



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Απομόνωση, μελέτη και βιολογική δραστικότητα
συστατικών φυσικών προϊόντων**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΖΑΡΛΑΧΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Απομόνωση, μελέτη και βιολογική δραστικότητα
συστατικών φυσικών προϊόντων**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΖΑΡΛΑΧΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
2016

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 814^Α/01-04-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Δήμητρα Κόβαλα-Δεμερτζή, Ομοτ. Καθ. ΠΙ

Μέλη:

Ιωάννης Πλακατούρας, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ

Κωνσταντίνος Σταλίκας, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-04-2011

Θέμα: «Απομόνωση, μελέτη και βιολογική δραστικότητα συστατικών φυσικών προϊόντων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 931^Α/11-07-2016

1. Δήμητρα Κόβαλα-Δεμερτζή, Ομοτ. Καθ. (Επιβλέπουσα Καθ.)
2. Ιωάννης Πλακατούρας, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ
3. Κωνσταντίνος Σταλίκας, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ
4. Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ
5. Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Αναπλ. Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ
6. Περικλής Παππάς, Αναπλ. Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής ΠΙ
7. Δημοσθένης Γκιώκας, Επικ. Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΠΙ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-07-2016

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ζωή-Βαλεντίνα Βαμβέτσου

Στις κόρες μου, Άννα και Μαρίνα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια Δήμητρα Κόβαλα – Δεμερτζή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια Δήμητρα Κόβαλα – Δεμερτζή, για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή βοήθειά της, την πολύπλευρη γνώση που απλόχερα μου μετέδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στη διάρκεια της εργασίας μου.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Καθηγητή Ιωάννη Πλακατούρα και Καθηγητή Κωνσταντίνο Σταλικά που με τίμησαν με την συμμετοχή τους, καθώς και για τις παρεμβάσεις και τις υποδείξεις στη συγγραφή και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Γκιόκα Δημοσθένη για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρωματογραφίας καθώς και για το συνεχές ενδιαφέρον και τις εύστοχες παρατηρήσεις κατά την συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Την Δρ. Tatjana P Stanojkovic για την *in vitro* μελέτη της βιολογικής δράσης προτύπων ενώσεων και εκχυλισμάτων εναντίον καρκινικών και φυσιολογικών κυτταρικών σειρών.

Την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα για την μελέτη της αναστολής λιπιδικής υπεροξειδωσης και λιποξυγενάσης *in vitro* προτύπων ενώσεων και εκχυλισμάτων βασιλικού.

Τον Δρ. Καρκαμπούνα Αθανάσιο για την βοήθειά του κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρωματογραφίας και στη συνέχεια στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Το μέλος Ειδικού Τεχνικού Εργαστηριακού Προσωπικού του ΤΕΙ Ηπείρου Κύρκα Δημήτριο, MSc για την ταυτοποίηση των φυτών που μελετήθηκαν στην διατριβή.

Τα μέλη της επταμελούς επιτροπής που με τίμησαν με την συμμετοχή τους.

Τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, Δρ. Αναστασία Πουρνάρα, Σταυρούλα Αναστασοπούλου MSc., Δρ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη για τις συζητήσεις και τη βοήθεια στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την υποστήριξή της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της παρούσας διατριβής αυτής ήταν ο προσδιορισμός του είδους και της ποσότητας των φαινολικών και флаβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας Lamiaceae της ελληνικής υπαίθρου, η διαπίστωση των αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων και η ταυτοποίηση των ενώσεων με αντιοξειδωτική και βιολογική δράση.

Σκοπός μας ήταν η μελέτη της επίδρασης τεσσάρων διαλυτών εκχύλισης (αιθανόλης, νερού, διχλωρομεθανίου και εξανίου)

- στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο
- στον υπολογισμό των συνολικών флаβονοειδών
- στην αντιοξειδωτική δράση
- στην ποιοτική και ποσοτική σύσταση

των εκχυλισμάτων τριών φυτών της ελληνικής χλωρίδας, του βασιλικού (λατ. *Ocimum basilicum*), του δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* Linn.), και της ματζουράνας (λατ. *Origanum Majorana*).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων στους τέσσερις διαλύτες εκχύλισης έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών, με την αιθανόλη να παρουσιάζει την καλύτερη απόδοση σε σχέση με τους υπόλοιπους διαλύτες. Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας επίσης σχετίζονται με τις τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών και ολικών флаβονοειδών καθώς τα αποτελέσματα είναι αντίστοιχα.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με βαθμωτή έκλυση, σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών. Η ταυτοποίηση βασίστηκε στο συνδυασμό του χρόνου συγκράτησης, του φάσματος και του μήκους κύματος στο οποίο παρουσίασε το μέγιστο της απορρόφησης στο UV-Vis. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε την ισχυρή επίδραση των διαλυτών στην ανίχνευση των επιμέρους συστατικών. Με τη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας αναλύθηκαν πρότυπα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των αντίστοιχων ενώσεων στα εκχυλίσματα

που προέκυψαν από τους τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες. Η πλειονότητα των συστατικών εμφανίζεται μετά από εκχύλιση με αιθανόλη σε συμφωνία με τα πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν αντικαρκινικά πειράματα *in vitro* όπου μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των κυριότερων συστατικών που απαντούν στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* εναντίον κυτταρικών καρκινικών σειρών και προς φυσιολογικά κύτταρα με σκοπό να διαπιστωθεί πιθανή εκλεκτική κυτταροτοξικότητα. Μετρήθηκε για πρώτη φορά η αναστολή της λιποξυγενάσης *in vitro* με εκχυλίσματα βασιλικού και βρέθηκε σημαντική αναστολή του εκχυλίσματος φύλλων σε σχέση με το αιθέριο έλαιο. Τέλος ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά η ισοευγενόλη σε δείγματα βασιλικού ως συστατικό σε μικρή συγκέντρωση, ενώ μελετήθηκε για πρώτη φορά με υπολογιστικές μεθόδους μοριακής πρόσδεσης η ισοευγενόλη ως ενζυμικός αναστολέας της λιποξυγενάσης υιοθετώντας παρόμοια γεωμετρία θέσης με τον συγκρυσταλλωμένο υποκαστάτη της ινδομεθακίνης.

ABSTRACT

The aim of the thesis is to qualitatively and quantitatively assess the phenolic and flavonoid content of extracts of medicinal plants of the *Lamiaceae* family typically found in the Greek flora. Their antioxidant capacity was correlated to their anticancer activity by *in vitro* and *in silico* studies.

Specifically, we evaluated the impact of using four different solvent media (water, ethanol, dichloromethane and hexane) to the:

- total phenolic content
- total flavonoid content
- antioxidant activity
- qualitative and quantitative composition

of three aromatic plants: Sweet Basil (*Ocimum basilicum*), Rosmary (*Rosmarinus officinalis Linn.*), and Marjorma (*Origanum Majorana*).

Our results showed significant differences among the four different extracting routes with ethanol being the best extracting medium. We also found that antioxidant activity is linearly correlated to the total phenolic and flavonoid content.

The strong influence of the solvent medium was also confirmed by experiments with HPLC, ESI-MS and LC-MS. These experiments allowed us to determine the specific composition of each extract and the relative content for each solvent. Using these techniques we were able to suggest the content of isoeugenol in basil extracts for the first time in the literature.

The biological activity of the extracts was studied *in vitro* against a variety of malignant and normal cells lines to assess the possible selective anticancer capacity of the extracts. The results were compared with the analogous stemmed in parallel for the main molecular constituents (eugenol, isoeugenol, linalool, caffeic acid and rosmarinic acid). Remarkably, caffeic acid was found to be in the same activity range compared to cisplatin against four cell lines exhibiting significant anticancer activity; isoeugenol was found to be more cytotoxic than eugenol.

In silico modelling showed that isoeugenol can effectively inhibit cyclooxygenase and lipoxygenase enzymatic action adopting a pose similar to the co-crystallized ligand of indomethacin.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1.....	1
Φυσικά Προϊόντα – Φαρμακευτικά Φυτά	1
1.1. Φαρμακευτικά φυτά - Γενικά.....	1
1.2. Αιθέρια έλαια	3
1.3. Φυτοχημικά συστατικά	3
1.4. Ταξινόμηση φυτοχημικών προϊόντων.....	5
1.4.1. Δευτερογενή συστατικά	5
1.4.2. Φαινολικά οξέα	6
1.4.3. Δραστικότητα των φαινολικών οξέων	7
1.4.4. Φλαβονοειδή.....	7
1.4.5. Δραστικότητα φλαβονοειδών	8
1.4.6. Τανίνες.....	9
1.4.7. Αλκαλοειδή.....	10
1.4.8. Τερπενοειδή	10
1.4.9. Δραστικότητα τερπενίων.....	12
1.4.10. Σαπωνίνες.....	12
1.4.11. Δραστικότητα σαπωνίνων.....	12
Αναφορές	13
Κεφάλαιο 2.....	17
Η συμβολή των φυτοχημικών στην χημειοπροφύλαξη.....	17
2.1 Εισαγωγή στην έννοια της χημειοπροφύλαξης	17
Αναφορές	23
Κεφάλαιο 3.....	26
<i>Rosmarinus officinalis</i>	26
3.1. Εισαγωγή	26
3.2 Χημική σύσταση	27
3.2.1. Εκχύλισμα	27
3.2.2. Αιθέριο έλαιο	30
3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων	31
3.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	31

3.4.1 Παραδοσιακές χρήσεις του δεντρολίβανου	31
3.4.2 Βιολογική και Φαρμακευτική δράση	32
3.4.3 Ανεπιθύμητες δράσεις και παράπλευρα αποτελέσματα του αιθέριου ελαίου....	33
3.4.4. Αλληλεπιδράσεις με φάρμακα.....	33
3.4.5. Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου	34
3.4.6 Αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων δεντρολίβανου.....	36
3.4.7 Φυσικά αντιοξειδωτικά δενδρολίβανου.....	37
Αναφορές	38
Κεφάλαιο 4.....	42
<i>Origanum Majorana</i>	42
4.1. Εισαγωγή	42
4.2 Χημική σύσταση	44
4.2.1. Εκχύλισμα.....	44
4.2.2. Αιθέριο έλαιο	49
4.3. Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	52
4.3.1 Παραδοσιακές χρήσεις.....	52
4.3.2 Βιολογική και Φαρμακευτική δράση	53
4.3.3 Ανεπιθύμητες δράσεις και παράπλευρα αποτελέσματα του αιθέριου ελαίου	53
4.3.4. Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.....	54
4.3.5. Αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων	55
Αναφορές	56
Κεφάλαιο 5.....	60
<i>Ocimum basilicum</i>	60
5.1. Εισαγωγή	60
5.2 Χημική σύσταση	61
5.2.1. Εκχύλισμα.....	61
5.2.2. Αιθέριο έλαιο	65
5.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων	69
5.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	70
5.4.1 Παραδοσιακές χρήσεις του δεντρολίβανου	70
5.4.2 Βιολογική και Φαρμακευτική δράση	71
5.4.3. Αντιοξειδωτική δράση.....	75
Αναφορές	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	80
Υλικά και Μέθοδοι	80
6.1. Τεχνικές	80
6.1.1. Φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα.....	80
6.1.2. Φαινολικά.....	81
6.1.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	82
6.1.4. Φλαβονοειδή.....	83
6.1.5. Ενόργανες χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης	83
6.2. Υλικά και μέθοδοι.....	90
6.2.1. Φυτικό υλικό	90
6.2.2. Διαλύτες –Αντιδραστήρια	93
6.2.3. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη	93
6.2.4. Λυοφιλίωση.....	94
6.2.5. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH)	94
6.2.6. Μέτρηση φαινολικών συστατικών.....	95
6.2.7. Μέτρηση συνολικών φλαβονοειδών	95
6.2.8. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	96
6.2.9. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζων (LC-MS).....	98
6.2.10. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζων με ηλεκτρο- ψεκασμό (ESI-MS)	99
6.2.11. Αντικαρκινικά πειράματα (<i>in vitro</i>)	99
6.3. Υπολογιστική μοντελοποίηση (μοριακή πρόσδεση).....	101
6.4. Στατιστική Ανάλυση	102
Αναφορές	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	105
Αποτελέσματα και Συζήτηση	105
7.1. Μέτρηση συνολικών φαινολικών	105
7.2. Μέτρηση συνολικών φλαβονοειδών	107
7.2.3. Επίδραση του διαλύτη	111
7.3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	115
7.4. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	118
7.5. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (LC-MS).....	135
7.6. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζων με ηλεκτρο-ψεκασμό (ESI-MS)	158

7.7. Αντικαρκινικά πειράματα (<i>in vitro</i>)	163
7.8. Υπολογιστική μοντελοποίηση (μοριακή πρόσδεση).....	171
Αναφορές	175
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	184
Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές	184
8.1. Συμπεράσματα	184
8.2. Μελλοντικές προοπτικές.....	185
8.3. Δημοσιεύσεις	187
Αναφορές	187

Κεφάλαιο 1

Φυσικά Προϊόντα – Φαρμακευτικά Φυτά

Εισαγωγή

1.1. Φαρμακευτικά φυτά - Γενικά

Ως φαρμακευτικά φυτά ορίζονται τα φυτά όταν που περιέχουν ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά με ικανότητα να προλαμβάνουν, να ανακουφίζουν ή να θεραπεύουν ασθένειες.

Τα φαρμακευτικά φυτά ανήκουν στα φυσικά προϊόντα. Ο όρος φυσικά προϊόντα χρησιμοποιείται για όλες τις χημικές ενώσεις που υπάρχουν στη φύση αλλά συνηθίζεται για αυτές που συνθέτουν οι ζωντανοί οργανισμοί ή παράγονται από αυτούς.

Κάποιες σημαντικές κατηγορίες των φυσικών προϊόντων που ορίζονται ως προϊόντα πρωτογενούς μεταβολισμού και θεωρούνται τα βασικά συστατικά των οργανισμών, είναι οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα λίπη, τα νουκλεϊκά οξέα κ.λ.π. Αντίστοιχα, ως φυσικά προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού χαρακτηρίζονται όσα δεν συμμετέχουν στην βασική μεταβολική λειτουργία. Χαρακτηριστικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι τα βιοδραστικά φαινολικά παράγωγα (ανθοκυάνινες, φλαβονοειδή), τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή κ.α.

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες έχουν όμοιο ρόλο σε όλους τους οργανισμούς, αντίθετα με τους δευτερογενείς μεταβολίτες των οποίων ο ρόλος ποικίλλει ανάλογα με τον οργανισμό.

Παρόλα αυτά ο όρος «φυσικά προϊόντα» χρησιμοποιείται κυρίως για τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο. Ωστόσο,

το μεγαλύτερο μέρος των φυσικών προϊόντων προέρχεται από το φυτικό βασίλειο και κυρίως από τα ανώτερα φυτά. Ο απλούστερος διαχωρισμός των φυσικών αυτών προϊόντων είναι σε πτητικά και μη.

Τα Φαρμακευτικά Φυτά κατέχουν μια ιδιαίτερη θέση στη ζωή όλων των λαών και όλων των εποχών. Από τα αρχαία χρόνια ήταν γνωστές οι θεραπευτικές τους ιδιότητες. Πολλοί αρχαίοι φιλόσοφοι, ανάμεσά τους και ο Ιπποκράτης είχαν ασχοληθεί με την δράση τους. Στο παρελθόν αποτελούσαν την κύρια πηγή των πρώτων υλών για τα φάρμακα, τα συμπληρώματα διατροφής, τα καρυκεύματα των φαγητών και πολλές άλλες χρήσεις στο σπίτι, όπως στον αρωματισμό χώρων, στις βαφές, σε προϊόντα καθαρισμού και σε εντομοαπωθητικά, τα οποία προσφέρονται ακόμη και σήμερα ως εμπορικά προϊόντα.

Τα σύγχρονο αίτημα των καιρών η επιστροφή σε φυσικά προϊόντα. Η τάση αυτή έχει οδηγήσει, στην Ελλάδα αλλά και παγκοσμίως, σε μια αύξηση στη ζήτηση για φυσικά προϊόντα και ιδιαίτερα για τα φαρμακευτικά φυτά. Μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά βότανα έχουν ιατρικές ιδιότητες και αποτελούν στην ιατρική το βασικό υλικό για την παρασκευή φαρμάκων που καταπολεμούν σύγχρονες αρρώστιες.

Κοινό γνώρισμα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι η ύπαρξη αιθέριων ελαίων με πολλές χρήσεις, ενώ παράλληλα εξάγονται άλλες μη πτητικές ή μη αρωματικές ουσίες (π.χ. χρωστικές).

Οι κυριότερες χρήσεις είναι:

- ✓ Στη μαγειρική
- ✓ Σε καλλυντικά
- ✓ Στη ζαχαροπλαστική
- ✓ Στην ιατρική και κτηνιατρική
- ✓ Στη φαρμακευτική
- ✓ Στην γεωργία

Στην Ελλάδα υπάρχουν περισσότερα από 6000 είδη φυτών. Από αυτά, περίπου το 10% χαρακτηρίζονται ως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Ο αριθμός αυτός είναι συγκριτικά πολύ μεγάλος σε σχέση με τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες. Αυτό οφείλεται στην κατάλληλη γεωγραφική θέση της Ελλάδας αλλά και στις ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες.

1.2. Αιθέρια έλαια

Ως αιθέρια έλαια ορίζεται η ομάδα των αρωματικών πτητικών ουσιών με συγκεκριμένη σύσταση και ιδιότητες όπως για π.χ. να είναι διαλυτά σε αιθανόλη και λιγότερο διαλυτά στο νερό. Είναι στην πραγματικότητα μίγματα πτητικών ουσιών που προσδίδουν στο σχετικό φυτό τη χαρακτηριστική του οσμή.

Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και διαφέρουν από την ομάδα των «λιπών και ελαίων» τόσο στις φυσικές όσο και στις χημικές τους ιδιότητες. Ο ακριβής ρόλος τους στα φυτά δεν έχει διευκρινιστεί αν και είναι γνωστό ότι είναι πρόδρομες ουσίες δραστικών μεταβολιτών. Τα αιθέρια έλαια προσελκύουν τα έντομα που μαζεύουν γύρη και βοηθούν έτσι στην αναπαραγωγή με επικονίαση. Τέλος τα αιθέρια έλαια λόγω των διάφορων συστατικών που διαθέτουν έχουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντισηπτικές ιδιότητες εμφανίζοντας δράση κατά των βακτηρίων, των μυκήτων και των ζυμών.

Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων διακρίνονται σε τερπενικούς και μη τερπενικούς υδατάνθρακες. Τα τερπένια δρουν ως πρωτογενείς μεταβολίτες, συστατικά των μεμβρανών και συμμετέχουν σε φωτοπροστατευτικές χρωστικές.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που καθορίζουν τη χημική σύσταση καθώς και την απόδοση του αιθέριου ελαίου στα φυτά. Ορισμένοι από αυτούς είναι

- Το στάδιο ανάπτυξης των οργάνων (φύλλα, άνθη, καρποί)
- Το μέρος του φυτού (φύλλα, άνθη κ.λπ.) που αναλύεται
- Το εκκριτικό όργανο που παράγει τα αιθέρια έλαια
- Την εποχική διακύμανση
- Τις μηχανικές και χημικές βλάβες
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες (κλίμα, γεωγραφική θέση)

1.3. Φυτοχημικά συστατικά

Φυτοχημικά (από την ελληνική λέξη φυτό) (phytochemicals) είναι βιολογικά δραστικές, χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά, οι οποίες παρέχουν οφέλη για την υγεία των ανθρώπων και η δράση τους αποδίδεται σε μακροθρεπτικά συστατικά [1]. Προστατεύουν τα φυτά από ασθένειες και συμβάλουν στο χρώμα, το άρωμα και

τη γέυση του φυτού. Σε γενικές γραμμές, οι χημικές αυτές ουσίες προστατεύουν τα φυτικά κύτταρα από περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως η ρύπανση, το στρες, ξηρασία, έκθεση στην UV ακτινοβολία και προσβολές από παθογόνα μικρόβια [2]. Πρόσφατα, έγινε γνωστό ότι παίζουν ρόλο και στην προστασία της υγείας του ανθρώπου, όταν η διατροφική τους πρόσληψη είναι σημαντική. Πάνω από 4.000 φυτοχημικές ενώσεις έχουν καταγραφεί και έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με την προστατευτική τους λειτουργία, τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά [3]. Από το σύνολο αυτών των ενώσεων περίπου 150 είδη έχουν μελετηθεί με λεπτομέρεια. Κύριες πηγές τους είναι πολλά φρούτα και λαχανικά, όπως το μπρόκολο, λάχανο, καρότα, κρεμμύδια, σκόρδο, σιτάρι ολικής αλέσεως ψωμί, ντομάτες, σταφύλια, κεράσια, φράουλες, τα φασόλια, τα όσπρια, και τα τρόφιμα σόγιας [4].

Το ποσοστό τους ποικίλλει ανάλογα με το τμήμα του φυτού από το οποίο προέρχονται όπως ρίζες, μίσχους, φύλλα, άνθη. Επίσης ποικίλλει από φυτό σε φυτό, ανάλογα με την ποικιλία, τη μεταποίηση, το μαγείρεμα και τις συνθήκες καλλιέργειας [5].

Είναι γνωστές ως δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και έχουν βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Τα φυτοχημικά συστατικά δεν είναι απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το ανθρώπινο σώμα για τη διατήρηση της ζωής, αλλά έχουν σημαντικές ιδιότητες για την πρόληψη ή την καταπολέμηση ορισμένων ασθενειών.

Μετά από αιώνες εμπειρικής χρήσης του φυτικών σκευασμάτων, στις αρχές της δεκαετίας του 19^{ου} αιώνα απομονώθηκαν δραστικά συστατικά, όπως αλκαλοειδή μορφίνη, στρυχνίνη, κινίνη, κλπ. και το γεγονός αυτό σηματοδότησε μια νέα εποχή όσον αφορά τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών στην έρευνα.

Εντούτοις, ενδιαφέρον δόθηκε για φάρμακα φυτικής και ζωικής πιθανώς προέλευσής [6]. Η αποτελεσματικότητα ενός μεγάλου αριθμού φυτοφαρμακευτικών παρασκευασμάτων, όπως το σκόρδο ή η βαλεριάνα αύξησε το ενδιαφέρον από μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες. Έχει αποδειχθεί ότι είναι τόσο αποτελεσματικά όσο τα συνθετικά φάρμακα με λιγότερες ή καθόλου παρενέργειες και αντενδείξεις. Έχει αποδειχθεί ότι, τα αποτελέσματα της χρήσης των φαρμακευτικών φυτών είναι μερικές φορές καλύτερα και μακροπρόθεσμα, ιδίως σε χρόνιες ασθένειες [7].

Τα φυτοχημικά προϊόντα είναι υπεύθυνα για την πρόληψη των ασθενειών και την προάσπιση της υγείας. Για το λόγο αυτό έχουν μελετηθεί εκτενώς με κύριο στόχο την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν ταυτοποίηση, απομόνωση των χημικών συστατικών, και μελέτη της βιολογικής τους δραστικότητας σε πειραματόζωα και μέσω επιδημιολογικών και κλινικών μελετών και στον άνθρωπο.

Ευρήματα των μελετών υποδηλώνουν ότι φυτοχημικά μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο της στεφανιαίας καρδιακής νόσου εμποδίζοντας την οξείδωση της (LDL) χοληστερόλης και ομαλοποιούν την αρτηριακή πίεση. Επίσης μπορεί να έχουν αντικαρκινική δράση. Πιθανώς να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, να αναστέλλουν τα ένζυμα που ενεργοποιούν καρκινογόνες ουσίες , και να ενεργοποιούν ένζυμα που αποτοξινώνουν καρκινογόνες ουσίες.

1.4. Ταξινόμηση φυτοχημικών προϊόντων

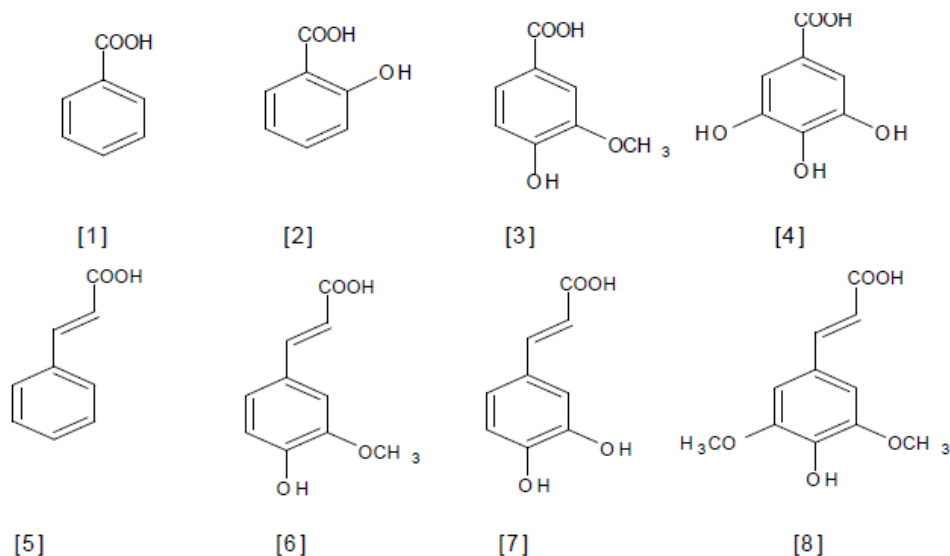
Φυτοχημικά έχουν χαρακτηριστεί ως κύρια ή δευτερογενή συστατικά, ανάλογα με τον ρόλο τους στο μεταβολισμό των φυτών. Τα κύρια συστατικά τους περιλαμβάνουν τα κοινά σάκχαρα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, πουρίνες και πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέα, χλωροφύλλης κλπ. Δευτερογενή συστατικά είναι οι υπόλοιπες χημικές ουσίες των φυτών, όπως αλκαλοειδή, τερπένια, флаβονοειδή, σαπωνίνες, φαινολικά, флаβονοειδή και γλυκοζίτες [8].

1.4.1. Δευτερογενή συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια μεγάλη και πολύπλοκη ομάδα χημικών συστατικών που βρέθηκαν στο φυτά [9]. Οι τρεις πιο σημαντικές ομάδες των διατροφικών φαινολικών είναι τα флаβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, και οι πολυφαινόλες. Οι φαινόλες είναι μία κατηγορία χημικών ενώσεων, όπου η (-OH) συνδέεται απ'ευθείας με έναν αρωματικό υδρογονάνθρακα. Η φαινόλη (C_6H_5OH) θεωρείται η απλούστερη κατηγορία αυτής της ομάδας των φυσικών ενώσεων. Τα флаβονοειδή είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτικών φαινολών και η πιο μελετημένη [10].

1.4.2. Φαινολικά οξέα

Ο όρος “φαινολικά οξέα”, ορίζει φαινόλες που διαθέτουν ένα καρβοξυλικό οξύ ως δραστική ομάδα. Τα φυσικά σχηματιζόμενα φαινολικά οξέα περιέχουν δύο διακριτικά πλαίσια του άνθρακα : hydroxycinnamic and hydroxybenzoic



Hydroxybenzoic acid are Benzoic acid [1], Salicylic acid [2], Vanillic acid [3], Gallic acid [4] and Hydroxycinnamic acid are Cinnamic acid [5], Ferulic acid [6], Sinapic acid [7] and Caffeic acid [8].

Σχήμα 1.1. Σημαντικά φαινολικά οξέα ευρισκόμενα σε φυτά

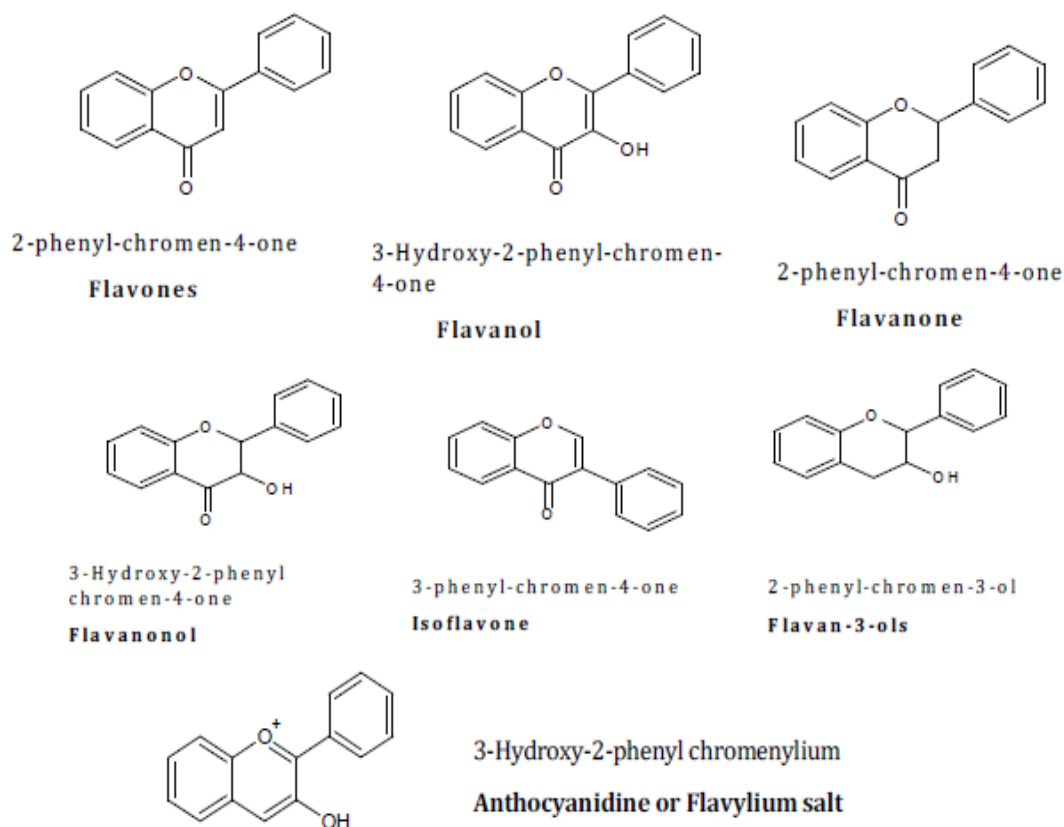
Στα φυτά οι φαινολικές ενώσεις είναι διαφορετικές σε μοριακή δομή, και χαρακτηρίζονται από υδροξυλιωμένους αρωματικούς δακτυλίους [11]. Αυτές οι ενώσεις έχουν μελετηθεί κυρίως για τις ιδιότητές τους κατά οξειδωτικών βλαβών που οδηγούν σε διάφορες εκφυλιστικές ασθένειες, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, φλεγμονές και καρκίνο [12]. Υπάρχει σημαντική βιβλιογραφία σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών οξέων, υπογραμμίζοντας τόσο την άμεση πρόσληψη μέσω κατανάλωσης τροφίμων όσο και την έμμεση βιοδιαθεσιμότητα τους που απορρέουν από το γαστρικό, εντερικό και ηπατικό μεταβολισμό [13]. Κατά τα τελευταία έτη, η σημασία της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών ενώσεων και της πιθανής χρήσης τους σε επεξεργασμένα τρόφιμα υποδεικνύουν ότι οι βιολογικές δράσεις των ενώσεων αυτών είναι συνδεδεμένες με την αντιοξειδωτική τους δράση [14].

1.4.3. Δραστικότητα των φαινολικών οξέων

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με μεγάλη φαρμακολογική δράση. Έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενός μεγάλου αριθμού γεωργικών, βιολογικών, χημικών και ιατρικών μελετών. Οι φαινολικές ενώσεις σε πολλά φυτά πολυμερίζονται σε μεγαλύτερα μόρια όπως η προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες τανίνες) και λιγνίνες. Η βιολογική δράση των φαινολικών οξέων έχει αναφερθεί, μειώνουν την αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα της χοληστερόλης και των λιπιδίων και της μικροβιακής δραστικότητα έναντι μερικών στελεχών βακτηριδίων όπως *Staphylococcus aureus* [15].

1.4.4. Φλαβονοειδή

Φλαβονοειδή είναι συνήθεις πολυφαινολικές ενώσεις. Περισσότερα από 4.000 φλαβονοειδή έχουν αναγνωρισθεί, πολλά από τα οποία υπάρχουν σε λαχανικά, φρούτα και ποτά, όπως το τσάι, ο καφές και ποτά φρούτων [16]. Τα φλαβονοειδή φαίνεται να έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της ιατρικής των αρχαίων χρόνων, και η χρήση τους έχει παραμείνει έως τώρα. Τα φλαβονοειδή εμφανίζονται ως γλυκοζίτες και μεθυλιωμένα παράγωγα. [17].



Σχήμα 1.2. Χημική δομή ορισμένων φλαβονοειδών

Τα περισσότερα φλαβονοειδή που απαντώνται στη φύση σχετίζονται με υδατάνθρακες σε συζευγμένη μορφή και μπορεί να χαρακτηρισθούν ως μονο-γλυκοσιδικά, δι-γλυκοσιδικά, κλπ. Ο γλυκοσιδικός δεσμός βρίσκεται συνήθως στη θέση 3 ή 7 και η μονάδα υδατανθράκων μπορεί να είναι L-ραμνόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη ή αραβινόζη [18].

1.4.5. Δραστηριότητα φλαβονοειδών

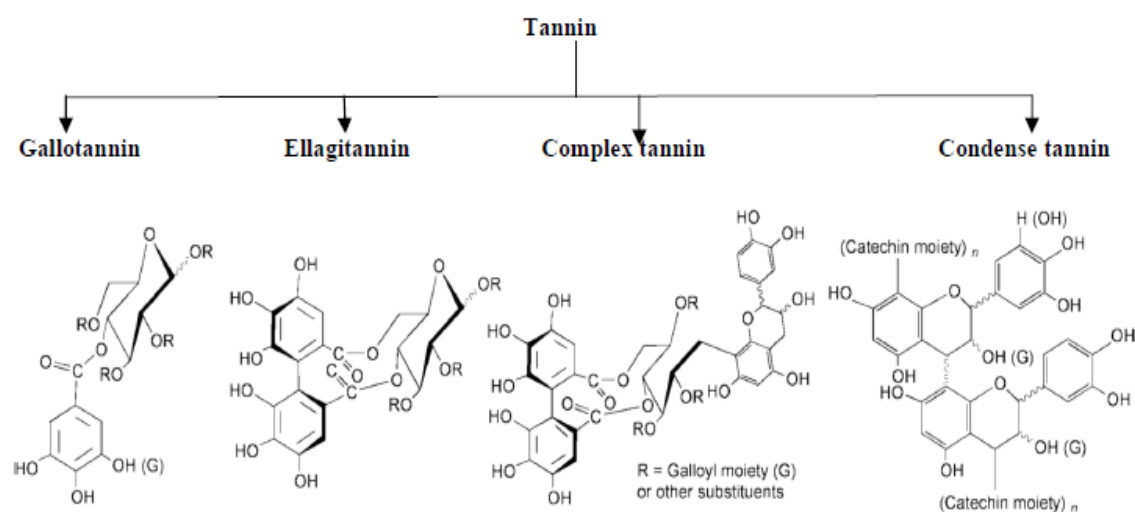
Τα φλαβονοειδή έχουν αποκτήσει την πρόσφατη προσοχή λόγω των αντιμικροβιακών, κυτταροτοξικών, αντιφλεγμονώδων δράσεων της ικανότητάς τους να δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία μπορεί να προστατεύσουν το ανθρώπινο σώμα από τις ελεύθερες ρίζες. Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν ως αντιοξειδωτικά εξαρτάται από τη μοριακή δομή τους τη θέση των ομάδων υδροξυλίου και άλλα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που μετατρέπουν τη χημική δομή των φλαβονοειδών σημαντική για την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητες. Αφ

ετέρου φλαβονοειδή όπως η λουτεολίνη και οι κατεχίνες, είναι από τα καλύτερα αντιοξειδωτικά.[¹⁹][²⁰].

1.4.6. Τανίνες

Από χημική άποψη είναι δύσκολο να καθοριστεί η έννοια τανίνες δεδομένου ότι ο όρος περιλαμβάνει μερικά πολύ διαφορετικά ολιγομερή και πολυμερή [²¹], [²²].

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι τανίνες είναι μια ετερογενής ομάδα υψηλού μοριακού βάρους πολυφαινολικών ενώσεων με την ικανότητα να σχηματίζουν αναστρέψιμα και μη αναστρέψιμα (reversible) σύμπλοκα με πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη, κλπ.), αλκαλοειδή, νουκλεϊκά οξέα, μέταλλα, κλπ [²³], [²⁴], [²⁵]. Με βάση δομικών χαρακτηριστικών τους είναι δυνατό να διαιρεθούν οι τανίνες σε τέσσερις ομάδες [²⁶], [²⁷], [²⁸]



Σχήμα 1.3. Ταξινόμηση τανινών

Στην ιατρική, ιδίως σε Ασιάτες (Ιάπωνες και Κινέζοι) φυσική θεραπεία, η τανίνη που περιέχουν τα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται ως στυπτικά, διουρητικά, ενάντια στο έλκος του δωδεκαδακτύλου [²⁹], και ως αντιφλεγμονώδη, αντισηπτικά, αντιοξειδωτικά και αιμοστατικά φαρμακευτικά προϊόντα [³⁰]. Τανίνες χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία χρωστικών ουσιών, όπως βαφές και επίσης στην παραγωγή μελανιών. Στη βιομηχανία τροφίμων τανίνες χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό κρασιού, μπύρας, καθώς και χυμών φρούτων. [³¹], [³²].

1.4.7. Αλκαλοειδή

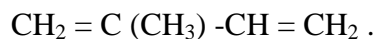
Αλκαλοειδή είναι φυσικά προϊόντα που περιέχουν ετεροκυκλικά άτομα αζώτου, και είναι βασικού χαρακτήρα. Το όνομα τους χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει οποιαδήποτε βάση που περιέχει άζωτο [33]. Τα αλκαλοειδή είναι σύνθετα φυσικά προϊόντα που προέρχονται από ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ζώων, των φυτών, τα βακτήρια και τους μύκητες. Τα αλκαλοειδή περιλαμβάνουν μια τέτοια ποικιλία μοριακής δομής τους ώστε η κατάταξη τους να είναι δύσκολη. Ωστόσο, η καλύτερη προσέγγιση στο πρόβλημα είναι ο διαχωρισμός τους σε οικογένειες, ανάλογα με τον τύπο του ετεροκυκλικού δακτυλίου που υπάρχει στο μόριο [34].

Τα αλκαλοειδή έχουν δράση κατά των μικροοργανισμών (αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση) και επίσης κατά άλλων φυτών με τη βοήθεια των ενεργών χημικών ουσιών [35]. Τα αλκαλοειδή έχουν πολλές φαρμακολογικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένων αντιυπερτασική δράση, αντιαρρυθμική δράση, ανθελονοσιακή δραστηριότητα [36]. Ορισμένα αλκαλοειδή έχουν διεγερτικές ιδιότητες, όπως καφεΐνη, νικοτίνη, και η μορφίνη που χρησιμοποιείται ως αναλγητικό.

1.4.8. Τερπενοειδή

Τα τερπένια (terpenes) είναι μια μεγάλη και ποικίλη κατηγορία υδρογονανθράκων, που παράγεται κυρίως από μεγάλη ποικιλία φυτών. Αν τερπένια τροποποιηθούν χημικά, είτε μέσω οξείδωσης είτε με αναδιάταξη του βασικού σκελετού, προκύπτουν τα τερπενοειδή. Τα τερπενοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών προϊόντων τα περισσότερα από τα οποία έχουν πολύ-κυκλικές δομές που διαφέρουν το ένα από το άλλο ανάλογα με τις λειτουργικές ομάδες. Αυτοί οι τύποι των φυσικών λιπιδίων μπορούν να βρεθούν σε κάθε κατηγορία έμβιων όντων, και ως εκ τούτου, θεωρείται ως η μεγαλύτερη ομάδα των φυσικών προϊόντων [37]. Πολλά από τα τερπενοειδή εμφανίζουν εμπορικό ενδιαφέρον, λόγω της χρήσης τους στον καθορισμό της γεύσης και του αρώματος σε τρόφιμα και καλλυντικά [38]. Τα τερπένια είναι ευρέως

διαδεδομένα στη φύση, κυρίως σε φυτά ως συστατικά των αιθέριων ελαίων κυρίως είναι το ισοπρένιο,



Το δομικό στοιχείο όλων των τερπενίων είναι μια μονάδα ισοπρενίου. Ως εκ τούτου, έχουν μοριακό τύπο (C_5H_8) και ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων [39].



Σχήμα 1.4. Το ισοπρένιο αποτελεί δομική μονάδα των τερπενίων.

Μονοτερπένια :

Βιοχημική τροποποίηση των μονοτερπενίων όπως οξείδωση ή αναδιάταξη παράγουν δύο μονάδες ισοπρενίου. Τα Μονοτερπένια μπορεί να έχουν δύο τύπους δηλαδή γραμμική (μη κυκλικά) ή να περιέχουν δακτυλίους π.χ. Ευκαλυπτόλη , Limonene , Citral , καμφορά.

Διτερπένια :

Αποτελούνται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου. Υπάρχουν ορισμένα παραδείγματα από διτερπένια όπως cembrene , kahweol , taxadiene και cafestol . Ρετινόλη του αμφιβληστροειδούς, και φυτόλη είναι οι βιολογικά σημαντικές ενώσεις, ενώ χρησιμοποιούνται διτερπένια ως βάση.

Τριτερπένια :

Αποτελούνται από έξι ισοπρενικές μονάδες , π.χ. λανοστερίνης και σκουαλένιο που βρίσκονται σε φύτρο σιταριού.

Τετρατερπένια: Περιέχουν οκτώ μονάδες ισοπρενίου οι οποίες μπορεί να είναι ακυκλικές, όπως το λυκοπένιο, μονοκυκλικές και δικυκλικές.

1.4.9. Δραστικότητα τερπενίων

Μεταξύ των φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών τα τερπενοειδή είναι δομικά η πιο ποικιλόμορφη ομάδα που λειτουργούν ως άμυνα των φυτών απέναντι σε φυτοφάγα ζώα και τους φυσικούς εχθρούς τους [40]. Πολλά φυτά παράγουν πτητικά τερπένια , προκειμένου να προσελκύσουν ειδικά έντομα για την επικονίαση. Λιγότερο ασταθείς, αλλά με έντονα πικρή γεύση ή τοξικά τερπένια προστατεύουν επίσης κάποια από τα φυτά που τρώγονται από τα ζώα [41]. Επίσης τα τερπένια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ενώσεις για ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών (φυτοορμόνες). Επιπλέον, τα τερπενοειδή μπορεί να έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως anticarcinogenic (π.χ. perilla αλκοόλη) , ανθελονοσιακά (π.χ. αρτεμισινίνη), αντι- έλκους, hepaticidal ,αντιμικροβιακή ή διουρητική (π.χ. γλυκυριζίνη) δραστηριότητα.

1.4.10. Σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες είναι μια ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών. Σχηματίζουν ένα σταθερό αφρό σε υδατικά διαλύματα όπως το σαπούνι, ως εκ τούτου και το όνομα "σαπωνίνη". Χημικά, η ομάδα σαπωνίνες περιλαμβάνουν ενώσεις οι οποίες είναι γλυκοζυλιωμένα στεροειδή. Οι σαπωνίνες που ένα μόριο σακχάρου συνδέεται στη θέση C-3 ονομάζονται σαπωνίνες monodesmoside, και εκείνοι που έχουν τουλάχιστον δύο σάκχαρα, που συνδέονται στη C-3 και μία στη C-22, ονομάζονται μονοδεσμικές (bidesmoside).

1.4.11. Δραστικότητα σαπωνίνων

Ο φυσιολογικός ρόλος που έχουν οι σαπωνίνες στα φυτά δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Ενώ υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός δημοσιεύσεων που περιγράφει την ταυτοποίησή τους στο φυτά, και πολλαπλές επιδράσεις τους σε ζωικά κύτταρα και σε μύκητες και βακτήρια, μόνο λίγα απευθύνονται στη λειτουργία τους σε φυτικά

κύτταρα. Πολλές σαπωνίνες είναι γνωστό ότι είναι αντιμικροβιακές, να αναστέλλουν τη μούχλα, και προστατεύουν τα φυτά από επίθεση εντόμων. Οι σαπωνίνες μπορεί να θεωρηθούν ως μέρος των φυτών σαν αμυντικά συστήματα, και ως τέτοιοι έχουν συμπεριληφθεί σε μια μεγάλη ομάδα των προστατευτικών μορίων που βρέθηκαν σε φυτά που ονομάζεται phytoanticipins ή phytoprotectants [42]. Μείγματα σαπωνίνων που εμφανίζονται στα φυτά και στα φυτικά προϊόντα έχουν διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις. Εκτεταμένη έρευνα που έχει διεξαχθεί βρέθηκε ότι επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη, την πρόσληψη τροφής και την αναπαραγωγή σε ζώα [43][44][45].

Αναφορές

- ¹ Hasler C.M., Blumberg J.B.: “Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology”, J. of Nutrition 129: 756-75S (1999).
- ² Gibson E.L., Wardel J., Watts C.J. :“Fruit and Vegetable Consumption, Nutritional Knowledge and Beliefs in Mothers and Children”, Appetite 31: 205-228 (1998).
- ³ Meagher E, Thomson C. “Vitamin and Mineral Therapy”, In Medical Nutrition and Disease, 2nd ed., G Morrison and L Hark, Malden,Massachusetts: Blackwell Science Inc, 33-58 (1999).
- ⁴ Mamta S., Jyoti S., Rajeev N., Dharmendra S., Abhishek G. : “Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, Phytochemistry of Medicinal Plants”, IC Journal No: 8192 Volume 1 Issue 6, 168-182, (2000).
- ⁵ King A., Young G.: “Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals”, Journal of the American Dietetic Association 24: 213-218 (1999).
- ⁶ Hamburger M., Hostettmann K.: “Bioactivity in Plants: The Link between Phytochemistry and Medicine”, Phytochemistry 30: 3864-3874 (1991).
- ⁷ Akunyili D.N.: “The role of regulation of medicinal plants and phytomedicine in socio-economic development”, AGM/SC of the Nigerian Society of Pharmacognosy. Abuja, 1-. (2003).
- ⁸ Hahn N.I.: “Is Phytoestrogens Nature’s Cure for What Ails Us A Look at the Research”, Journal of the American Dietetic Association 98: 974-976 (1998).

- ⁹ Walton N.J., Mayer M.J., Narbad A.: “Molecules of Interest: Vanillin”, *Phytochemistry* 63: 505-515 (2003).
- ¹⁰ Dai J., Mumper R.: “Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties”, *Molecules* 15: 7313-7352 (2010).
- ¹¹ Balasundram N., Sundram K., Saman S.: “Phenolic Compounds in Plants and Agriindustrial by- Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses”, *Food Chemistry* 99: 191-203 (2006).
- ¹² Chakraborty D., Dey S.: “Phenolic acids act as signaling molecules in plant–microbe symbioses”, *Plant Signal Behav* 5: 359-368 (2010).
- ¹³ Battisti V., Maders L.D., Bagatini M.D., Santos K.F., Spanevello R.M., Maldonado P.A., Brulé A.O., Araújo Mdo C., Schetinger M.R., Morsch V.M.: “Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients”, *Clin Biochem* 41: 511-518 (2008).
- ¹⁴ Lafay S., Gil-Izquierdo A.: “Bioavailability of phenolic acids”, *Phytochemical Reviews* 7: 301-311 (2008).
- ¹⁵ Gryglewski R.J., Korbut R., Robak J.: “On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids”, *Biochemical Pharmacology* 36: 317-321 (1987).
- ¹⁶ Pridham J.B.: “In: Phenolics in Plants in Health and Disease”, Pergamon Press, New York 34-35 (1960).
- ¹⁷ Harborne J.B., Baxter H.: “The handbook of natural flavonoids”, Volume 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons, (1999).
- ¹⁸ Pretorius J.C.: “Flavonoids: A Review of Its Commercial Application Potential as Anti-Infective Agents”, *Current Medicinal Chemistry- Anti Infective Agents* 2: 335-353 (2003).
- ¹⁹ Tapas A.R., Sakarkar D.M., Kakde R.B.: “Flavonoids as Nutraceuticals: A Review”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7: 1089-1099. (2008).
- ²⁰ Atmani D., Nassima C., Dina A., Meriem B., Nadjat D., Hania B.: “Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity”, *Current Nutrition & Food Science* 5: 225-237. (2009).
- ²¹ Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview”, *Methods Enzyme molecule* 186:1-85 (1990).
- ²² Harborne J.B.: “ Pharmacological and other beneficial effects of antinutritional factors in plants - A review”, *Journal Home*, vol.7, No25, (2008).

- ²³ Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N.: “Analysis of condensed tannins: a review”, *Animal Feed ScienceTechnology* 91: 21-40 (2001).
- ²⁴ Vansoest P.J.: “Nutritional ecology of the ruminant, 2nd ed”, Cornell Univ Press. Ithaca, NY 476 (1994).
- ²⁵ Mueller-harvey I., Mcallan A.B.: “Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. Advances in plant cell biochemistry and biotechnology”, Vol.1 Morrison IM ed. JAI Press Ltd, London (UK) 151-217 (1992).
- ²⁶ Mangan J.L.: “Nutritional effects of tannins in animal feeds”, *Nutrition Research and Reviews* 1: 209-231 (1988).
- ²⁷ Mc-Leod M.N.: “Plant tannins: Their role in forage quality”, *Nutrition Abstract Review* 44: 803-812 (1974).
- ²⁸ Mole S., Waterman P.G. :“Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation”, *Phytochemistry* 26: 99-102 (1987).
- ²⁹ De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A.: “Condensed vegetables tannins: biodiversity in structure and biological activities”, *Biochemical System Ecology* 27: 445–59 (1999).
- ³⁰ Dolaro P., Luceri C., De Filippo C., Femia A.P., Giovannelli L., Carderni G., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A.: “Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats”, *Mutation Research* 591: 237–46 (2005).
- ³¹ Palavy K., Priscilla M.D. :“Standardisation of selected Indian medicinal herbal raw material containing polyphenols as major constituents”, *Journal Pharmaceutical sciences* 68: 506-509 (2006).
- ³² Mueller-Harvey I.: “Tannins: their nature and biological significance. In: Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding”, Nottingham Univ Press (UK) 17-70 (1999).
- ³³ Mueller-Harvey I., McAllan A.B. Tannins. :“Their biochemistry and nutritional properties. In: Advances in plant cell biochemistry and biotechnology”, Morrison IM, ed. JAI Press Ltd, London (UK) Vol. 1 :151-217 (1992).
- ³⁴ Krishnan R., Chandravadana M.V., Ramachander P.R., Bharathkumar H.: “Inter-relationships between growth and alkaloid production in *Catharanthus roseus*”, *G. Don. Herba Hungarica* 22: 47-54 (1983).

- ³⁵ Molyneux R.J., Nash R.J., Asano N.: “Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives”, Vol. 11, Pelletier SW, ed. Pergamon, Oxford 30. (1996).
- ³⁶ Wink M., Schmeller T., Latz-Briining B.: “Modes of action of allelochemical alkaloids: Intraction with neuroreceptors, DNA and other molecular targets”, Journal of chemical Ecology 24: 1888- 1937 (1998).
- ³⁷ Elbein A.D., Molyneux R.J.: “Comprehensive Natural Products Chemistry”, Vol. 3, Barton D and Nakanishi K, ed. Amsterdam 129 (1999).
- ³⁸ Harborne J.B., Tomas-Barberan F.A.: “Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids”, Clarendon, Oxford, (1991).
- ³⁹ Langenheim J.H.: “Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles”, Journal of Chemical Ecology 20: 1223- 1280 (1994).
- ⁴⁰ McCaskill D., Croteau R.: “Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants”, Trends Biotechnology 16: 349–355 (1998).
- ⁴¹ Degenhardt J., Gershenzon J., Baldwin I.T., Kessler A.: “Attracting friends to feast on foes: Engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies”, Current Opinion Biotechnology 14: 169–176 (2003).
- ⁴² Lacaille-Dubois M.A., Wagner H. :“Bioactive saponins from plants: An update. In Studies in Natural Products Chemistry Atta-Ur-Rahman”, Elsevier Science. Amsterdam 21: 633-687 (2000).
- ⁴³ Morrissey J.P., Osbourn A.E.: “Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis”, Microbiological and Molecular Biological Reviews 63: 708–724 (1999).
- ⁴⁴ Takechi M., Matsunami S., Nishizawa J., Uno C., Tanaka Y.: “Haemolytic and antifungal activities of saponins or anti-ATPase and antiviral activities of cardiac glycosides”, Planta Medica 65: 585–586 (1999).
- ⁴⁵ Traore F., Faure R., Ollivier E., Gasquet M., Azas N., Debrauwer L., Keita A., Timon-David P., Balansard G.: “Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*”, Planta Medica 66: 368–37 (2000).

Κεφάλαιο 2

Η συμβολή των φυτοχημικών στην χημειοπροφύλαξη

2.1 Εισαγωγή στην έννοια της χημειοπροφύλαξης

Η χημειοπροφύλαξη (chemoprevention) αναφέρεται στη χρήση φυσικών προϊόντων για την αναστολή, την αναστροφή ή την επιβράδυνση της καρκινογένεσης. Πολλά φυτοχημικά που προέρχονται από εδώδιμα φυτά έχει αναφερθεί ότι παρεμβαίνουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης και διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί.

Ο καρκίνος είναι ένα αυξανόμενο πρόβλημα υγείας σε όλο τον κόσμο, ιδιαίτερα με τη σταθερή αύξηση του προσδόκιμου ζωής, την αύξηση της αστικοποίησης και αλλαγές στην περιβαλλοντικές συνθήκες. Σύμφωνα με μια πρόσφατη έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) , υπάρχουν σήμερα περισσότερα από 10 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου ετησίως σε όλο τον κόσμο. Έχει υπολογιστεί ότι πάνω από τα δύο τρίτα των ανθρώπινων καρκίνων θα μπορούσε να προληφθεί μέσω της κατάλληλης τροποποίησης του τρόπου ζωής. Έχει επίσης αναφερθεί ότι κατά μέσο όρο το 35 % της ανθρώπινης θνησιμότητας από καρκίνο οφείλεται σε κακές διατροφικές συνήθειες [1]. Αν και το ακριβές ποσοστό είναι αβέβαιο, υπάρχουν αρκετά στοιχεία από επιδημιολογικές, κλινικές και εργαστηριακές μελέτες που συνδέουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου με τους διατροφικούς παράγοντες. Ένα ευρύ φάσμα των ουσιών που προέρχονται από τη διατροφή έχουν βρεθεί ότι διεγείρουν την ανάπτυξη, την αύξηση και την εξάπλωση των όγκων σε πειραματόζωα, και τον μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων σε κακοήγη. Έτσι, πολλά διαιτητικά συστατικά μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο της ανάπτυξη του καρκίνου, αλλά υπάρχουν και εργαστηριακές μελέτες που υποστηρίζουν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της τακτικής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών και

του κινδύνου συγκεκριμένων καρκίνων (American Cancer Society, American Institute of Cancer Research (AICR) και National Cancer Institute (NCI)).

Με βάση επιδημιολογικές μελέτες, έχουν εντοπιστεί περίπου 35 φυτικά τρόφιμα που έχουν προληπτικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Αυτά περιλαμβάνουν το σκόρδο, σόγια, τζίντζερ, κρεμμύδι, κourkouμά, τις ντομάτες και τα σταυρανή λαχανικά (το μπρόκολο, το λάχανο, το κουνουπίδι και λαχανάκια Βρυξελλών). Πολλές πληθυσμιακές μελέτες έχουν αναδείξει την ικανότητα των μακροθρεπτικών (macronutrients) συστατικών (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά και φυτικές ίνες) και μικροθρεπτικά συστατικά (micronutrients) (αντιοξειδωτικές βιταμίνες και ιχνοστοιχεία), που περιέχονται σε λαχανικά και φρούτα να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου. Τα πιο συναρπαστικά ευρήματα έχουν επιτευχθεί με τις αντιοξειδωτικές βιταμίνες οι οποίες βρίσκονται σε σκούρα, φυλλώδη πράσινα λαχανικά και κίτρινα/ πορτοκαλί φρούτα και λαχανικά. Ωστόσο τα φυτά περιέχουν πολλές χημικές ουσίες, εκτός από τα μικροθρεπτικά συστατικά που θα μπορούσαν επίσης να είναι χρήσιμες στην πρόληψη.

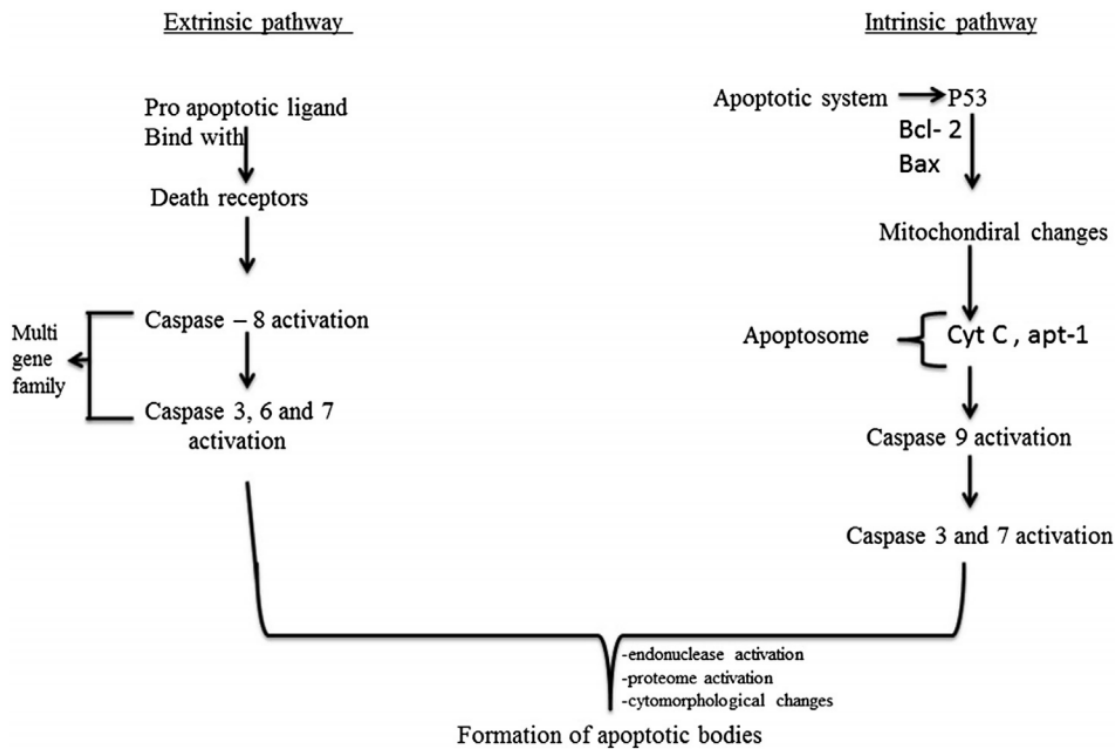
Στα μέσα της δεκαετίας του 70, επινοήθηκε από τον Michael Sporn ο όρος «χημειοπροστασία» υποδεικνύοντας την επιβράδυνση της έναρξης των καρκινικών όγκων με σχετικώς μη τοξικές χημικές ενώσεις. Το National Cancer Institute έχει ήδη περισσότερα από 65 φυτοχημικά υπό μελέτη σε Φάση I, II και III.

Η καρκινογένεση γενικά αναγνωρίζεται ως μία διαδικασία πολλών σταδίων στην οποία συμβαίνουν διακριτές μοριακές και κυτταρικές αλλοιώσεις. Από τη μελέτη της πειραματικά επαγόμενης καρκινογένεσης σε τρωκτικά, η ανάπτυξη όγκων θεωρείται ότι αποτελείται από 3 στάδια - την έναρξη του όγκου, την προώθηση και την εξέλιξη.

Η έναρξη είναι μια ταχεία και μη αναστρέψιμη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μια αλυσίδα των εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών γεγονότων. Αυτά περιλαμβάνουν την αρχική έκθεση σε έναν καρκινογόνο παράγοντα, τη μεταφορά του σε όργανα και ιστούς, μέσω μεταβολικής ενεργοποίησης και η ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA του κυττάρου-στόχου. Σε αντίθεση με την έναρξη, η προώθηση του όγκου θεωρείται ότι είναι μια σχετικά μακρά και αναστρέψιμη διαδικασία στην οποία έχουμε σημαντική συσσώρευση προνεοπλαστικών κυττάρων. Η εξέλιξη, που είναι το τελικό στάδιο, περιλαμβάνει την ανάπτυξη ενός όγκου με μεταστατικό δυναμικό.

Γενικά, αυτοί οι κυτταρικοί μηχανισμοί εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως η φυσικοχημεία του περιβάλλοντος, το φυσιολογικό/οξειδωτικό στρες και την δράση

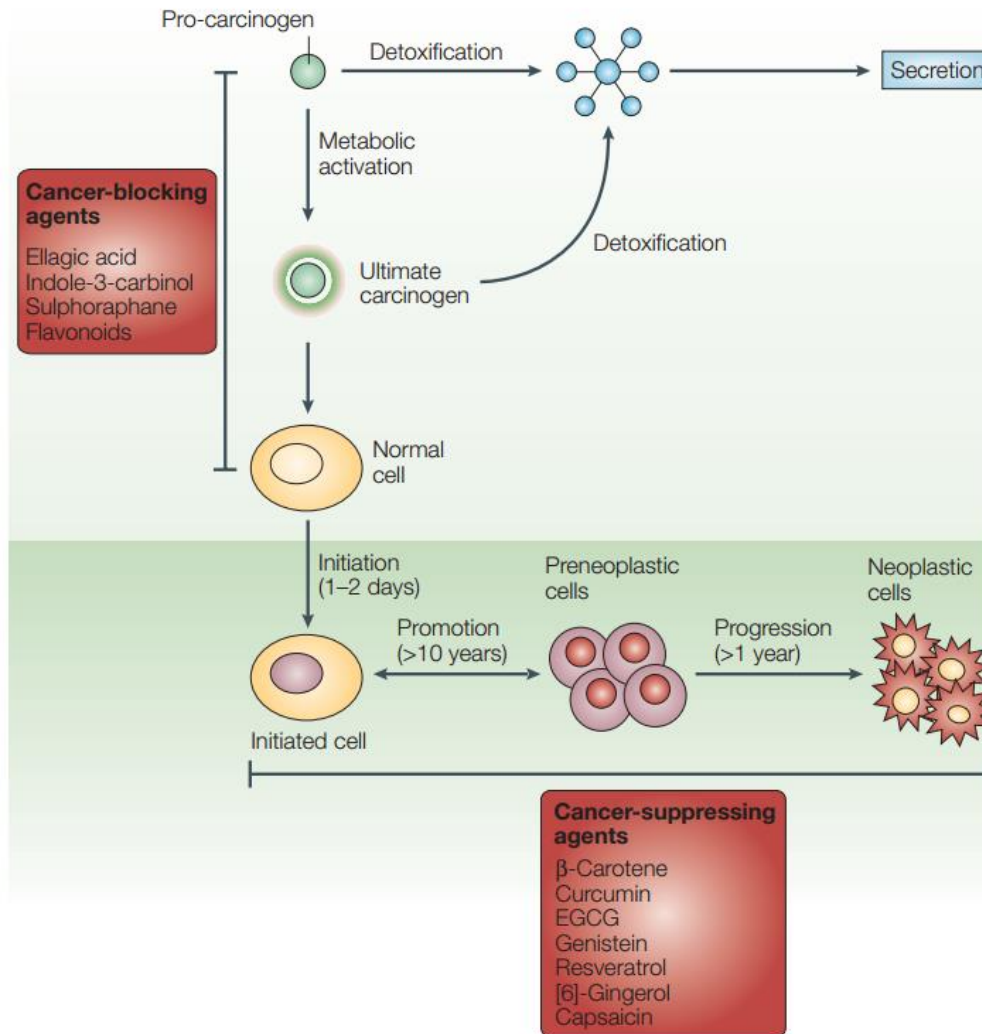
των ενζυμικών συμπαραγόντων (co-factors) του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 που δρα μέσω δύο διαδικασιών απόπτωσης: εσωτερικής και εξωτερικής [2][3].



Σχήμα 2.1. Ο μηχανισμός της απόπτωσης [3]

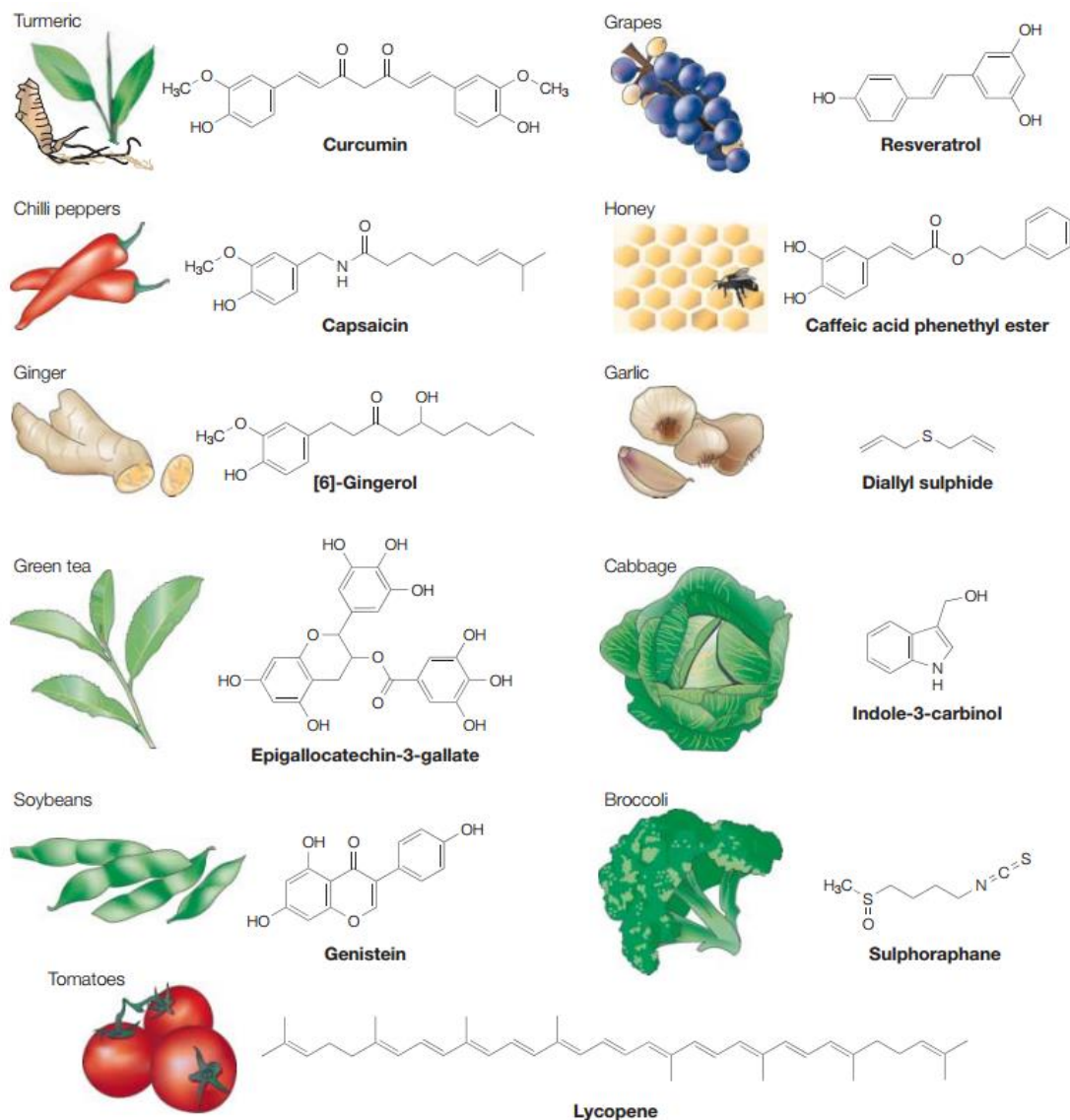
Σύμφωνα με τη ταξινόμηση που πρότεινε ο Lee Wattenberg [4], οι χημειοπροληπτικοί παράγοντες χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: αναστολής και καταστολής.

Οι παράγοντες αναστολής εμποδίζουν τις καρκινογόνες ουσίες είτε μέσω μεταβολικής ενεργοποίησης ή αλληλεπιδρώντας με μακρομόρια (DNA, RNA και πρωτεΐνες). Οι παράγοντες καταστολής, από την άλλη πλευρά, αναστέλλουν τον σχηματισμό κακοήθων κυττάρων στο στάδιο της προώθησης ή και στο στάδιο της εξέλιξης.



Σχήμα 2.2. Αναστολή ή καταστολή καρκινογένεσης από φυτοχημικά [5]

Το Σχήμα 2.2 απεικονίζει τις χημικές δομές αντιπροσωπευτικών φυτοχημικών με χημιοθεραπευτικό δυναμικό.



Σχήμα 2.3. Γνωστά χημιοθεραπευτικά

Πολλά φυτοχημικά που προσλαμβάνονται μέσω διαίτης έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλουν την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB (της πρωτεΐνης που καθορίζει την μεταγραφή του DNA) στα κακοήθη κύτταρα.

Η curcumin, μια κίτρινη χρωστική ουσία που είναι παρούσα στις ρίζες του φυτού *Curcuma Longa L.* και συναφών ειδών είναι ένα από τα φυτοχημικά που έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα. Έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την προαγωγή του όγκου σε ένα μοντέλο καρκινογένεσης του δέρματος σε πειραματόζωα [6] μέσω της αναστολής της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και του παράγοντα NF-κB. Η τζιντζερόλη μια φαινολική ουσία που είναι υπεύθυνη για την πικάντικη γεύση του τζιντζερ (*Zingiber officinale Roscoe*) - αναφέρθηκε ότι αναστέλλει την προαγωγή όγκων σε δέρμα ποντικού [7]. Η καψαϊκίνη - ένα πικάντικο συστατικό καυτερής πιπεριάς, τσίλι

(*Capsicum annuum* L.) - πιστεύεται ότι δρα ως συν-καρκινογόνος παράγοντας σε πειραματόζωα λόγω των ερεθιστικών ιδιοτήτων της, αλλά και άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ένωση έχει χημειοπροστατευτικά αποτελέσματα [8][9] τόσο σε δερματικούς καρκίνους όσο και in vitro σε κυτταροκαλλιέργειες HL-60 λευχαιμίας [10]. Η επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) είναι μία αντιοξειδωτική και χημειοπροληπτική πολυφαινόλη που βρίσκεται σε αφθονία στο πράσινο τσάι. Έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την κακοήγη μετατροπή του PMA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) που είναι προ-καρκινικός παράγοντας [11]. Η ρεσβερατρόλη είναι συστατικό που υπάρχει στα σταφύλια (*Vitis vinifera*) και είναι βασικό αντιοξειδωτικό συστατικό του κόκκινου κρασιού το οποίο πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνο για το λεγόμενο «γαλλικό παράδοξο» όπου η κατανάλωση κόκκινου κρασιού έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα ποσοστά θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα και ορισμένους καρκίνους. Η θεραπεία με ρεσβερατρόλη ανέστειλε τον καταλυτικό κύκλο του PMA σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού [12]. Επίσης αποδείχθηκε ότι έχει αντινεοπλαστική δράση in vitro σε κύτταρα MCF-7 [13].

Υπάρχει σε εξέλιξη μεγάλη έρευνα στο τομέα της χημειοπροφύλαξης του καρκίνου μέσω της διατροφής [14] και έχει βρεθεί ότι τα φαινολικά παράγωγα προερχόμενα από φυτά ή βότανα δρουν μέσω πολλαπλών οδών εναντίον του καρκίνου:

1. Δρουν ανασταλτικά εναντίον των ελευθέρων ριζών (reactive oxygen species, ROS) όπως τα ανιόντα υπεροξειδίου, τα υδρόξυ-ανιόντα, τα νιτρικά οξείδια και υδροξείδια κλπ. Κυριότερα παράγωγα με αντιοξειδωτική δράση είναι το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, φλαβονοειδή όπως η κατεχίνη, ταννίνες και κινόνες [15][16][17].
2. Δρουν ανασταλτικά ενάντια καρκινικών όγκων εμποδίζοντας την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με καρκινογένεση. Κυριότεροι αντιπρόσωποι της κατηγορίας είναι παράγωγα φαινολικών οξέων (hydroxytyrosol), φλαβονοειδή (EGCG, apigenin, hesperetin), ταννίνες (proanthocyanidins), κουρκουμίνη κλπ [18][19][20].
3. Ενισχύουν το αμυντικό σύστημα του οργανισμού και παρεμποδίζουν την ανασοκαταστολή μέσω της καταστολής φλεγμονοδών και προ-φλεγμονοδών παραγόντων όπως κυτοκίνες και η λιποξυγενάση. Το ροσμαρινικό οξύ έχει προταθεί ως σημαντικός παράγοντας της κατηγορίας αυτής [21].

4. Αναστέλλουν την λειτουργία ενζύμων μπλοκάροντας με τον τρόπο αυτό την δράση καρκινικών παραγόντων όπως COX-2, xanthine oxidase (XO), protein kinase C (PKC), και protein tyrosine kinase (PTK). Σημαντική είναι η δράση του καφεϊκού οξέος όπως και των φλαβονοειδών και κινονών [22][23].
5. Φαινολικά οξέα και άλλα παράγωγα όπως η ευγενόλη, προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [24].
6. Ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των οιστρογόνων και την παραγωγή στεροειδών ορμονών [25].
7. Έχουν αντιμικροβιακές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες ενώ μπορούν να καταστείλουν την έκφραση του HIV [26].

Δεν είναι τυχαίο λοιπόν ότι η χημειοπροφύλαξη με βρώσιμα φυτοχημικά θεωρείται ως μια λύση άμεσα εφαρμοστέα, αποδεκτή και προσιτή από τον γενικό πληθυσμό για τον έλεγχο του καρκίνου με χαμηλό κόστος. Αν και τα αποτελέσματα είναι ακόμα σε στάδιο έρευνας πολύ πιστεύουν στον όρο «nutragenomics» ως τον κατάλληλο για να περιγράψει την έρευνα που αναπτύσσεται στη διαιτητική πρόληψη του καρκίνου σε συνάρτηση με τις εξελίξεις στη γενετική και την μοριακή επιδημιολογία της καρκινογένεσης.

Αναφορές

- ¹ Doll R. & Peto R. : “The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today”, J. N. Cancer Inst.66, 1191–1308 (1981).
- ² Zhao-Zhin L, Jia-En LIJ, Cheng-Teng NG, Lin-Yue Yung L, Bay Boon-Huat. Gold nanoparticles in cancer therapy. Acta Pharm Sin. 32 (2011).
- ³ Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. A case study- Regulation and functional mechanisms of cancer cells and control its activity using plants and their derivatives. J Pharm Res 6(8), 884-892 (2013).
- ⁴ Wattenberg L. W.: “Chemoprevention of cancer”, Cancer Res. 45, 1–8 (1985).
- ⁵ Surh Y. “Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances”, Mut. Res. 428, 305–327 (1999).
- ⁶ Plummer S. M. et al.: “Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-B activation via the NIK/IKK signalling complex”, Oncogene 18, 6013–6020 (1999).

- ⁷ Park K. K., Chun K. S., Lee J. M., Lee S. S. & Surh Y. J.: “Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice”, *Cancer Lett.* 129, 139–144 (1998).
- ⁸ Surh Y. J. & Lee S. S.: “Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential”. *Life Sci.* 56, 1845–1855 (1995).
- ⁹ Surh Y. J. & Lee S. S.: “Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen”, *Food Chem. Toxicol.* 34, 313–316 (1996).
- ¹⁰ Han S. S., Keum Y. S., Chun K. S. & Surh Y. J.: “Suppression of phorbol ester-induced NF- κ B activation by capsaicin in cultured human promyelocytic leukemia cells”, *Arch. Pharm. Res.* 25, 475–479 (2002).
- ¹¹ Nomura M., Ma W., Chen N., Bode A. M. & Dong Z.: “Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF- κ B activation by tea polyphenols, (–)-epigallocatechin gallate and theaflavins”, *Carcinogenesis* 21, 1885–1890 (2000).
- ¹² Subbaramaiah K. et al.: “Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol estertreated human mammary epithelial cells”, *J. Biol. Chem.* 273, 21875–21882 (1998).
- ¹³ Banerjee S., Bueso-Ramos C. & Aggarwal B. B.: “Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9”, *Cancer Res.* 62, 4945–4954 (2002).
- ¹⁴ Greenwald P: “Chemoprevention of cancer”.*Sci Am* 275,96–99, (1996).
- ¹⁵ Fresco P., Borges F., Diniz C., and Marques M.: “New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols”, *Med Res Rev* 26, 747–766, (2006).
- ¹⁶ Han X.Z., Shen T., and Lou H.X.: “Dietary polyphenols and their biological significance”, *Int J Mol Sci*8,950–988, (2007).
- ¹⁷ Heim K.E., Tagliaferro A.R., and Bobilya D.J.: “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism, and structure-activity relationships”, *J Nutr Biochem* 13, 572–584, 2002
- ¹⁸ Smith S.H., Tate P.L., Huang G., Magee J.B., Meepagala K.M., et al.: “Antimutagenic activity of berry extracts”, *J Med Food* 7,450–455, (2004).

- ¹⁹ Chillemi R., Sciuto S., Spatafora C., and Tringali C.: “Anti-tumor properties of stilbene-based resveratrol analogues: Recent results”, *Nat Prod Comm* 2, 499–513, (2007).
- ²⁰ Asche C.: “Antitumour quinines”, *Mini-Rev Med Chem* 5, 449–467, (2005).
- ²¹ Shan B., Cai Y.Z., Sun M., and Corke H.: “Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents”, *J Agric Food Chem.* 53, 7749–7759, (2005).
- ²² Raghavendra M.P., Kumar P.R., and Prakash V.: “Mechanism of inhibition of rice bran lipase by polyphenols—a case study with chlorogenic acid and caffeic acid”, *J Food Sci.* 72, E412–E419, (2007).
- ²³ Shimada T.: “Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons”, *Drug .Pharmacokin.* 21, 257–276, (2006).
- ²⁴ Ghosh R., Nadiminty N., Fitzpatrick J.E., Alworth W.L., Slaga T.J., et al.: “Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity”, *J. Biol. Chemistry* 280, 5812–5819, (2005).
- ²⁵ Mense S.M., Hei T.K., Ganju R.K., and Bhat H.K.: “Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanisms of action”, *Environ. Health Persp.* 116, 426–433, (2008).
- ²⁶ Lin Y.M., Anderson H., Flavin M.T., Pai Y.H., Mata-Greenwood E, et al.: “In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*”, *J Nat Prod.* 60, 884–888, (1997).

Κεφάλαιο 3

Rosmarinus officinalis

3.1. Εισαγωγή

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* Linn. Οικ. *Lamiaceae*) είναι μία αειθαλής και πολυετής πόα με ύψος περίπου ένα μέτρο. Τα λουλούδια έχουν χρώμα κυανό-ιώδες και σε ορισμένες ποικιλίες λευκό ενώ τα φύλλα είναι σκούρα πράσινα, τα οποία είναι μικρά με άκρα γυρισμένα προς τα πίσω. Κάτω από αυτά τα στρογγυλεμένα άκρα υπάρχουν μικροί αδένες που περιέχουν αρωματικά έλαια. Φύεται αυθόρμητα κατά μήκος της βόρειας και της νότιας ακτής της θάλασσας της Μεσογείου [1][2][3]. Έχει καλλιεργηθεί από τα αρχαία χρόνια στην Αγγλία, τη Γερμανία, τη Γαλλία, τη Δανία και σε άλλες σκανδιναβικές χώρες, της Κεντρικής Αμερικής, στη Βενεζουέλα και τις Φιλιππίνες. Εισήχθη στη Βρετανία από τους Ρωμαίους και εξακολουθεί να είναι ιδιαίτερα αγαπητό σήμερα από τους Ιταλούς και τους Βρετανούς, οι οποίοι το χρησιμοποιούν συχνά στη μαγειρική τους. Στην αρχαία Ελλάδα και τη Ρώμη το δενδρολίβανο πιστεύεται ότι ενίσχυε την μνήμη, και είναι γνωστό ως το βότανο της μνήμης. Ήταν ένα σημαντικό βότανο του φαρμακοποιού κατά τη διάρκεια της Αναγέννησης. Ο Ιπποκράτης, ο Γαληνός, ο Διοσκουρίδης χρησιμοποιούσαν το δενδρολίβανο για ηπατικά προβλήματα [4].

Το δενδρολίβανο είναι ένα από τα αρχαιότερα φυτά λατρείας, που συνδέονταν στενά με την αγάπη και το γάμο, τη γέννηση και το θάνατο. Στην Αγγλία και στη Γερμανία εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε νυφικές ανθοδέσμες και ένα ελατήριο τοποθετείται στη βάση ενός νεογέννητου παιδιού για την προστασία έναντι των επιρροών και των κακών δυνάμεων. Τοποθετείται επίσης σε βιβλία και ανάμεσα σε ρούχα για να τα προστατεύει από τους σκώρους και να παράγει ένα ευχάριστο άρωμα. Το όνομα του φυτού αναφέρεται ότι προέρχεται από μια λατινική λέξη "Rosmarinus" που σημαίνει "Δρόσο της Θάλασσας" (Ros = Δροσιά και Marinus =

θάλασσα). "Dew of the Sea" (Ros=Dew; Marinus=Sea). Υπάρχουν περισσότερες από 20 ποικιλίες των φυτών δενδρολίβανου.



Εικόνα 1. *Rosmarinus officinalis* (Βοτανικός κήπος Αργοστολίου Κεφαλληνίας)

Είναι ένα κοινό φυτό του νοικοκυριού που χρησιμοποιείται για τον αρωματισμό των τροφίμων, των ποτών, καθώς και στα καλλυντικά. Στη λαϊκή ιατρική χρησιμοποιείται ως αντισπασμωδικό στον κωλικό νεφρού, στην ανακούφιση των αναπνευστικών διαταραχών και για την τόνωση της ανάπτυξης των μαλλιών.

3.2 Χημική σύσταση

3.2.1. Εκχύλισμα

Το υδατικό εκχύλισμα του δενδρολίβανου αναλύθηκε για τον προσδιορισμό των δραστικών συστατικών. Η χημική σύνθεση του αποκάλυψε την παρουσία πολλών

ουσιών με κυριότερες το ροσμαρικό οξύ (RA), το καφεϊκό οξύ (CA) ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση χλωρογενικό οξύ, carnosolic οξύ, ροσμανόλη, carnosol και διαφορετικές diterpenes, rosmariquinone, ουρσολικό οξύ, glucocolic οξύ και το αλκαλοειδές rosmarinic acid όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1.

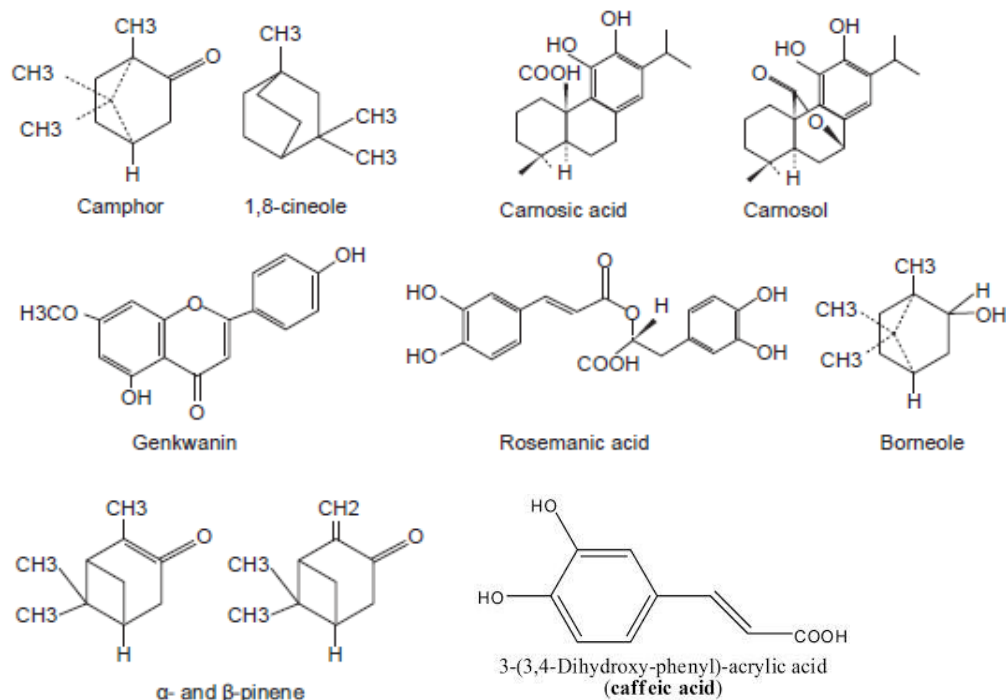
Πίνακας 3.1. Φαινολικά συστατικά του δενδρολίβανου που ταυτοποιήθηκαν από τους Mulinacci et al.^[5] (Glu: glucose, gluc: glucuronic acid, rha: rhamnose)

Ενώσεις	RT (min)	mw	MS (-)	MS(+)
Caffeic acid	7.7	180	135, 179	181
Flavonoid monoglicoside	13.4	478 (316)	315, 477	317, 479
Apigenin rha-glu	15.5	578 (270)		
Esperidin rha-glu	15.8	610 (302)	301, 609	
Diosmin rha-glu	17.4	608 (300)	299, 607	
Luteolin 7-O gluc	17.9	462 (286)	285, 461	
Ispidulin 7-O glu	18.5	462 (300)	461	
Rosmarinic acid	18.8	360	161, 197, 359, 719	
Flavonoid diglicoside	20.8	640 (316)	639	
Cirsimaritin O-glu	22.0	476 (316)	315, 475	
Flavonoid diglicoside	23.0	654 (316)	653	
Isoscutellarein 7-O-glu	23.1	462 (286)	285, 461	
Flavonoids	24–31			
Rosmanol/epirosmanol	34.4–35.1	346	283, 345	
Cirsimaritin	35.2	314	313	
Flavonoid	35.7			315
Genkwanine	38.4	284	283	285
Flavonoid	41.2	–	–	329, 351
Carnosol	41.6	330	285, 329, 659	331, 353
4'Metoxytectochrysin	42.2	298		299
Carnosic acid derivative	42.4	374		375, 397
Carnosic acid	42.8	332	287, 331	
Methyl carnosate	43.3	346	287, 331, 2	

Το έλαιο του δενδρολίβανου περιέχει εστέρες (2-6%), κυρίως βορνεόλης, σινεόλης και διάφορα τερπένια ^[6] (σχήμα 1).

Τα CA και RA είναι στο επίκεντρο της προσοχής των ερευνητών ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες. Το δενδρολίβανο αποτελεί μια από τις κύριες πηγές CA

και RA. Παρόλα αυτά και άλλα συγγενή φυτά περιέχουν τις ενώσεις αυτές όπως αναγράφεται στον Πίνακα 3.2.



Σχήμα 3.1. Μερικά από τα κύρια συστατικά του *Rosmarinus officinalis*

Πίνακας 3.2. Φυτά που περιέχουν καφεϊκό και ροσμαρικό οξύ [7]

1. <i>Anchusa officianalis L.</i>	RA
2. <i>Artemisia campestris</i>	CA
3. <i>Artemisia capillaris</i>	RA
4. <i>Artemisia montana</i>	RA
5. <i>Artemisia princeps</i>	RA
6. <i>Calendulla officianalis L</i>	CA
7. <i>Carissa spinarum</i>	CA
8. <i>Coleus blumei Benth</i>	RA
9. <i>Helianthus annuus L.</i>	CA
10. <i>Lavandula officianalis Chaix</i>	RA
11. <i>Lithospermum officianalis L.</i>	CA
12. <i>Lithospermum ruderale</i>	CA

13. <i>Lycopus europaeus L.</i>	RA
14. <i>Melissa officinalis</i>	CA,RA
15. <i>Mentha piperita</i>	RA
16. <i>Nicotiana tabacuum</i>	CA
17. <i>Olea europea L.</i>	CA
18. <i>Origanum vulgare L.</i>	RA
19. <i>Prunella vulgaris L.</i>	RA
20. <i>Pyrus comunis L.</i>	CA
21. <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	CA,RA
22. <i>Salvia aegyptiaca L.</i>	RA
23. <i>Salvia miltiorrhiza</i>	CA,RA
24. <i>Salvia officinalis L</i>	RA
25. <i>Strychnos innocua Del</i>	CA
26. <i>Strychnos stuhlmannii Gilg</i>	CA
27. <i>Thymus vulgaris L.</i>	CA

Κύρια ενεργά συστατικά είναι πτητικά έλαια που αποτελούνται από καμφένιο, καμφορά, κινεόλη, βορνεόλη, ρητίνη, ροσμαρικό οξύ και φλαβονοειδή [8][9].

3.2.2. Αιθέριο έλαιο

Τα αιθέρια έλαια του *R. officinalis*, λαμβάνονται από απόσταξη με ατμό από νοπά φύλλα και κλαδάκια, και οι αποδόσεις κυμαίνονται από 0.5 έως 1.0% [10]. Είναι σχεδόν άχρωμο έως ανοικτό κίτρινο υγρό με μία χαρακτηριστική, δροσιστική και ευχάριστη οσμή. Κύρια συστατικά που περιγράφονται για το έλαιο είναι α-πινένιο, 1,8-κινεόλη και καμφορά [11].

Οι κυριότερες δραστικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου είναι οι παρακάτω: [12]

- Μονοτερπένια. α-πινένιο 12%, β-πινένιο, καμφένιο 22%, myrcene 1.5%, alpha-phellandrene, λιμονένιο 0.5-1%, α και γ τερπινένιο, paracymene 2%.
- Μονοτερπενοειδή. linalool 0.5-1% terpine-1ol-4, a-terpineol 1.5%, borneol 3-5%, isoborneol, cis-thuyanol-4, trans-thuyanol-4, p-cymene-8-ol.
- Εστέρες τερπενίων. bornyl-actate, a-phenchyl-actate.

- Τερπενικό οξύ. 1,8-σινεόλ 30%, caryophylline-oxide, humulene-epoxide I and II.
- Κετόνες. 3-hexanon, methyl-hepteno.

3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων

Η χημική σύνθεση του αιθέριου ελαίου του δεντρολίβανου ποικίλει μεταξύ των περιφερειών και εξαρτάται κυρίως από το κλίμα, το έδαφος, την ηλικία και το στάδιο του βλαστικού κύκλου. Σημαντικές διαφορές στη χημική σύνθεση του ελαίου έχουν αναφερθεί σε σχέση με τη γεωγραφική προέλευση [13][14][15][16]. Ο χρόνος της συγκομιδής, η κατάσταση του κλαδιών και φύλλων, ο εξοπλισμός απόσταξης και ο τρόπος καλλιέργειας έχουν επίσης αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη συνολική ποιότητα του ελαίου [15].

3.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες

3.4.1 Παραδοσιακές χρήσεις του δεντρολίβανου

Καλλιεργείται για το αρωματικό λάδι του, που ονομάζεται "δεντρολίβανο" και προέρχεται από την απόσταξη ατμού από τα φρέσκα φύλλα και ανθισμένες κορυφές. Είναι ένα άχρωμο ή υποκίτρινο υγρό που έχει την χαρακτηριστική οσμή του φυτού. Είναι συστατικό για κολόνιες, τονωτικό και λοσιόν για τα μαλλιά κ.λπ. Τα φύλλα χρησιμοποιούνται για τον αρωματισμό των τροφίμων ως καρύκευμα. Από την αρχαία εποχή το δενδρολίβανο έχει χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική [17][18][19] ως αντισπασμωδικό σε κωλικό και στην ανακούφιση των αναπνευστικών διαταραχών. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως αναλγητικό, αντιρευματικό, διουρητικό, αποχρεμπτικό, και αντι-επιληπτικό. Άλλες χρήσεις είναι ως γενικό τονωτικό και σε καρδιακές παθήσεις καθώς επίσης ως εντομοκτόνο και ζιζανιοκτόνο. Εξωτερικά, είναι μια ουσία, και χρησιμοποιείται για να διεγείρει την ανάπτυξη των μαλλιών και τη θεραπεία του εκζέματος του τριχωτού της κεφαλής.

Είναι περιττό να πούμε ότι αυτές οι διαφορετικές δραστηριότητες του δενδρολίβανου έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον και το πτητικό έλαιό του, καθώς και μερικά από τα απομονωμένα συστατικά του, έχουν υποβληθεί για πολλές φαρμακολογικές έρευνες.

3.4.2 Βιολογική και Φαρμακευτική δράση

Πολλά *in vivo* και *in vitro* πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να αποδείξουν ότι τα συστατικά του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου έχουν σημαντική βιολογική δράση.

Οξυγονωμένα μονοτερπένια του αιθέριου ελαίου εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό κυτταροτοξικότητας. Ως λιπόφιλες ουσίες, περνούν διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και διαταράσσουν τη δομή τους. Σε βακτήρια, οι βλάβες της μεμβράνης σχετίζονται με την απώλεια των ιόντων και τη μείωση του δυναμικού της μεμβράνης, κατάρρευση της αντλίας πρωτονίων και εξάντληση ATP.

Τα αποτελέσματα των σχετικών μελετών έδειξαν ότι υπάρχουν βιολογικώς δραστικές ενώσεις στο έλαιο οι οποίες εμφανίζουν κυτταροτοξική, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική ιδιότητα. Επίσης έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν το επίπεδο της γλυκόζης σε διαβητικούς ασθενείς. Το αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου, ωστόσο, δεν ενισχύει την ανοσολογική απόκριση και υπάρχουν αναφορές με σχετικά δυσμενείς επιπτώσεις ιδιαίτερα στη γονιμότητα. Αιθέρια έλαια, είναι γνωστά ως αρώματα, και αποτελούν συνθετικές ενώσεις που παράγονται στη χημική βιομηχανία, χωρίς να δείχνουν τις ίδιες παρενέργειες [20].

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες του δενδρολίβανου. Οι κυριότερες παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3. Θεραπευτικές ιδιότητες του δενδρολίβανου

Φαρμακολογικές δράσεις	Θεραπευτικές ιδιότητες
Χαλάρωση του βρογχικού μυός	Βροχικό άσθμα
Χαλάρωση του βρογχικού μυός	Αντισπασμοδικό
Αναγωγή λευκοτριενών και παραγωγή	Βροχικό άσθμα, έλκος και φλεγμονές

PGE2	
Αναστολή της υπεροξειδωσις των λιπιδίων	Ηπατοτοξικότητα, αθηροσκλήρωση, ισχαιμία και φλεγμονές

3.4.3 Ανεπιθύμητες δράσεις και παράπλευρα αποτελέσματα του αιθέριου ελαίου.

Έχουν αναφερθεί τα κάτωθι:

1. Η εισπνοή μπορεί περιστασιακά να προκαλέσει ερεθισμό και πολύ σπάνια λαρυγγόσπασμο [21].
2. Εξωτερική χρήση μπορεί να επιδεινώσει το βρογχόσπασμα. ενώ σπάνια μπορεί να εμφανιστούν αντιδράσεις υπερευαισθησίας του δέρματος.
3. Περιπτώσεις υπερευαισθησίας ή αλλεργίας στο φυτό υλικό [22].
4. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε ασθενείς που πάσχουν από βρογχικό άσθμα ή βρογχίτιδα ή σε κατεστραμμένο δέρμα, όπως σε περιπτώσεις εγκαυμάτων, βλαβών ή δερματικά εξανθήματα.

3.4.4. Αλληλεπιδράσεις με φάρμακα

Η κινεόλη που είναι συστατικό του ελαίου είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τα τα ένζυμα του ήπατος. Ως εκ τούτου, το έλαιο μπορεί να αλληλεπιδράσει με διάφορα συνταγογραφούμενα φάρμακα. Έχει αναφερθεί εμφάνιση τερατογόνου δράσης κατά την κύηση αν και οι απόψεις στην βιβλιογραφία δίστανται [23]. Η χρήση του ακατέργαστου ελαίου κατά τη διάρκεια του θηλασμού και σε παιδιά κάτω από την ηλικία των 12 δεν συνίσταται.

Στο εκχύλισμα διχλωρομεθάνιου το δεντρολίβανο εξάγει μόνο το 28,1% των ενώσεων. Οι κύριες ενώσεις που χαρακτηρίστηκαν ήταν φλαβονοειδή και φαινολικά διτερπένια. Επίσης ανιχνεύτηκαν έξι δομές από φαινολικά διτερπένια ήτοι καρνοσικό οξύ (14.1%) και μεθυλιωμένη μορφή του (7.4%), καρνοσόλης (3.8%), η ροσμανόλη (1.4%), epirosmanol-μεθυλο αιθέρας (0.8%) και epirosmanol (σε ίχνη). Με διχλωρομεθάνιο εξάγονται και άλλες λιπόφιλες χημικές ουσίες που πιθανότατα

αντιστοιχούν σε χρωστικές ουσίες, στερόλες και υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα. Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα από φύλλα δενδρολίβανου είναι πλούσια σε ροζμαρινικό οξύ (1.3%) και φλαβονοειδή (3.0%). Ένα ευρύ φάσμα από οξυγονωμένα μονοτερπένια απομονώθηκαν: οξείδια και αλκοόλες, όπως βορνεόλη και γ-τερπινεόλη.

3.4.5. Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου

Ένας μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων εργασιών αναφέρονται στην αντιοξειδωτική δράση των αρωματικών φυτών. Τα αποτελέσματα τους είναι συνήθως δύσκολα να συγκριθούν γιατί η αντιοξειδωτική δράση ενός φυτού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως: η γεωγραφική προέλευση του φυτού ακόμη και αν αναφερόμαστε στο ίδιο είδος [24] ο τρόπος συλλογής του δείγματος δηλαδή αν το ξηρό μέρος του φυτού είναι με τη μορφή σκόνης (powder), οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται (πολικοί ή μη πολικοί) για την παραλαβή του μη πτητικού κλάσματος και τέλος το πτητικό κλάσμα δηλαδή τα αιθέρια έλαια που παραλαμβάνονται μετά από απόσταξη. Πολύ σημαντικός παράγοντας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτών είναι και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κατά την πειραματική διαδικασία. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την δράση των φυτών είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, ο υδρόφιλος ή λιπόφιλος χαρακτήρας του, η συνέργεια με άλλα αντιοξειδωτικά κα.

Για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης των περισσότερων αρωματικών φυτών με την μορφή σκόνης έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα (με κύρια το μεθυλεστέρα του λινολεϊκού οξέος και τον αριθμό των παραγόμενων υπεροξειδίων) με διάφορες αναλυτικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών συνοψίζονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Αντιοξειδωτική δράση δεντρολίβανου

Υπόστρωμα	Συγκριτική Δράση Φυτών
Χοίριο λίπος	δεντρολίβανο>φασκόμηλο>μοσχοκάρυδο >μαντζουράνα
Γαλάκτωμα ελαίου/νερού	γαρύφαλο>φασκόμηλο> >πιπέρι>δεντρολίβανο

Διάφοροι οργανικοί διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των ενεργών συστατικών από δεντρολίβανο φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.5). Ο Chang [25] διαπίστωσε ότι η αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου είναι τόσο μεγαλύτερη όσο περισσότερο πολικός είναι ο διαλύτης (από το εξάνιο προς τη μεθανόλη) που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των ενεργών συστατικών. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, η μεθανόλη είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την εκχύλιση των φυσικών αντιοξειδωτικών [26][27][28]. Ο Chipault [29] χρησιμοποίησε αιθανόλη και πετρελαϊκό αιθέρα για την εκχύλιση αρωματικών φυτών και στις περισσότερες περιπτώσεις τα αιθανολικά εκχυλίσματα ήταν πιο δραστικά από τα αντίστοιχα του πετρελαϊκού αιθέρα.

Σε αρκετές μελέτες συγκρίνεται και η δράση των εκχυλισμάτων που παραλαμβάνονται με χρήση μη πολικών διαλυτών, όπως είναι το εξάνιο, αν και η απόδοση σε εκχύλισμα είναι χαμηλότερη σε αυτή την περίπτωση [30] [31].

Ο Chen [32] χρησιμοποίησε τρεις διαφορετικούς διαλύτες (μεθανόλη, εξάνιο και ακετόνη) για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου. Το εκχύλισμα σε μεθανόλη εμφάνισε μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα του εξανίου και της ακετόνης. Έτσι κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση των αντιοξειδωτικών συστατικών του δεντρολίβανου είναι η ακετόνη. Η μελέτη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική δράση του κάθε εκχυλίσματος σχετίζεται με τη συνολική του περιεκτικότητα σε φαινολικές διτερπενικές ενώσεις. Ο προσδιορισμός με HPLC πέντε συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου έδειξε ότι η συγκέντρωση της κάθε ένωσης παρουσίαζε σημαντικές διακυμάνσεις στα διάφορα εκχυλίσματα [33].

Πίνακας 3.5. Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου σε διάφορα υποστρώματα

Διαλύτης εκχύλισης	Υπόστρωμα	Αναλυτική μέθοδος	Συγκριτική Δράση Φυτών
αραχιδέλαιο (και μοριακή απόσταξη)	λίπος κοτόπουλου	κατανάλωση O ₂	φασκόμηλο> δεντρολίβανο
εξάνιο, διγλωρομεθάνιο, αιθανόλη	λινελαϊκό οξύ	οξείδωση β-καροτενίου	εξάνιο>διγλωρομεθάνιο> μεθανόλη
εξάνιο, βενζόλιο, διαιθυλαιθέρας, χλωροφόρμιο, αιθυλενοχλωρίδιο, διοξάνιο	λίπος κοτόπουλου, φυτικά έλαια	αριθ. υπεροξειδίων	πολικά>μη πολικά
εξάνιο, ακετόνη, μεθανόλη	λίπος	Μέτρηση OSI	εξάνιο>ακετόνη>μεθανόλη
ελαιορητίνη	μεθυλεστέρας του λινελαϊκού οξέος	αέριο χρωματογραφική ανάλυση	φασκόμηλο>δεντρολίβανο

3.4.6 Αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων δεντρολίβανου

Η μέχρι τώρα συμβολή του αιθέριου ελαίου στην συνολική αντιοξειδωτική δράση του φυτού, παρότι έχουν μελετηθεί οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες και η δράση του ως συντηρητικού, [34] [35] [36] δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Πιθανότατα να οφείλεται στο ιδιαίτερα ισχυρό άρωμα που προσδίδουν ορισμένα πτητικά συστατικά στο αιθέριο έλαιο και έτσι περιορίζει τη δυνατότητα προσθήκης τους στα τρόφιμα. Ο περιορισμός αυτός όμως αναστέλλεται όταν χρησιμοποιηθούν μικρές συγκεντρώσεις [37] [38]. Η αντιοξειδωτική δράση σε διάφορα υποστρώματα αναφέρεται στον Πίνακα 3.6.

Πίνακας 3.6. Αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων σε διάφορα υποστρώματα

Υπόστρωμα	Μέθοδος	Συγκριτική Δράση Φυτών
γαλάκτωμα λινελαϊκού οξέος	Οξείδωση β-καροτενίου, συζυγή διένια, δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος	γαρύφαλλο>θυμάρι>δεντρολίβανο>κύμινο>φασκόμηλο>αγριοκύμινο
ηλιέλαιο	αρ.υπεροξειδίων	Δεντρολίβανο>φασκόμηλο>μαντζουράνα>ρίγανη

3.4.7 Φυσικά αντιοξειδωτικά δενδρολίβανου

Το 1969, ο Brieskorn [³⁹] απομόνωσε από το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) δύο φαινολικά διτερπένια, την καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ καθώς και το ροσμαρινικό οξύ (σχήμα 1). Η δραστικότητα του ροσμαρινικού οξέος βρέθηκε παρόμοια με την δραστικότητα του καφεϊκού οξέος. Από πειράματα διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη [33]. Οι Inatani και Nakatani [⁴⁰] [⁴¹] ταυτοποίησαν 4 ενεργές διτερπενικές ενώσεις συμπεριλαμβανόμενης της καρνοσόλης στο δεντρολίβανο. Η ένωση ροσμανόλη έδειξε αντιοξειδωτική δράση μεγαλύτερη εκείνης του BHT (butylated hydroxytoluene) και της α-τοκοφερόλης όταν προστέθηκε σε χοίριο λίπος. Η προσθήκη των φυσικών αντιοξειδωτικών καρνοσόλης, καρνοσικού οξέος, ροσμανόλης, επιροσμανόλης και ισοροσμανόλης σε συγκέντρωση 0.01% είτε σε χοίριο λίπος, είτε σε γαλάκτωμα λινολεϊκού οξέος, έδειξε παρόμοια επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης με εκείνα των συνθετικών αντιοξειδωτικών BHA (Butylated hydroxyanisole) και BHT στην ίδια ή σε διπλάσια συγκέντρωση (0.02%). Η αντιοξειδωτική δραστικότητα τους ήταν μεγαλύτερη σε χοίριο λίπος ή σε έλαιο από ότι σε αιθανολικό διάλυμα λινελαϊκού οξέος (Nakatani, 1984). Ο Houlihan [28] ταυτοποίησε δύο ακόμη διτερπενικές ενώσεις στο δεντρολίβανο (φαινόλη και κινόνη) με αντιοξειδωτική δράση παραπλήσια του BHT. Στα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου έχουν βρεθεί και άλλες φαινολικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών οξέων, όπως τα οξέα βανιλλικό, φερούλικό, καφεϊκό και πρωτοκατεχικό, και στην κατηγορία των φλαβονών όπως οι φλαβόνες 5-υδροξυ-7,4'-διμεθοξυ-φλαβόνη, 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-φλαβόνη, και 4',5,7,8-τετραυδροξυφλαβόνη και η απιγενίνη [⁴²][⁴³].

Αναφορές

- ¹ Tyler V.E., Brady L. R. & Robbers J. E., Pharmacognosy 7th edn., Lea and Febiger, Philadelphia 171, (1976)..
- ² Kotb DF (1985) Medicinal plants in Libya. Arab Encyclopedia House, Tripoli,720, (1985).
- ³ Chopra RN, Chopra IC, Handa KL, Kapur LD. *Terminalia arjuna* W&A (Combretaceae) In: Chopra RN, Chopra IC, Handa KL, Kapur LD, editors. Chopra's Indigenous Drugs of India. 1st ed. Calcutta, India: UN Dhur & Sons, 421–423, (1958).
- ⁴ Asia Begum, Subarda Sandhya, Syed Shaff ath Ali, Kombath Ravindran Vinod, Swapna Reddy, David Banji,: “AN IN-DEPTH REVIEW ON THE MEDICINAL FLORA *ROSMARINUS OFFICINALIS* (LAMIACEAE)”, Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 12(1), 61-73, (2013).
- ⁵ Mulinacci N., Innocenti M., Bellumori M., Giaccherini C., Martini V., Michelozzi M.: “Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study”, Talanta 85, 167-176 (2011).
- ⁶ Hoefler C., Fleurentin J., Mortier F., Pelt J.M., Guillemain J.: “ Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats”, J Ethnopharmacol Mar-Apr;19(2):133-43, (1987).
- ⁷ De-Eknamkul W., Ellis B.E.: "Purification and characterization of prephenate aminotransferase from *Anchusa officinalis* cell cultures". Arch. Biochem. Biophys. 267 (1): 87–94 (1988).
- ⁸ J. W. Wu, M.-H. Lee, C. T. Ho, and S. S. Chang: “Elucidation of the chemical structure of natural antioxidants from rosemary”, J. Am. Oil Chem. Soc. 59:339, (1982).
- ⁹ Begum A., Sandhya S., Syed Shaff ath A., Vinod K.R., Swapna R., Banji D.: “An in-depth review on the medicinal fl ora *Rosmarinus offi cinalis* (Lamiaceae)”, Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 12(1), 61-73 (2013).
- ¹⁰ Tewari, R. and Virmani, O. P. “Chemistry of Rosemary Oil: A Review”, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 9, 185-197 (1987).

- ¹¹ Bauer, K.; Garbe, D. and Surburg, H.: “Common Fragrance and Flavor Materials” Germany: Wiley-VCH 3. ed. (1997).
- ¹² Kokate C.K., Purohit A.P., Gokhale S.B., Pharmacognosy Nirali Prakashan Pune (2010).
- ¹³ Toker, A. O. and Maciarello, M. J.: “The essential oils of some rosemary cultivars”, Flavour and Fragrance Journal, 1, 137-142 (1986).
- ¹⁴ Mizrahi, I.; Juarez, M. A. and Bandoni, A. L.: “The essential oil of *Rosmarinus officinalis* growing in Argentina”, Journal of Essential Oils Research 3, 11-15 (1991).
- ¹⁵ Chalchat J. C., Garry R. P., Michet A., Benjilali B. and Chabat J. L.: “Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.. The chemical composition of oils of various origins (Marocco, Spain, France)”, Journal of Essential Oils Research 5, 613-618 (1993).
- ¹⁶ Lawrence, B.: “Progress in Essential Oils”, Perfumer and Flavorist, 20, 47-54 (1995).
- ¹⁷ Leth M.: “Herbs how to grow and use them”, George G Harrap and Co Ltd, London 50 (1976).
- ¹⁸ Ashoor A.: “Medication with herbs and plants”, Ebn-Sina Library for Publication and Distribution, Cairo (1985).
- ¹⁹ El-Gadi A & Bshina S M.: “Usage of some plants in Libyan folk medicine”, Dar Alkutob Alwatania, Benghazi Part 1 (1989).
- ²⁰ M R Al-Sereitia, K M Abu-Amerb & P Sena: “Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials”, Indian Journal of Experimental Biology 37, 124-131 (1999).
- ²¹ Blumenthal M., The complete German Commission E Monographs: Therapeutic guide to herbal medicines (1998).
- ²² Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J.: “Herbal medicine: Expanded Commission E Monographs. TX, Am. Bot. Coun. Austin”, (2000).
- ²³ Fahim F.A., Esmat A.Y., Fadel H.M., Hassan K.F., “Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis”, Int. J. Food Sci. Nutr. 50, 413-427 (1999).

- ²⁴ Svoboda K.P. and Deans S.G.: “A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the british market their antioxidative properties”, *Flavour Fragrance J.*, 1, 81-87 (1992).
- ²⁵ Chang S.S., Ostric-Matijasevic B., Hsieh O.A.L. and Huang C.-L.: “Natural antioxidants from rosemary and sage”, *J. Food Sci.*, 42, 1102-1106 (1977).
- ²⁶ Economou K.D., Oreopoulou V. and Thomopoulos CD.: “Antioxidant activity of some plant extracts of the family Lamiaceae”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 109-113 (1991).
- ²⁷ Houlihan CM., Ho C.-T. and Chang S.S.: “The structure of rosmariquinone-a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 96-98 (1985).
- ²⁸ Kikuzaki H. and Nakatani N.: “Structure of a new antioxidative phenolic acid from *Oregano*”, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 519-524 (1989).
- ²⁹ Chipault J.R., Mizuno G.R. and Hawkins J.M.: “The antioxidant properties of natural spices”, *Food Techn.*, 17, 46-55 (1952).
- ³⁰ Gordon M.H. and Weng X.C.: “Antioxidant properties of extracts from tanshen”, *Food Chem.*, 44, 119-122 (1992).
- ³¹ Svoboda K.P. and Deans S.G.: “A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the british market; their antioxidative properties”, *Flavour Fragrance J.*, 1, 81-87 (1992).
- ³² Chen Q., Shi H. and Ho C.-T.: “Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 999-1002 (1992).
- ³³ Schwarz K., Ternes W. and Schmauderer E.: “Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 104-107 (1992).
- ³⁴ Farag R.S., Badei A.Z.M.A., Hewedi F.M. and El-Baroty G.S.A.: “Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 792-798 (1989a).
- ³⁵ Farag R.S., Badei A.Z.M.A. and El-Baroty G.S.A.: “Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation”, *J. Am. Oil Chem Soc.*, 66, 800-804 (1989).

- ³⁶ Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M. and El-Baroty G.S.A.: “Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils”, *J. Food Prod.*, 52,665-667 (1989).
- ³⁷ Ismaeil A.A. and Pierson M.D.: “Inhibition of germination, outgrowth and vegetative growth of *Cbotulinum 67b* by spice oils”, *J. Food Prod*, 53,755-758 (1990).
- ³⁸ Nakatani N.: “Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices in "Spices, herbs and edible fungi", Elsevier Science Publishers, 251-271 (1994).
- ³⁹ Brieskora C.H., Loliger J. and Doemling H.J.: “Carnosic acid, asantioxidant in rosemary and sage leaves”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 141, 10-16 (1969).
- ⁴⁰ Inatani R., Nakatani N., Fuwa H. and Seto H.: “Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary”, *Agric. Biol. Chem.*, 46,1661-1666 (1982).
- ⁴¹ Inatani R., Nakatani N. and Fuwa H.: “Antioxidant effect of the constituents of rosemary and their derivatives”, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 521-528 (1983).
- ⁴² Schulz J.M.; Herrmann K.: “Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material I. Sample preparation and thin-layer chromatography”, *J. Chromatog.*, 195, 85-94 (1980).
- ⁴³ Cuvelier M.E., Richard H. and Berset C.: “Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary”, *J. Am. Oil Chem. Soc*, 73, 645-652 (1996).

Κεφάλαιο 4

Origanum Majorana

4.1. Εισαγωγή

Η ματζουράνα (λατ. *Origanum Majorana*) είναι ένα από τα πολλά είδη του γένους *Origanum* της οικογένειας *Lamiaceae*. Είναι ένα αγγειόσπερμο, δικότυλο, πολυετές φυτό. Ως πολύκλαδος αρωματικός θάμνος φτάνει σε ύψος περίπου 60 εκ. Τα φύλλα της είναι μικρά, ωοειδή, μαλακά και αρωματικά και φυτρώνουν επάνω στα κλαδιά. Όταν τριφτούν ανάμεσα στα δάκτυλα δίνουν μια ιδιαίτερη μυρωδιά βαλσάμου ενώ η γεύση τους είναι πικρή και στυφή. Το φυτό είναι αείφυλλο. Από τη μασχάλη των φύλλων φυτρώνουν πολλά μικρά ξυλώδη κλαδάκια, με τετράγωνο σχήμα, λίγο χνουδωτά και σε αυτά τα κλαδάκια αναπτύσσονται τα άνθη, τα οποία είναι μικρά, έχουν χρώμα λευκό, κάποτε ρόδινο, και σκεπάζονται από μικρά λέπια. Η ανθοφορία διαρκεί από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο. Αν και η ματζουράνα είναι αυτοφυές σε χώρες της ανατολικής Μεσογείου, δεν απαντά στη χώρα μας αλλά μόνο καλλιεργούμενη. Στη χώρα μας συναντάται σε κήπους ως καλλωπιστικό και αρωματικό φυτό ενώ σε άλλες χώρες καλλιεργείται συστηματικά. Τα τελευταία χρόνια καλλιεργείται συστηματικά και στην Κύπρο. Ήδη στον αρχαίο κόσμο το «σάμψυχον» ή «αμάρακον ο αείφυλλος», όπως ονομαζόταν θεωρείται ότι το χρησιμοποιούσε ο Ιπποκράτης ως αντισηπτικό. Επίσης ήταν συνδεδεμένο με τη θεά Αφροδίτη. Στη μυθολογία, η εμφάνισή της συνδέεται με τον Αμάρακο, γιο του βασιλιά της Κύπρου Κινύρα, ο οποίος ήταν αρωματοποιός. Επίσης έχαιρε μεγάλης εκτίμησης, όχι τόσο για τις αρτυματικές του ιδιότητες, αλλά και ως αρωματικό και θεραπευτικό βότανο. Οι Άραβες και οι Αιγύπτιοι το χρησιμοποιούσαν στα λουτρά τους αλλά και ως ενισχυτικό αφέψημα, ενώ οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν ματζουράνα για να θεραπεύσουν γαστρεντερικές ενοχλήσεις και να τονώσουν εγκεφαλικές λειτουργίες. Επίσης, τα νεαρά ζευγάρια στεφανώνονταν με ματζουράνα

στις γαμήλιες γιορτές γιατί πίστευαν ότι το φυτό της Αφροδίτης θα τους έδινε αγάπη, τιμή και ευτυχία. Οι αρχαίοι ιατροί απέδιδαν στο αφέψημα της χωνευτικές, διουρητικές και υπατικές ιδιότητες, ενώ με τα καταπλάσματα της θεραπείας πλήθος προβλημάτων αντιμετωπιζόταν, όπως διαστρέμματα και φλεγμονές. Για τη σύγχρονη φυτοθεραπεία, που αξιολογεί τα φαρμακευτικά φυτά με κριτήρια την πλούσια πείρα της αλλά και αποτελέσματα εργαστηριακών αναλύσεων, η μαντζουράνα είναι κυρίως χωνευτική αντιβηχική και ηρεμιστική. Στην εποχή μας χρησιμοποιείται κυρίως για την τελευταία ιδιότητα καθώς έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε άτομα που δεν μπορούν να διαχειριστούν το άγχος με αποτέλεσμα να υποφέρουν από νευρική εξάντληση, πονοκεφάλους και αϋπνίες [1]. Το αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας είναι πολύ δραστικό για τις αϋπνίες, και στην αρωματοποιία. Εντριβές με αραιωμένο αιθέριο έλαιο μαντζουράνας ξεκουράζουν το σώμα μετά την άσκηση.

Η συγκομιδή γίνεται όταν είναι πλήρως ανθισμένη, στις αρχές του θέρους με κόψιμο σε ύψος μιας πιθαμής από το έδαφος και ακολούθως προσεκτική ξήρανση στη σκιά ή σε ξηραντήριο.



Εικόνα 4.1. (*Origanum Majorana*)

Η μαντζουράνα είναι φυτό που στην όψη αλλά και στις καλλιεργητικές απαιτήσεις της μοιάζει πολύ με τη ρίγανη, είναι πιο ανθεκτική στο ψύχος, αλλά και πιο απαιτητική σε πότισμα. Για πολλά χρόνια, δεν υπήρχε σαφής διαχωρισμός της μαντζουράνας από τη ρίγανη και γι' αυτό η ρίγανη αναφερόταν ως «άγρια μαντζουράνα» ή και τα δύο είδη μαζί αναφέρονταν μαζί ως *Origanum Majorana*. Τώρα, η παραπάνω ονομασία χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη μαντζουράνα, αν και η επίσημη ταυτοποίησή της γίνεται ως *Majorana hortensis* ή γλυκιά μαντζουράνα [2]. Ένα άλλο είδος μαντζουράνας είναι η *Majorana syriaca*, η οποία όπως δηλώνει και το όνομά της ευδοκμεί κυρίως στη Συρία και γενικά στη Μέση Ανατολή. Μαντζουράνα βρίσκουμε σε όλα τα φυτώρια και καλλιεργείται σε γλάστρες. Αν επιθυμούμε να την καλλιεργήσουμε σε μεγαλύτερη κλίμακα, θα επιλέξουμε ένα γόνιμο και με καλή στράγγιση σημείο στον κήπο, στο οποίο θα φυτέψουμε στα μέσα του φθινοπώρου ή στις αρχές της άνοιξης.

4.2 Χημική σύσταση

4.2.1. Εκχύλισμα

Στη διεθνή βιβλιογραφία [3][4] έχει μελετηθεί μερικώς η χημική σύσταση του *Origanum Majorana* και του αιθέριου ελαίου του όσο αναφορά τα είδη των πτητικών και φαινολικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τις ιδιότητές του. Στην ξηρή μαντζουράνα παρουσιάζεται σημαντική διαφορά ως προς τις χημικές ενώσεις που περιέχει και κυρίως την περιεκτικότητά της σε μέταλλα, γεγονός που οφείλεται στον τόπο και τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού.

Ο παρακάτω πίνακας 4.1 δείχνει την ποσοτική ανάλυση (HPLC) σε ng των πολυφαινολών από δείγμα ματζουράνας [5]. Στον πίνακα συμπεριλαμβάνεται ο Συντελεστής Μεταβλητότητας (CV) ως δείκτης επαναληψιμότητας του πειράματος και εκφράζει το λόγο της τυπικής απόκλισης προς τη μέση τιμή.

Πίνακας 4.1. Ποσοτική ανάλυση με μεθόδους HPLC των πολυφαινόλων σε δείγμα ματζουράνας

Πρότυπο	M (ng)	ΣΜ (%CV)	Απόδοση (% ±SD)
Hydroquinones			
Hydroquinone	33.9	4.95	102 ± 1.01
<i>Flavanones</i>			
Narirutin	43.5	1.25	97.9 ± 2.19
Eriodictyol-7-O-β-glucoside	26.5	1.13	99.4 ± 1.13
Eriocitrin	33.0	1.09	99.7 ± 2.49
<i>Flavones</i>			
Apigenin	29.5	2.19	99.2 ± 1.56
Luteolin-7-O-rutinoside	35.1	1.91	101 ± 0.77
<i>Caffeic acid derivatives</i>			
Lithospermic acid	62.5	1.87	102 ± 1.3
Rosmarinic acid	23.0	1.66	99.0 ± 1.38
Methyl rosmarinate	62.0	2.17	96.3 ± 3.49
Caffeic acid	4.51	2.38	102 ± 1.11

Γενικά οι πολυφαινόλες έχουν υδροξυλικές ή/και καρβοξυλικές ομάδες και επομένως παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε αρνητικό ιονισμό σε ένα πείραμα φασματομετρίας μάζας. Στον πίνακα 4.2 [6] φαίνονται τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας σε φαινόλες από LC-MS/MS καθώς και οι τιμές $[M-H]^-$. Οι τιμές χωρίζονται σε αποτελέσματα εκχυλισμάτων από πολικούς και μη πολικούς διαλύτες.

Πίνακας 4.2. Κύρια συστατικά εκχυλίσματος ματζουράνας [6]

Είδος πολικότητας	RT (min)	Ένωση	Μοριακός τύπος	[M-H] ⁻ (m/z) (θεωρητικό)	[M-H] ⁻ (m/z) (πειραματικό)	[M-H] ⁻ (m/z)	M (mg)
Polar	1.5	Caffeic acid glucoside	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341.0883	341.0873	179.0, 161.0, 135	30.65
	4.36	Epigallocatechin	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	305.0665	305.0661	289.0, 225.0	46.60
	1.64	Arbutin	C ₁₂ H ₁₅ O ₇ ⁻	271.0818	271.0815	253.0, 108.0	18.81
	3.41	Luteolin rutinoside	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593.1533	593.1506	285.0	10.57
	9.21	Luteolin glucoronide	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂ ⁻	461.0725	461.0720	285.0	23.91
	10.83	Rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₅ O ₈ ⁻	359.0763	359.0767	197.0, 179.0, 161.0, 135.0	14.34

Είδος πολικότητας	RT (min)	Ένωση	Μοριακός τύπος	[M-H] ⁻ (m/z) (θεωρητικό)	[M-H] ⁻ (m/z) (πειραματικό)	[M-H] ⁻ (m/z)	M (mg)
Nonpolar	7.38	Dihydroquercetin	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁻	303.0505	303.0509	301.0, 285.0, 241.0, 227.0, 151.0, 135.0	19.30
	8	Dihydroluteolin	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	287.0556	287.0551	227.0, 151.0, 135.0	23.76
	10.17	Arbutin	C ₁₂ H ₁₅ O ₇ ⁻	271.0818	271.0815	253.0, 108.0	21.49
	10.46	Apigenin	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269.0441	269.0450	158.9	13.53
	7.38	Quercetin	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301.0334	301.0349	285.0, 227.1, 151.1, 135.0	64.73
	7.38	Gallocatechin derivative			391.0654	305.0, 289.0, 225.0	29.61
	8	Quercetin arabinoside	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	433.0771	433.0782	301.0	45.40

Είδος πολικότητας	RT (min)	Ένωση	Μοριακός τύπος	$[M-H]^-$ (<i>m/z</i>) (θεωρητικό)	$[M-H]^-$ (<i>m/z</i>) (πειραματικό)	$[M-H]^-$ (<i>m/z</i>)	M (mg)
	10.17	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447.0920	447.0927	285.0	5.10
	10.46	Gallocatechin derivative			414.0869	305.0, 289.0, 225.0	17.86
	10.87	Rosmarinic acid	$C_{18}H_{15}O_8^-$	359.0763	359.0767	197.0, 179.0, 161.0, 135.0	28.18 ^c

Στον παρακάτω πίνακα (4.3), παρατίθενται το μελετώμενο είδος, η προέλευσή του και οι συγκεντρώσεις των μετάλλων, όπως έχουν καταγραφεί στις αντίστοιχες αναφορές [7][8].

Πίνακας 4.3. Συγκεντρώσεις ανόργανων συστατικών στο είδος *Origanum Majorana* ή *Majorana hortensis*

Στοιχείο	Συγκέντρωση	
	<i>O.Majorana L.</i> , Ανατολία, Τουρκία	<i>Majorana hortensis</i> , Λιβύη
K (%)		1.86
Ca (%)		1.87
Mn (ppm)	35.4 ± 0.2	
Cd (ppm)	0.50 ± 0.04	
Cr (ppm)	9.70 ± 0.3	5.70

4.2.2. Αιθέριο έλαιο

Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αιθέρια έλαια, στην *O. Majorana* επισημαίνονται σημαντικές διαφορές στην χημική σύσταση ανάλογα με τον τόπο καλλιέργειας, την εποχή συγκομιδής και την μέθοδο παραλαβής του. Δείγματα διαφόρων γεωγραφικών προελεύσεων μπορεί να είναι πλούσια σε φαινόλες (θυμόλη και καρβακρόλη), ή σε μονοτερπενικές αλκοόλες (λιναλόλη, γ-τερπινένιο και σαβινένιο). Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό για τον προσδιορισμό της ποιότητας του ελαίου να προσδιορίζεται και ο τόπος παραγωγής του [9].

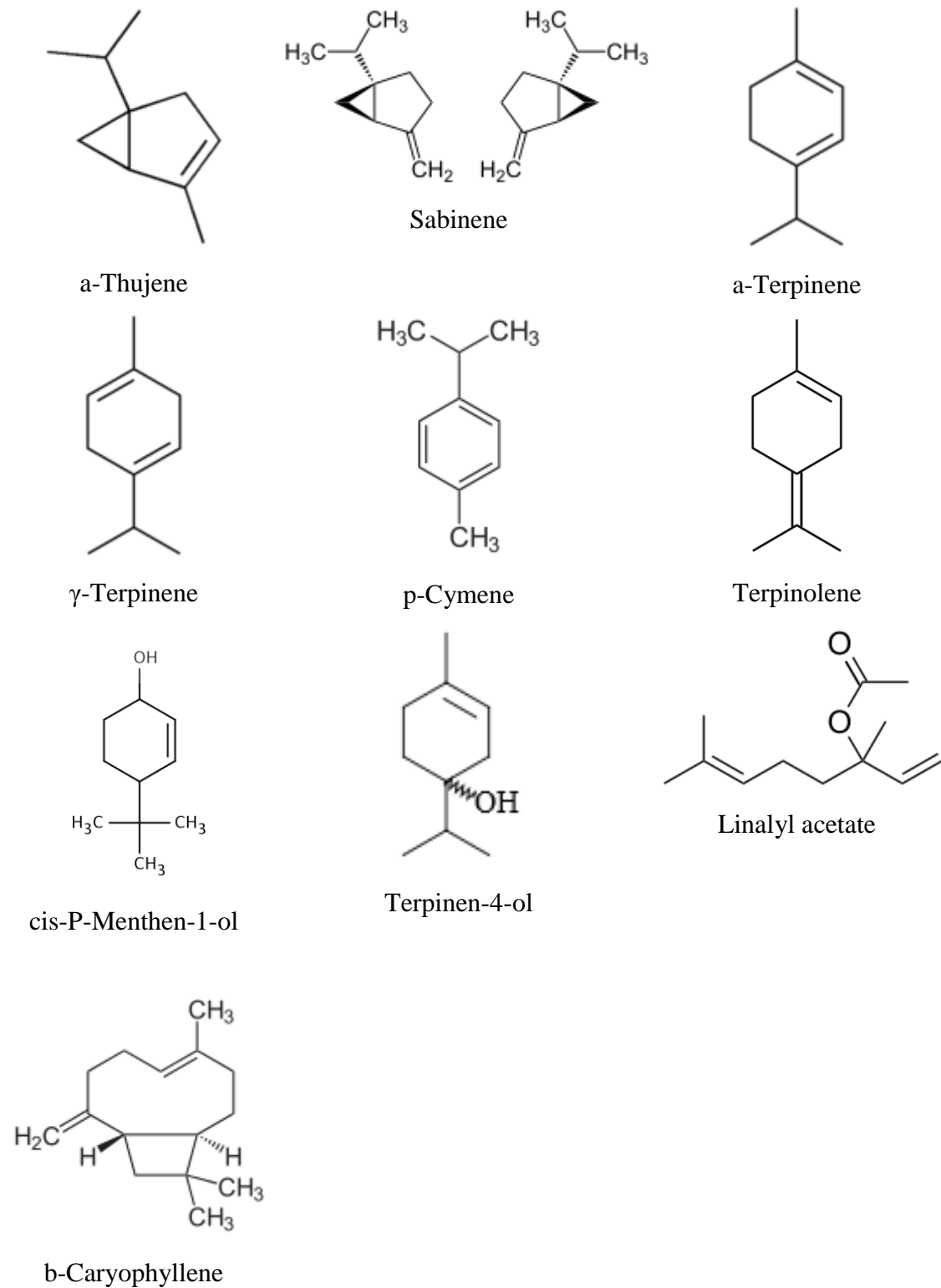
Έχει προταθεί ότι υπάρχουν δύο είδη αιθέριου ελαίου με ελαφρά διαφορετική χημική σύσταση. Η τερπινενόλη και το ένυδρο σαβινένιο αποτελούν τα κύρια συστατικά στη μία περίπτωση ενώ στην άλλη η θυμόλη και η καρβακρόλη. Άλλες ενώσεις που έχουν αναφερθεί είναι τα π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο [12]. Ο τύπος *O. Majorana* που φύεται στον Ελληνικό χώρο, αναφέρεται ότι ανήκει και στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες [10][11][12]. Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζεται η χημική

σύσταση του αιθέριου ελαίου του *Majorana hortensis* όπως προέκυψε από μελέτη με HPLC [29]

Πίνακας 4.4. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου *Majorana hortensis*

Ένωση	Χρόνος (min)	%	Ένωση	Χρόνος (min)	%
a-Thujene	9.48	1.08	trans-Sabinene hydrate acetate	20.84	1.11
Sabinene	11.04	3.87	Thymol	21.00	0.14
a-Myrcene	11.58	0.98	d-Elemene	21.76	0.13
a-Phellandrene	12.13	0.98	Neryl acetate	22.44	0.19
a-Terpinene	12.55	6.77	Geranyl acetate	22.97	0.26
p-Cymene	12.80	2.61	b-Caryophyllene	24.13	1.72
γ-Terpinene	12.96	11.34	a-trans-Bergamotene	24.38	0.12
cis-Sabinene hydrate	14.29	2.70	a-Humulene	24.99	0.15
Terpinolene	14.70	2.81	Bicyclogermacrene	25.99	0.74
trans-Sabinene hydrate	15.37	10.81	Spathulenol	27.96	0.78
cis-P-Menthen-1-ol	16.09	1.87	Veridiflorol	28.38	0.19
1-Terpineol	16.59	0.54	a-Cadinol	29.43	0.16
Terpinen-4-ol	18.10	29.96	Globulol	33.82	0.11
trans-Piperitol	18.62	0.52	<i>Monoterpene hydrocarbons</i>	30.40	
Nerol	18.92	0.20	<i>Oxygenated monoterpenes</i>	48.60	
Linalyl acetate	19.57	2.13	<i>Sesquiterpene hydrocarbons</i>	2.90	
Piperitone	19.76	0.11	<i>Oxygenated sesquiterpenes</i>	1.20	
L-Bornyl acetate	20.50	0.17	<i>Total identified</i>	85.2	

Η συλλογή του αιθέριου ελαίου γίνεται με απόσταξη φύλλων και ανθέων με απόδοση που κυμαίνεται μεταξύ 0.7-3.5% ανάλογα με τις μεθόδους συλλογής και αποξήρανσης. Το άρωμά του ομοιάζει με της λεβάντας, το χρώμα είναι ανοικτό πράσινο.



Σχήμα 4.2. Χημική δομή των κύριων συστατικών (> 1%) του αιθέριου ελαίου *Majorana hortensis*

4.3. Φαρμακευτικές ιδιότητες

4.3.1 Παραδοσιακές χρήσεις

Στη μαγειρική η μαντζουράνα χρησιμοποιείται είτε φρέσκια ή ολόκληρο το φυτό, όταν αλέθεται αποξηραμένη. Ως βότανο έχει, ελαφρύ και πικάντικο άρωμα, προστίθεται αποξηραμένη ή φρέσκια σε σούπες, σαλάτες και κρεατικά είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλα καρυκεύματα. Επειδή ανήκει στην ίδια οικογένεια με την ρίγανη πολλές φορές την αντικαθιστά στα φαγητά. Επίσης, προστίθεται μαζί με διάφορα άλλα μπαχαρικά σε κρασί δημιουργώντας ένα εξαιρετικό είδος κρασιού που φτιάχνεται στη Γαλλία, το *vinum Hippocraticum*. Όσον αφορά σε συνδυασμούς βοτάνων, διερευνήθηκε η δράση μειγμάτων βοτάνων στη συντήρηση ντομάτας [13], όπου αναφέρεται ότι η αποξηραμένη μαντζουράνα σε συνδυασμό με δενδρολίβανο, προφυλάσσει από την επίδραση του φωτός στην απώλεια του χρώματος της ντομάτας και αναστέλλει οξειδωτικές διαδικασίες, που οδηγούν στο σάπισμά της. Χρησιμοποιείται περισσότερο στο δυτικό κόσμο, και κυρίως στις ΗΠΑ, τη Γερμανία και την Ιταλία, όπου καλλιεργείται συστηματικά ενώ στην χώρα μας συνήθως σε συνδυασμό με τη ρίγανη ή άλλα καρυκεύματα.

Το αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* είναι το πιο συχνό χρησιμοποιούμενο έλαιο στην βιομηχανία τυποποιημένων τροφίμων. Σύμφωνα με μελέτες για τη χρήση αιθέριου ελαίου *Origanum Majorana* ως αντιμικροβιακό παράγοντα σε τυποποιημένα προϊόντα (λουκάνικα, επεξεργασμένα λαχανικά) , βρέθηκε ότι το έλαιο αυτό εκτός της ιδιαίτερης γεύσης που δίνει παρέχει προστασία (και μάλιστα μειώνει τις συγκεντρώσεις με την πάροδο των ημερών) από αερόβια ετεροτροφικά βακτήρια και από τα αναερόβια *Escherichia coli*. Επίσης, η συνδυασμένη χρήση αιθέριων ελαίων διάφορων χειλανθών σε συντηρούμενα τρόφιμα, δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των μικροβιακών επιθέσεων [14]. Μάλιστα, στις μέρες μας, που αναζητείται ένας πιο υγιεινός τρόπος συντήρησης των τροφίμων, πέρα από τις μεγάλες ποσότητες αλατιού και τη χρήση χημικών συντηρητικών, τα αιθέρια έλαια αποτελούν μια υποσχόμενη λύση.

4.3.2. Βιολογική και Φαρμακευτική δράση

Το είδος *Origanum Majorana*, ανήκει στην οικογένεια των αρωματικών, θεραπευτικών φυτών και σε πολλές περιοχές χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα για ιατρικούς σκοπούς. Το βότανο και αιθέριο έλαιο χρησιμοποιείται κατά κράμπες, κατάθλιψη, γαστρεντερικά προβλήματα, πονοκεφάλους, και ως διουρητικό. Το αιθέριο έλαιο χρησιμοποιείται εξωτερικά για την κυκλοφοριακή συμφόρηση στο στήθος, μυϊκούς πόνους, αρθρίτιδα. Για την αντιμετώπιση κοιλιακών πόνων από κρυολόγημα, ως κατάπλασμα στην επούλωση πληγών, ενώ ζεστό λάδι ελιάς εγχέεται με μαντζουράνα ως μια αναφερόμενη θεραπεία για λοιμώξεις του αυτιού.

Υπάρχουν αναφορές [15] ότι στην Παλαιά Διαθήκη είναι πιθανότατα το είδος *Majorana syriaca*, το οποίο εκτός από συμβολικό χαρακτήρα κάθαρσης για τους Εβραίους, είχε και θεραπευτικές ιδιότητες όσον αφορά τη διουρητική δράση του και την αντιμετώπιση υπογλυκαιμικών περιστατικών. Είναι τονωτικό, αγχολυτικό και αντικαταθλιπτικό [16]. Κρασί που περιέχει μαντζουράνα βοηθά στην ενίσχυση της μνήμης και στην όξυνση των αισθήσεων, ενώ διασπορά σκόνης μαντζουράνας στη γλώσσα θεωρείται ότι βοηθά στην επανάκτηση του λόγου και ενδυναμώνει τις εγκεφαλικές λειτουργίες [17]. Το αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* θεωρείται πολύ καλό για την αντιμετώπιση του πόνου και ιδιαίτερα των περιαρθρικών πόνων και των πόνων της μέσης. Επίσης, έχει σπασμολυτική δράση και γι' αυτό χρησιμοποιείται στη θεραπεία βρογχίτιδας.

4.3.3 Ανεπιθύμητες δράσεις και παράπλευρα αποτελέσματα του αιθέριου ελαίου

Η χρήση συνθετικών εντομοκτόνων έχει προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και στην ανάπτυξη των αντιστάσεων των εντόμων. Αυτό έχει δημιουργήσει την ανάγκη για βιοδιασπώμενα και στοχευμένα εντομοκτόνα. Μία πηγή των πιθανών νέων εντομοκτόνων είναι φυσικά προϊόντα που συντίθεται από φυτικά είδη. Πολλά φυτικά προϊόντα έχουν νυμοκτόνο και εντομοκτόνο δράση [18].

Ορισμένα φυσικά προϊόντα δύναται να χρησιμοποιηθούν ως πηγή νέων εντομοκτόνων. Επίσης τα παράγωγά τους μπορεί επίσης να είναι πιο φιλικά προς το

περιβάλλον από τα συνθετικά χημικά. Τα αιθέρια έλαια που αποτελούν ένα σύμπλοκο μίγμα από μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και οξυγονωμένα παράγωγα τους καθώς και προπένια και ουσίες που περιέχουν άζωτο ή θείο [19]. Επιπροσθέτως στην αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση τους, πολλά αιθέρια έλαια που απομονώνονται από φυτικά είδη όπως της ματζουράνας έχουν βρεθεί να δρουν εναντίον ως εντομοαπωθητικά [20][21][22].

4.3.4. Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων

Πειράματα έχουν αποδείξει τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, δραστηριότητες του *O. Majorana* [23][24][25][26]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την κυτταρική δραστηριότητα, την συσσωμάτωση και την έκκριση πρωτεϊνών και αυτό μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων και στη θρόμβωση. Οι σημαντικότερες από αυτές τις ιδιότητες παρατίθενται πιο αναλυτικά παρακάτω:

- *Αντιοξειδωτική δράση:*

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα καταστρεπτικές για το DNA, δημιουργούν μεταβολές στο μόριό του που οδηγούν σε προβλήματα κατά την αντιγραφή του με αποτέλεσμα μεταλλάξεις και καρκινογένεσεις. Επίσης συμμετέχουν καταστροφικά και άλλες ασθένειες όπως στις καρδιαγγειακές παθήσεις και τη λευχαιμία.

Ο τρόπος δράσης των ελεύθερων ριζών δηλαδή των χημικών ενώσεων που διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο είναι ο εξής: επιταχύνουν την οξείδωση των λιπιδίων, τα οποία αποτελούν δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα να χάνουν ηλεκτρόνια, να αλλάζουν δομή και ιδιότητες και συνεπώς να καταστρέφονται οι κυτταρικές μεμβράνες και τελικά τα κύτταρα.

Η μαντζουράνα είναι ένα από τα βότανα που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση[27] δηλαδή ανήκει στις ουσίες που μπορούν να παρεμποδίσουν ή να καθυστερήσουν τις αντιδράσεις όπου συμμετέχουν οι ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας επικίνδυνες οξειδώσεις. Συμμετέχει κυρίως στην οξείδωση των λιπιδίων, τα οποία υπάρχουν στα πολυακόρεστα λίπη και έλαια των τροφίμων. Η αντιοξειδωτική δράση της μαντζουράνας αποδίδεται στις φαινολικές ουσίες που αυτή περιέχει, ήτοι στα

φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή [28]. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία [29] διαπιστώθηκε ότι το αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* δρα παρεμποδιστικά στην οξειδωση κάποιων λιπιδίων ενώ καθυστερεί την οξειδωση ή την αυτό-οξειδωση άλλων λιπιδίων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, το αιθέριο έλαιο του *Origanum Majorana*, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολύ αποτελεσματικά στην πρόληψη και την αντιμετώπιση της φθοράς των κυττάρων. Σε πειράματα που έγιναν για να ελεγχθεί η δράση της μαντζουράνας στην πρόληψη εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, το καρνοσικό και το ουρσολικό οξύ φάνηκε ότι παρεμποδίζουν την εμφάνιση της ασθένειας μέσω της αναστολής παραγωγής ελευθέρων ριζών[30]. Επίσης το αιθανολικό εκχύλισμα της *O.Majorana* [31] θεωρήθηκε ότι αποτρέπει τις επιβλαβείς οξειδώσεις και δρα χημειοπροληπτικά, μειώνοντας το μέγεθος και την πληθυσμιακή αύξηση των μετασχηματισμένων κακοηθών κυττάρων.

• Έλεγχος συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων:

Η αρβουτίνη που περιέχεται στο εκχύλισμα της *O.Majorana*, είναι πιο δραστική ουσία στην αποτροπή συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων από συνήθεις παράγοντες που μελετήθηκαν (κολλαγόνο, αραχιδονικό οξύ, θρομβίνη) με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η θρόμβωση και κατά συνέπεια οι καρδιαγγειακές παθήσεις [32]. Επίσης το μεθανολικό εκχύλισμα της *Origanum Majorana* παρεμποδίζει αποτελεσματικά την προσκόλληση, τη συσσωμάτωση και την πρωτεϊνική έκκριση που ωθεί τα αιμοπετάλια σε συσσωματώματα και προκαλεί θρομβώσεις [33].

4.3.5. Αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων

Συγκριτική μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί για πλήθος αιθέριων ελαίων από βότανα, προκύπτει ότι το αιθέριο έλαιο του *Origanum Majorana* διαθέτει ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριδιακής δράσης. Οι Hammer *et al.* [34], μελέτησαν 50 διαφορετικά είδη αιθέριων ελαίων ως προς τη δράση τους εναντίον σε 10 βακτηρίων (*Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *C. albicans*, *Streptococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* και *S. Aureus*). Αποδείχθηκε ότι το έλαιο είναι το πιο αποτελεσματικό, σε σύγκριση με άλλα ανάλογα φυτικά προϊόντα, στην αναστολή όλων των

βακτηρίων. Επίσης θεωρήθηκε ως το καλύτερο έλαιο για την παρεμπόδιση ανάπτυξης μικροβίων και μυκήτων [35]. Σε συγκριτική μελέτη [36] που έγινε για τη δράση τριών αιθέριων ελαίων ως προς φυτοπαθογόνους μύκητες που απειλούν καλλιέργειες (*Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*), το έλαιο της *Origanum Majorana* δρα ανασταλτικά για τα τρία από τα τέσσερα είδη μυκήτων ενώ σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια αποτελεί καλό παρασιτοκτόνο. Οι Deans, Ritchie [37] αναφέρουν ότι εξετάστηκαν με 50 αιθέρια έλαια για 25 είδη βακτηρίων (τύπου G(+)) αλλά και G(-)) και το αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* δρα ανασταλτικά για τα 22 από αυτά.

Αναφορές

- ¹ Van Wyk, B.E., & Wink, M. Medicinal plants of the world. (pp 177, 200, 204, 207, 221, 276, 283). Timber Press (2005).
- ² Peter K.V.: “Handbook of herbs and spices”, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge (2001).
- ³ Baranauskien R., Venskutonis P.R., Dewettinck K. R.: “Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk proteinbased matrices”, Food Research International 39 : 41325 (2006).
- ⁴ Baratta M., Dorman H., Deans S.G., Figueiredo C., Barroso J. Ruberto G.: “Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils”, Flavour and Fragrance Journal 13 : 235 244 (1998).
- ⁵ Fecka I.; Turek S.: “Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques”, Food Chemistry 108, 1039-1053 (2008).
- ⁶ Hossain M. B., Camphuis G., Aguiló-Aguayo I., Gangopadhyay N. and Rai D. K.: “Antioxidant activity guided separation of major polyphenols of marjoram (*Origanum majorana* L.) using flash chromatography and their identification by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry”, J. Sep. Science, 37: 3205–3213 (2014).

- ⁷ Divrikli U., Horzum N., Soylak M. Elci L.: “Trace heavy metal contents of some spices and herbal plants from western Anatolia, Turkey”, *International Journal of Food Science and Technology* 41 : 712 (2006).
- ⁸ Abugassa I. O., Bashir A. T., Doubali K., Etwir R. H., AbuEnawel M. Abugassa S. O.: “Characterization of trace elements in medicinal herbs by instrumental neutron activation analysis”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 278 : 563 (2008).
- ⁹ Karawya MS, el-Kiey MA, Sina A, Nour G. Simultaneous: “ TLC separation of khellin and visnagin and their assay in Ammi visnaga fruits, extracts, and formulations”, *J Pharm Sci* . 59, 1025-1027, (1970).
- ¹⁰ Komaitis M.E.: “Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.)”, *Food Chemistry* 45 (1992).
- ¹¹ Fischer N., Nitz S., and Drawert F.: “Original flavor compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis* Moench.)”, *Flav. Fragr. J.* 2, 55 – 61 (1987).
- ¹² Sarer E., Scheffer J. J. C., and Svedsen A. B.: “Monoterpenes in the essential oil of *Origanum majorana*”, *Planta Med.* 46, 236 – 239, (1982)
- ¹³ Biacs P. and Wissgott U., “Investigation of colour changes of some tomato products during frozen storage”, *Nahrung* **41** : 306 310 (1997).
- ¹⁴ Gutierrez J., BarryRyan C. Bourke P.: “The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients”, *International Journal of Food Microbiology* 124 : 91 (2008).
- ¹⁵ Fleisher A. Fleisher Z.: “Identification of Biblical Hyssop and Origin of the Traditional Use of OreganoGroup Herbs in the Mediterranean Region”, *Economic Botany* 42 : 232 241 (1988).
- ¹⁶ Steflitsch W. Steflitsch M.: “Clinical aromatherapy”, *Journal of Men's Health* **5** : 74 (2008)
- ¹⁷ Adams M., Gmnder F. Hamburger M.: “Plants traditionally used in age related brain disordersA survey of ethnobotanical literature”, *Journal of Ethnopharmacology* 113 : 363381 (2007).
- ¹⁸ Thorsell WA, Mikiver M & Malam E.: “Plant extracts as protectants against disease causing insects”, *Entomologisk Tidskrift* 100: 138–141 (1979).

- ¹⁹ Cowan M.M.: “Plant products as antimicrobial agents *Clinical Microbiology*”, *Reviews* 12: 564–582 (1999).
- ²⁰ Abbassy M.A.: “Naturally occurring chemicals for pest control. V. Insecticidal and synergistic citrus oils isolated from certain food and medicinal plants”, *Proceedings of the Fourth Arab Pesticide Conference*, (ed. by AS El-Nawawy), Vol. IIIA. 409–414, Tanta University, Tanta, Egypt (1981).
- ²¹ Curtis C.F., Lines J.D., Lu B. & Renz A.: “Natural and synthetic repellents”, *Control of Disease Vectors in the Community* (ed. by CF Curtis), 75–92, Wolfe Publishing, London, UK (1991).
- ²² Regnault-Roger C.: “The potential of botanical essential oils for insect pest control”, *Integrated Pest Management Review* 2: 15–34 (1997).
- ²³ A. Gupta, R. Gupta, and B. Lal: “Effect of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study,” *Journal of Association of Physicians of India*, 49, 1057–1061, (2001).
- ²⁴ L. Leeja and J. E. Thoppil: “Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (Sweet marjoram)”, *Journal of Environmental Biology*, 28, 1, 145–146, (2007).
- ²⁵ S. Chao, G. Young, C. Oberg, and K. Nakaoka :“Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils”, *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 6, 444–449, (2008).
- ²⁶ R. Yazdanparast and L. Shahriyary: “Comparative effects of *Artemisia dracunculus*, *Satureja hortensis* and *Origanum majorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion”, *Vascular Pharmacology*, 48, 1, 32–37, (2008).
- ²⁷ Woo Jin Jun, Bok Kyung Han, Kwang Won Yu, Moo Sung Kim, Ih Seop Chang, Hee Yun Kim and Hong Yon Cho: “Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals”, *Food Chemistry* 75 : 439 (2001).
- ²⁸ Sellami I.H., Maamouri E., Chached T., Wannes W.A., Kchouk M.E. Marzouk B.: “Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) ”, *Industrial Crops and Products* 30: 395 402 (2009).

- ²⁹ Baričević H., Bartol T.: “*The biological/pharmacological activity of the Origanum Genus*, in Sp. Kintzios *Oregano*”, The genera *Origanum* and *Lippia*, CRC Press, USA (2002).
- ³⁰ Yu Y.M., Tzeng Y.M. Chang W.C.: “*Origanum majorana* L. prevents cardiovascular disease caused by obesity: suppression of leptin-induced proliferation in vascular smooth muscle cells”, *Atherosclerosis Supplements* 11 (2010).
- ³¹ Massih R.L., Fares R., Bazzi S., ElChami N. Baydoun E.: “*e apoptotic and antiproliferative activity of Origanum majorana extracts on human leukemic cell line*”, *Leukemia Research* 34 : 1052 (2010).
- ³² Okazaki K., Nakayama S., Kawazoe K. Takaishi Y.: “*Antiaggregant Effects on Human Platelets of Culinary Herbs*”, *Phytotherapy Research* 12 : 603 (1998).
- ³³ Yazdanparast R. Shahriyary L.: “*Comparative effects of Artemisia dracunculus, Satureja hortensis and Origanum majorana on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion*”, *Vascular Pharmacology* 48 : 3237 (2008).
- ³⁴ Hammer K.A., Carson C.F. Riley T.V.: “*Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*”, *Journal of Applied Microbiology* 86 (1999).
- ³⁵ Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.s., Mossi A.J., Dariva C., Rodrigues M.R.A., Corazza F.C., Corazza M.L., Oliveira J.V. Cansian R.L.: “*Application of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage*”, *Food Microbiology* 25 : 207 211 (2008).
- ³⁶ El Shafei G., ElSaid M., Attia H. Mohammed T.: “*Environmentally friendly pesticides: Essential oilbased w/o/w multiple emulsions for antifungal formulations*”, *Industrial Crops and Products* 31 : 99 (2010).
- ³⁷ Deans S.G, Ritchie G.: “*Antibacterial properties of plant essential oils*” *Journal of Food Microbiology*, Volume 5, Issue 2, 165-180 (1987).

Κεφάλαιο 5

Ocimum basilicum

5.1. Εισαγωγή

Ο βασιλικός (λατ. *Ocimum basilicum*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*. Η οικογένεια *Lamiaceae* περιλαμβάνει τα πιο χρησιμοποιούνται φαρμακευτικά φυτά ως μια παγκόσμια πηγή μπαχαρικών, αλλά και ως σημαντική πηγή των εκχυλισμάτων. Εξωτερικά, ο βασιλικός χαρακτηρίζεται από πλατειά φύλλα και χαρακτηριστική διακλάδωση μίσχων. Είναι το φυτό που καλλιεργείται σε εύκρατο κλίμα σε όλο τον κόσμο. Ο ακριβής αριθμός των ειδών του γένους *Ocimum* είναι προσεγγιστικός αλλά σύμφωνα με τους Tchoumboungang *et al.*, περιλαμβάνει τουλάχιστον 200 ποικιλίες που κατατάσσονται σε 64 ομάδες ειδών [1].

Υπάρχουν πολλές εκδοχές για την προέλευση της λέξης βασιλικός αλλά η πιο αξιόπιστη είναι ότι είναι μια συντετμημένη μορφή της ελληνικής «βασιλικό βότανο». Διάφορα μέρη του φυτού του *O. basilicum* έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική. Φύλλα και ανθοφόρα τμήματα του *O. basilicum* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως αντισπασμωδικά και αρωματικά σκευάσματα. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων, όπως εμπύρετη νόσο, κακή πέψη, ναυτία, κοιλιακές κράμπες, γαστρεντερίτιδα, ημικρανία, αϋπνία, κατάθλιψη και δυσεντερία [2].



Εικόνα 5.1. Φύλλα *Ocimum basilicum* (Βοτανικός κήπος Αργοστολίου Κεφαλληνίας)

5.2 Χημική σύσταση

5.2.1. Εκχύλισμα

Η χημική σύνθεση του εκχυλίσματος του βασιλικού αποτελεί συνεχές αντικείμενο μελέτης. Η βιβλιογραφία συνοψίζεται στους πίνακες 5.1 και 5.2.

Πίνακας 5.1. Χαρακτηριστικές κορυφές φασματομετρίας μάζας εκχυλίσματος βασιλικού (με ιδιαίτερη έμφαση στα αντιοξειδωτικά παράγωγα) [3].

RT (min)	Φαινολικά παράγωγα	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	[(M+H)+17] ⁺	UV _{max} (nm)
17.44	Caffeic acid	181	179	198	241,297s,327
25.99	Dihydrokaempferol-3- glucoside	467	465	484	245,302s,332
	Luteolin acetyl- glucuronide	505	503	522	
	Dihydroxykaempferol -glycoside	435	433	451	
34.69	Rosmarinic acid	361	359	378	234,291s,331
39.7	Caffeoyl ester	195	193		243,298s,327
45.32	Carnosic acid	333	331		246s,297
6.11	catechin	291	289	308	225,250
11.21	Catechol derivatives(NI-1)	313	311	330	250s,300s,330
16.36	Cinnamyl derivatives(NI-2)	327	325	344	300,328,236
19.26	Caffeic acid	181	179	198	244,300s,330
23.36	Caffeoyl derivatives(NI-3)	475	473	492	244,305
24.91	NI-4		249		243,300s,331
30.04	Ferulic acid Caffeoyl -3-O- rutinise Rosmarinic acid	195	193		243,300s,330
38.49	Apigenin Apigenin-glucuronide	271	269		242,300s,331
39.3	Caffeoyl ester	195	193		242,298s,327
52.49	NI-5	409	407	426	243,315
52.6	chlorogenin	355	353	372	245,292

54.13	NI-6 Chlorogenic acid	311	309	328	245,310
11.13	Catechol derivatives	313	311	330	246s,300s,330
16.13	Cinnamyl derivatives	327	325	344	328,236
23.4	Caffeoyl derivatives		249		243,300s,331

Στον παρακάτω πίνακα (5.2) φαίνονται μερικά από τα συστατικά του *O. Basilicum* όπως προσδιορίστηκαν με HPLC-MS^[4].

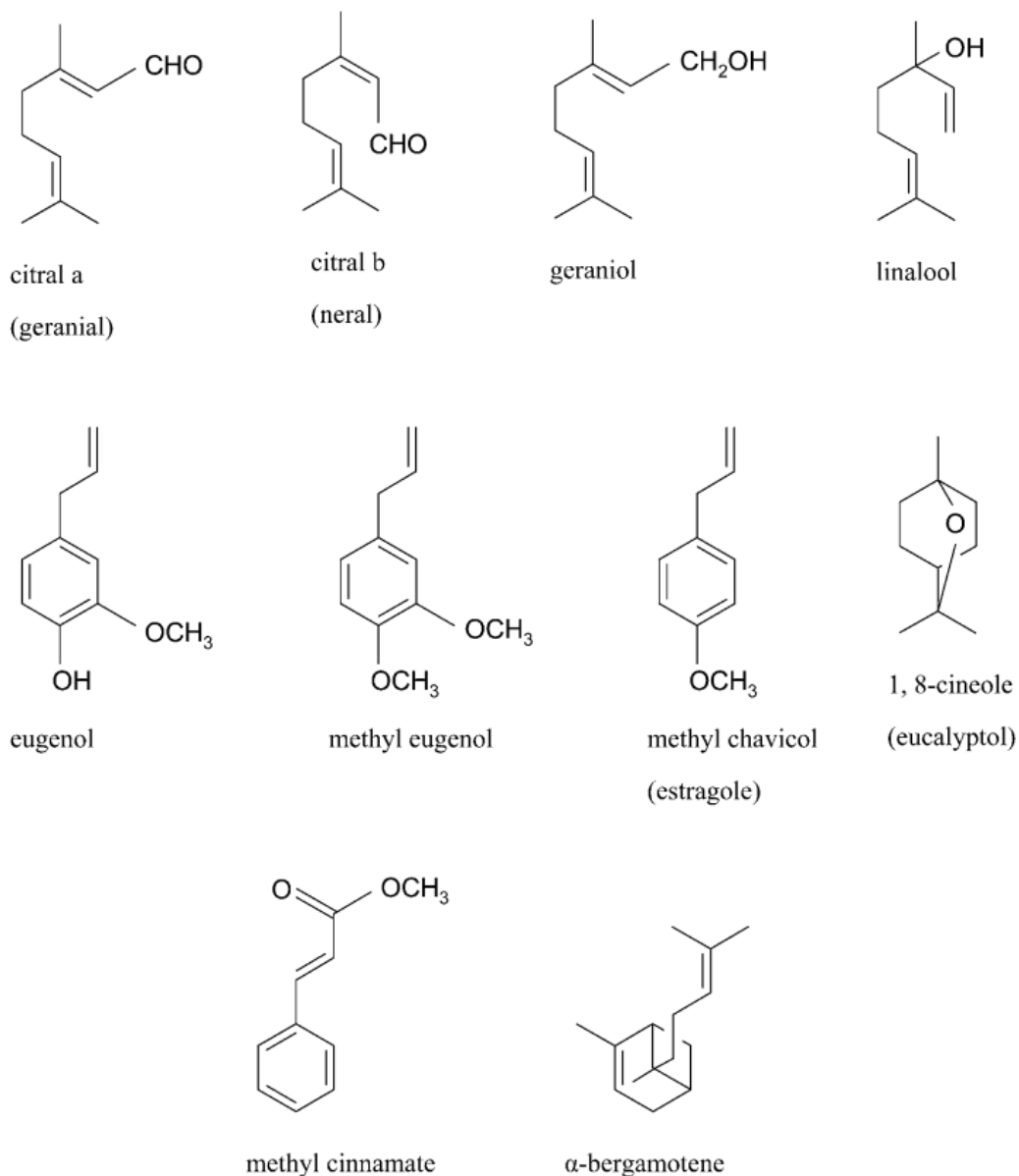
Πίνακας 5.2. Συστατικά του *O. Basilicum* από HPLC-MS

RT (min)	[M-H] ⁻	Ένωση	Αναφορά
8.17	447	Luteolin 5- <i>O</i> -glucoside	[⁵]
10.4	395	Caffeic acid derivative	[⁶]
10.7	179	Caffeic acid	Commercial standard
11.3	609	Rutin	Commercial standard
12.1	473	Chicoric acid	Commercial standard
12.4	537	Kaemperol 3- <i>O</i> -maonylglucoside	[⁷]
13.4	503	Luteolin acetyl-glucuronide	[³]
16.1	359	Rosmarinic acid	Commercial standard
20.2	456	Ursolic acid	Commercial standard

Ποσοτικά χαρακτηριστικά της σύστασης του εκχυλίσματος του βασιλικού φαίνονται στον Πίνακα 5.3 ενώ σημαντικές χημικές ενώσεις του εκχυλίσματος αλλά και του αιθέριου ελαίου του βασιλικού φαίνονται στο Σχήμα 1.

Πίνακας 5.3. Ενεργειακή απόδοση και σύσταση φύλλων βασιλικού σε βασικά ανόργανα και οργανικά συστατικά (ανά 100 g) [4]

	Απόδοση	% συνιστώμενη ημερήσια δόση (FDA)
Energy	23 Kcal	1
Carbohydrates	2.65 g	2
Protein	3.15 g	6
Total fat	0.64 g	2
Cholesterol	0 mg	0
Dietary fiber	1.60 g	4
Folates	68 mcg	17
Niacin	0.902 mg	6
Pantothenic acid	0.209 mg	4
Pyridoxine	0.155 mg	12
Riboflavin	0.076 mg	6
Thiamin	0.034 mg	2.5
Vitamin A	5275 IU	17.5
Vitamin C	18 mg	30
Vitamin E	0.80 mg	5
Vitamin K	414.8 mcg	345
Sodium	4 mg	0
Potassium	295 mg	6
Ανόργανα συστατικά		
Calcium	177 mg	18
Copper	385 mg	43
Iron	3.17 mg	40
Magnesium	64 mg	16
Manganese	1.15 mg	57
Οργανικές ενώσεις		
Carotene	3142 mcg	-
Crypto-xanthin	46 mcg	-
Lutein-zeaxanthin	5650 mcg	-



Σχήμα 5.1. Χημικές δομές των κύριων συστατικών του *O. basilicum*

5.2.2. Αιθέριο έλαιο

Η χημική σύνθεση του αιθέριου ελαίου βασιλικού έχει διερευνηθεί και μέχρι τώρα περισσότερα από 200 χημικά συστατικά έχουν αναφερθεί από πολλές περιοχές του κόσμου. Η χημική σύσταση έδειξε την παρουσία υδρογονανθράκων μονοτερπενίου και οξο-μονοτερπενίου, φλαβονοειδών και αρωματικών ενώσεων. Επίσης η χημική τους σύνθεση διαφέρει σημαντικά στις διάφορες εποχές του χρόνου όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4. Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων *O. Basilicum*^{α,β}

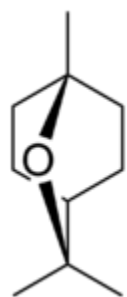
Φυτοχημικά	% Σύσταση			
	<i>Καλοκαίρι</i>	<i>Φθινόπωρο</i>	<i>Χειμώνας</i>	<i>Άνοιξη</i>
Limonene	t	t	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0
cis-b-Ocimene	-	-	0.8 ± 0.0	0.6 ± 0.0
1,8-Cineole	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0
Fenchone	t	t	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Linalool oxide	t	t	1.1 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Linalool	56.7 ± 1.7	60.5 ± 1.8	60.6 ± 1.2	58.6 ± 1.3
Camphor	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1
a-Terpineol	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0
cis-Geraniol	0.9 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Linalyl acetate	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	t	-
Bornyl acetate	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	t	t
a-Copaene	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-
b-Cubebene	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	t	t
b-Caryophyllene	1.7 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.0
a-Bergamotene	9.2 ± 0.2	7.4 ± 0.3	7.8 ± 0.2	7.6 ± 0.2
a-Humulene	t	t	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0
c-Muurolene	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0
Germacrene	3.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0	2.0 ± 0.1
b-Selinene	0.8 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Bicyclogermacrene	1.1 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0
γ-Cadinene	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1
Calamenene	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0
Spathulenol	t	t	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Caryophyllene oxide	t	t	0.7 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Viridiflorol	1.7 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.6 ± 0.1
Cadinol	11.4 ± 0.2	12.4 ± 0.4	8.6 ± 0.2	10.0 ± 0.3
b-Eudesmol	t	t	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
a-Cadinol	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
a-Bisabolol	t	t	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0

Σύνολο	98.6	99.0	98.0	99.7
--------	------	------	------	------

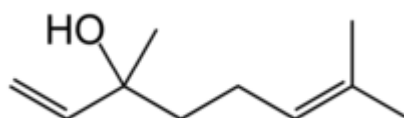
α. Τιμές σε μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση

β. t: trace (<0.05%).

Στο Σχήμα 5.2 φαίνονται οι χημικοί τύποι των ενώσεων που συμμετέχουν στην σύσταση του αιθέριου ελαίου σε αναλογία > 1%.



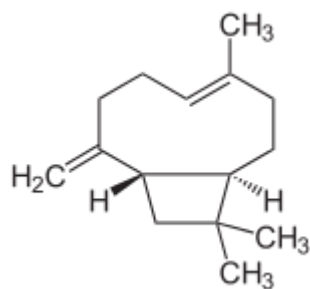
1,8-Cineole



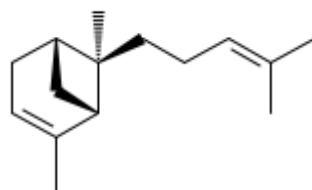
Linalool



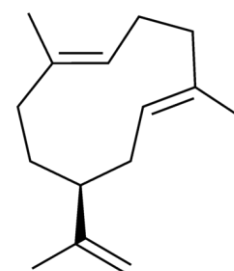
Camphor



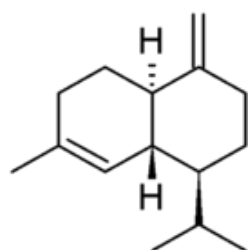
b-Caryophyllene



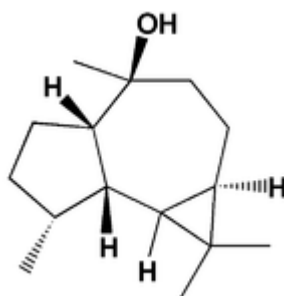
a-Bergamotene



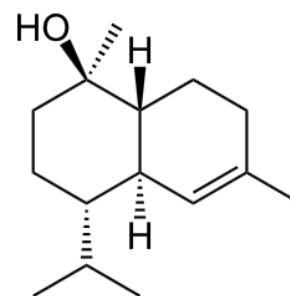
Germacrene



γ-Cadinene



Viridiflorol



Cadinol

Σχήμα 5.2. Χημικές δομές αιθέριου ελαίου του *O. basilicum* σε αναλογία > 1%

Το linalool είναι το κύριο συστατικό του *O. Basilicum* στο αιθέριο έλαιο (60.6%), ακολουθούμενο από τα α-cadinol, γ-cadinene, α-bergamotene, c-cadinene, germacrene D και camphor. Επίσης τα αιθέρια έλαια βρέθηκε ότι γενικότερα αποτελούνται κυρίως από οξυ-γονωμένα μονοτερπένια (68.9%), από σεσκιτερπένια

(24.3%) και οξυγονωμένα sesquiterpenes (14.4%). Οι ενώσεις αυτές είναι κοινές μεταξύ των αιθέριων ελαίων από διάφορες περιοχές όπως η Τουρκία, το Μπαγκλαντές, η Βουλγαρία και η Ινδία. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα συστατικά μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες και σε διαφορετικούς χημειότυπους.

Πίνακας 5.5. Χημειότυποι αιθέριων ελαίων *O. Basilicum* ανά γεωγραφική περιοχή [7]

Περιοχή	Κύριο Συστατικό	Χώρα αναφοράς
European	linalool, methyl chavicol	Γαλλία, Ιταλία, Αίγυπτος, Ουγγαρία, Νότια Αφρική, U.S.A.
Tropical	methyl cinnamate	Βουλγαρία, Ινδία, Γουατεμάλα, Πακιστάν
Java	eugenol	Ινδονησία, Βόρεια Αφρική, Ρωσία

Η χημική ανάλυση των ουσιωδών ελαίων που προέρχονται από *O. basilicum* έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών με διαφορετικά αποτελέσματα από χώρα σε χώρα (Πίνακας 5.6) και το γεγονός αυτό καθιστά πολύ ελκυστική την έρευνα για την ταυτοποίηση φυτών διαφορετικής προέλευσης.

Πίνακας 5.6. Χημικά συστατικά *O. Basilicum* με βάση την χώρα προέλευσης

Χώρα προέλευσης	Χημική Σύσταση (% w/w)	Αναφορά
Μπενίν		[36]
	methyl chavicol (> 65)	
	methyl chavicol (55), linalool (20-30)	
	linalool (42-45), eugenol (15), with or without trans-R-bergamotene (6-15)	
Βραζιλία		[35]
	linalool (49.73)	
	1,8-cineole (22)	
	methyl chavicol (47)	

Καμερόν	linalool (50.8), eugenol (13.5), limonene (10.4), 1,8-cineole (3.1)	[⁸]
Κούβα	linalool (4.95), R-bisabolene (3.60) (E)-R-bergamotene (2.96)	[⁹]
Γερμανία	methyl chavicol (86.1)	[¹⁰]
Ιταλία		[¹¹]
	linalool (70), 1,8-cineole (13)	
	linalool (41-60), methyl chavicol (18- 41) 1,8-cineole (2-6)	
	linalool (61-76), eugenol (4), 1,8- cineole (1-11)	
	eugenol (2.22-3.89), linalool (60.76- 64.14)	
	eugenol (trace-1.99), linalool (69.06- 76.20)	
Μογγολία	methyl chavicol (52), linalool (23.8), δ- cadinol (4.4)	[¹²]
Νέα Γουινέα	linalool (69), eugenol (10), trans-R- bergamotene (3), thymol (2)	[¹³]
Σομαλία	dihydrotagetone (> 80)	[¹⁴]
Ταϊλάνδη	methyl chavicol and R-humulene (88.2)	[¹⁵]
Τουρκία	linalool (17-24), methyl-(E)-cinnamate (12-16), 1,8-cineole (7-13), δ-cadinol (5-7)	[¹⁶]

5.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων

Ένας σχετικά μεγάλος αριθμός παραγόντων βρέθηκε ότι επηρεάζουν τη σύνθεση των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων του βασιλικού:

- (i) Η περίοδος συγκομιδής των φυτών, συμπεριλαμβανομένων της πρώιμης ανθοφορίας, και του χρόνου σποράς. Για παράδειγμα, το είδος *Genovese Gigante*, περιέχει λιναλοόλη ως κύριο συστατικό του κατά την έναρξη της ανθοφορίας, αλλά η ισοευγενόλη και ευγενόλη βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση μεταξύ 4 και 6 εβδομάδων μετά την σπορά [17].
- (ii) Η μέθοδος εκχύλισης επηρεάζει τη σύνθεση των εκχυλισμάτων. Έτσι, οι αποδόσεις είναι υψηλότερες χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμο CO₂ που ακολουθείται από το υγρό CO₂ και στη συνέχεια νερό [32]. Επίσης οι μέθοδος εκχύλισης του βασιλικού επηρεάζει τη χημική σύνθεση και των μεγάλων πτητικών ουσιών.
- (iii) Θερμικές τεχνικές επεξεργασίας που μπορεί να έχει δυσμενή επίδραση επί του περιεχομένου στις θερμικά ασταθείς ενώσεις, όπως λιναλοόλη, και κινναμικού μεθυλεστέρα [18].
- (iv) Η λυοφιλίωση των φύλλων βασιλικού μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση της λιναλοόλης [31].
- (v) Συμπληρωματική επεξεργασία με ακτινοβολία UV-B μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των πιο σημαντικών πτητικών όπως τα φαινυλοπαράγωγα και τα τερπενοειδή [19].
- (vi) Το περιεχόμενο σε μερικά συστατικά όπως του μεθυλο-καβικόλη και μεθυλο-(E)-κινναμικού είναι συνήθως υψηλότερο σε βασιλικό του αγρού σε σχέση με τα φυτά του θερμοκηπίου. Αντίθετα, το περιεχόμενο λιναλοόλης είναι μικρότερο σε σύγκριση με τα φυτά του θερμοκηπίου [35].

Υπάρχει σημαντική έρευνα σε εξέλιξη για να καθοριστεί αν φυσικά φυτικά εκχυλίσματα θα μπορούσαν να δράσουν ως αντιμικροβιακός παράγοντας σε συσκευασμένα τρόφιμα.

5.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες

5.4.1 Παραδοσιακές χρήσεις του βασιλικού

Το *O. basilicum* είναι ένα δημοφιλές μαγειρικό βότανο, και τα αιθέρια έλαια του έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για πολλά χρόνια στην ζαχαροπλαστική καθώς και

σε καρυκεύματα (π.χ., κέτσαπ, πάστες ντομάτα, τσίλι, και ξύδι), λουκάνικα και κρέατα, σάλτσες σαλάτας, μη αλκοολούχα ποτά και παγωτά. Λάδι βασιλικού έχει βρει επίσης ευρεία εφαρμογή στην αρωματοποιία, καθώς και σε οδοντιατρικά προϊόντα [20]. Επιπλέον, σήμερα χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων [21], φυσικής προέλευσης. Μελετάται η χρήση του αιθέριου ελαίου του βασιλικού στη διατήρηση των τροφίμων λόγω της χημικής σύνθεσης του και της επίδρασης που έχει στους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελαίου βασιλικού που διατίθενται στο εμπόριο. Αυτά τα έλαια συνήθως εξάγονται με απόσταξη από φύλλα και ανθοφόρες κορυφές ή από επεξεργασία με υγρό CO₂ ή σε υπερκρίσιμη φάση.

Ο βασιλικός χρησιμοποιείται σε παραδοσιακά φάρμακα, ως ένα γαστρονομικό βότανο και ως πηγή αρωματικών προϊόντων [22]. Είναι ένα δημοφιλές βότανο στις ΗΠΑ και ιδιαίτερα στη Μεσόγειο. Οι βιομηχανίες καλλυντικών χρησιμοποιούν βασιλικό σε σαπούνια, σαμπουάν, λοσιόν, έλαια και αρώματα. Το λάδι του έχει χρησιμοποιηθεί ως άρωμα και ως φάρμακο για το άγχος, τις ημικρανίες, και την αλλεργική ρινίτιδα. Ο βασιλικός ως αφέψημα είναι καλό για την πέψη.

5.4.2 Βιολογική και Φαρμακευτική δράση

Κατά τα τελευταία έτη, τα αιθέρια έλαια και τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν προσελκύσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον ως πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Η αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων αποτέλεσαν τη βάση για πολλές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων νωπών και μεταποιημένων τροφίμων ενώ η έρευνα έχει επεκταθεί και στην πιθανότητα θεραπείας μολυσματικών ασθενειών. Επίσης χρησιμοποιείται για τη θεραπεία από πνευματική κόπωση και σε νευρικές καταστάσεις. Φύλλα και ανθοφόρα τμήματα του *O. Basilicum* έχουν ιατρική χρήση ως αντισπασμωδικά και τονωτικά. Μελέτες έδειξαν ότι τα αλκοολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν καρδιοτονωτικά αποτελέσματα ενώ το υδατικό εκχύλισμα προσομοιάζει αποτελέσματα που οφείλονται σε αδρενεργικούς υποδοχείς (adrenergic receptors) δηλαδή υποδοχείς που ενεργοποιούνται από νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη.

Έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έδειξε επίσης καρδιοτονωτικά,

υπογλυκαιμικά και υπολιπιδαιμικά αποτελέσματα και ανασταλτικά επί της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Τα αιθέρια έλαια βρέθηκε ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δραστικότητα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων και ζυμομυκήτων. Επίσης, μελετήθηκαν ευρέως εκχυλίσματα του *O. basilicum* για πιθανή *in vitro* αντιμικροβιακή δραστικότητα σε αιθανόλη, μεθανόλη και εξάνιο. [23]. Βρέθηκε ότι τα τρία εκχυλίσματα είχαν διαφορετική αντιβακτηριακή δραστικότητα: το εκχύλισμα αιθανόλης εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι 9 στελεχών των *acinetobacter*, *escherichia* και *staphylococcus*, καθιστώντας το αποτελεσματικό σε ποσοστό 6% από τα συνολικά 146 βακτηριακά στελέχη που δοκιμάστηκαν. Από την άλλη πλευρά, τα εκχυλίσματα σε μεθανόλη και εξάνιο έδειξαν αντιβακτηριακή δράση κατά 11 και 13 αντιστοίχως στελεχών έξι βακτηριακών γενών: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brucella*, *Escherichia*, *Micrococcus* και *Staphylococcus* ήτοι το 9% και 10% των 146 βακτηριακών στελεχών που δοκιμάστηκαν, αντίστοιχα [24] (Πίνακας 5.7)

Πίνακας 5.7. Βιολογική δραστικότητα των φυτοχημικών του βασιλικού

Αντιβακτηριακές ιδιότητες		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> . Two different strains of <i>Escherichia coli</i> .	Methanol extract	[25]
<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> and <i>Pseudomonas</i>	Linalool, methylchavicol, methyl cinnamat and linolen	[26]
<i>Escheriachia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i> .	Extract	[27]
<i>Giardia lamblia</i>	Linalool	[28]
<i>Pseudomonas aernuginosa</i>	Rosmarinic acid	[29]
9 strains of 4 genera (<i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i>)	Ethanol extract	[30]
11 strains of 6 genera (<i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brucella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Micrococcus</i> and <i>Staphylococcus</i>)	Methanol extract	[15]

13 strains of 6 genera (<i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brucella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>)	Hexane extract	[¹⁵]
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>Vibrio mimicus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , and <i>Salmonella typhi</i>	methanol extract	[³¹]
Antifungal activity		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.), <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. exFr.) Vuill, <i>Mucor</i> sp. (Fisher)	Linalool and eugenol	[³²]
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> and <i>Rhizopus nigricans</i> ,	Cineol, linalool, methylchavicol and eugenol	[³³]
Three isolates of <i>Candida albicans</i>	Methanol and hexane extract	[¹⁵]
Antiviral activity		
Herpes viruses, Adenoviruses, hepatitis B virus and coxsackie virus B1 and enterovirus 71	Apigenin, linalool	[³⁴]
Insecticidal activity		
<i>Spodoptera littoralis</i> (Egyptian cottonworm)	Extract	[¹⁹]
<i>Tribolium castaneum</i> , <i>Sitophilus oryzae</i> , <i>Stagobiom paniceum</i> , <i>Bruchus chinensis</i> (stored grain insects)	Ocimene, cineole, linalool, methyl cinnamate, methyl chavicol	[³⁵]
<i>Ceratitis capitata</i> , <i>Bactrocera dorsalis</i> , <i>B.cucurbitae</i>	Basil oil and <i>trans</i> -anethole, estragole, linalool	[³⁶]
Trypanocidal activity		
Epimastigotes and trypomastigotes forms	eugenoland linalool	[³⁷]

Οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες του ελαίου *O. basilicum* μελετήθηκαν μέσω ενσωμάτωσης των πτητικών ελαίων σε οδοντόκρεμες σε αναλογία 2 και 5% [38]. Τα πτητικά έλαια έδειξαν αντιβακτηριδιακές δραστηριότητες συγκρίσιμες με μια εμπορική οδοντόκρεμα ενώ ήδη έχουν εμφανισθεί στην αγορά οδοντόκρεμες που περιέχουν έλαιο *O. basilicum* σε αναλογία 0,01%.

Επίσης προτάθηκε ότι το αιθέριο έλαιο του *Ocimum basilicum* επιδρά στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Όταν δοκιμάστηκε σε ποντικούς, το αιθέριο έλαιο δεν είχε καμία επίδραση στην κινητική δραστηριότητα μέχρι δόσης 1.2 mL kg⁻¹. Ωστόσο, υψηλότερες δόσεις προκάλεσαν δυσλειτουργία κίνησης. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αιθέριου ελαίου μείωσε σημαντικά τους σπασμούς σε πειραματόζωα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η απόκριση προς διαφορετικά σπασμωδικά ερεθίσματα (ED₅₀) ήταν 0.61, 0.43 και 1.27 ml kg⁻¹, έναντι σπασμών που προκαλούνται από πεντυλενετετραζόλη, πικροτοξίνη και στρυχνίνη, αντίστοιχα [39]. Αντίθετα, το αιθέριο έλαιο δεν έχει καμία τοπική αναισθητική δράση [40].

Σύμφωνα με τους Zeggwagh *et al.* [41], το υδατικό εκχύλισμα του *Ocimum basilicum* εμφανίζει υπογλυκαιμική δράση σε διαβητικούς επίμυες. Μετά από εφάπαξ από του στόματος χορήγηση, το υδατικό εκχύλισμα μείωσε σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης αίματος σε φυσιολογικούς ($p < 0.01$) και διαβητικούς επίμυες ($p < 0.001$). Επίσης τα συστατικά του *O. Basilicum* περιέχουν πολικές ενώσεις που είναι ενδεχομένως σε θέση να μειώσουν τις συγκεντρώσεις λιπιδίων στο πλάσμα επ' ωφελεία στην πρόληψη της υπερλιπιδαιμίας και σχετιζομένων καρδιαγγειακών παθήσεων, με σημαντική μείωση της χοληστερόλης στο ήπαρ και των τριγλυκεριδίων. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρείται επίσης και στη συγκέντρωση της LDL. Τα υδατικά διαλύματα έδειξαν σημαντικό αντιθρομβωτικό προφίλ αναστέλλοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από την ADP και την θρομβίνη. Επίσης αναφέρεται η επιτάχυνση της επούλωσης επιφανειακών δερματικών πληγών σε επίμυες [42]. Σε ότι αφορά στην τοξικότητα αν και δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, είναι βέβαιο ότι τα διάφορα είδη του *O. Basilicum* περιέχουν ποικιλία σχετικά τοξικών ενώσεων σε διάφορες, κατά κανόνα μικρές, συγκεντρώσεις. Μερικές από αυτές τις ενώσεις είναι: η σαφρόλη, το καφεϊκό οξύ, η τρυπτοφάνη και η κερσετίνη. Για παράδειγμα, το καφεϊκό οξύ (και γενικότερα τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται σε αφθονία στον βασιλικό) μπορεί να αναστείλει την

πέψη των φυτικών ενώσεων στα μηρυκαστικά εξαιτίας της αντιμικροβιακής τους δράσης. Επίσης δρουν στον μεταβολισμό μέσω των παράγωγων ενώσεων που σχηματίζονται κατά την οξείδωση των συστατικών. Η κερσετίνη (α-flavanoid) έχει προταθεί ότι μπορεί να σχετίζεται με κακοήθη επιθηλιακά θηλώματα στο ανώτερο πεπτικό σωλήνα των βοοειδών [⁴³]. Η σαφρόλη, χρησιμοποιήθηκε παλαιότερα σε αναψυκτικά ενώ σήμερα έχει απαγορευθεί από τον FDA στις ΗΠΑ ως ύποπτο συστατικό καρκινογένεσης.

5.4.3. Αντιοξειδωτική δράση

Υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στην βιβλιογραφία για την αντιοξειδωτική δράση του βασιλικού (*O. Basilicum*). Οι πιθανές χρήσεις του εκχυλίσματος και του αιθέριου ελαίου του *O. Basilicum* ως αντιμικροβιακό και αντιοξειδωτικό ακόμα αποτελεί αντικείμενο μελέτης λόγω της ισχυρής δραστηριότητας του αιθέριου ελαίου [⁴⁴] και αποτελεί σημαντικό μέρος του αντικειμένου της παρούσας διατριβής.

Αναφορές

- ¹ Tchoumboungang F., Amvam Zollo., Avlessi F., Alitonou. G.A, Sohounhloue D.K., Ouamba J.M., Tsomambet A., Okemy-Andissa N., Dagne E., Agnani H., Bessière J.M. and Menut C.: “Variability in the chemical compositions of the essential oils of five *Ocimum* species from tropical African area”, *J. Essent. Oil Res.*, 18, 194 (2006).
- ² Kaya I., Yigit N. and Benli M.: “Phytochemical constituents and pharmacological activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae)”, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 5, 363 (2008).
- ³ Jayasinghe C., Gotoh N., Aoki T., Wada S.: “Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4442-4449 (2003).
- ⁴ Lu Y. J., Gao B. Y., Chen P., Charles D., Yu L. L.: “Characterisation of organic and conventional sweet basil leaves using chromatographic and flow-injection

- mass spectrometric (FIMS) fingerprints combined with principal component analysis”, *Food Chemistry* 154, 262-268 (2014).
- ⁵ Grayer R. J., Kite G.C., Veitch N.C., Eckert M.R., Marin P.D., Senanayake P., et al.: “Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*”, *Biochemical Systematics and Ecology* 30 , 327–342 (2002).
- ⁶ Jaiswal R., Kuhnert N.: “Identification and characterization of two new derivatives of chlorogenic acids in *Arnica* (*Arnica montana* L.) flowers by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 4033–4039 (2011).
- ⁷ Simon J. E., Quinn J., Murray R. G.: “Basil: a source of essential oils. In *Advances in New Crop*”, Timber Press: Portland, OR, 484-489 (1990).
- ⁸ Amvam Zollo, P. H., Biyiti L., Tchoumboungang F., Menut C., Lamaty G., Bouchet P.: “Aromatic plants of tropical central africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon”, *FlaVour Fragrance J.* 13, 107-114 (1998).
- ⁹ Pino J., Rosado A., Goire I., Roncal E., Garcia I.: “Analysis of the essential oil from cuban basil (*Ocimum basilicum* L.)”, *Die Nahrung* 37, 501-504 (1993).
- ¹⁰ Baratta M. T., Dorman H. J. D., Deans S. G., Figueiredo A. C., Baroso J. G., Ruberto G.: “Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils”, *FlaVour Fragrance J.* 13, 235-244 (1998).
- ¹¹ Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E.: “Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.)”, Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3926-3929, (1996).
- ¹² Shartar S., Altantsetseg S.: “Essential oil composition of some plants cultivated in Mongolian climate”, *J. Essent. Oil Res.* 12, 745-750 (2000).
- ¹³ Keita S. M., Vincent C., Schmit J.-P., Belanger A.: “Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suaVe* L. in the Republic of Guinea” *FlaVour Fragrance J.* 15, 339-341 (2000).
- ¹⁴ Ruberto G., Spadaro A., Piattelli M., Piozzi F., Passannanti S.: “Volatile flavour components of *Ocimum basilicum* var. *hispidum* (Lam.) Chiov.” *FlaVour Fragrance J.* 6, 225- 227 (1991).
- ¹⁵ Hogg B. M., Terhune S. J., Pichitakul N.: “Essential oils and their constituents. IX. The oils of *Ocimum basilicum* from Thailand”, *FlaVour Ind.* 3, 47-49 (1972).

- ¹⁶ Ozek T., Beis S. H., Demircakmak B., Baser K. H. C.: “Composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L.cultivated in Turkey”, J. Essent. Oil Res. 7, 203-205 (1995).
- ¹⁷ Miele M., Dondero R., Ciarallo G., Mazzei M.: “Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv Genovese Gigante”, J. Agric. Food Chem. 49, 517-521 (2001).
- ¹⁸ Reverchon E., Donsi G., Pota F.: “Extraction of essential oils using supercritical CO₂: Effect of some process and preprocess parameters”, Ital. J. Food Sci. 4, 187-194 (1992).
- ¹⁹ Johnson C. B., Kirby J., Naxakis G.: “Pearson, S. Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)”, Phytochemistry 51, 507-510 (1999).
- ²⁰ Guenther E.: “The Essential Oils”, Krieger Publishing Company: Malabar, FL, Vol. III (1975).
- ²¹ Nicholson M. D.: “The role of natural antimicrobials in food/ packaging biopreservation” , J. Plast. Film Sheeting 14, 234-241 (1998).
- ²² Sekar K., Thangaraj S., Babu S.S., Harisaranraj R. and Suresh K., Phytol J., 1, 408 (2009).
- ²³ Budka D. and Khan N.A.: “ The effect of *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* essential oils on *Bacillus cereus* in rice-based foods”, Eur. J. Biol. Sci., 2, 17 (2010).
- ²⁴ Bunrathep S., Palanuvej C. and Ruangrunsi N.: “ Phytochemical constituents and pharmacological activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae)”, J. Health Res., 3, 201 (2007).
- ²⁵ Kaya I., Yigit N. and BenliM.: “ Phytochemical constituents and pharmacological activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae)”, J. Tradit. Complement. Altern. Med., 5, 363 (2008).

- 26 Opalchenova G. and Obreshkova D.: “Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*”, *J. Microbiol. Methods*, 54, 105 (2003).
- 27 Onwuliri F.C., Wonang D.L. and Onwuliri E.A.: “Phytochemical constituents and pharmacological activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae)”, *Int. J. Nat. Appl. Sci.*, 2, 214 (2006).
- 28 Almeida I., Alviano D.S., Vieira, D.P. Alves P.B., Blank A.F., Lopes A.H., Alviano C.S. and Mdo S.R.: “Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil”, *Parasitol. Res.*, 101, 443 (2007).
- 29 Bais H.P., Walker T.S., Schweizer H.P. and Vivanco J.M.: “Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*”, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 983 (2002).
- 30 Adiguzel A., Gulluce M., Pengul M., Ogutcu H., Sahin F. and Karaman I.: “Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract”, *Turk J. Biol.*, 29, 155 (2005).
- 31 Hossain M.A., Kabir M.J., Salehuddin S.M., Rahman S.M., Das A.K., Singh S.K., Alam M.K. and Rahman A.: “Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh”, *Pharm. Biol.*, 48, 504 (2010).
- 32 Edris A.E. and Farrag E.S.: “Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase”, *Nahrung.*, 47, 117 (2003).
- 33 Reuveni R. Fleischer A. and Putievsky E.: “Fungistatic activity of essential oils from *Ocimum basilicum* chemotypes”, *J. Phytopathol.*, 110, 20 (1984).
- 34 Pavela R. and Chermenskaya T.: “Potential insecticidal activity of extracts from 18 species of medicinal plants on larvae of *Spodoptera littoralis*”, *Plant Protect. Sci.*, 40, 145 (2004).
- ³⁵ Bhatti H.A.: “Thesis, Isolation and Structure Elucidation of the Chemical Constituents of *Ocimum basilicum* L. and *Centella asiatica* and Synthesis of Lawsonin and its Relative Dhydrobenzofuran Derivatives, International Center for Chemical and Biological Sciences H.E.J”, Research Institute of Chemistry University of Karachi, Pakistan, 1-217 (2008).

- 36 Chang C.L., Cho I.K. and Li Q.X.: “Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*”, *Econom. Entomol.*, 102, 203 (2009).
- 37 Santoro G.F., Cardoso M.G., Guimarães L.G., Mendonça L.Z. and Soares M.J.: “*Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes”, *Exp. Parasitol.*, 116, 283 (2007)
- 38 Chang X., Alderson P.G. and Wright C.J.: “Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils”, *Environ. Exp. Bot.*, 63, 216 (2008).
- 39 Chiang L.C., Ng L.T., Cheng P.W., Chiang W. and Lin C.C.: “Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*”, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 32, 811 (2005).
- 40 Ismail M.: “Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum*. Essential Oil”, *Pharmaceut. Biol.*, 44, 619 (2006).
- 41 Zeggwagh N.A., Sulpice T. and Eddouks M.: “Phytochemical constituents and pharmacological activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae)”, *Am. J. Pharm. Toxicol.*, 2, 123 (2007).
- 42 Salma A.A.M. and Sidik K.: “Synergistic effects of alcoholic extract of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves and honey on cutaneous wound healing in rats”, *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 1, 220 (2005).
- 43 Javanmardi J., Khalighi A., Kashi A., Bais H.P. and Vivanco J.M.: “Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran”, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5878 (2002)
- ⁴⁴ Lee S. J., Umano K., Shibamoto T., & Lee K. G.: “Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties”, *Food Chemistry*, 91, 131-137 (2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Υλικά και Μέθοδοι

6.1. Τεχνικές

6.1.1. Φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα

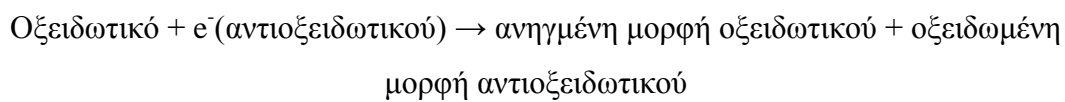
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφέρουν με βάση τα χρησιμοποιούμενα συστήματα, τις τεχνικές ανίχνευσης και τις συνθήκες αντίδρασης και για τους λόγους αυτούς διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Οι κυριότερες κατηγορίες είναι δύο. Η πρώτη βασίζεται στην αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την αντίδραση που στηρίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίου (single electron transfer, ET). Στον Πίνακα 6.1 αναφέρονται οι συνηθέστερες χρησιμοποιούμενες μέθοδοι εύρεσης αντιοξειδωτικής ενεργότητας.

Πίνακας 6.1. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας in vitro

Μέθοδοι αντιδράσεων μεταφοράς ατόμου υδρογόνου	
$ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$	ORAC (oxygen radical absorbance capacity) Δοκιμασία Crocin
$ROO\cdot + LH \rightarrow ROOH + L\cdot$	IOU (inhibited oxygen uptake) Αναστολή οξείδωσης του λινολεϊκού οξέος Αναστολή οξείδωσης LDL
Μέθοδοι αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίου	
$M(n) + e \text{ (από AH)} \rightarrow AH^+ + M(n-1)$	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) FRAP (ferric ion reducing antioxidant)

	parameter) DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) Αναγωγική ικανότητα Cu(II) Μέθοδος Folin – Ciocalteu
Άλλες μέθοδοι	
TOSC (total oxidant scavenging capacity)	
Μέθοδος Briggs-Rauscher	
Χημειοφωταύγεια	
Εлектроχημειοφωταύγεια	

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιοξειδωτική ικανότητα αλλά και για τη μέτρηση των συνολικών φαινολικών είναι και οι δύο ET. Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει δύο συστατικά: το αντιοξειδωτικό και το οξειδωτικό και λαμβάνει χώρα η οξειδοαναγωγική αντίδραση:



Δηλαδή το οξειδωτικό αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό προκαλώντας αλλαγή χρώματος του πρώτου. Ο ρυθμός αλλαγής χρώματος είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών. Η αντίδραση τελειώνει όταν σταματά η αλλαγή χρώματος. Η γραφική παράσταση της απορρόφησης σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού είναι ευθεία, όπου η κλίση της αντιστοιχεί στη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και η οποία εκφράζεται είτε σε ισοδύναμα Trolox είτε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος καθώς και καφεϊκού οξέος [1].

6.1.2. Φαινολικά

Η μέτρηση των φαινολικών συστατικών για τα εκχυλίσματα των διαφόρων αρωματικών φυτών έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu [2]. Αρχικά τη μέθοδο αυτή την χρησιμοποίησαν για την ανάλυση πρωτεϊνών, αλλά αργότερα επεκτάθηκε και σε άλλα φυτικά συστατικά. Με τη μέθοδο αυτή δεν διαχωρίζονται μονομερή, διμερή ή

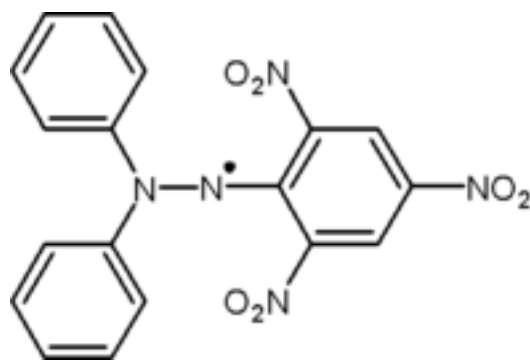
άλλα φαινολικά συστατικά, αλλά προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί μίγμα μολυβδαινικού νατρίου (Na_2MoO_4), βολφραιμικού νατρίου (Na_2WO_4) και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) και προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραιμίου χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που απορροφά στην περιοχή του ορατού (725 nm) και η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 . Για την ακρίβεια το αντιδραστήριο αυτό μετρά την μείωση της δραστικότητας του δείγματος η οποία είναι γραμμική [1].

6.1.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του DPPH (2,2 διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίλιο) (Σχήμα 1). Το DPPH είναι μία σταθερή εμπορικά διαθέσιμη οργανική ρίζα αζώτου η οποία λόγω της παρουσίας του μονήρους ηλεκτρονίου έχει υψηλή απορρόφηση στα 517 nm όπου παρατηρείται το μέγιστο της απορρόφησης του φάσματος του μορίου της ρίζας. Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση του αντιοξειδωτικού με μεθανολικό διάλυμα της σταθερής ρίζας, η οποία με την προσφορά ηλεκτρονίου ανάγεται σε υδραζίνη με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος DPPH που αρχικά έχει μωβ χρώμα [3]. Το διάλυμα του DPPH σε μεθανόλη αναμιγνύεται με το διάλυμα του δείγματος σε κυψελίδα και παρακολουθείται η απορρόφηση της αντίδρασης για 30 min ή μέχρι να λάβει σταθερή τιμή. Το ποσοστό % του DPPH που παραμένει ($\% \text{DPPH}_{\text{rem}}$) σε σχέση με το αρχικό $\text{DPPH}_{\text{T=0}}$ εκφράζεται ως:

$$\% \text{DPPH}_{\text{rem}} = 100 \times [\text{DPPH}]_{\text{rem}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}}$$

όπου το $\% \text{DPPH}_{\text{rem}}$ είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών. Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης υπολογίζεται από την κινητική καμπύλη της αντίδρασης του DPPH με το αντιοξειδωτικό και είναι γνωστός ως TIC_{50} .



Σχήμα 6.1. Χημική δομή DPPH

6.1.4. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που είναι πολύ διαδεδομένες στα φυτά και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής. Στα φλαβονοειδή συμπεριλαμβάνονται οι κατεχίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανίνες [4][5][6][7]. Τα φλαβονοειδή έχουν βρεθεί ότι εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας [8][9][10]. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Τα φυσικά φλαβονοειδή αποτελούν μία διαφορετική λύση για την προστασία των τροφίμων από την οξείδωση σε αντίθεση με τα συνθετικά, με αποτέλεσμα σημαντικά οφέλη για την υγεία όπως προκύπτει από μελέτες [11]. Η δράση των φλαβονοειδών ως αντιοξειδωτικά στηρίζεται σε δύο μηχανισμούς: διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης δίνοντας άτομα υδρογόνου. Επίσης σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση [12].

6.1.5. Ενόργανες χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μείγματος χημικών ουσιών με παραπλήσια δομή και στηρίζεται στη διαφορετική

προσροφητικότητα των σωμάτων. Στη μέθοδο αυτή διακρίνουμε δύο φάσεις : α) τη σταθερή ή στατική φάση που αποτελείται από το κατάλληλο προσροφητικό μέσο, στερεό ή υγρό και β) την κινητή φάση που αποτελείται συνήθως από ένα διαλύτη και από το μίγμα των συστατικών που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Η κινητή φάση είναι πάντα σε υγρή ή αέρια μορφή. Ο πίνακας 6.2 είναι ένας κατάλογος δύο κατηγοριών χρωματογραφίας της υγρής και της αέριας. Όπως φαίνεται στην στήλη 2 του πίνακα, πολλές ειδικές χρωματογραφικές μέθοδοι εμπίπτουν σε κάθε μία από τις δύο γενικές κατηγορίες. Ανάλογα με τις διαφορές των συστατικών ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως είναι η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων και το σημείο ζέσεως, τα συστατικά του μείγματος καθώς διέρχονται από την χρωματογραφική στήλη μετατοπίζονται διαφορετικά και εξέρχονται από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανιχνεύσεως και καταμετρήσεως της ποσότητας κάθε συστατικού, εκτός από τον διαχωρισμό και παράλληλα με αυτό, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών. Όλοι οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί στηρίζονται σε διαφορές στην έκταση που οι διαλυμένες ενώσεις κατανέμονται μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης. Η ισορροπία που λαμβάνει χώρα μπορεί να περιγραφεί ποσοτικά μέσω ενός συντελεστή κατανομής k . Η σχέση που συνδέει τον συντελεστή κατανομής με τις συγκεντρώσεις της ουσίας στην ακίνητη φάση (C_A) και στην κινητή φάση (C_B) είναι $k=C_A/C_B$.

Πίνακας 6.2. Ταξινόμηση των χρωματογραφικών μεθόδων στήλης

Γενική ταξινόμηση	Ειδική μέθοδος	Στατική φάση	Τύπος Ισορροπίας
Υγρή χρωματογραφία (LC) Κινητή φάση: υγρό	Υγρό-υγρό(LLC)	Υγρό προσροφηθέν σε στερεό	Κατανομή μεταξύ μη – μίγνυόμενων υγρών
	Υγρό-στερεό (LSC)	Στερεό	Προσρόφηση
	Υγρή-δεμένη φάση (LBC)	Οργανικά σωματίδια δεμένα σε στερεή επιφάνεια	Κατανομή προσρόφηση
	Ιονανταλλαγή (IEC)	Ρητίνη ιονανταλλαγής	Ιονανταλλαγή
	Διαπερατότητα Πηκτής (GPC)	Υγρό στις ενδοπλεγματικές κοιλότητες πολυμερικού υλικού	Κατανομή/Διήθηση
Αέρια χρωματογραφία GC) (κινητή φάση: αέριο)	Αέριο Υγρό (GLC)	Υγρό προσροφηθέν σε στερεό	Κατανομή μεταξύ αερίου και υγρού
	Αέριο-στερεό (GSC)	Στερεό	Προσρόφηση
	Αέριο-δεμένη φάση	Οργανικά μόρια δεμένα σε στερεά επιφάνεια	Κατανομή/απορρόφηση

Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης, τη φύση και την μορφή της στατικής φάσης, ως προς το μηχανισμό, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεως του μέσα σε αυτή.

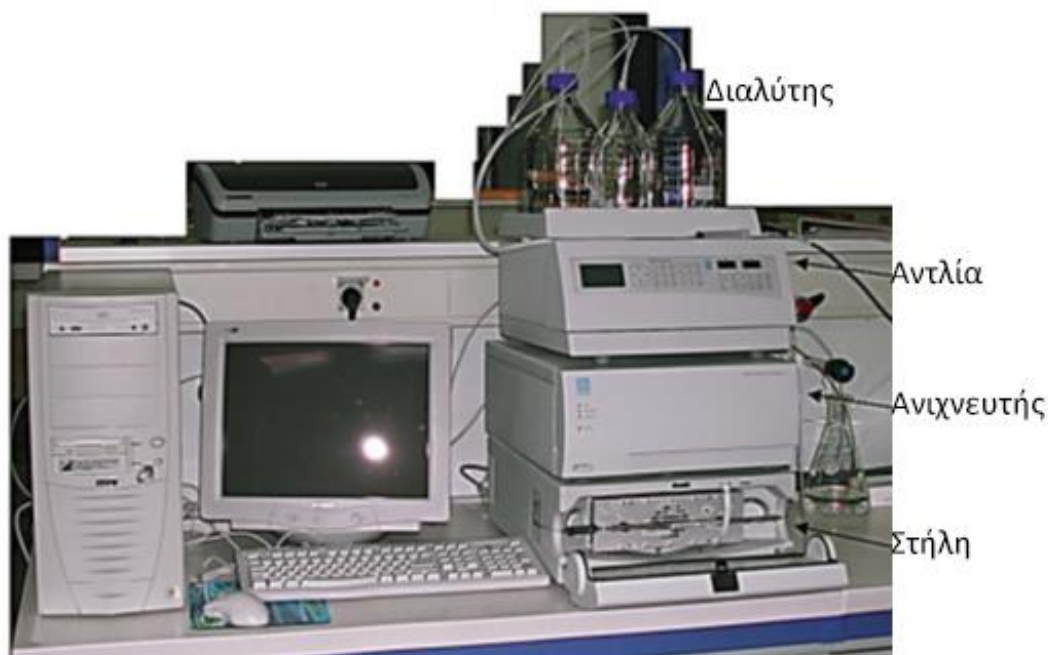
A) Με βάση τη φύση της κινητής φάσης και στατικής φάσης ταξινομούνται σε υγρή (LC) και αέρια χρωματογραφία (GC).

B) Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού διακρίνουμε τους παρακάτω τύπους: χρωματογραφία ιονανταλλαγής, χρωματογραφία προσροφήσεως, χρωματογραφία κατανομής, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφία συγγένειας.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, είναι μία αναλυτική τεχνική διαχωρισμού και χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων. Η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου σωματίδια και επομένως υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ενώ η κινητή φάση είναι υγρή και η διαβίβασή της γίνεται με την χρήση αντλιών υψηλής πίεσης [¹³].

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη : α) Το δοχείο κινητής φάσης – διαλυτών, β) την αντλία, γ) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, δ) την στήλη, ε) τον ανιχνευτή και στ) τον καταγραφέα ή ηλεκτρονικό υπολογιστή, τα οποία συνδέονται με τρόπο όπως δείχνει η εικόνα 6.1.



Εικόνα 6.1. Αποτελούμενα μέρη και διάταξη ενός HPLC συστήματος

Η ανίχνευση των συστατικών πραγματοποιείται μετά την διέλευση της ουσίας από την στατική φάση, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για το διαχωρισμό. Η ένωση, διέρχεται μέσα από τη στήλη και με τη βοήθεια της κινητής φάσης διαχωρίζεται και εμφανίζεται σε διαφορετικό χρόνο, γνωστός ως χρόνος συγκράτησης (*retention time*, t) ο οποίος συγκρίνεται με αντίστοιχους χρόνους πρότυπων ουσιών σε παρόμοιες χρωματογραφικές συνθήκες. Ένας ανιχνευτής που είναι τοποθετημένος στην έξοδο της στήλης δίνει ένα ηλεκτρικό σήμα το οποίο καταγράφεται στον υπολογιστή ως συνάρτηση του χρόνου. Έτσι λαμβάνεται σειρά κορυφών, το χρωματογράφημα, με τη βοήθεια του οποίου μπορεί να γίνει στη συνέχεια ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση του αγνώστου φάσματος με πρότυπα φάσματα από βιβλιοθήκες φασμάτων και ταυτοποιείται το άγνωστο συστατικό [14].

Για τον προσδιορισμό μιας άγνωστης ένωσης ποσοτικά χρησιμοποιείται η μέθοδος του εξωτερικού ή εσωτερικού προτύπου. Το εμβαδόν της περιοχής μεταξύ της κορυφής του χρωματογραφήματος και της βασικής γραμμής αντιστοιχεί στην ποσότητα του προς ανάλυση συστατικού. Στη συνέχεια συγκρίνεται ο χρόνος του αγνώστου δείγματος με αντίστοιχους χρόνους πρότυπων ουσιών που έχουν αναλυθεί στις ίδιες συνθήκες. Μικρές αποκλίσεις οδηγούν στον προσδιορισμό των συστατικών ενός εξεταζόμενου δείγματος. Στην παρούσα μελέτη ο προσδιορισμός των

συστατικών των φυτικών υλικών πραγματοποιήθηκε με την χρήση πρότυπων ουσιών που αναλύθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα άγνωστα δείγματα και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για την καλύτερη ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων των φυτών Lamiales είναι το χαμηλό pH του διαλύτη της κινητής φάσης με την προσθήκη οξέων όπως το μυρμηγκικό ή το οξικό οξύ. Μελέτη της επίδρασης του pH [15] στον διαχωρισμό, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι και μικρή αύξηση του pH οδηγεί σε χαμηλούς χρόνους συγκράτησης και άρα σε χαμηλή ανάλυση των χρωματογραφημάτων (χαμηλή διαχωριστική ικανότητα, low resolution). Ειδικότερα το HPLC σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση ήταν το Agilent 1200 chromatographic system (Agilent, USA) με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού UV-Vis μεταβαλλόμενου μήκους κύματος Diode-Array Detector (DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP ChemStation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Η χρωματογραφική στήλη ήταν η Eclipse XDB-C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm) and Supleco (25 cm x 4.6 mm, 5 μm). Για όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 25 μL διαλύματος. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 25 °C.

Φασματομετρία μάζας

Όταν ηλεκτρόνια υψηλής ενεργειακής στάθμης προσκρούσουν σε μόρια μιας ενώσεως, που βρίσκονται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ενώσεως μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Στη συνέχεια με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα, που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος (πάντοτε σε σχετικές και όχι απόλυτες μονάδες), ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum) της ουσίας.

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ουσίας από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS). Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Χρησιμοποιείται κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής των διαφόρων οργανικών ενώσεων κατά την

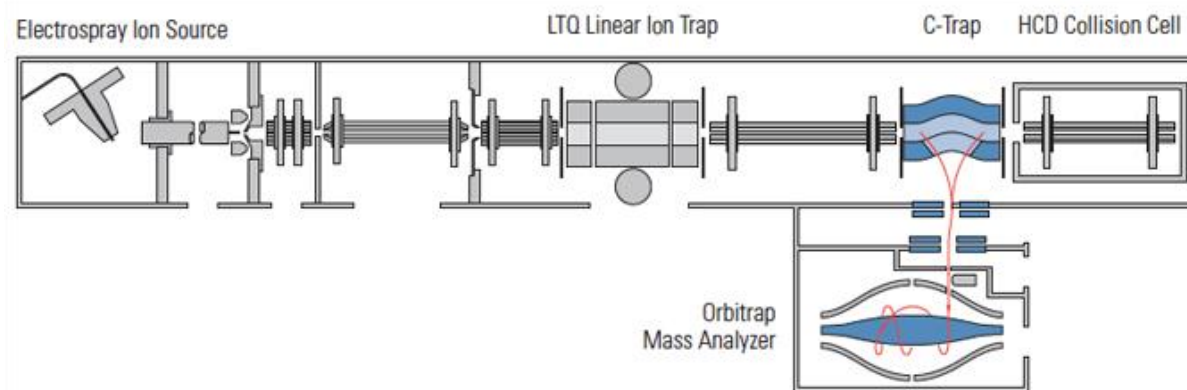
συνθετική τους πορεία (όπως π.χ. νέων φαρμάκων), και για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων.

Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυασθεί με την αέρια χρωματογραφία (GC) ή την υγρή χρωματογραφία (LC), που σήμερα αποτελούν τις συνηθέστερες τεχνικές για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μειγμάτων οργανικών ενώσεων.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών είναι η αυξημένη ευαισθησία της, σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, και η υψηλή εξειδίκευσή της κατά την ταυτοποίηση ουσιών ή την επιβεβαίωση της παρουσίας ύποπτων ουσιών. Ως μειονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών μπορεί να θεωρηθούν το συγκριτικά μεγάλο κόστος των απαιτούμενων οργάνων, το μεγάλο κόστος λειτουργίας και συντηρήσεώς τους, και ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσεως του χρήστη για το χειρισμό των σχετικών ουσιών και την ορθή ερμηνεία των φασμάτων μαζών.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα κοινά και διακριτά τμήματα: α) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, β) την πηγή ιόντων, γ) τον αναλυτή μαζών, δ) τον ανιχνευτή. Εκτός απ' αυτά τα τμήματα, κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και σύστημα παρουσιάσεως των φασμάτων, όπως π.χ. καταγραφείς και παλμογράφους. Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος [16].

Η διάταξη φασματομετρίας μάζας σε σειρά με γραμμική παγίδα και αναλυτή Orbitrap (LIT – Orbitrap) παρουσιάζεται στην εικόνα 6.2:



Εικόνα 6.2. Διάταξη φασματομετρίας μάζας σε σειρά με γραμμική παγίδα ιόντων και αναλυτή Orbitrap (LIT – Orbitrap)[¹⁷]

6.2. Υλικά και μέθοδοι

6.2.1. Φυτικό υλικό

Τα φυτά συλλέχθηκαν στην περιοχή της Ηπείρου. Ταυτοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΤΕΙ Ηπείρου ως:

Rosmarinus officinalis L. - Κοινή ον.:
Ροσμαρίνος ο φαρμακευτικός, δενδρολίβανο,
Rosemary



Origanum majorana L. - Κοινή ον.: Ορίγανον
η μαντζουράνα, ματζουράνα, Sweet Marjoram



Ocimum basilicum L. - Κοινή ον.: Ωκιμον το βασιλικόν, βασιλικός, Sweet Basil



που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae (Χειλανθή).

Αποξηραμένα φύλλα και άνθη από τα φυτικά δείγματα, αφού ξηράνθηκαν στο πυριαντήριο για 3 περίπου ώρες στους 45 °C, λειοτριβήθηκαν στο χέρι σε πορσελάνινο γουδί, για την μετατροπή αυτών σε σκόνη και αφαιρέθηκαν οι ξυλοποιημένοι βλαστοί που τυχόν υπήρχαν.

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες ουσίες που φαίνονται στον πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3. Πρότυπες ουσίες

α/α	Πρότυπο	Code
1	Caffeic acid	60020-10G-F (Aldrich)
2	Rosmarinic acid	536954-5G (Aldrich)
3	Eugenol	E51791-100G (Aldrich)
4	Isoeugenol	05622BE (Aldrich)
5	Linalool	L2602-5G (Aldrich)
6	Rutin hydrate	R5143(Aldrich)
7	Betulinic acid	B8936 (Sigma)
8	Ursolic acid	89797 (Fluka)
9	Apigenin	10798 (Sigma)
10	Oleanolic acid	42515 (Sigma)
11	Luteolin	72511 (Sigma)

6.2.2. Διαλύτες –Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες υψηλής καθαρότητας (99%) όπως προμηθεύτηκαν από την εταιρία Aldrich GmbH, Sternheim, Germany.

- Αιθανόλη
- Μεθανόλη
- Φορμικό οξύ
- Διχλωρομεθάνιο
- Εξάνιο
- DPPH
- Folin-Ciocalcu

6.2.3. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Ζυγίστηκε 4.51 gr αποξηραμένου και κονιορτοποιημένου βασιλικού και διαλύθηκε σε μίγμα αιθανόλης και νερού (3:1 v/v) (38 ml αιθανόλης και 12 ml νερού). Στη συνέχεια ακολούθησε reflux υπό ανάδευση στους 55 °C για 30 min, απουσία φωτός, ώστε να αποφευχθεί η φωτο-οξειδωση των περιεχόμενων ουσιών. Ακολούθησε διήθηση με διηθητικό χαρτί 125 mm. Το διήθημα συλλέγεται και ακολουθεί πλήρη εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporator). Το στερεό, χρώματος καφέ, 1.2 gr συλλέχθηκε σε πλαστικό δοχείο και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους 0°C [18]. Επιπλέον συμπύκνωση μέχρι ξηρού πραγματοποιήθηκε στο λυοφιλοποιητή και το φυτικό εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Η απόδοση σε όλες τις περιπτώσεις ήταν της τάξης του 25 % κ.β.

Για την περίπτωση του δενδρολίβανου και μαντζουράνας επαναλήφθηκε η ανωτέρω πορεία με τη διαφορά ότι η εκχύλιση έγινε σε καθαρό διαλύτη και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT). Πειράματα που διενεργήθηκαν με διαφορετικές αναλογίες (3:1, 2:1, 1:1 v/v) έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιβλιογραφία για ανάλογα φυτά αλλά δεν οδήγησαν σε ομοιογενή αποτελέσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 6.4) παρουσιάζονται τα πειράματα με τα αντίστοιχα φυτικά υλικά.

Πίνακας 6.4. Πειράματα με τα αντίστοιχα φυτικά υλικά

	Βασιλικός		Δεντρολίβανο		Μαντζουράνα
	Ethanol/H ₂ O (3:1 v/v) (50 ml)		Ethanol (75 ml)		Ethanol (75 ml)
	4.51gr		5.03 gr		5.02 gr
	H ₂ O (75 ml)		H ₂ O (75 ml)		H ₂ O (75 ml)
	5.00 gr		5.01 gr		5.01 gr
	DCM (75 ml)		DCM (75 ml)		DCM (75 ml)
	5.01 gr		5.09 gr		5.09 gr
	Hexane (75 ml)		Hexane (75 ml)		Hexane (75 ml)
	5.02 gr		4.98 gr		5.00 gr

6.2.4. Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση είναι η πιο ήπια μέθοδος συντήρησης του φυτικού υλικού. Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε ειδικά γυάλινα δοχεία, σε κατάλληλη συσκευή που λειτουργεί υπό κενό, η επιφάνεια της οποίας διατηρείται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-60 έως -70° C), μετατρέποντας το νερό από την υγρή φάση στη στερεή. Στη συνέχεια, ο πάγος εξαχνώνεται και οι υδρατμοί από το κατεψυγμένο φυτικό υλικό μεταφέρονται γρήγορα στην ψυχρή επιφάνεια. Η διαδικασία διαρκεί περίπου 24 ώρες και στη συνέχεια τα δείγματα αφαιρούνται από τη συσκευή τοποθετούνται σε φιαλίδια και ζυγίζονται.

6.2.5. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH)

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας για τα εκχυλίσματα του βασιλικού έγινε με την μέθοδο του DPPH [19]. Σε διάλυμα DPPH (0.1 και 0.5 mM) σε αιθανόλη, προστίθεται ίσος όγκος των αντίστοιχων εκχυλισμάτων διαλυμένα σε αιθανόλη. Για τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται καθαρή αιθανόλη. Μετά από 20 και 60 min μετρήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 517 nm.

Για κάθε εκχύλισμα φυτού δεντρολίβανου και μαντζουράνας συγκέντρωσης 1 mgr/ml σε μεθανόλη, μετρήθηκαν συγκεντρώσεις 10-500 ppm. Στη συνέχεια ετοιμάστηκε διάλυμα DPPH 10^{-4} M σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης (0.4 ml, 70:30 v/v). Μετά την ανάμειξη με 1ml δείγματος, ακολουθεί μηχανική ανάδευση των μιγμάτων με συσκευή ανάδευσης Vortex. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία σε σκοτεινό σημείο για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm με φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Μίγμα το οποίο περιείχε διάλυμα DPPH 10^{-4} M (1 mL) και υδατική μεθανόλη (70% v/v) (1 mL) χρησιμοποιήθηκε ως “τυφλό” ενώ ως δείγμα αναφοράς για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υδατικής μεθανόλης (70% v/v). Η μείωση της απορρόφησης του διαλύματος DPPH υποδηλώνει την δέσμευση αυτής της ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικά συστατικά που υπάρχουν στα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα. Το ποσοστό δέσμευσης του DPPH δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\% \text{DPPH}_{\text{inh}} = 100 * [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$$

όπου A_{blank} , η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος DPPH στα 517 nm και A_{sample} η απορρόφηση του δείγματος στο ίδιο μήκος [20] [21].

6.2.6. Μέτρηση φαινολικών συστατικών

0.2 ml από κάθε εκχύλισμα διαλύονται σε μεθανόλη (1mgr/ml), στη συνέχεια προσθέτουμε 4.8 ml dH₂O και 0.5 ml Folin-Ciocalcu. Μετά από 3 λεπτά, προσθέτουμε 1ml διαλύματος Na₂CO₃ (332 gr/lit) και στη συνέχεια H₂O μέχρι τελικού όγκου 10ml. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το “τυφλό” δείγμα χρησιμοποιώντας 0.2 ml μεθανόλης και μετά από το πέρασ 1 ώρας μετρήθηκε η απορρόφηση στα 725 nm. Η καμπύλη αναφοράς έγινε χρησιμοποιώντας 0.2 ml καφεϊκού οξέος. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 50-500 mgr [20].

6.2.7. Μέτρηση συνολικών φλαβονοειδών

0.1 ml από κάθε εκχύλισμα διαλύονται σε μεθανόλη (10 gr/L) και στη συνέχεια προσθέτω 0.1 ml AlCl₃ (σε μεθανόλη 20 gr/L), ακολουθεί προσθήκη αιθανόλης μέχρι

τελικού όγκου 2.5 ml. Χρησιμοποιήσαμε “τυφλό” διάλυμα με 0.1 ml μεθανόλη και 0.1 ml $AlCl_3$ και αιθανόλη μέχρι τελικού όγκου 2.5ml. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήσαμε πρότυπο διάλυμα ρουτίνης συγκέντρωσης από: 50-500 $\mu g/ml$. Μετρήσαμε την απορρόφηση και των προτύπων διαλυμάτων και των εκχυλισμάτων στα 415 nm μετά από 40 min στους 20°C [22].

6.2.8. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για το εκχύλισμα του βασιλικού χρησιμοποιήσαμε σύστημα δύο διαλυτών [22]. με διαλύτη A: μεθανόλη και διαλύτη B: ακετονιτρίλιο – νερό – οξικό οξύ σε αναλογία 15:84:1.

Εναλλακτικά ακολουθήσαμε και 2^η μεθοδολογία [23] η οποία έδωσε καλύτερα αποτελέσματα και τελικά προτιμήθηκε για την διεξαγωγή των υπόλοιπων πειραμάτων. Σε αυτή την πειραματική πορεία χρησιμοποιούμε ακετονιτρίλιο και νερό σε διαφορετικές σχετικές αναλογίες με βάση τον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 6.5. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα βασιλικού

Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	MeCN (%)	H ₂ O (%)
0	0.7	50	50
5	0.7	50	50
15	1.0	60	40
24	1.0	60	40
40	1.0	90	10

Η ανάλυση HPLC έγινε με αιθέριο έλαιο βασιλικού (δωρεά της εταιρεία bio art-προϊόντα βιολογικής γεωργίας), καθώς και πρότυπων δειγμάτων ευγενόλης, ισοευγενόλης και linalool σε υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 20 ppm.

Στη συνέχεια παρασκευάσαμε δείγματα αιθέριου ελαίου με 2 διαφορετικές ποσότητες ευγενόλης όπως φαίνεται στον πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6

α/α	Αιθέριο έλαιο (ml)	Ευγενόλη (μl)
1	3	75
2	3	150

Για το εκχύλισμα του βασιλικού αρχικά δόθηκαν τα πρότυπα δείγματα καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος για ανάλυση και στη συνέχεια το εκχύλισμα του βασιλικού συγκέντρωσης 40 ppm. Τέλος, στο εκχύλισμα του βασιλικού προσθέσαμε διαφορετικές ποσότητες καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος όπως φαίνεται στον επόμενο πίνακα και τα δείγματα δόθηκαν για ανάλυση. Η ανάλυση έγινε με βάση τη μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε και στο αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 6.7.

Βασιλικός (ml)	Καφεϊκό οξύ (μl)	Ροσμαρινικό οξύ (μl)
3	50	
3	100	
3		50
3		100

Για τα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου και της ματζουράνας, η ανάλυσή τους με HPLC έγινε με σύστημα δύο διαλυτών A: 0.1% φορμικό οξύ / νερό και B: ακετονιτρίλιο σε διαφορετικές αναλογίες ανά χρόνο σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα [24]:

Πίνακας 6.8. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα δεντρολίβανου και ματζουράνας

Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	(A) 0.1% φορμικό οξύ / νερό	(B) CH ₃ CN
0-15	0.4		15-25%
15-25	0.4		25-35%
25-35	0.4		35-50%
35-40	0.4		50-100%

Τα UV/VIS φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή 200-500 nm και τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν ήταν στα 240, 284, 330 και 350 nm. Εφαρμόστηκε έκλουση με 100% ισοπροπανόλη για να απομακρυνθούν τα ίχνη των λιπόφιλων ενώσεων από τη στήλη.

Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 300 ppm για τα εκχυλίσματα σε αιθανόλη, H₂O, DCM καθώς και για το αιθέριο έλαιο, καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ.

6.2.9. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζων (LC-MS)

Τα πειράματα LC / ESI-MS έγιναν σε ένα αναλυτή μάζας παγίδας ιόντων τετραπόλου (Agilent Technologies, μοντέλο παγίδας MSD SL) εξοπλισμένο με δυαδικό σύστημα 1100 HPLC φέρων πηγή ιονισμού ηλεκτροσπασμού (Agilent Technologies, Karlsruhe, Germany) και ελεγχόμενο από το λογισμικό Agilent Chemstation. Ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος του βασιλικού και του αιθέριου ελαίου έγινε με αναλυτική στήλη 25 cm × 4,6 mm id., 5 μm Altima C18 (Alltech, Deerfield, USA), με ρυθμό ροής 0,7 mL / min, χρησιμοποιώντας σαν διαλύτη A, νερό / μυρμηκικό οξύ, 99.9: 0.1 v/v και διαλύτη B ακετονιτρίλιο. Τα πρότυπα και τα προϊόντα ιόντα των φαινολικών ενώσεων ανιχνεύτηκαν μεταξύ m / z 100 - m / z 1.000 σε θετική και αρνητική πολικότητα. Για την πηγή ιονισμού: τάση 3.5 kV, θερμοκρασία αερίου ξηράνσεως 349 °C, ροή αζώτου, 12 L / min. Ο μέγιστος χρόνος συσσώρευσης ιόντων στην παγίδα ορίστηκε σε 3 ms [23].

Τα στερεά δείγματα διαλύθηκαν σε διαλύτη H₂O και σε αιθανόλη με αναλογία 2 mgr/ml.

Πίνακας 6.9.

			H ₂ O		Αιθανόλη
α/α	Δείγματα	m (mgr)	V (ml)	m (mgr)	V (ml)
1	ethanol	5.37	2.69	6.34	3.17
2	H ₂ O	4.04	2.02	3.27	1.64
3	DCM	2.73	1.37	3.45	1.73
4	oil	3.86	1.93	3.86	1.93
5	caffeic	6.62	3.31	4.98	2.49

6	rosmarinic	8.65	4.33	4.13	2.07
---	------------	------	------	------	------

6.2.10. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζων με ηλεκτρο-ψεκασμό (ESI-MS)

Για την ανίχνευση των ενδιάμεσων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας υπερυψηλής πίεσης UPLC-ESI-MS/MS της Thermo Fisher Scientific (Germany) με τεχνολογία γραμμικής παγίδας ιόντων (LIT, Linear Ion trap), και παγίδασιόντων Orbitrap εφοδιασμένο με χρωματογραφική στήλη C18 Hypersil Gold, 100 mm x 2.1 mm εσωτερική διάμετρο και 1.9 μm μέγεθος πόρων (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA).

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με σύστημα δύο διαλυτών Α: νερό + 0.1% φορμικό οξύ και Β: ακετονιτρίλιο + 0.1% φορμικό οξύ σύμφωνα με το επόμενο πρόγραμμα έκλουσης, ενώ ο όγκος της ένεσης ήταν 10 μl [25].

Πίνακας 6.10.

Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	(Α) νερό + 0.1% φορμικό οξύ	(Β) CH ₃ CN + 0.1% φορμικό οξύ
0 -5	0.4	5%	95%
5 – 6	0.4		95%
6 – 9	0.4		5%

Το λογισμικό Xcalibur χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη και την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μάζας. Η ταυτοποίηση έγινε με τεχνικές GC – MS, και βασίστηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας που ελήφθησαν με πρότυπα φάσματα.

6.2.11. Αντικαρκινικά πειράματα (*in vitro*)

Οι κυτταρικές σειρές HeLa, FemX, K562 και SKOV3 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου, μελανώματος, χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και ωοθηκών αντόστοιχα) για την περίπτωση του βασιλικού και HeLa, A549, LS174 και MRC5 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου, αδενοκαρκινώματος, εντέρου και φυσιολογικά κύτταρα εμβρυικού πνεύμονα αντίστοιχα) για την περίπτωση του δενδρολίβανου και της ματζουράνας ελήφθησαν από την American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Όλες οι καρκινικές κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν στο συνιστώμενο RPMI-1640 μέσο συμπληρωμένο με 10% θερμοαπενεργοποιημένο (56 °C) ορό εμβρύου μόσχου, L-γλουταμίνη (3 mM), στρεπτομυκίνη (100 mg = mL), πενικιλίνη (100 IU = mL), και 25 mM HEPES και ρυθμίστηκαν σε pH 7.2 με διττανθρακικό διάλυμα. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% CO₂ στους 37 °C. Στοκ διαλύματα (20 mM) των ενώσεων, έγιναν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), διαλύθηκαν σε μέσον σε απαιτούμενες συγκεντρώσεις εργασίας. Κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων και 24 ώρες αργότερα πέντε διαφορετικές, συγκεντρώσεις των ενώσεων που ερευνήθηκαν, προστέθηκαν. Οι τελικές συγκεντρώσεις που εφαρμόζονται σε κύτταρα στόχους ήταν 200, 100, 50, 25 και 12.5 μM, εκτός για τα control με μόνο θρεπτικό μέσο. Ειδικά, τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου και του εκχυλίσματος των ενώσεων από 12,5 έως 200 μg / ml για 72 ώρες. Θρεπτικό μέσο ήταν RPMI 1640 συμπληρωμένο με L-γλουταμίνη (3 mM), στρεπτομυκίνη (100 μg/mL) και πενικιλίνη (100 IU / mL), 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση (56 °C), ορό εμβρύου μόσχου (FBS) και 25 mM HEPES, και ρυθμίστηκε σε pH 7.2 με διττανθρακικό διάλυμα. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 72 ώρες.

Προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων (δοκιμή MTT)

Η επίδραση των εκχυλισμάτων στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων προσδιορίστηκε με δοκιμή MTT (δοκιμή τετραζολίου μικροκαλλιέργειας), σύμφωνα με [26] και με μια τροποποίηση σύμφωνα με τους [27]. 20 μl διαλύματος MTT (5 mg / mL PBS) προστέθηκαν σε κάθε δειγματοφορέα για 72 h. Τα δείγματα επώαστηκαν για περισσότερες από 4 ώρες στους 37 °C σε 5% CO₂ και υγροποιημένη ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, 100 μl από 10% SDS προστέθηκαν για την εκχύλιση του αδιάλυτου προϊόντος φορμαζάνης, που προκύπτει από τη μετατροπή της χρωστικής MTT από βιώσιμα κύτταρα. Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων σε κάθε φρεάτιο ήταν ανάλογη

προς την ένταση της απορρόφησης του φωτός στα 570 nm (ELISA τεστ) 24 ώρες αργότερα. Η επί τοις εκατό επιβίωση των κυττάρων παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων διαιρέθηκε με τον έλεγχο της οπτικής πυκνότητας (απορρόφηση κυττάρων ελέγχου που καλλιεργούνται μόνο σε θρεπτικό μέσο) και πολλαπλασιάζεται με 100. Ως συγκέντρωση IC₅₀ ορίστηκε ως η συγκέντρωση του παράγοντα αναστολής της κυτταρικής επιβίωσης κατά 50%, σε σύγκριση με το πρότυπο. Τυπικά τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα ανάλογα του διαμινοδιχλωρολευκόχρυσου (cisplatin). Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

6.3. Υπολογιστική μοντελοποίηση (μοριακή πρόσδεση)

Οι τρισδιάστατες συντεταγμένες της 2-κυκλοξυγενάσης (COX-2) και 5-λιποξυγενάσης (5-LOX) ελήφθησαν από την Protein Data Bank (www.rcsb.org) (pdb IDs: 4COX και 3V99) αντίστοιχα. Η 4COX αντιπροσωπεύει την κρυσταλλική δομή που επιλύθηκε με ακτίνες X της COX-2 και η οποία συν-κρυσταλλώνεται με ινδομεθακίνη. Η 3V99 είναι η κρυσταλλική δομή ακτίνων X της 5-LOX με αραχιδονικό οξύ (AA) το οποίο συν-κρυσταλλώνεται ως υπόστρωμα και βρίσκεται στην ενεργή θέση του ενζύμου. Όλα τα μόρια του διαλύτη απομακρύνθηκαν από τη δομή της πρωτεΐνης πριν τους υπολογισμούς. Η μοριακή πρόσδεση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Molegro Virtual Docker software (www.molegro.com) με χρήση της MolDock Score function [²⁸]. Η μοριακή πρόσδεση επιβεβαιώθηκε με δοκιμές επικύρωσης, που έδειξαν ότι η διαμόρφωση του κάθε συγκρυσταλλωμένου υποκαταστάτη αναπαράγεται επιτυχώς (RMSD < 1.5 Å). Τα αποτελέσματα κατατάσσονται με βάση τη συνάρτηση "rerank score" που είναι ένας σταθμισμένος γραμμικός συνδυασμός των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (στερικών, van der Waals, δεσμών υδρογόνου, ηλεκτροστατικών δυνάμεων) μεταξύ του υποκαταστάτη και της πρωτεΐνης, και ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (κάμψεων, sp²-sp², στερικών, van der Waals, δεσμών υδρογόνου, ηλεκτροστατικών δυνάμεων) του υποκαταστάτη. Πριν την πρόσδεση έγιναν υπολογισμοί βελτιστοποίησης της γεωμετρίας των αρχικών δομών των υποκαταστατών χρησιμοποιώντας την ημιεμπειρική μέθοδο PM3.

6.4. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης ενός κριτηρίου (one-way ANOVA) και ακολούθως με την διαδικασία πολλαπλών συγκρίσεων (post hoc Turkey test) σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Το Brown-Forsythe test χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει ότι τα δεδομένα προέρχονται από σύνολα με παραπλήσια τυπική απόκλιση.

Αναφορές

- ¹ Huang D., Ou B. and Prior R.L.: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841, (2005).
- ² Singleton V.L., Orthofer R., & Lamuela-Raventos R.M. : “Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent Methods of Enzymology” Free Radical Biology & Medicine, 24, 1355–1363 (1999).
- ³ Kumaran A, Karunakaran R.J.: “In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India”, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 40:344–352 (2007).
- ⁴ Fukumoto L. and Mazza, G.: “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds”, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 3597-3604 (2000).
- ⁵ Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hras A., Simonie M., Knez Z.: “Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities”, Food Chemistry, 89, 191-198 (2005).
- ⁶ Balasundram N., Sundram K., Samman S.: “Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses” Food Chemistry, 99, 191-203 (2006).
- ⁷ Merken H.M., Beecher G.R.: “Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review”, J Agric Food Chem 48:577–599 (2000).
- ⁸ Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F.: “Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents”, Food Res. Int., 32: 407-412 (1999).

- ⁹ Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., Van Norren K. & Van Leeuwen P.A. “Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–425 (2001).
- ¹⁰ Sang-Kook L, Kyung-Ae N, Yoen-Hoi H.: “Cytotoxic activity and G2/M cell cycle arrest mediated by antofine, a phenanthroindolizidine alkaloid isolated from *Cynanchum paniculatum*”, *Planta Med.* 69(1):21–25 (2003).
- ¹¹ Hertog M. G., Feskens E. J., Kromhout D.: “Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk”, *Lancet* 349, 699 (1997).
- ¹² Pratt D.E. and Hudson B.J.F.: “Natural antioxidants not exploited commercially in *Food Antioxidants*”, Elsevier, Amsterdam, 171 -189 (1990).
- ¹³ Ταραντίλης Πέτρος: ‘Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης - Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων’, Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2004).
- ¹⁴ Ταραντίλης Π., & Πολυσίου Μ.: Ενόργανη ανάλυση Πανεπιστημιακές σημειώσεις (2008).
- ¹⁵ Sanli N., Fonrodona G., Özkan G., Barbosa J., Beltrán J.L.: “Modelling retention in liquid chromatography of polyphenolic acids. Prediction of solvent composition and pH of the mobile phase”, *Analytica Chimica Acta* 537, 53 -61 (2005).
- ¹⁶ Χατζηιωάννου Θ., Ευσταθίου Κ. “Ενόργανες τεχνικές αναλύσεως”, Τόμος Α. Πανεπιστήμιο Αθηνών (1992).
- ¹⁷ Thermo Scientific (http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.Vc7aJs_smR0)
- ¹⁸ T.Juntachote, E.Berghofer: “Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galagan”, *Food Chemistry* 92, 193-202 (2005).
- ¹⁹ Kovala-Demertzi D., Hadjipavlou-Litina D., Primikiria A., Staninskaa M., Kotogloua C. and Demertzis M.: “Anti-Inflammatory, Antiproliferative, and Radical-Scavenging Activities of Tolfenamic Acid and Its Metal Complexes”, *CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 6* (2009).
- ²⁰ Kontogianni V.G., Tomic G., Nikolic I., Nerantzaki A. A., Sayyad N. , Stosic-Grujicic S., Stojanovic I., Gerothanassis I. P., Tzakos A. G.: “Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to

- their antioxidant and anti-proliferative activity”, *Food Chemistry* 136 120–129 (2013).
- ²¹Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 28, Issue 1, , Pages 25-30, 1995.
- ²²Hakkim F.L., Shankar C.G., and Girija S.: “Chemical Composition and Antioxidant Property of Holy Basil (*Ocinum sanctum* L.) Leaves, Stems, and Inflorescence and Their in Vitro Callus Cultures”, *J. Agric. Food Ghem.* 55, 9109-9117 (2007).
- ²³ Villa C., Gambaro R., Mariani E., Dorato S.: “High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products”, *Journal of pharmaceutical and Biomedica analysis* 44, 3, 755-762 (2007).
- ²⁴ Mulinaccia N., Innocentia M., Bellumoria M., Giaccherinia C., Martinib V., Michelozzib M.: “Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study” *Talanta* 85 167–176 (2011).
- ²⁵ Keckes S., Gasic U., Cirkovic Velickovic T., Milojkovic-Opsenica D., Natic M., Tesic Z.: “The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry”, *Food Chemistry* 138 32-40 (2013).
- ²⁶ Mosmann T.: “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods* 65, 55 (1983).
- ²⁷ Ohno M.and Abe T.: “ Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6)”, *Journal of Immunological Methods* 145, 199 (1991).
- ²⁸ Thomsen R. and Christensen M. H.: “ MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking”, *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 3315 (2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Αποτελέσματα και Συζήτηση

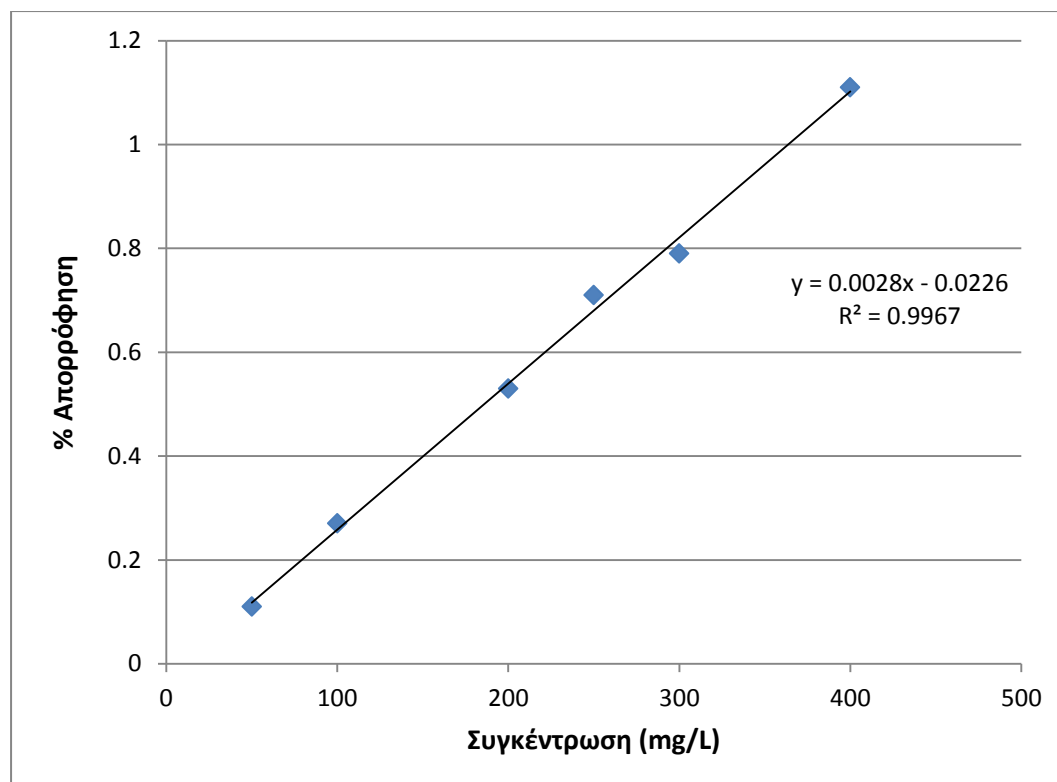
7.1. Μέτρηση συνολικών φαινολικών

Ο υπολογισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των επιμέρους εκχυλισμάτων έγινε σε διαλύματα που προέκυψαν μετά την εκχύλιση σε διαφορετικούς διαλύτες ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση των διαλυτών στην συλλογή τους καθώς και στην μετέπειτα μελέτη της βιολογικής τους δράσης. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/gr εκχυλίσματος. Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος σε περιοχές συγκεντρώσεων από 50-400 mg/L. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό βρέθηκε να είναι η ακόλουθη $y=0.0028x+0.0226$

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα για κατασκευή πρότυπης καμπύλης

	Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
1	50	0.011
2	100	0.027
3	200	0.053
4	250	0.071
5	300	0.079
6	400	0.111

Με βάση τις παραπάνω τιμές των προτύπων διαλυμάτων, κατασκευάζουμε την καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 7.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τα ολικά φαινολικά συστατικά (Folin-Ciocalteu).

Στους πίνακες 7.2 και 7.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των διαφόρων εκχυλίσματων του δεντρολίβανου και της μαντζουράνας εκφρασμένα σε συγκέντρωση καφεϊκού οξέος.

Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu) εκχυλίσματος δενδρολίβανου

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση (mg/L)
H ₂ O	88.8 ± 17.2
ΕΤΟΗ	166.7 ± 23.2
DCM	110.5 ± 18.3
Hexane	101.3 ± 25.0
Αιθέριο έλαιο	-

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu) εκχυλίσματος μαντζουράνας

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση (mg/L)
H ₂ O	60.1 ± 12.3
ΕΤΟΗ	102.0 ± 12.0
DCM	74.4 ± 19.0
Hexane	72.1 ± 5.2
Αιθέριο έλαιο	-

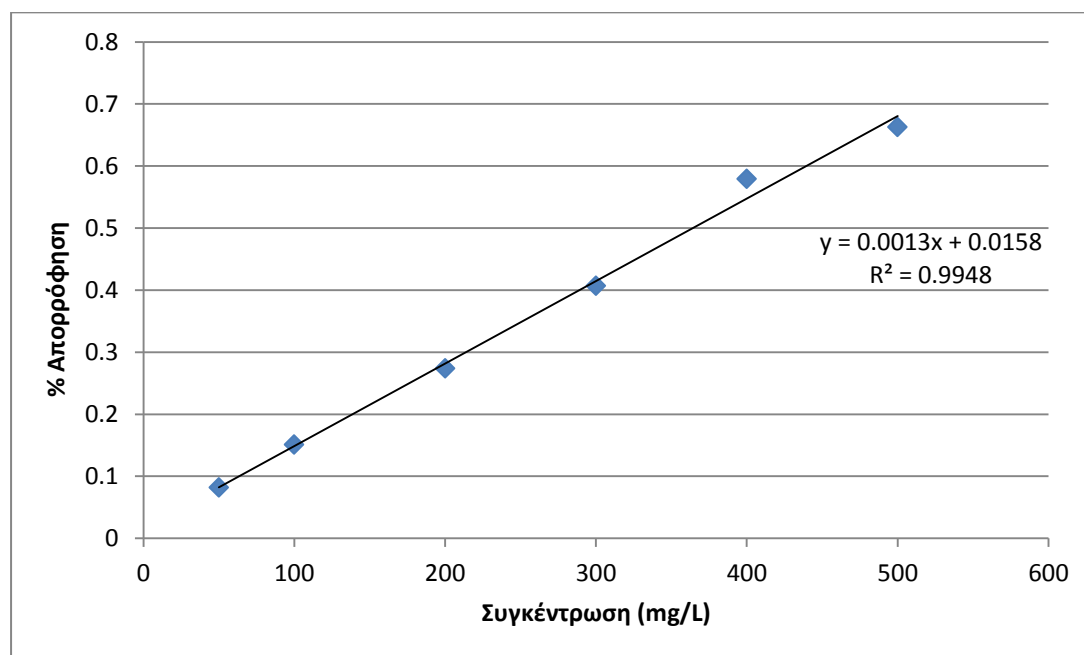
Παρατηρούμε ότι η εκχύλιση σε διαλύτη αιθανόλη παρουσιάζει την καλύτερη απόδοση σε σχέση με τους άλλους διαλύτες, περίπου 60% περισσότερο σε σχέση με το H₂O, ενώ σε σύγκριση με το διχλωρομεθάνιο και το εξάνιο το ποσοστό κυμαίνεται από 25 έως 30%. Η παραλαβή του ροσμαρινικού οξέος από το δεντρολίβανο δεν είναι πάντα επιτυχής διότι αν και περιέχει μεγάλες ποσότητες η απόδοση είναι μικρή λόγω των πολύ σκληρών φύλλων που διαθέτει [1]. Επίσης παρατηρούμε σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκχύλισης, ανάλογα με την πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης, κάτι το οποίο πρόσφατα παρατηρήθηκε στη διεθνή βιβλιογραφία [2]. Τα αντίστοιχα αιθέρια έλαια δεν εμφάνισαν σημαντική τιμή απορρόφησης διότι έχουν υποστεί βιομηχανική επεξεργασία και η ολική συγκέντρωση φαινολικών είναι ελάχιστη.

7.2. Μέτρηση συνολικών φλαβονοειδών

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκε ο αριθμός των συνολικών φλαβονοειδών στα διαλύματα που προέκυψαν μετά την εκχύλιση σε διαφορετικούς διαλύτες. Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς ρουτίνης σε περιοχές συγκεντρώσεων από 50-500 mg/L. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό βρέθηκε ότι είναι η ακόλουθη $y=0.0013x+0.0158$.

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα για κατασκευή πρότυπης καμπύλης

	Συγκέντρωση ρουτίνης (mg/L)	Απορρόφηση
1	50	0.082
2	100	0.151
3	200	0.274
4	300	0.407
5	400	0.579
6	500	0.663

**Σχήμα 7.2:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για ολικά φλαβονοειδή

Με βάση την καμπύλη αυτή υπολογίστηκαν τις συγκεντρώσεις για τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου και της μαντζουράνας και τα αποτελέσματα φαίνονται στους επόμενους πίνακες 7.5 και 7.6

Πίνακας 7.5: Υπολογισμός συγκεντρώσεων για τα αντίστοιχα εκχυλίσματα δενδρολίβανου

Εκχύλιση	Συγκέντρωση (mg/L)
H ₂ O	137.0 ± 14.0
ΕΤΟΗ	484.1 ± 10.4
DCM	292.7 ± 25.0
Hexane	358.4 ± 15.0

Πίνακας 7.6: Υπολογισμός συγκεντρώσεων για τα αντίστοιχα εκχυλίσματα ματζουράνας

Εκχύλιση	Συγκέντρωση (mg/L)
H ₂ O	237.1 ± 33.0
ΕΤΟΗ	464.8 ± 21.2
DCM	209.0 ± 14.0
Hexane	265.8 ± 10.1

Συγκρίνοντας τους δύο πίνακες παρατηρούμε ότι το νερό αποτελεί πολύ καλύτερο διαλύτη εκχύλισης για τη ματζουράνα σε σχέση με το δενδρολίβανο κάτι το οποίο πιθανά οφείλεται στην σκληρότητα των φύλλων του δενδρολίβανου σε σχέση με την ματζουράνα. Η εκχύλιση με αιθανόλη παραμένει η καλύτερη μέθοδος εκχύλισης ενώ οι άλλοι δύο διαλύτες έχουν μικρότερη απόδοση.

Η ποσοτικοποίηση των συνολικών флаβονοειδών έγινε με βάση των τύπο:

$$X = (A \times m_0 \times 10) / (A_0 \times m)$$

Όπου: X = τα συνολικά флаβονοειδή σε mg/g εκχυλίσματος, A = απορρόφηση των διαλυμάτων extract, A₀ = απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων ρουτίνης, m = μάζα των εκχυλισμάτων σε g και m₀ = μάζα της πρότυπης ουσίας σε g.

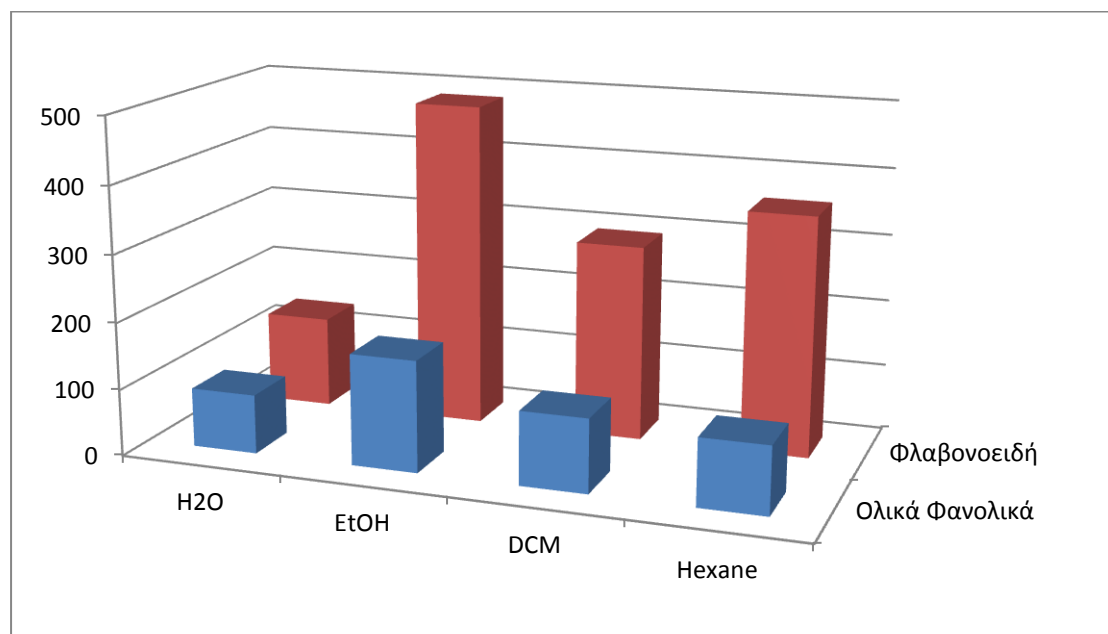
Με βάση τον τύπο αυτό χρησιμοποιώντας ως A₀ την απορρόφηση του διαλύματος των 500 mg/L, βρίσκουμε για τα αντίστοιχα εκχυλίσματα τιμές που κυμαίνονται από

6.85 έως 21 mg/g εκφρασμένα σε ισοδύναμα ρουτίνης (Rutin Equivalents – RE) [3][4].

Πίνακας 7.7: Υπολογισμός συνολικών φλαβονοειδών δενδρολίβανου

Εκχύλισμα	Φλαβονοειδή (mg/g)
H ₂ O	6.8
Ethanol	21.0
DCM	13.1
Hexane	15.9

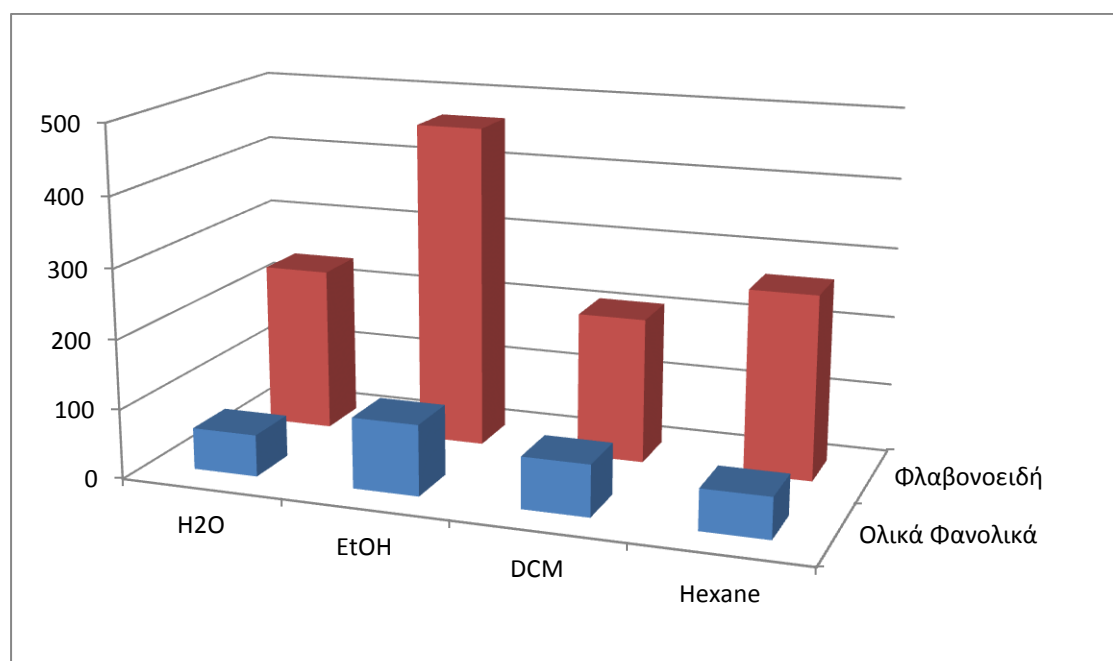
Παρατηρούμε ότι η εκχύλιση σε διαλύτη αιθανόλη παρουσιάζει την καλύτερη απόδοση σε σχέση με τους υπόλοιπους διαλύτες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από τον υπολογισμό των συνολικών φαινολικών. Επομένως το εκχύλισμα που προκύπτει από αιθανόλη εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά απόδοσης σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή, ενώ και στους υπόλοιπους διαλύτες έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 7.3: Απόδοση ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών συναρτήση του διαλύτη εκχύλισης για το δενδρολίβανο

Πίνακας 7.8: Υπολογισμός συνολικών φλαβονοειδών μαντζουράνας

Εκχύλισμα	Φλαβονοειδή (mg/g)
H ₂ O	9.0
Ethanol	17.3
DCM	8.03
Hexane	10.2

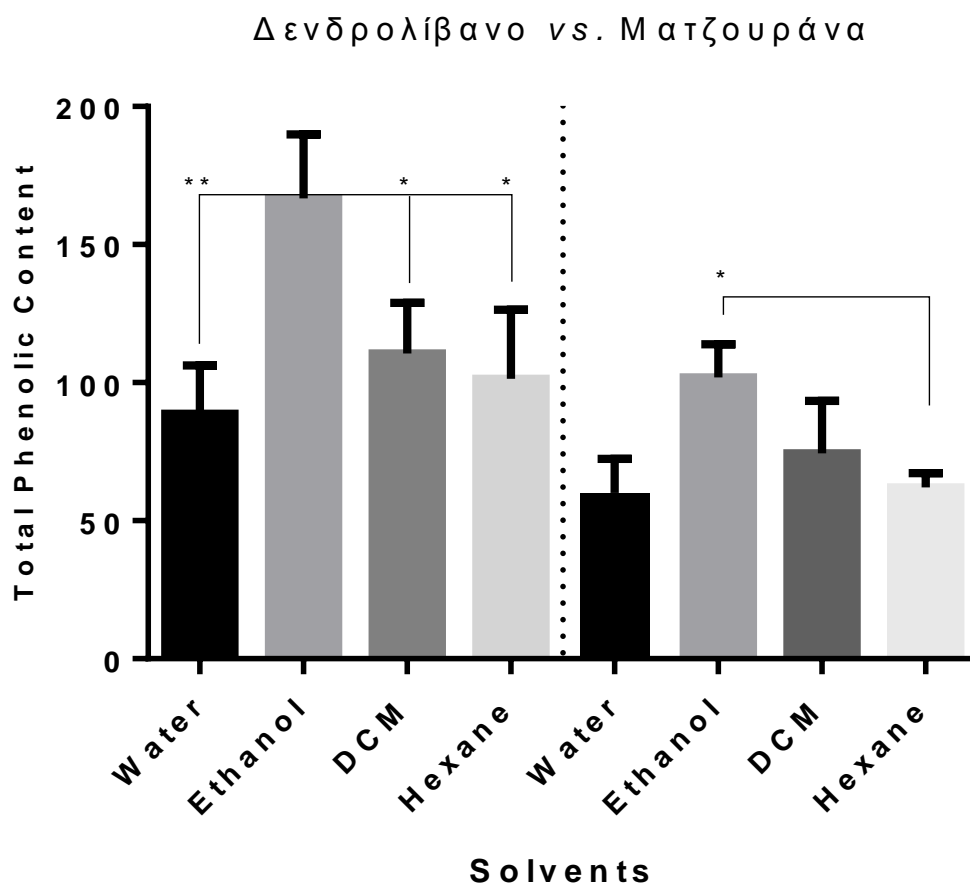
**Σχήμα 7.4:** Απόδοση ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών συναρτήση του διαλύτη εκχύλισης για την μαντζουράνα

Στα σχήματα 7.3 και 7.4 γίνεται φανερή η πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών σε σχέση με τα φαινολικά οξέα. Οι τιμές αυτές φαίνεται να εξαρτώνται ισχυρά από την περίοδο συγκομιδής του φυτού. Έχει αναφερθεί [5] ότι η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή είναι μικρή στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του φυτού και υπερδιπλασιάζεται όταν το φυτό ωριμάσει κάτι το οποίο ισχύει και στην παρούσα μελέτη.

7.2.3. Επίδραση του διαλύτη

Με σκοπό να μελετήσουμε την επίδραση των διαλυτών στα αποτελέσματα έγινε στατιστική ανάλυση με την μέθοδο ANOVA πολλαπλών συγκρίσεων όπου οι τιμές της κάθε στήλης (διαλύτης, 3 μετρήσεις ανά δείγμα) συγκρίνεται με όλες τις στήλες. Στο σχήμα 7.5 φαίνεται το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης με τη μορφή γραφήματος όπου στατιστικώς σημαντικές διαφορές ορίζονται για $p < 0.05$.

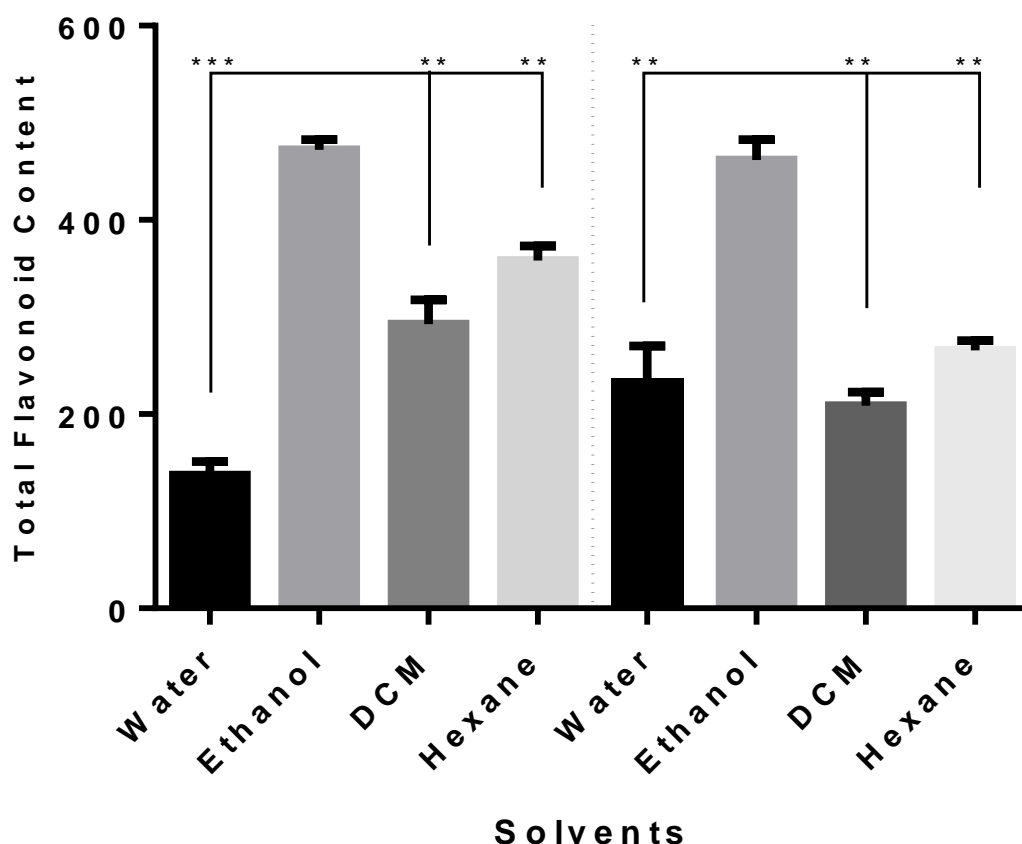
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στο δενδρολίβανο η επίδραση της αιθανόλης είναι καταλυτική στην παραλαβή των φαινολικών μορίων ενώ αντίθετα στα φύλλα της μαντζουράνας δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο είδος του διαλύτη που θα χρησιμοποιήσουμε με μόνη εξαίρεση την περίπτωση του εξανίου. Γενικά η παραλαβή των φαινολικών ενώσεων σε διαφορετικά δείγματα εξαρτάται από την πολικότητα των διαλυτών εκχύλισης και την διαλυτότητα κάθε ένωσης στο διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία της εκχύλισης [6][7]. Αν και δεν φαίνεται να υπάρχει ένας ενιαίος κανόνας για την εξαγωγή φαινολών από εκχυλίσματα φυτών [8] σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι η αιθανόλη αποτελεί την καλύτερη επιλογή. Σε μια πρόσφατη δημοσίευση, οι Poki-Assanga et al. [9], παρατήρησαν ότι η διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων εξαρτάται κυρίως από την παρουσία και την θέση των υδροξύλο- ομάδων, το μέγεθος των ενώσεων και το μήκος του κορμού των αλυσίδων των υδατανθράκων. Τα φαινολικά παράγωγα συνήθως παραλαμβάνονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε πολικούς διαλύτες. Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα συμπίπτουν με τα ανωτέρω [9] καθώς φαίνεται ότι το υδατικό διάλυμα (δείκτης πολικότητας νερού, $PI = 9$) δεν είναι το πιο κατάλληλο για την εξαγωγή των φαινολών όπου η αιθανόλη υπερισχύει (δείκτης πολικότητας αιθανόλης, $PI = 5.2$). Το γεγονός αυτό πιθανά σχετίζεται με την διαφορά διαλυτότητας των ενώσεων αυτών σε διαφορετικούς διαλύτες κάτι το οποίο εξηγεί μερικώς τα αποτελέσματα αφού συγκριτικά τα δύο φυτά δεν παρουσιάζουν την ίδια εξάρτηση από την χρησιμοποίηση της αιθανόλης. Ο πιο σημαντικός παράγοντας φαίνεται πως είναι η χαμηλή θερμοκρασία εκχύλισης (RT) και όχι τόσο η πολικότητα αφού παρατηρούμε σημαντική απόδοση σε πολυφαινόλες ακόμα και σε μη πολικούς διαλύτες (PI εξανίου = 0.1, PI διχλωρομεθανίου = 3.5).



Σχήμα 7.5: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών από εκχυλίσματα δενδρολίβανου και ματζουράνας σε διαφορετικό διαλύτη. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσοι \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Το * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) ενώ το **, $p < 0.01$.

Η ανάλογη στατιστική ανάλυση για την επίδραση των διαλυτών στην εξαγωγή των φλαβονοειδών οδήγησε στο σχήμα 7.6.

Δενδρολίβανο vs. Ματζουράνα



Σχήμα 7.6: Συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών από εκχυλίσματα δενδρολίβανου και ματζουράνας σε διαφορετικό διαλύτη. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσοι \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Το ** υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.01$) ενώ το ***, $p < 0.001$.

Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση των φλαβονοειδών, η επιλογή της αιθανόλης δίνει μακράν τα καλύτερα αποτελέσματα ενώ αντίθετα η χρησιμοποίηση άλλων διαλυτών δεν δίνει στατιστικά σημαντική διαφορά εκτός από την περίπτωση του νερού όπου φαίνεται να αποτελεί τον διαλύτη όπου η παραλαβή φλαβονοειδών καθίσταται δυσχερής ακόμα και υπό θέρμανση.

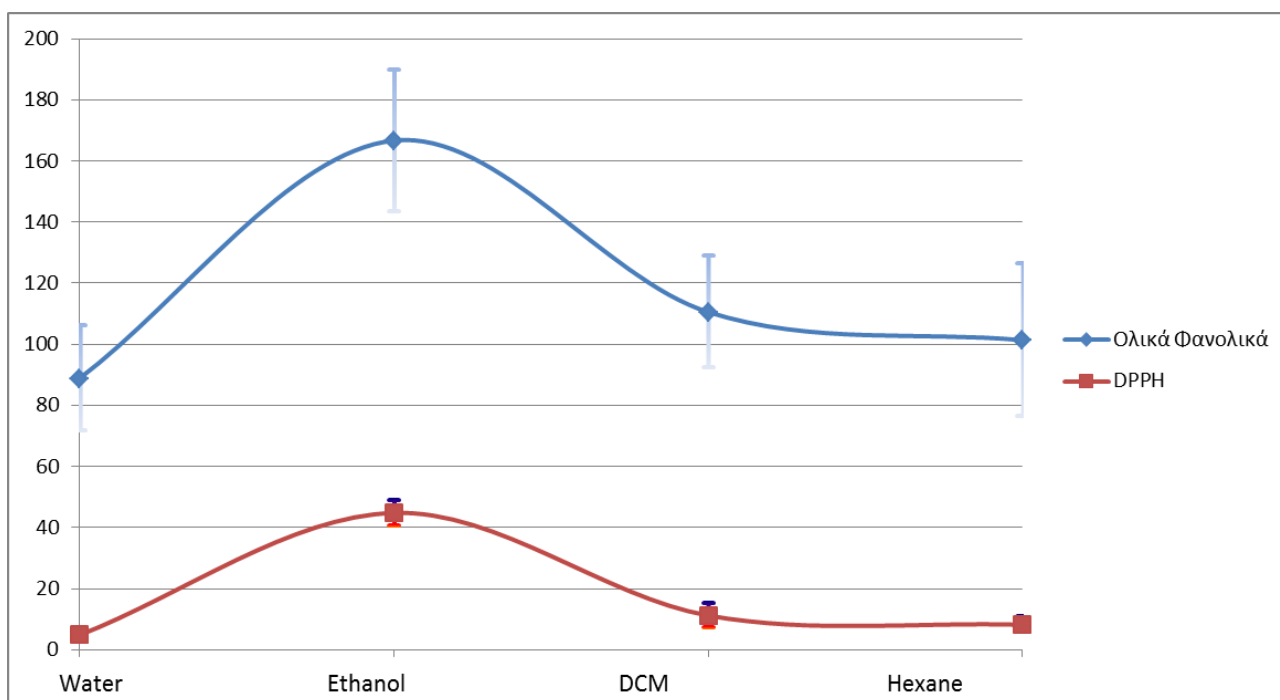
7.3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου με τη μέθοδο DPPH δίνονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 7.9: Υπολογισμός ποσοστού δέσμευσης DPPH στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου

Διαλύτης	% Αναστολή
H ₂ O	4.8 ± 0.4
EtOH	44.8 ± 1.2
DCM	11.2 ± 1.3
Hexane	8.2 ± 0.9

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας σχετίζονται θετικά με τις τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών και ολικών φλαβονοειδών με αντίστοιχα αποτελέσματα (σχήμα 7.7)



Σχήμα 7.7: Συσχέτιση ολικών φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu) και αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) (δενδρολίβανο).

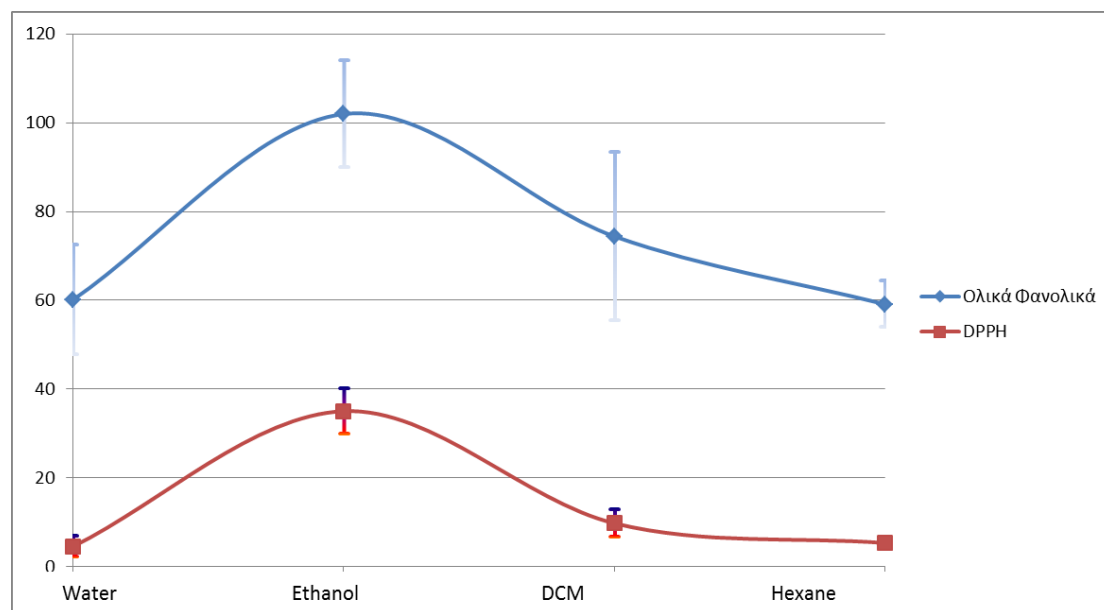
Από το σχήμα 7.7 γίνεται φανερή η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα προς την ελεύθερη ρίζα DPPH του αιθανολικού εκχυλίσματος η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.01$). Το γεγονός αυτό εμφανώς σχετίζεται με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών. Η απρόσμενα μικρή αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζει το υδατικό διάλυμα πιθανόν να οφείλεται στην απομάκρυνση πολλών φαινολικών συστατικών κατά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο των αρωματικών φυτών, έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Τα αποτελέσματα για τα εκχυλίσματα της μαντζουράνας δίνονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 7.10: Υπολογισμός ποσοστού δέσμευσης DPPH στα εκχυλίσματα μαντζουράνας

Διαλύτης	% Αναστολή
H ₂ O	4.6 ± 0.7
EtOH	35.0 ± 1.1
DCM	9.8 ± 0.8
Hexane	5.3 ± 0.6

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας ακολουθούν την ίδια τάση με τα προηγούμενα και συσχετίζονται θετικά με τις τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών και ολικών φλαβονοειδών καθώς τα αποτελέσματα είναι αντίστοιχα (σχήμα 7.6)



Σχήμα 7.8: Συσχέτιση ολικών φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu) και αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) (μαντζουράνα).

Από το σχήμα 7.9 γίνεται φανερή η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα προς την ελεύθερη ρίζα DPPH του αιθανολικού εκχυλίσματος η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Είναι γεγονός ότι οι φαινολικές ενώσεις είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά καθώς συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και μπορούν να ουδετεροποιούν ελεύθερες ρίζες [10]. Παρατηρούμε ανάλογη συμπεριφορά με την περίπτωση του δενδρολίβανου όπου η εκχύλιση σε νερό παράγει εκχύλισμα με την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η θετική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών έχει υπογραμμιστεί από αρκετούς συγγραφείς στη διεθνή βιβλιογραφία κάτι το οποίο δείχνει ότι οι πολυφαινόλες είναι τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά τόσο στο δενδρολίβανο όσο και στη μαντζουράνα [11] [12] [13].

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του αιθανολικού διαλύματος από φύλλα δύο ειδών βασιλικού (holy basil και sweet basil) και του αιθέριου ελαίου του sweet basil μελετήθηκε με τρία τεστ: (i) αναστολή DPPH (ii) αναστολή υπεροξειδωσης λιπιδίων *in vitro* και (iii) αναστολή λιποξυγενάσης *in vitro*. Τα αποτελέσματα περιγράφονται στον πίνακα 17. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν με τυπική απόκλιση $SD < \pm 10\%$. Η τιμή μηδέν υποδηλώνει καμία αλληλεπίδραση.

Πίνακας 7.11: Αλληλεπίδραση % με DPPH (RA %), % αναστολή υπεροξειδωσης λιπιδίων *in vitro* (LP %), % αναστολή λιποξυγενάσης *in vitro* (LOX %).

	Δείγματα	RA% ±SD 0.1mM 20min or 20μl/2ml^b	LP % ±SD (0.1mM) or 20μl/2ml^b	LOX % ±SD (0.1mM) or 20μl/2ml^b
1	Holly basil [#]	47 ^a	100	66
2	Sweet basil [#]	27 ^a	100	99
3	Linalool	87	19	0
4	Eugenol	95	100	0
5	Essential [#]	51	100	100
6	Caffeic	85 ^a	100	0
7	Rosmarinic	30 ^a	0	80
8	Isoeugenol	38 ^a	100	21.5
9	NDGA	81.0 ± 3.0		40 ± 1.8 % (0.1mM)
10	Trolox		63	

^a Άμεση αντίδραση, αλλά η μέτρηση έγινε στα 20 min.

^b Αντιστοιχεί στις περιπτώσεις: Holly basil (0.024g/0.24ml stock solution), Sweet basil (0.021g/0.21ml stock solution), αιθέριο έλαιο (0.073g/0.73 ml stock solution)

7.4. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων ώστε να καθοριστούν οι ουσίες που προσδίδουν στα εκχυλίσματα αντιοξειδωτική ικανότητα. Από την προηγούμενη ανάλυση φάνηκε ότι η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων συσχετίζεται γραμμικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτοχημικών. Τα φαινολικά οξέα έχουν ως βασική δομή τη φαινόλη. Από την άλλη, τα φλαβονοειδή αναφέρονται συνήθως ως “πολυφαινόλες” και περιέχουν τουλάχιστον δύο υπομονάδες φαινόλης. Τα φαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα ήταν το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ, ενώ τα φλαβονοειδή ήταν η ρουτίνη, απιγενίνη, λουτεολίνη. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης Butelinic acid, Ursolic acid, Oleanolic acid

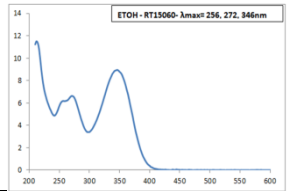
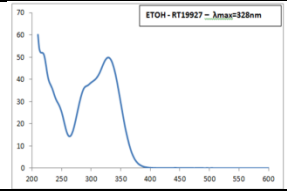
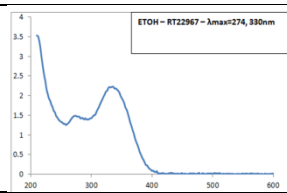
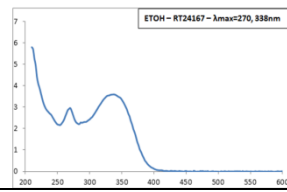
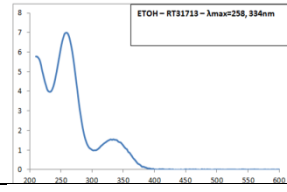
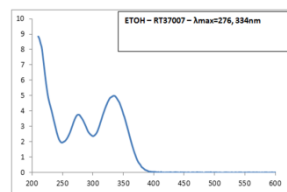
που ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών, καθώς και ευγενόλη, ισο-ευγενόλη και linalool (terpene alcohol).

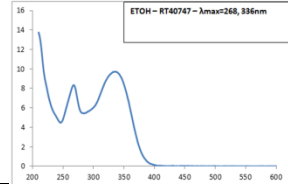
Τα δείγματα των εκχυλισμάτων προήρθαν από την εκχύλιση με τέσσερις διαλύτες (διχλωρομεθάνιο, αιθανόλη, νερό και εξάνιο) με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο ο διαλύτης εκχύλισης επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων. Η επίδραση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης δεν μελετήθηκε ως ξεχωριστός παράγοντας καθώς σκοπός μας ήταν η μελέτη της επίδρασης του διαλύτη. Γενικά υψηλές θερμοκρασίες έχουν υψηλές αποδόσεις. Παρόλα αυτά με χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών υπάρχει ο κίνδυνος παραλαβής χαμηλής ποιότητας εκχυλισμάτων λόγω της καταστροφής των θερμοευαίσθητων συστατικών [14]. Στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε να διατηρήσουμε τη θερμοκρασία χαμηλή (RT), καθώς μετά από σειρά πειραμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες διαπιστώσαμε με πειράματα HPLC ότι σημαντικός αριθμός συστατικών είναι ανιχνεύσιμος σε αυτή τη θερμοκρασία.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 7.12) παρουσιάζονται όλες οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα διάφορα εκχυλίσματα καθώς και η περιεκτικότητά τους στο κάθε εκχύλισμα. Η ταυτοποίηση βασίστηκε στο συνδυασμό του χρόνου συγκράτησης, του φάσματος και του μήκους κύματος στο οποίο παρουσίασε το μέγιστο της απορρόφησης στο UV-Vis. Από τον παρακάτω πίνακα παραλείπονται οι ενώσεις οι οποίες δεν κατάφεραν να ανιχνευθούν σε κανένα φυτικό εκχύλισμα αν και πιθανά μπορεί να περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία (βλ. παρακάτω).

Πίνακας 7.12: Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου σε διαφορετικούς διαλύτες στα 330nm

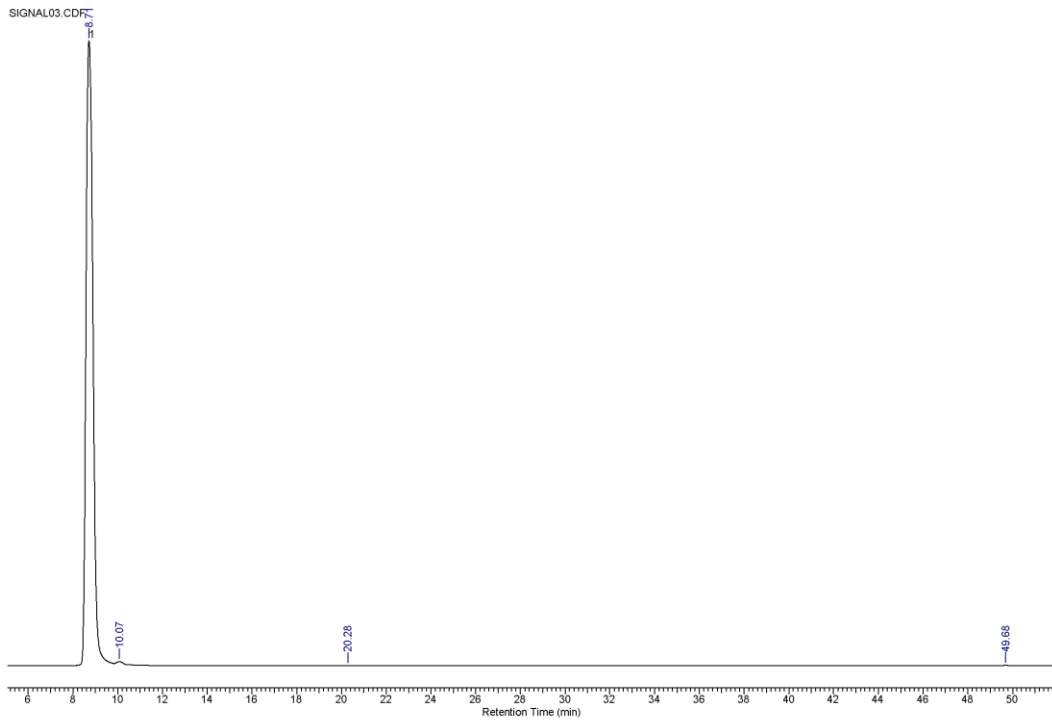
(330 nm) Ethanol				
	RT (min)	Compound	Area Percent	
1	15.03	Apigenin	3.7	
2a	16.50	Luteolin	0.7	
2	16.96	Luteolin	0.6	
3	18.51	Ispidulin	2.2	
4	19.88	Rosmarinic acid	32.5	
4b	20.01	Rosmarinic acid	7.3	
5	23.05	Isoscutellarein 7-O-glu	2.0	
6a	23.58	Genwanine	0.7	
7	23.39	Ladanein	1.0	
8	24.17	Episorosmanol	2.6	
9	25.25	Epirosmanol	1.1	
9a	29.21	rosmaridiphenol	1.8	
10	31.73	4-Methoxytecto-chrysin	1.3	
11	36.98	Girsimaritin	3.8	
11c	37.15	Girsimaritin	0.3	
12a	38.01	Genkwanine	1.7	

13	40.75	Flavonoid	5.3	
14	45.18	Unknown	2.0	
15	47.94	Unknown	2.3	
16	49.64	Unknown	3.0	
17b	52.82	Butelinic acid	0.8	
17c	51.13	Butelinic	1.7	
18b	53.03	Oleanolic acid	1.0	
18c	52.20	Oleanolic	0.2	

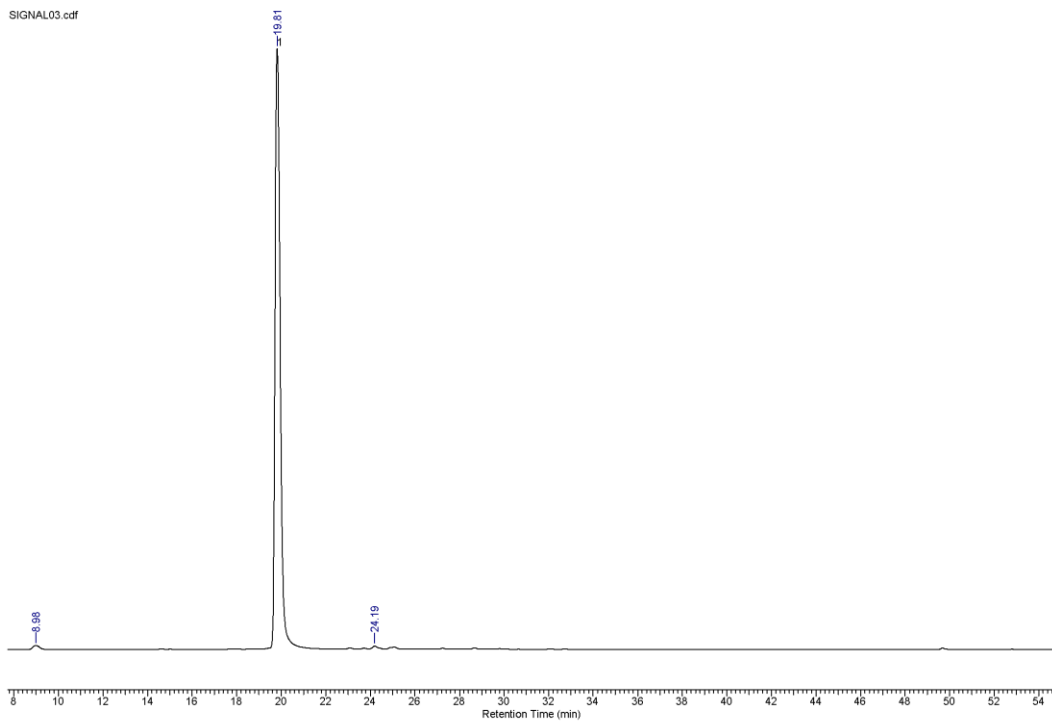
a, H₂O, b, Hexane, c, DCM

Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε την ισχυρή επίδραση των διαλυτών στην ανίχνευση των επιμέρους συστατικών. Το ροσμαρινικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα δείγματα που προέρχονται από την εκχύλιση σε διαλύτη αιθανόλη. Έχει βρεθεί ότι το ροσμαρινικό οξύ είναι το μοναδικό συστατικό που συνεισφέρει σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία των τεσσάρων υδροξυλομάδων στο μόριο του ροσμαρινικού οξέος καθώς και άλλα φαινολικά συστατικά έχουν μόνο μία ή δύο υδροξυλομάδες [15]. Το ροσμαρινικό οξύ βρίσκεται σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* [16] [17] [18] [19]. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται ότι τα φαινολικά συστατικά δεν είναι σταθερά και αρχίζουν να διασπώνται, όπου η θερμότητα τείνει να υδρολύσει το ροσμαρινικό οξύ, παράγοντας με αυτό τον τρόπο καφεϊκό οξύ [20] [21]. Όπως ειπώθηκε η θερμοκρασία εκχύλισης διατηρήθηκε σε επίπεδα περιβάλλοντος με σκοπό την αποφυγή του φαινομένου αυτού. Διαφορετικά η μελέτη κυτταροτοξικότητας των ενώσεων αυτών θα έπρεπε να σταθμιστεί με βάση μόνο το καφεϊκό οξύ το οποίο και τελικά ανιχνεύθηκε σε μικρές ποσότητες.

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν κατά την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος.



Σχήμα 7.9: Πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος στα 330 nm



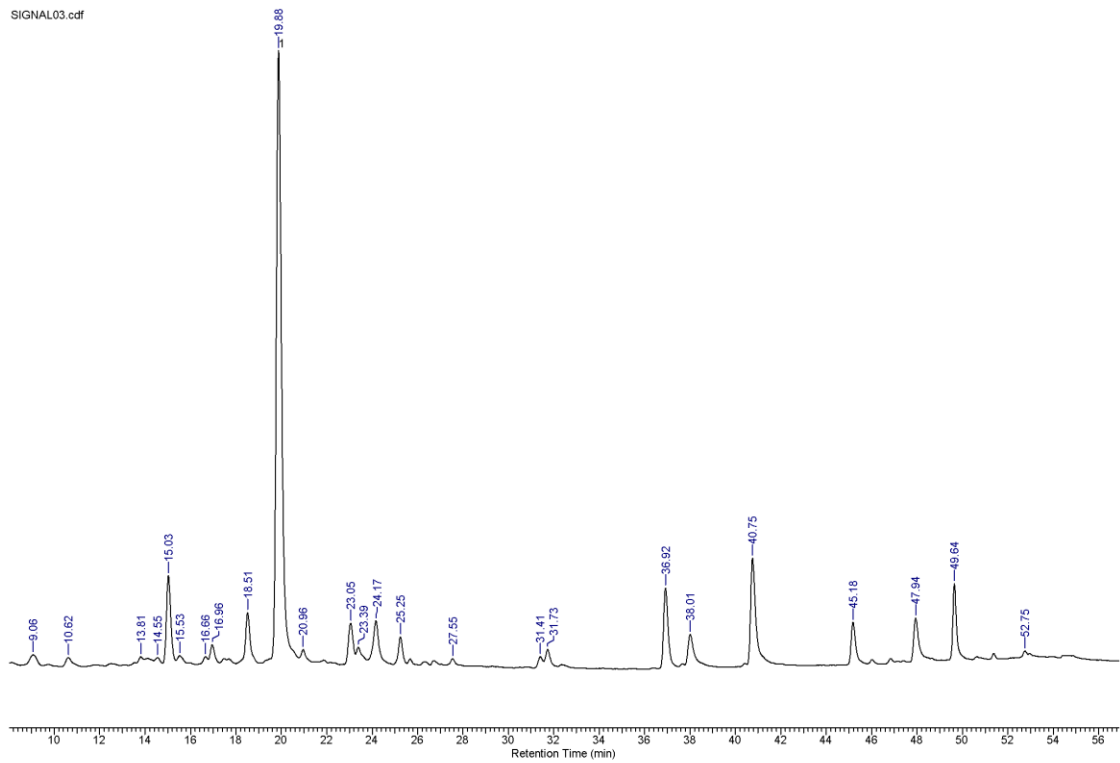
Σχήμα 7.10: Πρότυπο διάλυμα ροσμαρινικού οξέος στα 330 nm

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου σε τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες (αιθανόλη, νερό, διχλωρομεθάνιο και εξάνιο). Παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος εμφανίζεται στο μεθανολικό εκχύλισμα κάτι που αναφέρεται και στη βιβλιογραφία [22] [23]. Σε άλλες έρευνες που έχουν προκύψει από τη μελέτη και άλλων φυτών της οικογένειας Lamiales [24][25][26][27][28][29] παρατηρήθηκε η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος ως κύριο συστατικό.

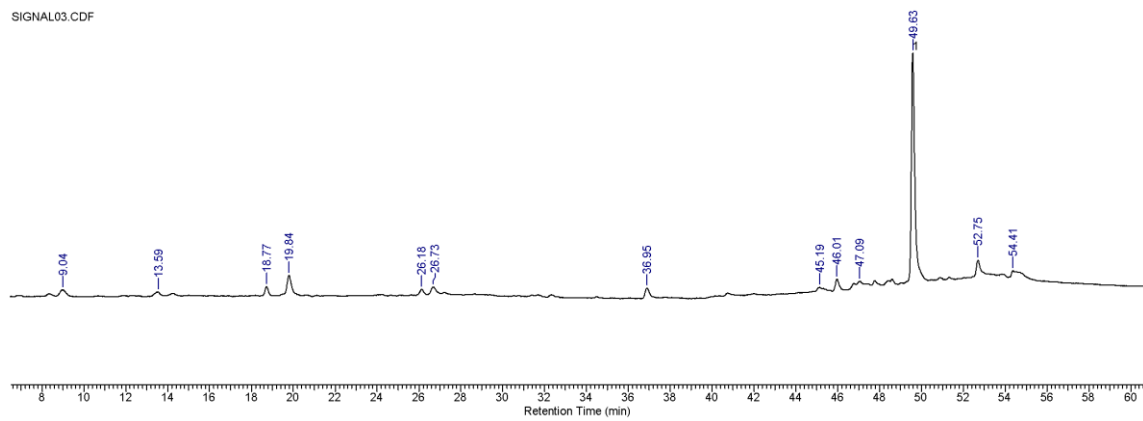
Η παρουσία του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και άλλων γλυκοζιτών της λουτεόλης έχει αναφερθεί σε πολλές έρευνες [30]. Στα δείγματά μας εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό και οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στη γεωγραφία, στο κλίμα της περιοχής, κλπ. που είναι συνήθεις παράγοντες διακύμανσης.

Σε όλα τα δείγματα εμφανίζονται επίσης και οι ενώσεις Diosmin, Ispidulin, Episorosmanol, Girsimaritin, Genkwanine, Butelinic acid, Oleanolic acid, Ursolic acid. Επίσης έχουν βρεθεί ενώσεις όπως συριγγικό, φερουλικό, κατεχίνη και λουτεολίνη η οποία δεν είναι συνδεδεμένες με κάποιο γλυκοζίτη, καθώς επίσης και p-κουμαρικό οξύ [31]. Επίσης έχουν βρεθεί λουτεολίνη και απιγενίνη από την οικογένεια φλαβονοειδών [32].

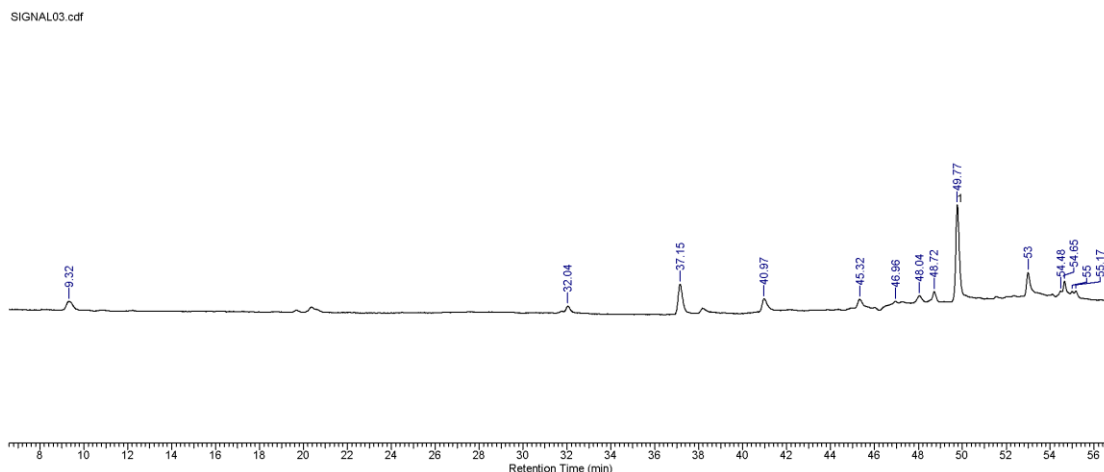
Μεγάλες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ του δεντρολίβανου που έχει εκχυλιστεί σε νερό. Αυτό φανερώνει την έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού που όμως λόγω της φυσιολογίας του φυτού οι αντιοξειδωτικές ενώσεις παραλαμβάνονται σχετικά δύσκολα [33].



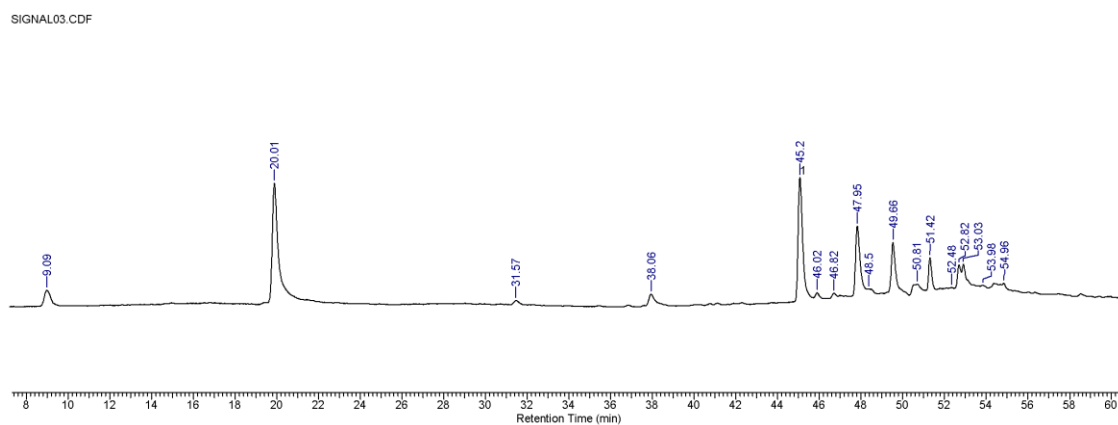
Σχήμα 7.11: Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου στα 330 nm



Σχήμα 7.12: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου στα 330 nm

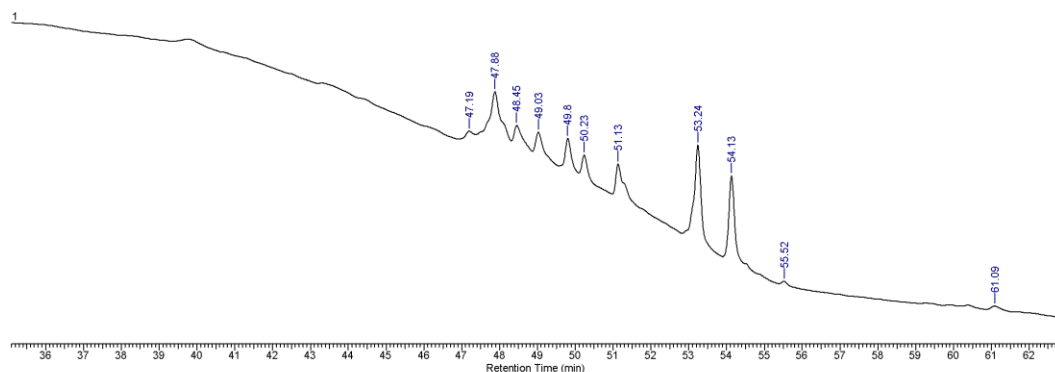


Σχήμα 7.13: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε διχλωρομεθάνιο στα 330 nm



Σχήμα 7.14: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε εξάνιο στα 330 nm

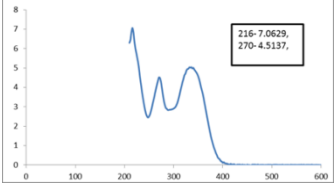
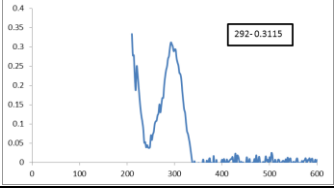
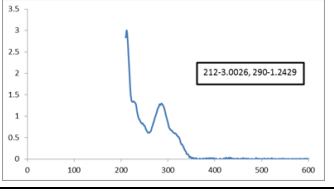
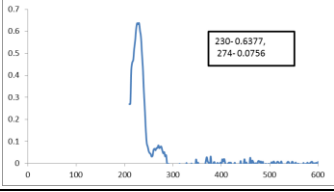
SIGNAL05.cdf

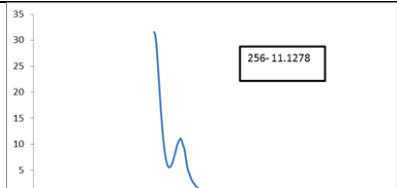


Σχήμα 7.15: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθέριου ελαίου δεντρολίβανου στα 330 nm

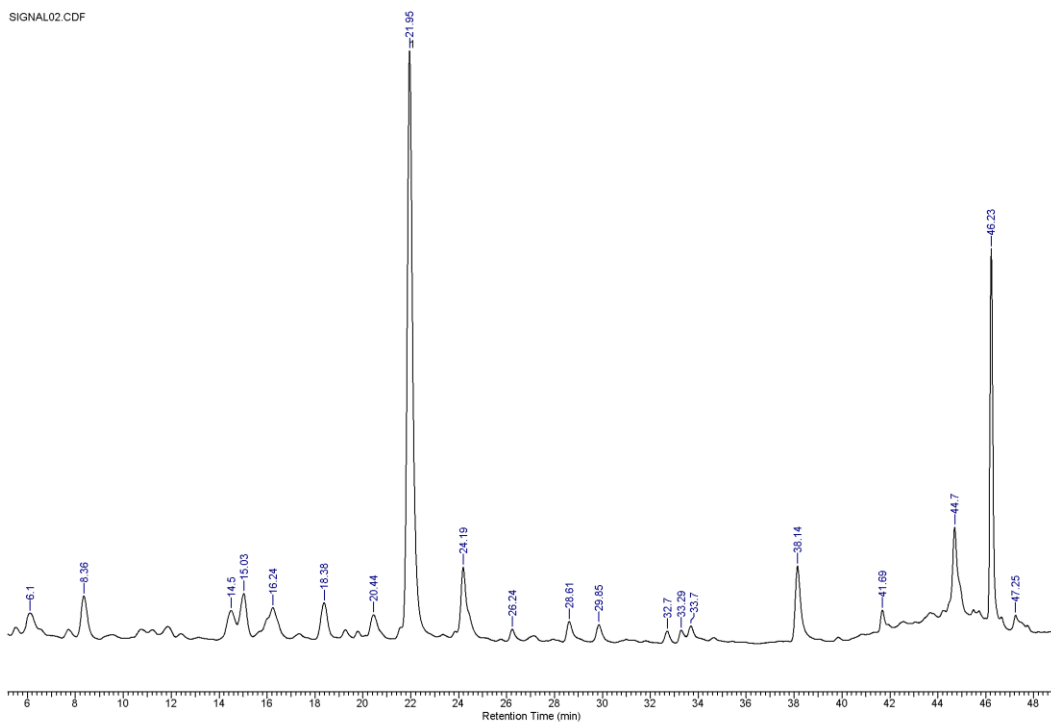
Ο πίνακας 7.13 περιλαμβάνει τα πειραματικά αποτελέσματα όπως τους χρόνους συγκράτησης και τα εμβαδά του των κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση με HPLC σε εκχυλίσματα μαντζουράνας. Από τον πίνακα γίνεται φανερό ότι τα δείγματα έχουν σε υψηλή περιεκτικότητα ροσμαρινικό οξύ και methyl rosmarenate. Αντίστοιχη περιεκτικότητα σε αυτές τις ενώσεις βρέθηκε και στην βιβλιογραφία [34].

Πίνακας 7.13: Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των εκχυλισμάτων μαντζουράνας σε διαφορετικούς διαλύτες στα 280 nm

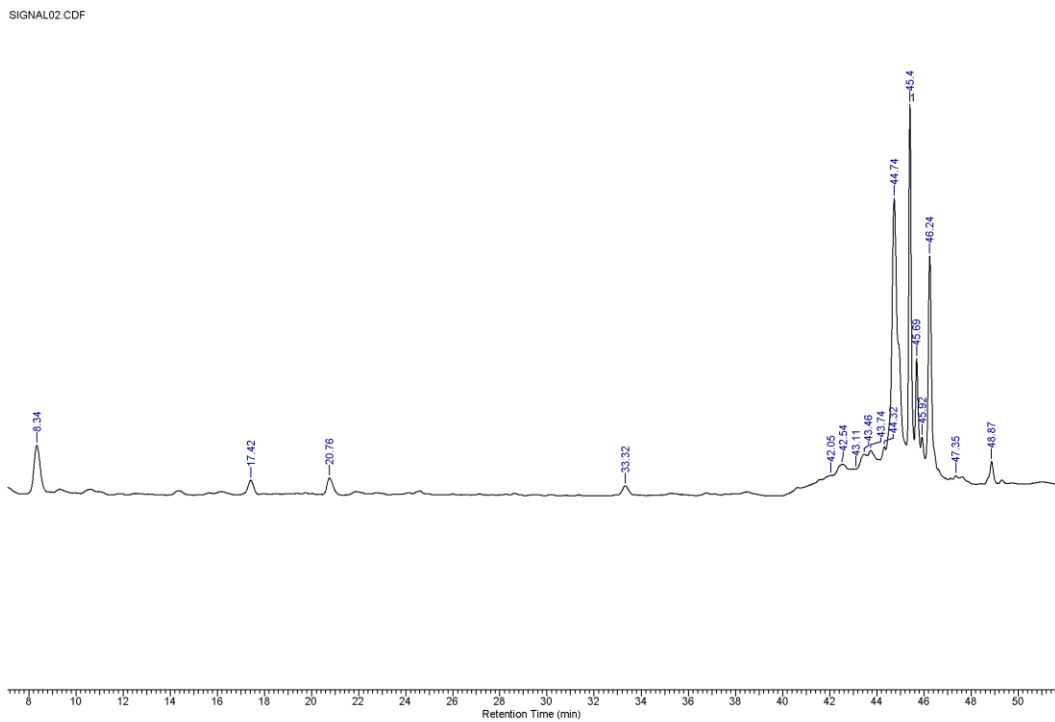
		(280 nm) Ethanol		
	RT	Compound	Area Percent	
1	6.10	4 dihydroxyphenolic	1.7	
2	8.35	resorcinol	2.4	
2a	8.34	resorcinol	2.1	
2c	8.37	resorcinol	1.2	
3	14.50	2 dihydroxycinnamic acid	1.9	
3b	14.49	2 dihydroxycinnamic acid	0.6	
4	15.03	Luteolin	2.4	
5	16.24	Luteolin	2.4	
5c	16.23	Luteolin	5.8	
6	18.38	chlorogenic acid	2.2	
6b	19.22	amentoflavone	2.0	
7	20.44	hesperidin	1.5	
7a	20.76	hesperidin	0.7	
7c	20.34	hesperidin	8.2	
8	21.95	rosmarinic acid	30.3	
8c	21.94	rosmarinic acid	20.7	
8b	22.76	p-Coumaric acid	1.1	
9	24.19	Caffeoylquinic acid	3.7	
9c	24.19	Caffeoylquinic acid	12.2	
10	26.23	Quercetin glucoside	0.5	

11	28.61	Ferulic acid	1.0	
12	29.85	naringenin-apigenin	0.8	
13	32.70	carosic acid	0.5	
14	33.29		0.5	
15	33.69		0.7	
16	38.14	cinnanic acid	3.7	
17	41.69	rosmarenic acid	0.8	
18	44.70	Methyl rosmarelate	4.	
18a	44.73	Methyl rosmarelate	12.2	
18b	44.23	Methyl rosmarelate	1.4	
19	46.23		9.8	
20	47.25		0.6	
21	54.01	Apigenin	0.8	
21a	54.06	Apigenin	1.0	
21b	54.08	Apigenin	0.5	

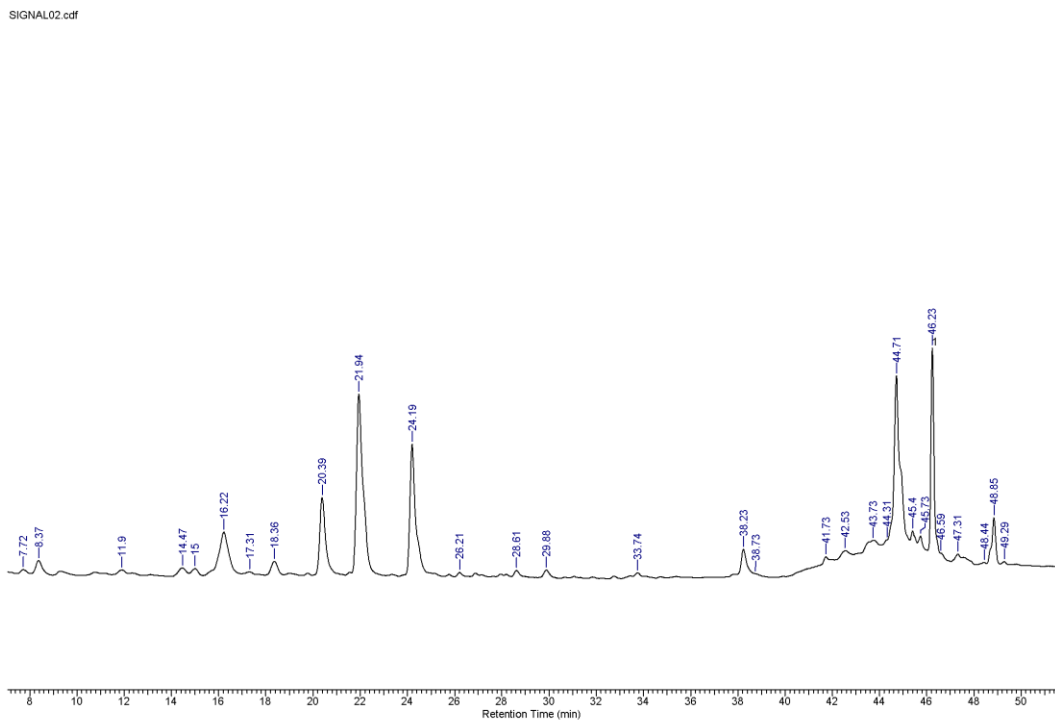
a, H₂O, b, Hexane, c, DCM



Σχήμα 7.16 : Αιθανολικό εκχύλισμα μαντζουράνας στα 280 nm

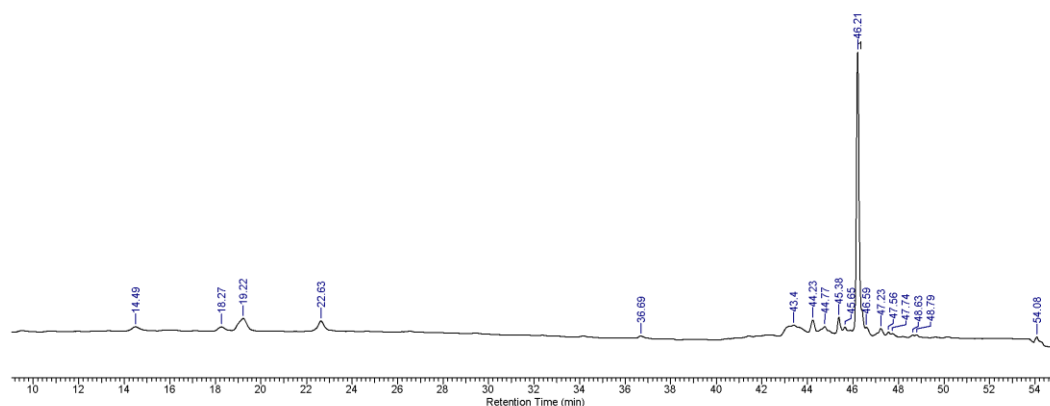


Σχήμα 7.17: Υδατικό εκχύλισμα μαντζουράνας στα 280 nm



Σχήμα 7.18: Εκχύλισμα μαντζουράνας σε διχλωρομεθάνιο στα 280 nm

SIGNAL02.CDF

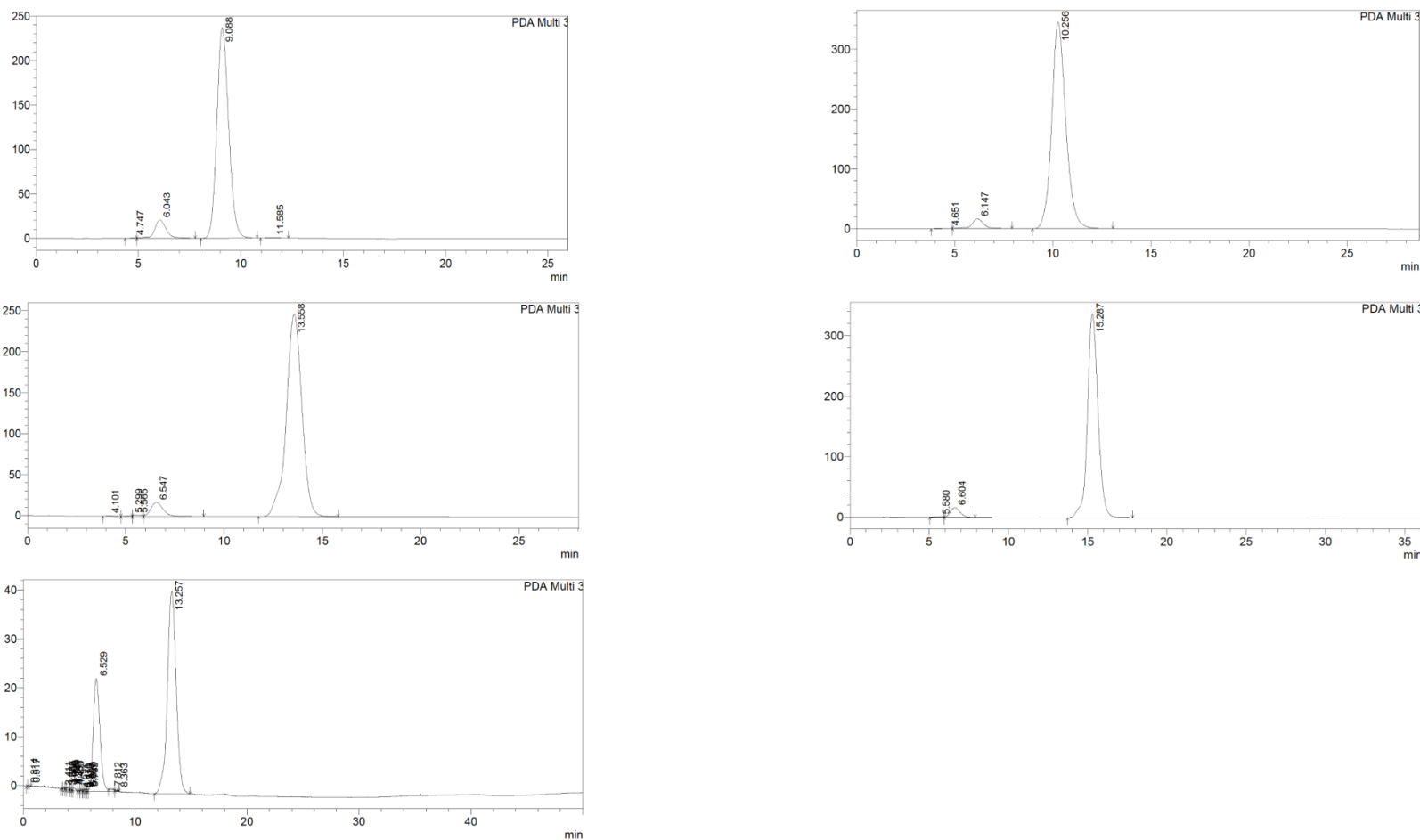


Σχήμα 7.19: Εκχύλισμα μαντζουράνας σε εξάνιο στα 280 nm

Για την περίπτωση του βασιλικού αποφασίσαμε να ακολουθήσουμε μια διαφορετική προσέγγιση ώστε να επιτύχουμε τον ποσοτικό προσδιορισμό του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος πέραν του ποιοτικού προσδιορισμού. Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς σε περιοχές συγκεντρώσεων από 3-180 mg/L, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα αρχικής συγκέντρωσης 300 mg/L. Όλα τα διαλύματα ήταν τελικού όγκου 1ml. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τα πρότυπα δείγματα καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος, παρασκευάσαμε τέσσερα πρότυπα μείγματα με συγκεντρώσεις του γενικού τύπου:

$150\mu\text{l} \times [\text{Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος}] + 850\mu\text{l} \times [\text{Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος}]$

Τα δείγματα που προέκυψαν μελετήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Από τον υπολογισμό του εμβαδού επιφάνειας των αντίστοιχων κορυφών υπολογίστηκε η συγκέντρωση από την καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 7.20: Χρωματογραφήματα (254 nm) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σχετικών συστατικών σε εκχύλισμα φύλλων και αιθέριου ελαίου βασιλικού.

Η καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος ήταν της μορφής: $y = 87529x + 133983$
με $R^2 = 0.9997$

Η καμπύλη αναφοράς του ροσμαρινικού οξέος ήταν της μορφής: $y = 39406x + 356792$
με $R^2 = 0.9967$

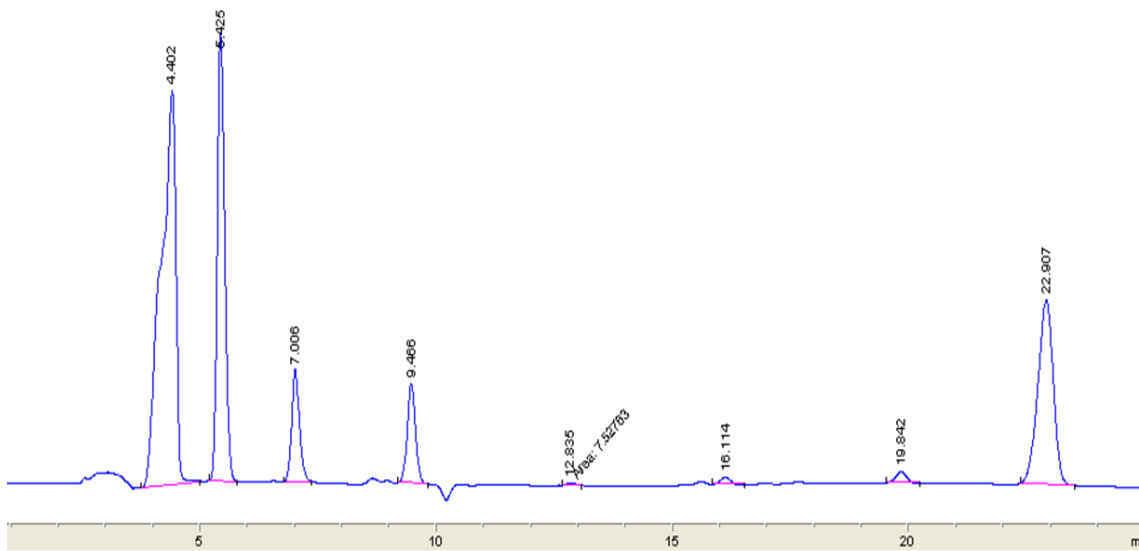
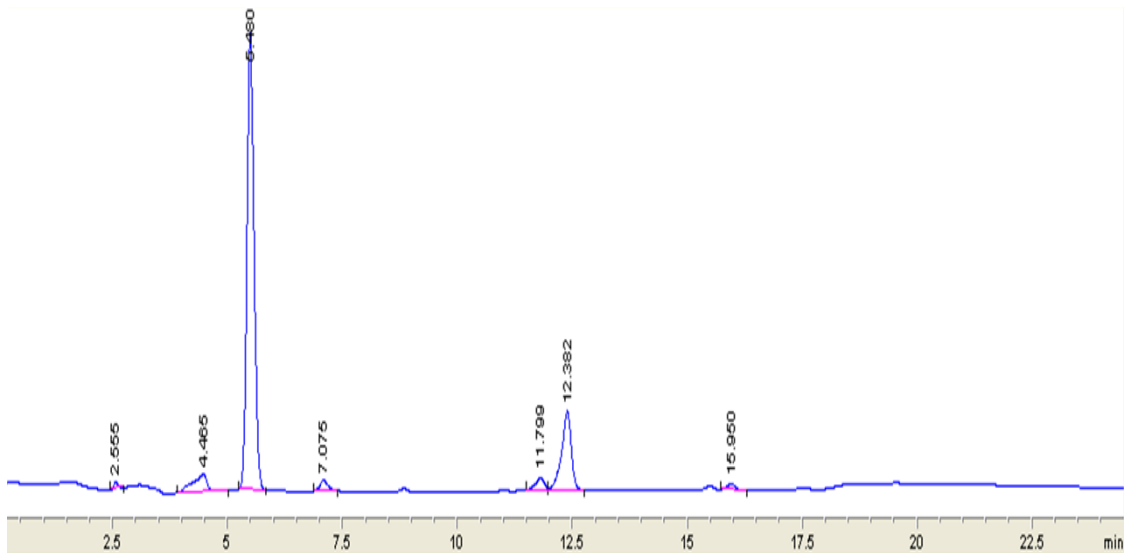
Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία υπολογίσαμε ανάλογες καμπύλες αναφοράς για τα πρότυπα δείγματα eugenol, isoeugenol και linalool, αρχικής συγκέντρωσης 300 ppm σε ποσότητες 0.1 – 0.5 ml. Τα μείγματα δόθηκαν για χρωματογραφία HPLC, για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών αυτών στο άγνωστο δείγμα αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης 100ppm. Από τις τιμές εμβαδού επιφάνειας και συγκέντρωσης κατασκευάσαμε τις καμπύλες αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αγνώστου.

Καμπύλη αναφοράς ευγενόλης $y = 103152x$, $R^2 = 0.9925$

Καμπύλη αναφοράς ισοευγενόλης $y = 14502x$, $R^2 = 0.9945$

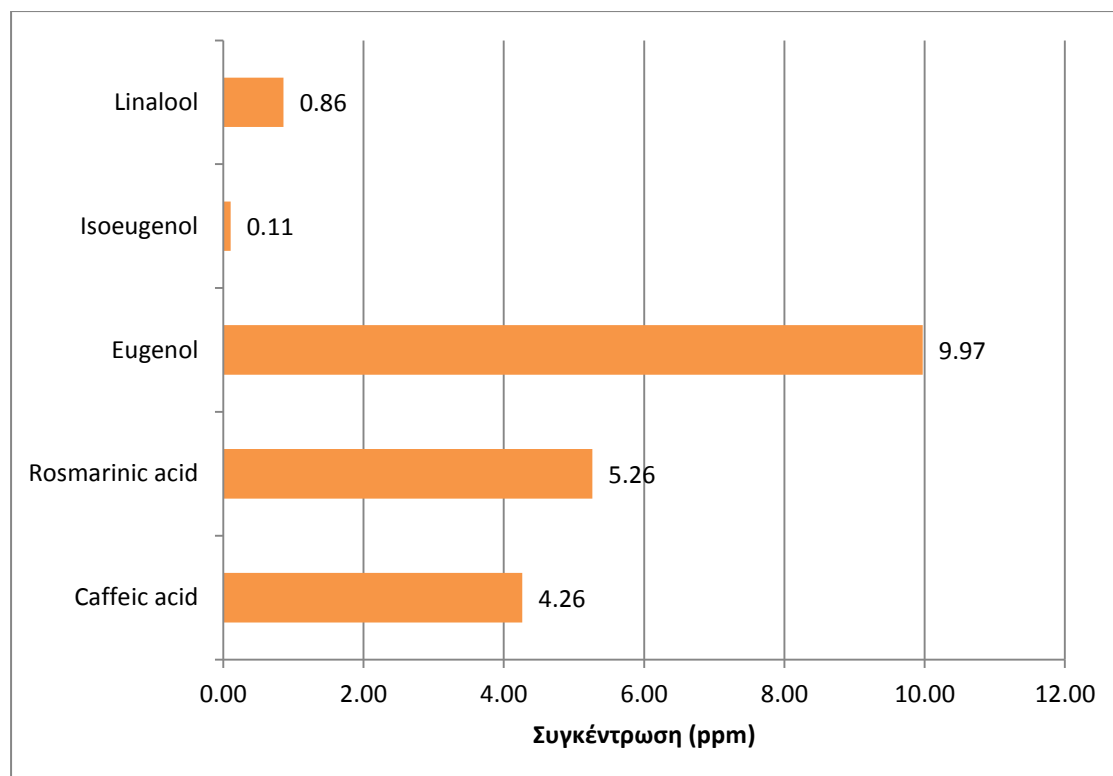
Καμπύλη αναφοράς λιναλοόλης $y = 20607x$, $R^2 = 0.9884$

Για το εκχύλισμα του βασιλικού οι κορυφές του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος εμφανίζονται περίπου σε χρόνους κατακράτησης στα 4.4 min και 5.5 min αντίστοιχα. Για το αιθέριο έλαιο όπου τα κύρια συστατικά είναι η ευγενόλη, η ισοευγενόλη και η λιναλοόλη [³⁵][³⁶][³⁷] οι χρόνοι για την ισοευγενόλη ήταν 7.8 min, για την ευγενόλη 12.8 min και για το linalool 18.9 min όπως προέκυψε από την μελέτη προτύπων δειγμάτων.



Σχήμα 7.21: Χρωματογραφήματα για το εκχύλισμα του βασιλικού (α) (254 nm) και του αιθέριου ελαίου (β) (280 nm)

Η ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων βασιλικού έδωσε τις παρακάτω τιμές σε ότι αφορά στις πέντε ενώσεις που αναλύθηκαν



Σχήμα 7.22: Ποσοτική ανάλυση των αιθανολικών εκχυλισμάτων του βασιλικού

Η αναλογία της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού ως προς το καφεϊκό οξύ είναι 1.2. Η τιμή αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία όπου ο λόγος υπολογίστηκε να είναι 1.3 [38]. Η συγκέντρωση της ευγενόλης ως κύριο συστατικό των εκχυλισμάτων του βασιλικού (φύλλα) αποτελεί θέμα υπό συζήτηση στη διεθνή βιβλιογραφία καθώς φαίνεται να επηρεάζεται ισχυρά από την περίοδο συγκομιδής του φυτικού υλικού [39]. Οι Hakkim et al. [40] μελετώντας το ίδιο είδος βασιλικού βρήκαν ότι η ευγενόλη είναι το κύριο συστατικό των φύλλων σε αναλογία 18% μικρότερη από την δική μας μελέτη. Αντίθετα οι Lee et al. [41] πρότειναν ότι το κύριο συστατικό είναι η λιναλοόλη σε συγκέντρωση μεγαλύτερη μιας τάξης μεγέθους σε σχέση με την ευγενόλη. Η παρουσία της ισοευγενόλης προτάθηκε από την ερευνητική μας ομάδα για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία [42] καθώς κατέστη δυνατή η απομόνωση της σε συγκέντρωση 100 φορές μικρότερη σε σχέση με την ευγενόλη.

7.5. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Με τη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας αναλύθηκαν τα πρότυπα δείγματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα και χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των αντίστοιχων ενώσεων στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τους τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες. Στα εκχυλίσματα των φύλλων του δεντρολίβανου ανιχνεύθηκαν όλες οι πρότυπες ουσίες αν και παρατηρούμε τη σημαντική επίδραση του διαλύτη στην ανίχνευση ή όχι ενός συστατικού. Επίσης στον πίνακα αναφέρονται οι χρόνοι κατακράτησης των αντίστοιχων ενώσεων όπως ανιχνεύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

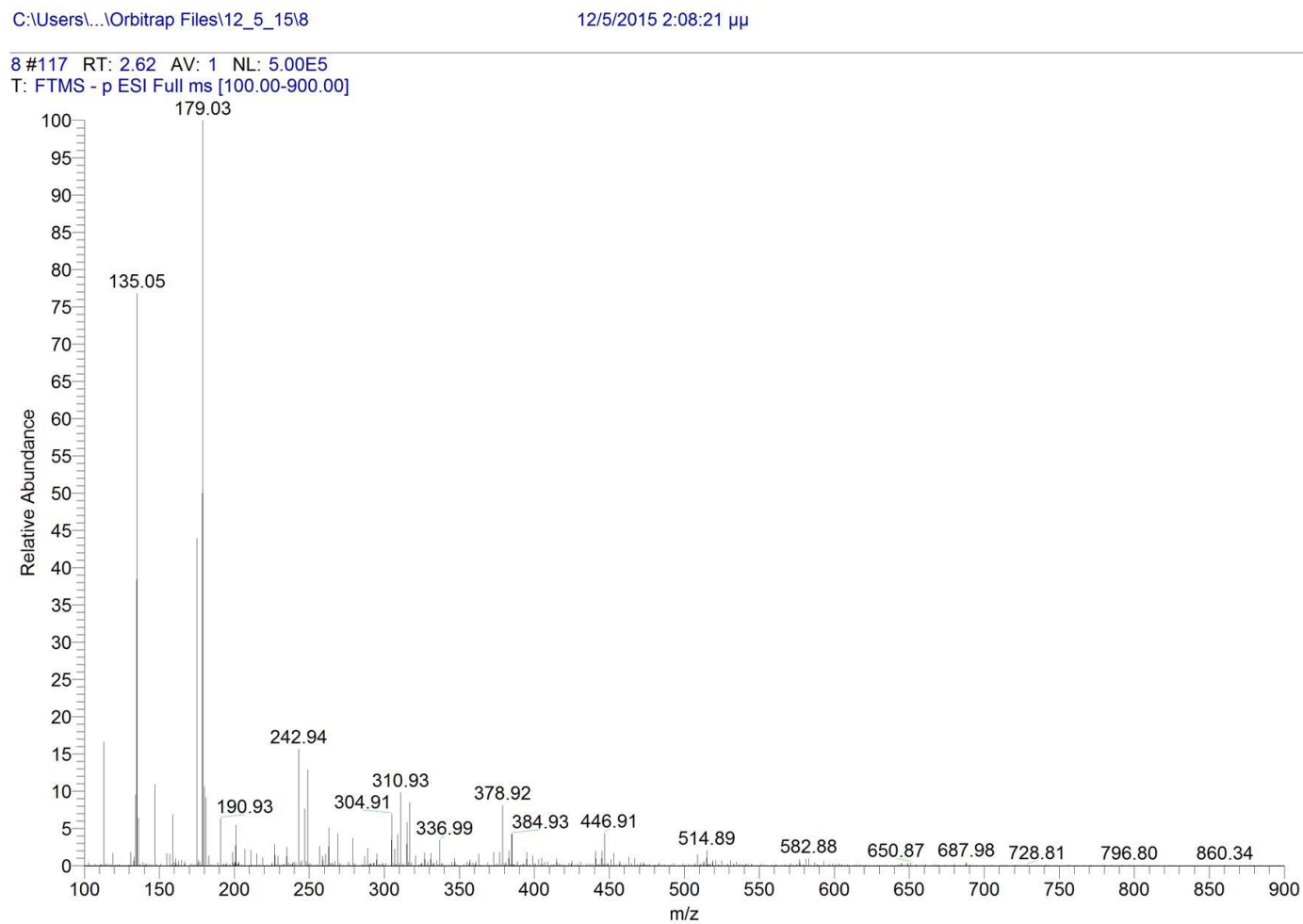
Πίνακας 7.14: Αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας και HPLC για τα πρότυπα και τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα δενδρολίβανου

	Compound	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z) (θεωρητικό)	Acc. Mass (πειραματικό)	Σφάλμα (ppm)	MS ² [M-H] (m/z) (%)	Διαλύτες εκχύλισης	HPLC
1	Caffeic acid	2.62	179.1495	179.0368	6.2897	135.05 (100)	(a,b,c,d)	
2	Rosmarinic acid	4.15	359.3069	359.0808	6.2927	161.02 (100) 197.05 (29)	(a)	19.9 (a) 20.0 (b)
3	Luteolin	4.83	285.2284	284.5405	24.1161	285.04 (100) 286.04 (47)	(a,c,d)	16.9 (a) 16.5 (c)
4	Apigenin	5.37	269.2290	269.0428	6.9146	285.04 (100) 225.06 (27)	(a,c)	15.1 (a)
5	Rutin	6.27	609.5096	609.1489	5.9172	174.96 (100)	(a)	
6	Betulinic acid	10.01	455.6924	455.3485	7.5463	158.98 (100)	(a,c,d)	52.1 (a) 52.8 (b) 51.1 (d)
7	Oleanolic acid	10.19	455.6924	455.3576	7.3466		(a,c,d)	53.9 (a) 53.9 (b) 52.9 (d)
8	Eugenol	10.37	163.1931	162.5764	37.7920		(a,c,d)	
9	Isoeugenol	10.36	163.1931	162.5764	37.7920	163.11 (100)	(a,b,c,d)	
10	Ursolic acid	10.41	455.6924	455.3484	7.5485	158.98 (100)	(b,d)	55.7 (a, b) 54.2 (d)
11	Hispidulin	7.00	299.2549	299.0434	7.0689	283 (100), 227	(a)	18.5 (a)

						(21)		
12	Rosmanol isomer/ Epirosmanol	10.35	345.4095	345.2321	5.1359	163.11 (100)	(a)	25.3 (a)
13	Tectochrysin	7.50	267.2561	265.1501	78.8023	174.96 (100)	(c,d)	31.7 (a)
14	Cirsimaritin	2.73	313.2815	313.2894	0.2515	242.74 (100) 174.96 (27)	(a,c)	36.9 (a), 37.1 (d)
15	Genkwanin	7.87	283.2555	283.1533	3.6095	201.09 (100) 214.10 (83)	(a)	38.0 (a)
16	Quinic acid	17.28	191.1586	190.9304	11.9398	146.94 (100)	(a,c)	2.9 (a, b, d)

a:αιθανόλη, b:Εξάνιο, c:Νερό, d:Διγλωρομεθάνιο

Η πλειονότητα των συστατικών εμφανίζεται μετά από εκχύλιση με αιθανόλη σε συμφωνία με τα πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών. Στα σχήματα 7.30 έως 7.40 φαίνονται τα κυριότερα θραύσματα που ελήφθησαν από τα πειράματα LC-MS εκχυλισμάτων δενδρολίβανου.

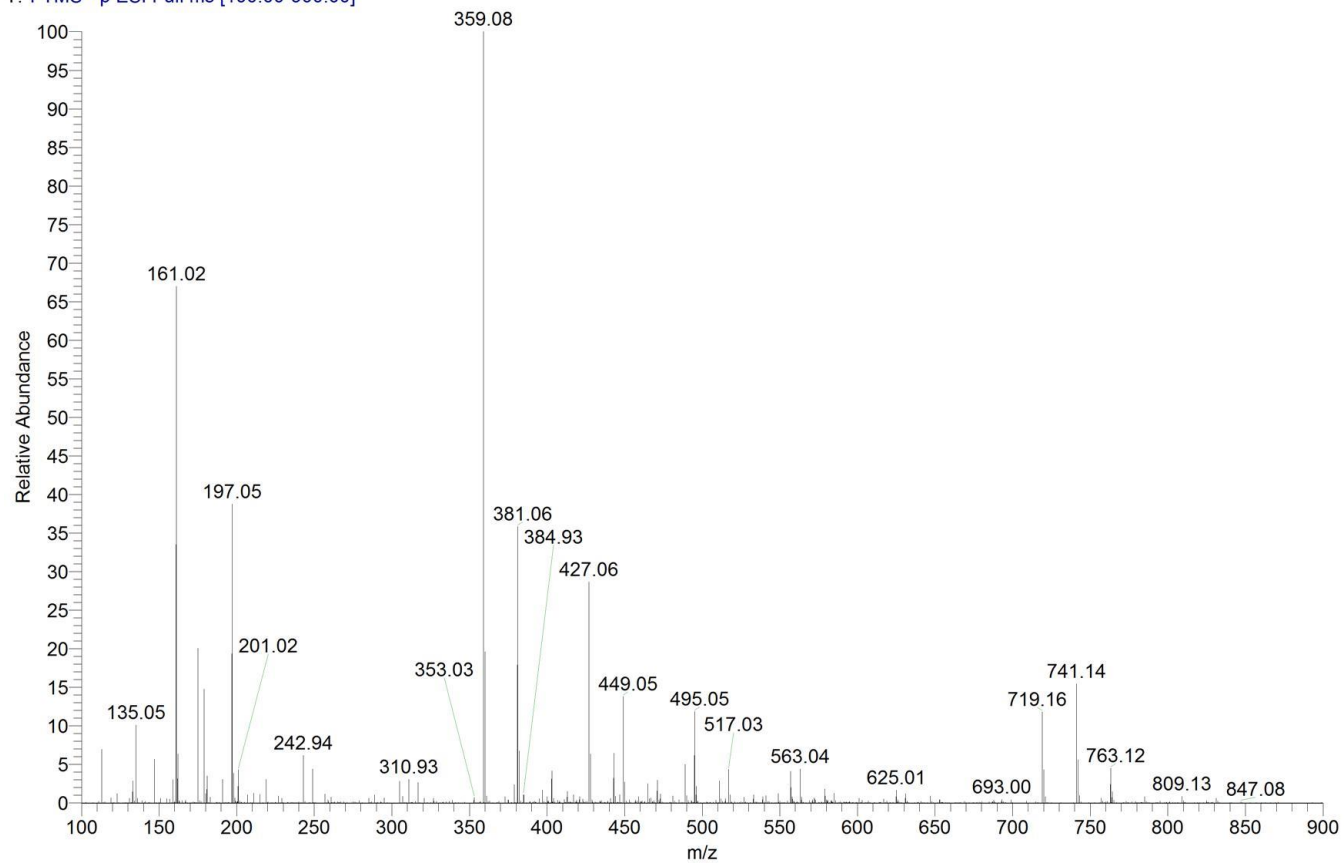


Σχήμα 7.23: Φάσμα μάζας καφεϊκού οξέος

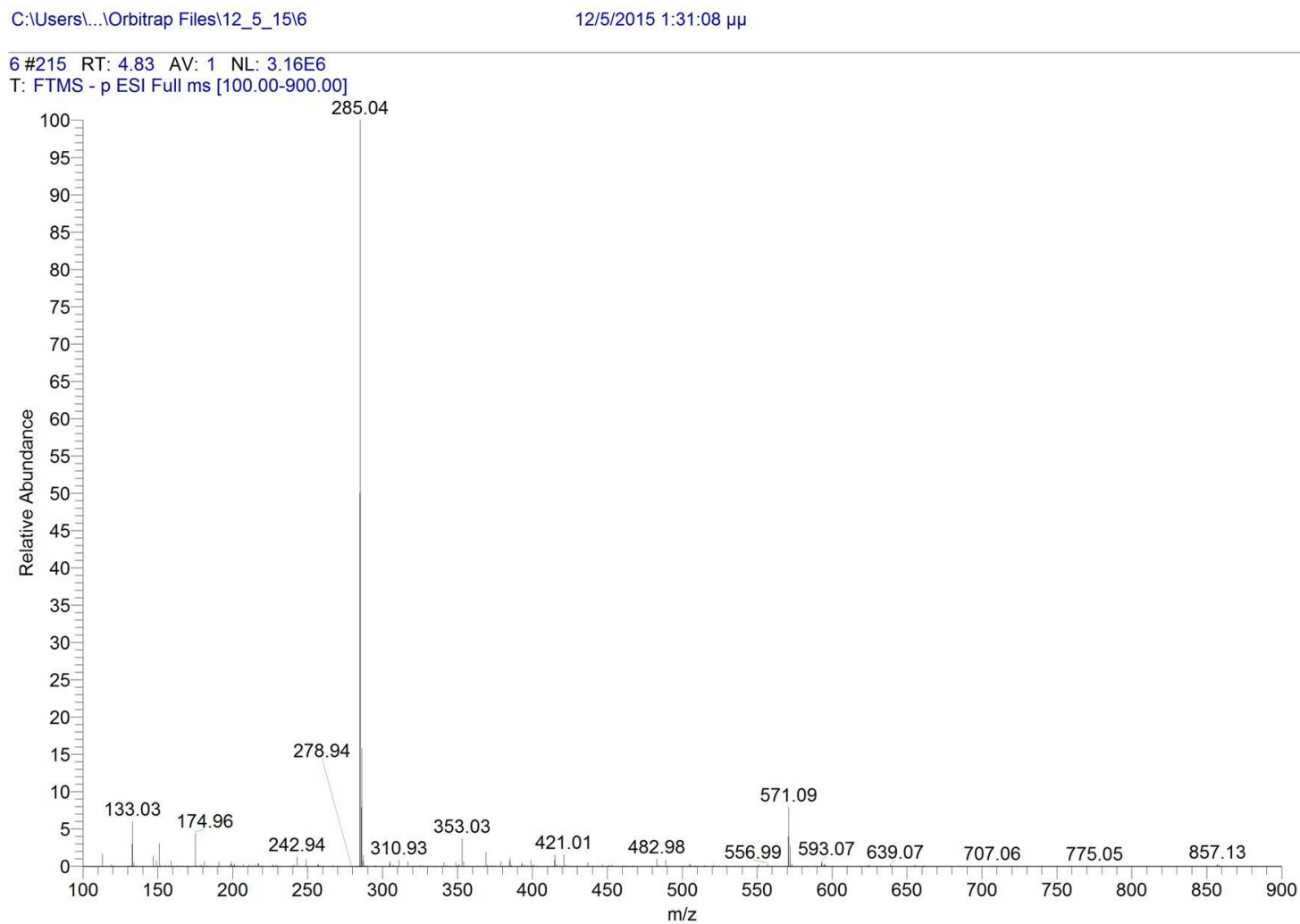
C:\Users\...\Orbitrap Files\12_5_15\7

12/5/2015 1:49:45 μμ

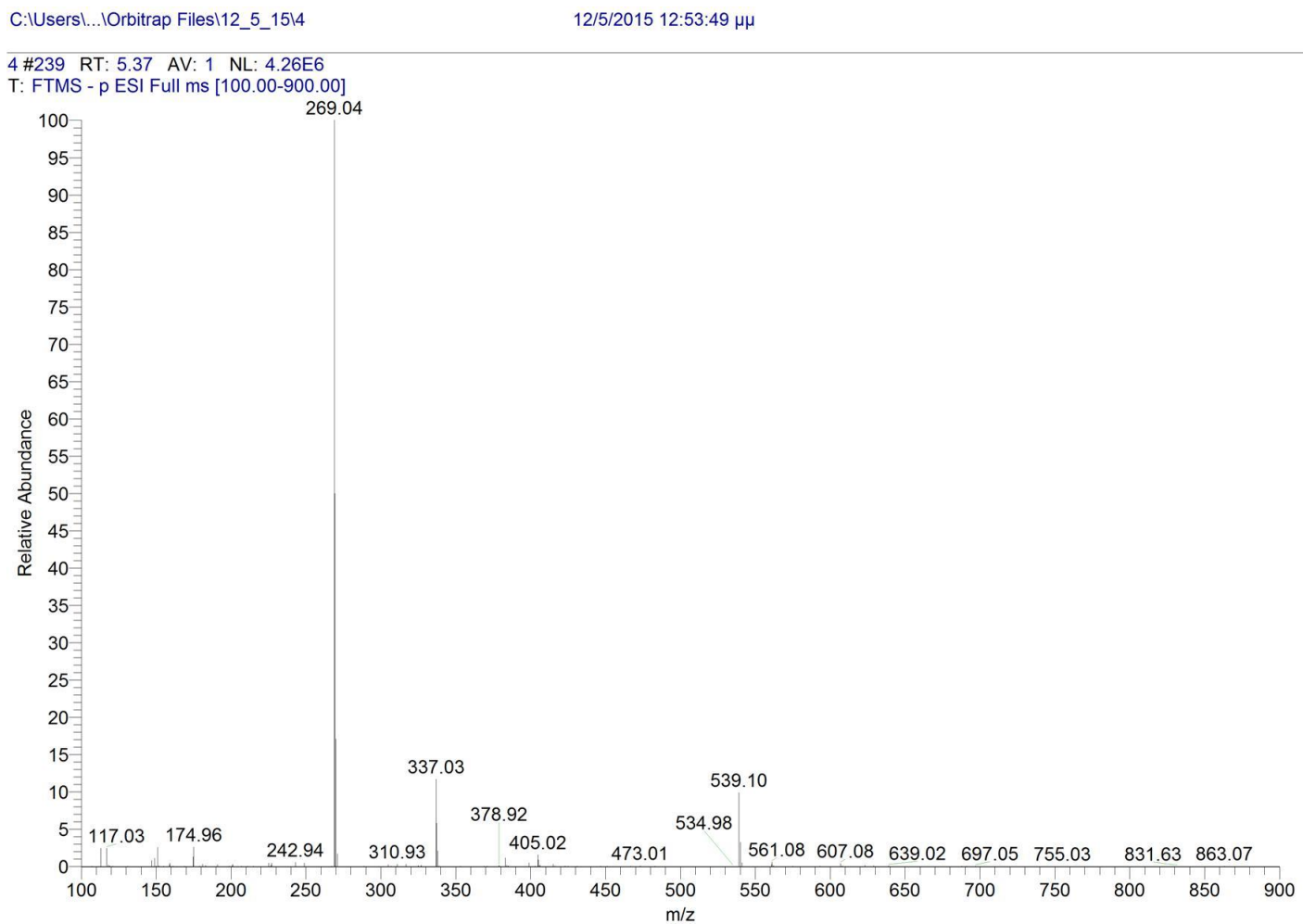
7 #185 RT: 4.15 AV: 1 NL: 7.09E5
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-900.00]



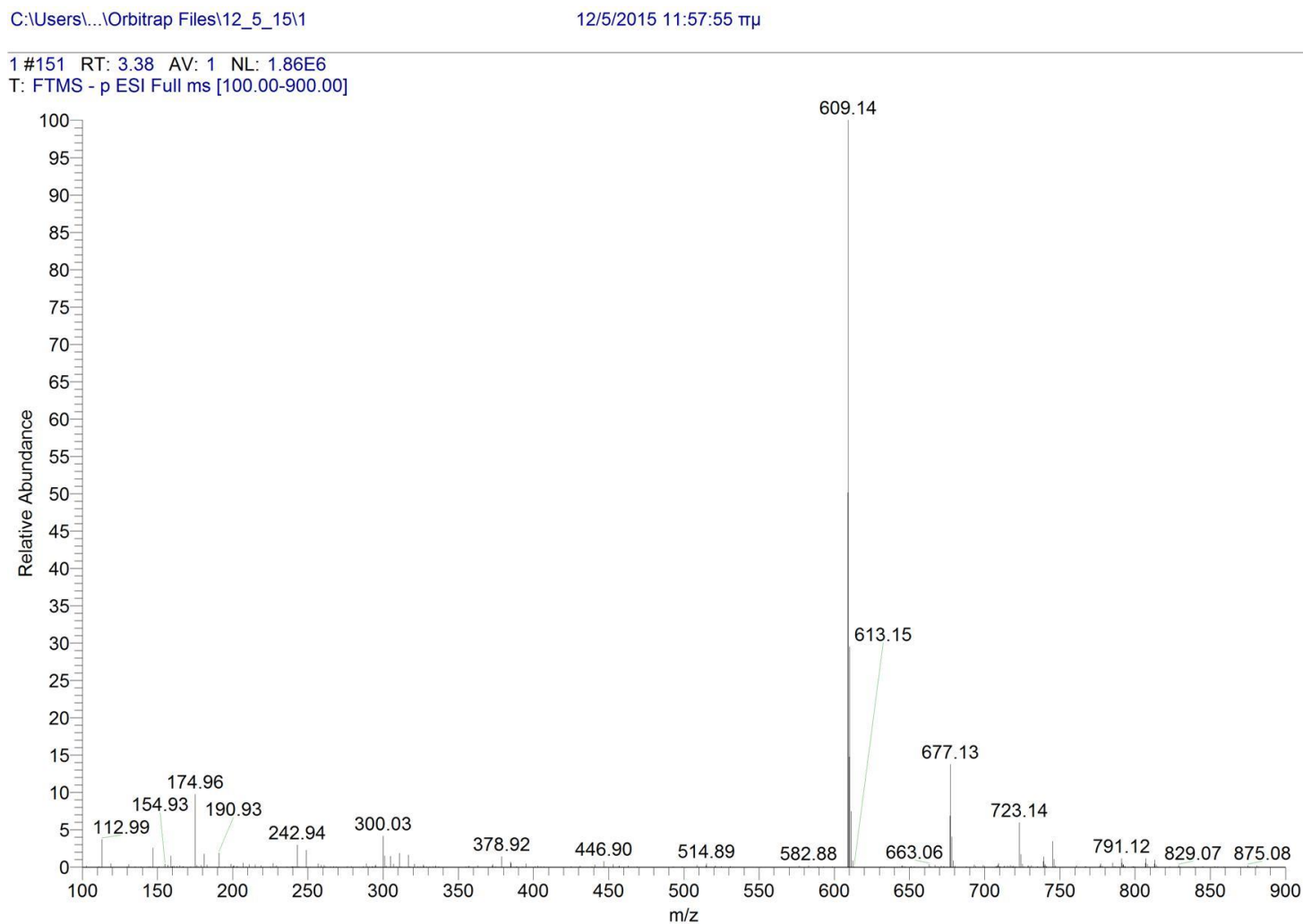
Σχήμα 7.24: Φάσμα μάζας ροσμαρινικού οξέος



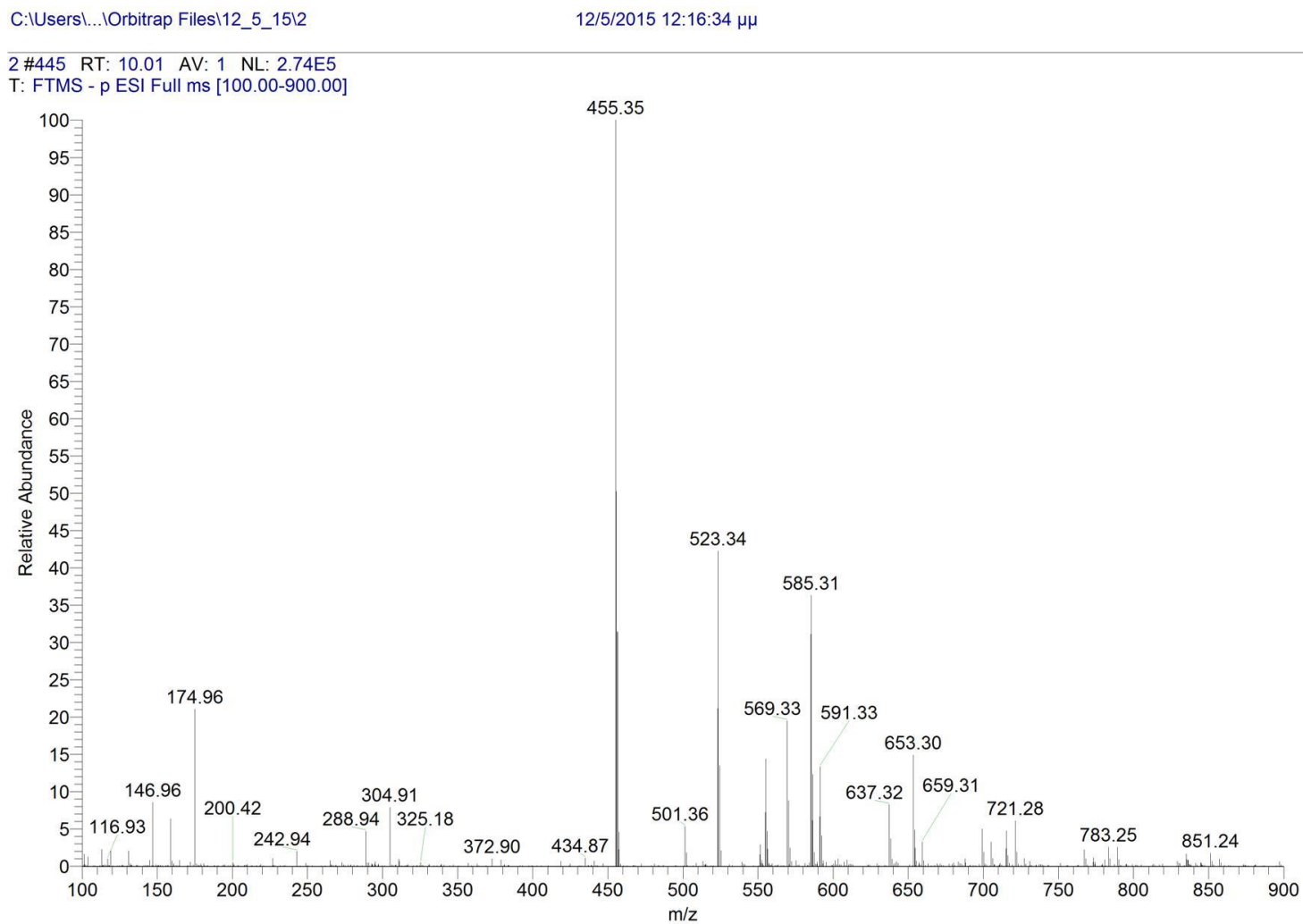
Σχήμα 7.25: Φάσμα μάζας luteolin



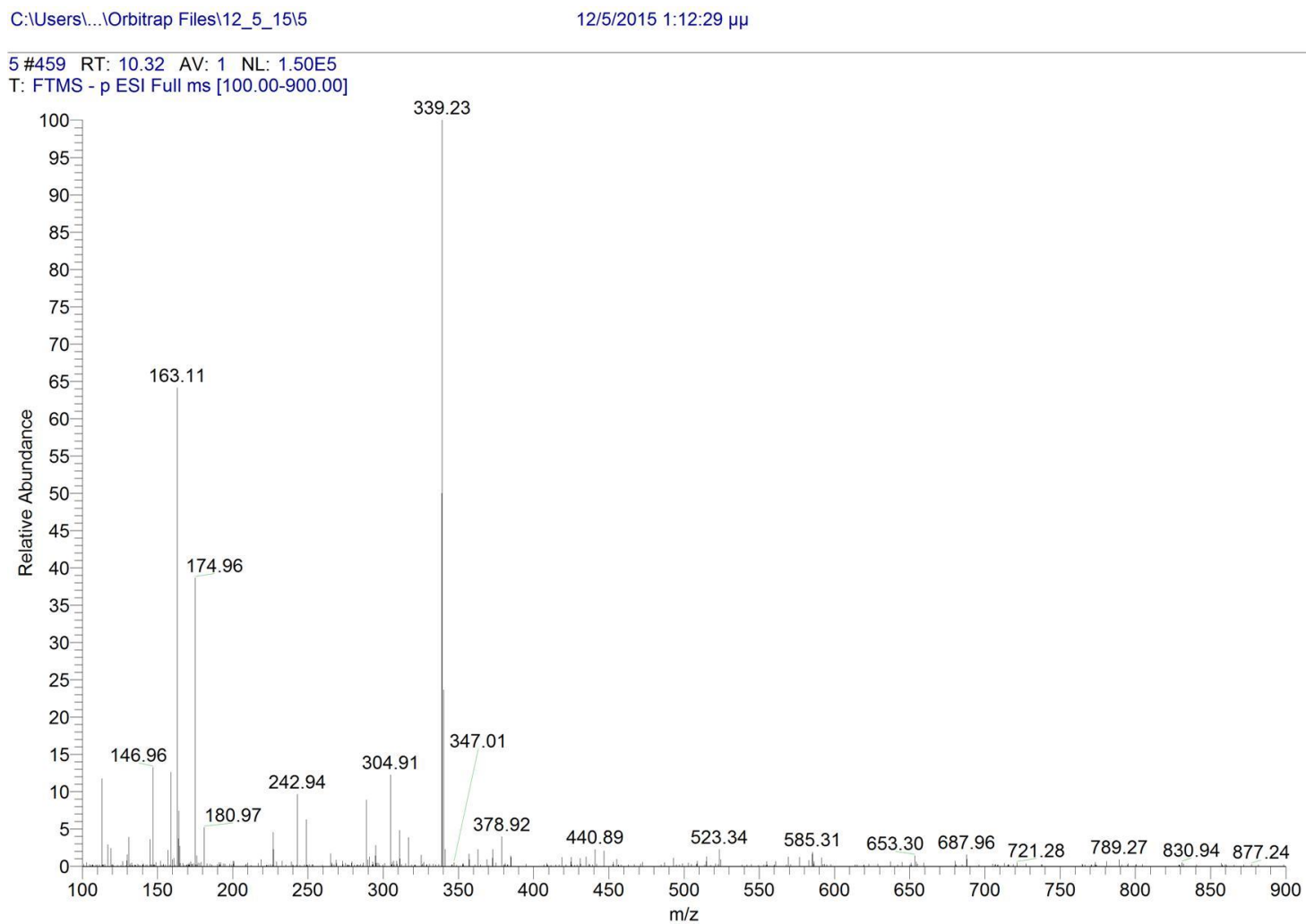
Σχήμα 7.26: Φάσμα μάζας arigenin



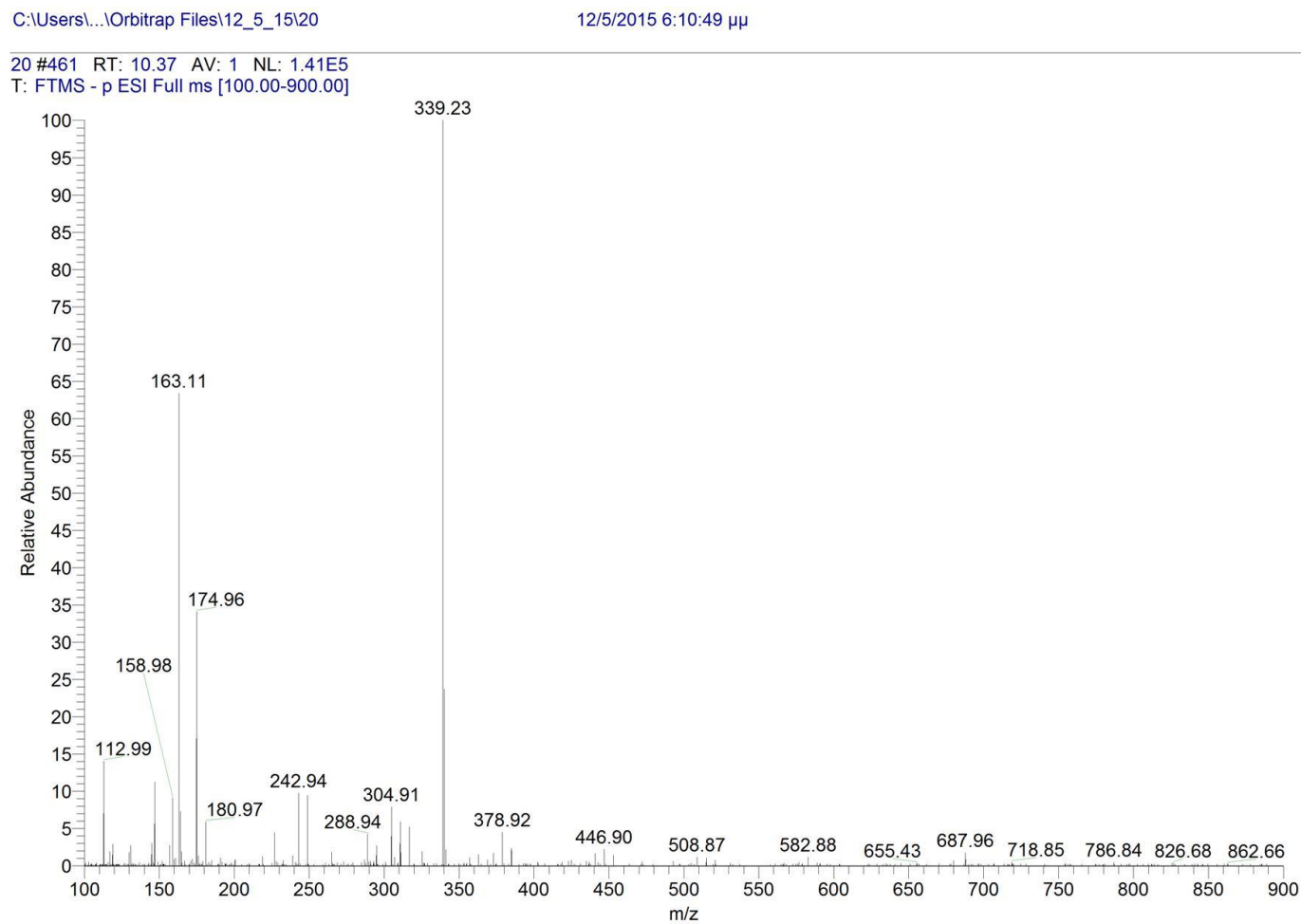
Σχήμα 7.27: Φάσμα μάζας rutin



Σχήμα 7.28: Φάσμα μάζας Betulinic acid



Σχήμα 7.29: Φάσμα μάζας oleanolic acid

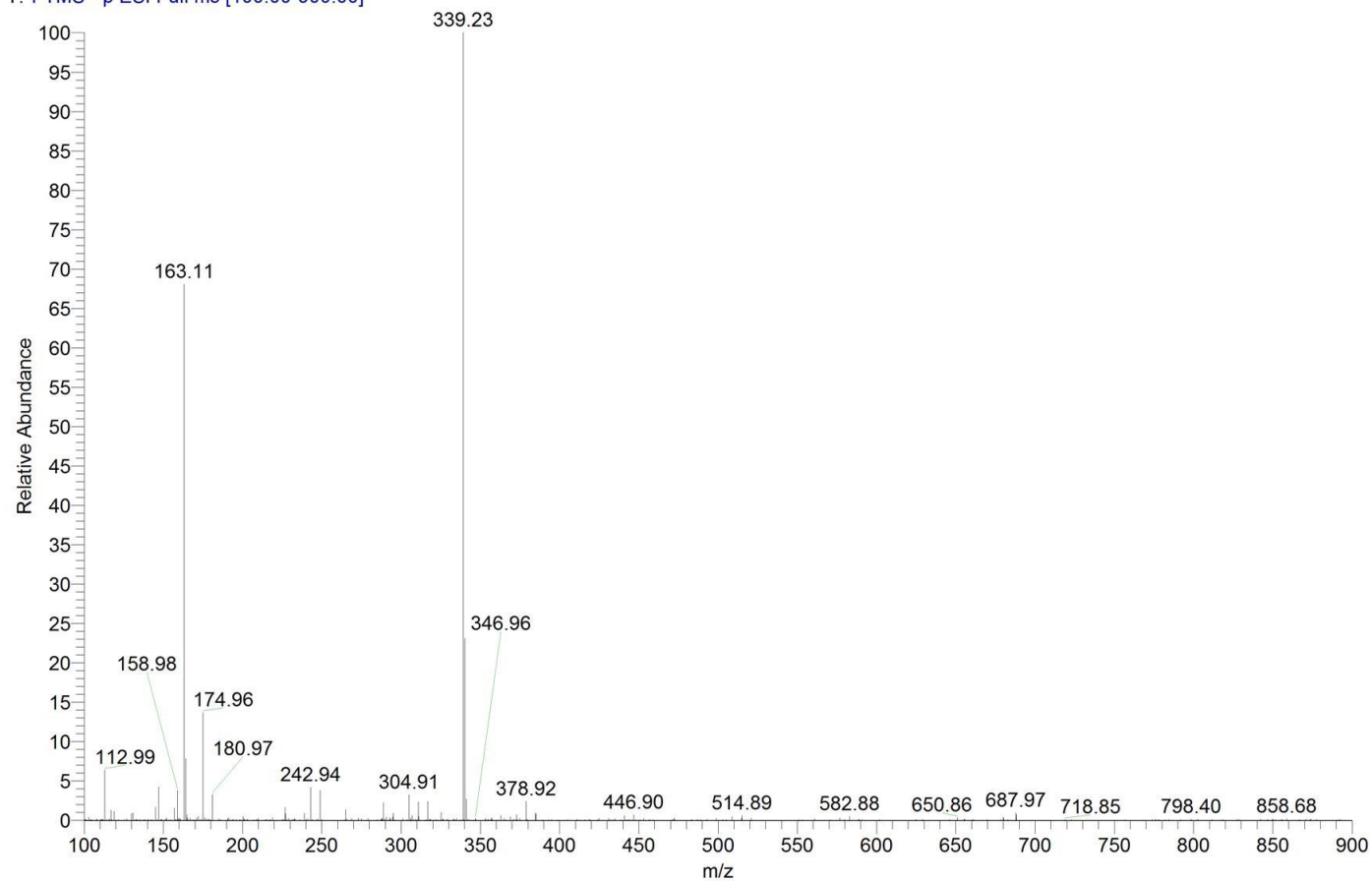


Σχήμα 7.30: Φάσμα μάζας eugenol

C:\Users\...\Orbitrap Files\12_5_15\18

12/5/2015 5:33:31 μμ

18 #461 RT: 10.36 AV: 1 NL: 2.82E5
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-900.00]

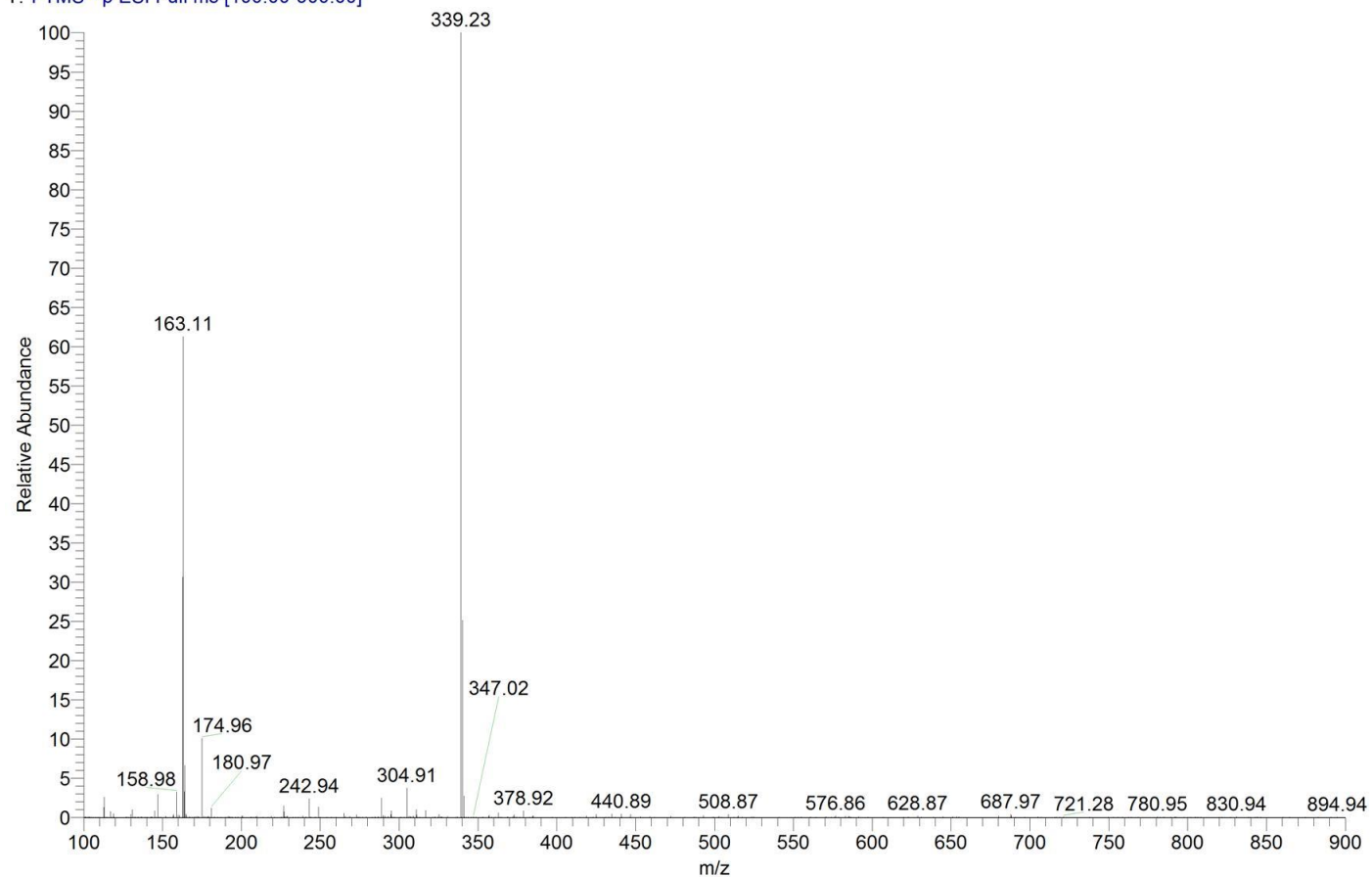


Σχήμα 7.31: Φάσμα μάζας isoeugenol

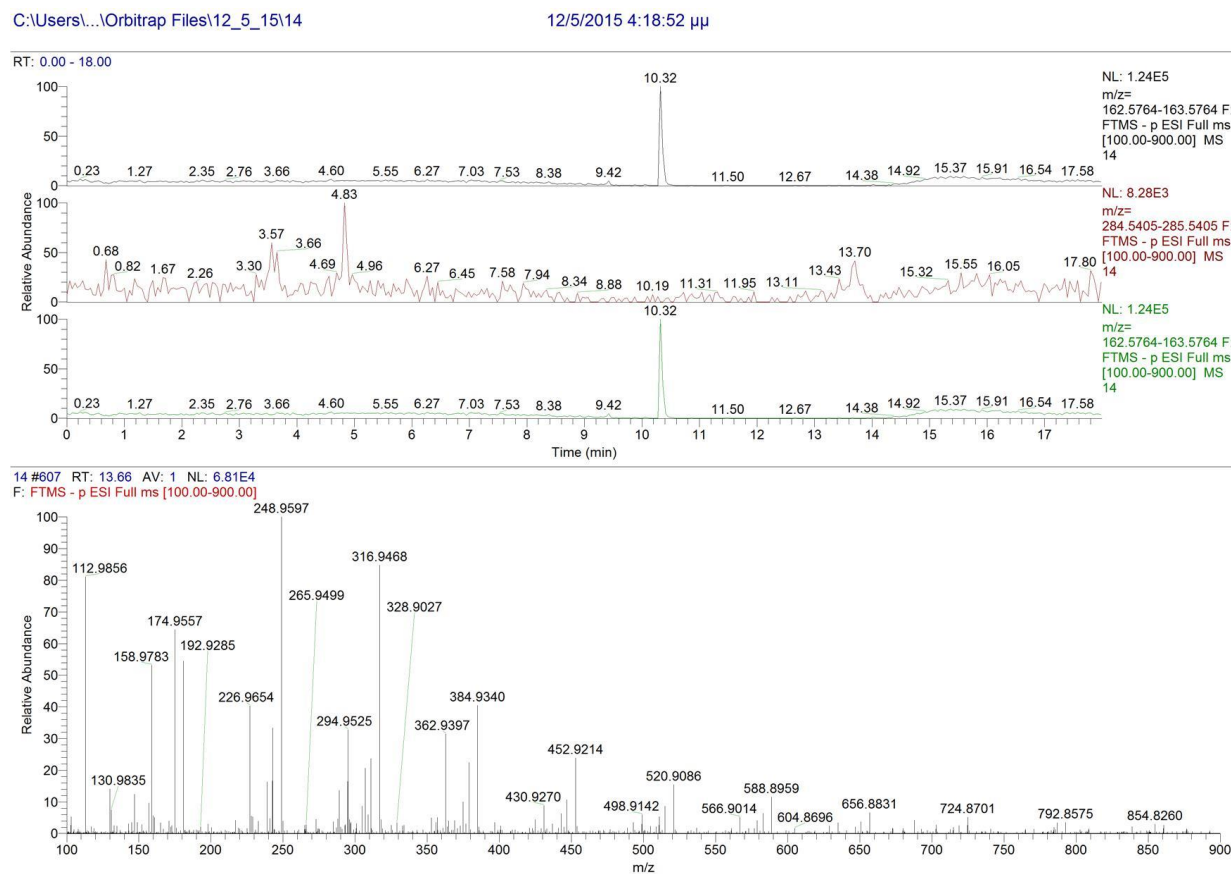
C:\Users\...\Orbitrap Files\12_5_15\3

12/5/2015 12:35:11 μμ

3 #461 RT: 10.37 AV: 1 NL: 5.66E5
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-900.00]



Σχήμα 7.32: Φάσμα μάζας Ursolic



Σχήμα 7.33: Τυπικό φάσμα MS εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε αιθανόλη και σύγκριση με τρεις πρότυπες ενώσεις όπως πραγματοποιείται με το λογισμικό Xcalibur 2.1.0 Thermo Scientific.

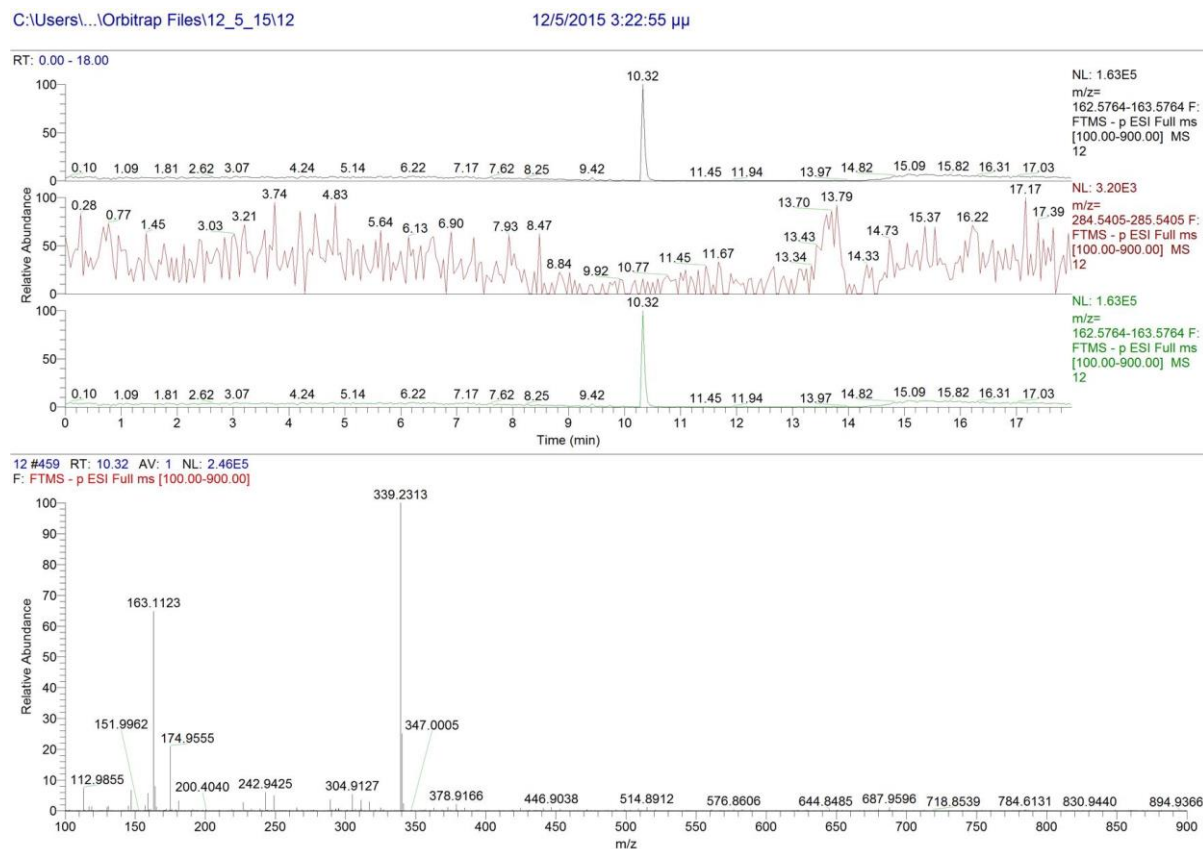
Στα εκχυλίσματα των φύλλων της μαντζουράνας ανιχνεύθηκαν όλες οι πρότυπες ουσίες. Όπως και στην περίπτωση του δενδρολίβανου παρατηρούμε τη σημαντική επίδραση του διαλύτη στην ανίχνευση ή όχι ενός συστατικού. Στον πίνακα αναφέρονται οι χρόνοι κατακράτησης των αντίστοιχων ενώσεων όπως ανιχνεύθηκαν με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Πίνακας 7.15: Αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας και HPLC για τα πρότυπα και τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα ματζουράνας

	Compound	RT (min)	[M-H] (m/z) (θεωρητικό)	Acc. Mass (πειραματικό)	Σφάλμα (ppm)	MS ² [M-H] (m/z) (%)	Διαλύτες εκχύλισης	HPLC
1	Caffeic acid	2.62	179.16	179.0368	6.2897	135.05 (100)	(a,b,d)	
2	Rosmarinic acid	4.15	359.32	359.0808	6.2927	161.02 (100) 197.05 (29)	(a,b,d)	
3	Luteolin	4.83	285.24	284.5405	24.1161	285.04 (100) 286.04 (47)	(a,c)	15.029 (a)
4	Apigenin	5.37	269.24	269.0428	6.9146	285.04 (100) 225.06 (27)	(a,b,c,d)	54.0 (a, b, c, d)
5	Rutin	6.27	609.52	609.1489	5.9172	174.96 (100)	(a,b)	
6	Betulinic acid	10.01	455.71	455.3485	7.5463	158.98 (100)	(a,b)	
7	Oleanolic acid	10.19	455.71	455.3576	7.3466			
8	Eugenol	10.37	163.20	162.5764	37.7920		(a,b,d)	
9	Isoeugenol	10.36	163.20	162.5764	37.7920	163.11 (100)	(a,b,d)	
10	Ursolic acid	10.41	455.71	455.3484	7.5485	158.98 (100)	(a,b)	
11	Arbutin	13.99	271.25	271.9606	26.4449	195.98 (100) 228.97 (27)	(d)	3.475 (a, b, c, d)
12	Chlorogenic acid	8.22	353.31	353.2934	0.2089	163.65 (100) 244.67 (88)	(a,b)	18.382 (a, b)

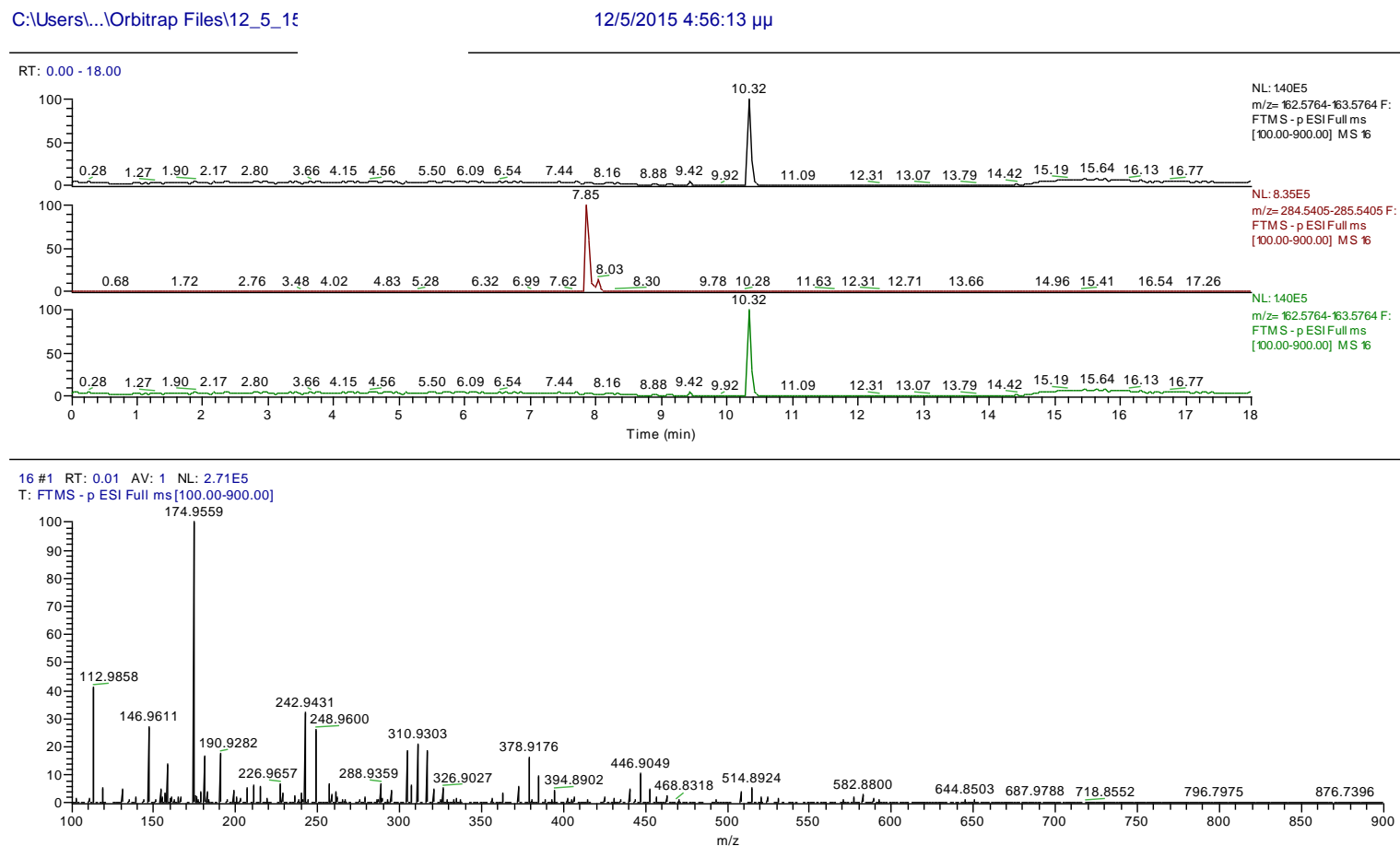
13	Quercetin	6.87	301.24	301.9103	22.6586	174.9 (100)	(a,b)	26.235 (a)
14	Ferulic acid	17.05	193.18	193.9389	39.4894	146.94 (100)	(a)	28.609 (a)
15	Carnosic acid	10.38	331.44	330.8578	17.1435	163.11 (100)	(a)	32.702 (a)
16	Cinnamic acid	10.02	147.16	146.9643	12.6659	118.97 (100)	(a)	38.142 (a) 38.2 (d)

a:αιθανόλη, b:Εξάνιο, c:Νερό, d:Διγλωρομεθάνιο



Σχήμα 7.34: Τυπικό φάσμα MS εκχυλίσματος μαντζουράνας σε αιθανόλη και σύγκριση με τρεις πρότυπες ενώσεις όπως πραγματοποιείται με το λογισμικό Xcalibur 2.1.0 Thermo Scientific

Με βάση το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στα προηγούμενα ακολούθησε ανάλυση των συστατικών του εκχύλισματος βασιλικού με βάση τις πρότυπες ενώσεις που μετρήθηκαν και της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Ο χαρακτηρισμός των υπολοίπων (πλην των προτύπων) ιόντων έγινε με βάση τη βιβλιογραφία για την χημική σύσταση των φύλλων του συγκεκριμένου είδους βασιλικού. Το betulinic acid βρίσκεται στα φύλλα του *Ocimum basilicum* [43] και μάλιστα σε ιδιαίτερα μεγάλη συγκέντρωση σε σχέση με άλλα είδη, *Ocimum kilimandscharicum*, *Ocimum sanctum excluding Ocimum grattissimum* [44]. Η απιγενίνη και η λουτεολίνη βρίσκονται τόσο στο πρωτογενές υλικό όσο και στο εκχύλισμα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από το καφεϊκό οξύ αλλά σε μικρότερη από το ροσμαρινικό οξύ [45][46]. Ανάλυση δειγμάτων με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (Flow Injection Analysis, FIA) έδειξε επίσης ότι το ουρσολικό οξύ υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση [47] αν και στην παρούσα μελέτη εντοπίζεται μόνο στο εκχύλισμα αιθανόλης το οποίο και φαίνεται το καταλληλότερο για την ανίχνευση των περισσοτέρων συστατικών με εξαίρεση την ρουτίνη και την λουτεολίνη που ανιχνεύονται μόνο σε διχλωρομεθάνιο.



Σχήμα 7.35: Τυπικό φάσμα MS εκχλίσματος βασιλικού σε αιθανόλη και σύγκριση με τρεις πρότυπες ενώσεις όπως πραγματοποιείται με το λογισμικό Xcalibur 2.1.0 Thermo Scientific

Πίνακας 7.16: Αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας και HPLC για τα πρότυπα και τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα του βασιλικού

	Compound	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z) (θεωρητικό)	Acc. Mass (πειραματικό)	Σφάλμα (ppm)	MS ² [M-H] (m/z) (%)	Διαλύτες εκχύλισης	HPLC
1	Caffeic acid	2.62	179.1495	179.0368	6.2897	135.05 (100)	(a,b,c,d)	2.55 (a)
2	Rosmarinic acid	4.15	359.3069	359.0808	6.2927	161.02 (100) 197.05 (29)	(a,b,c,d)	5.48 (a)
3	Luteolin	4.83	285.2284	284.5405	24.1161	285.04 (100) 286.04 (47)	(d)	
4	Apigenin	5.37	269.2290	269.0428	6.9146	285.04 (100) 225.06 (27)	(b,c,d)	
5	Rutin	6.27	609.5096	609.1489	5.9172	174.96 (100)	(d)	
6	Betulinic acid	10.01	455.6924	455.3485	7.5463	158.98 (100)	(a,c)	
7	Oleanolic acid	10.19	455.6924	455.3576	7.3466			

8	Eugenol	10.37	163.1931	162.5764	37.7920		(a,c,d)	11.8 (a)
9	Isoeugenol	10.36	163.1931	162.5764	37.7920	163.11 (100)	(a,c,d)	12.4 (a)
10	Ursolic acid	10.41	455.6924	455.3484	7.5485	158.98 (100)	(a)	

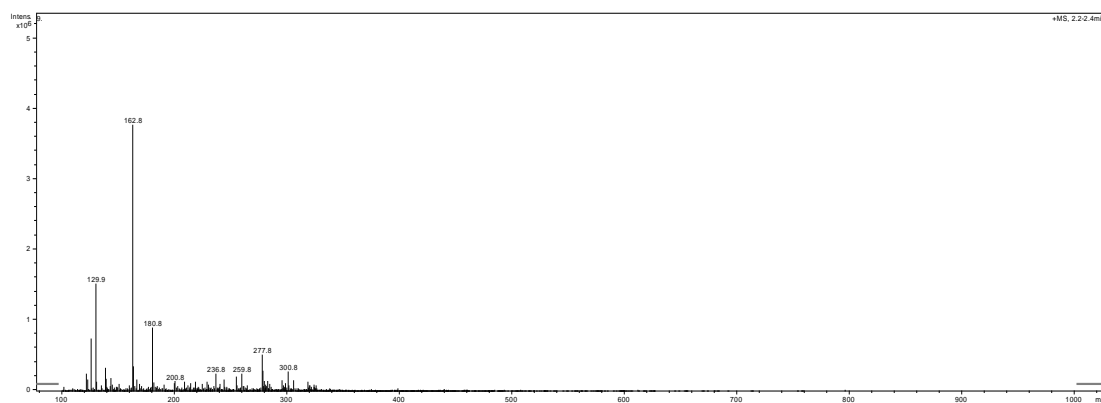
a:αιθανόλη, b:Εξάνιο, c:Νερό, d:Διγλωρομεθάνιο

7.6. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζων με ήλεκτρο-ψεκασμό (ESI-MS)

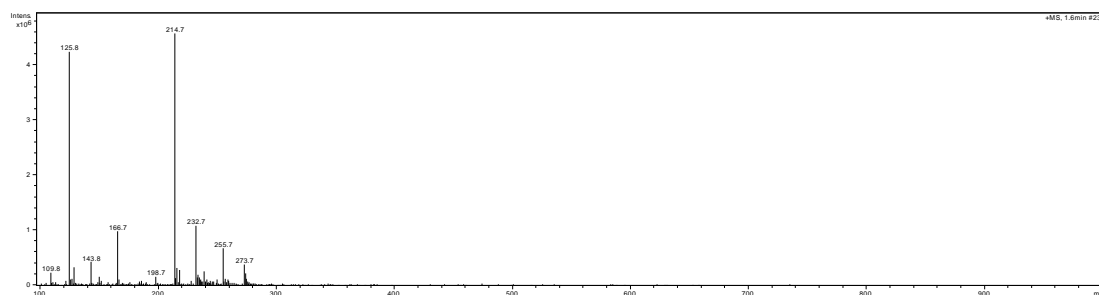
Οι κορυφές των φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος του βασιλικού και του αιθέριου ελαίου ταυτοποιήθηκαν και με πειραματικά δεδομένα ESI-MS. Στον πίνακα 18 φαίνονται τα ιόντα ($[M + H]^+$) που ανιχνεύτηκαν.

Πίνακας 7.17. Πρότυπες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με ESI-MS

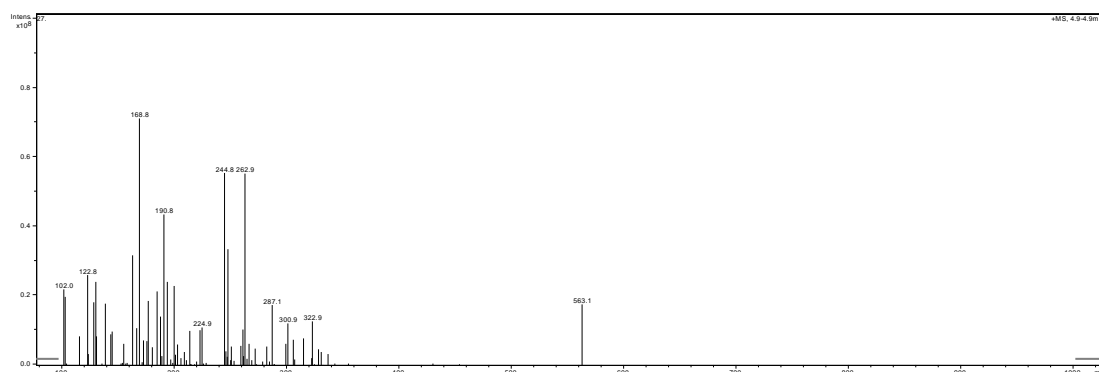
Ένωση	Rt (min)	$[M + H]^+$	Ιόντα (positive mode)	Σχήμα
Καφεϊκό οξύ	2.45	181.17	163, 130	36
Ροσμαρινικό οξύ	2.22	361.32	135, 198	37
Ευγενόλη	4.90	165.21	123, 191, 245, 263	38
Ισοευγενόλη	3.63	165.21	295, 327, 349	39



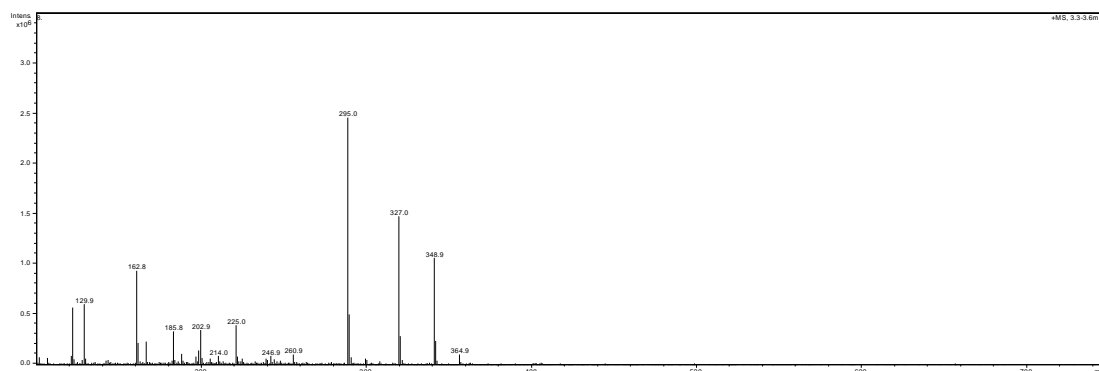
Σχήμα 7.36: ESI-MS καφεϊκού οξέος



Σχήμα 7.37: ESI-MS ροσμαρινικού οξέος



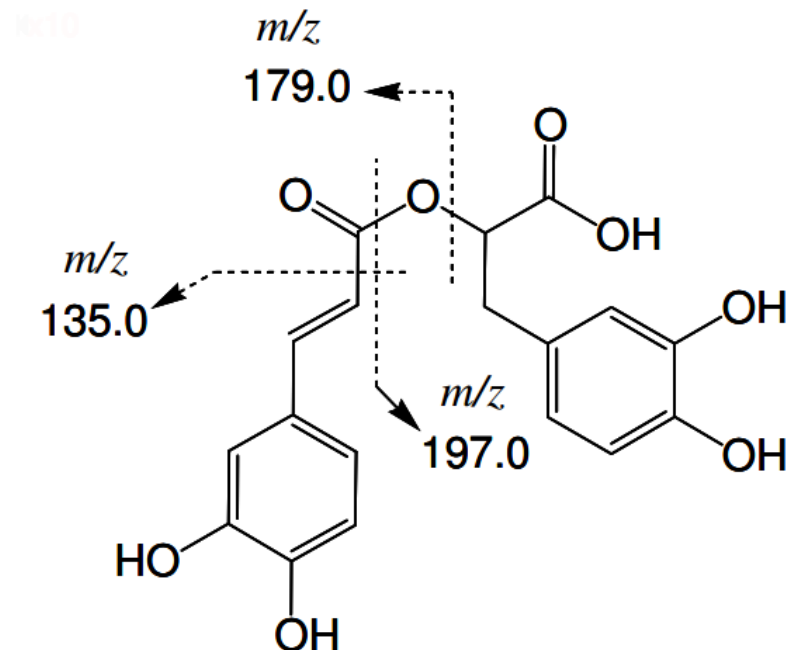
Σχήμα 7.38: ESI-MS ευγενόλης



Σχήμα 7.39: ESI-MS ισοευγενόλης

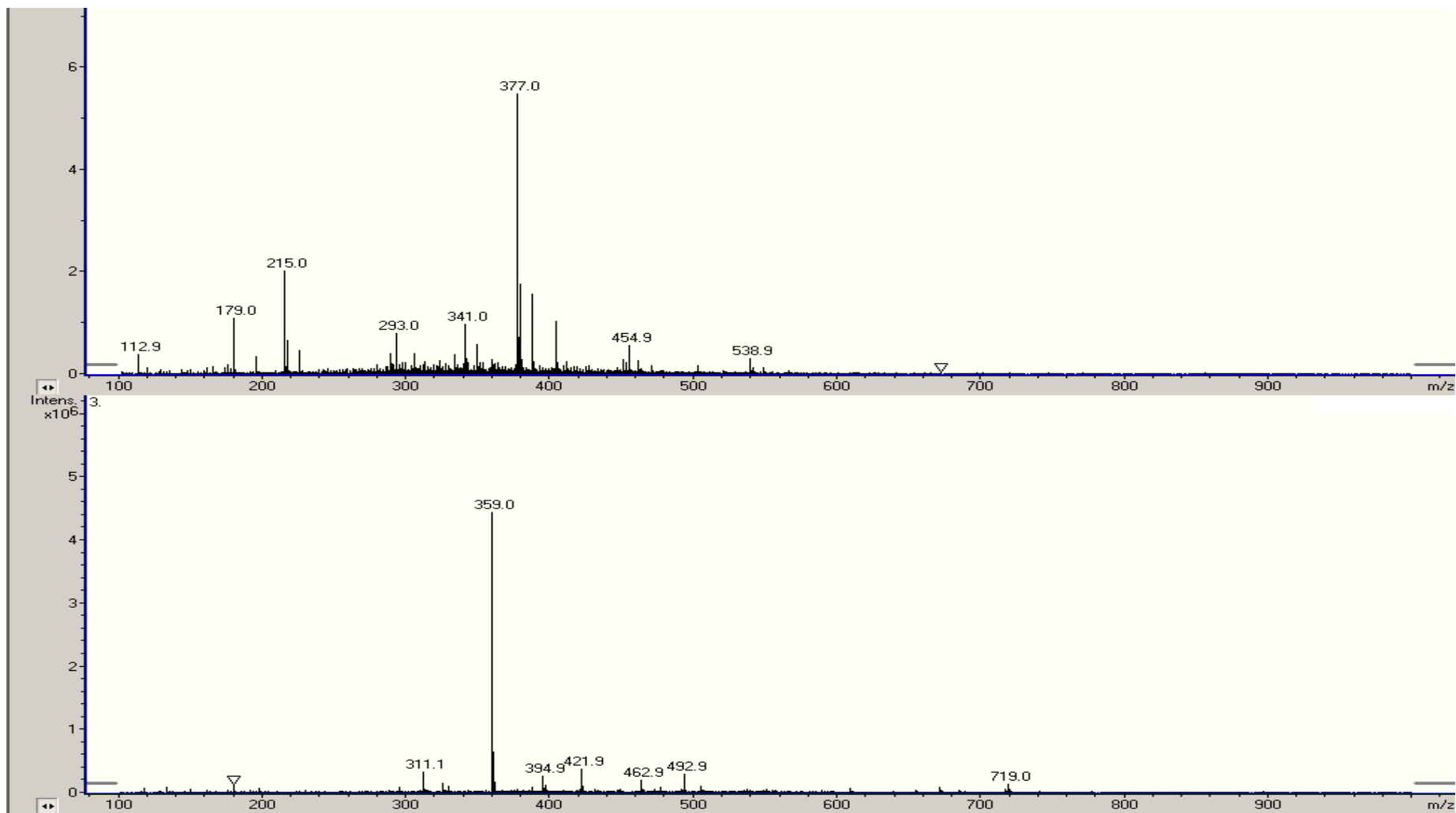
Το πρότυπο δείγμα της λιναλοόλης δεν κατέστη δυνατό να μελετηθεί καθώς φάνηκε ότι είχε υποστεί επιμόλυνση ή (φωτο)διάσπαση. Στο πρότυπο του ροσμαρινικού οξέος παρατηρούμε διάφορα θραύσματα που προέρχονται από την υδρόλυση του

μορίου [48] (σχήμα 41) όπου το ιόν ($[M-H]^-$ 214 m/z) αντιστοιχεί στο ενυδατωμένο 2-υδρόξο παράγωγο (197 m/z).

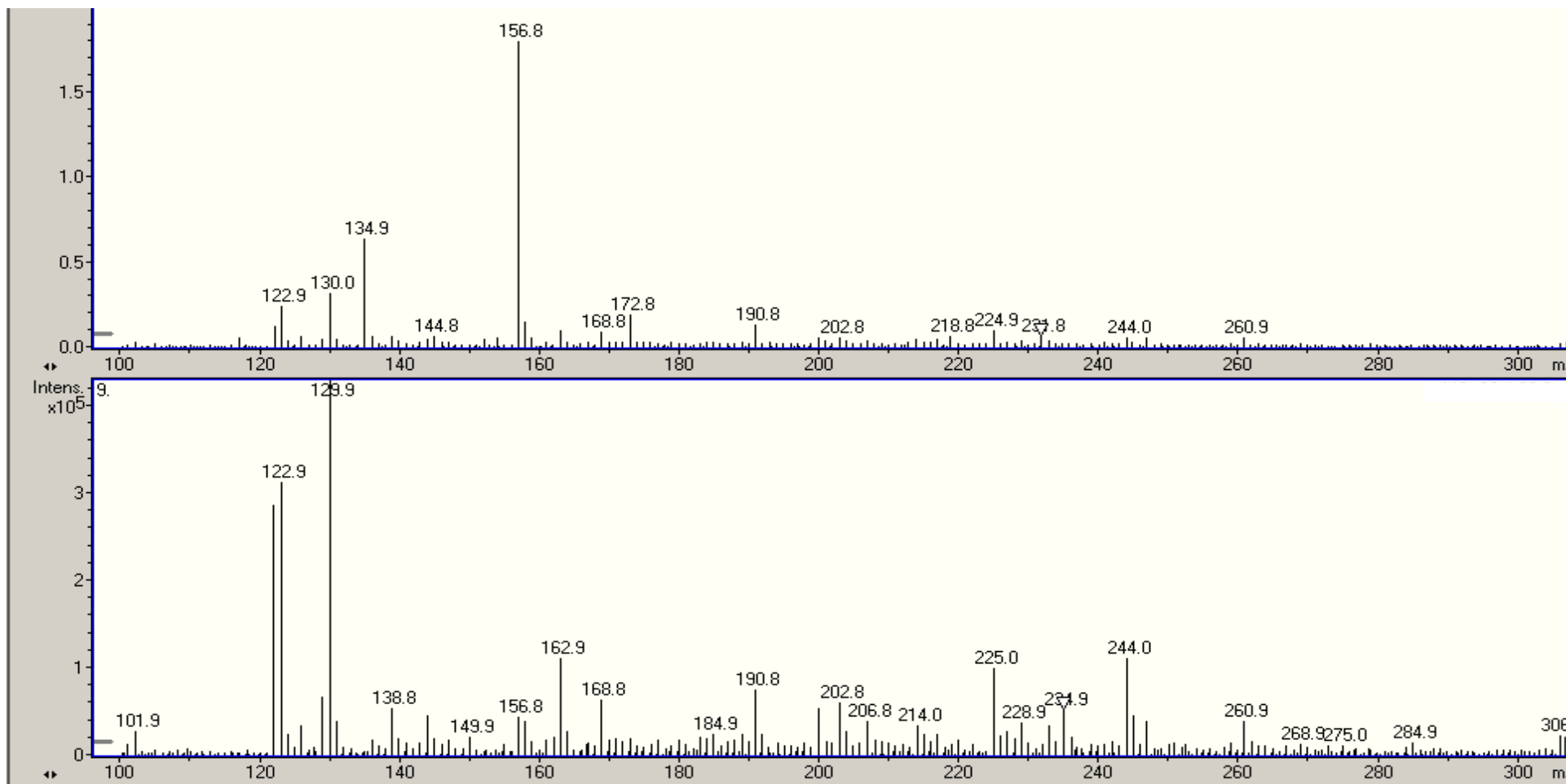


Σχήμα 7.40: Πιθανά θραύσματα του ροσμαρινικού οξέος

Στα σχήματα 7.41 και 7.42 φαίνονται τα φάσματα μαζών των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν, οι οποίες ήταν για το εκχύλισμα του βασιλικού: καφεϊκό οξύ ($[M-H]^-$ 179 m/z) και ροσμαρινικό οξύ ($[M-H]^-$ 359 m/z), ενώ για το αιθέριο έλαιο: linalool ($[M+H]^+$ 157 m/z) και ισοευγενόλη ($[M+H]^+$ 163 m/z).



Σχήμα 7.41: Φάσμα ESI-MS εκχυλίσματος φύλων βασιλικού



Σχήμα 7.42: Φάσμα ESI-MS αιθέριου ελαίου βασιλικού

7.7. Αντικαρκινικά πειράματα (*in vitro*)

Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας *in vitro* φαίνονται στον Πίνακα 7.18 και εκφράζονται με τον δείκτη IC_{50} που ορίζεται ως η ποσότητα μιας ένωσης (σε $\mu\text{g} / \text{mL}$) που απαιτείται για την αναστολή κυτταρικής επιβίωσης κατά 50 % , σε σύγκριση με τον έλεγχο προτύπου. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν HeLa (κύτταρα τραχήλου μήτρας), A549 (ανθρώπινα επιθηλιακά βασικοκυτταρικά) και LS174 (ανθρώπινα κύτταρα εντέρου) και συγκρίθηκαν με τη σειρά MRC5 (φυσιολογικά κύτταρα ανθρώπινου ιστού πνεύμονα) ώστε να διαπιστωθεί τυχόν επιλεκτική δράση.

Πίνακας 7.18: Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g}/\text{ml}$) των εκχυλισμάτων που προκάλεσαν μια μείωση 50 % σε HeLa, A549 και LS174 κακοήθη κύτταρα και MRC5 φυσιολογικά κύτταρα. Τα εκχυλίσματα επώαστηκαν με κύτταρα για 72 h

Ένωση	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)*			
	HeLa	A549	LS174	MRC5
εκχύλισμα δεντρολίβανου σε διχλωρομεθάνιο	20 ± 0	56 ± 1	67 ± 2	62 ± 0
εκχύλισμα δεντρολίβανου σε αιθανόλη	>200	>200	>200	>200
εκχύλισμα δεντρολίβανου σε νερό	15 ± 1	22 ± 1	64 ± 2	33 ± 0
cisplatin	0.7 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	15 ± 0

*Οι τιμές IC_{50} εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD και προσδιορίζεται από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα του δεντρολίβανου σε αιθανόλη επιδεικνύει πολύ φτωχή κυτταροτοξική δράση εναντίον όλων των καρκινικών κυτταρικών γραμμών. Αντίθετα σε διχλωρομεθάνιο και νερό επιδεικνύει σχετική κυτταροτοξική δράση *in vitro* εναντίον όλων των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν αλλά σε κάθε περίπτωση μικρότερη από αυτή του cisplatin όπως και είναι αναμενόμενο. Ειδικότερα, τα εκχυλίσματα δείχνουν μη επιλεκτική δραστικότητα αναστέλλοντας καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα σε ίδια τάξη μεγέθους. Αντίθετα το cisplatin ειδικά για τα καρκινικά κύτταρα HeLa εμφανίζει 18 φορές μεγαλύτερη δράση σε σχέση με τα φυσιολογικά MRC5. Τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν ότι ο διαλύτης του εκχυλίσματος είναι πολύ σημαντικός για την όποια πιθανή φαρμακευτική δράση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την περιεκτικότητα σε φαινολικά και φλαβονοειδή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένα φυτοχημικά παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση ενώ ο συνδυασμός τους με άλλες (όπως συμβαίνει στα διαλύματα αιθανόλης) είναι επιβαρυντικός παράγοντας ελαχιστοποιώντας της όποια δράση. Επομένως παρατηρούμε ότι τα υδατικά διαλύματα είναι και τα πιο κυτταροτοξικά. Ειδικά για την περίπτωση του υδατικού διαλύματος παρατηρούμε στον Πίνακα 8 ότι τα φυτοχημικά που εντοπίζονται με τις τεχνικές HPLC και LC/MS στο υδατικό διάλυμα είναι Luteolin, Apigenin, Betulinic acid, Isoeugenol, Tectochrysin, Cirsimaritin, Genkwanin και Quinic acid. Όλες αυτές οι ενώσεις αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως κυτταροτοξικές σε *in vitro* μελέτες. Η λουτεολίνη έχει βρεθεί ότι αποτελεί από τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή με αντικαρκινική δράση. Βρέθηκε ότι συμβάλλει στην απόπτωση των κυττάρων HTC-15 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα εντέρου) [49], εναντίον καρκινικών σειρών κυττάρων του πνεύμονα (H292) και του πλακώδους καρκινώματος του δέρματος (Tu212) [50] και εναντίον κυτταρικών σειρών καρκίνου του στήθους (MDA-MB-231) [51]. Αντίστοιχα η απιγενίνη προτάθηκε ότι αναστέλλει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων [52] ώστε να μην μπορούν να «εισβάλλουν» σε υγιείς ιστούς [53]. Το φλαβονοειδές Tectochrysin αναφέρθηκε ότι είναι εκλεκτικός αναστολέας της πρωτεΐνης ABCG2 που υπερκεφράζεται στα καρκινικά κύτταρα [54]. Το φλαβονοειδές Cirsimaritin βρέθηκε ότι είναι ανταγωνιστής της αδενοσίνης σε μελέτες με τρωκτικά [55] ενώ το Quinic acid αναστέλλει πυρηνικό ρυθμιστικό παράγοντα NF-κΒ [56]. Το betulinic acid βρέθηκε ότι είναι ίσως το πιο σημαντικό τερπένιο εναντίον πλειάδας κυτταρικών σειρών [57][58].

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας *in vitro* για την μαντζουράνα για τις ίδιες κυτταρικές σειρές φαίνονται στον Πίνακα 7.18 και συγκρίνονται με την ευρέως χρησιμοποιούμενη σύμπλοκη ένωση του λευκοχρύσου cisplatin.

Πίνακας 7.19: Συγκεντρώσεις (μg / ml) των εκχυλισμάτων που προκάλεσαν μια μείωση 50 % σε HeLa, A549 και LS174 κακοήθη κύτταρα και MRC5 φυσιολογικά κύτταρα. Τα εκχυλίσματα επώαστηκαν με κύτταρα για 72 h

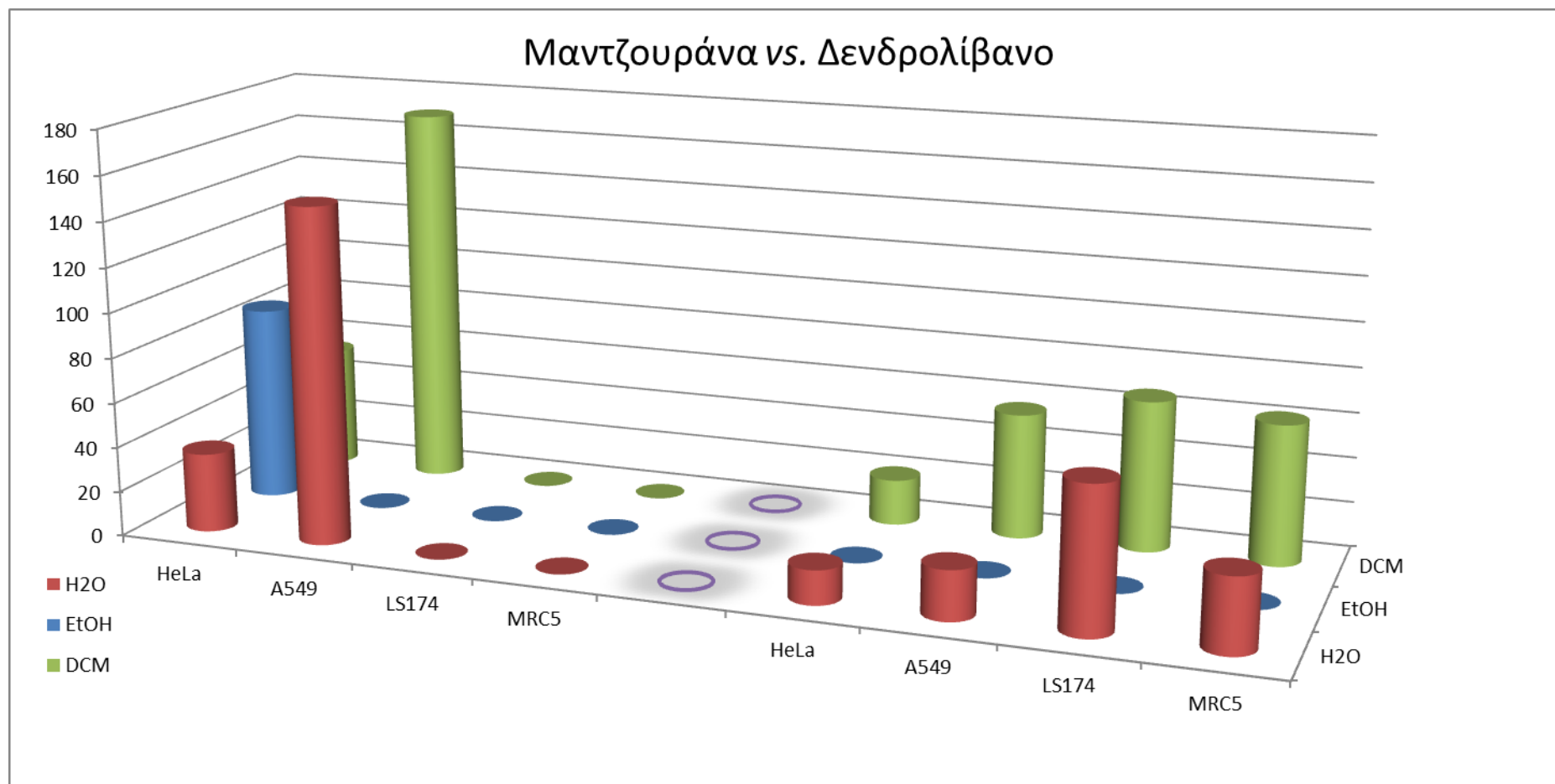
Ένωση	IC ₅₀ (μg/ml)*			
	HeLa	A549	LS174	MRC5
εκχύλισμα μαντζουράνας σε διχλωρομεθάνιο	54 ± 1	170 ± 4	>200	>200
εκχύλισμα μαντζουράνας σε αιθανόλη	87 ± 2	>200	>200	>200
υδατικό εκχύλισμα μαντζουράνας	35 ± 1	149 ± 2	>200	>200
cisplatin	1 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	15 ± 0

*Οι τιμές IC₅₀ εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD και προσδιορίζεται από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα της μαντζουράνας σε όλους τους διαλύτες που δοκιμάστηκε (διχλωρομεθάνιο, αιθανόλη και νερό) είναι επιλεκτικό *in vitro* εναντίον της κυτταρικής σειράς HeLa σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα MRC5 και είναι 73, 117 και 45 φορές λιγότερο κυτταροτοξικό σε σχέση με το cisplatin. Σε διάλυμα διχλωρομεθανίου και νερού είναι επίσης επιλεκτικό εναντίον των A549 και περίπου 50 φορές λιγότερο κυτταροτοξικό σε σχέση με το cisplatin. Δεν υπάρχει

δραστικότητα εναντίον των κυττάρων LS174 (αδενοκαρκίνωμα εντέρου). Όπως και στην περίπτωση του δενδρολίβανου, ο διαλύτης φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξικότητα *in vitro* με τα εκχυλίσματα σε αιθανόλη να παρουσιάζουν τις μικρότερες τιμές IC50. Σε μια πρόσφατη δημοσίευση [59], οι Erenler et al., κατέληξαν σε ανάλογο συμπέρασμα ότι δηλαδή το αιθανολικό εκχύλισμα φύλλων της ματζουράνας είναι λιγότερο αποτελεσματικό εναντίον των καρκινικών κυττάρων C6 (εγκέφαλος αρουραίων) σε σχέση με το αντίστοιχο εκχύλισμα σε μη πολικούς διαλύτες ενώ σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 30 µg/ml δεν έχει καμία δράση όταν το αντίστοιχο εκχύλισμα σε εξάνιο επιτυγχάνει 50% απόπτωση. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία ότι η βιολογική δράση *in vitro* των εκχυλισμάτων της ματζουράνας είναι εξαρτόμενο της δόσης [60].

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η σύγκριση με τα αποτελέσματα αντίστοιχων κυτταρικών σειρών για το δενδρολίβανο.



Σχήμα 7.43: IC₅₀ εκχυλισμάτων μαντζουράνας και δενδρολίβανου σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης. Μικρότερες τιμές υποδηλώνουν μεγαλύτερη δράση. Μηδενικές τιμές (κυκλικοί δίσκοι) αντιπροσωπεύουν IC₅₀ > 200 mg/ml.

Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του δενδρολίβανου παρατηρούμε τα διαλύματα σε νερό και διχλωρομεθάνιο ακολουθούν την ίδια τάση κυτταροτοξικότητας. Αυτό πιθανά υποδηλώνει ότι οι ίδιες ενώσεις είναι υπεύθυνες για την δραστικότητα *in vitro* αφού εκφράζονται στους ίδιους διαλύτες σε διαφορετική περιεκτικότητα (μεγαλύτερη στο δενδρολίβανο). Το αιθανολικό εκχύλισμα της ματζουράνας παρουσιάζει μόνο σε μια περίπτωση κυτταροτοξική δράση ενάντια στα κύτταρα HeLa.

Το εκχύλισμα του βασιλικού δοκιμάστηκε *in vitro* ενάντια στις καρκινικές σειρές HeLa, FemX, K562 και SKOV3 και συγκρίθηκε την αντικαρκινική δράση πρότυπων ενώσεων.

Πίνακας 7.20: Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g} / \text{ml}$) των εκχυλισμάτων που προκάλεσαν μια μείωση 50 % σε HeLa, FemX, K562 και SKOV3 κακοήθη κύτταρα. Τα εκχυλίσματα επώαστηκαν με κύτταρα για 72 h

Ένωση	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)*			
	HeLa	FemX	K562	SKOV3
Eugenol	16 ± 3	>200	10 ± 3	28 ± 1
Isoeugenol	14 ± 0	16 ± 1	8 ± 0	23 ± 1
Linalool	>200	>200	>200	24 ± 3
Caffeic acid	4 ± 0	5 ± 2	13 ± 0	5 ± 3
Rosmarinic acid	41 ± 1	53 ± 3	30 ± 1	59 ± 1
Sweet basil	165 ± 3	191 ± 2	157 ± 2	>200
Basil Essential Oil	86 ± 1	97 ± 1	160 ± 2	>200
Cis-platin	0.7 ± 0	1 ± 0	3 ± 0	10 ± 1

Από τα αποτελέσματα καταδεικνύεται ότι η ισοευγενόλη είναι 20 και 14 φορές λιγότερο κυτταροτοξική από το cisplatin έναντι των κυτταρικών γραμμών HeLa και Femx, ενώ είναι 2.8 και 2.4 φορές λιγότερο κυτταροτοξική από το cisplatin έναντι

των καρκινικών κυτταρικών γραμμών K562 και SKOV3, υποδεικνύοντας ισχυρή κυτταροτοξικότητα και αντικαρκινική δραστικότητα σε σύγκριση με το πρότυπο. Η ευγενόλη επιδεικνύει πολύ φτωχή κυτταροτοξική δράση εναντίον των καρκινικών κυτταρικών γραμμών FemX. Αντιθέτως είναι 23.9, 3.7 και 2.9 λιγότερο κυτταροτοξική από το cisplatin έναντι των HeLa, K562 and SKOV3 καρκινικών κυτταρικών γραμμών. Η linalool έχει επίσης πολύ φτωχή κυτταροτοξική δραστικότητα. Αντιθέτως, το καφεϊκό οξύ είναι στο ίδιο εύρος ή σε κάποιες περιπτώσεις καλύτερο σε σύγκριση με το cisplatin στις τέσσερις κυτταρικές σειρές. Το καφεϊκό οξύ είναι 6.1 και 4.5 φορές λιγότερο κυτταροτοξικό από το cisplatin έναντι των HeLa και FemX κυτταρικών σειρών, ενώ είναι 4.8 φορές λιγότερο κυτταροτοξικό από το cisplatin στην K562 κυτταρική καρκινική σειρά αλλά 2.0 φορές περισσότερο κυτταροτοξικό από το cisplatin έναντι της SKOV3 καρκινικής κυτταρικής γραμμής. Ισοευγενόλη, ευγενόλη, λιναλοόλη και καφεϊκό οξύ παρουσιάζουν υψηλή κυτταροτοξικότητα και αντικαρκινική δραστικότητα εναντίον της καρκινικής κυτταρικής σειράς ανθρώπινης ωοθήκης SKOV3. Δεδομένου ότι ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ο πιο θανατηφόρος γυναικολογικός καρκίνος στο δυτικό κόσμο και η τέταρτη συνηθέστερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, μετά του μαστού, του πνεύμονα, του καρκίνου του παχέος εντέρου, τα ευρήματα θεωρούνται αξιοσημείωτα. Το ροσμαρινικό οξύ είναι 10.8 και 6.,1 φορές λιγότερο κυτταροτοξικό από το cisplatin κατά των K562 και SKOV3 καρκινικών κυτταρικών σειρών. Το εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο δείχνουν ήπια, αλλά σχετικά υψηλή δραστηριότητα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων και το αιθέριο έλαιο του βασιλικού έχουν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση. Σχετικές προηγούμενες μελέτες σχετικών ενώσεων φυτικής προέλευσης, όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, φαινόλες, μονοτερπένια και καφεϊκό οξύ, έδειξαν ανάλογα αποτελέσματα [61][62][63][64]. Ωστόσο σημαντικές διαφορές ανιχνεύονται μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών σειρών. Ως εκ τούτου, η αντινεοπλασιαστική δραστικότητα των αιθέριων ελαίων από 17 φαρμακευτικά φυτά της Ταϊλάνδης σε κυτταρικές σειρές δερματικού καρκίνου ανθρώπου (KB) και λευχαιμίας σε τρωκτικά (P388) μελετήθηκαν *in vitro* με τη διενέργεια MTT assay από τους Manosroi et al. [65]. Το αιθέριο έλαιο του βασιλικού έδωσε την υψηλότερη αντινεοπλασιαστική δραστικότητα με τιμή IC50 των 36.2 μg/ml (12.7 φορές λιγότερο ισχυρή από 5-FU) σε πειράματα με την κυτταρική σειρά P388. Το αιθέριο έλαιο του *Ocimum basilicum* Linn., που καλλιεργείται στη νότια Ινδία βρέθηκε ότι αποτελείται κυρίως από

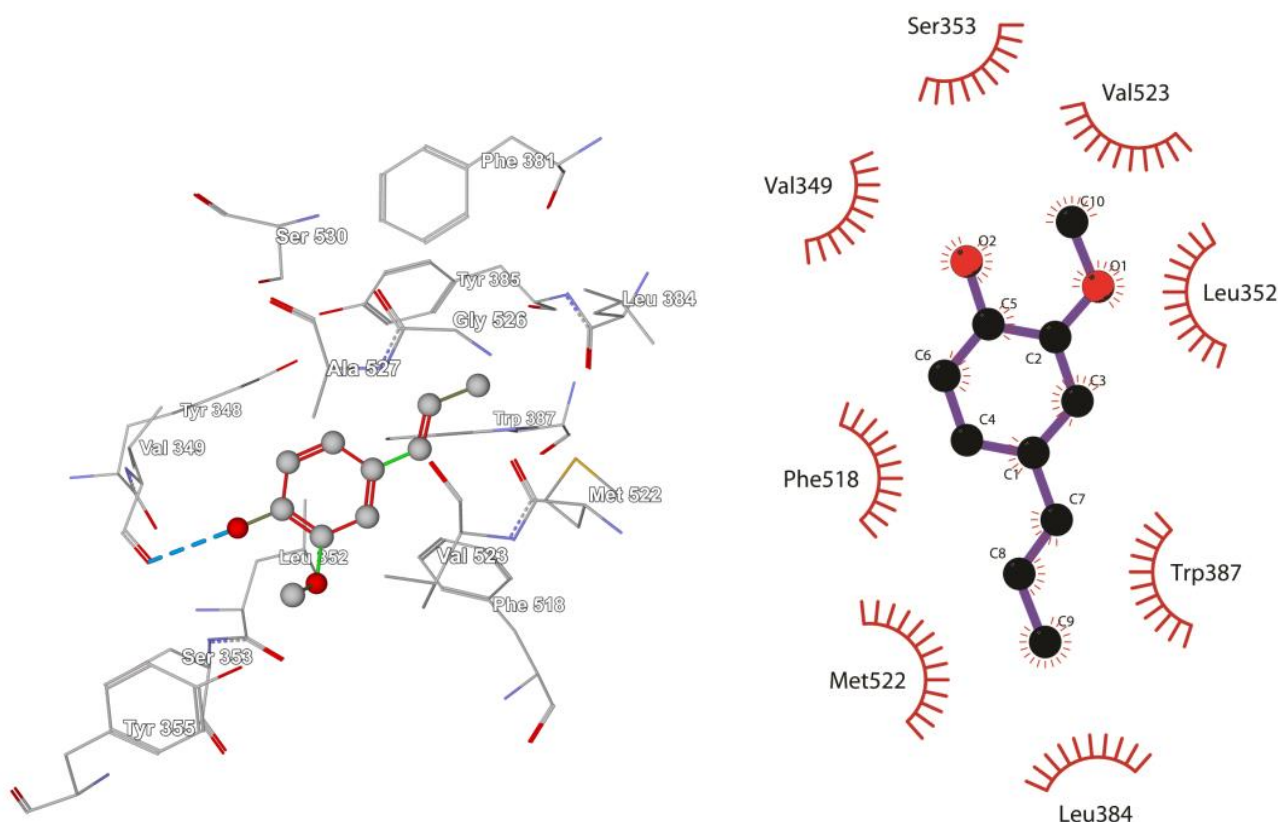
κιναμικό μεθυλεστέρα (70,1%) (methyl cinnamate) και λιναλοόλη (17,5%) [66]. Οι ενώσεις αυτές μελετήθηκαν έναντι του καρκίνου του τραχηλού (HeLa) και σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα λάρυγγα (HEp-2). Οι τιμές IC50 που ελήφθησαν ήταν 90.5 και 96.3 $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα. Η αντικαρκινική προστατευτική δράση των αιθέριων ελαίων φύλλων βασιλικού σε μύες (Swiss mice) με νεοπλασία φάνηκε από τη σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης [67]. Το καφεϊκό οξύ και ο σχετικός φαινυλ-εστέρας του (CAPE) έδειξαν αναστολή της ανάπτυξης ηπατώματος και μετάστασης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος [68]. Προτάθηκε ότι οι αντι-μεταστατική και αντι-καρκινική δράση αυτών των ενώσεων γίνεται μέσω της επιλεκτικής αναστολής του ενζύμου MMP-9 και της καταστολής των NF- κ B. Η ευγενόλη αναφέρεται ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, είτε αυθύπαρκα είτε σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Διατυπώθηκε η άποψη ότι η ευγενόλη δημιουργεί αντικαρκινικό προφίλ κυρίως μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης της [69]. Η λιναλοόλη έδειξε ισχυρή δραστηριότητα έναντι κυττάρων ιστοκυτταρικού λεμφώματος U937 (IC50: 3.51 $\mu\text{g/ml}$) και λεμφοκυττάρων Burkitt P3HR1 (IC50: 4.21 $\mu\text{g/ml}$) [70]. Στην περίπτωση μας, έχουμε εντοπίσει επιτυχώς τα μόρια του καφεϊκού οξέος, της ευγενόλης, της ισοευγενόλης και του ροσμαρινικού οξέος που είναι τα κύρια φυτοχημικά συστατικά του βασιλικού και επομένως πιθανώς υπεύθυνα για τυχόν αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι καρκινικών σειρών ανθρώπου όπως τραχήλου HeLa, μελανώματος FemX και χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας K562. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι παρόλο που το φυτό περιέχει ενώσεις όπως καφεϊκό οξύ, ευγενόλη, ισοευγενόλη, λιναλοόλη και ροσμαρινικό οξύ που είναι δραστικές έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών SKOV3, το εκχύλισμα και το έλαιο δεν παρουσιάζει καμία δράση (πίνακας 17). Αυτό πιθανά οφείλεται σε μια αρνητική επίδραση ή αλληλεπίδραση κάποιων άλλων συστατικών του εκχυλίσματος και του ελαίου που όμως δεν εντοπίστηκαν. Προηγούμενες μελέτες [71][72] έχουν ερευνήσει την κυτταροτοξική δραστηριότητα και τη δυναμική αναστολής της σύνθεσης του DNA της ευγενόλης και της ισοευγενόλης σε κυτταρικές σειρές σιελογόνων αδένων (HSG) και ινοβλαστών ούλων (HGF) και έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η υψηλότερη κυτταροτοξική δράση της ισοευγενόλης οφείλεται στις λιπόφιλες ρίζες και στην αλληλεπίδρασή τους με τις κυτταρικές μεμβράνες. Στην παρούσα μελέτη, έχουμε επίσης δείξει ότι η ισοευγενόλη εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα έναντι των κυττάρων HeLa, FemX, K562, και SKOV3 σε σύγκριση με την ευγενόλη. Επιπλέον, η ισοευγενόλη έχει την

υψηλότερη δραστηριότητα από όλες τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν έναντι των κυττάρων K562 (χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας).

7.8. Υπολογιστική μοντελοποίηση (μοριακή πρόσδεση)

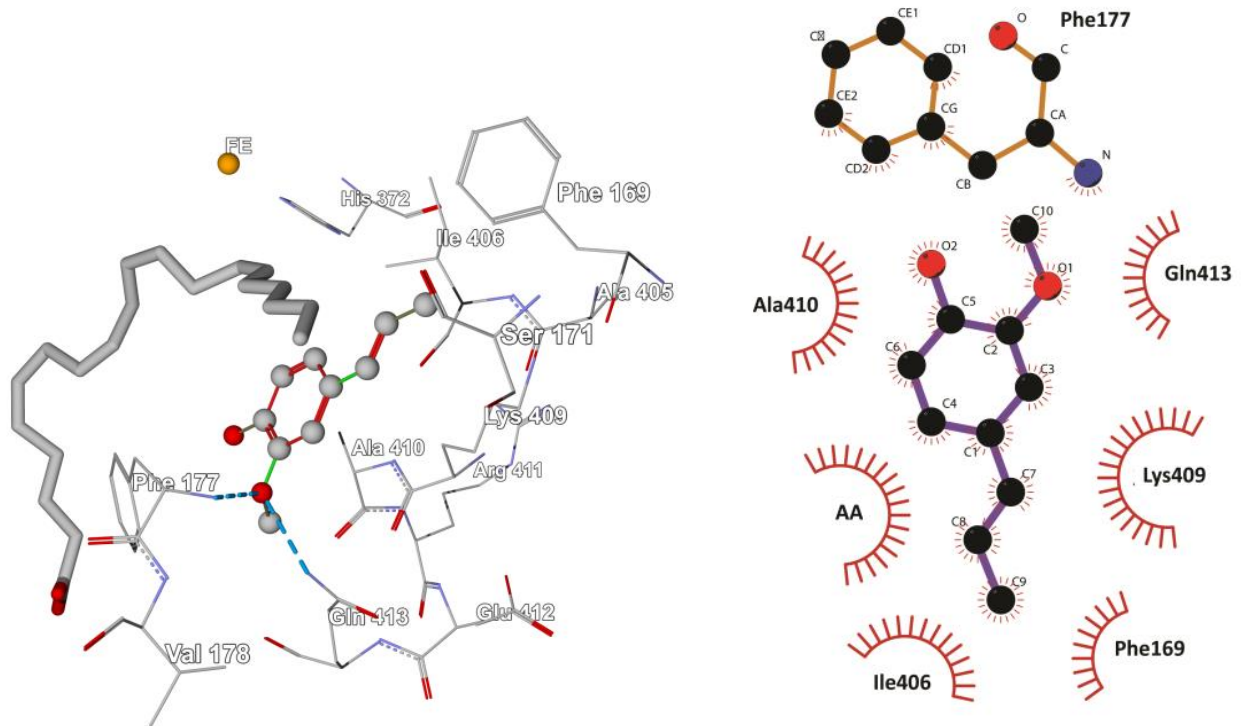
In silico μέθοδοι σε συνδυασμό με μεθόδους *in vitro* (ή *in vivo*) μπορούν να εφαρμοστούν συνεργατικά για την επιτυχή μελέτη της ανασταλτικής δράσης μιας ένωσης προς έναν υποδοχέα. Για τις φυτικές ενώσεις έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες αν και ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει ασαφής. Σε μία προσπάθεια διερεύνησης των μηχανισμών αλληλεπίδρασης ενζύμου / υποδοχέα, πραγματοποιήσαμε θεωρητική μελέτη προς την κατεύθυνση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και λιποξυγενάσης-5 (LOX). Η κυκλοοξυγενάση είναι ένα ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση φλεγμονωδών ενδιαμέσων, όπως η προσταγλανδίνη E2. Επειδή υπάρχει μία σαφής συσχέτιση μεταξύ φλεγμονής και καρκινογένεσης, πιστεύεται ότι πιθανοί αναστολείς της COX-2 μπορούν να θεωρηθούν ως χημειοπροληπτικοί παράγοντες καρκίνου [73]. Οι λιποξυγενάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν σίδηρο και δρουν ως καταλύτες οξειδώνοντας κορεσμένα λιπαρά οξέα και εστέρες σε υπεροξο- παράγωγα [74]. Η λιποξυγενάση-5 ταυτοποιείται ως ο κατάλληλος στόχος για τη μείωση της παραγωγής λευκοτριενίων οι οποίες σχετίζονται με τη διαδικασία της φλεγμονής, των αλλεργικών αποκρίσεων και του άσθματος [75][76]. Η λιποξυγενάση-15 έχει επίσης συνδεθεί με την εξέλιξη ορισμένων καρκίνων [77]. Τα *in vitro* αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πιο ισχυρές κυτταροτοξικές ενώσεις είναι ευγενόλη, ισοευγενόλη και καφεϊκό οξύ. Βιβλιογραφικές μελέτες δείχνουν ότι οι COX-2 και LOX-5 αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους εναντίον νεοπλασιών [78][79]. Τα *in vitro* αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι ευγενόλη, ισοευγενόλη και καφεϊκό οξύ εμφανίζουν την πιο υποσχόμενη κυτταροτοξική δράση. Οι Leem et al. [80] έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο του *Eugenia caryophyllata*, το οποίο περιέχει ευγενόλη ως το κύριο συστατικό, εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα έναντι της COX-2 (58,15%) και 15-LOX (86,15%) (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ και 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, αντίστοιχα). Επιπλέον, τα παράγωγα της ευγενόλης (όχι ισοευγενόλης) έχουν αξιολογηθεί ως πιθανοί αναστολείς της λιποξυγενάσης-15 μέσω μελετών μοριακής σύνδεσης [81]. Το καφεϊκό οξύ είναι ένας γνωστός αναστολέας της

λιποξυγενάσης και η δράση του έχει αξιολογηθεί προηγουμένως [82]. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε την ισοευγενόλη ως ισχυρό αναστολέα της COX-2 και της 5-LOX. Η γεωμετρική – στερεοχημική διευθέτηση του υποκαταστάτη μαζί με τη χαμηλότερη ενεργειακή διαμόρφωση επιλέχθηκαν ως την πιθανότερη κατάσταση πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης της ισοευγενόλης προς την COX-2 (PDB ID: 4COX) αποκαλύπτουν ότι το μόριο ενθυλακώνεται στο ενεργό κέντρο με παρόμοιο προσανατολισμό με την ινδομεθακίνη. Η υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης αποτελείται από τα Ala527, Gly526, Leu35, Leu384, Met522, Phe381, Phe518, Ser353, Ser530, Trp387, Tyr355, Tyr385, Val349, και Val523. Το τερματικό άτομο άνθρακα οδεύει προς Leu384, ενώ το αντίθετης κατεύθυνσης άτομο O του υδροξυλίου κατευθύνεται προς την είσοδο του υδρόφοβου καναλιού (Ser353). Αυτό το άτομο οξυγόνου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου 3.1 Å με το άτομο οξυγόνου του Val349. Σημαντικές στερικές και van der Waals αλληλεπιδράσεις είναι επίσης εμφανείς (Σχήμα 7.51).



Σχήμα 7.44: Το μόριο της ισοευγενόλης στο ενεργό κέντρο της COX-2.

Η κρυσταλλική δομή του 5 - LOX (3V99) περιέχει αραχιδονικό οξύ στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το ένζυμο εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα ανάλογης της λιποξυγενάσης-15 (15-LOX) μέσω μιας μετάλλαξης στο Ser663 [⁸³]. Η ισοευγενόλη δεσμεύεται αποτελεσματικά στην κοιλότητα της δραστηκής θέσης πλησίον του αραχιδονικού οξέος. Αλληλεπιδρά μέσω του ατόμου Ο του υδροξυλίου και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα αζώτου του Phe177 και Gln413 σε αποστάσεις 2.8 and 3.1 Å αντίστοιχα. Υπάρχουν σημαντικές στερικές αλληλεπιδράσεις με τα γειτονικά αμινοξέα (Ala405, Ala410, Gln413, Ile406, Lys409, Phe169 και Phe177). Οι δεσμοί υδρογόνου συμβάλλουν περίπου σε ποσοστό 5% των ενεργειακών αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη (PLP στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις και LJ12-6). Οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης έδειξαν ότι η ισοευγενόλη έχει τη δυνατότητα να αναστείλει την δράση των ενζύμων COX και LOX εξηγώντας πιθανώς εν μέρει την υψηλή τους δραστηριότητα μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης της καθώς ενθυλακώνεται στο ενεργό κέντρο της COX-2 με ανάλογη στερεοχημική διεύθυνση με το μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες μόριο της ινδομεθακίνης. Το καφεϊκό οξύ είναι συγκρίσιμο με το cisplatin έναντι των τεσσάρων κυτταρικών σειρών που εξετάστηκαν, ενώ η δραστηριότητα του κατά των καρκινικών κυττάρων SKOV3 είναι ιδιαίτερα υψηλή.



Σχήμα 7.45: Το μόριο της ισοευγενόλης στο ενεργό κέντρο της 5-LOX πλησίον του AA. Επίσης εμφανίζονται οι στερικές αλληλεπιδράσεις (δεξιά) και οι δεσμοί υδρογόνου.

Αναφορές

- ¹ Chen, S. S., Spiro, M., Kinetics of microwave extraction of rosemary leaves in hexane, ethanol and a hexane + ethanol mixture. *Flavour and Fragrance Journal*, 10, (2), 101-112 (1995)
- ² Iloki-Assanga S.B., Lewis-Luján L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L., Haines D.D., “Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*”, *BMC Research Notes*, 8, 396 (2015).
- ³ Miliuskas, G.; Venskutonis, P. R.; van Beek, T. A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, (2), 231-237 (2004).
- ⁴ Zhang, M.; Chen, H.; Li, J.; Pei, Y.; Liang, Y., Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. *LWT - Food Science and Technology*, 43, (1), 181-185 (2010).
- ⁵ Sellami I.H., Maamouri E., Chahed T., Wannas W.A., Kchouk M.E., Marzouk B., “Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.)”, *Industrial Crops and Products* 30, 395-402, (2009).
- ⁶ Alothman M., Bhat R., Karim A., “Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents”, *Food Chem.*, 115:785–8, (2009).
- ⁷ Sulaiman S., Sajak A., Supriatno K., Seow E., “Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables”, *Food comp anal.* 24:506–15, (2011).
- ⁸ Kchaou W., Abbes F., Blecker C., Attia H., Besbes S., “Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.)”, *Ind crop prod.* 45:262–9, (2013).
- ⁹ Iloki-Assanga S. B., Lewis-Luján L. M., Lara-Espinoza C. L., Gil-Salido A. A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J. L., Haines D. D., “Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*”, *BMC Research Notes* 8, (1), 1-14, (2015).

- ¹⁰Florence O., Adeolu A., Anthony J., “ Comparison of the nutritive value, antioxidant and antibacterial activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*”, *Rec Nat Prod.* 5(1):29–42, (2011).
- ¹¹ Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H., *J. Agric. Food Chem.* 53, 7749–7759, (2005).
- ¹² Hossain, M. B., Brunton, N. P., Barry-Ryan, C., MartinDiana, A. B., Wilkinson, M., *Rasayan J. Chem.* 1,751–756, (2008).
- ¹³ Tierney M. S., Smyth T. J., Rai D. K., Soler-Vila A., Croft A. K., Brunton N., “Food Chemistry”, 139, 753–761, (2013).
- ¹⁴Font N., Hernández F., Hogendoorn E.A., Baumann R.A., P. van Zoonen, “Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides”, *J Chromatogr A*, 798 179-186, (1998).
- ¹⁵Chen J.H. & Ho C.T., “Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds”, *Journal of. Agricultural and. Food Chemistry* 45,2374-2378, (1997).
- ¹⁶Tagashira M. & Ohtake Y., “A New Antioxidative 1,3-Benzodioxole from *Melissa Officinalis*”, *Planta Medica*, 64, 555-558 (1998).
- ¹⁷Lamaison J.L.,Petitjean-Freytet C. & Carnat A., “Lamiacées Médicinales à Propriétés Antioxydantes, Sources Potentielles d’Acide Rosmarinique”, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 66 (7), 185-188, (1991).
- ¹⁸Hohmann J., Zupkó I., Rédei D., Csányi M., Falkay G., Máthé I. & Janicsák G., “ Protective effects of the aerial parts of *Salvia Officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula Angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation”, *Planta Medica*, 65, 576-578 (1999).
- ¹⁹Janicsák G., Máthé I., Miklóssy-Vári V. & Blunden G., “ Comparative Studies of the Rosmarinic and Caffeic Acid Contents of Lamiaceae Species”, *Biochemical. Systematics and. Ecology*, 27, 733-738 (1999).
- ²⁰Rawn H., Pedersen M.F., Borum J., Andary C., Anthoni U., Christophersen C. Nielsen P.H., “Seasonal Variation and Distribution of Two PhenolicSeasonal Variation and Distribution of Two Phenolic Compounds, Rosmarinic Acid and Caffeic Acid, in Leaves and Roots-Rhizomes of Eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia*, 40 (1), 51-61, (1994).

- ²¹Caniova A. & Brandsteterova E., “HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (17), 2647-2659, (2001).
- ²²Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.-J.E. & Komaitis M., “RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity”, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 1190-1195, (2005).
- ²³Zgorka G., Glowniak K., “Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79-87, (2001).
- ²⁴Carnat A. B., Carnat D. & Lamaison J.-L., “The aromatic and polyphenolic compositions of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea”, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72, 301–305, (1998).
- ²⁵Dorman H. J. D., Bachmayer O., Kos-ar M. & Hiltunen R., “Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563–4569, (2003).
- ²⁶Dorman H.J.D., Peltoketo A., Hiltunen R. & Tikkanen M.J., “Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *lamiaceae* herbs”, *Food Chemistry*, 83, 255-262. (2003).
- ²⁷Zgorka G. & Glowniak K., “Variation of free phenolics acid in medicinal plants belongin to the *Lamiaceae* family”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79–87, (2006).
- ²⁸Ziakova A. & Brandsteterova E., “Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some *Lamiaceae* family plants”, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 26, 443–453. (2003).
- ²⁹Ziakova A. & Brandsteterova E., “Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis”, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 25, 3017–3032, (2002).
- ³⁰Agiomyrgianaki, A.; Petrakis, P. V.; Dais, P., Detection of refined olive oil adulteration with refined hazelnut oil by employing NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Talanta* 80, (5), 2165-2171, (2010)

- ³¹Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.-J.E. & Komaitis M., “RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity”, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 1190-1195, (2005).
- ³²Wojdylo A., Oszmianski J. & Czemerys R., “Antioxidants activity and phenolic compounds in 32 selected herbs”, *Food chemistry*, 105, 940-949, (2007).
- ³³Rodríguez-Meizoso, I.; Castro-Puyana, M.; Börjesson, P.; Mendiola, J. A.; Turner, C.; Ibáñez, E., Life cycle assessment of green pilot-scale extraction processes to obtain potent antioxidants from rosemary leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 205-212 (2012).
- ³⁴Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A.-H., Khalel K.I., “Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts”, *Industrial Crops and Products* 43, 827-831, (2013).
- ³⁵Grayer, R.J., Kite, G.C., Goldstone, F.J., Bryan, S.E., Paton, A., Putievsky, E. Infrasppecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43, 1033-1039, (1996)
- ³⁶Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S. Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4442-4449, (2003).
- ³⁷Lu, Y., Gao, B., Chen, P., Charles, D., Yu, L. Characterisation of organic and conventional sweet basil leaves using chromatographic and flow-injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints combined with principal component analysis. *Food Chemistry* 154, 262-268, (2014)
- ³⁸Kwee, E.M., Niemeyer, E.D. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry* 128, 1044-1050, (2011).
- ³⁹Hussain, A.I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S.T., Przybylski, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* 108, 986-995, (2008).

- ⁴⁰ Hakkim, F.L., Shankar, C.G., Girija, S. Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *J Agric Food Chem* 55, 9109-9117, (2007)
- ⁴¹ Lee, S.-J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.-G.. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91, 131-137, (2005).
- ⁴² Zarlaha, A., Kourkoumelis, N., Stanojkovic, T.P., Kovala-Demertzi, D. Cytotoxic Activity of Essential Oil and Extracts of *Ocimum Basilicum* against Human Carcinoma Cells. *Molecular Docking Study of Isoeugenol as a Potent Cox and Lox Inhibitor. Dig J Nanomater Bios* 9, 907-917, (2014).
- ⁴³ Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules*. 14(6):2016-2031, (2009).
- ⁴⁴ Pandey, H., Pandey, P., Singh, S., Gupta, R., Banerjee, S. Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma* 252, 647-655, (2014).
- ⁴⁵ Synowiec, A., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Przybył, J.L., Bączek, K., Węglarz, Z. Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 23, 171-181, (2014).
- ⁴⁶ Grayer, R.J., Bryan, S.E., Veitch, N.C., Goldstone, F.J., Paton, A., Wollenweber, E. External flavones in sweet basil, *Ocimum basilicum*, and related taxa. *Phytochemistry* 43, 1041-1047, (1996).
- ⁴⁷ Lu, Y., Gao, B., Chen, P., Charles, D., Yu, L.L. Characterisation of organic and conventional sweet basil leaves using chromatographic and flow-injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints combined with principal component analysis. *Food Chem* 154, 262-268, (2014).
- ⁴⁸ Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10576-10581, (2010).

- ⁴⁹Sulaiman G. M., “In vitro study of molecular structure and cytotoxicity effect of luteolin in the human colon carcinoma cells”, *European Food Research and Technology*, 241, (1), 83-90, (2015).
- ⁵⁰Majumdar D., Jung K. H., Zhang H., Nannapaneni S., Wang X., Amin A. R., Chen Z., Chen Z. G., Shin D. M., “Luteolin nanoparticle in chemoprevention: in vitro and in vivo anticancer activity”, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 7, (1), 65-73,(2014).
- ⁵¹Sun D. W., Zhang H. D., Mao L., Mao C. F., Chen W., Cui M., Ma R., Cao H. X., Jing C. W., Wang Z., Wu J. Z., Tang J. H., “Luteolin Inhibits Breast Cancer Development and Progression In Vitro and In Vivo by Suppressing Notch Signaling and Regulating MiRNAs”, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 37, (5), 1693-711, (2015).
- ⁵²Czyz J., Madeja Z., Irmer U., Korohoda W., Hulser D. F., “Flavonoid apigenin inhibits motility and invasiveness of carcinoma cells in vitro”, *International journal of cancer. Journal international du cancer* 114, (1), 12-8, (2005).
- ⁵³Li B., Birt D. F., “In vivo and in vitro percutaneous absorption of cancer preventive flavonoid apigenin in different vehicles in mouse skin”, *Pharm Res* 13, (11), 1710-5, (1996).
- ⁵⁴Park M.H., Hong J.E., Park E.S., “Anticancer effect of tectochrysin in colon cancer cell via suppression of NF-kappaB activity and enhancement of death receptor expression”, *Molecular Cancer*. 14:124, (2015).
- ⁵⁵Hasrat J. A., De Bruyne T., De Backer J. P., Vauquelin G., Vlietinck A. J., “Cirsimaritin and cirsimaritin, flavonoids of *Microtea debilis* (Phytolaccaceae) with adenosine antagonistic properties in rats: leads for new therapeutics in acute renal failure”, *The Journal of pharmacy and pharmacology* 49, (11), 1150-6, (1997).
- ⁵⁶Akesson C., Lindgren H., Pero R. W., Leanderson T., Ivars F., “Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100”, *International immunopharmacology* 5, (1), 219-29, (2005).
- ⁵⁷Kessler J. H., Mullauer F. B., de Roo G. M., Medema J. P., “Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types”, *Cancer Letters* 251, (1), 132-145, (2007).

- ⁵⁸ Liebscher G., Vanchangiri K., Mueller T., Feige K., Cavalleri J. M. V., Paschke R., “In vitro anticancer activity of Betulinic acid and derivatives thereof on equine melanoma cell lines from grey horses and invivo safety assessment of the compound NVX-207 in two horses”, *Chemico-Biological Interactions* 246, 20-29, (2016).
- ⁵⁹ Erenler R., Sen O., Aksit H., Demirtas I., Yaglioglu A.S., Elmastas M., Telci I., “Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities”, *Journal of the science of food and agriculture* 96, 822-836, (2016).
- ⁶⁰ Abdel-Massih R.M., Fares R., Bazzi S., El-Chami N., Baydoun E., “The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line”, *Leukemia research* 34, 1052-1056, (2010).
- ⁶¹ Devi P. U., Ganasoundari A., Vrinda B., Srinivasan K. K. and Unnikrishnan M. K., “Radiation Protection by the *Ocimum* Flavonoids Orientin and Vicenin: Mechanisms of Action”, *Radiation Research* 154, 455 (2000).
- ⁶² Beric T., Nikolic B., Stanojevic J., Vukovic-Gacic B. and Knezevic-Vukcevic J., “Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis”, *Food and Chemical Toxicology* 46, 724 (2008).
- ⁶³ Jayasinghe C., Gotoh N., Aoki T. and Wada S., “Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4442 (2003).
- ⁶⁴ Chattopadhyay R. R., “A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin”, *Journal of Ethnopharmacology* 67, 367 (1999).
- ⁶⁵ Manosroi J., Dhumtanom P. and Manosroi A., “Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines”, *Cancer Letters* 235, 114 (2006).
- ⁶⁶ Kathirvel P. and Ravi S., “Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts”, *Natural Product Research* 26, 1112 (2012).
- ⁶⁷ Aruna K. and Sivaramakrishnan V. M., “Anticarcinogenic Effects of the Essential Oils from Cumin, Poppy and Basil”, *Phytotherapy Research* 10, 577 (1996).

- ⁶⁸Chung T. W., Moon S. K., Chang Y. C., Ko J. H., Lee Y. C., Cho G., Kim S. H., Kim J. G. and Kim C. H., “Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism”, *Faseb Journal* 18, 1670 (2004).
- ⁶⁹Hussain A., Brahmabhatt K., Priyani A., Ahmed M., Rizvi T. A. and Sharma C., “Eugenol Enhances the Chemotherapeutic Potential of Gemcitabine and Induces Anticarcinogenic and Anti-inflammatory Activity in Human Cervical Cancer Cells”, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 26, 519 (2011).
- ⁷⁰Chiang L. C., Chiang W., Chang M. Y., Ng L. T. and Lin C. C., *American Journal of Chinese Medicine* 31, 37 (2003).
- ⁷¹Atsumi T., Fujisawa S., Satoh K., Sakagami H., Iwakura I., Uehai T., Sugita Y. and Yokoe I., “Free Radical Metabolism of Methyleugenol and Related Compounds”, *Anticancer Research* 20, 2519 (2000).
- ⁷²Fujisawa S., Atsumi T., Ishihara M. and Kadoma Y., “Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds”, *Anticancer Research* 24, 563 (2004).
- ⁷³Kamatou G. P., Vermaak I., and Viljoen A. M., “Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule”, *Molecules* 17, 6953 (2012).
- ⁷⁴Brash A. R. J., “Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate”, *Biological Chemistry* 274, 23679–23682 (1999).
- ⁷⁵Schonfeld W., Schluter B., Hilger R., Konig W., “Leukotriene generation and metabolism in isolated human lung macrophages”. *Immunology* 65, 529 – 536 (1988).
- ⁷⁶D. W. P. Hay, T. J. Torphy, B. J. Udem, *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 304 – 309 (1995).
- ⁷⁷Kelavkar U. P., Cohen C., Kamitani H., Eling T. E. and Badr K. F., “Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging”, *Carcinogenesis* 21, 1777 (2000).
- ⁷⁸Sheng H., Shao J., Morrow J. D., Beauchamp R. D., DuBois R. N., “Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells”, *Cancer Res.* 58, 362 – 366 (1998).

- ⁷⁹A. J. Dannenberg, K. Subbaramaiah, *Cancer Cell*. 4, 431–436 (2003).
- ⁸⁰Leem H. H., Kim E. O., Seo M. J., Choi S. W., *Korean Soc J.*, “Biotransformation of methyleugenol by rat hepatic microsomes”, *Food Sci. Nutr.* 40, 1361–1370 (2011).
- ⁸¹Sadeghian H., Seyedi S. M., Saberi M. R., Arghiani Z. and Riazi M., “Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 890 (2008).
- ⁸²Neophytou N., Leonis G., Stavrinoudakis N., Simcic M., Grdadolnik S. G. S. G., Papavassilopoulou E., Michas G., Moutevelis-Minakakis P., Papadopoulos M. G., Zing M., and Mavromoustakos T., “Docking and Molecular Dynamics Calculations of Pyrrolidinone Analog MMK16 Bound to COX and LOX Enzymes”, *Molecular Informatics* 30, 473 (2011).
- ⁸³Gilbert N. C., Rui Z., Neau D. B., Waight M. T., Bartlett S. G., Boeglin W. E., Brash A. R., and Newcomer M. E., “Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663”, *Faseb Journal* 26, 3222 (2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές

8.1. Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή εστιάστηκε στην μελέτη τριών αντιπροσωπευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*: *Rosmarinus officinalis*, *Origanum Majorana* και *Ocimum basilicum*. Αναπτύξαμε τρόπους βέλτιστης παραλαβής των φαινολικών και флаβονοειδών συστατικών που εμπεριέχονται στα φυτά μέσω της χρησιμοποίησης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών εκ των οποίων οι δύο έχουν υψηλό δείκτη πολικότητας. Έγινε σημαντική προσπάθεια στην ανίχνευση σημαντικών φυτοχημικών μέσω της χρησιμοποίησης προτύπων διαλυμάτων και εστίασαμε στην *in vitro* βιολογική δραστικότητα των εκχυλισμάτων.

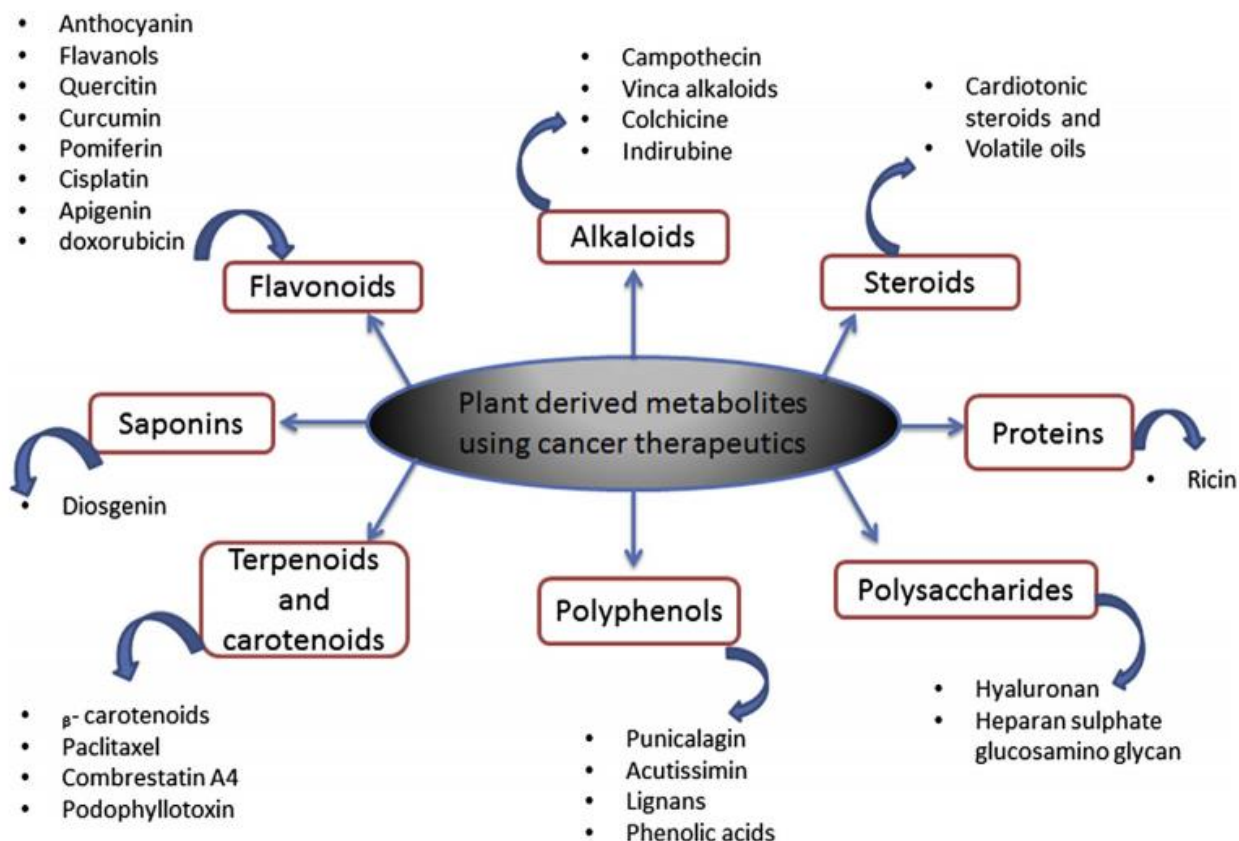
Συγκεκριμένα:

- Καταγράφηκαν τα κυριότερα συστατικά τριών αντιπροσωπευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* με μεθόδους φασματομετρίας μάζας και χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.
- Καταγράφηκε ως κρίσιμη παράμετρος ο διαλύτης εκχύλισης τόσο για την απόδοση των φυτοχημικών ενώσεων όσο και για την αντικαρκινική δράση *in vitro*. Υπολογίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ειδικά για την περίπτωση των флаβονοειδών όπου η χρησιμοποίηση αιθανόλης δίνει την μεγαλύτερη συγκέντρωση.
- Μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση του διαλύτη στην κυτταροτοξικότητα εναντίον πολλαπλών κυτταρικών καρκινικών σειρών HeLa, A549, LS174 και συγκρίθηκε με αυτή προς φυσιολογικά κύτταρα MRC5.

- Μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των κυριότερων συστατικών που απαντούν στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* εναντίον των κυτταρικών καρκινικών σειρών HeLa, FemX, K562 και SKOV3.
- Μετρήθηκε για πρώτη φορά η αναστολή της λιποξυγενάσης *in vitro* με εκχυλίσματα βασιλικού και βρέθηκε σημαντική αναστολή του εκχυλίσματος φύλλων σε σχέση με το αιθέριο έλαιο.
- Υπολογίστηκε η θετική συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών τόσο στα εκχυλίσματα δενδρολίβανου όσο και σε αυτά της ματζουράνας.
- Σε αυτά τα δύο φυτά διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση φλαβονοειδών είναι υπερδιπλάσια της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών και αυτό φαίνεται ότι εξαρτάται από την περίοδο συγκομιδής.
- Ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά η ισοευγενόλη σε δείγματα βασιλικού ως συστατικό σε μικρή συγκέντρωση.
- Μελετήθηκε για πρώτη φορά με υπολογιστικές μεθόδους μοριακής πρόσδεσης η ισοευγενόλη ως ενζυμικός αναστολέας της λιποξυγενάσης.

8.2. Μελλοντικές προοπτικές

Τα φυτά χρησιμοποιούνται εδώ και εκατοντάδες χρόνια για την αντιμετώπιση ενδημικών και μη ασθενειών σε διάφορες μορφές εκχυλίσματος, σκόνης ή πολτού. Σήμερα τα λεγόμενα φαρμακευτικά φυτά δοκιμάζονται ευρέως για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών όπως η ηπατίτιδα, οι νευρολογικές διαταραχές, νεφρικές διαταραχές και ο καρκίνος. Ειδικά για τον καρκίνο οι φυτοχημικές ενώσεις αποτελούν τη κυριότερη εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης καθώς είναι πολύ λιγότερο τοξικά από τα συνήθη φαρμακευτικά σκευάσματα και είναι φθηνότερα στην παραγωγή. Έχει βρεθεί ότι εκχυλίσματα και βιομάζα φαρμακευτικών φυτών εμπεριέχουν κυτταροδραστικές ενώσεις όπως στεροειδή, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, πολυσακχαρίδια, σαπωνίνες, αλκαλοειδή, ταννίνες και τερπενοειδή. Στο σχήμα 8.1. περιγράφονται οι πρόσφατες κλινικές δοκιμές και χρήσεις παραγώγων φαρμακευτικών φυτών ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες [1].



Σχήμα 8.1: Χρήσεις παραγώγων φαρμακευτικών φυτών ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες που εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Είναι επομένως εμφανές ότι πραγματοποιείται πολύ μεγάλη προσπάθεια εκμετάλλευσης του φυσικού πλούτου για την παραγωγή νέων αντικαρκινικών σκευασμάτων.

Στις μελλοντικές προοπτικές της διατριβής αναφέρουμε:

- Την αξιολόγηση πειραματικών παραμέτρων όπως ο διαλύτης, η θερμοκρασία εκχύλισης και το στάδιο ανάπτυξης για την παραλαβή κλασμάτων φυτοχημικών
- Την εκτενέστερη χρησιμοποίηση προτύπων ενώσεων για την πλήρη ποιοτική καταγραφή των εκχυλισμάτων
- Την ποσοτικοποίηση των συστατικών των εκχυλισμάτων σε σχέση με την αντικαρκινική τους δράση
- Πειράματα σε καρκινικές σειρές

- Πειράματα σε βακτήρια, μικρόβια κλπ καθώς υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ικανοποιητική δράση
- Μελέτη της επίδρασης των ενεργών συστατικών σε κυτταρικούς υποδοχείς

8.3. Δημοσιεύσεις

Περιοδικά:

Zarlaha, A., Kourkoumelis, N., Stanojkovic, T.P., Kovala-Demertzi, D., 2014. Cytotoxic Activity of Essential Oil and Extracts of Ocimum Basilicum against Human Carcinoma Cells. Molecular Docking Study of Isoeugenol as a Potent Cox and Lox Inhibitor. Dig J Nanomater Bios 9, 907-917

Συνέδρια:

Zarlaha, A., Stanojkovic, T., Hadjipavlou-Litina, D., Kourkoumelis, N., Kovala-Demertzi, D., 2012. Anti-proliferative and antioxidant properties of Ocimum basilicum. 12th Eurasia Conference on Chemical Sciences, Corfu, Greece

Αναφορές

¹ Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. A case study- Regulation and functional mechanisms of cancer cells and control its activity using plants and their derivatives. J Pharm Res 2013;6(8):884-892