



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων φυτών

BSc Thesis

Evaluation of antibacterial activity of plant essential oils

**ΟΝΟΜΑΤΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ / NAMES OF STUDENTS**

Κόμης Λουκιανός / Komis Loukianos 16158

Σιούτη Μαρίνα / Shyti Marina 20684143

**ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑΣ / NAME OF THE SUPERVISOR**

Χούχουλα Δήμητρα / Houhoula Dimitra

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2024 / AIGALEO, JULY 2024

## Επιτροπή Αξιολόγησης

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο «Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων φυτών» που παρουσιάστηκε από τους Κόμης Λουκιανός / Σιούτη Μαρίνα, υποψήφιοι για τον πτυχιακό τίτλο σπουδών στην Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

α/α	Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα/Ιδιότητα	Ψηφιακή Υπογραφή
1.	Χούχουλα Δήμητρα	Καθηγήτρια και Αντιπρόεδρος του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	
2.	Μπατρίνου Ανθιμία	Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	
3.	Αντωνόπουλος Διονύσιος	Μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	

## Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνουμε ότι είμαστε αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μας αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Κόμης Λουκιανός



Σιούτη Μαρίνα



## Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια και μέντορα, Χούχουλα Δήμητρα που μας δέχτηκε στο εργαστήριο της και μας εμπιστεύτηκε το θέμα. Οι κατευθυντήριες γραμμές της και οι συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής χρονιάς έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της επιστημονικής μας σκέψης και στην σωστή προσέγγιση και διεκπεραίωση του θέματος που αναλάβαμε να εκπονήσουμε. Δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε όμως κάτι σημαντικότερο, όχι μόνο ως επαγγελματίες, αλλά και ως άνθρωπος κατάφερε να μας εμπνεύσει αξίες και ιδεώδη που θα προσπαθούμε να κατακτούμε και να τα χρησιμοποιούμε ως εργαλεία, στοχεύοντας πάντα στην πρόοδο και την εξέλιξη.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την διδάκτορα Τσάκνη Αλίκη για τις πολύτιμες συμβουλές και την επίλυση αποριών μας πάνω στο θέμα μέσα στη χρονιά, αλλά και για τη φιλική και ένθερμή της προσέγγιση.

Τέλος, δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε την σημαντική επίδραση της υποστήριξης που λάβαμε από τις οικογένειες μας και τους φίλους μας, σε όλη την διάρκεια της ακαδημαϊκής μας σταδιοδρομίας.

## Περίληψη

Τα αιθέρια έλαια είναι συμπυκνωμένα υγρά με πολύπλοκη σύνθεση, πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως τερπένια, αλδεΐδες, εστέρες, φαινόλες και αλκοόλες, οι οποίες συμβάλλουν στις μοναδικές ιδιότητες τους. Αυτές οι ενώσεις τους επιτρέπουν να χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς, όπως η αρωματοθεραπεία, η φαρμακευτική, η κοσμετολογία και η βιομηχανία τροφίμων. Η όλο ένα και αυξανόμενη απαίτηση των καταναλωτών για τρόφιμα χωρίς συνθετικές χημικές προσμίξεις, τα οποία θα έχουν και μακρά διάρκεια ζωής στα ράφια, καθώς και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά φάρμακα, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην εύρεση νέων φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων. Στην παρούσα μελέτη έγινε αξιολόγηση της αντιμικροβιακής, κυτταροτοξικής και αντικής δράσης των αιθέριων ελαίων των φυτών *Posidonia oceanica* και *Cistus creticus* L. έναντι των βακτηριακών στελεχών *B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* και του μύκητα *C. albicans*, σε τρία χρονικά διαστήματα. Για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με νερό και με αιθανόλη και έγινε σύγκριση των δύο διαλυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο από τα Φύκη, που είχε προκύψει από εκχύλιση με νερό, είχε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus* και της *S. enterica*, ενώ το έλαιο που προέκυψε από εκχύλιση με αιθανόλη, έδειξε αναστολή ανάπτυξης στα *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus* και *E. coli*. Αντίστοιχα, το αιθέριο έλαιο Κουνούκλας, που είχε προκύψει από εκχύλιση με νερό, ανέστειλε την ανάπτυξη του *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* και *C. albicans*, ενώ το έλαιο που προέκυψε από εκχύλιση με αιθανόλη ανέστειλε τα *B. cereus*, *E. faecalis* και *S. aureus*. Τέλος, η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας της Κουνούκλας έδειξε αρκετά θετικά αποτελέσματα, ενώ αντίθετα η αντική της δράση είναι αρκετά χαμηλή.

**Λέξεις - Κλειδιά:** Φυτικά εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, φύκη, κουνούκλα, *P. oceanica*, *C. creticus*, παθογόνοι μικροοργανισμοί, HPLC-DAD, αντιμικροβιακή δράση, κυτταροτοξικότητα, αντικότητα

## Abstract

Essential oils are concentrated liquids with a complex composition, rich in bioactive compounds such as terpenes, aldehydes, esters, phenols and alcohols, which contribute to their unique properties. These compounds allow them to be used in various fields such as aromatherapy, pharmaceuticals, cosmetology and the food industry. The ever-increasing consumer demand for artificial chemical-free foods with a long lifespan, as well as the development of resistance of microorganisms to antibiotic drugs, have focused the interest of researchers on finding new natural antimicrobial agents. In the present study, the antimicrobial, cytotoxic and antiviral activity of essential oils of *Posidonia oceanica* and *Cistus creticus* L. plants were evaluated against bacterial strains *B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* and *C. albicans* fungus at three-time courses. To obtain the essential oils, extraction with water and ethanol was carried out and the two solvents were compared. The results showed that the algal essential oil obtained from extraction with water had antimicrobial activity against *S. aureus* and *S. enterica*, while the oil obtained from extraction with ethanol showed growth inhibition on *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus* and *E. coli*. Similarly, the pink rock rose essential oil obtained from extraction with water inhibited the growth of *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, while the oil obtained from extraction with ethanol inhibited *B. cereus*, *E. faecalis* and *S. aureus*. Finally, the evaluation of the cytotoxicity of the pink rock rose showed quite positive results, while in contrast its antiviral activity is quite low.

**Keywords:** Plant extracts, essential oils, seaweed, pink rock rose, *P. oceanica*, *C. creticus*, pathogenic microorganisms, HPLC-DAD, antimicrobial activity, cytotoxicity, antimicrobial activity

## Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright .....	III
Ευχαριστίες .....	IV
Περίληψη .....	V
Abstract .....	VI
Πίνακας περιεχομένων .....	VII
Κατάλογος Εικόνων .....	X
Κατάλογος Πινάκων .....	XI
Κατάλογος Σχημάτων .....	XII
1. Εισαγωγή.....	1
2. Αιθέρια έλαια.....	2
2.1 Ορισμός .....	2
2.2 Χρήσεις αιθέριων ελαίων .....	2
2.2.1 Πρώιμες χρήσεις .....	2
2.2.2 Εμπορικές χρήσεις.....	3
2.2.3 Χρήσεις στην βιομηχανία τροφίμων .....	3
2.2.4 Κοσμετικές χρήσεις.....	3
2.2.5 Φαρμακευτικές χρήσεις.....	4
2.3 Βιομηχανικοί τρόποι εξαγωγής αιθέριων ελαίων .....	4
2.3.1 Υδροαπόσταξη.....	4
2.3.2 Συρροή μέσω ατμό νερού .....	5
2.3.3 Εξαγωγή μέσω οργανικού διαλύτη .....	5
2.3.4 Ψυχρή έκθλιψη .....	5
2.4 Καινοτόμοι τρόποι εξαγωγής αιθέριων ελαίων .....	5
2.4.1 Εκχύλιση υγρού υπερκρίσιμου σημείου .....	5
2.4.2 Εξαγωγή ελαίων με βοήθεια υπερήχων .....	6
2.4.3 Εξαγωγή με βοήθεια μικροκυμάτων .....	6
2.5 Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων .....	6
2.5.1 Ενεργά συστατικά αιθέριων ελαίων .....	7
2.5.1.1 Τερπένια C <sub>5n</sub> .....	7
2.5.1.2 Μονοτερπένια C <sub>10</sub> .....	7
2.5.1.3 Σεσκιτερπένια C <sub>15</sub> .....	7
2.5.1.4 Διτερπένια C <sub>20</sub> .....	7
2.5.1.5 Αλκοόλες .....	8
2.5.1.6 Αλδεΐδες.....	8

2.5.1.7 Εστέρες .....	8
2.5.1.8 Οξέα .....	8
2.6 Λειτουργικός ρόλος/Ιδιότητες .....	9
2.6.1 Αντιμικροβιακή δράση.....	9
2.6.2 Αντικότητα.....	10
2.6.3 Κυτταροτοξικότητα .....	11
2.7 Εφαρμογές ελαίων.....	13
2.7.1 Γενικές εφαρμογές .....	13
2.7.2 Θεραπευτικές εφαρμογές.....	14
2.7.2.1 Αρωματοθεραπεία .....	14
2.7.2.2 Στην βιομηχανία τροφίμων .....	14
2.8 Φυτά.....	15
2.8.1 <i>Posidonia oceanica</i> .....	15
2.8.1.1 Προ υπάρχουσες χρήσεις.....	15
2.8.1.2 Εξέλιξη του φυτού .....	16
2.8.2 <i>Cistus creticus L.</i> .....	17
2.8.2.1 Προ υπάρχουσες χρήσεις.....	19
2.8.2.2 Εξέλιξη του φυτού .....	20
2.9 Μικροοργανισμοί .....	21
2.9.1 Βακτήρια .....	21
2.9.1.1 Χρώση κατά Gram.....	21
2.9.2 Μύκητες .....	24
3. Υλικά και μέθοδοι .....	27
I. Σκοπός .....	27
II. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	27
3.1 Υλικά.....	31
3.2 Μέθοδοι.....	32
3.2.1 Εκχύλιση με νερό .....	32
3.2.2 Εκχύλιση με αιθανόλη .....	32
3.2.3 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης.....	32
3.3 Αναλυτική τεχνική .....	33
3.3.1 Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με διάταξη ανίχνευσης διόδων (HPLC-DAD) .....	33
3.4 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης .....	33
3.5 Κυτταροτοξικότητα .....	34
3.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	34



3.5.2 Δοκιμή κυτταροτοξικότητας .....	34
3.5.3 Δοκιμασία λουσιφεράσης και δοκιμασίες Bradford .....	35
3.6 Αντικότητα .....	35
3.6.1 Αντιικές δοκιμασίες με βάση τα κύτταρα .....	35
3.6.2 Αποθέματα ιού DENV και μόλυνση κυττάρων .....	36
3.6.3 Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στον πολλαπλασιασμό του ορότυπου 2 του ιού DENV .....	36
4. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....	37
4.1 HPLC-DAD.....	37
4.2 Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης <i>in vitro</i> .....	40
4.3 Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων.....	46
4.4 Εκτίμηση αντικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων.....	47
5. Συμπεράσματα .....	49
6. Βιβλιογραφία .....	53

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.</b> Περιβαλλοντικά οφέλη της <i>P. oceanica</i> (Vasarri et al., 2021b) .....	15
<b>Εικόνα 2.</b> Άνθος <i>C. creticus</i> (αριστερά) και αποξηραμένο <i>C. creticus</i> (δεξιά) (Skorić et al., 2012a) .....	18

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1.</b> Μικροβιολογικά προφίλ βακτηρίων και μύκητα.....	25
<b>Πίνακας 2.</b> Πειράματα και μέθοδοι που σχετίζονται με το βιοχημικό προφίλ και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων <i>Posidonia oceanica</i> και <i>Cistus spp.</i> .....	28
<b>Πίνακας 3.</b> Πρότυπες ενώσεις, χρόνος κατακράτησης, καμπύλες βαθμονόμησης, συντελεστές παλινδρόμησης, μέγιστα μήκη κύματος στην υπεριώδη περιοχή και η συγκέντρωσή του στο αιθέριο έλαιο <i>C. creticus</i> με διαλύτη αιθανόλη.....	39
<b>Πίνακας 4.</b> Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο της <i>P. oceanica</i> με διαλύτη νερό.....	43
<b>Πίνακας 5.</b> Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο του <i>C. creticus</i> με διαλύτη νερό.....	43
<b>Πίνακας 6.</b> Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο της <i>P. oceanica</i> με διαλύτη αιθανόλη.....	44
<b>Πίνακας 7.</b> Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο του <i>C. creticus</i> με διαλύτη αιθανόλη.....	45

## Κατάλογος Σχημάτων

<b>Σχήμα 1.</b> Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου <i>C. creticus</i> με διαλύτη αιθανόλη στη συσκευή HPLC-DAD.....	40
<b>Σχήμα 2.</b> Συγκριτικό ραβδόγραμμα που περιγράφει την κυτταροτοξική δράση υδατικού αιθέριου ελαίου και υδατικού εκχυλίσματος της <i>P. oceanica</i> .....	47

## 1. Εισαγωγή

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά φάρμακα αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια. Το φαινόμενο αυτό, των super-bugs, κοστίζει τις ζωές πολλών ανθρώπων ετησίως απειλώντας τη δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο. Έτσι, η ζήτηση για νέους και δραστικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες αυξάνεται συνεχώς. Επιπλέον, αυξημένο ενδιαφέρον παρατηρείται στην πιθανή χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων φυτικής προέλευσης. Μεταξύ άλλων φυσικών πηγών αντιμικροβιακής δράσης, τα αιθέρια έλαια έχουν προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας ως πιθανοί παράγοντες αντιμικροβιακής δράσης. Τα αιθέρια έλαια των φυτών είναι συμπυκνωμένα υδρόφοβα υγρά, τα οποία περιέχουν πτητικές και αρωματικές ενώσεις. Χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια σαν παραδοσιακά φάρμακα και γιατροσόφια. Μελέτες έχουν δείξει πως συγκεκριμένα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι ενός μεγάλου εύρους παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης τους, καθώς και η πιθανή χρήση τους ως αποτελεσματικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Παρά τις πολλά υποσχόμενες αντιμικροβιακές ιδιότητες των ελαίων, υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες έναντι σε συγκεκριμένα πολυανθεκτικά βακτήρια. Επίσης, η κυτταροτοξική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα, καθώς και η βέλτιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται η δράση τους, δεν έχει προσδιορισθεί ακόμα με ακρίβεια. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής, κυτταροτοξικής και αντικής δράσης επιλεγμένων αιθέριων ελαίων έναντι πολλαπλών παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως από τον χώρο των τροφίμων. Τα φυτά που επιλέχθηκαν για την παραγωγή αιθέριων ελαίων είναι τα κοινά Φύκη (*Posidonia oceanica*) και η Κουνούκλα (*Cistus creticus* L.). Τα Φύκη επιλέχθηκαν, διότι αποτελούν κοινό είδος στη χώρα, συναντώνται σε αφθονία σε όλη την ακτογραμμή της και έτσι η παραλαβή τους με σκοπό την παραγωγή αιθέριου ελαίου μπορεί να είναι άμεση και γρήγορη. Η Κουνούκλα αποτελεί ένα ενδημικό είδος της Μεσογείου, απαντάται μόνο στην περιοχή της Κρήτης και η επιλογή της ως δεύτερο φυτό έγινε καθώς δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες ως προς τις αντιμικροβιακές, κυτταροτοξικές και αντικές ιδιότητές της.

## 2. Αιθέρια έλαια

### 2.1 Ορισμός

Ως αιθέρια ή αρωματικά έλαια ορίζονται, βάσει της 7<sup>ης</sup> έκδοσης του European Pharmacopoeia, “τα πτητικά προϊόντα με πολύπλοκη σύνθεση που λαμβάνονται από ακατέργαστα φυτικά εκχυλίσματα μέσω εκχύλισης ατμών, ξηρή απόσταξη ή με κατάλληλες μηχανικές μεθόδους χωρίς θέρμανση” (Aziz et al., 2018). Κατηγοριοποιούνται στους δευτερεύοντες μεταβολίτες και αναλόγως την προέλευσή τους, κατηγοριοποιούνται σε φυσικά, τεχνητά ή συνθετικά. Έλαιο μπορεί να ληφθεί από όλα τα μέρη του φυτού (ανθούς, σπόρους, φύλλα, κλαδιά, κορμό, καρπούς και ρίζες), ενώ αποθηκεύονται και σε κοιλότητες, κανάλια, επιδερμικά και εκκριτικά κύτταρα του φυτού (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004). Γενικά, για τον διαχωρισμό του αιθέριου ελαίου από την υδατική φάση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται φυσικές μέθοδοι, οι οποίες δεν επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στην χημική του σύνθεση (Aziz et al., 2018).

### 2.2 Χρήσεις αιθέριων ελαίων

#### 2.2.1 Πρώιμες χρήσεις

Από την αρχαιότητα τα συγκεκριμένα φυτικά εκχυλίσματα χρησίμευαν ως φαρμακευτικά σκευάσματα, με σκοπό να καταπολεμήσουν παθήσεις, όπως βρογχίτιδα, φαρυγγίτιδα, πνευμονία, περιοδοντίτιδα, πληγές και άλλες ασθένειες (Riedel & Israel, 2013). Από το 4.500 π.Χ. υπάρχουν καταγεγραμμένες χρήσεις αιθέριων ελαίων. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, οι αρχαίοι Σουμέριοι, καθώς και οι αρχαίοι Έλληνες αντιμετώπιζαν έλαια συγκεκριμένων φυτών ως πολυτιμότερα από χρυσάφι. Συγκεκριμένα, ο βασιλιάς Τουτανχαμούν θάφτηκε με περίπου 350 λίτρα από έλαια φυτών, όπως μύρο, καθώς θεωρούσαν πως θα φανεί χρήσιμο στην μετά θάνατον ζωή του. Για το μύρο αλλά και το λιβάνι, των οποίων τα έλαια προέρχονται από την ρητίνη θάμνων του γένους *Commiphora* και *Burseraceae* αντίστοιχα, υπάρχουν πολλές πηγές που αναφέρουν την μεμονωμένη ή και ταυτόχρονη χρήση τους (Tucker, 1986). Τα φυτά αυτά απαντώνται κυρίως σε ζεστά και ξηρά κλίματα (Subhuti Dharmananda, 2003). Ιατρικές χρήσεις αρωματικών ελαίων συναντάμε και στον υπόλοιπο αρχαίο κόσμο, όπως Αμερική, Αυστραλία και Ασία, με κάποιες από αυτές να συνεχίζουν την χρήση τους μέχρι και σήμερα (Gurib-Fakim, 2006).

### **2.2.2 Εμπορικές χρήσεις**

Από τα αρχαία χρόνια μέχρι και σήμερα, ο εμπορικός κλάδος εκμεταλλεύεται τα αιθέρια έλαια για τις ιδιότητές τους (φαρμακευτικές, εντομοαπωθητικές, κοσμετικές, χημικές). Πιο συγκεκριμένα, το 2017 η παραγωγή και η εξαγωγή αιθέριων ελαίων τριπλασιάστηκε στην Ευρώπη σε σχέση με το 1990, με συνολική παραγωγή 150.000 τόνων και αξίας σχεδόν 6 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Το μεγαλύτερο μερίδιο των παραχθέντων ελαίων (35%) χρησιμοποιήθηκε από την βιομηχανία τροφίμων. Μεγάλο ποσοστό είχε και η χρήση τους ως αρώματα, κοσμετικά προϊόντα και λάδια αρωματοθεραπείας (29%), έπειτα, χαμηλότερα ποσοστά είχαν οι βιομηχανίες οικιακών (16%) και φαρμακευτικών (15%) προϊόντων. Μεγαλύτερος εξαγωγέας στην Ευρώπη ήταν η Γαλλία με χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γερμανία και η Ολλανδία να ακολουθούν (Hany El-Shemy, 2018).

### **2.2.3 Χρήσεις στην βιομηχανία τροφίμων**

Τα τελευταία χρόνια η βιομηχανία τροφίμων έχει προσφύγει στα συστατικά των ελαίων για τις αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητές τους. Ο λόγος είναι πως οι καταναλωτές απαιτούν πλέον τρόφιμα χωρίς συνθετικές χημικές προσμίξεις, τα οποία θα έχουν και μακρά διάρκεια ζωής στα ράφια. Για να επιτευχθεί αυτό το δύσκολο εγχείρημα, οι βιομηχανίες χρησιμοποιούν τους μερικώς άγνωστους μηχανισμούς αντιβακτηριακής και αντιμυκητιακής δράσης των ελαίων σε εύρος 0,05-0,1% (500-1000 ppm). Τα κύρια συστατικά που προσδίδουν τις συγκεκριμένες ιδιότητες είναι τα τερπενοειδή, που περιέχονται μέσα στα έλαια. Οι βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες δράσεις των συστατικών των ελαίων εκμεταλλεύονται είτε αυτούσια είτε σε συνδυασμό με άλλες, συνήθως συνθετικές ουσίες, με σκοπό την βελτίωση της αποτελεσματικότητάς τους (Mihai & Popa, 2013).

### **2.2.4 Κοσμετικές χρήσεις**

Στον ίδιο τόνο βρίσκεται και η βιομηχανία κοσμετικών προϊόντων, η οποία ψάχνει τρόπους για να κάνει τα προϊόντα της πιο οικολογικά και βιώσιμα, χρησιμοποιώντας νέα ανανεώσιμα ενεργά συστατικά. Τα αιθέρια έλαια αποτελούν την καλύτερη επιλογή, καθώς είναι εν δυνάμει ανεξάντλητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργά συστατικά ή ως συντηρητικά. Η βιομηχανία χρησιμοποιεί τα έλαια είτε αυτούσια είτε σε διαφορετικές μίξεις των διαφορετικών συστατικών τους. Η δυσκολία στην ένταξη τους στην κοσμετική βιομηχανία οφείλεται στην

μεγάλη ποικιλία αιθέριων ελαίων και συστατικών αυτών. Αυτό το εύρος επιλογών καθιστά την έρευνα για την εύρεση του βέλτιστου συστατικού (ή συνδυασμό συστατικών) στα προϊόντα χρονοβόρα και ακριβή, καθώς διαφορετικά προϊόντα χρειάζονται διαφορετικά συστατικά για την επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων (E. Guzmán & Lucia, 2021).

### **2.2.5 Φαρμακευτικές χρήσεις**

Πολλοί άνθρωποι ανά τον κόσμο χρησιμοποιούν εσκεμμένα ή μη, φαρμακευτικά προϊόντα, τα οποία περιέχουν αιθέρια έλαια. Προτιμώνται συνήθως λόγω της πεποίθησης ότι τα έλαια αυτά είναι πιο «φυσικά» σε αντίθεση με τα φαρμακευτικά σκευάσματα της βιομηχανίας. Τα αιθέρια έλαια είναι γνωστά στον κόσμο για τις θετικές ιδιότητες τους στην υγεία, όπως η αντικόπηση, η αντιοξειδωτικότητα, η αντιμικροβιακή και η αντιβιοτική δράση (Svoboda et al, 1995), αλλά και για τις επιδράσεις τους στην ψυχική υγεία, καθώς μειώνουν το άγχος και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών διαταραχών ύπνου (Hwang & Shin, 2015; Perry & Perry, 2006).

## **2.3 Βιομηχανικοί τρόποι εξαγωγής αιθέριων ελαίων**

### **2.3.1 Υδροαπόσταξη**

Πρόκειται για την πιο απλή και παλιά μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή αιθέριων ελαίων. Αποτελείται από μια πηγή θέρμανσης, ένα μέσο συγκράτησης του νερού, στο οποίο μπαίνει μαζί το φυτικό υλικό, με σκοπό οι ατμοί του νερού να περάσουν μέσα από το φυτό, έτσι ώστε να εναποθέσει την ενθαλπία εξάτμισής του και τα στερεά μέρη του φυτικού υλικού να τεθούν σε θερμοκρασία εκμετάλλευσης. Σε εκείνο το στάδιο, το φυτό απορροφά το συμπύκνωμα και το επαναφέρει στο εξωτερικό του, όταν φτάσει μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, παραλαμβάνοντας ταυτόχρονα μια ποσότητα λαδιού (Masango, 2005). Έπειτα, ο ατμός συμπυκνώνεται μέσα σε έναν συμπυκνωτή μαζί με το έλαιο που έχει παρθεί από το φυτό. Τέλος με επαναθέρμανση του προϊόντος, το νερό εξατμίζεται και εν τέλει μένει το έλαιο του φυτού (Sovoná & Aleksovski, 2006).



### **2.3.2 Συρροή μέσω ατμό νερού**

Η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στην αρχή της υδροαπόσταξης με την διαφορά πως το νερό δεν έρχεται σε επαφή με το φυτικό υλικό, μειώνοντας έτσι τον χρόνο της απόσταξης αλλά και τις χημικές αλλοιώσεις (Masango, 2005).

### **2.3.3 Εξαγωγή μέσω οργανικού διαλύτη**

Το φυτό βυθίζεται σε οργανικό διαλύτη, ο οποίος διαλύει τις κυτταρικές δομές του ελευθερώνοντας το έλαιο. Το έλαιο συγκεντρώνεται με την αφαίρεση του διαλύτη υπό χαμηλή πίεση. Η μέθοδος αυτή αποτρέπει τις αλλοιώσεις, αλλά εμπεριέχει υπολείμματα, τα οποία μολύνουν τα τρόφιμα και τα κοσμητικά προϊόντα στα οποία προστίθεται. Τα υπολείμματα αυτά θέτουν σε κίνδυνο την ασφάλεια των προϊόντων που εξάγονται με αυτή την μέθοδο, καθιστώντας την μη χρηστική για την βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων (X. M. Li et al., 2009).

### **2.3.4 Ψυχρή έκθλιψη**

Πρόκειται για μια παραδοσιακή τεχνική εξαγωγής αιθέριων ελαίων από το ξύσμα εσπεριδοειδών. Κατά την εξαγωγή, σάκοι ελαίου σπάνε, απελευθερώνοντας πτητικά έλαια. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με φυγοκέντριση (Ferhat et al., 2007).

## **2.4 Καινοτόμοι τρόποι εξαγωγής αιθέριων ελαίων**

### **2.4.1 Εκχύλιση υγρού υπερκρίσιμου σημείου**

Για τα υγρά, η υπερκρίσιμη κατάσταση επιτυγχάνεται σε σαφώς καθορισμένες συνθήκες: κρίσιμη πίεση ( $P_c$ ) και θερμοκρασία ( $T_c$ ). Τα κρίσιμα υγρά επιδεικνύουν πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες: χαμηλό ιξώδες, υψηλή ικανότητα διάχυσης, πυκνότητα πολύ κοντά σε αυτή των υγρών. Ο πιο ευρέως διαδεδομένος διαλύτης είναι το διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ). Η αρχή βασίζεται στην χρήση και την ανακύκλωση του υγρού σε επαναλαμβανόμενα στάδια συμπίεσης/αποσυμπίεσης. Ανεβάζοντας αρκετά την πίεση και την θερμοκρασία, το διοξείδιο περνάει μέσα από το φυτό και παρασύρει πτητικές ύλες και φυτικά εκχυλίσματα. Αυτό ακολουθείται από ένα στάδιο αποσυμπίεσης, έτσι ώστε να διαχωριστεί το διοξείδιο από το εκχύλισμα (Fornari et al., 2012).

#### **2.4.2 Εξαγωγή ελαίων με βοήθεια υπερήχων**

Οι υπέρηχοι επιτρέπουν την εκλεκτική εξαγωγή αιθέριων ελαίων επιταχύνοντας την απελευθέρωσή τους από το φυτό όταν χρησιμοποιούνται σε συνεργασία με άλλες τεχνικές (υδροαπόσταξη και εξαγωγή με διαλύτες). Το φυτικό υλικό βυθίζεται σε νερό ή διαλύτη και ταυτόχρονα υπόκειται στην δράση των υπερήχων, οι οποίοι δημιουργούν μηχανικές δονήσεις στα τοιχώματα και τις μεμβράνες των φυτικών κυττάρων, επιτυγχάνοντας γρήγορη απελευθέρωση μικροσταγονιδίων ελαίου. Ο μηχανισμός εξαγωγής περιλαμβάνει δύο φαινόμενα: διάχυση μέσα από τα κυτταρικά τοιχώματα και έκπλυση του κυτταρικού περιεχομένου μετά την διάσπαση των τοιχωμάτων. Θεωρείται κατάλληλη μέθοδος για υλικά, τα οποία είναι θερμοευαίσθητα (Vinatoru, n.d.).

#### **2.4.3 Εξαγωγή με βοήθεια μικροκυμάτων**

Η μέθοδος αυτή δημιουργήθηκε και εξαπλώθηκε λόγω της ζήτησης νέων τεχνικών εξαγωγής φιλικότερες προς το περιβάλλον, οι οποίες δεν καταναλώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας. Έχει γίνει ταχύτερα μια από τις καλύτερες, ανερχόμενες τεχνικές εξαγωγής, καθώς προσφέρει μεγαλύτερη επαναληψιμότητα σε μικρότερα χρονικά διαστήματα, ευκολότερη μεταχείριση, χαμηλότερη κατανάλωση διαλύτη και χαμηλότερα επίπεδα ενέργειας. Η πιο διαδομένη συχνότητα που χρησιμοποιείται είναι τα 2450 MHz που αντιστοιχεί σε μήκος κύματος 12,2 cm. (Golmakani & Rezaei, 2008; Stashenko et al., 2004).

### **2.5 Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων**

Πάνω από 200 συστατικά βρίσκονται παρόντα στα χημικώς καθαρά αιθέρια έλαια, κυρίως φαινυλοπροπανικά παράγωγα ή τερπένια (Rao & Sahoo, n.d.). Οι ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τάξεις. Τα πτητικά κλάσματα (υδρογονάνθρακες ελαιώδους υφής), τα οποία απαρτίζουν το 90-95% του συνολικού βάρους και τα μη πτητικά υπολείμματα (υδρογονάνθρακες στερεάς μορφής) που αναλογούν στο 1-10 % του συνολικού βάρους (Sonia Malik, 2019).

## **2.5.1 Ενεργά συστατικά αιθέριων ελαίων**

### **2.5.1.1 Τερπένια C<sub>5v</sub>**

Τα κύρια ενεργά συστατικά στα αιθέρια έλαια είναι τα τερπένια (ισοπρενοειδή). Πρόκειται για ενώσεις που προκύπτουν από συνένωση μονάδων ισοπρενίου μέσω του μοτίβου κεφαλής-ουράς, ενώ η δομή τους περιέχει πολλαπλάσια των πέντε ατόμων άνθρακα και ως αποτέλεσμα έχουν σχετικά υψηλό σημείο βρασμού (140-180°C) (Seyed Mohammad Bagher Hashemi et al., 2018). Προσδίδουν στο έλαιο αντισηπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές και αντικές ιδιότητες. Τα τερπένια χωρίζονται μονοτερπένια, διτερπένια και σεσκιτερπένια. Παραδείγματα αυτών είναι το πινένιο, το λιμονένιο, το καμφένιο, η πιπερίνη κ.α (Ninkuu et al., 2021).

### **2.5.1.2 Μονοτερπένια C<sub>10</sub>**

Πρόκειται για ακόρεστους υδρογονάνθρακες κατά πλειοψηφία και είναι φυσικά συστατικά των αιθέριων ελαίων. Προκύπτουν από συνδυασμό δύο μονάδων ισοπρενίου. Κατά κύριο λόγο προσδίδουν αρώματα που ελκύουν ή απωθούν ζώα (θυμόλη, λεμονίνη, γερανίλη). Ορισμένα ζώα χρησιμοποιούν μονοτερπένια, όπως γερανιόλη και τερπινολίνη σαν φερομόνες (F. Shahidi et al., 1999).

### **2.5.1.3 Σεσκιτερπένια C<sub>15</sub>**

Αποτελούνται από συνδυασμό τριών μονάδων ισοπρενίου. Απαντώνται συνήθως σε ψηλότερα φυτά (higher plants) και χωρίζονται σε άκυκλα, μονο-, δι-, τρι- και τετράκυκλα συστήματα. Έχουν αντιμικροβιακές (Sotanaphun1 et al., 1999), αντιμυκητιακές (Ahmed, 2005), αντικαρκινικές (Modzelewska et al., 2005) και κυτταροτοξικές (David et al., 1999) ιδιότητες και παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών με έντομα και μικροοργανισμούς. Λειτουργούν και ως απωθητικά αλλά και ως ελκτικές ουσίες και φυτοαλεξίνες (Modzelewska et al., 2005).

### **2.5.1.4 Διτερπένια C<sub>20</sub>**

Αποτελούνται από τον συνδυασμό τεσσάρων μονάδων ισοπρενίου. Λόγω μεγάλου μοριακού βάρους δεν εξατμίζονται εύκολα κατά τις θερμικές διαδικασίες απομόνωσης του ελαίου. Θεωρούνται αντιβακτηριακοί και εντομοαποθητικοί παράγοντες ενώ, ερευνάται και η αντικαρκινική και αντιφυματική τους δράση (Torçu & Gören, 2007).

### **2.5.1.5 Αλκοόλες**

Τις ίδιες ιδιότητες προσδίδουν και οι αλκοόλες, οι οποίες προέρχονται από την ένωση τερπενίων με μια καρβοξυλομάδα. Θεωρούνται ασφαλείς ως προς την χρήση τους, καθώς παρατηρείται ελάχιστη ή και καθόλου τοξικότητα ως προς το ανθρώπινο σώμα και δέρμα (Sonia Malik, 2019).

### **2.5.1.6 Αλδεΐδες**

Τις αντιμυκητιακές ιδιότητες των ελαίων τις προσδίδουν οι αλδεΐδες, οι οποίες ταυτόχρονα έχουν ηρεμιστικές, αντισηπτικές και απολυμαντικές δράσεις. Θεωρούνται πολύ σημαντικές ως προς τις ιατρικές τους εφαρμογές, καθώς χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση μυκήτων, όπως η *Candida* και πολλές άλλες (Kurita et al., 1979).

### **2.5.1.7 Εστέρες**

Οι εστέρες είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ αλκοολών και οξέων. Οι εστέρες στα αιθέρια έλαια παρέχουν καταπραϋντικές ιδιότητες, αλλά και αντιφλεγμονώδεις, λόγω της ύπαρξης αλκοολικών ομάδων μέσα στους εστέρες. Ακόμη, στις ιατρικές επιστήμες, θεωρείται ότι παρέχουν και αντιμυκητιακές και ηρεμιστικές ιδιότητες, με εξισορροπητική δράση στο νευρικό σύστημα. Οι πιο συνηθισμένοι εστέρες που συναντάμε στα αιθέρια έλαια είναι η λιναλοόλη και το μυρμηκικό γερανύλιο, που υπάρχουν στο περγαμόντο και τη λεβάντα (Aziz et al., 2018).

### **2.5.1.8 Οξέα**

Τα οξέα, που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια, παρέχουν αντιφλεγμονώδη δράση. Τα οργανικά οξέα υπάρχουν σε πολύ μικρή ποσότητα σε ελεύθερη μορφή, ενώ τα φυτικά οξέα δρουν ως συστατικά ή ρυθμιστικά συστήματα για τον έλεγχο της οξύτητας. Για παράδειγμα, στη βενζόη, περιέχεται βενζοϊκό και κινναμωμικό οξύ (Sonia Malik, 2019).

## 2.6 Λειτουργικός ρόλος/Ιδιότητες

### 2.6.1 Αντιμικροβιακή δράση

Τα αιθέρια έλαια λειτουργούν σαν πιθανοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, έχοντας την δυνατότητα να ελέγξουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Bajrai et al., 2012). Λόγω των σημερινών απαιτήσεων σε λιγότερο συνθετικά συντηρητικά, καθώς και την αύξηση της ανοσίας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά, νέοι τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης είναι αναγκαίοι. Έτσι, αιθέρια έλαια ή συστατικά αυτών έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα (Costa et al., 2015).

Για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ελαίων έχουν γίνει πολλαπλές έρευνες, οι οποίες στοχεύουν στην αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αλλά και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης των ελαίων σε ποικίλους μικροοργανισμούς. Οι βιομελέτες αυτές διεξάγονται με μεθόδους, όπως η διάχυση με δίσκο και η αραίωση σε ζωμό ή άγαρ. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του οργανισμού. Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση που θανατώνει το 99,9% των αρχικών εμβολίων (Chouhan et al., 2017).

Η πιο αποδοτική μέθοδος για τον προσδιορισμό βακτηριοκτόνων ιδιοτήτων είναι το time-kill test, το οποίο παρέχει και πληροφορίες σχετικά με την δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιμικροβιακού παράγοντα και του μικροβιακού στελέχους.

Συγκεκριμένα, οι Li et al. 2014 ανέφεραν ότι οι αντιβακτηριακές καμπύλες του ελαίου *Litsea cubeba* σε συγκέντρωση 0,0625% (v/v) ήταν σε θέση να παρατείνουν την ανάπτυξη της lag phase των κυττάρων *E. coli* σε περίπου 12 ώρες, ενώ τα κύτταρα σκοτώθηκαν πλήρως σε συγκέντρωση 0,125% (v/v) εντός 2 ωρών, όπως φάνηκε από την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης. Για την μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι αραίωσης ζωμού, καθώς και η μέθοδος πητικότητας δίσκου. Επομένως, θα ήταν δυνατή μια ευρεία εφαρμογή του ελαίου *Litsea cubeba* στην αντιμικροβιακή βιομηχανία λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του (W. R. Li et al., 2014).

Άλλη ανάλογη έρευνα διεξήχθη από τους Ahmad et al. 2011 για την καλύτερη και πιο στοχευμένη αντιμετώπιση του μύκητα *Candida* με έλαιο από το φυτό *Coraria nepalensis*. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τους έδειξαν πως σε τιμές της χαμηλότερης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα (έλαιο *Coraria nepalensis*), μόνο το 20% των κυττάρων *Candida*

είχαν άθικτη κυτταρική μεμβράνη, σε σύγκριση με το τυπικό φάρμακο αντιμετώπισης μυκητίασης από *Candida*, Amp B, το οποίο κατάφερε να σκοτώσει μόλις το 25% των κυττάρων στον ίδιο χρόνο. Με βάση τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης κρίθηκε σημαντική η περαιτέρω έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο έλαιο καθώς, όπως αναφέρεται, με την σωστή τυποποίηση θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην αντιμετώπιση του μύκητα (Ahmad et al., 2011).

Οι W. R. Li et al. 2013 σε μια άλλη έρευνα που αφορά την αντιβακτηριακή δράση ελαίου σιτρονέλλας έναντι σε στέλεχος *Aspergillus niger*. Για την μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι αραιώσης ζωμού, καθώς και η μέθοδος πτητικότητας δίσκου. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ισχυρή αντιμυκητιακή δράση του ελαίου. Σε συγκέντρωση 0,125 (v/v) και 0,25% (v/v) κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη  $5 \times 10^5$  σπόριων/mL κονιδίων. Ενώ σε συγκέντρωση 0,5% (v/v) μπορούσε να σκοτώσει πλήρως τα κονίδια  $5 \times 10^5$  σπόριων/mL. Επιπλέον, οι μυκητοκτόνες καμπύλες αποκάλυψαν ότι πάνω από το 90% των κονιδίων θανατώθηκαν σε όλες τις επεξεργασίες με έλαιο σιτρονέλλας 0,125 έως 2% μετά από 24 ώρες. Το κατώτατο όριο για την πλήρη θανάτωση των κονιδίων φάνηκε να είναι συγκέντρωση 0,5% (v/v) ελαίου σιτρονέλλας, ενώ τα επιζώντα κονιόδια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με έλαιο σιτρονέλλας συγκέντρωσης 0,5 έως 2% με αποτέλεσμα να μειώνεται δραστικά το μέγεθός τους ανά ημέρα και εν τέλει να μην επιζήσει κανένας μύκητας μετά το πέρας των 10 ημερών (W. R. Li et al., 2013).

### 2.6.2 Αντικότητα

Οι ιοί είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα, τα οποία αναπαράγονται και πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή (παράγοντας ιούς) και εξαπλώνονται εκτός αυτών δημιουργώντας μια αλυσίδα κυτταρικής μόλυνσης (Reichling et al., 2009).

Πολλαπλές μελέτες δείχνουν την αντική δράση των αιθέριων ελαίων, είτε σε εμφωλευμένους είτε σε μη εμφωλευμένους ιούς. Πιο συγκεκριμένα, φαινόλες, αλκοόλες και άλλα οξυγονωμένα συστατικά των ελαίων (καρβακρόλη, 1,8-σινεόλη, ευγενόλη, γερμακρόνη, θυμόλη, τερπινέν-4-όλη) είναι υπεύθυνα για την αντική τους δράση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιούνταν συστατικά αιθέριων ελαίων αγορασμένα από το εμπόριο. Λόγω στερεοϊσομερίας, είναι πιθανό τα αποτελέσματα να διαφέρουν από αυτά των απευθείας απομονωμένων συστατικών (Reichling et al., 2009).

Βάσει στην βιβλιογραφία, τα αιθέρια έλαια επέδειξαν ιοκτονικά χαρακτηριστικά σε ιούς ελεύθερους κυττάρων, διατάραξη του ιικού περιβλήματος, αναστολή σύνθεσης ιικών πρωτεϊνών και RNA εντός των κυττάρων του ξενιστή καθώς και αναστολή των αρχικών/τελικών σταδίων του πολλαπλασιασμού των ιών μέσα στα κύτταρα του ξενιστή (Reichling et al., 2009).

Οι Saddi et al. 2007 σε μια *in vitro* έρευνα που αφορά τα αντικαταστάσιμα χαρακτηριστικά του ελαίου από το φυτό *Artemisia arborescens* έναντι στους ιούς HSV-1 και HSV-2 κατέδειξαν πως το έλαιο και συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή του, αναστέλλουν την εξωκυττάρια δραστηριότητα των ιών, αλλά και την διάχυση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο ήδη μολυσμένων κυττάρων. Η έρευνα υποστηρίζει πως η αντικαταστάσιμότητα του συγκεκριμένου ελαίου έναντι στους δύο ιούς είναι πολύ ενδιαφέρουσα, καθώς οι τιμές IC<sub>50</sub> 2,4 και 4,1 μg/mL για HSV-1 και HSV-2 αντίστοιχα, είναι αρκετά χαμηλότερες από τις τιμές CC<sub>50</sub> κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα Vero (κύτταρα νεφρού μαϊμούδων), η οποία είναι 132 μg/mL. Το γεγονός αυτό καθιστά το συγκεκριμένο έλαιο ως έναν καλό παράγοντα αντιμετώπισης των ιών αυτών (Saddi et al., 2007).

Οι Haddad et al. 2019 διεξήγαγαν μια έρευνα που αφορά τις αντικαταστάσιμες ιδιότητες του ελαίου του φυτού *Ayurana triplinervis* έναντι στον ιό Zika (ZIKV). Προσδιορίζοντας αρχικά τις κυτταροτοξικές τιμές του ελαίου σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, διεξήγαγαν πειράματα *in vivo* σε ψάρια του γένους *Danio rerio* μολυσμένα με τον ιό. Μετά τους υπολογισμούς τους, το συμπέρασμα της έρευνας ήταν πως η ανασταλτική συγκέντρωση του ελαίου (IC<sub>50</sub>), είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτή της κυτταροτοξικότητάς του (CC<sub>50</sub>), 38 μg/mL και 475 μg/mL αντίστοιχα. Το έλαιο κατάφερε να αναστείλει την επιμόλυνση του ZIKV κατά ~80% σε συγκέντρωση ελαίου 125 μg/mL. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι αρκετά ενδιαφέροντα, καθώς δεν υπάρχει αντικαταστάσιμος παράγοντας για τον συγκεκριμένο ιό (Haddad et al., 2019).

### **2.6.3 Κυτταροτοξικότητα**

Η κυτταροτοξικότητα είναι ένας απλουστευμένος όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια μεμονωμένη τοξική επίδραση σε οποιονδήποτε τύπο κυττάρων που μπορεί να προέρχονται από διάφορες προελεύσεις, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών ή επιθηλιακών κυττάρων, ή αν στοχεύουν σε έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρων παραδείγματος χάρι καρκινικά κύτταρα όγκων ή ηπατικά κύτταρα (ηπατοτοξικότητα). Ο ορισμός της

κυτταροτοξικότητας που εξετάζεται εδώ αφορά τη «διάσπαση της μεμβράνης με μηχανικά μέσα» (Gould & Templin, 2023).

Η χρήση αιθέριων ελαίων στην φαρμακευτική βιομηχανία είναι αρκετά ευρεία. Ένας παράγοντας που περιορίζει την χρήση ελαίων ως αντιμικροβιακούς συντελεστές *in vitro* είναι η απορρόφηση και η μεταφορά των δραστικών συστατικών στο σημείο δράσης αλλά και η μέγιστη δόση που μπορεί να χορηγηθεί χωρίς τοξικές παρενέργειες (Reichling et al., 2009).

Πληθώρα δοκιμών έχει διεξαχθεί για τον προσδιορισμό της μέγιστης μη τοξικής συγκέντρωσης πολλών ελαίων σε κύτταρα θηλαστικών *in vivo*. Η βιβλιογραφία αναφέρει πως κατά κύριο λόγο στις *in vitro* δοκιμές που διεξήχθησαν σε επιθηλιακά κύτταρα δέρματος ανθρώπων και κύτταρα όγκων, τα αιθέρια έλαια έδειξαν κυτταροτοξική δράση σε  $CC_{50}$  σε τιμές 5,0-1.950  $\mu\text{g/mL}$  ανάλογα τον χρόνο επώασης (1-96 ώρες), ενώ η αντιμικροβιακή τους δράση χρειάζεται 20-20.000  $\mu\text{g/mL}$  (Reichling et al., 2009). Οι *in vitro* δοκιμές συνήθως υπερεκτιμούν την κυτταροτοξική δράση των ελαίων καθώς, οι δομές των ιστών αλλά και ο βιομετασχηματισμός και μεταφοράς δεν μπορούν να προσομοιωθούν σε κυτταρικές καλλιέργειες. Το σύστημα Halle and Göres είναι ένα παράδειγμα συστήματος, το οποίο έχει δημιουργηθεί για να μπορέσει να συγκρίνει τις *in vitro* με τις *in vivo* τιμές κυτταροτοξικότητας αιθέριων ελαίων. Με βάση αυτό το σύστημα, η κυτταροτοξικότητα των ελαίων κατατάσσεται σε μέτρια προς χαμηλή (Reichling et al., 2009).

Μια έρευνα των Tipton et al. 2003 με σκοπό την μελέτη της κυτταροτοξικότητας έλαιο από μύρο έδειξε πως το συγκεκριμένο έλαιο μπορεί να μειώσει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τους ινοβλάστες και συνεπώς, να μειώσει την συμμετοχή αυτών των κυττάρων στην φλεγμόνη των ούλων που σχετίζεται με την ουλίτιδα και την περιοδοντίτιδα. Όπως αναφέρεται και στην έρευνα, οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για αυτές τις επιδράσεις είναι άγνωστοι και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Η βιωσιμότητα των κυττάρων και η κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκαν με μεταβολική αναγωγή ενός άλατος τετραζόλιου σε χρωστική φορμαζάνη (δοκιμασία MTT) και με τον υπολογισμό απελευθερωμένης γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) από κύτταρα με κατεστραμμένη μεμβράνη, αντίστοιχα (Tipton et al., 2003).

Οι Rashar et al. 2004 διεξήγαγαν μια έρευνα με σκοπό τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας ελαίου λεβάντας (*Lavandula angustifolia*) σε ανθρώπινα κύτταρα δέρματος. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το έλαιο λεβάντας είναι κυτταροτοξικό για τα κύτταρα του ανθρώπινου δέρματος *in vitro* σε συγκέντρωση 0,25% (v/v) σε όλους τους τύπους κυττάρων



που εξετάστηκαν (HMEC-1, HNDF και 153BR). Η δραστικότητα της λιναλοόλης (71% του ελαίου) αντανakλούσε τη δραστικότητα ολόκληρου του ελαίου, υποδεικνύοντας ότι η λιναλοόλη μπορεί να είναι το δραστικό συστατικό του ελαίου λεβάντας. Η κυτταροτοξικότητα του οξικού λιναλίου ήταν υψηλότερη από εκείνη του ίδιου του ελαίου, γεγονός που υποδηλώνει την καταστολή της δραστηριότητάς του από έναν άγνωστο παράγοντα του ελαίου. Η έρευνα υποδεικνύει πως ακόμα και αν τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση, είναι σημαντικό να αναγνωρίζουμε τα όρια του κάθε παράγοντα και να μπορεί η πιθανώς κυτταροτοξική δράση του να περιοριστεί με την χρήση μικρότερων συγκεντρώσεων ή την απομάκρυνση των κυτταροτοξικών παραγόντων από το έλαιο για να μπορέσει να υπάρξει ομαλή και ασφαλής χρήση τους (Rashar et al., 2004).

## **2.7 Εφαρμογές ελαίων**

### **2.7.1 Γενικές εφαρμογές**

Στα φυτά ο ρόλος των αιθέριων ελαίων είναι κυρίως εντομοαπωθητικός για τα περισσότερα έντομα, ενώ στοχευμένα προσελκύουν άλλα είδη, ώστε να γίνει η γονιμοποίηση. Ταυτόχρονα λειτουργούν ως διαλυτικά μέσα ρητίνων σε περίπτωση τραυματισμού του φυτού αλλά και ως μέσα απομάκρυνσης ανεπιθύμητων προϊόντων μεταβολισμού (Asbahani et al., 2015).

Η χρήση από τον άνθρωπο δεν σταματάει στα εντομοαπωθητικά καθώς, η βιομηχανία για την εκμετάλλευση των ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων διακλαδώνεται σε πολλούς διαφορετικούς τομείς, όπως αυτοί της κοσμετολογίας, βιομηχανίας τροφίμων, ποτοποιίας, φαρμακευτικής, αρωματοποιίας και ιατρικής (Husnu Can Baser & Buchbauer, 2010). Χρησιμοποιούνται σαν συστατικά σε καλλυντικά, αρωματικά χώρου, αρώματα, προϊόντα περιποίησης, προϊόντα καθαρισμού επιφανειών (Aburjai & Natsheh, 2003), αλλά και ως στοματικά αντισηπτικά, καθώς δρουν έναντι βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας, όπως ο *Streptococcus mutans* (Wallace, 2004).

## **2.7.2 Θεραπευτικές εφαρμογές**

### **2.7.2.1 Αρωματοθεραπεία**

Αρωματοθεραπεία ονομάζεται η πρακτική στην οποία χρησιμοποιούνται αιθέρια έλαια σαν θεραπευτικοί παράγοντες ή για θεραπευτικούς σκοπούς (Manion & Widder, 2017). Την συναντάμε αρχικά στους αρχαίους Αιγύπτιους και Ινδούς και είναι ευρέως διαδεδομένη και σήμερα με την επίβλεψη και εποπτεία επίσημων φορέων, όπως το Aromatherapy Organizations Council του Ηνωμένου Βασιλείου. Η βάση αυτής της πρακτικής είναι η ικανότητα των ελαίων να απορροφώνται εύκολα από το δέρμα. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανακούφιση συμπτωμάτων αλλεργιών και ρευματικών νόσων, αλλά και για την εμφάνιση αντιφλεγμονώδους, αντιγηραντικής δράσης (Ali et al., 2015a). Ενώ υπάρχουν δεδομένα για την αποτελεσματικότητα της πρακτικής αυτής, καθώς έρευνες έχουν δείξει πως έλαια συγκεκριμένων φυτών (λεβάντας, τσαγιού) παρέχουν ανακούφιση από αλλεργικά συμπτώματα, αναστέλλοντας την απελευθέρωση ισταμίνης και την παραγωγή κυτταροκινών *in vitro* και *in vivo*, επίσημοι ιατρικοί φορείς δε φαίνεται να αναγνωρίζουν την πρακτική σαν συμβατική ιατρική, αν και το επιστημονικό ενδιαφέρον για την αρωματοθεραπεία έχει αρχίσει να αυξάνεται τα τελευταία χρόνια (Ali et al., 2015b; Lee et al., 2012).

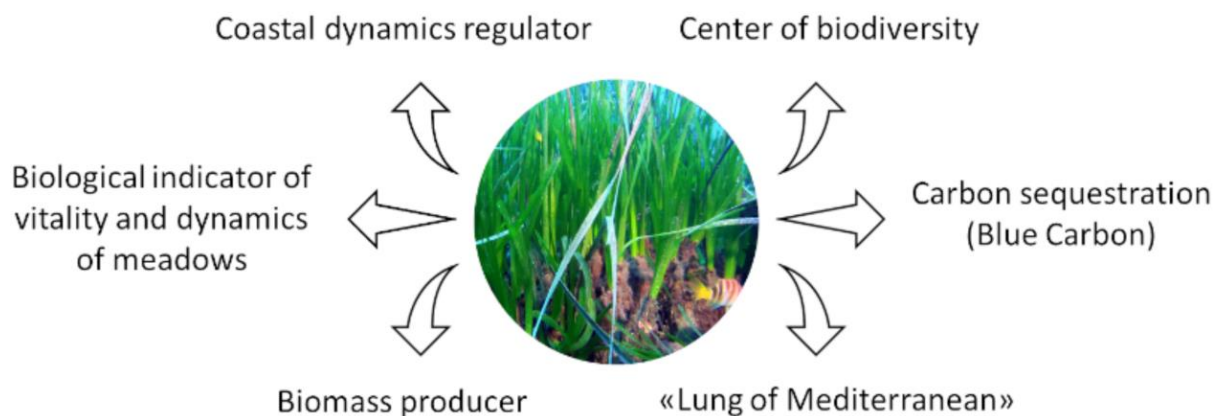
### **2.7.2.2 Στην βιομηχανία τροφίμων**

Στην σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων όπου υπάρχει ευρεία χρήση συνθετικών συντηρητικών, οι καταναλωτές έχουν αρχίσει να αναζητούν και να απαιτούν από τους παραγωγούς την χρήση λιγότερο επεξεργασμένων, φυσικών συστατικών έναντι των τυποποιημένων. Τα αιθέρια έλαια με τις αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές τους ιδιότητες είναι κύριοι παράγοντες για την κάλυψη αυτών των αναγκών, καθώς δυσχεραίνουν τις συνθήκες ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών, αυξάνοντας την διάρκεια ζωής των προϊόντων στο ράφι χωρίς να αλλοιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, όταν προστίθενται σε μικρές συγκεντρώσεις (Mihai & Popa, 2013). Άλλος ένας λόγος χρήσης των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα από τις βιομηχανίες είναι η αυξανόμενη αντοχή των παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά και σε άλλους τυποποιημένους τρόπους μείωσης της ανάπτυξής τους. Τα αιθέρια έλαια ή τα συστατικά τους, αυτούσια ή σε συνδυασμό με τυποποιημένα συντηρητικά, μπορούν να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση της τάσης αυτής καθώς οι μικροοργανισμοί δεν έχουν αναπτύξει ακόμα τρόπους άμυνας απέναντι στις ιδιότητες των ελαίων (Bajraji & Baek, 2016).

## 2.8 Φυτά

### 2.8.1 *Posidonia oceanica*

Ως *Posidonia oceanica* ή Seagrass ορίζεται το θαλάσσιο γρασίδι ή τα φύκη, η οποία αναπτύσσεται σε καθαρό νερό με βάθος που φτάνει τα 45 m και είναι κοινό φυτό στη Μεσόγειο Θάλασσα (Romero et al., 1998). Η *P. oceanica* ανήκει στην οικογένεια *Posidoniaceae* και το γένος *Posidonia* έχει εννέα είδη, στα οποία η *P. oceanica* περιορίζεται πλήρως στη Μεσόγειο Θάλασσα (Den Hartog & Kuo, n.d.). Η *P. oceanica* διαθέτει διάφορες χημικές ενώσεις, όπως: αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, φαινόλες, ταννίνες, σαπωνίνες, φλοβατανίνες, στερόλες, πρωτεΐνες, αναγωγικά σάκχαρα, πολυσακχαρίτες και ρητίνες, οι οποίες διαφέρουν σε συγκέντρωση ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται και έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* με μεταβλητή δραστηριότητα έναντι άλλων χρησιμοποιούμενων βακτηριακών στελεχών (Ayad Berfad et al., 2014a). Προστατεύουν την ενδοχώρα από την επίθεση των κυμάτων και σταθεροποιούν τον πυθμένα της θάλασσας, καθώς τα φύκη αμβλύνουν τα ρεύματα των κυμάτων (Koftis & Prinos, n.d.). Χρησιμοποιούνται ως ένδειξη της θαλάσσιας μόλυνσης, καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη θαλάσσια ρύπανση (Cozza et al., 2004).



**Εικόνα 1.** Περιβαλλοντικά οφέλη της *P. oceanica* (Vasarri et al., 2021b)

#### 2.8.1.1 Προ υπάρχουσες χρήσεις

Η πρώτη γνωστή χρήση της *P. oceanica* στον ανθρώπινο πολιτισμό χρονολογείται στην αρχαία Αίγυπτο, όπου η *P. oceanica egagropils* (συσσωματώματα σφαιρικών ιών από νεκρά φύλλα της *P. oceanica* που σχηματίστηκαν μέσω υδροδυναμικών δυνάμεων σε ρηγά νερά και στη συνέχεια ξεβράστηκαν στην ακτή) χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή υποδημάτων. Αυτές

οι φυσικές μπάλες ινών δημιουργούνται όταν τα φύλλα της *P. oceanica* φθείρονται και διασπώνται και τα ρεύματα του νερού και τα κύματα τα περιστρέφουν σε σφαιρικά σχήματα.

Στην Τυνησία, τα φύλλα της *P. oceanica* χρησιμοποιούνταν ως στρωμή για τα ζώα και χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα χάρη στις αντιμυκητιακές και εντομοαπωθητικές τους ιδιότητες. Λαμβάνοντας υπόψη τη διατροφική αξία της *P. oceanica*, παρόμοια με εκείνη των κτηνοτροφικών φυτών, χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως συμπληρώματα διατροφής για τα πουλερικά και τα ζώα. Μεταξύ άλλων χρήσεων, η *P. oceanica* χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή χαρτιού στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα.

Πέρα από τις ποικίλες εφαρμογές στις ανθρώπινες δραστηριότητες, η *P. oceanica* έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά επίσης ως φαρμακευτικό φυτό για τη θεραπεία διαφόρων ανθρώπινων διαταραχών. Η πρώτη πληροφορία για τις θεραπευτικές ιδιότητες της *P. oceanica* προέρχεται από την αρχαία Αίγυπτο, όπου χρησιμοποιούνταν για πονόλαιμο και δερματικά προβλήματα. Ένα παλιό εγχειρίδιο βοτανολογίας του Cazzuola αναφέρει επίσης την *P. oceanica* ως ένα δημοφιλές προϊόν της φαρμακοποιίας (Vasarrì et al., 2021a). Έχει επίσης τεκμηριωθεί ότι τα φύλλα της *P. oceanica* χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία φλεγμονών και ερεθισμών, αλλά επίσης ως φάρμακο για την ακμή, τον πόνο στα κάτω άκρα και την ελκώδη κολίτιδα (El-Darier & El-Mokasabi, 2014).

Από την άλλη πλευρά, η περίεργη χρήση της *P. oceanica* ως μαξιλάρι και στρώματα χρονολογείται από τον δέκατο έκτο αιώνα. Η πρακτική αυτή εξυπηρετούσε την πρόληψη των λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος και την ανακούφιση των ατόμων με φυματίωση. Η χρήση του αφεψήματος των φύλλων της *P. oceanica* ως φυσική θεραπεία για τον διαβήτη και την υπέρταση από τους κατοίκους των παράκτιων περιοχών της Δυτικής Ανατολής ανήκει σε μια πιο πρόσφατη παράδοση (Gokce & Haznedaroglu, 2008).

### 2.8.1.2 Εξέλιξη του φυτού

Ήδη από το 1989, οι Bernard και Pesando απέδωσαν σε ένα εκχύλισμα ριζωμάτων της *P. oceanica* για τη μεσογειακή θαλάσσια χλωρίδα αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες (Bernard & Pesando, 1989). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από τα φύλλα του *P. oceanica* είχαν επίσης αντιβακτηριακή δράση τόσο κατά των θετικών κατά Gram όσο και κατά των αρνητικών, με ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα κατά της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* (Ayad Berfad et al., 2014a). Η *P. oceanica* έχει επίσης επιδείξει αντικές

ικανότητες, συγκεκριμένα, το 2018 οι Farid et al. έλαβαν ότι τα εκχυλίσματα από τις φυσικές μάλες ινών της *P. oceanica* ανέστειλαν τη μόλυνση από τον ιό H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> (γρίπη των πτηνών) κατά 45% (Farid et al., 2018a).

Μελέτες έδειξαν ότι εκχύλισμα φύλλων *P. oceanica*, πλούσιο σε κιχωρικό οξύ, φάνηκε ότι έχει επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών και στην παραγωγή κολλαγόνου, καθώς και αντιμελανογόνες ιδιότητες στα ανθρώπινα κύτταρα (Cornara et al., 2018). Επομένως, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος *P. oceanica* μπορεί να σχετίζεται με την προστασία από το σχηματισμό ρυτίδων, τη γήρανση του δέρματος, την ανεπιθύμητη υπερμελάγχρωση και την κυτταρίτιδα, στην οποία το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο.

Σε πρόσφατες μελέτες, η *P. oceanica* (πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες) έχει δείξει ορισμένες σημαντικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και αντιγλυκαιμικές και την ικανότητα καταστολής της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων (Vasarri et al., 2021a).

### **2.8.2 *Cistus creticus* L.**

Η οικογένεια *Cistaceae* (Angiosperm, Malvales) αποτελείται από 8 γένη (J.M. Arrington & K. Kubitzki, 2003) και 180 είδη, με 5 γένη ενδημικά στην περιοχή της Μεσογείου (*Cistus*, *Fumara*, *Halimium*, *Helianthemum* και *Tuberaria*). Η ταξινομική διαφοροποίηση του γένους καθορίζεται από φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των μορφολογικών χαρακτηριστικών, όπως το σχήμα, τον αριθμό των νεύρων, το χρώμα και τα τριχώματα των φύλλων και του βλαστού, καθώς και των αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών, όπως τον αριθμό των πετάλων και των σεπάλων, το σχήμα και το χρώμα του άνθους, τον αριθμό των βαλβίδων του καρπού και το μέγεθός του. Επίσης, η ταξινόμηση του γένους με βάση τον φαινότυπο έχει επιβεβαιωθεί με τη χρήση χημειότυπων φυτών και μοριακών μεθοδολογιών (Papaefthimiou et al., 2014).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του γένους *Cistus* είναι ο συνδυασμός διαφορετικών τύπων τριχιδίων στα φύλλα, στο βλαστό και στον κάλυκα, συμπεριλαμβανομένων των μη αδενικών τριχωμάτων. Τα φουντωτά, αστεροειδή, καθώς και τα επιμήκη αδενικά τριχώματα παράγουν και εκκρίνουν ρητίνη. Σε ορισμένα είδη (π.χ. *C. creticus* subsp. *creticus*), η ρητίνη αυτή είναι πλούσια σε βιολογικά δραστικούς και φαρμακολογικά ενδιαφέροντες μεταβολίτες,

όπως φλαβονοειδείς αγλυκόνες, γλυκοζίτες, και τερπενοειδή, συμπεριλαμβανομένων διτερπενίων τύπου λαβδάνης (B. Guzmán & Vargas, 2005).

Ως *Cistus creticus* L. ή Pink Rock Rose ή Κίστος ή Λάδανο ορίζεται ένα γένος δικοτυλήδων πολυετών ποωδών φυτών, το οποίο έχει σκληρά φύλλα και αναπτύσσεται σε ανοιχτές περιοχές με πετρώδη και άγονα εδάφη. Είναι αυτοφυή στην περιοχή της Μεσογείου και είναι γνωστό για την ανθεκτικότητά του. Ακόμη και μετά από φυσικές δασικές πυρκαγιές, το φυτό αυτό είναι ικανό να αναπτυχθεί λόγω της αύξησης της βλαστικής ικανότητας των σπόρων μετά την έκθεση τους σε υψηλές θερμοκρασίες (Thanos et al., 1992). Σε ορισμένα είδη φυτών παρατηρείται φαινόμενο, το οποίο ονομάζεται εποχιακός διμορφισμός. Αυτό επιτρέπει στα φυτά να προσαρμοστούν σε συνθήκες ξηρασίας με τη μείωση του μεγέθους των φύλλων και την αύξηση των τριχιδίων (Aronne & De Micco, 2001).



**Εικόνα 2.** Άνθος *C. creticus* (αριστερά) και αποξηραμένο *C. creticus* (δεξιά)  
(Skorić et al., 2012a)

### 2.8.2.1 Προ υπάρχουσες χρήσεις

Το 1753 ο Carl Linnaeus αναφέρθηκε για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*, σε πολυάριθμα είδη και σε υποείδη, τα οποία έχουν ταξινομηθεί σε αυτό το γένος. Έπειτα από αρκετές ταξινομικές επανεκτιμήσεις, έχουν ταυτοποιηθεί έως σήμερα περίπου 21 διαφορετικά είδη του γένους *Cistus*. Τα είδη αυτά κατανέμονται σε δύο γενεαλογικούς κλάδους, τα οποία διακρίνονται από το χρώμα των ανθών τους και ανήκουν είτε στα λευκά ανθοφόρα, είτε στα ροζ ανθοφόρα φυτά, είτε και στα δύο (B. Guzmán & Vargas, 2005). Πολλά από αυτά τα είδη έχουν βρει εφαρμογές στη μεσογειακή παραδοσιακή ιατρική, καθώς χρησιμοποιούνται ως αφεψήματα βοτάνων για την ανακούφιση από πεπτικά προβλήματα και κρυολογήματα, επίσης χρησιμοποιούνται και ως εκχυλίσματα για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων, ως σκευάσματα και ως αρώματα (Papaefthimiou et al., 2014).

Τα είδη του γένους *Cistus* συχνά χρησιμοποιούνται σε πολλές παραδοσιακές φαρμακευτικές συνταγές λόγω των αντιμικροβιακών (Chinou et al., n.d.; Demetzos et al., 1999), αντικαρκινικών (Skorić et al., 2012a), αντικών (Kalus et al., 2009) και αντιφλεγμονώδων (Küpeli & Yesilada, 2007) ιδιοτήτων τους.

Διάφορες προϋπάρχουσες μελέτες τεκμηρίωσαν την παραδοσιακή χρήση αυτού του φαρμακευτικού φυτού. Μία έρευνα από τους Fakir et al. (2009) το *C. creticus*, που συλλέγεται για ιατρική χρήση από τους ντόπιους κατοίκους στη Δυτική Μεσόγειο, της Τουρκίας. Ανακαλύφθηκε ότι το *C. creticus*, το οποίο είναι γνωστό όχι μόνο για τις ιδιότητες του ως αποχρεμπτικό, αλλά και για την παραδοσιακή του χρήση ως φάρμακο κατά της δυσκοιλιότητας. Μια άλλη έρευνα που διεξήχθη από τους Κοçyiğit και Özhatay (Koçyiğit & Özhatay, 2006) ανέδειξε την παραδοσιακή χρήση αυτού του είδους ως φάρμακο για τη φλεγμονή της ουρήθρας, τη στειρότητα, ως διεγερτικό, τα προβλήματα στο στομάχι, για να καταπολεμά την ευκοιλιότητα, καθώς και για τη θεραπεία δαγκώματος από φίδια, από εγκαύματα και για επούλωση πληγών. Οι ενέργειες αυτές συνδέονται με την παρουσία πτητικών ή μη πτητικών ενώσεων, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, οι τανίνες και οι φλαβονολικές ουσίες (Lukas et al., 2021; Sahraoui & Chaker, 2015).

### 2.8.2.2 Εξέλιξη του φυτού

Παλαιότερες έρευνες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα *Cistus* διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Ait Lahcen et al., 2020a; Bouamama et al., 2006).

Τα αποτελέσματα αυτά ενθάρρυναν τους ερευνητές να επεκτείνουν την έρευνά τους σχετικά με τις ιδιότητες αυτές και ιδιαίτερα για το *C. creticus*, το οποίο για την συγκεκριμένη έρευνα συλλέχθηκε από δύο διαφορετικές τοποθεσίες στο νησί της Ρόδου (Επτά Πηγές και Κοιλιάδα των Πεταλούδων). Αξιολογήθηκε η αντιβακτηριακή παράμετρος έναντι ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων με βάση τη δημόσια υγεία, η κυτταροτοξική δραστηριότητα σε διάφορα καρκινικά κύτταρα, η αντιοξειδωτική ικανότητα και η αντιφλεγμονώδη δράση των εκχυλισμάτων *Cistus*. Η χημική σύνθεση προσδιορίστηκε με τη χρήση της τεχνικής LC-DAD-ESI/MS, προκειμένου να διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ των εκτιμώμενων βιολογικών επιδράσεων και συγκεκριμένων ενώσεων. Τα κυρίαρχα συστατικά που εντοπίστηκαν στα εκχυλίσματα ήταν παράγωγα κερκετίνης και μυρικετίνης (Mocan et al., 2022).

Τα παρασκευάσματα του *C. creticus* σε υδατικές και υδροαιθανολικές μορφές χρησιμεύουν ως σημαντικές πηγές βιοδραστικών ενώσεων, που οι περισσότερες από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολών. Η μυρικετίνη και η κερκετίνη ξεχωρίζουν ως κύρια συστατικά, με τη διαφορετική κατανομή τους στα δείγματα να αποδίδεται στον τόπο συγκομιδής και στον τύπο του διαλύτη, που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία εκχύλισης. Ανακαλύφθηκε ότι τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν σημαντικές ποσότητες φαινολικών, καθιστώντας τα ιδιαίτερα αποτελεσματικά ως αντιοξειδωτικά, κυτταροτοξικά μέσα και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η αξιολόγηση για αντιβακτηριακή δράση απέδειξε ότι τα αφεψήματα επιδεικνύουν βακτηριοκτόνες ιδιότητες, αν και με ασθενέστερη δράση κατά του βιοφίλμ σε σύγκριση με τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα. Συνολικά, τα ευρήματά της παρούσας έρευνας υποδεικνύουν ότι διαλύτες ενδιάμεσης πολικότητας αποδίδουν καλύτερη ανάκτηση βασικών ενώσεων από το *C. creticus*, με αποτέλεσμα φυτικά παρασκευάσματα με ενισχυμένο βιοδραστικό δυναμικό. Επιπλέον, αυτός ο τύπος διαλύτη μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της εξαγωγής για άλλες ενώσεις που δεν είναι φαινολικές, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν τις θεραπευτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος μέσω μιας συνεργιστικής δράσης (Mocan et al., 2022).

Σε μία άλλη έρευνα, φυτά *C. creticus* αναπτύχθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια σε διαφορετικά επίπεδα αλατότητας (0, 30 ή 60 mM NaCl) και εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας



δύο διαφορετικούς διαλύτες (70% αιθανόλη και απεσταγμένο νερό). Η έρευνα επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επίδρασης της αλατότητας στην ανάπτυξη των φυτών, στην ομοίωση των ανόργανων συστατικών, στη βιοχημική σύνθεση των εκχυλισμάτων και στις θεραπευτικές τους δυνατότητες όσον αφορά τον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος.

Το *C. creticus* παρουσίασε ιδιαίτερα ευεργετική επίδραση τόσο στα καρκινικά κύτταρα, όσο και στην κυτταρική επιβίωση. Τα εκχυλίσματα αιθανόλης περιείχαν υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολικών ενώσεων και επέδειξαν ανώτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα νερού. Επιπλέον, το *C. creticus* τακτοποιήθηκε ως σημαντικό αντιοξειδωτικό με στόχο τα μιτοχόνδρια στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος (Ozbekle et al., 2024).

## **2.9 Μικροοργανισμοί**

### **2.9.1 Βακτήρια**

#### **2.9.1.1 Χρώση κατά Gram**

Η διαφορεική χρώση που έγινε από τον μελετητή Christian Gram βασίσθηκε στην ικανότητα ή ανικανότητα του βακτηρίου να κατακρατεί το σύμπλοκο της χρώσεως του με crystal violet και ιώδιο, όταν εκπλύνονταν με οργανικό διαλύτη, όπως η ακετόνη ή η αιθανόλη. Η πεπτιδογλυκάνη είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος και των θετικών και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006). Τα βακτήρια χωρίζονται σε θετικά κατά Gram βακτήρια (Gr+) και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Gr-).

#### **I. Θετικά κατά Gram βακτήρια (Gr+)**

Θετικά κατά Gram χαρακτηρίζονται τα βακτήρια, τα οποία έχουν τοίχωμα υψηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη και χαμηλότερης σε λιπίδια. Το κυτταρικό τοίχωμα χρωματίζεται με την επίδραση του κρυσταλλικού ιώδους (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006). Τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι:

1. *Bacillus cereus*

Το γένος *Bacillus* ανήκει στην οικογένεια *Bacillaceae*. Ο *B. cereus* είναι αερόβιο βακτήριο, είναι θετικό κατά Gram, έχει σχήμα ραβδίου, παρουσιάζει κινητικότητα, σχηματίζει ελλειψοειδή ή κυλινδρικά σπόρια στο άκρο του ραβδίου και το εύρος του σποριάγγελιου είναι μεγαλύτερο του 0,9 μm. Ο *B. cereus* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 4-50°C. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30-37°C (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006; Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

2. *Enterococcus faecalis*

Το γένος *Enterococcus* ανήκει στην οικογένεια *Enterococcaceae*. Ο *E. faecalis* είναι ένας μη σπορογόνος, ζυμωτικός, προαιρετικά αναερόβιος, θετικός κατά Gram κόκκος. Τα κύτταρα του βακτηρίου είναι ωοειδή, με διάμετρο 0,5 έως 1 μm και απαντώνται είτε μεμονωμένα, ή ενωμένα ανά δύο ή σχηματίζοντας κοντές αλυσίδες. Ο *E. faecalis* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 0-50°C. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35-37°C (Rô C , As et al., 2004; Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

3. *Listeria monocytogenes*

Το γένος *Listeria* ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae*. Η *L. monocytogenes* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, είναι θετικό κατά Gram, έχει σχήμα ραβδίου και δεν σχηματίζει σπόρια. Η *L. monocytogenes* είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 1-45°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 30-37°C (Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

4. *Staphylococcus aureus*

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια *Staphylococcaceae*. Τα περισσότερα στελέχη του *S. aureus* που παράγουν εντεροτοξίνη παράγουν κοαγκουλάση, είναι προαιρετικά αναερόβια, αλλά αναπτύσσονται καλύτερα σε αερόβιο παρά σε αναερόβιο περιβάλλον. Είναι θετικό κατά Gram και έχει σχήμα σφαιρικό. Ο *S. aureus* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 7-48°C, ενώ εντεροτοξίνη παράγεται σε θερμοκρασία 10-46°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή εντεροτοξίνης είναι 40-45°C, ενώ η βέλτιστη ανάπτυξη του *S. aureus* είναι 37°C. Όσο η θερμοκρασία

ανάπτυξης του μικροοργανισμού μειώνεται της βέλτιστης θερμοκρασίας παραγωγής τοξίνης, μειώνεται και ο ρυθμός παραγωγής της εντεροτοξίνης (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006; Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

## II. Αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Gr-)

Αρνητικά κατά Gram χαρακτηρίζονται τα βακτήρια, τα οποία έχουν κυτταρικό τοίχωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη και υψηλότερης σε λιπίδια. Το κυτταρικό τοίχωμα δεν συγκρατεί το κρυσταλλικό ιώδες (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006). Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι:

### 1. *Escherichia coli*

Το γένος *Escherichia* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η *E. coli* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, είναι αρνητικό κατά Gram και έχει σχήμα ραβδίου. Η *E. coli* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 10-45°C. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 39°C (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006).

### 2. *Klebsiella pneumoniae*

Το γένος *Klebsiella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η *K. pneumoniae* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, είναι αρνητικό κατά Gram και έχει σχήμα ραβδίου. Η *K. pneumoniae* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 10-45°C. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37°C (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006).

### 3. *Pseudomonas aeruginosa*

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Η *P. aeruginosa* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, είναι αρνητικό κατά Gram και έχει σχήμα ραβδίου. Η *P. aeruginosa* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 4-42°C. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37°C (Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

#### 4. *Salmonella enterica*

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Με ορολογικές δοκιμές διακρίνονται περισσότεροι από 2.541 διαφορετικοί ορότυποι. Το είδος *S. enterica* διακρίνεται σε 6 υποείδη (*S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae* και *S. enterica subsp. indica*). Ενώ παλαιότερα οι ορότυποι των σαλμονελλών θεωρούνταν είδη, σήμερα αναφέρονται ως *S. Typhimurium* και εννοούμε *S. enterica* ορότυπος *Typhimurium*. Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, είναι αρνητικά κατά Gram, έχουν σχήμα ραβδίου, παρουσιάζουν κινητικότητα, δεν σχηματίζουν σπόρια και παρουσιάζουν μικρή θερμοανθεκτικότητα. Οι σαλμονέλλες δεν είναι πρωτεολυτικά βακτήρια. Η *S. enterica* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες που αναπτύσσονται οι σαλμονέλλες είναι 2-4°C. Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των σαλμονελλών είναι 45°C, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37°C. Ορισμένα στελέχη *S. Typhimurium* έχουν μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 54°C (Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

#### 2.9.2 Μύκητες

Ο μύκητας είναι:

##### 1. *Candida albicans*

Το γένος *Candida* ανήκει στην οικογένεια *Cryptococcaceae* («ατελείς» ζύμες που δεν σχηματίζουν σπόρια και αναπαράγονται με εκβλάστηση). Η *C. albicans* είναι προαιρετικά αναερόβιο μυκήτιο και συγκεκριμένα είναι μονοκυτταρικής μορφής. Συνήθως εμφανίζεται ως σφαιρικά κύτταρα (κοκκίδια) ή ως μονοκυτταρικές υφές. Η *C. albicans* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 20-37°C. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37°C (Γιώργος Μπαλατσούρας, 2006; Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται σημαντικά δεδομένα για τους μικροοργανισμούς σύμφωνα με τις παραπάνω πληροφορίες.

**Πίνακας 1.** Μικροβιολογικά προφίλ βακτηρίων και μύκητα

<b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	<b>ΓΕΝΟΣ</b>	<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ O<sub>2</sub></b>	<b>ΣΧΗΜΑ</b>	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ)</b>
<b>Βακτήρια</b>					
<b>Θετικά κατά Gram</b>					
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	Αερόβιο	Ραβδίου	Μεσόφιλος 30-37°C
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Ωοειδές	Μεσόφιλος 35-37°C
<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Ραβδίου	Ψυχρότροφος 30-37°C
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Σφαιρικό	Μεσόφιλος 37°C

Αρνητικά κατά Gram					
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Ραβδίου	Μεσόφιλος 39°C
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Ραβδίου	Μεσόφιλος 37°C
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Ραβδίου	Μεσόφιλος 37°C
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>	Αερόβιο ή Προαιρετικά αναερόβιο	Ραβδίου	Μεσόφιλος 37°C
Μύκητες					
<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>	Προαιρετικά αναερόβιο	Σφαιρικά κύτταρα (κοκκίδια) ή ως μονοκυτταρικές υφές	Μεσόφιλος 37°C

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### I. Σκοπός

Από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα, τα φυτά έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας και μελέτης, αναδεικνύοντας τις μοναδικές τους ιδιότητες και τα πολλαπλά τους οφέλη. Η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων έχει καθιερωθεί ως αναπόσπαστο μέρος διαφόρων βιομηχανιών, όπως της διατροφής, των καλλυντικών, των αρωμάτων και των φαρμάκων, λόγω των αποδεδειγμένων ευεργετικών επιδράσεών τους στην ανθρώπινη υγεία. Αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις αποδίδονται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, οι οποίες προσφέρουν σημαντικά αντιμικροβιακά, αντιμυκητιακά, κυτταροτοξικά και αντικαρκινικά οφέλη. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν διεξοδικά οι αντιμικροβιακές δράσεις των εκχυλισμάτων των φυτών *Posidonia oceanica* και *Cistus creticus*, τα οποία καλλιεργούνται στα ελληνικά εδάφη και ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Αναλυτικότερα, ο σκοπός της εργασίας επικεντρώνεται στα παρακάτω:

1. Χρήση υδατικών και οργανικών διαλυτών για την εύρεση της βέλτιστης απόδοσης των αιθέριων ελαίων όσο αναφορά τις βιολογικές τους ιδιότητες.
2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC-DAD για την ανάλυση φαινολικού προφίλ των εκχυλισμάτων.
3. Εμβολιασμός υποστρωμάτων σε τρυβλία petri για την αξιολόγηση αντιβακτηριακής και αντιμυκητιακής δράσης.
4. Εφαρμογή μεθόδου AlamarBlue για τον προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης.
5. Εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού λουσιφεράσης προερχόμενη από iό για την εκτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των ελαίων.
6. Εμπλουτισμός της βιβλιογραφίας με καινοτόμα ευρήματα μέσω συγκριτικών αναλύσεων φυτικών εκχυλισμάτων.

#### II. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η μελέτη του βιοχημικού προφίλ και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων φυτών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας εδώ και πολλά χρόνια. Τα φυτικά εκχυλίσματα της *P. oceanica* έχουν αναλυθεί εκτενώς, κυρίως για τις ευεργετικές τους

επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, ενώ τα φυτικά εκχυλίσματα του *C. creticus* δεν έχουν τον ίδιο όγκο ερευνητικών εργασιών, καταλήγοντας στο ότι χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για την εξακρίβωση των ολιγάριθμων έως τώρα δεδομένων και την δημιουργία καινούργιων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2), αναφέρονται συνοπτικά δημοσιεύσεις, σχετιζόμενες με την ανάλυση του χημικού προφίλ των συγκεκριμένων φυτικών εκχυλισμάτων, καθώς και με τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, ύστερα από ενδελεχή έρευνα.

**Πίνακας 2.** Πειράματα και μέθοδοι που σχετίζονται με το βιοχημικό προφίλ και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων *Posidonia oceanica* και *Cistus spp.*

	Αναλύσεις	Μέθοδοι/Σκοπός	Αναφορά
<i>Posidonia oceanica</i>	Αντιοξειδωτική δράση, αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων εντέρου με χρήση εκχυλισμάτων <i>P. Oceanica</i>	Ανάλυση UHPLC-DAD, Ανάλυση φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, Αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα με εύρεση IC <sub>50</sub> για τα καρκινικά κύτταρα εντέρου	(Kevrekidou et al., 2024)
	Φυτοχημική ανάλυση, <i>in vitro</i> αξιολόγηση αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών δράσεων φαινολικών εκχυλισμάτων από φύλλα <i>P.oceanica</i>	Μέθοδος Folin-Ciocalteu, χρωματομετρική ανάλυση, για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου και του ολικού φλαβονοϊκού περιεχομένου αντίστοιχα, ανάλυση HPLC	(Abdelmohsen et al., 2016)
	Φυτοχημική ανάλυση και αντιβακτηριακή δράση 5 διαφορετικών εκχυλισμάτων από <i>P.oceanica</i>	Μέθοδος διήθηση δίσκου σε άγαρ, διάφορες δοκιμές για τον προσδιορισμό πολλαπλών χημικών ενώσεων στα εκχυλίσματα	(Ayad Berfad et al., 2014b)



	Κυτταροτοξικό και χημοσυστηματικό ενδιαφέρον του <i>P.oceanica</i>	LC/ESI/MS ανάλυση, Δοκιμή σουλφοροδοταμίνης-B (SRB) για τον προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης	(Farid et al., 2018b)
Cistus spp.	Αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης υδατικών εκχυλισμάτων του <i>Cistus populifolius</i> και <i>Cistus ladanifer</i>	Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC για <i>S. aureus</i> και <i>E. coli</i> Μέθοδος μικρόπλακας	(Barrajón-Catalán et al., 2010)
	Εύρεση χημικής σύνθεσης, αντιοξειδωτικής, αντιμυκητιακής και αντιμικροβιακής δράσης από φύλλα <i>C.creticus</i>	Υδροαπόσταξη για την εξαγωγή του ελαίου και αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας για την χημική ανάλυση. Μικροβιολογικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πολλαπλών αραιώσεων σε άγαρ	(Ait Lahcen et al., 2020b)
	Κυτταροτοξική δράση εκχυλισμάτων αιθανόλης <i>in vitro</i> σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα	GC/FID και GC/MS για την χημική ανάλυση του εκχυλίσματος. δοκιμασία σουλφοροδοταμίνης B (SRB) για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης	(Skorić et al., 2012b)
	Φυτοχημικές και αντιμικροβιακές δράσεις Αιθέριων Ελαίων του είδους <i>Cistus</i> στην Κροατία	Αναλύσεις GC/MS/FID για την εύρεση της χημικής σύνθεσης του φυτού. Για την αντιμικροβιακή δράση χρησιμοποιήθηκαν δοκιμασίες μικροδιαλυτοποίησης σε άγαρ	(Politeo et al., 2018)

	<p>Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων των <i>Cistus creticus</i> και <i>Cistus salviifolius</i></p>	<p>Υδροαπόσταξη για την απομόνωση των εκχυλισμάτων. GC και GC-MS για την χημική ανάλυση του εκχυλίσματος και για την αντιοξειδωτικότητα δοκιμή απορρόφησης ριζών DPPH, απορρόφησης υπεροξειδίου του υδρογόνου και χηλικής δραστηριότητας ιόντων σιδήρου</p>	<p>(Abu-Orabi et al., 2020)</p>
--	--	---	---------------------------------

### 3.1 Υλικά

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

- ✓ Ποτήρια ζέσεως 400, 600 και 2000 mL
  - ✓ Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 2 δεκαδικών ψηφίων (RADWAG)
  - ✓ Δεξαμενή με διάταξη απόσταξης με ενσωματωμένο συμπυκνωτή υδρατμών, μανόμετρο, θερμομέτρο
  - ✓ Διηθητικό χαρτί
  - ✓ Κωνικές φιάλες 250 και 500 mL
  - ✓ Θερμαντικές πλάκες
  - ✓ Μαγνητική μπάρα ανάδευσης
  - ✓ Σωληνάκια πλαστικά βιδωτά κωνικά, τύπου Falcon 50 mL
  - ✓ Ψυγείο
  - ✓ Φυγόκεντρος (YINGTAI TD4N)
  - ✓ Στατώ δοκιμαστικών σωλήνων
  - ✓ Δοκιμαστικός σωλήνας
  - ✓ Water for injection
  - ✓ Μικροβιολογικοί κρίκοι μπλε
  - ✓ Parafilm “M” (PECHINEY PLASTIC PACKAGING)
  - ✓ Vortex (VELP SCIENTIFICA, ZX3)
  - ✓ Στατώ σωληναρίων Eppendorf
  - ✓ Σωληνάκια Eppendorf 1,5 mL
  - ✓ Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου 2-20, 20-200 και 100-1000  $\mu$ L
  - ✓ Tips πιπέτας
  - ✓ Τρυβλία petri με εκλεκτικά υποστρώματα (Bioprepere)
  - ✓ Επωαστικός κλίβανος (ARGO LAB ICN35)
  - ✓ Απαγωγός
  - ✓ HPLC/DAD
- 
- **Αντιδραστήρια**
    - ✓ Αιθανόλη (καθαρότητα  $\geq 99,9\%$ ) της Merck (Darmstadt Germany)
    - ✓ Μεθανόλη HPLC (καθαρότητα  $\geq 99,9\%$ ) της Merck (Darmstadt Germany)
    - ✓ Ακετονιτρίλιο HPLC (καθαρότητα  $\geq 99,9\%$ ) της Merck (Darmstadt Germany)

✓ Νερό HPLC (καθαρότητα  $\geq 99,9\%$ ) της Merck (Darmstadt Germany)

- **Φυτά**

Για την δημιουργία των αιθέριων ελαίων και την περαιτέρω μελέτη τους χρησιμοποιήθηκε η *P. oceanica* και το *C. creticus*. Η *P. oceanica* συλλέχθηκε από ακτή του νησιού της Ικαρίας και το *C. creticus* προμηθεύτηκε από κατάστημα μπαχαρικών.

## **3.2 Μέθοδοι**

### **3.2.1 Εκχύλιση με νερό**

Για την εκχύλιση των δειγμάτων της *P. oceanica* και του *C. creticus* προστέθηκαν 5,5 L νερό σε δεξαμενή με διάταξη απόσταξης με ενσωματωμένο συμπυκνωτή υδρατμών, μανόμετρο, θερμόμετρο, τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί (για το *C. creticus*) και προστέθηκαν 100 g φυτού. Όταν η ένδειξη στο θερμόμετρο δείξει 100°C, τότε ξεκινάει η εκχύλιση. Με τον τρόπο αυτόν συλλέχθηκαν 5,5 L νερού με παρασυρμένο έλαιο σε ποτήρια ζέσεως, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θερμαντικές πλάκες για αφυδάτωση προς απομόνωση του ελαίου. Το έλαιο που συλλέχθηκε ήταν 550 mL, μεταφέρθηκε σε falcon 50 mL και τοποθετήθηκαν σε ψύξη.

### **3.2.2 Εκχύλιση με αιθανόλη**

Για την εκχύλιση των δειγμάτων της *P. oceanica* και του *C. creticus* με αιθανόλη προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως (600 mL) 15 g φυτού και 70 mL αιθανόλη και αφέθηκαν μέσα σε απαγωγό με parafilm για 24h. Μετά από 24h το δείγμα μεταφέρθηκε μέσω διήθησης σε άλλο ποτήρι ζέσεως και τοποθετήθηκε σε θερμαντική πλάκα με μαγνητική μπάρα ανάδευσης έως ότου εξατμιστεί η αιθανόλη. Το έλαιο που συλλέχθηκε ήταν 10 mL, μεταφέρθηκε σε falcon 50 mL και τοποθετήθηκε σε ψύξη.

### **3.2.3 *In vitro* αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης**

Χρησιμοποιήθηκε μικροβιακή καλλιέργεια με εκτιμώμενο μέγεθος εμβολίου  $1,0 \times 10^8$  CFU/mL (κλίμακα McFarland 0,5). Υδατικά εκχυλίσματα διαφόρων συγκεντρώσεων (50-450  $\mu$ L) προστέθηκαν στα βακτηριακά εναιωρήματα ( $1,0 \times 10^8$  CFU/mL) και 25  $\mu$ L

εμβολιάστηκαν σε πλάκες εκλεκτικού άγαρ (Biorprepare, Αθήνα, Ελλάδα) που αντιστοιχούσαν στους παραπάνω μικροοργανισμούς. Οι πλάκες επωάστηκαν στους 37°C για 24 h και 48 h και κάποιες καλλιέργειες ήταν άμεσες. Έτσι, η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με την καταμέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για κάθε παθογόνο. Για να διαπιστωθεί αν ο θετικός έλεγχος λειτούργησε, εμβολιάστηκαν πλάκες χωρίς φυτικά εκχυλίσματα.

### 3.3 Αναλυτική τεχνική

#### 3.3.1 Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με διάταξη ανίχνευσης διόδων (HPLC-DAD)

Η ανάλυση HPLC πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος HPLC-UV (VWR Hitachi Elite LaChrom system, VWR, Darmstadt, Germany) που αποτελείται από αυτόματο δειγματολήπτη (L-2200), δυαδική αντλία (L-2130), φούρνο στήλης (L-2300) και ανιχνευτή διόδων (L-2455). Ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης SVEA C18 (150 mm × 4,6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm, Nanologica, Stockholm, Sweden), η οποία διατηρήθηκε στους 30°C, με ρυθμό ροής 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Η ανάλυση HPLC-DAD προτάθηκε από τους Kouri et al. (2007) (Kouri et al., 2007) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η κινητή φάση αποτελούνταν από νερό με 1% μυρμηκικό οξύ (Α), μεθανόλη με 1% μυρμηκικό οξύ (Β) και ακετονιτρίλιο με 1% μυρμηκικό οξύ (Γ). Η κλίση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 90% Α, 6% Β, 4% C 0-5 λεπτά, 85% Α, 9% Β, 6% C 5-30 λεπτά, 71% Α, 17,4% Β, 11,6% C 30-60 λεπτά, 0% Α, 85% Β, 15% C 60-63 λεπτά, 90% Α, 6% Β, 4% C 63-65 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL και τα φάσματα απεικονίστηκαν στα 280 nm. Όλες οι αναλύσεις πέραν αυτής του προσδιορισμού του *C. creticus* σε αιθανόλη έγιναν εις τριπλούν καθώς, με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, δεν προέκυψε κάποιο αποτέλεσμα στους υπόλοιπους τρεις προσδιορισμούς (*P. oceanica* σε νερό, *P. oceanica* σε αιθανόλη, *C. creticus* σε νερό). Δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση με HPLC-DAD.

### 3.4 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης

Τα εκχυλίσματα των φαρμακευτικών φυτών, τα οποία φημίζονται για την αποτελεσματικότητά τους ως προς την θεραπεία διάφορων ασθενειών και συμπτωμάτων τους (El Astal Khan et al., 2005), εξετάζονται για την αντιμικροβιακή τους δράση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζεται η ικανότητα των αιθέριων ελαίων να αναστείλουν την ανάπτυξη 4 Gram (+) παθογόνων μικροοργανισμών, 4 Gram (-) παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και ενός μύκητα.

Πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του κάθε εκχυλίσματος με τον κάθε μικροοργανισμό σε εύρος αναλογιών 1:2 έως 1:7 και 1:10 και για τα δύο εκχυλίσματα. Έπειτα, τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία Petri σε εκλεκτικά υποστρώματα για τον κάθε παθογόνο μικροοργανισμό. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων σε επωστικό κλίβανο (ARGO LAB ICN 35) για 24 και 48 ώρες. Έτσι, υπολογίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τον εκάστοτε εξεταζόμενο μικροοργανισμό.

### **3.5 Κυτταροτοξικότητα**

#### **3.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων**

Τα κύτταρα Huh7.5, η σταθερή κυτταρική σειρά Huh5-2 που φιλοξενούσε το υπογονιδιωματικό ρεπλίκον του γονότυπου 1b (Con1) καθώς και το HuhD-2 που φιλοξενούσε το υπογονιδιωματικό ρεπλίκον του ορότυπου 2 του DENV (στέλεχος 16681), καλλιεργήθηκαν σε τροποποιημένο ελάχιστο απαραίτητο μέσο Dulbecco's με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (25 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), συμπληρωμένο με 0,1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη και 10% (v/v) θερμικά αδρανοποιημένο εμβρυϊκό ορό μοσχαριού (αναφέρεται ως πλήρες DMEM). Για τα κύτταρα Huh5-2, η πλήρης DMEM συμπληρώθηκε με G418 σε 500 μg/mL. Τα κύτταρα καλλιεργούνταν στους 37°C σε περιβάλλον 5% (v/v) CO<sub>2</sub>.

#### **3.5.2 Δοκιμή κυτταροτοξικότητας**

Η βιοδοκιμή αναγωγής alamarBlue®, η οποία βασίζεται στην αναγωγή του alamarBlue® από κυτταρικά ένζυμα που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική οδό, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας των υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων που παρέχονται. Συγκεκριμένα, 104 κύτταρα replicon σε συνολικό όγκο 200 μL πλήρους DMEM ανά well, τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 well με επίπεδο πυθμένα. 24 ώρες μετά τη σπορά, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων, οι οποίες προέκυψαν από τη μέγιστη πρόσληψη νερού λόγω περιορισμών ώσμωσης στα κύτταρα, η οποία είναι 10% v/v, και στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37°C (5% CO<sub>2</sub>) για 2 ημέρες. Τα

κύτταρα που είχαν υποστεί επεξεργασία με νερό χρησιμοποιήθηκαν ως έλεγχος. Σε κάθε well χορηγήθηκαν 10  $\mu$ L alamarBlue® και τα κύτταρα επώστηκαν στη συνέχεια στους 37°C για επιπλέον 4 ώρες. Χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη πλάκας, η απορρόφηση διαβάστηκε στα 570 nm (ανηγμένα) και 600 nm (οξειδωμένα) αντίστοιχα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ένωσης που προκαλεί 50% κυτταρικό θάνατο (CC50) πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της ποσοστιαίας διαφοράς στη μείωση της χρωστικής μεταξύ των κυττάρων ελέγχου και των επεξεργασμένων κυττάρων. Η μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των τιμών CC50 μετά τη μετατροπή των συγκεντρώσεων των φαρμάκων σε log-X χρησιμοποιώντας το λογισμικό Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### **3.5.3 Δοκιμασία λουσιφεράσης και δοκιμασίες Bradford**

Οι δραστηριότητες της λουσιφεράσης Renilla (R-Luc) και Firefly (F-Luc) προσδιορίστηκαν σε κυτταρικά λύσματα, χρησιμοποιώντας 12  $\mu$ M κολεντεραζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7.4, 500 mM NaCl και 1 mM EDTA) ή σύστημα Luciferase Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA), αντίστοιχα, και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φωτασιόμετρο GloMax 20/20 single tube luminometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) για 10 s. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκε ως προς τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που ποσοτικοποιήθηκε με το αντιδραστήριο Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## **3.6 Αντικότητα**

### **3.6.1 Αντιικές δοκιμασίες με βάση τα κύτταρα**

Τα κύτταρα αντιμετωπίστηκαν με σειριακές αραιώσεις των εξεταζόμενων ενώσεων ή του διαλύτη H<sub>2</sub>O. Η αντιική δραστηριότητα προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης που προέρχεται από τον ιό. Η διάμεση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC<sub>50</sub>) των ενώσεων, που μειώνει το σήμα της λουσιφεράσης κατά 50%, προσδιορίστηκε με ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση του λογισμικού Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

### 3.6.2 Αποθέματα ιού DENV και μόλυνση κυττάρων

Τα πλασμίδια που έφεραν το γονιδίωμα του DENV (άγριου τύπου και ρεπόρτερ) έγιναν γραμμικά με τη χρήση XbaI, πριν από τις αντιδράσεις μεταγραφής *in vitro*. Το μεταγραφόμενο RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή μετουσιωτικής αγαρόζης, ενώ η συγκέντρωση και η ποιότητά του μετρήθηκαν με τη χρήση nanodrop. Τα παραχθέντα από την *in vitro* μεταγραφή, αντίστοιχα RNAs του γονιδιώματος του DENV πλήρους μήκους, ηλεκτροφορήθηκαν σε κύτταρα VeroE6. Μετά τη μεταμόσχευση (24 ώρες), το κυτταρικό μέσο άλλαξε με DMEM complete συμπληρωμένο με 15 mM HEPES (pH 7,5) και η επώαση συνεχίστηκε μέχρι το σημείο του κυτταροπαθητικού αποτελέσματος (CPE) που σχετίζεται με τον DENV. Τις ημέρες 4-7 μετά τη μεταμόσχευση, τα υπερκείμενα των ηλεκτρομεταμοσχευμένων κυττάρων συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν μαζί, διηθήθηκαν (0,45 μm), απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους - 80°C (απόθεμα ιού). Για τη μέτρηση του τίτλου του ιού χρησιμοποιήθηκε η τυπική δοκιμασία πλάκας, μετά από εμβολιασμό 4 ωρών σε κύτταρα VeroE6.

Για τα πειράματα μόλυνσης χρησιμοποιήθηκε απόθεμα DENV για τον εμβολιασμό των κυττάρων (4 ώρες), στη συνέχεια το μέσο που περιείχε τον ιό αντικαταστάθηκε από πλήρη DMEM και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν περαιτέρω και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία, όπως υποδεικνύεται κάθε φορά από τον πειραματικό σχεδιασμό.

### 3.6.3 Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στον πολλαπλασιασμό του ορότυπου 2 του ιού DENV

Τα κύτταρα HuhD-2, που φιλοξενούσαν υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του ορότυπου 2 του DENV (στέλεχος 16681), υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για 48 ώρες με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων ή υποβλήθηκαν σε εικονική επεξεργασία (έλεγχος) με το διαλύτη. Προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της ρενίλλα λουσιφεράσης που προέρχεται από την αντιγραφή του ιικού RNA και εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Η διάμεση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC50) των ενώσεων, που μειώνει το σήμα της λουσιφεράσης κατά 50%, προσδιορίστηκε με ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας το λογισμικό Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου ορίστηκαν σε εκατό. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από τρία ανεξάρτητα πειράματα σε τρία αντίγραφα. Οι ράβδοι σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  έναντι ελέγχου.



## 4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

### 4.1 HPLC-DAD

Τα φυτικά εκχυλίσματα, στην πλειοψηφία τους περιέχουν σε μεγάλες αναλογίες βιοδραστικές ενώσεις (Wolfender, 2009). Γι' αυτό τον λόγο παρουσιάζουν πληθώρα ευεργετικών βιολογικών ιδιοτήτων. Αναλυτικότερα, οι αντιμικροβιακές, αντικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιμυκητιακές δράσεις των φυτών, των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων οφείλονται κατά κύριο λόγο στα περιεχόμενα φυσικοχημικά συστατικά τους (Rayne & Mazza, 2007). Με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC-DAD προσδιορίστηκε το φαινικό προφίλ των δειγμάτων ποιοτικά και ποσοτικά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία από τα τέσσερα δείγματα που μελετήθηκαν αποτέλεσμα έδωσε μόνο το ένα και συγκεκριμένα το *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη. Η συγκέντρωση του δείγματος που εξετάστηκε υπολογίστηκε στα 1.500 mg/mL μετέπειτα από την εξάτμιση. Στην εν λόγω ερευνητική εργασία αναλύθηκαν 18 πρότυπες ουσίες ως προς τον χρόνο κατακράτησης, την καμπύλη βαθμονόμησης, το συντελεστή παλινδρόμησης, το μέγιστο μήκος κύματος και την συγκέντρωση τους στο κάθε δείγμα (Πίνακας 3, Σχήμα 1). Συγκεκριμένα, το αιθανολικό εκχύλισμα του *C. creticus* είναι πλούσιο στο φλαβονοειδές, ρουτίνη (709,28 ppm) και στο φαινολικό οξύ, βενζοϊκό οξύ (569,62 ppm). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ανευρίσκονται επίσης οι εξής πρότυπες ενώσεις: ρασμαρινικό οξύ, γλυκοζίτης της απιγενίνης, φερουλικό οξύ. Τέλος, η ναρινγκενίνη, το χλωρογενικό οξύ και η εριοδικτυόλη εμπεριέχονται στο δείγμα σε ίχνη.

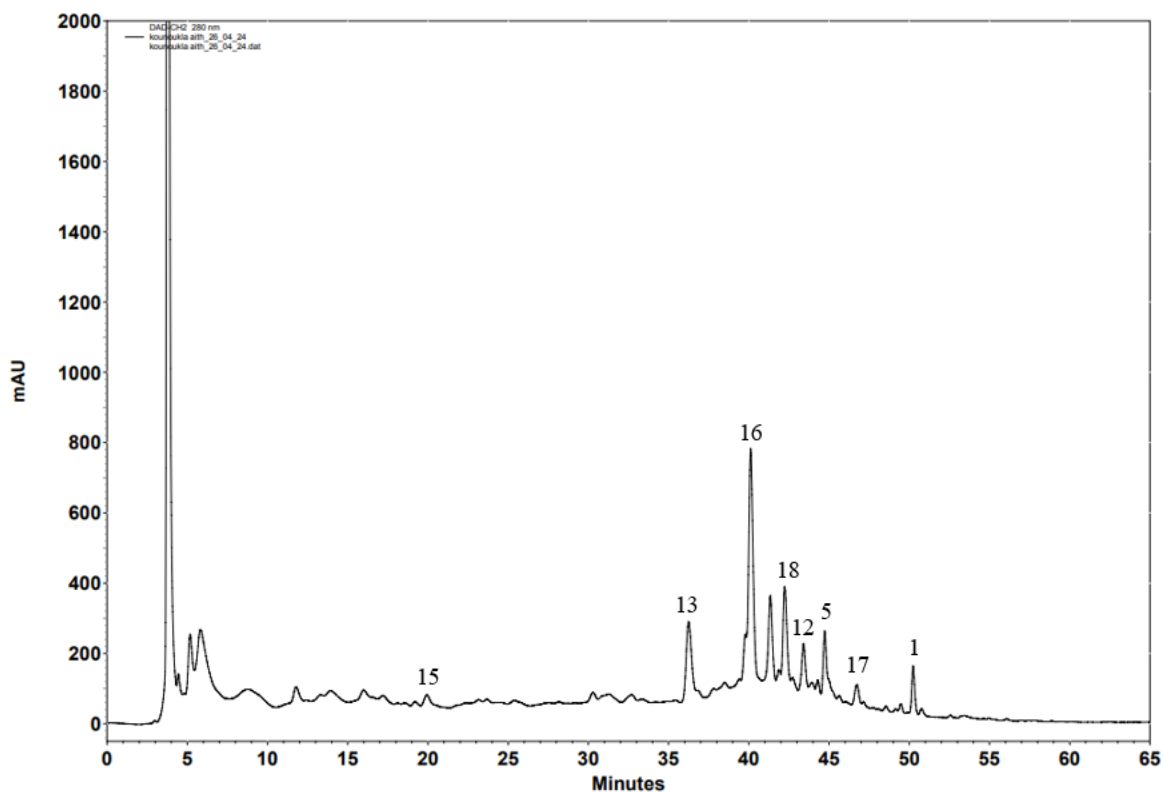
Σε μια έρευνα των Maggi et al. 2016, όπου μελετήθηκε η φυτοχημική ανάλυση του *C. creticus* με την χρήση της μεθόδου HPLC-MS παρατηρήθηκε παρόμοια συγκέντρωση ρουτίνης (609 ppm), καθώς και μια πληθώρα λιπαρών οξέων, τα οποία αποτελούν το 13,5% του ελαίου. Επίσης, αναγνωρίστηκε ένα νέο φυσικό προϊόν, ο 3,5-διυδροξυ-4-(O-b-D-γλυκοπυρανοσυλ)-κυκλοεξ-1-εν-1-(O-b-D-γλυκοπυρανοσυλ)-εστέρας (Maggi et al., 2016). Άλλη έρευνα των Demetzos et al. 1995, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας GC/MS παρατηρήθηκε η ύπαρξη γλυκοσιδίων (Demetzos et al., 1995). Περαιτέρω έρευνες χρειάζονται για την πλήρη ταυτοποίηση της σύστασης του συγκεκριμένου ελαίου.

Συνοψίζοντας, στο εκχύλισμα της παρούσας εργασίας προσδιορίζονται υψηλές συγκεντρώσεις του φλαβονοειδούς γλυκοσιδίου ρουτίνης και του φαινολικού οξέος, βενζοϊκού οξέος. Οι υπόλοιπες ουσίες που βρίσκονται στο δείγμα είναι σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Βιβλιογραφικά τα αιθέρια έλαια είναι αυξημένα σε τερπενοειδείς ενώσεις. Έρευνα των Guímarães et al. 2019, μελετά 33 είδη ελεύθερων τερπενίων που απαντώνται συχνά μέσα σε έλαια ως προς την αντιμικροβιακή και βακτηριοκτονική δράση τους, καθώς και τον τρόπο λειτουργίας των ιδιοτήτων αυτών έναντι μικροοργανισμών, όπως ο *B. cereus* και η *S. enterica* μέσω χρήσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Από τα 33 συστατικά τα οποία μελετήθηκαν βρέθηκε πως τα 16 από αυτά είχαν αντιβακτηριακή δράση. Μάλιστα η ευγενόλη ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) έδειξε άμεση βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *S. enterica* και η τερπινεόλη ( $C_{10}H_{18}O$ ) έδειξε άμεση και αποτελεσματική βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *B. cereus*. Με βάση τα ευρήματα της έρευνας μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση έδειξαν οι ουσίες με υδροξυλομάδες, σε αντίθεση με αυτές που ανήκουν στα καβοξύλια. Αποδείχτηκε πως η αντιβακτηριακή δράση ήταν απόρροια της απώλειας της ακεραιότητας της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης (Guímarães et al., 2019). Στην παρούσα εργασία η HPLC που διεξήχθη είχε ως στόχο τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα. Με βάση τα αποτελέσματά της, βρέθηκε έλλειψη φαινολικών ενώσεων καθώς στα δείγματα *P. oenicus* με διαλύτη νερό, *C. creticus* με διαλύτη νερό και *P. oenicus* με διαλύτη αιθανόλη τα διαγράμματα δεν έδειξαν κορυφές. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε έμμεσα να συνάδει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν ότι τα αιθέρια έλαια είναι πλούσια σε τερπενοειδείς ενώσεις. Ωστόσο, απαραίτητο είναι να γίνουν περαιτέρω πειράματα που να προσδιορίζουν τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε τερπένια προτού διεξαχθεί με ασφάλεια κάποιο συμπέρασμα.

**Πίνακας 3.** Πρότυπες ενώσεις, χρόνος κατακράτησης, καμπύλες βαθμονόμησης, συντελεστές παλινδρόμησης, μέγιστα μήκη κύματος στην υπεριώδη περιοχή και η συγκέντρωσή του στο αιθέριο έλαιο *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη.

	Πρότυπη ένωση	Χρόνος κατακράτησης (min)	Καμπύλη βαθμονόμησης	Συντελεστής παλινδρόμησης (R <sup>2</sup> )	Μέγιστο μήκος κύματος (nm)	Συγκέντρωση στο δείγμα (ppm)
						<i>C. creticus</i>
1	Ναρινγκενίνη	50,11	$y = 392749 x + 600702$	0,998	235, 289	21,25
2	Θυμόλη	57,99	$y = 140232 x + 563914$	0,995	215, 276, 345	-
3	Καρβακρόλη	57,65	$y = 96580 x + 159301$	0,998	221, 275	-
4	Βανιλλικό οξύ	22,55	$y = 280308 x + 1000000$	0,997	208, 265, 292	-
5	Ροσμαρινικό οξύ	44,50	$y = 342476 x - 1000000$	0,994	206, 245, 330	82,16
6	p-Κουμαρικό οξύ	32,87	$y = 1000000 x - 268063$	0,996	216, 309, 395	-
7	Λουτεολίνη	49,80	$y = 201134 x + 343231$	0,996	256, 263, 349	-
8	Κουερσετίνη	49,24	$y = 208457 x + 441912$	0,999	230, 256, 370	-
9	Καμφερόλη	52,03	$y = 265195 x - 28475$	0,998	250, 315	-
10	Απιγενίνη	52,21	$y = 407824 x + 599220$	0,999	267, 338	-
11	Υδροξυβενζοϊκό οξύ	19,24	$y = 216500 x - 261891$	0,996	210, 260, 388	-
12	Γλυκοζίτης της απιγενίνης	43,20	$y = 475911 x - 3000000$	0,991	206, 267, 337	49,47
13	Φερουλικό οξύ	36,77	$y = 361100 x + 667162$	0,998	210, 322	84,16
14	Καφεϊκό οξύ	23,80	$y = 460642 x - 243764$	0,993	209, 240, 323	-
15	Χλωρογενικό οξύ	20,26	$y = 373013 x - 3000000$	0,998	213, 325	29,39
16	Ρουτίνη	40,63	$y = 101038 x + 244152$	0,994	258, 356	709,28
17	Εριδικτυόλη	46,96	$y = 462783 x + 901504$	0,999	205, 230, 288	19,39
18	Βενζοϊκό οξύ	42,23	$y = 56565 x + 111379$	0,996	273, 370	569,62



**Σχήμα 1.** Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη στη συσκευή HPLC-DAD.

## 4.2 Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης *in vitro*

Οι προκαλούμενες ασθένειες και λοιμώξεις από τους παθογόνους μικροοργανισμούς αποτελούν την συχνότερη απειλή για την ανθρώπινη υγεία και στις αναπτυσσόμενες χώρες καθίστανται η σημαντικότερη αίτια θανάτου. Η θεραπεία των μικροβιακών λοιμώξεων αντιμετωπίζει σημαντικά προβλήματα, καθώς η ανθεκτικότητα των φαρμάκων και των αντιβιοτικών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών μειονεκτεί. Σήμερα, στη σύγχρονη φαρμακοβιομηχανία τα φυσικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα των αντιβιοτικών στην αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων βιοενεργών ουσιών που εμπεριέχουν (Calvo et al., n.d.).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετώνται οι αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες των τεσσάρων αιθέριων ελαίων έναντι 8 παθογόνων μικροοργανισμών, Gram (+) και Gram (-) και ενός δυνητικά παθογόνου μικροοργανισμού. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται με τις τιμές MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Αναλυτικότερα, ο χρόνος επώασης των τρυβλίων με τον μικροοργανισμό και το δείγμα, ήταν 24 ή 48 ώρες. Σε ό,τι αφορά

το υδατικό αιθέριο έλαιο *P. oceanica*, βρέθηκε ότι η MIC ισούται με 90,91 mg/mL κατά του *B. cereus*. Με τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του δείγματος έναντι των *E. faecalis*, *L. monocytogenes* και *E. coli* με MIC = 25,97 mg/mL. Σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν παρατηρήθηκε αναστολή έναντι των *S. aureus* και *S. enterica*. Επίσης, η MIC των *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* ισούται με 18,18 mg/mL και της *C. albicans* με 45,46 mg/mL. Ωστόσο, ύστερα από επώαση δύο ημερών, τα συγκεκριμένα αιθέρια έλαια παρουσίασαν τις ίδιες ανασταλτικές δράσεις (Πίνακας 4).

Από την άλλη, για το υδατικό αιθέριο έλαιο *C. creticus* πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο 24 ωρών. Σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν παρατηρήθηκε αναστολή έναντι των *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* και *C. albicans*. Βρέθηκε ότι η MIC ισούται με 60,61 mg/mL κατά του *E. faecalis*. Επίσης, η MIC της *L. monocytogenes* ισούται με 36,36 mg/mL και της *K. pneumoniae* 18,18 mg/mL (Πίνακας 5).

Σε ό,τι αφορά το αιθέριο έλαιο *P. oceanica* με διαλύτη αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο 24 ωρών. Σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν παρατηρήθηκε αναστολή έναντι των *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus* και *E. coli*. Βρέθηκε ότι η MIC ισούται με 214,28 mg/mL κατά των *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa*. Για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα δεν πραγματοποιήθηκε επώαση για τους *L. monocytogenes*, *S. enterica* και *C. albicans* (Πίνακας 6).

Από την άλλη, για το αιθέριο έλαιο *C. creticus*, με διαλύτη αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο 24 ωρών. Σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν παρατηρήθηκε αναστολή έναντι των *B. cereus*, *E. faecalis* και *S. aureus*. Βρέθηκε ότι η MIC ισούται με 214,28 mg/mL κατά των *L. monocytogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* και *C. albicans* (Πίνακας 7).

Μελέτη από τους Berfad et al. 2014, η οποία ερεύνησε διάφορα εκχυλίσματα από την *P. oceanica*, έδειξε πολύ καλή αναστολή ανάπτυξης στην *K. pneumoniae*, καθώς και στην *P. aeruginosa*. Λιγότερη αναστολή υπήρξε στην *E. coli* και στην *S. typhi*, η οποία δεν παύει να θεωρείται σημαντικό εύρημα. Σύμφωνα με το άρθρο τα εκχυλίσματα του φυτού, τα οποία κατάφεραν αυτήν την αναστολή είναι κατά κύριο λόγο το εκχύλισμα του κυκλοεξανίου και του γλωροφορμίου. Το συμπέρασμα της έρευνας αποκαλύπτει πως η αντιμικροβιακή δράση της *P. oceanica* εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον τρόπο εκχύλισης του (Ayad Berfad et al., 2014b).

Μία άλλη έρευνα από τους Demetzos et al. 1997, η οποία μελετά την χημική σύνθεση αιθέριου ελαίου εκχυλισμένο μέσο υδροαπόσταξης από το *C. creticus*, καθώς και την αντιμικροβιακή του δράση έναντι σε πολλαπλά παθογόνα, έδειξε πως κατά κύριο λόγο τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια (*E. coli* και *P. aeruginosa*) επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο έλαιο, ενώ τα κατά Gram θετικά (*B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* και *B. subtilis*), καθώς και ο μύκητας (*C. albicans*), έδειξαν μεγάλη ευαισθησία στο έλαιο, έχοντας αναστολή ακόμα και σε πολύ μεγάλες αραιώσεις. Το άρθρο αναφέρει πως κατά κύριο λόγο το ενεργό συστατικό του ελαίου είναι τα ισομερή οξειδίου το μανουΐλιου, το οποίο είναι και αυτό στο οποίο οφείλεται η αντιμικροβιακή δράση (Demetzos et al., 1997).

Πολλαπλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων αποδίδοντας όμως την δράση στα πιο κοινά συστατικά των ελαίων. Περαιτέρω ανάλυση χρειάζεται να γίνει, έτσι ώστε να μπορεί να αποδοθεί και εμπειριστατωμένα αντιβακτηριακή και βακτηριοκτόνος δράση.

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* με διαλύτη νερό.

Αιθέριο έλαιο	Μικροοργανισμός	Αντιβακτηριακή δράση			Σχόλια
		Άμεσο	24h	48h	
<i>P. oceanica</i> σε νερό	<i>B. cereus</i>	1:2-1:3	1:2	1:2	
	<i>E. faecalis</i>	1:2-1:6	1:2-1:7	1:2-1:7	Ανάπτυξη 1:7 Άμεσο
	<i>L. monocytogenes</i>	X	1:2-1:7	1:2-1:7	
	<i>S. aureus</i>	X	X	X	
	<i>E. coli</i>	1:2-1:7	1:2-1:7	1:2-1:7	Ανάπτυξη 1:6 24h
	<i>K. pneumoniae</i>	1:3-1:10	1:3-1:10	1:3-1:10	
	<i>P. aeruginosa</i>	1:2-1:10	1:2-1:10	1:2-1:10	
	<i>S. enterica</i>	X	X	X	
	<i>C. albicans</i>	1:2-1:4	1:2-1:4	1:2-1:4	

X: Υπήρξε Ανάπτυξη (Επιβίωση)

**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο του *C. creticus* με διαλύτη νερό.

Αιθέριο έλαιο	Μικροοργανισμός	Αντιβακτηριακή δράση			Σχόλια
		Άμεσο	24h	48h	
<i>C. creticus</i> σε νερό	<i>B. cereus</i>	X	X	-	
	<i>E. faecalis</i>	1:2-1:3	1:2-1:3	-	
	<i>L. monocytogenes</i>	1:2-1:6	1:2-1:5	-	Ανάπτυξη 1:6 24h
	<i>S. aureus</i>	X	X	-	
	<i>E. coli</i>	X	X	-	
	<i>K. pneumoniae</i>	1:2-1:10	1:2-1:10	-	
	<i>P. aeruginosa</i>	1:2-1:10	1:2-1:10	-	
	<i>S. enterica</i>	1:7-1:10	1:7-1:10	-	
	<i>C. albicans</i>	X	X	-	

X: Υπήρξε ανάπτυξη (Επιβίωση)

(-): Δεν πραγματοποιήθηκε

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* με διαλύτη αιθανόλη.

Αιθέριο έλαιο	Μικροοργανισμός	Αντιβακτηριακή δράση		
		Άμεσο	24h	48h
<i>P. oceanica</i> σε αιθανόλη	<i>B. cereus</i>	X	X	-
	<i>E. faecalis</i>	X	X	-
	<i>L. monocytogenes</i>	1:6-1:7	-	-
	<i>S. aureus</i>	X	X	-
	<i>E. coli</i>	X	X	-
	<i>K. pneumoniae</i>	1:7	1:7	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1:7	1:7	-
	<i>S. enterica</i>	1:6-1:7	-	-
	<i>C. albicans</i>	1:7	-	-

X: Υπήρξε ανάπτυξη (Επιβίωση)

(-): Δεν πραγματοποιήθηκε



**Πίνακας 7.** Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης για το αιθέριο έλαιο του *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη.

Αιθέριο έλαιο	Μικροοργανισμός	Αντιβακτηριακή δράση		
		Άμεσο	24h	48h
<i>C. creticus</i> σε αιθανόλη	<i>B. cereus</i>	X	X	-
	<i>E. faecalis</i>	1:6-1:7	X	-
	<i>L. monocytogenes</i>	1:6-1:7	1:7	-
	<i>S. aureus</i>	1:6-1:7	X	-
	<i>E. coli</i>	1:6	1:7	-
	<i>K. pneumoniae</i>	1:6-1:7	1:7	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1:6	1:7	-
	<i>S. enterica</i>	X	1:7	-
	<i>C. albicans</i>	1:6-1:7	1:7	-

X: Υπήρξε ανάπτυξη (Επιβίωση)

(-): Δεν πραγματοποιήθηκε

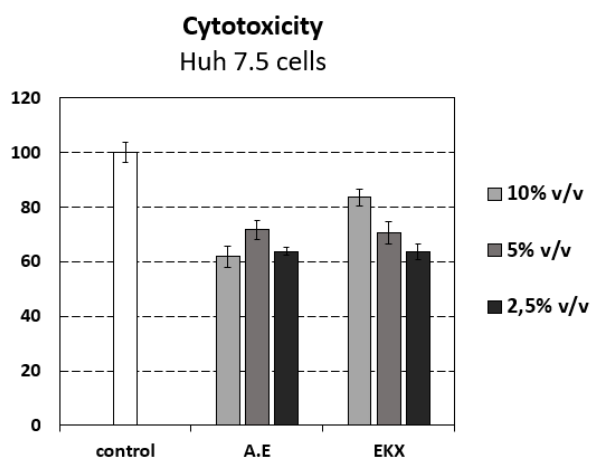
### 4.3 Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων

Τα τελευταία χρόνια τα φυσικά εκχυλίσματα κρίνονται ολοένα και πιο σημαντικά για την ανθρωπότητα. Όπως προ αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες (βλ. Ενότητα 4.1), οι φυτοχημικές ενώσεις κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην θεραπεία χρόνιων ασθενειών. Μία από της σοβαρότερες παθήσεις αποτελεί ο διαφόρων τύπου καρκίνος (Kueete et al., 2016). Έτσι, η ερευνητική και επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των φυτικών αιθέριων ελαίων. Στην εν λόγω ερεύνα, εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα τόσο του υδατικού αιθέριου ελαίου όσο και του υδατικού εκχυλίσματος του θαλάσσιου φυτού, *P. oceanica*.

Το είδος των καρκινικών κυττάρων που ερευνήθηκε ήταν τα Huh7.5. Η συγκεκριμένη καρκινική σειρά αφορά κύτταρα που απομονώνονται από το ήπαρ. Τα εξεταζόμενα δείγματα αξιολογούνται σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,5% v/v, 5% v/v και 10% v/v. Η μέγιστη τιμή της περιεκτικότητας και των δύο δειγμάτων δεν ξεπερνά το 10% v/v, εξαιτίας του φαινομένου της ώσμωσης. Τα αποτελέσματα για τις 3 διαφορετικές εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων συγκρίνονται με το δείγμα control, στο οποίο περιέχεται μόνο νερό και παρουσιάζει 100% κυτταρική ανάπτυξη. Για το αιθέριο έλαιο από *P. oceanica*, παρατηρείται ότι η πιο αποδοτική συγκέντρωση κατά της κυτταροτοξικότητας είναι το 5% v/v (>70%), εν αντιθέσει για το εκχύλισμα το 10% v/v (>80%). Παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις, η περιεκτικότητα 2,5% v/v εμφανίζει παρόμοια αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού (περίπου 60%) (Σχήμα 2). Η έκφραση των αποτελεσμάτων της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιείται με το συντελεστή  $CC_{50}$ . Η εν λόγω τιμή αναφέρεται στη συγκέντρωση του δείγματος, η οποία μπορεί να προκαλέσει 50% κυτταρικό θάνατο (Koutsoni et al., 2019). Τα 2 δείγματα, αιθέριο έλαιο και εκχύλισμα εμφανίζουν παρόμοια δράση, διότι οι τιμές  $CC_{50}$  είναι μεγαλύτερες από 10 ppm.

Σε μία έρευνα των Sevimli-Gur και Yesil-Celiktas 2019, η οποία μελέτησε την κυτταροτοξικότητα των ενεργών συστατικών εκχυλισμάτων *P. oceanica*, *Zostera marina* με την χρήση της μεθόδου υπερκρίσιμου ρευστού για την εξαγωγή τους, πάνω σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα στήθους, πρωκτού, μήτρας και προστάτη με control ηπατικά κύτταρα Αφρικάνικου πράσινου πιθήκου, παρατηρήθηκε έντονη κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και μηδενική κυτταροτοξική δράση έναντι του control, υποδηλώνοντας έτσι εκλεκτική κυτταροτοξική δράση (Sevimli-Gur & Yesil-Celiktas, 2019).

Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι οι δύο πρότυπες ουσίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως και η συνεργιστική τους δράση συμβάλλουν στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου. Τα περισσότερα φυτοχημικά συστατικά έχουν θετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου, γεγονός που οδηγεί τις σύγχρονες φαρμακοβιομηχανίες να εξετάζουν εναλλακτικούς τρόπους θεραπείας σοβαρών ασθενειών με τη χρήση φυσικών προϊόντων.



CC50 (%v/v)	
A.E	>10
Eκκ.	>10

**Σχήμα 2.** Συγκριτικό ραβδόγραμμα που περιγράφει την κυτταροτοξική δράση υδατικού αιθέριου ελαίου και υδατικού εκχυλίσματος της *P. oceanica*.

#### 4.4 Εκτίμηση αντικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων

Καθώς η ανθεκτικότητα σε αντικά φάρμακα και σκευάσματα ολοένα και αυξάνεται, η έρευνα για νέα και καινοτόμα προϊόντα καταπολέμησης των ιών είναι σημαντική. Μελέτες που έχουν γίνει πάνω στην αντική δράση των αιθέριων ελαίων τα κατατάσσουν ως καλούς υποψηφίους σαν βάση για τις μελέτες λόγω της χημικής πολυπλοκότητάς τους, η οποία προσδίδει μηχανισμούς δράσης ευρέος φάσματος και μη ειδικές αντικές ιδιότητες. Ελάχιστες μελέτες υπάρχουν που να μας ενημερώνουν για την σχέση των συστατικών τους με την αντική δράση (Ma & Yao, 2020).

Στην ανάλυση που έγινε πάνω στο αιθέριο έλαιο φυκιού ως προς την αντική του δράση έναντι σε κύτταρα Huh7.5 μολυσμένα με DVR2A το εξεταζόμενο δείγμα αξιολογήθηκε σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις 0,3% v/v, 1,1% v/v και 3,3% v/v. Τα αποτελέσματα για τις 3 εξεταζόμενες συγκεντρώσεις συγκρίνονται με το δείγμα control, στο οποίο παρατηρείται 100% ιική ανάπτυξη. Για το αιθέριο έλαιο από *P. oceanica*, δεν φαίνεται κάποια συγκέντρωση στην οποία το έλαιο να είναι αποτελεσματικό έναντι στα μολυσμένα με DVR2A κύτταρα. Η τιμή της EC<sub>50</sub>, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση της ουσίας που απαιτείται για να επιτευχθεί η θανάτωση του 50% του φορτίου, του δείγματος ξεπερνά το 5% v/v, η οποία θεωρήθηκε σχετικά μεγάλη. Δεν παρατηρήθηκε κάποια αντική δράση στο συγκεκριμένο κύκλο πειραμάτων. Τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται.

## 5. Συμπεράσματα

Η έρευνα των φυσικών εκχυλισμάτων από βότανα και θαλάσσια φυτά έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών επιστημόνων από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. Τα φυτοχημικά συστατικά που περιέχονται σε αυτά έχουν ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, όπως επιβεβαιώνεται από την παρούσα μελέτη. Η βιοδραστικότητα των ενώσεων που βρίσκονται σε αυτά τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκε σε σχέση με τα οφέλη τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος και οι βακτηριακές λοιμώξεις. Η προστατευτική τους δράση αποδίδεται κυρίως στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτοχημικών συστατικών και στη χαμηλή κυτταροτοξικότητά τους. Οι συγκεντρώσεις κατανάλωσης των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοκιμαστική διαδικασία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για όλες τις ιδιότητες που παρουσιάζουν. Η εκχύλιση των δύο φυτών πραγματοποιήθηκε σε δεξαμενή με διάταξη απόσταξης, η οποία περιλάμβανε ενσωματωμένο συμπυκνωτή υδρατμών, μανόμετρο και θερμόμετρο, παρέχοντας καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση φαινολικών ενώσεων και για τα δύο αιθέρια έλαια σε σύγκριση με άλλες μεθόδους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε το υδατικό αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* και του *C. creticus* και το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* και του *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη. Η HPLC δοκιμάστηκε σε όλα τα διαλύματα των φυτών, παρόλα αυτά μόνο το *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη έδωσε αποτελέσματα. Πρόκειται για ένα είδος φυτού προερχόμενο από την οικογένεια *Cistaceae*. Η πλούσια περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις επιβεβαιώνεται με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Εκτενέστερα, στην δημιουργία ευδιάκριτων και οξέων κορυφών στο γράφημα συνέβαλε ο διαχωρισμός των ενώσεων μέσω της στήλης χρωματογραφίας με στόχο, το ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του δείγματος. Τα βασικότερα συστατικά, που παρατηρήθηκαν, στο αιθέριο έλαιο του *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη είναι το φλαγονοειδές, ρουτίνη και το φαινολικό οξύ, βενζοϊκό οξύ. Οι συγκεκριμένες ουσίες που εμπεριέχονται στο δείγμα, καθώς και τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή που εντοπίστηκαν σε χαμηλότερες περιεκτικότητες, δρουν συνεργιστικά και αποσκοπούν στην θεραπεία διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου. Οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών αυτών κυμάνθηκαν από  $709 \pm 0,3$  έως  $19 \pm 0,5$  ppm.

Η αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος του φυτού, το μέρος του φυτού (π.χ. φύλλα, ρίζωμα, κλπ.), τον διαλύτη εκχύλισης και τα βακτηριακά στελέχη που μελετώνται. Το νερό θεωρείται ο πιο

αποτελεσματικός διαλύτης για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης, καθώς δεν εμφανίζει ανασταλτική επίδραση έναντι των παθογόνων, συγκριτικά με άλλους οργανικούς διαλύτες, όπως αιθανόλη, μεθανόλη κλπ. Επομένως, η μικροβιακή αναστολή θεωρείται πιο αξιόπιστη όταν εξετάζεται με υδατικά εκχυλίσματα. Όμως, σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκαν αιθέρια έλαια με δύο διαφορετικούς διαλύτες, το νερό και την αιθανόλη. Τα φυσικά εκχυλίσματα είναι γνωστά για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες, κυρίως λόγω των φαινολικών συστατικών και άλλων φυσικών ενώσεων που περιέχουν. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην αντιμετώπιση διαφόρων βακτηρίων, καθιστώντας τα εκχυλίσματα πολύτιμα για ιατρικές και φαρμακευτικές χρήσεις. Με βάση τις τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) αξιολογήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των φυσικών εκχυλισμάτων. Οι τιμές MIC ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του δείγματος, της μεθόδου αντιμικροβιακής δράσης και το παθογόνου που μελετάται. Συνεπώς, κάθε δείγμα μπορεί να επηρεάζει διαφορετικά τα βακτήρια που εξετάζονται, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη μελέτη και την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων. Το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* με διαλύτη νερό ανέδειξε ανασταλτική δράση κατά των 7 από τους 9 μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν στο χρονικό διάστημα επώασης των 24 και 48 ωρών. Σε ό,τι αφορά το αιθέριο έλαιο του *C. creticus* με διαλύτη νερό ανέδειξε ανασταλτική δράση κατά των 5 από τους 9 μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν στο χρονικό διάστημα επώασης των 24 ωρών, καθώς δεν πραγματοποιήθηκε επώαση στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών. Όσο για τα εκχυλίσματα με διαλύτη αιθανόλη πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο στο χρονικό διάστημα των 24 ωρών. Το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* με διαλύτη αιθανόλη ανέδειξε ανασταλτική δράση κατά των 2 από τους 6 μικροοργανισμούς, καθώς σε 3 μικροοργανισμούς δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός. Σε ό,τι αφορά το αιθέριο έλαιο του *C. creticus* με διαλύτη αιθανόλη ανέδειξε ανασταλτική δράση κατά των 6 από τους 9 μικροοργανισμούς. Συνολικά, οποιαδήποτε αντιβακτηριακή δράση των εκχυλισμάτων αυτών μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων, καθώς και στην πιθανή συνεργιστική επίδραση άλλων μη φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα με διαλύτη αντίστοιχα το νερό και την αιθανόλη των δύο φυτών. Επιπλέον, είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς σήμερα τη δομή και την ανατομία των βακτηρίων, προκειμένου να μπορέσει να αντιληφθεί πλήρως τη λειτουργία της αντιμικροβιακής δράσης.

Η κυτταροτοξικότητα της *P. oceanica* με διαλύτη νερό αξιολογήθηκε με την χρήση κυτταρικών σειρών που απομονώθηκαν από το ανθρώπινο ήπαρ. Το συγκεκριμένο φυτό στην παρούσα δοκιμή μελετήθηκε ως υδατικό αιθέριο έλαιο και υδατικό εκχύλισμα. Τα δύο

δείγματα έδρασαν παρόμοια, εμφανίζοντας χαμηλή κυτταροτοξική δράση κατά των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων του ήπατος. Στην αποτελεσματικότητα της κυτταροτοξικότητας συμβάλει σημαντικά η φυτοχημική σύσταση του φυτού. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* παρουσίασε κυτταροτοξικότητα σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκρινόμενο με το εκχύλισμα. Ωστόσο, η χαμηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε και στις δύο περιπτώσεις εμφάνισε την μεγαλύτερη απόκλιση από το control, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στις χαμηλότερες αναλογίες των βιοδραστικών ενώσεων στην εν λόγω συγκέντρωση. Συμπερασματικά, αποδεικνύεται ότι η επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών στα κύτταρα λειτουργεί ως πανάκεια για την διατήρηση της βιωσιμότητάς τους.

Η αντικότητα της *P. oceanica* με διαλύτη νερό αξιολογήθηκε με την χρήση κυτταρικών σειρών που απομονώθηκαν από το ανθρώπινο ήπαρ, μολυσμένα με DENV. Το συγκεκριμένο φυτό στην παρούσα δοκιμή μελετήθηκε ως υδατικό αιθέριο έλαιο. Δεν παρατηρήθηκε κάποια αντική δράση κατά την πειραματική μελέτη. Η τιμή EC<sub>50</sub> ήταν αρκετά υψηλή (> 5% v/v). Συμπερασματικά, το αιθέριο έλαιο της *P. oceanica* δεν έχει αρκετή δραστηριότητα σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις. Δεν είναι βιώσιμη η χρήση του ελαίου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς αυτό επιφέρει επιπλοκές, όπως η έναρξη της κυτταροτοξικής δράσης του, καθώς και ίσως να υπάρξουν επιδράσεις από το έλαιο, οι οποίες να είναι εκτός στόχου. Ταυτόχρονα με τις επιπλοκές ως προς την αποτελεσματικότητα του ελαίου, ένα σκεύασμα με βάση το έλαιο της *P. oceanica* ως αντικό παράγοντα θα ήταν δύσκολο να δημιουργηθεί, καθώς οι μεγάλες συγκεντρώσεις του ελαίου στο τελικό προϊόν ίσως οδηγήσουν σε θέματα χημικής σταθερότητας, καθώς τα έλαια είναι πτητικά και σε μεγάλες συγκεντρώσεις υποβαθμίζονται. Επίσης, σε σύγκριση με άλλα σκευάσματα αντικού χαρακτήρα, ένα προϊόν με βάση το έλαιο της *P. oceanica* δεν θα μπορούσε να γίνει εύκολα ανταγωνιστικό.

Συμπερασματικά, η παρούσα πτυχιακή εργασία καταδεικνύει ότι τα δύο υδατικά και τα δύο οργανικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω και από άλλους συναφείς επιστημονικούς κλάδους. Η δοκιμή και η εκχύλιση με διαφορετικούς διαλύτες κρίνεται απαραίτητη και ενδιαφέρουσα, καθώς θα εξετάσει πιο αποτελεσματικά την αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ενδέχεται να αποτελέσει κίνητρο για βιομηχανίες διαφόρων κλάδων, όπως των τροφίμων, των φαρμάκων και της κοσμετολογίας. Η συγκεκριμένη αξιολόγηση των υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων της *P. oceanica* και της *C. creticus* παρέχει νέα ευρήματα, τα οποία δεν έχουν

ελεγχθεί, αξιολογηθεί και εκτιμηθεί σε προηγούμενες μελέτες. Ωστόσο, σε συνδυασμό με τις παραπάνω μεθόδους, θα ήταν σκόπιμο να μελετηθούν και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τεσσάρων δειγμάτων, με στόχο την εμπάθυνση της μελέτης για τις ευεργετικές δράσεις των φυσικών εκχυλισμάτων στην ανθρώπινη υγεία. Πλέον, όλο και περισσότεροι επιστημονικοί κλάδοι, όπως η ιατρική, η φαρμακευτική και η επιστήμη τροφίμων, στρέφονται προς την ανάλυση και εκτίμηση των ιδιοτήτων των φυτών, με σκοπό τον περιορισμό των παρενεργειών και των επιβλαβών επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία.



## 6. Βιβλιογραφία

- Abdelmohsen, M. M., Hassanein, H. D., Hassan, R. A., Abreu, A. C., Simões, M., Nazif, N. M., & Abou-Setta, L. M. (2016). Phytochemical analysis, in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of phenolic extracts from *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves. *Available Online Www.Jocpr.Com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(6), 449–457. [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com)
- Abu-Orabi, S. T., Al-Qudah, M. A., Saleh, N. R., Bataineh, T. T., Obeidat, S. M., Al-Sheraideh, M. S., Al-Jaber, H. I., Tashtoush, H. I., & Lahham, J. N. (2020). Antioxidant activity of crude extracts and essential oils from flower buds and leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(7), 6256–6266. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.05.043>
- Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003). Plants Used in Cosmetics. In *Phytotherapy Research* (Vol. 17, Issue 9, pp. 987–1000). <https://doi.org/10.1002/ptr.1363>
- Ahmad, A., Khan, A., Kumar, P., Bhatt, R. P., & Manzoor, N. (2011). Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast*, 28(8), 611–617. <https://doi.org/10.1002/yea.1890>
- Ahmed, S. M. (2005). *Antifungal Activity of Extracts and Sesquiterpene Lactones from Magnolia grandiflora L. (Magnoliaceae)*. <https://www.researchgate.net/publication/242293459>
- Ait Lahcen, S., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., Tabyaoui, M., & Zarrouk, A. (2020a). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus Creticus* leaves. *Chemical Data Collections*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100346>
- Ait Lahcen, S., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., Tabyaoui, M., & Zarrouk, A. (2020b). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus Creticus* leaves. *Chemical Data Collections*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100346>
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015a). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. In *Asian Pacific Journal of Tropical*

- Biomedicine* (Vol. 5, Issue 8, pp. 601–611). Hainan Medical University.  
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015b). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 5, Issue 8, pp. 601–611). Hainan Medical University.  
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Aronne, G., & De Micco, V. (2001). Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Annals of Botany*, 87(6), 789–794.  
<https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1407>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 483, Issues 1–2, pp. 220–243). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Ayad Berfad, M., S Alnour Assistant professor, T. M., & S Alnour, T. M. (2014a). Phytochemical analysis and Antibacterial activity of the 5 different extract from the seagrasses *Posidonia oceanica*. ~ 15 ~ *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2(4), 15–18.
- Ayad Berfad, M., S Alnour Assistant professor, T. M., & S Alnour, T. M. (2014b). Phytochemical analysis and Antibacterial activity of the 5 different extract from the seagrasses *Posidonia oceanica*. ~ 15 ~ *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2(4), 15–18.
- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, Mohd., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110.  
<https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
- Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2016). Biological Efficacy and Application of Essential Oils in Foods-A Review. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 19(1), 1–19.  
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935033>
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. In *Food Research International* (Vol. 45, Issue 2, pp. 722–734).  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 446–475). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2273–2282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060>
- Bernard, P., & Pesando, D. (1989). Bernard and Pesando: Antibacterial and antifungal activity of extracts from the rhizomes of *Posidonia oceanica* Antibacterial and Antifungal Activity of Extracts from the Rhizomes of the Mediterranean Seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. In *Botanica Marina* (Vol. 32).
- Bouamama, H., Noël, T., Villard, J., Benharref, A., & Jana, M. (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1–2), 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.062>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 223–253). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calvo, M. A., Arosemena, E. L., Shiva, C., & Adelantado, C. (n.d.). *Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils*.
- Chinou<sup>1</sup>, F., Demefzos<sup>1</sup>, C., Harvala, C., Roussakis<sup>2</sup>, C., & Verbist<sup>2</sup>, A. F. (n.d.). *Cytotoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aerial Parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus* Materials and Methods*.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Cornara, L., Pastorino, G., Borghesi, B., Salis, A., Clericuzio, M., Marchetti, C., Damonte, G., & Burlando, B. (2018). *Posidonia oceanica* (L.) delile ethanolic extract modulates cell activities with skin health applications. *Marine Drugs*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/md16010021>

- Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 336–354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>
- Cozza, R., Chiappetta, A., Petrarulo, M., Salimonti, A., Rende, F., Bitonti, M. B., & Innocenti, A. M. (2004). Cytophysiological features of *Posidonia oceanica* as putative markers of environmental conditions. *Chemistry and Ecology*, 20(3), 215–223. <https://doi.org/10.1080/02757540410001689777>
- David, J. P., Alessandro, A. J., Maria, M. L., David, J. M., Chai, H. B., Pezzuto, J. M., Angerhofer, C. K., & Cordell, G. A. (1999). Sesquiterpene lactones from *Ambrosia artemisiaefolia* (Asteraceae). *Pharmaceutical Biology*, 37(2), 165–168. <https://doi.org/10.1076/phbi.37.2.165.6077>
- Demetzos, C., Katerinopoulos, H., Kouvarakis, A., Stratigakis, N., Loukis, A., Ekonomakis, C., Spiliotis, V., & Tsaknis, andj. (1997). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. In *Letters Planta Med* (Vol. 63).
- Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N., & Katerinopoulos, H. E. (1995). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 7(4), 407–410. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698549>
- Demetzosl, C., Stahl, B., Anastassaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L. S., & Rallis, M. (1999). The Pharmacology of Chinese Herbs. In *Chem. Pharm. Bull* (Vol. 65). CRC Press.
- Den Hartog, C., & Kuo, J. (n.d.). *Taxonomy and Biogeography of Seagrasses*.
- El Astal Khan, Z. Y., El-Rahiem Ashour, A. A., El Astal Khan, Z., Astal, E. Z., Aera, A., & Aam, K. (2005). *ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME MEDICINAL PLANT EXTRACTS IN PALESTINE* (Vol. 21, Issue 2). [www.pjms.com.pk](http://www.pjms.com.pk)
- El-Darier, S. M., & El-Mokasabi, F. M. (2014). Floristic Composition and Traditional Uses of Plant Species at Wadi Alkuf, Al-Jabal Al-Akhder, Libya. *J. Agric. & Environ. Sci*, 14(8), 685–697. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2014.14.08.12375>
- F. Shahidi et al. (1999). *MONOTERPENES IN ESSENTIAL OILS Biosynthesis and Properties*.

- Farid, M., Marzouk, M. M., Hussein, S., Elkhateeb, A., Farid, M. M., Marzouk, M. M., Hussein, S. R., Elkhateeb, A., & Abdel-Hameed, E. S. (2018a). Comparative study of *Posidonia oceanica* L.: LC/ESI/MS analysis, cytotoxic activity and chemosystematic significance. *J. Mater. Environ. Sci*, 9(6), 1676–1682. <https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.6.187>
- Farid, M., Marzouk, M. M., Hussein, S., Elkhateeb, A., Farid, M. M., Marzouk, M. M., Hussein, S. R., Elkhateeb, A., & Abdel-Hameed, E. S. (2018b). Comparative study of *Posidonia oceanica* L.: LC/ESI/MS analysis, cytotoxic activity and chemosystematic significance. *J. Mater. Environ. Sci*, 9(6), 1676–1682. <https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.6.187>
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *J*, 22, 494–504. <https://doi.org/10.1002/ffj.1829>
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., & Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1250, pp. 34–48). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.051>
- Gokce, G., & Haznedaroglu, M. Z. (2008). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.016>
- Golmakani, M. T., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925–930. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.084>
- Gould, S., & Templin, M. V. (2023). Off target toxicities and links with physicochemical properties of medicinal products, including antibiotics, oligonucleotides, lipid nanoparticles (with cationic and/or anionic charges). Data review suggests an emerging pattern. In *Toxicology Letters* (Vol. 384, pp. 14–29). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.07.011>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>

- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 27, Issue 1, pp. 1–93). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Guzmán, B., & Vargas, P. (2005). Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(3), 644–660. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.04.026>
- Guzmán, E., & Lucia, A. (2021). Essential oils and their individual components in cosmetic products. In *Cosmetics* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040114>
- Haddad, J. G., Picard, M., Bénard, S., Desvignes, C., Desprès, P., Diotel, N., & El Kalamouni, C. (2019). Ayapana triplinervis essential oil and its main component thymohydroquinone dimethyl ether inhibit zika virus at doses devoid of toxicity in zebrafish. *Molecules*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193447>
- Hany El-Shemy. (2018). *Potential of Essential Oils* (Hany El-Shemy, Ed.). IntechOpen.
- Husnu Can Baser, K., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*.
- Hwang, E., & Shin, S. (2015). The effects of aromatherapy on sleep improvement: A systematic literature review and meta-analysis. In *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (Vol. 21, Issue 2, pp. 61–68). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/acm.2014.0113>
- J.M. Arrington, & K. Kubitzki. (2003). Flowering Plants · Dicotyledons. *Springer-Verlag*, 62–70.
- Kalus, U., Grigorov, A., Kadecki, O., Jansen, J. P., Kiesewetter, H., & Radtke, H. (2009). *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Research*, 84(3), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.001>
- Kevrekidou, A., Assimopoulou, A. N., Trachana, V., Stagos, D., & Malea, P. (2024). Antioxidant Activity, Inhibition of Intestinal Cancer Cell Growth and Polyphenolic Compounds of the Seagrass *Posidonia oceanica*'s Extracts from Living Plants and Beach Casts. *Marine Drugs*, 22(3), 130. <https://doi.org/10.3390/md22030130>

- Koçyiğit, M., & Özhatay, N. (2006). WILD PLANTS USED AS MEDICINAL PURPOSE in YALOVA (NORTHWEST TURKEY). In *Turkish J. Pharm. Sci* (Vol. 3, Issue 2).
- Koftis, T., & Prinos, P. (n.d.). *Estimation of wave attenuation over Posidonia Oceanica*.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., & Oreopoulou, V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.09.003>
- Koutsoni, O. S., Karampetsou, K., & Dotsika, E. (2019). In vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC50, CC50 and SI Values. *Bio-Protocol*, 9(21). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3410>
- Kuete, V., Mbaveng, A. T., Nono, E. C. N., Simo, C. C., Zeino, M., Nkengfack, A. E., & Efferth, T. (2016). Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multifactorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 23(8), 856–863. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.04.007>
- Küpeli, E., & Yesilada, E. (2007). Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.011>
- Kurita, N., Miyaji, M., Kuraney, R., Takahara, Y., & Ichimura, K. (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(11), 2365–2371. <https://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863805>
- Lee, M. S., Choi, J., Posadzki, P., & Ernst, E. (2012). Aromatherapy for health care: An overview of systematic reviews. In *Maturitas* (Vol. 71, Issue 3, pp. 257–260). <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.12.018>
- Li, W. R., Shi, Q. S., Liang, Q., Xie, X. B., Huang, X. M., & Chen, Y. Ben. (2014). Antibacterial activity and kinetics of *Litsea cubeba* oil on *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110983>
- Li, W. R., Shi, Q. S., Ouyang, Y. S., Chen, Y. Ben, & Duan, S. S. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7483–7492. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4460-y>

- Li, X. M., Tian, S. L., Pang, Z. C., Shi, J. Y., Feng, Z. S., & Zhang, Y. M. (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*, *115*(3), 1114–1119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.091>
- Lukas, B., Bragagna, L., Starzyk, K., Labeledz, K., Stolze, K., & Novak, J. (2021). Polyphenol diversity and antioxidant activity of european *Cistus creticus* L. (cistaceae) compared to six further, partly sympatric *Cistus* species. *Plants*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/plants10040615>
- Ma, L., & Yao, L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: An updated review. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25112627>
- Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., & Dall'Acqua, S. (2016). Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochemical Systematics and Ecology*, *66*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.030>
- Manion, C. R., & Widder, R. M. (2017). Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *74*(9), e153–e162. <https://doi.org/10.2146/ajhp151043>
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, *13*(8), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
- Mihai, A. L., & Popa, M. E. (2013). *ESSENTIAL OILS UTILIZATION IN FOOD INDUSTRY-A LITERATURE REVIEW*.
- Mocan, A., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Gavrilăş, L., Ferreira, I. C. F. R., Ivanov, M., Sokovic, M., Barros, L., & Babotă, M. (2022). Bioactive Compounds and Functional Properties of Herbal Preparations of *Cystus creticus* L. Collected From Rhodes Island. *Frontiers in Nutrition*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.881210>
- Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, S. K., & Khan, S. R. (2005). Sesquiterpenes: Natural Products That Decrease Cancer Growth. In *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* (Vol. 5).



- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>
- Ozbekle, B., Arikan, Y., Arisan, E. D., & Kutman, B. Y. (2024). Extracts of *Cistus creticus* cultivated at different salinity levels exhibit promising therapeutic potential for pancreatic cancer cell lines. *Phytomedicine Plus*, 4(2). <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100551>
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., & Kanellis, A. K. (2014). Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 2, Issue JUN). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>
- Perry, N., & Perry, E. (2006). *Aromatherapy in the Management of Psychiatric Disorders Clinical and Neuropharmacological Perspectives*.
- Politeo, O., Maravić, A., Burčul, F., Carev, I., & Kamenjarin, J. (2018). *Phytochemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Wild Growing Cistus species in Croatia*.
- Rao, V. P. S., & Sahoo, A. (n.d.). *EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL AND ITS APPLICATIONS*.
- Rashar, A. P., Ocke, I. C. L., & Vans, C. S. E. (2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. In *Cell Prolif* (Vol. 37).
- Rayne, S., & Mazza, G. (2007). *Biological Activities of Extracts from Sumac (Rhus spp.): A Review*.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview. In *Forschende Komplementarmedizin* (Vol. 16, Issue 2, pp. 79–90). <https://doi.org/10.1159/000207196>
- Riedel, S., & Israel, B. (2013). Essential Oils and Future Antibiotics: New Weapons against Emerging 'Superbugs'? *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies. J Anc Dis Prev Rem*, 1(2). <https://doi.org/10.4172/jadpr.1000105>

- Rô C , As, I. N., Siqueira, J. F., Tia, K., & Santos, R. N. (2004). *Association of Enterococcus faecalis With Different Forms of Periradicular Diseases*.
- Romero', J., Pérez', M., Alcoverro I, T., Mateo', M. Á., & Sánchez-Lizas02, L. (1998). Production ecology of *Posidonia oceanica* (L.) Delile meadows in Nueva Tabarca Marine Reserve: Growth, biomass and nutrient stocks along a bathymetric gradient. In *Oecologia aquatica* (Vol. 11).
- Saddi, M., Sanna, A., Cottiglia, F., Chisu, L., Casu, L., Bonsignore, L., & De Logu, A. (2007). *Antiherpevirus activity of Artemisia arborescens essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells*. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6>
- Sahraoui, R., & Chaker, A. N. (2015). *Morphological, anatomical, secondary metabolites investigation and physicochemical analysis of Cistus creticus Pharmacognosy Communications*. 3. <https://doi.org/10.5530/pc.2013.4.8>
- Sevimli-Gur, C., & Yesil-Celiktas, O. (2019). Cytotoxicity screening of supercritical fluid extracted seaweeds and phenylpropanoids. *Molecular Biology Reports*, 46(4), 3691–3699. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04812-9>
- Seyed Mohammad Bagher Hashemi, Amin Mousavi Khaneghah, & Anderson de Souza Sant'Ana. (2018). *Essential Oils in Food Processing*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/>
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., & Radulović, S. Š. (2012a). Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Industrial Crops and Products*, 38(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.017>
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., & Radulović, S. Š. (2012b). Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Industrial Crops and Products*, 38(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.017>
- Sonia Malik. (2019). Essential Oil Research. In *Essential Oil Research*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8>
- Sotanaphun1, U., Lipipun2, V., Suttisri2, R., & Bavovada2, R. (1999). A New Antiviral and Antimicrobial Sesquiterpene from *Glyptopetalum scierocarpum*. In *Letters Planta Med* (Vol. 65).

- Sovová, H., & Aleksovski, S. A. (2006). Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. *J*, 21, 881–889. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.058>
- Subhuti Dharmananda. (2003). Myrrh and Frankincense. *Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon*.
- Svoboda K.P., & Deans S.G. (1995). Biological activities of Essential Oils from Selected Aromatic Plants. *Acta Horticulturae* , 390, 203–209.
- Thanos, C. A., Georghiou, K., Kadis, C., & Pantazi, C. (1992). Cistaceae: A plant family with hard seeds. *Israel Journal of Botany*, 41(4–6), 251–263. <https://doi.org/10.1080/0021213X.1992.10677232>
- Tipton, D. A., Lyle, B., Babich, H., & Dabbous, M. K. (2003). In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 17(3), 301–310. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00018-3)
- Topçu, G., & Gören, A. C. (2007). Biological Activity of Diterpenoids Isolated from Anatolian Lamiaceae Plants. In *Nat. Prod* (Vol. 1).
- Tucker, A. O. (1986). *Frankincense and Myrrh I*.
- Vasarri, M., De Biasi, A. M., Barletta, E., Pretti, C., & Degl'innocenti, D. (2021a). An overview of new insights into the benefits of the seagrass *Posidonia oceanica* for human health. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md19090476>
- Vasarri, M., De Biasi, A. M., Barletta, E., Pretti, C., & Degl'innocenti, D. (2021b). An overview of new insights into the benefits of the seagrass *Posidonia oceanica* for human health. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md19090476>
- Vinatoru, M. (n.d.). *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*. [www.elsevier.nl/locate/ultsonch](http://www.elsevier.nl/locate/ultsonch)
- Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(4), 621–629. <https://doi.org/10.1079/pns2004393>

Wolfender, J. L. (2009). HPLC in natural product analysis: The detection issue. In *Planta Medica* (Vol. 75, Issue 7, pp. 719–734). <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088393>

Γιώργος Μπαλατσούρας. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων* (ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΒΡΥΟ).

Π. Κοτζεκίδου - Ρουκά. (2009). *Μικροβιολογία Τροφίμων & Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων* (Εκδόσεις Γιαχούδη).