



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

### Πτυχιακή Εργασία

«Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων φυτών»



<b>ΦΙΤΣΙΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑ</b>	<b>ΝΑΖΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ</b>
<b>ΑΜ: 20684107</b>	<b>ΑΜ: 19684160</b>

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:**  
**ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**Αιγάλεω, Ιούλιος 2024**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF FOOD SCIENCES  
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**Diploma Thesis**

**«Evaluation of antibacterial activity of plant extracts»**

<b>FITSIΟΥ VASILEIA</b>	<b>NAZOU AIKATERINI</b>
<b>RN: 20684107</b>	<b>RN: 19684160</b>

**Supervisor:**

**HOUHOULA DIMITRA**

**Aigaleo, July 2024**

## Επιτροπή Αξιολόγησης

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο «Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων φυτών» που παρουσιάστηκε από τις Φίτσιο Βασιλεία / Νάζου Αικατερίνη, 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 Ανθμία	Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	
3.	Αντωνόπουλος Διονύσιος	Μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	

## Υπεύθυνη δήλωση μη λογοκλοπής

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Φίτσιου Βασιλεία του Γεωργίου με αριθμό μητρώου 20684107 και Νάζου Αικατερίνη του Αλεξάνδρου με αριθμό μητρώου 19684160 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς, είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Η Δηλούσα  
Φίτσιου Βασιλεία

Η Δηλούσα  
Νάζου Αικατερίνη

## Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε πρωτίστως την επιβλέπουσα καθηγήτρια μας, Δήμητρα Χούχουλα, για το χρόνο και τις γνώσεις που μας μετέδωσε μέσα από την παρούσα πτυχιακή εργασία. Αξίζει το «ευχαριστώ» μας, όχι μονάχα σαν καθηγήτρια, αλλά κυρίως γιατί είναι ένας ξεχωριστός και μοναδικός άνθρωπος, ο οποίος μέσα από όλο αυτό το ταξίδι μας μας έμαθε ότι πρέπει να επιμένουμε και να υπομένουμε αν θέλουμε κάτι πολύ στη ζωή μας. Φυσικά, δεν θα μπορούσαμε να μην ευχαριστήσουμε για τη συμβολή της στην προσπάθεια μας, μία εκπληκτική διδάκτορα, την Αλίκη Τσάκη, αλλά και όσους στάθηκαν στο πλευρό μας όλη αυτή την περίοδο εκπόνησης της εργασίας μας.

## **Αφιερώσεις**

Αφιερώνουμε από κοινού την παρούσα πτυχιακή στην καθηγήτρια μας, Δήμητρα Χούχουλα, για όλη την αδιάκοπη υποστήριξη, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη της που αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης και κινητήριο δύναμη σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μας προσπάθειας. Η σοφία και η εμπειρία της συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση αυτού του έργου. Της εκφράζουμε την πιο ειλικρινή μας ευγνωμοσύνη.

Φυσικά, δεν θα μπορούσαμε να παραβλέψουμε, την διδάκτορα, που ήταν πλάι μας σε ολόκληρη την προσπάθειά μας, Αλίκη Τσάκη. Της ευχόμαστε ολόψυχα μία λαμπρή ακαδημαϊκή καριέρα και να εκπληρώσει κάθε όνειρο της!

Επιπρόσθετα, στις οικογένειές μας για όλη την στήριξη, την κατανόηση και την αγάπη καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

## Περίληψη

Τα φυτικά εκχυλίσματα από την αρχαιότητα έως σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους κλάδους, όπως στη φαρμακευτική, αισθητική και ιατρική. Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματεύεται την εκχύλιση δύο φυτών, της κουνούκλας και της Ποσειδωνίας, με τη χρήση υπερήχων. Αναλυτικότερα, τα δύο υδατικά εκχυλίσματα αναλύονται ως προς την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις και συγγρόνως, αξιολογούνται για την αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική τους δράση. Μέσω του προσδιορισμού των περιεχόμενων ενώσεων, από την υγρή χρωματογραφία, το καλύτερο εκχύλισμα ήταν του κιστού, διότι ταυτοποιήθηκε με πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων και με χαρακτηριστικότερη της ρουτίνης. Ωστόσο, και τα δύο φυτικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν παρόμοια αντιμικροβιακή δράση, εφόσον οι τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) δεν διαφέρουν σημαντικά για τον εκάστοτε μικροοργανισμό. Το εύρος των τιμών MIC για την αναστολής της πλειοψηφίας των βακτηρίων και του μύκητα ανέρχεται στα 17-20 mg/mL. Επίσης, όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα, οι κατηγορίες των δύο δειγμάτων εμφανίζουν χαμηλή δράση, τόσο το εκχύλισμα της Ποσειδωνίας, όσο και της κουνούκλας. Συμπερασματικά, καλύτερο εκχύλισμα κρίνεται αυτό που καταφέρνει να συνδυάζει αποτελεσματική κυτταροτοξική και αντιμικροβιακή δράση και φυσικά, όλες τις υπόλοιπες αναγκαίες ιδιότητες, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί εκτενέστερα στην παρούσα ερευνητική εργασία.

Λέξεις- κλειδιά: φυτικά εκχυλίσματα, κουνούκλα, Ποσειδωνία, *C. incanus*, *P. oceanica*, παθογόνοι μικροοργανισμοί, κυτταροτοξικότητα, αντιμικροβιακή δράση

## Abstract

From antiquity to the present, plant extracts have been widely used in various fields such as pharmaceuticals, aesthetics and medicine. This research study focuses on the extraction of two plants, *Cistus incanus* (rockrose) and *Posidonia oceanica*, using ultrasound-assisted extraction. Specifically, the two aqueous extracts are analyzed for their phenolic compound content and simultaneously evaluated for their antimicrobial and cytotoxic activities. Through the determination of the contained compounds using liquid chromatography, the best extract was that of *Cistus incanus*, as it was identified with a plethora of bioactive compounds, with rutin being the most characteristic. However, both plant extracts exhibit similar antimicrobial activity, as the minimum inhibitory concentration (MIC) values do not significantly differ for each microorganism. The MIC values for inhibiting the majority of bacteria and fungi range from 17-20 mg/mL. Additionally, in terms of cytotoxicity, both samples exhibit low activity, including the extracts of *Posidonia oceanica* and *Cistus incanus*. In conclusion, the best extract is considered to be the one that manages to combine effective cytotoxic and antimicrobial activities, along with all other necessary properties, which have not been extensively studied in the present research.

Keywords: plant extracts, *Cistus incanus*, *Posidonia oceanica*, pathogens, cytotoxicity, antimicrobial activity



# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Αφιερώσεις .....	6
Περίληψη .....	7
Abstract .....	8
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ: .....	11
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ: .....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1 Φυτικά εκχυλίσματα .....	15
1.1.1 Εκχυλίσματα-Γενικά.....	15
1.1.2 Αντιμικροβιακό προφίλ φυτικών εκχυλισμάτων .....	17
1.2 Κουνούκλα ή λαδανιά.....	21
1.2.1 Ιστορική αναδρομή .....	21
1.2.2 Βοτανική περιγραφή-προέλευση .....	22
1.2.3 Λάβδανο, ρητίνη .....	27
1.2.4 Σύσταση/χημικό προφίλ κιστού .....	28
1.2.5 Ιδιότητες και οφέλη στην υγεία του ανθρώπου .....	28
1.3 Φύκη ή θαλάσσια λιβάδια.....	30
1.3.1 Ιστορική αναδρομή.....	30
1.3.2 Βοτανική περιγραφή-προέλευση.....	31
1.3.3 Σύσταση/χημικό προφίλ.....	33
1.3.4 Ιδιότητες και οφέλη στην υγεία του ανθρώπου.....	33
1.4 Ανάλυση μικροβιολογικού προφίλ μικροοργανισμών .....	34
1.4.1 Μικροοργανισμοί .....	34
1.4.2 Κατηγοριοποίηση βακτηρίων με βάση τη χρώση Gram .....	35
1.4.3 Θετικά κατά Gram βακτήρια.....	36
1.4.4 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια .....	38
1.4.5 Μύκητας: <i>Candida albicans</i> .....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	42
2.Πειραματικό .....	43
2.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση .....	43
2.2 Σκοπός.....	46
2.3 Υλικά και μέθοδοι .....	47
2.3.1 Αντιδραστήρια.....	47

2.3.2 Φυτά .....	47
2.3.3 Υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	47
2.3.4 Εξοπλισμός .....	47
2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.4.1 Εκχύλιση με υπερήχους .....	48
2.4.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC - DAD .....	48
2.4.3 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο της διάχυσης σε εκλεκτικά υποστρώματα.....	49
3. Αποτελέσματα - Συζήτηση .....	51
3.1 HPLC-DAD.....	51
3.2 Διάχυση σε τρυβλία Petri.....	54
3.3 Κυτταροτοξικότητα .....	58
4. Συμπεράσματα.....	60
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ:**

Εικόνα 1: Είδη του cistus Πηγή: <a href="https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/">https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/</a> .....	23
Εικόνα 2: Σύγκριση των cistus Πηγή: <a href="https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/">https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/</a> .....	24
Εικόνα 3: Λάβδανο, ρητίνη Πηγή: <a href="https://botano.gr/el/products/cretan-labdanum-resin-cistus-creticus-ssp-incanus">https://botano.gr/el/products/cretan-labdanum-resin-cistus-creticus-ssp-incanus</a> .....	27
Εικόνα 4: Posidonia oceanica Πηγή: <a href="https://medposidonianetwork.com/biology/">https://medposidonianetwork.com/biology/</a> .....	31
Εικόνα 5: Χρωματογράφημα HPLC-DAD εκχυλίσματος κουνούκλας. ....	53
Εικόνα 6: Χρωματογράφημα HPLC-DAD εκχυλίσματος Ποσειδωνίας. ....	54
Εικόνα 7: Συγκριτικό ραβδόγραμμα που περιγράφει την κυτταροτοξική δράση αιθέριου ελαίου και εκχυλίσματος της ωκεανίας. ....	60

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ:

Πίνακας 1: Κύριες ομάδες φυτικών ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση .....	19
Πίνακας 2: 7 Cistus (Rock roses) σε σύγκριση Πηγή: <a href="https://mymediterraneanangarden.com/types-of-cistus/">https://mymediterraneanangarden.com/types-of-cistus/</a> .....	25
Πίνακας 3: Posidonia oceanica Βοτανική προέλευση Πηγή: <a href="https://kepea-syrou.kyk.sch.gr/wp-content/uploads/2022/11/PosidoniaOceanica_ErgastiriaDexiotiton_KepeaSyrou.pdf">https://kepea-syrou.kyk.sch.gr/wp-content/uploads/2022/11/PosidoniaOceanica_ErgastiriaDexiotiton_KepeaSyrou.pdf</a>	32
Πίνακας 4: Μικροβιολογικά προφίλ θετικών κατά Gram βακτηρίων .....	38
Πίνακας 5: Μικροβιολογικά προφίλ αρνητικών κατά Gram βακτηρίων .....	40
Πίνακας 6: Πειράματα και μέθοδοι που σχετίζονται με το βιοχημικό προφίλ και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων Cistus spp. και P.oceanica ..	43
Πίνακας 7: Πρότυπες ενώσεις, ο χρόνος κατακράτησης του, καμπύλες βαθμονόμησης, μέγιστα μήκη κύματος στην υπεριώδη περιοχή και η συγκέντρωσή τους στα εκχυλίσματα Cistus incanus και Posidonia oceanica .....	52
Πίνακας 8: Αποτελέσματα από την διάχυση σε τρυβλία Petri για το εκχύλισμα P. Oceanica .....	56
Πίνακας 9: Αποτελέσματα από την διάχυση σε τρυβλία Petri για το εκχύλισμα Cistus incanus. ....	57

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η έρευνα φυσικών προϊόντων είναι ένας ενεργός κλάδος της επιστήμης, που καθοδηγείται από την αυξημένη αξία που δίνεται στην ατομική υγεία και ευημερία. Η άνοδος των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών έχει δώσει εξίσου επιπλέον ώθηση στην αναζήτηση νέων φυτών με αντιβακτηριακές ενώσεις. Τα φυσικά προϊόντα, είτε ως καθарές ενώσεις, είτε ως τυποποιημένα φυτικά εκχυλίσματα, δίδουν απεριόριστες ευκαιρίες για την ανάπτυξη νέων και κατάλληλων προσθέτων αλλά και φαρμακευτικών θεραπειών λόγω του απaráμιλλου φάσματος χημικής ποικιλομορφίας τους. Πολυάριθμα αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, γλυκοσίδες, τερπένια, ταννίνες και πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση καθιστώντας τα, αρκετά ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία. Ο αριθμός των άρθρων/εργασιών που δημοσιεύονται σχετικά με τη δράση των φυτικών εκχυλισμάτων και τη σύγκρισή τους με αποτελέσματα από ήδη υπάρχοντα αντιμικροβιακά ολοένα και αυξάνεται. Στην παρούσα εργασία, η έρευνα επικεντρώνεται στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων δύο φυτικών ειδών: του *Cistus incanus* και του *Posidonia oceanica*. Το *Cistus incanus*, γνωστό και ως κίστος, είναι ένα φυτό με ιστορική χρήση στην παραδοσιακή ιατρική λόγω των αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων. Η *Posidonia oceanica*, ή αλλιώς Ποσειδωνία, είναι ένα είδος θαλάσσιου χόρτου που απαντάται στη Μεσόγειο και έχει μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές του ιδιότητες.

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να αξιολογήσει τις αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, κυτταροτοξικές και αντικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων του *Cistus incanus* και του *Posidonia oceanica*. Οι κύριοι στόχοι της έρευνας περιλαμβάνουν την ανάλυση της αποτελεσματικότητάς τους σε διάφορα μικροβιακά στελέχη, Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*), Gram - (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), μύκητες (*Candida albicans*), καθώς και την σύγκριση της αποτελεσματικότητάς τους με άλλες παρόμοιες μεθόδους. Η υπόθεση της έρευνας είναι ότι τα εκχυλίσματα του *Cistus incanus* και του *Posidonia oceanica* θα παρουσιάσουν σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα κατά των επιλεγμένων μικροβιακών στελεχών, χαμηλή κυτταροτοξική δράση και αποτελεσματική αντική ικανότητα. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι, οι οποίες είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση της αντιμικροβιακής τους δράσης, όπως η μέθοδος διάχυσης δίσκων σε άγαρ, μέθοδος

διάχυσης πηγαδιού, βιοαυτογραφική μέθοδος, υπολογισμός τιμών ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Εφόσον δεν βασίζονται όλα στις ίδιες αρχές, τα αποτελέσματα που προκύπτουν επηρεάζονται όχι μόνο από την επιλεγμένη μέθοδο, αλλά και από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται, τη μέθοδο εκχύλισης ή το βαθμό της διαλυτότητας κάθε ελεγχόμενης ένωσης. Η παρούσα έρευνα θα χρησιμοποιήσει μια σειρά από πειραματικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών διάχυσης σε τρυβλία για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας, της μεθόδου AlamarBlue για τον προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης και την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD) για τη μελέτη του φαινολικού προφίλ των εκχυλισμάτων.

## **1.1 Φυτικά εκχυλίσματα**

### **1.1.1 Εκχυλίσματα-Γενικά**

Ο όρος «φυσικά προϊόντα ή εκχυλίσματα» καλύπτει ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών που παράγονται και απομονώνονται από βιολογικές πηγές. Τα φυσικά προϊόντα περιλαμβάνουν ουσίες που απαντώνται στη φύση και είναι φυτικής προέλευσης, με σημαντικότερα παραδείγματα τα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια.

Οι ουσίες που προέρχονται από τα φυτά έχουν σχεδόν πάντα σκοπό να προστατεύουν το φυτό. Η διαδικασία αυτή είναι μερικές φορές εμφανής: αν π.χ. τραυματιστεί ο φλοιός ενός ελάτου, το δέντρο παράγει ρετσίνι για να κλείσει την πληγή και να προστατευτεί από μολύνσεις από ιούς, ζυμομύκητες και μούχλα. Ωστόσο, η προστασία είναι συνήθως πολύ πιο περίπλοκη και μπορεί να χαρακτηριστεί ως «χημικά όπλα» ενάντια στους οργανισμούς που απειλούν το φυτό. Στη μάχη αυτή ανάμεσα στα φυτά, τις ζύμες, τη μούχλα, τους ιούς, τα βακτήρια, τα έντομα και άλλα ζώα, τα φυτά παράγουν σύνθετα μίγματα ουσιών, που εκτιμώνται για το άρωμά τους, τη γεύση τους, τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες ή τις διάφορες άλλες χρήσεις τους από τον άνθρωπο.

Τα φυτικά εκχυλίσματα παραλαμβάνονται από τα μέρη των φυτών μέσω της χρήσης διαλυτών. Η αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών από τα οποία προέρχονται. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ουσίες που, αν και δεν σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη ενός οργανισμού, συμβάλλουν στην επιβίωσή του (Μαχούχα,

2014). Τα φυτά χρησιμοποιούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού για να προστατευτούν από μικροοργανισμούς και έντομα που είναι βλαβερά για αυτά.

Μερικοί δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες για τη θεραπεία διαταραχών και ασθενειών. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των φυτών οφείλονται στα φυτοχημικά συστατικά τους, τα οποία είναι κυρίως δευτερογενείς μεταβολίτες. Η σύνθεσή τους συνδέεται άμεσα με τη λειτουργία των φυτικών κυττάρων και ιστών, και όπως προαναφέρθηκε, με τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι παθογόνων, εντόμων ή φυτοφάγων ζώων. Επομένως, η χρήση τους ως φυτοφάρμακα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογία (Ιγνατιάδου, 2009, Stanforth, 2006).

Τα εκχυλίσματα φυτών έχουν δείξει σημαντικές υποσχέσεις σε πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και πολλά από αυτά έχουν αποκτήσει την κατάσταση GRAS (Generally Recognized as Safe). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων οφείλονται σε διάφορα συστατικά τους και ορισμένα εκχυλίσματα έχουν αντιμικροβιακή δράση λόγω των φυτοχημικών συστατικών τους. Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα πιθανόν οφείλεται στα συνδυασμένα αποτελέσματα της προσρόφησης των πολυφαινόλων στις βακτηριακές μεμβράνες, που προκαλεί διαταραχή της μεμβράνης και επακόλουθη διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου (Ikigai et al., 1993; Otake et al., 1991), καθώς και στην παραγωγή υδροϋπεροξειδίων από τις πολυφαινόλες (Akagawa et al., 2003).

Παρόλο που έχουν διεξαχθεί πολλές *in-vitro* μελέτες για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες που εστιάζουν στην εφαρμογή τους σε τρόφιμα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι τα φυτικά εκχυλίσματα δεν σχεδιάστηκαν για να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά, σε αντίθεση με πολλές καθαρές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Η μειωμένη αποτελεσματικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων στις περισσότερες μελέτες μπορεί να αποδοθεί στη χρήση ακατέργαστων εκχυλισμάτων, τα οποία συχνά περιέχουν φλαβονοειδή σε γλυκοσιδική μορφή. Η παρουσία ζάχαρης σε αυτές τις μορφές μειώνει την αποτελεσματικότητα έναντι ορισμένων βακτηρίων (Karoor et al., 2007; Parvathy et al., 2009; Rhee et al., 1994).

Οι πρώιμες χρήσεις φυτικών εκχυλισμάτων χρονολογούνται αιώνες πίσω και ποικίλλουν ανάλογα με τον πολιτισμό και τις περιστάσεις. Αρχαίες πολιτισμικές



κοινότητες, όπως οι αρχαίοι Έλληνες, οι Ρωμαίοι, οι Αιγύπτιοι και οι Κινέζοι, χρησιμοποίησαν φυτικά εκχυλίσματα για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως για την ανακούφιση από πόνους, την αντιμετώπιση των περιστατικών ασθενειών και τη βελτίωση της γενικής ευεξίας.

Παραδείγματα περιλαμβάνουν τη χρήση μέντας για την ανακούφιση των προβλημάτων του πεπτικού συστήματος, τον ευκάλυπτο για την ανακούφιση από τον πονόλαιμο και το δενδρολίβανο για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Αυτές οι παραδοσιακές χρήσεις εξελίχθηκαν σε μια πληθώρα φυτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε διάφορους τομείς, όπως η φαρμακολογία, η διατροφή, η αισθητική και η υγεία των ζώων.

### **1.1.2 Αντιμικροβιακό προφίλ φυτικών εκχυλισμάτων**

Είναι γεγονός ότι πρέπει να αντιμετωπίζονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, και γι' αυτό ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών έχει μελετήσει τις ιδιότητες των δευτερογενών μεταβολιτών ως αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές και αντικές ουσίες. Τέτοιες δράσεις έχουν αποδειχθεί από τις διάφορες κατηγορίες των βιοδραστικών ενώσεων. Είναι γνωστό ότι τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες από ανθρώπους που εφαρμόζουν την παραδοσιακή ιατρική σε πολλά μέρη του κόσμου, καθώς περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι βιοδραστικοί. Συμπερασματικά, έχει διεξαχθεί έρευνα για να διαπιστωθούν οι αντιμικροβιακές δράσεις μιας μεγάλης ποικιλίας φαρμακευτικών φυτών και των εκχυλισμάτων τους (Cantrell et al., 1998; Cowan, 1999).

Στην ιατρική, οι αλκαλοειδείς ενώσεις όπως η ατροπίνη, η μορφίνη, η κινίνη και η διγιοξίνη έχουν ευρεία χρήση. Αυτές οι ουσίες χρησιμοποιούνται είτε ως καθарές είτε ως παράγωγά τους, όπως η ασπιρίνη και ορισμένα τοπικά αναισθητικά. Η κινίνη, η οποία βρίσκεται σε φυτά του γένους *Cinchona*, θεωρείται βασικό φάρμακο κατά της ελονοσίας, ενώ το στερεοϊσομερές της, η κινιδίνη, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της αρρυθμίας (Verpoorte, 1998).

Επιπλέον, το ενδιαφέρον για τη χρήση φαρμακευτικών φυτών και των παραγώγων τους ως φυσικά αντιμικροβιακά αυξάνεται λόγω της ασφάλειας που προσφέρουν στα τρόφιμα. Η προσθήκη τους μειώνει τη μικροβιακή μόλυνση από

παθογόνους μικροοργανισμούς όπως οι *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus*. Τα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών μπορούν να βελτιώσουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων και να μειώσουν τα παθογόνα και τις τοξίνες των μικροοργανισμών (Škronánková et al., 2012). Πάνω από 1.340 φυτά έχουν μελετηθεί για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες και περισσότερα από 30.000 συστατικά από φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων με ικανοποιητικά αποτελέσματα (Tajkarimi et al., 2010).

Χρησιμοποιώντας την κλασματοποίηση βιοδραστικών φυτικών εκχυλισμάτων, έχουν απομονωθεί διάφορες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακές ιδιότητες (Πίνακας 1). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται κυρίως σε αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, τερπενοειδή, φαινολικές ενώσεις και ταννίνες (Grayer et al., 1994). Επίσης, υπάρχουν δευτερεύοντα συστατικά με αντιμικροβιακές ιδιότητες που πιθανόν συνεργάζονται με τα κύρια συστατικά. Ωστόσο, για να είναι αποτελεσματικά σε τρόφιμα, απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Škronánková et al., 2012).

Τα φαινολικά συστατικά είναι κυρίως υπεύθυνα για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των φυσικών συντηρητικών (Cosentino et al., 1999). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αλληλοεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς, αναστέλλοντας ή περιορίζοντας την ανάπτυξή τους μέσω αλλαγών στην κυτταρική μορφολογία, αναστολής της κυτταρικής αναπνοής, μείωσης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τριφωσφορικής αδενοσίνης και διαταραχής της μεμβράνης (Wink et al., 2010). Προκαλούν επίσης τοξικότητα στους μικροοργανισμούς αναστέλλοντας διάφορα ένζυμα και τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και συνδέονται απευθείας με το μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα (Cowan, 1999).

Η αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση των φλαβονοειδών έχει μελετηθεί εκτενώς, αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει ασαφής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση μεταξύ δομής και δράσης των φλαβονοειδών στη βιοσύνθεση DNA και RNA θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ορισμένες φλαβονόλες, όπως η μυρικετίνη, είναι πιο αποτελεσματικές από φλαβανόνες και φλαβανόλες. Η παρουσία συγκεκριμένων ομάδων στη δομή τους είναι απαραίτητη για την αντιμικροβιακή τους δράση (Wink et al., 2010).

Η σύνθεση των φυτικών εκχυλισμάτων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την εποχή συγκομιδής και τη γεωγραφική θέση του φυτού (Arrasand, 1992; Cosentino et al., 1999; Juliano et al., 2000; Marino et al., 1999; Marotti et al., 1994; Mc Gimpsey et al., 1994). Συνήθως, τα αιθέρια έλαια από φυτά που συγκομίζονται κατά τη διάρκεια ή μετά την ανθοφορία έχουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση (Marino et al., 1999; Mc Gimpsey et al., 1994). Για παράδειγμα, τα αιθέρια έλαια από αποξηραμένους σπόρους κόλιανδρου έχουν διαφορετική σύνθεση από αυτά που παράγονται από φύλλα του ίδιου φυτού (Delaquis et al., 2002).

Τα δευτερεύοντα συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δραστηριότητα, πιθανώς λόγω συνεργιστικών αποτελεσμάτων με άλλα συστατικά, όπως έχει διαπιστωθεί για το φασκόμηλο, το θυμάρι και τη ρίγανη (Marino et al., 2001; Lattaoui & Tantaoui-Elaraki, 1994; Paster et al., 1995).

*Πίνακας 1: Κύριες ομάδες φυτικών ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση*

<b>ΧΗΜΙΚΗ ΕΝΩΣΗ</b>	<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ</b>	<b>ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	<b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ</b>
<b>ΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>	ΑΠΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ	ΚΑΤΕΧΟΛΗ	ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ
		ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ MEMBRANΗΣ
	ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΟΕΥ	ΚΙΝΝΑΜΙΝΙΚΟ ΟΕΥ	-
	ΚΟΥΙΝΟΝΕΣ	ΥΠΕΡΚΙΝΙΝΗ	ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΑΔΕΣΙΝΗ, ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ, ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ENZΥΜΟΥ
	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΧΡΥΣΙΝΗ	ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΑΔΕΣΙΝΗ

	ΦΛΑΒΟΝΕΣ	ABYSSINONE	ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ENZΥΜΟΥ
			ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ HIV
	ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ	TOTAROL	-
	ΤΑΝΝΙΝΕΣ	ΕΛΛΑΓΙΤΑΝΝΙΝΕΣ	ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
			ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΑΔΕΣΙΝΗ
			ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ
			ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ
			ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ
			ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ MEMBRANΗΣ
			ΣΥΜΠΛΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ
	ΚΟΥΜΑΡΙΝΗ	ΒΑΡΦΑΡΙΝΗ	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ DNA (ΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ)
<b>ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ</b>	-	ΒΕΡΒΕΡΙΝΗ	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ Ή DNA
		ΠΙΠΕΡΙΝΗ	
<b>ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΑ</b>	-	ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΗ MANNOZΗΣ	-

## 1.2 Κουνούκλα ή λαδανιά

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Σύμφωνα με τη μυθολογία, πραγματοποιήθηκε ένα συμβούλιο στον Όλυμπο, κατά το οποίο οι θεοί αποφάσισαν ποια φυτά θα θεωρούνταν ιατρικά. Οι ίδιοι καθόρισαν ότι η λαδανιά θα ήταν ικανή να θεραπεύει τους πολεμιστές που επλήγησαν στη μάχη. Αυτό προκάλεσε δυσαρέσκεια στις θεές, καθώς ήταν βέβαιες ότι το φυτό με τα λεπτά ρόδινα άνθη θα ήταν πιο κατάλληλο για την ομορφιά - εσωτερική και εξωτερική. Επομένως, ο κιστός αποκτά και τις δύο ιδιότητες, θεραπευτική και καλλυντική.

Οι Αρχαίοι Αιγύπτιοι ήταν ο πρώτος λαός που ασχολήθηκε με τη συλλογή της ρητίνης του Κίστου. Συγκεκριμένα, τη χρησιμοποίησαν στην ταρίχευση (στις μούμιες) και το έκαιγαν ως λιβάνι στους ναούς. Επίσης, είναι διαδεδομένο και ως “Το Μύρο της Βίβλου” και ήταν ένα από τα βασικά λιβάνια που έκαιγαν κατά την ανάγνωση των Ψαλμών του Δαβίδ και της Βίβλου. Η λαδανιά αποτελεί ένα από τα σαράντα συστατικά που απαιτούνται για την παρασκευή του Αγίου Μύρου.

Στον Μινωικό πολιτισμό υπάρχουν ενδείξεις χρήσης του Κίστου ως καλλυντικού και θεραπευτικού. Η σημασία του *Cistus incanus* L. για τους Μινωίτες αποτυπώνεται σε τοιχογραφία στο παλάτι της Κνωσού που αναπαρίσταται το φυτό. Έχουν βρεθεί αναφορές από σχεδόν όλους τους γιατρούς της εν λόγω εποχής, όπως ο Ιπποκράτης, ο Θεόφραστος, ο Γαίος Πλίνιος Σέκουνδος, ο Διοσκουρίδης και άλλοι.

Ο Διοσκουρίδης αναφέρεται στις ιδιότητες της αλάνθανου και τη χρήση της στην περιποίηση του δέρματος, των μαλλιών και στον τρόπο συλλογής της ρητίνης στη λαδανιά. Ο Ρωμαίος ιατρός Κέλσος αναφέρει τη χρήση της ρητίνης της λαδανιάς για την αντιμετώπιση σαρκωμάτων κακοήθειας. Οι Άραβες χρησιμοποιούσαν τη ρητίνη ως θυμίαμα, ενώ ο Πέρσης ιατρός Αβικέννας την εφάρμοζε για ανακούφιση των προβλημάτων του στομάχου και του εντέρου, καθώς και ως αλοιφή για τη θεραπεία του δέρματος. Κατά τον Μεσαίωνα, χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της πανώλης, ενώ κατά την Αναγέννηση διακινούνταν αρωματικά χώρου με βάση τη λαδανιά (Σταύρος Ασπραδάκης, 2014).

## 1.2.2 Βοτανική περιγραφή-προέλευση





























Στην φυτική τάξη Cistaceae συμπεριλαμβάνονται ποώδη φυτά και θάμνοι 8 γενών και 200 ειδών. Τα γένη εμπεριέχουν *Helianthemum* (100 spp.), *Cistus* (20 spp.) και *Halimium*. (Sahraoui et al., 2013; Abu-Orabii et al., 2020). Ο Linnaeus, με βάση την αρχική περιγραφή του γένους το 1753, ταξινόμησε ορισμένα είδη και υποείδη στο *Cistus* (Εικόνα 1). Τα είδη αυτού διανέμονται τόσο στην ανατολική όσο και στη δυτική Μεσόγειο, όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη ποικιλότητα και είναι, επίσης, ευρέως διαδεδομένα στα νησιά Βαλεαρίδων και Κανάριων Νήσων. Το γένος *Cistus* L. rock rose, holly rose, είναι γνωστό για την αντοχή του (Skorić et al., 2012) και στην Ελλάδα καλλιεργείται στην Κρήτη και στην Χαλκιδική. Είναι ένα αρκετά πολύπλοκο γένος λόγω της ποικιλομορφίας των ειδών του και των διασυνδυασμών μεταξύ συγγενών ειδών. Πράγματι, οι συνθήκες υβριδισμού φαίνεται να είναι ενεργές στο γένος *Cistus* και πολλοί υβριδικοί συνδυασμοί μεταξύ ειδών με ροζ ή λευκά άνθη έχουν παρατηρηθεί στο φυσικό περιβάλλον, με βάση ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες (Εικόνα 2) (Paolini et al., 2009; Lukas et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για ένα είδος δικοτυλήδων πολυετών ποωδών φυτών που έχουν σκληρά φύλλα και αναπτύσσονται σε ανοιχτές περιοχές με πετρώδη και άγονα εδάφη, για αυτό τον λόγο είναι γνωστά και ως rock rose (Πίνακας 2). Αυτά τα φυτά είναι ικανά να αναπτυχθούν ύστερα και από έντονες δασικές πυρκαγιές, χάρη της αυξημένης βλαστικής ικανότητας των σπόρων τους, ακόμη και μετά την έκθεση αυτών σε υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, ορισμένα είδη έχουν εμφανίσει εποχιακό διμορφισμό, που επιτρέπει τον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας, κατάσταση που προκαλεί μείωση του μεγέθους των φύλλων και ανάπτυξη περισσότερων τριχών. Βασικό γνώρισμα του γένους καθίσταται ένας συνδυασμός διαφορετικών τύπων τριχώματος στο φύλλο, στο στέλεχος και στον κάλυκα. Τα φύλλα του και τα κλαδιά μπορούν να υποβληθούν σε διαφορετικές διαδικασίες εκχύλισης και απόσταξης για την παραγωγή διαφόρων τύπων εκχυλισμάτων (Alves-Ferreira et al., 2022). Πλήθος αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί στην μεσογειακή λαϊκή ιατρική ως αφεψήματα τσαγιού με στόχο

την θεραπεία πεπτικών προβλημάτων και κρυολογημάτων, ως εκχύλισμα για τη θεραπεία ασθενειών και ως αρωματικά.



*Εικόνα 1: Είδη του cistus*

*Πηγή: <https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/>*

	Shrub	Stem	Flower	Leaf
<b>Cistus crispus</b> "Curled-leaved Rock rose"	2m/6.5ft 			
<b>Cistus salviifolius</b> "Sage leaf Rock rose"	2m/6.5ft 			
<b>Cistus albidus</b> "White-leaved Rock rose"	2m/6.5ft 			
<b>Cistus monspeliensis</b> "Montepeller Rock rose"	2m/6.5ft 			
<b>Cistus creticus</b> "Cretan Rock rose"	2m/6.5ft 			
<b>Cistus laurifolius</b> "Laurel leaf Rock rose"	2m/6.5ft 			
<b>Cistus ladanifer</b> "Gum Rock rose"	2m/6.5ft 			

Family: Cistaceae

Genus: Cistus

Species: C. creticus, C. salviifolius,  
 C. albidus, C. monspeliensis,  
 C. creticus, C. laurifolius,  
 C. ladanifer

Εικόνα 2: Σύγκριση των cistus

Πηγή: <https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/>



Πίνακας 2: 7 *Cistus* (Rock roses) σε σύγκριση

Πηγή: <https://mymediterraneangarden.com/types-of-cistus/>

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΑΝΤΟΧΗ	ΗΛΙΑΚΟ ΦΩΣ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΞΗΡΑΣΙΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>Cistus crispus</i> (Curled Leaf Rock Rose)	30-40 cm ύψος & 0,8-1 m πάχος	-12°C έως -7°C	Πλήρη ήλιο/μερική σκιά	Περίπου 4 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου (Νοτιοδυτική Ευρώπη έως Βόρεια Αφρική)
<i>Cistus creticus</i> (Cretan Rock Rose)	0,8-1m ύψος & 0,8-1 m πλάτος	-12°C έως -7°C	Πλήρη ήλιο/μερική σκιά	Περίπου 5 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου (Ελληνικά Νησιά, συγκεκριμένα στην Κρήτη)
<i>Cistus salviifolius</i> (Sage Leaf Rock Rose)	0,8-1m ύψος & από 1 m και άνω πλάτος	-18°C έως -12°C	Πλήρη ήλιο/μερική σκιά	Περίπου 4 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου (Νότια Ευρώπη και Βόρεια Αφρική)
<i>Cistus albidus</i> (White Leaf Rock Rose)	1m ύψος & 1 m πλάτος	-12°C έως -7°C	Πλήρη ήλιο	Περίπου 4 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου
<i>Cistus monspeliensis</i> (Montpellier Rock Rose)	1-1,25 m ύψος & 0,8-1 m πλάτος	-18°C έως -12°C	Πλήρη ήλιο	Περίπου 5 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου (Ν. Ευρώπη και Β. Αφρική)

Cistus laurifolius (Laurel Leaf Rock Rose)	2 m και άνω ύψος & 1-1,25 m πλάτος	-23°C έως -18°C	Πλήρη ήλιο/μερική σκιά	Περίπου 5 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου (Ν. Ευρώπη, Β. Αφρική και Τουρκία)
Cistus ladanifer (Gum Rock Rose)	2 m και άνω ύψος & 1-1,25 m πλάτος	-18°C έως -12°C	Πλήρη ήλιο	Περίπου 5 μήνες	Λεκάνη της Μεσογείου (Ν. Γαλλία, Ισπανία, Πορτογαλία και Β. Αφρική)

### 1.2.3 Λάβδανο, ρητίνη

Ρητίνες ονομάζονται οι κολλώδεις φυτικές εκκρίσεις που σκληραίνουν όταν εκτίθενται στον αέρα. Οι ρητίνες έκαναν την εμφάνιση τους σχετικά νωρίς στην εξέλιξη των δέντρων, όπως αυτό επιβεβαιώνεται από την απολιθωμένη μορφή τους, το κεχριμπάρι. Σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα τα δέντρα παράγουν άφθονες ποσότητες ρητίνης και αυτό έχει υψηλό ποσοστό συσχέτισης με την ανάγκη των δέντρων για προστασία από φυτοφάγα ζώα και μικροοργανισμούς (Langenheim et al., 1990). Στον κιστό η ρητίνη εκκρίνεται από τα φύλλα και κυρίως τα φουντωτά, αστρικά και επιμήκη τριχώματα όλων των ειδών του, κυρίως τις ζεστές εποχές. Η ρητίνη αυτή έχει σκούρο καφέ χρώμα, με άρωμα ξυλώδους κεχριμπαριού και είναι μια παχύρρευστη κολλώδης μάζα ή ένα εύθραυστο στερεό με την ονομασία *ladanum*, *labdanum* ή *ladano* (λάβδανο) (Εικόνα 3). Αποτελείται κυρίως από φλαβονοειδή (ως αγλυκόνες και γλυκοσίδες), προ-ανθοκυανιδίνες, τερπενοειδή (διτερπένια τύπου *labdane*), πολυφαινόλες και τανίνες, τα οποία συμβάλλουν στο αρωματικό και χημικό προφίλ του είδους αυτού (Bouama et al., 2006; Skorčić et al., 2012; Thanos et al., 1992; Aronne and Micco, 2001; Guzmán and Vargas, 2005; Guzmán and Vargas, 2010; Abu-Orabi et al., 2020). Από τα πρώτα χρόνια οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν τις ρητίνες για διάφορους σκοπούς και είχαν μεγάλη εκτίμηση για αυτές (Langenheim et al., 1990). Στην αρωματοποιία, έχει αξιοποιηθεί για τις κολλώδεις ιδιότητές του, καθιστώντας τη ιδανική για την καύση θυμιαμάτων και άλλων προϊόντων. Στα καλλυντικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μάσκες, προϊόντα για ντεμακιγιάζ και κρέμες (Alves-Ferreira et al., 2022).



Εικόνα 3: Λάβδανο, ρητίνη

Πηγή:

<https://botano.gr/el/products/cretan-labdanum-resin-cistus-creticus-ssp-incanus>

#### 1.2.4 Σύσταση/χημικό προφίλ κιστού

Το συγκεκριμένο φυτό διακρίνεται για την ποικιλία των φαινολικών ενώσεών του, με κυριότερα τα φλαβονοειδή και τις ταννίνες. Στα εκχυλίσματά του εντοπίζονται παράγωγα της φλαβονόλης, όπως η μυρικετίνη, η κερσετίνη, η καμφερόλη και οι γλυκοσίδες τους, όπως η μυρικιτρίνη, η κουερσιτρίνη, η υπεροσίδη και η τιλιοζίδη. Οι μη φλαβονοειδείς πολυφαινόλες στο *C. incanus* περιλαμβάνουν ταννίνες, όπως οι προανθοκυανιδίνες (γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες) και οι υδρολύομενες ταννίνες, κυρίως εστέρες γλυκόζης με εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ. Οι ελλαγιταννίνες, όπως η πουνικαλίνη, η πουνικαλαγίνη, η τερφλαβίνη Α και η σιστουσίνη είναι σημαντικά συστατικά που βρίσκονται στο εκχύλισμα νερού του *C. incanus* και σε άλλα εκχυλίσματα. Τα φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ και μικρότερες ποσότητες πρωτοκατεχουικού, π-κουμαρικού, χλωρογενικού και ελλαγικού οξέος, αποτελούν μια καλά μελετημένη μικρή ομάδα φαινολικών ενώσεων.

#### 1.2.5 Ιδιότητες και οφέλη στην υγεία του ανθρώπου

Τα είδη του γένους *Cistus* χρησιμοποιούνται ευρέως σε παραδοσιακά φάρμακα λόγω των ιδιοτήτων τους (Bouamama et al., (2006). Έχει χρησιμοποιηθεί για αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντισπασμωδικές, αντιελκωτικές, επουλωτικές και αγγειοδιασταλτικές θεραπείες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το *Cistus incanus*, που προέρχεται από τοπικούς φυτικούς πόρους, έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιδιαβητικός παράγοντας στο Μαρόκο.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα διτερπένια τύπου labdane έχουν διάφορες αντιφλεγμονώδεις, ρυθμιστικές και βιολογικές δράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως οι ισχυρές αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες εναντίων πολλών βακτηρίων και μυκήτων που ευθύνονται για ανθρώπινες λοιμώξεις. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορα διτερπένια labdane που προέρχονται από το *Cistus* έχουν κυτταροτοξική δράση κατά κυτταρικών γραμμών λευχαιμίας και καρκίνου, ενώ επηρεάζουν βιοχημικές οδούς και την έκφραση πρωτοογκογονιδίων. Οι πολυφαινόλες και ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή, που είναι παρούσες στα φυτά, θεωρούνται ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και

αντικαρκινογόνες δραστηριότητες (Abu-Orabi et al., 2020; Skorić et al., 2012; Lahcen et al., 2020).

Σε πρόσφατη εργασία, η επίδραση του *C. incanus* στο COVID-19 έχει επίσης διερευνηθεί. Πέρυσι, οι Kuchta και συν. (Kuchta et al., 2021) απέδειξαν ότι η συστηματική χορήγηση έγχυσης νερού *C. incanus* μείωσε τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες και της δυσλιπιδαιμίας, βελτιώνοντας το λιπιδικό προφίλ, αυξάνοντας τη συγκέντρωση HDL-C και μειώνοντας τα επίπεδα τριακυλογλυκερόλης, μηλονδιαλδεϋδης ορού και προϊόντων προηγμένης πρωτεΐνης οξείδωσης (AOPP) (Bernacka et al., (2022); Bouamama et al., 2006). Εκχυλίσματα και δραστικές ενώσεις που απομονώθηκαν από το συγκεκριμένο είδος αποδείχτηκε ότι διαθέτουν πολλές πολύτιμες ιδιότητες και για την προστασία του δέρματος. Το έγχυμα χρησιμοποιήθηκε στην παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση διαφόρων δερματικών παθήσεων, χάρη του αντιφλεγμονώδους δυναμικού τους (Gawel-Beben et al., 2020).

Οι Kalus και συν. (2009) πραγματοποίησαν την πρώτη κλινική δοκιμή με προοπτικό, ελεγχόμενο με εικονικό φάρμακο τρόπο, για να αξιολογήσουν την αποτελεσματικότητα του *Cistus incanus* στη θεραπεία των λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος. Έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες ότι οι πολυφαινόλες που προέρχονται από φυτά μπορούν να δεσμεύουν και να αδρανοποιούν ιούς και βακτήρια μέσω φυσικών και μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Η επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και η διγαλλική θεαφλαβίνη, δύο πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους που απαντώνται ευρέως στα φυτά, έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με την αιμοσυγκολλητίνη του ιού της γρίπης και έτσι εμποδίζουν την μολυσματικότητά του. Είναι γνωστό ότι το *Cistus* περιέχει κυρίως πολυμερικές πολυφαινόλες, οι οποίες φαίνεται να δεσμεύουν παθογόνα και με αυτόν τον τρόπο να αναστέλλουν τη διείσδυσή τους στα ανθρώπινα κύτταρα (Kalus et al., 2009).

Οι ιογενείς λοιμώξεις συνιστούν σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία λόγω της ταχείας εξάπλωσής τους. Ορισμένες από τις πιο επικίνδυνες ιογενείς λοιμώξεις περιλαμβάνουν το AIDS, τη γρίπη και το SARS. Για παράδειγμα, η γρίπη ευθύνεται για περισσότερα από 3 εκατομμύρια νέα κρούσματα ασθένειας και από 300.000 έως 500.000 θανάτους ετησίως. Η αύξηση των ασθενών με ιογενείς λοιμώξεις προκαλεί ανησυχία, με την πανδημία του COVID-19 να έχει μολύνει περίπου 141 εκατομμύρια

άτομα και να έχει προκαλέσει 3,1 εκατομμύρια θανάτους (σύμφωνα με τον ΠΟΥ, 21/04/2021).

Η θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων είναι δύσκολη λόγω της προσαρμοστικότητας των ιών, της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, του υψηλού κόστους των θεραπειών, των παρενεργειών των φαρμάκων και της αντοχής των ιών στα αντικά φάρμακα. Τα φυτικά φάρμακα έχουν αποκτήσει αυξανόμενη σημασία λόγω της φυσικής τους προσαρμοστικότητας, του χαμηλού κόστους και των περιορισμένων παρενεργειών. Στην περίπτωση του φυτού *Cistus*, η περισσότερη έρευνα έχει διεξαχθεί στην Ελλάδα και την Τουρκία.

### **1.3 Θαλάσσια λιβάδια ή Ωκεάνιος**

#### **1.3.1 Ιστορική αναδρομή**

Τα θαλάσσια λιβάδια αναπτύσσονται σε αμμώδεις βυθούς, σχηματίζοντας πυκνές κοινότητες φυτών. Παρά την πλούσια θαλάσσια ζωή, τα θαλάσσια λιβάδια αποτελούν μόλις το 0,02% της συνολικής θαλάσσιας βιομάζας. Τα λιβάδια αυτά, που καλύπτουν περίπου 600.000 km<sup>2</sup> των θαλασσών, είναι διαδεδομένα σε περιοχές όπου ποτάμια εκβάλλουν στις θάλασσες σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά δεν υπάρχουν στην Ανταρκτική. Αυτά τα λιβάδια έχουν αναπτύξει μεγάλη αντοχή σε ακραίες θερμοκρασίες και έχουν αναπτύξει ένα σύστημα που μεταφέρει οξυγόνο για να αντιμετωπίζουν τα ιζήματα που περιέχουν τοξικές ουσίες. Είναι κρίσιμης σημασίας για τα παράκτια οικοσυστήματα καθώς προσφέρουν μεγάλη παραγωγικότητα, τρέφουν διάφορα είδη, παρέχουν οξυγόνο στα ιζήματα και ανακυκλώνουν θρεπτικά συστατικά. Ζουν κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας και παίρνουν τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία από τα ιζήματα μέσω των ριζών ή του νερού μέσω των φύλλων. Το οξυγόνο προμηθεύεται μέσω ενός συστήματος καναλιών και διαχέεται μέσω της ροής του νερού. Στην Ευρώπη συναντώνται μόνο 4 είδη θαλάσσιων λιβαδιών μεταξύ των οποίων και το *Posidonia Oceanica*. Τέλος, πρόκειται για το κυρίαρχο ενδημικό είδος βλάστησης στην περιοχή της Μεσογείου, καλύπτοντας τεράστιες εκτάσεις έως και 60 μέτρα βάθος.

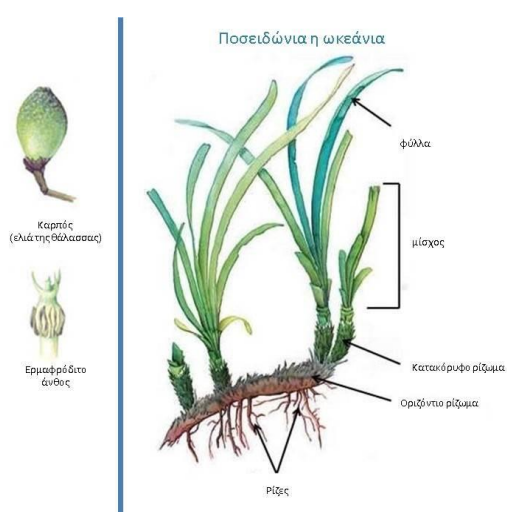
Στην αρχαιότητα, οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν το θαλάσσιο φυτό για θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά και ως καλλυντικό. Στο Μεσαίωνα, η χρήση του *Posidonia oceanica* αποσκοπούσε στην θεραπεία ασθενειών του δέρματος και των

αρθρώσεων. Ωστόσο, οι σύγχρονες εφαρμογές το καθιστούν ένα δημοφιλές συστατικό σε πολλά προϊόντα περιποίησης δέρματος και μαλλιών. Συνοψίζοντας, πλήθος επιστημονικών μελετών έχει αναδείξει ότι το *Posidonia oceanica* είναι πλούσιο σε βιολογικά δραστικά συστατικά, όπως αμινοξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και μέταλλα, τα οποία αυτομάτως του προσδίδουν θρεπτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

### 1.3.2 Βοτανική περιγραφή-προέλευση

Το *P. oceanica* είναι το πιο αναπαραγώγιμο είδος στη Μεσόγειο θάλασσα, γεγονός που δικαιολογεί γιατί το εν λόγω φυτό ευημερεί σε θερμοκρασίες 13-26 °C. Το μήκος του ριζώματος του μπορεί να φτάσει τα 156 cm για αυτό και έχει ρίζες που αναπτύσσονται κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος. Τα φύλλα ζουν 5 έως 8 μήνες και έχουν πλάτος μικρότερο των 5 cm. Η άνθιση πραγματοποιείται όταν υπάρχει ζέστη και διαφοροποιείται ανάλογα με το βάθος του νερού.

Η ανάπτυξη του θαλάσσιου λιβαδιού *P. oceanica* επηρεάζεται σημαντικά από 3 παράγοντες, οι οποίοι είναι το φως, η θερμοκρασία και η αλμυρότητα. Αναλυτικότερα, το φως μειώνεται όσο αυξάνεται το βάθος, πράγμα που επηρεάζει την φωτοσύνθεση του φυτού. Το ποσοστό της αλμυρότητας, δηλαδή πόσα άλατα είναι διαλυμένα στη θάλασσα, επιδρά στην αλατότητα των θαλασσών και κατά συνέπεια μεταβάλλει την ωσμωτική πίεση στα κύτταρα του φυτού. Τέλος, τα λιβάδια αναπτύσσονται σε θερμά περιβάλλοντα με ακραίες θερμοκρασίες (Πίνακας 3).



Εικόνα 4: *Posidonia oceanica*

Πηγή:

<https://medposidonianetwork.com/biology/>

Πίνακας 3: *Posidonia oceanica* Βοτανική προέλευση  
 Πηγή: [https://kepea-syrou.kyk.sch.gr/wp-content/uploads/2022/11/PosidoniaOceanica\\_ErgastiriaDexiotiton\\_KepeaSyrou.pdf](https://kepea-syrou.kyk.sch.gr/wp-content/uploads/2022/11/PosidoniaOceanica_ErgastiriaDexiotiton_KepeaSyrou.pdf)

Επίσημη ονομασία	<i>Posidonia oceanica</i>
Γνωστό και ως	«Γρασίδι του Ποσειδώνα» ή πιο απλά Ποσειδωνία. Οι ψαράδες την αποκαλούν «φυκιάδα»
Που βρίσκεται	Φύεται μόνο στη Μεσόγειο θάλασσα (ενδημικό)
Βάθος	Αναπτύσσεται σε εκτεταμένα λιβάδια, και σε βάθη από 1 έως ~ 40μ.
Φύλλα-Ρίζες	Τα καταπράσινα φύλλα της μοιάζουν με κορδέλες και φθάνουν σε μήκος το 1,2 μ., ενώ οι ρίζες της εισχωρούν βαθιά στον πυθμένα, σχηματίζοντας ένα πολύπλοκο δικτυωτό πλέγμα
Ανάπτυξη	Για να δημιουργηθεί ένα μόνο μέτρο χαμένης Ποσειδωνίας, χρειάζεται περίπου έναν αιώνα!
Εποχές	Ανθίζει το φθινόπωρο και την άνοιξη αποδίδει καρπούς. Αυτά τα φρούτα επιπλέουν στην επιφάνεια και είναι γνωστά ως ελιές της θάλασσας.
Κατάσταση	Απειλούμενο είδος



### 1.3.3 Σύσταση/χημικό προφίλ

Σύμφωνα με πολλές μελέτες η *Posidonia oceanica* αποτελεί πλούσια πηγή δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως αντιπροσωπευόμενων από φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αυτοπροστασία των φυτών από το φωτοσυνθετικό στρες, τις αντιδράσεις οξυγόνου, τις ανθρωπογενείς πιέσεις, τους θηρευτές και τα παθογόνα. Το κιχορικό οξύ επισημαίνεται ως το κύριο συστατικό των φύλλων της *P. oceanica*. Ωστόσο, τα φύλλα της *P. oceanica* περιέχουν επίσης άφθονο καφταρικό, γεντισικό, χλωρογενικό, καφεϊκό, φερουλικό, κινναμικό, γαλλικό και p-κουμαρικό οξύ. Επιπλέον, η κουερσετίνη, η μυρικετίνη, η καμφερόλη και η ισοραμεντίνη βρέθηκαν στο διαιθυλικό στρώμα ενός διαλύματος υδροχλωρικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση από τα φύλλα της *P. oceanica*, και ήταν οι πιο αντιπροσωπευτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών.

Άλλα φαινορικά παράγωγα καταγράφηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα φύλλων της *P. oceanica*, συμπεριλαμβανομένων των φλωρογλουκινόλης, πυροκατεχόλης, πυρογαλλόλης, βανιλίνης αλδεϋδης, 4-υδροξυβενζαλδεϋδης, 3,4-διυδροξυβενζαλδεϋδης, βενζοϊκού οξέος, p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, p-ανισικού οξέος, βανιλικού οξέος, συριγγικού οξέος, προανθοκυανιδινών και καλχονών (όπως η φλωρετίνη και η φλωριδζίνη). Η παρουσία μακράς αλύσου λιπαρών οξέων στο θαλάσσιο φυτό *P. oceanica* είναι ένα άλλο διακριτικό χαρακτηριστικό. Η λιπιδική κλάση των εκχυλισμάτων φύλλων της *P. oceanica* βρέθηκε να αποτελείται κυρίως από παλμιτικό, παλμιτολεϊκό, ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ, καθώς και από τα φυτοστεροειδή καμπεστερόλη, σιγμαστερόλη, και β-σιτοστερόλη. Η λιγνίνη που προέρχεται από πολυφαινόλες βρέθηκε να υπάρχει σε όλους τους φυτικούς ιστούς (Vasarrì et al., 2021).

### 1.3.4 Ιδιότητες και οφέλη στην υγεία του ανθρώπου

Εκτός από τις ποικίλες χρήσεις στην ανθρώπινη δραστηριότητα, η *P. oceanica* έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί και ως φαρμακευτικό φυτό για τη θεραπεία διάφορων ανθρώπινων παθήσεων. Οι αρχικές αναφορές για τις θεραπευτικές ιδιότητες της *P. oceanica* προέρχονται από την αρχαία Αίγυπτο, όπου φαίνεται να χρησιμοποιούνταν για πονόλαιμο και προβλήματα του δέρματος. Ένα παλιό βοτανολογικό εγχειρίδιο

αναφέρει επίσης την *P. oceanica* ως δημοφιλές προϊόν φαρμακοποιίας. Έχει επίσης καταγραφεί 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 κολίτιδα. Από την άλλη πλευρά, η παραδοσιακή χρήση της *P. oceanica* ως υλικό γεμίσματος για μαξιλάρια και στρώματα χρονολογείται από τον 16ο αιώνα, πιθανώς με σκοπό να προληφθούν αναπνευστικές λοιμώξεις και να ανακουφιστούν οι συνθήκες των ατόμων με φυματίωση. Τέλος, η χρήση αφεψήματος από φύλλα *P. oceanica* ως φυσικό φάρμακο για τον διαβήτη και την υπέρταση από κατοίκους παράκτιων περιοχών αποτελεί μια πιο πρόσφατη παράδοση. Με μια ιστορία 120 εκατομμυρίων ετών ως "βασίλισσα των θαλασσών", η *P. oceanica* έχει αποδειχθεί πολύτιμη για τη φροντίδα της ανθρώπινης υγείας (Vasarri et al., 2021).

## **1.4 Ανάλυση μικροβιολογικού προφίλ μικροοργανισμών**

### **1.4.1 Μικροοργανισμοί**

Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν παντού γύρω μας και η παρουσία τους στα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς τα τρόφιμα αποτελούν κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξή τους. Όπως όλοι οι οργανισμοί, έτσι και οι μικροοργανισμοί, επιδιώκουν τη διαίωσιση του είδους τους. Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί για να επιτύχουν αυτό, μετατρέπουν την οργανική ύλη σε ενέργεια και ανόργανες ενώσεις (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Τα τρόφιμα, πλούσια σε οργανική ύλη, επιτρέπουν στους μικροοργανισμούς να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται. Ανάλογα με το αποτέλεσμα που επιφέρουν στα τρόφιμα, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διακριθούν σε παθογόνους, αλλοιογόνους και ωφέλιμους. Είναι προφανές ότι οι παθογόνοι και οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ανεπιθύμητοι στα τρόφιμα, και γι' αυτό γίνονται μεγάλες προσπάθειες για την παραγωγή τροφίμων χωρίς την παρουσία τους. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η δράση εκχυλισμάτων χαρουπιού κατά των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις μέσω της κατανάλωσής τους. Οι τροφικές δηλητηριάσεις διακρίνονται σε τροφοτοξινώσεις και τροφολοιμώξεις. Οι τροφοτοξινώσεις προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τοξικές ουσίες, οι οποίες είτε προστέθηκαν στα τρόφιμα είτε είναι προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Οι τροφολοιμώξεις

προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μικροοργανισμούς, οι οποίοι προσβάλλουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016).

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών έχει σοβαρό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία, γι' αυτό έχουν καθοριστεί αυστηρά όρια για την παρουσία τους στα τρόφιμα. Ένα αρνητικό χαρακτηριστικό των παθογόνων μικροοργανισμών είναι ότι, σε αντίθεση με τους αλλοιογόνους που δίνουν εμφανή οργανοληπτικά σημάδια για την παρουσία τους, συχνά δεν προειδοποιούν τους καταναλωτές. Αυτό μπορεί να συμβεί μόνο όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, κάτι που είναι σπάνιο.

Για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών, έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις στην επεξεργασία, τη συντήρηση, τη συσκευασία και τη διακίνηση των τροφίμων. Παρ' όλα αυτά, ο αριθμός των τροφικών δηλητηριάσεων έχει αυξηθεί, κυρίως λόγω της αύξησης στην κατανάλωση τροφίμων που έχουν υποστεί ήπια επεξεργασία και λόγω της βελτίωσης των διαγνωστικών μεθόδων, που παρέχουν μια πιο ακριβή εικόνα του προβλήματος (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Είναι επομένως επιτακτική η ανάγκη αντιμετώπισης της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα.

#### **1.4.2 Κατηγοριοποίηση βακτηρίων με βάση τη χρώση Gram**

Η χρώση κατά Gram κατατάσσει τα βακτήρια σε Gram θετικά και Gram αρνητικά ανάλογα με την δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος. Αρχικά, τα δείγματα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες και ιώδιο, κατόπιν ξεπλένονται με αιθυλική αλκοόλη και τέλος βάφονται με μια κόκκινη χρωστική, όπως είναι η σαφρανίνη. Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου καθορίζει το χρώμα που θα προκύψει από τη χρώση. Αναλυτικότερα, τα θετικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη και παγιδεύει τη χρωστική κρυσταλλικό ιώδες στο κυτταρόπλασμα. Η πλύση με αιθυλική αλκοόλη δεν αφαιρεί τη χρωστική, η οποία δεν αφήνει να φανεί η σαφρανίνη, η κόκκινη χρωστική που προστίθεται στη συνέχεια. Αντιθέτως, η στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο λεπτή και εντοπίζεται μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μιας εξωτερικής μεμβράνης. Η χρωστική κρυσταλλικό ιώδες σε αυτή την περίπτωση ξεπλένεται εύκολα από το κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα στο μικροσκόπιο το κύτταρο να φαίνεται ροζ ή κόκκινο.

Στα θετικά κατά Gram βακτήρια εντάσσονται ο *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια κατατάσσονται η *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

### 1.4.3 Θετικά κατά Gram βακτήρια

#### 1. *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα Gram-θετικό βακτήριο που έχει την μορφή κόκκου και εμφανίζεται μόνο του, σε ζευγάρια ή σε ομάδες που θυμίζουν τσαμπί από σταφύλια. Παράγει μια καροτενοειδή χρωστική, η οποία προσδίδει χρυσαφί χρώμα στις αποικίες, όπου και προκύπτει το όνομα του (*aureus*) που σημαίνει χρυσός. Είναι προαιρετικά αναερόβιο, ακίνητο, δεν σχηματίζει σπόρους και είναι θετικό στην καταλάση και την κοαγκουλάση. Ο *S. aureus* μπορεί να βρεθεί στα ρουθούνια, στο δέρμα και στα μαλλιά των θερμόαιμων ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (7-48,5 °C με βέλτιστη στους 30–37 °C), pH (από 4,2 έως 9,3 με βέλτιστη τιμή από 7 έως 7,5) και συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (έως 15% NaCl) (Πίνακας 4). Λόγω των συνθηκών ανάπτυξής του, διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ασφάλεια των τροφίμων, ειδικά αυτών που χρειάζονται επεξεργασία κατά την παρασκευή τους. Ο *S. aureus* μπορεί να παράγει πολλούς παράγοντες παθογένειας, όπως τοξίνες, διεισδυτικότητα και αντοχή στα αντιβιοτικά, προκαλώντας μια ποικιλία συμπτωμάτων από μικρά αποστήματα έως σύνδρομο τοξικού σοκ, ανάλογα με τους συνδυασμούς αυτών των παραγόντων. Αντίθετα, η τροφική δηλητηρίαση από *S. aureus* (SFP) οφείλεται σε έναν μόνο παράγοντα παθογένειας, τις εντεροτοξίνες (SEs) (Grispoldi et al., 2021).

#### 2. *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένας Gram-θετικός, προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, ο οποίος είναι κινητός σε θερμοκρασίες από 22 έως 28°C αλλά χάνει την κινητικότητά του πάνω από τους 30°C. Μπορεί να αναπτυχθεί σε

θερμοκρασίες που κυμαίνονται από - 0,4°C έως 45°C, με την ιδανική θερμοκρασία να είναι στους 37°C. Επιπλέον, μπορεί να επιβιώσει σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας ύδατος  $a_w < 0,90$  και σε ευρύ φάσμα pH, από 4,6 έως 9,5, καθώς και να αντέξει αλατούχα περιβάλλοντα με συγκεντρώσεις αλατιού έως και 20% (Πίνακας 4). Αυτές οι ικανότητες επιτρέπουν στο βακτήριο να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, που συχνά υπάρχουν στις μονάδες παραγωγής τροφίμων. Ως εκ τούτου, η *L. monocytogenes* είναι ένας σημαντικός παθογόνος μικροοργανισμός που μεταδίδεται μέσω των τροφίμων και προκαλεί την ασθένεια λιστερίωση. Η λιστερίωση μπορεί να εμφανιστεί είτε ως μεμονωμένες περιπτώσεις είτε ως επιδημίες, με ένα σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας που κυμαίνεται μεταξύ 20-30% παγκοσμίως (Osek et al., 2022)

### 3. *Enterococcus faecalis*

Ο *Enterococcus faecalis* ανήκει σε μια ομάδα μικροοργανισμών γνωστών ως βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB). Είναι Gram-θετικοί, μη σπορογόνοι, αρνητικοί στην καταλάση και οξειδάση, προαιρετικά αναερόβιοι και εμφανίζονται μεμονωμένοι, σε ζεύγη ή σε αλυσίδες. Αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασία 35°C, αν και τα περισσότερα είδη του γένους μπορούν να επιβιώσουν σε εύρος θερμοκρασιών από 10 έως 45°C. Μπορούν επίσης να εξελιχθούν σε περιβάλλοντα με 6,5% NaCl, σε pH 9,6, και να αντέξουν θέρμανση στους 60°C για 30 λεπτά (Πίνακας 4). Υπάρχουν, ωστόσο, ορισμένες εξαιρέσεις, όπως οι *E. dispar* και *E. sulfureus*, *E. malodoratus* και *E. Moraviensis*, που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες άνω των 45°C. Επιπλέον, οι *E. cecorum* και *E. columbae* δεν μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C. Τα είδη *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* και *E. columbae* παρουσιάζουν περιορισμένη ή καθόλου ανάπτυξη σε περιβάλλοντα με 6,5% NaCl. Οι εντερόκοκκοι είναι από τα πιο συχνά νοσοκομειακά παθογόνα και έχουν αναγνωριστεί ως σημαντική αιτία ενδοκαρδίτιδας, βακτηριαμίας, λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεων του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενδοκοιλιακών και πυελικών λοιμώξεων, καθώς και αντοχής σε πολλαπλά αντιβιοτικά (Moreno et al., 2006).

Πίνακας 4: Μικροβιολογικά προφίλ θετικών κατά Gram βακτηρίων

ΓΕΝΟΣ	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Staphylococcaceae	Listeriaceae	Enterococcaceae
ΤΥΠΟΣ	Gram θετικά		
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	Τοξίνες/ εντεροτοξίνες (λοίμωξη)	Λυστερίωση	Λοίμωξη
ΑΝΤΟΧΗ	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά	Ανθεκτικότητα σε πολλαπλά αντιβιοτικά
ΙΔΑΝΙΚΟ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟ ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	30°C-37°C	37°C	35°C
ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ pH	4,2-9,3 με βέλτιστη τιμή από 7-7,5	4,6-9,5	9,6

#### 1.4.4 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

##### 1. *Salmonella enterica*

Πρόκειται για ένα βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που αναπτύσσεται συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλά ποσοστά υγρασίας. Ορισμένοι τύποι του βακτηρίου αυτού συχνά εντοπίζονται σε ακατέργαστα τρόφιμα, όπως τα αυγά, το νωπό κοτόπουλο, γεγονός που τα καθιστά μία από τις συνηθέστερες αιτίες τροφικών δηλητηριάσεων. Ωστόσο, η *S. enterica* αναπτύσσεται ιδανικά σε ουδέτερες έως ελαφρώς αλκαλικές τιμές pH, καθώς και σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες μεταξύ 37°C και 45°C (Πίνακας 5). Τέλος, είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, χαρακτηριστικό που τον καθιστά επικίνδυνο παράγοντα για την ανθρώπινη υγεία.

##### 2. *Escherichia coli*

Ο εν λόγω μικροοργανισμός της οικογένειας *Enterobacteriaceae* εντοπίζεται συχνά στο πεπτικό σύστημα των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Αν και ορισμένοι τύποι του *E. coli* είναι αβλαβείς και συγχρόνως απαραίτητοι για την καλή υγεία του εντέρου, άλλοι είναι ικανοί να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις. Ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης για το *E. coli* καθίστανται το ουδέτερο περιβάλλον pH 6,5-7,5 και θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 37°C και 45°C (Πίνακας 5). Ακόμη, αυτό μπορεί να αναπτυχθεί είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου, δηλαδή είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Η επαφή του *E. coli* με φυσικά ύδατα ή μολυσμένα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει σε λοίμωξη, με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο βακτήριο να αποτελεί σοβαρή πηγή κινδύνου για την υγεία του ανθρώπου.

### 3. *Klebsiella pneumoniae*

Το συγκεκριμένο βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae* συναντάται συχνά στο πεπτικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Μερικοί από τους τύπους της είναι αβλαβείς, άλλοι προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, κατ' εξοχήν σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή ή με άλλες υποκείμενες παθήσεις. Οι βέλτιστες συνθήκες επώασής της είναι το ουδέτερο περιβάλλον pH 7-8 και θερμοκρασίες περίπου στους 37°C (Πίνακας 5). Επίσης, δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή απουσία οξυγόνου, διότι είναι και αυτό προαιρετικά αναερόβιο. Η μετάδοση της *Klebsiella pneumoniae* συνήθως πραγματοποιείται μέσω επαφής με μολυσμένα υγρά, όπως τα αναπνευστικά εκκρίματα ή τα απόβλητα, και μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας.

### 4. *Pseudomonas aeruginosa*

Πρόκειται για ένα βακτήριο, το οποίο εντοπίζεται στο περιβάλλον, δηλαδή στο έδαφος, τα ύδατα και τα φυτά. Ωστόσο, μπορεί να μην βλάψει υγιείς ανθρώπους, αλλά είναι δυνατόν να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις σε ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, με εκτεταμένα εγκαύματα ή νοσηλευόμενους στην εντατική. Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* αναπτύσσεται ιδανικά σε ουδέτερο περιβάλλον pH 6-7 και σε εύρος θερμοκρασιών από περίπου 4°C έως 42°C, παραμένοντας ανεπηρέαστο από την παρουσία ή απουσία οξυγόνου, αφού είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο

(Πίνακας 5). Όσον αφορά τη μετάδοση αυτού προκαλείται μέσω της επαφής με μολυσμένα νερά, τρόφιμα ή τραύματα και μπορεί να προκαλέσει μία σειρά από λοιμώξεις, όπως ουρολοιμώξεις, πνευμονίες και επιπλοκές των εγκαυμάτων.

Πίνακας 5: Μικροβιολογικά προφίλ αρνητικών κατά Gram βακτηρίων

ΓΕΝΟΣ	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	<i>Enterobacteriaceae</i>			
ΤΥΠΟΣ	Gram αρνητικά			
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	Διατροφικές λοιμώξεις (σαλμονέλλωση)	Εντερολοιμώξεις	Αναπνευστικές και ουροποιητικές λοιμώξεις	Αναπνευστικές λοιμώξεις
ΑΝΤΟΧΗ	Επιβίωση σε τρόφιμα και νερό	Ορισμένοι τύποι σε αντιβιοτικά	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά
ΙΔΑΝΙΚΟ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟ ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	37°C-42 °C	37 °C	20 °C-40 °C	25 °C-37 °C
ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ pH	4,0-9,0	6,5-7,5	7,0-8,0	6,0-7,0

#### 1.4.5 Μύκητας: *Candida albicans*

Η *Candida albicans* ανήκει στην οικογένεια Cryptococcaceae της διαίρεσης Deuteromycota. Δεν σχηματίζει σπόρια και αναπαράγεται με εκβλάστηση. Ως ζύμη, μπορεί να θεωρηθεί ασήμαντη, καθώς αποτελεί μικρό μέρος του αρχικού μικροβιακού φορτίου και αναπτύσσεται πιο αργά σε σύγκριση με τα περισσότερα βακτήρια. Ωστόσο, έχει τη δυνατότητα να ευδοκιμεί σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH, από 2 έως 10 (Davis 2003). Ένα θετικό χαρακτηριστικό είναι ότι η ανάπτυξη των ζυμών προκαλεί ανεπιθύμητες μεταβολές στις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων, οι οποίες μπορούν να γίνουν αντιληπτές από τους καταναλωτές μέσω της όρασης ή της οσμής



(Τυμπής, Πετράκης, Κοντελής 2016). Το γένος *Candida* δημιουργεί αποικίες με χρώμα κρεμ ή κιτρινωπό και με υφή που μπορεί να είναι κολλώδης, λεία, ξηρή, ζαρωμένη ή θαμπή, ανάλογα με το είδος. Χαρακτηριστικό αυτού του γένους είναι η γρήγορη ανάπτυξή του, καθώς ωριμάζει μέσα σε 3 ημέρες. Πηγές της *Candida* μπορούν να θεωρηθούν το περιβάλλον, ο άνθρωπος και τα θηλαστικά (Samadi et al. 2019). Στα τρόφιμα, εμφανίζεται πιο συχνά στον κιμά και στα πουλερικά (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2016). Ένα σημαντικό παράδειγμα των αρνητικών επιπτώσεων της *Candida albicans* είναι οι στοματικές λοιμώξεις. Μελέτες δείχνουν ότι αυτή η ζύμη μπορεί να συμβάλει στην εμφάνιση προκαρκινικών καταστάσεων στο στόμα και απομονώνεται σε ποσοστό 80% από όλες τις μορφές ανθρώπινης καντιντίασης (Samadi et al. 2019).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 2. Πειραματικό

### 2.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Ο προσδιορισμός τόσο του βιοχημικού προφίλ όσο και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων για τα φυτικά εκχυλίσματα των *Cistus spp.* και *Posidonia oceanica* αποτελούσε από το παρελθόν αντικείμενο μελέτης. Τα φυτικά εκχυλίσματα από το παρελθόν μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί εμπεριστατωμένα, κυρίως για τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6), μετέπειτα από ενδελεχή έρευνα, αναφέρονται συνοπτικά δημοσιεύσεις, σχετιζόμενες με την ανάλυση του χημικού προφίλ των συγκεκριμένων φυτικών εκχυλισμάτων, αλλά και των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων.

Πίνακας 6: Πειράματα και μέθοδοι που σχετίζονται με το βιοχημικό προφίλ και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων *Cistus spp.* και

*P.oceanica*

	Αναλύσεις	Μέθοδοι / Σκοπός	Αναφορά
<i>Cistus spp.</i>	Μελέτη του φαινολικού προφίλ σε εκχύλισμα από φύλλα <i>Cistus salviifolius L.</i>	Προκαταρτική ταυτοποίηση των σύνθετων πολυφαινολών • Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC-DAD, HPLC-MS	Simultaneous LC-DAD and LC-MS Determination of Ellagitannins, Flavonoid Glycosides, and Acyl-Glycosyl Flavonoids in <i>Cistus salviifolius L.</i> Leaves E. Saracini, M. Tattini, M. L. Traversi, F. F. Vincieri, P. Pinelli (2005).

<p>Αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης υδατικών εκχυλισμάτων του <i>Cistus populifolius</i> και <i>Cistus ladanifer</i></p>	<p>Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC για <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Escherichia coli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέθοδος μικρόπλακας</li> </ul>	<p>Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. Barrajón-Catalán, E.; Fernández-Arroyo, S.; Saura, D.; Guillén, E.; Fernández-Gutiérrez, A.; Carretero, A.S.; Micol, V. (2010)</p>
<p>Μελέτη αντιμυκητιακής δράσης για το αιθανολικό εκχύλισμα <i>Cistus crencia</i></p>	<p>Προσδιορισμός ανασταλτικής δράσης έναντι του μύκητα <i>Candida albicans</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέθοδος διάχυσης σε τρυβλία Petri με την τεχνική της διασποράς</li> </ul>	<p>Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan <i>Cistus creticus</i> leaves. Lahcen, S. A., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., ... &amp; Zarrouk, A. (2020).</p>
<p>Αξιολόγηση αναστολής ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων σε εκχυλίσματα φύλλων <i>Cistus ladanifer</i></p>	<p>Υπολογισμός ποσοστού του δείκτη κυτταροτοξικότητας έναντι διαφόρων συγκεντρώσεων φυτικού εκχυλίσματος</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέθοδος MTT</li> </ul>	<p>Leaf Extracts of <i>Cistus ladanifer</i> Exhibit Potent Antioxidant and Antiproliferative Activities against Liver, Prostate and Breast Cancer Cells K. Bouthmany, M. Bourhia, N. Aoussar, M. Attaleb, A.M. Salamatullah, et al. (2022)</p>
<p>Μελέτη αντιικής δράσης του <i>Cistus incanus</i> κατά του HIV και του Filoviruses</p>	<p>Έρευνα ανασταλτικής δράσης του εκχυλίσματος έναντι απομονωμένων στελεχών HIV τύπου 1 και 2</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέθοδος MTT</li> </ul>	<p>Potent in vitro antiviral activity of <i>Cistus incanus</i> extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. Rebensburg, S., Helfer, M., Schneider, M. et al. (2016)</p>

<b>P.oceanica</b>	Μελέτη φαινολικού προφίλ του υδατικού εκχυλίσματος <i>Possidonia oceanica</i>	Ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων στο υδατικό εκχύλισμα <ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC-DAD</li> </ul>	Phytochemical analysis, in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of phenolic extracts from <i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile leaves. Abdelmohsen, M. M., Hassanein, H. D., Hassan, R. A., Abreu, A. C., Simões, M., Nazif, N. M., & Abou-Setta, L. M. (2016).
	Αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος <i>P. Oceanica</i>	Προσδιορισμός αντιβακτηριακής δράσης του εκχυλίσματος έναντι των βακτηρίων: <i>S. aureus</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabillis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. Coli</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέθοδος διάχυσης γραφείου</li> </ul>	Phytochemical analysis and Antibacterial activity of the 5 different extract from the seagrasses <i>Posidonia oceanica</i> . Berfad, M. A., & Alnour, T. M. (2014).
	Μελέτη αντιμυκητιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος <i>P. Oceanica</i> .	Προσδιορισμός της αντιμυκητιακής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος κατά του <i>Pythium spp.</i> και <i>Aspergillus flavus</i> . <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέθοδο δοκιμασίας αναστολής ανάπτυξης μυκήτων</li> </ul>	Preliminary phytochemical and antifungal studies of sea grass, <i>Posidonia oceanica</i> obtained from mediterranean sea of Libya. Berfad, M. A., Fahej, M. A. S., Kumar, A., & Edrah, S. (2015).
	Μελέτη <i>in vitro</i> κυτταροτοξικής επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων από φύλλα και ριζώματα του <i>P. oceanica</i> L.	Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δοκιμασία κυτταρικής καλλιέργειας και βιωσιμότητας</li> <li>• Δοκιμή αποκλεισμού του μπλε τρυπανιού</li> </ul>	In Vitro Cytotoxic Effect of Aqueous Extracts from Leaves and Rhizomes of the Seagrass <i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile on HepG2 Liver Cancer Cells: Focus on Autophagy and Apoptosis.

			Abruscato, G., Chiarelli, R., Lazzara, V., Punginelli, D., Sugár, S., Mauro, M., ... & Luparello, C. (2023).
--	--	--	--

## 2.2 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων δύο φυτικών εκχυλισμάτων, του *Cistus incanus* και *Posidonia oceanica*. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν η αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και κυτταροτοξική δράση των εν λόγω εκχυλισμάτων. Λαμβάνοντας υπόψιν τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, επιλέχθηκαν μέθοδοι που δεν επικεντρώνονται σε έναν συγκεκριμένο επιστημονικό κλάδο, με στόχο τη συσχέτιση διαφόρων παραμέτρων προκειμένου να εξαχθούν πολυδιάστατα αποτελέσματα. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό:

1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC-DAD για την ανάλυση φαινολικού προφίλ των εκχυλισμάτων.
2. Εκτίμηση αντιβακτηριακής και αντιμυκητιακής δράσης μέσω διάχυσης σε τρυβλία petri.
3. Εφαρμογή μεθόδου AlamarBlue για τον προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης.

Όλες οι παραπάνω αναλύσεις παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς στη σύγχρονη εποχή οι φαρμακοβιομηχανίες εστιάζουν ολοένα και περισσότερο στην απομόνωση φαινολικών ενώσεων, οι οποίες θα συμβάλλουν στη δημιουργία είτε ευεργετικών αφεψημάτων είτε φυτικών φαρμάκων προς όφελος της ανθρώπινης υγείας. Εξάλλου, πλήθος μελετών μέχρι τώρα επιβεβαιώνει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων λόγω του πλούσιου φαινολικού προφίλ που αυτά διαθέτουν.

## 2.3 Υλικά και μέθοδοι

Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται αναφορά στα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν, στον εξοπλισμό, στα αντιδραστήρια, στη μέθοδο εκχύλισης καθώς και στη μέθοδο προσδιορισμού της αντιμικροβιακής δράσης των επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων.

### 2.3.1 Αντιδραστήρια

Μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό HPLC και αιθανόλη (καθαρότητα  $\geq 99,9\%$ ) προμηθεύτηκαν από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Πρότυπες φαινολικές ενώσεις όπως ναρινγκενίνη, θυμόλη, καρβακρόλη, λουτεολίνη, κερσετίνη, καμφερόλη, απιγενίνη, απιγενιν-7-γλυκοσίδη, ρουτίνη, εριοδκτυλόλη, βανιλικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ,  $\pi$ -κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφενεζοϊκό οξύ, υδροβενζοϊκό οξύ, οξύ και χλωρογενικό οξύ αγοράστηκαν από την DR EHRENSTORFER GmbH (Augsburg, Γερμανία).

### 2.3.2 Φυτά

Για την δημιουργία των εκχυλισμάτων και την περαιτέρω μελέτη τους χρησιμοποιήθηκε το ξηρό υλικό της κουνούκλας (*Cistus incanus*) και της Ποσειδωνίας (*P. oceanica*). Η κουνούκλα προμηθεύτηκε από κατάστημα μπαχαρικών, ενώ η Ποσειδωνία συλλέχθηκε από ακτή του νησιού Ικαρίας.

### 2.3.3 Υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί επιστρώθηκαν σε τρυβλία με εκλεκτικά υποστρώματα σε θερμοκρασία 37°C. Κάποιες καλλιέργειες ήταν άμεσες και κάποιες επώαστηκαν για 24 ώρες, ώστε τα βακτήρια να βρίσκονται στην αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης.

### 2.3.4 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε:

- Ψυγείο (με κατάψυξη στους - 40 °C)
- Υάλινα ποτήρια ζέσεως των 250 mL
- Θερμαντική πλάκα
- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Συσκευή φυγοκέντρωσης
- Σωληνάκια τύπου erpendorf
- Κλίβανος
- Μικροπιπέτες (10 µl - 1000µl)
- Τρυβλία petri
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης

## 2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.4.1 Εκχύλιση με υπερήχους

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων UNITECH s.r.l (Vigonza, Italy), εξοπλισμένο με ψηφιακό χρονόμετρο, συχνότητα και ελεγκτή θερμοκρασίας και για τα δύο φυτά. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το νερό. Η εκχύλιση διήρκησε 90 λεπτά και η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε τους 75 °C. Μετά το πέρας της εκχύλισης ακολούθησε φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά και εξάτμιση του νερού σε θερμαντική πλάκα έως ότου λάβουμε συμπυκνωμένο εκχύλισμα. Τέλος, στο συμπυκνωμένο αυτό εκχύλισμα έγινε ανάλυση HPLC.

### 2.4.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC - DAD

Η ανάλυση HPLC διεξήχθη χρησιμοποιώντας σύστημα HPLC-UV (σύστημα VWR Hitachi Elite LaChrom, VWR, Darmstadt, Γερμανία) αποτελούμενο από αυτόματο δειγματολήπτη (L-2200), δυαδική αντλία (L-2130), φούρνο στήλης (L-2300) και ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (L-2455). Ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης SVEA C18 (150 mm × 4,6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 µm, Nanologica, Στοκχόλμη, Σουηδία), που 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) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η κινητή φάση αποτελούνταν από νερό με 1% μυρμηκικό



οξύ (A), μεθανόλη με 1% μυρμηκικό οξύ (B) και ακετονιτρίλιο με 1% μυρμηκικό οξύ (C). Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 90% A, 6% B, 4% C 0–5 min, 85% A, 9% B, 6% C 5–30 min, 71% A, 17,4% B, 11,6% C 30–60 min, 0% A, 85% B, 15% C 60–63 min, 90% A, 6% B, 4% C 63–65 min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20  $\mu\text{L}$  και τα φάσματα αντιπροσωπεύτηκαν στα 280 nm. Όλες οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν. Δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων με τη χρήση της HPLC-DAD.

#### **2.4.3 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο της διάχυσης σε εκλεκτικά υποστρώματα**

Πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του εκάστοτε εκχυλίσματος με τον κάθε μικροοργανισμό σε εύρος αναλογιών 1:3 έως 1:10 για το εκχύλισμα από Ποσειδωνία και 1:5 έως 1:10 για το εκχύλισμα της κουνούκλας. Στη συνέχεια, τα δείγματα εμβολιάστηκαν σε τρυβλία Petri με εκλεκτικά υποστρώματα για τον κάθε παθογόνο μικροοργανισμό. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων σε επωαστικό κλίβανο (ARGO LAB ICN 35) για 24 έως και 48 ώρες. Με αυτό τον τρόπο υπολογίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για καθένα από τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν.

#### **2.4.4 Δοκιμή κυτταροτοξικότητας**

Η βιοδοκιμή αναγωγής AlamarBlue®, η οποία βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου AlamarBlue® από κυτταρικά ένζυμα που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική οδό, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας των υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων που παρέχονται. Συγκεκριμένα,  $10^4$  ρεπλικόνια προστέθηκαν σε συνολικό όγκο 200  $\mu\text{L}$  θρεπτικού υλικού DMEM σε πλάκες με 96 φρεάτια. Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων, οι οποίες προέκυψαν από τη μέγιστη πρόσληψη νερού λόγω του φαινομένου της ώσμωσης στα κύτταρα (10% v/v). Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C (παρουσία 5% CO<sub>2</sub>) για 2 ημέρες. Τα κύτταρα που είχαν υποστεί επεξεργασία μόνο με νερό χρησιμοποιήθηκαν ως έλεγχος (control). Σε κάθε φρεάτιο χορηγήθηκαν 10  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου AlamarBlue® και τα εξεταζόμενα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για επιπλέον 4 ώρες. Χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη πλάκας, η απορρόφηση

μετρήθηκε στα 570 nm (ανηγμένα) και 600 nm (οξειδωμένα), αντίστοιχα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος που προκαλεί 50% κυτταρικό θάνατο (CC50) πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της ποσοστιαίας διαφοράς στην αναγωγή 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. Αποτελέσματα - Συζήτηση

#### 3.1 HPLC-DAD

Οι βιοδραστικές ενώσεις συναντώνται σε μεγάλα ποσοστά σε φυτικά εκχυλίσματα (Wolfender, 2009). Η παρουσία τους ευθύνεται για τις ευεργετικές βιολογικές ιδιότητές τους. Συγκεκριμένα, τα φυτοχημικά συστατικά εξηγούν τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιικές, αντικαρκινικές, αντιμυκητιακές δράσεις των φυτών, των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων τους (Rayne & Mazza, 2007). Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους πραγματοποιείται με αναλυτικές τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων.

Η συγκέντρωση των δειγμάτων που εξετάστηκαν υπολογίστηκε στα 100 mg/ml ύστερα από την εξάτμιση. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, 18 πρότυπες ενώσεις αναλύθηκαν ως προς τον χρόνο κατακράτησης, την καμπύλη βαθμονόμησης, το συντελεστή παλινδρόμησης, το μέγιστο μήκος κύματος και την περιεκτικότητά τους στο εκάστοτε δείγμα (Πίνακας 7, Εικόνα 5). Αναλυτικότερα, το εκχύλισμα της κουνούκλας είναι πλούσιο στο φλαβονοειδές, ρουτίνη (965,50 ppm) και στο φαινολικό οξύ, φερουλικό οξύ (877,27 ppm). Σε μικρότερες αναλογίες, συναντώνται επίσης οι εξής πρότυπες ουσίες: βενζοϊκό οξύ, γλωρογενικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, υδροξυβενζοϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ και γλυκοζίτης της απιγενίνης. Τέλος, η κουερσετίνη και η ναρινγκενίνη εντοπίζονται στο δείγμα της κουνούκλας σε ίχνη. Η Dimcheva και οι συνεργάτες της (2019), μελέτησαν εκχυλίσματα φύλλων *Cistus incanus* και ταυτοποίησαν τη ρουτίνη σε μικρότερη συγκέντρωση ( $489,98 \pm 2,89$  ppm). Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν ήταν η κατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, το γαλλικό οξύ, σε αντίθεση με το δείγμα μας. Παρόμοια, σε έρευνα του 2008, η Santagati και οι συνεργάτες της εντόπισαν στο εκχύλισμα του κιστού 5 είδη κατεχινών, γαλλικό οξύ και ρουτίνη. Επομένως, η ρουτίνη είναι το κοινό συστατικό που ανευρίσκεται στην πλειονότητα των επιστημονικών δημοσιεύσεων με την χρήση υγρής χρωματογραφίας.

Ένα άλλο δείγμα που μελετάται σε αυτήν την εργασία είναι το εκχύλισμα της Ποσειδωνίας. Οι πρότυπες ενώσεις που ταυτοποιούνται στο παραπάνω δείγμα είναι το βανιλικό οξύ, σε συγκέντρωση 25,05 ppm και η λουτεολίνη, της οποίας η

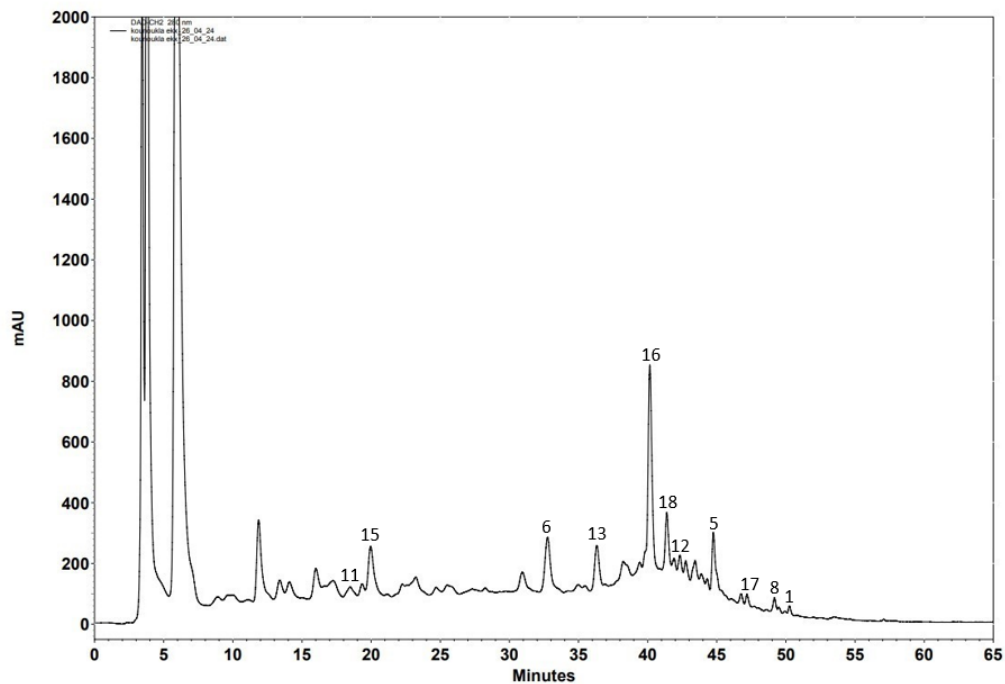
περιεκτικότητα ανέρχεται στα 8,52 ppm. Δεν παρατηρείται καμία άλλη από τις υπόλοιπες 16 διαθέσιμες πρότυπες ουσίες (Πίνακας 7, Εικόνα 6). Η Messina και οι συνεργάτες της (2021) ανέλυσαν το φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων της *Posidonia oceanica*. Τα συστατικά που υπερεπερέσαν σε αυτό το δείγμα ήταν το υδροξυβενζοϊκό, το γαλλικό και το βανιλλικό οξύ. Ωστόσο, δεν ταυτοποιήθηκε η φλαβόνη, λουτεολίνη. Αντίθετα, σε προηγούμενη έρευνα (Grignon-Dubois & Rezzonico, 2015) οι φαινολικές ενώσεις, που ήταν κυρίαρχες στο εκχύλισμα της Ποσειδωνίας ήταν το υδροξυκιναμικό οξύ και το κικορικό οξύ.

Συνοψίζοντας, στα εκχυλίσματα της παρούσας εργασίας προσδιορίζονται υψηλές συγκεντρώσεις του φλαβονοειδούς γλυκοσιδίου ρουτίνης, και των φαινολικών οξέων, φερουλικού και βενζοϊκού οξέος. Οι υπόλοιπες ουσίες που βρίσκονται στα δείγματα είναι σε μικρότερες περιεκτικότητες. Ωστόσο, η συνεργιστική δραστηριότητα των πρότυπων φαινολικών ουσιών εξηγεί την ευεργετική επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανθρώπινη υγεία και την αντιμετώπιση διάφορων κλινικών καταστάσεων και παθολογικών προβλημάτων.

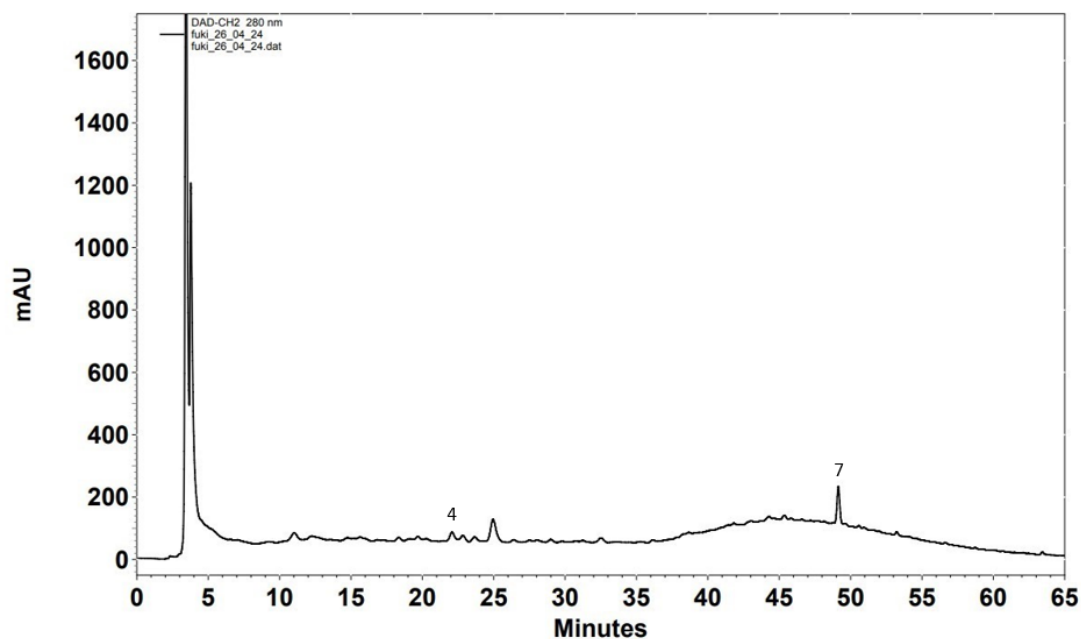
Πίνακας 7: Πρότυπες ενώσεις, ο χρόνος κατακράτησης του, καμπύλες βαθμονόμησης, μέγιστα μήκη κύματος στην υπεριώδη περιοχή και η συγκέντρωσή τους στα εκχυλίσματα *Cistus incanus* και *Posidonia oceanica*.

	Πρότυπη ένωση	Χρόνος κατακράτησης (min)	Καμπύλη βαθμονόμησης	Συντελεστής παλινδρόμησης (R <sup>2</sup> )	Μέγιστο μήκος κύματος (nm)	Συγκέντρωση στο δείγμα (ppm)	
						<i>C.incanus</i>	<i>P.oceanica</i>
							<i>a</i>
1	Ναρινγκενίνη	50,11	y=392749x+600702	0,998	235,289	6,86	-
2	Θυμόλη	57,99	y=140232x+563914	0,995	215,276,345	-	-
3	Καρβακόλη	57,65	y=96580x+159301	0,998	221,275	-	-
4	Βανιλλικό οξύ	22,55	y=280308x+1000000	0,997	208,265,292	-	25,05
5	Ροσμαρινικό οξύ	44,50	y=342476x-1000000	0,994	206,245,330	122,20	-

6	p- Κουμαρικό οξύ	32,87	$y=1000000x-268063$	0,996	216,309,395	51,79	-
7	Λουτεολίνη	49,80	$y=201134x+343231$	0,996	256,263,349	-	8,52
8	Κουερσετίνη	49,24	$y=208457x+441912$	0,999	230,256,370	10,82	-
9	Καμφερόλη	52,03	$y=265195x-28475$	0,998	250,315	-	-
10	Απιγενίνη	52,21	$y=407824x+599220$	0,999	267,338	-	-
11	Υδροξυβενζοϊκό οξύ	19,24	$y=216500x-261891$	0,996	210,260,388	67,32	-
12	Γλυκοζίτης της απιγενίνης	43,20	$y=475911x-3000000$	0,991	206,267,337	46,80	-
13	Φερουλικό οξύ	36,77	$y=36100x+667162$	0,998	210,322	877,27	-
14	Καφεϊκό οξύ	23,80	$y=460642x-243764$	0,993	209,240,323	-	-
15	Χλωρογενικό οξύ	20,26	$y=373013x-3000000$	0,998	213,325	117,78	-
16	Ρουτίνη	40,63	$y=101038x+244152$	0,994	258,356	965,50	-
17	Εριοδικτυόλη	46,96	$y=462783x+901504$	0,999	205,230,288	13,96	-
18	Βενζοϊκό οξύ	42,23	$y=56565x+111379$	0,996	273,370	676,52	-



Εικόνα 5: Χρωματογράφημα HPLC-DAD εκχυλίσματος κουνούκλας.



Εικόνα 6: Χρωματογράφημα HPLC-DAD εκχυλίσματος Ποσειδωνίας.

### 3.2 Διάχυση σε τρυβλία Petri

Οι λοιμώξεις από τους παθογόνους μικροοργανισμούς απειλούν συχνά την υγεία του ανθρώπου και στις αναπτυσσόμενες χώρες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου. Πολλές φορές τα φάρμακα και τα αντιβιοτικά δεν εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε παθογόνα στελέχη μικροοργανισμών και αυτό αναγνωρίζεται ως μείζον πρόβλημα στη θεραπεία μικροβιακών λοιμώξεων. Τα φυσικά εκχυλίσματα και επομένως, οι βιοδραστικές τους ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα των αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση διάφορων παθήσεων (Calvo et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη, εξετάζονται οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των δύο εκχυλισμάτων έναντι 7 παθογόνων μικροοργανισμών, Gram + και Gram - και ενός μύκητα. Η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται με τις τιμές MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Αναλυτικότερα, το χρονικό διάστημα επώασης των τρυβλίων, με τον μικροοργανισμό και το δείγμα, ήταν 24 ώρες. Σε ό,τι αφορά το υδατικό εκχύλισμα της ωκεάνιας, βρέθηκε ότι η MIC ισούται με 17 mg/mL κατά των *S.aureus*,

*L.monocytogenes*, *E.coli* και *C.albicans*. Με τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του δείγματος έναντι του *E. faecalis* με MIC= 20 mg/mL. Σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν παρατηρήθηκε αναστολή έναντι των υπόλοιπων Gram αρνητικών βακτηρίων. Ωστόσο, ύστερα από επώαση δύο ημερών, το συγκεκριμένο εκχύλισμα παρουσίασε ανασταλτική δράση κατά της *S. enterica* με MIC=20 mg/mL (Πίνακας 8).

Από την άλλη, ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και για το υδατικό εκχύλισμα του κιστού με τιμή MIC ίση με 17 mg/mL για όλα τα εξεταζόμενα Gram + βακτήρια μετά από επώαση 24 ωρών. Όμοια, η ίδια τιμή MIC υπολογίστηκε και για τους μικροοργανισμούς, *E. coli*, *K. pneumoniae*, αλλά και για τον μύκητα *C.albicans* (Πίνακας 9).

Ωστόσο, η πλειοψηφία των δημοσιεύσεων για το υδατικό εκχύλισμα του κιστού επικεντρώνεται στην αναστολή κατεξοχήν των βακτηρίων *S. aureus* και *E. coli*, αλλά και στον μύκητα *C. albicans*. Πιο συγκεκριμένα, η Viarriana και συν. (2017), σε διερεύνησή τους με την ίδια μέθοδο, επιβεβαιώνουν ότι το υδατικό εκχύλισμα της κουνούκλας εμφάνισε καλύτερη αντιμικροβιακή δράση κατά των Gram + βακτηρίων, στην προκειμένη περίπτωση του *S. aureus* (MIC= 0,5-8 mg/mL), ύστερα από επώαση των πλακών για 48 ώρες στους 37°C. Στην αναστολή του μύκητα και του κολοβακτηριδίου απέδειξαν ότι την καλύτερη ανασταλτική δράση είχε το υδρομεθανολικό εκχύλισμα και όχι το υδατικό. Όμοια, ο Zalegh et al. (2021) αξιολόγησε το ίδιο είδος φυτού, ως υδατικό εκχύλισμα, άλλα μονάχα την αντιμυκητιακή του δράση, για τον *C. albicans* (MID = 1/250). Σχετικά, με τα άλλα δύο πολυμελετημένα βακτήρια που προαναφέρθηκαν, η συγκεκριμένη επιστημονική ομάδα ήλεγξε την ανασταλτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων από άλλα είδη της ίδιας οικογένειας του κιστού. Για τα υπόλοιπα βακτήρια που εξετάστηκαν στην παρούσα αξιολόγηση δεν έχει γίνει κάποια σχετική αναφορά για την επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος της λαδανιάς.

Όσον αφορά στο δείγμα της Ποσειδωνιάς, η Punginelli και οι συν. (2023) ερεύνησαν το υδατικό εκχύλισμα του ίδιου θαλάσσιου φυτού εμπλουτισμένο με πολυπεπτίδια ως προς την αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή τους δράση. Τα βακτήρια *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* και ο μύκητας, *C. albicans*, εμφάνισαν ίδια τιμή MIC ίση με 25% v/v και με κοινή περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο δείγμα (7,5 μg/ mL).

Τα αποτελέσματα τους επικροτούν το γεγονός της υψηλής ανασταλτικής ικανότητας του συγκεκριμένου εκχυλίσματος, συνδυαστικά με τη δράση των πολυπεπτιδίων. Οι επιστημονικές αναφορές σε υδατικά εκχυλίσματα της Ποσειδωνίας για την αντιμικροβιακή τους δράση είναι περιορισμένες.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα από την διάχυση σε τρυβλία Petri για το εκχύλισμα *P. Oceanica*.

ΕΙΔΟΣ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ/ΑΝΑΣΤΟΛΗ		
			Άμεσο	24h	48h
Gram <sup>+</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	50-200 (1:5)	+	-	x
		50-250 (1:6)	-	-	x
		50-450 (1:10)	+	+	x
	<i>Enterococcus faecalis</i>	50-100 (1:3)	x	x	-
		50-200 (1:5)	x	x	-
		50-250 (1:6)	+	+	x
		50-300 (1:7)	+	+	x
		50-450 (1:10)	+	+	x
	<i>Listeria monocytogenes</i>	50-250 (1:6)	-	-	x
		50-300 (1:7)	+	+	x
		50-450 (1:10)	+	+	x
	Gram <sup>-</sup>	<i>Salmonella enterica</i>	50-100 (1:3)	x	x
50-200 (1:5)			x	x	-
50-250 (1:6)			+	x	x
50-450 (1:10)			+	+	x
<i>Escherichia coli</i>		50-250 (1:6)	+	-	x
		50-300 (1:7)	-	+	x
		50-450 (1:10)	+	+	x
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		50-250 (1:6)	-	x	x
		50-300 (1:7)	+	+	x
		50-450 (1:10)	-	+	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50-450 (1:10)	-	+	x



<b>ΜΥΚΗΤΑΣ</b>	<i>Candida albicans</i>	50-100 (1:3)	<b>x</b>	<b>x</b>	+
		50-200 (1:5)	<b>x</b>	<b>x</b>	+
		50-250 (1:6)	-	<b>x</b>	<b>x</b>
		50-300 (1:7)	+	+	<b>x</b>
		50-450 (1:10)	+	+	<b>x</b>

Πίνακας 9: Αποτελέσματα από την διάχυση σε τρυβλία Petri για το εκχύλισμα *Cistus incanus*.

<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ</b>	<b>ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ/ΑΝΑΣΤΟΛΗ</b>		
			<b>Άμεσο</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>
<b>Gram<sup>+</sup></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	50-200 (1:5)	+	-	<b>x</b>
		50-250 (1:6)	-	-	<b>x</b>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	50-250 (1:6)	-	-	<b>x</b>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	50-250 (1:6)	-	-	<b>x</b>
<b>Gram<sup>-</sup></b>	<i>Salmonella enterica</i>	50-200 (1:5)	+	-	<b>x</b>
		50-250 (1:6)	+	+	<b>x</b>
	<i>Escherichia coli</i>	50-250 (1:6)	+	-	<b>x</b>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50-250 (1:6)	-	-	<b>x</b>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50-450 (1:10)	-	<b>x</b>	<b>x</b>
<b>ΜΥΚΗΤΑΣ</b>	<i>Candida albicans</i>	50-200 (1:5)	+	+	<b>x</b>
		50-250 (1:6)	-	+	<b>x</b>

+ : θετικό αποτέλεσμα (επιβίωση)

-: αρνητικό αποτέλεσμα (αναστολή)

**x**: δεν πραγματοποιήθηκε

### 3.3 Κυτταροτοξικότητα

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρησιμότητα των φυσικών εκχυλισμάτων στην ανθρωπότητα αυξάνεται ολοένα και περισσότερο. Όπως φαίνεται στις προηγούμενες ενότητες (βλ. Ενότητα 3.1), οι φυτοχημικές ενώσεις διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην καταπολέμηση χρόνιων ασθενειών. Μία από αυτές τις σοβαρές παθήσεις είναι ο διαφόρων τύπων καρκίνος (Kueete et al., 2016). Για αυτόν το λόγο, το ενδιαφέρον των ερευνητών και επιστημόνων έχει επικεντρωθεί στην αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των φυσικών εκχυλισμάτων. Σε αυτή την έρευνα, μελετήθηκε το δυναμικό της κυτταροτοξικής δράσης τόσο του εκχυλίσματος όσο και του αιθέριου ελαίου της ωκεάνιας από το νησί της Ικαρίας.

Τα καρκινικά κύτταρα που εξετάστηκαν ήταν τα Huh 7.5. Η συγκεκριμένη καρκινική σειρά περιγράφει κύτταρα που απομονώνονται από το ήπαρ. Τα εξεταζόμενα δείγματα μελετώνται σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,5% v/v, 5% v/v και 10% v/v. Παρατηρείται ότι η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων φτάνει το 10% v/v, λόγω του φαινομένου της ώσμωσης. Τα αποτελέσματα των 3 διαφορετικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων συγκρίνονται με το δείγμα control, το οποίο περιέχει μόνο νερό, και εμφανίζει 100% κυτταρική βιωσιμότητα. Όσον αφορά στο αιθέριο έλαιο της Ποσειδωνίας, η πιο αποδοτική συγκέντρωση έναντι της κυτταροτοξικότητας καθίσταται το 5% v/v (>70%), ενώ για το αντίστοιχο εκχύλισμα το 10% v/v (>80%). Παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις, η περιεκτικότητα 2,5% v/v προκαλεί παρόμοια αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού (περίπου 60%) (Εικόνα 7). Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας εκφράζονται με το συντελεστή CC<sub>50</sub>. Η τιμή αυτή εκφράζει τη συγκέντρωση του δείγματος που μπορεί να προκαλέσει 50% κυτταρικό θάνατο (Koutsoni et al., 2019). Η δράση του εκχυλίσματος και του αιθέριου ελαίου είναι παρόμοια, καθώς οι τιμές CC<sub>50</sub> είναι μεγαλύτερες από 10 ppm και στις δύο περιπτώσεις.

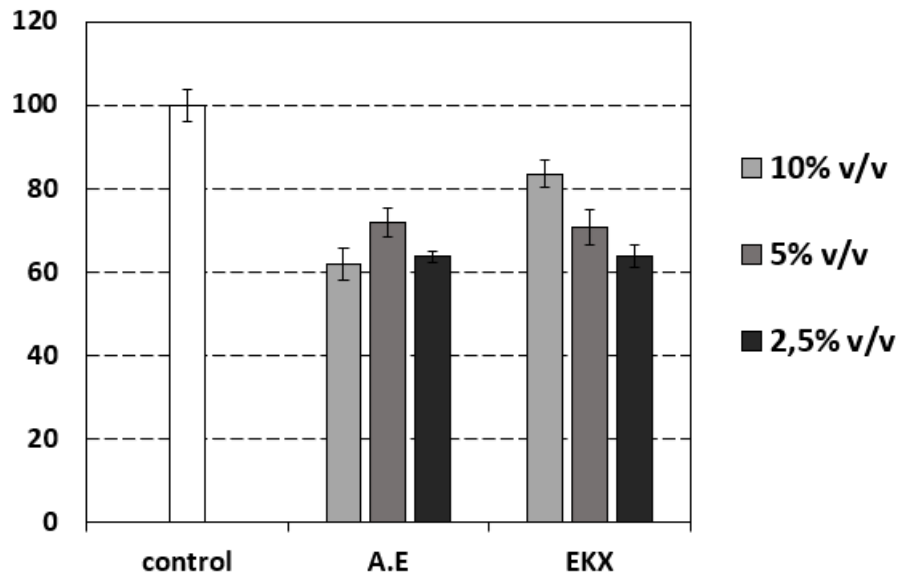
Τα υδατικά εκχυλίσματα της *P.oceanica* ελέγχθηκαν για την κυτταροτοξική τους δράση έναντι ηπατικών καρκινικών κυττάρων και από τους ερευνητές Abruscato και συν. (2023). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα των φύλλων και του ριζώματος της ωκεάνιας, στα οποία προσδιορίστηκε η τιμή CC<sub>50</sub> και υπολογίστηκε πάνω από 10 ppm. Σε παλαιότερη έρευνα, η Vasarri και συν. (2021) εξέτασαν το εκχύλισμα της Ποσειδωνίας και απέδειξαν τις θεραπευτικές τους ιδιότητες έναντι των

κυττάρων του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας του αιθέριου ελαίου είναι περιορισμένη και τα ευρήματα αυτής της εργασίας αποτελούν θεμέλιο για την επιστημονική κοινότητα και κατ' επέκταση για τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων.

Σε προηγούμενο κεφάλαιο (βλ. Ενότητα 3.1) και συγκεκριμένα στο εκχύλισμα της Ποσειδωνίας εντοπίστηκαν το βανιλλικό οξύ και η λουτεολίνη. Το βανιλλικό οξύ θεωρείται φυτικός δευτερογενής μεταβολίτης και πειράματα *in vitro* και *in vivo* απέδειξαν ότι έχει την ικανότητα να αναστέλλει τις ελεύθερες ρίζες, να θεραπεύει διαταραχές, όπως τη γήρανση, τον διαβήτη και τον καρκίνο (Taner et al., 2016). Ο Almeida και συν. (2016) επιβεβαίωσαν την επωφελή δράση του εν λόγω φαινολικού οξέος, καθώς καταφέρνει να διατηρήσει την κυτταρική βιωσιμότητα των ηπατοκαρκινικών κυττάρων. Η λουτεολίνη, μια φλαβόνη που συναντάται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά, φημίζεται για την αποτελεσματική αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση της. Έχει μελετηθεί έναντι της ανθρώπινης καρκινικής σειράς MCF-7, η οποία περιγράφει κύτταρα μαστού. Η πολλαπλασιαστική επίδραση της λουτεολίνης στα κύτταρα χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς, καθώς καταφέρνει και διατηρεί την κυτταρική βιωσιμότητα κυρίως σε μικρές συγκεντρώσεις (Sato et al., 2015). Επιπλέον, η απομόνωση της λουτεολίνης ελέγχθηκε για τις κυτταροτοξικές της ιδιότητες κατά του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος *in vitro* (Hanchinalmath & Londonkar, 2014). Η επιτυχής δράση αυτής της φλαβόνης επιβεβαιώθηκε με τη χρήση της μεθόδου MTT.

Συνάγεται, επομένως, το συμπέρασμα ότι και οι δύο πρότυπες ουσίες που προαναφέρθηκαν και η συνεργιστικότητά τους συμβάλλουν στην αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκινικών νοσημάτων. Η πλειοψηφία των φυτοχημικών συστατικών επιδρά θετικά στη διατήρηση της υγείας του ανθρώπου, με αποτέλεσμα οι σύγχρονες φαρμακοβιομηχανίες να αναζητούν εναλλακτικούς τρόπους θεραπείας σοβαρών παθήσεων με τη χρήση φυσικών προϊόντων.

## Cytotoxicity Huh 7.5 cells



CC50 (%v/v)	
A.E	>10
<u>Eκχ.</u>	>10

Εικόνα 7: Συγκριτικό ραβδόγραμμα που περιγράφει την κυτταροτοξική δράση αιθέριου ελαίου και εκχυλίσματος της ωκεανίας.

## 4. Συμπεράσματα

Η εμπειρισταωμένη μελέτη των φυσικών εκχυλισμάτων από βότανα και θαλάσσια φυτά έχει απασχολήσει από την αρχαιότητα έως σήμερα πληθώρα ερευνητών. Τα περιεχόμενα φυτοχημικά συστατικά αυτών έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, η βιοδραστικότητα των ενώσεων, που περιέχονται σε αυτά τα εκχυλίσματα, αξιολογήθηκε αναφορικά με την ευεργετική τους δράση σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων, λόγω χάρη του καρκίνου και διαφόρων βακτηριακών λοιμώξεων. Αυτή η προστατευτική τους δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο τόσο στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτοχημικών συστατικών τους, όσο και στη μειωμένη

κυτταροτοξική δράση που συχνά εμφανίζουν. Ασφαλώς, καθοριστικό ρόλο για όλες τις ιδιότητες, που διαθέτουν, διαδραματίζουν οι συγκεντρώσεις κατανάλωσης των εκχυλισμάτων στην εκάστοτε δοκιμαστική διαδικασία. Η εκχύλιση των δύο φυτών έγινε με υπερήχους, χάρη στην αποτελεσματικότερη απόδοση φαινολικών ενώσεων και για τα δύο εκχυλίσματα, συγκριτικά με άλλες μεθόδους.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, μελετήθηκαν 2 διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα, του κιστού ή λαδανιάς και της Ποσειδωνιάς ή ωκεανιάς. Πρόκειται για δύο είδη φυτών, προερχόμενων από διαφορετικές οικογένειες. Το πλούσιο φαινολικό προφίλ τους επιβεβαιώνεται με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Αναλυτικότερα, η στήλη της χρωματογραφίας συνέβαλε στον διαχωρισμό των ενώσεων, με τη δημιουργία διακριτών και οξείων κορυφών στο γράφημα του εκάστοτε εκχυλίσματος, αποσκοπώντας στον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των συστατικών του καθενός. Τα βασικότερα συστατικά, που εντοπίστηκαν, στο εκχύλιμα της κουνούκλας είναι το φλαβονοειδές, ρουτίνη, και το φαινολικό οξύ, φερουλικό οξύ. Από την άλλη, στο εκχύλιμα της Ποσειδωνιάς κυριάρχησε η φλαβόνη, λουτεολίνη, και το βανιλλικό οξύ. Οι εν λόγω ουσίες που ανευρέθηκαν στα δύο δείγματα, καθώς και τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή που ανιχνεύτηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις, δρουν συνεργιστικά και στοχεύουν στην καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου. Οι περιεκτικότητες των πολυφαινολών αυτών κυμάνθηκαν από  $965 \pm 0,5$  έως  $6,5 \pm 0,3$  ppm.

Σε ό,τι αφορά την αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, είναι γνωστό ότι η αποδοτικότητά της στηρίζεται σε πληθώρα μεταβλητών, όπως το είδος του φυτού, το μέρος του φυτού (φύλλα, ρίζωμα, κλπ.), το διαλύτη εκχύλισης και τα βακτηριακά στελέχη που μελετώνται. Το νερό κρίνεται ο αποτελεσματικότερος διαλύτης για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης, εφόσον δεν παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι των παθογόνων, συγκριτικά με άλλους οργανικούς διαλύτες (π.χ. αιθανόλη, μεθανόλη κλπ.). Συνεπώς, η μικροβιακή αναστολή είναι περισσότερο αξιόπιστη όταν εξετάζεται με υδατικά εκχυλίσματα, όπως και σε αυτήν τη μελέτη. Τα φυσικά εκχυλίσματα είναι γνωστά για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες, κυρίως λόγω των φαινολικών συστατικών και άλλων κατηγοριών φυσικών ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν στην αντιμετώπιση διαφόρων βακτηρίων, καθιστώντας τα εκχυλίσματα πολύτιμα για ιατρικές και φαρμακευτικές χρήσεις. Η αντιβακτηριακή

δράση των φυσικών εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε μέσω των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Οι τιμές MIC διαφέρουν ανάλογα με το είδος του δείγματος, της μεθόδου αντιμικροβιακής δράσης και του παθογόνου που εξετάζεται. Επομένως, κάθε δείγμα μπορεί να επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό τα εξεταζόμενα βακτήρια, γεγονός που καθιστά σημαντική τη μελέτη και την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων. Το εκχύλισμα της Ποσειδωνίας ανέδειξε ανασταλτική δράση κατά των 6 από τους 7 μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν στο χρονικό διάστημα επώασης των 24 ωρών. Αντίθετα, το δείγμα της λαδανιάς ανέστειλλε την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων, εκτός του μύκητα. Συνολικά, οποιαδήποτε αντιβακτηριακή δράση παρουσιάζουν αυτά τα εκχυλίσματα θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία ειδικών φαινολικών ενώσεων και στην πιθανή ύπαρξη συνεργιστικών επιδράσεων με άλλα μη φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στα υδατικά εκχυλίσματα των δύο φυτών. Επίσης, κρίνεται αναγκαίο να γνωρίζει κανείς σήμερα τη δομή και ανατομία των βακτηρίων, προκειμένου να μπορέσει να κατανοήσει εκτενέστερα τη λειτουργία της αντιμικροβιακής δράσης.

Η κυτταροτοξικότητα της Ποσειδωνίας εξετάστηκε χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές που απομονώθηκαν από το ήπαρ ανθρώπου. Το συγκεκριμένο φυτό στην παρούσα δοκιμή μελετήθηκε ως υδατικό εκχύλισμα και ως αιθέριο έλαιο. Οι δύο μορφές των δειγμάτων εμφάνισαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του ήπατος, δηλαδή έδρασαν παρόμοια. Η φυτοχημική σύσταση του φυτού συνέβαλε σημαντικά στην αποτελεσματικότητά του κατά της κυτταροτοξικότητας και κατά συνέπεια, άλλων σοβαρών παθήσεων που σχετίζονται με το ήπαρ (π.χ. καρκίνος). Η αντικαρκινική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων χρήζει περαιτέρω έρευνας, καθώς εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε ότι το αιθέριο έλαιο της ωκεάνιας εμφάνισε αντικυτταροτοξική δράση σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με το εκχύλισμα. Παρ' όλα αυτά, και στις δύο περιπτώσεις η χαμηλότερη περιεκτικότητα που δοκιμάστηκε είχε τη μεγαλύτερη απόκλιση από το control, πράγμα που πιθανότατα να οφείλεται και στις χαμηλότερες αναλογίες των βιοδραστικών ουσιών στη συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας δείχνουν ότι και τα δύο υδατικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν αξίζει να μελετηθούν εμπειριστατωμένα και από άλλους συναφείς κλάδους. Η δοκιμή και η εκχύλιση με διαφορετικούς διαλύτες

κρίνεται αναγκαία και ενδιαφέρουσα, καθώς θα εξετάσει αποτελεσματικότερα κατ' εξοχήν την αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων. Το αποτύπωμα της εν λόγω μελέτης ενδέχεται να αποτελέσει κίνητρο για τις βιομηχανίες διαφόρων κλάδων, όπως τροφίμων, φαρμάκων και αισθητικής. Η συγκεκριμένη αξιολόγηση των υδατικών εκχυλισμάτων κουνούκλας και Ποσειδωνίας διαθέτει νέα ευρήματα, τα οποία δεν έχουν ελεγχθεί, αξιολογηθεί και εκτιμηθεί σε μελέτες προηγούμενων ετών. Ωστόσο, συνδυαστικά με τις παραπάνω μεθόδους που αναλύθηκαν, άξιζε να μελετηθούν και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των δύο δειγμάτων, με στόχο την εμβάθυνση της μελέτης για τις ευεργετικές δράσεις των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανθρώπινη υγεία. Πλέον, ολοένα και περισσότεροι κλάδοι επιστημών, με κυριότερους της ιατρικής, φαρμακευτικής και της επιστήμης τροφίμων, στρέφονται προς την ανάλυση και εκτίμηση των ιδιοτήτων των φυτών, αποσκοπώντας στον περιορισμό των παρενεργειών και επιβλαβών επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agnieszka Viapiana, Agnieszka Konopacka, Krzysztof Waleron, Marek Wesolowski, (2017)
- Abruscato, G., Chiarelli, R., Lazzara, V., Punginelli, D., Sugár, S., Mauro, M., ... & Luparello, C. (2023). In vitro Κυτταροτοξική Επίδραση Υδατικών Εκχυλισμάτων από Φύλλα και Ριζώματα του θαλάσσιου χόρτου *Posidonia oceanica* (L.) Delile στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2: Εστίαση στην αυτοφαγία και την απόπτωση. *Biology*, 12 (4), 616.
- Abu-Orabi, S. T., Al-Qudah, M. A., Saleh, N. R., Bataineh, T. T., Obeidat, S. M., Al-Sheraideh, M. S., ... & 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.
- Almeida, IV, Cavalcante, F., & Vicentini, V. (2016). Διαφορετικές αποκρίσεις του βανιλικού οξέος, μιας φαινολικής ένωσης, στα κύτταρα htc: Κυτταροτοξικότητα, αντιπολλαπλασιαστική δράση και προστασία από βλάβες που προκαλούνται από το DNA. *Genet. Mol. Res*, 15 (4).
- Alves-Ferreira, J., Duarte, L. C., Fernandes, M. C., Pereira, H., & Carvalheiro, F. (2022). *Cistus ladanifer* as a potential feedstock for biorefineries: A review. *Energies*, 16(1), 391.
- Alves-Ferreira, J., Duarte, L. C., Fernandes, M. C., Pereira, H., & Carvalheiro, F. (2022). *Cistus ladanifer* as a potential feedstock for biorefineries: A review. *Energies*, 16(1), 391.
- Bernacka, K., Bednarska, K., Starzec, A., Mazurek, S., & Fecka, I. (2022). Antioxidant and antiglycation effects of *Cistus*× *incanus* water infusion, its phenolic components, and respective metabolites. *Molecules*, 27(8), 2432.
- Bouamama, H., Noel, 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.
- Bouamama, H., Noel, 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.



- Calvo, M. A., Arosemena, E. L., Shiva, C., & Adelantado, C. (2012). Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 1179-1185.
- Dimcheva, V., Kaloyanov, N., & Karsheva, M. (2019). Η πολυφαινολική σύνθεση των εγχύσεων *Cistus incanus* L., *Trachystemon orientalis* L. και *Melissa officinalis* L. με μέθοδο HPLC-DAD. *Open Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 3 (1), 031-038.
- Gawel-Bęben, K., Kukula-Koch, W., Hoian, U., Czop, M., Strzpek-Gomółka, M., & Antosiewicz, B. (2020). Characterization of *Cistus*× *incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. extracts as potential multifunctional antioxidant ingredients for skin protecting cosmetics. *Antioxidants*, 9(3), 202.
- Greathead, H. (2003). *Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proceedings of the nutrition Society*, 62(2), 279-290.
- Grignon-Dubois, M., & Rezzonico, B. (2015). Phenolic fingerprint of the seagrass *Posidonia oceanica* from four locations in the Mediterranean Sea: First evidence for the large predominance of chicoric acid. *Botanica Marina*, 58(5), 379-391.
- Grispoli, L., Karama, M., Armani, A., Hadjicharalambous, C., & Cenci-Goga, B. T. (2021). Staphylococcus aureus enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 677-690.
- Hanchinalmath, J. V., & Londonkar, R. (2014). Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of luteolin isolated from *Feronia limonia* on HepG2 cells. *Biolife J*, 2, 1287-92.
- Kuchta, A., Konopacka, A., Waleron, K., Viapiana, A., Wesółowski, M., Dąbkowski, K., ... & Jankowski, M. (2021). The effect of *Cistus incanus* herbal tea supplementation on oxidative stress markers and lipid profile in healthy adults. *Cardiology journal*, 28(4), 534-542.
- 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.

- 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), e3410-e3410.
- Kuete, V., Mbaveng, A. T., Nono, E. C., Simo, C. C., Zeino, M., Nkengfack, A. E., & Efferth, T. (2016). Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 23(8), 856-863.
- Lahcen, S. A., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., ... & Zarrouk, A. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. *Chemical Data Collections*, 26, 100346.
- Langenheim, J. H. (1990). Plant resins. *American Scientist*, 78(1), 16-24.
- Leri, M., Ramazzotti, M., Vasarri, M., Peri, S., Barletta, E., Pretti, C., & Degl'Innocenti, D. (2018). Οι βιοδραστικές ενώσεις από την *Posidonia oceanica* (L.) deile επηρεάζουν τη μετανάστευση κακοήθων κυττάρων μέσω της διαμόρφωσης της αυτοφαγίας. *Marine drugs*, 16 (4), 137.
- Lukas, B., Bragagna, L., Starzyk, K., Labedz, 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), 615.
- Messina, C. M., Arena, R., Manuguerra, S., Pericot, Y., Curcuraci, E., Kerninon, F., ... & Santulli, A. (2021). Antioxidant bioactivity of extracts from beach cast leaves of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Marine Drugs*, 19(10), 560.
- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.
- Osek, J., Lachtara, B., & Wiczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes*—how this pathogen survives in food-production environments?. *Frontiers in Microbiology*, 13, 866462.
- Paolini, J., Falchi, A., Quilichini, Y., Desjobert, J. M., De Cian, M. C., Varesi, L., & Costa, J. (2009). Morphological, chemical and genetic differentiation of

two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry*, 70(9), 1146-1160.

- Punginelli, D., Catania, V., Abruscato, G., Luparello, C., Vazzana, M., Mauro, M., ... & Schillaci, D. (2023). New bioactive peptides from the mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile and their impact on antimicrobial activity and apoptosis of human cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5650.
- Rayne, S., & Mazza, G. (2007). Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): a review. *Nature precedings*, 1-1.
- Sahraoui, R., Djellali, S., & Chaker, A. N. (2013). Morphological, anatomical, secondary metabolites investigation and physicochemical analysis of *Cistus creticus*. *Pharmacognosy Communications*, 3(4), 58.
- Santagati, NA, Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F., & Ronsisvalle, G. (2008). Ταυτόχρονος προσδιορισμός κατεχινών, ρουτίνης και γαλλικού οξέος σε εκχυλίσματα ειδών *Cistus* με HPLC με ανίχνευση διάταξης διόδων. *Journal of chromatographic Science*, 46 (2), 150-156.
- Sato, Y., Sasaki, N., Saito, M., Endo, N., Kugawa, F., & Ueno, A. (2015). Luteolin attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity to MCF-7 human breast cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(5), 703-709.
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., & Radulović, S. (2012). Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Industrial Crops and Products*, 38, 153-159.
- Tan, J. B. L., & Lim, Y. Y. (2015). Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food chemistry*, 172, 814-822.
- Taner, G., Özkan Vardar, D., Aydin, S., Aytaz, Z., Başaran, A., & Başaran, N. (2017). Χρήση δοκιμασιών in vitro για την αξιολόγηση των πιθανών κυτταροτοξικών, γονοτοξικών και αντιγονοτοξικών επιδράσεων του βανιλικού και κινναμωμικού οξέος. *Drug and χημική τοξικολογία*, 40 (2), 183-190.
- Vasarri, M., De Biasi, A. M., Barletta, E., Pretti, C., & Degl'Innocenti, D. (2021). An overview of new insights into the benefits of the seagrass *Posidonia oceanica* for human health. *Marine Drugs*, 19(9), 476.

- Viapiana, A., Konopacka, A., Waleron, K., & Wesolowski, M. (2017). Cistus incanus L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Industrial crops and products*, 107, 297-304.
- Wolfender, J. L. (2009). HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta medica*, 75(07), 719-734.
- Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., ... & Mhand, R. A. (2021). A review on Cistus sp.: phytochemical and antimicrobial activities. *Plants*, 10(6), 1214.
- Αλοΐζου, Ε. (2022). Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων με εφαρμογή στο χαρούπι.
- Samadi, F. M., Suhail, S., Sonam, M., Sharma, N., Singh, S., Gupta, S., ... & Pradhan, H. (2019). Antifungal efficacy of herbs. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 9(1), 28-32.