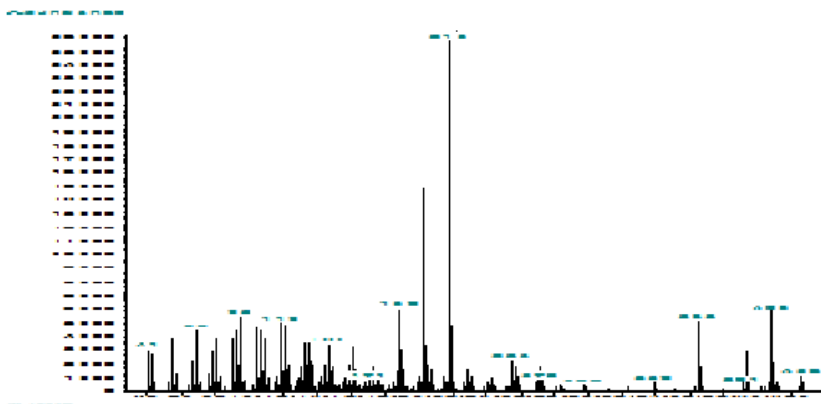
- Στο χρωματογράφημα διαπιστώθηκε η ύπαρξη 2 τριτερπενίων, για τα οποία η βιβλιοθήκη έδινε φάσμα μάζας παρόμοιο με αυτό της **λουπεόλης (3)** με μοριακό ιόν  $426[\text{M}^+]$  και κύρια κορυφή που αντιστοιχεί σε  $m/z=218$  ενώ στο δεύτερο έδινε φάσμα μάζας με μοριακό ιόν  $440[\text{M}^+]$  και κύρια κορυφή που αντιστοιχεί σε  $m/z=55$ . Η αναλογία των 2 αυτών βασικών μορίων βάση του ποσοστού επί τοις εκατό των κορυφών τους ήταν 70% και 30% αντίστοιχα.
- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  εκτός από τα δυο βασικά τριτερπένια διακρίνεται και η παρουσία ενός τρίτου σε πολύ μικρό ποσοστό για το οποίο συγκριτικά με το φάσμα του κλάσματος 3.10(δείγμα 3) αποδόθηκε η δομή της  **$\alpha$ -αμυρίνης (12)**.
- Στο ίδιο φάσμα διακρίνονται 2 ευρείες διπλές κορυφές ενός εξωκυκλικού δεσμού στα 4,56 και 4,68ppm, δυο διευρυμένες κορυφές στα 5,10 και στα 5,18ppm που αντιστοιχούν σε 2 διπλούς δεσμούς καθώς και η ύπαρξη 14 $\text{CH}_3$  εκ των οποίων τα τρία είναι πιο αποθωρακισμένα και συντονίζονται στα 1,60(1 $\text{CH}_3$ ) και 1,68ppm (2 $\text{CH}_3$ ). Επιπλέον διακρίνεται και μια τριπλή κορυφή στα 5,13ppm χαρακτηριστική για την  $\alpha$ -αμυρίνη.
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  εντοπίζονται οι κορυφές του άνθρακα της αλδεΐδης που συντονίζεται στα 206,8ppm, των δυο οξυγονωμένων C που συντονίζονται στα 79ppm και των ανθράκων των διπλών δεσμών που συντονίζονται στα 121,0 και στα 124,4ppm.

- Από το HMQC φαίνεται ότι το πρωτόνιο στα 5,10ppm ανήκει στον C που συντονίζεται 124,4ppm, το πρωτόνιο στα 5,18ppm ανήκει στον C που συντονίζεται 121ppm και τα δυο πρωτόνια που συντονίζονται στα 3,22ppm ανήκουν στους οξυγονωμένους άνθρακες στα 79ppm. Επίσης τα πρωτόνια του εξωκυκλικού δεσμού ανήκουν στον ίδιο άνθρακα που συντονίζεται στα 110ppm.

#### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (E14)

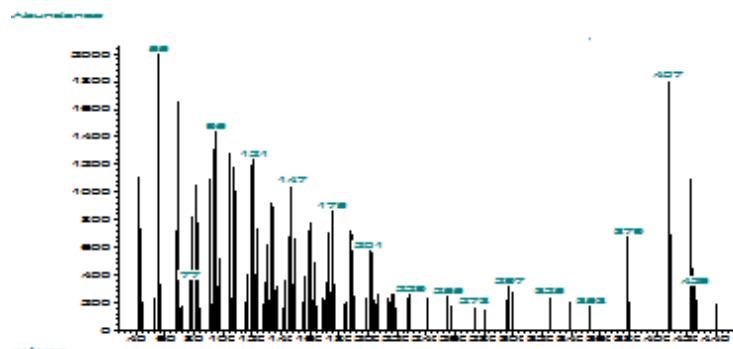


#### ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ 1 (RT=52,27min)



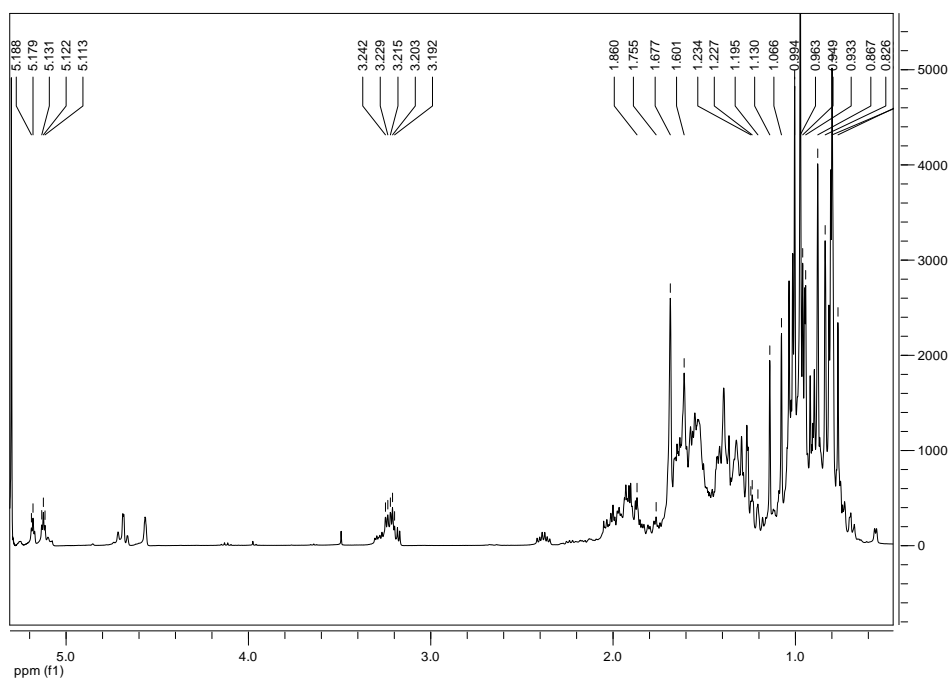
Τα κυριότερα θραύσματα είναι: 426[M<sup>+</sup>], 408, 393, 218(100), 203, 189.

## ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ 2 (RT=52,40min)

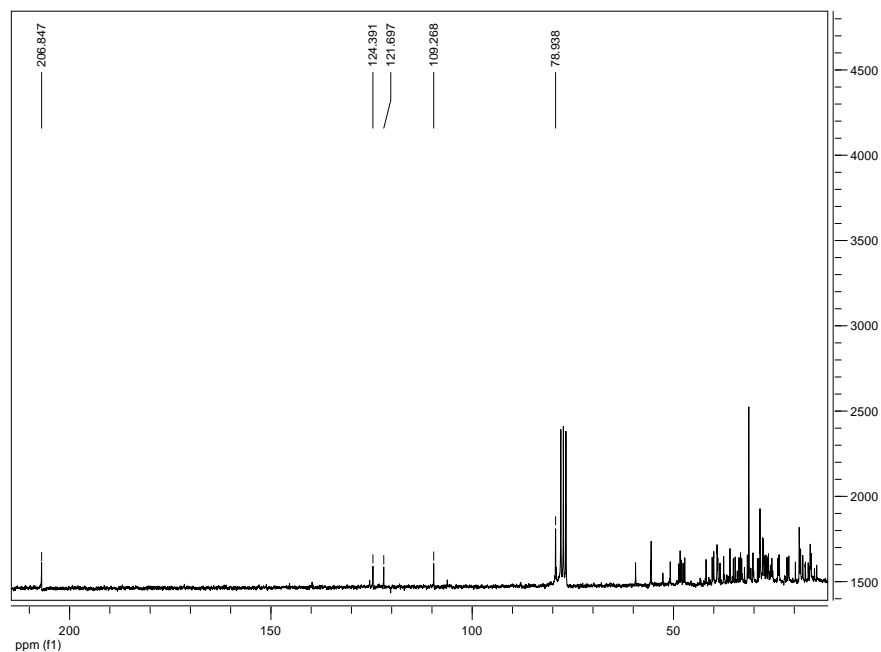


Τα κυριότερα θραύσματα είναι: 440[M<sup>+</sup>], 422, 407, 379, 205, 189, 133, 105, 81, 69, 55(100)

## ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR



## ΦΑΣΜΑ $^{13}\text{C}$ -NMR



Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H}$ -NMR για το τριτερπένιο με αναλογία 70% φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
<b>3</b>	3,22 (1H, brdd, $J=5,4/10,6$ )
<b>12</b>	5,18 (1H, t, m)
<b>21</b>	5,10 (1H, brt, $J=7,2$ )
<b>23</b>	0,96 (3H,s)
<b>24</b>	0,79 (3H,s)
<b>25</b>	0,99 (3H,s)
<b>26</b>	0,99 (3H,s)
<b>27</b>	1,06 (3H,s)
<b>28</b>	0,75 (3H,s)
<b>29</b>	1,68 (3H,s)
<b>30</b>	1,60 (3H,s)

Η απόδοση του φάσματος  $^{13}\text{C-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΆτομοC	$\delta$ (ppm)	ΆτομοC	$\delta$ (ppm)	ΆτομοC	$\delta$ (ppm)
<b>1</b>	38,8	<b>11</b>	23,2	<b>21</b>	124,4
<b>2</b>	27,3	<b>12</b>	121,0	<b>22</b>	141,0
<b>3</b>	79,0	<b>13</b>	140	<b>23</b>	28,1
<b>4</b>	38,8	<b>14</b>	42,9	<b>24</b>	15,7
<b>5</b>	55,3	<b>15</b>	26,5	<b>25</b>	16,0
<b>6</b>	18,3	<b>16</b>	33,3	<b>26</b>	17,4
<b>7</b>	34,2	<b>17</b>	34,2	<b>27</b>	21,8
<b>8</b>	39,5	<b>18</b>	44,6	<b>28</b>	21,4
<b>9</b>	47,9	<b>19</b>	46,7	<b>29</b>	25,4
<b>10</b>	37,1	<b>20</b>	21,9	<b>30</b>	17,4

Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά δεδομένα στο τριτερπένιο με το ποσοστό 70% αποδόθηκε η δομή της **μπαχαρά-12,21διεν-3β-όλης(17)** ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ), μιας τριτερπενικής αλκοόλης, που απομονώνεται **για πρώτη φορά από πρόπολη**. Επιπλέον έχει απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά όπως *Cicerarietinum*, *Vignacylindrical* και *Vignamungo* [Akihisa *et al.*, 1994] που φύονται στο Cameroon [Πίνακας 1].

Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  για το τριτερπένιο με αναλογία 30% φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
<b>3</b>	3,22 (1H, brdd, $J=5,4/10,6$ )
<b>19</b>	2,35 (1H, m)
<b>23</b>	0,86 (3H, s)
<b>24</b>	0,85 (3H, s)
<b>25</b>	1,00 (3H, s)
<b>26</b>	1,02 (3H, s)
<b>27</b>	0,99 (3H, s)
<b>29</b>	4,56-4,68 (2H, brs)
<b>30</b>	1,67 (3H, s)

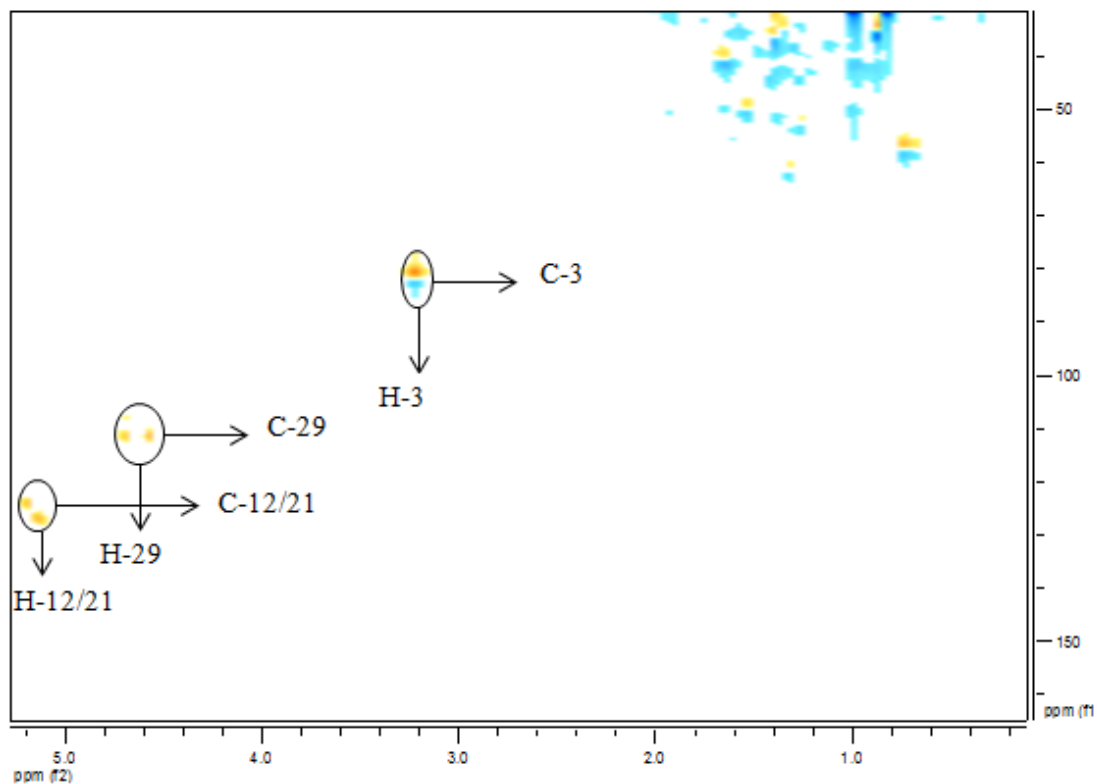
Η πλήρης απόδοση του φάσματος  $^{13}\text{C-NMR}$  δίνεται στον παρακάτω πίνακα:



Ατομο C	$\delta$ (ppm)	Ατομο C	$\delta$ (ppm)	Ατομο C	$\delta$ (ppm)
<b>1</b>	38,7	<b>11</b>	20,7	<b>21</b>	29,8
<b>2</b>	27,3	<b>12</b>	25,5	<b>22</b>	33,2
<b>3</b>	79,0	<b>13</b>	38,7	<b>23</b>	27,9
<b>4</b>	38,8	<b>14</b>	42,5	<b>24</b>	15,4
<b>5</b>	55,5	<b>15</b>	29,2	<b>25</b>	15,9
<b>6</b>	18,2	<b>16</b>	28,8	<b>26</b>	16,1
<b>7</b>	34,2	<b>17</b>	59,3	<b>27</b>	14,2
<b>8</b>	40,8	<b>18</b>	48,0	<b>28</b>	206,8
<b>9</b>	50,4	<b>19</b>	47,5	<b>29</b>	110,0
<b>10</b>	37,1	<b>20</b>	149,8	<b>30</b>	19,0

Για το τριτερπένιο με την αναλογία 30% η ταυτοποίηση έγινε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και αναζήτηση στη βιβλιογραφία [Melnikova*etal.*, 2012] όπου διαπιστώθηκε ότι το φάσμα μάζας 2 ανήκει στη **μπετουλιν-αλδεΐδη (18)**(C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>) και απομονώνεται για **πρώτη φορά από πρόπολη**. Η δομή της μπετουλιν-αλδεΐδης επαληθεύτηκε από το φάσμα του <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR συγκρινόμενο με τη βιβλιογραφία [Mahato&Kundu, 1994; Pohjaia*etal.*, 2009; Melnikova*etal.*, 2012]. Επιπλέον έχει απομονωθεί από το μελιτοφόρο φυτό *Tectonagrandis* που φύεται στο Cameroon [Pathaka*etal.*, 1988][Πίνακας 1].

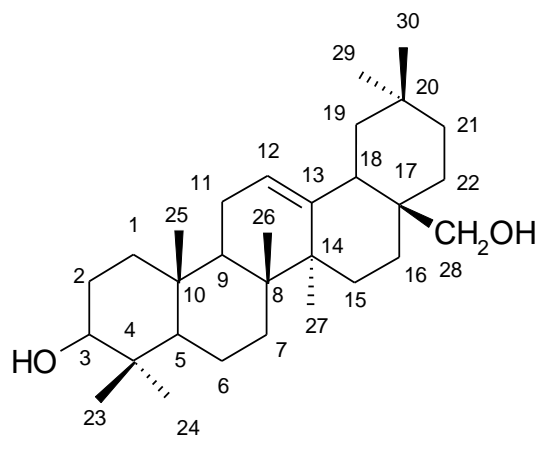
## ΦΑΣΜΑ ΗΜQC



Οι βασικότερες συσχετίσεις του ΗΜQC φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Άτομο C $\delta$ (ppm)	Άτομο H $\delta$ (ppm)	Άτομο C $\delta$ (ppm)	Άτομο H $\delta$ (ppm)
<b>Μπαχαρα-12,21διεν-3β-όλη</b>		<b>Μπετουλιν-αλδεΐδη</b>	
<b>3</b> (79,0)	3,22	<b>29</b> (110,0)	4,56/4,68
<b>12</b> (121,0)	5,18		
<b>21</b> (124,4)	5,10		

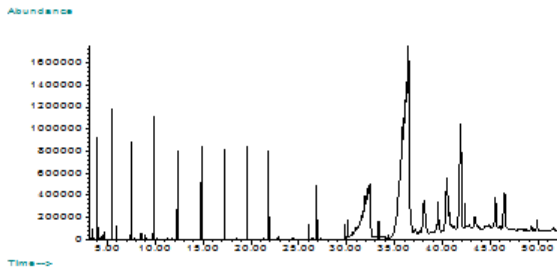
### 2.9.2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΡΥΘΡΟΔΙΟΛΗΣ(ΚΛΑΣΜΑ Α4)



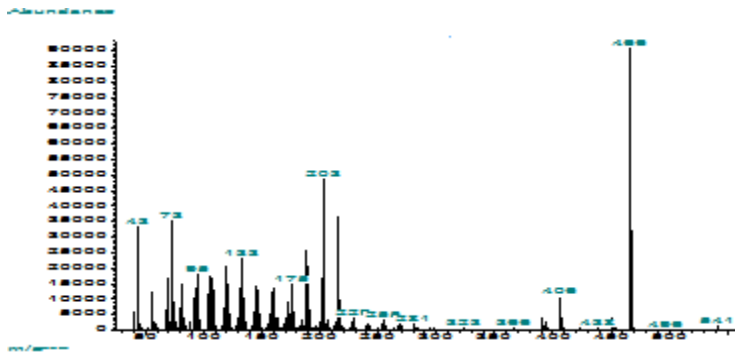
Για το κλάσμα Α4 έγινε σιλυλίωση, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4.1 και μελετη με GC-MS . Κατόπιν πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Me: 98/2 και απομονώθηκε η ζώνη D βάρους 2,5mg στην οποία λήφθηκε φάσμα <sup>1</sup>H-NMR σε CDCl<sub>3</sub>. Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο χρωματογράφημα διαπιστώθηκε η ύπαρξη μιας τριτερπενικής αλκοόλης κατηγορίας β-αμυρίνης για την οποία η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε την ερυθροδιόλη (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>) με μοριακό βάρος 442, ψευδομοριακό ιόν 541, και κυριότερα θραύσματα: 541[M<sup>+</sup>], 466(100), 216, 203, 188, 175.
- Το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR έδωσε δομή που αντιστοιχούσε σε τριτερπενική αλκοόλη κατηγορίας β-αμυρίνης. Στην περιοχή 3,2 έως 3,5ppm οι δυο διπλές κορυφές είναι χαρακτηριστικές της υδροξυμεθυλ-ομάδας αυτής της δομής.
- Στο ίδιο φάσμα διακρίνονται ένα πρωτόνιο διπλού δεσμού που δίνει μια χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στα 5,19ppm, ένα πρωτόνιο που συντονίζεται στα 3,21ppm δίνοντας μια χαρακτηριστική dd και ανήκει σε οξυγονωμένο άνθρακα και 7 μεθύλια που συντονίζονται στην περιοχή (0,93-1,16ppm).

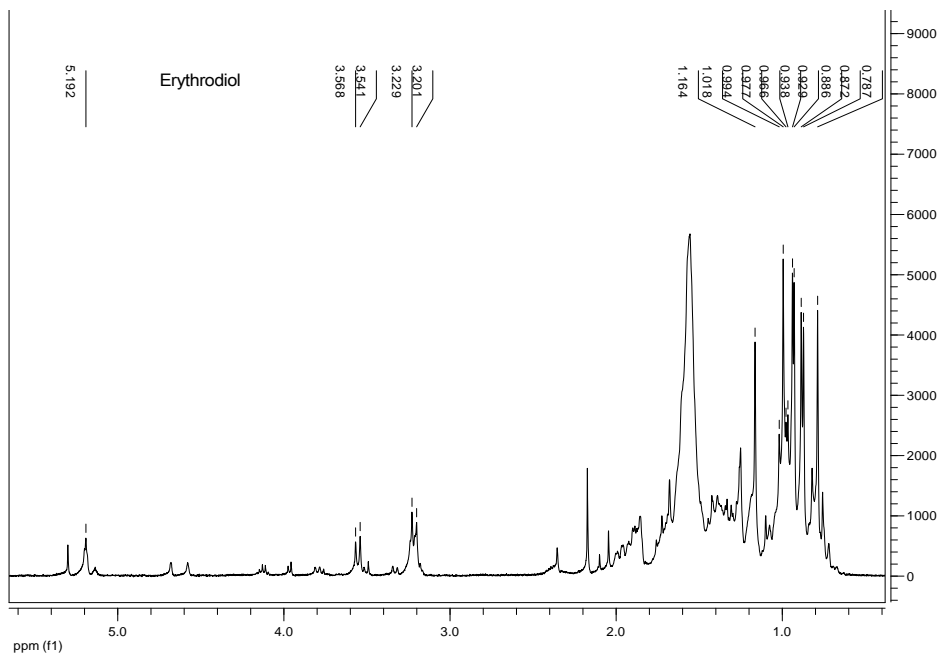
## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ (A4)



## ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΕΡΥΘΡΟΛΙΟΛΗΣ (RT=46,20min)



## ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$

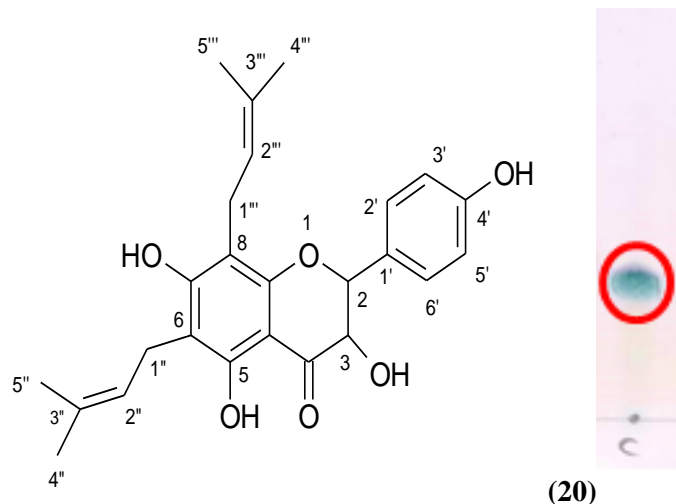


Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm) Σταθερά σύζευξης $J$ (Hz)
<b>3</b>	3,21 (1H, dd, $J=4,4/10,8$ )
<b>12</b>	5,19 (1H, t, $J=3,3$ )
<b>23</b>	0,93 (3H, s)
<b>24</b>	0,78 (3H, s)
<b>25</b>	0,87 (3H, s)
<b>26</b>	0,88 (3H, s)
<b>27</b>	0,99 (3H, s)
<b>28<math>\alpha</math></b>	3,22 (1H, d, $J=10,8$ )
<b>28<math>\beta</math></b>	3,54 (1H, d, $J=10,8$ )
<b>29</b>	0,94 (3H, s)
<b>30</b>	1,16 (3H, s)

Με βάση τα φασματοσκοπικά και βιβλιογραφικά δεδομένα [Aktaretal., 2009] στο κλάσμα A4 αποδόθηκε η δομή της **ερυθροδιόλης** ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ), που απομονώνεται για **πρώτη φορά από πρόπολη**. Η ερυθροδιόλη έχει απομονωθεί από το φυτικό είδος *Ixoraarborea*Roxb που φύεται στην Ταϊλάνδη. [Aktaretal., 2009], ενώ δεν έχει καταγραφεί φυτική πηγή αυτού του δευτερογενούς μεταβολίτη στην Αφρική.

#### 2.9.2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 6,8 ΔΙΠΡΕΝΥΛ-ΑΡΟΜΑΔΕΝΑΡΙΝΗΣ (ΚΛΑΣΜΑΑ7)

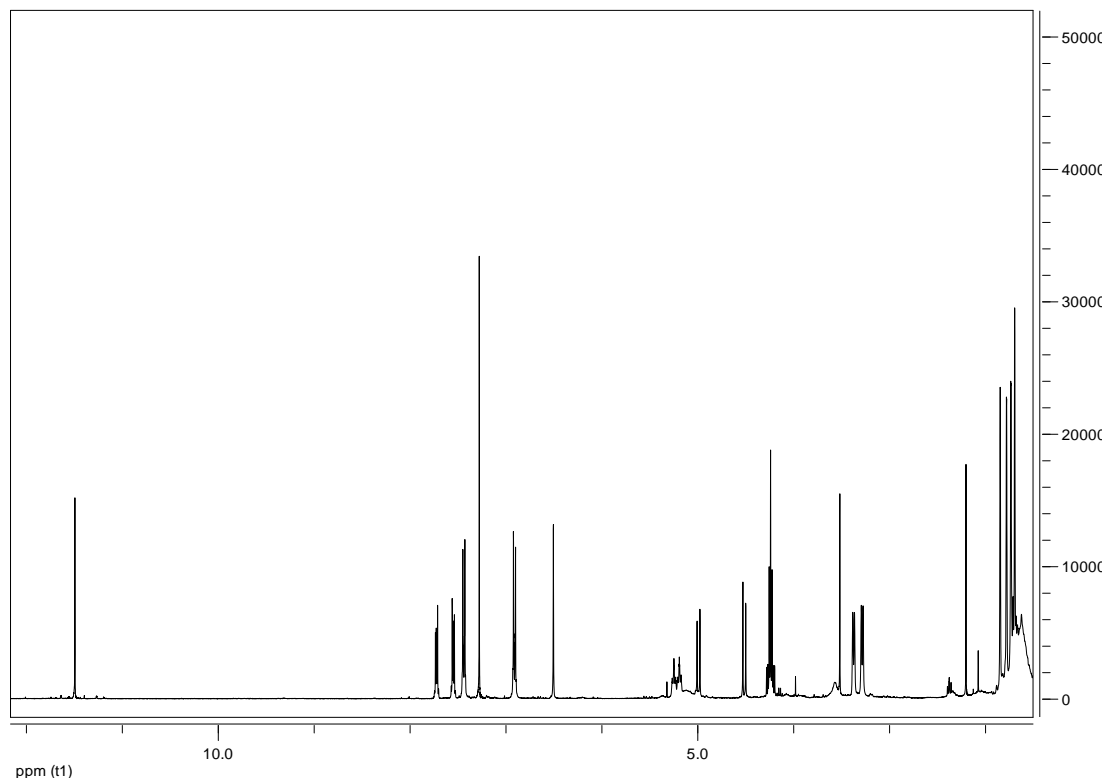


Στο κλάσμα A7 έγινε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 98/2 από την οποία και απομονώθηκε η καθαρή ουσία C βάρους 3,3mg στην οποία λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  και φάσματα δυο διαστάσεων.

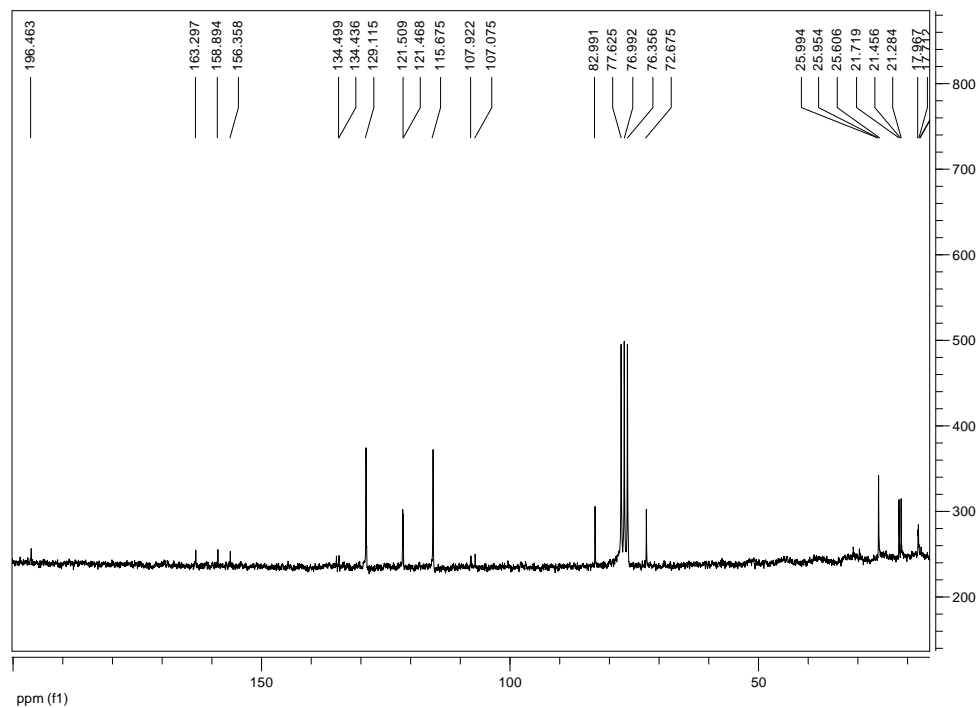
Οι κυριότερες παρατηρήσεις που διατυπώθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  διακρίνονται δυο διπλές κορυφές στα 7,39ppm και στα 6,87ppm με  $J=8\text{Hz}$ , που χαρακτηρίζουν ένα πάρα-υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.
- Στο ίδιο φάσμα οι δυο διπλές κορυφές στα 3,25 και 3,36ppm καθώς και οι δύο τριπλές στα 5,18 και 5,23ppm επιβεβαιώνουν την ύπαρξη δυο πρενυλ-ομάδων όπως έχουμε παρατηρήσει και σε προηγούμενες δομές, ενώ στο ίδιο φάσμα διακρίνεται και η παρουσία ενός OH στα 11,5ppm το οποίο φαίνεται λόγω δεσμού υδρογόνου με καρβονύλιο καθώς και ενός ακόμη OH στα 6,51ppm.
- Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  παρατηρήθηκαν οι αναμενόμενες κορυφές των δυο διπλών δεσμών των ανθράκων (121,4/121,5ppm) καθώς και αυτές των αρωματικών δακτυλίων (107,0-160,0ppm)
- Στο φάσμα COSY οι κυριότερες συσχετίσεις που προέκυψαν είναι μεταξύ των πρωτονίων των αρωματικών δακτυλίων (7,39-6,87) και μεταξύ των πρωτονίων στα 5,0ppm (οξυμεθίνιο) και στα 4,5ppm (μεθίνιο δίπλα σε καρβονύλιο) που δείχνουν δομή διυδροφλαβανόλης. Στο ίδιο φάσμα διακρίνεται και οι συσχετίσεις μεταξύ των μεθυλίων στα 1,66-1,82ppm με τα H στα 3,25 και 3,36ppm των δυο πρενυλ-ομάδων.

## ΦΑΣΜΑ <sup>1</sup>H-NMR



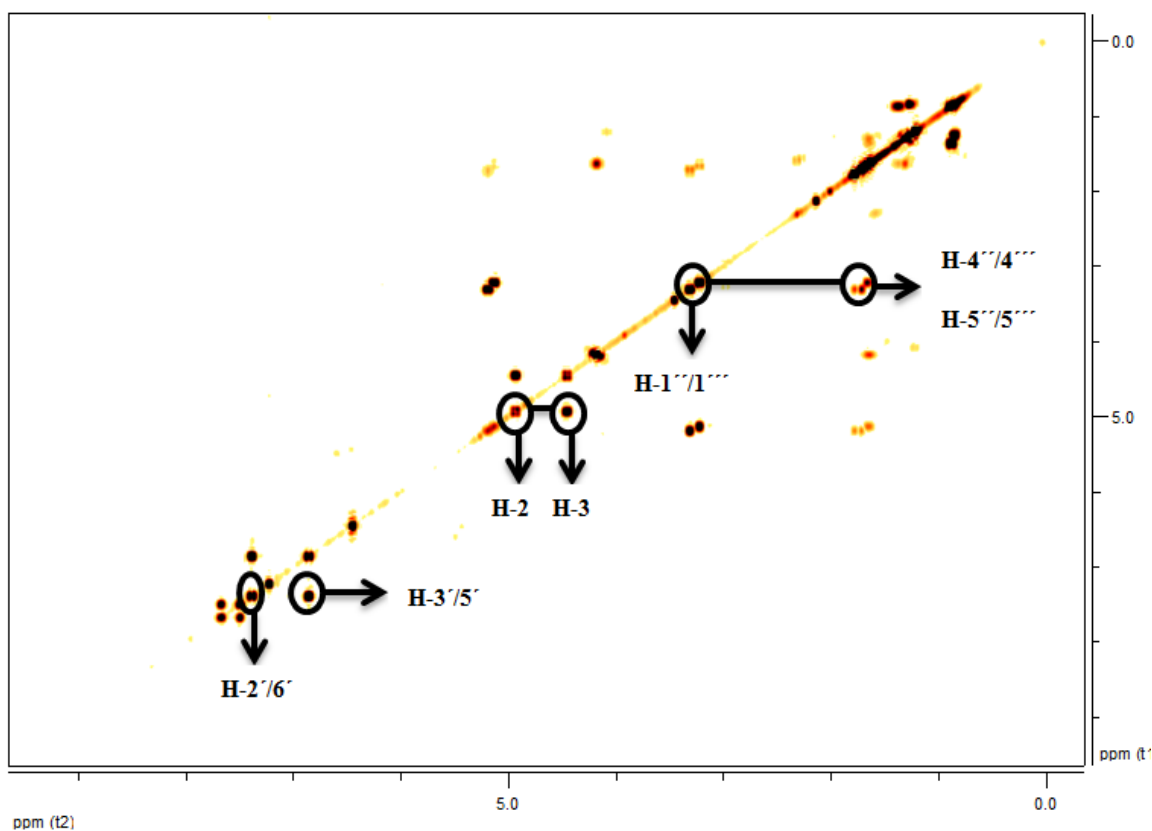
## ΦΑΣΜΑ <sup>13</sup>C-NMR



Η απόδοση των κορυφών των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Θέση	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J(\text{Hz})$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	Θέση	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J(\text{Hz})$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
2	5,00 (d, $J=12,0$ )	84,0	5'	6,87 (d, $J=8,0$ )	115,5
3	4,50 (d, $J=12,0$ )	73,0	6'	7,39 (d, $J=8,0$ )	129,0
4	-	196,4	1''	3,36 (d, $J=6,5$ )	21,3
5	-	158,8	1'''	3,25(d, $J=6,5$ )	21,8
6	-	108,0	2''	5,23 (t, $J=6,8$ )	121,5
7	-	164,0	2'''	5,18 (t, $J=6,8$ )	121,4
8	-	107,0	3''	-	134,5
1'	-	129,0	3'''	-	134,4
2'	7,39 (d, $J=8,0$ )	129,0	4''/4''' 5''/5'''	1,66-1,82 (s)	17,9 25,9
3'	6,87 (d, $J=8,0$ )	115,5	OH-5	11,5 (s)	-
4'	-	156,4	OH-7	6,51 (s)	-

### ΦΑΣΜΑ COSY

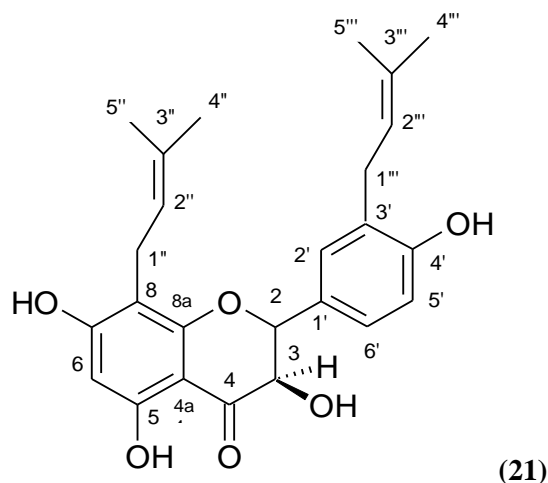


Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και περαιτέρω αναζήτηση σε βιβλιογραφία [Meragelman, 2001] στη ζώνη C του κλάσματος A7 αποδόθηκε η δομή της **6,8-διπρενυλ-αρομαδενδρίνης** ( $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$ ) μιας



διυδροφλαβανόλης, που απομονώνεται για πρώτη φορά από πρόπολη, ενώ έχει απομονωθεί από μελιτοφόρα φυτά που φύονται στο Cameroon όπως *Monotesafricanus* και *Morus mesozygia* [Karche et al., 2011], [Πίνακας 1].

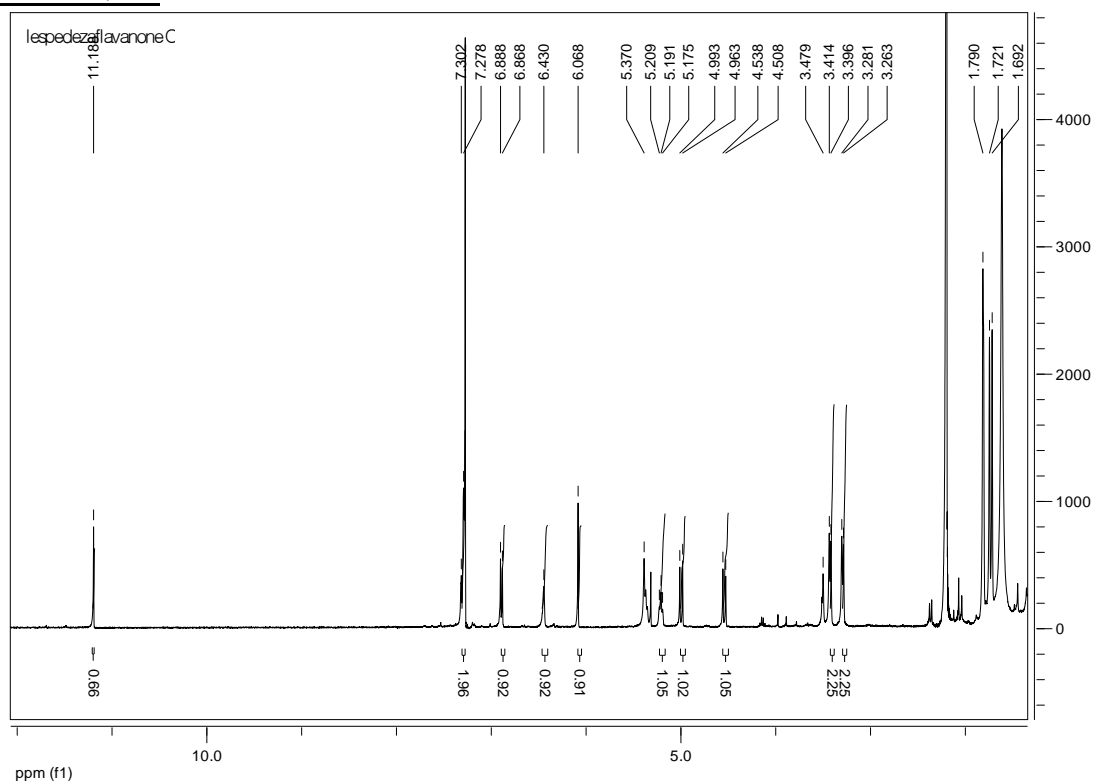
### 2.9.2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΣΠΕΝΤΕΖΑΦΛΑΒΑΝΟΝΗΣ C (ΚΛΑΣΜΑ Α10)



Στο κλάσμα Α10 έγινε παρασκευαστική χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}:98/2$  από την οποία και απομονώθηκε η καθαρή ουσία Α βάρους 3,3mg στην οποία λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ .

- Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  διακρίνονται μια κορυφή διπλή-διπλών στα 7,30ppm με  $J=8,8\text{Hz}$ , μια διπλή στα 6,88ppm με  $J=8,47\text{Hz}$  και μια απλή κορυφή στα 7,28ppm που συνιστούν την ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου.
- Χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος είναι οι δυο τριπλές κορυφές που δείχνουν την ύπαρξη δυο πρενύλ-ομάδων στα 5,19 και 5,35ppm με  $J=6,5/13\text{Hz}$  και οι δυο διπλές κορυφές στα 3,30 και 3,40ppm με  $J=6,80\text{Hz}$ .
- Επιπλέον σημαντικές είναι και οι διπλές κορυφές των πρωτονίων στα 4,96ppm και 4,50ppm με  $J=12,9\text{Hz}$  και η κορυφή στα 11,18ppm που αντιστοιχεί σε OH χαρακτηριστικό της θέσης 5 της φλαβανόλης, το οποίο διακρίνεται λόγω του δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο.

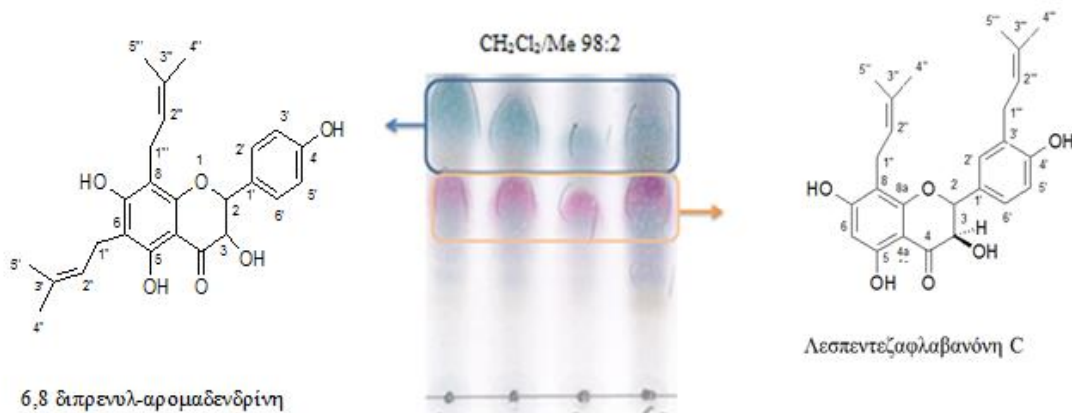
## ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$



Η απόδοση των κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm), Πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
<b>2</b>	4,96 (1H, d, $J=12,90$ )
<b>3</b>	4,50 (1H, d, $J=12,90$ )
<b>6</b>	6,06 (1H, s)
<b>2'</b>	7,28 (1H, s)
<b>6'</b>	7,30 (1H, dd, $J=8,8/2,8$ )
<b>5'</b>	6,88 (1H, d, $J=8,47$ )
<b>1''/1'''</b>	3,28-3,39 (4H, d, $J=6,8$ )
<b>2''/2'''</b>	5,19-5,35 (2H, t, $J=13,0/6,5$ )
<b>4''/4'''/5''/5'''</b>	1,69/1,72/1,79(12H, s)
<b>OH-5</b>	11,18 (1H, s)
<b>OH-7</b>	6,43(1H, s)

Με βάση τα ανωτέρω φασματοσκοπικά δεδομένα και περαιτέρω αναζήτηση σε βιβλιογραφία [Li&Wang, 1989] στο κλάσμα A10A αποδόθηκε η δομή της **λεσπεντεξαφλαβονόνης C** (8,3'διμεθυλ-αλλυλ-5,7,4'τριυδροξύ φλαβανόλη) (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>), μιας διπρενυλ-φλαβανόλης που **απομονώνεται από πρόπολη για πρώτη φορά**, ενώ έχει απομονωθεί προηγουμένως από το φυτό *Lespedeza davidii*, που φύεται στη Ν. Κίνα. Από μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, δεν έχει καταγραφεί φυτική πηγή αυτού του δευτερογενούς μεταβολίτη στην Αφρικανική ήπειρο.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Πρόπολη Congo(δείγμα 1)

Μελετήθηκε ένα δείγμα πρόπολης προέλευσης της χώρας του Congo, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφίαγια **πρώτη φορά**, από το οποίο απομονώθηκαν τρία τριτερπένια: λουπενόνη (**1**), β-αμυρίνη (**2**), λουπεόλη (**3**) και δυο διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή: λογχοκαρπόλη A (**4**) και 6,8-διπρενυλ-εριοδικτυόλη (**5**). Τα τριτερπένια αυτά έχουν απομονωθεί προηγουμένως από πρόπολη Βραζιλίας [Furukawa *et al.*, 2002; Trusheva *et al.*, 2004; 2006], Κούβας [Marquez & Cuesta-Rubio, 2010], Αιγύπτου [Hegazi *et al.*, 2007] και Cameroon [Talla *et al.*, 2013]. Τα δυο διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή (**4**) και (**5**) απομονώνονται και αναφέρονται για **πρώτη φορά σε πρόπολη διεθνώς**.

### Πρόπολη Cameroon (δείγματα 2,3 & 4)

Με βάση τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι και σήμερα η πρόπολη του Cameroon έχει μελετηθεί δύο φορές προηγουμένως [Talla *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014], όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας.

Στη μελέτη μας αυτή τριών δειγμάτων πρόπολης από τη χώρα του Cameroon απομονώθηκαν συνολικά 13 τριτερπένια: λουπενόνη (**1**), β-αμυρίνη (**2**), ψ-οξική ταραξαστερόλη (**6**), οξική ταραξαστερόλη (**7**), 3-Ο-ακετυλο-λουπεόλη (**8**), λανοστερόλη (**9**), 3α-υδροξυ-ολεαν-12εν-30-όλη (**10**), α-αμυρόνη (**11**), α-αμυρίνη (**12**), β-ακετοξυ-αμυρίνη (**15**), μπετουλιν-αλδεϋδη (**17**), μπαχαρα-12,21-διεν-3β-όλη (**18**), ερυθροδιόλη (**19**), 2 μονοτερπενικές αλκοόλες: α-τερπινεόλη (**13**), 1,8-τερπινεόλη (**14**). Επίσης 4 διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή: λογχοκαρπόλη A (**4**), 6,8-διπρενυλ-εριοδικτυόλη (**5**), 6,8-διπρενυλ-αρομαδενρίνη (**20**), λεσπεντεζαφλαβανόνη C (**21**), και ένας εστέρας λιπαρού οξέος: αιθυλεστέρας παλμιτικού οξέος (**16**). Σύμφωνα με τις παραπάνω δυο μελέτες που αναφέρθηκαν, τα συστατικά **2, 4-8, 10-12, 14-21 απομονώνονται και αναφέρονται** για πρώτη φορά σε πρόπολη του Cameroon [Talla *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014] ενώ τα συστατικά **4-7, 10, 14** και **17-21** αναφέρονται για **πρώτη φορά σε πρόπολη διεθνώς**.

Από τη χημική ανάλυση των τεσσάρων δειγμάτων απομονώθηκαν συνολικά 21 ενώσεις, 14 τριτερπένια, 2 μονοτερπενικές αλκοόλες, ένας εστέρας λιπαρού οξέος και 4 διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή. Από αυτές οι 11 απομονώνονται για **πρώτη φορά σε πρόπολη διεθνώς** και εμφανίζονται στον Πίνακα 2 με έντονο χαρακτήρα.

Τέλος επισημαίνεται ότι η έντονη παρουσία των τριτερπενίων σε όλα τα δείγματα και ιδιαίτερα των παραγώγων αμυρίνης και λουπεόλης συμφωνεί με τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για

την Αφρικανική πρόπολη και έχουν αναλυθεί στην εισαγωγή της παρούσας μελέτης [Hegazi*et al.*, 2007;Talla*et al.*, 2013;Rushdi*et al.*;Zhangetal., 2014].Επίσης η έντονη παρουσία των διπρενυλιωμένων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από τα δείγματα **1** και **4** ενδέχεται να συσχετίζεται με τα αντίστοιχα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή (ισοφλαβονοειδή σε αυτή τη μελέτη) που έχουν αναφερθεί πρόσφατα στη χημική ταξινόμηση που δημοσιεύθηκε σε Αφρικανική πρόπολη προέλευσης Μαλάουι και Ν. Νιγηρίας [Zhangetal., 2014].

ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2	ΔΕΙΓΜΑ 3	ΔΕΙΓΜΑ 4
<b>1</b>	λουπενόνη	+	+	
<b>2</b>	β-αμυρίνη	+	+	+
<b>3</b>	λουπεόλη	+		
<b>4</b>	<b>λογχοκαρπόλη Α</b>	+		+
<b>5</b>	<b>6,8-διπρενυλ-εριοδικτυόλη</b>	+		
<b>6</b>	<b>ψ-οξική ταραξαστερόλη</b>		+	
<b>7</b>	<b>οξική ταραξαστερόλη</b>		+	
<b>8</b>	3-Ο-ακετυλο-λουπεόλη		+	
<b>9</b>	λανοστερόλη		+	
<b>10</b>	<b>3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη</b>		+	+
<b>11</b>	α-αμυρόνη		+	+
<b>12</b>	α-αμυρίνη		+	+
<b>13</b>	α-τερπινεόλη		+	
<b>14</b>	<b>1,8τερπινεόλη</b>		+	
<b>15</b>	β-ακετοξυ-αμυρίνη		+	+
<b>16</b>	αιθυλεστέρας παλμιτικού οξέος			+
<b>17</b>	<b>μπαχαρά-12,21διεν-3β-όλη</b>			+
<b>18</b>	<b>μπετουλιν-αλδεΰδη</b>			+
<b>19</b>	<b>ερυθροδιόλη</b>			+
<b>20</b>	<b>6,8-διπρενυλ-αρομαδενδρίνη</b>			+
<b>21</b>	<b>λεσπεντεζαφλαβανόνη C</b>			+

Πίνακας 2. Συνολικά ταυτοποιημένες ενώσεις από τα τέσσερα εκγυλίσματα πρόπολης

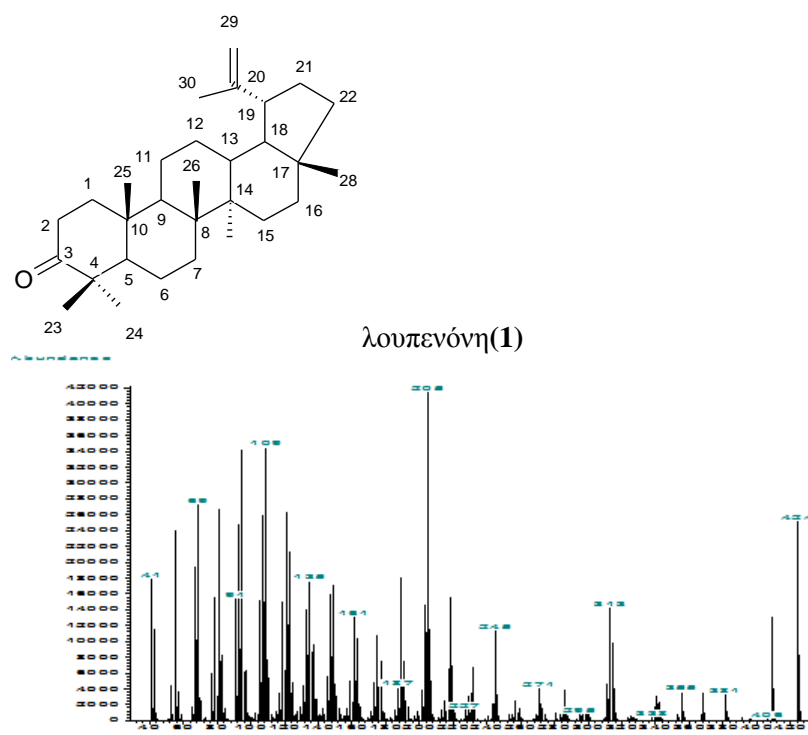
## 2.10 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ & ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΠΟΛΗΣ

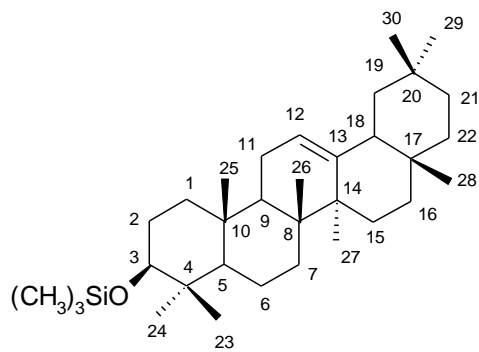
Για τις 21 απομονωμένες ενώσεις που αναφέρθηκαν έγινε μελέτη με αέρια χρωματογραφία με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα Ι ποσότητας 1μl και 1μl-μίγματος κανονικών υδρογονάνθρακων (C<sub>8</sub>-C<sub>36</sub>) ώστε να βρεθεί ο δείκτης (RI) για την κάθε ουσία. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε με το ίδιο πρόγραμμα κατόπιν σιλυλίωσης για τις καθαρές ενώσεις και για τα εκχυλίσματα των τεσσάρων δειγμάτων και έγινε συγκριτική μελέτη. Από τη διαδικασία αυτή βρέθηκαν οι δείκτες (RI) για τα 14 τριτερπένια και για τις δυο μονοτερπενικές αλκοόλες αλλά δεν υπήρξε ικανοποιητικό αποτέλεσμα για τα τέσσερα διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή. Αυτό πιθανότερα οφείλεται στο γεγονός ότι είναι θερμικά ασταθείς ενώσεις στις συνθήκες του GC-MS.

Οι τιμές του δείκτη RI των καθαρών τριτερπενίων και των μονοτερπενικών αλκοολών αποτέλεσαν χρήσιμο εργαλείο για την προσδιορισμό τους στα ολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων δειγμάτων πρόπολης που μελετήθηκαν με GC-MS και περιγράφονται παρακάτω.

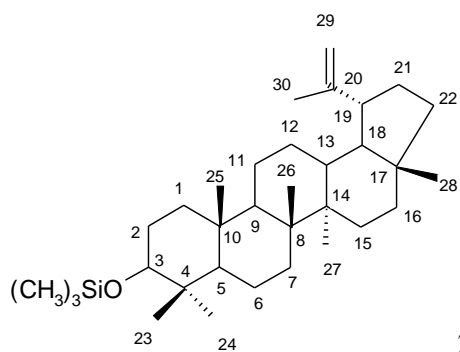
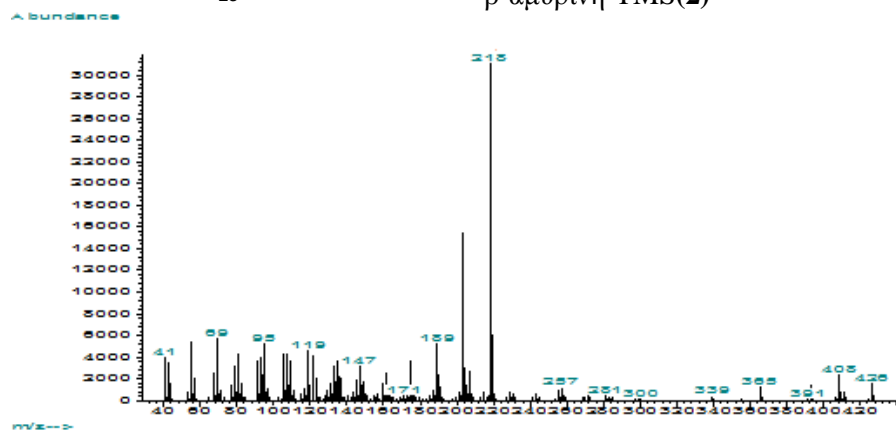
### 2.10.1 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ

Ακολουθούν τα φάσματα μάζας των 14 σιλυλιωμένων καθαρών τριτερπενίων και ο πίνακας με τους δείκτες RI:

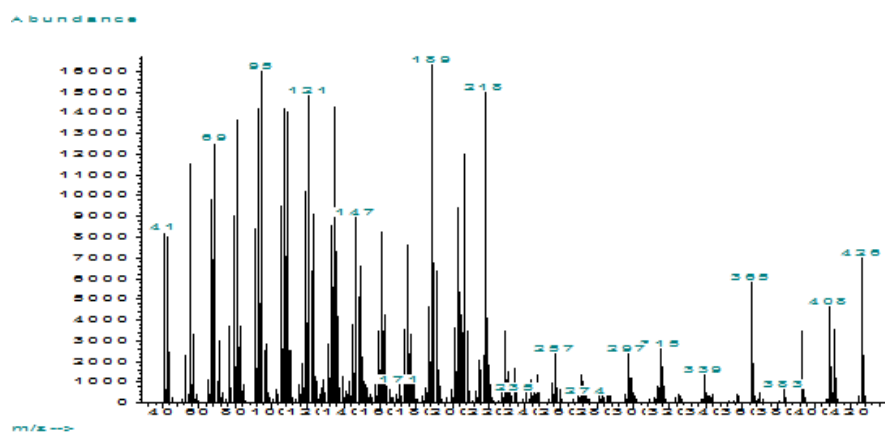


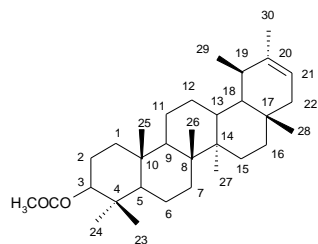


$\beta$ -αμυρίνη-TMS(2)

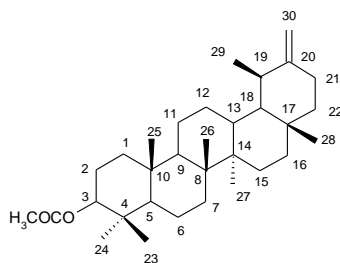


λουπεόλη-TMS(3)



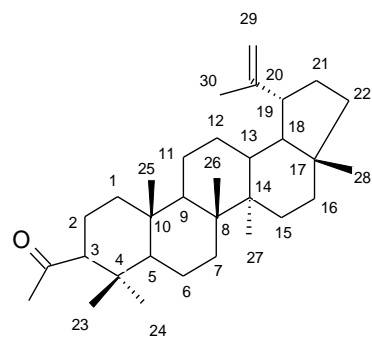
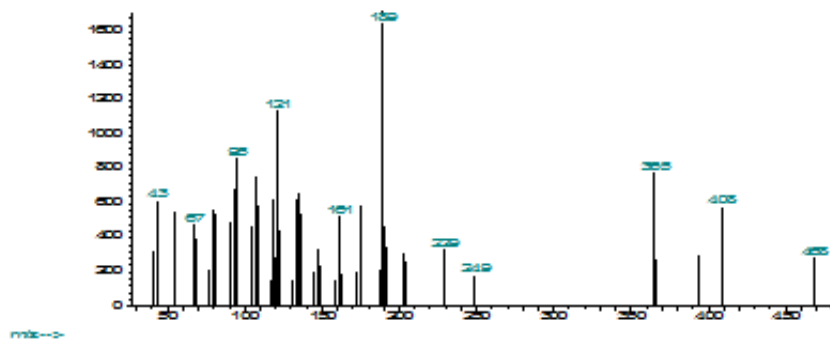


ψ-οξική ταραξαστερόλη (6)



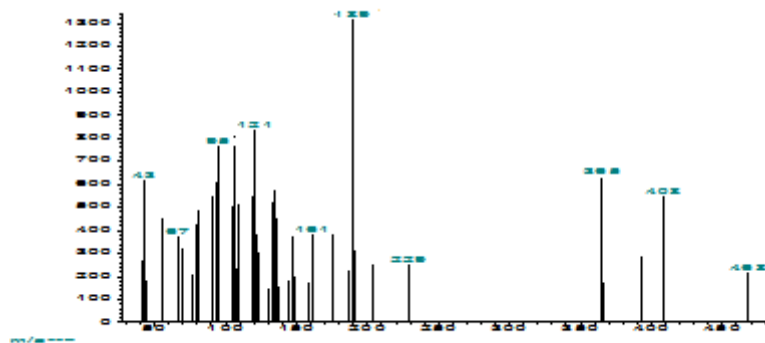
οξική ταραξαστερόλη (7)

Abundance

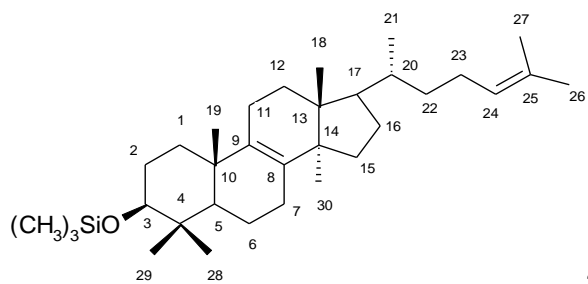


3-O-ακετυλο-λουπεόλη (8)

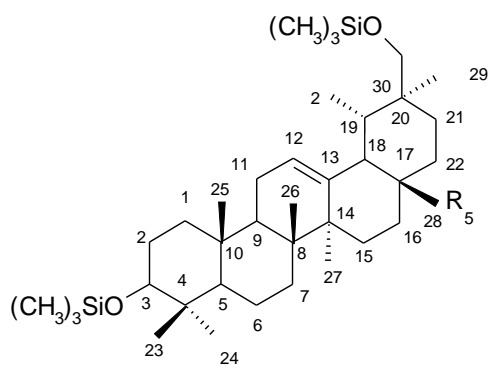
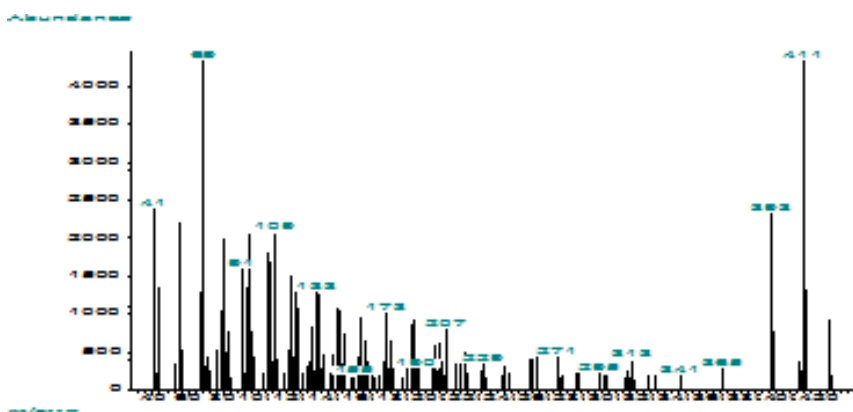
Abundance



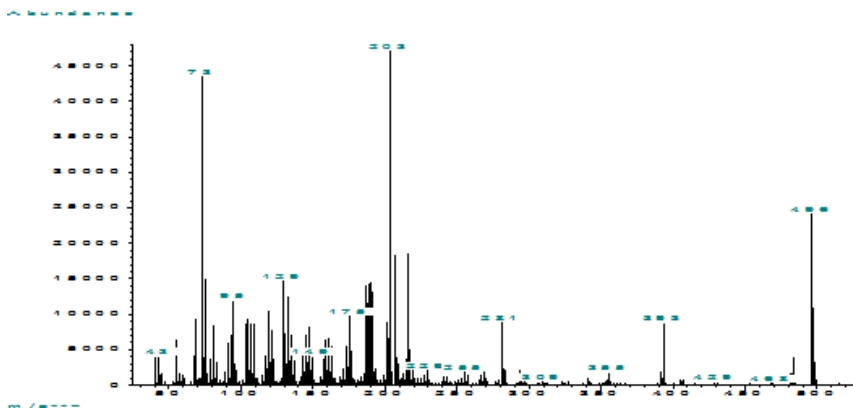


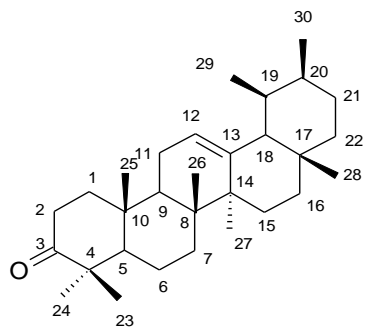


λανοστερόλη-TMS(9)

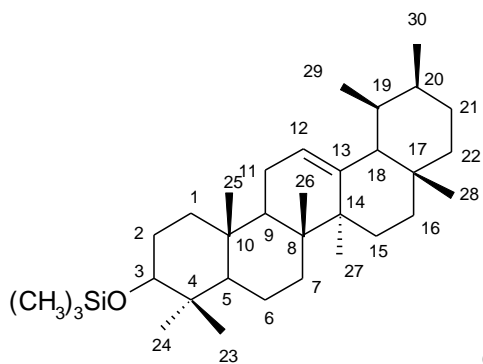
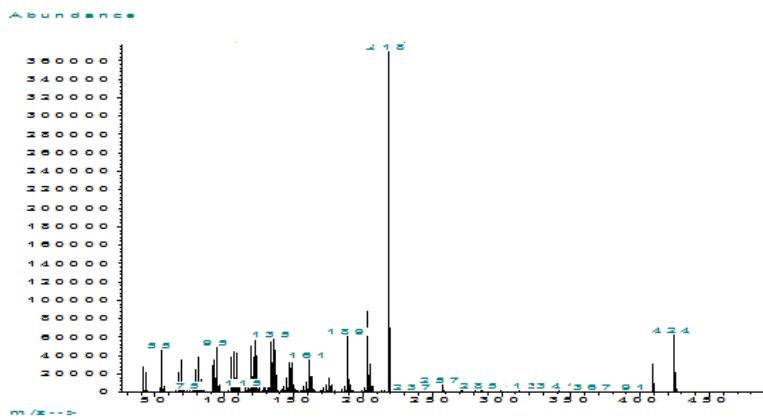


3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη-TMS(10)

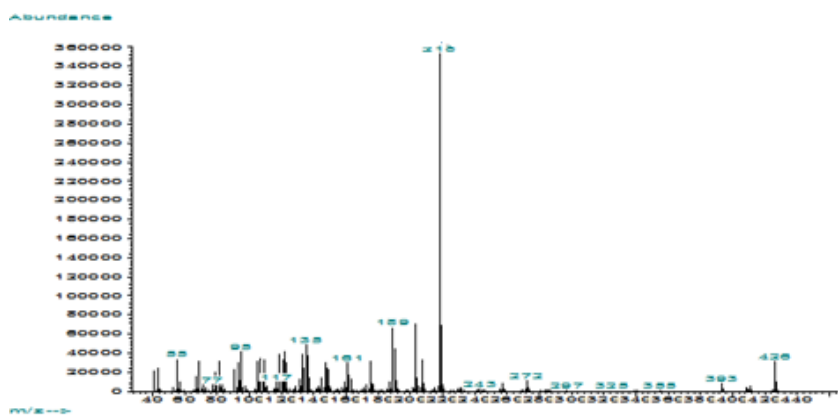


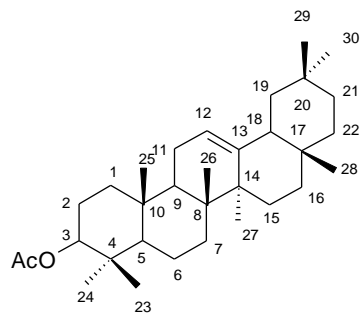


α-αμυρόνη (11)

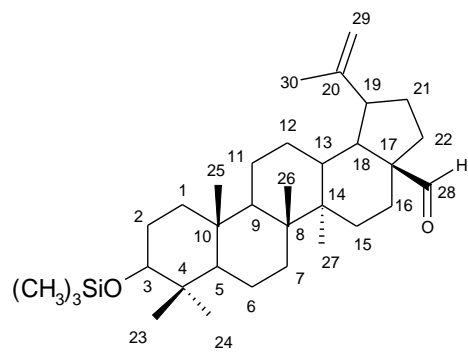
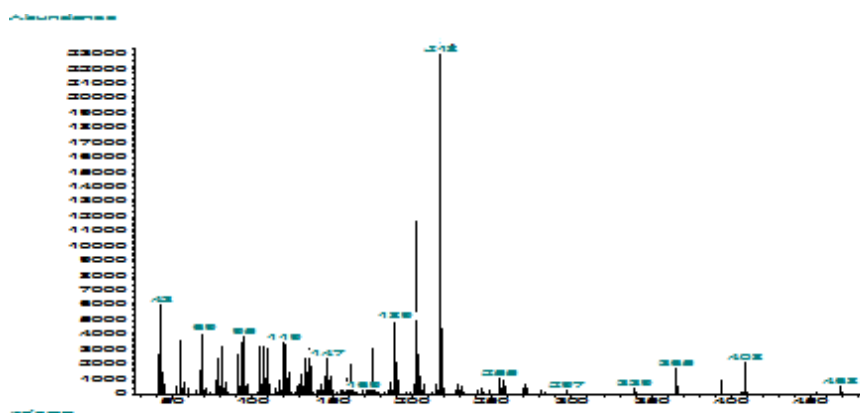


α-αμυρόνη-TMS (12)

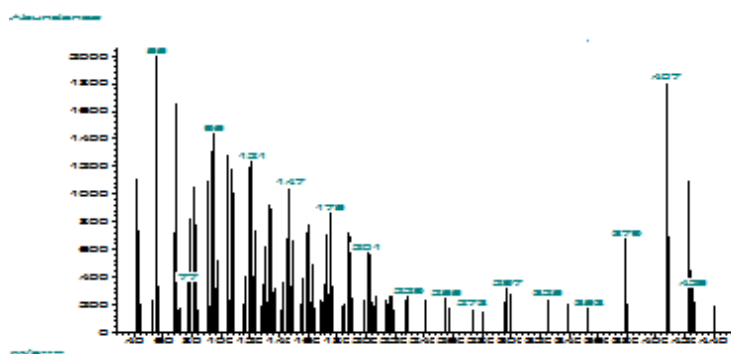


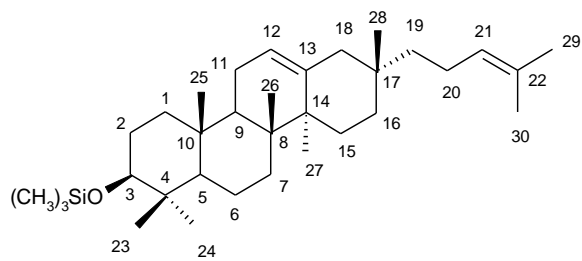


β-ακετοξυ-αμυρίνη (15)

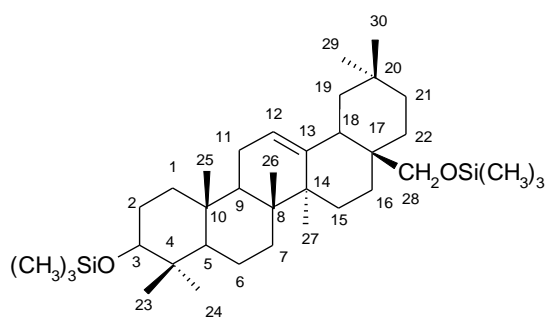
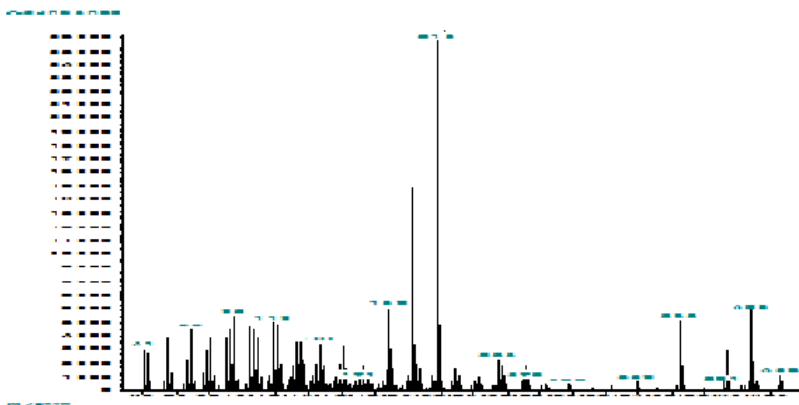


μπετουλιν-αλδεϋδη-TMS (17)

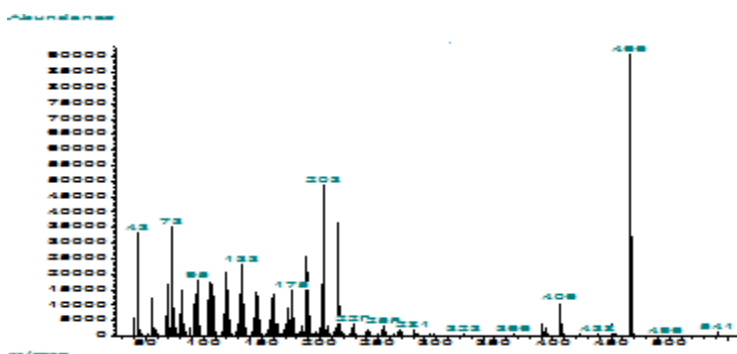




μπαχαρεν12,21διεν-3β-όλη(**18**)



ερυθροδιόλη-TMS(**19**)



Ουσίες	RT	RI Μη Συλλιωμένων	RT	RI Συλλιωμένων
ερυθροδιόλη	48,30	3395	46,20	3255
λανοστερόλη	49,05	3445	47,04	3311
ψ-οξική ταραξαστερόλη	47,35	3332	47,35	3332
οξική ταραξαστερόλη	47,37	3333	47,37	3333
3-ο-ακετυλο-λουπεόλη	47,40	3335	47,40	3335
α-αμυρίνη	50,05	3511	48,85	3432
β-αμυρίνη	49,00	3442	48,90	3435
3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη	51,03	3577	49,42	3468
α-αμυρόνη	49,50	3475	49,50	3475
λουπενόνη	49,68	3487	49,68	3487
β-ακετοξυ-αμυρίνη	49,90	3501	49,90	3501
λουπεόλη	51,20	3588	50,20	3555
μπαχαρα-12,21διεν-3β-όλη	52,30	3677	51,27	3560
μπετουλιν-αλδεΐδη	52,42	3687	51,40	3568

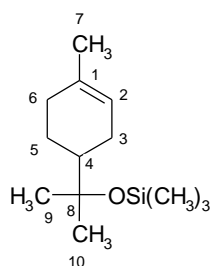
Πίνακας 3 Χρόνοι συγκράτησης (RT) και δείκτες (RI)μη συλλιωμένων & συλλιωμένων τριτερπενίων

## Παρατήρηση

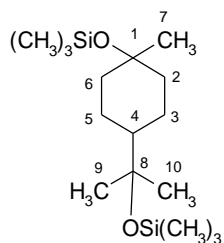
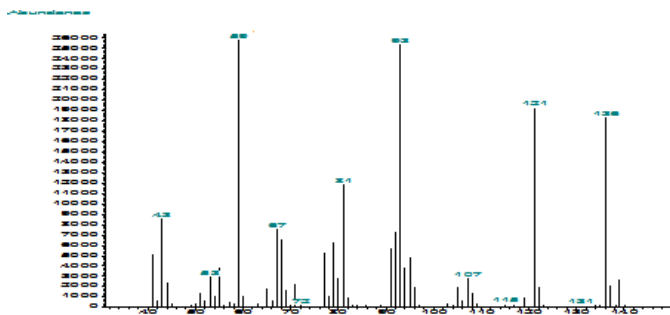
Οι δείκτες RI που βρέθηκαν δεν ήταν δυνατόν να συγκριθούν με πρότυπα καθώς με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχουν εξεταστεί τριτερπένια υπό τις ίδιες συνθήκες (τύπος στήλης και θερμοκρασιακό πρόγραμμα) με αυτές της παρούσας μελέτης.

### 2.10.2GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΚΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ

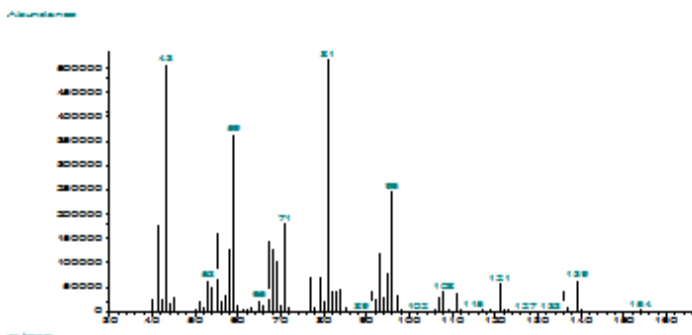
Ακολουθούν τα φάσματα μάζας των δυο συλλιωμένων καθαρών μονοτερπενικών αλκοολών και ο πίνακας με τους δείκτες RI:



α-τερπινεόλη-TMS (13)



1,8-τερπινεόλη-TMS (14)



Ουσίες	RT	RI Μη Συλλιωμένων	RT	RI Συλλιωμένων
α-τερπινεόλη	7,30	1190	6,91	1150
1,8-τερπινεόλη	14,40	1482	10,40	1322

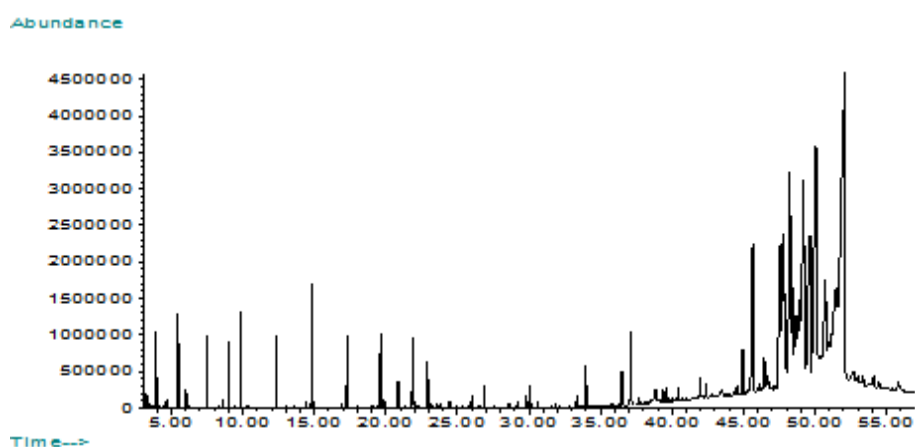
Πίνακας 4 Χρόνοι συγκράτησης (RT) και δείκτες (RI)μη συλλιωμένων & συλλιωμένων μονοτερπενικών Αλκοολών

### Παρατήρηση

Οι δείκτες RI που βρέθηκαν συγκρίθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία και οι τιμές τους ήταν σχεδόν ταυτόσημες και άρα αποδεκτές [Adams, 2007].

### 2.10.3 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 1)

Στο χρωματογράφημα του δείγματος 1 η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τα τρία απομονωμένα τριτερπένια: λουπενόνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη. Επιπλέον με βάση τις τιμές του δείκτη RI και τα φασμάτα μάζας των σιλυλιωμένων καθαρών τριτερπενίων αυτά που αναγνωρίστηκαν και στο ολικό εκχύλισμα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα με έντονο χαρακτήρα. Τα απομονωμένα διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή λογχοκαρπόλη Α και 6,8-διπρενυλ-εριοδικτυόλη δεν αναγνωρίστηκαν και πιθανόν να αποτελούν μέρος των φλαβονοειδών που αναγνωρίστηκαν στο ολικό εκχύλισμα μέσω GC-MS.



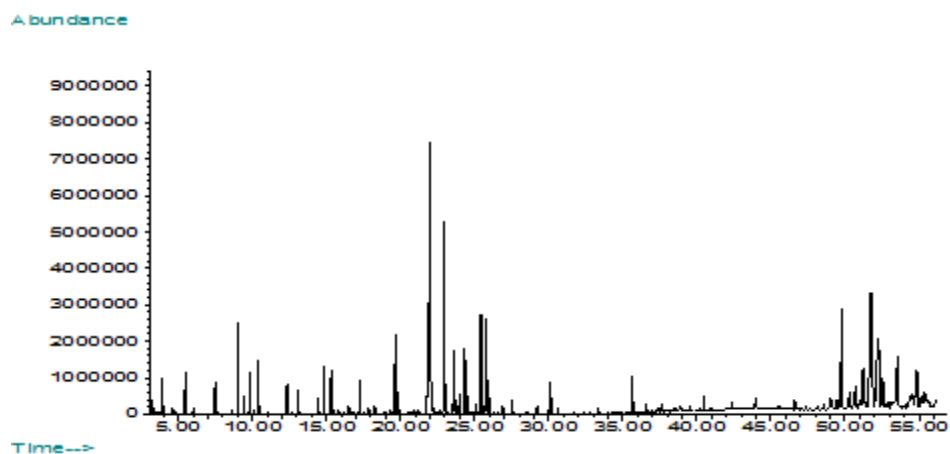
	RT	Συστατικό	Ποσοστό%	RI
<b>1</b>	9,02	γλυκερόλη	1,19	1268
<b>2</b>	14,8-23,0	σάκχαρα	2,30	
<b>3</b>	26,87	παλμιτικό οξύ	0,19	2045
<b>4</b>	30,09	ελαϊκό οξύ	0,18	2215
<b>5</b>	33,38	3-υδροξυ-στεατικό οξύ	0,20	2403
<b>6</b>	33,97	εικοσανοϊκό οξύ	0,40	2433
<b>7</b>	37,14	βεγενικό οξύ	0,70	2437
<b>8</b>	38,84-40,48	σάκχαρο	2,43	2807
<b>9</b>	41,94	φλαβονοειδές	0,27	2889
<b>10</b>	42,37-44,50	σάκχαρο	1,72	
<b>11</b>	44,93	φλαβονοειδές	4,86	3176
<b>12</b>	46,20	<b>ερυθροδιόλη</b>	2,77	3255
<b>13</b>	47,58	φλαβονοειδές	5,33	3347
<b>14</b>	48,22	φλαβονοειδές	9,95	3389
<b>15</b>	48,37	τριτερπένιο	2,72	3398

16	48,67	άγνωστο	2,77	3420
17	48,90	β-αμυρίνη	3,60	3435
18	49,68	λουπενόνη	6,86	3487
19	50,05	φλαβονοειδές	18,90	3511
20	50,20	λουπεόλη	6,79	3555
21	50,71	φλαβονοειδές	6,56	3556
22	51,40	<b>μπετουλιν-αλδεύδη</b>	19,01	3568

#### **2.10.4 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 2)**

Στο χρωματογράφημα του δείγματος 2η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τα δέκα απομονωμένα τριτερπένια: λουπενόνη, β-αμυρίνη, ψ-οξική ταραξαστερόλη, οξική ταραξαστερόλη, 3-O-ακετυλολουπεόλη, λανοστερόλη, 3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη, α-αμυρόνη α-αμυρίνη και β-ακετοξυ-αμυρίνη. Επίσης αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά σε πρόπολη αλλά δεν απομονώθηκαν δυο τριτερπένια: στιγμασταδιένιο, 8,24 λανοσταδιένιο και μια βενζοφουρανοδιόνη (2,2-διμεθυλ-6-προπ-2-ενυλ-βενζοφουραν-4,7-διόνη).

Επιπλέον με βάση τις τιμές του δείκτη RI και τα φασμάτα μάζας των σιλυλιωμένων καθαρών τριτερπενίων αυτά που αναγνωρίστηκαν και στο ολικό εκχύλισμα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα με έντονο χαρακτήρα.



	RT	Συστατικό	Ποσοστό%	RI
<b>1</b>	4,60	προπανοϊκό οξύ	0,27	1047
<b>2</b>	6,08	προπανόλη	0,55	1149
<b>3</b>	6,91	α-τερπινεόλη	6,4	1150
<b>4</b>	9,04	γλυκερόλη	3,1	1268
<b>5</b>	14,11	σάκχαρο	0,38	1472



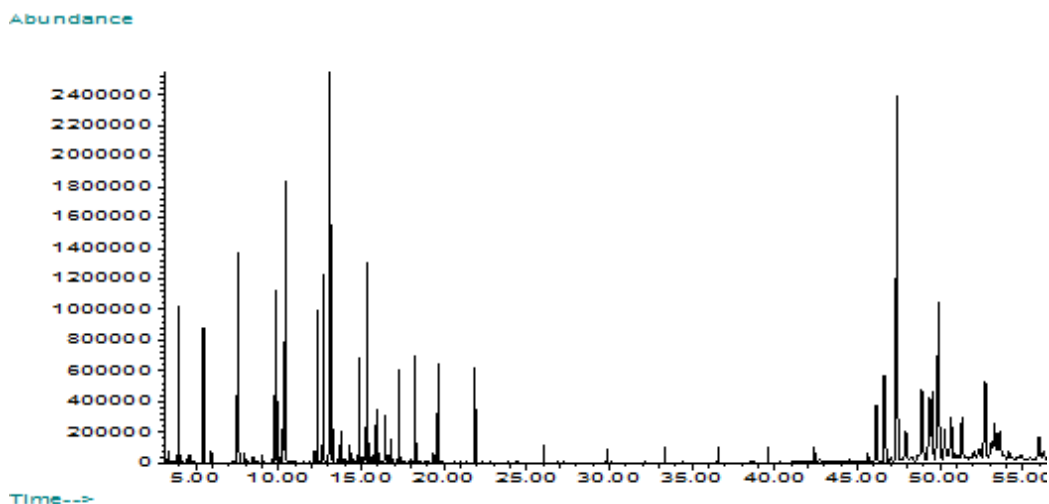
6	14,44	βουτανοδιϊκόοξύ	0,57	1485
7	14,55	κινναμωμικό οξύ	1,96	1489
8	15,65	2-προπενοϊκός φαινυλεστέρας	<0,1	1535
9	17,85	βενζοϊκό οξύ	0,40	1626
10	18,0-26,0	σάκχαρα	22,5	
11	26,87	παλμιτικό οξύ	0,63	2046
12	28,59	καφεϊκό οξύ	0,7	2137
13	29,97	λινολεϊκό οξύ	<0,1	2209
14	30,05	trans-9-οκταδεκενοϊκό οξύ	0,38	2214
15	30,09	ελαϊκό οξύ	1,21	2216
16	30,55	στεατικό οξύ	<0,1	2242
17	30,90	λιπαρό οξύ	1,21	2260
18	35,66-40,48	σάκχαρα	1,70	
19	45,66	2,2-διμεθυλ-6-προπ-2-ενυλ-βενζοφουραν-4,7-διόνη	1,10	3219
20	46,22	8,24-λανοσταδιένιο	0,55	3256
21	47,04	λανοστερόλη	1,42	3311
22	47,35	ψ-οξική ταραξαστερόλη	3,07	3332
23	47,37	οξική ταραξαστερόλη	<0,1	3333
24	47,40	3-Ο-ακετυλο-λουπεόλη	0,30	3335
25	47,60	στιγμασταδιένιο	0,66	3348
26	48,85	α-αμυρίνη	10,30	3432
27	48,90	β-αμυρίνη	10,27	3435
28	49,42	3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη	0,23	3468
29	49,50	α-αμυρόνη	5,15	3475
30	49,68	λουπενόνη	<0,1	3487
31	49,90	β-ακετόξυ-αμυρίνη	6,47	3501
32	50,20	λουπεόλη	0,88	3555
33	51,27	μπαχαρα-12,21διεν-3β-όλη	1,12	3560

### **2.10.5 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 3)**

Στο χρωματογράφημα του δείγματος 3η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνωρίσεται τρία απομονωμένα τριτερπένια: 3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη, α-αμυρόνη και α-αμυρίνη και τις δυο μονοτερπενικές αλκοόλες: α-τερπινεόλη και 1,8-τερπινεόλη. Επίσης αναγνωρίστηκαν τα τριτερπένια: παρκεόλη α-ακετοξυ-αμυρίνη, β-αμυρίνη, 3-Ο-ακετυλο λουπεόλη και ερυθροδιόλη καθώς και οι μονοτερπενικές αλκοόλες β-φενχόλη και 2-μεθυλ-κυκλοεξανόλη. Η α-ακετοξυ αμυρίνη έχει αναγνωριστεί μέσω GC-MS σε πρόπολη από την Αιθιοπία [Rushdi *et al.*, 2014] και η παρκεόλη αναγνωρίζεται για πρώτη φορά σε πρόπολη. Επίσης και οι δυο μονοτερπενικές αλκοόλες αναγνωρίζονται για πρώτη φορά σε πρόπολη. Η

παρκεόλη, η α-ακετοξυ-αμυρίνη, η β-φενχόλη και η 2-μεθυλ-κυκλοεξανόλη δεν έχουν απομονωθεί από το εξεταζόμενο δείγμα πρόπολης.

Επιπλέον με βάση τις τιμές του δείκτη RI και τα φασμάτα μάζας των σιλυλιωμένων καθαρών τριτερπενίων και των δυο μονοτερπενικών αλκοολών αυτά που αναγνωρίστηκαν και στο ολικό εκχύλισμα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα με έντονο χαρακτήρα.



	RT	συστατικό	Ποσοστό%	RI
<b>1</b>	6,91	<b>α-τερπινεόλη</b>	13,9	1150
<b>2</b>	7,60	β-φενχόλη	5,46	1205
<b>3</b>	10,40	<b>1,8-τερπινεόλη</b>	8,40	1322
<b>4</b>	13,13	2-μεθυλ-κυκλοεξανόλη	9,30	1434
<b>5</b>	13,23	μονοτερπενική κετόνη	1,23	1438
<b>6</b>	17,0-45,0	σάκχαρα	3,70	
<b>7</b>	26,90	παλμιτικό οξύ	0,20	2042
<b>8</b>	30,08	ελαϊκό οξύ	0,12	2215
<b>9</b>	46,20	<b>ερυθροδιόλη</b>	1,61	3255
<b>10</b>	46,63	τριτερπένιο	2,9	3284
<b>11</b>	47,40	<b>3-O-ακετυλο-λουπεόλη</b>	12,3	3335
<b>12</b>	47,94	παρκεόλη	1,06	3368
<b>13</b>	48,85	α-αμυρίνη	2,90	3432
<b>14</b>	48,89	β-αμυρίνη	3,2	3434
<b>15</b>	49,42	3α-υδροξυ-ολεαν-12-εν-30-όλη	2,25	3468
<b>16</b>	49,50	α-αμυρόνη	2,56	3475
<b>17</b>	49,90	β-ακετοξυ αμυρίνη	6,96	3501

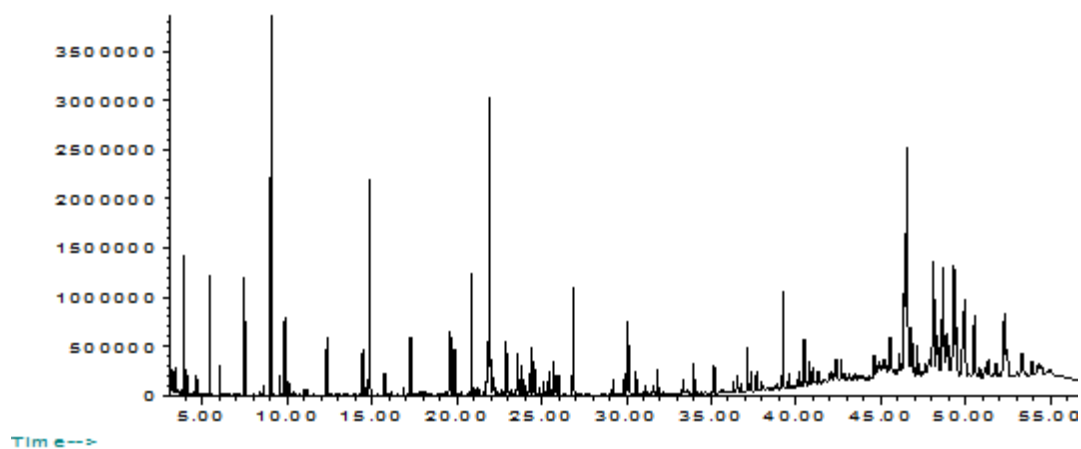
18	50,50	α-ακετοξυ αμυρίνη	2,66	3557
19	51,30-53,30	φλαβονοειδή	11,80	3595 3690 3735
20	53,58	τριτερπενική αλκοούλη	2,75	3759

#### **2.10.6 GC-MS ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΠΟΛΗΣ (ΔΕΙΓΜΑ 4)**

Στο χρωματογράφημα του δείγματος 4 η βιβλιοθήκη Wiley275 αναγνώρισε τον αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος καθώς και 5 από τα 7 απομονωμένα τριτερπένια: β-αμυρίνη, α-αμυρόνη, α-αμυρίνη β-ακετοξυ-αμυρίνη και ερυθροδιόλη. Τα απομονωμένα τριτερπένια μπαχαρά-12,21διεν-3β-όλη και η μπετουλιν-αλδεύδη, αναγνωρίστηκαν στο ολικό εκχύλισμα με βάση τις τιμές του δείκτη RI και τα φασμάτα μάζας των σιλυλιωμένων καθαρών τριτερπενίων και εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα επισημασμένα. Με σύγκριση (δείγμα 2) αναγνωρίστηκε και η 3-O-ακετυλο-λουπεόλη.

Τα απομονωμένα διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή λογχοκαρπόλη Α,6,8-διπρενυλ-αρομαδενδρίνη και λεσπεντεζαφλαβανόνη C δεν αναγνωρίστηκαν και πιθανόν να αποτελούν μέρος των φλαβονοειδών που αναγνωρίστηκαν μέσω GC-MS.

Abundance



Time-->

	RT	Συστατικό	Ποσοστό%	RI
1	4,60	προπανοϊκό οξύ	0,27	1047
2	9,04	γλυκερόλη	6,00	1268
3	9,56	φωσφορικό οξύ	0,22	1289
4	14,45	βουτανοδικό οξύ	0,62	1485
5	14,88	ερυθριτόλη	3,79	1503

6	19,86-25,73	σάκχαρα	17,41	
7	22,18	3,4 διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ	0,48	1816
8	25,89	αιθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος	0,3	1994
9	26,90	παλμιτικό οξύ	1,98	2042
10	29,23	αιθυλεστέρας του ολεϊκού οξέος	0,22	2170
11	29,9	λινολεϊκό οξύ	0,30	2205
12	30,08	ελαϊκό οξύ	1,14	2215
13	30,56	στεατικό οξύ	0,37	2243
14	33,9	εικοσανοϊκό οξύ	0,44	2437
15	35,15-37,66	σάκχαρα	1,25	
16	39,24-40,80	φαινολικά παράγωγα	3,24	
17	42,67	φλαβονοειδές	0,42	3025
18	46,20	ερυθροδιόλη	0,25	3255
19	46,40	στεροειδές	3,60	3268
20	46,56	φλαβονοειδές	11,25	3279
21	47,41	<b>3-O-ακετυλο-λουπεόλη</b>	5,36	3335
22	48,85	α-αμυρίνη	1,76	3432
23	48,91	β-αμυρίνη	3,64	3435
24	49,30	φαινολικό παράγωγο	3,80	3462
25	49,50	α-αμυρόνη	1,76	3475
26	49,90	β-ακετοξυ αμυρίνη	3,89	3501
27	51,27	<b>μπαχαρα-12,21διεν-3β-όλη</b>	2,61	3560
28	51,40	<b>μπετουλιν-αλδεΐδη</b>	1,02	3568

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη GC-MS ανάλυση των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε αναγνωρίστηκαν επιπλέον κάποιες ενώσεις. Στο δείγμα 1 αναγνωρίστηκε η μπετουλιν-αλδεΐδη η οποία έχει απομονωθεί από το δείγμα 4. Στο δείγμα 2 αναγνωρίστηκαν η λουπεόλη (απομονώθηκε από το δείγμα 1) και η μπαχαρα-12,21διεν-3β-όλη (απομονώθηκε από το δείγμα 4). Επιπλέον αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά σε πρόπολη χωρίς να έχουν απομονωθεί δυο τριτερπένια: στιγμασταδιένιο και 8,24-λανοσταδιένιο και μια βενζοφουρανοδιόνη η 2,2-διμεθυλ-6-προπ-2-ενυλ-βενζοφουραν-4,7-διόνη. Στο δείγμα 3 αναγνωρίστηκαν η ερυθροδιόλη (απομονώθηκε από το δείγμα 4) και η 3-O-ακετυλο-λουπεόλη (απομονώθηκε από το δείγμα 2). Επίσης αναγνωρίστηκαν τα τριτερπένια παρκεόλη και α-ακετοξυ-αμυρίνη. Η παρκεόλη ανιχνεύεται για πρώτη φορά σε πρόπολη ενώ η α-ακετοξυ-αμυρίνη έχει ανιχνευτεί σε πρόπολη Αιθιοπίας [Rushdi *et al.*, 2014]. Στο ίδιο δείγμα ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά σε πρόπολη και δυο μονοτερπενικές αλκοόλες β-φενχόλη και 2-μεθυλ-κυκλοεξανόλη. Στο δείγμα 4 αναγνωρίστηκε επιπλέον η 3-O-ακετυλο-λουπεόλη (απομονώθηκε από το δείγμα 2).

## **2.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU**

### **2.11.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών [Folin & Ciocalteu, 1927] και είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος GAE (Gallic Acid Equivalence). Το 1965 βελτιώθηκε [Singleton *et al.*, 1965] και από τότε χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών διαφόρων φυσικών προϊόντων αλλά και για τον προσδιορισμό θειολών, νουκλεοτιδίων, τριοζών, γλυκεραλδεΐδης καθώς και ανόργανων συστατικών [Singleton *et al.*, 1999].

#### **2.11.1.1 ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Το **Folin-Ciocalteu** είναι μείγμα μολυβδαινικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), βολφραϊμικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ), και φωσφορικού οξέος ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Παρασκευάζεται με ανάμιξη  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , π. HCl, 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  σε ύδωρ και βρασμό για 10 ώρες. Κατόπιν προστίθεται  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  που του δίνει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Σχηματίζονται  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  και  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  και η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου [Singleton *et al.*, 1965]. Προκαλείται οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και για αυτό το λόγο το πολυφαινολικό προφίλ που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους. Το τελευταίο ανάγει το αντιδραστήριο σχηματίζοντας ένα βαθύ μπλε χρώματος σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου που απορροφά στο ορατό σε μήκος κύματος 725-750nm [Singleton *et al.*, 1965]. Πρέπει να τονιστεί ότι οι φαινολικές ενώσεις για να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu απαιτούν βασικό περιβάλλον γι' αυτό πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου το pH του δείγματος πρέπει να γίνεται βασικό (pH=10). Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Να σημειωθεί ότι δεν γίνεται διαχωρισμός των μονομερών, διμερών και των ανώτερων φαινολικών συστατικών. Στην πραγματικότητα

προσδιορίζεται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος, αφού η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι μια οξειδοαναγωγή [Gutfinger, 1981]. Ως εσωτερικό πρότυπο για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ ενώ οι μετρήσεις έγιναν στα 725nm. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε και για τα τέσσερα δείγματα πρόπολης. Στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας έγινε η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς ενώ ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για πυκνά και για αραιά διαλύματα των εκχυλισμάτων. Οι τιμές που ελήφθησαν στο φασματοφωτόμετρο UV-VIS εκφράζονται σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (CaffeicAcidEquivalents, CAE)/g εκχυλίσματος.

### **Οργανολογία**

- Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-1700 series Pharmaspec της εταιρίας Shimadzu ρυθμισμένο στα 725nm. Οι λάμπες του οργάνου ήταν μια λάμπα αλογόνου (Halogen WI) και μια λάμπα δευτερίου (Deuterium D2).
- Κυψελίδες μιας χρήσης διαμέτρου 1dm.
- Πιπέτες ακριβείας των 100μl και των 1000μl της εταιρείας Gilson.
- Συσκευή μηχανικής ανάδευσης (Vortex)
- Eppendorf

### **Κατασκευή καμπύλης αναφοράς**

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς γίνεται με εύρος συγκέντρωσης καφεϊκού οξέος από 0-10μg /mL MeOH. Αρχικά προστέθηκε η ποσότητα νερού αντίστοιχη για κάθε συγκέντρωση ενώ ακολουθούν οι αντίστοιχες ποσότητες του Δ2 (αραιό καφεϊκό οξύ συγκέντρωσης 250μl/ml MeOH). Προστέθηκαν 60μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu σε κάθε Eppendorf (ανά 30 sec) και μετά από την πάροδο 3 λεπτών προστέθηκαν 120μl κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (ανά 30 sec). Σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν 420μl υπερκάθαρου νερού έως ότου ο συνολικός όγκος να είναι 1,2ml. Τέλος, κάθε Eppendorf αναδεύτηκε σε Vortex για 1-2sec και τα δείγματα αφέθηκαν για 1h ακριβώς προτού φωτομετρηθούν.

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι ποσότητες για κάθε αντιδραστήριο:

Κωδικός Δείγματος	μg καφεϊκού οξέος	μL H <sub>2</sub> O	μL Δ2	μL Follin	μL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Τυφλό	0	600	0	60	120
1a/b	1	596	4	60	120
2a/b	2	592	8	60	120
3a/b	4	584	16	60	120
4a/b	6	576	24	60	120
5a/b	8	568	32	60	120
6a/b	10	560	40	60	120
7a/b	12	552	48	60	120

### **Κατασκευή καμπύλης δειγμάτων**

Για κάθε δείγμα προς φωτομέτρηση παρασκευάστηκε από ένα πυκνό και ένα αραιό διάλυμα ως εξής:

Πυκνό δ/μα: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10mg εκχυλίσματος και κατόπιν διαλύθηκαν σε 1000μl MeOH. (2 πυκνά δ/τα για κάθε δείγμα)

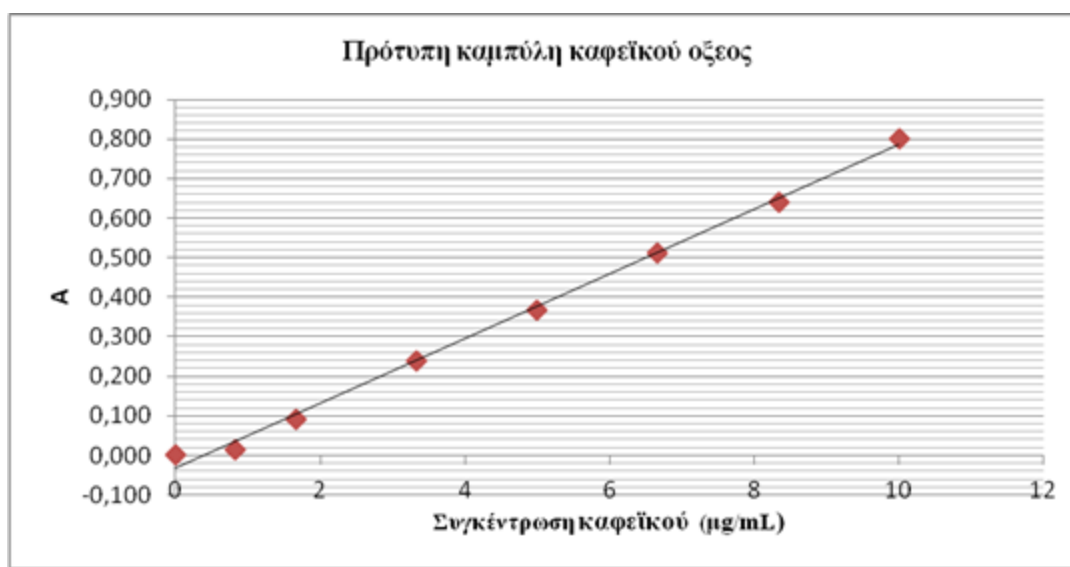
Αραιό δ/μα: Παρασκευάστηκε με αραιώση ποσότητας 100μl του πυκνού διαλύματος σε 900μl MeOH. (2 αραιά δ/τα για κάθε δείγμα).

Για τη μέτρηση των δειγμάτων προστέθηκαν 50μl από κάθε αραιό και κάθε πυκνό διάλυμα στα Erpendorf και έπειτα 550 μl αποσταγμένο νερό και ακολούθησε η ίδια διαδικασία με αυτήν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

### 2.11.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Καμπύλη αναφοράς Congo (Δείγμα 1)

Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος (μg/ml)	Τιμή Απορρόφησης A	Τιμή Απορρόφησης B	Μέσος όρος
0	0,000	0,000	0,000
1	0,031	0,054	0,043
2	0,084	0,12	0,102
3	0,245	0,247	0,246
5	0,378	0,396	0,387
7	0,555	0,572	0,564
8	0,689	0,725	0,707
10	0,837	0,843	0,840

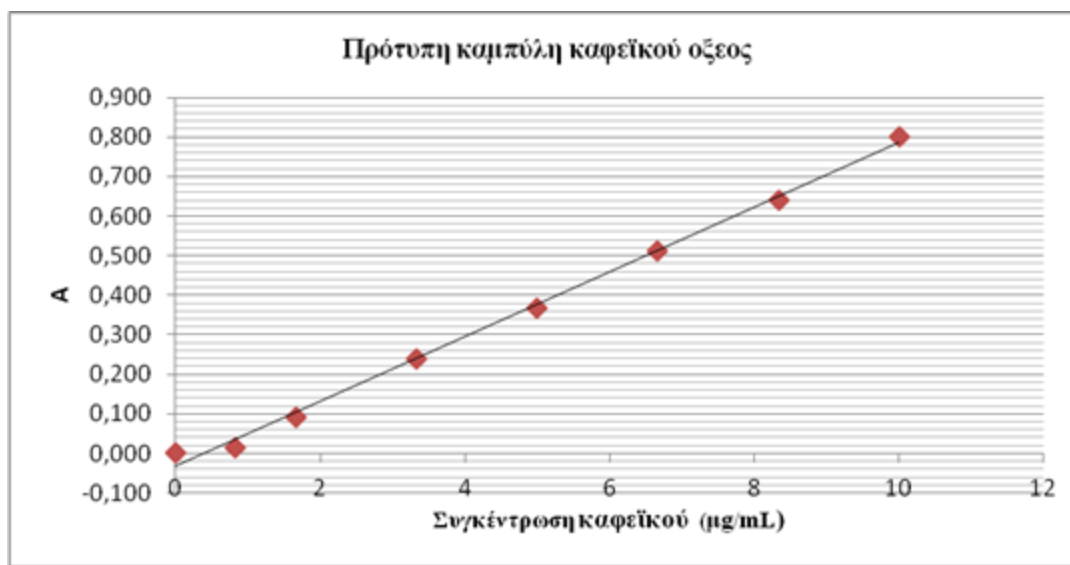


#### Καμπύλη αναφοράς δείγματος Oku (Δείγμα 2)

Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος (μg/ml)	Τιμή Απορρόφησης A	Τιμή Απορρόφησης B	Μέσος όρος
0	0,000	0,000	0,000
1	-0,005	0,033	0,014
2	0,078	0,107	0,093
3	0,248	0,232	0,240
5	0,341	0,391	0,366
7	0,5	0,523	0,512

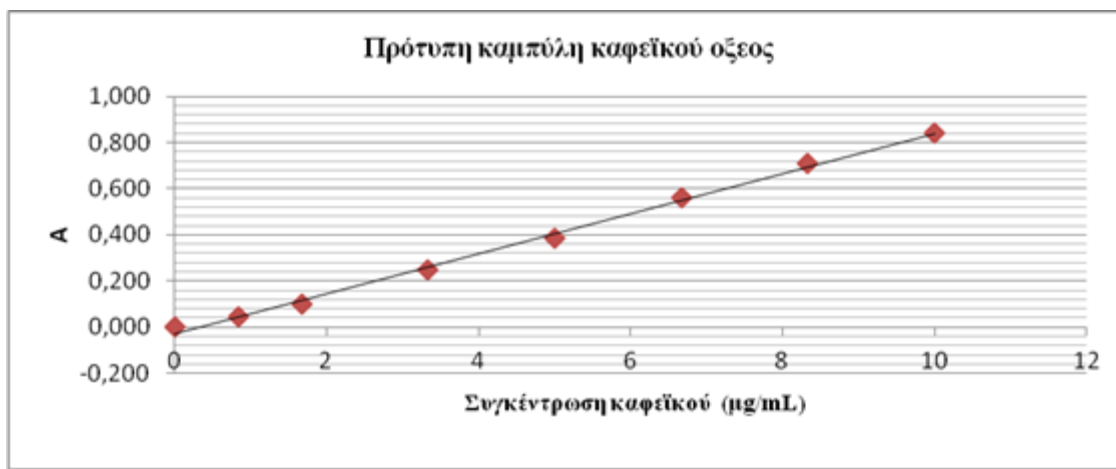


<b>8</b>	0,617	0,663	0,640
<b>10</b>	0,801	0,803	0,802



**Καμπύλη αναφοράς δειγμάτων Ngaoundal&Tekel (Δείγματα 3 & 4)**

Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος (µg/ml)	Τιμή Απορρόφησης Α	Τιμή Απορρόφησης Β	Μέσος όρος
<b>0</b>	0,000	0,000	0,000
<b>1</b>	0,051	0,060	0,056
<b>2</b>	0,111	0,127	0,119
<b>3</b>	0,230	0,265	0,248
<b>5</b>	0,405	0,404	0,405
<b>7</b>	0,553	0,548	0,551
<b>8</b>	0,716	0,703	0,710
<b>10</b>	0,832	0,841	0,837



**ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Διαλύματα	A(Congo)	A(Oku)	A(Ngaoundal)	A(Tekel)
<b>Αραιό δ/μα1</b>	0,567	0,093	0,109	0,635
<b>Αραιό δ/μα2</b>	0,525	0,094	0,105	0,624
<b>Πυκνό δ/μα1</b>	3,612	0,754	0,380	3,215
<b>Πυκνό δ/μα2</b>	3,613	0,744	0,382	3,311

Επειδή για τα δείγματα 1 και 4 οι τιμές των απορροφήσεων βγήκαν εκτός των ορίων γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς, για τα συγκεκριμένα δείγματα παρασκευάστηκαν επιπλέον δυο αραιά διαλύματα ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση για κάθε διάλυμα με τη μεγαλύτερη ακρίβεια.

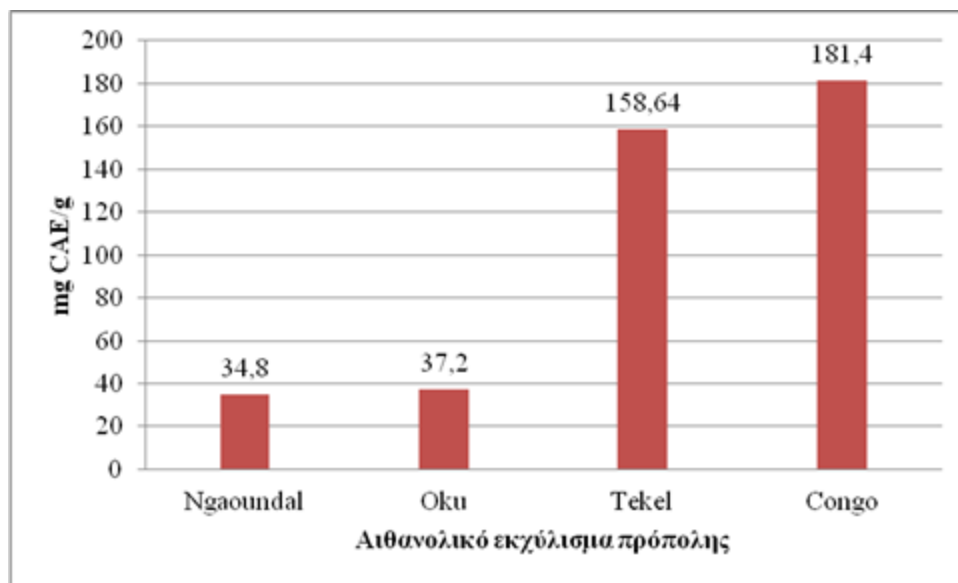
Διαλύματα	A(Congo) Δείγμα 1	A(Tekel) Δείγμα 4
<b>Αραιό δ/μα1</b>	0,567	0,635
<b>Αραιό δ/μα2</b>	0,525	0,624
<b>Αραιό δ/μα3</b>	0,526	0,641
<b>Αραιό δ/μα4</b>	0,530	0,632

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται αρχικά η συγκέντρωση του βάσης της απορρόφησης και της εξίσωσης ελαχίστων τετραγώνων,  $y=ax+\beta$  που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς (σχέση 1). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε mg ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (caffeic acid equivalents, CAE)/g εκχυλίσματος όπως αυτά υπολογίστηκαν (σχέση 2) κατά αύξουσα σειρά.

$$C_{\text{δείγματος}} = (A_{\text{δείγματος}} - \beta) / a \quad (1)$$

$$\text{mgCAE/g}_{\text{εκχυλίσματος}} = (C_{\text{δείγματος}} \times 1,2 \text{ml} \times 1000 \text{mg}) / 500 \text{mg} \quad (2)$$

Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης	mg CAE/g
<b>Ngaoundal</b>	34,8
<b>Oku</b>	37,2
<b>Tekel</b>	158,6
<b>Congo</b>	181,4



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις για κάθε δείγμα είναι: 181,4mg CAE/g (δείγμα1), 37,2 mg CAE/g (δείγμα 2), 34,8mg CAE/g (δείγμα 3) και 158,6 mg CAE/g (δείγμα 4). Επομένως μεγαλύτερη περιεκτικότητα έχουν το δείγμα **1** και το δείγμα **4**.

Αυτό επαληθεύεται και από τη χημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα καθώς απομονώθηκαν διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή σε ικανοποιητικές ποσότητες. Αναλυτικότερα από το δείγμα 1 απομονώθηκαν τα φλαβονοειδή λογχοκαρπόλη Α και 6,8-διπρενυλ-εριοδικτυόλη και από το δείγμα 4 τα φλαβονοειδή λογχοκαρπόλη Α, 6,8-διπρενυλ-αρομαδεσρνή και λεσπεντεζαφλαβανόνηC. Αντιθέτως από τη χημική ανάλυση των δειγμάτων 2 και 3 προέκυψε ότι έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριτερπένια και όχι σε φαινολικές ενώσεις.

Το χημικό προφίλ των τεσσάρων δειγμάτων επαληθεύτηκε επίσης και από τηGC-MSανάλυση των ολικών τους εκχυλισμάτων που έχει περιγραφεί στην προηγούμενη ενότητα.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ**

Μεταξύ των στόχων αυτής της εργασίας, ήταν και οι βιολογικοί έλεγχοι στα δείγματα που μελετήθηκαν και οι οποίοι πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών:

1. Έλεγχοι **αντιβακτηριακής** δράσης.
2. Έλεγχοι **αντιμυκητιασικής** δράσης.

#### **ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ&ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ**

Η εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διάλυσης (dilution method), με προσδιορισμό των τιμών ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεών τους (τιμές MIC). Σε όλα τα δείγματά μας έγιναν μετρήσεις, σε διάφορες συγκεντρώσεις και μετρήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC), με την dilution method σε 96-τρυπες πλάκες. Χρησιμοποιήθηκαν 6 πρότυπα στελέχη βακτηρίων δυο Gram(+): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) και τεσσερα Gram(-): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) και *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 227853). Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. tropicalis* (ATCC 13801) and *C. glabrata* (ATCC 28838) της ATCC (American Type Culture Collection). Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης ήταν τα αντιβιοτικά νετιλμικίνη, αμοξυκιλλίνη και κλαβουλανικό οξύ (AMCA), τα αντιμυκητιασικά, αμφοτερικίνη, ιντρακοναζόλη και 5-φλουκυτοσίνη (Sanofi, Diagnostics Pasteur). Επίσης για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό ο διαλύτης στον οποίο είχαν διαλυθεί τα προς εξέταση δείγματα.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
ΔΕΙΓΜΑ 1	10,52	10,85	>50	21,7	21,6	>50	21,00	19,84	17,87
ΔΕΙΓΜΑ 2	20,30	20,00	>50	12,40	20,18	>50	22,50	20,80	19,75
ΔΕΙΓΜΑ 3	18,50	17,10	>50	12,87	21,3	>50	21,25	20,67	20,00
ΔΕΙΓΜΑ 4	13,80	13,55	>50	19,70	22,44	>50	20,25	18,75	16,64
ιτρακοναζόλη							1•10 <sup>-3</sup>	0,1•10 <sup>-3</sup>	1•10 <sup>-3</sup>
5-φλουκντοσίνη							0,1•10 <sup>-3</sup>	1•10 <sup>-3</sup>	10•10 <sup>-3</sup>
αμφοτερικίνη							1•10 <sup>-3</sup>	0,5•10 <sup>-3</sup>	0,4•10 <sup>-3</sup>
αμοξικιλίνη	2•10 <sup>-3</sup>	2•10 <sup>-3</sup>	2,4•10 <sup>-3</sup>	2,2•10 <sup>-3</sup>	2,8 2•10 <sup>-3</sup>	2•10 <sup>-3</sup>			
νετιλμικίνη	4•10 <sup>-3</sup>	4•10 <sup>-3</sup>	8,8•10 <sup>-3</sup>	8•10 <sup>-3</sup>	8•10 <sup>-3</sup>	10•10 <sup>-3</sup>			
κλαβουλανικό οξύ	2•10 <sup>-3</sup>	2•10 <sup>-3</sup>	2,4•10 <sup>-3</sup>	2,2•10 <sup>-3</sup>	2,8•10 <sup>-3</sup>	2•10 <sup>-3</sup>			

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα τα δείγματα εμφάνισαν μικρή αντιβακτηριακή δράση έναντι όλων των στελεχών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Ισχυρότερη δράση έναντι των Gram(+) βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* εμφάνισαν το δείγμα από το Congo (δείγμα 1) και ένα δείγμα από το Cameroon (δείγμα 4), ενώ τα στελέχη των Gram(-) βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* και *Escherichia coli* εμφανίστηκαν περισσότερο ανθεκτικά. Η υψηλότερη δραστηριότητα των δυο αυτών δειγμάτων οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, που διαπιστώθηκε τόσο προσδιορισμό των ολικών φαινολικών όσο και στη GC-MS ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων που περιγράφονται στις προηγούμενες ενότητες. Από τον αντιμυκητιασικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε όλα τα δείγματα εμφάνισαν χαμηλή αντιμυκητιασική δράση έναντι όλων των στελεχών μυκήτων που ελέγχθηκαν. Τις ισχυρότερες δράσεις εμφάνισαν και εδώ τα δείγματα 1 και 4 για τους ίδιους λόγους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν τέσσερα δείγματα Αφρικανικής πρόπολης. Αρχικά αναλύθηκε για πρώτη φορά ένα δείγμα πρόπολης προέλευσης Congo(1). Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν τρία τριτερπένια: λουπενόνη (1), β-αμυρίνη (2), λουπεόλη (3) και δυο διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή: λογχοκαρπόλη Α (4) και 6,8-διπρενυλ-εριοδικτυολη (5), εκ των οποίων τα συστατικά 4 και 5 βρίσκονται για πρώτη φορά σε πρόπολη διεθνώς.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τρία δείγματα πρόπολης προέλευσης Cameroon και συγκεκριμένα από τις περιοχές Oku(2), Ngaoundal(3) & Tekel(4). Από αυτά απομονώθηκαν 13 τριτερπένια: λουπενόνη (1), β-αμυρίνη (2), ψ-οξική ταραξαστερόλη (6), οξική ταραξαστερόλη (7), 3-Ο-ακετυλο-λουπεόλη (8), λανοστερόλη (9), 3α-υδροξυ-ολεαν-12εν-30-όλη (10), α-αμυρόνη (11), α-αμυρίνη (12), β-ακετοξυ-αμυρίνη (15), μετουλιν-αλδεΐδη (17), μπαχαρα-12,21-διεν-3β-όλη (18), ερυθροδιόλη (19), 2 μονοτερπενικές αλκοόλες: α-τερπινεόλη (13), 1,8-τερπινεόλη (14), 4 διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή: λογχοκαρπόλη Α (4), 6,8-διπρενυλ-εριοδικτυολη (5), 6,8-διπρενυλ-αρομαδενρίνη (20), λεσπεντεζαφλαβανόνη C (21) και ένας εστέρας λιπαρού οξέος: αιθυλεστέρας παλμιτικού οξέος (16). Με βάση τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί τα συστατικά 2, 4-8, 10-12, 14-21 βρίσκονται για πρώτη φορά σε πρόπολη του Cameroon [Talla *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014] ενώ τα 4-7, 10, 14 και 17-21 αναφέρονται για πρώτη φορά σε πρόπολη διεθνώς.

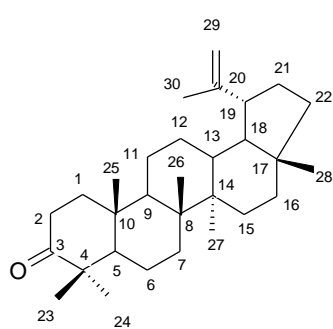
Όλα τα εκχυλίσματα και οι 21 απομονωμένες ενώσεις που αναφέρθηκαν συλλιγίσθησαν και προστέθηκε μίγμα κανονικών υδρογονανθρακών για τον προσδιορισμό των δεικτών RI. Από τη διαδικασία αυτή βρέθηκαν οι δείκτες (RI) για τα 14 καθαρά απομονωμένα τριτερπένια και για τις δυο μονοτερπενικές αλκοόλες αλλά δεν υπήρξε ικανοποιητικό αποτέλεσμα για τα τέσσερα διπρενυλιωμένα φλαβονοειδή. Από τη GC-MS ανάλυση διαπιστώθηκε η υψηλή περιεκτικότητα των δειγμάτων σε τριτερπένια και φαινολικά παράγωγα. Με αυτήν τη διαδικασία αναγνωρίστηκαν χωρίς να έχουν απομονωθεί στα δείγματα 2 και 3 του Cameroon επιπλέον τέσσερα τριτερπένια: στιγμασταδιένιο, 8,24 λανοσταδιένιο, α-ακετοξυ-αμυρίνη και παρκεόλη, δυο μονοτερπενικές αλκοόλες β-φενχόλη και 2-μεθυλ-κυκλοεξανόλη και μια βενζοφουρανοδιόνη η 2,2-διμεθυλ-6-προπ-2-ενυλ-βενζοφουραν-4,7-διόνη. Από αυτά μόνο η α-ακετοξυ-αμυρίνη έχει αναγνωριστεί μέσω GC-MS σε πρόπολη Αιθιοπίας [Rushdi *et al.*, 2014] ενώ τα υπόλοιπα αναφέρονται για πρώτη φορά σε πρόπολη.

Επιπλέον έγινε και προσδιορισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πολυφαινολικές ενώσεις με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις εμφάνισαν τα δείγματα 1 και 4 όπως επιβεβαιώθηκε και από την GC-MS ανάλυση των αιθανολικών τους εκχυλισμάτων. Επίσης τα τέσσερα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι μια σειράς 2

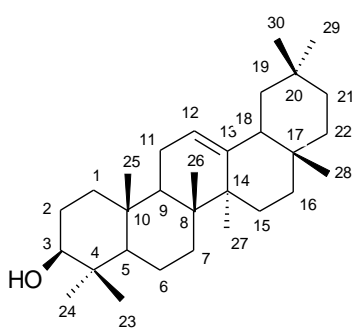
Gramθετικών βακτηρίων, 4 Gram αρνητικών και 3 μυκήτων, όπου διαπιστώθηκε ότι όλα τα δείγματα εμφάνισαν μικρή αντιμικροβιακή δράση με ισχυρότερη αυτή των δειγμάτων **1** και **4** πιθανότερα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε φαινολικές ενώσεις.

Τέλος αξίζει να τονιστεί ότι η έντονη παρουσία των τριτερπενίων σε όλα τα δείγματα και ιδιαίτερα των παραγώγων αμυρίνης και λουπεόλης συμφωνεί με τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για την Αφρικανική πρόπολη και που έχουν αναλυθεί στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας [Hegazi*et al.*, 2007; Talla*et al.*, 2013; Rushdi*et al.*; Zhan*et al.*, 2014]. Επίσης η έντονη παρουσία των διπρενυλιωμένων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από τα δείγματα **1** και **4** ενδέχεται να συσχετίζεται με τα αντίστοιχα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή που έχουν αναφερθεί στη χημική ταξινόμηση που δημοσιεύθηκε για πρόπολη προέλευσης Μαλαουσι και Ν.Νιγηρίας [Zhan*et al.*, 2014]. Σύμφωνα με τα παραπάνω η πρόπολη από το Congo και το Cameroon παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα. Ένα καλό κριτήριο σχετικά με το ποιοτικό προφίλ της πρόπολης μπορεί να αποτελέσει το GC-MS ενώ η μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολικών είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.

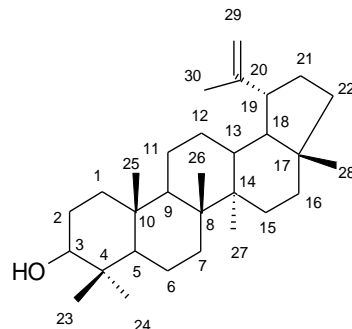
Ακολουθούν οι δομές των απομονωμένων μορίων.



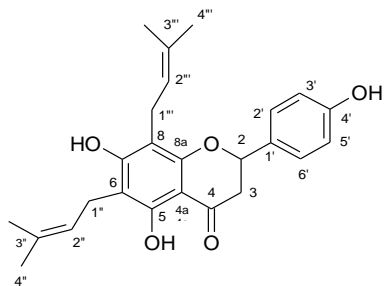
λουπενόνη (**1**)



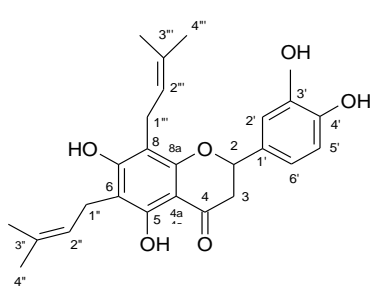
β-αμυρίνη (**2**)



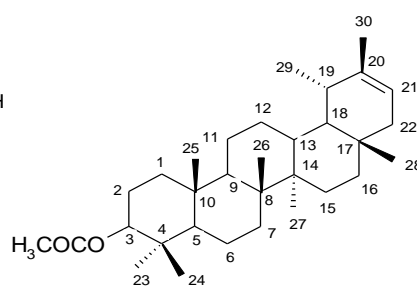
λουπεόλη(**3**)



λογκοκαρπόλη Α(**4**)

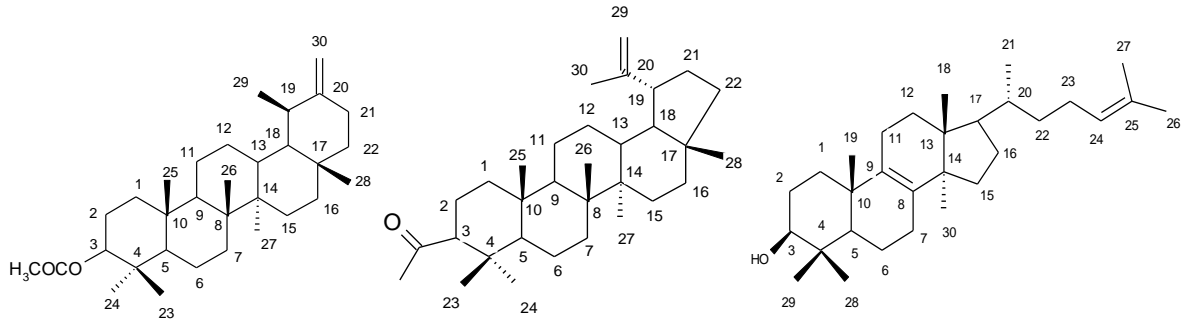


6,8-διπρενυλ-εριοδικτύολη (**5**)



ψ-οξική ταραξαστερόλη (**6**)

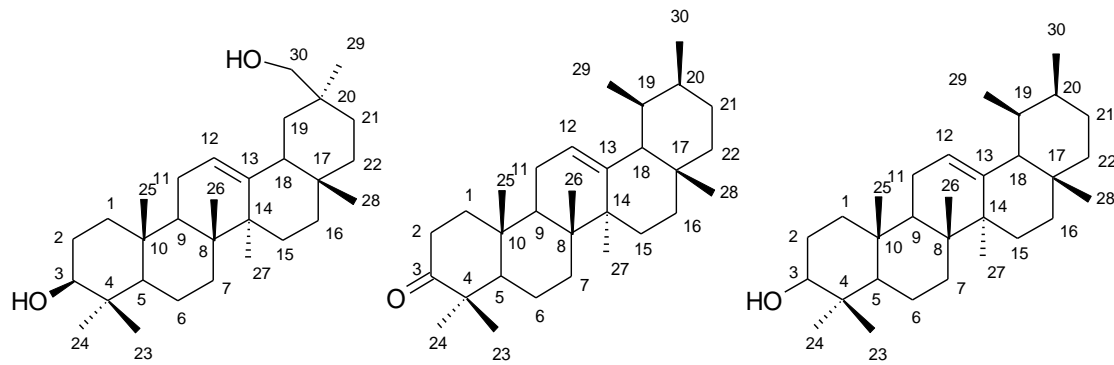




οξική ταραξαστερόλη (7)

3-Ο-ακετυλο-λουπεόλη (8)

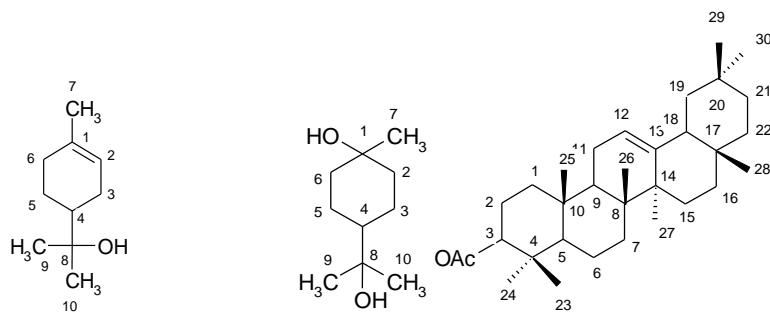
λανοστερόλη (9)



3α-υδροξυ-ολεαν-12εν-30όλη (10)

α-αμυρόνη (11)

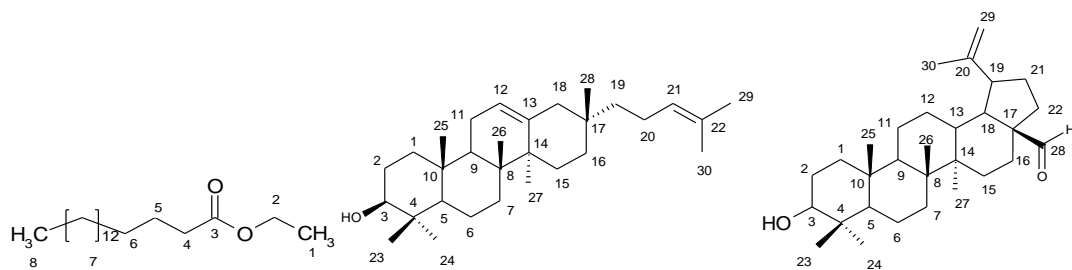
α-αμυρίνη (12)



α-τερπινεόλη (13)

1,8-τερπινεόλη (14)

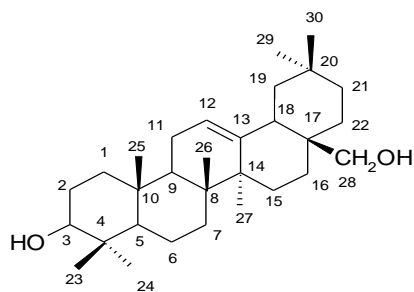
β-ακετοξυ-αμυρίνη (15)



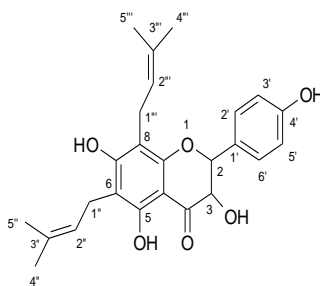
αιθυλεστέρας παλμιτικού οξέος (16)

μπαχαρα-12,21διεν-3β-όλη (17)

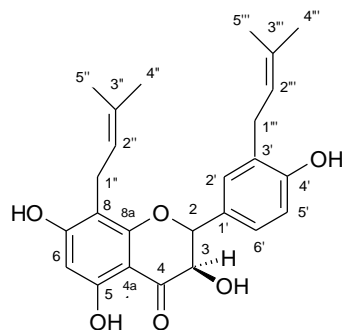
μπετουλιν-αλδεΐδη (18)



ερυθροδιόλη (19)



6,8-διπρενυλ-αρομαδενρίνη (20)



λεσπεντεζαφλαβανόνη C(21)

## SUMMARY

In the present Master thesis four African propolis samples were studied. Initially a sample from Congo was analyzed for the **first time** and five compounds were isolated, three triterpenoids: lupenone (**1**),  $\beta$ -amyrin(**2**) and lupeol (**3**) and two diprenyl-flavonoids: lochocarpol-A(**4**) & 6,8-diprenyl-eriodictyol(**5**). it is noteworthy to mention that compounds **4** and **5** are **reported in propolis for the very first time worldwide**.

Subsequently three samples from Cameroon and specifically from the regions of Oku(**2**), Ngaoundal(**3**) and Tekel(**4**) were studied. From those 13 triterpenoids were isolated: lupenone(**1**),  $\beta$ -amyrin(**2**),  $\psi$ -taraxasterol-acetate(**6**), taraxasterol acetate(**7**), 3-O-acetyl-lupeol (**8**), lanosterol (**9**), 3 $\alpha$ -hydroxy-olean-12-en-30ol(**10**),  $\alpha$ -amyrone (**11**),  $\alpha$ -amyrine (**12**),  $\beta$ -acetoxy-amyrine (**15**), betuline-aldehyde (**17**), bachara-12,21-dien-3 $\beta$ -ol (**18**), erythrodiol (**19**), 2 monoterpeneic alcohols:  $\alpha$ -terpineol (**13**), 1,8-terpineol (**14**), 4 diprenyl flavonoids: lochocarpol-A(**4**), 6,8-diprenyl-eriodictyol (**5**), 6,8-diprenyl-aromadendrin (**20**), lespendese-flavone-C(**21**) and one fatty acid ester: palmitic acid ethyl-ester(**16**). Based on published studies [Talla *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014] the compounds **2,4-8, 10-12** and **14-21**, are found for the first time in Cameroon's propolis, while the compounds **4-7, 10, 14** and **17-21** are reported in propolis **for the first time worldwide**.

All the extracts and the 21 mentioned isolated compounds were silylated and a mixture of normal hydrocarbons was added, for the determination of the (RI) indices. From that procedure the RI indices were found for the 14 pure isolated triterpenoids and the two monoterpeneic alcohols, but there was no satisfactory result for the four diprenyl flavonoids. From the GC-MS analyses it was found that all samples were rich in triterpenoids and polyphenols. Through this analyses four additional triterpenoids were identified but not isolated in samples 2 and 3 of Cameroon: stigmastadiene, 8,24 lanostadiene,  $\alpha$ -acetoxy-amyrine, parkeol, two monoterpeneic alcohols:  $\beta$ -fenchol and 2-methyl-cyclohexanol and one benzofuran-dione: 2,2 dimethyl-6-prop-2-enyl-benzofuran-4,7-dione. From those only  $\beta$ -acetoxy-amyrine was previously reported in propolis [Rushdi *et al.*, 2014].

Additionally, Total Polyphenol Content (TPC) was estimated for each sample by Folin-Ciocalteu method. Higher content in phenolic compounds showed the samples **1** and **4** which was also confirmed by the GC-MS analyses of their ethanol extracts. Also, the four samples were studied for their antimicrobial action against two Gram(+) bacteria, four Gram(-) bacteria and three fungi and found to have a little antibacterial and antifungal activity, with that of samples **1** and **4** to be stronger due to their higher concentration in phenolic compounds.

Finally it should be noted that the intense presence of triterpenoids in all samples and especially the derivatives of amyrine and lupeol agrees with the studies published so far for the African propolis and have been analysed in the introduction of the present study [Hegasi *et al.*, 2007,; Talla *et al.*, 2013; Rushdi *et al.*; Zhang *et al.*, 2013]. Also the intense presence of diprenylflavonoids, which were isolated from the samples **1** and **4** is probably correlated with the corresponded prenylated flavonoids, mentioned in the chemical classification, published in Malaoui's and Nigeria's propolis [Zhang *et al.*, 2014].

According to our study, studied sample of propolis from Congo and Cameroon present exhibit special interest for further investigations. It seems, that a good quality criterium for the qualitative profile of propolis might be the GC-MS, while the Total Polyphenol Content method is especially useful for their further quantitative determination.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abozid M.M, Ahmed A.A. Chemical composition of Egyptian and commercial propolis and its effects on liver function and lipid profiles in albino rats. *J. of Biological Chem.Sci.* 8(2): 323-340 (2013)
- Adams R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas-Chromatography/Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> Edition:1-804 (2007)
- Afoulous S, Ferhout H, Raoelison E.G, Valentin A, Moukarzel B, Couderc F, Bouajila J. *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. *Molecules*16: 8273-8291 (2011)
- Ageta H, Arai Y. Fern constituents: Pentacyclic triterpenoids isolated from *Polypodium niponicum* and *P.formosanum*. *Phytochemistry* 22(8): 1801-1808 (1983)
- Ahmed Z, Ali D, Malic A. Structure determination of ursene-type triterpenes by NMR techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry*44(7): 717-719(2006)
- Ahn M. R, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*101(4): 1400-1409 (2007)
- Akihisa T, Kimura Y, Tamura T. Bacchara-12,21dien-3 $\beta$ -ol from the seeds of *Glycine max*. *Phytochemistry* 37(5): 1413-1415 (1994)
- Aktar F.M, Kaiser M.A, Hasan C.M, Rashid M.A. Phytochemical and biological investigations of *Ixora arborea* Roxb. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 8(2): 161-166 (2009)
- Al-Ghamdi A.A, Nuru A, Khanbash M.S, Smith D.R. Geographical distribution and population variation of *Apis mellifera jemenitica* Ruttner. *Journal of Apicultural Research* 52(3): 124-133 (2013)
- Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J.Nat. Prod.* 57: 644-647 (1994)
- Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. *Aust. Endod. J.* 35: 52-58 (2009)
- Bahtiti N.H. Study of preservative effect of propolis on the storage quality of mashed potatoes. *Food Science and Technology* 1(2): 17-20 (2013)
- Bankova V, Marcucci M.C, Simova S, Nikolova N, Kujumdjiev A, Popov S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch.* 50c: 277-280 (1996)

- Bankova V, Christov R.S, Tejera A.D. Lignans and other constituents of propolis from Canary Islands. *Phytochemistry* 49: 1411-1415 (1998i)
- Bankova V, Christov R, Marcucci C, Popov S. Constituents of Brazilian geopropolis Z. *Naturforsch.* 53c: 402-406 (1998ii)
- Bankova V, De Castro S.L, Marcucci M.C. Standardization of propolis: Present status and perspectives. *Bee World.* 81: 182-188 (2000i)
- Bankova V.S, Castro S.L, Marcucci M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3-15 (2000ii)
- Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini A.G. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforsch.*57c: 530-533(2002)
- Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100: 114-117 (2005)
- Banskota A.H, Tezuka Y, Prasain J. K, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J.Nat. Prod.*61: 896-900 (1998)
- Banskota A.H, Tezuka Y, Adnyana I.K, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas A.A, Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol.* 72: 239-246 (2000)
- Banskota A.H, Tezuka Y, Kadota S.H.Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research.*15: 561-571 (2001)
- Barros M.P, Sousa J.P. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 110: 567-571 (2007)
- Barros.F. Amyrine esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*19: 1268-1276 (2011)
- Bartolome A.P, Villaseñor I.M, Yang W.C. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine:* 1-51 (2013)
- Bignell C. M, Dunlop P.J, Brophy J.J. Volatile leaf oils of some Queensland and Northern Australian species of the genus *Eucalyptus* (Series II) Part II. Subgenera (a), *Blakella*(b), *Corymbia*(c), *Unnamed*(d), *Idiogenes*(e), *Monocalyptus* and *Symphyomyrtus* (f).*Flavour Fragr. J.* 12: 277-284 (1997)
- Bufalo M.C, Figueiredo A.S, Sousa J.P.B. Anti-poliovirus activity of *B.dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1669-1680 (2009)

- Burdock G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chem. Toxicol.* 36: 347-363 (1998)
- Cambo F.M, Cuesta-Rubio O, Perez A.R, Montes De Oca Porto R, Marquez-Hernandez I, Piccinelli A.L, Rastrelli L. Determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *J.Agric.Food Chem.* 56: 9927-9932 (2008)
- Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 73: 1-6 (2002)
- Chan Y.Y, Li C.H, Shen Y.C, Tian-Shung W.U. Anti-inflammatory principles from the stem and root barks of *Citrus medica*. *Chem. Pharm. Bull.* 58(1): 61-65 (2010)
- Chen C.N, Wu C.L, Lin J.K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology* 67: 53-66 (2004)
- Chen C.N, Wu C.L, Lin J.K. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. *Cancer Lett.* 245(1-2): 218-231 (2007)
- Chen Y.W, Wu S.W. Characterization of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 412-419 (2008)
- Chernyak N.F. On synergistic effect of propolis and some anti-bacterial drugs. *Antibiotiki* 18: 259-261 (1973)
- Chien S.C, Xiao J.H, Tseng Y.H, Kuo Y.H, Wang S.Y. Composition and antifungal activity of balsam from *Liquidambar formosana* Hance. *Holzforschung De Gruyter* 1-7 (2012)
- Chinou I. Chemical and biological activities of propolis and Royal jelly of Greek origin. 4<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products. The application of chromatographic methods in phytochemical & biomedical analysis, Lublin- Kazimierz, Dolny, Poland. (Oral presentation) June 14-17 (2004)
- Chinou I. Chemistry and biological activities from Greek bee-keeping products (honeys, propolis and royal jelly). History and new prospects. Phytotherapy the role of an ancient tradition in modern times. Funchal, Madeira (Portugal), (Oral presentation) November 1-5 (2005)
- Chinou I. Chemical constituents and bioactivities of honeys, propolis and royal jelly of Greek origin. Department of Organic Chemistry University of Sofia-Bulgaria (Oral presentation) 31 May (2006)

- Chinou I. Chemical analysis of propolis and Royal jelly. Evaluation of their biological activities. HMPC Informal Meeting, German Presidency, Bonn, Germany, (Oral presentation) March 28-30 (2007)
- Choudhari M.K, Haghniaz R, Rajwade J.M, Paknikar K.M. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an *in vitro* study. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 13: 1-10 (2013)
- Christov R, Bankova V, Hegazi A, El-Hadi F.A, Popov S. Chemical composition of Egyptian propolis, *Z. Naturforsch.* 53c: 197-200 (1998)
- Christov R, Bankova V, Tsvetkova I, Kujumgiev A, Delgado-Tejera. A. Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis. *Fitoterapia* 70: 89-92 (1999)
- Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* 19(7): 673-678 (2005)
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79: 213-220 (2002)
- Coggs W, Morse R.A. Beeswax: production, harvesting, processing and products. *Wicwas Press*, Ithaca, NY, USA.1-192 (1984)
- Cuesta-Rubio O, Velez-Castro H, Frontana-Urribia B.A, Cardenas J. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Jack. Phytochemistry* 57: 279-283 (2001)
- Cuesta-Rubio O, Frontana-Urribia B.A, Ramirez-Apan T., Cardenas J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis, biological activity of nemorosone. *Z. Naturforsch.*57c: 372-378 (2002)
- Cuesta Rubio O, Piccinelli A.L, Fernandez M.C, Hernandez I.M, Rosado A, Rastrelli L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J.Agric.Food. Chem.* 55: 7502-7509 (2007)
- Da Silva D.B, Fernandes E.F.A, De Santis L, Ferreira D, Callejon R, Guaratini T, Norberto J, Lopes C, Meyre-Silva C, Filho V.C, Lopes N.P. Megastigmanes from *Aleurites moluccana* (L.) Willd. (Euphorbiaceae) *Systematics and Ecology* 40: 34-37 (2012)
- Dania F, Bazeldze N, Chinou I, Melliou E, Rallis M, Papaioannou G. In vivo Antidiabetic activity of Greek propolis and Royal Jelly.7<sup>th</sup> Joint meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, Athens, August 3-8 (2008)



- Debiaggi M, Tateo F, Pagani L, Luini M, Romero E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica* 13: 207-213 (1990)
- De Castro S.L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Ann. Rev. Biomed. Sci.* 3: 49-83 (2001)
- Dekebo A, Dagne E, Gautun O.R, Aasen A.J. Triterpenes from the resin of *Boswellia neglecta*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 16(1): 87-90 (2002)
- Dickson R.A, Annan K, Fleischer T.C.F, Amponsah I.K, Nsiah K, Oteng J.A Phytochemical investigations and nutritive potential of eight selected plants from Ghana. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 2: 172-177(2012)
- Donadieu Y. La propolis. *Editions Maloine*, Paris (1979)
- Dongock D.N, Thoumboue J, Ricciardelli-D'albore G, Youmbi E, Pinta Y.J. Spectrum of melliferous plants used by *Apis mellifera adansonii* in the Sudano-Guinean Western highlands of Cameroon. *Grana* 46: 123-128 (2007)
- Dulcetti O.J.R, Andreucci V.C, Cunha I.B.S, Araújo C.E.P, Oliveira F, Marcucci M.C. Investigations of the anti-inflammatory and analgesic activities of a sample of Brazilian propolis. *Acta Farm Bonaerense* 23: 285-291 (2004)
- Duffall K.G, Ngadjui B.T, Simeon K.F, Abegaz B.M, Croft k.d. Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia manii*. *J.ofEthnopharmacol.* 87(1): 67-72 (2003)
- Emmons G.T, Wilson W.K, Schroepfer G.J. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR Assignments for Lanostan-3β-ol derivatives: Revised Assignments for Lanosterol. *Magnetic Resonance in Chemistry* 27: 1012-1024 (1989)
- Faten K, El-Hady A, Hegazi A.G. Egyptian propolis 2. Chemical composition, antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Z.Naturforsch.* 57c: 386-394 (2002)
- Feleke S, Brehane A. Triterpene compounds from the latex of *Ficus sur* I. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 19(2): 307-310 (2005)
- Fidalgo L.M, Ramos I.S, Parra M.G, Cuesta-Rubio O, Hernandez I.M, Fernandez M.C, Piccinelli A.L, Rastrelli L. Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Nat.Prod.Comm.* 6(7): 973-976 (2011)
- Fohouo F.N.T, Tope S.F, Mbianda A.P, Messi J, Bruckner D. Foraging behavior of *Apis mellifera adansonii* (Hymenoptera: Apidae) on *Combretum nirigans*, *Erythrina sigmoidea*, *Lannea kerstingii* and *Vernonia amygdalina* flowers at Dang (Ngaoundere, Cameroon). *International Journal of Tropical Insect Science.* 30(1): 40-47 (2010)

- Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins *J. Biol. Chem.* 73: 627-550 (1927)
- Fourneau C, Hocquemiller R, Cav A. Triterpenes From *Prunus africana* Bark. *Phytochemistry*.42 (5): 1387-1389 (1996)
- Freitas S.F, Shinohara L, Sforcin J.M, Guimarães S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13(3): 170-175 (2006)
- Furukawa S, Takagi N, Ikeda T, Ono M, Nafady A.M, Nohara T, Sugimoto H, Doi S, Yamada H. Two novel long-chain alcanoic acid esters of lupeol from alecrim-propolis. *Chem. Pharm. Bull.* 50f: 439-440 (2002)
- Garcia-Viguera C, Greenaway W, Whatley F. R. Composition of propolis from two different Spanish regions. *Z. Naturforsch.* 47c: 634-637 (1992)
- Gekker G, Hy S, Spivak M, Lokensgard J.R., Peterson P.K. Anti HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *J. Ethnopharmacol.* 102: 158-163 (2005)
- Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84 (1979)
- Golder W. Propolis. The bee glue as presented by the Graeco-Roman literature. *Wurzburg Medizinhist Mitt* 23: 133-145 (2004)
- Graikou K, Gortzi O, Lalas S, Chinou I. Chemical composition biological activities of selected samples of propolis from South Greece. 58<sup>th</sup> Annual Congress of Ga, Berlin, Germany (2010)
- Graikou K, Popova M, Gortzi O, Bankova V, Chinou I Qualitative analysis and biological evaluation of selected propolis samples all over the world. 8<sup>th</sup> Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, USA 28 July (2012)
- Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley F.R. The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. *Bee world* 71: 107-118 (1990)
- Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K. Referential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia.* 44: 230-232 (1988)
- Guo X, Chen B, Luo L, Zhang X, Dai X, Gong S. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. *J Agric Food Chem.* 59: 1210-1216 (2011)
- Gutfinger T. Phenols in olive oils. *JAOS* 58: 966-998 (1981)
- Haborne J.B, Greenham J, Williams C.A, Eagles J, Markham K.R. Ten isoprenylated and C-methylated Flavonoids from the leaves of three *Vellozia* species. *Phytochemistry* 34(1): 219-226 (1993)

- Hakki Z, Cao B, Heskes A.M, Goodger J.Q.D, Woodrow I.E, Williams S.J. Synthesis of the monoterpenoid esters cypellocarpin C and cuniloside B and evidence for their widespread occurrence in Eucalyptus. *Carbohydrate Research* 345: 2079-2084 (2010)
- Hegazi A, Faten A.E.H. Egyptian propolis: Antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z. Naturforsch.* 56c: 82-88. (2001)
- Hegazi A, Faten K. Inhibitory effect of Egyptian propolis on *Fasciola gigantica* eggs with reference to its effect on *Clostridium oematiens* and correlation to chemical composition. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(19):3295-3305 (2007)
- Hegazi A.G, Fatma A, Raboh A, Ramzy N.A, Shaaban D.M, Khader D.Y. Bee venom and propolis as new treatment modality in patients with localized plaque psoriasis. *International Research Journal of Medicine and Medical Science.* 1(2): 27-33 (2013)
- Hill K.D, Johnson A.S. Study of essential oils of *Eucalyptus resinifera* Smith, *E.tereticornis* Smith and *Corymbia maculata* (Hook.). *Flavour Fragr. J.* 17: 1-4 (2002)
- Hernandez I.M, Fernandez M.C, Cuesta-Rubio O, Piccinelli A.L, Rastrelli L. Polyprenylated benzophenones derivatives from Cuban propolis. *J. Nat. Prod.* 68(6): 931-934 (2005)
- Ingram V. Sweet, Sticky, and Sustainable Social Business. *Ecology & Society* 16(1): 1-37 (2011i)
- Ingram V. Melliferous plants for Cameroon Highlands and Adamaoua Plateau honey. 1-22 (2011ii)
- Ingram V. Governing Forest Commons in the Congo Basin: Non-Timber Forest Product Value Chains. Centre for International Forestry Research, Indonesia and University of Amsterdam, the Netherlands 13<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for study of the commons, Hyderabad, India: 1-16 (2011iii)
- Isidorov V.A, Szczepaniak L, Bakier S. Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry* 142: 101-106 (2014)
- Ito J, Chang F.R, Wang H.K, Park Y.K, Ikegaki M, Kilgore N, Lee K.H. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid from Brazilian propolis. *J.Nat.Prod.* 64 (10): 1278-1281 (2001)
- Jamal A.K, Yaacob W.A, Din L.B. A chemical study on *Phyllanthus columnaris*. *European Journal of Scientific Research* 28(1): 76-81 (2009)
- Januzzi J. High profits from Lowly propolis. *Am. Bee J.*4: 237-238 (1990)
- Januzzi J. Propolis collectors. *Am. Bee J.* 6: 104-107 (1993)
- Joshi H, Joshi A.B, Sati H, Gururaja M.P, Shetty P.R, Subrahmanyam E.V.S, Satyanaryana D. Fatty acids from *Memecylon umbellatum*. *Asian J.Research Chem.* 2(2):178-180 (2009)

- Kapche G.D.W.F, Amadou D, Waffo-Teguo P, Jean H, Donfack J.H, Christian D, Fozing C.D, Harakat D, Tchana A.N, Jean M, Mérillon J.M, Moundipa P.F, Ngadjui B.T, Berhanu M, Abegaz B.M. Hepatoprotective and antioxidant arylbenzofurans and flavonoids from the twigs of *Morus mesozygia*. *Planta Med* 77: 1044-1047 (2011)
- Kaplan J.K. What's buzzing with the Africanized honey bees? *USDA Agricultural Research Magazine*.52: 4-8 (2004)
- Kawsar S.M.A, Mostafa G, Nahar N, Huq E. Chemical constitutions and hemolytic activity of *Marotyloma uniflorum* Linn. *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 3(1): 69-72 (2009)
- Kayyal M.T, El-Ghazaly M.A, El-Khatib A.S. A clinical pharmacological study on the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 17:93-102 (2003)
- Khachaturov A.A, Gudkov A.I. Propolis therapy of certain dermatoses and burns in the far north. *Vestn.Dermatol Venerol.* 43: 63-65 (1969)
- Khajista J, Ahmad E. Athar M. Antifungal compounds from *Melia azedarach* leaves for management of *Ascochyta rabiei*, the cause of chickpea blight. *Natural products research* 25(3): 264-276 (2011)
- Kedzia B, Iwaszkiewicz J, Geppert B. Pharmacological investigations on ethanolic extract of propolis. *Herba Polonica* 34: 243-53 (1988)
- Kedzia B., Geppert B., Iwaszkiewicz J. Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytotherapie* 6:7-10 (1990)
- Knapp K, Graikou K, Chinou I, Knöss W. Modern approaches to characterise the quality of propolis. 58<sup>th</sup> Annual Congress of Ga, Berlin, Germany (2010)
- Knapp K, Orland A, Graikou K, König G.M, Chinou I, Knöss W. Modern approaches to characterise the quality of propolis. International Society of Ethnopharmacology (ISE), Traditional medicines and globalization the future of ancient systems of medicine, Kolkata, India.(2012)
- Koenig B. Plant sources of propolis. *Bee world* 66: 136-139 (1985)
- Koorbanally C, Crouch N.R, Mulholland D.A, Fort P.O. The phytochemistry and ethnobotany of the southern African genus *Eucomis* (Hyacinthaceae: Hyacinthoideae) Kerala, India, *Phytochemistry: Advances in Research.* 69-85 (2006)

- Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsuno T, Zydowicz G, Shani J, Mos M. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J. Ethnopharmacol.* 55: 19-25 (1996)
- Kuete V, Voukeng I.K, Tsobou R, Mbaveng A.T, Wiench B, Beng V.P, Efferth T. Cytotoxicity of *Elaeophorbium drupifera* and other Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multidrug resistant cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(250): 1-8 (2013)
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T, Nakayama T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *J Agric Food Chem.* 50: 4777-4782 (2002)
- Kumazawa S., Nakamura J. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behaviour observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften* 95: 781-786 (2008)
- Kuropatnicki A.K, Szliszka E, Krol W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Hindawi Publishing Corporation Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 1-11 (2013)
- Kushiro T, Shibuya M, Ebzuka Y.  $\alpha$ -Amyrin synthase. Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* 256:238-244 (1998)
- Lejeune B, Pourrat A, Dehmouche H. Propolis utilisation en dermocosmetologie. *Parfums, Cosmetiques Aromes.* 8(2): 73-77 (1988)
- Li J, Wang M. Two flavanones from the root bark of *Lespedeza davidii*. *Phytochemistry* 28(12):3564-3566 (1989)
- Ling S.K, Fukumari S, Tomii K, Tanaka T, Kouno I. *Journal of Tropical Forest Science* 18(1): 81-85 (2006)
- Liu B, Dong X, Lin X, Mo J, Zhang Y, Su X, Liu B. Chemical components of the essential oil from *Callistemon rigidus* R. Br. *Qinghua Daxue Xuebao/ Journal of Tsinghua University* 50(9): 1437-1439 (2010)
- Lobreau-Callen D, Damblon F. Pollen spectra of honey *Apis mellifera* L. and vegetation zones in West-tropical Mediterranean Africa. *Grana.* 33: 245-258 (1994)
- Lotti C, Cambo-Fernandez M, Piccinelli A.L, Cuesta-Rubio O, Hernandez M.I, Rastrelli L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J.Agric.Food.Chem.* 24(58): 2209-2213 (2010)
- Mahato B, Kundu A.P.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37(6): 1517-1575 (1994)

- Mahmoud M.A. Profiles of drug substances excipients and related methodology. Analytical profiles of drug substances 14: 273-323 (1985)
- Makana J.R, Thomas S.C. Impacts of selective logging and agricultural clearing on forest structure, floristic composition and diversity and timber tree regeneration in the Ituri Forest, Democratic Republic of Congo. Biodiversity and Conservation 15: 1375-1397 (2006)
- Manguro L.A.O, Midiwo J.O, Kraus W, Ugi I. Benzoquinone derivatives of *Myrsine africana* and *Maesa lanceolata*. *Phytochemistry*. 64: 855–862 (2003)
- Manguro L.O.A, Lemmen-Hao P, Wong K.C. Triterpene saponins of *Maesa lanceolata* stem wood. *Journal of Asian Natural Products Research* 14(11): 987–1001 (2012)
- Marcucci M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutical activity, *Apidologie* 26: 83-99 (1995)
- Marcucci M. C, Bankova V. S. Chemical composition, Plant origin and Biological activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry* 2: 115-123 (1999)
- Marin R.M, Alarcon A.B, Cuesta-Rubio O, Piccinelli A.L, Rastrelli L. Polyprenylated benzophenones from *Clusia minor* fruits. *Lat.Am.J.Pharm.* 27(5): 762-765 (2008)
- Marquez H, Cuesta-Rubio O. Studied on the Constituents of yellow Cuban propolis, GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *J.Agric.Food.Chem.*58(8): 4725-4730 (2010)
- Martos I, Cossentini M, Ferreres F, Barderan-Tomas.F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J.Agric.Food Chem.*45: 2824-2829 (1997)
- Matsushige K, Kusumoto I.T, Yamamoto Y, Kadota S, Namba T. Quality evaluation of propolis. A comparative study on radical scavenging effects of propolis and vespaee nidus. *J.Trad.Med.*12: 45-53 (1995)
- Matu E.N. *Vepris verdoorniana* (Exell & Mendoca). *Acta.Univ.Upsal.* 30(1): 76 (1992)
- Mavri A, Abramovic H, Polac T, Bertocej J, Jasmnik P, Mozine S.S, Jersek B. Chemical properties and Antioxidant and Antimicrobial activities of Slovenian propolis. *Chemistry & Biodiversity* 9: 1545-1558 (2012)
- Melliou E, Chinou I. Chemical analysis and Antimicrobial activity of Greek propolis constituents. 51<sup>st</sup> Annual Congress (Society Medicinal Plant Research), Kiel, Germany, September 1-4 (2003)
- Melliou E, Chinou I. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis constituents. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Natural Drugs, Naples, Italy, October 2-4 (2003)
- Melliou E, Chinou I. Chemical analysis and Antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Med.* 70: 515-519 (2004)

- Melliou E, Stratis E, Chinou I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-antimicrobial activity. *Food Chemistry* 103: 375-380 (2007)
- Melnikova N, Burlova I, Kiseleva T, Klabukova I, Gulenova M, Kislitsin A, Vasin V, Tanaseichuc B. A practical synthesis of betulonic acid using selective oxidation of betulin on Aluminium solid support. *Molecules* 17: 11849-11863 (2012)
- Menezes H, Alvarez J.M, Almeida E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzeimittelforsch.* 49: 705-707 (1999)
- Meragelman K.M. Anti-HIV Prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. *J.Nat.Prod.* 64: 546-548 (2001)
- Miguel M.G. Chemical and biological properties of propolis from the Western countries of the Mediterranean basin and Portugal. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(3): 403-409 (2013)
- Miguel M.G, Doughmi O, Aazza S, Antunes D, Lyoussi B. Antioxidant, Antiinflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.* 23(1): 313-322 (2014)
- Mirzoeva O.K, Calder P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 55: 441-449 (1996)
- Mishima S, Yoshida C, Akino S, Sakamoto T. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28(10): 1909-1914 (2005)
- Mitamura T, Matsuno T, Sakamoto S, Maemura M, Kudo H, Suzuki S, Kuwa K, Yoshimura S, Sassa S, Nakayama T, Nagasawa H. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. *Anticancer Res.* 16: 2669-2672 (1996)
- Mouse H.A, Tilaoui M, Jaafari A, Mbarek L.A, Aboufatima R, Abderrahmane C, Zyad A. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* anticancer properties of Moroccan propolis extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 558-567 (2012)
- Nana F, Sandjo L.P, Keumedjio F, Kuete V, Ngadjui B.T. A new fatty aldol ester from the aerial part of *Mimosa invisa* (Mimosaceae). *Natural Product Research* 26(19): 1831-1836 (2012)
- Ndelebe V.J, Crouch N.R, Mulholland D.A. Triterpenoids from the African tree *Phyllanthus polyanthus*. *Phytochemistry Letters* 1(1): 11-17 (2008)
- Ngadjui B.T. Geranylated and prenylated flavonoids from the twigs of *Dorstenia mannii*. *Phytochemistry* 48(2): 349-354 (1998)

- Ngagegni-Limbili C.A, Cerny B.Z.M, Gouolally Tsiba G, Ndinga A.E.M, Mouloungui Z, Fourastier I, Ouambab J.M., *Aframomum spiculatum* (Gagnep) K. Schum and *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hanb) K Schum as Aroma Tincto Oleo Crops resources: essential oil, fatty acids, sterols, tocopherols, and tocotrienols composition of different fruit parts of Congo varieties. *J Sci Food Agric.* 93: 67-75 (2013)
- Nunes C.A, Guerreiro J. Characterisation of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. *Sci. Food Agric.* 92: 433-438 (2012)
- Opute F.I. Lipid and sterol composition of the pollen of the West African oil palm, *Elaeis guineensis*. *Phytochemistry* 14: 1023-1026 (1975)
- Orsolich N, Knezevic A.H, Sver L. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.* 94: 307-315 (2004)
- Orsolich N, Benkovic V, Knezevic A.H, Kopjar N, Kosalec I, Bakmaz M, Mihaljevic Z, Bendelja K, Basic I. Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds. *Biol.Pharm.Bull.* 30(5): 946-951 (2007)
- Oyaizu M, Ogihara H, Fujimoto Y. Antioxidative activity of extracts from propolis. *J. Jap. Oil Chem Soc.* 48: 135-138 (1999)
- Ozturk F, Kurt E, Cerci M. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res.* 32: 13-18 (2000)
- Papachroni D, Graikou K, Chinou I, Kosalec I, Ingram V. Triterpenic Content and Biological Evaluation of Selected Cameroon propolis samples. A joint Meeting of TERPNET, Kolymvari, Crete, Greece, June 1-5 (2013)
- Papachroni D, Graikou K, Ingram V, Kosalec I, Chinou I. Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples, 5<sup>th</sup> International BBBB Conference, Athens, Greece, September 26-28 (2013)
- Papotti G, Bertelli D, Bortolotti L, Plessi M. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *J. Agric. Food. Chem.* 60: 2852-2862 (2012)
- Park Y.K, Koo M.H, Ikegaki M, Cury J.A, Rosalen P.L. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Rev. Microbiologia* 29: 143-148 (1998)
- Park Y.K, Alencar S.M, Aguiar C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 2502-2506 (2002)
- Pascual C, Gonzalez R, Torricella R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. Ethnopharmacol.* 41: 9-13 (1994)



- Pathak N.K.R, Neogi P, Biswas M, Tripathi Y.C. Pandey V.B. Betulin aldehyde, an antitumor agent from the bark of *Tectona grandis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50(2): 124-125 (1988)
- Payette A. Les Apoides du Quebec: Abeilles et agriculture. *L'Abeille* 16(4): 14-15 (1996)
- Pellati F, Benvenuti S, Yoshizaki F, Bertelli D, Rossi M.C. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84: 103-111 (2013)
- Pereira A.S, Bicalho B, Neto F.R.D.A. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* 34: 291-298 (2003)
- Petrova A, Popova M. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* 81: 509-514 (2010)
- Phan V.K, Quang T.H, Huang T.T, Nhung L.T.M, Cuong N.X, Minh C.V, Choi E.M, Kim Y.H. Chemical Constituents of *Acanthus ilicifolius* L. and effect on osteoblastic MC3T3E1 cells. *Arch Pharm Res.* 31(7): 823-829 (2008)
- Piccinelli A.L, Menchenrini T, Celano R, Mouhoubi Z, Tamendjari A, Aquino R.P, Rastrelli L. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian Propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 61(21): 5080-5088 (2013)
- Pino J.A, Marbot R, Quert R, Garcia H. Study of essential oils of *Eucalyptus resinifera* Smith, *E.tereticornis* Smith and *Corymbia maculata* (Hook.). *Flavour Fragr. J.* 17: 1-4 (2002)
- Pohjaia L, Alakurtti S, Ahola T, Kauhaluoma J.Y, Tammela P. Betulin-derived compounds as inhibitors of alphavirus replication. *J.Nat. Prod.* 72(11): 1917-1926 (2009)
- Popova M, Widelski J, Graikou K, Skalicka-Wozniak, Glowniak K, Bankova V. Chinou I. Chemical analysis of Polish propolis- Antimicrobial activity. 6<sup>th</sup> International Congress on Natural Products, Lublin, Poland, June 15-18 (2008)
- Popova M, Bankova V, Chinou I. Chemical and biological evaluation of propolis samples from Crete-Greece .6<sup>th</sup> International Congress on Natural Products, Lublin, Poland, June 15-18 (2008)
- Popova M, Graikou K, Bankova V, Chinou I. Chemical composition of 10 selected samples of Mediterranean propolis. 7<sup>th</sup> Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, Athens, August 3-8 (2008)
- Popova M, Chinou I, Bankova V. New antibacterial terpenes of Cretan propolis. 57<sup>th</sup> Annual Congress of Ga, Geneva, Switzerland (2009i)
- Popova M, Chinou I.B, Marekov I.N, Bankova V.S. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70 (10): 1262-1271 (2009ii)

- Popova M, Graikou K., Chinou I, Bankova V. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J. Agric. Food. Chem.*58: 167-176 (2010)
- Popova M, Trusheva B, Antonova D. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry* 126: 1431–1435(2011)
- Popova M, Trusheva B, Cutajar S, Antonova D, Misfud D, Farrugia C, Bankova V. Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis. *Natural Product Communications* 7: 569-570 (2012)
- Prachayasittikul S, Saraban P, Cherdtrakulkiat R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *Diospyros rubra* Lec.*EXCLI Journal* 9: 1611-1615 (2010)
- Pratsinis H, Kletsas D, Melliou E. Chinou I Antiproliferative activity of Greek propolis. *Journal of Medicinal Food.*13(2): 286-290 (2010)
- Quintão N.L.M, Antonialli C.S, Da Silva G.F, Rocha L.W, De Souza M.M, Bresolin T.M, Filho V.C. *Aleurites moluccana* and its main active ingredient, the flavonoid 2''-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 102: 302-311 (2012)
- Rai M.K, Cardell G.A, Martinez J.L, Manikoff M, Rastrelli L. (Editors).Cuesta-Rubio O, Piccinelli A.L., Rasrtelli L. Medicinal plants Biodiversity and Drugs. *CRC Press* 8: 210-240 (2012)
- Ramadan M.A, Ahmad A.S, Nafady A.M, Mansour A.I. Chemical composition of the stem bark and leaves of *Ficus pandurata* Hance. *Natural Product Research* 23(13): 1218-1830 (2009)
- Reynolds W, McLean S, Poplawski J. Total assignment of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H Spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: An investigation of the potential utility of <sup>1</sup>H Chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron* 42(13): 3419-3428 (1986)
- Roussis V, Stephen A. Flavanones from *Lonchocarpus minimiflorus*. *Phytochemistry* (26): 2371-2375 (1987)
- Rushdi A.I, Adgaba N, Bayaqoob N.I.M, Al-Khazim A, Simoneit B.R.T, El-Mubarak A.H, Al-Mutlaq K. Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *SpringerPlus* 3(253): 1-9 (2014)
- Ruttner F, Tassencourt L, Louveaux J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9: 363-381 (1978)
- Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honey bees, Berlin, Germany. *Springer-Verlag*: 12-284 (1988)

- Salatino A, Teixeira E.W, Origin and Chemical Variation of Brazilian propolis. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2: 33-38 (2005)
- Salatino A, Salatino M.L.F. Propolis: A complex product with mixed origin. Beneficial effects of propolis on human health and chronic diseases. *Botanical Research and Practises* (1): 39-68(2012)
- Santos V.R. Propolis: Alternative Medicine for the Treatment of Oral Microbial Diseases. *Alternative Medicine* 7: 134-169 (2012)
- Scazzocchio F, D'Auria F.D, Alessandrinia D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* 161:327-333 (2006)
- Scheller S, Gazda G, Krol W, Czuba Z, Zajusz A, Gabrys J, Shani J. The ability of ethanolic extract of propolis (EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch.* 44c: 1049-1052 (1989)
- Schneider S.S, McNally L.C. Factors influencing seasonal absconding in colonies of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata*. *Ins.Soc.* 39: 403-423 (1992)
- Segueni N, Zellagui A, Moussaoui F, Lahouel M, Rhouati S. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry* (Article in press) (2013)
- Seo E.K, SilvaG.L, Chan H.B, Chagnedera T.E, Farnsesworth N.R, Cordelle G.A, Pezzuto J.M, Kinghorn A.D. Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. *Phytochemistry* 45(3): 509-515 (1997)
- Serkedjieva J, Manolova N, BankovaV. Anti-influenza virus effect of propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids).*J.Nat. Prod.* 55: 294-302 (1992)
- Sforcin J.M, Fernandes J.A, Lopes C.A.M, Bankova V, Funari S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73: 243-239 (2000)
- Sforcin J.M, Fernandes J.A, Lopes.C.A.M, Bankova V, Funari. S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicallis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 8: 19-29 (2001)
- Sforcin J.M, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133: 253-260 (2011)
- Shi H, Yang H, Zhang X, Yu L.L. Identification and Quantification of Phytochemical Composition and Anti-inflammatory and Radical Scavenging Properties of Methanolic extracts of Chinese propolis. *J. Agric. Food Chem.*60: 12403-12410 (2012)

- Silva B.B, Rosalen P.L, Cury J.A, Ikegaki M, Souza V.C, Esteves A, Alencar S.M. Chemical composition and Botanical Origin of Red Propolis, a new type of Brazilian Propolis. *eCAM* 5(3): 313-316 (2008)
- Singleton V. L, Joseph A, Rossi J.R, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3): 144-158 (1965)
- Singleton V. L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178 (1999)
- Skaskovskii E.D, Lamotkin S.A, Shpak S.I, Tychinskaya L.Y, Gaidukevitch O.A, Lamotkin A.I. Application of NMR spectroscopy for analysis of pine needle essential oil. *J.Applied Spectr.* 37(2): 275-279 (2006)
- Sodipo O.A, Abdulrahman F.I, Alemika T.E, Gulani I.A, Akinniyi J.A. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacy & Bioresources* 7(2): 164-172 (2010)
- Spencer W.G (Editor), Celsus A. *De Medicina* Harvard University Press 5(3) (1971)
- Stratis E, Kretsi E, Chinou E, Chinou I. In vitro antimicrobial activity of the essential oils of Greek propolis. 12<sup>th</sup> European congress of clinical microbiology and infectious diseases Milan, Italy 24-27 April (2002)
- Sun F, Hayami S, Haruna S. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 1462-1465 (2000)
- Suresh A, Feng L, Onozuka H. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16: 181-189 (2008)
- Susanti D, Amiroudine M.Z, Rezali M.F, Taher M. Friedelin and lanosterol from *Garcinia prainiana* stimulated glucose uptake and adipocytes differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Nat.Prod. Res.* 27(4-5): 417-424 (2013)
- Suzuki I, Takai H, Koide M, Yamamoto H. Anti-tumor effect of immunologically active fractions obtained from Brazilian propolis, given in combination with anticancer drug in Ehrlich carcinoma bearing mice. *Mitsubachi kagaku* 17: 1-6 (1996)
- Takai H, Yamamoto H, Suzuki I. The effect against antitumor and recovery of leukopenia by combined use of water soluble propolis and antitumor drug (5-FU). *Igaku to Seibutsugaku* 132: 311-316 (1996)

- Takaisi-Kinuni N.B, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 60: 222-227 (1994)
- Tala M.F, Tan N.H, Ndontsa B.L, Tane P. Triterpenoids and phenolic compounds from *Crotonmacrostachyus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 51: 138-141 (2013)
- Talla E, Dabole B, Taiwe G.S, Ngo-Bum E, Mbafor J.T, Atchade A.D.T, Malik R, Zulfiqar A, Sidiki N, Nguimbou R.M, Choudhary M.I. Antonociceptive pentacyclic triterpenoids from the Cameroonian brown propolis. *Pharmacologia* 4(3): 218-227 (2013)
- Tamokou J, Mpetga D.J.S, Lunga P.K, Tene M, Tane P. Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(99): 1-10 (2012)
- Toreti V.C, Sato H.H, Pastore G.M, Park Y.K. Recent Progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-13 (2013)
- Tosi E.A, Re E, Ortega M.E, Cazzoli A.F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry* 104(3):1025-1029(2007)
- Toyang N.J, Verpoorte R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 146: 681-723 (2013)
- Trusheva B, Popova M, Bankova V, Tsvetkova I, Naydenski H, Sabatini A.G. A new type of European propolis, containing bioactive labdanes. *Rivista Italiana E.P.P.O.S* 36: 3-7 (2003)
- Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova I, Rodriguez J.G, Bankova V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia* 75: 683-689 (2004)
- Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simone S, Marrucci M.C. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.3: 249-254 (2006)
- Trusheva B, Todorov I, Ninova M, Najdenski H, Daneshmand A, Bankova V. Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal* 4(8): 1-4 (2010)
- Trusheva B, Popova M, Kendhori E.B, Tsvetkova I, Naydenski C, Bankova V. Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. *Nat.Prod.Res.* 25(6): 606-613 (2011)

- Vilegas J.H.Y, Lancas F.M, Vilegas W, Pozetti G.L. Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 8(5): 529-535 (1997)
- Volpi N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by the on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42: 354-361 (2006)
- Wandji J, Fomum Z.T, Tillequin F, Skaltsounis A.L, Koch M. Erysenegalenseins H and I: Two new isoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Planta Med.* 60(2): 178-180 (1994)
- Wheng M.S, Liao C.H, Chen C.N, Wu C.L, Lin J.K. Propolin H from Taiwanese propolis induces G1 arrest in human lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.*55(13): 5289–5298 (2007)
- Winston M.L. The biology of the honey bee: *First HARVARD University press paper back*: 1-9 (1991)
- Wu J, Wan Z, Peng W, Zheng C, Wu J. Chemical constituents of *Bidens pilosa* var. *Radiata* *Chemistry of Natural Compounds* 49(4): 759-760 (2013)
- Zhang T, Omar R, Siheri W, Al Mutairi S, Clements C, Fearnley J, Edrada-Ebel R, Watson D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta* 120: 181-190 (2014)
- Zhou J, Li L, Zhao J, Xue X, Wu L, Chen F. Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. *Food Chemistry* 108: 749-759(2008)
- Zitteri-Eqleer K, Sosa S, Juretsch J, Zsilavec M.S, Logia R.D, Tubaro A, Bertolidi M, Franz C. Anti oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) *J. Ethnopharmacol.* 57(2): 139-144 (1997)

### Ελληνική βιβλιογραφία

- Δερματόπουλος Β. Η σύγχρονη πρακτική μελισσοκομία. Έκδοση Δ, Αθήνα (1984)
- Κατραμάνου Ε. Συγκριτική χημική ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων Κυπριακής πρόπολης με Ελληνική-Βιολογικές δράσεις, Πτυχιακή εργασία, Αθήνα (2012)
- Μάρκος Ν. Μελέτη χημικών συστατικών Βιολογικών δράσεων 5 δειγμάτων Ελληνικής Πρόπολης από την Πελοπόννησο και την Κω, Πτυχιακή εργασία Αθήνα (2010)
- Μέλλιου.Ε. Μελέτη χημικών συστατικών και βιολογικών δράσεων μελιού, βασιλικού πολτού, πρόπολης, μελιτοφόρων φυτών, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα (2005)
- Σκάρλος Δ. Μελέτη χημικών συστατικών Βιολογικών δράσεων Πολωνικής πρόπολης Φεβρουάριος, Πτυχιακή εργασία, Αθήνα(2008)

- Στρατής Ε, Χήνου Ι. Πρόπολις-Το φυσικό προϊόν του 21ου Αιώνα, Φαρμακευτική 13(II): 52-54. Αθήνα (2002)
- Στρατής Ε. Μελέτη πτητικών χημικών συστατικών και βιολογικών δράσεων δειγμάτων Ελληνικής Πρόπολης και Ελληνικών μελιών. Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης, Αθήνα (2005)
- Τρουλλίδου Ε. Πρόπολη-Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων της και αξιολογήση ενθυλακωμένων μορφών της σε βιοπολυμερή, με έμφαση στις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές της και την απελευθέρωσή της. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας Διατροφής. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα (2007)
- Χαριζάνης Π. Η πρόπολη και πως την παρασκευάζουμε για προσωπική χρήση. Μελισσοκομική Επιθεώρηση 6:101-104 (1992)