



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Εισηγητής : Δημήτρης Μπλέντζος (15153)

Επιβλέποντες : ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα 2022

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1.Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Μπατρίνου Ανθιμία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

2.Μέλος επιτροπής

Ζουμπουλάκης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας
Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

3.Μέλος επιτροπής

Κοντελές Σπύρος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι ο αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές 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.

Δημήτρης Μπλέντζος



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1.ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	9
1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1.2.Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΙΣ ΠΕΡΑΣΜΕΝΕΣ ΔΕΚΑΕΤΙΕΣ.....	10
1.1.3.ΓΕΝΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ.....	12
1.1.4.ΚΥΡΙΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ.....	14
1.1.5.ΚΙΝΟΝΕΣ.....	18
1.1.6.ΦΛΑΒΟΝΕΣ.....	19
1.2.ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΩΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	23
1.2.1.ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ.....	25
1.2.2.ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	26
1.2.2.1.ΜΕΙΓΜΑΤΑ.....	27
1.2.2.2.ΑΛΛΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	29
1.3.ΦΥΣΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜ. ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ.....	29
1.3.1.ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΛΕΒΑΝΤΑΣ	31
1.3.2.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ,ΑΝΤΙΟΞ. ΚΑΙ ΑΝΤΙΜ. ΔΡΑΣΗΣ ΛΕΒ.....	33
1.4ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ.....	36
1.4.1.ΙΟΙ.....	39
1.4.2.ΠΡΩΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΕΛΜΙΝΘΕΣ.....	42
1.4.3.ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	44
1.5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	45
2.ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ	
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	46
2.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	48
2.2.ESCHERICHIA COLI.....	49
2.3.SALMONELLA SPP.....	49
2.4.LISTERIA MONOCYTOGENES.....	51
2.5.STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	53

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜ. ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤ. ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΑΡ....

3.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	55
3.2.ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	57
3.2.1.ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	57
3.2.2.ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	58
3.3.1.ΠΕΙΡΑΜΑ 1:ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	58
3.3.2.ΠΕΙΡΑΜΑ 2:ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟΝΛΕΒΑΝΤΑΣ ΩΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΑΡΑΓ.....	60
3.3.3.ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΠΟΛΗΣ ΩΣ ΦΥΣΙΚΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ.....	60
3.3.4.ΜΕΛΕΤΗ ΝΙΣΙΝΗΣ ΩΣ ΦΥΣΙΚΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ.....	67
3.4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : ΦΥΤΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	16
ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΠΙΝΑΚΑ 1.....	17
ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΠΙΝΑΚΑ 1.....	18
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 :ΚΥΡΙΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ.....	23
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	40
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 :ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ.....	40
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 : ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙ – HIV ΔΡΑΣΗ	41
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 : ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΑ 490 ΜΜ.....	59
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2 : ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ ΣΤΑ 490 ΜΜ ΚΑΙ % ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗΣ (ΜΟ=ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ,ΑΝΤΙΒ=ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ).....	60
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3 :% W/V ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ ESHERICHIA COLI-A ΔΟΚΙΜΗ ΚΑΙ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤ 490 ΜΜ.....	61

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4: % W/V ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>ESHERICHIA COLI</i> - Β ΔΟΚΙΜΗ ΚΑΙ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 490 MM.....	61
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5 : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> – ΔΟΚΙΜΗ Α.....	62
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6 : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> – ΔΟΚΙΜΗ Β.....	62
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7: <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> – ΔΟΚΙΜΗ Γ.....	62
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8: <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	62
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.9: <i>SALMONELLA TYPHIMIRIUM</i>	63
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.10: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΣΤΑ 490 MM ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΠΡΟΠΟΛΗ.....	65
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.11: <i>ESCHERICHIA COLI</i>	65
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.12: <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	66
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.13: <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	66
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.14: <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	67
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.15: <i>SALMONELLA TYPHMIRIUM</i>	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πτυχιακή αυτή αναλύει την αντιμικροβιακή δράση φυτικών εκχυλισμάτων. Πέρα από το θεωρητικό κομμάτι όμως, πραγματοποιείται και εργαστηριακή έρευνα της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο της μικροαραίωσης. Αρχικά, γίνεται αναφορά στην γενική ιστορία των αντιμικροβιακών ενώσεων τις περασμένες δεκαετίες και στις κύριες ομάδες αντιμικροβιακών ενώσεων από φυτά. Στη συνέχεια, υπάρχει ανάλυση των αιθέριων ελαίων ως αντιμικροβιακά στα συστήματα τροφίμων και αναφέρονται οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα αυτή. Ακόμη, γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στην λεβάντα, καθώς είναι μία από τις βασικές αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Βασικό κομμάτι αυτής της πτυχιακής, επίσης, είναι η μελέτη των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν. Έπειτα, στο ερευνητικό μέρος της πτυχιακής αυτής, γράφεται η προετοιμασία των καλλιεργειών και των φυτικών εκχυλισμάτων. Τέλος, πραγματοποιείται αναλυτική περιγραφή των πειραμάτων που έγιναν με τα συμπεράσματά τους να αναλύονται.

ABSTRACT

This dissertation analyzes the antimicrobial action of plant extracts. In addition to the theoretical part, however, laboratory research is carried out on the antimicrobial action of plant extracts by the method of microdilution. Next, there is an analysis of essential oils as antimicrobials in food systems and are reported the antimicrobials used in this research. Also, special mention is made of lavender, as it is one of the main antimicrobial substances used in the experiments. A special part of this dissertation is also the study of pathogenic microorganisms used. Then, in the research part of this dissertation, the preparation of crops and natural extracts is written. Finally, a detailed description of the experiments performed and their conclusions are analyzed.

Κεφάλαιο 1:

Μελέτη φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων

1.1.Εισαγωγή

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τις μεθόδους διάχυσης αραίωσης για τον προσδιορισμό της αντιβακτηριακής δραστηριότητας των φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων και των μειγμάτων τους. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ενός φυσικού εκχυλίσματος είναι διαθέσιμες, αλλά δεν υπάρχει τυπική διαδικασία, όπως υπάρχει στα αντιβιοτικά. Δοκιμάσαμε διαφορετικά φυσικά εκχυλίσματα, τα μείγματα τους και τα φαινοτικά οξέα σε επιλεγμένα θετικά κατά Gram (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Listeria monocytogenes*) και Gram αρνητικά με τη διάχυση του δίσκου άγαρ και με μεθόδους αραίωσης, μικροαραίωσης και μακροαραίωσης ζωμού.

Ακριβώς όπως η αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, είναι επίσης απαραίτητη για τη διαλογή νέων αντιμικροβιακών.

Φυσικά προϊόντα, είτε καθαρές ενώσεις είτε τυποποιημένα φυτικά εκχυλίσματα, παρέχουν απεριόριστες ευκαιρίες για νέα και κατάλληλα πρόσθετα αλλά και φάρμακα θεραπειών λόγω του απaráμιλλου φάσματος χημικής ποικιλομορφίας τους. Επί του παρόντος, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι διαθέσιμες για την ανίχνευση της αντιμικροβιακής τους δράσης. Εφόσον, δεν βασίζονται όλα στις ίδιες αρχές, τα αποτελέσματα που προκύπτουν επηρεάζονται όχι μόνο από την επιλεγμένη μέθοδο αλλά κι από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται με τη μέθοδο εκχύλισης ή το βαθμό της διαλυτότητας κάθε ελεγχόμενης ένωσης.

Τα συστήματα αντιμικροβιακών δοκιμών θα πρέπει ιδανικά να είναι γρήγορα, απλά, φθηνά και να υπάρχει μεγιστοποίηση της απόδοσης του μείγματος κατά σειρά για να αντιμετωπίσει έναν ποικίλο αριθμό εκχυλισμάτων και κλασμάτων.

Αυτή η μελέτη γίνεται, διότι φυσικά προϊόντα, είτε καθαρές ενώσεις, είτε τυποποιημένα φυτικά εκχυλίσματα, παρέχουν απεριόριστες ευκαιρίες για νέα και κατάλληλα πρόσθετα και φάρμακα θεραπειών λόγω του απaráμιλλου φάσματος χημικής ποικιλομορφίας τους. Οπότε μέσα από αυτή την έρευνα δίνεται η δυνατότητα της μελέτης διαφόρων αντιμικροβιακών ενώσεων. Επί του παρόντος υπάρχουν αρκετές μέθοδοι, οι οποίες είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση της αντιμικροβιακής τους δράσης. Εφόσον δεν βασίζονται όλα στις ίδιες αρχές, τα αποτελέσματα που προκύπτουν επηρεάζονται όχι μόνο από την επιλεγμένη μέθοδο, αλλά και από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται με τη μέθοδο εκχύλισης ή το βαθμό της διαλυτότητας

κάθε ελεγχόμενης ένωσης. Αρκετές αντιμικροβιακές ενώσεις χρησιμοποιούνται εύκολα σαν διαθέσιμες πηγές, όπως γεωργικές και κηπευτικές καλλιέργειες (αμπέλια, εσπεριδοειδή, λυκίσκος, μούρα, φύλλα τσαγιού) ή φαρμακευτικά φυτά.

Οι τιμές των φυσικών εκχυλισμάτων και των καθαρών φαινολικών οξέων προσδιορίστηκαν ως αξιολόγηση της αντιμικροβιακής τους δράσης έναντι επιλεγμένων παθογόνων βακτηρίων που μεταδίδονται στα τρόφιμα.

Επιπλέον, οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι χημικές ενώσεις, που υπάρχουν ή προστίθενται σε τρόφιμα που καθυστερούν την ανάπτυξη των μικροβίων ή προκαλούν μικροβιακό θάνατο. Τέλος, πρόσφατα, πολλοί ερευνητές διερεύνησαν την πιθανή χρήση ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων ως αποτελεσματικών φυσικών συντηρητικών.

Παραδοσιακά, τα ακατέργαστα εκχυλίσματα διαφορετικών τμημάτων ιατρικών φυτών, συμπεριλαμβανόμενης της ρίζας του μίσχου, των λουλουδιών, των φρούτων, και των κλαδιών, χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για τη θεραπεία ορισμένων ανθρώπινων ασθενειών. Τα φαρμακευτικά φυτά περιέχουν πολλά φυτοχημικά όπως φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, τανίνες και τερπενοειδή τα οποία διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες ορισμένων φυτικών ειδών έχουν ερευνηθεί ευρέως. Για παράδειγμα, τα ακατέργαστα εκχυλίσματα κανέλας, σκόρδου, βασιλικού, κάρυ, τζίντζερ, φασκόμυλου, μουστάρδας και άλλων βοτάνων παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η κατανόηση του μηχανισμού της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών είναι το πρώτο βήμα στη βέλτιστη χρήση αυτών των εκχυλισμάτων ως φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων για την παράταση της διάρκειας ζωής και τη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων.

Τις τελευταίες δεκαετίες υπήρξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη χρήση άφθονων, φυσικών, αντιμικροβιακών (βότανα, μπαχαρικά και φυτά). Όπως πρέπει να είναι τα αποτελέσματα από διαφορετικές μελέτες, συγκριτικά, εξετάσαμε την αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων και τα μείγματά τους με τις μεθόδους διάχυσης και αραίωσης κατά Gram – θετικά και Gram – αρνητικά βακτήρια για να προτείνουμε μία ομοιόμορφη διαδικασία ελέγχου της αντιβακτηριακής δράσης του εκχυλίσματος φυτών.

Πρόσφατα, πολλοί ερευνητές διερεύνησα την πιθανή χρήση ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων ως αποτελεσματικών φυτικών συντηρητικών. Παραδοσιακά, τα ακατέργαστα εκχυλίσματα διαφορετικών τμημάτων ιατρικών φυτών, συμπεριλαμβανόμενης της ρίζας και άλλων χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για τη θεραπεία ορισμένων ανθρώπινων ασθενειών.

1.1.2. Η ιστορία των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών τις περασμένες δεκαετίες

Η εύρεση θεραπευτικών δυνάμεων στα φυτά είναι μία αρχαία ιδέα. Άνθρωποι σε όλες τις ηπείρους έχουν εφαρμόσει κατά καιρούς καταπλάσματα και εμποτισμένες εγχύσεις εκατοντάδων, αν όχι χιλιάδων, αυτοχθόνων φυτών, που χρονολογούνται από την προϊστορία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι Νεάντερνταλ ζώντας πριν από 60.000 χρόνια στο σημερινό Ιρακ χρησιμοποιούσαν φυτά όπως π.χ αλκέα. Αυτά τα φυτά εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως στην εθνοϊατρική σε όλο τον κόσμο. Ιστορικά, θεραπευτικά αποτελέσματα έχουν αναμειχθεί και αρκετά συχνά προέκυψαν θεραπείες ή ανακούφιση από τα συμπτώματα. Σε υψηλό ποσοστό σημειώθηκαν και δηλητηριάσεις. Επί του παρόντος, το ένα τέταρτο έως το μισό όλων των φαρμακευτικών προϊόντων που διανέμονται στις Ηνωμένες Πολιτείες που έχουν ανώτερη φυτική προέλευση, τείνουν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά, καθώς έχουμε βασιστεί σε πηγές βακτηρίων και μυκητών για αυτές τις ορισμένες δραστηριότητες.

Από την έλευση των αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1950, η χρήση φυτικών παραγώγων ως αντιμικροβιακό ήταν ουσιαστικά ανύπαρκτη. Οι κλινικοί μικροβιολόγοι έχουν δύο λόγους να ενδιαφέρονται για το θέμα των αντιμικροβιακών φυτικών εκχυλισμάτων. Πρώτον, είναι πολύ πιθανό ότι αυτά τα φυτοχημικά θα βρουν τον δρόμο τους στο οπλοστάσιο των αντιμικροβιακών φαρμάκων, που συνταγογραφούνται από γιατρούς, ενώ αρκετά είναι έτοιμα να δοκιμάζονται σε ανθρώπους. Αναφέρεται ότι, κατά μέσο όρο, δύο ή τρία αντιβιοτικά που προέρχονται από μικροοργανισμούς κυκλοφορούν κάθε χρόνο (Clark, A. M. et.al, 1996).

Μετά από μία ύφεση σε αυτό το ρυθμό τις τελευταίες δεκαετίες, ο ρυθμός επιτάχυνεται και πάλι καθώς οι επιστήμονες συνειδητοποιούν ότι η αποτελεσματική διάρκεια ζωής οποιουδήποτε αντιβιοτικού είναι περιορισμένη. Παγκόσμια δαπάνη για την εύρεση νέων αντιμολυσματικών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένων των εμβολίων) αναμένεται να αυξηθεί κατά 60% από τα επίπεδα δαπανών το 1993.

Νέες πηγές, ειδικά φυτά, επίσης ερευνώνται. Δεύτερον, το κοινό συνηθειοποιεί όλο και περισσότερο τα προβλήματα με την υπερσυνταγογράφηση και την κακή χρήση των παραδοσιακών αντιβιοτικών.

Επιπλέον, πολλοί άνθρωποι ενδιαφέρονται να έχουν μεγαλύτερη αυτονομία έναντι της δικής τους ιατρικής φροντίδας. Ένα πλήθος φυτικών τροφίμων και η αυτοθεραπεία με αυτές τις ουσίες είναι κοινή. Η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων, καθώς και άλλες εναλλακτικές μορφές ιατρικών θεραπειών, απολάμβανε μεγάλη δημοτικότητα στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Νωρίτερα αυτή τη δεκαετία, περίπου το ένα τρίτο των ερωτηθέντων των κρατών των Ηνωμένων Πολιτειών χρησιμοποιούσαν τουλάχιστον μία "συμβατική" θεραπεία κατά την διάρκεια του προηγούμενου έτους. Αναφέρθηκε ότι το 1996, οι πωλήσεις βοτανικών φαρμάκων αυξήθηκαν κατά 37% σε σχέση με το 1995. Εικάζεται ότι το αμερικανικό κοινό ενδέχεται να αντέδρασε στην υπερσυνταγογράφηση

ορισμένων τοξικών φαρμάκων, όπως και οι προκάτοχοί τους το 19ο αιώνα αντέδρασαν στην υπερβολική χρήση τους. (Yankauer, A et.al ,1997).

1.1.3. Γενική ιστορία

Υπολογίζονται ότι υπάρχουν 250.000 έως 500.000 είδη φυτών στη γη. Ένα σχετικά μικρό ποσοστό (1 έως 10%) από αυτά χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα τόσο από τον άνθρωπο όσο και από άλλα είδη ζώων. Είναι πιθανό ότι ακόμη περισσότερα χρησιμοποιούνται για σκοπούς φαρμακευτικής αγωγής. Ο Ιπποκράτης (στα τέλη του πέμπτου αιώνα π.Χ) ανέφερε 300 έως 400 φαρμακευτικά φυτά. Τον πρώτο αιώνα μ.Χ, ο Διοσκουρίδης έγραψε ένα φαρμακευτικό φυτικό κατάλογο που έγινε το πρότυπο για τις σύγχρονες φαρμακοποιίες. Η Βίβλος προσφέρει περιγραφές περίπου 30 θεραπευτικών φυτών. Πράγματι, το λιβάνι και το μύρο πιθανότατα απολάμβαναν την αξία τους λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους.

Αναφέρθηκε ότι έχουν αντισηπτικές ιδιότητες, οι οποίες ήταν ομοιόμορφες και χρησιμοποιούνταν ως στοματικό διάλυμα. Η πτώση των αρχαίων πολιτισμών εμπόδισε τις δυτικές προόδους στην κατανόηση των φαρμακευτικών φυτών, με μεγάλο μέρος της τεκμηρίωσης των φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων να καταστρέφεται ή να χάνεται. Κατά τους σκοτεινούς αιώνες, ο αραβικός κόσμος συνέχισε να ανασκάπτει τα δικό του παλαιότερα έργα και να οικοδομούν πάνω τους. Φυσικά, υπήρχαν και οι ασιατικές κουλτούρες που ήταν απασχολημένες με τη σύνταξη της δικής τους φαρμακοποιίας (Stockwell, C et.al ,1988).

Στη Δύση, τα χρόνια της Αναγέννησης είδαν μία αναβίωση της αρχαίας ιατρικής, η οποία ήταν βασισμένη σε μεγάλο βαθμό σε φυτικά φάρμακα. Η ιστορία της φαρμακευτικής χρήσης φυτών στη Βόρεια Αμερική ακολουθεί δύο σκέλη. Η χρήση τους από αυτόχθονους πολιτισμούς (ιθαγενείς αμερικάνοι), που χρονολογείται από την προϊστορία και ένα "εναλλακτικό " κίνημα μεταξύ των Αμερικανών ευρωπαϊκής καταγωγής ξεκινώντας από τον 19ο αιώνα. Οι ιθαγενείς Αμερικάνοι χρησιμοποιούν φυτικά φάρμακα, τα οποία αναθεωρήθηκαν εκτενώς σε μία σειρά άρθρων. Ανέφεραν ότι έχουν χρησιμοποιηθεί 1.625 είδη φυτών από διάφορες ομάδες ιθαγενών Αμερικάνων ως φαγητό, ενώ έχουν βρεθεί και 2.564 είδη φυτών, που χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς του, αυτό φέρνει περίπου 18.000 είδη φυτών που δεν χρησιμοποιήθηκαν ούτε για φαγητό ούτε για φάρμακα. Εικασίες για το πώς και γιατί επιλεγμένος αριθμός φυτικών ειδών χρησιμοποιήθηκε για κάθε τρόφιμο ή ναρκωτικό είναι συναρπαστικό αλλά εκτός του πεδίου αυτής της αναθεώρησης.

Μεταξύ των Ευρωπαίων που ζουν στον Νέο Κόσμο, η χρήση των βοτανικών ήταν μία αντίδραση ενάντια στα επεμβατικά ή τοξικά κύρια ρεύματα ιατρικών πρακτικών της εποχής (Klink, B et.al ,1997).

Ένας άλλος ερευνητής, σημείωσε ότι οι ιατρικές θεραπείες του 1800 μπορεί να είναι επικίνδυνες και αναποτελεσματικές. Τα παραδείγματα περιλαμβάνουν τη χρήση λουτρών υδραργύρου στα "κουρεία" του Λονδίνου για τη θεραπεία της σύφιλης και επικίνδυνων παραισθησιογόνων ως "θεραπεία" της φυματίωσης. Το 1861 αυτός ο ερευνητής έγραψε << Αν μπορούσε όλο το υλικό της ιατρικής που χρησιμοποιείται τώρα να βυθιστεί στον βυθό της θάλασσας, θα ήταν πολύ καλύτερο για την ανθρωπότητα και χειρότερο για τα ψάρια >>. Το 1887, εναλλακτικοί επαγγελματίες συνέταξαν τους δικούς τους καταλόγους, κυρίως της Ομοιοπαθητικής ή Φαρμακοποιίας των Ηνωμένων Πολιτειών (Holmes, O. W et.al ,1861).

Η κύρια ιατρική γίνεται όλο και πιο δεκτική στη χρήση των αντιμικροβιακών και άλλων φαρμάκων που προέρχονται από φυτά, καθώς τα παραδοσιακά αντιβιοτικά (προϊόντα μικροοργανισμών ή τα συνθετικά παράγωγά τους) καθίστανται αναποτελεσματικά και ως νέα, ιδιαίτερα ιογενείς, οι ασθένειες παραμένουν ανίατες σε αυτόν τον τύπο φαρμάκων.

Άλλος κινητήριος παράγοντας για το ανανεωμένο ενδιαφέρον για τα φυτικά αντιμικροβιακά τα τελευταία 20 χρόνια ήταν ο ταχύς ρυθμός της εξαφάνισης των (φυτικών) ειδών.

Υπάρχει μία αίσθηση ανάμεσα στα φυσικά προϊόντα και τους χημικούς και τους μικροβιολόγους ότι το πλήθος των δυνητικά χρήσιμων φυτοχημικών δομών που θα μπορούσαν να συντεθούν με χημικό μέγεθος κινδυνεύει να χαθεί ανεπανόρθωτα. Εκεί είναι ένας επιστημονικός κλάδος γνωστός ως εθνοβοτανική, στόχος του οποίου είναι να αξιοποιήσει την εντυπωσιακή σειρά γνώσεων που συγκεντρώνουν οι αυτόχθονες πληθυσμοί για τα φυτά και τα ζωϊκά προϊόντα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διατήρηση της υγείας.

Τέλος, η επικράτηση του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) έχει ωθήσει την εντατική έρευνα για τα φυτικά παράγωγα που μπορεί να είναι αποτελεσματικά, ειδικά για χρήση σε υπανάπτυκτες χώρες με μικρή πρόσβαση σε δυτικά φάρμακα. Γίνεται περιγραφή της τρέχουσας κατάστασης των φυτικών αντιμικροβιακών στις Ηνωμένες Πολιτείες, που κυμαίνονται από εκχυλίσματα συνήθως σε χρήση, σε μεγάλο βαθμό από την λαϊκή κοινότητα, σε ουσίες που εξετάζονται και ελέγχονται από ερευνητές και κλινικούς γιατρούς. Επίσης, ενώσεις δυνητικά αποτελεσματικές στη θεραπεία λοιμώξεων από τον HIV, οι οποίες αναζητούνται ευρέως για πιθανή χρήση στη Βόρεια Αμερική, αντιμετωπίζονται επίσης. Γίνεται επίσης, προσπάθεια περίληψης της τρέχουσας κατάστασης με γνώσεις σχετικά απροσδιόριστων βοτάνων, αφού οι κλινικοί γιατροί σε αυτή τη χώρα θα συναντήσουν τους ασθενείς που κάνουν χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες. Αυτή η κριτική δεν αντιμετωπίζει την παγκόσμια χρήση των φυτών ως φαρμακευτικά προϊόντα, αλλά,

μάλλον επικεντρώνεται στα φυτά και τα εκχυλίσματά τους που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στη Βόρεια Αμερική (De Clercq, E et.al,1995).

Μόνο φυτοχημικά έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντιμολυσματικές ιδιότητες εξετάζοντας τα. Τα πολλά φυτά που χρησιμοποιούνται για το ανοσοποιητικό σύστημα ενισχύοντας τα, δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής αυτής της αναθεώρησης.

1.1.4.Κύριες ομάδες αντιμικροβιακών ενώσεων από φυτά

Τα φυτά έχουν μία σχεδόν απεριόριστη ικανότητα να συνθέτουν αρωματικές ουσίες, οι περισσότερες από τις οποίες είναι φαινόλες ή τα υποκατεστημένα τους με τα παράγωγα του οξυγόνου. Οι περισσότεροι είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 12.000, αριθμός που υπολογίζεται να είναι λιγότερο από το 10% συνόλου. Σε πολλές περιπτώσεις αυτές οι ουσίες χρησιμεύουν ως μηχανισμοί άμυνας των φυτών κατά της θήρευσης από μικροοργανισμούς, έντομα και φυτοφάγα ζώα. Κάποια, όπως π.χ τερπενοειδή, δίνουν στα φυτά τις μυρωδιές τους. Άλλα (κινόνες και τανίνες) είναι υπεύθυνα για τη χρωστική των φυτών. Πολλές ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη γεύση των φυτών (π.χ το τερπενοειδές, καψαϊκίνη από πιπεριές τσίλι), και μερικά από τα ίδια βότανα και μπαχαρικά που χρησιμοποιούνται από τους ανθρώπους για να καρικεύουν τα τρόφιμα αποδίδουν χρήσιμες φαρμακευτικές ενώσεις (ΠΙΝΑΚΑΣ 1).

Τα χρήσιμα αντιμικροβιακά φυτοχημικά μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες, που περιγράφονται παρακάτω και συνοψίζονται στον Πίνακα 2 (Schultes, R. E. et.al.1978).

Μερικά από τα πιο απλά και βιοενεργά φυτοχημικά αποτελούνται από έναν μόνο υποκατεστημένο φαινολικό δακτύλιο. Το κινναμικό και το καφεϊκό οξύ είναι κοινά αντιπροσωπευτικά μιας ευρείας ομάδας ενώσεων που προέρχονται από φαινυλοπροπάνιο που βρίσκονται στην υψηλότερη κατάσταση οξειδωσης.

Τα κοινά βότανα εστραγκόν και θυμαριού περιέχουν και τα δύο καφεϊκό οξύ, το οποίο είναι αποτελεσματικό κατά των ιών, των βακτηρίων και των μυκητών.

Η κατεχόλη και η πυρογαλλόλη είναι και οι δύο υδροξυλιώμενες φαινόλες, οι οποίες αποδεικνύονται τοξικές για τους μικροοργανισμούς. Η κατεχόλη έχει δύο ομάδες υδροξειλίου και η πυρογαλλόλη έχει τρεις. Οι ιστότοποι και ο αριθμός των ομάδων υδροξειλίου στην ομάδα φαινόλης πιστεύεται ότι σχετίζονται με την τοξικότητα τους στους μικροοργανισμούς, με στοιχεία να δείχνουν ότι η αυξημένη υδροξυλίωση οδηγεί σε αυξημένη τοξικότητα. Επιπλέον, ορισμένοι συγγραφείς έχουν βρει ότι οξειδώνονται περισσότερο οι φαινόλες και είναι πιο ανασταλτικές. Οι μηχανισμοί θεωρούνται ότι ευθύνονται για τη φαινολική τοξικότητα σε μικροοργανισμούς που περιλαμβάνουν την αναστολή ενζύμων από τις οξειδωμένες ενώσεις, πιθανώς μέσω αντίδρασης με σουλφυδρυλικές ομάδες ή μέσω

πιο μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με τις πρωτεΐνες. Φαινολικές ενώσεις με πλευρική αλυσίδα C3 στο χαμηλότερο επίπεδο οξείδωσης που δεν περιέχουν οξυγόνο ταξινομούνται ως αιθέρια έλαια και συχνά αναφέρονται και ως αντιμικροβιακά (Thomson, W. A. R.et.al ,1978).

Η ευγενόλη είναι ένας καλά χαρακτηρισμένος εκπρόσωπος που βρίσκεται στο φαρυφαλέλαιο. Η ευγενόλη θεωρείται βακτηριοστατική κατά των δύο μυκητών και βακτηριών.

Πίνακας 1. Φυτά που περιέχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα

TABLE 1. Plants containing antimicrobial activity^a

Common name	Scientific name	Compound	Class	Activity ^d	Relative toxicity ^b	Reference(s) ^f
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	?		Gram-positive organisms	2.3	
Allspice	<i>Pimenta dioica</i>	Eugenol	Essential oil	General	2.5	
Aloe	<i>Aloe barbadensis</i> , <i>Aloe vera</i>	Latex	Complex mixture	<i>Corynebacterium</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>S. aureus</i>	2.7	136
Apple	<i>Malus sylvestris</i>	Phloretin	Flavonoid derivative	General	3.0	101
Ashwagandha	<i>Withania somniferum</i>	Withafarin A	Lactone	Bacteria, fungi	0.0	
Aveloz	<i>Euphorbia tirucalli</i>	?		<i>S. aureus</i>	0.0	
Bael tree	<i>Aegle marmelos</i>	Essential oil	Terpenoid	Fungi		179
Balsam pear	<i>Momordica charantia</i>	?		General	1.0	
Barberry	<i>Berberis vulgaris</i>	Berberine	Alkaloid	Bacteria, protozoa	2.0	140, 163
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	Essential oils	Terpenoids	<i>Salmonella</i> , bacteria	2.5	241
Bay	<i>Laurus nobilis</i>	Essential oils	Terpenoids	Bacteria, fungi	0.7	
Betel pepper	<i>Piper betel</i>	Catechols, eugenol	Essential oils	General	1.0	
Black pepper	<i>Piper nigrum</i>	Piperine	Alkaloid	Fungi, <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>	1.0	78
Blueberry	<i>Vaccinium</i> spp.	Fructose	Monosaccharide	<i>E. coli</i>		158
Brazilian pepper tree	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Terebinthone	Terpenoids	General	1.0	
Buchu	<i>Barosma setulina</i>	Essential oil	Terpenoid	General	2.0	
Burdock	<i>Arcium lappa</i>		Polyacetylene, tannins, terpenoids	Bacteria, fungi, viruses	2.3	
Buttercup	<i>Ranunculus bulbosus</i>	Protoanemonin	Lactone	General	2.0	
Caraway	<i>Carum carvi</i>		Coumarins	Bacteria, fungi, viruses		24, 26, 83, 193
Cascara sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Tannins	Polyphenols Anthraquinone	Viruses, bacteria, fungi	1.0	
Cashew	<i>Anacardium pulsatilla</i>	Salicylic acids	Polyphenols	<i>P. acnes</i> Bacteria, fungi		91
Castor bean	<i>Ricinus communis</i>	?		General	0.0	
Ceylon cinnamon	<i>Cinnamomum verum</i>	Essential oils, others	Terpenoids, tannins	General	2.0	
Chamomile	<i>Matricaria chamomilla</i>	Anthemic acid	Phenolic acid	<i>M. tuberculosis</i> , <i>S. typhi-</i> <i>murium</i> , <i>S. aureus</i> , helminths	2.3	26, 83, 193
Chapparral	<i>Larrea tridentata</i>	—	Coumarins Lignan	Viruses Skin bacteria		24
Chili peppers, paprika	<i>Capsicum annuum</i>	Nordihydroguai- aretic acid Capsaicin	Terpenoid	Bacteria	2.0	42, 107
Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	Terpenoid	General	1.7	
Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocaine	Alkaloid	Gram-negative and -positive cocci	0.5	
Cockle	<i>Agrostemma githago</i>	?		General	1.0	
Coltsfoot	<i>Tussilago farfara</i>	?		General	2.0	
Coriander, cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	?		Bacteria, fungi		
Cranberry	<i>Vaccinium</i> spp.	Fructose Other	Monosaccharide	Bacteria		17, 158, 159
Dandelion	<i>Taraxacum officinale</i>	?		<i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>	2.7	
Dill	<i>Anethum graveolens</i>	Essential oil	Terpenoid	Bacteria	3.0	
Echinacea	<i>Echinaceae</i> <i>angustifolia</i>	?		General		153
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tannin —	Polyphenol Terpenoid	Bacteria, viruses	1.5	
Fava bean	<i>Vicia faba</i>	Fabatin	Thionin	Bacteria		
Gamboge	<i>Garcinia hanburyi</i>		Resin	General	0.5	
Garlic	<i>Allium sativum</i>	Allicin, ajoene	Sulfoxide Sulfated terpenoids Saponins	General		150, 187, 188 250
Ginseng	<i>Panax notoginseng</i>			<i>E. coli</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Tricho-</i> <i>phyton</i>	2.7	
Glory lily	<i>Gloriosa superba</i>	Colchicine	Alkaloid	General	0.0	
Goldenseal	<i>Hydrastis canadensis</i>	Berberine, hydrastine	Alkaloids	Bacteria, <i>Giardia duodenale</i> , trypanosomes Plasmodia	2.0	73 163
Gotu kola	<i>Centella asiatica</i>	Asiatococside	Terpenoid	<i>M. leprae</i>	1.7	
Grapefruit peel	<i>Citrus paradisa</i>		Terpenoid	Fungi		209

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Common name	Scientific name	Compound	Class	Activity ^d	Relative toxicity ^b	Reference(s) ^f
Green tea	<i>Camellia sinensis</i>	Catechin	Flavonoid	General	2.0	
				<i>Shigella</i>		235
				<i>Vibrio</i>		226
				<i>S. mutans</i>		166
				Viruses		113
Harmel, rue	<i>Peganum harmala</i>	?		Bacteria, fungi	1.0	
Hemp	<i>Cannabis sativa</i>	β -Reserecyclic acid	Organic acid	Bacteria and viruses	1.0	
Henna	<i>Lawsonia inermis</i>	Gallic acid	Phenolic	<i>S. aureus</i>	1.5	
Hops	<i>Humulus lupulus</i>	Lupulone, humulone	Phenolic acids	General	2.3	
		—	(Hemi)terpenoids			
Horseradish	<i>Armoracia rusticana</i>		Terpenoids	General		
Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	—	Terpenoids	Viruses		
(Japanese) herb	<i>Rabdosa trichocarpa</i>	Trichorabdol A	Terpene	<i>Helicobacter pylori</i>		108
Lantana	<i>Lantana camara</i>	?		General	1.0	
—	<i>Lawsonia</i>	Lawsonone	Quinone	<i>M. tuberculosis</i>	—	
Lavender-cotton	<i>Santolina chamaecyparissus</i>	?		Gram-positive bacteria, <i>Candida</i>	1.0	213
Legume (West Africa)	<i>Milletia thonningii</i>	Alpinumisoflavone	Flavone	<i>Schistosoma</i>		175
Lemon balm	<i>Melissa officinalis</i>	Tannins	Polyphenols	Viruses		245
Lemon verbena	<i>Aloysia triphylla</i>	Essential oil	Terpenoid	<i>Ascaris</i>	1.5	
			?	<i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i>		
Licorice	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glabrol	Phenolic alcohol	<i>S. aureus</i> , <i>M. tuberculosis</i>	2.0	
Lucky nut, yellow	<i>Thevetia peruviana</i>	?		<i>Plasmodium</i>	0.0	
Mace, nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>	?		General	1.5	
Marigold	<i>Calendula officinalis</i>	?		Bacteria	2.7	
Mesquite	<i>Prosopis juliflora</i>	?		General	1.5	
Mountain tobacco	<i>Arnica montana</i>	Helanins	Lactones	General	2.0	
Oak	<i>Quercus rubra</i>	Tannins	Polyphenols			
		Quercetin (available commercially)	Flavonoid			113
Olive oil	<i>Olea europaea</i>	Hexanal	Aldehyde	General		120
Onion	<i>Allium cepa</i>	Allicin	Sulfoxide	Bacteria, <i>Candida</i>		239
Orange peel	<i>Citrus sinensis</i>	?	Terpenoid	Fungi		209
Oregon grape	<i>Mahonia aquifolia</i>	Berberine	Alkaloid	<i>Plasmodium</i>	2.0	163
				Trypanosomes, general		73
Pao d'arco	<i>Tabebuia</i>	Sesquiterpenes	Terpenoids	Fungi	1.0	
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Latex	Mix of terpenoids, organic acids, alkaloids	General	3.0	34, 168, 191
Pasque-flower	<i>Anemone pulsatilla</i>	Anemonins	Lactone	Bacteria	0.5	
Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	Menthol	Terpenoid	General		
Periwinkle	<i>Vinca minor</i>	Reserpine	Alkaloid	General	1.5	
Peyote	<i>Lophophora williamsii</i>	Mescaline	Alkaloid	General	1.5	
Poinsettia	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	?		General	0.0	
Poppy	<i>Papaver somniferum</i>	Opium	Alkaloids and others	General	0.5	
Potato	<i>Solanum tuberosum</i>	?		Bacteria, fungi	2.0	
Prostrate knotweed	<i>Polygonum aviculare</i>	?		General	2.0	
Purple prairie clover	<i>Petalostemum</i>	Petalostemumol	Flavonol	Bacteria, fungi		100
Quinine	<i>Cinchona</i> sp.	Quinine	Alkaloid	<i>Plasmodium</i> spp.	2.0	
Rauwolfia, chandra	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Reserpine	Alkaloid	General	1.0	
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Essential oil	Terpenoid	General	2.3	
Sainfoin	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Tannins	Polyphenols	Ruminal bacteria		105
Sassafras	<i>Sassafras albidum</i>	?		Helminths	2.0	
Savory	<i>Satureja montana</i>	Carvacrol	Terpenoid	General	2.0	6
Senna	<i>Cassia angustifolia</i>	Rhein	Anthraquinone	<i>S. aureus</i>	2.0	
Smooth hydrangea, seven barks	<i>Hydrangea arborescens</i>	?		General	2.3	
Snakeplant	<i>Rivea corymbosa</i>	?		General	1.0	
St. John's wort	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin, others	Anthraquinone	General	1.7	
Sweet flag, calamus	<i>Acorus calamus</i>	?		Enteric bacteria	0.7	
Tansy	<i>Tanacetum vulgare</i>	Essential oils	Terpenoid	Helminths, bacteria	2.0	
Tarragon	<i>Artemisia dracunculus</i>	Caffeic acids, tannins	Terpenoid	Viruses, helminths	2.5	
			Polyphenols			245

TABLE 1—Continued

Common name	Scientific name	Compound	Class	Activity ^d	Relative toxicity ^b	Reference(s) ^f
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Caffeic acid Thymol Tannins —	Terpenoid Phenolic alcohol Polyphenols Flavones	Viruses, bacteria, fungi	2.5	
Tree bard	<i>Podocarpus nagi</i>	Totarol	Flavonol	<i>P. acnes</i> , other gram-positive bacteria		123
		Nagilactone	Lactone	Fungi		121 122
Tua-Tua	<i>Jatropha gossypifolia</i>	?		General	0.0	
Turmeric	<i>Curcuma longa</i>	Curcumin Turmeric oil	Terpenoids	Bacteria, protozoa		14
Valerian	<i>Valeriana officinalis</i>	Essential oil	Terpenoid	General	2.7	
Willow	<i>Salix alba</i>	Salicin Tannins Essential oil	Phenolic glucoside Polyphenols Terpenoid			
Wintergreen	<i>Gaultheria procumbens</i>	Tannins	Polyphenols	General	1.0	
Woodruff	<i>Galium odoratum</i>	—	Coumarin	General Viruses	3.0	26, 83, 193 24
Yarrow	<i>Achillea millefolium</i>	?		Viruses, helminths	2.3	
Yellow dock	<i>Rumex crispus</i>	?		<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i>	1.0	

1.1.5.Κινόνες

Οι κινόνες είναι αρωματικοί δακτύλιοι με δύο κετόνες αντικαταστάτες. Είναι πανταχού παρόντα στη φύση τους και είναι χαρακτηριστικά εξαιρετικά αντιδραστικά. Αυτές οι ενώσεις καθώς είναι έγχρωμες, είναι υπεύθυνες για το μαύρο χρώμα σε κομμένα ή σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά και αποτελούν ενδιάμεσο μονοπάτι σύνθεσης μελατίνης στο ανθρώπινο δέρμα. Η παρουσία τους στη χέννα προσδίδει στο υλικό τις ιδιότητες βαφής του (Schmidt, H et.al, 1988).

Η εναλλαγή μεταξύ διφαινόλης (ή υδροκινόνης) και δικετόνης (ή κινόνης) εμφανίζεται εύκολα μέσω οξειδωσης και αναγωγής των αντιδράσεων. Το μεμονωμένο δυναμικό οξειδοαναγωγής του συγκεκριμένου ζεύγους υδροκινόνης είναι πολύ σημαντικό σε πολλά βιολογικά συστήματα και μαρτυρά τον ρόλο της ουβικινόνης (στο ένζυμο Q) στα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων των θηλαστικών.

Η βιταμίνη K είναι ένα σύμπλεγμα ναφθοκινόνης. Η αντιαμορραγική του δράση μπορεί να σχετίζεται με την ευκολία της οξειδωσης στους ιστούς του σώματος. Υδροξυλιώμενα αμινοξύ, που μπορούν να μετατραπούν σε κινόνες παρουσία κατάλληλων ενζύμων, όπως μία πολυφαινολοοξειδάση. Η αντίδραση για την μετατροπή της τυροσίνης σε κινόνη φαίνεται στο σύκο (Harris, R. S. 1963).

Εκτός από την παρόχη μιας πηγής σταθερών ελεύθερων ριζών, οι κινόνες είναι γνωστό ότι συμπλέκονται μη αναστρέψιμα με πυρηνόφιλα αμινοξέα σε πρωτεΐνες, που συχνά οδηγούν σε

αδρανοποίηση της πρωτεΐνης και σε απώλεια της λειτουργικότητας. Για το λόγο αυτό, οι δυνατότητες του φάσματος των αντιμικροβιακών επιδράσεων της κινόνης είναι μεγάλες .

Πιθανή πίσσα που παίρνει στο μικροβιακό κύτταρο είναι επιφανειακά εκτεθειμένη με προσκολλητίνες, με το κύτταρο των πολυπεπτιδίων του τοιχώματος και ενζύμων που συνδέονται με τη μεμβράνη. Κινόνες μπορεί, επίσης, να καταστήσουν τα υποστρώματα μη διαθέσιμα στον μικροοργανισμό.

Όπως συμβαίνει με όλα τα φυτικής προέλευσης αντιμικροβιακά, οι πιθανές τοξικές επιδράσεις των κινόνων πρέπει να εξεταστούν διεξοδικά.

Έχουν υπάρξει περιγραφές μίας ανθρακινόνης πάνω σ' ένα φυτό που λέγεται ιταλική κασσία, ένα πακιστανικό δέντρο, το οποίο ήταν βακτηριοκτόνο για τον *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphtherium*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas pseudomalliae*. Η υπερικίνη, μία ανθρακινόνη από το υπερικό (*Hypericum perforatum*), έχει λάβει μεγάλη προσοχή στο δημοφιλή τύπο πρόσφατα ως αντικαταθλιπτικό και το 1985 αναφέρθηκε ότι είχε γενικές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Kazmi et al).

1.1.6. Φλαβόνες

Οι φλαβόνες είναι φαινολικές δομές που περιέχουν μία ομάδα καρβονυλίου (σε αντίθεση με τα δύο καρβονύλια σε κινόνες). Η προσθήκη μίας 3 – υδροξυλικής ομάδας αποδίδει μία φλαβανόλη. Τα φλεβανοειδή είναι, επίσης, υδροξυλιώμενες φαινολικές ουσίες, αλλά εμφανίζονται ως μονάδα C6 – C3 συνδεδεμένη σε ένα αρωματικό δαχτυλίδι. Δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι συντίθενται από φυτά ως απόκριση σε μικροβιακή μόλυνση, δεν θα έπρεπε να αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι έχουν βρεθεί αποτελεσματικές αντιμικροβιακές ουσίες ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Η δραστηριότητα τους οφείλεται πιθανώς στην ικανότητά τους να συνθέτουν με εξωκυτταρικές και διαλυτές πρωτεΐνες και να δημιουργούν συμπλέξεις με βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα, όπως περιγράφεται παραπάνω για τις κινόνες. Τα λιπόφιλα φλαβονοειδή μπορούν επίσης να διαταράξουν τις μικροβιακές μεμβράνες (Tsuchiya, H., M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T. Tanaka, and M. Iinuma. 1996).

Οι κατεχίνες αδρανοποίησαν την τοξίνη της χολέρας και ανέστειλαν απομονωμένες βακτηριακές γλυκοξυλοτρανσφεράσες στο *S.aureus*, πιθανώς λόγω συμπλοκοποιητικών δραστηριοτήτων που περιγράφονται για κινόνες παραπάνω. Αυτή η τελευταία δραστηριότητα επιβεβαιώθηκε σε δοκιμές συμβατικών αρουραίων. Όταν οι αρουραίοι τράφηκαν με διαίτα που περιείχε 0,1 % κατεχίνες τσαγιού, η τερηδόνα (που προκαλείται από *S.mutans*) μειώθηκε κατά 40 % (Ooshima, T., T. Minami, W. Aono, A. Izumitani, S. Sobue, T. Fujiwara, S. Kawabata, and S. Hamada. 1993).

Οι φλαβονοειδείς ενώσεις επιδεικνύουν ανασταλτικά αποτελέσματα έναντι των πολλαπλών ιών. Πολυάριθμες μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αποτελεσματικότητα φλαβονοειδών όπως η γλυκυριζίνη (από γλυκόριζα) και η χρυσίνη έναντι του HIV.

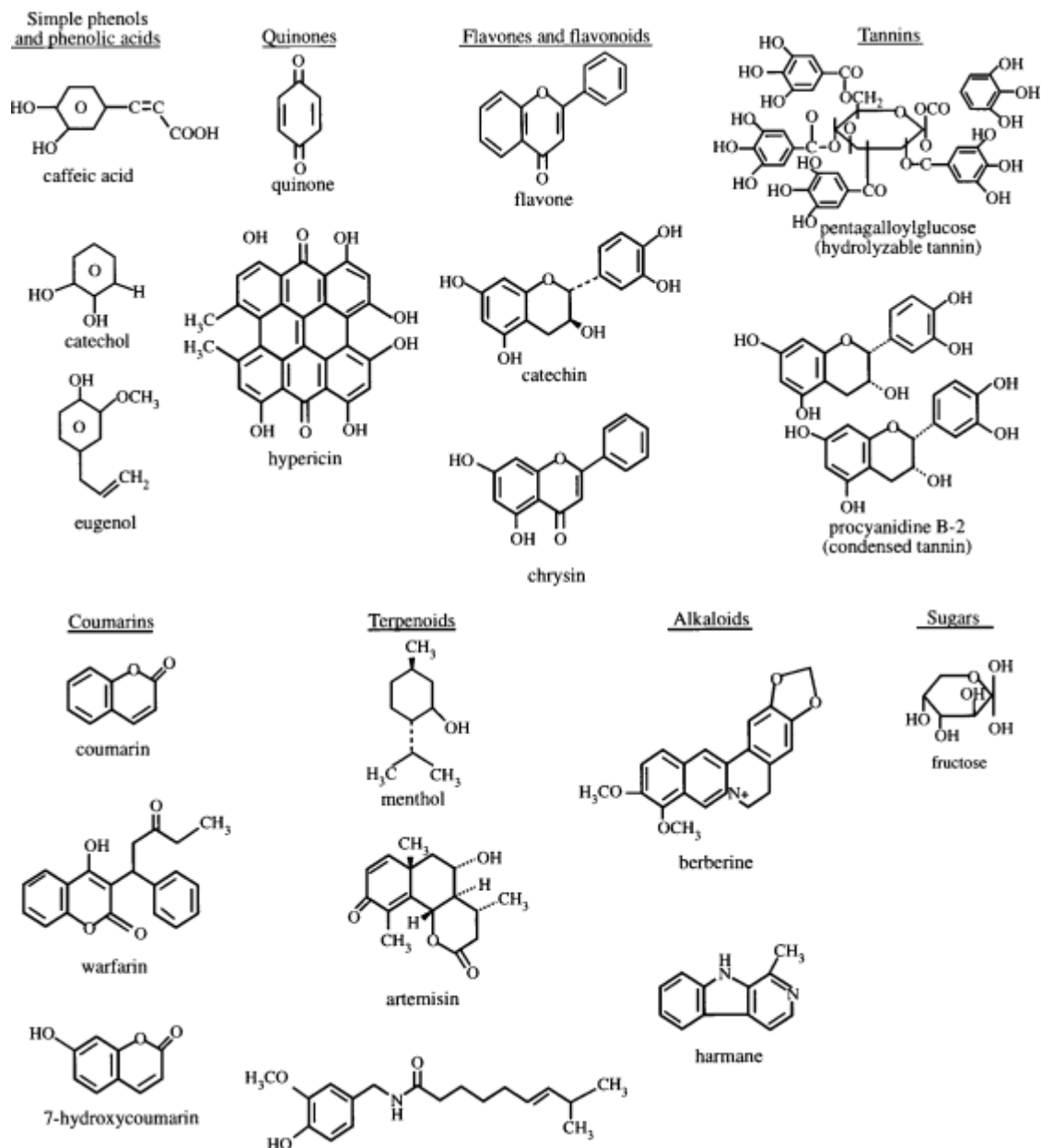
Περισσότερες από μία μελέτες έχουν βρει ότι τα παράγωγα φλαβονών είναι ανασταλτικά στον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV). Ακόμη γίνεται αναφορά σε μία περίληψη των δραστηριοτήτων και των τρόπων της δράσης της κερκετίνης, της ναρινγίνης, της εσπερετίνης και της κατεχίνης στις μονοστιβάδες κυτταροκαλλιέργειας. Ενώ η ναρινγίνη δεν ήταν ανασταλτική στον ιό του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1), στον ιό της πολιομυελίτιδας τύπου 1, στον ιό της παραγρίπης τύπου 3 ή RSV, τα άλλα τρία φλαβονοειδή ήταν αποτελεσματικά με διάφορους τρόπους. Η εσπερετίνη μείωσε την ενδοκυτταρική αντιγραφή και των τεσσάρων ιών. Η κατεχίνη ανέστειλε τη μολυσματικότητα αλλά όχι την ενδοκυτταρική αντιγραφή του RSV και του HSV-1, ενώ η κερκετίνη ήταν παγκοσμίως αποτελεσματική στη μείωση της μολυσματικότητας. Οι μικρές διαφορές στις δοκιμές που γίνονται στις ενώσεις είναι κρίσιμες για τη δραστηριότητα τους και επίσης υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα σε αρκετά φυτικά παράγωγα όπως το χαμηλό τους τοξικό δυναμικό.

Η μέση δυτική καθημερινή διατροφή περιέχει περίπου 1 γραμμάριο μικτά φλαβονοειδή. Οι φαρμακολογικά ενεργές συγκεντρώσεις δεν είναι πιθανό να είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο ξενιστή (Kuhnau, J. 1976).

Μία ισοφλαβόνη που βρίσκεται σε ένα όσπριο της Δυτικής Αφρικής, αποτρέπει τη σχιστοσωμική ή μόλυνση όταν εφαρμόζεται τοπικά. Η φλορετίνη, που βρίσκεται σε ορισμένους ορούς μήλων, μπορεί να έχει δράση έναντι διαφόρων μικροοργανισμών. Η τριχυδροξυφλαβόνη, η οποία προέρχεται από το πολυετές βότανο *Helichrysum aureonitens*, φαίνεται να είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη ένωση, καθώς έχει δείξει δράση ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα θετικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και μύκητες και ιούς, ιδιαίτερα τον ιό HSV-1 και τον ιό coxsackie τύπου B (Meyer, J. J. M., A. J. Afolayan, M. B. Taylor, and D. Erasmus. 1997).

Οριοθέτηση του πιθανού μηχανισμού δράσης των φλαβονών και τα φλαβονοειδή παρεμποδίζεται από αντικρουόμενα ευρήματα. Φλαβονοειδή χωρίς υδροξυλομάδες στους β-δακτυλίους τους είναι πιο ενεργά έναντι των μικροοργανισμών από ότι είναι εκείνοι με τις ομάδες 2 OH. Αυτό το εύρημα υποστηρίζει την ιδέα ότι ο μικροβιακός τους στόχος είναι η μεμβράνη. Οι λιπόφιλες ενώσεις θα ήταν πιο διασπαστικές αυτής της δομής. Ωστόσο, αρκετοί συγγραφείς έχουν επίσης βρει το αντίθετο αποτέλεσμα δηλαδή όσο περισσότερη υδροξυλίωση, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιμικροβιακή δράση. Αυτό το τελευταίο εύρημα αντανάκλα το παρόμοιο αποτέλεσμα για τα απλά φαινολικά. Είναι ασφαλές να το πούμε αυτό, διότι δεν υπάρχει σαφής προβλεψιμότητα για τον βαθμό υδροξυλίωσης και τοξικότητας στους μικροοργανισμούς.

Εικόνα 1.1.6. Δομές κοινών αντιμικροβιακών χημικών φυτών (Cowan, Marjorie Murphyet.al).



Οι κατεχίνες, είναι η μορφή της μονάδας C3 σε φλαβονοειδείς ενώσεις, που αξίζουν ιδιαίτερης αναφοράς. Αυτά τα φλεβανοειδή έχουν ερευνηθεί εκτενώς λόγω της εμφάνισής τους στο πράσινο τσάι. Παρατηρήθηκε πριν από λίγο καιρό ότι στο τσάι ασκείται αντιμικροβιακή δράση και ότι περιέχει μείγμα ενώσεων κατεχίνης. Αυτές οι ενώσεις ανέστειλαν κάποιους μικροοργανισμούς όπως *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* και άλλα βακτήρια και μικροοργανισμούς. (Sato, M., S. Fujiwara, H. Tsuchiya, T. Fujii, M. Inuma, H. Tosa, and Y. Ohkawa. 1996).

Οι τανίνες το λεγόμενο " Tannin " είναι ένα γενικό περιγραφικό όνομα για μια ομάδα από πολυμερείς φαινολικές ουσίες ικανές να μαυρίζουν δέρμα ή να δημιουργούν καθίζηση της ζελατίνης από το διάλυμα, μία ιδιότητα γνωστή ως στιπτικότητας (astrin gency).Τα μοριακά τους βάρη κυμαίνονται από 500 έως 3.000 και βρίσκονται σχεδόν σε κάθε μέρος του φυτού :φλοιός, ξύλο, φύλλα, καρποί και ρίζες. Χωρίζονται στα δύο οι ομάδες υδρολυόμενες και συμπηκνωμένες τανίνες. Οι υδρολύσιμες τανίνες βασίζονται στο γαλλικό οξύ, συνήθως ως πολλαπλοί εστέρες με D-γλυκόζη, ενώ οι πολυάριθμες συμπηκνωμένες τανίνες(συχνά ονομάζονται προανθοκυανιδίνες),που προέρχονται από φλαβονοειδή μονομερή. Οι τανίνες μπορούν να σχηματιστούν με πολυμερισμό μονάδων κινόνης.

Αυτή η ομάδα ενώσεων έχει λάβει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια, διότι η κατανάλωση τανινών περιέχουν άμεση αδρανοποίηση των μικροοργανισμών: οι χαμηλές συγκεντρώσεις τανίνης τροποποιούν τη μορφολογία των βλαστικών σωληνών. Οι τανίνες στα φυτά αναστέλλουν την ανάπτυξη των εντόμων και διαταράσσουν τα πεπτικά συμβάντα σε μηρυκαστικά ζώα (Butler, L. G. 1988).

Έχουν επανεξεταστεί οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των τανινών το 1991. Υπήρξαν 33 μελέτες που είχαν τεκμηριώσει τις ανασταλτικές δραστηριότητες των τανινών μέχρι εκείνο το σημείο. Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, οι τανίνες μπορεί να είναι τοξικές για τους νηματώδεις μύκητες, ζυμομύκητες και βακτήρια. Οι συμπηκνωμένες τανίνες έχουν προσδιοριστεί να δεσμεύουν τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, του μηρυκαστικού, εμποδίζοντας την ανάπτυξη και τη δραστικότητα της πρωτεάσης. Αν και αυτό είναι ακόμα εικαστικό, οι τανίνες θεωρούνται τουλάχιστον εν μέρει υπεύθυνες για την αντιβιοτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων του φλοιού που βρέθηκε στο Νεπάλ(Kakiuchi, N., M. Hattori, and T. Namba. 1985).

Οι κουμαρίνες είναι φαινολικές ουσίες από συντηγμένους δακτυλίους βενζολίου και α-πυρόνης. Είναι υπεύθυνοι για τη χαρακτηριστική μυρωδιά του σανού. Αρκετές άλλες κουμαρίνες έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ένας άλλος διακεκριμένος επιστήμονας ο κύριος Thornes, που εργάστηκε σ' ένα νοσοκομείο της Βοστώνης, το 1954 αναζήτησε έναν παράγοντα για τη θεραπεία της κολπικής κατιντίασης στις έγκυες ασθενείς του. Η κουμαρίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει την *Candida albicans*.

Κατά την διάρκεια των επακόλουθων δοκιμών σε κουνέλια, η παροχή νερού δόθηκε κατά λάθος σε όλα τα ζώα στην ερευνητική εγκατάσταση και ανακαλύφθηκε ότι ήταν ισχυρός αντισυλληπτικός παράγοντας, καθώς όταν ξεκίνησαν τα προγράμματα αναπαραγωγής αποτύγχαναν. Οι αστρογονικές επιδράσεις του περιγράφηκαν αργότερα.

Ως ομάδα, οι κουμαρίνες έχουν βρεθεί ότι διεγείρουν τα μακροφάγα, τα οποία θα μπορούσαν να έχουν έμμεση αρνητική επίδραση στις λοιμώξεις. Πιο συγκεκριμένα, η κουμαρίνη έχει

χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη των υποτροπών του έρπητα που προκαλούνται από τον HSV-1 στους ανθρώπους, αλλά βρέθηκε αναποτελεσματικό κατά της λέπρας. (Weinmann, I. 1997).

Πίνακας 2.Κύριες ενώσεις αντιμικροβιακών ενώσεων από φυτά

TABLE 2. Major classes of antimicrobial compounds from plants

Class	Subclass	Example(s)	Mechanism	Reference(s)	
Phenolics	Simple phenols	Catechol	Substrate deprivation	174	
		Epicatechin	Membrane disruption	226	
	Phenolic acids	Cinnamic acid		66	
		Hypericin	Bind to adhesins, complex with cell wall, inactivate enzymes	58, 114	
	Flavonoids	Chrysin	Bind to adhesins	175, 182	
			Complex with cell wall		
	Flavones	Abyssinone	Inactivate enzymes	32, 219	
			Inhibit HIV reverse transcriptase	164	
	Flavonols	Tannins	Totanol	?	122
			Ellagitannin	Bind to proteins	196, 210
			Bind to adhesins	192	
			Enzyme inhibition	87, 33, 35	
			Substrate deprivation		
			Complex with cell wall		
			Membrane disruption		
			Metal ion complexation		
	Coumarins	Warfarin	Interaction with eucaryotic DNA (antiviral activity)	26, 95, 113, 251	
Terpenoids, essential oils		Capsaicin	Membrane disruption	42	
Alkaloids		Berberine	Intercalate into cell wall and/or DNA	15, 34, 73, 94	
		Piperine			
Lectins and polypeptides		Mannose-specific agglutinin	Block viral fusion or adsorption	145, 253	
		Fabatin	Form disulfide bridges		
Polycetylenes		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol	?	62	

1.2.Αιθέρια έλαια ως αντιμικροβιακά σε συστήματα τρόφιμων

Αυτά τα φυσικά αντιμικροβιακά έχουν εκτεταμένες ιστορίες για τη χρήση τους σε τρόφιμα, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από διάφορα συστατικά των φυτών όπως φύλλα, φλοιοί, μίσχοι, ρίζες, άνθη και φρούτα (Erasto, Bojase-Moleta, & Majinda, 2004; Rahman & Gray, 2002, Zhu, Zhang, & Lo, 2004). Τα αιθέρια έλαια δεν είναι αυστηρά έλαια, αλλά είναι συχνά ελάχιστα διαλυτά στο νερό όπως και τα έλαια. Τα αιθέρια έλαια συχνά έχουν μία ευχάριστη οσμή και μερικές φορές μία χαρακτηριστική γεύση και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται σε σημαντικές ποσότητες στη βιομηχανία αρωμάτων (Burt 2004).

Τα αιθέρια έλαια παρασκευάζονται συνήθως με τεχνικές εκχύλισης, όπως η απόσταξη (συμπεριλαμβανόμενης της απόσταξης με ατμό), η ψυχρή έκθλιψη ή η εκχύλιση (διαβροχή). Τυπικά τα αιθέρια έλαια είναι εξαιρετικά πολύπλοκα μείγματα συχνά εκατοντάδων μεμονωμένων αρωματικών ενώσεων. Τα βότανα και τα μπαχαρικά που χρησιμοποιούνται συνήθως στα τρόφιμα έχουν δώσει τα περισσότερα από τα αιθέρια έλαια που έχουν μελετηθεί για την αντιμικροβιακή τους δράση (Cueva et al, 2010 Negi, 2012, Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

Πολλοί καταναλωτές απαιτούν τρόφιμα χωρίς αυτό που αντιλαμβάνονται ως τεχνικές και επιβλαβείς χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων πολλών που χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά και συντηρητικά στα τρόφιμα. Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον για πιο φυσικά, μη συνθετικά, αντιμικροβιακά ως πιθανές εναλλακτικές σε σχέση με τα συμβατικά αντιμικροβιακά για την επέκταση του ραφίου έχει αυξηθεί και παρατηρείται προσπάθεια για την καταπολέμηση των τροφιμογενών παθογόνων.

Τα αρωματικά φυτά και τα συστατικά τους έχουν εξεταστεί ως πιθανοί αναστολείς της βακτηριακής ανάπτυξης και οι περισσότερες από τις ιδιότητες τους έχουν συνδεθεί με αιθέρια έλαια και άλλους δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες.

Ιστορικά, αιθέρια έλαια από διαφορετικές πηγές έχουν προωθηθεί ευρέως για τις πιθανές αντιμικροβιακές τους ικανότητες. Σε αυτή την ανασκόπηση, οι μηχανισμοί της αντιμικροβιακής δράσης και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών αιθέριων ελαίων συζητούνται, συμπεριλαμβανομένων αυτών των τρόπων δράσης, αποτελεσματικότητας, συνεργιστικών αποτελεσμάτων και κυρίων συστατικών για χρήση σε τρόφιμα.

Τα τελευταία χρόνια, τα αρωματικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους εξετάστηκαν για την αποτελεσματικότητά τους για την ασφάλεια και τη συντήρηση των τροφίμων σε εφαρμογές που έχουν λάβει την προσοχή ως προαγωγοί ανάπτυξης και υγείας (Fisher & Phillips, 2008; Gyawali & Ibrahim, 2014, Prakash, Media, Mishra, & Dubey, 2015).

Ο έλεγχος της αλλοίωσης των τροφίμων και των παθογόνων βακτηρίων επιτυγχάνεται κυρίως με χημικό έλεγχο, αλλά η χρήση συνθετικών χημικών ουσιών είναι περιορισμένη λόγω ανεπιθύμητων παραστάσεων συμπεριλαμβανομένης της καρκινογένεσης, της οξείας τοξικότητας, τερατογένεσης και βραδείας αποικοδόμησης, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως η ρύπανση (Faleiro, 2011; Sofos, Beuchat, Davidson, & Johnson, 1998).

Η αρνητική αντίληψη του κοινού για τα βιομηχανικά συνθετικά τρόφιμα με αντιμικροβιακά έχει δημιουργήσει ενδιαφέρον για τη χρήση με πιο φυσικές απαντώμενες ενώσεις. Έχει γίνει εκτεταμένη αναζήτηση δυνατοτήτων φυσικών υποψηφίων πρόσθετων τροφίμων που διατηρούν ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών δράσεων ενώ διαθέτουν την ικανότητα για τη βελτίωση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των ευπαθών τροφίμων (Fratanni, et al., 2010).

Η εμφάνιση βακτηριακής αντοχής στα αντιβιοτικά και η αρνητική στάση των καταναλωτών απέναντι στα συντηρητικά τροφίμων έχει οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση φυτικών συστατικών που περιέχουν αιθέρια έλαια και αποστάγματα ως εναλλακτικοί παράγοντες για τον έλεγχο των τροφίμων, την αλλοίωση τους και τα επιβλαβή παθογόνα τους. Αρκετοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά τους να διεισδύουν μέσω βακτηριακών μεμβρανών στο εσωτερικό του κυττάρου και να επιδεικνύουν

ανασταλτική δράση στις λειτουργικές ιδιότητες του κυττάρου και στις λιπόφιλες ιδιότητες τους (Bajpai et al., 2012; Fisher & Phillips, 2009; Guinoiseau et al., 2010; Smith-Palmer et al., 1998).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους είναι η υδροφοβικότητα, επιτρέποντας στα αιθέρια έλαια να διαχωρίσουν τα λιπίδια της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και τα μιτοχόνδρια στη διαδικασία αυτή αναγκάζουν το βακτηριακό κύτταρο να γίνει πιο διαπερατό (Burt, 2004, Friedly et al. 2009).

Η αλληλεπίδραση των αιθέριων ελαίων με τα μικροβιακά κύτταρα και με τις μεμβράνες έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης ορισμένων κατά Gram θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Gram θετικά βακτήρια όπως ο *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus* είναι πιο ευαίσθητα στα αιθέρια έλαια από τα Gram – αρνητικά βακτήρια όπως π.χ *Escherichia coli* και *Salmonella Enteritidis* (Χωριανόπουλος et al., 2004).

Γενικά πιστεύεται ότι τα αιθέρια έλαια θα έπρεπε να είναι πιο αποτελεσματικά έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων λόγω της άμεσης αλληλεπίδρασης της κυτταρικής μεμβράνης με υδρόφοβα συστατικά των αιθέριων ελαίων. Αντίθετα, με βάση αυτή την υπόθεση, τα Gram αρνητικά κύτταρα θα πρέπει να είναι πιο ανθεκτικά στα φυτικά αιθέρια έλαια επειδή διαθέτουν υδρόφιλο κυτταρικό τοίχωμα. Αυτό το εξωτερικό στρώμα βοηθά στην πρόληψη της διείσδυσης υδρόφοβων ενώσεων. Τα λάδια με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα περιελάμβαναν τη ρίζα τζίντζερ, το γιασεμί, τους σπόρους καρότου, τους σπόρους σέλινου, το πορτοκάλι και τα πικρά έλαια, τη ρίγανη, το θυμάρι, τη κανέλα, τη δάφνη, το μπουμπούκι γαρυφάλλου, το λεμονόχορτο, το μπαχάρι και την μαντζουράνα. Το μαύρο πιπέρι και το συστατικό του, το οποίο είναι η πιπερίνη έχουν αποδείξει αντιμικροβιακή δράση έναντι των οργανισμών που βρίσκονται σε τρόφιμα όπως το *S.aureus*, τη *Salmonella*, το *B.cereus* και το *Bacillus subtilis*.

1.2.1. Αιθέρια έλαια και τερπενοειδή

Είναι το άρωμα των φυτών που μεταφέρεται στο λεγόμενο κλάσμα του αιθέριου ελαίου. Αυτά τα λάδια είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες που είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένες σε ενώσεις που βασίζονται σε μία δομή ισοπρενίου. Ονομάζονται τερπένια, καθώς η γενική χημική δομή είναι $C_{10}H_{16}$ και εμφανίζονται ως διτερπένια, τριτερπένια και τετρατερπένια (C_{20} , C_{30} και C_{40}), καθώς και ημιτερπένια και σεσκιτερπένια. Όταν οι ενώσεις περιέχουν πρόσθετα στοιχεία, συνήθως οξυγόνου, αυτά ονομάζονται τερπενοειδή.

Το 1977 αναφέρθηκε ότι το 60% των παραγώγων αιθέριων ελαίων που εξετάστηκαν μέχρι σήμερα ήταν ανασταλτικά για τους μύκητες, ενώ το 30% ανέστειλε βακτήρια. Το τριτερπενοειδές βετουλινικό οξύ είναι ακριβώς ένα από τα πολλά τερπενοειδή που έχουν παρουσιαστεί για την αναστολή του HIV. Ο μηχανισμός δράσης των τερπενίων δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά

εικάζεται ότι περιλαμβάνει διάρρηξη της μεμβράνης από τις λιπόφιλες ενώσεις. Κατά συνέπεια, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της υδροφιλικότητας του καυρενίου στα διτερπενοειδή με την προσθήκη μιας μεθυλομάδας μειώνουν δραστικά την αντιμικροβιακή τους δράση. Οι επιστήμονες τροφίμων ανακάλυψαν ότι τα τερπενοειδή που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια των φυτών είναι χρήσιμα στον έλεγχο της *Listeria monocytogenes*. Το λάδι βασιλικού, ένα βότανο που διατίθενται στο εμπόριο, βρέθηκε ότι είναι τόσο αποτελεσματικό όσο 125 ppm χλώριο στην απολύμανση των φύλλων μαρουλιού (Wan, J., A. Wilcock, and M. J. Coventry. 1998).

Οι πιπεριές Χιλής είναι ένα τρόφιμο που βρίσκεται σχεδόν παντού στους μεσοαμερικάνικους πολιτισμούς. Η χρήση τους μπορεί να αντανάκλα περισσότερο μία επιθυμία να αρωματίσουμε τα φαγητά. Πολλά απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, όπως π.χ βιταμίνη C, προνιταμίνες A και E και αρκετές βιταμίνες B, είναι που βρέθηκαν στη Χιλή. Ένα τερπενοειδή συστατικό, η καψαϊκίνη, έχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων στον άνθρωπο, που επηρεάζουν το νευρικό, καρδιαγγειακό και πεπτικό σύστημα και βρίσκει χρήση ως αναλγητικό. Τα στοιχεία για την αντιμικροβιακή τους δράση είναι μικτά (Ayafor, J. F., M. H. K. Tchuendem, and B. Nyasse. 1994).

Το διαλυτό σε αιθανόλη κλάσμα του πορφυρού τριφυλλίου λιβαδιού αποδίδει ως τερπενοειδές που ονομάζεται πεταλοστεμουμόλη, το οποίο έδειξε εξαιρετική δράση έναντι του *Bacillus subtilis* και του *Staphylococcus aureus*, ενώ έδειξε μικρότερη δράση έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και του *Candida albicans*. Δύο διτερπένια που απομονώθηκαν από συγκεκριμένους ερευνητές, βρέθηκαν σε καλύτερη κατάσταση και λειτούργησαν καλά έναντι του *Staphylococcus aureus*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* και *Candida spp*. Όταν παρατηρήθηκε ότι κάτοικοι του Μάλι χρησιμοποιούσαν το φλοιό ενός δέντρου που ονομάζεται *Ptelopsis suberosa* για τη θεραπεία του γαστρικού έλκους, οι ερευνητές εξέτασαν κλάσματα που περιείχαν τα τερπενοειδή σε 10 αρουραίους πριν και αφού οι αρουραίοι είχαν έλκη στα χημικά που προκαλείται. Διαπίστωσαν ότι τα τερπενοειδή εμπόδιζαν το σχηματισμό ελκών και μείωσαν τη σοβαρότητα των υπάρχοντων ελκών. Είτε αυτή η δραστηριότητα οφειλόταν σε αντιμικροβιακή δράση είτε σε προστασία του γαστρικού βλεννογόνου δεν είναι ξεκάθαρη (De Pasquale, R., M. P. Germano, A. Keita, R. Sanogo, and L. Iauk. 1995).

1.2.2.Λεκτίνες και Πολυπεπίδια

Τα πεπίδια που είναι ανασταλτικά στους μικροοργανισμούς πρώτα αναφέρθηκαν το 1942. Συχνά είναι θετικά φορτισμένα και περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο μηχανισμός δράσης τους μπορεί να είναι ο σχηματισμός διαύλων ιόντων στη μικροβιακή μεμβράνη ή η ανταγωνιστική αναστολή της προσκόλλησης μικροβίων των πρωτεϊνών για να φιλοξενήσουν υποδοχείς πολυσακχαρίτη. Το πρόσφατο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί κυρίως στη μελέτη των πεπτιδίων κατά του HIV και στις λεκτίνες αλλά και στην αναστολή των βακτηρίων και των μυκητών από αυτά τα μακρομόρια (De

Bolle, M. F., R. W. Osborn, I. J. Goderis, L. Noe, D. Acland, C. A. Hart, S. Torreken, F. Van Leuven, and N. F. Broekart. 1996).

Οι θειονίνες είναι πεπτίδια που βρίσκονται συνήθως στο κριθάρι και το σιτάρι που αποτελούνται από 47 υπολείμματα αμινοξέων. Είναι τοξικά σε ζυμομύκητες και gram – αρνητικά και θετικά Gram βακτήρια. Οι θειονίνες AX1 και AX2 από ζαχαρότευτλα δρα κατά των μυκητών αλλά όχι των βακτηρίων. Ένα πρόσφατα εντοπισμένο υπόλειμμα πεπτιδίου από τη φάβα, φαίνεται να σχετίζεται δομικά με τις g – θειονίνες από δημητριακά και να αναστέλλει το *E.coli*, *P. aeruginosa* και *Enterococcus hirae* αλλά όχι το *Candida* ή το *Saccharomyces* (Zhang, Y., and K. Lewis. 1997).

Τα μεγαλύτερα μόρια λεκτίνης, τα οποία περιλαμβάνουν ειδικά για τη μαννόζη, λεκτίνες από πολλά φυτά και από πικρό πεπόνι είναι ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό του ιού (HIV), πιθανώς αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση του ιού με τον κρίσιμο ξενιστή κυτταρικών συστατικών. Αξίζει να τονιστεί ότι τα μόρια και οι ενώσεις, των οποίων ο τρόπος δράσης μπορεί να αναστέλλουν την πρόσφυση και δεν θα ανιχνευθούν με τη χρήση των πιο γενικών πρωτοκόλλων φυτικής αντιμικροβιακής διαλογής, ακόμη και με τις διαδικασίες κλασμάτωσης που ασ πούμε καθοδηγούνται από συγκεκριμένα αντιμικροβιακά φυτά, που χρησιμοποιούνται από χημικούς φυσικών προϊόντων. Είναι ένας τομέας που αξίζει προσοχής, έτσι ώστε οι αρχικές οθόνες των δυνητικά φαρμακολογικών ενεργών φυτών να μπορεί να γίνουν πιο χρήσιμες (Vlietinck, A. J., and D. A. Vanden Berghe. 1991).

1.2.2.1.Μείγματα

Το μασητικό ραβδί χρησιμοποιείται ευρέως στις αφρικανικές χώρες ως βοήθημα στοματικής υγιεινής (στη θέση οδοντόβουρτσας). Τα μπαστούνια προέρχονται από διαφορετικά είδη φυτών και τα χημικά συστατικά μπορεί να είναι ετερογενές. Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενός είδους που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό, ανέστειλαν τα περιοδοντικά παθογόνα *Porphy romonas gingivalis* και *Bacteroides mlaninogenicus*. Το ενεργό συστατικό του νιγηριανού μασήματος ραβδιού βρέθηκε να αποτελείται από διάφορα αλκαλοειδή. Το εάν αυτές οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται εδώ και πολύ καιρό στις αναπτυσσόμενες χώρες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον δυτικό κόσμο δεν είναι ακόμα γνωστό (Odebiyi, O. O., and E. A. Sofowora. 1979).

Η παπάγια (*Carica paraya*) δίνει έναν γαλακτώδη χυμό, που συχνά ονομάζεται α λάτεξ, το οποίο είναι ένα πολύπλοκο μείγμα χημικών ουσιών. Επικεφαλής μεταξύ αυτών είναι η παπαίνη, ένα πολύ γνωστό πρωτεολυτικό ένζυμο. Υπαρχει, επίσης, ένα αλκαλοειδές, η καρπαίνη.

Διαπίστωσαν ότι το λάτεξ είναι βακτηριοστατικό του *B. Subtilis*, *Enterobacter clocae*, *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* και *Proteus vulgaris* (Osato, J. A., L. A. Santiago, G. M. Remo, M. S. Cuadra, and A. Mori. 1993).

Η αγιουβέρδα είναι ένα είδος θεραπευτικής τέχνης που ασκείται στην Ινδία αλλά όχι άγνωστο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι ασκούμενοι της Αγιουβέρδας βασίζονται σε φυτικά εκχυλίσματα τόσο "αγνά" μονοφυτικά παρασκευάσματα όσο και μικτά σκευάσματα. Τα σκευάσματα έχουν λυρικές ονομασίες, όπως π.χ. Ashwagandha. Αυτές οι προετοιμασίες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ζώων καθώς και ανθρώπων, Επιπρόσθετα, στις αντιμικροβιακές δραστηριότητες τους, έχει βρεθεί ότι έχουν αντιδιαρροϊκές, ανοσοτροποποιητικές, αντικαρκινικές και ψυχότροπες ιδιότητες. Σε άλλες μελέτες, σ'ένα σκεύασμα Αγιουβέρδα, βρέθηκε μία ελαφρά μείωση πειραματικών επαγόμενων καρδιακών αρρυθμιών σε σκύλους. Δύο μικροοργανισμοί κατά των οποίων έχουν τα αγιουρβιδικά σκευάσματα είναι η *Aspergillus spp* και *Propionibacterium acnes*. Η μελέτη ασπεργίλλωσης πραγματοποιήθηκε με ποντίκια και επομένως είναι αδύνατο να προσδιοριστεί εάν οι επιδράσεις οφείλονται στη διέγερση της δραστηριότητας των μακροφάγων σε ολόκληρο το ζώο αντί για άμεση αντιμικροβιακή δράση.

Η τοξικότητα των παρασκευασμάτων της Αγιουβέρδα ήταν το θέμα από κάποιες εικασίες, ειδικά επειδή ορισμένες από αυτές περιλαμβάνουν μέταλλα. Εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα μολύβδου στο αίμα ενηλίκων εθελοντών που είχαν κάνει αυτοθεραπεία με Αγιουρβεδικά φάρμακα (Prpic-Majic, D., A. Pizent, J. Jurasovic, J. Pongracic, and N. RestekSamarzija. 1996).

Η προπόλη είναι ένα ακατέργαστο εκχύλισμα από το βάλαμο διαφόρων δέντρων, το οποίο συχνά ονομάζεται κόλλα μελισσών, αφού τις μέλισσες τις μαζεύουν από τα δέντρα. Η χημική του σύσταση είναι πολύ περίπλοκη όπως τα λάτεξ που περιγράφονται παραπάνω, υπάρχουν τερπενοειδή, καθώς και флаβονοειδή, βενζοϊκά οξέα, εστέρες και υποκατεστημένα αινολικά οξέα. Συνθετικά κινναμωμικά οξέα, πανομοιότυπα με αυτά από προπόλη, βρέθηκαν ότι αναστέλλουν τη δραστηριότητα αιματοσυγκόλλησης των ιών γρίπης (Serkedjievna, J., and N. Manolova. 1992).

Διαπιστώθηκε ότι η προπόλη ήταν ενεργή ενός ανθεκτικού στην ακυκλοβίρη, που είναι μετάλλαξη του HSV – 1, του αδενοϊκού τύπου 2, του ιού της φυσαλιδώδους στοματίτιδας και του ιού της πολιομυελίτιδας. Ανάμειξη των χημικών ουσιών, όπως αυτές που βρίσκονται στο λάτεξ και στην προπόλη, μπορεί να ενεργούν συνεργηστικά. Ενώ τα συστατικά флаβόνια και флаβονοειδή, που επώαστηκαν ταυτόχρονα με τον ιό ήταν πιο αποτελεσματικά παρά μεμονωμένα χημικά. Μία πιθανή εξήγηση του είναι γιατί η προπόλη είναι πιο αποτελεσματική από τις μεμονωμένες ενώσεις του. Φυσικά, τα μείγματα είναι πιο πιθανό να περιέχουν τοξικά συστατικά και αυτά πρέπει να διερευνηθούν διεξοδικά και να τυποποιηθούν πριν εγκριθεί για χρήση σε μεγάλη κλίμακα στη Δύση (Amoros, M., C. M. O. Simoes, and L. Girre. 1992).

1.2.2.2. Άλλες ενώσεις

Έχουν βρεθεί πολλά φυτοχημικά που δεν αναφέρονται παραπάνω να ασκούν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Αυτή η κριτική έχει προσπαθήσει να εστιάσει σε αναφορές χημικών ουσιών που βρίσκονται σε πολλαπλές περιπτώσεις. Πρέπει να αναφερθεί όμως ότι υπάρχουν αναφορές για αντιμικροβιακές ιδιότητες που σχετίζονται με πολυαμίνες (ιδιαίτερα σπερμιδίνη), ισοθειοκυανικά, θειοσουλφινικά και γλυκοζίτες (Murakami, A., H. Ohigashi, S. Tanaka, A. Tatematsu, and K. Koshimizu. 1993).

Τα πολυακετυλένια αξίζουν ιδιαίτερης αναφοράς. Απομονώθηκε, στη συνέχεια, μία ένωση πολυακετυλενίου C17 από το *Bupleurum salici folium*, ένα φυτό το οποίο βρίσκεται στα Κανάρια Νησιά. Ενώσεις ακετυλενίου και φλαβονοειδή από φυτά που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στη βραζιλία για τη θεραπεία της ελονοσίας, ο πυρετός και οι ηπατικές διαταραχές έχουν επίσης συσχετιστεί με δράση κατά της ελονοσίας. Πολλά έχουν γραφτεί για τις αντιμικροβιακές επιδράσεις του χυμού μούρων. Ιστορικά, οι γυναίκες έχουν πει να πίνουν τον χυμό για την πρόληψη και ακόμη και τη θεραπεία ουρολοιμώξεων. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι ο μονοσακχαρίτης της φρουκτόζης υπάρχει στους χυμούς που περιέχουν *cramberry* και *blueberry*, τα οποία ανέστειλαν ανταγωνιστικά την προσρόφιση του παθογόνου *E.coli* σε επιθηλιακά κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος, που λειτουργούν ως ανάλογα της μαννόζης.

Κλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τις προστατευτικές επιδράσεις του χυμού *cramberry*. Πολλά φρούτα περιέχουν φρουκτόζη, ωστόσο, και οι ερευνητές αναζητούν τώρα μια δεύτερη δραστική ένωση από χυμό *cramberry* που συμβάλλει στις αντιμικροβιακές ιδιότητες του χυμού (Zafriri, D., I. Ofek, R. Adar, M. Pocino, and N. Sharon. 1989).

1.3.Φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα

Ένα από τα υλικά που ερευνήσαμε για να δούμε την αντιμικροβιακή του δραστηριότητα είναι η λεβάντα η οποία είναι γένος φυτών που ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών. Το πιο γνωστό είναι η λαβαντούλα, το οποίο διαθέτει γύρω στα 25 είδη. Προέρχεται από τις παραμεσόγειες περιοχές όπως τα Κανάρια νησιά και στις ασιατικές περιοχές όπως η Ινδία. Η λεβάντα περιέχει το αιθέριο έλαιο στα φύλλα της, το οποίο χρησιμοποιείται για την θεραπεία πολλών νευρασθενειών. Οι ιαματικές ιδιότητες που έχει αναφέρονται από την αρχαιότητα. Επιπλέον χρησιμοποιείται και σε άλλους τομείς όπως είναι η αρωματοποιία, η σαπυνοποιία αλλά και η φαρμακευτική με τη μορφή τονωτικού ή αντικαταρροϊκού.

Η λεβάντα σαν κύρια συστατικά περιέχει αλκοόλες με το κύριο να είναι η ένωση το οξικό λιναλύλιο. Το αιθέριο έλαιο της λεβάντας προέρχεται από δύο είδη τα οποία είναι η *Lavandula*

Intermedia και η *Lavandula Angustifoli*, τα οποία έχουν αντισηπτικές, αντιμυκητιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Τα περισσότερα είδη λεβάντας καλλιεργούνται σε εδάφη με υψηλή ποσότητα ασβεστίου,διότι έτσι αυξάνεται η ποιότητα και η ποσότητα του αιθέριου ελαίου. Η λεβάντα καταστρέφει τα μικρόβια και πολλές φορές χρησιμοποιείται για την απολύμανση τραυματισμένων περιοχών του σώματος. Επιπλέον εξουδετερώνει τον στρεπτόκοκκο και τον πνευμονιόκοκκο και συμβάλλει σημαντικά στην θεραπεία της βρογχίτιδας,της φυματίωσης και του τύφου.Ακόμη το αιθέριο έλαιο της λεβάντας μπορεί να ενσωματωθεί σε κρέμες ή σε έλαια και οι πολυ καλές επουλωτικές και αναπλαστικές δράσεις του το καθιστούν ως ένα από τα καλύτερα έλαια.

Ακόμη χρησιμοποιήσαμε την προπόλη. Η προπόλη είναι φυσική αντιμικροβιακή δράση. Χρησιμοποιείται σαν σπρέι για τη μυτή,έχει αντιφλεγμονώδη και αντισηπτική δράση. Είναι το δομικό υλικό της κυψέλης που αποτελείται από τις μέλισσες,το οποίο χρησιμοποιείται για την προστασία τους και την απολύμανση τους.Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της προπόλης είναι η σημαντική μεταβλητότητα της χημικής της σύστασης, η οποία δημιουργεί αρκετές ευεργετικές ιδιότητες όπου γίνεται χρήση της.

Η προπόλη τα τελευταία χρόνια συνδέεται όλο και πιο πολύ με παθολογικές καταστάσεις όσον αφορά τις ιδιότητες της. Έχει αποδειχθεί ότι δρα τόσο κατά των Gram-αρνητικών όσο και κατά των Gram-θετικών βακτηρίων,όπως και σε αερόβια και αναερόβια βακτήρια. Χρήση της γίνεται στην στοματική υγιεινή,για την υγεία του δέρματος,για την ακμή,σε μεταβολικές ασθένειες,για την σωστή καρδιακή λειτουργία και για την εύρυθμη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, επίσης, έγινε χρήση της χλωραμφενικόλης και της βανκομυκίνης. Η χλωραμφενικόλη είναι ένα αντιβιοτικό, το οποίο βοηθάει στην καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων. Η αρχική της χρήση, ήταν για ιατρικούς λόγους και συγκεκριμένα για την θεραπεία της μηνιγγίτιδας, της πανώλης, της χολέρας και του τυφοειδούς πυρετού.Η χλωραμφενικόλη είναι ένα ευρέος φάσματος αντιβιοτικό, που συνήθως σταματά την ανάπτυξη βακτηρίων όταν μειώνει την παραγωγή πρωτεϊνών. Ανακαλύφθηκε, αφού απομονώθηκε από το *Streptomyces venezuelae*.

Κατασκευάστηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1949 και συμπεριλαμβάνεται στον κατάλογο βασικών φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ως γενόσημο φάρμακο.

Είναι αποτελεσματική και στη θεραπεία οφθαλμικών λοιμώξεων, που προκαλούνται από έναν αριθμό βακτηρίων όπως είναι ο *Staphylococcus aureus* και ο *Escherichia coli*. Τέλος, η χλωραμφενικόλη είναι διαλυτή στα λιπίδια, παραμένει μη δεσμευμένη στις πρωτεΐνες και είναι ένα μικρό μόριο.

Το άλλο αντιβιοτικό που γίνεται χρήση του είναι η βανκοκυμίνη, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ορισμένων βακτηριακών λοιμώξεων. Χορηγείται για λοιμώξεις του δέρματος, του αίματος

για την ενδοκαρδίτιδα και για τη μηνιγγίτιδα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτηρίζει την βανκοκυμίνη ως εξαιρετικά σημαντική για την ιατρική.

Συγκεκριμένα, η βανκοκυμίνη ενδείκνυται για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από θετικά κατά Gram βακτήρια που δεν έχουν ανταπόκριση από άλλα αντιβιοτικά. Η βανκοκυμίνη παράγεται από το βακτήριο του εδάφους το *Amycolatopsis orientalis*.

1.3.1.Αντιμικροβιακή δραστηριότητα της λεβάντας

1.3.1.Λάδι λεβάντας και τειϊόδεντρου

Εκτενής τεκμηρίωση σχετικά με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους έχει πραγματοποιηθεί από αρκετούς εργαζόμενους. Αν και ο μηχανισμός δράσης μερικών συστατικών αιθέριων ελαίων έχει αποσαφηνιστεί σε πολλές πρωτοποριακές εργασίες στο παρελθόν, η λεπτομερής γνώση των περισσότερων από τις ενώσεις και του μηχανισμού δράσης τους εξακολουθεί να λείπει. Αυτή η γνώση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον προσδιορισμό της επίδρασης των αιθέριων ελαίων σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς, τον τρόπο δράσης τους σε συνδυασμό με άλλες αντιμικροβιακές ενώσεις και την αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά της μήτρας τροφίμων.

Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα νανοσωματίδια που λειτουργούν με αιθέρια έλαια έχουν σημαντικό αντιμικροβιακό δυναμικό έναντι πολυανθεκτικών παθογόνων, λόγω αύξησης της χημικής σταθερότητας και διαλυτότητας και της μειωμένης ταχείας εξάτμισης και ελαχιστοποιημένης αποδόμησης των ενεργών συστατικών αιθέριων ελαίων (Chouhan, Sonam, et al.). Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς, όπως η φαρμακολογία η ιατρική μικροβιολογία, η φυτοπαθολογία και η συντήρηση τροφίμων. Ο αριθμός των μελετών που επικεντρώνονται σε αυτές τις ουσίες, καθώς και η εφαρμογή τους ως νέοι πιθανοί αντιβιοτικοί παράγοντες κατά φυτικών και ανθρώπινων μικροοργανισμών, έχει πρόσφατα αυξηθεί. Αυτά τα πειράματα είναι σημαντικά επειδή τα αντιβιοτικά ή τα χημικά σπρέι εφαρμόζονται για πρόληψη και θεραπεία στη γεωργία και η ανθρώπινη ιατρική μπορεί δυστηχώς να προκαλέσει επιλεκτική πίεση που οδηγεί στην εξάπλωση ανθεκτικών μεταλλαγμένων (Horváth, Györgyi, et al.).

Έλαια λεβάντας και τειϊόδεντρου που προστέθηκαν σε συγκέντρωση 0,5 % σε καλλυντικά σκευάσματα κατάφεραν και σκότωσαν τον *Staphylococcus aureus* ήδη μετά από δύο ημέρες επώασης.

Ταυτόχρονα, το έλαιο λεβάντας δεν επηρέασε τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και το έλαιο λεβάντας δεν επηρέασε τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και το έλαιο τειϊόδεντρου ανέστειλε ελαφρώς μόνο την ανάπτυξη του *Asp.nigera* (κατά περίπου μία λογαριθμική μονάδα). Μετά από 7

ημέρες δοκιμασίας, παρατηρήθηκε ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα έναντι του *Pseudomona aeruginosa* στο γάλα σώματος με μείγμα και των δύο ελαίων, σε συγκέντρωση 0,5 % το καθένα. Το μίγμα, ωστόσο, δεν εμφάνισε μυκητοστατική δράση. Η εισαγωγή ενός συνθετικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 0,1 % στο σκεύασμα που περιέχει 0,5 % έλαιο λεβάντας και τεϊόδεντρου προκάλεσε μία απροσδόκητη ανασταλτική δράση έναντι όλων των ελεγμένων στελεχών ήδη μετά από 2 ημέρες. Το μίγμα των ελαίων ενίσχυσε σημαντικά την δράση των συντηρητικών (Kunicka-Styczyńska, et.al).

1.3.2. Σύγκριση χημικής σύνθεσης, αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης λεβάντας

Σε αυτή τη μελέτη διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, δηλαδή της υδροαπόσταξης, της υπερκρίσιμης εκχύλισης CO₂ (SCE) και της εκχύλισης με εξάνιο στην απόδοση, τη χημική σύνθεση και τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας. Η SCE παρήγαγε απόδοση 6,7 % (ξηρός βάρος), η οποία ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της υδροαπόσταξης (4,6 %). Η χημική σύνθεση των ελαίων παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των μεθόδων εκχύλισης, με τη λιναλόλη, το οξικό λιναύλιο, την καμφορά και τη βορνεόλη να αποτελούν περίπου το 80 % των ταυτοποιημένων συστατικών σε όλα τα εκχυλίσματα. Η εκχύλιση εξανίου παρήγαγε έλαια με την παρουσία κεριών, χρωστικών και λευκωματωδών υλικών με ημιστερεή σύσταση, ενώ τα εκχυλίσματα υδροαπόσταξης έδειξαν σημάδια θερμικής αποδόμησης. Τα εκχυλίσματα SCE είχαν ένα άρωμα με τη μεγαλύτερη ομοιότητα με το αρχικό υλικό, παρουσιάζοντας αμελητέα θερμική αποικοδόμηση και εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλίσματα υδροαπόσταξης και εξανίου. Τα έλαια που παράγονται με SCE και υδροαπόσταξη είχαν αντιμικροβιακή δράση υψηλότερη από τα εκχυλίσματα εξανίου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης καταδεικνύουν ότι τα SCE είναι μια πολλά υποσχόμενη διαδικασία για την εξαγωγή αιθέριου ελαίου λεβάντας (Danh, Luu Thai, et al.).

Σε μία άλλη μελέτη για την αντιβακτηριδιακή δράση της λεβάντας βγήκε το συμπέρασμα πως παρουσιάζει σημαντικές βακτηριοκτόνες επιδράσεις κατά μικροοργανισμών όπως *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* και *E.coli*, ακόμη και απουσία ενεργών συστατικών όπως η λιναλοόλη και ο οξικός λιναλυλεστέρας, που πιστώνονται με ισχυρές αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές επιδράσεις. Η μελέτη προτείνει για άλλη μία φορά ότι η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων είναι αποτέλεσμα των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων του κύριου και των δευτερευόντων συστατικών στη χημική τους σύνθεση. Για όλα αυτά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που καθορίζουν την αύξηση της βιοδραστησιότητας αλλά και της συνεργιστικής σχέσης μεταξύ των συστατικών. Η εξήγηση αυτών των μηχανισμών θα επιτρέψει την εύκολη

πρόσβαση σε νέες πηγές φυσικών αντισηπτικών με εφαρμογές στα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα φαρμακευτικά προϊόντα στις βιομηχανίες (Jianu, Calin, et al.).

Τα αιθέρια έλαια που αποστάζονται από μέλη του γένους *Lavandula* χρησιμοποιούνται τόσο ως καλλυντικά όσο και ως θεραπευτικά εδώ και αιώνες με τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη να είναι τα *L.latifolia*, *L.stoechas*, *L.xindermedia*. Αν και υπάρχουν σημαντικές ανέκδοτες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα αυτών των ελαίων, πολλά από αυτά δεν έχουν τεκμηριωθεί από επιστημονικά ή κλινικά στοιχεία. Μεταξύ των ισχυρισμών που γίνονται για το έλαιο λεβάντας είναι πως χαρακτηρίζεται ως αντιβακτηρικό, αντιμυκητιακό, ανθρακούχο (χαλαρωτικό των λείων μυών), ηρεμιστικό, αντικαταθλιπτικό και αποτελεσματικό για εγκαύματα και τσιμπήματα εντόμων. Στο συγκεκριμένο κείμενο περιγράφεται λεπτομερώς η τρέχουσα κατάσταση της γνώσης σχετικά με την επίδραση των ελαίων λεβάντας σε ψυχολογικές και φυσιολογικές παραμέτρους και η χρήση του σαν αντιμικροβιακός παράγοντας. Αν και τα δεδομένα εξακολουθούν να είναι ασαφή και συχνά αμφιλεγόμενα, φαίνεται ότι υπάρχουν τόσο επιστημονικά όσο και κλινικά δεδομένα που υποστηρίζουν τις παραδοσιακές χρήσεις της λεβάντας. Ωστόσο, προβλήματα μεθολογικά και ταυτοποίησης ελαίων έχουν παρεμποδίσει σοβαρά την αξιολόγηση της θεραπευτικής σημασίας μεγάλου μέρους της έρευνας για το *Lavandula* spp. Αυτά τα ζητήματα πρέπει να επιλυθούν πριν έχουμε μια αληθινή εικόνα των βιολογικών δραστηριοτήτων των αιθέριων ελαίων λεβάντας (Cavanagh, H. M. A., and J. M. Wilkinson et al).

Τα αιθέρια έλαια, τα οποία αποτελούν μέρος της φυσιοπαθητικής θεραπείας, είναι ευρέως γνωστά για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Έχει βρεθεί ότι είναι ωφέλιμα στους τομείς της δερματολογίας, της γαστρίτιδας, των αναπνευστικών προβλημάτων, της επούλωσης τραυμάτων και των λοιμώξεων των γεννητικών οργάνων. Από τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο, το έλαιο λεβάντας (*Lavandula angustifolia*) φαίνεται να είναι ένα από τα πιο δημοφιλή. Η παλαιότερη θεραπευτική χρήση του *L.angustifolia* mill εντοπίζεται στη ρωμαϊκή και ελληνική εποχή. Η σημασία της οποίας, σε σχέση με τις αντιμικροβιακές εφαρμογές, έχει τονιστεί περαιτέρω σε μια σειρά από μελέτες. Στις βιομηχανίες αρωματοθεραπείας και ευεξίας, το λάδι έχει ενδειχθεί για τη θεραπεία μιας πληθώρας καταστάσεων, όπως η ρηνίτιδα, ο υγρός βήχας, τα ελαφρά εγκαύματα και η επείγουσα θεραπεία τραυμάτων (de Rapper, Stephanie, et al.).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων έχουν αναγνωριστεί εδώ και πολλά χρόνια. Πολλές ενώσεις αιθέριων ελαίων θεωρείται ότι διαθέτουν βιολογικές ικανότητες. Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων ήταν αντικείμενο πολυάριθμων ερευνών. Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε το *Paeruginosa* φάνηκε να είναι το πιο ανθεκτικό στα αιθέρια έλαια και τις δραστικές ενώσεις. Η δραστική ένωση με το ευρύτερο φάσμα δραστικότητας ήταν η θυμόλη. Gram - θετικά βακτήρια *S.aureus* και *B.subtilis* ήταν πιο ευαίσθητα στα αιθέρια έλαια από τα Gram -

αρνητικά βακτήρια. Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων προκύπτει από τη συνδυασμένη επίδραση των ενώσεων (Bosnić, et. al).

Σε μία άλλη έρευνα για τα αιθέρια έλαια από αποξηραμένα φύλλα *Lavandula bipinnata* Kuntze (*Lamiaceae*), που ελήφθησαν με εκχύλιση *sohxlet*, αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS) και αξιολογήθηκαν για την αντιμικροβιακή δράση. Τα πιο κοινά συστατικά που βρίσκονται συνήθως στα αιθέρια έλαια λεβάντας υπήρχαν στα δείγματα ελαίων που αναλύθηκαν. Από τις 43 κορυφές, 29 συστατικά εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο. Τα κύρια συστατικά ήταν η τρανσκαρβεόλη (18,93%), η πουλεγόνη (8,45%) η καμφορά (7,09%), και η μενθόλη (5,89 %). Άλλα συστατικά που υπάρχουν σε αρκετά καλές ποσότητες είναι η πιπερόνη (4,65%), το καρυοφυλλενοξειδίο (3,68%), ο οξικός λιναλυεστερας (3,37%) και το δικυκλογερμακρένιο (3,09%). Το αιθέριο έλαιο ελέγχθηκε για αντιμικροβιακή δράση με δοκιμασία διάχυσης δίσκου και ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση έναντι βακτηρίων και μυκήτων. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι τα αιθέρια έλαια *L. bipinnata* είναι ανασταλτικά έναντι των δοκιμασμένων βακτηρίων και στελεχών μυκητών (Hanamanthagouda, Manohar Shirugumbi, et al.).

Ακολουθήθηκε η επίδραση ορισμένων κοινώς χρησιμοποιούμενων αιθέριων ελαίων σε μικκυλιακό και υδατικό εκχύλισμα σε μερικά από τα πιο κοινά παθογόνα βακτήρια. Αιθέρια έλαια λιβανιού, μυρτιάς, θυμαριού, λεμονιού, ρίγανης και λεβάντας δοκιμάστηκαν έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*. Τόσο τα μικκυλιακά όσο και τα υδατικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ελάχιστων ανασταλτικών και βακτηριοκτόνων συγκεντρώσεών τους. Τα πιο δραστικά έλαια ήταν η ρίγανη, το θυμάρι, το λεμόνι και η λεβάντα, ενώ τα λιγότερο δραστικά ήταν το λιβάνι και η μυρτιά. Το λάδι ρίγανης παρουσίασε ως και 64 φορές χαμηλότερη ανασταλτική δράση από την αιθυλιακή αλκοόλη, εάν θεωρηθεί ως τυπική, σε όλα τα βακτήρια. Τα πιο ευαίσθητα βακτήρια ήταν οι Gram-θετικοί κόκκοι, συμπεριλαμβανομένου του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus*, ενώ το πιο ανθεκτικό ήταν το *P. aeruginosa*. Τα έλαια θυμαριού, λεμονιού και ρίγανης παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερα συνολικά ανασταλτική δράση για τη μικκυλιακή τους μορφή απ' ό,τι για τα υδατικά τους εκχυλίσματα (Man, Adrian, et al.).

Οι παραγωγοί αιθέριων ελαίων από τη Δημοκρατία της Μολδαβίας ενδιαφέρονται για τη ποιότητα των προϊόντων τους και ταυτόχρονα προσπαθούν να αξιοποιήσουν τα απόβλητα από την επεξεργασία. Η ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθέριου ελαίου της λεβάντας και ορισμένων παραπροϊόντων που προέρχονται από την παραγωγή της (υπόλειμμα νερού, υπολειμματικά βότανα), καθώς και η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής τους δράσης ήταν ο σκοπός τους. Η ανάλυση αερίου χρωματογραφίας -φασματομετρίας μάζας των αιθέριων ελαίων που παράγονται από 7 βιομηχανικούς κατασκευαστές οδήγησε στον εντοπισμό 41 συστατικών που σήμαιναν το 96,8 % -

99,79 % του συνόλου. Η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό των γνωστών τριτερπενίων, ουρσολικών και ελανολικών οξέων σε φρεσκοαποξηραμένα φυτά λεβάντας και στα υπολειμματικά παραπροϊόντα μετά την υδροαπόσταξη του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο λεβάντας έδειξε καλή αντιβακτηριδιακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* σε συγκέντρωση 300 µg/mL και *Erwinia amylovora*, *Candida utilis* σε συγκέντρωση 150 µg/mL, αντίστοιχα (Ciocarlan, Alexandru, et al.).

1.4. Πειραματικές προσεγγίσεις με τις αντιμικροβιακές συγκεντρώσεις

Μέθοδοι εκχύλισης

Υπάρχουν πολλές συμβουλές για τον ερασιτέχνη βοτανολόγο για το πώς να προετοιμαστεί, έτσι ώστε να δημιουργήσει θεραπευτικές ενώσεις από φυτά και βότανα. Το νερό είναι σχεδόν γενικά ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση της δραστηριότητας. Στο σπίτι, αποξηραμένα φυτά μπορούν να καταποθούν ως τσάι (φυτά βουτηγμένα σε ζεστό νερό) ή σπάνια, βάμματα (φυτά σε αλκοολούχα διαλύματα) ή εισπνεόμενα μέσω ατμού από τα βρασμένα εναιωρήματα των εξαρτημάτων. Αποξηραμένα μέρη φυτών μπορεί να προστεθούν σε λάδια ή βαζελίνη και να εφαρμοστούν εξωτερικά. Καταπλάσματα μπορούν, επίσης, να παρασκευαστούν από συμπηκνωμένο τσάι ή βάμματα (Brantner, A., and E. Grein. 1994).

Η επιστημονική ανάλυση των συστατικών των φυτών ακολουθεί μια λογική σαν ένα μονοπάτι. Τα φυτά συλλέγονται είτε τυχαία είτε παρέχοντας το μόλυβδο από τοπικούς θεραπευτές σε γεωγραφικές περιοχές, όπου βρίσκονται τα φυτά. Αρχικές εξετάσεις φυτών για πιθανές αντιμικροβιακές δραστηριότητες ξεκινούν τυπικά με τη χρήση ακατέργαστου υδατικού ή οινοπνευματώδεις εκχυλίσεων. Δεδομένου ότι σχεδόν όλα τα ταυτοποιημένα συστατικά από φυτά, τα οποία είναι δραστικά κατά των μικροοργανισμών είναι αρωματικά ή κορεσμένες οργανικές ενώσεις, οι οποίες λαμβάνονται πιο συχνά μέσω αρχικής εκχύλισης αιθανόλης ή μεθανόλης. Μάλιστα, πολλές μελέτες αποφεύγουν εντελώς τη χρήση υδατικής κλασματοποίησης, που είναι εξαιρετικές υδατοδιαλυτές ενώσεις, όπως πολυσακχαρίτες (π.χ άμυλο) και πολυπεπτίδια, συμπεριλαμβανομένης της φαμπατίνης και τις διάφορες λεκτίνες, οι οποίες είναι συνήθως πιο αποτελεσματικές ως αναστολείς της προσρόφησης παθογόνων (συνήθως ιού) και δεν θα εντοπιστούν στις τεχνικές διαλογής που χρησιμοποιούνται συνήθως (Zhang, Y., and K. Lewis. 1997).

Ενίοτε, τανίνες και τερπενοειδή θα βρεθούν στην υδατική φάση, αλλά πιο συχνά λαμβάνονται με θεραπεία με λιγότερο πολικούς διαλύτες. Ο Πίνακας 3 παραθέτει παραδείγματα διαλυτών εκχύλισης, όπου τα προκύπτοντα ενεργά κλάσματα αναφέρθηκαν σε πρόσφατες μελέτες. Σύνθετες λίρες, οι

οποίες σύμφωνα με βιβλιογραφία, χωρίζουν αποκλειστικά ειδικότερα τους διαλυτές, που υποδεικνύονται με έντονη γραφή στο τραπέζι. Οποιοδήποτε μέρος του φυτού μπορεί να περιέχει ενεργά συστατικά (Thomson, W. A. R. (ed.). 1978).

Για παράδειγμα, οι ρίζες των φυτών ginseng περιέχουν τις ενεργές σαπωνίνες και αιθέρια έλαια, ενώ τα φύλλα ευκαλύπτου συλλέγονται για τα αιθέρια έλαια και τις τανίνες τους. Μερικά δέντρα, όπως το βάλσαμο λεύκας, αποδίδουν χρήσιμες ουσίες στο φλοιό, τα φύλλα τους και τους βλαστούς.

Για αλκοολικές εκχυλίσσεις, τα μέρη των φυτών ξηραίνονται, αλέθονται σε μία λεπτή υφή και στη συνέχεια εμποτίζονται σε μεθανόλη ή αιθανόλη για εκτεταμένες περιόδους. Ο πολτός στη συνέχεια, διηθείται και πλένεται, πράγμα που μπορεί να στεγνώσει υπό μειωμένη πίεση και να επαναδιαλυθεί στην αλκοόλη σε καθορισμένη συγκέντρωση. Το νερό χρησιμοποιείται για εκχυλίσσεις και τα φυτά εμποτίζονται γενικά με αποσταγμένο νερό, που στεγνώνει με λεκέδες, γίνεται πολτός μέσω ανάμειξης και στη συνέχεια στραγγίζεται ή φιλτράρεται. Το διήθημα μπορεί να φυγοκεντρηθεί πολλές φορές για διαύγεια. Στη συνέχεια τα ακατέργαστα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δίσκους με δοκιμές διάχυσης και αραίωσης ζωμού για έλεγχο αντιμυκητιακού και αντιβακτηριακών ιδιοτήτων και σε μία ποικιλία αναλύσεων για έλεγχο αντιϊκής δράσης, όπως περιγράφεται παρακάτω (CH., and P. A. Thorpe. 1996).

Οι χημικοί φυσικών προϊόντων καθορίζουν περαιτέρω τις δραστικές χημικές ουσίες από ακατέργαστα εκχυλίσματα με ποικίλες μεθόδους. Πεταλοστεμουμόλη, μια φλεβανόλη από μωβ λιβαδί τριφύλλι, ελήφθη από το εκχύλισμα αιθανόλης μεταξύ η – εξανίου και 10% μεθανόλης. Το κλάσμα μεθανόλης χρωματογραφήθηκε και εκλούστηκε με τολουόλιο. Τερπενοειδή λακτόνες έχουν ληφθεί από διαδοχικές εκχυλίσσεις αποξηραμένων φλοιών με ξάνιο CHC13 και μεθανόλη, με δραστηριότητα συγκεντρωμένη στο κλάσμα. Οι χημικές δομές του καθορισμένου υλικού μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν.

Τεχνικές για περαιτέρω χημική ανάλυση περιλαμβάνουν χρωματογραφία, βιοαυτογραφία, ραδιοανοσοδοκιμασία, διάφορες μεθόδους αναγνώρισης δομών και νεότερα εργαλεία όπως φασματομετρία μάζας βομβαρδισμού γρήγορου ατόμου, σε σειρά φασματοκοπίας μάζας, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Borris, R. P. 1996).

Πρόσφατα, ένας ερευνητής εξέτασε μια ποικιλία εκχυλιστικών για την ικανότητα τους να διαλυτοποιούν αντιμικροβιακά από φυτά, καθώς και άλλους παράγοντες όπως η σχετική κατάταξη τους ως βιολογικοί κίνδυνοι και την ευκολία απομάκρυνσης του διαλύτη από το κλάσμα. Το επίκεντρό του στη μελέτη ήταν να παράσχει μια πιο τυποποιημένη εξαγωγή μεθόδων για μια μεγάλη ποικιλία ερευνητών, που εργάζονται σε διάφορες ρυθμίσεις. Αν και τα εκχυλιστικά δεν είναι από τα πιο συχνά που χρησιμοποιούμε, σε μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, η ακετόνη έλαβε την υψηλότερη συνολική βαθμολογία. Στην πραγματικότητα, σε μία ανασκόπηση 48 άρθρων που

περιγράφουν τον έλεγχο των φυτικών εκχυλισμάτων για αντιμικροβιακές ιδιότητες στα πιο πρόσφατα χρόνια, μόνο μία μελέτη χρησιμοποίησε ακετόνη ως εκχυλιστικό.

Από τους διαλύτες που αναφέρονται στον Πίνακα 3, οι οποίοι αναφέρονται στην πρόσφατη βιβλιογραφία με την υψηλότερη συχνότητα, ο ερευνητής τους κατέταξε με τη σειρά διχλωριούχο μεθυλένιο, μεθανόλη, αιθανόλη και νερό. Ο πίνακας 4 εμφανίζει την κατανομή βαθμολογιών για τους διάφορους διαλύτες που μελετήθηκαν. Η σειρά που υποδεικνύει τον αριθμό των αναστολέων που εκχυλίζεται με κάθε διαλύτη υποδεικνύει δύο συνέπειες: πρώτον, ότι τα περισσότερα ενεργά συστατικά δεν είναι υδατοδιαλυτά, υποστηρίζοντας τα δεδομένα αναφερόμενοι στον Πίνακα 3 και δεύτερον, ότι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες (αιθανόλη και μεθανόλη και οι δύο χρησιμοποιούνται ως αρχικά εκχυλιστικά στο 35% περίπου των μελετών που εμφανίζονται στην πρόσφατη βιβλιογραφία), μπορεί να μην καταδεικνύει τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην παραγωγή αντιμικροβιακών χημικών σε μία αρχική διαλογή. Αυτή η διαφορά θα πρέπει να εξεταστεί ως αναζήτηση νέων αντιμικροβιακών που εντείνονται σε δοκιμασίες αραίωσης και διάχυσης των κυψελιδών δίσκου ή άγαρ δοκιμασίας, όπου οι κλινικοί μικροβιολόγοι είναι πολύ εξοικειωμένοι με αυτές τις αναλύσεις. Προσαρμογές όπως η μέθοδος επικάλυψης άγαρ μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν (Eloff, J. N. 1998).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι εμβολιασμένες πλάκες ή σωλήνες είναι εκτεθειμένες σε υπεριώδη ακτινοβολία για έλεγχο για την παρουσία φωτοευαισθητοποιητικών φωτοχημικών ουσιών. Άλλες παραλλαγές αυτών των μεθόδων χρησιμοποιούνται επίσης. Για παράδειγμα, για να δοκιμάσετε τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων σε διεισδυτικά είδη *Shigella*, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων μπορούν να προστεθούν σε κυτταροκαλλιέργειες που εκτίθενται σε εμβόλιο *Shigella*. Η μείωση του κυτταροπαθητικού αποτελέσματος στη συνέχεια μετράται στην παρουσία του φυτικού εκχυλίσματος. Εκτός από αυτές τις αναλύσεις, μπορεί να είναι και αντιμυκητιακές φυτοχημικές, οι οποίες αναλύθηκαν με μια δοκιμασία βλάστησης σπορίων. Δείγματα φυτικών εκχυλισμάτων ή καθαρών ενώσεων μπορούν να προστεθούν σε σπόρια μυκητών που συλλέγονται από στερεές καλλιέργειες, οι οποίες τοποθετούνται σε γυάλινες πλάκες και επωάζονται σε κατάλληλη θερμοκρασία (συνήθως 25 βαθμούς κελσίου) για 24 ώρες. Διαφάνειες στη συνέχεια, στερεώνονται σε μπλε λακτοφαινόλης – βαμβάκι και παρατηρούνται μικροσκοπικά για βλάστηση σπορίων (Rana, B. K., U. P. Singh, and V. Taneja. 1997).

Φυσικά, μετά τον αρχικό έλεγχο των φυτοχημικών, θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες λεπτομερείς μελέτες των αντιβιοτικών τους. Σε αυτό το στάδιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο συγκεκριμένα μέσα και τα μίγματα να μπορούν να συγκριθούν αποτελεσματικά με αυτές ενός ευρύτερου φάσματος. Επί του παρόντος, χρησιμοποιούμε αντιβιοτικά. Η διερεύνηση των φυτικών εκχυλισμάτων είναι αποτελεσματική έναντι του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S.aureus*, που περιέχει ένα παράδειγμα αναζήτησης νέων ενώσεων που μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές έναντι

λοιμώξεων που επί του παρόντος είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν. Εξετάστηκε, επίσης, η δραστηριότητα τριών εκχυλισμάτων από τα καρποφόρα σώματα του δέντρου *Terminalia chebuda* rets έναντι του ευαίσθητου στη μεθυκιλλίνη και του ανθεκτικού στη μεθυκιλλίνη *S.aureus*, καθώς και 12 άλλων gram-αρνητικών και gram-θετικών βακτηρίων. Βρήκαν ότι τα παράγωγα του γαλλικού οξέος ήταν περισσότερο αποτελεσματικά έναντι των δύο τύπων *S.aureus* απ' ότι ήταν εναντίον άλλων ειδών (Sato, Y., H. Odetani, K. Singyouchi, T. Ohtsubo, M. Kihara, H. Shibata, and T. Higuti. 1997).

1.4.1.Ιοί

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση ιοκτόνων ή ανασταλτικών (αντιϊκών) δράσεων στα φυτά. Ερευνητές μπορεί να αναζήτησαν κυτταροπαθητικά αποτελέσματα ή σχηματισμό πλάκας ή για μετασχηματισμό ή πολλαπλασιαστικά αποτελέσματα σε κυτταρικές σειρές. Η αντιγραφή του ιού μπορεί να προσδιοριστεί με ανίχνευση ιικών προϊόντων όπως DNA, RNA ή πολυπεπίδια. Έχει σημειωθεί, ότι η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αντιικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε διάφορα εργαστήρια δεν είναι τυποποιημένες και επομένως τα αποτελέσματα συχνά δεν είναι συγκρίσιμα με των άλλων. Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς, επισημαίνουν επίσης, ότι στους ερευνητές πρέπει να γίνεται διάκριση μεταξύ των απλών τοξικών επιδράσεων και των παραγόντων στον ξενιστή. Πρέπει να αναφερθεί εδώ, ότι οι αντιικές αναλύσεις συχνά ελέγχουν για δραστικές ουσίες που εμποδίζουν την προσρόφηση των μικροοργανισμών στα κύτταρα ξενιστές. Αυτή η δραστηριότητα παραβλέπεται σε διαδικασίες διαλογής για αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ουσίες (Lee, C. D., M. Ott, S. P. Thyagarajan, D. A. Shafritz, R. D. Burk, and S. Gupta. 1996).

Ωστόσο, το μεγάλο σώμα της λογοτεχνίας συσσωρεύεται σε αντισυγκολλητικές προσεγγίσεις σε βακτηριακές λοιμώξεις. Τα φυτοχημικά θα πρέπει να αξιολογούνται για αυτήν την κατηγορία δράσης εκτός από τις δολοφονικές και ανασταλτικές τους δραστηριότητες (Paris, A., B. Strukelj, M. Renko, and V. Turk. 1993).

Πίνακας 3. Σύγκριση εκχυλιστικών με διαφορετικές παραμέτρους .

TABLE 4. Comparison of extractants on different parameters based on a five-point scale (1 to 5) and with different weights allocated to the different parameters^a

Parameter	Weight ^b	Acetone		Ethanol		Methanol		MCW ^c		Methylene dichloride		Water	
		A ^d	C ^e	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Quantity extracted	3	6	3	9	6	12	12	12	12	3	3	9	9
Rate of extraction	3	12	15	12	12	12	12	12	12	15	15	9	9
No. of compounds extracted	5	20	20	10	15	15	20	10	15	10	15	5	5
No. of inhibitors extracted	5	20	20	0	10	20	15	20	20	20	15	0	0
Toxicity in bioassay	4	16	16	8	8	0	0	8	8	8	8	16	16
Ease of removal	5	20	20	5	5	10	10	10	10	20	20	0	0
Hazardous to use	2	8	8	8	8	2	2	6	6	6	6	8	8
Total		102	102	52	64	71	71	78	83	79	79	47	47

Πίνακας 4. Διαλυτές που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση ενεργών συστατικών.

TABLE 3. Solvents used for active component extraction^a

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Dichloromethanol	Ether	Acetone
Anthocyanins (111)	Tannins (204)	Anthocyanins	Terpenoids (18)	Terpenoids (144)	Alkaloids	Flavonols (2)
Starches	Polyphenols (151)	Terpenoids (221)	Flavonoids (175)		Terpenoids	
Tannins (192)	Polyacetylenes (29, 62)	Saponins			Coumarins	
Saponins (53)	Flavonol (29, 100)	Tannins (221)			Fatty acids	
Terpenoids	Terpenoids (82)	Xanthoxyllines				
Polypeptides	Sterols (53)	Totarol (121)				
Lectins	Alkaloids (103)	Quassinoids (115)				
	Propolis	Lactones (180)				
		Flavones (189, 219)				
		Phenones (174)				
		Polyphenols (235)				

Πίνακας 6.Ενώσεις με αντί – HIV δράση

TABLE 6. Compounds with anti-HIV activity

Target	Compound	Class	Plant	Reference(s)	
Reverse transcriptase	Ellagitannin	Tannin	— ^a	155	
	Hydroxymaprounic acid, hydroxybenzoate	Terpenoids	<i>Maprounea africana</i>	173	
	Betulinic acid, platanic acid	Terpenoids	<i>Syzygium claviflorum</i>	74	
	Catechin	Polyphenol	—	147	
	Faicalin, quercetin, myricetin, baicalin	Flavonoids	<i>Quercus rubra</i> , others	165, 208, 216	
	Nigranoic acid	Terpenoids	<i>Schisandra sphaerandra</i>	212	
	Amentoflavone, scutellarein, others	Flavonoids, flavones	—	96, 146, 164, 165, 208, 217, 218	
	Benzophenanthridine	Alkaloid	—	200, 217	
	Protoberberine	Alkaloid	—	217	
	Psychotrines	Alkaloids	<i>Ipecac (Cephaelis ipecacuanha)</i>	217	
	Michellamine B	Alkaloid	<i>Ancistrocladus korupensis</i>	142	
	Suksdorfia	Coumarins	<i>Lomatium suksdorfii</i>	126	
	Coriandrin	Coumarin	Coriander (<i>Coriandrum sativum</i>)	99	
	Caffeic acid	Tannin	<i>Hyssop officinalis</i>	119	
	Cornusin, others	Condensed and hydrolyzable tannins	<i>Cornus officinalis</i> and others	111	
	Swertifranchesiide	Flavonoid	<i>Swertia franchetiana</i>	172	
	Salaspermic acid	Flavonoid	<i>Trypterygium wilfordii</i>	40	
	Glycyrrhizin	Flavonoid	Licorice (<i>Glycyrrhiza rhiza</i>)	102, 242	
	—	Protein	Cactus (<i>Opuntia streptacantha</i>)	3	
	Methyl nordihydroguaiaretic acid	Lignan	Many trees	80	
	Thuja polysaccharide	Polysaccharide	<i>Thuja occidentalis</i>	160	
	—	Lignin-polysaccharide complexes	Japanese white pine (<i>Pinus parviflora</i>)	126	
	Integrase	—	Flavonoids, flavones	—	32, 67
		MAP30, GAP31, DAP 32, DAP 30	Proteins	<i>Momordica charantia</i> , <i>Gelonium multiflorum</i>	97, 128–130
		—	Lectins	—	20
		Caffeic acid	Terpenoid	—	68
		Curcumin	Terpenoid	Turmeric (<i>Curcuma longa</i>)	139
Protease	Quercetin	Flavonoid	<i>Quercus rubra</i>	67	
	Carnosolic acid	Terpenoid	Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	171	
	Ursolic acid	Terpenoids	<i>Geum japonicum</i>	246	
Adsorption	—	Flavonoids, flavones	—	32, 48, 67	
	Mannose-specific lectins	Lectins	Snowdrop (<i>Galanthus</i>), daffodil (<i>Narcissus</i>), amaryllis (<i>Amaryllis</i>), <i>Gerardia</i>	148	
Viral fusion	Schumannifine 1	Alkaloid	<i>Schumanniphyton magnificum</i>	94	
	Prunellin	Polysaccharide	<i>Prunella</i>	249	
Syncytium formation	Mannose- and N-acetylglucosamine-specific lectins	Lectins	<i>Cymbidium</i> hybrid, <i>Epiactis helleborine</i> , <i>Listeria ovata</i> , <i>Urtica dioica</i>	20	
	Propolis	Mixture	Various trees	9, 52	
Interference with cellular factors	Michellamine B	Alkaloid	<i>Ancistrocladus korupensis</i>	142	
	MAR-10	Polysaccharide	<i>Hyssop officinalis</i>	81	
	Chrysin	Flavone	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	48	
	29,000-mol-wt protein	Protein	Pokeweed (<i>Phytolacca</i>)	41	
	Hypericin	Anthraquinone	St. John's wort (<i>Hypericum</i>)	41, 99	
Unknown	Camptothecin	Alkaloid	?	169	
	Trichosanthin, momorcharins	Ribosome-inactivating proteins	Cucurbitaceae family	141	
	—	Sulfated polysaccharide	<i>Prunella vulgaris</i>	214	
	—	Sulfonated polysaccharide	<i>Viola yedoensis</i>	154	
	Jacalin	Lectin	?	46, 64	
	Zingibroside R-1	Terpenoid	<i>Panax zingiberensis</i> Wu et Feng	86	
	Thiarubrin	Terpenoids	Asteraceae	98	
Chrysin	Flavonoid	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	96		
—	Essential oil/terpenoids	<i>Houttuynia cordata</i>	88		

^a —, unspecified.

1.4.2. Πρωτόζωα και ελμίνθες

Διαλογή φυτικών εκχυλισμάτων για τη δραστηριότητα κατά των πρωτοζώων και των ελμινθών μπορεί να είναι πιο περίπλοκη από τον έλεγχο για δραστηριότητα έναντι βακτηριών, μυκήτων ή ιών. Η ανάπτυξη των οργανισμών είναι συχνά πιο δύσκολη και λαμβάνονται λιγότεροι οργανισμοί. Οι αναλύσεις είναι γενικά ειδικές για τους μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα, ένας ερευνητής χρησιμοποίησε δύο μεθόδους για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας των ενώσεων έναντι του *Trypanosoma brucei*. Πρώτον, καλλιέργειες ιστών 66 ωρών των τρυπανομερών εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν με αναστρεψιμό μικροσκόπιο (σε αυτήν την περίπτωση το *mic* ορίστηκε ως η χαμηλότερη συκέντρωση εκχυλίσματος που ανέστειλλε πλήρως την ανάπτυξη των πανοσωμάτων). Δεύτερον, αυτοί οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν μια δοκιμασία φθορισμού βιωσιμότητας τρυπανοσώματος σε κυψελίδες μικροτιτλοδότησης (Freiburghaus, F., R. Kaminsky, M. H. H. Nkunya, and R. Brun. 1996).

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τα φυτικά χημικά που μπορεί να έχουν αντιμολυσματικές ιδιότητες για είδη *Plasmodium*. Μία μέθοδος για τον έλεγχο εκχυλισμάτων που μπορεί να είναι τοξική για το πλασμώδιο χρησιμοποιεί μικροοργανισμούς ραδιοσημασμένους σε μια δοκιμασία μόλυνσης ερυθροκυττάρων με πιάτα μικροτιτλοδότησης. Τα παρασιτισμένα ερυθροκύτταρα επώάζονται με και χωρίς ελεγχόμενες ουσίες και ο αριθμός των οργανισμών πλασμοδίου μετά την περίοδο επώασης ποσοτικοποιείται. Ένα άλλο εργαστήριο μετρά άμεσα μειώσεις στην ανάπτυξη του *Plasmodium* υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων σε δοκιμές φυτοχημικών. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα των μελετών σε ζώα από την πρόσφατη βιβλιογραφία είναι οι περιγραφές των επιδράσεων των πολυφαινόλων του τσαγιού *colong* στην οδοντική τερηδόνα σε αρουραίους και χολέρα σε ποντίκια. Άλλο μοντέλο βακτηριακής λοίμωξης είναι το *P. Aeguginosa*, το οποίο προκαλεί πνευμονική λοίμωξη μικρών αρουραίων και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της υποδόριας χορήγησης τζίνσενγκ. Οι αρουραίοι που έλαβαν θεραπεία είχαν μειωμένη παθολογία των πνευμόνων και βακτηριακό φορτίο, αν και θεωρήθηκε ενισχυμένη χημική ανοσία, οπότε είναι εν μέρει υπεύθυνοι (Song, Z. J., H. K. Johansen, V. Faber, and N. Hoiby. 1997).

Ίσως λόγω του μακροχρόνιου ενδιαφέροντος για εναλλακτικές λύσεις, τα φαρμακευτικά προϊόντα για χρήση σε αναπτυσσόμενες και τροπικές περιοχές ανά τον κόσμο, έχουν δείξει πολλές μελέτες που έχουν εξετάσει την αντιπρωτοζωϊκή αποτελεσματικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων. Δύο πρόσφατες μελέτες με αρουραίους χρησιμοποίησαν πειραματικές λοιμώξεις από *Entamoeba* για να δοκιμάσουν την αποτελεσματικότητα ενός ακατέργαστου ινδικού φυτικού εκχυλίσματος και ενός αιθανολικού εκχυλίσματος από φρούτα *Piper longum*, πιθανώς περιέχουν την αλκαλοειδή πιπερίνη. Μετά την τοπική εφαρμογή του εκχυλίσματος χλωροφορμίου του όσπριου *Milletia thonningii* στο

δέρμα ποντικών, διαπιστώθηκε ότι επέτρεψε την εγκατάσταση επακόλουθης λοίμωξης από *Schistosoma mansoni*.

Υπάρχουν, επίσης, μελέτες σε ζώα για τη δράση διαφόρων εκχυλισμάτων του φλοιού *Pteleopsis suberosa* κατά των ελκών, της παπάγιας λάτεξ κατά των λοιμώξεων με τον ελμινθό *Heligmosomoides polygyrus* και αιθέριου ελαίου *Sandrolina chamaecyparissus* κατά των λοιμώξεων από καντιντία (Suresh, B., S. Sriram, S. A. Dhanaraj, K. Elango, and K. Chinnaswamy. 1997).

Χορηγήθηκε ένα αγιουρβεδικό σκεύασμα, από το στόμα σε αρουραίους είτε πριν είτε μετά την πρόκληση διάρροιας από καστορέλαιο. Ενώ αυτή η δοκιμή δεν εξέτασε τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες του παρασκευάσματος αλλά, μάλλον, την επίδρασή του στην κινητικότητα του εντέρου και στα ιόντα απώλειας στα άρρωστα ζώα. Έδειξε ότι είχε και τα δύο, δηλαδή, προστατευτικό και θεραπευτικό αποτέλεσμα σε αρουραίους. Μία παρόμοια μελέτη με παρόμοια αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους με χημικά επαγόμενα έλκη. Η αγιουβερδική *Ashwagandha* βρέθηκε να παρατείνει την περίοδο επιβίωσης των ποντικών που έχουν μολυνθεί με *Aspergillus*, μία επίδραση που πιστεύεται ότι προκαλείται από αυξημένη λειτουργία μακροφάγων (Dhuley, J. 1998).

Φυσικά, έχουν χρησιμοποιηθεί φυτά για αιώνες για τη θεραπεία λοιμώξεων και άλλων ασθενειών στον άνθρωπο και σε ομάδες ιθαγενών, αλλά οι ελεγχόμενες κλινικές μελέτες είναι σπάνιες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι παραδοσιακοί θεραπευτές συνεργάζονται με εκπαιδευμένους επιστήμονες, που έχουν αρχίσει να διατηρούν αρχεία για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φυτοχημικών θεραπειών, αλλά αυτές είναι γενικά μη ελεγχόμενες και μη τυχαιοποιημένες μελέτες. Παραδείγματα των δοκιμών από ομότιμους για τη χρήση φυτοχημικών σε ανθρώπους αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

Μία σύγχρονη επιστημονική μελέτη (άρα, όχι μία τυχαία δοκιμή) της αποτελεσματικότητας των μαστικών ραβδιών σε σχέση με τις οδοντόβουρτσες στην προώθηση της στοματικής υγιεινής διεξήχθη στη Δυτική Αφρική. Οι συγγραφείς της μελέτης διαπίστωσαν, μειωμένη αποτελεσματικότητα σε χρήστες μασήματος ραβδιών σε σύγκριση με χρήστες οδοντόβουρτσας και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αντιμικροβιακές χημικές ουσίες που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στα ραβδιά δεν πρόσθεσαν κανένα όφελος για την υγεία του στόματος. Επίσης, σχετικά με τη στοματική υγεία, στοματικά διαλύματα που περιέχουν διάφορα αντιμικροβιακά έχουν αξιολογηθεί σε ανθρώπους. Στοματικά που περιέχουν φυτοχημικά δεν βρέθηκαν να είναι τόσο αποτελεσματικά στη μείωση της πλάκας ή της κλινικής ουλίτιδας (Walker, C. B. 1988).

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί λίγες τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές φυτικών αντιμικροβιακών ουσιών. Υπήρξε σύγκριση ενός αποσπάσματος *Solanum nigrescens* με νυστατίνη.

Και τα δύο χορηγούνται ενδοκολπικά ως υπόθετα, σε γυναίκες με επιβεβαιωμένη κολπίτιδα από *C. albicans*.

Το εκχύλισμα αποδείχθηκε τόσο αποτελεσματικό όσο η νυστατίνη. Το 1996 οι μακροχρόνιες αναγνωρισμένες επιδράσεις του χυμού cranberry στο ουροποιητικό σύστημα σε λοιμώξεις μελετήθηκαν σε μία ομάδα ηλικιωμένων γυναικών. Δεν υπάρχουν δεδομένα, που να παρέχονται από τον συγγραφέα σχετικά με τα κλινικά αποτελέσματα, αλλά αντιμετωπίζονται σε γυναίκες, που είχαν λιγότερα βακτήρια στα ούρα του από τις γυναίκες που δεν είχαν λάβει θεραπεία (Avorn, J. 1996).

Τέσσερα διαφορετικά σκευάσματα Αγιουβέρδας δοκιμάστηκαν έναντι ενός εικονικού φαρμάκου για την αποτελεσματικότητα τους κατά της κοινής ακμής. Ένα από τα σκευάσματα, *sunder vati*, παρήγαγε σημαντικά μεγαλύτερη μείωση του αριθμού των βλαβών σε σχέση με τα άλλα τρία και το εικονικό φάρμακο.

Δεν παρατηρήθηκαν τοξικές παρενέργειες. Δύο πρωταρχικές ενώσεις που προέρχονται από τροπικά φυτά, *provir*, για τη θεραπεία των αναπνευστικών ιογενών λοιμώξεων και το *Virend*, ένας τοπικός αντιέρπης, δοκιμάστηκαν σε κλινικές μελέτες το 1994. Έκτοτε, η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του *Virend* καθιερώθηκε και σε άλλες μελέτες (Orozco-Torpete, et al. 1997).

1.4.3.Εμπορική διαθεσιμότητα και ασφάλεια ενώσεων

Μεγάλη ποικιλία φυτικών εκχυλισμάτων, μειγμάτων, μεμονωμένων φυτών και ενώσεις είναι διαθέσιμες στις Ηνωμένες Πολιτείες χωρίς ιατρική συνταγή μέσω καταστημάτων υγιεινής διατροφής και λιανοπωλητών βιταμινών. Για παράδειγμα, παρασκευάσματα φλαβονών (εμπορικές ονομασίες *Flavons 500* και *Citrus Bioflavonoids*) πωλούνται από προμηθευτές συμπληρωμάτων. Η καψαϊκίνη εμφανίζεται σε μια τοπική κρέμα κατά της αρθρίτιδας που διατίθενται σε παραδοσιακά παντοπωλεία και φαρμακεία. Τα εξωχρηματιστηριακά παρασκευάσματα είναι σχετικά μη ρυθμισμένα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, παρασκευάσματα αβέβαιης και μεταβλητής καθαρότητας.

Πολλά καταστήματα καλούν, επίσης, ολόκληρα αποξηραμένα φυτά, τα οποία έχουν βρεθεί περιστασιακά να αναγνωρίζονται εσφαλμένα, με δυνητικά καταστροφικές συνέπειες. Προφανώς, μπορούν να καλλιεργηθούν και πολλά φυτά από τον καταναλωτή σε οικιακούς κήπους. Το 1994, το Κογκρέσο πέρασε ένα νόμο περί Αγωγής Υγείας για το Συμπλήρωμα Διατροφής, που απαιτούσε η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων να αναπτύξει απαιτήσεις επισήμανσης ειδικά σχεδιασμένες για προϊόντα που περιέχουν συστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα και βότανα που προορίζονται να συμπληρώσουν τη δίαιτα. Οι νέοι κανόνες, που εκδόθηκαν στα τέλη του 1997, απαιτούν προϊόντα που πρέπει να επισημαίνονται ως συμπληρώματα διατροφής και να φέρουν ένα Πίνακα "Συμπληρωματικά Γεγονότα" με πληροφορίες παρόμοιες με τους πίνακες "Στοιχεία διατροφής", που εμφανίζονται στα επεξεργασμένα τρόφιμα. Οι κανόνες απαιτούν, επίσης, τα προϊόντα που

περιέχουν βοτανικά συστατικά να προσδιορίσουν το μέρος της εγκατάστασης που χρησιμοποιείται (Food and Drug Administration. 1997).

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων ρυθμίζει τα συμπληρώματα διατροφής ως τρόφιμα, εφόσον δεν υπάρχουν ισχυρισμοί για φάρμακα για αυτά. Άλλοι οργανισμοί που επιβλέπουν τα βότανα και τα βοτανικά είναι η επιτροπή της Αμερικανικής Διαιτολογικής Εταιρείας για τις Ετικέτες Συμπληρωμάτων Διατροφής (Anonymous. 1997).

Η πρώτη ερευνητική νέα εφαρμογή φαρμάκου για φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα, διαθέσιμα με ιατρική συνταγή, υποβλήθηκε το 1997. Αν αυτή είναι η αρχή μίας ουσιαστικής "βιασύνης" στην αγορά είναι ασαφές.

Ορισμένοι αναλυτές, προτείνουν ότι οι φαρμακευτικές εταιρείες δεν θα επενδύσουν σε δοκιμές φαρμάκων για βοτανικά, δεδομένου ότι είναι ακόμη ασαφές εάν μπορούν να υποβληθούν σε ιδιοκτησιακές αξιώσεις. Ένας αναλυτής του κλάδου, συμφωνεί, λέγοντας ότι οι περισσότερες νέες έρευνες για τα αντιβιοτικά διεξάγονται αντ' αυτού από εταιρείες βιοτεχνολογίας (Alper, J. 1998).

Φυτά ή και φυτικά συστατικά που είναι επί του παρόντος διαθέσιμα στους καταναλωτές ως συμπληρώματα μέσω εμπορικών καταστημάτων είναι μεταξύ εκείνων που παρατίθενται στο Πίνακα 1. Οι χονδρικές ταξινομήσεις τοξικότητας παρέχονται, επίσης. Έχει αναγνωρισθεί εδώ και καιρό ότι πιθανώς τα απευτικά τρόφιμα μπορεί, επίσης, να περιέχουν ουσίες που δρουν ως δηλητήρια σε ανθρώπους. Κλινικοί επιστήμονες και ιατροί συνιστούν, καλύτερα να γνωρίζεται την ευρέως διαδεδομένη αυτοθεραπεία με αυτά τα προϊόντα και να εξεταστούν οι επιπτώσεις τους στους ασθενείς (Liener, I. E. 1970).

1.5.Συμπεράσματα

Επιστήμονες από διαφορετικά πεδία ερευνούν εκ νέου τα φυτά με γνώμονα την αντιμικροβιακή τους χρησιμότητα. Μία αίσθηση επείγουσας ανάγκης συνοδεύει την αναζήτηση ως το ρυθμό της εξαφάνισης των ειδών που συνεχίζεται. Εργαστήρια του κόσμου έχουν βρει κυριολεκτικά άμμους φυτοχημικών που έχουν ανασταλτικές επιδράσεις σε όλους τους τύπους των μικροοργανισμών. Περισσότερες από αυτές τις ενώσεις θα πρέπει να υποβληθούν σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους για να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητά τους σε συστήματα ολόκληρου του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων ειδικών μελετών τοξικότητας, καθώς και εξέτασης των επιπτώσεων τους στην ωφέλιμη φυσιολογική μικροχλωρίδα. Θα ήταν επωφελές, να υπάρξει μία τυποποίηση μεθόδων εκχύλισης και δοκιμών, έτσι ώστε η αναζήτηση να μπορούσε να είναι πιο συστηματική και ερμηνευτική για να διευκολυνθούν τα αποτελέσματα. Επίσης, εναλλακτικοί μηχανισμοί για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων θα πρέπει να περιλαμβάνονται στους

αρχικούς ελέγχους δραστηριότητας. Η διαταραχή της πρόσφυσης είναι ένα παράδειγμα μιας αντι-λοιμώδους δραστηριότητας, που δεν ελέγχεται συνήθως επί του παρόντος. Η προσοχή σε αυτά τα ζητήματα θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία εξαιρετικά απαραίτητη νέα εποχή χημειοθεραπευτικής θεραπείας των λοιμώξεων με χρήση αρχών που προέρχονται από φυτά.

Μπορεί, ακόμη, να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η χρήση υπερήχων σε μεθόδους κατά την εκχύλιση βελτιώνει αποτελεσματικά την απόδοση παραγωγής. Συνολικά, υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα από επιλεγμένα φυτά έχουν αντιμικροβιακή δράση, καθώς αναστέλλουν την ανάπτυξη δοκιμασμένων παθογόνων τροφίμων και μικροοργανισμών, που αλλοιώνουν. Τα αιθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα ροζέλας και γαρυφάλου είχαν αντιμικροβιακή δράση έναντι όλων των ελεγχόμενων μικροοργανισμών. Μείωση του κυτταρικού pH, παρατηρήθηκε με διάρρηξη του κοιταρικού τοιχώματος σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με εκχυλίσματα φυτού, υποδηλώνοντας έναν πιθανό μηχανισμό αντιβακτηριδιακής δράσης. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα φυτικά εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικοί συντηρητικοί παράγοντες στα τρόφιμα για να εξαλείφουν ή ελέγχουν την ανάπτυξη αλλοιώσεων και παθογόνων μικροοργανισμών.

Κεφάλαιο 2:

Μελέτη των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν

2.1.Εισαγωγή

Στα τρόφιμα υπάρχει μεγάλη ευκολία μόλυνσεων και σχεδόν πάντα έχουν μεγάλη απορροφητικότητα σε θρεπτικά στοιχεία οι φορείς μικροοργανισμών. Ο όρος "μικροοργανισμός" αφορά τους ζωντανούς οργανισμούς από διάφορες ταξινομικές ομάδες με αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Τα βακτήρια, τα οποία είναι οι κύριοι μικροοργανισμοί που γίνεται χρήση τους, είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, που πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Τα βακτήρια έχουν διάφορες μορφές και μεγέθη όπως ράβδοι, κόκκοι και σπείρες. Διακρίνονται σε κατά Gram θετικά και κατά Gram αρνητικά. Πρόκειται για την κυριότερη πηγή μόλυνσης των τροφίμων.

Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε έγινε χρήση ορισμένων μικροοργανισμών για να βγει το συμπέρασμα εάν οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ισχυρή ή όχι αντιμικροβιακή δράση. Οι μικροοργανισμοί είναι ο *Enterococcus faecalis*, ο *Escherichia coli*, η *Listeria Monocytogenes*, ο *Pseudomonas aeruginosa*, ο *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* και η *Yersinia enterocolitica*.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η αλλοίωση των τροφίμων που προκαλείται από μικροοργανισμούς εξακολουθεί να επηρεάζει ευρέως όλους τους τύπους τροφίμων και προκαλεί σπατάλη και απώλεια τροφίμων, ακόμη και στις αναπτυγμένες χώρες. Έχει υπολογιστεί ότι οι ετήσιες απώλειες τροφίμων παγκοσμίως φτάνουν έως και το 40% λόγω διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της αλλοίωσης από μικροοργανισμούς. Τα βακτήρια, η μαγιά και οι μούχλες είναι οι συνήθεις τύποι μικροοργανισμών που ευθύνονται για την αλλοίωση σημαντικού αριθμού τροφίμων και προϊόντων διατροφής. Μόλις αυτοί οι μικροοργανισμοί φτάσουν στα τρόφιμα, αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά συστατικά και παράγουν μεταβολιτές, που προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων. Η τροφιμογενής νόσος είναι ένα άλλο διαχυτό πρόβλημα ασφάλειας των τροφίμων, που προκαλείται από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων διατροφής, η οποία αποτελεί σημαντική ανησυχία για την ασφάλεια της δημόσιας υγείας (Lianou et al., 2016).

Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν, φυσικά, στο περιβάλλον, επομένως μπορούν εύκολα να φτάσουν στα τρόφιμα κατά τη συγκομιδή, τη σφαγή, την επεξεργασία και τη συσκευασία. Αυτοί οι μικροοργανισμοί, μπορούν να επιβιώσουν κάτω από αντίξοες συνθήκες που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση τροφίμων, όπως χαμηλή θερμοκρασία, συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας,

συσκευασία κενού, καθώς και να αντισταθούν στη συμβατική παστερίωση. Έτσι, υπάρχει μια σημαντική ανησυχία μεταξύ των καταναλωτών σχετικά με τον κίνδυνο χρήσης συνθετικών πρόσθετων για την ανθρώπινη υγεία, που οδήγησε στη μείωση της χρήσης αυτών των χημικών ουσιών στη συντήρηση τροφίμων. Ως εκ τούτου, απαιτούνται νέες φιλικές προς το περιβάλλον μεθοδολογίες για τη μείωση της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων και την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, χωρίς τη χρήση χημικών συντηρητικών (Gyawali and Ibrahim, 2014; Caleja et al., 2016; Kalem et al. , 2017).

Σε αυτήν την έρευνα δοκιμάσαμε την ικανότητα των βακτηρίων να παράγουν ορατή ανάπτυξη σε ορισμένη συγκέντρωση.

Τα δύο στελέχη (SA και EC) έχουν επιλεγεί ως παράδειγμα των Gram – θετικών και Gram – αρνητικών βακτηρίων για τη μελέτη του αντιβακτηριακού μηχανισμού φυτικών εκχυλισμάτων. Εν συντομία, καλλιεργήθηκαν βακτηριακά κύτταρα (SA και EC) σε ζωμό θρεπτικών συστατικών.

2.2.ESCHERICHIA COLI

Ένας από τους κύριους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήσα στα πειράματα είναι ο *Escherichia coli*. Πρόκειται, για έναν μικροοργανισμό που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και χαρακτηρίζεται ως εντεροβακτήριο. Πιο αναλυτικά, είναι αερόβια, Gram αρνητικά και μη σπορογόνα βακτήρια. Τα κολοβακτηρίδια που έχουν προέλευση το έντερο ενδημούν στον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων, γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως " δείκτης κοπρομόλυνσης ". Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ο πιο χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος της ομάδας της εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδών. Η ύπαρξη αυτού του βακτηρίου στα τρόφιμα οφείλεται σε επιμόλυνση τους. Μπορεί να καταστραφεί με ήπια θερμική επεξεργασία και με αφυδάτωση ή κατάψυξη. Επομένως, βγαίνει το συμπέρασμα πως αποτελεί και έναν δείκτη των συνθηκών υγιεινής, που επικρατούν στη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι πως μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση στα τρόφιμα. Αυτό δημιουργείται με ανάπτυξη σε μεγάλο βαθμό υποστρωμάτων, όπου γίνεται χρήση ενέργειας από υδατάνθρακες και άλλες οργανικές ενώσεις. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 10 μέχρι και 46 βαθμούς Κελσίου. Προκαλούν ζύμωση των σακχάρων και παράγουν σε μεγάλες ποσότητες οξέα και αέρια. Ακόμη γίνεται παραγωγή ανεπιθύμητων οσμών στα τρόφιμα.

Όπως είπαμε προηγουμένως προέρχεται από τον εντερικό σωλήνα, όπου μεγαλώνει και πολλαπλασιάζεται. Έχει την πρωτιά στους μικροοργανισμούς σε ότι έχει να κάνει με τη συχνότητα που βρίσκεται μέσα στα κόπρανα και αποτελεί δείκτη εντερικής μόλυνσης των τροφίμων. Τα

στελέχη του στο μεγαλύτερο ποσοστό τους προκαλούν ζύμωση της λακτόζης με παραγωγή αερίου και ινδόλης (Τυμπής ,Πετράκης ,Κοντελές et.al).

Η *Escherichia coli* είναι η κυρίαρχη μη παθογόνος προαιρετική χλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου. Ορισμένα στελέχη *E.coli*, ωστόσο, έχουν αναπτύξει την ικανότητα να προκαλούν ασθένειες του γαστρεντερικού, του ουροποιητικού ή του κεντρικού νευρικού συστήματος ακόμη και στους πιο ισχυρούς ανθρώπινους ξενιστές. Τα διαρροϊκά στελέχη του *E.coli* μπορούν να χωριστούν σε τουλάχιστον έξι διαφορετικές κατηγορίες με αντίστοιχα διακριτά παθογόνα σχήματα. Συνολικά, αυτοί οι οργανισμοί αντιπροσωπεύουν, πιθανώς, την πιο κοινή αιτία παιδικής διάρροιας παγκοσμίως. Αρκετά διακριτά κλινικά σύνδρομα συνοδεύουν λοίμωξη από διαρροϊκές κατηγορίες *E.coli*, συμπεριλαμβανομένης της διάρροιας των ταξιδιωτών (εντεροτοξιογόνικη *E.coli*), της αιμορραγικής κολίτιδας και του αιμολυτικού-ουραιμικού συνδρόμου (εντεροαιμορραγικό *E.coli*), της επίμονης διάρροιας (εντεροαιμορραγικό) και της διαρροϊκής διάρροιας του νερού (*enteroaggregare*) σε βρέφη (εντεροπαθογόνο *E.coli*). Τα παθογόνα τους σχήματα αποτελούν τη βάση των κλινικών εκδηλώσεων, της διαγνωστικής προσέγγισης και της επιδημιολογικής έρευνας αυτών των σημαντικών παθογόνων (Nataro, James P., and James B. Kaper.et.al.).



Εικόνα 2.2.*Escherichia coli* κύτταρο βακτηριδίου (Kaper, James B.et.al).

Σ' αυτό το βακτήριο οφείλονται πολλές τροφικές δηλητηριάσεις που παθαίνουμε όπως, επίσης, πνευμονία και λοίμωξη του ουροποιητικού, όπως είναι γνωστή σε όλους μας ουρολοίμωξη. Πολύ συχνό φαινόμενο είναι η ανάπτυξη του μικροβίου στο νερό, είτε αυτό είναι πόσιμο είτε δεν είναι. Άλλες περιπτώσεις που μπορεί να έχει αναπτυχθεί είναι σε κάποια λίμνη ή στη θάλασσα (Τυμπής ,Πετράκης ,Κοντελές et.al).

2.3.SALMONELLA.SPP

Οι σαλμονέλλες ανήκουν και αυτές στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Είναι Gram αρνητικά, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα και κοκκοβακτηρίδια. Ένα πολύ διαδεδομένο είδος του γένους είναι η *Salmonella Typhimurium*, της οποίας και γίνεται χρήση στα πειράματα.

Συνήθως, η σαλμονέλλα δεν αποικοδομεί τη λακτόζη και τη σακχαρόζη. Είναι γνωστά για την παραγωγή καταλάσης ενώ ως πηγή άνθρακα κάνουν χρήση κιτρικών ιόντων. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 6 έως 45 βαθμούς κελσίου. Η τέλεια θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι οι 37 βαθμοί, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι τιμές pH, στις οποίες μπορούν να αναπτυχθούν είναι από 4,1 έως 9,0. Ακόμη για την ανάπτυξή τους παίζει ρόλο και η ενεργότητα ύδατος (aw). Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας ύδατος διαφέρει και είναι ανάλογα το είδος του προϊόντος. Κυμαίνεται από 0,94 έως 0,95.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της σαλμονέλλας είναι πως προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις. Μεγάλο ρόλο στις τροφικές δηλητηριάσεις παίζει η κατάσταση που βρίσκεται ο οργανισμός, δηλαδή ανάλογα την ανθεκτικότητα του καθενός. Επίσης, παίζει ρόλο η μολυσματική ικανότητα του στελέχους και ο αριθμός των βακτηρίων που έχουν ληφθεί με το τρόφιμο. Γενικά η σαλμονέλλα είναι και αόρατη, δηλαδή μπορεί αρκετά τρόφιμα να περιέχουν μεγάλο αριθμό σαλμονέλλας χωρίς να υπάρχουν αλλοιώσεις στην οσμή, την εμφάνιση ή τη γεύση τους.

Είναι πολύ ισχυρά βακτήρια κι αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι ακόμη και ένα βακτήριο μπορεί να προκαλέσει τροφική λοίμωξη αλλιώς σαλμονέλλωση. Βέβαια για να συμβεί αυτό πρέπει να βοηθούν και οι συνθήκες, που κάνουν το τρόφιμο να αναπτυχθεί ή και η ευαισθησία των ίδιων των ατόμων.

Για να προσδιοριστούν τα βακτήρια της σαλμονέλλας στα τρόφιμα χρειάζεται μία αρκετά περίπλοκη διαδικασία, καθώς ο αριθμός τους είναι χαμηλός, σε σύγκριση με την υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα.



Εικόνα 2.3.Σαλμονέλλα ή *Salmonella* spp (Dantas, Stéfani TA, et al.).

Για να προσδιορίσουμε την σαλμονέλλα γίνεται χρήση διάφορων τεχνικών. Μία τεχνική είναι σε στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα. Πραγματοποιείται ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών και ακολουθεί επώαση στους 35 βαθμούς κελσίου. Τα βακτήρια της σαλμονέλλας σχηματίζουν άχρωμες ή ροζ ημιδιαφανές ή διαφανείς αποικίες ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει έχει χρώμα ροζ προς το κόκκιν. Τέλος, τα βακτήρια που συμβάλλουν στην αποιοδόμηση της λακτόζης ή της σακχαρόζης σχηματίζουν κιτρινοπράσινες ή πράσινες αποικίες στο υπόστρωμα (Τυμπής ,Πετράκης ,Κοντελές et.al).

Το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* προκαλεί τη τυφική σαλμονέλλωση, η οποία είναι γνωστή ως τυφοειδής πυρετός. Τα χαρακτηριστικά του είναι η μόλυνση και η αλλοίωση διάφορων οργάνων. Αυτή η κατηγορία σαλμονέλλας δημιουργεί μεγάλο κίνδυνο για όλο τον οργανισμό κάνοντας την ασθένεια ακόμη και θανατηφόρα. Η σαλμονέλλα προκαλείται όταν το μικρόβιο της διεισδύει στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και προκαλεί φλεγμονή. Το συγκεκριμένο βακτήριο συναντάται συχνά σε νεαρά άτομα και σε ζώα όπως οι πάπιες, τα βοοειδή, τα πρόβατα και τα άλογα. Προκαλεί μολυσματική διάρροια.

Για παράδειγμα, η μόλυνση ποντικών με *Salmonella typhimurium* οδηγεί σε συστηματική μόλυνση και μια ασθένεια παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στους ανθρώπους μετά τη μόλυνση με *S.typhimurium*. Το έμφυτο αναπαραγωγικό σύστημα μπορεί να περιορίσει την αναπαραγωγή του *S.typhimurium* σε κάποιο βαθμό, αλλά για τον αποτελεσματικό έλεγχο και την εκρίζωση των βακτηρίων, η επίκτητη ανοσία είναι απαραίτητη (Mittrücker, Hans-Willi et.al.).

Για την προστασία των τροφίμων από τη σαλμονέλλα η βιομηχανία τροφίμων έχει δημιουργήσει συσκευασίες από κενό ή υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες με υψηλή δηλαδή συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα. Βέβαια με το πέρασμα του χρόνου υπάρχει μείωση του μίγματος αερίων στις συσκευασίες που βρίσκονται ακόμα στα ράφια των μαγαζιών με αποτέλεσμα το προϊόν να μην είναι τελείως ασφαλές. Επιπλέον, η σαλμονέλλα έχει την ιδιότητα να καταφέρνει να επιβιώνει σε περιβάλλον, όπου η υγρασία είναι χαμηλή. Τέτοια παραδείγματα είναι οι σκόνες γάλακτος ή αυγού (Τυμπής ,Πετράκης ,Κοντελές et.al).

2.4.LISTERIA MONOCYTOGENES

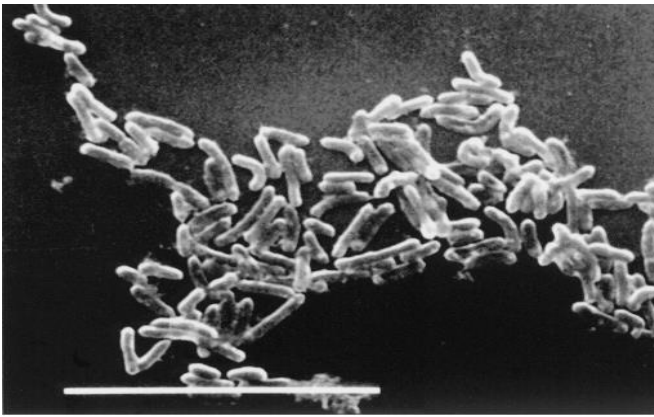
Η *Listeria Monocytogenes* ανήκει στο είδος *Listeria* της οικογένειας *Listeriaceae*. Είναι βακτήριο Gram αρνητικό, μη σπορογόνο και το σχήμα του μοιάζει με κοντής ράβδου ή κόκκου. Μπορεί να κινηθεί σε θερμοκρασίες από 20 έως 25 βαθμούς κελσίου και να μείνει ακίνητο στους 37 βαθμούς κελσίου.

Είναι το βακτήριο που προκαλεί στα τρόφιμα την λεγόμενη λιστερίωση. Είναι αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο και έχει την ικανότητα να επιβιώσει παρουσίας ή μη οξυγόνου. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 1 έως 44 βαθμούς κελσίου με την άριστη να είναι μεταξύ 30 και 37 βαθμούς. Έχει ψυχότροφο χαρακτήρα, που σημαίνει πως μπορεί να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασίες ψύξης. Τα περισσότερα στελέχη της είναι παθογόνα για τον άνθρωπο προκαλώντας σοβαρές τροφικές δηλητηριάσεις όπως προείπαμε, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει νοθετήσει κανονισμούς με τους οποίους επιτρέπονται συγκεκριμένα ποσοτικά όρια του εν λόγω βακτηρίου, τα οποία εξαρτώνται από το είδος του τροφίμου. Για παράδειγμα, στις παιδικές τροφές ακολουθείται ο κανόνας της μηδενικής ανοχής στην παρουσία του βακτηρίου, πράγμα που σημαίνει πως στα 25 g δείγματος απαγορεύεται η παρουσία του βακτηρίου.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες τροφίμων. Αυτό που μπορεί σε όλη τη διάρκεια ζωής τους να αναπτύσσουν τη *Listeria monocytogenes* και αυτοί που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του. Στην πρώτη κατηγορία επιτρέπει μέχρι 100 cfu /g (25 g) η παρουσία του βακτηρίου στα σημεία πώλησης ενώ στη δεύτερη κατηγορία το όριο είναι ίδιο.

Το συγκεκριμένο βακτήρι παρουσιάζει μεγάλη αύξηση στις δημητηριάσεις από καταναλωτές την τελευταία δεκαετία γι' αυτό και έχουν ληφθεί συγκεκριμένα μέτρα, καθώς ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό καταναλωτών μπορεί να κινδυνέψει ακόμη και με θάνατο. Συγκεκριμένες ομάδες ανθρώπων είναι πιο ευαίσθητες όπως οι έγκυες γυναίκες, στις οποίες οι πιθανότητες να παρουσιάσουν λιστερίωση είναι 12 φορές μεγαλύτερες απ' ότι σε μία γυναίκα η οποία δεν είναι έγκυος.

Στα τρόφιμα που δεν πραγματοποιείται υψηλή θερμική επεξεργασία και που η συντήρησή τους γίνεται με ψύξη η απομόνωση της *Listeria monocytogenes* είναι μεγαλύτερη. Τέτοια τρόφιμα, κυρίως, είναι τα έτοιμα προς κατανάλωση. Στο νοπό γάλα παρατηρείται μεγαλύτερη απορρόφηση, καθώς έρχεται σε άμεση επαφή με τα ζώα που δίνουν το γάλα και τις ζωοτροφές. Τα πιο ευαίσθητα είναι τα τυριά, στα οποία και παρατηρούνται οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης. Υψηλά ποσοστά, επίσης έχουν τα κοτόπουλα και τα λουκάνικα αλλά και πολλά προϊόντα ψαριών που έχουν υποστεί ζύμωση. Στις ωμές φύτρες λαχανικών, ακόμη, όταν υπάρχει υγρασία και ζέστη αναπτύσσεται γι' αυτό το λόγο πρέπει πάντα να πλένουμε τα λαχανικά ή να τα βράζουμε προτού τα φάμε (Τυμπής, Πετράκης, Κοντελής et.al).



Εικόνα 2.4. Φωτογραφία με το βακτήριο της *Listeria Monocytogenes* (Gardan, Rozenn, et al.).

Την τελευταία δεκαετία το βακτήριο *Listeria monocytogenes* έχει ενοχοποιηθεί ως ο αιτιολογικός οργανισμός σε πολλές εστίες τροφιμογενών ασθενειών. Οι επιδημιολογικές έρευνες μπορούν να κάνουν χρήση διαδικασιών τυποποίησης στελεχών, όπως η ανάλυση ενζύμου περιορισμού DNA ή ηλεκτροφορητική τυποποίηση ενζύμων. Το βακτήριο εμφανίζεται ευρέως στα τρόφιμα, με τις υψηλότερες συχνότητες να εντοπίζονται στο κρέας, τα πουλερικά και τα θαλασσινά (Farber, Jeffrey M et.al.).

2.5. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Οι τροφιμογενείς ασθένειες αποτελούν μείζονα ανησυχία παγκοσμίως. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί περίπου 250 διαφορετικές ασθένειες και τα βακτήρια είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες των δύο τρίτων των τροφιμογενών επιδημιών. Μεταξύ των κυρίαρχων βακτηριών που εμπλέκονται σε αυτές τις ασθένειες, ο *Staphylococcus aureus* είναι η κύρια αιτία γαστρεντερίτιδας που προκύπτει από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Η τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο οφείλεται στην απορρόφηση σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών που έχουν προσχηματιστεί στο φαγητό (Le Loir, Yves, Florence Baron et.a;).

Ο *Staphylococcus aureus* ανήκει στο γένος *Staphylococcus*, της οικογένειας *Micrococcaceae*. Οι σταφυλόκοκκοι είναι ευρέως γνωστοί μέσα στο περιβάλλον. Εκεί που συναντώνται πιο συχνά είναι μέσα στο δέρμα και συγκεκριμένα στα αποστήματα και στον ρινοφάρυγγα στους ανθρώπους αλλά και στα ζώα. Όσον αφορά την υγιεινή των τροφίμων πρόκειται για μία από τις κυριότερες αιτίες των τροφικών δηλητηριάσεων, το οποίο είναι ένα σημαντικό πρόβλημα.

Μία από τις κυριότερες τροφολοιμώξεις είναι η σταφυλοκοκκική τοξίνωση ή σταφυλοκοκκίαση, η οποία δημιουργείται από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν στελέχη σταφυλόκοκκων και

εξωτιζίνες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες. Γενικά οι εξωτιζίνες δεν επηρεάζονται από τις επεξεργασίες που γίνονται, οι οποίες στόχο έχουν την ελάτωση των στελεχών των σταφυλόκοκκων.

Οι κύριοι υπεύθυνοι για τις μολύνσεις με σταφυλόκοκκο είναι τα ζώ και οι άνθρωποι. Η πιο συχνή μόλυνση γίνεται μετά την παρασκευή των τροφίμων και συγκεκριμένα ότα οι συνθήκες της θερμοκρασίας είναι πολύ ευνοϊκές για πολλές ώρες.

Η αναζήτηση των εντεροτοξίνων, που είναι οι εξωτιζίνες σ' ένα τρόφιμο είναι διαδικασία αρκετά μπερδεμένη, δαπανηρή και χρειάζεται πολύς χρόνος και συγκεκριμένος εργαστηριακός εξοπλισμός. Οπότε ο υγειονομικός έλεγχος σχεδιάζεται έτσι, ώστε να αριθμεί μόνο τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* και μόνο εάν προκύψει μεγάλος κίνδυνος σ' ένα τρόφιμο κινείται η διαδικασία για την έρευνα εντεροτοξινών.

Υπάρχουν διάφορες περιπτώσεις για τις οποίες προσδιορίζεται ο *Staphylococcus aureus* στα τρόφιμα. Ο πιο συνηθισμένος είναι όταν έχει προκληθεί τροφική δηλητηρίαση, τότε γίνεται εξέταση για την ύπαρξη ή όχι του *Staphylococcus aureus*. Πολλά τρόφιμα μπορεί να μολυνθούν, οπότε γίνεται και έλεγχος των τροφίμων για πρόκληση τροφικής δηλητηρίασης. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να γίνουν επιμολύνσεις στο εργατικό προσωπικό ή στις εγκαταστάσεις του εργοστασίου από αυτό το βακτήριο, άρα επιβάλλεται και εκεί έλεγχος μετά τη θερμική επεξεργασία (Τυμπής, Πετράκης, Κοντελής et.al).

Κεφάλαιο 3:

Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης φυσικών ενώσεων με την μέθοδο της μικροαραίωσης

3.1. Εισαγωγή

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την μέθοδο μικρο-αραίωσης (micro-dilution) για τον προσδιορισμό της αντιβακτηριακής δραστηριότητας των φυτικών εκχυλισμάτων και των μειγμάτων τους. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ενός φυτικού εκχυλίσματος είναι διαθέσιμες, αλλά δεν υπάρχει τυπική διαδικασία όπως υπάρχει στα αντιβιοτικά. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε gram θετικά-βακτήρια (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, κα) και gram-αρνητικά βακτήρια (*Escherichia coli*) και είναι μία εναλλακτική μέθοδος σε σύγκριση με τη μέθοδο διάχυσης του δίσκου (disc diffusion) ή την μέθοδο διάχυσης σε «πηγαδάκια» άγαρ (well diffusion), οι οποίες εφαρμόζονται σε τρυβλία petri με άγαρ. Στην μέθοδο μικρο-αραίωσης, τα δείγματα εμβολιάζονται σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων τύπου ELISA (Σχήμα 3.1).

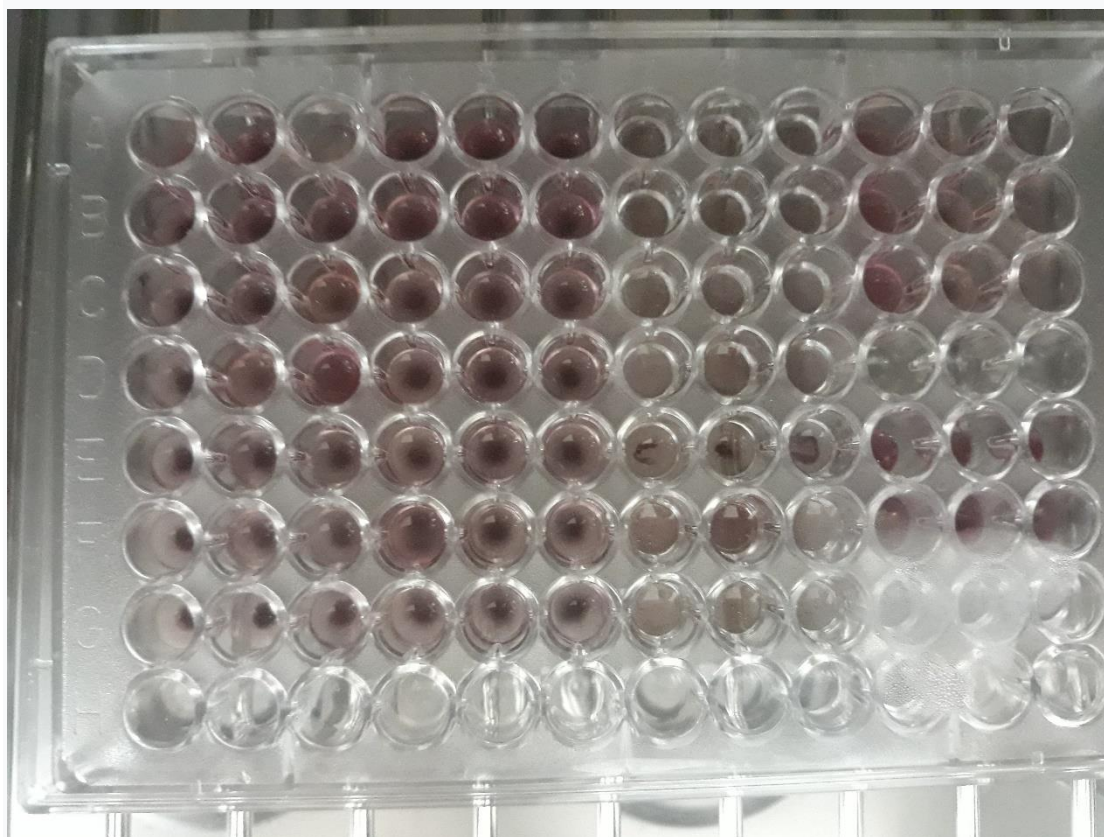
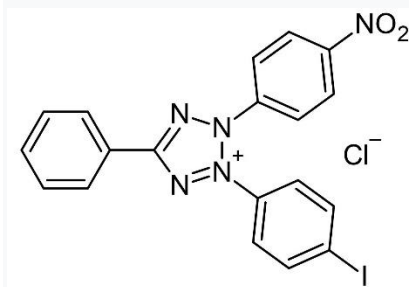
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Σχήμα 3.1. Διάταξη της πλάκας μικροτιτλοδότησης όπου γίνονται οι δοκιμές μικροαραίωσης.

Χρησιμοποιήθηκε χρωματομετρική μέθοδος η οποία αντιπροσωπεύει μία εναλλακτική προσέγγιση, χρησιμοποιώντας άλατα τετραζολίου ως δείκτες, αφού τα ενεργά βακτήρια, κατά την διάρκεια της επώασης, τα μετατρέπουν σε έγχρωμα παράγωγα φορμαζάνης που μπορεί να ποσοτικοποιηθούν. Το

έγχρωμο προϊόν που προκύπτει μετά την επώαση είναι δείκτης βακτηριακής ανάπτυξης. Όταν στην επώαση έχει προστεθεί ένας αντιμικροβιακός παράγοντας (πχ αντιβιοτικό, αιθέριο έλαιο, κτλ) τότε παρατηρούνται μεταβολές στην ένταση του χρώματος που προκύπτει, οι οποίες ποσοτικοποιούνται φασματοφωτομετρικά στα 490 nm (Εικόνα 3.1).

Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος μικροαραίωσης έγινε με την χρήση της χρωστικής TTC (χλωριούχο 2,3,5-τριφαινυλ τετραζόλιο) και INT (χλωριούχο νιτροφαινυλ-5-φαινυλ τετραζόλιο 2-p-ιωδοφαινυλ-3-p).



Εικόνα 3.1. Χρωματικές μεταβολές στην πλάκα μικροτιτλοδότησης μετά την προσθήκη χρωστικής INT

Ο σκοπός αυτής της πτυχιακής είναι να μελετήσουμε την μικροβιακή δράση φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων έναντι των βασικών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών.

3.2. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν

	Bacteria
1	<i>Samonella</i> Typhimirium
2	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10788/ATCC 6538
3	<i>Escherichia coli</i> NCTC 12241/ATCC 25922
4	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 7973/ATCC 35152
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12903/ATCC 27853
6	<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775/ATCC 19433
7	<i>Yersinia enterocolitica</i> NCTC12982/ATCC 9610

3.2.1. Προετοιμασία καλλιιεργειών

Όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι πρότυπες καλλιέργειες σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ενδεικτικά, αναφέρεται η προετοιμασία της *Escherichia coli* ATCC 25922. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σε κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό.

- Εμβολιασμός ενός δίσκου *Escherichia coli* ATCC 25922 (Selectrol® Discs) σε ζωμό Tryptic Soy (TS)
- επώαση στους 37°C για 24 ώρες
- Μετά την επώαση, εμβολιασμός με έναν αποστειρωμένο βρόχο από τον ζωμό σε αποστειρωμένα σωληνάρια με κεκλιμένο άγαρ Mueller Hinton (MHA)
- επώαση στους 37°C για 24 ώρες

Για δοκιμές αντιμικροβιακής δράσης:

- Προσθήκη 2 mL αποστειρωμένου ισοτονικού αραιωτικού σε σωλήνες με κεκλιμένο άγαρ και απομάκρυνση αποικιών με αποστειρωμένο βρόχο σε φιάλη που περιέχει 2 mL αποστειρωμένο ισοτονικό αραιωτικό
- προετοιμασία αραιώσεων της παραπάνω υγρής καλλιέργειας μέχρι McFarland Standard 0,5 (~10⁸ κύτταρα) και εμβολιασμός ομοιόμορφα 1 mL του αραιωμένου εναιωρήματος σε ένα τρυβλίο Petri,
- προσθήκη τηγμένου MHA και ανάδευση

Προετοιμασία αντιδραστηρίων:

MHA: Mueller Hinton Agar: σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
Ζωμός TSA: σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
Ισοτονικό αραιωτικό:
Αποστείρωση στους 121°C, 15 λεπτά σε αυτόκλειστο

3.2.2. Προετοιμασία φυσικών εκχυλισμάτων

Έγινε η προετοιμασία των φυσικών εκχυλισμάτων με κατάλληλες αραιώσεις (Gonelimali et al, 2018).

Για παράδειγμα, για την δημιουργία ενός διαλύματος 20% w/v, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Ζυγίζονται 2g εκχυλίσματος και διαλύονται σε 10 mL DMSO ή νερό (20% w/v).
- Ξεκινώντας από αυτό το πυκνό διάλυμα (stock solution) υπολογίζονται και οι επόμενες αραιώσεις, συνήθως 1:2, όπως φαίνεται παρακάτω:
 - 20% (200 mg/mL)
 - 10%, (100mg/ml)
 - 5%, (50 mg/ml)
 - 2.5%, (25 mg/ml)
 - 1.25% (12.5mg/ml)

3.3.1. Πείραμα 1: Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης αντιβιοτικών

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα όπου μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση ενός γνωστού αντιβιοτικού, της χλωραμφενικόλης. Εμβολιάστηκαν 7 διαφορετικοί μικροοργανισμοί:

<i>E.coli</i>
<i>L.monocytogenes</i>
<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>S.aureus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>

Ποσότητες εμβολιασμού

50 μ L μικροοργανισμός + 50 μ L δείγμα (αντιμικροβιακός παράγοντας) + 10 μ L INT

Positive Control: 50 μ L μικροοργανισμός+ 50 μ L broth + 10 μ L INT

Negative control 1: 100 μ L broth+ 10 μ L INT

Negative control 2: 50 μ L δείγμα (αντιμικροβιακός παράγοντας) +50 μ L broth +10 μ L INT

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιούνται σε τρεις επαναλήψεις.

Στην συνέχεια εμβολιάζουμε με τα δείγματα και τον μικροοργανισμό στην πλάκα μικροαραιώσης 96 θέσεων, η οποία φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Το broth που χρησιμοποιήθηκε ήταν υγρό θρεπτικό υλικό BHI (Brain Heart Infusion)

Μετά από 24 ώρες επώαση στους 37°C, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις όλων των δειγμάτων της μικροπλάκας σε plate reader στα 490nm, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,638	3,54	1,636	0,13	2,144	2,23	3,841	0,157	3,389	3,499	0,66	0,672
B	0,15	0,282	0,267	0,255	0,253	0,234	0,209	0,217	0,222	0,2	0,162	0,373
C	0,098	0,191	0,242	0,237	3,006	2,932	2,97	0,291	0,232	0,13	0,099	0,098
D	3,283	3,461	3,936	1,731	1,627	1,689	0,157	3,494	3,495	3,497	1,7	1,899
E	0,529	0,137	0,195	0,214	0,211	0,205	0,226	0,273	0,272	0,287	0,225	0,18
F	0,096	0,098	0,093	0,096	0,099	0,102	0,167	0,129	0,094	0,098	0,089	0,092
G	3,837	3,361	3,755	3,758	3,308	3,64	0,352	OVRFLW	0,331	0,144	0,139	0,133
H	0,459	0,512	0,636	0,48	0,315	0,548	0,098	0,099	0,1	0,098	0,11	0,088

Πίνακας 3.1. Απορροφήσεις των δειγμάτων στα 490nm

Υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι από τις 3 επαναλήψεις κάθε δείγματος και το % αναστολής της ανάπτυξης μικροοργανισμού λόγω του αντιμικροβιακού παράγοντα σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ ΑΝΑΣΤΟΛΗ (Inhibition): } I\% = [(C-S)/C] * 100$$

Όπου:

- C=απορρόφηση του μικροοργανισμού μετά την επώαση χωρίς τον αντιμικροβιακό παράγοντα (θετικό control) και

- S=απορρόφηση του μικροοργανισμού μαζί με τον αντιμικροβιακό παράγοντα μετά την επώαση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως απορροφήσεις στα 490nm και υπολογίζεται το % αναστολής στον παρακάτω πίνακα (MO=Μικροοργανισμός, ANTIB=Αντιβιοτικό):

Πίνακας 3.2: Απορροφήσεις στα 490nm και % αναστολής με προσθήκη χλωραμφενικόλης (MO=Μικροοργανισμός, ANTIB=Αντιβιοτικό)

Μικροοργανισμός	Απορρόφηση (490nm) MO	Απορρόφηση (490nm) MO+ANTIB	% Αναστολή
<i>E.coli</i>	2,94	0,2	92,1
<i>L.monocytogenes</i>	3,56	0,3	91,9
<i>Salmonella</i>	3,65	0,5	85,3
<i>S.aureus</i>	2,74	0,2	91,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,50	0,3	92,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,44	0,21	93,9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,67	0,27	59,8

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το αντιβιοτικό έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με >85% αναστολής σε όλους τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν. Μόνο, η περίπτωση της *Yersinia enterocolitica* δεν έδειξε ξεκάθαρα αποτελέσματα γιατί το θετικό control δηλαδή ο μικροοργανισμός χωρίς τον αντιμικροβιακό παράγοντα έδωσε πολύ χαμηλή απορρόφηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι πιθανόν να χρειαζόταν μεγαλύτερος χρόνος επώασης για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

3.3.2. Πείραμα 2: Αιθέριο έλαιο λεβάντας ως φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας

Σε αυτό το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε πολλές επιμέρους δοκιμές, μελετήθηκε δείγμα με αιθέριο έλαιο λεβάντας. Το αρχικό δείγμα περιέχει 209,7 mg αιθέριου ελαίου λεβάντας. Οι δοκιμές έγιναν στους παρακάτω μικροοργανισμούς:

- *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538
- *Listeria monocytogenes* NCTC 7973/ATCC 35152
- *Salmonella* Typhimurium

Ποσότητες εμβολιασμού:

50 μL μικροοργανισμός + 50 μL δείγμα (αντιμικροβιακός παράγοντας) + 10 μL INT

Θετικό Control: 50 μL μικροοργανισμός+ 50 μL broth + 10 μL INT

Negative control 1: 100 μL broth+ 10 μL INT

Negative control 2: 50 μL δείγμα (αντιμικροβιακός παράγοντας) +50 μL broth +10 μL INT

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν υγρό θρεπτικό υλικό BHI (Brain Heart Infusion broth)

Μετά την επώαση παραλαμβάνεται η πλάκα και γίνεται φασματοφωτομέτρηση στα 490nm (BIOTEC nanospectrometer).

Μετρήθηκε το % αναστολής:

$$\% \text{ ΑΝΑΣΤΟΛΗ, } I\% = [(C-S)/C] * 100$$

Το αιθέριο έλαιο λεβάντας αραιώθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως απορροφήσεις στα 490nm και υπολογίζεται το % αναστολής, όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες 4.3 -4.9:

Πίνακας 3.3

	<i>Escherichia coli</i> (Α δοκιμή)	
%w/v αιθέριο έλαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
1	0,33	86,3
0,5	0,47	80,8
0,25	0,45	81,5
0,0625	0,49	80,0
0,03125	0,45	81,3
0,015625	0,50	79,6
0	2,43	0,0

Πίνακας 3.4

<i>Escherichia coli</i> (B δοκιμή)		
%w/v αιθέριο έ-λαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
0,75	0,25	93,1
0,5	0,23	93,6
0	3,61	0,0

Πίνακας 3.5

<i>Staphylococcus aureus</i> (A δοκιμή)		
%w/v αιθέριο έ-λαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
2,13	0,56	77,6
1,06	0,71	71,6
0,53	0,67	73,2
0,266	0,57	77,2
0,133	0,7	72
0	2,5	0

Πίνακας 3.6

<i>Staphylococcus aureus</i> (B δοκιμή)		
%w/v αιθέριο έ-λαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
1,5	0,21	83,0
1	0,22	82,3
0,75	0,23	81,3
0,5	0,24	80,4
0,25	0,25	80,0
0,125	0,35	71,9
0	1,24	0,0

Πίνακας 3.7

<i>Staphylococcus aureus</i> (Γ δοκιμή)		
%w/v αιθέριο έλαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
0,75	0,20	93,7
0,5	0,20	93,7
0	3,19	0,0

Πίνακας 3.8

<i>Listeria monocytogenes</i>		
%w/v αιθέριο έλαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
0,75	0,33	89,8
0,5	0,47	85,8
0	3,28	0,0

Πίνακας 3.9

<i>Salmonella Typhimurium</i>		
%w/v αιθέριο έλαιο λεβάντας	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
0,75	0,33	91,3
0,5	0,47	87,8
0	3,84	0,0

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το αιθέριο έλαιο λεβάντας έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με υψηλά ποσοστά αναστολής (>70%) σε όλους τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν.

3.3.3.Πείραμα 3: Μελέτη προπόλης ως φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας

Σε αυτό το πείραμα έγινε χρήση της προπόλης, η οποία είναι φυσική αντιμικροβιακή ουσία. Χρησιμοποιείται σαν σπρέι για τη μύτη ,ενώ έχει αντιφλεγμονώδη και αντισηπτική δράση. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δείγματα:

ΔΕΙΓΜΑ 1 : προπόλη και *E.coli*

ΔΕΙΓΜΑ 2: προπόλη και *L.monocytogenes*

ΔΕΙΓΜΑ 3: προπόλη και *Enterococcus faecalis*

Η *E.coli* είναι ένα αρνητικό κατά γκرام κωλοβακτηρίδιο , το οποίο βρίσκεται συνήθως στο έντερο ενδόθερμων ζώων. Απαντώνται συχνά στα κόπρανα των ανθρώπων και των ζώων. Τα περισσότερα στελέχη του είναι αβλαβή. Εκτός από το 0157:H7 το οποία παράγει την πολύ ισχυρή τοξίνη verotoxin που καταστρέφει το έντερο. Όταν αυτή η τοξίνη βρεθεί σε διπλανά όργανα μπορεί να προκαλέσει ουρολοίμωξη. Το συγκεκριμένο βακτήριο δεν αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες και καταστρέφεται στους 70°C .

Η *Listeria monocytogenes* είναι βακτηριδιακός παθογόνος μικροοργανισμός που εκδηλώνεται ως ενδοκυτταρικό παράσιτο. Τα βακτήρια της λιστέριας επιβιώνουν ακόμα και στη ψύξη ή και στη κατάψυξη. Η έγκυρη θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί να βοηθήσει στην αναχαίτιση των επιπτώσεων της μόλυνσης από λιστέρια.

Αραιώσεις δειγμάτων:

- Ζυγίζουμε το stock solution μας που πρέπει να είναι 0,2 gr για 1ml H₂O.
- Χρησιμοποιούμε erpendorf σωληνάκια στα οποία καταγράφουμε στην επιφάνεια τους όλες τις αραιώσεις με έναν μαρκαδόρο.
- Χρησιμοποιούμε μία καθαρή καλλιέργεια 24 ωρών στους 37°C.
- Προσθήκη 100 μικρόλιτρα καλλιέργειας σε 9 ml Broth. Από αυτά εμβολιάζουμε στις μικροκυψελίδες.
- Οι κυψελίδες, ανάλογα το σχέδιο που έχουμε καταγράψει σε πίνακα περιέχουν τις εξής ποσότητες:

ΔΕΙΓΜΑ 1: 50 μικρόλιτρα προπόλη + 50 μικρόλιτρα *E.coli* + 10 μικρόλιτρα TTC ,που είναι η χρωστική που θα χρησιμοποιήσουμε.

ΔΕΙΓΜΑ 2 : 50 μικρόλιτρα προπόλη +50 μικρόλιτρα *Listeria Monocytogenes* + 10 μικρόλιτρα TTC.

ΔΕΙΓΜΑ 3 : 50 μικρόλιτρα προπόλη +50 μικρόλιτρα *Enterococcus faecalis*+ 10 μικρόλιτρα TTC.

Υπολογισμοί:

Αρχικό δείγμα πρόπολης 20% w/v (εμπορικό σκεύασμα φαρμακείου)

Παρασκευάστηκαν αραιώσεις

1:2, 1:4, 1:8, 1:16 και 1:32

άρα στα 100ml έχουμε 20gr

στο 1 ml $x=0,2$ gr

Για 1/2 : $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$0,2 \cdot V1 = 0,1 \cdot 1$

$V1 = 0,5$ ml .

Για 1/4 : $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$0,2 \cdot V1 = 0,05 \cdot 1$

$V1 = 0,25$

Για 1/8 : $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$0,2 \cdot V1 = 0,025 \cdot V2$

$V1 = 0,125$

Για 1/16 : $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$0,2 \cdot V1 = 0,0125 \cdot V2$

$V1 = 0,0625$

Για 1/32 : $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$0,2 \cdot V1 = C2 \cdot 0,00625 \cdot V2$

$V2 = 0,03125$

Δείγματα	% w/v
P	20%
P1	10%
P2	5%
P3	2.5%
P4	1,25%
P5	0.0625%

Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων απεικονίζονται στον πίνακα 3.10 και αναλύονται στους πίνακες 3.11-3.13

Πίνακας 3.10, Αποτελέσματα απορροφήσεων στα 490nm δειγμάτων με πρόπολη

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,839	3,841	3,585	0,321	0,326	0,492	0,913	0,52	0,276	3,939	3,84	3,837
B	3,585	3,237	3,106	0,366	0,342	0,463	0,475	0,498	0,36	4,062	3,937	3,76
C	3,393	3,139	3,261	0,296	0,492	0,366	2,768	3,019	0,282	3,838	3,842	3,838
D	3,458	3,143	3,632	0,294	0,294	0,392	0,398	0,352	0,258	3,761	3,761	3,581
E	3,84	3,761	3,758	0,235	0,251	0,317	0,343	0,326	0,274	3,759	3,636	3,763
F	3,499	3,427	3,695	0,243	0,24	0,574	0,553	0,547	0,234	3,842	3,639	3,841
G	3,58	3,496	3,361	0,217	0,285	0,292	4,062	4,063	0,176	3,143	0,348	0,213
H	3,636	3,457	3,495	0,107	0,312	0,317	3,759	3,838	0,116	0,34	0,327	0,219

Πίνακας 3.11

<i>Escherichia coli</i>		
%w/v πρόπολη	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
20%	3,2	15,8
10%	3,31	12,9
5%	3,26	14,1
2.5%	3,41	10,2
1,25%	3,79	0,4
0.0625%	3,54	6,8
0	3,8	0,0

Πίνακας 3.12

<i>Listeria monocytogenes</i>		
%w/v πρόπολη	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
20%	0,30	61,0
10%	0,48	37,8
5%	0,50	35,1
2.5%	0,55	28,6
1,25%	0,60	22,1
0.0625%	0,62	19,5
0	0,77	0,0

Πίνακας 3.13

<i>Enterococcus faecalis</i>		
%w/v πρόπολη	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
20%	3,87	1,5
10%	3,92	0,3
5%	3,84	2,3
2.5%	3,70	5,8
1,25%	3,72	5,4
0.0625%	3,77	4,0
0	3,9305	0,0

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εμπορικό σκεύασμα πρόπολης στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε έδειξε μία πολύ ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli* με μέγιστο ποσοστό αναστολής 15.8% και σχεδόν καθόλου αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Enterococcus faecalis*. Η *Listeria monocytogenes* έδειξε μία μεγαλύτερη ευαισθησία στην πρόπολη καθώς τα ποσοστά αναστολής ήταν υψηλότερα, ως και 61%.

3.3.4.Πείραμα 4: Μελέτη νισίνης ως φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας

Σε αυτό το πείραμα έγινε χρήση της νισίνης, η οποία είναι φυσική αντιμικροβιακή ουσία. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δείγματα:

ΔΕΙΓΜΑ 1: νισίνη και *L.monocytogenes*

ΔΕΙΓΜΑ 2: νισίνη και *Salmonella Typhimurium*

Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων στα 490nm απεικονίζονται στον πίνακα 3.10 και αναλύονται στους πίνακες 3.14-3.15

Πίνακας 3.14

<i>Listeria monocytogenes</i>		
%w/v νισίνη	Απορρόφηση (490nm)	% Αναστολή
5%	2,77	1,2
2,5%	2,70	3,6
1,25%	2,78	0,7
0,0625%	2,70	3,6
0%	2,8	0,0

Πίνακας 3.15

<i>Salmonella Typhimurium</i>		
%w/v νισίνη	Απορρό-φηση (490nm)	% Αναστολή
5%	2,80	15,7
2,5%	2,83	14,9
1,25%	2,21	33,4
0,0625%	2,80	15,6
0%	3,32	0,0

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εμπορικό σκεύασμα νισίνης στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε έδειξε μία πολύ ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι της gram αρνητικής *Salmonella Typhimurium* με μέγιστο ποσοστό αναστολής 15.7% και σχεδόν καθόλου αντιμικροβιακή δράση έναντι της gram θετικής *Listeria monocytogenes*.

3.4.Συμπεράσματα

- Η μέθοδος ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης με μικροαραιώση σε πλάκες μικροτιτλοδότησης και με χρήση χρωστικών INT ή TTC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων.
- Το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με >85% αναστολής σε όλους τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν.
- Το αιθέριο έλαιο λεβάντας έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με υψηλά ποσοστά αναστολής (>70%) σε όλους τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν.

- Το εμπορικό σκεύασμα πρόπολης στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε έδειξε μία πολύ ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli* με μέγιστο ποσοστό αναστολής 15.8% και σχεδόν καθόλου αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Enterococcus faecalis*. Η *Listeria monocytogenes* έδειξε μία μεγαλύτερη ευαισθησία στην πρόπολη καθώς τα ποσοστά αναστολής ήταν υψηλότερα, ως και 61%.
- Το εμπορικό σκεύασμα νισίνης στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε έδειξε μία πολύ ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι της gram αρνητικής *Salmonella Typhimurium* με μέγιστο ποσοστό αναστολής 15.7% και σχεδόν καθόλου αντιμικροβιακή δράση έναντι της gram θετικής *Listeria monocytogenes*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μικροβιολογία Τροφίμων ,Μεθοδολογία και Τεχνικές Αναλύσεων
Δημ.Τυμπής – Ελ.Πετράκης– Σπ.Κοντελής
2. Cowan, Marjorie Murphy. "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical microbiology reviews* 12.4 (1999): 564-582.
3. Gonelimali, Faraja D., et al. "Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 1639.
4. Klančnik, Anja, et al. "Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts." *Journal of microbiological methods* 81.2 (2010): 121-126.
5. Calo, Juliany Rivera, et al. "Essential oils as antimicrobials in food systems—A review." *Food control* 54 (2015): 111-119.
6. Kunicka-Styczyńska, A., M. Sikora, and D. Kalemba. "Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems." *Journal of applied microbiology* 107.6 (2009): 1903-1911.
7. Danh, Luu Thai, et al. "Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO₂, hexane and hydrodistillation." *Food and bioprocess technology* 6.12 (2013): 3481-3489.
8. Jianu, Calin, et al. "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania." *International journal of agriculture and biology* 15.4 (2013).
9. Cavanagh, H. M. A., and J. M. Wilkinson. "Biological activities of lavender essential oil." *Phytotherapy research* 16.4 (2002): 301-308.
10. Bosnić, Tamara, Dženita Softić, and Jela Grujić-Vasić. "Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils." *Acta Medica Academica* 35.1 (2006): 9-14.
11. de Rapper, Stephanie, et al. "The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013 (2013).

12. Chouhan, Sonam, Kanika Sharma, and Sanjay Guleria. "Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives." *Medicines* 4.3 (2017): 58.
13. Hanamanthagouda, Manohar Shirugumbi, et al. "Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities." *Food Chemistry* 118.3 (2010): 836-839.
14. Man, Adrian, et al. "Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study." *Pathogens* 8.1 (2019):
15. Ciocarlan, Alexandru, et al. "Chemical composition and assessment of antimicrobial activity of lavender essential oil and some by-products." *Plants* 10.9 (2021): 1829.
16. Horváth, Györgyi, et al. "Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography." *Flavour and fragrance journal* 25.3 (2010): 178-182.
17. Nataro, James P., and James B. Kaper. "Diarrheogenic *Escherichia coli*." *Clinical microbiology reviews* 11.1 (1998): 142-201.
18. Mittrücker, Hans-Willi, and Stefan HE Kaufmann. "Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice." *Journal of leukocyte biology* 67.4 (2000): 457-463.
19. Farber, Jeffrey M., and PI372831 Peterkin. "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen." *Microbiological reviews* 55.3 (1991): 476-511.
20. Le Loir, Yves, Florence Baron, and Michel Gautier. "[*i*] *Staphylococcus aureus* [*/i*] and food poisoning." *Genetics and molecular research: GMR* 2.1 (2003): 63-76.
21. Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry LT Mobley. "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nature reviews microbiology* 2.2 (2004): 123-140.
22. Dantas, Stéfani TA, et al. "Environmental persistence and virulence of *Salmonella* spp. Isolated from a poultry slaughterhouse." *Food Research International* 129 (2020): 108835.
23. Gardan, Rozenn, et al. "Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance." *Applied and Environmental Microbiology* 69.1 (2003): 154-161.