



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων
με εφαρμογή στο χαρούπι**

Εισηγήτρια : Ελένη Αλοΐζου (18684002)

Επιβλέπουσα: Ανθιμία Μπατρίνου

ΑΘΗΝΑ 2022

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2022

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και Λέκτορας Εφαρμογών Εργαστηρίου
Μικροβιολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και
Τεχνολογίας Τροφίμων

2. Μέλος επιτροπής

Ειρήνη Στρατή

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια

Λέκτορας Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος επιτροπής

Σπυρίδων Κοντελές

Γεωπόνος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι η αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Αλοΐζου Ελένη



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιτακτική ανάγκη για νέα φυτικά εκχυλίσματα με αντιμικροβιακή δράση και η μεγάλη ποσότητα ανεκμετάλλευτου χαρουπιού, *Ceratonia siliqua* L, αποτελούν αφορμή για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Με αυτόν τον σκοπό παρασκευάζονται εκχυλίσματα χαρουπιάς, με μεθόδους διαβροχής και εξαγωγής υποβοηθούμενης από υπερήχους. Σε αυτές γίνεται χρήση μη τοξικών και περιβαλλοντικά καλοθών διαλυτών και συγκεκριμένα νερού και υδατικού διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90. Με τις μεθόδους διάχυσης φρεατίου σε άγαρ και με την αυτοματοποιημένη μέθοδο θολομέτρου, Bioscreen, μελετάται η αντιμικροβιακή δράση αυτών, έναντι των συχνά εμφανιζόμενων στα τρόφιμα παθογόνων μικροοργανισμών και ειδικά των ακόλουθων στελεχών *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538 και *Candida albicans* NCPF 3255/ATCC 2091. Ακολουθεί μελέτη και σε περιπτώσεις στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μεθόδων ανίχνευσης της αντιμικροβιακής ικανότητας. Βάση αυτών, προκύπτουν αξιοσημείωτες παρατηρήσεις, ως προς τα εκχυλίσματα ανώριμων λοβών και φύλλων χαρουπιάς έναντι στην *Escherichia coli* και τον *Staphylococcus aureus*. Πιο σημαντικό αποτέλεσμα κρίνεται η αντιμικροβιακή δράση Εκχυλίσματος φύλλων χαρουπιάς, που προκύπτει με διαβροχή με αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη και με αναλογία υγρού:στερεού 200:10 έναντι της *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922.

Λέξεις κλειδιά: εκχύλισμα χαρουπιού, αντιμικροβιακή δράση, πολυφαινόλες, διάχυση φρεατίου σε άγαρ, Bioscreen

ABSTRACT

The urgent need for new plant extracts with antimicrobial activity and the large amount of unexploited carob, *Ceratonia siliqua L*, are the reason for carrying out the present study. For this purpose, carob extracts are prepared, using ultrasonically assisted maceration and extraction methods. In these, non-toxic and environmentally benign solvents are used, specifically water and an aqueous solution of ethanol:water 10:90. With the agar well diffusion methods and the automated turbidometer method, Bioscreen, the antimicrobial activity of these is studied against the pathogenic microorganisms that often appear in foods and especially the following strains *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538 and *Candida albicans* NCPF 3255/ATCC 2091. Subsequently occurs study and in some cases statistical analysis of the results of the antimicrobial capacity detection methods. Based on these, important observations are made regarding the extracts of immature pods and carob leaves against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. A more significant result is considered to be the antimicrobial activity of carob leaf extract, obtained by soaking with ethanol:water 10:90 as a solvent and with a liquid:solid ratio of 200:10 against *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922.

Keywords: carob extract, antimicrobial activity, polyphenols, agar well diffusion method, Bioscreen

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	7
1.1. Χαρούπι.....	7
1.1.1. Ιστορική Αναδρομή	7
1.1.2. Περιβάλλον και Στατιστικά Παραγωγής.....	7
1.1.3. Βοτανική Περιγραφή	8
1.1.4. Σύσταση.....	9
1.1.5. Επιρροές στη σύνθεση.....	13
1.1.6. Ευεργετικές Ιδιότητες.....	14
1.1.7. Χρήσεις.....	18
1.2. Εκχυλίσαις	20
1.2.1. Μέθοδοι εκχύλισης.....	20
1.2.2. Επιρροές στα εκχυλίσματα	23
1.3. Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας.....	25
1.3.1. Μελέτες φυτικών εκχυλισμάτων	25
1.3.2. Μέθοδοι.....	26
1.3.2.1 Μέθοδος διάχυσης και επιρροές	28
1.3.2.1.1. Μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ.....	28
1.3.2.1.2. Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ	31
1.3.2.2. Bioscreen.....	31
1.4. Μικροοργανισμοί	33
1.4.1. Staphylococcus aureus.....	34
1.4.2. Escherichia coli.....	35
1.4.3. Candida albicans.....	36
2. Υλικά και Μέθοδοι	37
2.1 Υλικά και εξοπλισμός	37
2.2. Μέθοδοι.....	38
2.2.1. Μέθοδοι εκχύλισης χαρουπιού.....	38

2.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων	38
2.2.1.2. Πορεία εκχύλισης	40
2.2.2. Επιπλέον επεξεργασίες	44
2.2.3. Μέθοδοι ανίχνευσης αντιμικροβιακής ικανότητας	44
3. Αποτελέσματα.....	47
4. Συζήτηση.....	92
5. Συμπεράσματα	96
6. Βιβλιογραφία	97

1. Εισαγωγή

1.1. Χαρούπι

1.1.1. Ιστορική Αναδρομή

Η χαρουπιά, *Ceratonia siliqua* L. , ανήκει στην οικογένεια Leguminosae (συν. Fabaceae) γνωστή και ως οικογένεια οσπρίων και μπιζελιών. Η επιστημονική της ονομασία προέρχεται από την ελληνική λέξη «keras» ή στην σύγχρονη «κέρατο» και την λατινική λέξη «siliqua», που συνολικά παραπέμπει στο σχήμα και την σκληρότητα του λοβού αντίστοιχα. Το κοινό όνομα προέρχεται από την εβραϊκή λέξη «kharun» (Batlle et al. 1997). Η χαρουπιά θεωρείται αυτόχθονές δέντρο και υπάρχουν αναφορές σχετικά με την καλλιέργεια του στην αρχαιότητα στις περισσότερες χώρες της Μεσογειακής λεκάνης. Οι αρχαίοι Έλληνες αναγνώρισαν την αξία του και το έφεραν από τη Μέση Ανατολή στην Ελλάδα και την Ιταλία, ενώ οι Άραβες το διέδωσαν κατά μήκος των ακτών της Βόρειας Αφρικής και βόρεια στην Ισπανία και την Πορτογαλία (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Παραδοσιακά το χαρούπι θεωρείται τροφή για ζώα και ανθρώπους. Συγκεκριμένα ο καφέ λοβός καταναλωνόταν ως τροφή, από την αρχαιότητα ως καραμέλα για τα παιδιά. Ακόμη βάση ιστορικών αναφορών φαίνεται ότι έβρισκε εφαρμογή σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης, όπως ο πόλεμος (Owen et al. 2003). Οι καρποί της χαρουπιάς χρησιμοποιούνταν επίσης, στο παρελθόν, ως φάρμακο στην παραδοσιακή ιατρική πολλών περιοχών της Μεσογείου, με δράση κυρίως έναντι στον βήχα και τα κονδυλωμάτα (Aissani et al. 2012).

1.1.2 Περιβάλλον και Στατιστικά Παραγωγής

Κρίνεται πολυετές δέντρο αφού αναπτύσσεται αργά και μπορεί να ζει έως και 150 χρόνια (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Ακόμα η χαρουπιά απαιτεί λίγη συντήρηση και προσοχή. Έτσι αποτελεί έναν πολύτιμο πόρο για την αναδάσωση και κρίνεται σημαντικό συστατικό της βλάστησης όχι μόνο για οικονομικούς αλλά και περιβαλλοντικούς λόγους. Στην Τυνησία μάλιστα, το χαρουπόδεντρο συμπεριλαμβάνεται στον εθνικό κατάλογο δασικών γενετικών πόρων προτεραιότητας για διατήρηση και διαχείριση (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Hadrich, Dimitrov, and Kriaa 2017). Επισημαίνεται ότι η χαρουπιά μπορεί να αναπτυχθεί σε ήπια και ξηρά μέρη με φτωχά εδάφη. Συνεπώς καλλιεργούταν σε περιοχές με λίγες βροχοπτώσεις (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Σήμερα, λόγω της ανθρώπινης εξάπλωσης ανά τον πλανήτη, οι

καλλιέργειες της φτάνουν σε περιοχές πολύ μακριά από την Μεσόγειο όπου το κλίμα είναι παρόμοιο. Μερικά παραδείγματα τέτοιων περιοχών είναι η Καλιφόρνια, η Αριζόνα, το Μεξικό, η Χιλή και η Αργεντινή στην Αμερική, η Ινδία στην Ασία, η Νότια Αφρική αλλά και η Αυστραλία. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να θεωρείται χαρακτηριστικό γηγενές δέντρο της Μεσογειακής λεκάνης, δίπλα στις ελιές, την αμυγδαλιά και τις συκιές με κύριες χώρες παραγωγής την Ισπανία, την Ιταλία, την Πορτογαλία, το Μαρόκο, την Ελλάδα, την Κύπρο, την Αλγερία και την Τυνησία (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Rtibi et al. 2017), (Kokkinofta et al. 2020). Σε παγκόσμια κλίμακα η παραγωγή χαρουπιών υπολογίζεται ότι φθάνει περίπου τους 310.000 τόνους ετησίως και φαίνεται να οφείλεται σε περίπου 200.000 εκτάρια. Σαφώς το ύψος της παραγωγής ανά έτος επηρεάζεται πολύ από διάφορες μεταβλητές, όπως η ποικιλία, η περιοχή και οι γεωργικές πρακτικές (Wissam et al. 2013). Συγκεκριμένα τα στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) (FAOSTAT, 2020) για την χρονική περίοδο από το 1994 έως το 2018 και λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες τιμές παραγωγής, χαρακτηρίζουν την Πορτογαλία ως ο κορυφαίος παραγωγός χαρουπιού με μέση ετήσια παραγωγή 40.007,88 τόνους, ακολουθούμενη από την Ιταλία (30.992,48 τόνοι) και το Μαρόκο (272.46 τόνοι) (ben Ayache et al. 2021). Όμως παρά το γεγονός ότι, όπως φαίνεται, παρατηρούνται μεγάλες ετήσιες αποδόσεις κατά την παραγωγή του χαρουπιού, σήμερα θεωρείται υποχρησιμοποιούμενη καλλιέργεια.

1.1.3. Βοτανική Περιγραφή

Η χαρουπιά αποτελεί αειθαλές δέντρο καθώς δεν ρίχνει τα φύλλα της το φθινόπωρο αλλά μόνο τον Ιούλιο κάθε δεύτερο χρόνο και τα ανανεώνει μόνο εν μέρει την άνοιξη (Rtibi et al. 2017). Σχετικά με την βοτανική περιγραφή της χαρουπιάς αξίζει να αναφερθεί ότι αναπτύσσεται ως σκληρόφυλλο δέντρο, με ύψος που φτάνει τα 10m. Ο κορμός του είναι παχύς και έχει καφέ τραχύ φλοιό και γερά κλαδιά. Τα τελευταία κατά την άνθιση τους έχουν σχήμα που παρομοιάζει με φαρδύ ημισφαιρικό στέμμα (Batlle et al. 1997). Τα φύλλα της χαρουπιάς έχουν μήκος 3-7 cm, με ή χωρίς φυλλάδιο για την προσάρτηση τους στα κλαδιά (Rtibi et al. 2017). Σχηματικά μπορεί να είναι από ωοειδή έως ελλειπτικά και εμφανίζονται σε αντίθετα ζεύγη πλήθους 4-10. Από την πάνω επιφάνεια έχουν σκούρο πράσινο και γυαλιστερό χρώμα, ενώ από κάτω έχουν ανοιχτό πράσινο χρώμα με λεπτές φλέβες με ελαφρώς διογκωμένα περιθώρια. Επίσης

χαρακτηρίζονται ως σκληρόφυλλα και έχουν πολύ παχιά μονόστρωματική άνω επιδερμίδα (Batlle et al. 1997).

Ο καρπός της χαρουπιάς είναι ένας λοβός, ο οποίος όταν ωριμάσει έχει μήκος 10-30 cm, πλάτος 1,5-3,5 cm και πάχος περίπου 1 cm με αμβλύ ή υποξεία κορυφή. Είναι επιμήκης, συμπιεσμένος, ίσιος ή καμπύλος και σχηματικά παρομοιάζει παραλληλεπίπεδο διαφορετικών μεγεθών. Επιπλέον είναι καφέ με ζαρωμένη επιφάνεια. Ο ανώριμος λοβός έχει σαφώς μικρότερες διαστάσεις και ανοιχτό πράσινο χρώμα. Ο ώριμος λοβός αποτελείται από πολτό (90%) και σπόρους (10%) που αποτελούνται από φλοιό, ενδοσπέρμιο και φύτρο (Aissani et al. 2012). Πολτός θεωρείται το τμήμα του λοβού χωρίς σπόρους, του οποίου το εξωτερικό δερματώδες στρώμα ονομάζεται περικάρπιο και είναι κάπως αδιαπέραστο, ενώ η εσωτερική μαλακή περιοχή ονομάζεται μεσοκάρπιο (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018) (Mulet et al. 2016), (Batlle et al. 1997) .

Οι σπόροι του καρπού είναι εγκάρσια τοποθετημένοι ως προς τον λοβό και χωρίζονται με μεσοκάρπιο. Για την παραλαβή τους ο λοβός ψιλοκόβεται και προκύπτουν τόσο οι σπόροι όσο και οι λοβοί χωρίς σπόρους διαφορετικών μεγεθών. Οι σπόροι του χαρουπιού είναι καλυμμένοι με ένα στενό καφέ τρίχωμα και περιέχουν ένα λευκό και ημιδιαφανές ενδοσπέρμιο, το οποίο ονομάζεται και κόμμι χαρουπιού (Rtibi et al. 2017). Επίσης οι σπόροι έχουν μήκος 8-10 mm, 7-8 mm πλάτος και 3-5 mm πάχος και παρουσιάζουν συμπιεσμένο ωοειδές επιμήκη σχήμα, ενώ θεωρούνται και πολύ σκληροί (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Batlle et al. 1997). Σχετικά με τις λοβούς απαλλαγμένους από σπόρους επισημαίνεται ότι, εάν έχουν μέγεθος περίπου 5 mm ή μεγαλύτερο, οι περισσότερες από αυτές θα έχουν και τις δύο πλευρές καλυμμένες από αυτό το αδιαπέραστο στρώμα (περικάρπιο) (Mulet et al. 2016).

1.1.4. Σύσταση

Το χαρούπι θεωρείται αρκετά περίπλοκη μήτρα καθώς η σύνθεση του αποτελείται από πολλά διαφορετικά συστατικά και σε διαφορετικές ποσότητες και μάλιστα αυτά επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες. Περιληπτικά για την σύνθεση του λοβού χωρίς σπόρους του χαρουπιού αναφέρεται ότι περιέχουν υψηλές ποσότητες

υδατανθράκων χαμηλού μοριακού βάρους (40–60%), είναι πλούσιοι σε ευκόλως ζυμώσιμα σάκχαρα, με κύριους αντιπροσώπους τη σακχαρόζη (32-38%), τη φρουκτόζη (5-7%) και τη γλυκόζη (5-6%), βέβαια οι σχετικές αναλογίες τους μπορεί να ποικίλλουν. Ακόμα περιέχει πολλές πολυφαινολικές ενώσεις και κυρίως τανίνες (18–20%), διαιτητικές ίνες (27–50%), μέταλλα (κάλιο, νάτριο, σίδηρο, χαλκό, μαγγάνιο και ψευδάργυρο). Τέλος οι ποσότητες πρωτεϊνών και λιπιδίων που περιέχονται κρίνονται χαμηλές και είναι της τάξης του 3–4% και 0,4–0,8% αντίστοιχα (Rtibi et al. 2017), (ben Ayache et al. 2021). Σπουδαίο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες που περιέχονται στον πολτό, λόγω της μεγάλης ποσότητας και ποικιλίας τους. (ben Ayache et al. 2021), (ben Ayache et al. 2021). Ενώ αξίζει να αναφερθεί ακόμα ότι ιδιαίτερα τα εκχυλίσματα άγουρων λοβών κρίνονται εξαιρετικά εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Συνήθως οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με τους δακτυλίους φαινόλης που περιέχουν και τις δομικές διαφορές στη σύνδεση αυτών (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Επισημαίνεται ακόμη ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις βρίσκονται στους ιστούς των φυτών και είναι σημαντικές για την ανάπτυξη αυτών, καθώς παρέχουν έναν αμυντικό μηχανισμό έναντι λοιμώξεων και τραυματισμών (Paragiannopoulos et al. 2004). Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια πολύ ετερογενή ομάδα, η οποία μπορεί να διακριθεί κυρίως σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, ταννίνες, ισοφλαβόνες, λιγνάνες, ανθοκυάνες και στυλβένια (Owen et al. 2003). Γενικά βρίσκονται φυσικά στα φυτά και είναι υπεύθυνες για πολλές ευεργετικές ιδιότητες. Έτσι έχουν προσελκύσει σπουδαίο επιστημονικό ενδιαφέρον. Ως επί των πλείστων για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιείται η μέθοδος HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), ενώ για την ποσοτικοποίηση τους, που αποτελεί πρόκληση, ως βέλτιστη τεχνική προτείνεται η LC-MS/MS (Liquid Chromatograph Two Mass Spectrometry) (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Rtibi et al. 2017). Βάση αυτών των τεχνικών και άλλων που δοκιμάστηκαν, διάφορες μελέτες προσπαθούν να χαρακτηρίσουν το πολυφαινολικό προφίλ των χαρουπιών. Έτσι προκύπτουν τα ακόλουθα αποτελέσματα, τα οποία χαρακτηρίζουν ως τις κύριες εκχυλίσσιμες πολυφαινόλες του πολτού χαρουπιών το γαλλικό οξύ και τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Σχετικά με το γαλλικό οξύ γίνονται αναφορές που το χαρακτηρίζουν ως την πιο άφθονη ένωση στο πολτό χαρουπιών. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι, αυτή η παρατήρηση δεν είναι ακριβώς αληθινή καθώς το γαλλικό οξύ μπορεί να σχηματιστεί κατά τη διάρκεια των διεργασιών εκχύλισης.

Αναλυτικότερα τα φαινολικά οξέα, η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη είναι οι απλούστερες μορφές φαινολικών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν και τις δομικές μονάδες άλλων ενώσεων, όπως οι φλαβανόλες και οι τανίνες. Με την αποικοδόμηση των τελευταίων σχηματίζονται ελεύθερα φαινολικά μονομερή. Συνεπώς το γαλλικό οξύ, η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη στις περισσότερες μελέτες χαρακτηρίζονται ως οι πιο άφθονες ενώσεις. Αυτός είναι επίσης ένας από τους λόγους για τις διακυμάνσεις στα αποτελέσματα μεταξύ μελετών (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Αναφορικά με τις συμπυκνωμένες τανίνες, σχολιάζεται ότι οι ώριμοι λοβοί χαρουπιών φαίνεται να είναι αυτοί που περιέχουν ιδιαίτερα μεγάλη ποσότητα (16-20% των ξηρών βάρους) (Batlle et al. 1997). Συγκεκριμένα οι προανθοκυανιδίνες αποτελούν συχνά ευρισκόμενη συμπυκνωμένη ταννίνη και φαίνεται να παρουσιάζουν 20 φορές πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από βιταμίνη C και 50 φορές πιο ισχυρή από τη βιταμίνη E. (Wissam et al. 2013). Ακόμα αξίζουν να αναφερθούν ονομαστικά και άλλες πολυφαινόλες που έχουν ανιχνευθεί σε εκχυλίσματα πολλού χαρουπιών, όπως υδρολυομένες τανίνες (γαλλοταννίνες και ελλαγιταννίνες), γλυκοσίδες φλαβονολών, ίχνη ισοφλαβονοειδών, μυρικετίνη, ρουτίνη, κατεχίνη κερσετίνη (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Goulas and Georgiou 2020), (Papagiannopoulos et al. 2004), (Owen et al. 2003). Συγκεκριμένα για τις συμπυκνωμένες ταννίνες, αναφέρεται συχνά η παρουσία προανθοκυανιδίων, αποτελούμενες από ομάδες φλαβαν-3-όλης και τους γαλλοϋλεστέρες τους (Rtibi et al. 2017). Αξίζει ακόμα να αναφερθούν και κάποιες παραπάνω λεπτομέρειες για τα υπόλοιπα συστατικά. Έτσι αναφορές φανερώνουν ότι τα λιπίδια που περιέχονται αποτελούνται από περίπου ίσες αναλογίες κορεσμένων και ακόρεστων οξέων. Επίσης έχει γίνει αναφορά για την παρουσία των αμινοξέων αλανίνη, γλυκίνη, λευκίνη, προλίνη, βαλίνη, χυροσίνη και φαινυλαλανίνη. Σχετικά με τις πρωτεΐνες και υλοποιώντας δοκιμές διατροφής, φαίνεται ότι ο πολτός χαρουπιού περιέχει μόνο 1-2% εύπεπτη πρωτεΐνη και είναι σχετικά χαμηλή σε μεταβολική ενέργεια. Τέλος έχουν γίνει αναφορές για παρουσία έως και περίπου 18% κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. (Batlle et al. 1997).

Τα φύλλα χαρακτηρίζονται ως το τμήμα της χαρουπιάς, το οποίο είναι πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες και συγκεκριμένα σε ολικές φαινόλες, συμπυκνωμένες τανίνες και φλαβονοειδή, σε σύγκριση με τον πολτό (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Αμφίβολο θεωρείται αν αυτές οι ποσότητες μεταξύ φύλλων και

πολτού είναι συγκρίσιμες ή σημαντικά υψηλότερες για τα πρώτα. Για τον προσδιορισμό της σύνθεσης των φύλλων χρησιμοποιείται συνήθως η ανάλυση HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Υλοποιώντας λοιπόν αυτήν την τεχνική έχουν προκύψει οι θεωρήσεις ότι οι κύριες φαινολικές ενώσεις που περιέχονται, είναι η καμπερόλη, το ταννικό οξύ, ένυδρη κατεχίνη και την πολυδατίνη (Rtibi et al. 2017). Ονομαστικά αξίζει ακόμα να αναφερθούν το γαλλικό οξύ, το π- υδροξυβενζοϊκό οξύ , το χλωρογενικό οξύ , το κουμαρικό οξύ ,το φερουλικό οξύ ,το συριγγικό οξύ, το γεντισικό οξύ, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η (-)-επιγαλλοκατεχιναικό, η μυρικετίνη, η ρουτίνη, η κερκετίνη, η καεμπερόλη, η απιγενίνη , η ισοκερσετίνη , η γλυκοσίδα μυρικετίνης, η ραμνοσίδα μυρικετίνης (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Επιπλέον μελέτες αναφέρουν ότι τα φύλλα των αρσενικών και των ερμαφρόδιτων δέντρων, περιέχουν υψηλότερες ποσότητες φλαβονοειδών σε σύγκριση με τα θηλυκά (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι τα φύλλα της χαρουπιάς με την μέθοδο HPLC χαρακτηρίζονται πιο πλούσια σε φυτικές ίνες από τους λοβούς της χαρουπιάς (Rtibi et al. 2017).

Οι σπόροι χαρουπιού εμφανίζουν αρκετά διαφορετική σύνθεση σε σύγκριση με τον πολτό και τα φύλλα του χαρουπιού. Αρχικά μελέτες φανερώνουν ότι η σπόροι περιέχουν τοκοφερόλες , με την γ-τοκοφερόλη να επικρατεί έναντι των άλλων ισομορφών. Φαίνεται δηλαδή ότι μπορούν να χαρακτηριστούν ως πηγή βιταμερών βιταμίνης E, δηλαδή τοκοφερολών (ben Ayache et al. 2021). Επίσης μελέτες φανερώνουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και περισσότερο λίπος στους σπόρους σε σύγκριση με τον πολτό (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Σχετικά με τις φαινολικές ενώσεις, η πιο δημοφιλής άποψη, κατατάσσει τους σπόρους φτωχότερους σε σύγκριση με τα άλλα δύο τμήματα που αναλύθηκαν παραπάνω. Μελέτη έχει δείξει ότι η απιγενίνη, θεωρείται ως η άφθονη κατηγορία φαινολικών στο φύτρο της χαρουπιάς. Παρόμοια έχει αναφερθεί ότι η κερσετίνη, είναι η κύρια φαινολική ομάδα που εντοπίζεται στη φλούδα των σπόρων. Ονομαστικά αναφέρονται και άλλες φαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί, όπως (+)-κατεχίνη, γεντισικό οξύ , χλωρογενικό οξύ, κατεχόλη, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, μυρικετίνη, γαλλικός μεθυλεστερας, ρουτίνη, συριγγικό οξύ, θεοφυλλίνη, και βανιλίνη (ben Ayache et al. 2021). Τέλος ισχύει ότι, οι σπόροι του χαρουπιού περιέχουν μεγάλες ποσότητες από γαλακτομαννάνες (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021).

1.1.5. Επιρροές στη σύνθεση

Τα τμήματα της χαρουπιάς, όπως φαίνεται πλέον, παρουσιάζουν σπουδαίο ενδιαφέρον λόγω της πολύτιμης σύνθεσης τους. Συνεπώς έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες και έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τον καθορισμό της σύνθεσης του. Αποδεικνύεται όμως ότι αυτό αποτελεί μεγάλη πρόκληση καθώς η σύνθεση των τμημάτων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Συγκεκριμένα η σύνθεση επηρεάζεται από το τμήμα του δέντρου το οποίο μελετάται, την γεωγραφική προέλευση του δείγματος δηλαδή τη χώρα, το κλίμα και το έδαφος στο οποίο αναπτύσσεται, το στάδιο ωρίμανσης στη διάρκεια του οποίου γίνεται η μελέτη και συνεπώς και τον χρόνο συγκομιδής, την ποικιλία του δέντρου όπως τον γονότυπο και το φύλο καθώς και από τις πρακτικές τις οποίες έχει υποστεί κατά την παραγωγή (γεωργία), την συγκομιδή, την αποθήκευση και την επεξεργασία. (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Rtibi et al. 2017), (Mulet et al. 2016), (Kokkinofta et al. 2020). Αυτοί λοιπόν είναι οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στη μορφολογική μεταβλητότητα και τη χημική σύνθεση του χαρουπιού. Οι περισσότερες αναφορές συμφωνούν ότι οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις αφορούν τις ποσότητες πολυφαινόλων και σακχάρων. Επιπλέον όμως επηρεάζονται οι διαιτητικές ίνες, η υγρασία, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά, η τέφρα και τα Cu, Zn, Mn, διαμορφώνοντας την διατροφική αξία, το χημειοπροληπτικό προφίλ και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Αξίζει επιπλέον να αναφερθούν κάποια παραδείγματα της επίδρασης που ασκούν κάποιοι παράγοντες. Έτσι η ποικιλία που χρησιμοποιείται ανάλογα με το αν οι χαρουπιές είναι άγριες ή εξημερωμένες έχουν διαφορές στην περιεκτικότητα σε φαινολικά. Μάλιστα συνήθως τα άγρια δέντρα κρίνονται πιο πλούσια σε πολυφαινόλες. Επιπλέον η επιρροή που ασκεί το φύλο, καθιστά τα ερμαφρόδιτα και τα αρσενικά εκχυλίσματα πλουσιότερα σε πολυφαινόλες από τα θηλυκά (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Ακόμα σπουδαίο ρόλο παρουσιάζει το στάδιο ωρίμανσης του υπό εξέταση τμήματος. Με την ωρίμανση, πραγματοποιείται μια σειρά από πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις, όπως της αποδόμησης ή της σύνθεσης και της συσσώρευσης βιοδραστικών συστατικών. Συγκεκριμένα μελέτες αποδεικνύουν ιδιαίτερη επίδραση στην πολυφαινολική σύνθεση. Έτσι κατά την περίοδο ωρίμανσης καταγράφεται σημαντική μείωση των πολυφαινόλων. Η παρατηρούμενη μείωση θα μπορούσε να αποδοθεί στην οξειδωση των φαινολικών ενώσεων από το ένζυμο οξειδάση της πολυφαινόλης και/ή στη

μετατροπή διαλυτών φαινολικών ενώσεων σε αδιάλυτες, οι οποίες συνδέονται με πολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τοίχωμα και δεν διαλύονται ελεύθερα στον διαλύτη (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Επίσης η επεξεργασία των τμημάτων του χαρουπιού οδηγεί σε αλλαγές της σύνθεσης. Ως παράδειγμα αναφέρεται ότι οι ίνες χαρουπιού, δηλαδή η σκόνη πολλού χαρουπιού χωρίς ζάχαρη, θεωρείται πλουσιότερο σε αδιάλυτες διαιτητικές ίνες και παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις σε γλυκοσίδες, φλαβονόλης και υδρολυόμενες τανίνες. Αντίστοιχα για τα καβουρδισμένα προϊόντα χαρουπιού επικρατεί η θεώρηση ότι περιέχουν πιο υψηλά επίπεδα γαλλικού οξέος (Paragiannopoulos et al. 2004). Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν, για την μεγάλη ποικιλία στη σύνθεση των τμημάτων χαρουπιού, επιρροή ασκούν και εξωγενείς συντελεστές. Αρχικά η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συστατικών αποτελεί βασικό κριτήριο. Ως επί των πλείστων χρησιμοποιείται η τεχνική HPLC, όμως αυτή μπορεί να μην είναι σε θέση να ανιχνεύσει ορισμένες πολυφαινόλες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Επίσης με σκοπό την λήψη πιο ακριβή αποτελεσμάτων, θα έπρεπε να πραγματοποιείται σύγκριση μόνο όταν χρησιμοποιούνται οι ίδιες διαδικασίες (μέθοδοι εξαγωγής, απομόνωσης και ανάλυσης) (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Κυρίαρχο ρόλο έχει, καθώς οι περισσότερες αναλύσεις πραγματοποιούνται σε εκχυλίσματα, η διαδικασία της εξαγωγής. Συγκεκριμένα ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί, ο χρόνος, η θερμοκρασία, η μέθοδος και άλλα που θα αναπτυχθούν διεξοδικά στο υποκεφάλαιο 1.2.2.. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα πάντως, τα τμήματα του χαρουπιού φαίνεται να έχουν μοναδική χημική σύσταση, και έτσι μελέτες που χρησιμοποιούν δείγμα από το ίδιο δέντρο και υλοποιούν ίδιες τεχνικές είναι πιθανό να εμφανίζουν διαφορές στη σύνθεση.

1.1.6. Ευεργετικές Ιδιότητες

Το χαρούπι όπως αναφέρθηκε κρίνεται πλούσιο τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποικιλία βιοδραστικών ουσιών καθώς συν άλλων περιέχει βιταμίνες, μέταλλα, διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες, γαλλοταννίνες, φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες. Επίσης αναφέρθηκε ότι θεωρείται φθηνή και ανεκμετάλλευτη πρώτη ύλη. Συνεπώς κρίνεται λογικό να προσέλκυσε το ερευνητικό ενδιαφέρον με απώτερο σκοπό την εύρεση ευεργετικών δράσεων του. Πράγματι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αποδίδουν στο χαρούπι αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιμεταλλαξιογόνο,

αντιπολλαπλασιαστική ή αντιοιστρογονική, κυτταροτοξική, αντιδιαβητική και αντιφλεγμονώδη δράση. Μέχρι και σήμερα βέβαια δεν μπορούν αυτές οι δράσεις να αποδοθούν εμπειριστατωμένα και με σιγουριά στο χαρούπι. Αυτό οφείλεται κυρίως στο πολύ μεγάλο πλήθος παραγόντων από το οποίο μπορεί να επηρεαστεί η σύνθεση των χαρουπιών. Το γεγονός αυτό καθιστά τα αποτελέσματα των ερευνών μη συγκρίσιμα, ενώ δεν αποκλείεται να οδηγήσει και στην διαφωνία τους. Επιπλέον πολλές από τις βιοδραστικές ουσίες που περιέχονται στο χαρούπι δρουν είτε μόνα τους είτε συνεργατικά, δυσκολεύοντας έτσι την εξαγωγή σίγουρων συμπερασμάτων. Τα οφέλη όμως που φαίνεται να έχει το χαρούπι, το καθιστούν άξιο περαιτέρω μελέτης και έρευνας. Μερικές από τις μέχρι σήμερα ευεργετικές ιδιότητες του χαρουπιού που έχουν μελετηθεί αναφέρονται στη συνέχεια.

Ιδιαίτερη προσοχή έχει λάβει το χαρούπι λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης που του προσφέρουν κυρίως οι περιεχόμενες πολυφαινόλες. Γενικά οι λοβοί και τα φύλλα του χαρουπιού που όπως αναφέρθηκε είναι πλούσια σε πολυφαινόλες κρίνονται ως ισχυρά αντιοξειδωτικά, καθώς μπορούν να αποτρέψουν την οξειδωτική βλάβη ορισμένων βιομορίων (Papagiannopoulos et al. 2004). Συνεπώς το χαρούπι μπορεί να χαρακτηριστεί ως διαιτητικό φυσικό αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα συμβάλλοντας στη πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες (Stavrou, Christou, and Karnissi-Christodoulou 2018). Συγκεκριμένα οι ίνες χαρουπιού (σκόνη πολτού χαρουπιού χωρίς ζάχαρη) φαίνεται να εμφανίζουν υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό από πολλές άλλες τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες, όπως τα βατόμουρα ή το κόκκινο κρασί (Owen et al. 2003).

Θεωρείται ακόμη ότι το χαρούπι παρουσιάζει αντικαρκινική δράση. Αυτή αποδίδεται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Γενικά στις διαιτητικές ίνες αποδίδεται πιθανό χημειοπροληπτικό δυναμικό έναντι ορισμένων καρκίνων και ιδιαίτερα αυτών της γαστρεντερικής οδού. Σχετικά τις πολυφαινόλες, υπάρχουν ενδείξεις πως ο εγκιβωτισμός τους στην καθημερινή διατροφή, μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και μείωση του καρκίνου και των καρδιακών παθήσεων. Αυτό μπορεί να πηγάζει από το γεγονός ότι τόσο οι απλές φαινόλες όσο και οι πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στις ίνες του χαρουπιού, δηλαδή στη σκόνη πολτού χαρουπιού χωρίς ζάχαρη, θεωρούνται ισχυροί δεσμευτές ενεργών ειδών οξυγόνου. Ακόμη μπορεί να οφείλεται στο ότι οι

πολυφαινόλες φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά με κάποιους υποδοχείς που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας και οι υποδοχείς οιστρογόνου. Επιπλέον οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την καρκινογένεση σε ζωικά μοντέλα και ρυθμίζουν την έκφραση πρωτεϊνικών κινασών σε πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων. Η συμβολή των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητα τους αναστέλλουν ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η κυκλοοξυγενάση των κυτοκινών, οι οποίες επίσης κατηγορούνται για ευνοήσει του καρκίνου (Owen et al. 2003). Έχουν μάλιστα πραγματοποιηθεί διάφορες πειραματικές μελέτες με σκοπό την αξιολόγηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης εκχυλισμάτων, κυρίως από λοβούς χαρουπιών. Κάποια από τα αποτελέσματα τους φανερώνουν υψηλή ανασταλτική ικανότητα έναντι της βιωσιμότητας κυττάρων νευροβλαστώματος N1E-115 αρουραίου. Η ικανότητα αυτή αποδόθηκε στην παρουσία και δράση κατεχίνης και γαλλικού οξέος. Επιπλέον έρευνες που διεκπεραιώθηκαν έδειξαν ενίσχυση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MCF-7. Η δράση αυτή ερμηνεύτηκε στην παρουσία ναριγγίνης στο εκχύλισμα λοβών χαρουπιάς με τη μέθοδο υπερκρίσιμης εκχύλισης υγρού (ben Othmen et al. 2021) (Paragiannopoulos et al. 2004). Κάποιες άλλες μελέτες αναφέρουν επίσης συμβολή των εκχυλισμάτων χαρουπιού στην αναστολή του πολλαπλασιασμού σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα ποντικού, κύτταρα HT29 αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου και αδενώματα LT97 (Paragiannopoulos et al. 2004). Έτσι φανερώνεται το μεγάλο δυναμικό των εκχυλισμάτων χαρουπιού ως πηγή φυσικών αντικαρκινικών ενώσεων και θεωρείται λογική η περαιτέρω μελέτη του.

Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι εκτός από το χημειοπροληπτικό δυναμικό του καρκίνου, που παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες, μειώνουν επίσης τη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου καταστέλλοντας την οξειδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και προάγοντας την διαδικασία της αγγειοδιαστολής (Owen et al. 2003). Επιπλέον φαίνεται το ανώριμο χαρούπι εμποδίζει την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης, χαρακτηρίζοντας το ως αντιδιαβητικό. Συγκεκριμένα έρευνες σε ποντίκια χρησιμοποιώντας τη τεχνική του θαλάμου Ussing, δείχνουν ότι το ανώριμο χαρούπι συμβάλει στην αναστολή της μεταφοράς της γλυκόζης στο αίμα, η οποία επιδρά στη υπογλυκαιμική κατάσταση. Έτσι μειώνεται σημαντική η γλυκόζη του αίματος και των βιοχημικών προφίλ στους διαβητικούς αρουραίους (Stavrou, Christou, and Kapnissi-

Christodoulou 2018). Αναφορές έχουν γίνει επίσης σχετικά με την ικανότητα του χαρουπιού να μειώνει τα επίπεδα της ολικής και της LDL χοληστερόλης στο αίμα υπερχοληστερολαιμικών και όχι μόνο ατόμων (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Paragiannopoulos et al. 2004). Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε φώσφορο και ασβέστιο, φαίνεται ότι το χαρούπι συμβάλλει και στην καταπολέμηση της οστεοπόρωσης (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Το χαρούπι βελτιώνει επίσης την διαδικασία της πέψης. Συγκεκριμένα έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την κατανάλωση ινών χαρουπιού, πλούσιες σε συμπυκνωμένες τανίνες, οι οποίες φανερώνουν ευεργετική επίδραση στο σωματικό βάρος. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα τους να μειώνουν τις μεταγευματικές αποκρίσεις της ακετυλιωμένης γκρελίνης (ορεξιγονική ορμόνη που μπορεί να επηρεάσει τη χρήση του υποστρώματος στον άνθρωπο), των τριγλυκεριδίων, των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων και να μεταβάλλουν το αναπνευστικό πηλίκο (αριθμός που χρησιμοποιείται στους υπολογισμούς του βασικό μεταβολικό ρυθμό), υποδηλώνοντας μια αλλαγή προς την αυξημένη οξείδωση των λιπαρών οξέων. Συνεπώς θεωρείται ότι η κατανάλωση χαρουπιού μπορεί να συμβάλει στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας. Επίσης λόγω των πολυφαινολών στα χαρούπια, φαίνεται ότι αυτά αποτρέπουν ή/και προστατεύουν το γαστρικό βλεννογόνο από οξεία βλάβη και ευνοούν την επούλωση των χρόνιων γαστρικών ελκών (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018).

Στο ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει το χαρούπι, συγκαταλέγεται και η αντιμικροβιακή του ικανότητα, η οποία αποτελεί και το θέμα της παρούσας εργασίας. Πλήθος από έρευνες *in vitro* έχουν υλοποιηθεί παρέχοντας σημαντικά ευρήματα. Μελέτες βασισμένες σε διάφορες τεχνικές εκχύλισης, για διάφορα τμήματα της χαρουπιού και έναντι μεγάλου πλήθους μικροοργανισμών έχουν διεκπεραιωθεί και συμπεραίνουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών βακτηρίων και μυκήτων. Αναφέρεται ακόμα ότι οι δράσεις αυτές οφείλονται κυρίως στην παρουσία πολυφαινολών και πιο συγκεκριμένα στο γαλλικό οξύ που περιέχεται στις τανίνες του χαρουπιού (Paragiannopoulos et al. 2004). Αξίζει να αναφερθεί ότι, οι Aissani et al. 2012 απέδωσαν αντιλυστική δράση στα φύλλα της χαρουπιάς που περιέχουν υψηλά επίπεδα πολυφαινολικών ενώσεων. Επίσης οι ben Ayache et al. 2021 απέδωσαν σε εκχυλίσματα σπόρων χαρουπιάς ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη της *E. coli* και του *B. cereus*. Όμως η καθιέρωση αντιμικροβιακής δράσης συγκεκριμένου

εκχυλίσματος σε συγκεκριμένο μικροοργανισμό θεωρείται δύσκολη διαδικασία, η οποία ακόμα δεν έχει υλοποιηθεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στη πολυπαραγοντική και ευκόλως επηρεαζόμενη διαδικασία που χρειάζεται να διεκπεραιωθεί.

1.1.7. Χρήσεις

Η χαρουπιά αποτελεί φθηνή πρώτη ύλη με πλούσια και πολύτιμη σύσταση που την καθιστά αξιοποιήσιμη από πολλούς βιομηχανικούς κλάδους. Στις μέρες μας χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών, ενώ βρίσκουν εφαρμογή και κατά την εξαγωγή καουτσούκ από τους σπόρους του καρπού (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Quiles-Carrillo et al. 2019). Στην τελευταία αξιοποιούνται κυρίως με τη μορφή σαπουνιού και ενυδατικής κρέμας (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Στον τομέα της φαρμακευτικής βρίσκει εφαρμογή καθώς έχει φαρμακευτικές ιδιότητες που σχετίζονται κυρίως με την πρόληψη και θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών. Συγκεκριμένα εμφανίζει δράση κατά της διάρροιας, του έλκους και της δυσκοιλιότητας, ενώ παρουσιάζουν ακόμη διουρητική και αντι-απορροφητική δράση έναντι της γλυκόζης στο γαστρεντερικό σωλήνα. Χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα στην παραδοσιακή/ λαϊκή ιατρική πολλών χωρών, όπως η Τυνησία και η Τουρκία (Rtibi et al. 2017), (Aissani et al. 2012).

Το εύρος χρήσεων του χαρουπιού στην βιομηχανία τροφίμων μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα μεγάλο. Όμως λαμβάνοντας υπόψη τις δυνατότητες που έχει και το ύψος των ετήσιων παραγωγών του, χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα παραμελημένος καρπός. Συγκεκριμένα ενώ όλος ο καρπός της χαρουπιάς είναι αξιοποιήσιμος, το μέρος του λοβού που δέχεται το μεγαλύτερο βιομηχανικό ενδιαφέρον και την μεγαλύτερη διατροφική εφαρμογή θεωρείται ο σπόρος, καθώς είναι πηγή κόμμεος. Το κόμμι χαρουπιάς, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι το λευκό και ημιδιαφανές ενδοσπέρμιο. Αυτό χρησιμοποιείται ως φυσικό πρόσθετο τροφίμων (E410) καθώς έχει συν άλλων πηκτική, σταθεροποιητική και γαλακτωματοποιητική δράση. Συνήθως προστίθεται σε προϊόντα όπως το παγωτό, τα γλυκά, το ζελέ και το ντρέσινγκ σαλάτας (Aissani et al. 2012), (Clodoveo et al. 2022), (ben Ayache et al. 2021). Επίσης λόγω των δράσεων που αναφέρονται παραπάνω, οι σπόροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλους τομείς όπως φαρμακευτική ως ενεργό συστατικό, η κλωστοϋφαντουργία και η βιομηχανίες καλλυντικών (ben Ayache et al. 2021), (Goulas and Georgiou 2020). Όπως γίνεται

αντιληπτό, η μηχανική επεξεργασία που πραγματοποιείται για την παραλαβή των σπόρων χαρουπιού, αφήνει πολύ μεγάλες ποσότητες ξεσποριασμένων λοβών χαρουπιών (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Επισημαίνεται ότι οι σπόροι αποτελούν μόνον το 10% του λοβού. Έτσι οι λοβοί χωρίς τους σπόρους είναι υποπροϊόν που μπορεί να παραμείνει ανεκμετάλλευτο και να θεωρηθεί απόβλητο της βιομηχανίας αγροδιατροφής. Τα τελευταία χρόνια βέβαια γίνονται κινήσεις για την αξιοποίηση του ως άφθονη και φθηνή ανανεώσιμη πηγή (Almanasrah et al. 2015). Ακόμα όμως χρησιμοποιούνται κυρίως ως θρεπτική ζωοτροφή, και επομένως έχει χαμηλή οικονομική αξία (Clodoveo et al. 2022). Η δεύτερη πιο διαδεδομένη χρήση των λοβών χωρίς σπόρους συνδέεται με την υψηλή περιεκτικότητα του σε σάκχαρα (48–56%). Έτσι παράγονται προϊόντα όπως σιρόπια χαρουπιού ή μελάσα. Επιπλέον χρησιμοποιείται για την παραγωγή χαρουπάλευρου, το οποίο περιέχει πολλά θρεπτικά συστατικά και προτείνεται ως διαιτητική ανθρώπινη τροφή. Με αυτό μπορεί σαφώς να προκύψει μεγάλη ποικιλία αρτοσκευασμάτων και ζυμαρικών. Πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του θεωρείται ακόμη, ότι περιέχει μια πρωτεΐνη με παρόμοιες ιδιότητες με τη γλουτένη, η οποία ονομάζεται καρουμπίνη. Για αυτόν τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα που θα είναι κατάλληλα για ανθρώπους με κοιλιοκάκη. Επιπλέον όμως το χαρακτηριστικό του αυτό έρχεται σε συμφωνία με την τάση των καταναλωτών, την σημερινή εποχή, για προϊόντα χωρίς γλουτένη. Επίσης αξιοποιείται κατά την παραγωγή υποκατάστατου κακάο, το οποίο μπορεί να είναι είτε μη καβουρδισμένη, είτε καβουρδισμένη σκόνη. Συνεπώς έχουν αναπτυχθεί και σοκολάτες από χαρούπι, ενώ βρίσκει απήχηση και στην ζαχαροπλαστική. Έχει δε το πλεονέκτημα ότι δεν περιέχει καφεΐνη, θειοβρωμίνη ή οξαλικό οξύ, ενώ έχει και χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Έτσι καθίσταται γοητευτικό προϊόν για μια μερίδα των καταναλωτών (Clodoveo et al. 2022), (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Papagiannopoulos et al. 2004). Ένα ακόμα προϊόν που προκύπτει από τον πολτό είναι το λικέρ χαρουπιού. Αυτό αποτελεί τοπικό αλκοολούχο ποτό (τουλάχιστον 15% v/v αιθανόλης και 100 g/L ζάχαρη) των μεσογειακών χώρων. Πιο αναλυτικά αυτό παράγεται με διαβροχή μερικώς θρυμματισμένων λοβών χαρουπιού στην υδροαλκοολική βάση, με προσθήκη ζάχαρης (Hanousek Čiča et al. 2019). Ανεκμετάλλευτο όμως και με περιορισμένη εφαρμογή παραμένει το φαινολικό κλάσμα του καρπού της χαρουπιάς. Τα τελευταία χρόνια όμως πραγματοποιούνται πολλές μελέτες με σκοπό την αξιοποίηση αυτού του χαμηλού κόστους παραπροϊόν, το οποίο κρίνεται εξαιρετικά πλούσιο σε πολύτιμες βιοδραστικές ενώσεις, ιδιαίτερα σε

πολυφαινόλες. Οι τελευταίες προσφέρουν ποικίλα πιθανά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία και που μπορούν να εκχυλιστούν αποτελεσματικά με τη διαβροχή τεμαχισμένων λοβών χαρουπιών σε διάφορους διαλύτες (Hanousek Čiča et al. 2019), (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Συνολικά γίνονται προσπάθειες για την επιστροφή του χαρουπιού στην παγκόσμια αγορά ως δυναμικό λειτουργικό και θρεπτικό προϊόν διατροφής, εξυπηρετώντας και ικανοποιώντας τις σύγχρονες υγειονομικές και διατροφικές απαιτήσεις των καταναλωτών (Kokkinofta et al. 2020). Μέχρι και σήμερα όμως υπάρχουν περιθώρια για ευρεία μελέτη και εξέλιξη αυτού του καρπού.

1.2. Εκχυλίσεις

1.2.1. Μέθοδοι εκχύλισης

Καθώς η ανάγκη για εύρεση νέων φυτοχημικών αυξάνεται, πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες για την αντιμικροβιακή δράση φυτικών εκχυλισμάτων. Επί του παρόντος θέματος, δηλαδή της χαρουπιιάς, τα κύρια συστατικά που χαρακτηρίζονται ως σημαντικά για την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης, κρίνονται οι πολυφαινόλες. Συνέπως η διαδικασία της εκχύλισης έχει ως κύριο σκοπό την ανάκτηση πολυφαινολών. Ως επί των πλείστων οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού δηλαδή η μέθοδος διαβροχής, η οποία βασίζεται στην επιλογή κατάλληλου συνδιασμού διαλύτη, χρόνου, ανάδευσης και θερμότητας και η τεχνική Soxhlet. Αυτές λόγω της ευρείας χρήσης τους χαρακτηρίζονται ως συμβατικές μέθοδοι, όμως παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα (Clodoveo et al. 2022), (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021), (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Αρχικά αυτές συχνά απαιτούν μεγάλη ποσότητα διαλυτών, η οποία αποτελεί ακόμα μεγαλύτερο πρόβλημα στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η ακετόνη, ο διαιθυλαιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας. Αυτοί οι διαλύτες αποτελούν επικίνδυνες ενώσεις στον χειρισμό και κρίνονται αρκετά επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Όμως κάποια υπολείμματα τους ενδέχεται να παραμείνουν στο τελικό εκχύλισμα, και για την αφαίρεση τους απαιτούνται χρονοβόρα βήματα καθαρισμού (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Στο πρόβλημα αυτό, καλή λύση θεωρείται η χρήση νερού ή/ και αιθανόλης ως διαλύτες. Στην περίπτωση του νερού, αξίζει να αναφερθεί ότι είναι πολικός διαλύτης, γεγονός το οποίο ευνοεί την εκχύλιση των ζητούμενων πολυφαινολών. Επιπλέον θεωρείται ότι το

νερό δρα ως παράγοντας διόγκωσης του φυτού, αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής μεταξύ στερεάς φυτικής μήτρας και διαλύτη εκχύλισης, επιτρέποντας καλύτερη μεταφορά μάζας των βιοδραστικών ενώσεων και τελικά συμβάλλοντας στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Σχετικά με την αιθανόλη, καθώς παράγεται μέσω ζύμωσης διαφόρων πρώτων υλών που περιέχουν υδατάνθρακες, θεωρείται βιοδιαλύτης, ο οποίος Έχει το πλεονέκτημα ότι σε με τους άλλους διαλύτες που αναφέρθηκαν, η αιθανόλη είναι μη τοξική. Επιπλέον παρέχει την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης μετά την ανάκτησή της και αφότου αφαιρεθεί από το εκχύλισμα, δημιουργώντας έτσι σχεδόν μηδενικά απόβλητα. Συνεπώς η αιθανόλη μπορεί να χαρακτηριστεί ως περιβαλλοντικά καλοήθης διαλύτης (Cavdarova and Makris 2014). Σαφώς όλοι οι παραπάνω μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνοι τους ή ως υδατικό διάλυμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε περιπτώσεις διαλύματος με υψηλότερο ποσοστό αλκοόλης, διαλύονται κυρίως αιθέρια έλαια, λιπίδια και ρητίνες, ενώ σε περιπτώσεις με χαμηλότερο ποσοστό αλκοόλης διαλύονται κυρίως υδατοδιαλυτές ουσίες, όπως οργανικά οξέα, πικρές ουσίες και υδατάνθρακες (Hanousek Čiča et al. 2019). Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν και υδατοδιαλυτή φύση, καθώς η πλειονότητα τους απαντάται φυσικά ως γλυκοσίδες. Κατ' επέκταση προτείνονται υδατικά διαλύματα με μεγάλες συγκεντρώσεις νερού (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Στην συγκεκριμένη περίπτωση των πολυφαινολών, οι (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018) αναφέρουν καλύτερη εκχύλιση γαλλικού οξέος, (-)-επιγαλλοκατεχίνης, (+)-κατεχίνης, (-)-επικατεχινγαλικού και (-)-επιγαλλοκατεχιναιλικού με νερό ως διαλύτη, ενώ με χρήση οργανικών διαλυτών ή υαδικών διαλυμάτων αυτών, παρατηρείται εκχύλιση ορισμένων φλαβονοειδων, όπως γλυκοζίτες κερκετίνης αλλά και κάποιες τανίνες. Επιπλέον οι συμβατικές μέθοδοι συχνά απαιτούν μεγάλους χρόνους επεξεργασίας και υψηλές θερμοκρασίες. Τέτοιες διαδικασίες με μεγάλο χρόνο επεξεργασίας ενδέχεται να οδηγήσουν αποικοδόμηση των πολυφαινολών, ενώ η θέρμανση και ο βρασμός μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια πολυφαινολών λόγω ιονισμού, υδρόλυσης και οξειδωσης κατά την εκχύλιση (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Clodoveo et al. 2022), (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Τις τελευταίες δεκαετίες λόγω των παραπάνω μειονεκτημάτων, των αυστηρότερων απαιτήσεων σχετικά τη χρήση χημικών διαλυτών παγκοσμίως και τις ανησυχίες για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, γίνονται μεγάλες προσπάθειες για την ανάπτυξη εναλλακτικών τεχνικών

εκχύλισης. Οι πιο διαδεδομένες από αυτές κρίνονται η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE), η εξαγωγή με υπερήχους (HAE), η εξαγωγή υπερκρίσιμου υγρού (SFE) και η εκχύλιση υπό πίεση (PLE) (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021), (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Κατά γενική ομολογία αυτές πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών μεθόδων, καθώς εξοικονομούν χρόνο, χαρακτηρίζονται φιλικές προς το περιβάλλον, απαιτούν μικρότερες ποσότητες διαλύτη και παρέχουν φαινορικά εκχυλίσματα υψηλής ποιότητας με μια οικονομικά αποδοτική διαδικασία (Clodoveo et al. 2022). Συγκεκριμένα η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE) πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες καταφέροντας όμως να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα εκχύλισης. Η μέθοδος υψηλής υδροστατικής πίεσης (HHP) προσφέρει πολύ υψηλές αποδόσεις εκχύλισης από διάφορες μήτρες (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018). Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE) χρησιμοποιεί πολύ μικρές ποσότητες τοξικών διαλυτών και πραγματοποιείται απουσίας φωτός και αέρα. Έτσι δεν υποβαθμίζεται το εκχύλισμα και θεωρείται ότι παρουσιάζει αυξημένη επιλεκτικότητα, αποτελεσματικότητα και αυτοματοποίηση (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018), (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Τέλος η υποβοηθούμενη εξαγωγή από υπερήχους (HAE) αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, η οποία είναι ιδιαίτερα ελκυστική καθώς θεωρείται απλή στην χρήση, φθηνή και με εξοπλισμό χαμηλού κόστους, με μικρότερη χρονική απαίτηση από τις συμβατικές και μικρότερη κατανάλωση διαλύτη (Clodoveo et al. 2022), (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021), (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Επίσης είναι πολύ αποτελεσματική καθώς αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης και βελτιώνει την κινητική της (Hadrich, Dimitrov, and Kriaa 2017). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση ενέργειας που προέρχεται από υπερήχους για τη διευκόλυνση της εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από στερεό δείγμα (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Τα ηχητικά κύματα προτείνεται για φυτικές εκχυλίσσεις να λαμβάνουν συχνότητες εύρους μεταξύ 20 kHz με 100 kHz (Clodoveo et al. 2022), (Roseiro, Duarte, et al. 2013). Έτσι προκαλείται το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης, το οποίο σε συνδυασμό με στις επερχόμενες θερμικές, χημικές και μηχανικές επιδράσεις, οφείλεται για τα πλεονεκτήματα της μεθόδου (Clodoveo et al. 2022), (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021), (Hadrich, Dimitrov, and Kriaa 2017). Στην πράξη προκαλείται διαταραχή των κυτταρικών τοιχωμάτων, η οποία ευνοεί τη μεταφορά μάζας (Clodoveo et al. 2022). Έτσι προκύπτει μια επαρκή επαφή της μήτρας του δείγματος με τον διαλύτη εκχύλισης,

με απαίτηση χαμηλότερων θερμοκρασιών, χωρίς της βλάβη θερμικά ασταθών συστατικών (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021), (Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018) . Συγκεκριμένα για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα χαρουπιών με αυτή την μέθοδο, λίγες είναι οι αναφορές πλήρους βελτιστοποίησης της ώστε να είναι συγκρίσιμη με τις συμβατικές τεχνικές εξαγωγής (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021).

1.2.2. Επιρροές στα εκχυλίσματα

Η σύνθεση των εκχυλισμάτων χαρουπιάς που προκύπτει με κάποια από τις παραπάνω μεθόδους δεν θα μπορούσε να προβλεφθεί. Βιβλιογραφικά μάλιστα αναφέρονται αρκετά και διαφορετικά φαινολικά προφίλ τέτοιων εκχυλισμάτων. Αυτό οφείλεται ιδιαίτερα στο πολύπλοκο και ευκόλως επηρεαζόμενο προφίλ των τμημάτων της χαρουπιάς, το οποίο ήδη αναλύθηκε. Όμως εξίσου σημαντικό ρόλο έχει και η μεθοδολογία της εκχύλισης. Περιληπτικά αναφέρονται ο τύπος και η συγκέντρωση του διαλύτη, η αναλογία διαλύτη-στερεού, το μέγεθος σωματιδίων, ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης. Η σημαντικότητα τους είναι αμφιλεγόμενη. Οι Stavrou, Christou, and Kapnissi-Christodoulou 2018 αναφέρουν ως πιο σημαντικούς παράγοντες την πολικότητα του διαλύτη και την θερμοκρασία. Σίγουρα όμως, όλοι επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα, την εκλεκτικότητα και την απόδοση της εκχύλισης. Πιο αναλυτικά για την αναλογία υγρού (διαλύτη) προς στερεό (φυτικού υλικού), φαίνεται ότι προτιμητέο είναι ο διαλύτης να είναι τετραπλάσιος σε σύγκριση με το στερεό. Οι πολύ μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη οδηγούν σε σχετικά χαμηλή απόδοση ολικών φαινολικών και παράγουν πολύ αραιά εκχυλίσματα. Η μελέτη τέτοιων εκχυλισμάτων μπορεί να απαιτεί περαιτέρω επεξεργασίες για μείωση του περιεχομένου υγρού και δημιουργία πιο πυκνού εκχυλίσματος, οι οποίες όμως έρχονται στον αντίποδα της οικονομίας της διαδικασίας (Almanasrah et al. 2015). Οι πολύ μικρότερες ποσότητες διαλύτη μπορεί να οδηγήσουν σε γρήγορο κορεσμό του και συνεπώς μη ολοκλήρωση της διαδικασίας εκχύλισης. Αντίστοιχα η υπερβολική ποσότητα φυτικού υλικού, φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους του διαλύτη και συνεπώς αναστολή της διάχυσης φυτικού υλικού των πολυφαινολών στο μέσο εκχύλισης (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Η σωστή επιλογή διαλύτη αποτελεί ακόμα βασικό παράγοντα για καλή αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι ζητούμενες ενώσεις στην περίπτωση του χαρουπιού είναι κυρίως οι

πολυφαινόλες, προτείνεται η χρήση πολικών διαλυτών. Βάση αυτού ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος αποτελεί τον πιο μη πολικός διαλύτη από αυτούς που μελετώνται κυρίως στις φυτικές εκχύλισεις, θεωρείται εξαιρετικά ακατάλληλος (Wissam et al. 2013). Επιπλέον για τον ίδιο λόγο προτείνεται η χρήση υδατικών διαλυμάτων για την εκχύλιση, καθώς έτσι δημιουργείται ένα πιο πολικό περιβάλλον, το οποίο ενισχύει την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από τα φυτικά κύτταρα (Christou, Stavrou, and Karpnissi-Christodoulou 2021). Η επίδραση της πολικότητας του διαλύτη φαίνεται ακόμα ότι εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης, στο οποίο βρίσκεται το υπό μελέτη τμήμα του χαρουπιού. Περί αυτού, οι ben Othmen et al. 2021 παρατήρησαν ότι, όταν το προς εκχύλιση δείγμα βρίσκεται στο μεσώριμο και ώριμο στάδιο, το νερό αποτελεί πιο κατάλληλο διαλύτη συγκριτικά με την αιθανόλη. Αναφορικά με την θερμοκρασία φαίνεται ότι η αύξηση της ευνοεί την εκχύλιση πολυφαινολών. Αυτό ερμηνεύεται στο γεγονός ότι ο φυτικός ιστός «μαλακώνει» περισσότερο σε υψηλές θερμοκρασίες και έτσι μειώνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ πολυφαινολών και πρωτεϊνών ή πολυσακχαριτών, βελτιώνοντας τη διαλυτότητα και τη διάχυση τους (Almanasrah et al. 2015), (Roseiro, Tavares, et al. 2013)]. Επίσης παρόλο που κάποιες μελέτες ερευνούν επιδράσεις σε θερμοκρασίες έως και 100°C, οι (Mulet et al. 2016) προτείνουν μέγιστη θερμοκρασία εκχύλισης τους 70°C. Προφανώς βέβαια η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να βλάψει θερμοευαίσθητες ουσίες. Σχετικά με τον χρόνο της εκχύλισης, η αύξηση του φαίνεται να οδηγεί σε χαμηλότερες αποδόσεις της εκχύλισης. Ισχύει μεν ότι τα φυτικά κύτταρα, με αύξηση του χρόνου εκχύλισης, διαταράσσονται περισσότερο ευνοώντας την απελευθέρωση και την διάχυση των πολυφαινολών. Ωστόσο, αν η διάρκεια της εκχύλισης υπερβεί την βέλτιστη, μπορεί να προκύψει χημική αποσύνθεση κάποιων βιοδραστικών ενώσεις και συνεπώς μείωση της αποτελεσματικότητας και της απόδοσης της εκχύλισης (Christou, Stavrou, and Karpnissi-Christodoulou 2021). Οι Roseiro, Tavares, et al. 2013 αναφέρουν ακόμα ότι ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζει την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων, τρεις φορές λιγότερο συγκριτικά με τη θερμοκρασία. Το μέγεθος των σωματιδίων φαίνεται να μην ασκεί μεγάλη επιρροή στην εκχύλιση, αρκεί ουσιαστικά σαφώς το δείγμα να είναι κονιοποιημένο, αλεσμένο ή τεμαχισμένο (Clodoveo et al. 2022). Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις κατά την εκχύλιση μειώνεται παρουσία φωτός (Hanousek Čiča et al. 2019).

Όσον αφορά την εναλλακτική μέθοδο εξαγωγής με υπερήχους (HAE), η αποτελεσματικότητα της επηρεάζεται σαφώς από όλους τους παραπάνω παράγοντες, αλλά και από την ισχύ των υπερήχων, την συχνότητα των υπερήχων και την λειτουργία (συνεχής ή παλμική) (Clodoveo et al. 2022), (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Σχετικά με την λειτουργία, παρόλο που και οι δύο παρουσιάζουν παρόμοιες βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, η εκχύλιση σε παλμική λειτουργία οδηγεί σε μεγαλύτερες τιμές φαινολικών ενώσεων. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι η συνεχής έκθεση του φυτικού κυττάρου στη σπηλαίωση οδηγεί σε αύξηση τόσο της θερμοκρασίας όσο και της πίεσης, με αποτέλεσμα την αποσύνθεση ευαίσθητων βιοδραστικών ουσιών. Αναφορικά με το εύρος των υπερήχων, φαίνεται ότι αύξηση του οδηγεί σε μείωση της περιεκτικότητας σε φαινολικά (Christou, Stavrou, and Kapnissi-Christodoulou 2021). Ακόμα αξίζει να αναφερθεί ότι οι Clodoveo et al. 2022 αποδίδουν αμελητέα επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαγωγής με υπερήχους.

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι, ποιες πολυφαινόλες που θα υπάρχουν στο τελικό εκχύλισμα, θα εξαρτηθεί από πολύ μεγάλο πλήθος παραγόντων, οι οποίοι μάλιστα αλληλεξαρτώνται. Έτσι προκύπτουν σημαντικές διαφορές και μη συγκρίσιμα ευρήματα ανά την βιβλιογραφία (Clodoveo et al. 2022). Οπότε κρίνεται λογική η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με σκοπό την εύρεση μιας τυποποιημένης μεθόδου εκχύλισης. Ακόμα μεγαλύτερη πρόκληση αποτελεί η θεμελίωση μεθόδων, οι οποίες όχι μόνο παρουσιάζουν καλή απόδοση σε εργαστηριακή κλίμακα, αλλά και σε μεγαλύτερη κλίμακα. Επισημαίνεται ότι οι εκχυλίσσεις με νερό παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς αυτό το ζητούμενο, καθώς πλεονεκτούν τόσο από οικονομική όσο και από περιβαλλοντική άποψη (Almanasrah et al. 2015).

1.3. Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας

1.3.1. Μελέτες φυτικών εκχυλισμάτων

Κάποιοι μικροοργανισμοί ανέκαθεν είχαν αποτελέσει κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Έτσι είχαν πραγματοποιηθεί μεγάλες και μάλιστα αρκετά επιτυχημένες προσπάθειες για την εύρεση αντιμικροβιακών ενώσεων. Έτσι όσο περισσότερες αντιμικροβιακές ενώσεις ανακαλύπτονταν, υπήρχε η θεώρηση ότι οι μολυσματικές ασθένειες θα εξαλειφθούν με την χρήση αυτών. Δυστυχώς, όμως οι μικροοργανισμοί φάνηκε ότι μπορούν να αναπτύσσουν αντοχή έναντι των αντιμικροβιακών ενώσεων

και οι τελευταίες χάνουν την αποτελεσματικότητά τους. Κατ' επέκταση λόγω του κινδύνου πολυανθεκτικών βακτηρίων, υπάρχει παγκόσμια ανησυχία για τη δημόσια υγεία (Balouiri, Sadiki, and Ibnsouda 2016). Γεννήθηκε έτσι η ανάγκη τόσο για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας ή της αντίστασης που εμφανίζουν οι μικροοργανισμοί, όσο και για την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων. Στο τομέα των τροφίμων, στο οποίο αναφέρεται και η παρούσα εργασία, ως αντιμικροβιακές ενώσεις ορίζονται χημικές ή φυσικές ενώσεις που υπάρχουν ή προστίθενται σε τρόφιμα που καθυστερούν την ανάπτυξη των μικροβίων ή προκαλούν μικροβιακό θάνατο (Klančnik et al. 2010). Στην σημερινή εποχή η παγκόσμια τάση, που οφείλεται στις απαιτήσεις των πιο ευσυνείδητων πλέων καταναλωτών, επιτάσσει την παραγωγή τροφίμων χωρίς τεχνητές και χημικές ουσίες ακόμα και αν αυτές χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά και συντηρητικά μέσα. Έτσι το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσανατολιστεί στη ανακάλυψη φυτοχημικών, δηλαδή φυσικών αντιμικροβιακών για την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων. Πράγματι πολλοί είναι οι φυτικοί πόροι με ελπιδοφόρο δράση. Αυτοί κυμαίνονται από γεωργικές και κηπευτικές καλλιέργειες όπως αμπέλια, εσπεριδοειδή, λυκίσκο, μούρα και φύλλα τσαγιού, σε αιθέρια έλαια όπως λεβάντα, έως και φαρμακευτικά φυτά όπως πεύκο, φασκόμηλο, δεντρολίβανο, ρίγανη, θυμάρι και πολλά άλλα (Klančnik et al. 2010). Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγεται και το χαρούπι, το οποίο μελετάται σε αυτήν την εργασία και αποτελεί άφθονο και ευοίωνο αντιμικροβιακό παράγοντα.

1.3.2. Μέθοδοι

Για την ανίχνευση αντιμικροβιακής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων ή καθαρών ουσιών αλλά και για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του έναντι σε κάποιον μικροοργανισμό έχουν χρησιμοποιηθεί ανά τα χρόνια διάφορες *in vitro* μέθοδοι. Αυτές ιδανικά θα έπρεπε να είναι απλές, γρήγορες, αναπαραγωγίσιμες, φθηνές και ικανές να μεγιστοποιούν την απόδοση του δείγματος ώστε τελικά να μπορεί να αντιμετωπίσει έναν ποικίλο αριθμό εκχυλισμάτων και κλασμάτων (Klančnik et al. 2010). Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι η διάχυση δίσκου, η διάχυση φρεατίου, η αραίωση ζωμού ή άγαρ, η κυτταροφθορομετρία ροής και η βιοφωταύγεια. Σχετικά με τις μεθόδους διάχυσης δίσκου και φρεατίου, αποτελούν δοκιμές διάχυσης άγαρ στις οποίες γίνεται χρήση δύο διαφορετικών τύπων δεξαμενών, συγκεκριμένα δίσκοι διηθητικού χαρτιού και φρεάτια (πηγάδια) αντίστοιχα (Balouiri

et al. 2016). Αυτές είναι πολύ γνωστές και βρίσκουν μεγάλη χρήση (Παπαοικονόμου 2014). Όμως είναι κατάλληλες κυρίως για ποιοτικές μελέτες καθώς παρέχουν μια εικόνα παρουσίας ή απουσίας ουσιών με αντιμικροβιακά δραστηριότητα (Valgas et al. 2007). Αντίστοιχα μεγάλη απήχηση βρίσκουν και οι μέθοδοι αραίωσης, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ποσοτικές δοκιμές, παρέχοντας πληροφορίες για την ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωση (Valgas et al. 2007) ,(Παπαοικονόμου 2014). Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι η πιο γνωστή μέθοδος της κατηγορίας αυτής είναι η μέθοδος μικροαραίωσης ζωμού. Αντίθετα οι μέθοδοι κυτταροφθορομετρίας ροής και βιοφωταύγειας δεν βρίσκουν τόσο μεγάλη χρήση καθώς απαιτούν συγκεκριμένο εξοπλισμό, γεγονός το οποίο συνεπάγεται περαιτέρω κόστος. Παρόλο που παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα των επιδράσεων του αντιμικροβιακού παράγοντα, συχνά χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας τους (Valgas et al. 2007) . Έτσι η χρήση τους προτείνεται ως μορφή συμπληρωματικής μελέτης με σκοπό την εμβάθυνση των αποτελεσμάτων. Αυτές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική βλάβη που υφίσταται ο υπό έλεγχο μικροοργανισμός και με τη φύση του ανασταλτικού αποτελέσματος (βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό) και σε εξάρτηση με τον χρόνο ή τη συγκέντρωση (Balouiri et al. 2016) , (Valgas et al. 2007). Ακόμα αναφέρεται η τεχνική δηλητηριασμένης τροφής, η οποία όμως βρίσκει χρήση ειδικά σε αντιμυκητιασικές δοκιμές. Ακόμη μεγάλης σημασίας κρίνεται η καθιέρωση της έννοιας της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration , MIC), δηλαδή της χαμηλότερης συγκέντρωσης ενός αντιμικροβιακού παράγοντα η οποία αποτρέπει την ορατή ανάπτυξη μικροοργανισμών μετά από ολονύχτια επώαση. Στο πλαίσιο της εύρεσης νέων φυτοχημικών αξίζει να αναφερθεί η δυνατότητα συνδυαστικής μελέτης με την τεχνολογία πολλαπλών εμποδίων, με σκοπό την εύρεση καλύτερων αποτελεσμάτων. Έτσι θα μπορούσε να δοκιμαστεί τόσο η συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση πολλών φυτικών εκχυλισμάτων , όσο και η προσθήκη ορανικών οξέων τα οποία ταξινομούνται ως ασφαλή (GRAS). Αναφορικά με την βοήθεια από οργανικά οξέα μπορεί να αναφερθεί, ότι παρουσιάζουν πολλούς διαφορετικούς αντιμικροβιακούς μηχανισμούς, όπως η διαταραχή του ενδοκυτταρικού pH, οσμωτική καταπόνηση και διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης (Calo et al. 2015). Τέλος όμως απαιτείται να αναφερθεί ότι η σύγκριση των αποτελεσμάτων τέτοιων μεθόδων μπορεί να είναι δύσκολη, λόγω χρήσης διαφορετικών μη τυποποιημένων προσεγγίσεων των τεχνικών προετοιμασίας εμβολίου, μεγέθους εμβολίου, μέσου ανάπτυξης, συνθηκών επώασης και άλλων (Balouiri et al. 2016).

1.3.2.1 Μέθοδος διάχυσης και επιρροές

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην διάχυση παρουσιάζουν πολλούς παράγοντες επιρροής. Ο αριθμός των σωματιδίων είναι ένας από αυτούς καθώς ισχύει ότι τα μόρια διαχέονται ταχύτερα όταν βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση. Επίσης ο όγκος σωματιδίων επηρεάζει τον ρυθμό διάχυσης, αφού τα μικρά σωματίδια διαχέονται πιο γρήγορα συγκριτικά με τα μεγάλα. Επιπλέον η θερμοκρασία, αυξανόμενη, φαίνεται ευνοεί τον ρυθμό διάχυσης. Αυτό οφείλεται στην αύξηση της μέσης κινητικής ενέργειας των μορίων που προκαλεί. Έτσι δημιουργείται και ο προβληματισμός αναφορικά με την διατήρηση των τρυβλίων σε θερμοκρασία ψύξης για λίγη ώρα πριν την επώαση. Αυτό σαφώς παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, με απώτερο σκοπό την διευκόλυνση της διάχυσης. Το pH των διαλυτών είναι ακόμα ένας παράγοντας, ο οποίος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν πριν από τη δοκιμή, καθώς μπορεί η μικροβιακή ανάπτυξη να παρεμποδίζεται σε μέσα που έχουν καταστεί πολύ όξινα ή πολύ αλκαλικά (Valgas et al. 2007). Χρειάζεται να επισημανθεί ότι η αναλύσεις διάχυσης δεν είναι κατάλληλες για μελέτες φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων, οι οποίες είναι ελάχιστα διαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό. Αυτό ισχύει διότι λόγω της υδρόφοβης φύσης τους, εμποδίζεται η ομοιόμορφη διάχυση στο άγαρ (Klančnik et al. 2010). Ενώ γίνεται αντιληπτό πως είναι κατάλληλη για την μελέτη μόνο αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών.

1.3.2.1.1. Μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ

Η ποιοτική αυτή μέθοδος προσδιορισμού της ευαισθησίας των βακτηρίων στα αντιμικροβιακά, αναπτύχθηκε το 1940 και αξίζει περαιτέρω ανάλυση. Τα κύρια πλεονεκτήματα της είναι η απλότητα, το χαμηλό κόστος, η δυνατότητα δοκιμής τεράστιου αριθμού μικροοργανισμών και αντιμικροβιακών παραγόντων και η ευκολία στην ερμηνεία των παρεχόμενων αποτελεσμάτων (Balouiri et al. 2016). Ωστόσο όπως όλες οι μέθοδοι που βασίζονται σε μελέτες με άγαρ, απαιτούν εργασία και χρόνο (Klančnik et al. 2010). Κατά την διεκπεραίωση αυτής της μεθόδου φαίνεται να έχουν πραγματοποιηθεί πολλές διαφορετικές μορφές, καθώς κάθε εργαστήριο μπορεί να τροποποιεί τη διαδικασία ώστε να ανταποκρίνεται στις εκάστοτε ανάγκες. Έτσι γίνεται χρήση διαφορετικών τύπων μέσα, συγκεντρώσεων εμβολίου, χρόνου επώασης,

θερμοκρασίας επώασης, και συγκεντρώσεων της αντιμικροβιακής ένωσης. Η βασική όμως μεθοδολογία της μεθόδου αυτή, αποτελείται από τον εμβολιασμό με εναιώρημα του υπό μελέτη παθογόνου μικροοργανισμού σε πλάκα με άγαρ Mueller-Hinton και στην συνέχεια τοποθέτηση δίσκων φίλτρου, εμποτισμένων με έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Πρακτικά έτσι εξελίσσεται τόσο η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όσο ταυτόχρονη διάχυση των αντιμικροβιακών ενώσεων στην επιφάνεια του άγαρ. Αξίζει να αναφερθεί ότι η διάχυση μέσω του άγαρ πραγματοποιείται πιο αργά σε σύγκριση με την εκχύλιση του αντιμικροβιακού έξω από το δίσκο. Έτσι η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού βρίσκεται μέγιστη πλησιέστερα στο δίσκο, ενώ απομακρυνόμενη από τον δίσκο εμφανίζεται μια λογαριθμική μείωση της συγκέντρωσης. Ο ρυθμός διάχυσης του αντιμικροβιακού παράγοντα στο άγαρ εξαρτάται από τις ιδιότητες διαλυτότητας του φαρμάκου σε αυτό αλλά και από το μοριακό βάρος της αντιμικροβιακής ένωσης. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι τα μεγαλύτερα μόρια διαχέονται με πιο αργούς ρυθμούς από ενώσεις χαμηλότερου μοριακού βάρους. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης αναμένεται να συμβεί όταν αυτός φτάσει σε μια κρίσιμη μάζα και είναι ικανός να υπερνικήσει την ανασταλτική επίδραση. Ο χρόνος που απαιτείται ώστε το μικροβιακό εναιώρημα να φτάσει στην κρίσιμη μάζα εκτιμάται συνήθως στις 4 έως 10 ώρες, αλλά είναι χαρακτηριστικό κάθε είδους, και επηρεάζεται από τα μέσα και τη θερμοκρασία επώασης. Τελικά αντιμικροβιακή δράση θα αποδοθεί, αν μετά από επώαση παρουσιαστεί ζώνη αναστολής γύρω από τον δίσκο διηθητικού χαρτιού. Δηλαδή η παρουσία ή η απουσία ανάπτυξης γύρω από τους δίσκους είναι ένα έμμεσο μέτρο της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκάστοτε ενώσεων. Ως ζώνη αναστολής θεωρείται η περιοχή στην οποία δεν υπάρχει εμφανής, ορατή ανάπτυξη που μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνό μάτι. Δεδομένου όμως του γεγονότος ότι, η αναστολή της ανάπτυξης δεν σημαίνει θάνατο των μικροοργανισμών, η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά αποτελέσματα. Επίσης η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), καθώς είναι αδύνατο να προσδιοριστεί ποσοτικά η ποσότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα που διαχέεται στο άγαρ. Η χρήση της μεθόδου αυτής λοιπόν βασίζεται στην ερμηνεία της παρουσιαζόμενη ζώνης για την διάκριση των μικροοργανισμών ως ευαίσθητα, ενδιάμεσα ή ανθεκτικά.

Σχετικά με κάποια σημεία προσοχής κατά την διεξαγωγή της μεθόδου και κάποιες πληροφορίες για την καταλληλότητα της αναφέρονται τα ακόλουθα. Αρχικά οι δίσκοι

δηθητικού χαρτιού, οι οποίες συνήθως έχουν διάμετρο 6mm, απαιτείται να αποθηκεύονται καταλλήλως για την λήψη σωστών και αναπαραγωγίσιμων αποτελεσμάτων. Για αυτό πρέπει να φυλάσσονται είτε στους 8°C είτε στην κατάψυξη στους -14°C (Anon 2009). Ωστόσο για την χρήση τους οι δίσκοι αυτοί πρέπει να αποκτούν θερμοκρασία ανάλογη του περιβάλλοντος και μάλιστα παραμένουν σε αυτή έως ότου ολοκληρωθεί η εξάτμιση του αραιωτικού υγρού (Valgas et al. 2007). Λογικό κρίνεται ότι, η τοποθέτηση των δίσκων στα τρυβλία πρέπει να είναι κατάλληλη. Σημαντικό κρίνεται κυρίως οι δίσκοι να μην βρίσκονται ιδιαίτερα κοντά μεταξύ τους αλλά ούτε και στα τοιχώματα του τρυβλίου. Έτσι η εμφανιζόμενη ζώνη αναστολής θα είναι προφανής και ευκόλως μετρήσιμη (Anon 2009). Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI) το εναιώρημα μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι τάξης 0,5 σύμφωνα με το πρότυπο McFarland. Ώστε βάση της οπτικής σύγκρισης η βακτηριακή πυκνότητα, να αντιστοιχεί σε παρουσία $(1-2) \times 10^8$ CFU/mL. Επιπλέον αυτό το εγκεκριμένο πρότυπο προτείνει χρήση του υποστρώματος Mueller Hinton και θερμοκρασία επώασης $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Balouiri et al. 2016) (Valgas et al. 2007). Το θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton έχει κάποιες ιδιότητες, οι οποίες το καθιστούν εξαιρετικό σε δοκιμές αντιβιοτικών. Μεταξύ αυτών των ιδιοτήτων συγκαταλέγεται ότι είναι ένα μη-εκλεκτικό, δηλαδή σχεδόν όλοι οι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτό. Επιπλέον, περιέχει άμυλο, το οποίο μπορεί να απορροφήσει τις τοξίνες που απελευθερώνονται από τα βακτήρια, έτσι ώστε να μην αντιδράσουν με τα αντιβιοτικά, επιτρέποντας την καλύτερη διάχυση των αντιβιοτικών από τις άλλες πλάκες (Παπαοικονόμου 2014). Ακόμα οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται χρειάζεται να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης τους. Για αυτόν το λόγο προτείνεται η ανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού να λάβει χώρα την προηγούμενη μέρα από την διεξαγωγή της μεθόδου. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι το μέγεθος της ζώνης αυτής επηρεάζεται εκτός από όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες και από το βάθος του άγαρ, καθώς το αντιμικροβιακό διαχέεται σε τρεις διαστάσεις. Έτσι σε ένα ρηχό στρώμα του άγαρ αναμένεται να παρουσιαστεί μεγαλύτερη ζώνη αναστολής από ένα βαθύτερο στρώμα (Anon 2009). Επίσης χρειάζεται να επισημανθεί ότι η απουσία ζώνης αναστολής δεν ισοδυναμεί απαραίτητα σε ανενεργή ένωση, ειδικά αν αυτή είναι λιγότερο πολική, καθώς τότε διαχέεται πιο αργά στο μέσο καλλιέργειας (Klančnik et al. 2010). Τέλος αν κατά την διεξαγωγή της μεθόδου αυτή, όλα γίνουν σωστά, οι ζώνες αναστολής θα πρέπει να εμφανίζονται ομοιόμορφα κυκλικές (Anon 2009).

1.3.2.1.2. Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ

Η διαδικασία αυτής της μεθόδου είναι ίδια με της μεθόδου διάχυσης δίσκου, με την μόνη πρακτική διαφορά να βρίσκεται στην αντικατάσταση των δίσκων διηθητικού χαρτιού με φρεάτια. Ως φρεάτια ονομάζονται οπές με διάμετρο 6 έως 8 mm, οι οποίες ανοίγονται ασηπτικά και μπορούν να χωρέσουν όγκο του αντιμικροβιακού παράγοντα της τάξης των 20–100 μL (Balouiri et al. 2016). Παρατηρείται λοιπόν και μια περαιτέρω οικονομική μείωση στην κατά τα άλλα ήδη φθηνή μέθοδο. Στην συγκεκριμένη μέθοδο προτείνεται μεγαλύτερο βάθος του άγαρ ώστε να μπορεί να περιληφθεί μεγαλύτερη ποσότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα και να ληφθούν καλύτερα αποτελέσματα. Βέβαια αυτό έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι η διάχυση πραγματοποιείται σε τρεις διαστάσεις και συνεπώς καλύτερα αποτελέσματα δίνονται σε πιο ρηχό άγαρ. Η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή της πρωτότυπης μεθόδου διάχυσης δίσκου. Ωστόσο οι (Valgas et al. 2007) αναφέρουν ότι η μέθοδος διάχυσης φρεατίου παρουσιάζει καλύτερη ευαισθησία στα αποτελέσματα της κατά την μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης φυσικών προϊόντων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι, η παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων στο προς έλεγχο δείγμα είναι πολύ λιγότερο πιθανό να παρεμποδίσει τη διάχυση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο άγαρ σε σύγκριση με τον δίσκο διηθητικού χαρτιού. Επιπλέον η επιφάνεια του δίσκου διηθητικού χαρτιού μπορεί να χαρακτηριστεί υδρόφιλη. Συνεπώς στην περίπτωση κατιονικά ουσιών, αναμένεται αυτές να προσροφηθούν στην επιφάνεια του δίσκου χωρίς όμως να διαχυθούν στο άγαρ. Έτσι μία κατιονική πολική ένωση μπορεί να εμφανίζει καλή αντιβακτηριακή δράση, η οποία όμως να μην μπορεί να αλλά η οποία δεν θα μπορεί να γίνει αισθητή κατά τη διάχυση με δίσκο. Αυτό όμως δεν θα συμβεί στην περίπτωση των φρεατίων (Valgas et al. 2007).

1.3.2.2. Bioscreen

Τα τελευταία χρόνια διάφορες αυτοματοποιημένες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ταχεία αξιολόγηση της δράσης αντιβιοτικών. Μια από αυτές είναι η χρήση του οργάνου Bioscreen, το οποίο αποτελεί ένα αυτοματοποιημένο και ταχύ σύστημα θολομέτρου (Garcia et al. 2021). Ως σύστημα αποτελείται από πλακέτα μικροαραίωσης με 100 φρεάτια, το κατάλληλο όργανο με ενσωματωμένο σύστημα διαλύτη-κατανομέα

και το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα. Έτσι τα αποτελέσματα της οπτικής πυκνότητας σε συγκεκριμένο κάθε φορά μήκος κύματος, μετατρέπονται σε καμπύλες ανάπτυξης από τις οποίες μπορούμε να υπολογίσουμε διάφορες παραμέτρους όπως ο χρόνος που απαιτείται για να εμφανιστεί μία ανιχνεύσιμη αύξηση της οπτικής πυκνότητας (Τύμπης, Πετράκης, Κοντελής 2016). Με αυτόν το τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την συνεχή παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων. Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα ότι είναι αυτοματοποιημένη, χαρακτηριστικό πολύ σημαντικό ανάμεσα στις άλλες μεθόδους, ενώ περιέχει ακόμα θερμοκοιτίδα και αναδευτήρα. Αξιολογό κρίνεται επίσης το γεγονός ότι έχει υψηλή απόδοση. Ακόμα προσφέρει εξοικονόμηση χρόνου, προσωπικού και χώρου ενώ ταυτόχρονα δίνει την δυνατότητα μελέτης μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων διατηρώντας καλή μικροβιακή ποιότητα (Τύμπης, Πετράκης, Κοντελής 2016). Σαφώς όμως παρουσιάζει και κάποιους περιορισμούς, όπως το όριο ανίχνευσης που διαθέτει, το οποίο μπορεί να ανιχνεύσει αύξηση του ολικού αριθμού των βακτηρίων της τάξης των $10^6 - 10^7$ CFU/mL. Επιπλέον τα αποτελέσματα του, καθώς βασίζονται στη οπτική πυκνότητα, συμπεριλαμβάνουν τόσο τα ζωντανά όσο και τα νεκρά κύτταρα. Κατ' επέκταση όχι μόνο δεν μπορεί να δώσει καλά αποτελέσματα σχετικά με την βακτηριοκτόνο δράση αλλά δίνει και λανθασμένα αποτελέσματα για την ευαισθησία των μικροοργανισμών. Η ακρίβεια λοιπόν της μεθόδου αυτής είναι περιορισμένη. Τέλος καθώς χρησιμοποιεί πλακέτα μικροαραίωσης χαρακτηρίζεται από χαμηλό όγκο εργασίας. Συγκεκριμένα η μέγιστη ποσότητα μελέτης είναι 400 μ L. Ένα ακόμα μειονέκτημα που δεν μπορεί να παραληφθεί είναι το υψηλό κόστος που απαιτείται για τον εξοπλισμό (Ungphakorn et al. 2017). Κάποια όμως από τα μειονεκτήματα αυτά μπορούν να αντισταθμιστούν από το γεγονός ότι η μέθοδος δίνει την δυνατότητα μελέτης 100 διαφορετικών δειγμάτων ταυτόχρονα και την δυνατότητα καταγραφής της οπτικής πυκνότητας ανά τακτά χρονικά διαστήματα και για μεγάλο διάστημα, που παρέχει. Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι με την μέθοδο αυτή μπορεί να υλοποιηθεί η δοκιμασία σκακιέρας. Εν συντομία δηλαδή, η μέθοδος επιτρέπει ποικίλες συγκεντρώσεις κάθε αντιμικροβιακού κατά μήκος του διαφορετικού άξονα μιας μήτρας 10×10 , διασφαλίζοντας έτσι ότι κάθε φρεάτιο της πλάκας ανάλυσης αντιπροσωπεύει διαφορετικό συνδυασμό. Έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως ποσοτική μέθοδος καθώς μπορεί να υπολογίσει την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη βακτηρίων μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Olasupo et al. 2003). Βάση όλων αυτών

συμπεραίνεται ότι αυτό το αυτοματοποιημένο σύστημα θολομέτρου αποτελεί σημαντικό εργαλείο, ικανό να παρέχει σημαντικές συμπληρωματικές πληροφορίες σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης ενός παράγοντα.

1.4. Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν παντού γύρω μας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία τους στον τομέα των τροφίμων, καθώς αυτά αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη τους. Όπως όλοι οι οργανισμοί, έτσι και οι μικροοργανισμοί, έχουν ως κύριο σκοπό την διαίωσιση του είδους τους. Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί για την επίτευξη αυτού μετατρέπουν την οργανική ύλη σε ενέργεια και ανόργανες ενώσεις (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Τα τρόφιμα είναι σαφώς πλούσια σε οργανική ύλη και έτσι οι μικροοργανισμοί καταφέρνουν τόσο να αναπτυχθούν όσο και να πολλαπλασιαστούν σε αυτά. Βάση του αποτελέσματος που επιφέρουν στα τρόφιμα, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διακριθούν ως παθογόνοι, αλλοιογόνοι, και ωφέλιμοι. Γίνεται κατανοητό ότι οι παθογόνοι και οι αλλοιογόνοι είναι ανεπιθύμητοι στα τρόφιμα και κατ' επέκταση γίνονται και εξακολουθούν να γίνονται μεγάλες προσπάθειες για την παραγωγή τροφίμων, στα οποία αυτοί απουσιάζουν. Στην παρούσα εργασία μελετάται η δράση εκχυλισμάτων χαρουπιού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτοί είναι ικανοί να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις με την πρόσληψη τους. Οι τροφικές δηλητηριάσεις διακρίνονται σε τροφοτοξινώσεις και τροφολοιμώξεις. Οι τροφοτοξινώσεις προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τοξικές ουσίες, οι οποίες εκούσια ή ακούσια προστέθηκαν στα τρόφιμα ή είναι προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Οι τροφολοιμώξεις προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που φέρνουν μικροοργανισμούς οι οποίοι προσβάλλουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Καθώς λοιπόν η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών έχει αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία, έχουν καθοριστεί πολύ αυστηρά όρια για την παρουσία τους στα τρόφιμα. Αρνητικό των παθογόνων μικροοργανισμών αποτελεί ακόμα το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τους αλλοιογόνους που δίνουν εμφανείς οργανοληπτικές ενδείξεις για την παρουσία τους, δεν προσφέρουν συχνά προειδοποίηση στους καταναλωτές. Κάτι τέτοιο μπορεί να προκύψει αν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο τρόφιμο, όμως κάτι τέτοιο είναι σπάνιο. Με σκοπό λοιπόν την καταπολέμηση του προβλήματος που δημιουργούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί,

έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις στον τομέα της επεξεργασίας, της συντήρησης, της συσκευασίας και της διακίνησης των τροφίμων. Ωστόσο φαίνεται ότι αυτό αύξησε τον αριθμό των τροφικών δηλητηριάσεων αυτό, κυρίως λόγω της αύξησης στη κατανάλωση τροφίμων που έχουν υποστεί ήπια μορφή επεξεργασίας καθώς και στη βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης με αποτέλεσμα την δημιουργία πιο αντικειμενικής εικόνας του προβλήματος (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Η ανάγκη λοιπόν για την αντιμετώπιση του προβλήματος, παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα κρίνεται επιτακτική.

1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* ανήκει στην οικογένεια Micrococcaceae. Είναι θετικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο έχει μορφή κόκκου και δεν έχει ικανότητα κίνησης. Δίνει θετικά αποτελέσματα στην δοκιμή καταλάσης και μπορεί να ζυμώσει αναερόβια την γλυκόζη. Επισημαίνεται ότι δεν σχηματίζει ενδοσπόρια παράγει όμως εξωτοξίνες ή αλλιώς εντεροτοξίνες, η οποίες είναι απλές πρωτεΐνες (Τύμπης, Πετράκης, Κοντελές 2016). Σχετικά με τις συνθήκες ανάπτυξης του, αναφέρονται τα παρακάτω. Η θερμοκρασία ανάπτυξης του κυμαίνεται από τους 7 έως τους 48°C. Ενώ ο *Staphylococcus aureus* παράγει εντεροτοξίνη σε θερμοκρασίες από 10 έως 46°C, με βέλτιστη να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 45°C. Στην μείωση της ενεργότητας νερό (a_w) αυτό το βακτήριο φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό, καθώς σε αερόβιες συνθήκες η ελάχιστη τιμή για την ανάπτυξη του είναι 0,86 ενώ σε αναερόβιες συνθήκες, όπως σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασίας απουσία οξυγόνου ή στα υπό κενό συσκευασμένα προϊόντα, είναι 0,90. Τοξίνη μπορεί να παραχθεί σε ενεργότητα ύδατος έως και 0,93. Αναφορικά με το pH στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί ισχύει το εύρος 4 έως 9,8, με βέλτιστο μεταξύ 6 και 7. Επισημαίνεται ότι η ελάχιστη τιμή pH στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί είναι χαμηλότερη υπό αερόβιες συνθήκες συγκριτικά με την περίπτωση στην οποία βρίσκεται σε αναερόβιο περιβάλλον (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί παθογόνο βακτήριο με σπουδαία σημασία στην επιστήμη τροφίμων. Αυτό οφείλεται κυρίως στους δύο παρακάτω παράγοντες. Αρχικά το γεγονός ότι, συναντάται τόσο στην εντερική οδό όσο και στο δέρμα των ζώων, αλλά κυρίως επειδή βασική πηγή μόλυνσης αποτελεί το ανθρώπινο προσωπικό το οποίο έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι μπορεί να προκαλέσει τροφοτοξίνωση στον άνθρωπο και συγκεκριμένα σταφυλοκοκκική γαστρεντερίτιδα.

Για την πρόκληση αυτή της τροφοτοξίνωσης το προϊόν πρέπει να περιέχει περισσότερες των 10^7 εντεροτοξίνες/ gr ή ml. Αξίζει να αναφερθεί ότι κρούσματα σταφυλοκοκκικής γαστρεντερίτιδας οφείλονται κυρίως σε ανεπαρκή ψύξη τροφίμων. Τα συμπτώματα της διαφέρουν από άτομο σε άτομο, με τα πιο κοινά να θεωρούνται η σιελόρροια, η ναυτία, ο εμετός, οι κράμπες και η διάρροια (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Στην συγκεκριμένη εργασία θα μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων χαρουπιού έναντι στο στέλεχος *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538.

1.4.2. *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Συγκεκριμένα θεωρείται κολοβακτηριοειδής, αφού ζυμώνει τη λακτόζη παράγοντας οξύ και αέριο και ακόμα πιο ειδικά χαρακτηρίζεται ως εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή αφού ενδημεί μόνο στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Βάση αυτού χρησιμοποιείται ως ποιοτικός δείκτης στα τρόφιμα και μάλιστα ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης (Τύμπης, Πετράκης, Κοντελής 2016). Είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο και δεν παράγει σπόρια. Επίσης αναφέρεται ότι δεν σχηματίζει χρωστικές, αντιδρά θετικά στην αποικοδόμηση της λακτόζης και αρνητικά στην παραγωγή οξειδάσης. Επιπλέον χαρακτηρίζεται αερόβιο και προαιρετικά αερόβιο βακτήριο και αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, της τάξης 10 έως 46°C (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Παρόλο που καταστρέφεται με ήπια θερμική επεξεργασία, αφυδάτωση και κατάψυξη, συναντάται σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Επίσης αναφέρεται ότι η *Escherichia coli* έχει ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη της ίση με 4,2. Αυτό αιτιολογείται από τη δυνατότητα της να αναπτύσσεται σε μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων χρησιμοποιούν σαν πηγή ενέργειας μεγάλο αριθμό υδατανθράκων και άλλων οργανικών ενώσεων. Θετικό μπορεί να θεωρηθεί ότι όπως ήδη αναφέρθηκε ζυμώνει σάκχαρα παράγοντας μεγάλες ποσότητες οξέος και αερίου, προκαλώντας έτσι ανεπιθύμητες οσμές στα τρόφιμα και προειδοποιώντας εν μέρη τον καταναλωτή (Τύμπης, Πετράκης, Κοντελής 2016). Αξίζει να αναφερθεί ότι η *Escherichia* είναι το πιο μελετημένο γένος των βακτηρίων και αναφέρεται ως ένας από τους πιο κοινούς μικροοργανισμούς που εμπλέκονται σε τροφολοιμώξεις, όπως γαστρεντερίτιδα (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Στην συγκεκριμένη εργασία θα μελετηθεί η

αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων χαρουπιού έναντι στο στέλεχος *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922.

1.4.3. *Candida albicans*

Η *Candida albicans* ανήκει στην οικογένεια Cryptococcaceae της διαίρεσης Deuteromycota. Δεν σχηματίζει σπόρια και αναπαράγεται με εκβλάστηση. Ως ζύμη μπορεί να παραμεληθεί, βάση της θεώρησης ότι αυτές αποτελούν μικρό τμήμα του αρχικού μικροβιακού φορτίου και αναπτύσσονται αργά σε σχέση με τα περισσότερα βακτήρια. Αναφέρεται ότι το είδος αυτό έχει την ικανότητα να ευδοκιμεί σε πολύ μεγάλο φάσμα τιμών pH, το οποίο καλύπτει τιμές από το 2 έως το 10 (Davis 2003). Θετικό χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι με την ανάπτυξη των ζυμών προκαλούνται ανεπιθύμητες μεταβολές των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων, οι οποίες μπορούν να γίνουν αντιληπτές από τον καταναλωτή είτε με την όραση είτε και με την οσμή (Τύμπης, Πετράκης, Κοντελής 2016). Συγκεκριμένα το γένος *Candida* δημιουργεί αποικίες κρεμ και κιτρινωπού χρώματος με κολλώδης, λεία, ξηρή, ζαρωμένη ή θαμπή υφή ανάλογα με το είδος. Χαρακτηριστικό του γένους θεωρείται ακόμα ότι αναπτύσσεται γρήγορα και ωριμάζει σε 3 ημέρες. Πηγή της μπορεί να θεωρηθεί το περιβάλλον, ο άνθρωπος αλλά και τα θηλαστικά (Samadi et al. 2019). Αναφορικά με την παρουσία του στα τρόφιμα, πιο συχνά παρατηρείται στον κιμά και στα πουλερικά (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Σημαντικό παράδειγμα των δυσάρεστων επιπτώσεων που μπορεί να έχει αυτή η παθογόνος ζύμη, είναι οι στοματικές λοιμώξεις. Μελέτες δείχνουν επίσης ότι το είδος *Candida albicans* μπορεί να οφείλεται για την εμφάνιση του προκαρκινικού καρκίνου του στόματος ενώ απομονώνεται κατά 80% από όλες τις μορφές της ανθρώπινης καντιντίασης (Samadi et al. 2019). Στην συγκεκριμένη εργασία θα μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων χαρουπιού έναντι στο στέλεχος *Candida albicans* NCPF 3255/ATCC 2091.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά και εξοπλισμός

Ακολουθεί παράθεση των μηχανημάτων και του εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

- Δοκιμαστικοί σωλήνες καλλιέργειας
- Λύχνος Bunsen
- Ηλεκτρόδιο θερμοκρασίας και pH (HANNA instruments)
- Vortex (Scientific Industries)
- Μαγνητικός θερμαντήρας ανάδευσης
- Αναλυτικός Ζυγός (KERN-EW)
- Περιστροφικός Μύλος (BRABENDER)
- Εμπορικό μπλέντερ (WARING)
- Γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- Πιπέτα (Accumax PRO)
- Tips
- Γυάλινες πιπέτες
- Διηθητικό χαρτί εργαστηρίου
- Μονάδα καθαρισμού με υπερήχους (Elmasonic S10 H, Elma)
- Πλαστικά τρυβλία (Laborgeräte GmbH , ISOLAB)
- Υδατόλουτρο (memmert)
- Bioscreen C
- Κλίβανός (memmert)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης, 50ml (BD Falcon)
- Πρότυπα McFarland
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι, 250ml
- Ποτήρια ζέσεως, 100 ml
- Ποτήρια ζέσεως, 250ml
- Χωνί

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα ακόλουθα.

- Στελέχη μικροοργανισμών :
 - Escherichia coli NCTC 12241/ATCC 25922
 - Staphylococcus aureus NCTC 10788/ATCC 6538
 - Candida albicans NCPF 3255/ATCC 2091
- Αιθανόλη
- Απιονισμένο νερό
- Διάλυμα καυστικού νατρίου, 1N
- Τμήματα χαρούπιας (φύλλα , ώριμοι και άγουροι λοβοί), (Ελλάδα, Αττική, Αιγάλεω, 38.0026982458746, 23.67478574005336)
- Mueller Hinton Agar (pronadisa, CONDA)

- Brain Heart Infusion Agar (pronadisa, CONDA)
- Tryptic soy agar (Merck KGaA)
- Sabouraud (pronadisa, CONDA)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Μέθοδοι εκχύλισης χαρουπιού

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι εκχύλισης. Έγινε χρήση φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο διαλυτών, σε διάφορους συνδυασμούς και μεθόδους, με σκοπό να εξαχθούν συμπεράσματα για την καταλληλότητα τους και τελικά την εύρεση αποδοτικού εκχυλίσματος. Επιλέχθηκε να μελετηθεί κυρίως η εκχύλιση με διαβροχή, ως κύριος εκπρόσωπος των συμβατικών μεθόδων. Ωστόσο αποφεύχθηκαν οι τοξικοί οργανικοί διαλύτες και αντικαταστάθηκαν από νερό και αιθανόλη. Το νερό επιλέχθηκε καθώς είναι πολικό ευνοώντας την εκχύλιση πολυφαινολών και επειδή αποτελεί οικονομικά και περιβαλλοντικά συμφέρων διαλύτη. Η αιθανόλη, η οποία είναι βιοδιαλύτης χωρίς τοξική δράση, χρησιμοποιήθηκε σε μορφή υδατικών διαλυμάτων και μάλιστα σε μικρές συγκεντρώσεις αξιοποιώντας έτσι τις δράσεις του νερού. Επιπλέον μελετήθηκε η υποβοηθούμενη από υπερήχους εξαγωγή, με σκοπό την όσο το δυνατόν σύγκριση αυτής της καινοτόμου και εναλλακτικής μεθόδου με την συμβατική της διαβροχής. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται ακολούθως στις διάφορες παραλλαγές τους.

2.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Μελετήθηκαν 4 διαφορετικά τμήματα χαρουπιού. Αρχικά έγινε χρήση του τμήματος ώριμων λοβών χωρίς σπόρους. Για την παραλαβή της τελικής ζητούμενης μορφής τους, γίνεται συγκομιδή ολόκληρων ώριμων λοβών και απομακρύνονται τα σπόρια τους. Τα κομμάτια ώριμων λοβών χωρίς σπόρους που απομένουν αλέθονται με εμπορικό μπλέντερ και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκιερό μέρος. Επίσης γίνεται μελέτη σπόρων από ώριμους λοβούς. Μετά την συγκομιδή των λοβών και την παραλαβή των σπόρων ακολουθεί αποθήκευση τους σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκιερό μέρος. Έπειτα οι σπόροι εισάγονται σε επωαστικό κλίβανο στους 40°C για 24h. Εν συνεχεία εισάγονται για περαιτέρω ξήρανση σε ξηρό κλίβανο στους 40°C για 1h. Οι σπόροι στην συνέχεια ολοκληρώνουν μια αρχική άλεση σε εμπορικό

μπλέντερ και μετά περνούν από περιστρεφόμενο μύλο και λαμβάνουν τελική μορφή αλεύρου. Τέλος αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκιερό μέρος. Ακόμα χρησιμοποιούνται ανώριμοι λοβοί, οι οποίοι μετά την συγκομιδή τους τεμαχίζονται σε λεπτά κομμάτια και χρησιμοποιούνται απευθείας. Ίδια επεξεργασία ακολουθείται και για την μελέτη των φύλλων της χαρουπιάς.



Εικόνα 1: Αρχική μορφή τμημάτων χαρουπιάς που μελετώνται. Όπου 1: κομμάτια ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, 2: σπόροι ώριμων λοβών, 3: φύλλα χαρουπιάς, 4α: ανώριμος λοβός τον Απρίλιο, 4β: ώριμος λοβός.



Εικόνα 2: Τελική μορφή I: ώριμου λοβού χωρίς σπόρους και II: σπόρων ώριμου λοβού

2.2.1.2. Πορεία εκχύλισης

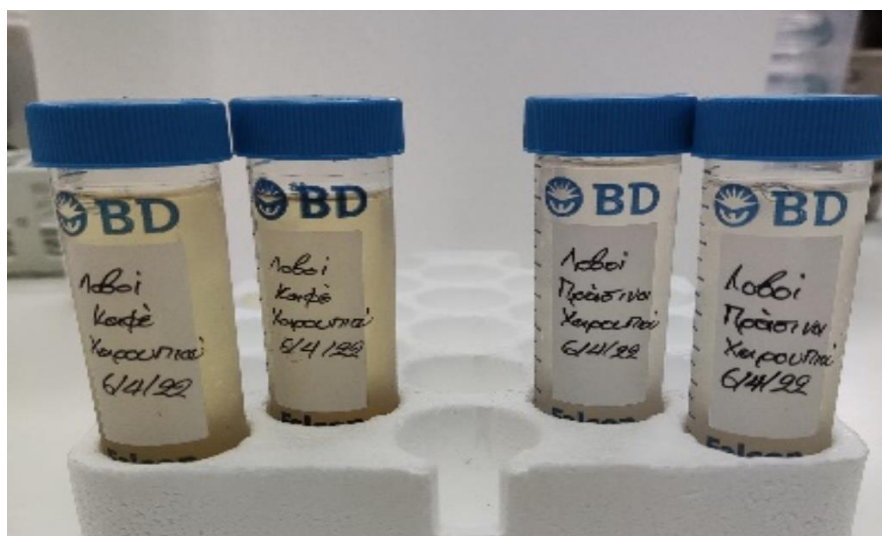
Μέθοδος Α: Εκχύλιση με διαβροχή, με νερό ως διαλύτη και αναλογία υγρού:στερεού 100:1

Γίνεται μελέτη της εκχύλισης από 2 τμημάτων χαρουπιάς, συγκεκριμένα από ώριμους λοβούς χωρίς σπόρους και ολόκληρους ανώριμους λοβούς που έχουν υποστεί την επεξεργασία που αναφέρεται παραπάνω. Λαμβάνεται 1g από κάθε δείγμα και προστίθενται έκαστος 100ml απιονισμένου νερού, ως διαλύτης της εκχύλισης. Έπειτα τα διαλύματα τοποθετούνται σε θερμαντική πλάκα και ακολουθεί θέρμανση στους 50°C για 20min με ταυτόχρονη μαγνητική ανάδευση, 200rpm. Μετά το πέρας των 20min και αφότου τα διαλύματα αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί



διήθηση. Συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί, ενώ ότι έμεινα στο διηθητικό χαρτί απομακρύνεται ως απόβλητο. Επισημαίνεται ότι με χρήση κατάλληλου ηλεκτρόδιου έγινε μέτρηση και καταγραφή του pH των εκχυλισμάτων, τα οποία τελικά αποθηκεύονται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C.

Εικόνα 3: Μαγνητική ανάδευση υπό θέρμανση κατά την μέθοδο Α.



Εικόνα 4: Εκχυλίσματα από την μέθοδο Α.

Μέθοδος Β: Εξαγωγή υποβοηθούμενη με υπέρηχους, με νερό ως διαλύτη και αναλογία υγρού:στερεού 100:3

Γίνεται μελέτη σπόρων από ώριμους λοβούς που έχουν υποστεί την επεξεργασία που αναφέρεται παραπάνω. Για την εκχύλιση χρησιμοποιούνται 3g αλεσμένων σπόρων στα οποία προστίθενται 100ml απιονισμένο νερό, ως διαλύτης. Ακολουθεί έκθεση σε υπέρηχους σε 90W για 40min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 40min



πραγματοποιείται διήθηση, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί, και ότι απομένει στο διηθητικό χαρτί απομακρύνεται ως απόβλητο. Επισημαίνεται ότι με χρήση κατάλληλου ηλεκτροδίου έγινε μέτρηση και καταγραφή του pH των εκχυλισμάτων, τα οποία τελικά αποθηκεύονται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C.

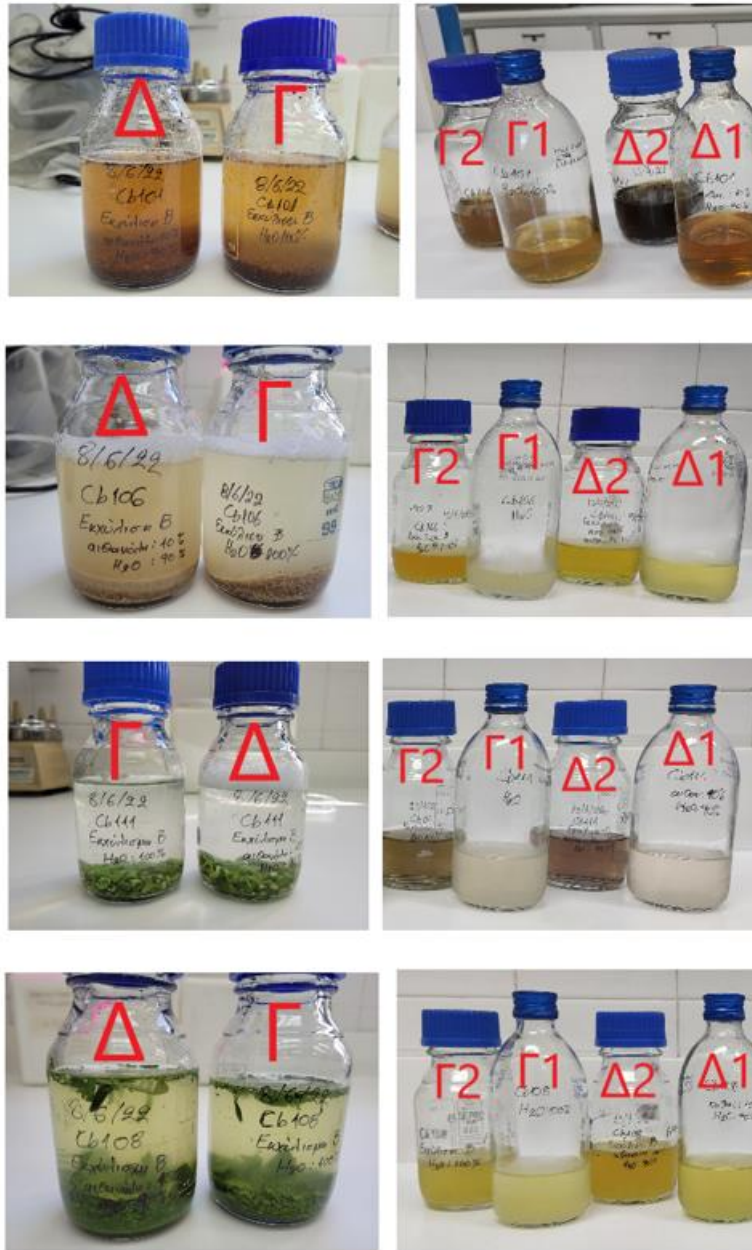
Εικόνα 5: Επίδραση υπέρηχων κατά την μέθοδο Β.

Μέθοδος Γ: Εκχύλιση με διαβροχή, με νερό ως διαλύτη και αναλογία υγρού:στερεού 20:1

Γίνεται μελέτη της εκχύλισης και των 4 τμημάτων χαρουπιάς, δηλαδή ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, σπόρια ώριμων λοβών, ολόκληροι ανώριμοι λοβοί και φύλλα χαρουπιάς, που έχουν υποστεί την επεξεργασία όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Οι ώριμοι λοβοί που μελετήθηκαν με αυτήν την μέθοδο εκχύλισης συλλέχθηκαν τον Απρίλιο. Λαμβάνονται 10g από κάθε δείγμα και προστίθενται 200ml απιονισμένου νερού στο κάθε ένα. Τα διαλύματα αφήνονται για 5 ημέρες σε ηρεμία και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σκιερό μέρος, για την διεξαγωγή της εκχύλισης. Έπειτα ακολουθεί διήθηση των δειγμάτων, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί και ότι απομένει στο εκάστοτε διηθητικό χαρτί απομακρύνεται ως απόβλητο. Επισημαίνεται τα εκχυλίσματα χωρίστηκαν κατά προσέγγιση στο μισό του όγκους τους και με χρήση κατάλληλου ηλεκτροδίου έγινε μέτρηση και καταγραφή του pH των μισών εκχυλισμάτων και προσαρμογή του pH κοντά στην ουδέτερη περιοχή στα άλλα μισά. Τέλος τα εκχυλίσματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C.

Μέθοδος Δ: Εκχύλιση με διαβροχή, με αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη και αναλογία υγρού:στερεού 20:1

Γίνεται μελέτη της εκχύλισης και των 4 τμημάτων χαρουπιάς, δηλαδή ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, σπόρια ώριμων λοβών, ολόκληροι ανώριμοι λοβοί και φύλλα χαρουπιάς, που έχουν υποστεί την επεξεργασία όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Οι ώριμοι λοβοί που μελετήθηκαν με αυτήν την μέθοδο εκχύλισης συλλέχθηκαν τον Απρίλιο. Λαμβάνονται 10g από κάθε δείγμα και αναμιγνύονται έκαστος με 200ml διαλύματος αλκοόλης: απιονισμένο νερό 10:90. Τα διαλύματα αφήνονται για 5 ημέρες σε ηρεμία και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σκιερό μέρος, για την διεξαγωγή της εκχύλισης. Έπειτα ακολουθεί διήθηση των δειγμάτων, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί και ότι έμεινα στο διηθητικό χαρτί κάθε διήθησης απομακρύνεται ως απόβλητο. Επισημαίνεται τα εκχυλίσματα χωρίστηκαν κατά προσέγγιση στο μισό του όγκους τους και με χρήση κατάλληλου ηλεκτρόδιου έγινε μέτρηση και καταγραφή του pH των μισών εκχυλισμάτων και προσαρμογή του pH κοντά στην ουδέτερη περιοχή στα άλλα μισά. Τέλος τα εκχυλίσματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C.



Εικόνα 6: Εκχυλίσματα κατά σειρά από ώριμους λοβούς χωρίς σπόρους, σπόρια ώριμων λοβών, ολόκληρους ανώριμους λοβούς και φύλλα χαρουπιάς βάση των μεθόδων Γ και Δ σε αντιστοιχία με τις αναφορές που παρουσιάζονται. Όπου 1 αντιστοιχεί σε δείγμα χωρίς αλλαγή pH, ενώ όπου 2 αντιστοιχεί σε δείγμα με pH ρυθμισμένο στο 7.

2.2.2. Επιπλέον επεξεργασίες

Όλα τα υπερκείμενα των διηθήσεων που περιγράφονται στο παράρτημα 3.2.1.2. υπέστησαν ήπια παστερίωση με σκοπό την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών που μπορεί να περιέχουν και να επηρεάσουν εν συνεχεία τα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών δοκιμών. Επισημαίνεται ότι η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε χειροποίητο υδατόλουτρο, που έγινε σε θερμαντικό μανδύα και η επίβλεψη της θερμοκρασίας των εκχυλισμάτων επιτευχθεί με χρήση ηλεκτρόδιου θερμοκρασίας.

Έτσι τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την μέθοδο Α και Β θερμάνθηκαν στους 55°C για 20min πριν από την χρήση τους στις μεθόδους ανίχνευσης αντιμικροβιακής ικανότητας. Ομοίως τα εκχυλίσματα των μεθόδων Γ και Δ θερμάνθηκαν στους 70°C για 2min.

Επιπλέον όλα τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε μέτρηση του pH τους χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο μέτρησης pH. Αυτό κρίνεται σπουδαίας σημασίας καθώς η ενδεχόμενη απόδοση αντιμικροβιακής ικανότητας στα εκχυλίσματα χαρουπιάς επιζητάτε να οφείλεται στα συστατικά τους και κυρίως στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Έτσι εκχυλίσματα με χαμηλό pH μπορεί να δώσουν αποτελέσματα αναστολής των μικροοργανισμών τα οποία όμως να είναι παραπλανητικά για την μελέτη αυτή.

2.2.3. Μέθοδοι ανίχνευσης αντιμικροβιακής ικανότητας

Για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων χαρουπιού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης φρεατίου και η τεχνική Bioscreen . Η μέθοδος διάχυσης φρεατίου επιλέχθηκε ως παραλλαγή της πρωτότυπης μεθόδου διάχυσης δίσκου, η οποία έχει όλα τα πλεονεκτήματα αυτής και επιπλέον είναι πιο οικονομική και με καλύτερη ευαισθησία. Η τεχνική του Bioscreen, επιλέχθηκε ως ένα αυτοματοποιημένο και ταχύ σύστημα θολομέτρου, το οποίο επιτρέπει συνεχή παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων.

Επισημαίνεται ότι για όλες τις δοκιμασίες , οι μικροοργανισμοί είχαν ανακαλλιεργηθεί την προηγούμενη μέρα, με σκοπό να βρίσκονται στην λογαριθμική τους φάση και τα αποτελέσματα των μεθόδων να είναι αντιπροσωπευτικά της δράσης των εκχυλισμάτων. Για την διαδικασία αυτή η αρχική καλλιέργεια του μικροοργανισμού πρέπει να ανακινηθεί σε vortex. Έπειτα γίνεται χρήση πιπέτας, με την οποία μεταφέρεται 0,1ml από την καλλιέργεια του εκάστοτε μικροοργανισμού σε

δοκιμαστικούς σωλήνες καλλιέργειας με πώμα, οι οποία περιέχουν Brain Heart Infusion Broth. Ακολουθεί επώαση για 24h στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο.

Με την μέθοδο διάχυσης φρεατίου, μελετήθηκαν οι μέθοδοι εκχύλισης Α, Β, Γ και Δ. Με αυτό τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία, τα οποία συμπληρώθηκαν με θρεπτικό υπόστρωμα και αφέθηκαν μέχρι σταθεροποίησης αυτού. Στην συνέχεια υλοποιήθηκε η διαδικασία επίστρωσης. Έτσι με πιπέτα αφέθηκε 0,1ml από την νέα ανακαλλιέργεια του εκάστοτε μικροοργανισμού και αυτό απλώθηκε σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος με κατάλληλη και αποστειρωμένη τριγωνική γυάλινη ράβδο. Πριν την χρήση αυτών ελέγχεται με πρότυπο McFarland της τάξης 0,5, ότι το εναιώρημα μικροοργανισμού αντιστοιχεί σε παρουσία $(1-2) \times 10^8$ CFU/mL. Έπειτα δημιουργήθηκαν τα απαιτούμενα φρεάτια σε κάθε τρυβλίο, κάνοντας χρήση γυάλινης πιπέτας pasteur. Μετά με πιπέτα γεμίζονται τα φρεάτια είτε με εκχύλισμα χαρουπιού είτε με αρνητικό control. Επισημαίνεται ότι όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες, οι οποίες επιτυγχάνονται στο κοντινό περιβάλλον του εν λειτουργία λύχνου Bunsen. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής τα τρυβλία παραμένουν σε θερμοκρασία ψύξης για 30min, με σκοπό την ενίσχυση της διάχυσης των εκχυλισμάτων στο υπόστρωμα έναντι της μικροβιακής ανάπτυξης. Τέλος τα τρυβλία επωάζονται για 24h στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο.

Συγκεκριμένα με την μέθοδο εκχύλισης Α και Β, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση έναντι στην *Escherichia coli* και την *Candida albicans*. Έτσι σχηματίστηκαν 6 τρυβλία, 3 για κάθε μικροοργανισμό και σε συνδυασμό με κάθε ένα τμήμα χαρουπιάς που εκχυλίστηκε με αυτές τις μεθόδους, με 4 φρεάτια το καθένα. Στην προκειμένη ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε Mueller Hinton και 3 εκ των τεσσάρων φρεατίων γεμίστηκαν με εκχύλισμα χαρουπιού και το άλλο ένα γεμίστηκε με νερό. Με τη μέθοδο Γ και Δ, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση έναντι στην *Escherichia coli*, *Candida albicans* και τον *Staphylococcus aureus*. Με αυτό τον σκοπό σχηματίστηκαν 40 τρυβλία με 5 φρεάτια το καθένα. Πιο αναλυτικά 16 τρυβλία αφορούν την *Escherichia coli*, ένα για κάθε εκχύλισμα των μεθόδων Γ και Δ στο κανονικό και το μεταποιημένο τους pH. Ομοίως 16 αφορούν την *Candida albicans*, ενώ τα τελευταία 8 αφορούν τον *Staphylococcus aureus* και μελετάνε μόνο τα εκχυλίσματα με το δικό τους pH. Τα πρώτα 16 έχουν ως υπόστρωμα το Mueller Hinton, τα 8 τα οποία ασχολούνται με την *Candida albicans* και τα εκχυλίσματα με κανονικό pH έχουν ως υπόστρωμα το Sabouraud, τα άλλα 8 με το ουδέτερο pH έχουν ως υπόστρωμα το Mueller Hinton

εκτός από τα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών και φύλλων χαρουπιάς με την μέθοδο Δ και τα τελευταία 8 τρυβλία περιείχαν ως υπόστρωμα Brain Heart Infusion για την μέθοδο Γ και Tryptic Soy Agar για την μέθοδο Δ. Από τα 5 φρεάτια σε αυτά τα τρυβλία, τα 3 γεμίζονται με τα εκχυλίσματα και τα άλλα περιέχουν τα αρνητικά control την μεθόδου, δηλαδή το νερό και το διάλυμα αιθανόλη:νερό 10:90.

Επιπλέον μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων χαρουπιάς πραγματοποιήθηκε με διεξαγωγή της τεχνικής Bioscreen C. Συγκεκριμένα στην τεχνική αυτή υποβλήθηκαν τα εκχυλίσματα από τις μεθόδους Γ και Δ.

Η πορεία που ακολουθείται για την ετοιμασία της πλακέτας μικροαραίωσης του Bioscreen C περιγράφεται ακολούθως. Καθώς η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να χωρέσει σε κάθε φρεάτιο της πλακέτας είναι 400 μL και για αποφυγή του κινδύνου υπερχειλίσης, κάθε φρεάτιο γεμίστηκε με 350 μL . Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Brain Heart Infusion Broth και οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν, υποβλήθηκαν σε μια δεκαδική αραίωση. Συγκεκριμένα 0,1 μL από την ανακαλλιέργεια κάθε μικροοργανισμού, η οποία είχε παρασκευαστεί κατά τα γνωστά την προηγούμενη ημέρα, μεταφέρθηκε με πιπέτα σε 9ml Brain Heart Infusion Broth. Οι μικροοργανισμοί λοιπόν που προστέθηκαν στα φρεάτια προήλθαν από αυτά τα εναιωρήματα, τα οποία είχαν σκοπό να κάνουν πιο αραιά τα διαλύματα.

Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων από τις μεθόδους Γ και Δ τα 100 φρεάτια, αξιοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Candida albicans* και *Staphylococcus aureus* τόσο όλων των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις μεθόδους Γ και Δ, όσο και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις εκχυλίσεις, δηλαδή του νερού και του διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90. Επισημαίνεται ότι για κάθε πιθανό συνδυασμό εκχυλίσματος – μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια , ενώ για κάθε πιθανό συνδυασμό διαλύτη – μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν 2 φρεάτια. Πιο αναλυτικά οι περιεχόμενες ποσότητες στα φρεάτια, στην περίπτωση των εκχυλισμάτων καθορίστηκαν στα 250 μL υποστρώματος, 50 μL εκχυλίσματος και 50 μL μικροοργανισμού, στην περίπτωση του νερού καθορίστηκαν στα 300 μL υποστρώματος και 50 μL μικροοργανισμού και στην περίπτωση του διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 καθορίστηκαν στα 250 μL υποστρώματος, 50 μL διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 και 50 μL

μικροοργανισμού. Τέλος 2 φρεάτια από την πλακέτα γεμίστηκαν μόνο με 350μL υποστρώματος και άλλα 2 φρεάτια έμειναν άδεια. Μόλις ολοκληρώθηκε η επεξεργασία της πλακέτας, αυτή εισήχθη στην συσκευή του Bioscreen, στην οποία ρυθμίστηκαν κάποιοι παράγοντες. Συγκεκριμένα η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 37°C, η διάρκεια της τεχνικής στις 2 ημέρες με λήψη τιμών οπτικής πυκνότητας ανά 30min και με δύο φίλτρα, σε μήκη κύματος 600nm και 420-580nm αντίστοιχα.



Εικόνα 9: Πλακέτα μικροαρέωσης Bioscreen.

3. Αποτελέσματα

Σε μελέτες αντιμικροβιακής ικανότητας απαιτείται να λαμβάνεται υπόψιν η τιμή του pH των υπό μελέτη παράγοντα. Έτσι στην συνέχεια παρατίθενται οι τιμές pH όλων των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, με σκοπό τον πιο εύστοχο σχολιασμό των αντιμικροβιακών δοκιμών.

Πίνακας 1: Τιμές pH που λήφθηκαν με ηλεκτρόδιο pH για όλα τα εκχυλίσματα.

Μέθοδος εκχύλισης	Τμήμα χαρουπιού	pH
Α	Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρους	5,36
	Ανώριμοι λοβοί	5,34
Β	Σπόροι ώριμου λοβού	5,59
Γ	Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρους	4,61 και με ρύθμιση 7,05
	Σπόροι ώριμου λοβού	5,47 και με ρύθμιση 6,99
	Ανώριμοι λοβοί	4,42 και με ρύθμιση 6,97
	Φύλλα χαρουπιάς	5,21 και με ρύθμιση 6,98
Δ	Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρους	4,93 και με ρύθμιση 7,04
	Σπόροι ώριμου λοβού	4,57 και με ρύθμιση 6,95
	Ανώριμοι λοβοί	4,98 και με ρύθμιση 6,98
	Φύλλα χαρουπιάς	5,41 και με ρύθμιση 6,98

Για τον σχολιασμό των δεδομένων αυτών χρειάζεται να υπενθυμιστεί ότι, ο *Staphylococcus aureus*, η *Escherichia coli* και η *Candida albicans* χαρακτηρίζονται από ελάχιστη τιμή pH στην οποία μπορούν να ευδοκιμήσουν, την 4, 4,2 και 2 αντίστοιχα. Έτσι αμφίβολα θα μπορούσαν να θεωρηθούν τα αποτελέσματα όλων των εκχυλισμάτων. Αξίζει βέβαια να επισημανθεί ότι οι βέλτιστες τιμές pH για την ανάπτυξη τους βρίσκονται σαφώς σε υψηλότερες τιμές pH. Αυτό ωστόσο δεν

καταφέρνει να αυξήσει σημαντικά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που θα παρατεθούν στην συνέχεια. Σίγουρα μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσιάσουν τα αποτελέσματα των δοκιμών αντιμικροβιακής δράσης με ρυθμισμένο pH στην ουδέτερη περιοχή.

Η πρώτη μέθοδος μου χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων από τα διάφορα τμήματα χαρουπιάς είναι η μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ. Τα αποτελέσματα αυτής παρατηρούνται μετά την ολοκλήρωση της επώασης των τρυβλίων. Συγκεκριμένα κάθε τρυβλίο τοποθετείται στην κατεύθυνση του φωτός και γίνεται έλεγχος για παρουσία ζώνης διαστολής κάθε φρεατίου. Σε κάθε περίπτωση με χρήση χάρακα γίνεται μέτρηση της διαμέτρου της εμφανιζόμενης ζώνης αναστολής και γίνεται καταγραφή της. Υπενθυμίζεται ότι τα φρεάτια εχαν διάμετρο 6mm και παρόλο που η παρουσία διαυγούς ζώνης γύρω από κάποιο φρεάτιο συνδέεται με αντιμικροβιακή δράση, σημαντικά θεωρούνται τα αποτελέσματα με διάμετρο μεγαλύτερη των 9mm. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν αναγράφονται στους ακόλουθους πίνακες και ακολουθεί σχολιασμός τους.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα εκχυλίσματα της μεθόδου Α.

			Φρεάτια			
Τμήμα χαρουπιάς	Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	1ο	2ο	3ο	4ο (Control ,νερό)
Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρους	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Mueller Hinton	9	9	-	-
Ανώριμοι λοβοί	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	8	-
	<i>Candida albicans</i>	Mueller Hinton	8	9	8	-

Πίνακας: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα εκχυλίσματα της μεθόδου Β.

			Φρεάτια			
Τμήμα χαρουπιάς	Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	1ο	2ο	3ο	4ο (Control ,νερό)
Σπόροι ώριμων λοβών	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Mueller Hinton	-	-	-	-

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα εκχυλίσματα της μεθόδου Γ με το κανονικό τους pH.

			Φρεάτια				
Τμήμα χαρουπιάς	Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	1ο	2ο	3ο	4ο (Control 1 ,νερό)	5ο (Control 2, etOH:H ₂ O 10:90)
Ώριμοι λοβοί Χωρίς σπόρους	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	8	8	8	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Brain Heart Infusion	-	-	-	-	-
Σπόροι ώριμων λοβών	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	12	9	10	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Brain Heart Infusion	-	-	-	-	-
Ανώριμοι λοβοί	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	9	9	9	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Brain Heart Infusion	-	-	-	-	-

Φύλλα χαρουπιάς	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	8	8	8	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Brain Heart Infusion	-	-	-	-	-

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα εκχυλίσματα της μεθόδου Γ με ουδέτερο pH.

			Φρεάτια				
Τμήμα χαρουπιάς	Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο
			(Control 1, νερό)			(Control 2, etOH:H ₂ O 10:90)	
Ώριμοι λοβοί χωρίς σπόρους	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	9	9	-	-	-
Σπόροι ώριμων λοβών	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	10	-	-	-	-
Ανώριμοι λοβοί	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	8	7	7	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
Φύλλα χαρουπιάς	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	10	7	7	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-

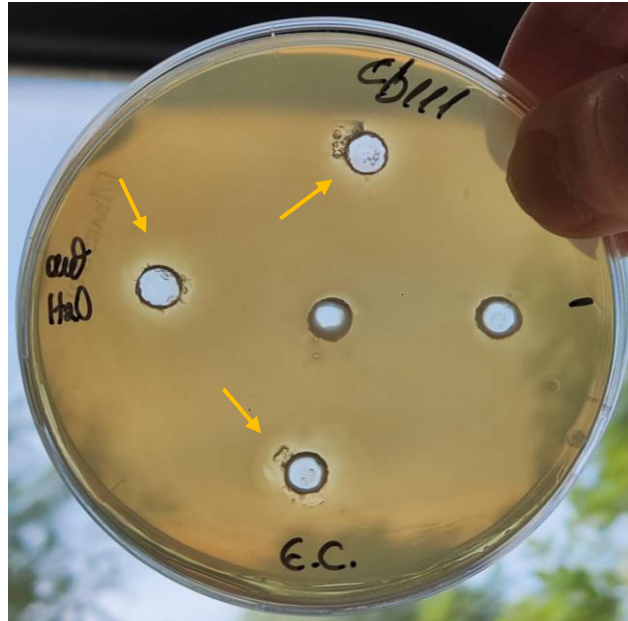
Πίνακας 5: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα εκχυλίσματα της μεθόδου Δ με το κανονικό τους pH.

Τμήμα χαρουπιάς	Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	Φρεάτια				
			1ο	2ο	3ο	4ο (Control 1, νερό)	5ο (Control 2, etOH:H ₂ O 10:90)
Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρους	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	8	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tryptic Soy Agar	-	-	-	-	-
Σπόροι ώριμων λοβών	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	10	8	8	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tryptic Soy Agar	-	-	-	-	-
Ανώριμοι λοβοί	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	10	10	9	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tryptic Soy Agar	-	-	-	-	-
Φύλλα χαρουπιάς	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	9	10	9	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tryptic Soy Agar	-	-	-	-	-

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα εκχυλίσματα της μεθόδου Δ με ουδέτερο pH.

			Φρεάτια				
Τμήμα χαρουπιάς	Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	1ο	2ο	3ο	4ο (Control 1 ,νερό)	5ο (Control 2, etOH:H ₂ O 10:90)
Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρους	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	-	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
Σπόροι ώριμων λοβών	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	9	9	9	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
Ανώριμοι λοβοί	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	7	7	7	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	-	-	-	-	-
Φύλλα χαρουπιάς	<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	9	9	9	-	-
	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	10	9	-	-	-

Με σκοπό την καλύτερη αντίληψη τόσο των ζωνών διαστολής που εμφανίζονται όσο και την γενική μορφή των τρυβλίων με την μέθοδο της διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, γίνεται η ακόλουθη οπτική απεικόνιση. Συγκεκριμένα η Εικόνα 10, απεικονίζει τα αποτελέσματα του εκχυλίσματος ανώριμων λοβών με αιθανόλη:νερό 10:90 που προέκυψε με την μέθοδο Δ, έναντι στην *Escherichia coli*. Αυτό αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αποτελέσματα, εμφανίζοντας διαμέτρους ζώνης αναστολής 9-10mm. Επίσης στην προκειμένη εικόνα, είναι ιδιαίτερα ευδιάκριτες οι ζώνες διαστολής και συμφωνούν ικανοποιητικά με τις ζητούμενες ομοίμορφα κυκλικές ζώνες, παρέχοντας καλή απεικόνιση αυτών. Λαμβάνεται βέβαια υπόψιν ότι η οπτική και η φωτεινότητα με την οποία παρατηρείται, απεικονίζεται κατά το δυνατόν αλλά όχι απόλυτα.



Εικόνα 10: Αποτελέσματα μεθόδου διάχυσης φρεατίου που αποδίδει το εκχύλισμα ανώριμων λοβών με αιθανόλη:νερό 10:90, έναντι στην *Esherichia coli*.

Παρατηρείται ότι όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο διάχυσης φρεατίου σε άγαρ συμφωνούν στην έλλειψη ζώνης ανατολής κατά τις δοκιμές των διαλύτων των εκχυλίσεων. Αυτό συμβάλει στην αξιοπιστία κατά την απόδοση αντιμικροβιακής ικανότητας στα εκχυλίσματα, καθώς φανερώνει ότι οφείλεται στα συστατικά του εκάστοτε τμήματος χαρουπιάς και όχι στον διαλύτη της εκχύλισης.

Πρέπει να αναφερθεί ότι σε αποτελέσματα που αντιστοιχούν σε υποστρώματα εκτός του Mueller Hinton είναι δύσκολο να αξιολογηθεί αν η έλλειψη εμφάνισης ζώνης αναστολής οφείλεται σε μη αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων ή σε λανθασμένα αποτελέσματα. Αρχικά επισημαίνεται ότι το πρότυπο θρεπτικό υπόστρωμα για τις μεθόδους διάχυσης είναι το Mueller Hinton, συνεπώς ακόμα και η εμφάνιση ζώνης αναστολής θα έπρεπε να σχολιαστεί με επιφύλαξη. Εκτός όμως από την πιθανή ακαταλληλότητα των υποστρωμάτων Sabouraud, Brain Heart Infusion και Tryptic Soy Agar όπου το κάθε ένα χρησιμοποιήθηκε, λόγοι για την απουσία ζώνης αναστολής μπορεί να είναι ο μη επαρκής χρόνος επώασης των τρυβλίων και η παλαιότητα των υποστρωμάτων που μπορεί να τα καθιστά ανεπαρκή για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η τελευταία αιτία που αναφέρεται φαίνεται να είναι αρκετά πιθανή, καθώς πολλά ήταν τα τρυβλία με αυτά τα υποστρώματα στα οποία δεν μπόρεσε να παρατηρηθεί ανάπτυξη μικροοργανισμών με γυμνό μάτι. Κατ' επέκταση μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η απουσία ζώνης αναστολής σε αυτές τις περιπτώσεις δεν

οφείλεται έλλειψη αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα αυτά τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν κυρίως στις μελέτες έναντι των *Candida albicans* και *Staphylococcus aureus*. Πρέπει λοιπόν να μην παρερμηνευθεί η απουσία ζώνης αναστολής με αντοχή αυτών των μικροοργανισμών έναντι στα δοκιμαζόμενα εκχυλίσματα.

Εν συνεχεία τα αποτελέσματα που μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα, δηλαδή αυτά των τρυβλίων με Mueller Hinton ως υπόστρωμα, μελετώνται περαιτέρω. Με αυτόν τον σκοπό υπολογίζεται ο μέσος όρος της διαμέτρου των ζωνών αναστολής που παρατηρήθηκαν. Οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων που κρίθηκαν σημαντικά παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα από εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρους.

Μέθοδος εκχύλισης	pH εκχυλίσματος	Μικροοργανισμός	Μέσος όρος διαμέτρου ζώνης αναστολής
Γ	4,61	<i>Escherichia coli</i>	8

Τα εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρους φαίνεται ότι παρουσιάζουν ζώνη αναστολής της *Escherichia coli* μόνο στην περίπτωση της εκχύλισης Γ, χωρίς μεταποίηση του pH του δείγματος. Καθώς όμως η διάμετρος τους κρίνεται αρκετά μικρή για να θεωρηθεί σημαντική και η αντίστοιχη δοκιμή με προσαρμοσμένο ουδέτερο pH του εκχυλίσματος δεν παρουσιάζει κάποια αντιμικροβιακή ικανότητα, συμπεραίνεται ότι δεν παρουσιάζουν κάποια αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση. Με αυτό συμφωνεί και η απουσία ζώνης αναστολής της *Escherichia coli* σε όλες τις υπόλοιπες δοκιμές, οπότε κρίνεται ότι για την εκχύλιση των ζητούμενων πολυφαινολών απαιτείται μετατροπή ή ακόμα και αλλαγή των μεθόδων εκχύλισης που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Επισημαίνεται ακόμα ότι τα αποτελέσματα της δοκιμής ώριμων λοβών χωρίς σπόρια με την εκχύλιση Α έδειξαν ζώνη αναστολής με διάμετρο 9mm της *Candida albicans* σε 2 από τα 3 φρεάτια που παρασκευάστηκαν. Έτσι κρίνεται πιθανή η ανίχνευση αντιμικροβιακής ικανότητας και οπότε η απουσία ζώνης αναστολής στο ένα φρεάτιο ερμηνεύεται σε πειραματικό λάθος κατά την παρασκευή. Δυστυχώς οι υπόλοιπες δοκιμές με την διάχυση φρεατίου των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρια

ανήκουν στις μη αξιόπιστες δοκιμές και συνεπώς δεν μπορούν να υποστηρίξουν ή να απορρίψουν αυτήν την θεωρία.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα από εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών.

Μέθοδος εκχύλισης	pH εκχυλίσματος	Μικροοργανισμός	Μέσος όρος διαμέτρου ζώνης αναστολής
Γ	5,47	<i>Escherichia coli</i>	10,33
Δ	4,57	<i>Escherichia coli</i>	8,67
Δ	6,95	<i>Escherichia coli</i>	9

Φαίνεται ότι τα αποτελέσματα με την δοκιμή των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την μέθοδο Γ, χωρίς αλλαγή του pH τους, εμφανίζουν σημαντική διάμετρο ζώνης ανατολής. Έτσι τα εκχυλίσματα αυτά κρίνονται αξιόλογα για περαιτέρω μελέτη με τελικά πιθανή απόδοση αντιμικροβιακής ικανότητας. Στην θεωρία αυτή αντιτίθεται η απουσία ζώνης ανατολής των αντίστοιχων εκχυλισμάτων με τροποποίηση του pH τους. Καθώς όμως το εκχύλισμα που προκάλεσε την ζώνη αναστολής της *Escherichia coli* έχει pH ίσο με 5,47, δηλαδή φαινομενικά όχι αρκετό για να προκαλέσει μόνο του την αντιμικροβιακή δράση, η σημασία των αποτελεσμάτων δεν μπορεί να παραλειφθεί.

Ακόμα περισσότερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων της μεθόδου Δ, αφού σχεδόν ανεξάρτητα από το pH τους, προκαλούν ζώνη αναστολής της *Escherichia coli* με παρόμοια διάμετρο. Η τάξη αυτής μπορεί να θεωρηθεί αξιοσημείωτη και συνεπώς αρχή για περαιτέρω μελέτη.

Επισημαίνεται ακόμα ότι η μέθοδος εκχύλισης Β η οποία χρησιμοποίησε την μέθοδο εξαγωγής υποβοηθούμενη από υπερήχους, με διαλύτη το νερό και μελέτησε μόνο σπόρους ώριμων λοβών δεν υποδεικνύει κάποια αντιμικροβιακή δράση. Καθώς όμως οι υπόλοιπες μέθοδοι εμφάνισαν κάποια αντιμικροβιακή ικανότητα, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μέθοδος εξαγωγής υποβοηθούμενη από υπερήχους είναι ακατάλληλη για την εκχύλιση αντιμικροβιακών παραγόντων από τα σπόρια χαρουπιάς, είτε ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε απαιτεί μορφοποίηση. Η δεύτερη ερμηνεία φαίνεται πιο πιθανή, βάση της θεώρησης ότι η υποβοηθούμενη εξαγωγή από υπερήχους αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα από εκχυλίσματα ανώριμων λοβών.

Μέθοδος εκχύλισης	pH εκχυλίσματος	Μικροοργανισμός	Μέσος όρος διαμέτρου ζώνης αναστολής
A	5,34	<i>Candida albicans</i>	8,33
Γ	4,42	<i>Escherichia coli</i>	9
Γ	6,97	<i>Escherichia coli</i>	7,33
Δ	4,98	<i>Escherichia coli</i>	10
Δ	6,98	<i>Escherichia coli</i>	7

Με παρατήρηση των αποτελεσμάτων που αναγράφονται στον παραπάνω Πίνακα μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα ανώριμων λοβών που προέκυψαν από τις μεθόδους Γ και Δ παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ικανότητες. Παρατηρείται όμως ότι, η μετατροπή του pH των εκχυλισμάτων σε ουδέτερο, οδήγησε σε σημαντική μείωση της διάμετρος της ζώνης αναστολής, σε τάξη μάλιστα που μπορεί να θεωρηθεί αμφίβολη η αντιμικροβιακή ικανότητα. Αυτό μπορεί να σχολιαστεί και ως αναμενόμενο, καθώς οι τιμές pH 4,42 και 4,98 μπορούν να θεωρηθούν αρκετά χαμηλές. Συνεπώς ένα ποσοστό της αντιμικροβιακής ικανότητας τους προς την *Escherichia coli* οφείλεται στο χαμηλό pH που εμποδίζει τους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν. Σίγουρα όμως κρίνεται βάσιμη η περαιτέρω μελέτη, με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης η οποία να μπορεί να εκχυλίσει ακόμα πιο αποτελεσματικά τους αντιμικροβιακούς παράγοντες των άγουρων λοβών, όπως τις πολυφαινόλες.

Επισημαίνεται ακόμα ότι τα αποτελέσματα της δοκιμής των άγουρων λοβών με την εκχύλιση A έδειξαν ζώνη αναστολής της *Candida albicans* με μέσο όρο διαμέτρου 8,33mm. Σαφώς η διάμετρος αυτή δεν κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική, ωστόσο λαμβάνοντας υπόψιν ότι η μέθοδος εκχύλισης A είναι αρκετά ελαφριά, μπορεί να χαρακτηριστεί ως έναυσμα για περαιτέρω μελέτη. Δυστυχώς οι υπόλοιπες δοκιμές με την διάχυση φρεατίου των εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών ανήκουν στις μη αξιόπιστες δοκιμές και συνεπώς δεν μπορούν να υποστηρίξουν ή να απορρίψουν αυτήν την θεωρία.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα από εκχυλίσματα φύλλων χαρουπιάς.

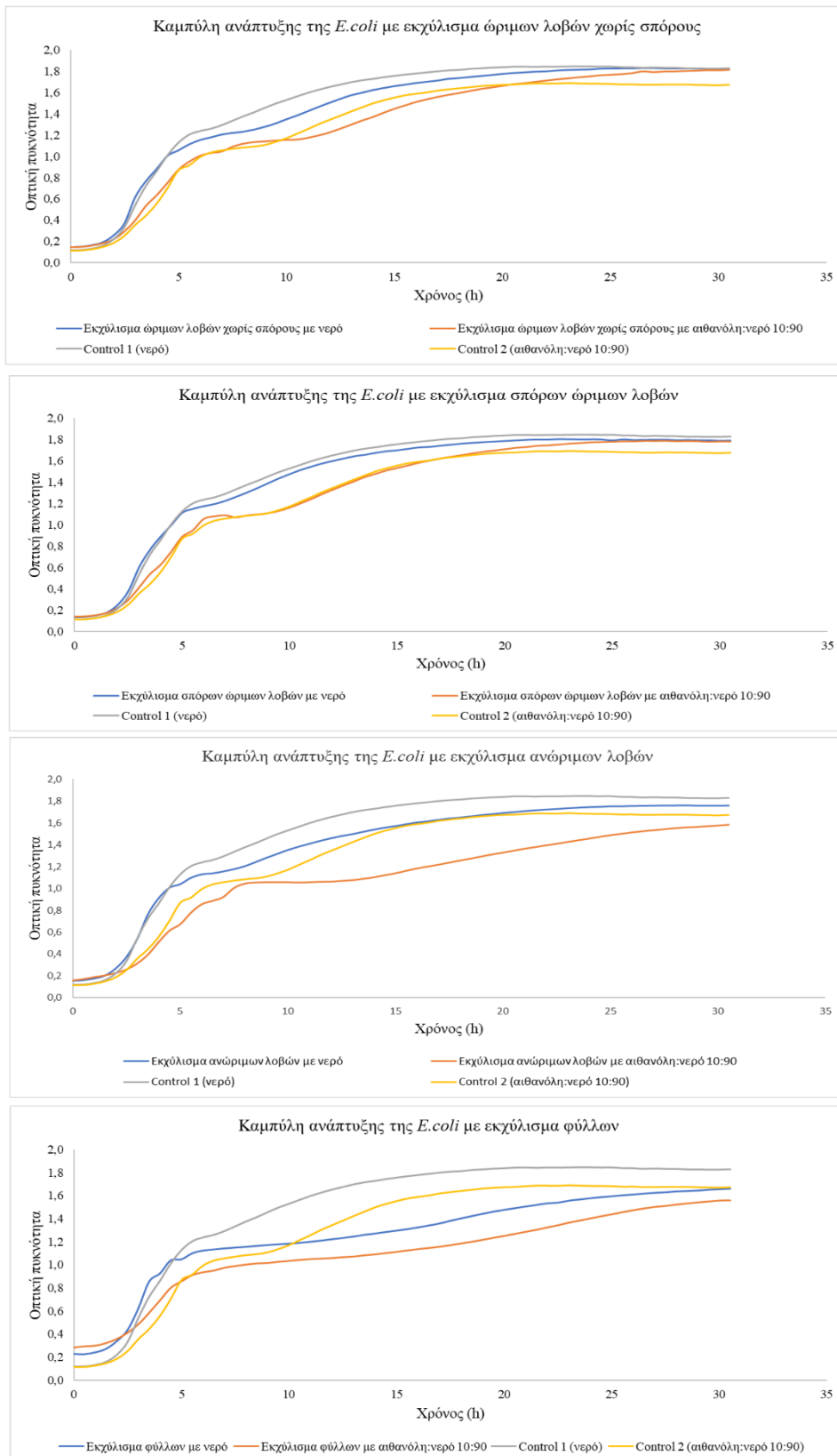
Μέθοδος εκχύλισης	pH εκχυλίσματος	Μικροοργανισμός	Μέσος όρος διαμέτρου ζώνης αναστολής
Γ	5,21	<i>Escherichia coli</i>	8
Γ	6,98	<i>Escherichia coli</i>	8
Δ	5,41	<i>Escherichia coli</i>	9,33
Δ	6,98	<i>Escherichia coli</i>	9

Τα εκχυλίσματα των φύλλων χαρουπιάς που προέκυψαν με τις μεθόδους Γ και Δ φαίνεται να παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι στην *Escherichia coli*. Οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών αναστολής δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ιδιαίτερα μεγάλοι, ωστόσο πυροδοτούν σίγουρα το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος Δ έδωσε εκχυλίσματα που απέδειξαν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα και συνεπώς η χρήση του διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη τη εκχύλισης φαίνεται να ευνόησε την εκχύλιση αντιμικροβιακών παραγόντων. Ακόμα φαίνεται ότι η μεταβολή του pH σε ουδέτερο δεν επέφερε κάποια σημαντική αλλαγή στις διαμέτρους των ζωνών ανατολής. Αυτό κρίνεται λογικό καθώς τα εκχυλίσματα είχαν αυτούσια αρκετά υψηλό pH ώστε να επηρεάσουν ανασταλτικά την μικροβιακή ανάπτυξη.

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την τεχνική Bioscreen C και αφορούν σειρές δεδομένων χρόνου – οπτική πυκνότητας, επεξεργάζονται με το Microsoft Excel XP 2019. Έτσι λαμβάνονται οι ακόλουθες γραφικές παραστάσεις, σε διάταξη βάση της επίδρασης που ασκούν τα διάφορα εκχυλίσματα των τμημάτων χαρουπιάς στην ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού που μελετήθηκε. Επισημαίνεται ότι κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων η οπτική πυκνότητα, θεωρείται ανάλογη της ποσότητας των μικροοργανισμών και συνολικά τα διαγράμματα απεικονίζουν καμπύλες ανάπτυξης. Λαμβάνεται βέβαια υπόψιν ότι, αυτό ενδέχεται να επιφέρει κάποιο σφάλμα κατά την διεξαγωγή συμπερασμάτων, κυρίως λόγω της συνυπολόγισης των νεκρών μικροοργανισμών στην τιμή της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας.

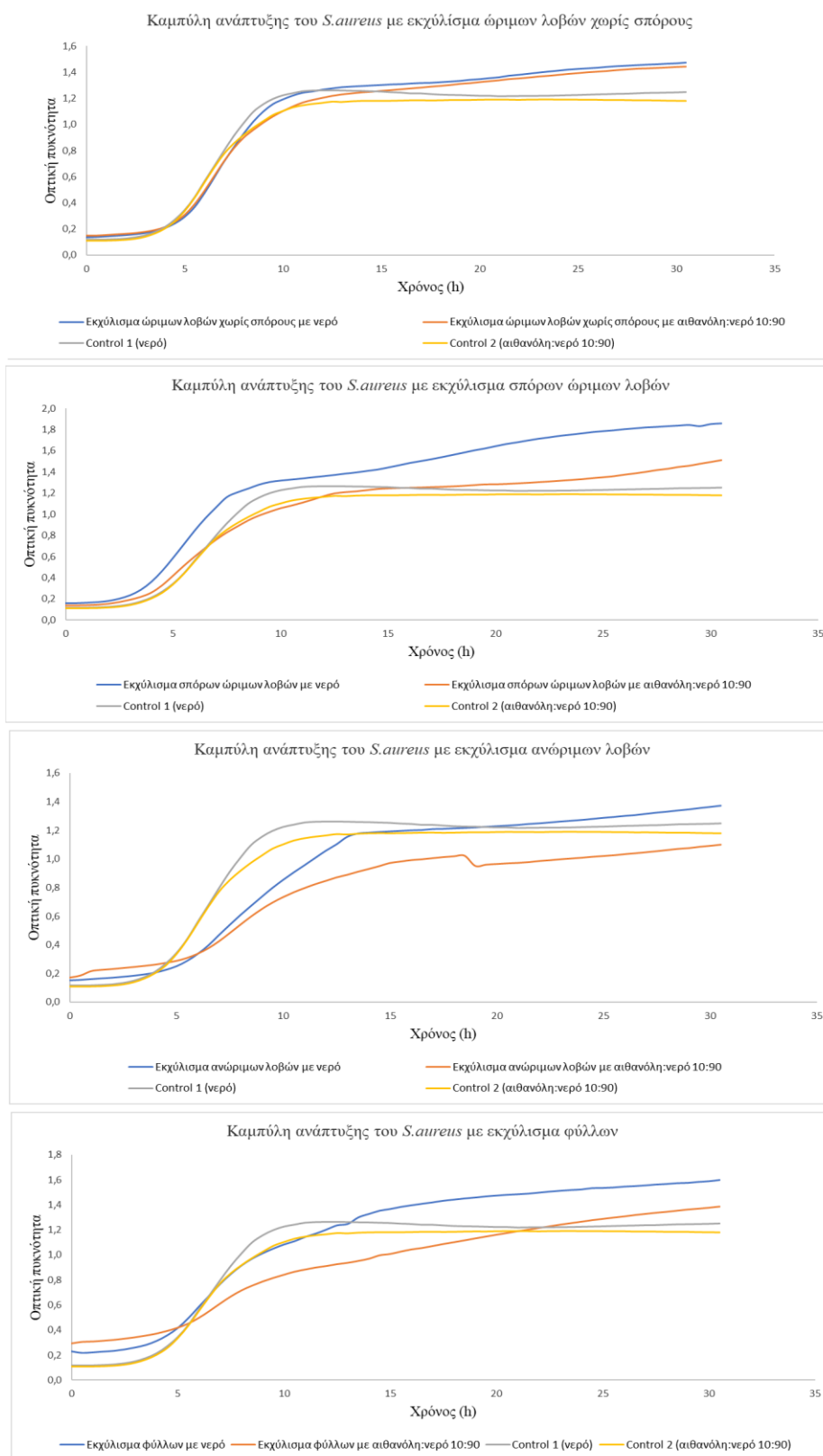
Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα του Bioscreen C, φανερώνουν καλή επαναληψιμότητα στις τριάδες των φρεατίων για κάθε συνδυασμό μεθόδου εκχύλισης – τμήματος χαρουπιάς – μικροοργανισμού. Κατ' επέκταση μπορεί να τους αποδοθεί καλή αξιοπιστία. Επιπλέον τα φρεάτια που περιείχαν μόνο θρεπτικό υπόστρωμα δεν παρουσίασαν αύξηση της οπτικής πυκνότητας με την πάροδο του χρόνου, επιβεβαιώνοντας την παστεριωμένη και χωρίς επιμολύνσεις κατάσταση τους.

Επισημαίνεται ότι όλοι τα συμπεράσματα που εξάγονται από τις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν, βασίζονται στην σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης παρουσία εκχυλισμάτων και παρουσία μόνο των αντίστοιχων κάθε φορά διαλυτών



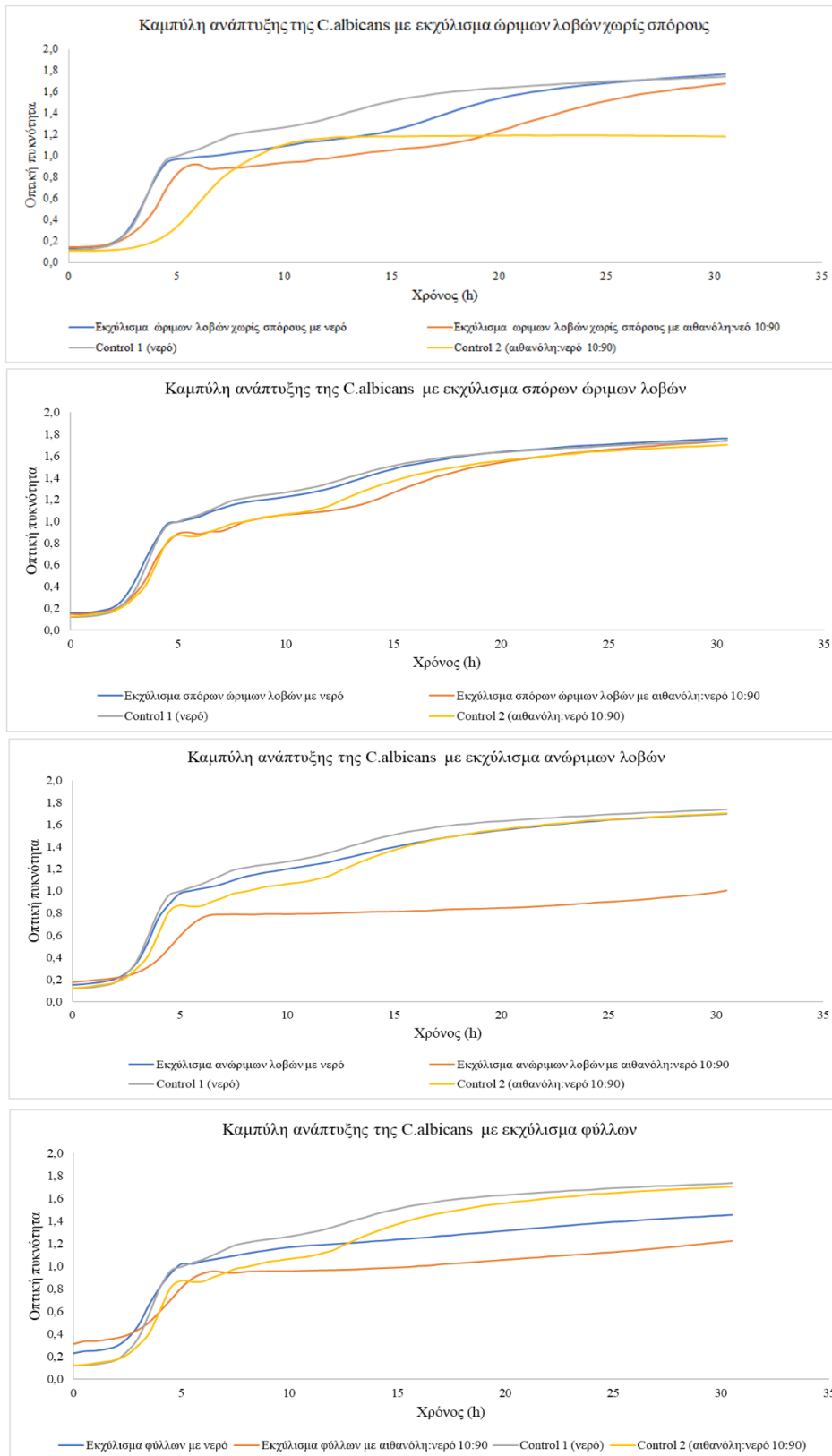
Διάγραμμα 1: Γραφικές παραστάσεις χρόνου (h) σε συνάρτηση με την οπτική πυκνότητα που προέκυψαν από Bioscreen C, για τις μεθόδους εκχύλισης Γ και Δ και τους διαλύτες τους σε σχέση με την *Escherichia coli*.

Η παρατήρηση του παραπάνω διαγράμματος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα των μεθόδων εκχύλισης Γ και Δ δεν παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*. Συγκεκριμένα δεν παρατηρείται αύξηση της διάρκειας του χρόνου προσαρμογής του μικροοργανισμού με παρουσία των εκχυλισμάτων. Επιπλέον δεν παρουσιάζεται σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου και του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Ιδιαίτερος οι καμπύλες που δίνονται από τα εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρια και των σπόρων αυτών, φαίνεται να έχουν καμπύλη ανάπτυξης σχεδόν ίδια με αυτή των αντίστοιχων διαλυτών, υποδηλώνοντας απουσία αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων αυτών. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων φύλλων και ανώριμων λοβών χαρουπιάς παρατηρείται μικρή μείωση του μικροβιακού πληθυσμού, ενώ η χρήση του διαλύτη αιθανόλη:νερό 10:90 φαίνεται να επιφέρει κάποια μείωση στο ρυθμό της λογαριθμικής φάσης. Έτσι ο έλεγχος της αντιμικροβιακής ικανότητας εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς και άγουρων λοβών, αξίζει περαιτέρω μελέτη.



Διάγραμμα 2: Γραφικές παραστάσεις χρόνου (h) σε συνάρτηση με την οπτική πυκνότητα που προέκυψαν από Bioscreen C, για τις μεθόδους εκχύλισης Γ και Δ και τους διαλύτες τους σε σχέση με τον *Staphylococcus aureus*.

Η παρατήρηση του παραπάνω διαγράμματος οδηγεί στο συμπέρασμα απουσίας αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρια με τις μεθόδους Γ και Δ στο βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων σπόρων, ομοίως δεν μπορεί να αποδοθεί αντιμικροβιακή ικανότητα, ενώ στην μέθοδο Γ εμφανίζεται ανησυχητική αύξηση της οπτικής πυκνότητας, όταν ακόμα και στην περίπτωση του νερού, αυτή φαίνεται να έχει σταθεροποιηθεί. Τα εκχυλίσματα φύλλων χαρουπιάς φαίνεται να παρουσιάζουν ενδιαφέρον κυρίως με την μέθοδο Δ, καθώς η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζει εμφανώς μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου. Παρόμοια αποτελέσματα φαίνεται να δίνουν και τα εκχυλίσματα των ανώριμων λοβών και ιδιαιτέρως με την μέθοδο Δ. Τα εκχυλίσματα άγουρων λοβών εμφανίζουν επίσης αύξηση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής, το οποίο συμβάλει στον ευοίωνα χαρακτήρα των αποτελεσμάτων.



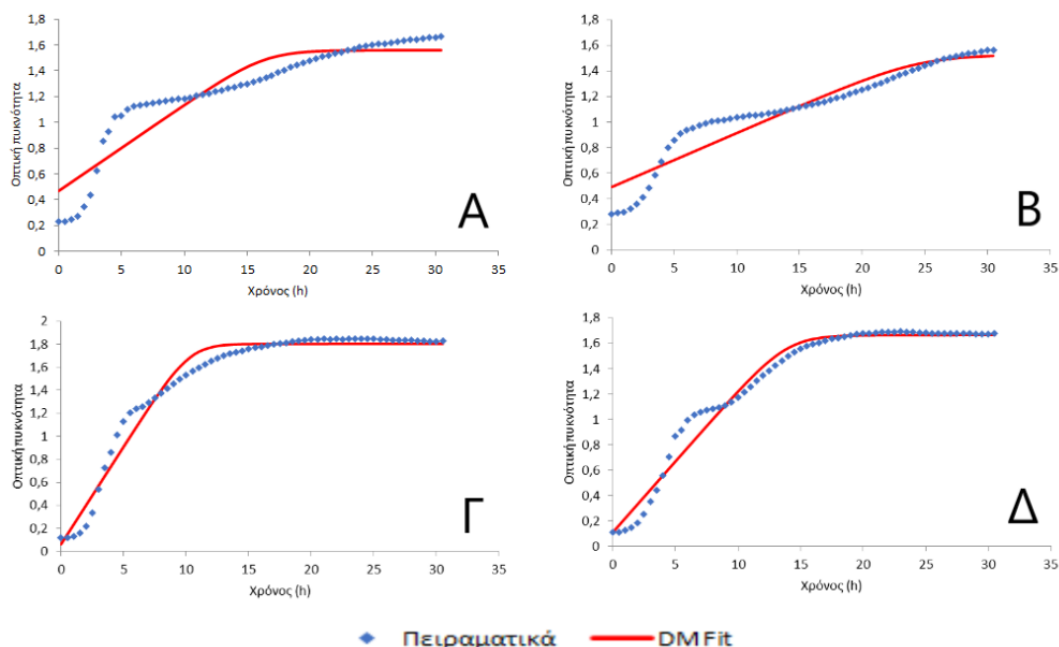
Διάγραμμα 3: Γραφικές παραστάσεις χρόνου (h) σε συνάρτηση με την οπτική πυκνότητα που προέκυψαν από Bioscreen C, για τις μεθόδους εκχύλισης Γ και Δ και τους διαλύτες τους σε σχέση με την *Candida albicans*.

Βάση των πληροφοριών που εξάγονται από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών χαρουπιού δεν παρουσιάζουν καθόλου αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Candida albicans*. Ομοίως στην περίπτωση των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρια δεν παρατηρείται σημαντική αντιμικροβιακή επίδραση. Αναφορικά με τα εκχυλίσματα φύλλων χαρουπιάς παρατηρείται κυρίως μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών ενώ στην μέθοδο εκχύλισης Δ παρατηρείται και μια μικρή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού στην λογαριθμική φάση. Ίσως λοιπόν το εκχύλισμα των φύλλων, με εκτενέστερη μελέτη να αποδώσει αντιμικροβιακή δράση προς την ζύμη. Τα εκχυλίσματα άγουρων λοβών που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο Γ δεν παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση, γεγονός που έρχεται σε μεγάλη αντίθεση με τα αποτελέσματα της μεθόδου Δ. Με αυτήν παρατηρείται τόσο αύξηση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής, όσο μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και μείωση του πληθυσμού της ζύμης. Αυτά αποτελούν σημαντικές παρατηρήσεις κατά την μελέτη της αντιμικροβιακής ικανότητας.

Με σκοπό την εκτενέστερη μελέτη των παραπάνω αποτελεσμάτων του Bioscreen C ακολουθείται η ακόλουθη επεξεργασία των δεδομένων. Γίνεται εφαρμογή του μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994), μέσω του προγράμματος DMFit, για μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης. Η καμπύλη του μοντέλου Baranyi είναι σιγμοειδούς μορφής, περιλαμβάνει λανθάνουσα φάση, εκθετική φάση και φάση στασιμότητας και ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου αναφέρεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Έτσι βάση των δεδομένων που προέκυψαν από την τεχνική Bioscreen C, γίνεται λήψη καμπυλών χρόνου με colony form units για την βακτηριακή ανάπτυξη. Μέσω του λογισμικού DMFit μπορούν μεταξύ άλλων να ληφθούν οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, της διάρκειας της φάσης προσαρμογής, του μέγιστου επιπέδου του μικροβιακού πληθυσμού και του συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής (Γουγουλή Μ. 2006).

Επισημαίνεται ότι κατά την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών οπτικής πυκνότητας κάθε όμοιας τριάδας φρεατίων. Ακόμα όλοι οι σχολιασμοί βασίζονται στην σύγκριση των αποτελεσμάτων παρουσία εκχυλισμάτων χαρουπιάς και απουσίας αυτών, δηλαδή με τους αντίστοιχους κάθε φορά διαλύτες.

Ως παράδειγμα των γραφικών παραστάσεων που προκύπτουν από το πρόγραμμα DMFit και με σκοπό την καλύτερη αντίληψη των αποτελεσμάτων που προκύπτουν, παρατίθεται το ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4: Γραφικές παραστάσεις χρόνου (h) σε συνάρτηση με την οπτική πυκνότητα που συνδυάζουν τις καμπύλες από τεχνική Bioscreen C και πρόγραμμα DMFit, για την *Escherichia coli*. Όπου A: εκχύλιση φύλλων χαρουπιάς με την μέθοδο εκχύλισης Γ, B: εκχύλιση φύλλων με την μέθοδο εκχύλισης Δ, Γ: νερό, Δ: αιθανόλη:νερό 10:90.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας βάση των μεθόδων εκχύλισης Γ και Δ, έναντι της *Escherichia coli*.

Εκχύλισμα	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ (1/h)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (h)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού (απορρόφηση στα 600nm και 420-580nm)	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής, R^2
Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρια με μέθοδο Γ	0,121	-	1,778	0,957
Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρια με μέθοδο Δ	0,086	-	1,753	0,957
Σπόροι ώριμων λοβών με μέθοδο Γ	0,151	-	1,761	0,970
Σπόροι ώριμων λοβών με μέθοδο Δ	0,099	-	1,750	0,968
Φύλλα χαρουπιάς με μέθοδο Γ	0,067	-	1,561	0,862
Φύλλα χαρουπιάς με μέθοδο Δ	0,042	-	1,527	0,898
Ανώριμοι λοβοί με μέθοδο Γ	0,123	-	1,692	0,951
Ανώριμοι λοβοί με μέθοδο Δ	0,062	-	1,489	0,917
Control 1 (Νερό)	0,169	-	1,801	0,972

Control 2 (Αιθανόλη:Νερό 10:90)	0,112	-	1,666	0,976
---------------------------------------	-------	---	-------	-------

Βάση των παραπάνω δεδομένων δεν μπορεί να αποδοθεί αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι της *Escherichia coli* στα εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρια ούτε σπόρων ώριμων λοβών που προκύπτουν από τις μεθόδους εκχύλισης Γ και Δ. Αυτό προκύπτει από την μη σημαντική μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού τους συγκριτικά με των αντίστοιχων διαλυτών. Αυτή η παρατήρηση μάλιστα μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αξιόπιστη καθώς ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής έχει ικανοποιητική τιμή. Ευοίωνα αποτελέσματα και με μέτριο συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα ανώριμων λοβών τόσο της μεθόδου Γ όσο και της Δ. Αυτά αποτελούν άξιο έναυσμα για περαιτέρω μελέτη, χωρίς όμως να μπορούν να αποδώσουν αντιμικροβιακή ικανότητα από μόνα τους. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς των μεθόδων Γ και Δ, φαίνεται σχεδόν υποδιπλασιασμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli*, γεγονός που τους αποδίδει αντιμικροβιακή δράση. Λαμβάνοντας όμως υπόψιν την σχεδόν ασήμαντη μείωση του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού και της μικρής τιμής του συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής, το αποτέλεσμα κρίνεται αμφίβολο και απαιτείται σε βάθος μελέτη του.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας βάση των μεθόδων εκχύλισης Γ και Δ, έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Εκχύλισμα	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ (1/h)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (h)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού (απορρόφηση στα 600nm και 420-580nm)	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής, R^2
Ώριμοι λοβοί χωρίς σπόρια με μέθοδο Γ	0,190	4,077	1,372	0,985

Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρια με μέθοδο Δ	0,148	3,265	1,346	0,981
Σπόροι ώριμων λοβών με μέθοδο Γ	0,114	-	1,715	0,945
Σπόροι ώριμων λοβών με μέθοδο Δ	0,117	1,558	1,333	0,973
Φύλλα χαρουπιάς με μέθοδο Γ	0,100	0,968	1,517	0,984
Φύλλα χαρουπιάς με μέθοδο Δ	0,050	-	1,327	0,980
Ανώριμοι λοβοί με μέθοδο Γ	0,123	-	1,692	0,951
Ανώριμοι λοβοί με μέθοδο Δ	0,083	3,975	1,016	0,988
Control 1 (Νερό)	0,231	4,106	1,238	0,999
Control 2 (Αιθανόλη:Νερό 10:90)	0,184	3,614	1,180	0,998

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν αποδίδεται αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι του *Staphylococcus aureus* στα εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρια που προκύπτουν από τις μεθόδους εκχύλισης Γ και Δ. Αυτό φαίνεται εύστοχο καθώς δεν παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού αλλά ούτε και αύξηση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής ενώ ταυτόχρονα ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής είναι ικανοποιητικά μεγάλος. Σχετικά με τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών αξιολογή

φαίνεται η μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στην μέθοδο εκχύλισης Γ. Ωστόσο και οι δύο μέθοδοι εκχύλισης (Γ και Δ) φαίνεται να μην αποδίδουν αντιμικροβιακή ικανότητα στα εκχυλίσματα καθώς με ικανοποιητικό συντελεστή προσαρμογής συσχέτισης, το μέγιστο επίπεδο πληθυσμού είναι υψηλότερο από το αντίστοιχο παρουσία μόνο των διαλυτών. Στην περίπτωση των φύλλων χαρουπιάς η μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, τάξης μεγαλύτερης του υποδιπλασιασμού, φανερώνει σημαντική αντιμικροβιακή επίδραση στον *Staphylococcus aureus* των εκχυλισμάτων των μεθόδων Γ και Δ. Όμως αυτό το συμπέρασμα αντιτίθεται στην αύξηση του μέγιστου επιπέδου του πληθυσμού και θεωρείται αμφιλεγόμενο βάση της μέτριας αξιοπιστίας που προσφέρει ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής. Μάλιστα στην περίπτωση του εκχυλίσματος των φύλλων με την μέθοδο Γ, παρατηρείται σημαντική μείωση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων. Παρομοίως και τα εκχυλίσματα των άγουρων λοβών εμφανίζουν σχεδόν υποδιπλασιασμό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης, με αμφιλεγόμενη αλλαγή στη τιμή του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού και μέτριο συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής. Επισημαίνεται ότι στο εκχύλισμα της μεθόδου Δ, παρατηρείται μικρή αύξηση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής. Τέλος φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων χαρουπιάς και των ανώριμων λοβών αξίζουν εκτενέστερη μελέτη.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας βάση των μεθόδων εκχύλισης Γ και Δ, έναντι της *Candida albicans*.

Εκχύλισμα	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ (1/h)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (h)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού (απορρόφηση στα 600nm και 420-580nm)	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής, R^2
Ωριμοι λοβοί χωρίς σπόρια με μέθοδο Γ	0,065	-	1,708	0,917

Ωριμοί λοβοί χωρίς σπόρια με μέθοδο Δ	0,046	-	-	0,911
Σπόροι ώριμων λοβών με μέθοδο Γ	0,097	-	1,672	0,936
Σπόροι ώριμων λοβών με μέθοδο Δ	0,071	-	1,679	0,950
Φύλλα χαρουπιάς με μέθοδο Γ	0,137	-	1,313	0,992
Φύλλα χαρουπιάς με μέθοδο Δ	0,102	-	1,065	0,897
Ανώριμοι λοβοί με μέθοδο Γ	0,121	4,322	1,271	0,991
Ανώριμοι λοβοί με μέθοδο Δ	0,149	1,730	0,858	0,930
Control 1 (Νερό)	0,121	-	1,639	0,940
Control 2 (Αιθανόλη:Νερό 10:90)	0,084	-	1,637	0,960

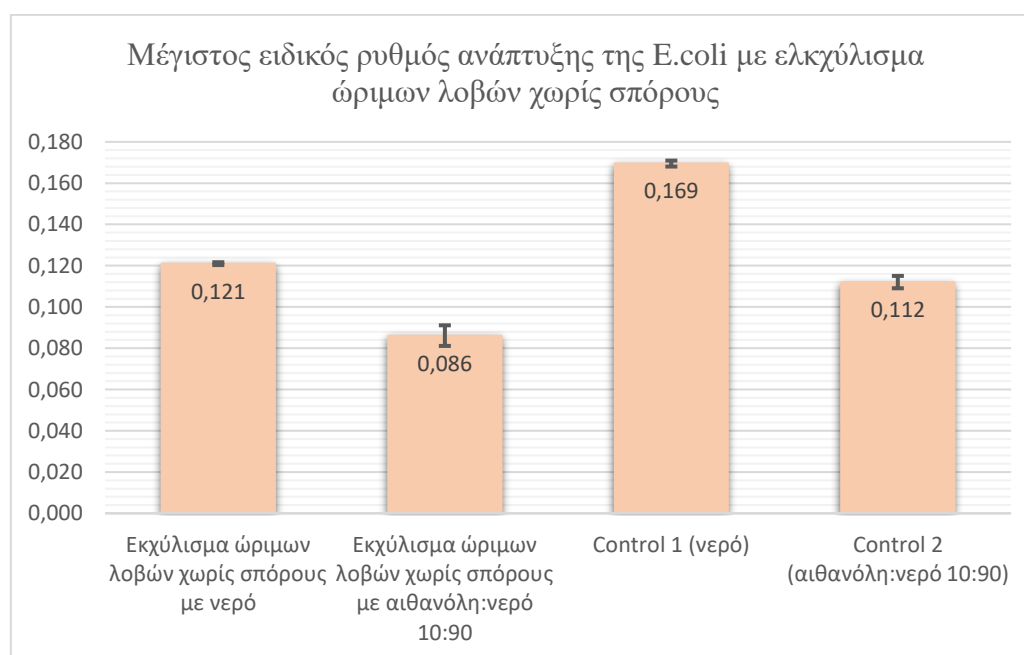
Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν αποδίδεται αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι της *Candida albicans* στα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών , ανώριμων λοβών και φύλλων χαρουπιάς. Αυτό υποστηρίζεται από την ένδειξη μη σημαντικής μείωσης του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Επισημαίνεται ότι το συμπέρασμα αυτό είναι γενικό ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ανομοιομορφίες στο μέγιστο επίπεδο πληθυσμού και στον συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής. Αξίζει να αναφερθεί ότι

παρουσιάζεται μείωση του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού παρουσία εκχυλισμάτων φύλλων και άγουρων λοβών της μεθόδου εκχύλισης Δ. Από μόνο της όμως αυτή η παρατήρηση δεν μπορεί να αποδώσει αντιμικροβιακή δράση. Τέλος ευοίωνα κρίνονται τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων ώριμου λοβού χωρίς σπόρια, καθώς παρατηρείται σχεδόν υποδιπλασιασμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Όμως ο χαμηλός συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής επιφέρει αναξιοπιστία στα αποτελέσματα και τελικά η παρατήρηση αποτελεί καλή αφορμή και περαιτέρω μελέτες.

Με σκοπό την σε βάθος κατανόηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την μέθοδο του Bioscreen, ώστε τα συμπεράσματα της να έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια, γίνεται η ακόλουθη εκτενέστερη μελέτη. Επισημαίνεται ότι οι σχολιασμοί των αποτελεσμάτων του προγράμματος DMFit, έδωσαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα κυρίως για την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς έναντι στην *Escherichia coli* και στον *Staphylococcus aureus* αλλά και των εκχυλισμάτων άγουρων λοβών έναντι του *Staphylococcus aureus*. Ωστόσο κρίνεται φρόνιμο να μελετηθούν όλα τα πειραματικά αποτελέσματα. Έτσι επαναλαμβάνεται η μελέτη με χρήση του προγράμματος DMFit, αυτήν τη φορά όμως λαμβάνονται καμπύλες ανάπτυξης για κάθε σχετικό φρεάτιο του Bioscreen και όχι μόνο για τον μέσο όρο κάθε τριάδας. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμού ανάπτυξης βάση της οπτικής πυκνότητας και του χρόνου που δίνονται από το Bioscreen για κάθε ένα από τα τρία σχετικά φρεάτια. Εν συνεχεία βέβαια υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών, επιδιώκεται όμως με αυτόν τον τρόπο η μείωση, κατά το δυνατόν, των σφαλμάτων. Έτσι ακολουθεί προσδιορισμός των τυπικών αποκλίσεων που εμφανίζει ο μέσος όρος σε σχέση με τις τρεις τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού του κάθε σχετικού φρεατίου. Τέλος δημιουργούνται διαγράμματα με στήλες και εμφανείς τις τυπικές αποκλίσεις. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με των αντίστοιχων διαλυτών που συνυπάρχουν στα διαγράμματα, εξάγονται συμπεράσματα για την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους βάσει των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Escherichia coli*.

	Ωριμων λοβών χωρίς σπόρους με την μέθοδο Γ	Ωριμων λοβών χωρίς σπόρους με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,120 0,121 0,122	0,092 0,086 0,080	0,168 0,171	0,115 0,109
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,121	0,086	0,169	0,112
Τυπική απόκλιση	0,001	0,005	0,001	0,003

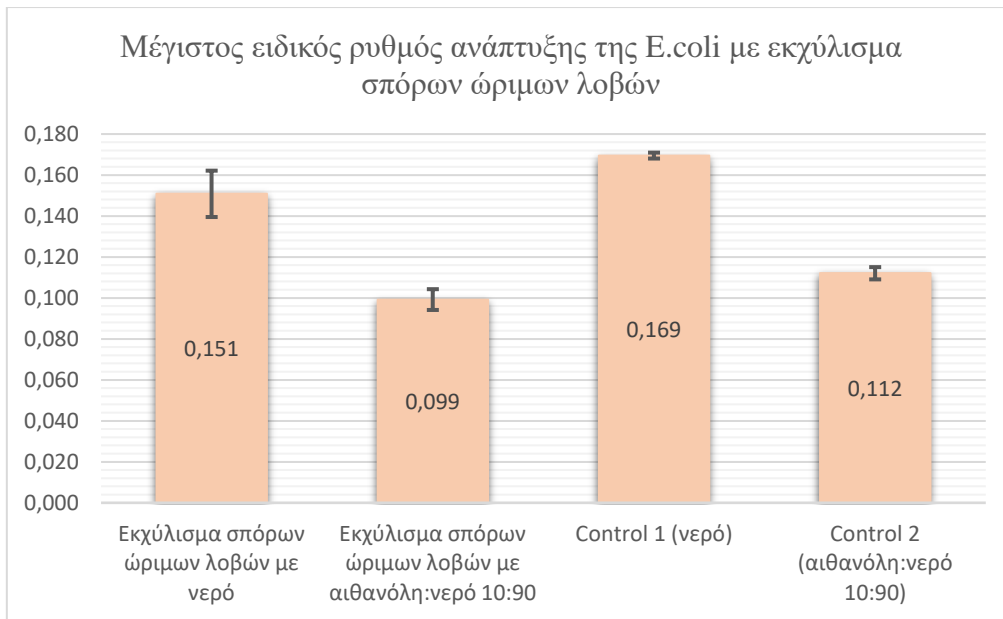


Διάγραμμα 5: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Escherichia coli* για μελέτη εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι η στήλη που αντιστοιχεί στο εκχύλισμα ώριμων λοβών χωρίς σπόρους με νερό είναι αξιοσημείωτη μικρότερη από την αντίστοιχη με το νερό και ανάλογα αποτελέσματα εμφανίζονται και στην περίπτωση με διαλύτη αιθανόλη:νερό 10:90. Πολύ σημαντικό κρίνεται ότι συνυπολογίζοντας τις τυπικές αποκλίσεις δεν προκύπτουν επικαλύψεις των κορυφών των στηλών. Κατ' επέκταση μπορούν τα αποτελέσματα να φανερώσουν δυσκολία της *Escherichia coli* στην ανάπτυξη της. Η μικρότερη τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης εμφανίζεται από το εκχύλισμα ώριμων λοβών χωρίς σπόρους με την μέθοδο Δ. Όμως καθώς ακόμα και σε αυτή την περίπτωση ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης δεν μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με το Control 2, μόνο ήπια αντιμικροβιακή δράση μπορεί να αποδοθεί σε αυτό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, το εκχύλισμα με την μέθοδο Γ εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης απ' ότι με αυτή της μεθόδου Δ, συγκριτικά με τα Control 1 και 2 αντίστοιχα. Αυτό δεν θα μπορούσε να προβλεφθεί. Φανερώνει μειωμένη ικανότητα εκχύλισης κατάλληλων πολυφαινολών του υδατικού διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90, είτε ακατάλληλη πορεία εκχύλισης για αυτό το διάλυμα.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Escherichia coli*.

	Σπόροι ώριμων λοβών με την μέθοδο Γ	Σπόροι ώριμων λοβών με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,151 0,137 0,165	0,106 0,096 0,095	0,168 0,171	0,115 0,109
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,151	0,099	0,169	0,112
Τυπική απόκλιση	0,011	0,005	0,001	0,003

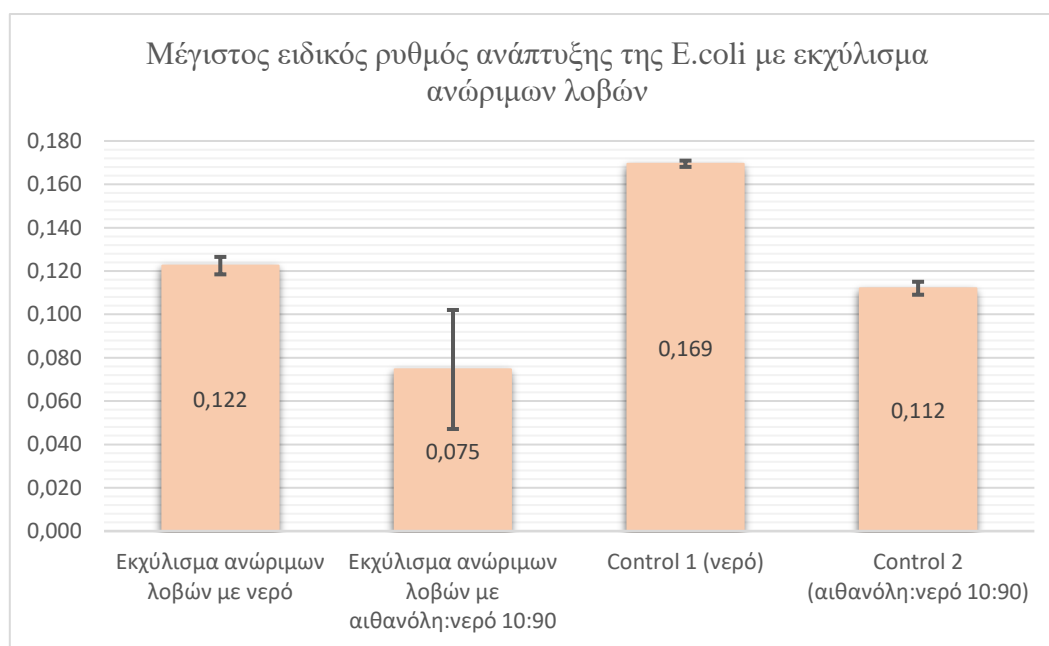


Διάγραμμα 6: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Escherichia coli* για μελέτη εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι τόσο η στήλη που αντιστοιχεί στο εκχύλισμα σπόρων ώριμων λοβών με νερό, όσο και αυτή με αιθανόλη:νερό 10:90 δεν παρουσιάζουν σχεδόν καθόλου μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli*. Αυτό το συμπέρασμα εξάγεται λαμβάνοντας υπόψιν και τις τυπικές αποκλίσεις, οι οποίες προκαλούν σχεδόν επικάλυψη των στηλών των εκχυλισμάτων με αυτές των αντίστοιχων Control. Έτσι δεν μπορεί να αποδοθεί στα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*, παρά μόνο αυτής που προσφέρεται από τους διαλύτες των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα αυτό βρίσκει εφαρμογή στην περίπτωση του υδατικού διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 καθώς το νερό από μόνο τους δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν με το γεγονός της μικρής περιεκτικότητας των σπόρων ώριμων λοβών σε πολυφαινόλες, αλλά ίσως υποδεικνύουν και ακαταλληλότητα της μεθόδου εκχύλισης ή αντοχή της *Escherichia coli* στα παράγοντες που καταφέρνουν να εκχυλιστούν.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών βάσει των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Escherichia coli*.

	Ανώριμοι λοβοί με την μέθοδο Γ	Ανώριμοι λοβοί με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,124 0,126 0,117	0,057 0,053 0,113	0,168 0,171	0,115 0,109
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,122	0,075	0,169	0,112
Τυπική απόκλιση	0,004	0,027	0,001	0,003

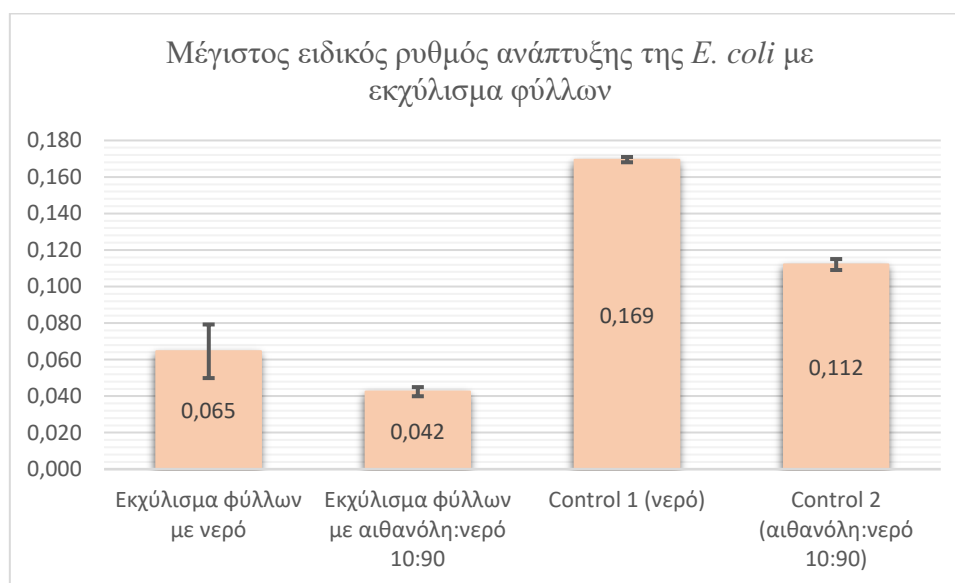


Διάγραμμα 7: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Escherichia coli* για μελέτη εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Η στήλη μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* του παραπάνω διαγράμματος που εμφανίζει μείωση άξια λόγου, είναι αυτή με χρήση εκχυλίσματος ανώριμων λοβών με νερό σε σύγκριση με αυτήν του Control 1. Δίνει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη, αποτελώντας ένδειξη ήπιας αντιμικροβιακής ικανότητας του εκχυλίσματος. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος ανώριμων λοβών με την μέθοδο Δ, φαίνεται ότι δεν μπορούν να αποδοθούν αντιμικροβιακές ικανότητες. Στην προκειμένη μπορεί να φανεί και η σημαντικότητα της περαιτέρω και εξειδικευμένης μελέτης που πραγματοποιήθηκε, καθώς η μη απόδοση αντιμικροβιακής δράσης οφείλεται στην τυπική απόκλιση. Πιο αναλυτικά η σύγκριση των τιμών του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του εκχυλίσματος ανώριμων λοβών με την μέθοδο Δ και του Control 2, θα μπορούσε να αποδώσει κάποια αντιμικροβιακή ικανότητα. Ωστόσο η τυπική απόκλιση της τιμής για το εκχύλισμα ανώριμων λοβών με αιθανόλη:νερό 10:90 εμφανίζεται πολύ μεγάλη και παρόλο που η αφαίρεση της θα μπορούσε να αποδώσει σημαντική αντιμικροβιακή δράση στο εκχύλισμα, η πρόσθεση της στον μέσο όρο οδηγεί σε σχεδόν επικάλυψη της στήλης αυτής με την αντίστοιχη του Control 2. Κατ' επέκταση δεν μπορεί να αποδοθεί αντιμικροβιακή ικανότητα στο εκχύλισμα ανώριμων λοβών που προκύπτει με την μέθοδο Δ. Σίγουρα φαίνεται έτσι ότι οι τιμές των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης της *Escherichia coli* δεν εμφάνισαν καλή επαναληψιμότητα και κρίνεται σκόπιμο να επαναληφθεί η μελέτη, κατά προτίμηση με παραπάνω δείγματα ώστε να διεξαχθούν σίγουρα αποτελέσματα.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Escherichia coli*.

	Φύλλα χαρουπιάς με την μέθοδο Γ	Φύλλα χαρουπιάς με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό 10:90)
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,077 0,072 0,044	0,046 0,041 0,041	0,168 0,171	0,115 0,109
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,065	0,042	0,169	0,112
Τυπική απόκλιση	0,015	0,002	0,001	0,003



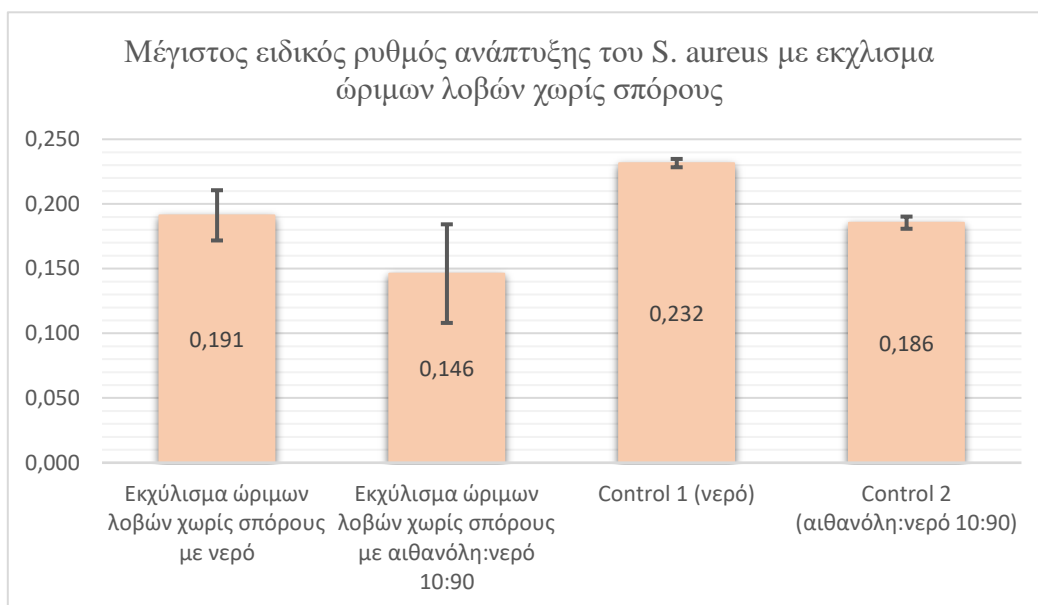
Διάγραμμα 8: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Escherichia coli* για μελέτη εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Τα αποτελέσματα του παραπάνω διαγράμματος κρίνονται πολύ σημαντικά για τον σκοπό της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα τόσο στην περίπτωση των εκχυλισμάτων φύλλων με νερό, όσο και με αιθανόλη:νερό 10:90, οι στήλες των μέγιστων ειδικών

ρυθμών ανάπτυξης παρουσιάζουν μεγάλη μείωση σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των Control 1 και 2. Επισημαίνεται ακόμα ότι οι τυπικές αποκλίσεις δεν πλησιάζουν σε καμία περίπτωση σε σημεία επικάλυψης, αποδίδοντας έτσι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων και των αντίστοιχων διαλυτών. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των εκχυλισμάτων φύλλων με την μέθοδο Γ, η τυπική απόκλιση λαμβάνει αρκετά μεγάλη τιμή. Παρόλο που το γεγονός αυτό δεν θέτει υπό αμφισβήτηση την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος, υποδεικνύει πιθανή υποτίμηση ή υπερτίμηση της επίδρασης που ασκεί το εκχύλισμα αυτό στον ρυθμό ανάπτυξης της *Escherichia coli*. Συνολικά πάντως βάση των δεδομένων για τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της *Escherichia coli*, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα φύλλων χαρουπιάς που παρήχθησαν με την μέθοδο Γ και Δ, έχουν αντιμικροβιακές ικανότητες έναντι στο εν λόγω βακτήριο.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι του *Staphylococcus aureus*.

	Ωριμοι λοβοί χωρίς σπόρους με την μέθοδο Γ	Ωριμοι λοβοί χωρίς σπόρους με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,178 0,219 0,177	0,182 0,163 0,093	0,235 0,228	0,190 0,181
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,191	0,146	0,232	0,186
Τυπική απόκλιση	0,019	0,038	0,003	0,005

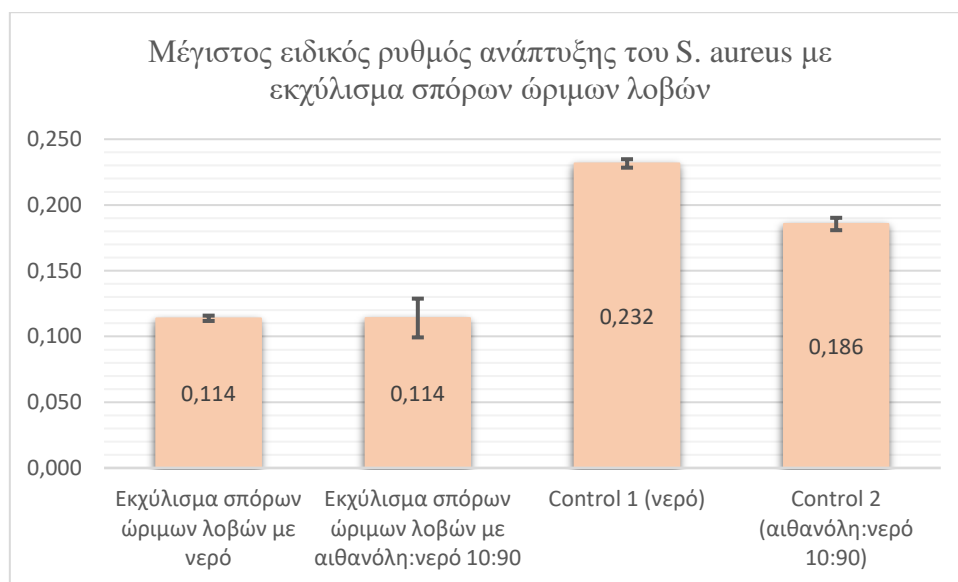


Διάγραμμα 9: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση του *Staphylococcus aureus* για μελέτη εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Βάση του διαγράμματος μπορεί να θεωρηθεί ότι τα εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρους που προκύπτουν με τις μεθόδους Γ και Δ, δεν παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*. Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται κυρίως στις σχεδόν επικαλύψεις των κορυφών των στηλών που προκύπτουν με πρόσθεση των τυπικών αποκλίσεων. Σαφώς με αφαίρεση αυτών, θα μπορούσε να αποδοθεί κάποια αντιμικροβιακή δράση στα εκχυλίσματα. Ωστόσο αυτή η γενίκευση δεν μπορεί να συμβεί, αλλά ούτε μπορεί να παραληφθεί η μικρή επαναληψιμότητα που εμφανίζουν τα αποτελέσματα με τα εκχυλίσματα. Έτσι προτείνεται επανάληψη της δοκιμασίας και ιδανικά με μεγαλύτερο πλήθος δειγμάτων, ώστε να είναι δυνατό να φανεί αν η επίδραση των εκχυλισμάτων στον βακτήριο επηρεάζει την ανάπτυξη του και αν αυτό οφείλεται στα συστατικά του χαρουπιού ή στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι του *Staphylococcus aureus*.

	Σπόροι ώριμων λοβών με την μέθοδο Γ	Σπόροι ώριμων λοβών με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό 10:90)
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,112 0,113 0,117	0,120 0,129 0,094	0,235 0,228	0,190 0,181
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,114	0,114	0,232	0,186
Τυπική απόκλιση	0,002	0,015	0,003	0,005

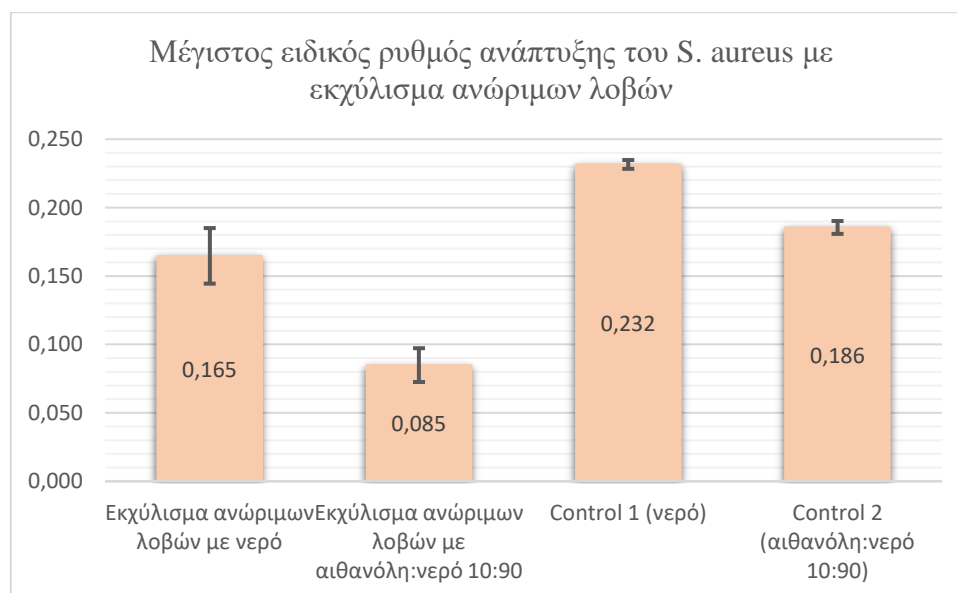


Διάγραμμα 10: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση του *Staphylococcus aureus* για μελέτη εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Τα αποτελέσματα του παραπάνω διαγράμματος κρίνονται πολύ σημαντικά για τον σκοπό της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα τόσο στην περίπτωση των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών με νερό, όσο και με αιθανόλη:νερό 10:90, οι στήλες των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης παρουσιάζουν μεγάλη μείωση σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των Control 1 και 2. Επισημαίνεται ακόμα ότι με πρόσθεση των τυπικών αποκλίσεων, δεν εμφανίζεται φαινόμενο επικάλυψης των κορυφών. Έτσι αυξάνεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και μπορεί να αποδοθεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών και των αντίστοιχων κάθε φορά Control. Αξίζει να σχολιαστεί ότι οι σπόροι των χαρουπιών παρότι δεν θεωρούνται πλούσιοι σε πολυφαινόλες στην προκειμένη εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Επισημαίνεται ότι στην περίπτωση των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών με την μέθοδο Δ, η τυπική απόκλιση δεν μπορεί να θεωρηθεί μικρή. Παρόλο που το γεγονός αυτό δεν θέτει υπό αμφισβήτηση την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος, υποδεικνύει πιθανή υποτίμηση ή υπερτίμηση της επίδρασης που ασκεί το εκχύλισμα αυτό στον ρυθμό ανάπτυξης της *Staphylococcus aureus*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η δράση των εκχυλισμάτων είτε αυτά προέκυψαν με χρήση νερού, είτε υδατικού διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη, φαίνεται να δίνει πολύ παρεμφερή αποτελέσματα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ανικανότητα της αιθανόλης να εκχυλίσει επιπλέον πολυφαινόλες ή άλλες αντιμικροβιακές ουσίες των σπόρων. Η παρατήρηση αυτή κρίνεται σημαντική και σύμφωνη με την σημερινή τάση για χρήση καλοηθών και οικονομικών υλικών. Συνολικά μπορεί να σχολιαστεί ότι τα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι του *Staphylococcus aureus*.

	Ανώριμοι λοβοί με την μέθοδο Γ	Ανώριμοι λοβοί με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,173 0,137 0,184	0,088 0,098 0,068	0,235 0,228	0,190 0,181
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,165	0,085	0,232	0,186
Τυπική απόκλιση	0,020	0,012	0,003	0,005

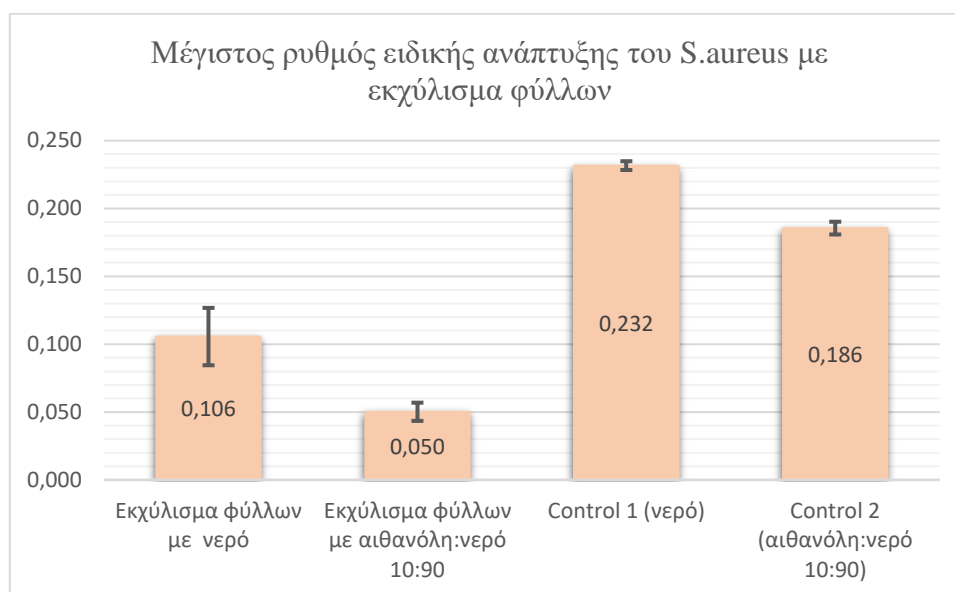


Διάγραμμα 11: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση του *Staphylococcus aureus* για μελέτη εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Η μελέτη του παραπάνω διαγράμματος οδηγεί σε απόδοση αντιμικροβιακής δράσης στο εκχύλισμα ανώριμων λοβών με την μέθοδο Δ και αμφιλεγόμενη αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος με την μέθοδο Γ. Στην περίπτωση της χρήσης του υδατικού διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη και παρά την σημαντική τυπική απόκλιση που εμφανίζει ο μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης, η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος έναντι του *Staphylococcus aureus* δεν μπορεί να αμφισβητηθεί. Παρατηρείται συγκεκριμένα τουλάχιστον υποδιαπλασιασμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου παρουσία του εκχυλίσματος με την μέθοδο Δ συγκριτικά με το Control 2. Επισημαίνεται ακόμη ότι συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του εκχυλίσματος με την μέθοδο Δ και του Control 2, τους αποδίδεται στατιστικά σημαντική διαφορά. Κατ' επέκταση η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται στις ουσίες των ανώριμων λοβών που εκχυλίστηκαν με την μέθοδο αυτή και όχι στον διαλύτη. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος ανώριμων λοβών που προκύπτει από την μέθοδο Γ και παρόλο που με πρόσθεση της τυπικής απόκλισης τυπικά δεν προκαλείται επικάλυψη με την κορυφή του Control 1, δεν μπορεί να αποδοθεί με σιγουριά αντιμικροβιακή ικανότητα. Αυτό οφείλεται κυρίως στην μεγάλη τιμή της τυπικής απόκλισης, βάση της οποίας προτείνεται επανάληψη της μελέτης και με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, για την λήψη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι του *Staphylococcus aureus*.

	Φύλλα χαρουπιάς με την μέθοδο Γ	Φύλλα χαρουπιάς με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,133 0,100 0,083	0,060 0,045 0,045	0,235 0,228	0,190 0,181
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,106	0,050	0,232	0,186
Τυπική απόκλιση	0,021	0,007	0,003	0,005

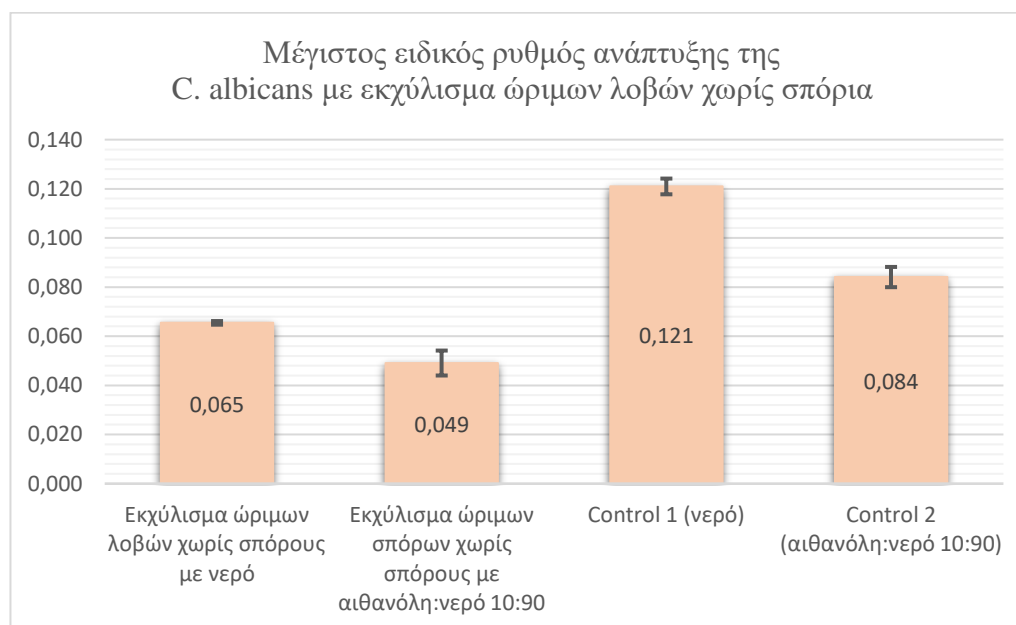


Διάγραμμα 12: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση του *Staphylococcus aureus* για μελέτη εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Τα αποτελέσματα που φαίνονται στο διάγραμμα κρίνονται πολύ σημαντικά για τον σκοπό της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα τόσο στην περίπτωση των εκχυλισμάτων φύλλων με νερό, όσο και με υδατικό διάλυμα αιθανόλη:νερό 10:90, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης εμφανίζει τουλάχιστον υποδιπλασιασμό συγκριτικά με τον αντίστοιχο των Control 1 και 2. Συνεπώς αποδίδεται αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φύλλων έναντι στον *Staphylococcus aureus*. Αξιόλογο κρίνεται επίσης ότι και στις δύο περιπτώσεις που μελετώνται σε αυτό το διάγραμμα, η τυπική απόκλιση δεν προκαλεί επ' ουδενί επικάλυψη με τις τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των αντίστοιχων Control και συνεπώς κρίνεται στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ αυτών. Έτσι δεν μπορεί να αμφισβητηθεί η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων και να αποδοθεί στους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκχύλιση. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι η τυπική απόκλιση του μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης εμφανίζεται μεγάλη στην περίπτωση του εκχυλίσματος με την μέθοδο Γ. Αυτό δεν μπορεί να αντιτεθεί στην αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζει το εκχύλισμα, ωστόσο προτείνεται επανάληψη της δοκιμής με σκοπό την λήψη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους βάση των μεθόδων Γ και Δ, έναντι της *Candida albicans*.

	Ωριμοι λοβοί χωρίς σπόρους με την μέθοδο Γ	Ωριμοι λοβοί χωρίς σπόρους με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,065 0,065 0,066	0,052 0,042 0,054	0,124 0,118	0,088 0,080
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,065	0,049	0,121	0,084
Τυπική απόκλιση	0,001	0,005	0,003	0,004



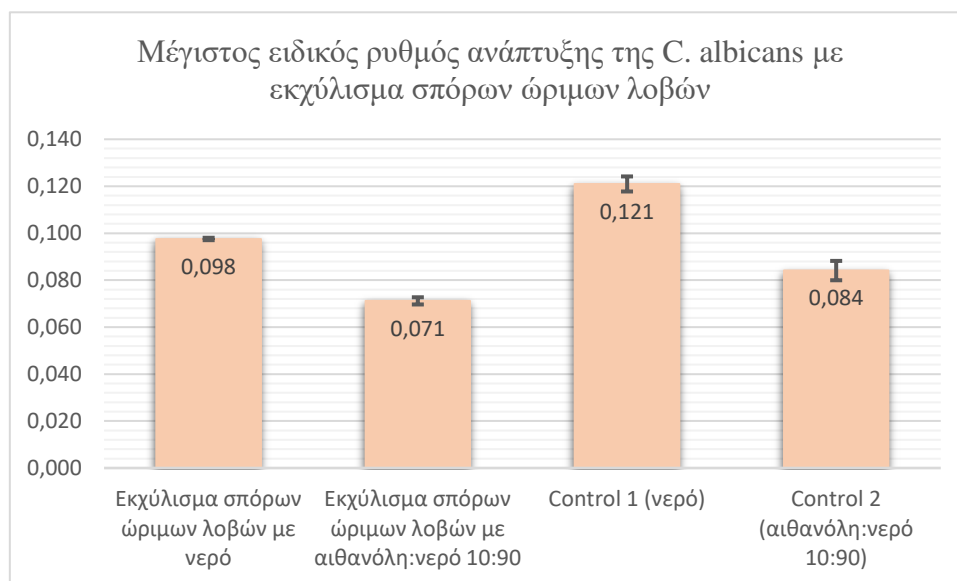
Διάγραμμα 13: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Candida albicans* για μελέτη εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στο παραπάνω διάγραμμα κρίνονται σημαντικά για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας. Η περίπτωση του εκχυλίσματος ώριμων

λοβών χωρίς σπόρους παρουσιάζει κυρίως ενδιαφέρον. Αυτό οφείλεται στον σχεδόν υποδιπλασιασμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Candida albicans* παρουσία του εκχυλίσματος συγκριτικά με το Control 1. Συνδυαστικά με την μικρή τυπική απόκλιση που εμφανίζει ο μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης με το εκχύλισμα της μεθόδου Γ και την εξολοκλήρου απουσία επικάλυψης με την κορυφή της στήλης του Control 1, τα αποτελέσματα σχολιάζονται ως επαναλήψιμα και με στατιστικά σημαντική διαφορά. Άρα τα εκχυλίσματα ώριμων λοβών χωρίς σπόρους με νερό φαίνεται να παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση στην *Candida albicans*. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους με την μέθοδο Δ, προτείνεται επανάληψη της δοκιμής ή περαιτέρω μελέτη. Αυτό οφείλεται κυρίως στις παρατηρήσεις ότι ο μέσος όρος των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης εμφανίζει ελπιδοφόρο μείωση σε σύγκριση με το Control 2, η οποία όμως δεν φτάνει σε επίπεδα υποδιπλασιασμού. Συνεπώς τα συμπεράσματα για την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος ώριμων λοβών χωρίς σπόρους είναι διφορούμενα.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Candida albicans*.

	Σπόροι ώριμων λοβών με την μέθοδο Γ	Σπόροι ώριμων λοβών με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,097 0,098 0,098	0,070 0,070 0,073	0,124 0,118	0,088 0,080
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,098	0,071	0,121	0,084
Τυπική απόκλιση	0,001	0,002	0,003	0,004

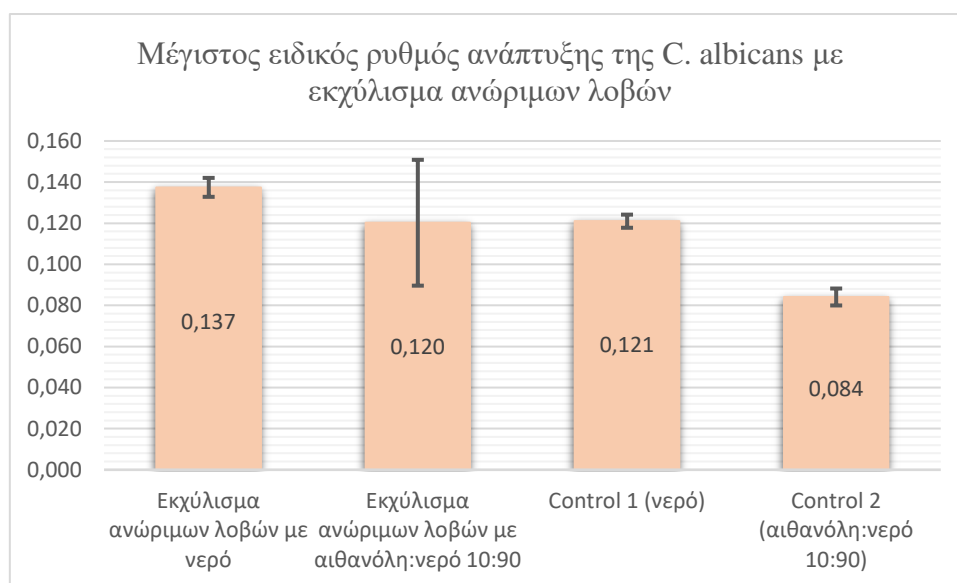


Διάγραμμα 14: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Candida albicans* για μελέτη εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Με παρατήρηση του παραπάνω διαγράμματος δεν μπορεί να αποδοθεί αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι της *Candida albicans* στα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών, είτε με νερό, είτε με υδατικό διάλυμα αιθανόλη:νερό 10:90. Το συμπέρασμα αυτό οφείλεται στην μη σημαντική μείωση των μέσων όρων των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης της ζύμης παρουσία εκχυλίσματος σπόρων ώριμων λοβών, συγκριτικά με του αντίστοιχους διαλύτες. Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να αλλάξει λόγω της μικρής τυπικής απόκλισης που υποδηλώνει καλή επαναληψιμότητα, ούτε λόγω της απουσίας επικάλυψης των κορυφών των στηλών μεταξύ κατάλληλου ζεύγους εκχυλίσματος και Control. Άρα δεν προτείνεται χρήση των εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών που προκύπτουν με τις μεθόδους Γ και Δ για την αναστολή της υπό μελέτη ζύμης. Επισημαίνεται επίσης ότι οι σπόροι δεν θεωρούνται πλούσιοι σε πολυφαινόλες και κατ' επέκταση δικαιολογείται η απουσία αντιμικροβιακής ικανότητας στα εκχυλίσματα τους.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Candida albicans*.

	Ανώριμοι λοβοί με την μέθοδο Γ	Ανώριμοι λοβοί με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,140 0,131 0,141	0,092 0,163 0,106	0,124 0,118	0,088 0,080
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,137	0,120	0,121	0,084
Τυπική απόκλιση	0,005	0,031	0,003	0,004

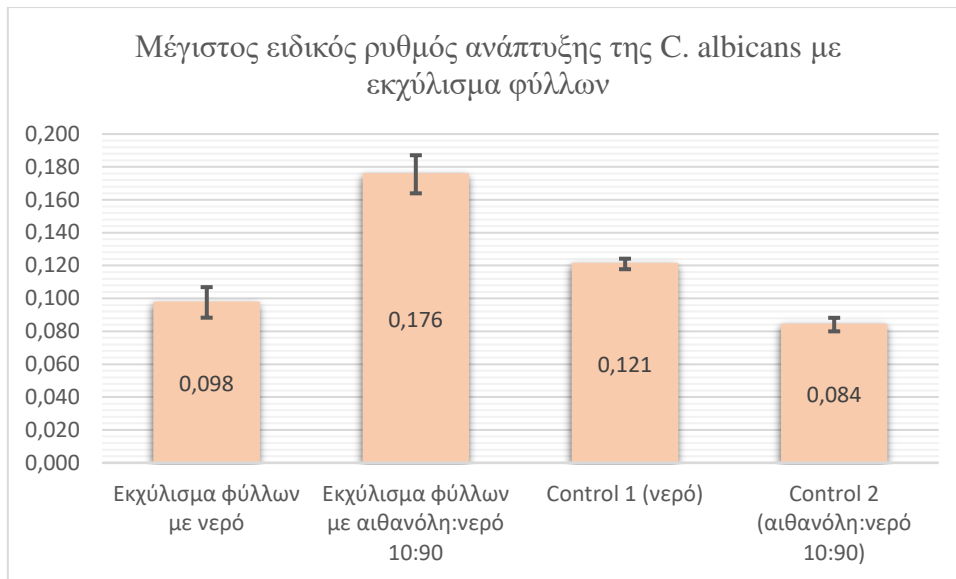


Διάγραμμα 15: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Candida albicans* για μελέτη εκχυλισμάτων ανώριμων λοβών, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Βάση του παραπάνω διαγράμματος, δίνεται η αντίληψη ότι η δοκιμή απαιτεί επανάληψη. Συγκεκριμένα περίεργο κρίνεται ότι ο μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης της *Candida albicans* με τα εκχυλίσματα ανώριμων λοβών, εμφανίζεται μεγαλύτερος απ'ότι των αντίστοιχων Control. Επιπλέον προβληματισμό δημιουργεί και η μεγάλη τυπική απόκλιση την περίπτωση του εκχυλίσματος ανώριμων λοβών με την μέθοδο Δ. Συνολικά μπορεί να θεωρηθεί ότι, αυτό οφείλεται σε παρουσία θρεπτικών παραγόντων στο εκχύλισμα ανώριμων λοβών, που ευνόησαν την ανάπτυξης της ζύμης.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα εκτενέστερης μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς βάση των μεθόδων Γ και Δ έναντι της *Candida albicans*.

	Φύλλα χαρουπιάς με την μέθοδο Γ	Φύλλα χαρουπιάς με την μέθοδο Δ	Control 1 (Νερό)	Control 2 (Αιθανόλη:Νερό) 10:90
Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ	0,087 0,109 0,097	0,159 0,186 0,181	0,124 0,118	0,088 0,080
Μέσος όρος των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης	0,098	0,176	0,121	0,084
Τυπική απόκλιση	0,009	0,012	0,003	0,004



Διάγραμμα 16: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης +/- τυπική απόκλιση της *Candida albicans* για μελέτη εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιάς, με τις μεθόδους Γ και Δ.

Με μελέτη του παραπάνω διαγράμματος δεν δίνεται η εικόνα εκχυλισμάτων με αντιμικροβιακή δράση. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος φύλλων χαρουπιάς με νερό δεν παρατηρείται αξιόλογη μείωση του μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης της *Candida albicans* συγκριτικά με αυτόν του Control 1. Έτσι δεν μπορεί να του αποδοθεί αντιμικροβιακή ικανότητα. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος φύλλων με την μέθοδο Δ, εμφανίζονται αναπάντεχα αποτελέσματα, τα οποία μπορούν να αποδοθούν σε διατροφικούς παράγοντες εντός του εκχυλίσματος που ενίσχυσαν την ανάπτυξη της *Candida albicans*. Έτσι προτείνεται η επανάληψη των δοκιμών αυτών.

Η σε βάθος μελέτη των αποτελεσμάτων της μεθόδου Bioscreen κρίνεται συνολικά χρήσιμη. Στις αναλύσεις που έγιναν παραπάνω φαίνεται ότι η τυπική απόκλιση δίνει πληροφορίες για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, ένδειξη υπερεκτίμησης ή υποτίμησης των αποτελεσμάτων και για την εξάρτηση των αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων με αυτά των αντίστοιχων διαλυτών, αποδίδοντας στατιστικά σημαντική ή μη διαφορά μεταξύ αυτών. Συνδυαστικά με τις υπόλοιπες πληροφορίες που μπορούν να διεξαχθούν από τις συγκρίσεις και τους σχολιασμούς των μέσων όρων των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης, διεξάγονται σημαντικά συμπεράσματα.

Επισημαίνεται ότι η τυπική απόκλιση των μέσων όρων των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης, για κάθε συνδυασμό μικροοργανισμού – διαλύτη, που μελετήθηκε, λαμβάνει μικρή τιμή. Έτσι αποδίδεται καλή επαναληψιμότητα και υψηλή αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό κρίνεται πολύ σημαντικό καθώς τα συμπεράσματα για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των εκχυλισμάτων προκύπτουν με συγκρίσεις με τους αντίστοιχους διαλύτες.

4. Συζήτηση

Κατά την διεκπεραίωση των πειραματικών διεργασιών αυτής της εργασίας προέκυψαν πολλές παρατηρήσεις οι οποίες αξίζουν περαιτέρω συζήτηση. Στο πλαίσιο των εκχυλίσεων και με την επίδραση κάποιων παραγόντων, εμφανίστηκαν κάποιες αλλαγές στα εκχυλίσματα, οι οποίες ήταν κυρίως χρωματικές. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι κατά την ρύθμιση του pH των εκχυλισμάτων των μεθόδων Γ και Δ στην ουδέτερη περιοχή, την χρήση υδατικών διαλυμάτων με αιθανόλη ως διαλύτη των εκχυλίσεων και κατά την παραμονή των εκχυλισμάτων στο φως, αυτά απέκτησαν πιο σκούρο χρώμα. Η σύγκριση γινόταν σε κάθε περίπτωση με τα εκχυλίσματα χωρίς την μεταβολή του pH τους, με χρήση νερού ως διαλύτη των εκχυλίσεων και κατά την αρχική απομάκρυνση τους από σκιερό μέρος αντίστοιχα. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα των χαρουπιών σε σάκχαρα, τα οποία ενδέχεται να συμμετείχαν σε αντιδράσεις καραμελοποίησης και Maillard, προσδίδοντας σκουρότερες και πιο καφέ αποχρώσεις στα εκχυλίσματα. Άλλο φαινόμενο που έλαβε χώρα, είναι η διφασική εμφάνιση που απέκτησαν τα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών των μεθόδων Β, Γ και Δ με την επίδραση της θέρμανσης, κατά την διεξαγωγή της ήπιας θερμικής επεξεργασίας. . Επισημαίνεται ότι αυτό το φαινόμενο εμφανίστηκε σε όλα τα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών και μόνο σε αυτά. Έτσι η αλλαγή αυτή που μπορεί να ερμηνευτεί βάση της πλούσιας περιεκτικότητας του φύτρου των χαρουπιών σε πρωτεΐνες. Ενδέχεται λοιπόν να οφείλεται σε μετουσίωση υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με την θέρμανση, που δημιουργούν την στερεή φάση στα εκχυλίσματα. Η παρατήρηση αυτή κρίνεται πού σημαντική, καθώς με διεξαγωγή επιπλέον εργασιών θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν αυτές οι πρωτεΐνες. Στον κατάλογο των μεταβολών που παρουσίασαν κάποια εκχυλίσματα, συγκαταλέγεται ακόμα η

ένδειξη ανάπτυξης μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα στα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων λοβών και φύλλων χαρουπιάς που προέκυψαν από την μέθοδο Γ, δηλαδή με χρήση ως διαλύτη μόνο νερό, στο πέρας του χρόνου εκχύλισης, παρατηρήθηκαν θολώδης ή/και χνουδωτοί όγκοι. Αυτό αποδόθηκε στην ανάπτυξη μικροοργανισμών και πιο ειδικά μυκήτων. Αυτό το φαινόμενο, συμβάλλει στην απαίτηση για θερμική επεξεργασία, της τάξης ήπιας παστερίωσης, των εκχυλισμάτων πριν την διεκπεραίωση των δοκιμών αντιμικροβιακής ικανότητας. Επισημαίνεται ωστόσο ότι οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες πρέπει να αποφεύγονται, για την προστασία των πολύτιμων πολυφαινολικών ουσιών που βρίσκονται στο εκχύλισμα.

Αναφορικά με τις μεθόδους εκχύλισης, αξίζει να συζητηθεί η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση. Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου δεν απέδωσαν αντιμικροβιακή δράση στους σπόρους ώριμων λοβών ούτε στην *Escherichia coli*, ούτε στην *Candida albicans*, καθώς δεν εμφανίστηκε ζώνης αναστολής κατά την μέθοδο διάχυσης φρεατίου σε άγαρ. Επισημαίνεται όμως ότι οι σπόροι ώριμων λοβών δεν θεωρούνται πλούσιοι σε πολυφαινολικές ουσίες και κατ' επέκταση η εμφάνιση αντιμικροβιακής δράσεις δεν θεωρούταν αναμενόμενη. Συνολικά η υποβοηθούμενη από υπερήχους μέθοδος εκχύλισης δεν μπορεί να κριθεί ακατάλληλη για την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων χαρουπιού. Προτείνεται η περαιτέρω μελέτη της με σκοπό την αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων που παρέχει, ως μια εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης.

Στο πλαίσιο των μεθόδων αντιμικροβιακής ικανότητας, κρίνεται γενικά σημαντική η επίδραση που μπορεί να έχει ο διαλύτης της εκχύλισης στα αποτελέσματα. Στην εργασία αυτή ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το νερό και υδατικό διάλυμα αιθανόλη:νερό 10:90. Στο νερό δεν μπορεί να αποδοθεί αντιμικροβιακή δράση και συνεπώς δεν τίθεται ζήτημα αλλοίωσης των αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση όμως του υδατικού διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90 και παρά την μικρή περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη ενδέχεται να επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Έχοντας αυτό ως γνώμονα και με σκοπό την ερμηνεία των αποτελεσμάτων με όση το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια για την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων, δίνεται μεγάλη σημασία στα αποτελέσματα του διαλύτη αυτού. Στις μεθόδους διάχυσης φρεατίου σε άγαρ για το υδατικό αυτό διάλυμα δεν εμφανίζεται ζώνη αναστολής. Ωστόσο τα διαγράμματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα της τεχνικής Bioscreen και με χρήση του προγράμματος DMFit παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση του

διαλύματος αιθανόλη:νερό 10:90. Οι σχολιασμοί όμως των αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων γίνονται σε κάθε περίπτωση συγκριτικά και λαμβάνοντας υπόψιν αυτό το γεγονός. Με αυτόν τον τρόπο δεν τίθεται σε κίνδυνο η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων από την τυχόν αντιμικροβιακή δράση του διαλύτη.

Σχετικά με τα αποτελέσματα των δοκιμών αντιμικροβιακής ικανότητας, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση εκχυλίσματος ανώριμων λοβών με υδατικό διάλυμα αιθανόλη:νερό 10:90 έναντι στην *Escherichia coli*. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος διάχυσης φρεατίου άγαρ εμφανίζει πολύ καλά αποτελέσματα, με μέσο όρο των διαμέτρων των ζωνών διαστολής, ίσο με 10mm. Αυτό θα μπορούσε να αποδώσει αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση στο εκχύλισμα, όμως απορρίπτεται με την παρατήρηση του εκχυλίσματος με ρυθμισμένο pH στα 6,98. Φαίνεται δηλαδή, ότι η αναστολή του βακτηρίου οφείλεται κυρίως στο χαμηλό pH του εκχυλίσματος. Επίσης η μελέτη αυτού του εκχυλίσματος με την τεχνική Bioscreen απέδωσε ελπιδοφόρα αποτελέσματα, καθώς παρουσίασε μειωμένο μέγιστο επίπεδο πληθυσμού και μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης της *Escherichia coli*. Ωστόσο η εκτενέστερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα DMFit, δεν φανέρωσε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου με το εκχύλισμα και με το υδατικό διάλυμα αιθανόλη:νερό 10:90. Συγκεκριμένα η τυπική απόκλιση του μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης με το εκχύλισμα παρατηρήθηκε μεγάλη και ικανή να φτάσει την τιμή με τον διαλύτη. Συνολικά λοιπόν στην περίπτωση του εκχυλίσματος των ανώριμων λοβών με αιθανόλη:νερό 10:90, παρόλο που τα αρχικά αποτελέσματα φανερώνουν αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*, αυτή φαίνεται τελικά ότι οφείλεται στο χαμηλό pH του εκχυλίσματος και στην αιθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί καλό παράδειγμα, για την μεγάλη σημασία που έχει η διεκπεραίωση εκτενής μελέτης.

Καθώς το θέμα της εργασίας επαληθεύεται ως ελπιδοφόρο, αξίζει να γίνουν κάποιες επιπλέον προτάσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να βοηθήσουν αντίστοιχες μελλοντικές μελέτες. Αρχικά επισημαίνεται ότι στην παρούσα εργασία ο πληθυσμός των δειγμάτων κρίνεται πολύ μικρός, καθιστώντας έτσι πολύ δύσκολη την θεώρηση των αποτελεσμάτων ως αξιόπιστα. Η γενίκευση που προκύπτει με τον μικρό πληθυσμό των τριών δειγμάτων κατά την χρήση του μέσου όρου τους, κρίνεται πολύ σημαντική. Καθώς το χαρούπι θεωρείται περίπλοκη μήτρα και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται

για την μελέτη της αντιμικροβιακής του δράσης κρίνονται πολυπαραγοντικές, η ανάγκη για αύξηση του πληθυσμού γίνεται ακόμα μεγαλύτερη. Αυτά συμβάλλουν εξάλλου στην δυσκολία που εμφανίζει η τυποποίηση μεθόδου για εκμετάλλευση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του χαρουπιού. Έτσι σε πρώτο στάδιο, προτείνεται η αύξηση των παρατηρήσεων ή δειγμάτων, με σκοπό η μέση τιμή τους να τείνει όσο το δυνατόν προς την πραγματική. Με σκοπό την εξέλιξη της μελέτης αυτής και βασιζόμενοι στα σημαντικά και ευεργετικά αποτελέσματα που μπορεί να επιφέρει, προτείνεται επίσης η χρήση ποσοτικών μεθόδων ανίχνευσης της αντιμικροβιακής ικανότητας. Έτσι θα δοθεί η ευκαιρία υπολογισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα. Αυτή η τιμή κρίνεται πολύ σημαντική για τέτοιου είδους μελέτες και επιτρέπει την καλύτερη και με μεγαλύτερη ακρίβεια σύγκριση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον προτείνεται η παρασκευή ξηρών εκχυλισμάτων, διευκολύνοντας έτσι τις ποσοτικές μελέτες. Συγκεκριμένα η ξήρανση των εκχυλισμάτων μπορεί να γίνει είτε με λυοφιλίωση είτε με αέρα. Προτιμάται βέβαια η μέθοδος της λυοφιλίωσης καθώς διατηρεί υψηλότερα επίπεδα φαινολικής περιεκτικότητας στα δείγματα, γεγονός που κρίνεται πολύ σημαντικό σε εκχυλίσματα χαρουπιού (Stavrou et al. 2018). Για να θεωρηθεί μια σχετική μελέτη ως ολοκληρωμένη, προτείνεται τέλος ο προσδιορισμός της σύνθεσης των εκχυλισμάτων. Ενδείκνυται δε, στην περίπτωση του χαρουπιού και όχι μόνο, η χρήση της μεθόδου HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Με την διεκπεραίωση αυτής της τεχνικής δίνεται η δυνατότητα τόσο για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, όσο και για την διεξαγωγή πιο συγκεκριμένων συμπερασμάτων αλλά και για την βελτιστοποίηση των τεχνικών που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα το πιο σημαντικό που μπορεί να προσφέρει μια τέτοια μέθοδος προσδιορισμού της σύνθεσης έγκειται στην ταυτοποίηση των ουσιών που προσφέρουν την αντιμικροβιακή δράση. Εν συνεχεία λοιπόν δίνεται η δυνατότητα προσαρμογής των τεχνικών εκχύλισης, ώστε να ληφθούν οι περισσότερες εκ των ζητούμενων ουσιών και μάλιστα σε ικανοποιητικές ποσότητες. Συνολικά λοιπόν προκύπτουν τρεις προτάσεις για μελλοντικές βελτιστοποιημένες μελέτες. Βάση αυτών, οι οποίες αναλύθηκαν παραπάνω, φανερώνεται ότι στο ήδη μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει η αντιμικροβιακή δράση του χαρουπιού, οι μελλοντική εφαρμογή αυτών των επιπλέον προτάσεων μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές βελτιώσεις.

5. Συμπεράσματα

Η χαρουπιά καθώς αποτελεί φθηνή και με πολύτιμη σύσταση πρώτη ύλη, η οποία στην σημερινή εποχή μένει αρκετά ανεκμετάλλευτη, κρίνεται ως σημαντικό εν δυνάμει φυτοχημικό. Σε γενικευμένο πλαίσιο αρκετά από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν να θεωρηθούν έναυσμα για περαιτέρω μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του χαρουπιού. Τα πιο σημαντικά εκ των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις δοκιμές της εργασίας αυτής παρατίθενται ακολούθως. Αρχικά η μεγαλύτερης έντασης αντιμικροβιακή δράση εμφανίζεται έναντι της *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, από εκχύλισμα φύλλων χαρουπιάς που προκύπτει από εκχύλιση με διαβροχή, με αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη και με αναλογία υγρού:στερεού 20:1. Σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα τόσο της μεθόδου διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, όσο η τεχνική Bioscreen αλλά και η εκτενέστερη μελέτη με χρήση του προγράμματος DMFit, συμφωνούν με την απόδοση αντιμικροβιακής δράσης στο εκχύλισμα. Μάλιστα η μελέτη με την μέθοδο διάχυσης φρεατίου σε άγαρ που έγινε για αυτό το εκχύλισμα και έναντι της *Escherichia coli*, αλλά με ουδέτερο pH εκχυλίσματος, φαίνεται ότι η αντιμικροβιακή ικανότητα δεν βασίζεται στο χαμηλό pH του εκχυλίσματος. Βάσιμες ενδείξεις αντιμικροβιακής δράσης έναντι του *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538 εμφανίζουν τα εκχυλίσματα ανώριμων λοβών και φύλλων χαρουπιάς που προκύπτουν από εκχύλιση με διαβροχή, με αιθανόλη:νερό 10:90 ως διαλύτη και με αναλογία υγρού:στερεού 20:1. Αποτελέσματα που πυροδοτούν εκτενέστερη μελέτη είναι η επίδραση εκχυλισμάτων σπόρων ώριμων λοβών με νερό στην *Escherichia coli* και εκχυλισμάτων ώριμων λοβών χωρίς σπόρους με νερό στην *Candida albicans*. Σε αυτές τις περιπτώσεις, προβληματισμοί δημιουργούνται από την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δοκιμών. Βάση αυτών προτείνεται εκτενέστερη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης τμημάτων χαρουπιάς, τόσο για την εξακρίβωση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας με απώτερο σκοπό την τυποποίηση της μεθόδου, όσο και η δοκιμή επιπλέον μεθόδων.

6. Βιβλιογραφία

- Aissani, Nadhem, Valentina Coroneo, Sami Fattouch, and Pierluigi Caboni. 2012. "Inhibitory Effect of Carob (*Ceratonia Siliqua*) Leaves Methanolic Extract on *Listeria Monocytogenes*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(40):9954–58. doi: 10.1021/jf3029623.
- Almanasrah, Mohammad, Luísa B. Roseiro, Rafal Bogel-Lukasik, Florbela Carvalheiro, Carla Brazinha, João Crespo, Mari Kallioinen, Mika Mänttari, and Luis C. Duarte. 2015. "Selective Recovery of Phenolic Compounds and Carbohydrates from Carob Kibbles Using Water-Based Extraction." *Industrial Crops and Products* 70:443–50. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.051.
- Anon. 2009. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*.
- ben Ayache, Siwar, Filipa S. Reis, Maria Inês Dias, Carla Pereira, Jasmina Glamočlija, Marina Soković, Emna Behija Saafi, Isabel C. F. R. Ferreira, Lillian Barros, and Lotfi Achour. 2021. "Chemical Characterization of Carob Seeds (*Ceratonia Siliqua* L.) and Use of Different Extraction Techniques to Promote Its Bioactivity." *Food Chemistry* 351. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129263.
- Balouiri, Mounyr, Moulay Sadiki, and Saad Koraichi Ibsouda. 2016. "Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review." *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2):71–79.
- Calo, Julianny Rivera, Philip G. Crandall, Corliss A. O'Bryan, and Steven C. Ricke. 2015. "Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems - A Review." *Food Control* 54:111–19.
- Cavdarova, Melita, and Dimitris P. Makris. 2014. "Extraction Kinetics of Phenolics from Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) Kibbles Using Environmentally Benign Solvents." *Waste and Biomass Valorization* 5(5):773–79. doi: 10.1007/s12649-014-9298-3.
- Christou, Atalanti, Ioannis J. Stavrou, and Constantina P. Kapnissi-Christodoulou. 2021. "Continuous and Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction of Carob's Antioxidants: Processing Parameters Optimization and Identification of Polyphenolic Composition." *Ultrasonics Sonochemistry* 76. doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105630.
- Clodoveo, Maria Lisa, Pasquale Crupi, Marilena Muraglia, and Filomena Corbo. 2022. "Ultrasound Assisted Extraction of Polyphenols from Ripe Carob Pods (*Ceratonia Siliqua* L.): Combined Designs for Screening and Optimizing the Processing Parameters." *Foods* 11(3). doi: 10.3390/foods11030284.
- Davis, Dana. 2003. "Adaptation to Environmental PH in *Candida Albicans* and Its Relation to Pathogenesis." *Current Genetics* 44(1):1–7.
- Garcia, Marcelo Valle, Esther Garcia-Cela, Naresh Magan, Marina Venturini Copetti, and Angel Medina. 2021. "Comparative Growth Inhibition of Bread Spoilage Fungi by Different Preservative Concentrations Using a Rapid Turbidimetric Assay System." *Frontiers in Microbiology* 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.678406.

- Goulas, Vlasios, and Eva Georgiou. 2020. "Utilization of Carob Fruit as Sources of Phenolic Compounds with Antioxidant Potential: Extraction Optimization and Application in Food Models." *Foods* 9(1). doi: 10.3390/foods9010020.
- Hadrich, Bilel, Krasimir Dimitrov, and Karim Kriaa. 2017. "Modelling Investigation and Parameters Study of Polyphenols Extraction from Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) Using Experimental Factorial Design." *Journal of Food Processing and Preservation* 41(2). doi: 10.1111/jfpp.12769.
- Hanousek Čiča K., Mrvčić J., Srećec S., Filipan K., Blažić M., Stanzer D. 2019. "Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions." Wiley. doi: 10.1002/fsn3.1374
- Klančnik, Anja, Saša Piskernik, Barbara Jeršek, and Sonja Smole Možina. 2010. "Evaluation of Diffusion and Dilution Methods to Determine the Antibacterial Activity of Plant Extracts." *Journal of Microbiological Methods* 81(2):121–26. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004.
- Kokkinofta, Rebecca, Stelios Yiannopoulos, Marinos A. Stylianou, and Agapios Agapiou. 2020. "Use of Chemometrics for Correlating Carobs Nutritional Compositional Values with Geographic Origin." *Metabolites* 10(2). doi: 10.3390/metabo10020062.
- Mulet, A., J. Fernández-Salguero, J. v. García-Pérez, and J. Bon. 2016. "Mechanistic Modeling to Address Process Analysis: Kibbles of Carob (*Ceratonia Siliqua*, L.) Pod Extraction." *Journal of Food Engineering* 176:71–76. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.06.011.
- Olasupo, N. A., D. J. Fitzgerald, M. J. Gasson, and A. Narbad. 2003. "Activity of Natural Antimicrobial Compounds against *Escherichia Coli* and *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium." *Letters in Applied Microbiology* 37(6):448–51. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x.
- ben Othmen, Khadija, Jose Maria Garcia-Beltrán, Walid Elfalleh, Mansour Haddad, and Maria Ángeles Esteban. 2021. "Phytochemical Compounds and Biological Properties of Carob Pods (*Ceratonia Siliqua* L.) Extracts at Different Ripening Stages." *Waste and Biomass Valorization* 12(9):4975–90. doi: 10.1007/s12649-021-01352-x.
- Owen, R. W., R. Haubner, W. E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, and B. Haber. 2003. "Isolation and Structure Elucidation of the Major Individual Polyphenols in Carob Fibre." *Food and Chemical Toxicology* 41(12):1727–38. doi: 10.1016/S0278-6915(03)00200-X.
- Papagiannopoulos, Menelaos, Hans Rainer Wollseifen, Annett Mellenthin, Bernd Haber, and Rudolf Galensa. 2004. "Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia Siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12):3784–91. doi: 10.1021/jf030660y.
- Quiles-Carrillo, L., C. Mellinas, M. C. Garrigos, R. Balart, and S. Torres-Giner. 2019. "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity from Carob Pods." *Food Analytical Methods* 12(11):2480–90. doi: 10.1007/s12161-019-01596-3.

- Roseiro, Luísa B., Luís C. Duarte, Diana L. Oliveira, Ricardo Roque, M. Gabriela Bernardo-Gil, Alice I. Martins, Catarina Sepúlveda, Joana Almeida, Margarida Meireles, Francisco M. Gírio, and Amélia Pilar Rauter. 2013. "Supercritical, Ultrasound and Conventional Extracts from Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) Biomass: Effect on the Phenolic Profile and Antiproliferative Activity." *Industrial Crops and Products* 47:132–38. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.02.026.
- Roseiro, Luísa B., Cláudia S. Tavares, José C. Roseiro, and Amélia P. Rauter. 2013. "Antioxidants from Aqueous Decoction of Carob Pods Biomass (*Ceratonia Siliqua* L.): Optimisation Using Response Surface Methodology and Phenolic Profile by Capillary Electrophoresis." *Industrial Crops and Products* 44:119–26. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.11.006.
- Rtibi, Kaïs, Slimen Selmi, Dhekra Grami, Mohamed Amri, Bruno Eto, Jamel El-benna, Hichem Sebai, and Lamjed Marzouki. 2017. "Chemical Constituents and Pharmacological Actions of Carob Pods and Leaves (*Ceratonia Siliqua* L.) on the Gastrointestinal Tract: A Review." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 93:522–28.
- Samadi, Fahad M., Shaista Suhail, Manjari Sonam, Neeta Sharma, Shruti Singh, Sushil Gupta, Ashwini Dobhal, and Harsha Pradhan. 2019. "Antifungal Efficacy of Herbs." *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 9(1):28–32. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.06.002.
- Stavrou, Ioannis J., Atalanti Christou, and Constantina P. Kapnissi-Christodoulou. 2018. "Polyphenols in Carobs: A Review on Their Composition, Antioxidant Capacity and Cytotoxic Effects, and Health Impact." *Food Chemistry* 269:355–74.
- Ungphakorn, Wanchana, Christer Malmberg, Pernilla Lagerbäck, Otto Cars, Elisabet I. Nielsen, and Thomas Tängdén. 2017. "Evaluation of Automated Time-Lapse Microscopy for Assessment of in Vitro Activity of Antibiotics." *Journal of Microbiological Methods* 132:69–75. doi: 10.1016/j.mimet.2016.11.001.
- Valgas, Cleidson, Simone Machado De Souza, ; Elza, F. A. Smânia, and Artur Smânia. 2007. "SCREENING METHODS TO DETERMINE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS." *Brazilian Journal of Microbiology* 38:369–80.
- Κοτζεκίδου-Ρουκά Π. 2016. "Μικροβιολογία Τροφίμων & Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων." Γιαχούδη.
- Τύμπης Δ., Πετράκης Ε., Κοντελής Σ. 2016. "Μικροβιολογία Τροφίμων, Μεθοδολογία και τεχνικές αναλύσεων." Δίσκιμα
- Γουγουλή Μ. 2006. . "Μελέτη και μαθηματική περιγραφή της ανάπτυξης/επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* σε μίγμα παγωτού σε στατικές και δυναμικές συνθήκες ψύξης-κατάψυξης." *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Επιστήμης Και Τεχνολογίας Τροφίμων.*
- Παπαϊκονόμου Σ. 2014. "Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι του Gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*." Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

