



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας-τοξικότητας φυτικών  
εκχυλισμάτων καλλιεργούμενων και αυτοφυών αρωματικών-  
φαρμακευτικών φυτών»**

**ΕΥΣΤΑΘΙΑ Π. ΣΚΩΤΤΗ**

Επιβλέπων: Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

**ΑΘΗΝΑ 2016**





ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας-τοξικότητας φυτικών  
εκχυλισμάτων καλλιεργούμενων και αυτοφύων αρωματικών-  
φαρμακευτικών φυτών»**

**ΕΥΣΤΑΘΙΑ Π. ΣΚΩΤΤΗ**

Επιβλέπων: Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

**ΑΘΗΝΑ 2016**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας-τοξικότητας φυτικών εκχυλισμάτων καλλιεργούμενων και αυτοφυών αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών»**

**ΕΥΣΤΑΘΙΑ Π. ΣΚΩΤΤΗ**

**Επιβλέπων: Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Μόσχος Πολυσιού, Καθηγητής Γ.Π.Α. (μέλος)

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α. (μέλος)

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μόσχος Πολυσιού, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Γαρουφαλιά Οικονόμου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθανάσιος Κυμπάρης, Επίκουρος Καθηγητής Δ.Π.Θ.

Ευφημία Ηρειώτου, Επίκουρη Καθηγήτρια, ΤΕΙ Ιονίων Νήσων



Σε όλους όσους με αγαπούν και στέκονται πλάι μου,





## Ευχαριστίες

Αυτή η διδακτορική διατριβή σηματοδοτεί το κλείσιμο ενός μεγάλου ταξιδιού για εμένα που ξεκίνησε πριν πολλά χρόνια με σπουδές στον ευρύ και πολυδιάστατο χώρο της επιστήμης του Περιβάλλοντος. Κι επειδή, όπως σοφά λέει κι ο ποιητής, σημασία πάντα θα έχει το ταξίδι κι όχι ο προορισμός, είχα την τύχη σε αυτό το μεγάλο ταξίδι να περιπλανηθώ σε ερευνητικούς τομείς κρίσιμους και ιδιαίτερα ενδιαφέροντες, γνώρισα υπέροχους ανθρώπους, απέκτησα σημαντική εμπειρία κυρίως μέσα από τα λάθη αλλά και τις επιτυχείς προσπάθειες, το κυριότερο όμως ήταν ότι άνοιξαν οι ορίζοντές μου και διαμορφώθηκε μια φιλοσοφία ζωής με βάση το Μέτρο που θα με ακολουθεί.

Θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Πέτρο Ταραντίλη. Τον ευχαριστώ για την υποστήριξή του, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλα τα στάδια εκπόνησης αυτής της διατριβής, και την κατανόησή του στις όποιες δυσκολίες αντιμετώπισα. Η καθοδήγηση και η συμπαράστασή του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης, συγγραφής και διόρθωσης της διατριβής ήταν ουσιαστική κι αμέριστη. Τον ευχαριστώ για την ελευθερία που μου ενέπνευσε να ακολουθήσω ερευνητικά μονοπάτια και εκτός του εργαστηρίου Χημείας στην πειραματική εξέλιξη της διατριβής καθώς και τη ρεαλιστική αντιμετώπιση των όποιων προβλημάτων ανέκυπταν.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Ομ. Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Μόσχο Πολυσίου ο οποίος πάντα άκουγε με προσοχή όλους τους προβληματισμούς μου, με συμβούλευε και με ενθάρρυνε στο μέγιστο δυνατό, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη για τη βοήθειά του και την εξαιρετική συνεργασία μας στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α. όπου διεξήχθηκε μεγάλο μέρος των πειραμάτων της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επικ. Καθηγητή Γ.Π.Α. κ. Χρήστο Παππά για τις γνώσεις και τις εξαιρετικές συμβουλές που μου παρείχε σε κρίσιμα σημεία της διατριβής.

Ξεχωριστά και ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ Ιονίων Νήσων κ. Παύλο Μπουχάγιερ, για την αμέριστη στήριξη που μου παρείχε σε

όλους τους τομείς, τους ορίζοντες που μου άνοιξε, την μεταλαμπάδευση της γνώσης του σε θέματα γεωπονίας και αλληλοπάθειας, τις σημαντικές συμβουλές του σε κάθε κρίσιμη καμπή και τη συμπαράστασή του με κάθε τρόπο σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

Στο εργαστήριο Χημείας είχα την τύχη να συνεργασθώ με ανθρώπους που ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν κάθε στιγμή. Ευχαριστώ τη Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα, το Δρ. Χαράλαμπο Κανάκη, τη Δρ. Ειρήνη Αναστασάκη και τον υποψήφιο διδάκτορα Λευτέρη Πετράκη για την άριστη συνεργασία. Επίσης, ευχαριστώ την Σοφία Κουντούρη και την Μαρία Καϊάφα για την εξαιρετική συνεργασία στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Πανορμίτη και Ευαγγελία, που όλα αυτά τα χρόνια με στήριξαν και συνεχίζουν να με στηρίζουν με κάθε θυσία. Ευχαριστώ ιδιαίτερα το γιο μου, Γιώργο, ο οποίος υπέμεινε με στωικότητα και πολύ αγάπη μια μητέρα-φοιτήτρια κατά τη διάρκεια της εφηβείας του. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην Αντιγόνη για την αγάπη, τη φιλοξενία και την ουσιαστική της συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια

Αθήνα, Ιανουάριος 2016

Ευσταθία Π. Σκώττη

## Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη υδατικών εκχυλισμάτων από καλλιεργούμενα και αυτοφυή αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της Ελληνικής χλωρίδας. Ο στόχος ήταν η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης και της τοξικότητάς τους προκειμένου αυτά να αξιοποιηθούν μελλοντικά από τη Βιομηχανία τροφίμων και τη βιολογική γεωργία.

Μελετήθηκαν τα φυτά: δίκταμο (*Origanum dictamnus* L.), ρίγανη (*Origanum vulgare* L.), ύσσωπος (*Hyssopus officinalis* L.), φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.), μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.) και κρόκος (*Crocus sativus* L.).

Η παραλαβή των εκχυλισμάτων για την εκτίμηση της τοξικότητάς τους προσομοιάστηκε με τη συνήθη χρήση αυτών ως αφέψημα (θερμοκρασία νερού 85°C και συγκέντρωση 1g/100mL νερού για τα είδη της οικογένειας *Lamiaceae* και 0.01g/100mL για τον κρόκο). Η εκτίμηση της τοξικότητας έγινε με τον αναλυτή *Microtox*<sup>®</sup> η λειτουργία του οποίου βασίζεται στο βακτήριο *Vibrio fischeri*, το οποίο εκπέμπει φωταύγεια. Πρόσθετα, για τα προαναφερόμενα φυτικά είδη, εκτιμήθηκε η τοξικότητα τους σε εκχυλίσματα τα οποία προέκυψαν από την ίδια αναλογία φυτικής μάζας σε νερό, και στον ίδιο χρόνο εκχύλισης αλλά με διαφοροποίηση της θερμοκρασίας τους νερού αλλά και με υποβοήθηση από λουτρό υπερήχων. Η εκχύλιση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έγινε προκειμένου να υπάρχει προσομοίωση της χρήσης των αρωματικών βοτάνων ως ενισχυτικά γεύσης σε φαγητά για τα οποία στη συνέχεια δεν ακολουθεί θερμική επεξεργασία, όπως στην περίπτωση της ρίγανης στις σαλάτες. Η τοξικότητα εκτιμήθηκε και σε εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν μετά την περεταίρω εκχύλιση όλων των προηγούμενων με πετρελαϊκό αιθέρα μέσω της οποίας αφαιρούνται τα μη υδατοδιαλυτά συστατικά που παραλαμβάνονται με τις διαδικασίες εκχύλισης που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Τα αποτελέσματα των ελέγχων τοξικότητας υπέδειξαν ότι η μικρή ποσότητα συστατικών του αιθέριου ελαίου η οποία περνά στην υδατική φάση κατά την παραλαβή των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* με διάφορες τεχνικές εκχύλισης, διαφοροποιεί τη βιολογική δράση του εκχυλίσματος. Η διαφοροποίηση στη βιολογική δράση αποτυπώθηκε από το γεγονός ότι τα μη υδατοδιαλυτά συστατικά του αιθέριου ελαίου που εισέρχονται στο εκχύλισμα είτε προωθούν είτε μερικώς παρεμποδίζουν τη βιολογική δράση των υδατοδιαλυτών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι η μεγαλύτερη συνέργεια στην τοξικότητα μεταξύ μη υδατοδιαλυτών και υδατοδιαλυτών συστατικών στα εκχυλίσματα προέκυψε από την εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία 85° C. Η ανάλυση της τοξικότητας των

αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, προσδιόρισε τις μέγιστες συγκεντρώσεις ανά είδος εκχύλισης, πάνω από τις οποίες κάποιο είδος μπορεί να θεωρηθεί τοξικό καθώς και τη συνέργεια στην τοξικότητα μεταξύ των υδατοδιαλυτών συστατικών και των συστατικών του αιθέριου ελαίου που εισέρχονται στο εκχύλισμα για κάθε φυτικό είδος και διαδικασία εκχύλισης. Οι τιμές τοξικότητας δε βρέθηκε να συσχετίζονται με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών και την αντιοξειδωτική ικανότητα των ίδιων εκχυλισμάτων.

Ακολούθως μελετήθηκε η βιολογική δράση υδατικών εκχυλισμάτων όλων των προαναφερόμενων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, επί των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* και του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana*. Επίσης, μέσω του υπολογισμού δεικτών συνέργειας μελετήθηκε ο ρόλος του μη υδατοδιαλυτού κλάσματος στη δράση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Αναφορικά με τη βιολογική δράση, το φαινόμενο που παρατηρήθηκε κυρίως ήταν η προώθηση της ανάπτυξης του μυκηλίου και της κονιδιογένεσης από συγκεκριμένα εκχυλίσματα, φθάνοντας σε κάποια από αυτά ποσοστό αύξησης έως και 300% σε σχέση με το μάρτυρα. Διαπιστώθηκε δε, ότι η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων επί της κονιδιογένεσης έχει ισχυρή συσχέτιση ( $R^2$ : 0.84) με τη συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος στα εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν.

Η μελέτη των αλλαγών στη δομική-βιοχημική σύσταση των κυττάρων των οργανισμών στόχων υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR, αποτέλεσε το αντικείμενο της επόμενης ενότητας στην παρούσα διατριβή. Με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερύθρου και της χημειομετρίας βρέθηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα επηρέασαν σημαντικά τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και τις πρωτεΐνες σε βαθμό που να διαχωρίζονται ικανοποιητικά όλες οι επεμβάσεις σε σχέση με το μάρτυρα στις περιοχές του φάσματος που αντιστοιχούν στις προαναφερόμενες ομάδες. Πρόσθετα, ένα εξαιρετικά σημαντικό αποτέλεσμα που προέκυψε από την παρούσα διατριβή και αφορά στη μελέτη μικροοργανισμών με φασματοσκοπία IR, είναι ότι διαπιστώθηκε και καταγράφηκε για πρώτη φορά η πολύ ισχυρή συσχέτιση ( $R^2$ : 0,88-0,98) της αύξησης του μυκηλίου με το λόγο του εμβαδού συγκεκριμένων κορυφών του φάσματος των μυκήτων. Το γεγονός αυτό, ανοίγει νέους δρόμους στη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου και σε μικροβιολογικές εφαρμογές.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση των ανωτέρω εκχυλισμάτων στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης από τον *Aspergillus flavus*. Ο έλεγχος για την παραγωγή αφλατοξίνης πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* και *in vivo* βιοδοκιμές με ποιοτική ανίχνευση των αφλατοξινών με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, αλλά και με ποσοτική τους εκτίμηση με τη μέθοδο ELISA. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο μηχανισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων με μοριακές μεθόδους (Real-time PCR) όπου και διαπιστώθηκε η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην έκφραση του μεταφραστικού παράγοντα *AflR* αλλά και του γονιδίου *Nor-1* που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης από τον *A. flavus*. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι στα υδατικά εκχυλίσματα των αυτοφυών και καλλιεργούμενων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που εξετάστηκαν περιέχονται βιοδραστικά μόρια ικανά να παρεμβαίνουν σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*) έδειξε με βάση τις *in vitro* και *in vivo* βιοδοκιμές ότι μπορεί να αποτελέσει ισχυρό αντιαφλατοξικογόνο παράγοντα ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές επιστήμες  
Άλλες επιστήμες

Λέξεις κλειδιά: Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά, Τοξικότητα, Βιοδραστικότητα, Φασματοσκοπία FT-IR, Αντιαφλατοξικογόνος δράση

## Abstract

The aim of this thesis was to study aqueous extracts of aromatic and medicinal native plants of the Greek flora. The main goal was the evaluation of their toxicity and biological activity in order to be further developed by the food industry and organic farming.

The plants studied were dittany (*Origanum dictamnus* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), hyssop (*Hyssopus officinalis* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and saffron (*Crocus sativus* L.).

Aqueous extracts for the toxicity assessment were prepared in beverage form (1g/100mL water at 85 °C) for all the Lamiaceae species and at the same temperature but at 0.01g/100mL for saffron. Toxicity was evaluated using the MICROTOX analyzer which based on the bioluminescence bacterium *Vibrio fischeri*. Additionally, toxicity was determined on extracts prepared with water in room temperature with or without ultrasound water bath assistance. Then all the above extracts were further extracted with petroleum ether in order to remove the volatile components and the toxicity tests were also conducted on the volatile free aqueous solutions. According to the results, the extraction procedure was found to influence toxicity of the extracts. Volatile components in the extracts found to act in synergism with water soluble substances. Interaction of water soluble and volatile organic compounds was evaluated through the estimation of synergism ratios (SR). Toxicity of plant extracts examined was not correlated to their total phenolic content and antioxidant activity, but it was found to be linked to the interaction of water soluble and volatile organic compounds.

The biological activity of aqueous extracts was further screened against the phytopathogenic fungal species *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* and the entomopathogenic species *Beauveria bassiana*. Biological activity was screened on crude aquatic extracts and their aqueous phase (-bpte) after further extraction with petroleum ether. All the *Lamiaceae* species examined were found to enhance significantly the mycelium growth. All -bpte extracts stimulated conidia production in high percentages more +300% in some cases compared to the control. The differences in biological activity between crude and -bpte extracts for each plant species were attributed through the calculation of correspondent synergism ratios (SR) to the interaction between volatile and water – soluble substances. Qualitative analysis of all plant extracts was conducted using High Performance Liquid Chromatography. Rosmarinic acid, detected as the most abundant phenolic compound in all

extracts analyzed and found to correlate ( $R^2$ : 0.84) with the stimulation effect on spore production of *A. alternata*.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was also employed in order to further investigate the bioactivity of plant extracts to *A. alternata*. Differences of original spectra were assigned mainly to amides of proteins. The second derivative transformation of spectra revealed changes in spectral regions corresponding to absorptions of the major cellular constituents such as cell membrane and proteins. Principal component analysis of the second derivative transformed spectra confirmed that fatty acids of the cell membranes, amides of proteins and polysaccharides of the cell wall had the major contribution to data variation. FTIR band area ratios were found to correlate with fungal mycelium growth.

Furthermore, all extracts were examined on aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in CCA (Coconut Cream Agar) medium. The toxin was extracted with TLC method and results showed notable reduction of aflatoxin production caused by some aromatic plants extracts. The effect of the different extracts at molecular level was further analyzed by Real-time PCR on expression of genes *Nor-1* and *AflR* that are involved in aflatoxin biosynthesis pathway. Quantitative determination of aflatoxin reduction due to the treatment by plant extracts was conducted by ELISA method in *in-vivo* experiments of the same extracts on *Pistachia vera*. Results underline that aqueous extracts of Greek native medicinal and aromatic plants contain bioactive compounds which can affect gene expression, and *Melissa officinalis* extract can be used as a strong anti-aflatoxigenic factor by the food industry.

Discipline:                              Agricultural Sciences  
    Other Agricultural Sciences

Keywords: Medicinal and Aromatic plants, Toxicity, Bioactivity, FT-IR Spectrometry, Anti-aflatoxigenic effect

## Στόχοι και σχεδιασμός

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτελεί η μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης και της τοξικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων καλλιεργούμενων και αυτοφυών φαρμακευτικών φυτών για την αξιοποίησή τους από τη βιομηχανία τροφίμων και τη βιολογική γεωργία.

Τα εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών και τα αιθέρια έλαια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών έχουν μελετηθεί εκτεταμένα ως προς τη σύνθεση και τη βιολογική τους δράση. Εν τούτοις, υπάρχουν λίγες εργασίες σχετικές με την αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων τους καθώς και με την εκτίμηση της τοξικότητάς τους όταν αυτά καταναλώνονται ως αφεψήματα ή προστίθενται στο φαγητό ως αρωματικά. Πρόσθετα, ακόμη πιο λίγες είναι οι μελέτες εκείνες που ασχολούνται με τα ενδημικά φυτά της Μεσογειακής χλωρίδας.

Σε πρώτη φάση η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στα αφεψήματα και τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Προσδιορίστηκε η τοξικότητά τους με τον αναλυτή τοξικότητας Mictotox® και υπολογίσθηκαν τα μέγιστα όρια ημερήσιας κατανάλωσης για κάθε φυτικό είδος που μελετήθηκε. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκχύλιση των προαναφερομένων υδατικών εκχυλισμάτων με πετρελαϊκό αιθέρα, και προσδιορισμός της αντίστοιχης τοξικότητας των υδατικών εκχυλισμάτων που ανέκυψαν. Οι διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ των αρχικών εκχυλισμάτων και αυτών που προέκυψαν μετά την περεταίρω εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα οφείλονται στο πτητικό κλάσμα που προέρχεται από τη φυτική δρόγη και εισέρχεται στην υδατική φάση κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Ο ακριβής ρόλος του πτητικού κλάσματος στην τοξικότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τον υπολογισμό του δείκτη συνέργειας SR.

Σε επόμενη φάση, ελέγχθηκε η βιολογική δράση των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φυτικής δρόγης, έναντι φυτοπαθογόνων και εντομοπαθογόνων μυκήτων. Προσδιορίστηκε και σε αυτή την περίπτωση η συνέργεια στη βιολογική δράση του πτητικού και αμιγώς υδατικού κλάσματος κάθε εκχυλίσματος. Στη συνέχεια έγινε ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών που περιέχονται σε κάθε εκχύλισμα και συσχέτιση της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος σε καθένα από αυτά με δείκτες βιολογικής δράσης επί των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Η επόμενη πειραματική ενότητα που σχεδιάστηκε περιλάμβανε χρήση φασματοσκοπίας FT-IR και χημειομετρίας με σκοπό τη διερεύνηση των δομικών αλλαγών



που υφίστανται τα κύτταρα κάθε οργανισμού στόχου μετά την επώασή του με κάθε ένα εκχύλισμα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

Στη συνέχεια έγινε διερεύνηση της επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή αφλατοξίνης από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Aspergillus flavus*. Η διερεύνηση έγινε καταρχήν με δοκιμή *in-vitro* σε καλλιέργειες σε τριβλίο και ποιοτική ανίχνευση των αφλατοξινών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Τα αποτελέσματα από τις *in-vitro* δοκιμές ήταν ενθαρρυντικά καθώς τα εκχυλίσματα της ρίγανης και του μελισσόχορτου βρέθηκε να περιορίζουν αισθητά την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A. flavus* χωρίς όμως να περιορίζουν την ανάπτυξη του μυκηλίου ή την παραγωγή κονιδίων. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των εκχυλισμάτων στην παραγωγή αφλατοξίνης από τον μύκητα με μοριακές μεθόδους προκειμένου να εξακριβωθεί η επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* και του βιοσυνθετικού γονιδίου *Nor-1* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αφλατοξίνης από το μύκητα *A. flavus*. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction). Οι μοριακές μέθοδοι υπέδειξαν περιορισμό της έκφρασης του βιοσυνθετικού γονιδίου *Nor-1* και του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* υπό την επίδραση συγκεκριμένων εκχυλισμάτων επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι το αποτέλεσμα του περιορισμού παραγωγής αφλατοξίνης από τον *A. flavus* οφείλεται στην επίδραση των εκχυλισμάτων και των συστατικών τους σε επίπεδο γονιδίων.

Ακολούθησε μια *in-vivo* βιοδοκιμή με τα ίδια εκχυλίσματα, χρησιμοποιώντας καρπούς *Pistacia vera* προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα εκχυλίσματα μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή αφλατοξίνης και εκτός της καλλιέργειας σε τριβλίο. Αυτή τη φορά, η αφλατοξίνη προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη μέθοδο ELISA. Και στις *in-vivo* δοκιμές επαληθεύθηκε η περιοριστική δράση κάποιων εκχυλισμάτων στην παραγωγή αφλατοξίνης, με το μελισσόχορτο συγκεκριμένα, να την περιορίζει σχεδόν απόλυτα.

Η ανάδειξη της βιολογικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων χαμηλού κόστους παραγωγής, όπως είναι τα υδατικά εκχυλίσματα, μπορεί να οδηγήσει σε νέα προϊόντα φυτικής προέλευσης με υψηλή προστιθέμενη αξία μεγιστοποιώντας την εμπορική αξία των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών κι ενισχύοντας άμεσα την αγροτική οικονομία. Πρόσθετα, οι απλές διαδικασίες παραγωγής των υδατικών εκχυλισμάτων που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη είναι δυνατό να δώσουν τη δυνατότητα αξιοποίησης των αρωματικών και

φαρμακευτικών φυτών και σε μικρομεσαίες μονάδες που δε διαθέτουν τα κεφάλαια για επενδύσεις σε εξοπλισμό μεγάλου κόστους.

Κάθε πειραματική ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατέληξε σε δημοσιοποίηση των αποτελεσμάτων της είτε σε Διεθνές Συνέδριο με κριτές είτε σε Επιστημονικό Περιοδικό με κριτές, ή και τα δύο. Οι σχετικές δημοσιεύσεις επισυνάπτονται στο τέλος κάθε πειραματικής ενότητας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη .....	i
Abstract .....	iv
Στόχοι και Σχεδιασμός .....	vi
Περιεχόμενα .....	ix

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>I.1. Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά της Μεσογειακής χλωρίδας .....</b>	<b>3</b>
I.1.1 Οικογένεια <i>Lamiaceae</i> .....	7
I.1.1.1 Ύσσωπος - <i>Hyssopus officinalis</i> L .....	8
I.1.1.2 Φασκόμηλο - <i>Salvia officinalis</i> L .....	11
I.1.1.3 Μελισσόχορτο - <i>Melissa officinalis</i> L .....	16
I.1.1.4 Δίκταμο - <i>Origanum dictamnus</i> L .....	19
I.1.1.5 Ρίγανη - <i>Origanum vulgare</i> L .....	23
I.1.2 Κρόκος - <i>Crocus sativus</i> L. (οικ. <i>Iridaceae</i> ) .....	27
<b>I.2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά .....</b>	<b>33</b>
I.2.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες .....	35
I.2.1.1 Φαινολικές ενώσεις .....	38
I.2.1.2 Τερπένια .....	44
I.2.2 Βιολογική δράση δευτερογενών μεταβολιτών – μηχανισμοί δράσης .....	51
I.2.2.1 Βιολογική δράση υδατοδιαλυτών συστατικών .....	51
I.2.2.3 Βιολογική δράση μη υδατοδιαλυτών συστατικών.....	54
<b>I.3. Φυτοπαθογόνοι και εντομοπαθογόνοι μύκητες .....</b>	<b>63</b>
I.3.1 <i>Alternaria alternata</i> .....	66
I.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	68
I.3.3 <i>Beauveria bassiana</i> .....	69
I.3.4 <i>Aspergillus flavus</i> .....	70
I.3.5 Βιολογική δράση φυτικών εκχυλισμάτων σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες .....	72
<b>I.4. Εκτίμηση τοξικότητας .....</b>	<b>81</b>
I.4.1 Βασικές Αρχές .....	83
I.4.1.1 Επίπεδα τοξικής δράσης .....	85
I.4.1.2 Μηχανισμοί τοξικής δράσης .....	86
I.4.2 Δοκιμές ελέγχου τοξικότητας .....	86
I.4.2.1 Αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών .....	89
I.4.2.2 Εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων .....	90
I.4.2.3 Κατηγοριοποίηση δειγμάτων .....	91
I.4.2.4 Επιπτώσεις τοξικότητας σε μικροοργανισμούς .....	91
I.4.3 Το βακτήριο <i>Vibrio fischeri</i> .....	92
I.4.4 Αναλυτής τοξικότητας Microtox .....	92
I.4.4.1 Προετοιμασία οργάνου .....	93
I.4.4.2 Πλήρωση κυψελίδων .....	95
I.4.4.3 Μεταφορά βακτηρίων .....	96
I.4.4.4 Μεταφορά δείγματος .....	97

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ****ΙΙ.1 Εκτίμηση τοξικότητας αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών**

ΙΙ.1.1 Εισαγωγή .....	103
ΙΙ.1.2 Υλικά και μέθοδοι .....	104
ΙΙ.1.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού .....	104
ΙΙ.1.2.2 Υλικά & Εξοπλισμός .....	105
ΙΙ.1.2.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων .....	106
ΙΙ.1.2.4 Εκτίμηση τοξικότητας με τον αναλυτή Microtox .....	107
ΙΙ.1.2.5 Εκτίμηση συνέργειας .....	109
ΙΙ.1.2.6 Στατιστική επεξεργασία .....	109
ΙΙ.1.3 Αποτελέσματα – συζήτηση .....	110
ΙΙ.1.4 Συμπεράσματα .....	116
Ανακοινώσεις σε Συνέδρια / Δημοσιεύσεις σε περιοδικά	
Άρθρο σε περιοδικά με κριτές .....	119
«Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. 2014. Industrial Crops and Products 53 pp 46-54»	
Παρουσιάσεις σε συνέδρια .....	128
Πρακτικά συνεδρίων .....	132
«Total phenolic compounds, antioxidant activity and toxicity of selected medicinal and aromatic plants. MICROBIOKOSMOS, 2012»	

**ΙΙ.2 Εκτίμηση της βιολογικής δράσης υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μήκυτες**

ΙΙ.2.1 Εισαγωγή .....	137
ΙΙ.2.2 Υλικά και μέθοδοι .....	139
ΙΙ.2.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού .....	139
ΙΙ.2.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων .....	139
ΙΙ.2.2.3 Αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό .....	141
ΙΙ.2.2.4 Καλλιέργειες Μυκήτων ( <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Beauveria bassiana</i> ) .....	141
ΙΙ.2.2.5 Μελέτη των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC .....	143
ΙΙ.2.2.6 Εκτίμηση συνέργειας .....	145
ΙΙ.2.2.7 Στατιστική Επεξεργασία .....	145
ΙΙ.2.3 Αποτελέσματα – συζήτηση .....	146
ΙΙ.2.3.1 Βιολογική δράση φυτικών εκχυλισμάτων .....	146
ΙΙ.2.3.2 Μελέτη των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) .....	167
ΙΙ.2.3.3 Εκτίμηση δεικτών συνέργειας .....	178
ΙΙ.2.4 Συμπεράσματα .....	181
Ανακοινώσεις σε Συνέδρια / Δημοσιεύσεις σε περιοδικά	
Πρακτικά συνεδρίων .....	185
Παρουσιάσεις σε συνέδρια .....	188
«Biological activity of aromatic plants aqueous extracts against plant pathogenic and entomopathogenic fungi. MICROBIOKOSMOS, 2012»	

### II.3 Χρήση φασματοσκοπίας FTIR για την εκτίμηση της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες

II.3.1 Εισαγωγή .....	193
II.3.2 Υλικά και μέθοδοι .....	195
II.3.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού .....	195
II.3.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων .....	195
II.3.2.3 Αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό .....	196
II.3.2.4 Καλλιέργειες μυκήτων .....	196
II.3.2.5 Ανάλυση δειγμάτων με φασματοσκοπίας FT-IR .....	197
II.3.3 Αποτελέσματα – συζήτηση .....	200
II.3.4 Συμπεράσματα .....	213
Ανακοινώσεις σε Συνέδρια / Δημοσιεύσεις σε περιοδικά	
Άρθρα σε περιοδικά με κριτές .....	217
«FTIR spectroscopic evaluation of changes in the cellular biochemical composition of the phytopathogenic fungus <i>Alternaria alternata</i> induced by extracts of some Greek medicinal and aromatic plants»	

### II.4 Αποτίμηση της δράσης των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή μυκοτοξινών από τον *Aspergillus flavus*

II.4.1 Εισαγωγή .....	229
II.4.2 Υλικά και μέθοδοι .....	231
II.4.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού .....	231
II.4.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων .....	232
II.4.2.3 Αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό .....	232
II.4.2.4 Βιοδοκιμές σε στερεές καλλιέργειες <i>Aspergillus flavus</i> .....	232
II.4.2.5 Μέθοδος ανίχνευσης αφλατοξινών με χρήση TLC .....	233
II.4.2.6 Απομόνωση RNA από μυκήλιο του <i>Aspergillus flavus</i> .....	235
II.4.2.7 Εκτίμηση βιολογικής δράσης με μοριακές τεχνικές – Διερεύνηση επιτυχίας μετάλλαξης με Real time PCR .....	236
II.4.2.8 <i>In vivo</i> δοκιμή επίδρασης εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή αφλατοξίνης .....	240
II.4.2.9 Εκτίμηση αφλατοξινών στις <i>in-vivo</i> δοκιμές με τη μέθοδο ELISA .....	240
II.4.3 Αποτελέσματα – συζήτηση .....	241
II.4.4 Συμπεράσματα .....	246
Ανακοινώσεις σε Συνέδρια / Δημοσιεύσεις σε περιοδικά	
Πρακτικά συνεδρίων .....	249
Παρουσιάσεις σε συνέδρια .....	252

Συμπεράσματα .....	255
--------------------	-----

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Περιεχόμενα εικόνων .....	299
Περιεχόμενα πινάκων .....	301
Περιεχόμενα σχημάτων .....	305

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



# I.1

## Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά







Ο άνθρωπος, από την αρχαιότητα στηρίζεται σε φυσικούς και ζωικούς πόρους για την κάλυψη των αναγκών του, σε τροφή, φάρμακα και καλλυντικά. Ακόμα και σήμερα, εκατοντάδες εκατομμύρια ανθρώπων στηρίζονται για τις ανάγκες της επιβίωσής τους σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης (Iqbal, 1993; Walter, 2001). Τα αρωματικά φυτά και τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνται από τους ανθρώπινους πολιτισμούς από την αρχαιότητα είτε για την ευχάριστη γεύση που δίνουν στα τρόφιμα, είτε λόγω της ιδιότητάς τους να συντηρούν τα τρόφιμα, είτε για τις θεραπευτικές ιδιότητες που τους αποδίδονταν από την παραδοσιακή ιατρική (Roby *et al.*, 2013), είτε ακόμα και για τις χρωστικές τους ιδιότητες. Στα αρωματικά φυτά απέδιδαν και άλλες ιδιότητες και συμβολισμούς. Για παράδειγμα η ματζουράνα γνωστή από αναφορές των αρχαίων Αιγυπτίων Ελλήνων και Ρωμαίων ήταν σύμβολο της ευτυχίας και της χαράς (Roby *et al.*, 2013).

Από την αρχαιότητα οι Έλληνες όπως ο Ιπποκράτης, ο Αριστοτέλης, ο Θεόφραστος και ο Διοσκουρίδης, συνέβαλαν σημαντικά στην ορθολογική χρήση των βοτάνων ως θεραπευτικά μέσα. Ακόμα και σήμερα, σε πολλές χώρες της Ευρώπης η χρήση των βοτάνων με την μορφή αφεψημάτων είναι πολύ δημοφιλής και χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική λύση για φάρμακα που προέρχονται από χημικές (συνθετικές) ουσίες. Παράλληλα, βιοδραστικές ενώσεις έχουν απομονωθεί από μεγάλο αριθμό βοτάνων που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά (Gurib-Fakim, 2006).

Στις ιστορικές αναφορές που παρατίθενται στις σελίδες που ακολουθούν υφίσταται πάντα η επιφύλαξη στο κατά πόσον η ιστορική αναφορά αναφέρεται στο ίδιο φυτικό είδος για το οποίο έχει διατηρηθεί η ονομασία αυτή μέχρι σήμερα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σε αυτό αποτελεί ο αριθμός διαφορετικών φυτικών ειδών τα οποία έχουν περιγραφεί στην αρχαία Ελλάδα, στους ρωμαϊκούς χρόνους αλλά και στο μεσαίωνα με το όνομα «δίκταμο» (Martinez-Frances *et al.*, 2015). Επιπλέον, στην περίπτωση που η ιστορική αναφορά αφορά στο ίδιο φυτικό είδος, ακόμα κι εκεί υπάρχει η επιφύλαξη στο κατά πόσο ο ενδημισμός και οι προσαρμογές του είδους με το πέρασμα του χρόνου σε κλειστά οικοσυστήματα, όπως αυτά των νησιωτικών περιοχών, έχουν επηρεάσει τους δευτερογενείς μεταβολίτες και κατά συνέπεια τη βιολογική του δράση.

Επί του παρόντος υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση των αρωματικών φυτών από τη βιομηχανία τροφίμων ως αντιοξειδωτικά συστατικά που θα ενισχύσουν τυποποιημένα τρόφιμα ως προς αυτό το χαρακτηριστικό, αλλά και ως φυσικά συντηρητικά τα οποία είτε θα αντικαταστήσουν τα χημικά αντίστοιχα, είτε θα μειώσουν την ποσότητα των χημικών συντηρητικών αν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με αυτά.

Τα αρωματικά φυτά ομαδοποιούνται σε μια ευρύτερη κατηγορία, αυτή των «Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών –ΑΦΦ» (Medicinal and Aromatic Plants –MAPs) που καλύπτουν το φάσμα των φυτών που χρησιμοποιούνται για την κάλυψη ιατρικών αναγκών καθώς και για άλλους σκοπούς όπως τρόφιμα, καρυκεύματα και καλλυντικά (Schirpmann *et al.*, 2002).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει ήδη προχωρήσει στην αποδοχή περισσότερων από 150 φυτικών ειδών των οποίων τα αιθέρια έλαια, και τα φυσικά εκχυλίσματα θεωρούνται ασφαλή να χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο χωρίς περιορισμούς στη χρήση τους (FDA, 2014a, 2014b). Η ρίγανη, το μελισσόχορτο και το φασκόμηλο περιλαμβάνονται στην ανωτέρω λίστα. Πολλά από τα αρωματικά φυτά που αναφέρονται σε αυτή τη λίστα ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae*.

Η χρήση των αρωματικών φυτών ακολουθεί τις νέες τάσεις και προωθείται από τους επαγγελματίες στο χώρο της υγείας λόγω της ιδιότητάς τους ως ισχυρά αντιοξειδωτικά. Στην Πορτογαλία το Εθνικό Πρόγραμμα προώθησης της υγείας μέσω της διατροφής προωθεί τη χρήση των αρωματικών φυτών στα τρόφιμα καθώς μπορούν να ενισχύσουν τη γεύση των φαγητών περιορίζοντας την περιεκτικότητά τους σε αλάτι το οποίο αποδεδειγμένα σχετίζεται με την υπέρταση. Πέραν της γευστικής ενίσχυσης στα φαγητά και των αντιοξειδωτικών συστατικών που περιέχουν, τα αρωματικά φυτά είναι πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών (Α, C, και βιταμινών του συμπλέγματος Β), μετάλλων (ασβέστιο, φώσφορο, νάτριο, κάλιο και σίδηρο) καθώς και ενεργών βιοδραστικών συστατικών τα οποία αν και περιέχονται σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες, είναι αποτελεσματικά ως προς τη δράση τους (Carvalho Costa *et al.*, 2015). Μεταξύ των ενώσεων που περιέχουν, τα φαινολικά συστατικά είναι αυτά που παίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο όσον αφορά τη βιολογική τους δράση. Σε κάθε περίπτωση, και παρά το γεγονός ότι καταναλώνονται σε μικρές ποσότητες δεν πρέπει να παραμερίζονται ενδεχόμενες αρνητικές επιπτώσεις από τυχόν υπερκατανάλωσή τους.

Σε εφαρμογή έχει τεθεί από 1<sup>η</sup> Μαΐου 2011 η οδηγία της Ε.Ε. με το χαρακτηριστικό όνομα Traditional Herbal Medicinal Products, THMPD Directive η οποία θέτει προδιαγραφές για την απόκτηση άδειας κυκλοφορίας των φυτικών παραδοσιακών φαρμάκων. Με βάση την οδηγία αυτή, μεγάλο μέρος φαρμακευτικών σκευασμάτων με βάση τα βότανα θα πρέπει να υποβληθούν σε διαδικασίες έγκρισης αντίστοιχες με τα φάρμακα σύνθεσης προτού κυκλοφορήσουν στην αγορά. Το τελευταίο, αφορά φυτικά φάρμακα ή ουσίες για τα οποία η ιατρική χρήση τους δεν αποδεικνύεται για περισσότερο από 30 χρόνια, 15 από τα οποία στα κράτη – μέλη της Ε.Ε.

Πρόσθετα, για τα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα, όλες οι διαδικασίες παραγωγής και επεξεργασίας τους θα πρέπει να συμμορφώνονται πλήρως με τις δυο κατευθυντήριες γραμμές της Ε.Ε. για την υγιεινή των τροφίμων και τις γενικές αρχές για την υγιεινή των τροφίμων του Διατροφικού Κώδικα (Codex Alimentarius) καθώς και την ευρωπαϊκή οδηγία για την ορθή παρασκευαστική πρακτική. Επί του παρόντος σε Ευρωπαϊκό Επίπεδο τα αρωματικά φυτά και η αξιοποίησή τους από τη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικά γεύσης γνωρίζει άνθηση εξαιτίας του γεγονός ότι είναι τα μόνα που χαρακτηρίζονται, και για τα οποία επιτρέπεται κατ αποκλειστικότητα να χρησιμοποιείται ο όρος «φυσικές αρωματικές ύλες» με βάση τον κανονισμό 1334/2008.

Τα φυτά, η βιολογική δράση των οποίων εξετάζεται στην παρούσα μελέτη, ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* με εξαίρεση τον κρόκο που ανήκει στην οικογένεια *Iridaceae*. Στις επόμενες σελίδες ακολουθεί μια σύντομη παρουσίαση των υπό μελέτη φυτικών ειδών με αναφορές στις ιδιότητές τους, τη χημική τους σύσταση αλλά και τη χρήση τους μέχρι σήμερα.

### 1.1.1 Οικογένεια *Lamiaceae*

Η οικογένεια *Lamiaceae* (*Labiatae*), περιλαμβάνει περίπου 235 γένη και 7173 είδη (Harley *et al.*, 2004). Απαντάται σε αρκετές περιοχές ανά τον κόσμο αλλά απουσιάζει από κρύες περιοχές μεγάλου γεωγραφικού πλάτους ή υψομέτρου (Harley *et al.*, 2004) και επικεντρώνεται κυρίως στη Μεσόγειο. Απαντάται σε όλους τους τύπους βλάστησης σε κλιματικά διαφορετικές περιοχές ενώ πολλά από τα είδη της είναι ενδημικά (Kokkini *et al.*, 1994).

Τα είδη της οικογένειας αυτής είναι συνήθως αρωματικά, αδενώδη (Baden, 1991) και πηγή αιθέριων ελαίων με τη χρήση τους να επικεντρώνεται στην ιατρική, τη μαγειρική και την κοσμετολογία (Kokkini *et al.*, 2003; Gurib-Fakim, 2006; Stagos *et al.*, 2012). Βιβλιογραφικές αναφορές υποδεικνύουν ότι τα αιθέρια έλαια καθώς και τα εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, έχουν αξιόλογη βιολογική δραστηριότητα (Scalbert *et al.*, 2000) που αποδίδεται κυρίως στις πολυφαινόλες και τα τερπένια (Stagos *et al.*, 2012) που περιέχονται σε αυτά.

Στην ελληνική αγορά, διακινούνται εμπορικά 30 taxa που ανήκουν σε 15 γένη της οικογένειας *Lamiaceae* (Hanlidou *et al.*, 2004; Karousou *et al.*, 2007, 2011). Τα περισσότερα taxa ανήκουν στα γένη *Mentha* και *Sideritis* ενώ ακολουθούν τα γένη *Origanum*, *Salvia*, *Acinos*, *Thymys* και *Teucrium*. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων Euro+Med 2006 από τα 30 taxa, ενδημικά στην Ανατολική Μεσόγειο και των Βαλκανίων είναι τα 15 που ανήκουν σε 6

γένη (*Salvia pomifera* L., *Salvia fruticosa* Miller, *Origanum dictamnus* L., *Acinos suaveolens*, *Satureja thymbra* L., *Thymus sibthorpii* Benth. και *Sideritis* spp.).

#### 1.1.1.1 Ύσσωπος – *Hyssopus officinalis* L.

Ο ύσσωπος *Hyssopus officinalis* L. είναι μια αρωματική, πολυετής πόα (6-7 χρόνια διάρκεια ζωής) με πολλούς βλαστούς τετράγωνους που εκφύονται από τη ρίζα, φτάνουν σε ύψος 30-60 cm και οι οποίοι ξυλοποιούνται. Τα φυτά του γένους *Hyssopus* έχουν ύψος μέχρι 60 cm και τα φύλλα είναι γραμμικά ή σχεδόν γραμμικά. Ο κάλυκας είναι ακτινόμορφος, μπλέ-μωβ χρώματος και τα άνθη (Εικ. 1.1.1) είναι διαταγμένα κατά σπονδύλους ροζ ή λευκού χρώματος, σχηματίζοντας ακτινωτή ταξιανθία.



Εικόνα 1.1.1 Άνθη *Hyssopus officinalis*

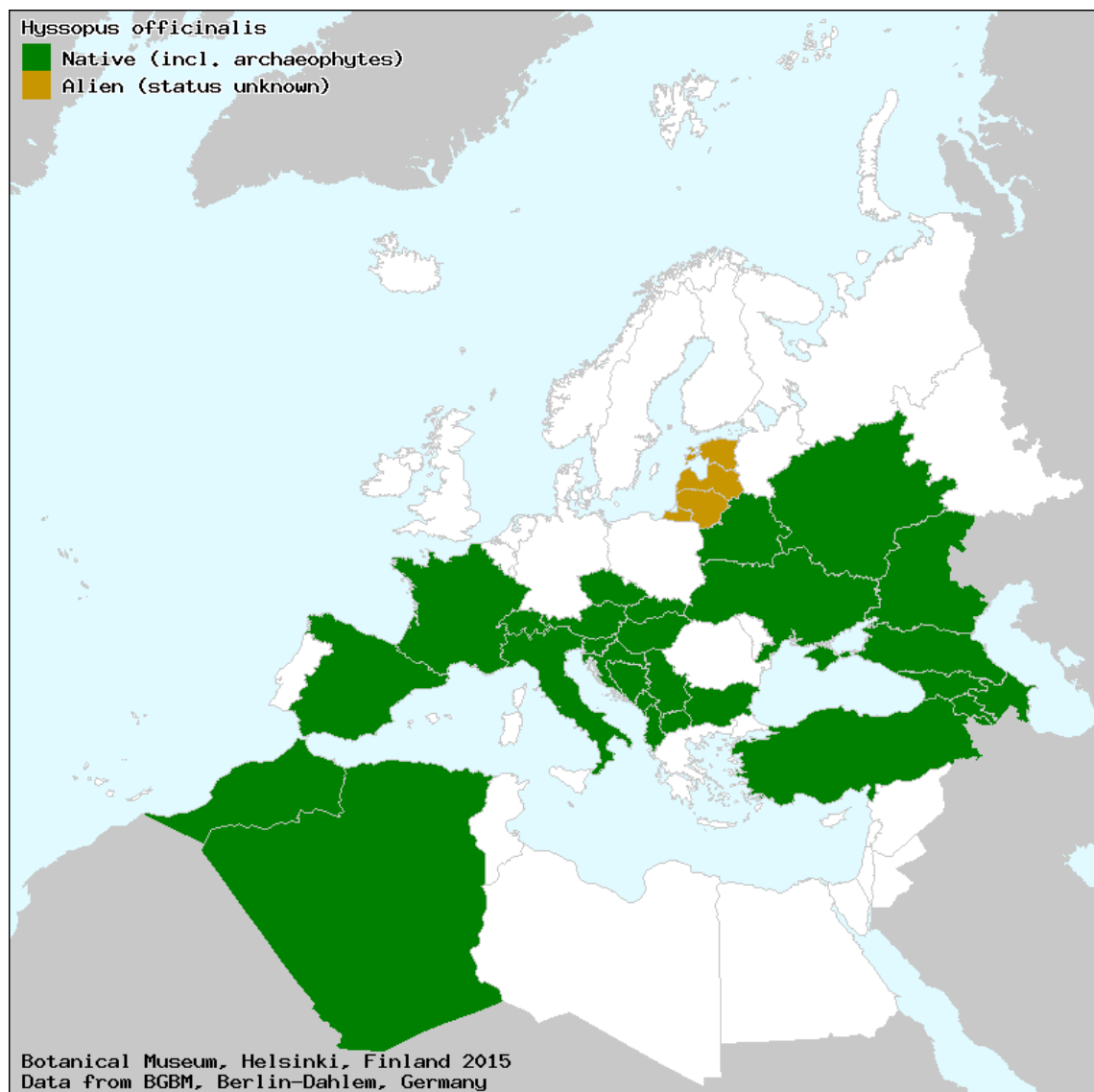
Ο ύσσωπος ευδοκιμεί σε περιοχές με χαμηλό υψόμετρο έως και 400 m. Παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή τόσο στην καλοκαιρινή ξηρασία όσο και στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα. Δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε εδάφη πολύ βαριά που δεν αποστραγγίζονται. Μπορεί όμως να καλλιεργηθεί σε εδάφη πετρώδη, ξηρικά και ασβεστούχα. Όταν χρησιμοποιείται για παραγωγή αιθέριου ελαίου τότε η συλλογή γίνεται στο στάδιο της πλήρους άνθησης που είναι συνήθως τέλη Μαΐου. Η συλλογή του ξεκινάει το 2ο έτος.

Ο *Hyssopus officinalis* L. αυτοφύεται από την Ισπανία μέχρι την Ινδία. Έχει εγκλιματιστεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, όπου αναπτύσσεται σε κήπους και κατά μήκος των δρόμων. Η εξάπλωσή του στην Ευρώπη παρουσιάζεται στο **σχήμα 1.1.1**. Πρόσφατο εύρημα αποτελεί ότι στην Ελλάδα, αυτοφύεται το υποείδος *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Briq, (Kokkini et al. 1994) γεγονός για το οποίο δεν έχουν ενημερωθεί οι βάσεις δεδομένων που δίνουν τα στοιχεία για τον χάρτη στο **σχήμα 1.1.1**.

Ο ύσσωπος χρησιμοποιείται ως ιεροτελεστικό, μαγικικό και φαρμακευτικό φυτό από την αρχαιότητα. Στην αρχαία Ελλάδα αναφέρεται από τον Ιπποκράτη, το Γαληνό και το Διοσκουρίδη ως αντιφλεγμονώδες και αποχρεμπτικό. Ο Αρχιγένης από την Απάμεια,

χρησιμοποίησε μεταξύ άλλων και τον ύσσωπο για τη θεραπεία κάποιων μορφών καρκίνου (Karpozilos & Pavlidis, 2004).

Ιδιαίτερη αναφορά στον ύσσωπο γίνεται στην Παλαιά Διαθήκη όπου τον χρησιμοποιούσαν για τον εξαγνισμό των ναών, καθώς αποτελούσε ανέκαθεν για τους εβραίους σύμβολο πνευματικής κάθαρσης. Κατά τους ρωμαϊκούς χρόνους χρησιμοποιήθηκε για την απολύμανση σπιτιών από τις ασθένειες. Ο ύσσωπος αναφέρεται σε όλες τις βοτανολογίες του μεσαίωνα, όπου τον καλλιεργούσαν κατά κύριο λόγο στους κήπους μοναστηριών και τον χρησιμοποιούσαν τόσο ως αρωματικό σε φαγητά και ποτά αλλά και ως φαρμακευτικό φυτό του οποίου παρελάμβαναν με απόσταξη το αιθέριο έλαιο.



Σχήμα Ι.1.1 Η Εξάπλωση του *Hyssopus officinalis* στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο

**Πίνακας I.1.1** Ιδιότητες του *Hyssopus officinalis* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος / δραστική ουσία	Ιδιότητα	Πηγή
Αιθέριο έλαιο	Αντιοξειδωτική δράση	Dzamic <i>et al.</i> , 2013; Venditti <i>et al.</i> , 2015
Λιναλοόλη –αιθέριο έλαιο	Κυτταροτοξική δράση	Chang and Shen, 2014
Λιναλοόλη –αιθέριο έλαιο	Αντιμικροβιακή δράση έναντι των <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. Coli</i> , <i>Candida albicans</i>	Mazzanti <i>et al.</i> , 1998
Υδατικό εκχύλισμα	Ανοσορρυθμιστική δράση Αντιμικροβιακή δράση έναντι μυκήτων	Venditti <i>et al.</i> , 2015

**Πίνακας I.1.2** Συστατικά εκχυλισμάτων του *Hyssopus officinalis* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος	Συστατικά	Αναφορές
Αιθέριο έλαιο	Λιναλοόλη, Γερμακρένιο, β-πινένιο, λιμονένιο, 1,8-κινεόλη, β-οκιμένιο, μεθυλευγενόλη, Ισοπιννοκαμφόνη, πινοκαρβόνη, θυμόλη, β-μπισαμπολόλη, καρβακρόλη, τερπινεόλη, καρυοφιλένιο	Venditti <i>et al.</i> , 2015; Dzamic <i>et al.</i> , 2013; Mazzanti <i>et al.</i> , 1998; Ozer <i>et al.</i> , 2005; Fathiazad <i>et al.</i> , 2011;
Υδατικό / Υδραλκοολικό εκχύλισμα	Ορσουλικό οξύ, Ολεανολικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, π-υδροβενζοϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, π-υδροβενζοϊκό οξύ, συρινγγικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, γεντισικό οξύ, κατεχίνη, απιγενίνη, κουερσετίνη, λουτεολίνη και οι γλυκοσίδες τους	Venditti <i>et al.</i> , 2015; Ovesna <i>et al.</i> , 2004; Zgorka & Glowniak, 2001; Dzamic, 2013; Proestos <i>et al.</i> , 2005; Fathiazad <i>et al.</i> , 2011; Babovic <i>et al.</i> , 2010; Hatipoglou <i>et al.</i> , 2013

Ο ύσσωπος παρουσιάζει σπασμολυτική δράση και χαρακτηρίζεται αποτελεσματικός για την θεραπεία του βήχα, της βρογχίτιδας, του βρογχικού άσθματος και άλλων αναπνευστικών ασθενειών. Το ισχυρό άρωμα του αιθέριου ελαίου του ύσσωπου είναι συστατικό πολλών ηδύποτων. Χρησιμοποιείται επίσης ως συστατικό σε κολόνιες και αρώματα. Το αιθέριο έλαιο του ύσσωπου παρουσιάζει αντιβακτηριδιακή δράση και μεταξύ άλλων χρησιμοποιείται στην κοσμετολογία για προστασία και καθαρισμό των ευαίσθητων επιδερμίδων. Σε σπάνιες περιπτώσεις τα φύλλα του χρησιμοποιούνται στην μαγειρική ως αρωματική ουσία για σούπες, σαλάτες κ.ά.. Είναι ισχυρό μελισσοτροφικό φυτό.

### 1.1.1.2 Φασκόμηλο – *Salvia officinalis* L.



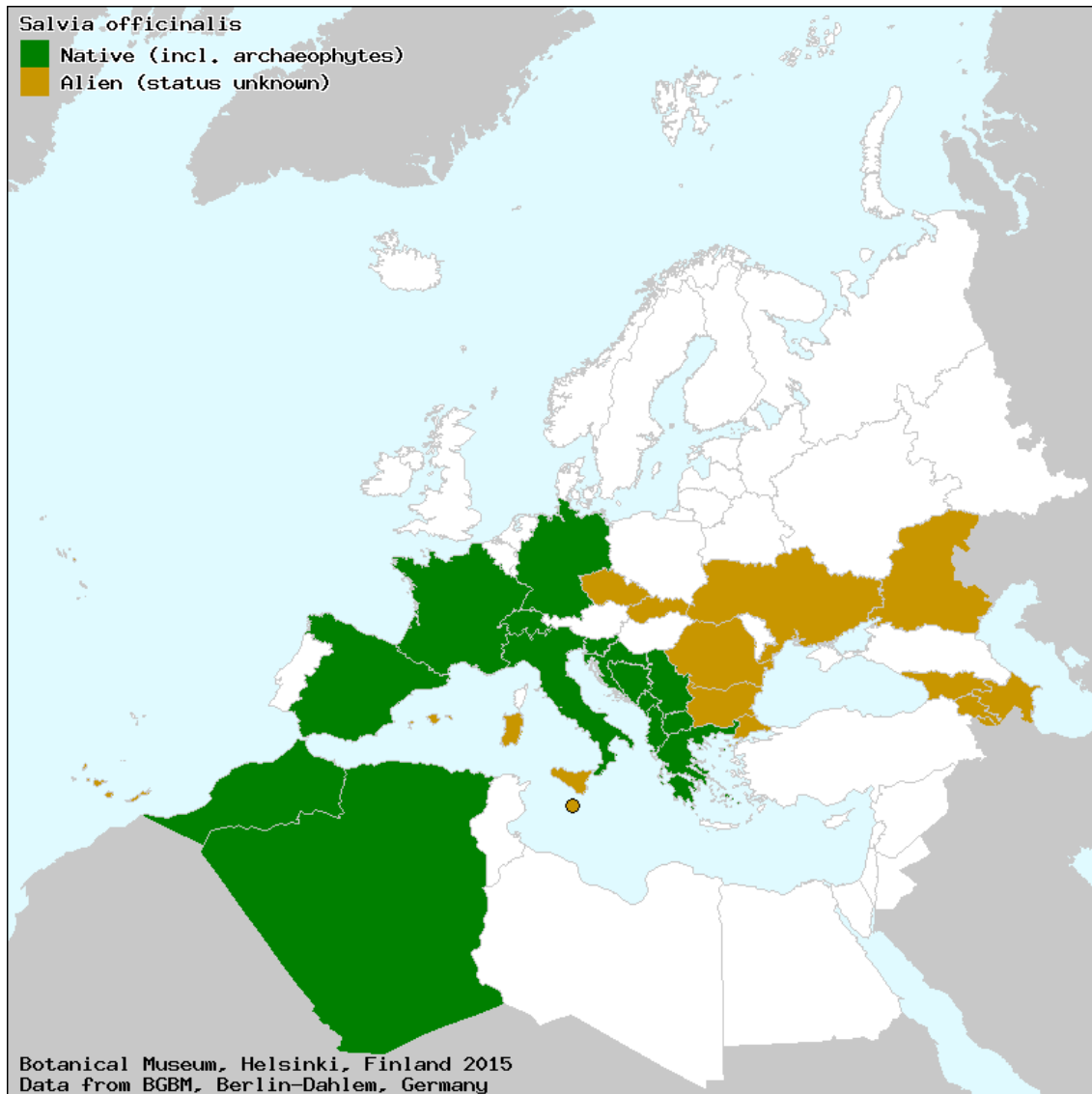
Εικόνα 1.1.2 *Salvia officinalis*

Το φασκόμηλο- *Salvia officinalis* L. (Εικ. 1.1.2) γνωστό επίσης στα αγγλικά ως sage είναι πολυετής πόα που φύεται σε χέρσα, ξηρά και πετρώδη εδάφη και ανήκει στο γένος *Salvia* που είναι ένα από τα πολυπληθέστερα γένη της οικογένειας των χειλανθών (*Lamiaceae*). Είναι μικρός θάμνος μέχρι 80 εκατοστά σε ύψος με ξυλώδη στελέχη, κοντά στη βάση διακλαδισμένα ψηλότερα. Τα άνθη του διατάσσονται σε μασχαλιαίους σπονδύλους χρώματος μπλε βιολετί και ανθίζουν τους μήνες από Μάιο έως Ιούνιο (Οικονομίδη & Τζάκου, 2015; Mabberley, 1997; Hedge, 1972; Wichtl & Bisset, 1994). Οι φυσικές θέσεις εξάπλωσης του φυτού (Σχ. 1.1.2) βρίσκονται στη Βαλκανική χερσόνησο, όπου απαντάται στην Ελλάδα και κατά μήκος των ακτών της Αδριατικής, στη βόρεια και κεντρική Ισπανία, στη Γαλλία, και στην Ιταλία.

Η επιστημονική ονομασία *Salvia* στα λατινικά, προέρχεται από το ρήμα *salvere* που σημαίνει, θεραπεύω και αντανakλά τις πολυάριθμες αναγνωρισμένες θεραπευτικές του ιδιότητες (Blumenthal, 2000; Dweck, 2000), καθώς θεωρούνταν ιερό φυτό, φυτό της αθανασίας και το χρησιμοποιούσαν σε θρησκευτικές τελετές. Εκπρόσωποι του γένους *Salvia* χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική πολλών πολιτισμών με πιο γνωστή στη δυτικοευρωπαϊκή ιατρική τη *Salvia officinalis*. Στην Αίγυπτο πιθανολογείται ότι χρησιμοποιούσαν το φασκόμηλο από το 6.000 π.χ. για την ενίσχυση της γυναικείας γονιμότητας. Στην αρχαία Ελλάδα όπου αναφέρεται ότι είναι πιθανό να καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά, θεωρείτο ιερό βότανο, αφιερωμένο στο Δία, και η χρήση του ήταν είτε ως τονωτικό του μυαλού και του σώματος, είτε ως επούλωτικό για την περιποίηση πληγών με τη μορφή επιθεμάτων, την αντιμετώπιση δηγμάτων φιδιών είτε για την αύξηση της γυναικείας γονιμότητας. Ο Διοσκουρίδης παρασκεύαζε υδατικό διάλυμα από το φασκόμηλο για τον καθαρισμό των πληγών, καθώς και την αντιμετώπιση της βραχνάδας και του βήχα (Blumenthal, 2000). Με βάση την ίδια πηγή, ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος κατέγραψε μεταξύ των



προαναφερόμενων ιδιοτήτων του φυτού τις ευεργετικές ιδιότητες που παρουσίαζε στη λειτουργία της μνήμης αλλά και στη θεραπεία εσωτερικών πληγών στο λαιμό και το στόμα σε συνδυασμό με κρασί, αγιόκλημα, δεντρολίβανο, πεντάνευρο και μέλι. Τόσο ο Διοσκουρίδης, όσο και ο Γαληνός χρησιμοποιούσαν παρασκευάσματα από τη *Salvia officinalis* ως αιμοστατικά, διουρητικά, τονωτικά και εμμηναγωγά (Dweck, 2000).



**Σχήμα 1.1.2** Η Εξάπλωση της *Salvia officinalis* στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο

Η φήμη και η χρήση του φασκόμηλου στην παραδοσιακή αρχαία ελληνική ιατρική ξεπέρασε τα σύνορα της μεσογείου και ταξίδεψε μέχρι την Ινδία, την Κίνα και την Ιαπωνία όπου ενσωματώθηκε στα παραδοσιακά ιατρικά τους συστήματα αλλά και στις φυλές των Ινδιάνων της Αμερικής. Με βάση τις ιστορικές πηγές (Dweck, 2000), στη μεγάλη επιδημία

πανώλης που ξέσπασε στην Τουλούζη το 1630, οι κλέφτες λεηλατούσαν τα πτώματα χωρίς να μολυνθούν από την ασθένεια χάρη σε ένα μείγμα που χρησιμοποιούσαν γνωστό ως «Ξύδι των τεσσάρων Ληστών» το οποίο έφτιαχναν από φασκόμηλο, θυμάρι λεβάντα και δεντρολίβανο. Τη συνταγή του μείγματος την αποκάλυψαν οι ληστές όταν συνελήφθησαν προκειμένου να αποφύγουν τη θανατική καταδίκη.

Στην κεντρική Ευρώπη, η *Salvia officinalis* καλλιεργείτο σε μοναστήρια και κήπους από τον 8<sup>ο</sup> αιώνα, με χαρακτηριστική αναφορά σε κυβερνητικό διάταγμα του 795 μ.χ. «Capitulare de villis» όπου σύμφωνα με αυτό η καλλιέργεια του φυτού ήταν υποχρεωτική (Teuscher, 2003). Η καλλιέργεια της στη Βόρεια Ευρώπη χρονολογείται από το Μεσαίωνα, ενώ στην Αμερική εισήχθη κατά τη διάρκεια του 17<sup>ου</sup> αιώνα (Οικονομίδη και Τζάκου, 2015; Blumenthal, 2000). Ο άγγλος βοτανοθεραπευτής John Gerard (1545-1607) υποστήριζε ότι το αφέψημα του φασκόμηλου επιτάχυνε τη λειτουργία του νευρικού συστήματος και βελτιώνει τη μνήμη, κάτι που υποστήριζε και ο ιατρός/βοτανολόγος Nicholas Culpeper (1616-1654) (Dweck, 2000; Engels, 2011) αλλά και ένας τούρκος βοτανοθεραπευτής στην περίοδο διακυβέρνησης του Σουλτάνου Μεχμέτ Δ' (1641-1693) (Orhan and Aslan, 2009). Επιπλέον των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του το φασκόμηλο υπήρξε, και είναι ακόμα και σήμερα εξαιρετικά δημοφιλές ως αρωματικό βότανο στη μαγειρική για την ισχυρή και έντονη γεύση του ειδικά στο κρέας και τα πουλερικά (Teuscher, 2003).

Από το 2009, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) εξέδωσε την τελική μονογραφία, η οποία αντικαθιστά τις μονογραφίες των ευρωπαϊκών εθνικών αρχών για την εγγραφή παραδοσιακών φαρμακευτικών προϊόντων φυτικής προέλευσης στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα που περιέχουν φασκόμηλο ως δραστικό συστατικό. Στην παραπάνω μονογραφία, οι παραδοσιακές χρήσεις που εγκρίνονται για τα φύλλα του φασκόμηλου είναι το ξηρό εκχύλισμα, το αφέψημα και το βάμμα, ενώ αναφορικά με το αιθέριο έλαιο η EMA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι κίνδυνοι δεν αντισταθμίζουν στο παρόν τα οφέλη και απαιτούνται επιπλέον στοιχεία για την κλινική ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Με βάση την EMA, οι παραδοσιακές χρήσεις που εγκρίνονται είναι (α) για τη συμπτωματική θεραπεία ήπιων προβλημάτων δυσπεψίας, (β) για την ανακούφιση από υπερβολική εφίδρωση, (γ) για τη συμπτωματική θεραπεία φλεγμονών στο λαιμό και το στόμα και (δ) για την ανακούφιση μικρών δερματικών φλεγμονών (EMA, 2009).

Στην Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής τα φύλλα του φασκόμηλου καταχωρούνται ως συστατικό τροφίμων και ως συστατικό συμπληρωμάτων διατροφής, ενώ για θεραπευτική χρήση, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) αξιολόγησε την ασφάλεια και

αποτελεσματικότητα του αιθερίου ελαίου φασκόμηλου σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο μέντας (*Mentha piperita*) για την αντιμετώπιση της οδοντικής πλάκας. Το συμπέρασμα για την ασφάλεια στη χρήση του αιθερίου ελαίου του φασκόμηλου από τη συγκεκριμένη υπηρεσία αφορά μόνο στην προαναφερόμενη χρήση, καθώς επίσης και στο ότι υπολείπονται ελεγχόμενες μελέτες που θα οδηγήσουν στην τελική κατάταξη της αποτελεσματικότητας του συνδυασμού των προαναφερόμενων αιθερίων ελαίων ως δραστικά συστατικά για τη μείωση της οδοντικής πλάκας και της ουλίτιδας (FDA, 21, 2015a).

**Πίνακας Ι.1.3** Ιδιότητες της *Salvia officinalis* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος / δραστική ουσία	Ιδιότητα	Πηγή
Αφέψημα	Υποβοήθηση της εξασθενούσας μνήμης, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση	Παραδοσιακή αρχαία ελληνική ιατρική; Διοσκουρίδης; Γαληνός; John Gerard, 1597; Perry <i>et al.</i> , 1999; Houghton, 2004; dos Santos-Neto <i>et al.</i> , 2006; Obulesu and Rao, 2011; Reuter <i>et al.</i> , 2007
αιθανολικό εκχύλισμα	Αναστολή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ακετυλοχολίνης (ACh) στον εγκέφαλο, βελτιώνοντας τη γνωστική λειτουργία και τη μνήμη	Houghton, 2004; Akhondzadeh <i>et al.</i> , 2003a; dos Santos-Neto <i>et al.</i> , 2006; Scholey <i>et al.</i> , 2008; Orhan & Aslan, 2009; Obulesu and Rao, 2011
1,8-κινεόλη α-πινένιο και καμφορά	Αναστολή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	Perry <i>et al.</i> , 2000;
Αιθέριο έλαιο	Εν δυνάμει θεραπευτική χρήση για ασθενείς μέτριας μορφής άνοιας, βελτίωση της ποιότητας της μνήμης	Saleven <i>et al.</i> , 2004; Engels, 2011;
Αποξηραμένα φύλλα	Ενάντια στη νόσο του Alzheimer και της φυσικής γήρανσης	Kennedy <i>et al.</i> , 2006; dos Santos-Neto <i>et al.</i> , 2006
Ουρσολικό οξύ	Μειώνει το επίπεδο της λιπιδικής υπεροξειδωσης αντιστρέφοντας αποτελεσματικά την εξασθένηση της μνήμης και της μάθησης που προκαλείται από τη D-γαλακτόζη. Αναστέλλει τη δράση της AChE μειώνοντας τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές δρώντας ωφέλιμα σε ασθενείς με νόσο Alzheimer	Wu <i>et al.</i> , 2011

Εκχύλισμα φασκόμηλου σε συνδυασμό με εχινάκεα και χλωρεξιδίνη/λιδοκαΐνη	Ενάντια στις λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού	Schapowal <i>et al.</i> , 2009
Σε μορφή κρέμας σε συνδυασμό με ραβέντι	Μειώνει τη διάρκεια των εξωτερικών εξανθημάτων του επιχειλίου έρπητα, κι ανακουφίζει από τον πόνο και το πρήξιμο που αισθάνονται οι ασθενείς	Engels, 2011

**Πίνακας I.1.4** Συστατικά εκχυλισμάτων της *Salvia officinalis* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος	Συστατικά	Αναφορές
Οleo-resin	Καρνοσόλη, Καρνοσικό οξύ, ροσμανόλη, επιροσμανόλη	Cuvelier <i>et al.</i> , 1994
Υδραλκοολικό εκχύλισμα	Καφεϊκό οξύ, Σαλβιανολικό οξύ, Ροσμαρινικό οξύ, Σαγερινικό οξύ, Γλυκοζίτης 7-Ο της Απιγενίνης, Ισπιδουλίνη, Γλυκοζίτης 7-Ο της Λουτεολίνης, Επιροσμανόλη, Χλωρογενικό οξύ, Καρνοσικό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναμικό οξύ, απιγενίνη	Martins <i>et al.</i> , 2015; Cvetkovijk <i>et al.</i> , 2013; Robby <i>et al.</i> , 2013; Zimmermann <i>et al.</i> , 2011
Αιθέριο έλαιο	1,8 κινεόλη, α-Θουγιόνη, Καμφορά, β-Θουγιόνη, Βορνεόλη, α-πινένιο, καμφένιο, β-πινένιο, καρυοφιλένιο, σκλαρεόλη,	Russo <i>et al.</i> , 2013
Αφεψήματα	Βαννιλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σιναπικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, επικατεχίνη, ναρινγενίνη, κατεχίνη, γενιστεΐνη, καεμφερόλη, κουερσετίνη	Kaliora <i>et al.</i> , 2014; Martins <i>et al.</i> , 2015

### 1.1.1.3 Μελισσόχορτο – *Melissa officinalis* L.

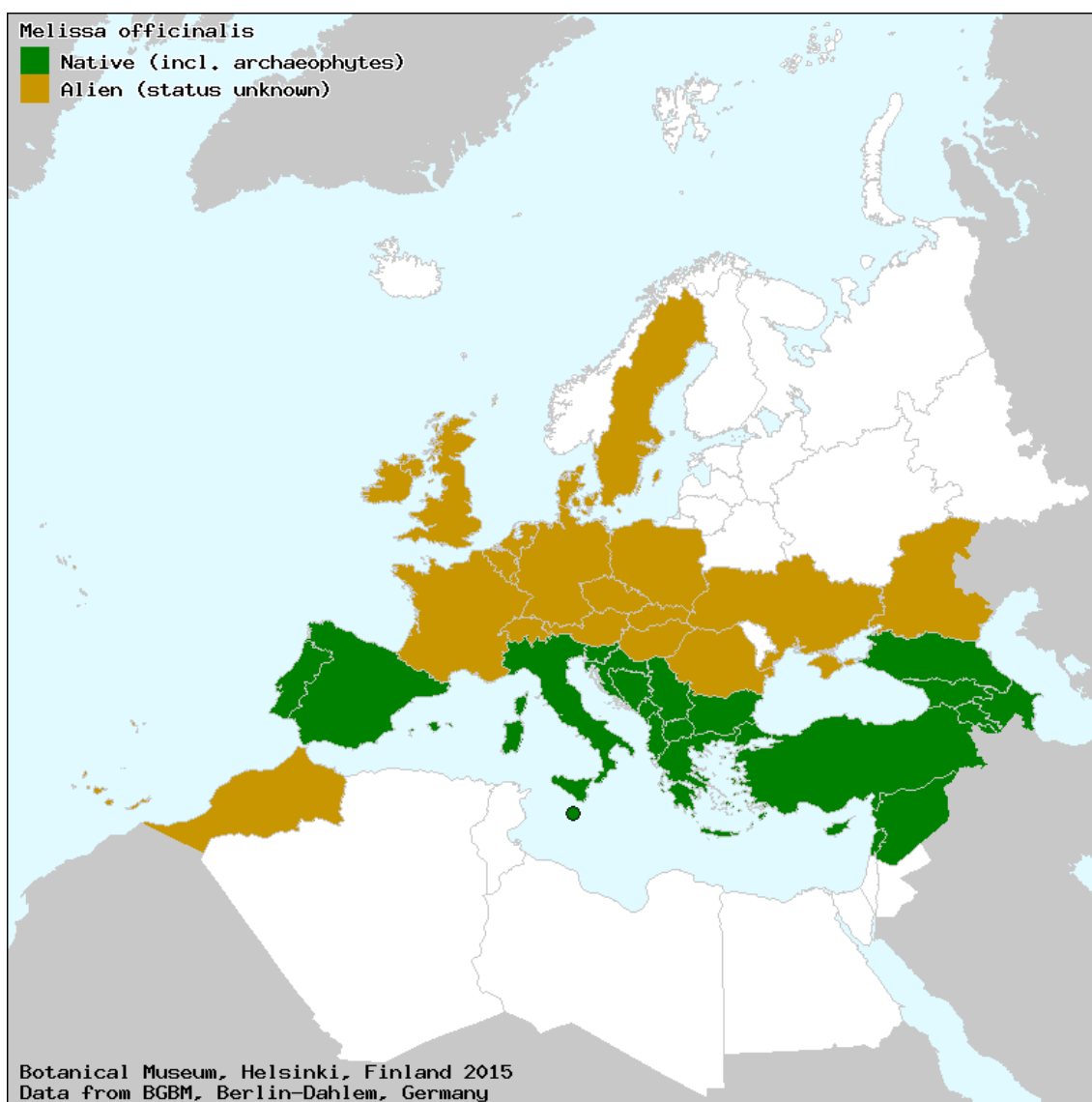
Το μελισσόχορτο *Melissa officinalis* (Εικ. 1.1.3) αυτοφύεται σε όλες τις μεσογειακές χώρες της Ευρώπης. Ειδικότερα στην Ελλάδα αυτοφύεται στη Μακεδονία, τη Θράκη και τα νησιά του Ιονίου, τόσο σε πεδινές όσο και σε ορεινές δασώδεις εκτάσεις. Είναι πόα πολυετής με ύψος μέχρι και ένα μέτρο με χαρακτηριστικό τετραγωνικό τριχτώ και πολύκλαδο βλαστό. Τα άνθη του χρώματος λευκού ή ανοιχτού ροζ σχηματίζουν μικρές ταξιανθίες που ανθίζουν κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Στην αγγλική γλώσσα η κοινή του ονομασία είναι lemon balm.



Εικόνα 1.1.3 *Melissa officinalis* L.

Ως φαρμακευτικό φυτό χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα ιδιαίτερα στις περιοχές της μεσογείου και της μέσης ανατολής όπου αυτοφύεται. Χρησιμοποιήθηκε ως τονωτικό, σπασμολυτικό, αντιδιαρροϊκό, ελαφρώς υπναγωγό, ενισχυτικό της μνήμης και κατά των πονοκεφάλων που οφείλονται στο άγχος (Blumenthal *et al.*, 2000). Το υδρόλυμα από την απόσταξη του μελισσόχορτου χρησιμοποιήθηκε και ως αντικαταθλιπτικό από τον Αβικέννα, φημισμένο ιατροφιλόσοφο Περσικής καταγωγής του 11<sup>ου</sup> αιώνα. Ο ίδιος το συνιστούσε και ως ενισχυτικό του κυκλοφορικού και της καρδιάς. Σε γραπτές αναφορές που έχουν βρεθεί τόσο ο Παράκελσος (1493-1541), όσο οι γαλλίδες μοναχές αλλά κι ένας Ελβετός γιατρός παρασκεύαζαν ένα εκχύλισμα το οποίο αποκαλούσαν «ελιξίριο ζωής» του οποίου η βάση ήταν το μελισσόχορτο. Αργότερα περιγράφηκε από έναν άγγλο περιηγητή τον John Evelyn (1620-1706) ως ενισχυτικό της μνήμης και των εγκεφαλικών διεργασιών καθώς και κατά της μελαγχολίας. Σε άλλες παραδοσιακές συνταγές αναφέρεται να χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με το υπέρικο (St. John's wort), για την αντιμετώπιση των εποχικών συναισθηματικών διαταραχών (Kuhn & Winston, 2000). Το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου, αναφερόμενο και ως «bal-smín» ήταν το έλαιο των ελαίων κατά τους Εβραίους. Στο παρόν το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου έχει δοκιμασθεί ως παράγοντας ενάντια στην αύξηση των καρκινικών όγκων (Janina, 2003; De Sousa *et al.*, 2004), στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων

από τον υιό του έρπη (HSV-2) (Turhan, 2006) καθώς και στην αντιμετώπιση και πρόληψη της νόσου του Alzheimer (Valnet, 1990). Επίσης, εκχυλίσματα μελισσόχορτου έχουν αποδειχθεί να δρουν ως αναλγητικά (Soulimani *et al.*, 1991), υπολιπιδαιμικά (Bolkent *et al.*, 2005) και αντιρευματικά (Valnet, 1990)



**Σχήμα I.1.3** Η Εξάπλωση του *Melissa officinalis* στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο

Η απόδοση του μελισσόχορτου σε αιθέριο έλαιο είναι εξαιρετικά χαμηλή (0,02-0,30%) γεγονός που ερμηνεύει το υψηλό κόστος παραγωγής του και την κατ' επέκταση υψηλή τιμή του στην αγορά (Moradkhani *et al.*, 2010). Το αιθέριο έλαιο περιέχει υψηλό ποσοστό κιτράλης κι άλλων συστατικών που αναφέρονται στον **Πίνακα I.1.6**. Τα υδατικά και υδραλκοολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, περιέχουν τα υψηλότερα ποσοστά

ροσμαρινικού οξέος συγκρινόμενα με άλλα είδη της οικογένειας *Lamiaceae*, καθώς και την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Dastmalchi *et al.*, 2008; Saltas *et al.*, 2013; Skotti *et al.*, 2014).

**Πίνακας I.1.5** Συστατικά εκχυλισμάτων του *Melissa officinalis* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος / δραστική ουσία	Ιδιότητα	Πηγή
Αιθέριο έλαιο	Καταπολεμά την εξάπλωση και τα συμπτώματα του ερπητοϊού (HSV-2) με διαφορετική δράση από αυτή του acyclovir	Schnitzler <i>et al.</i> , 2008; Turhan, 2006
	Αντιβιοτική δράση έναντι των στελεχών <i>P. Aeruginosa</i> , <i>K. Pneumonia</i> , <i>S. Aureus</i> , <i>C. Koseri</i>	Jalal <i>et al.</i> , 2015
	Μειώνει καρκινικούς όγκους	De Sousa <i>et al.</i> , 2004; Janina, 2003
Αφέψημα	Τονωτικό της μνήμης, κατά των πονοκεφάλων που προέρχονται από το στρες	Blumenthal, 2000
	Καταπολέμηση εποχικών συναισθηματικών διαταραχών	Kuhn & Winston., 2000
Υδραλκοολικό εκχύλισμα	Δράση κατά της νόσου Alzheimer	Akhondzadeh <i>et al.</i> , 2003b; Valnet, 1990
	Μειώνει τη χοληστερόλη	Bolkent <i>et al.</i> , 2005; Pereira <i>et al.</i> , 2014
	Αντιρευματικό	Valnet, 1990
	Αντιοξειδωτικό, Νευροπροστατευτικό	Kamdem <i>et al.</i> , 2013
	Αναγλητικό	Soulimani <i>et al.</i> , 1991
	Μειώνει καρκινικούς όγκους	Weidner <i>et al.</i> , 2015

Εκτός από την παραδοσιακή ιατρική, τα εκχυλίσματα και το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου έχουν μελετηθεί ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα τροφίμων (Marongui *et al.*, 2004; Mimica-Dukic *et al.*, 2004; Meftahizade *et al.*, 2010). Οι χρήσεις του υδρολύματος από την απόσταξη του αιθερίου ελαίου, του αιθερίου ελαίου και των υδραλκοολικών και υδατικών εκχυλισμάτων έχουν βρει εφαρμογές στην αρωματοποιία και τη βιομηχανία φυσικών καλλυντικών (Janina, 2003; Rose, 2000).

**Πίνακας I.1.6** Ιδιότητες του *Melissa officinalis* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος	Συστατικά	Αναφορές
Αιθέριο έλαιο	Κιτράλη, (Νεράλη, Γερασιάλη), Γερασιάλη, Θυμόλη, β-καρυοφιλένιο, κιτρονελλάλη, Λιναλοόλη, α-πινένιο, βορνεόλη, Οκιμένιο, Ισογερασιάλη	Mimica-Dukic <i>et al.</i> , 2004; Carnat <i>et al.</i> , 1998; Meftahizade <i>et al.</i> , 2010; Schnitzer <i>et al.</i> , 2008; Jalal <i>et al.</i> , 2015
Οργανικά / υδραλκοολικά εκχυλίσματα	Ροσμαρινικό οξύ, Λιθοσπερμικό οξύ, Καφταρικό οξύ Σαλβιανολικό οξύ, Σαγερινικό οξύ, ναρινγενίνη, εσπεριδίνη, εσπερετίνη, Γαλλικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, Κουερσετίνη, Καεμφερόλη, Ρουτίνη, Χλωρογενικό οξύ	Dastmalchi <i>et al.</i> , 2008; Barros <i>et al.</i> , 2013; Kamdem <i>et al.</i> , 2013
Υδατικά εκχυλίσματα / Αφεψήματα	Ροσμαρινικό οξύ, Χλωρογενικό οξύ, Ελλαγικό οξύ, Ρουτίνη, Γαλλικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, Φερουλικό οξύ, Συριγγικό οξύ,	Barros <i>et al.</i> , 2013; Arceusz <i>et al.</i> , 2013; Pereira <i>et al.</i> , 2014

#### 1.1.1.4 Δίκταμο – *Origanum dictamnus* L.

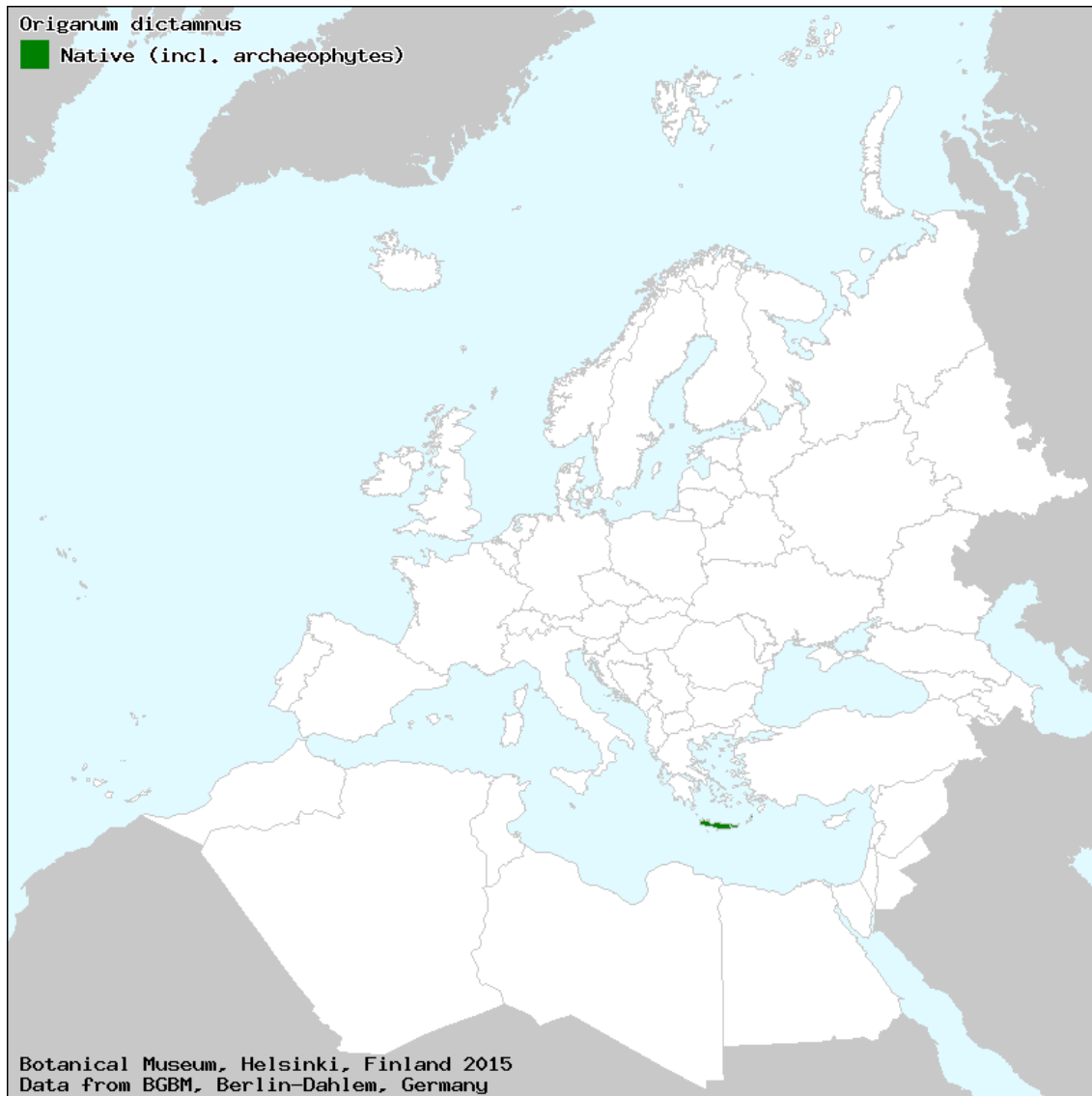
**Εικόνα I.1.4** *Origanum dictamnus*

Το δίκταμο (*Origanum dictamnus* L.) (Εικ. 1.1.4) είναι ενδημικό φυτό της Κρήτης και αυτοφύεται σε όλο το νησί. Το δίκταμο απαντάται από περιοχές κοντά στη θάλασσα μέχρι και την ορεινή ζώνη (Fernandes and Heywood, 1972), αλλά με μεγαλύτερη πυκνότητα στη δυτική Κρήτη.

Είναι θάμνος χαμηλού ύψους (μέχρι 35 cm) με κίτρινα ή μωβ άνθη. Τα φύλλα και τα άνθη του συλλέγονται την καλοκαιρινή περίοδο. Είναι αρωματικό φυτό με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον εξαιτίας της ευρείας χρήσης του ως αφέψημα. Παλιότερα η ζήτηση στην τοπική αγορά της Κρήτης καλύπτονταν από συλλογή άγριου ενδημικού πληθυσμού γεγονός που οδήγησε σε σταδιακή μείωση αλλά και εξαφάνιση του από κάποιες περιοχές στο νησί (Skoula



and Kamenopoulos, 1997). Πλέον, οι φυσικοί πληθυσμοί του είδους καλύπτονται από την αναθεωρημένη Συνθήκη της Βέρνης για τα απειλούμενα είδη, και οι ποσότητες που κυκλοφορούν στην αγορά προέρχονται αποκλειστικά από καλλιέργειες. Εξαιτίας του αυξημένου οικονομικού ενδιαφέροντος έχουν γίνει με επιτυχία προσπάθειες για εφαρμογή νέων τεχνικών όπως αυτή της υδροπονίας στην καλλιέργεια του δίκταμου (Econoimakis, 1993).



**Σχήμα 1.1.4** Η Εξάπλωση του *Origanum dictamnus* στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο

Σύμφωνα με τη μυθολογία, το φυτό ήταν αφιερωμένο στη θεά Δίκτυννα, απ όπου και πήρε το όνομά του. Η θεά Δίκτυννα μεταγενέστερα συνδέθηκε με τη θεά Άρτεμις, και το δίκταμο μαζί με τη θεά πίστευαν ότι μπορούσαν να δρουν μαγικά στην epούλωση των πληγών και γι αυτό ήταν συχνές οι εμφανίσεις της θεάς με στεφάνι στο κεφάλι φτιαγμένο

από δίκταμο (Liolios *et al.*, 2010; Skoula and Kremenopoulos, 1997). Σε πολλές τοιχογραφίες και διακοσμήσεις κεραμικών αντικειμένων της Μινωικής Περιόδου απεικονίζεται το δίκταμο (Diaroulis, 1980). Ανασκαφές στην Κνωσό, στο παλάτι του Μίνωα στην Κρήτη, στο Ζάκρο αλλά και στην Πύλο στην Πελοπόννησο έφεραν στο φως σπόρους αρωματικών φυτών *Artemisia absinthium*, *Salvia triloba* αλλά και δίκταμου καταδεικνύοντας την ύπαρξη εργαστηρίων αξιοποίησης των αρωματικών φυτών για την παρασκευή καλλυντικών, αρωμάτων ή και φαρμάκων (Liolios *et al.*, 2010).

Από την αρχαιότητα το δίκταμο θεωρήθηκε πανάκεια, δηλαδή φάρμακο που μπορούσε να θεραπεύσει κάθε ασθένεια. Αναφορές για το φυτό βρίσκονται στον Όμηρο, τον Ιπποκράτη, τον Αριστοτέλη, το Θεόφραστο αλλά και στη Ρωμαϊκή Εποχή από το Βιργίλιο, τον Κέλσο και τον Πλύνιο, αλλά και από τους Πλούταρχο, Διοσκουρίδη και Γαληνό για τις ιδιότητές του να επουλώνει τραύματα, αλλά και ως αντίδοτο σε δαγκώματα φιδιών (López *et al.*, 2006).

**Πίνακας 1.1.7** Ιδιότητες του *Origanum dictamnus* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος / δραστική ουσία	Ιδιότητα	Πηγή
Αιθέριο έλαιο	Δραστικό έναντι των κατά Gram θετικών βακτηρίων <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> (Η δραστικότητά του έχει συσχετιστεί άμεσα με το περιεχόμενό του σε καρβακρόλη), έναντι κατά Gram αρνητικών βακτηρίων <i>Penicillium aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , τους μύκητες <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> καθώς και του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> . Επίσης, έναντι των φυτοπαθογόνων στελεχών <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium sp.</i> , και <i>Clavibacter michiganensis subs. michiganensis</i> , της <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> και <i>Salmonella typhimurium</i> . Επίσης, έχει δοκιμασμένη νεκροπρωτική δράση έναντι σειράς καρκινικών κυττάρων.	Economakis <i>et al.</i> , 2002; Liolios <i>et al.</i> , 2009; Daferera <i>et al.</i> , 2002,2003; Vokou <i>et al.</i> 1993; Sivropoulou <i>et al.</i> , 1996; Panizzi <i>et al.</i> , 1993; Zeytinoglou <i>et al.</i> , 2003

Υδατικό εκχύλισμα / Αφέψημα	Αποτελεσματικό έναντι της <i>Yarrowia lipolytica</i>	Karanika <i>et al.</i> , 2001
Υδραλκοολικό εκχύλισμα	Βρέθηκε αποτελεσματικό σε <i>in vitro</i> δοκιμές κατά 15 κλινικών στελεχών του Ελικοβακτηριδίου ( <i>Helicobacter pylori</i> )	Stamatis <i>et al.</i> , 2003
Εκχύλισμα οργανικών διαλυτών	Αποτελεσματικό έναντι στελεχών κατά Gram αρνητικών βακτηρίων όπως <i>Acinetobacter haemolyticus</i> , <i>Empedobacter brevis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και <i>Klebsiella pneumonia</i> .	Chatzopoulou <i>et al.</i> , 2010
Παραδοσιακή χρήση που δεν υποστηρίζεται από <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα, παρά μόνο από ιστορικές πηγές	Το αφέψημα διευκολύνει την πέψη, είναι σπασμολυτικό, διουρητικό, κατά των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού και εμμηναγωγό.	Skoula and Kamenopoulos, 1997; Plimakis, 1997; Hanlidou <i>et al.</i> , 2004

**Πίνακας Ι.1.8** Συστατικά εκχυλισμάτων του *Origanum dictamnus* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος	Συστατικά	Αναφορές
Αιθέριο έλαιο	Καρβακρόλη, γ-τερπινένιο, π-κυμένιο, θυμοκινόνη, θυμόλη, α-πινένιο, Λιναλοόλη, Σαμπινένιο, Γερμακρένιο	Argyropoulou <i>et al.</i> , 2009; Liolios <i>et al.</i> , 2009; Chorianoopoulos <i>et al.</i> , 2004; Daferera <i>et al.</i> , 2003; Daferera <i>et al.</i> , 2002; Daferera <i>et al.</i> , 2000; Economakis <i>et al.</i> , 2005, Skoula <i>et al.</i> , 1999
Εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών	Ολεανολικό οξύ, Ουρσουλικό οξύ, παλμιτικό οξύ, φωσφατιδικό οξύ, εριοδικτυόλη, απιγενίνη, λουτεολίνη, κουερσετίνη, βιτεξίνη, θυμοκινόλη, θυμοκινόνη, σαβιανολικό οξύ, ταξιφολίνη, ναρινγενίνη, καεμπφερόλη	Revinthi-Moraiti <i>et al.</i> , 1985; Komaitis <i>et al.</i> , 1988; Piozzi <i>et al.</i> , 1986; Chatzopoulou <i>et al.</i> , 2010
Υδατικά / Υδραλκοολικά Εκχυλίσματα	π – κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, κατεχίνη, ροσμαρινικό οξύ,	Proestos <i>et al.</i> , 2006, 2008;

Στους μεσαιωνικούς χρόνους υπάρχει πάλι αναφορά για το δίκταμο στον Κώδικα του Καρλομάγνου και γραπτές αναφορές από την καλλιέργεια και την αξιοποίησή του από Βενεδικτίνους και Τραπιστές μοναχούς στην ποτοποιία αλλά και ως συστατικό σε σύνθετες θεραπευτικές φόρμουλες (Martinez-Frances *et al.*, 2015).

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει *in vitro* τη βιολογική δράση των εκχυλισμάτων του *Origanum dictamnus* αλλά και κάποιων επιμέρους συστατικών του προκειμένου να δώσουν επιστημονική τεκμηρίωση στην παραδοσιακή γνώση που υφίσταται για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα I.1.7.

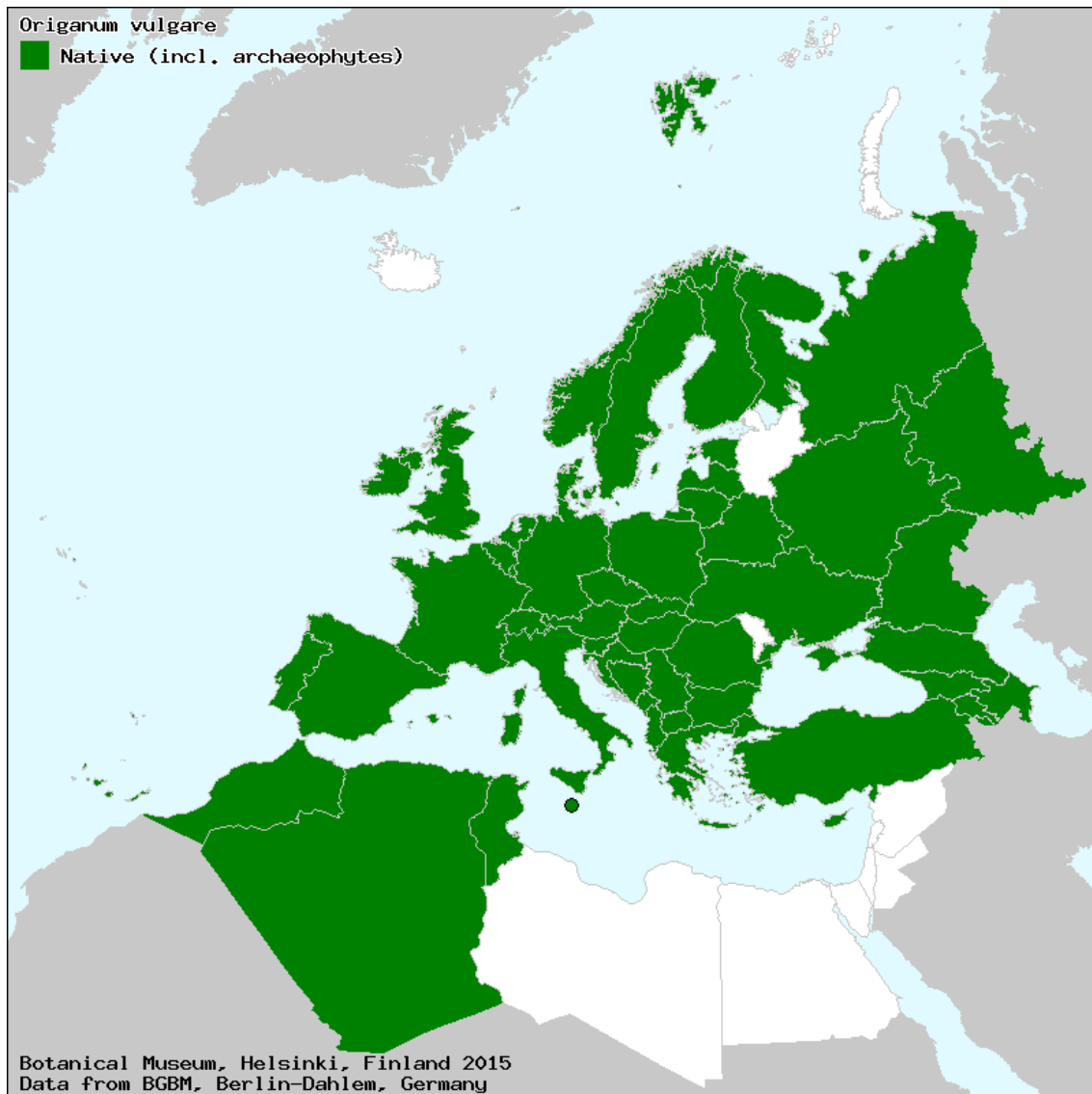
Παράλληλα με τη βιολογική δράση, αναλύθηκε και η σύσταση των εκχυλισμάτων του δίκταμου με χρωματογραφικές τεχνικές και τα κύρια αποτελέσματα με τις σχετικές αναφορές παρουσιάζονται στον Πίνακα I.1.8.

#### I.1.1.5 Ρίγανη – *Origanum vulgare* L.



Εικόνα I.1.5 *Origanum vulgare*

Η ρίγανη (*Origanum vulgare* L.) (Εικ. I.1.5) ανήκει και αυτή στην οικογένεια *Lamiaceae*. Είναι φυτό πολυετές με ύψος από 20 έως 50 εκατοστά. Είναι φυτό φρυγανώδες με βλαστό εύθραυστο, λεπτό, σκληρό και κοκκινωπού χρώματος. Ανθίζει από το Μάιο έως τον Οκτώβριο. Έχει φύλλα έμμισχα ωοειδή ή ελλειψοειδή (Κουκουλίτσα, 2006). Το είδος χαρακτηρίζει η μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση που εκτείνεται από τις Αζόρες, τη Μαδέρα, τα Κανάρια νησιά, την Ευρώπη και διαμέσου της Μεσογείου στη Δυτική και Κεντρική Ασία και φθάνει μέχρι την Ανατολική Ασία και την Ταϊβάν. Φύεται κυρίως σε ασβεστούχα εδάφη από το επίπεδο της θάλασσας, μέχρι ορεινές περιοχές.



**Σχήμα 1.1.5** Η Εξάπλωση του *Origanum vulgare* στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο

Ανάλογα με τις διαφορές στα χαρακτηριστικά, στον αριθμό των άμισχων αδένων στα φύλλα, στα βράκτια και στους κάλυκες, στο μέγεθος και το χρώμα των βρακτίων και των ανθέων, απαντάται σε έξι υποείδη, τρία από τα οποία φύονται στην Ελλάδα (Kokkini, 1996). Η κατανομή των τριών υποειδών στον Ελλαδικό χώρο σχετίζεται με τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή (Kokkini, 1996).

Το υποείδος *hirtum* απαντάται κυρίως στα νησιά και τη νότια Ελλάδα. Από μορφολογικής άποψης διακρίνεται από τα μικρά πράσινα βράκτια και τα λευκά άνθη. Στη βόρεια Ελλάδα και όπου επικρατεί Ηπειρωτικό Μεσογειακό κλίμα, κυριαρχούν τα υποείδη *viridulum* και *vulgare*. Το πρώτο χαρακτηρίζεται από μεγάλα πράσινα βράκτια και το δεύτερο

από μεγάλα ιώδη βράκτια και ροδίζοντα-ιώδη άνθη. Ο αριθμός των άμισχων αδένων στα φύλλα μειώνεται σημαντικά από τις νότιες προς τις βόρειες περιοχές.

Η ονομασία του γένους *Origanum* προέρχεται από τις λέξεις «όρος» και «γάνος» και αποδίδεται ως «ανανέωση του βουνού». Το *Origanum vulgare* L., είναι γνωστό με την κοινή ονομασία ρίγανη, αγριορίγανη και αγριορίγανος. Πιθανόν να είναι η αγριορίγανος που αναφέρει ο Διοσκουρίδης και η ορίγανη η μέλινα του Θεόφραστου (Καββάδας, 1965). Ο Διοσκουρίδης την ανέφερε ως θερμαντική και το αφέψημά της μαζί με κρασί, χρησιμοποιούταν ως αντίδοτο στο δηλητήριο από δάγκωμα ζώων. Επίσης, τη θεωρούσε μαλακτική και με ευεργετικές δράσεις στις στομαχικές διαταραχές, το βήχα, τη συμφόρηση των αναπνευστικών οδών κ.α. (Wellman, 1958).

**Πίνακας I.1.9** Ιδιότητες του *Origanum vulgare* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος / δραστική ουσία	Ιδιότητα	Πηγή
Αιθέριο έλαιο	Αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών στελεχών βακτηρίων ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Nicrococcus luteus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> ), καθώς και μυκήτων ( <i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Pichia minuscule</i> , <i>P. ohmeri</i> , <i>Debaryomyces klockeri</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ). Αντιμικροβιακή δράση έναντι των <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> . Ανασταλτική δράση της χολινεστεράσης (Ache BChE), που σχετίζεται άμεσα με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Αναστολή της δράσης των AChE και BChE έχουν δώσει μεμονωμένα η θυμόλη και η καρβακρόλη που καταλέγονται στα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της ρίγανης.	Castilho <i>et al.</i> , 2012; Rahbar <i>et al.</i> , 2012; Licina <i>et al.</i> , 2013; Orhan <i>et al.</i> , 2008; Sarikurkcü <i>et al.</i> , 2015; Jukic <i>et al.</i> , 2007; Aazza <i>et al.</i> , 2011; Bakalli <i>et al.</i> , 2008; Souza <i>et al.</i> , 2007; De Sousa <i>et al.</i> , 2013
Υδατικό εκχύλισμα / Αφέψημα	Το υδατικό εκχύλισμα έδωσε αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών και Gram	Licina <i>et al.</i> , 2013; Martins <i>et al.</i> , 2014

	αρνητικών βακτηρίων, των <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Υδραλκοολικό εκχύλισμα	Αντιμικροβιακή δράση έναντι των <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και <i>Proteus vulgaris</i>	Martins <i>et al.</i> 2014
Εκχύλισμα οργανικών διαλυτών	Ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος διεθλαιθέρα σε στελέχη <i>Staphylococcus aureus</i>	Licina <i>et al.</i> , 2013
Παραδοσιακή χρήση που δεν υποστηρίζεται από <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα, παρά μόνο από ιστορικές πηγές	Αντισηπτική, χωνευτική και σπασμολυτική ιδιότητα του αφεψήματος. Αντιφλεγμονώδης, εντεροχαραρωτική, αντιρευματική, νηματοδοκτόνος, αντιαθηροσκληρωτική	Vanaclocha and Canigueral, 2003; Bakkali <i>et al.</i> , 2008

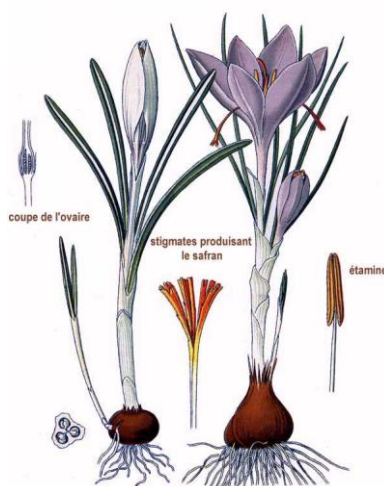
Σύμφωνα με πηγές που αναφέρονται αναλυτικά στον **πίνακα I.1.9**, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, καθώς και κάποια εκχυλίσματά της, έχουν αποδεδειγμένη δράση στην αναστολή της ανάπτυξης πολλών στελεχών βακτηρίων και μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προκαλούν τροφιογενείς λοιμώξεις. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούσαν τη ρίγανη παραδοσιακά όχι μόνο ως άρτυμα των τροφίμων αλλά και παράλληλα ως συντηρητικό. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία, στη ποτοποιία και ως άρτυμα στην αλλαντοποιία. Πέραν αυτών είναι άριστο μελιτογόνο φυτό.

**Πίνακας I.1.10** Συστατικά εκχυλισμάτων του *Origanum vulgare* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος	Συστατικά	Αναφορές
Αιθέριο έλαιο	Θυμόλη, Καρβακρόλη, γ-τερπινένιο, α-τερπινένιο, p-κυμένιο, μεθυλεστέρες της θυμόλης και της καρβακρόλης, β-καρυοφιλένιο, γερμακρένιο, μπισαμπολένιο, καμφένιο, βορνεόλη, α-τερπινένιο, σαμπινένιο,	Martins <i>et al.</i> , 2014; Kogiannou <i>et al.</i> , 2013; Castilho <i>et al.</i> , 2012; Sarikurkcu <i>et al.</i> , 2015; Licina <i>et al.</i> , 2013; Bakkali <i>et al.</i> , 2008
Εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών	Φερουλικό οξύ, απιγενίνη, ολεανολικό οξύ, ουρσουλικό	Agiomyrgianaki & Dais, 2012

	οξύ, ροσμαρινικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, ναρινγενίνη, εριοδικτυόλη, ταξιφολίνη	
Υδραλκοολικά εκχυλίσματα	Ροσμαρινικό οξύ, γλυκοσίδες της λουτεολίνης, λιθοσπερμικό οξύ, εριοδικτυόλη, ναρινγενίνη	Martins <i>et al.</i> , 2014
Υδατικά εκχυλίσματα / αφεψήματα	p-Υδροβενζοϊκό οξύ, βαννιλικό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, συρινγικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ολεανολικό οξύ, ουρσουλικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, γλυκοζίτης της λουτεολίνης, γλυκοζίτης της απιγενίνης	Kogiannou <i>et al.</i> , 2013; Martins <i>et al.</i> , 2014

### I.1.2 Κρόκος – *Crocus sativus*

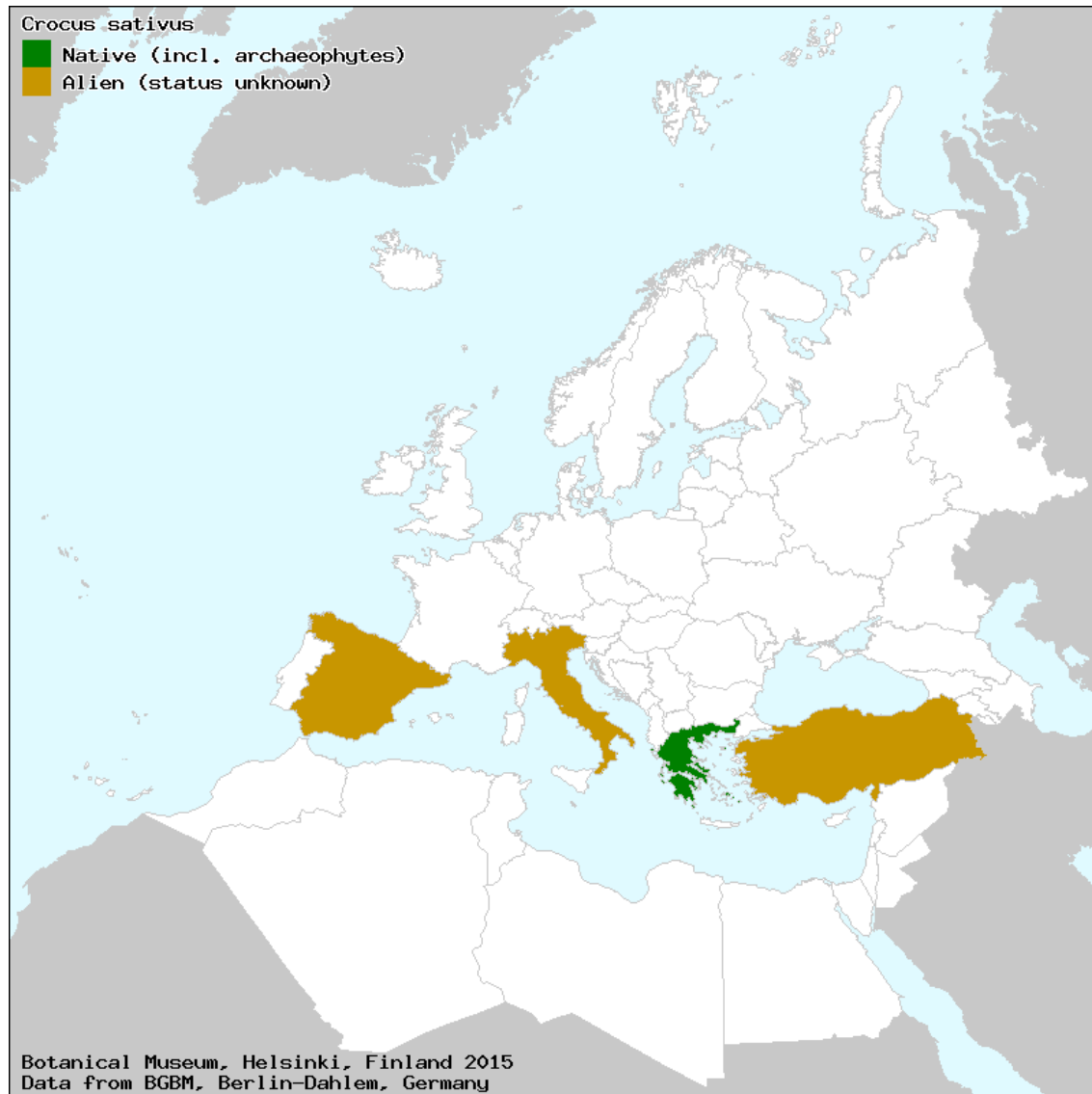


Pl.328. A. Safran cultivé. *Crocus sativus* L.  
B. Safran printanier. *Crocus vernus* Wulf.  
**Εικόνα I.1.6 *Crocus sativus***

Ο κρόκος, ή σαφράν ή ζαφορά είναι η φυτική δρόγη που προέρχεται από τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L. (Εικ. I.1.6). Το γένος *crocus* ανήκει στην οικογένεια *Iridaceae*, περιλαμβάνει περίπου 80 είδη τα οποία εκτίνονται από τη νοτιοδυτική Ευρώπη και την κεντρική Ευρώπη, την Τουρκία και τα νοτιοδυτικά τμήματα της Ασίας, έως και τη δυτική Κίνα (Παπανδρέου, 2010). Στην Ελλάδα φύονται 23 είδη (34 taxa) του γένους *Crocus*, από τα οποία τα 10 είδη (17 taxa) είναι ενδημικά της Ελλάδας (Πυλαρά, 2008). Το φυτό σήμερα καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του κόσμου, μεταξύ αυτών το Ιράν, η Ινδία, η Κίνα, η Ισπανία, η Ελλάδα κ.α. Στην Ελλάδα σήμερα καλλιεργείται στην περιοχή της Κοζάνης από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης, και βάση του Κανονισμού του



Συμβουλίου της ΕΟΚ 2081/92 ο κρίκος του Νομού Κοζάνης βρίσκεται πλέον στο μητρώο των «προστατευομένων ονομασιών προελεύσεως και των προστατευομένων γεωγραφικών ενδείξεων». Αποτελεί δε, το πλέον ακριβό μπαχαρικό στον κόσμο.

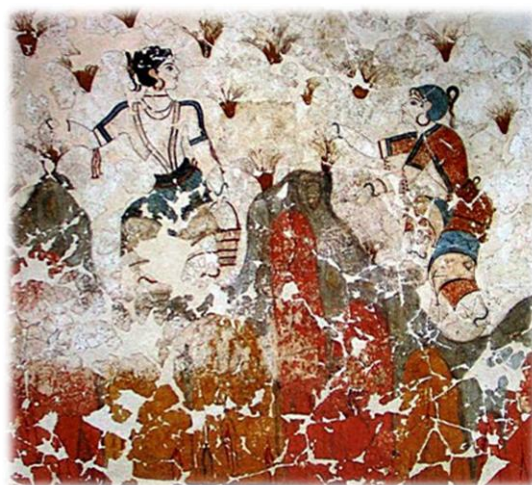


**Σχήμα 1.1.6** Η Εξάπλωση του *Crocus sativus* στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο

Ο κρίκος ανήκει στα σπάνια φαρμακευτικά και αρτυματικά φυτά με μεγάλη χρωστική ικανότητα. Με βάση τις ιστορικές πηγές, ο κρίκος συμπεριλαμβανόταν στα προσφιλέστερα φυτά των αρχαίων Ελλήνων, Αιγυπτίων και Ρωμαίων για το χρώμα, το άρωμα, τις αφροδισιακές του ιδιότητες και την ενίσχυση της γονιμότητας που απέδιδαν στη χρήση του. Αναφορές για τον κρίκο στην αρχαιότητα βρίσκει κανείς στον Όμηρο, τον Αισχύλο και το Σοφοκλή, στις περιγραφές αντικειμένων με ζωηρό χρώμα. Αναφορές όμως, για τις θεραπευτικές του ιδιότητες υπάρχουν στον Ιπποκράτη, το Θεόφραστο και το Διοσκουρίδη

αλλά και το Γαληνό. Και κατά το μεσαίωνα η χρήση της δρόγης του κρόκου έβρισκε εφαρμογές στην ιατρική. Στην παραδοσιακή ιατρική απαντάται η χρήση του κρόκου ως εμμηναγωγό , αλλά και ως εκτριωτικό όταν χρησιμοποιείται σε μεγάλες δόσεις (Ταραντίλης, 1994), ως αντικαταθλιπτικό από την παραδοσιακή ιατρική της Περσίας (Hosseinzadeh and Younesi, 2002; Akhondzaadeh *et al.*, 2004), αλλά και ως αναλγητικό και καρδιοπροστατευτικό από την παραδοσιακή ιατρική της Ινδίας (Srivastava *et al.*, 2010).

Οι πρώτες αναφορές στην καλλιέργεια του κρόκου χρονολογούνται περί τα 2300 π.χ. κι εντοπίζονται στην περιοχή του Ευφράτη σε ένα χωριό με την ονομασία Azurirano, που σημαίνει πόλη του σαφράν (Gadd, 1971). Στην Ελλάδα, οι πρώτες αναφορές για τον κρόκο έρχονται από τα χρόνια του Μίνωα. Εκτός από τις γραπτές αναφορές, ο κρόκος αποτέλεσε σημαντικό διακοσμητικό στοιχείο σε τοιχογραφίες με τον «κροκοσυλλέκτη πίθηκο» (Εικ. I.1.8) στο παλάτι του Μίνωα στην Κνωσό της Κρήτης (1700-1600 π.χ.). Επίσης, και σε τοιχογραφίες που ήρθαν στο φως στο Ακρωτήριο της Θήρας (1500 π.Χ.) απεικονίζονται κοπέλες να συλλέγουν τα στίγματα του κρόκου (Εικ. I.1.7).



**Εικόνα I.1.7** «Κροκοσυλλέκτριες», τοιχογραφία στο Ακρωτήριο της Θήρας με μορφές γυναικών που συλλέγουν άνθη κρόκου

Η πλέον διαδεδομένη χρήση του κρόκου είναι σαφώς ως άρτυμα το οποίο βελτιώνει με το άρωμα, το χρώμα και τη γεύση του φαγητού. Αποτελεί βασικό συστατικό χαρακτηριστικών συνταγών της Ισπανίας και της Ιταλίας, ενώ χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό από την αραβική κουζίνα (Srivastava *et al.*, 2010).



**Εικόνα I.1.8** «Ο κροκοσυλλέκτης πίθηκος», η χαρακτηριστικότερη αναφορά στον κρόκο κατά τη Μινωική εποχή. Βρέθηκε στο βορειοδυτικό τμήμα του ανακτόρου της Κνωσού στο «σπίτι των τοιχογραφιών» και χρονολογείται περίπου στα 1500 π.χ. Εκτίθεται στο μουσείο Ηρακλείου.

**Πίνακας I.1.11** Ιδιότητες του *Crocus sativus* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος / δραστική ουσία	Ιδιότητα	Πηγή
Κροκίνη	Μειώνει τα επίπεδα της LDL και των τριγλυκεριδίων	Sheng <i>et al.</i> , 2006
Κροκετίνη	Κατά της αθηροσκλήρωσης και της ινσουλινοαντίστασης	Xi <i>et al.</i> , 2005; Zheng <i>et al.</i> , 2005
Υδραλκοολικό εκχύλισμα	Περιορίζει σημαντικά τα συμπτώματα του προεμμηνορροιακού συνδρόμου (εμμηναγωγό). Χημειοπροστατευτικό έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου, με διάφορους μηχανισμούς δράσης κυρίως ενζυματικούς,	Beiranvand <i>et al.</i> , 2015; Bhandari, 2015; Geromichalos <i>et al.</i> , 2014; Chun <i>et al.</i> , 2014
Εκχύλισμα οργανικών διαλυτών	Κυτταροτοξική και νεκρωτική δράση έναντι σειράς καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από καρκίνο του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, του ορθού, του στήθους και του ήπατος. Επουλωτική δράση έναντι πληγών.	Samarghandian <i>et al.</i> , 2011; Kianbakht and Mozaffari, 2009; Tavakkol-Afshari <i>et al.</i> , 2008; Escribano <i>et al.</i> , 1996; Garcia-Olmo <i>et al.</i> , 1999
Υδατικό εκχύλισμα	Διευκολύνει την πέψη. Αντικαταθλιπτικό. Αγχολυτικό	Nabavizadeh <i>et al.</i> , 2009; Hosseinzadeh <i>et al.</i> , 2004
Παραδοσιακή χρήση που δεν υποστηρίζεται από <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα, παρά μόνο από ιστορικές πηγές	Αφροδισιακό, εμμηναγωγό, σπασμολυτικό, εκτριπτικό, αντικαταθλιπτικό, καρδιοτονωτικό	Bhargava, 2011; Srivastava <i>et al.</i> , 2010

Λόγω της ευρείας χρήσης του κρόκου από τις παραδοσιακές ιατρικές ανά τον κόσμο από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, έχει μελετηθεί αρκετά τόσο ως προς τη χημική του σύνθεση αλλά και ως προς τις βιολογικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων και των επιμέρους συστατικών του. Η ανάλυση της σύστασης των στίγματων του κρόκου έχει δώσει κατά προσέγγιση 10% υγρασία, 12% πρωτεΐνες, 5% λιπαρά, 5% φυτικές ίνες και 63% σάκχαρα με τα ποσοστά να διαφέρουν ανάλογα την περιοχή και τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τις εν δυνάμει βιοδραστικές χημικές ενώσεις που περιέχονται στον κρόκο καταλήγουν σε τέσσερις κυρίαρχες ενώσεις στο σαφράν, την κροκετίνη, την πικροκροκίνη, τη σαφρανάλη και τις κροκίνες. Αποτελέσματα των ερευνών αυτών, με τις, σχετικές αναφορές παρουσιάζονται στους **Πίνακες I.1.11** και **I.1.12**



**Εικόνα I.1.9** Στίγματα κρόκου

**Πίνακας I.1.12** Ιδιότητες του *Crocus sativus* με βάση τη βιβλιογραφία

Είδος εκχυλίσματος	Συστατικά	Αναφορές
Αιθέριο έλαιο	Σαφρανάλη, ισοφορόνη, και ισομερή τους	Tarantilis and Polissiou, 1997
Εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών	Κροκετίνη, α-καροτένιο, β-καροτένιο, λυκοπένιο, ζεαξανθίνη, κροκίνες, σαφρανάλη, πικροκροκίνη	Bhargava, 2011; Maggi <i>et al.</i> , 2011;
Υδατικά / Υδραλκωολικά εκχυλίσματα	Πικροκροκίνη, διγλυκοζίτης της καεμφερόλη, κροκετίνη, σαφρανάλη, κροκίνες	Tarantilis <i>et al.</i> , 1995; Caballero-Ortega <i>et al.</i> , 2007;



# Ι.2

## Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά





### 1.2.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Ως δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικών προϊόντων αναφέρονται οι ουσίες που προέρχονται βιοσυνθετικά από το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων και σε πολλές περιπτώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών.

Η κατανομή τους στο φυτικό βασίλειο δεν είναι τυχαία καθώς μεμονωμένα συστατικά ή ομάδες συστατικών συχνά χαρακτηρίζουν μεμονωμένες κλάσεις, οικογένειες, γένη, είδη και κλώνους. Το γεγονός αυτό τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους χαρακτήρες και στην ταξινόμηση των φυτών (Χανλίδου, 1996). Η μελέτη του οικολογικού τους ρόλου αποκαλύπτει ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα αλληλεπιδράσεων και συνεξελικτικών προσαρμογών ανάμεσα στα φυτά και τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος και ειδικότερα μεταξύ φυτών και ζώων ή φυτών με φυτά. Θεωρείται ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν εξελιχθεί κατά την προσαρμογή των φυτών ως μηχανισμοί άμυνας για την αποφυγή αντίξων βιοτικών και αβιοτικών επιδράσεων καθώς τα φυτά δεν έχουν την ικανότητα κίνησης για την αποφυγή των εχθρών τους (Καραμπουρνιώτης, 2003; Αϊναλίδου, 2008).

Οι περισσότερο ενδιαφέρουσες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι φαινολικές ενώσεις, τα τερπενοειδή, και τα αλκαλοειδή. Οι πορφυρίνες είναι μια τέταρτη, μικρή αλλά θεμελιώδους σημασίας ομάδα δευτερογενών προϊόντων. Η σημαντικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης αναδύεται μέσα από την επίδραση που μπορεί να έχουν στον άνθρωπο. Η μελέτη της φαρμακολογικής και βιολογικής τους δράσης οδηγεί σε ένα ευρύτατο φάσμα εφαρμογών στους τομείς των φαρμάκων, καλλυντικών, τροφίμων και βιοκτόνων. Μεγάλη ποικιλία ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα προέρχονται από δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες. Στις περιπτώσεις αυτές ανήκουν ενδεικτικά οι καρδιοτονωτικοί γλυκοζίτες όπως η ρεζερπίνη και η διγιτοξίνη, η κινίνη η οποία είναι ανθελονοσιακό φάρμακο, η μορφίνη, η κωδεΐνη, κι άλλα αλκαλοειδή όπως και η κοκαΐνη η οποία ανάλογα με τη δόση την οποία θα χρησιμοποιηθεί έχει διεγερτικές ή αναισθητικές ιδιότητες.

Στους δευτερογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνονται η καφεΐνη που περιέχεται στον καφέ και το τσάι καθώς και η νικοτίνη που περιέχεται στον καπνό κι αμφότερες έχουν διεγερτικές ιδιότητες.

Η νέα τάση γύρω από την έρευνα των δευτερογενών μεταβολιτών είναι η αναζήτηση ουσιών με κυταρροτοξικές ιδιότητες που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στις στρατηγικές για τη θεραπεία του καρκίνου, αλλά και αντιμικροβιακών ενώσεων και μιγμάτων που θα



μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά αντιβιοτικά και φυτοπροστατευτικά σκευάσματα.

Ένας άλλος τομέας όπου οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν σημαντικότερο ρόλο είναι αυτός της αλληλοπάθειας με την οποία προσδιορίζεται η ανάσχεση ή προώθηση της αύξησης φυτικών ή άλλων οργανισμών από τις ουσίες που εκκρίνονται από κάποιον άλλο οργανισμό. Στην περίπτωση αυτής της προσέγγισης οι δευτερογενείς μεταβολίτες νοούνται ως αλληλοχημικές ουσίες (allelochemicals) και μπορεί να διαιρεθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες, σε αυτές που:

1. φαίνεται να είναι ωφέλιμες για τον οργανισμό που τις παράγει, καθώς με αυτές απωθούνται οι ενδεχόμενοι εχθροί που τον απειλούν,
2. εκείνες που ωφελούν το λήπτη, όπως η παραγωγή ορμονών από ορισμένα φυτά οι οποίες εναρμονίζουν την αύξηση των εντόμων με την αύξηση των φυτών.

Ο φυσιολογικός και μεταβολικός ρόλος των διαφόρων δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά εκτός από την αλληλοπάθεια, δεν είναι πάντα ιδιαίτερα σαφής. Σε αρκετές περιπτώσεις, τα δευτερογενή προϊόντα φαίνεται να αποτελούν άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού τα οποία στη συνέχεια συσσωρεύονται στα χυμοτόπια. Οι ενώσεις που εκλύονται από τις ρίζες είτε το φύλλωμα των φυτών και μπορούν να επηρεάσουν λειτουργίες γειτονικών φυτών, την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή τους ονομάζονται αλληλοπαθητικές ουσίες. Οι πιο διαδεδομένες αλληλοπαθητικές ενώσεις είναι οι φαινολικές, και ακολουθούν τα τερπένια, τα αλκαλοειδή, τα κυανογενή γλυκοζίδια κ.α. (Machrafi et al., 2006).

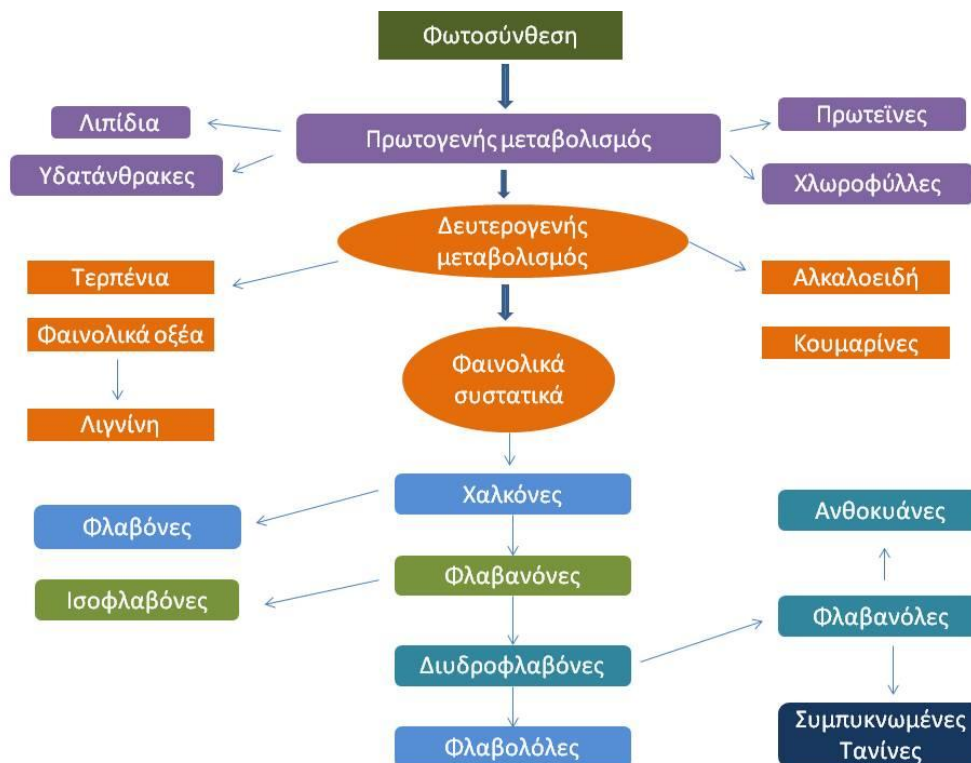
Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, τα προϊόντα αυτά αποτελούν αποταμιευτικά προϊόντα τα οποία κινητοποιούνται κατά τη διάρκεια ορισμένων φάσεων της ανάπτυξης του φυτού. Τα κινναμωμικά οξέα είναι πρόδρομες ενώσεις της λιγνίνης. Με την έκλυση πτητικών τερπενίων και ανθοκυανινών προσελκύονται επικονιαστές καθώς και φυσικοί εχθροί των οργανισμών που επιτίθενται στα φυτά (Wink, 1998; Heil & Kost, 2006). Τα флаβανοειδή έχουν επίσης προστατευτική δράση στα φυτά καθώς απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία (Αϊναλίδου, 2008).

Τα τερπένια έχει αποδειχθεί ότι βοηθούν τα φυτά στην προσαρμογή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (Αϊναλίδου, 2008). Οι τανίνες, που προέρχονται από τον πολυμερισμό φαινολικών ενώσεων, τα τερπένια, τα αλκαλοειδή και απλές φαινολικές ενώσεις προστατεύουν τα φυτά από προσβολές εντόμων ενώ φαινολικά γλυκοσίδια και τερπένια μπορεί να απωθήσουν έως και θηλαστικά που είναι βασικοί θηρευτές της φυτικής βιομάζας. Μια άλλη δράση τους που μελετήθηκε είναι ο ρόλος τους να δρουν ως σήματα επικοινωνίας

μεταξύ φυτών του ίδιου ή άλλου είδους προειδοποιώντας τα φυτά «δέκτες» για κάποιο επικείμενο κίνδυνο ώστε να ενεργοποιήσουν τα τελευταία τους αμυντικούς τους μηχανισμούς και να αντιμετωπίσουν τους εχθρούς τους περισσότερο αποτελεσματικά (Dicke *et al.*, 2003; Baldwin *et al.*, 2006; Preston *et al.*, 2001).

Προκειμένου για την περαιτέρω διερεύνηση της βιολογικής δράσης των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που εξετάζονται στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, είναι απαραίτητο να αναφερθούν τα ενεργά συστατικά τους, δηλαδή οι δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται σε αυτά.

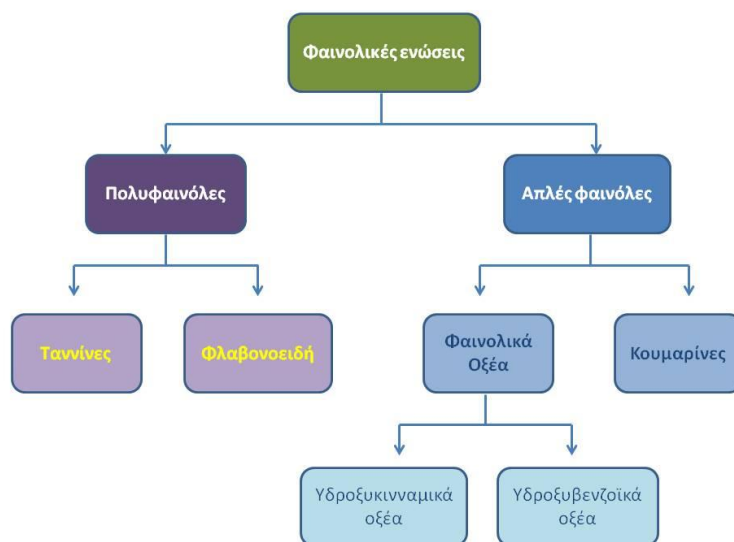
Οι πρόδρομες ενώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι πρωτογενείς μεταβολίτες που περιλαμβάνουν υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες,  $\alpha$ -αμινοξέα, νουκλεϊκά οξέα κλπ και αποτελούν τα θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά των οργανισμών (Σχ. I.2.1). Οι τάξεις ενώσεων που συνδέονται με τους δευτερογενείς μεταβολίτες είναι φαινολικές ουσίες στις οποίες περιλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυάνες, τα τερπένια, τα στεροειδή, τα αλκαλοειδή και πολλά ετεροκυκλικά παράγωγα. Στην παρούσα ενότητα και προκειμένου για τη μελέτη της δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών σε αρωματικά φυτά, δίδεται έμφαση στις φαινολικές ενώσεις και τα τερπένια.



**Σχήμα I.2.1** Πρωτογενής και δευτερογενής μεταβολισμός (Αναστασάκη, 2014 – προσαρμοσμένο από Morris and Robbins, 1997)

### 1.2.1.1 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινόλες είναι ενώσεις που φέρουν τουλάχιστον μια υδροξυλική ομάδα προσκολλημένη σε αρωματικό δακτύλιο. Αποτελούν την πλέον ενδιαφέρουσα ομάδα δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών εξαιτίας του μεγάλου αριθμού και της ποικιλίας των ενώσεων που απαντώνται στην ομάδα αυτή. Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα σπάνια απαντώνται ελεύθερα στους φυτικούς ιστούς, συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό τη μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών, στους οποίους αποτελούν το άγλυκο τμήμα της ένωσης (Αναστασάκη, 2014). Η όξινη υδρόλυση των φυτικών ιστών απελευθερώνει τα φαινολικά οξέα από τους εστέρες και τα άλατά τους κι επίσης διασπά τους γλυκοζίτες. Η αλκαλική υδρόλυση ή αλκαλική συμπύκνωση διασπά ενώσεις της κατηγορίας των φλαβονοειδών προς απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998). Είναι ενώσεις υδατοδιαλυτές και παίρνουν τη μορφή γλυκοσιδών όταν συνδυάζονται με ένα μόριο σακχάρου όπως η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η αραβινόζη, η ξυλόζη και η ρουτινόζη (Justesen *et al.*, 1998; Muchueti *et al.*, 2007).

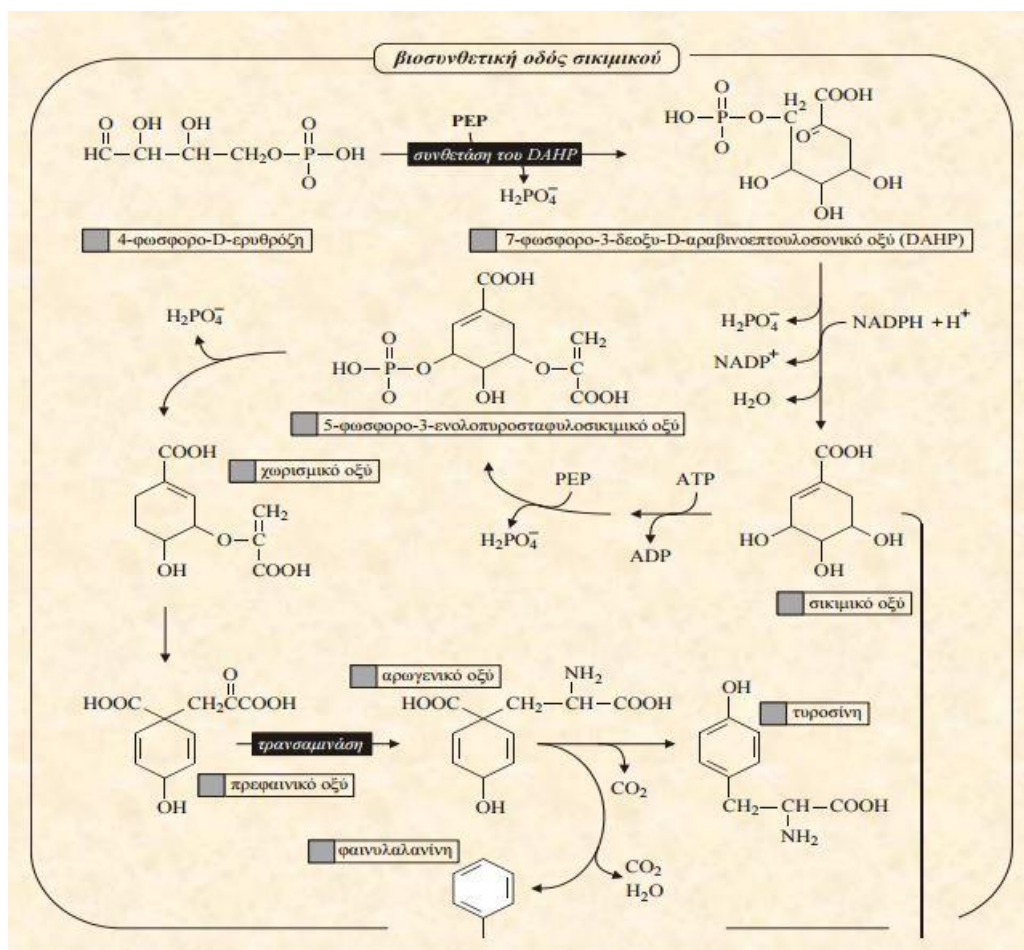


**Σχήμα 1.2.2** Κατηγορίες Φαινολικών Ενώσεων (Αναστασάκη, 2014, Προσαρμοσμένο από Robins, 2003)

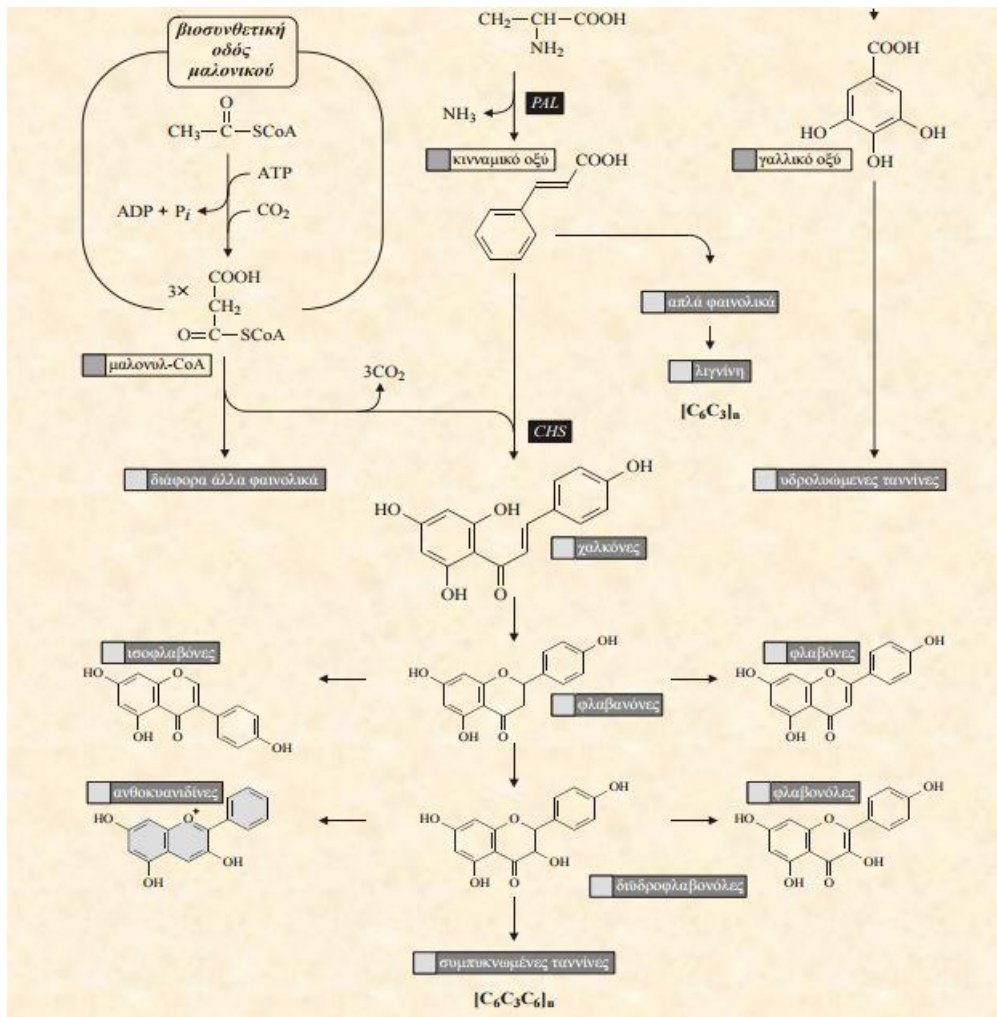
Περίπου 8.000 φαινολικές ενώσεις έχουν προσδιοριστεί οι οποίες κατατάσσονται από απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα μέχρι πολυμερείς ενώσεις όπως οι ταννίνες (Muchuwei *et al.*, 2007) **Σχ. (1.2.2)**. Οι κατηγορίες των φαινολικών συστατικών που απαντώνται στα αρωματικά φυτά παρουσιάζεται στο **Σχ. 1.2.2**.

## Φαινολικά οξέα

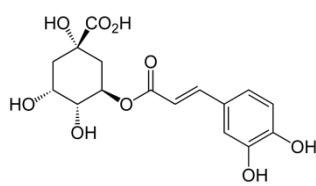
Όπως φαίνεται και στα Σχ. 1.2.3 & 1.2.4, η βιοσύνθεση των φαινολών γίνεται μέσα από τρία χαρακτηριστικά μονοπάτια, αυτή του σικιμικού οξέος, αυτή του οξικού – μηλονικού οξέος και από τα παράγωγα του φαινυλοπροπανίου. Με τη βιοσυνθετική πορεία μέσω του σικιμικού οξέος (Σχ. 1.2.3) σχηματίζονται τα αρωματικά οξέα, τα κινναμωμικά οξέα (τα οποία είναι τα πρώτα προϊόντα για το σχηματισμό παραγώγων του φαινυλοπροπανίου), τα φαινυλοκαρβοξυλικά οξέα και οι π-βενζοκινόνες. Τα φυσικά φαινολικά οξέα διακρίνονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους: τα υδροξυκινναμικά, με κύριους αντιπροσώπους το κινναμικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το σιναπικό, το φερουλικό και το *p*-κουμαρικό, και τα υδροξυβενζοϊκά όπως το βανιλικό, το σαλικυλικό, και το συριγγικό (Σχ. 1.2.4).



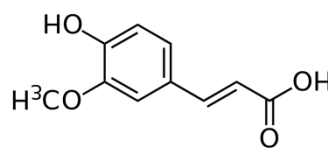
Σχήμα 1.2.3 Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων μέσω του σικιμικού οξέος (Καραμπουρνιώτης, 2015)



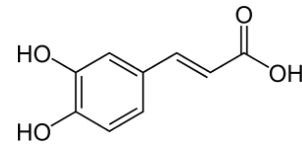
Σχήμα 1.2.4 Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων μέσω του μαλονικού οξέος (Καραμπουρνιώτης σημειώσεις, 2015)



Χλωρογενικό οξύ



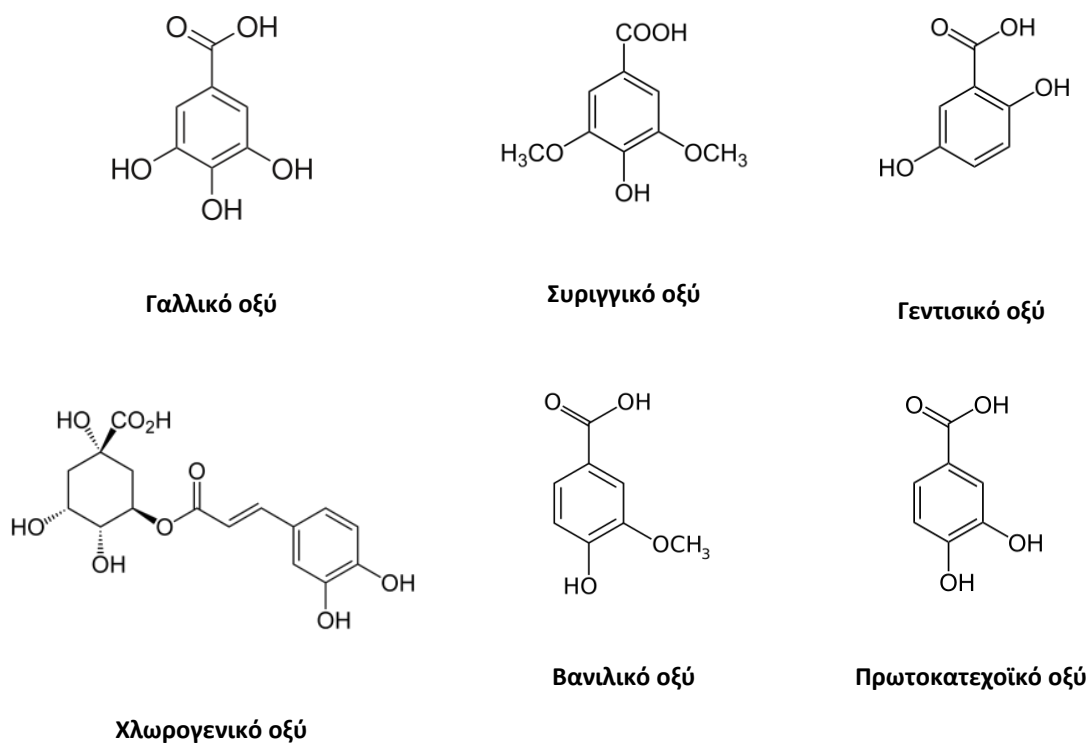
Φερουλικό οξύ



Καφεϊκό οξύ

Σχήμα 1.2.5 Υδροξυκινναμικά οξέα

Η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο σε αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι καθώς αυτά τα αμινοξέα είναι οι κοινές πρόδρομες ενώσεις (precursors) για την πλειοψηφία των φυσικών φαινολικών συστατικών (Σχ. 1.2.3).

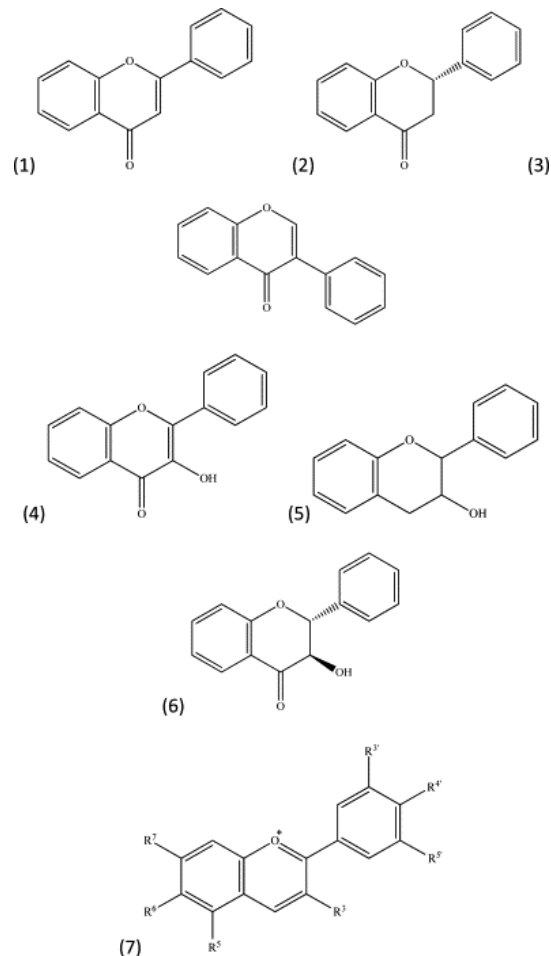


**Σχήμα 1.2.6** Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Οι απλές φαινόλες απαντώνται στα ανώτερα φυτά. Οι περισσότερο ενδιαφέρουσες απλές φαινόλες είναι η φαινόλη, η κατεχόλη, η υδροκινόνη και η φλωρογλυκινόλη. Η βιοσύνθεση των φαινολοκαρβοξυλικών οξέων και των απλών φαινολών σχετίζεται ιδιαίτερα. Στα ανώτερα φυτά τα φαινολοκαρβοξυλικά οξέα προέρχονται από διαφορετικά στάδια της βιοσυνθετικής πορείας μέσω του κινναμωμικού οξέος. Για παράδειγμα, το *p*-υδροβενζοϊκό οξύ είναι ένα παράδειγμα ενός φαινολικού καρβοξυλικού οξέος το οποίο προκύπτει με  $\beta$ -οξειδωση του *p*-κουμαρικού οξέος. Με εντελώς ανάλογο τρόπο το πρωτοκατεχοϊκό οξύ προκύπτει με  $\beta$ -οξειδωση του καφεϊκού οξέος, το βανιλικό από το φερουλικό κλπ.

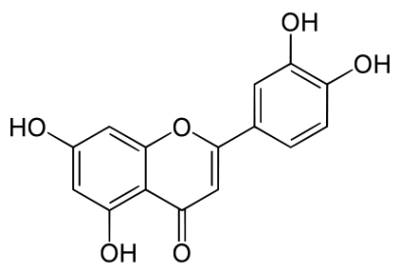
## Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή ή αλλιώς παράγωγα του φλαβανίου έχουν πάρει το όνομά τους από το λατινικό *flavus* που σημαίνει κίτρινο εξαιτίας του χρώματος αρκετών ενώσεων της ομάδας τους. Είναι πολυφαινολικές ενώσεις και διαιρούνται σύμφωνα με το στάδιο οξείδωσής τους στον κεντρικό ετεροδακτύλιο του φλαβανίου. Κατηγοριοποιούνται σε φλαβόνες (Λουτεολίνη, Απιγενίνη), φλαβονόλες (Κουερσετίνη, Καεμφερόλη) , φλαβανόνες (Ναρινγενίνη, Εριοδικτυόλη), ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες (Dai & Mumper, 2001).

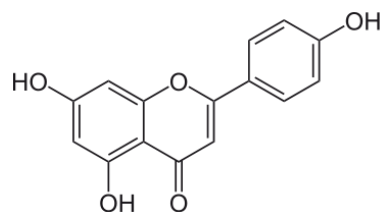


**Σχήμα 1.2.7** Βασικές δομές κοινών κατηγοριών φλαβονοειδών. (1) Φλαβόνες, (2) Φλαβανόνες, (3) ισοφλαβόνες, (4) φλαβονόλες, (5) φλαβανόλες, (6) φλαβανονόλες, (7) ισοφλαβόνες (Bessada et al., 2015)

Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από θέση και το βαθμό υδροξυλίωσης του μορίου τους (Robands, 2003). Οι γλυκοσίδες είναι λιγότερο ενεργοί από τις αγλυκόνες (Pena-Neira et al., 2000).

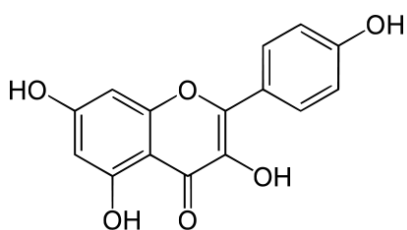


Λουτεολίνη

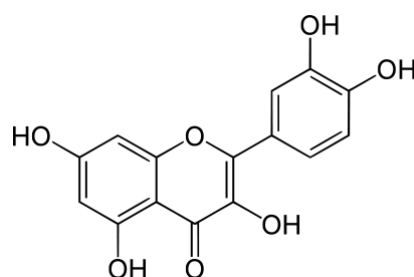


Απιγενίνη

Σχήμα 1.2.8 Φλαβόνες

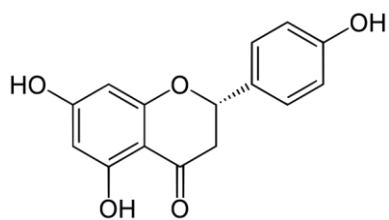


Καεμφερόλη

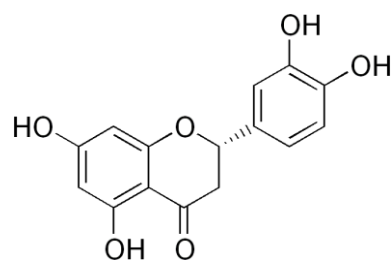


Κουερκετίνη

Σχήμα 1.2.9 Φλαβανόλες



Ναρινγενίνη



Εριοδικτυόλη

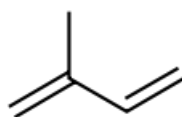
Σχήμα 1.2.10. Φλαβανόνες



Τα φλαβονοειδή και οι γλυκοσίδες τους είναι σταθερές ενώσεις και μπορούν να παραλαμβάνονται από τα φυτά με εκχύλιση με ψυχρούς ή θερμούς διαλύτες. Οι διαλύτες μπορεί να είναι νερό, οργανικοί διαλύτες, ή συνδυασμός αυτών.

### 1.2.1.2 Τερπένια

Τα τερπένια είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Είναι ενώσεις μη διαλυτές στο νερό, κυκλικές ή άκυκλες με πέντε, ή πολλαπλάσια του πέντε άτομα άνθρακα στο μόριό τους, που μπορεί να φτάσουν μέχρι και μερικές εκατοντάδες. Σύμφωνα με τον κανόνα του ισοπρενίου που προτάθηκε από τον Leopold Ruzicka τα τερπένια μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχονται από συνένωση κεφαλή- ουρά μονάδων ισοπρενίου (Σχήμα 1.2.11). Τα φυτικά αιθέρια έλαια αποτελούνται κυρίως από τερπένια.



Σχήμα 1.2.11 Ισοπρένιο

Πίνακας 1.2.1 Χαρακτηριστικές ομάδες τερπενοειδών

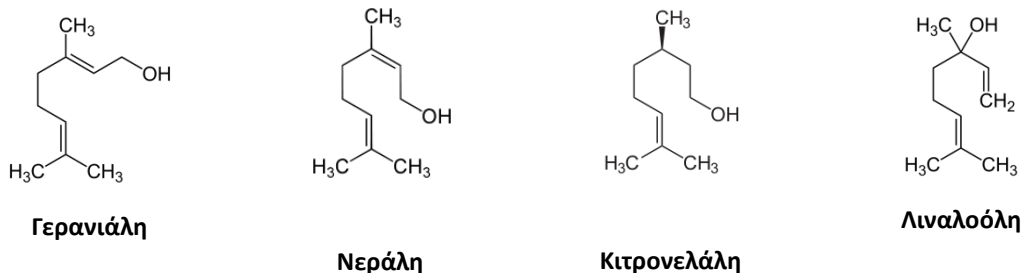
Ομάδα τερπενοειδών	Μονάδες ισοπρενίου/αριθμός ατόμων άνθρακα	Ενδεικτικά παραδείγματα
Μονοτερπένια	2 / 10	Θυμόλη, καρβακρόλη, θουγιόνη, γερανιόλη
Σεσκιτερπένια	3 / 15	Ζιγκιβερένιο, καρυοφυλένιο
Διτερπένια	4 / 20	Ρετινόλη, φυτόλη
Σεστερπένια	5 / 25	Γερανιφαρνεσόλη
Τριτερπένια	6 / 30	Χοληστερόλη
Τετρατερπένια	8 / 40	Λυκοπένιο, μονοκυκλικά και δικυκλικά καροτένια
Πολυτερπένια	>8	καουτσούκ

Οι μονάδες του ισοπρενίου συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν τις γραμμικές αλυσίδες ή δακτυλίους και οδηγούν στο σχηματισμό σκελετών με C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>30</sub> και C<sub>40</sub>. Τα τερπενοειδή κατατάσσονται σε ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου

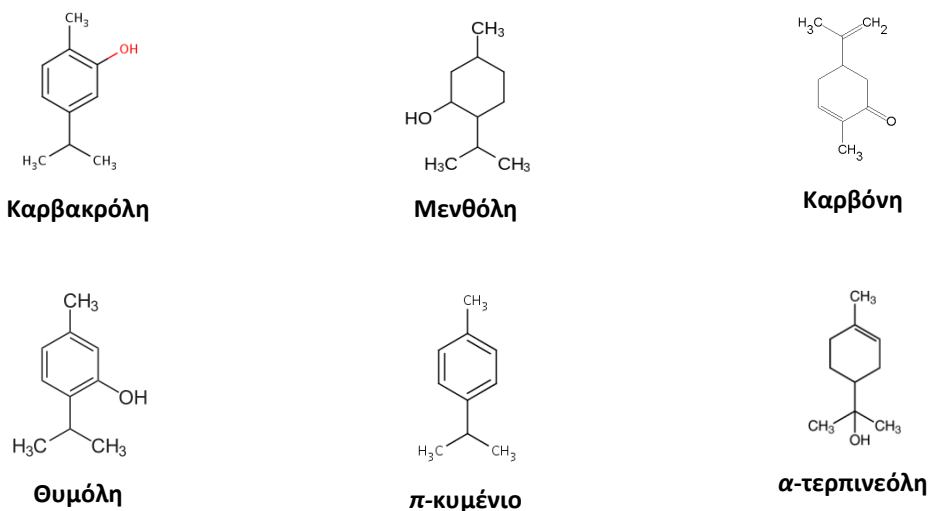
τις οποίες φέρουν στο μόριό τους (Πιν. 1.2.1). Έτσι τα μονοτερπένια είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και βιοσυντίθενται από δυο μονάδες ισοπρενίου, τα σесκιτερπένια έχουν 15 άτομα άνθρακα και προέρχονται από τρία μόρια ισοπρενίου κλπ (Murry, 1999). Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών ακολουθεί τη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος τα στάδια της οποίας παρουσιάζονται στο Σχ. 1.2.4.

### Μονοτερπένια

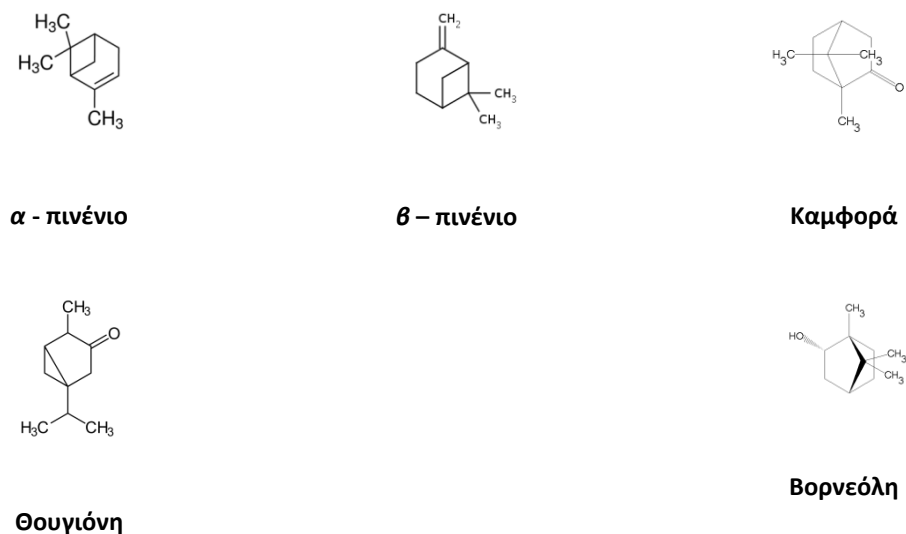
Τα μονοτερπένια είναι ενώσεις ευθείας ή κυκλικής δομής, που περιέχουν δυο ισοπρενικές αλυσίδες στο μόριό τους με μια ποικιλία ενεργών ομάδων. Είναι τα πλέον αντιπροσωπευτικά συστατικά των αιθερίων ελαίων (Bakkali *et al.*, 2008) σε ποσοστό μέχρι και 90% της σύστασής τους. Μπορεί να είναι άκυκλα, μονοκυκλικά ή δικυκλικά, πτητικά, και αδιάλυτα στο νερό. Μαζί με τα σесκιτερπένια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2.1. απαντώνται κυρίως στα φυτά και αποτελούν συστατικά των αιθερίων ελαίων τους. Εκτός όμως από αυτό, αποτελούν και πρόδρομες ενώσεις για τα πιο σημαντικά ποσοτικά φαινολικά και αρωματικά συστατικά των αιθερίων ελαίων (Αναστασάκη, 2014). Μεταξύ των άκυκλων μονοτερπενίων η γερανιάλη, νεράλη και κιτρονελάλη αποτελούν τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του μελισσόχορτου (Carnat *et al.*, 1998), ενώ η λιναλοόλη απαντάται στα αιθέρια έλαια πολλών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (Carnat *et al.*, 1998; Fathiazad *et al.*, 2011). Από τα μονοκυκλικά τερπένια, η καρβακρόλη, το π-κυμένιο και η θυμόλη περιέχονται σε σημαντικά ποσοστά στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης και του δίκταμου (Liolios *et al.*, 2009), η μενθόλη στη μέντα, και η καρβόνη και α-τερπινεόλη στο φασκόμηλο και το δεντρολίβανο (Daferera *et al.*, 2003). Από τα δικυκλικά μονοτερπένια, το α- και β-πινένιο, η βορνεόλη, η καμφορά και η θυγιόνη είναι κύριοι εκπρόσωποι των αιθερίων ελαίων του φασκόμηλου και του δεντρολίβανου (Li *et al.*, 2015).



Σχήμα 1.2.12 Άκυκλα μονοτερπένια



**Σχήμα I.2.13** Μονοκυκλικά μονοτερπένια

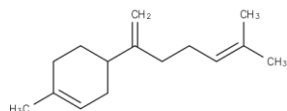


**Σχήμα I.2.14** Δικυκλικά Μονοτερπένια

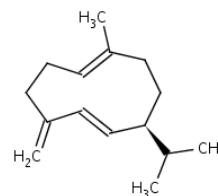
### Σεσκιτερπένια

Είναι ενώσεις που περιέχουν τρεις ισοπρενικές ρίζες στο μόριό τους και μπορεί να είναι άκυκλα, μονοκυκλικά ή δικυκλικά ή τρικυκλικά ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων στο μόριό τους. Τα μονοκυκλικά β-μπιζαμπολένιο και το D-γερμακρένιο, τα δικυκλικά β-καρυοφυλένιο, α-κοπαένιο και α-καδινένιο απαντώνται στα αιθέρια έλαια του

μελισσόχορτου, της ρίγανης και του δίκταμου (Carnat *et al.*, 1998; Fathiazad *et al.*, 2011, Liolios *et al.*, 2009, Daferera *et al.*, 2003).

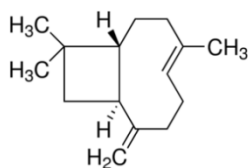


**β – μιζαμπολένιο**

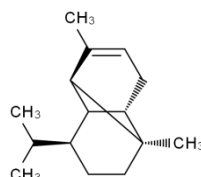


**D – γερμακρένιο**

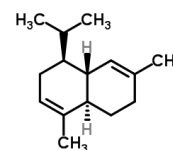
**Σχήμα I.2.15** Μονοκυκλικά σεσκιτερπένια



**β-καροφυλένιο**



**α-κοπαένιο**

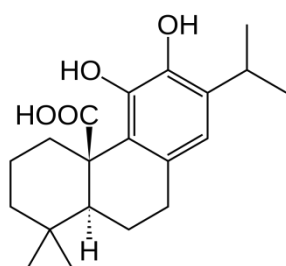


**α-καδινένιο**

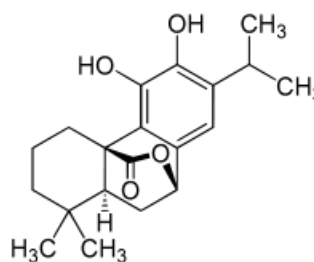
**Σχήμα I.2.16** Δικυκλικά σεσκιτερπένια

### Διτερπένια

Θεωρείται ότι προέρχονται από τέσσερις ισοπρενικές ρίζες, δεν είναι πητικακά και μπορεί να είναι άκυκλα ή κυκλικά. Επίσης, δεν παραλαμβάνονται από τα φυτά με τη διαδικασία της υδροαπόσταξης (Harbone, 1998). Παραλαμβάνονται όμως από την εκχύλιση της φυτικής δρόγης με οργανικούς διαλύτες όπως στην περίπτωση του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης (Σχ. I.2.17) που παραλαμβάνονται από το δεντρολίβανο και το φασκόμηλο (Cuneliev *et al.*, 1996). Χαρακτηριστικά παραδείγματα η φυτόλη, η οποία αποτελεί την ουρά στο μόριο της χλωροφύλλης, και στο καμφορένιο που φέρει στο μόριό του ένα εξαμελή δακτύλιο.



Καρνοσικό οξύ



Καρνοσόλη

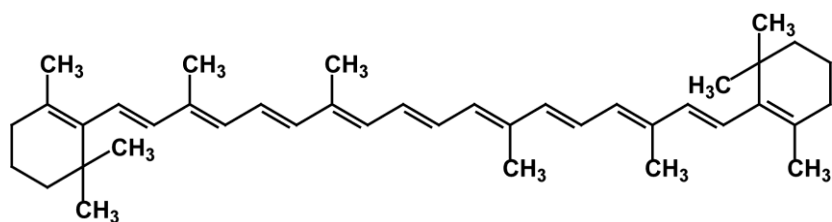
Σχήμα 1.2.17 Διτερπένια

### Τριτερπένια

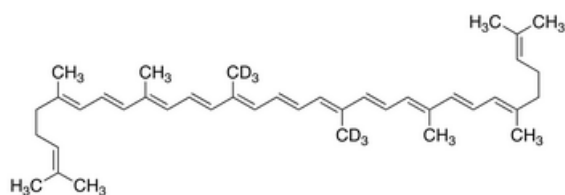
Μπορεί να είναι άκυκλα όπως το σκουαλένιο που είναι τριτερπένιο ανοιχτής αλυσίδας, αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της βιοσύνθεσης κυκλικών τριτερπενίων και βρίσκεται στο έλαιο ορισμένων σπερμάτων καθώς και το ελαιόλαδο. Κυκλικά τριτερπένια είναι τα στεροειδή στα οποία ανήκουν οι στερόλες, τα χολικά οξέα, οι στεροειδείς ορμόνες, οι βιταμίνες της ομάδας D, οι καρδιακοί γλυκοσίδες, οι στεροειδείς σαπωνίνες και τα στεροειδή αλκαλοειδή.

### Τετρατερπένια

Τα τετρατερπένια είναι κοινές λιποειδείς ενώσεις, και τα μοναδικά φυσικά είναι τα καροτινοειδή που βρίσκονται εντός των φωτοσυνθετικών ιστών κι εντοπίζονται στα θυλακοειδή των χλωροπλάστων και στους χρωμοπλάστες. Τα πλέον σημαντικά από αυτά είναι τα καροτενοειδή που συναντώνται σε διάφορα μέρη των φυτών σε φρούτα αλλά και κάποια είδη κατώτερων μικροοργανισμών (Αναστασάκη, 2014). Πρόκειται για λιποδιαλυτές φυσικές χρωστικές με χαρακτηριστικό κίτρινο και κόκκινο χρώμα που το δομικό τους τμήμα αποτελείται από τέσσερις ομάδες ισοπρενίου ενωμένες με σχέση «κεφαλή-κεφαλή» με αποτέλεσμα το κεντρικό τμήμα των ενώσεων αυτών να σχηματίζει μια μακριά ανθρακική αλυσίδα με συζυγιακούς ανθρακικούς δεσμούς. Στην περίπτωση του β-καροτένιου τα άκρα είναι κυκλοποιημένα ενώ στην περίπτωση του λυκοπένιου όχι (Σχ. 1.2.18).



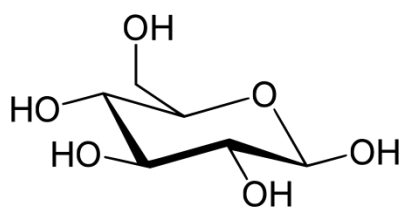
β-καροτένιο



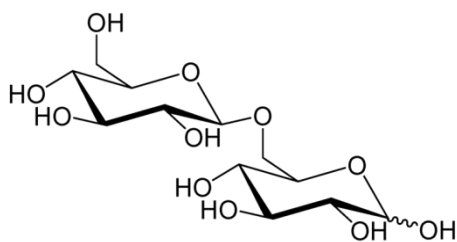
Λυκοπένιο

Σχήμα 1.2.18 Τετρατερπένια

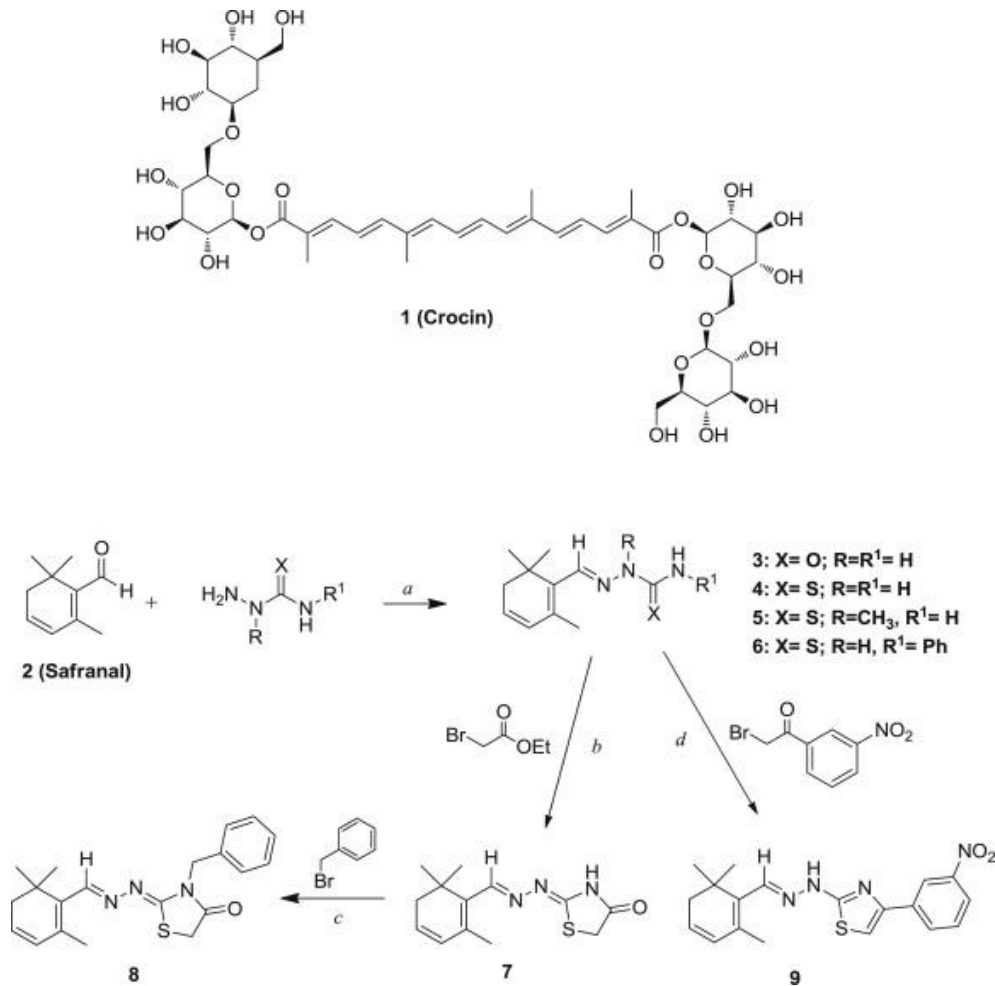
Στην ίδια κατηγορία ανήκουν οι κροκίνες (Σχ. 1.2.19) αλλά σε αντίθεση με τα υπόλοιπα καροτενοειδή είναι υδατοδιαλυτές. Οι κροκίνες αποτελούν τις κύριες ενώσεις του *Crocus sativus* L., (Tarantillis *et al.*, 1995) και σε αυτές οφείλεται το χαρακτηριστικό χρώμα των σιγμάτων του φυτού. Οι ίδιες ενώσεις απαντώνται και στους καρπούς της *Gardenia jasminoides* Ellis.



Γλυκόζη



Γεντοβιόζη



Σχήμα Ι.2.19 Δομές κροκινών

### Πολυτερπένια

Χαρακτηριστικό πολυτερπένιο είναι το καουτσούκ

### Μικτά τερπένια

Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται μια ποικιλία ενώσεων δομικά όμοιες με τα τερπένια αλλά φέρουν διάφορες προσθετικές ομάδες στο μόριό τους. Σε αυτές ανήκουν οι τοκοφερόλες, η βιταμίνη Κ, η ψυχοτρόπος κανναβινόλη, οι βενζοκινόνη και η ουμπικινόνη (συνένζυμο Q).

## 1.2.2 Βιολογική δράση δευτερογενών μεταβολιτών – μηχανισμοί δράσης

### 1.2.2.1 Βιολογική δράση υδατοδιαλυτών φαινολικών ουσιών

Από τις βιολογικές δράσεις των δευτερογενών μεταβολιτών, η αντιοξειδωτική είναι αυτή που έχει μελετηθεί εκτενώς (Fuentetaba, 2016). Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από τη θέση και το βαθμό υδροξυλίωσης του μορίου (Robards, 2003). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, οι γλυκοζίτες είναι λιγότερο ενεργοί από τις αγλυκόνες (Pena-Neira *et al.*, 2000).

Πέρα από τις εκτεταμένες βιβλιογραφικές αναφορές (Carvalho Costa *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2015; Heleno *et al.*, 2015; Janicsak *et al.*, 1999) για τη βιολογική δράση των φαινολικών οξέων, μικρή γνώση υφίσταται στο παρόν σχετικά με τον τρόπο απορρόφησής τους μέσα από τη διατροφή. Τα φαινολικά οξέα υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα φαγητά φυτικής προέλευσης και αποτελούν σημαντικό μέρος της καθημερινής διατροφής (Heleno *et al.*, 2015). Η μέση κατανάλωση φαινολικών οξέων από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής του έχει υπολογιστεί σε μια ποσότητα 200mg ανά ημέρα κατά προσέγγιση και ποικίλει ανάλογα τις διατροφικές συνήθειες (Clifford & Scalbert, 2000).

Το γαλλικό οξύ, το οποίο απαντάται στα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου – *Melissa officinalis* L. (Pereira *et al.*, 2014) και του δίκταμου *Origanum dictamnus* L. (Kouri *et al.*, 2007) εκτός από την αντισηπτική του δράση, έχει αναφερθεί επίσης ως βακτηριοστατικό, κατά της μελανινογένεσης και με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Kim, 2007). Επίσης, άλλες μελέτες του αποδίδουν αντικαρκινικές ιδιότητες σε δοκιμές καρκινικών κυττάρων από καρκίνο του προστάτη. Οι Gupta and Mahmood, (2007) αναφέρουν το γαλλικό οξύ ως πιθανό αναστολέα σουκρόζης και άλλων δισακχαριτών του παχέος εντέρου σε θηλαστικά ενώ οι Kratz *et al.* (2008) το έχει περιγράψει ως πολλά υποσχόμενη δραστική ουσία εναντίον του HSV-2 (Herpes Simplex Virus). Επιπλέον, ο Lu *et al.* (2010) έχουν προτείνει το γαλλικό οξύ ως πιθανή ουσία για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των όγκων του εγκεφάλου λόγω της ιδιότητάς του να μειώνει το χρόνο ζωής, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση σε κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος (glioma cells). Σε άλλες μελέτες η ίδια ουσία αποδείχθηκε ικανή να επιφέρει θανάτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω νεκρόπτωσης (You *et al.*, 2010).

Το *p*-Υδροβενζοϊκό οξύ που απαντάται σε εκχυλίσματα του ύσσωπου - *Hyssopus officinalis* L (Dzamic *et al.*, 2013) και της ρίγανης (*Origanum vulgare* L.) (Kogianou *et al.*, 2013) έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία να έχει ιδιαίτερα αντιοξειδωτική δράση ενάντια στις ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans *et al.*, 1996), αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνα



βακτήρια και μύκητες (Heleno *et al.*, 2013) καθώς και ιδιότητες ως οιστρογόνο και αντιμεταλλαξιγόνο (Pugazhendhi *et al.*, 2005).

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ που απαντάται στα εκχυλίσματα του ύσσωπου (Dzamic *et al.*, 2013; Hatiroglu *et al.*, 2013) του δίκταμου (Kouri *et al.*, 2007) και της ρίγανης (Kogiannou *et al.*, 2013) έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως αντιοξειδωτικό (Ferreira *et al.*, 2009), αντιμικροβιακό (Alves *et al.*, 2013), κυτταροτοξικό (Yip *et al.*, 2006), χημειοπροστατευτικό, με νευροπροστατευτικές ιδιότητες (An *et al.*, 2006) και δράση αναστολής οξείδωσης της LDL (Yin *et al.*, 2009).

Κι άλλα φαινορικά οξέα έχει αναφερθεί να έχουν επωφελείς ιδιότητες όπως το βανιλικό το οποίο έχει βρεθεί σε εκχυλίσματα του φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.) (Kalliora *et al.*, 2014), του δίκταμου (Kouri *et al.*, 2007), και της ρίγανης (Kogiannou *et al.*, 2013) το οποίο έχει δείξει να έχει τόσο ανθελμινθικές ιδιότητες όσο και να καταστέλλει την ηπατική ίνωση σε χρόνιες ηπατικές βλάβες (Itoh *et al.*, 2010). Πρόσθετα το βανιλικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι δύναται να αναστείλει την 5' – νουκλεοτιδάση που περιέχεται στο δηλητήριο φιδιών.

Το συριγγικό οξύ που περιέχεται στα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου (Arceusz *et al.*, 2013), του ύσσωπου (Dzamic *et al.*, 2013) και του δίκταμου (Kouri *et al.*, 2017), έχει δείξει να έχει αντιοξειδωτική, αντιβακτηριδιακή και ηπατοπροστατευτική δράση (Itoh *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2008). Το γεντισικό οξύ συστατικό των εκχυλισμάτων του ύσσωπου (Dzamic *et al.*, 2013) περιγράφεται στη βιβλιογραφία ως αντιφλεγμονώδες, αντιρρευματικό, αναλγητικό, κυτταροστατικό και ικανό να αναστείλει την οξείδωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης LDL στο ανθρώπινο πλάσμα (Ashidate *et al.*, 2005).

Το π-κουμαρικό οξύ το οποίο έχει εντοπιστεί σε εκχυλίσματα ύσσωπου (Dzamic *et al.*, 2013; Hatiroglu *et al.*, 2013), φασκόμηλου (Kalliora *et al.*, 2014; Roby *et al.*, 2013) και δίκταμου (Liolios *et al.*, 2010; Kouri *et al.*, 2007) εκτός από αντιοξειδωτική δράση έχει δείξει αντινεοπλασματικές ιδιότητες σε μια σειρά τύπων καρκίνου του μαστού (MCF7), NCI0H460 και HTC15 (Heleno *et al.*, 2014). Σε μελέτη για την αντιμικροβιακή δράση του ίδιου οξέος από τους Lou *et al.*, (2012) οι συγγραφείς ανέφεραν ότι το π-κουμαρικό οξύ έχει ένα διπλό μηχανισμό αντιμικροβιακής δράσης. Οι Heleno *et al.* (2014) περιέγραψαν την ίδια ουσία ως υποσχόμενα αποτελεσματική ενάντια σε μια σειρά παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων.

Στο χλωρογενικό οξύ το οποίο έχει βρεθεί να περιέχεται σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* που αναλύονται στην παρούσα μελέτη (Dzamic *et al.*, 2013; Kalliora *et al.*, 2014; Hatiroglu *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011; Roby *et al.*, 2013; Pereira *et al.*,

2014; Kouri *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014) με βάση έρευνες που έχουν προηγηθεί έχουν αποδοθεί διάφορες βιολογικές δράσεις οι οποίες περιλαμβάνουν αντιμεταλλαξιγόνες, ιντιικές, αντικαρκινικές (Xu *et al.*, 2012) αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές και νευροτροφικές (Shen *et al.*, 2012). Το χλωρογενικό οξύ έχει βρεθεί να εμφανίζει ποικιλία θετικών ανταποκρίσεων σε έμμονες φλεγμονές καθώς και σε νευροφλεγμονώδεις υποθέσεις της κατάθλιψης σε σχέση πάντα με τις υφιστάμενες αντικαταθλιπτικές θεραπείες. Οι νευροφλεγμονές παίζουν ρόλο κλειδί στη ρύθμιση του καταβολισμού της τρυπτοφάνης καθώς και στην υγεία και επιβίωση των νευρώνων. Το χλωρογενικό οξύ έχει δείξει να μειώνει τη παραγωγή ενός αριθμού προφλεγμονωδών μεσολαβητών περιλαμβανομένων των TNF- $\alpha$ , ιντερλευκίνης (IL)-1 $\beta$ , IL-6, και της ιντερφερόνης (IFN)- $\gamma$  στα μακροφάγα κύτταρα (Shen *et al.*, 2012). Πρόσθετα, ο Krakaueg (2002) βρήκε το ίδιο συστατικό να μειώνει τις εξωτοξίνες του σταφυλόκοκκου οι οποίες προσομοιώνουν τη δράση των μονοπύρηνων περιφερειακών αιματοκυττάρων –PMBC (Peripheral Mononuclear Blood Cells). Όλα τα προαναφερόμενα αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες για την κατάθλιψη αλλά και τους ρυθμιστές του καταβολισμού της τρυπτοφάνης (Hughes *et al.*, 2012; Maes, 2011; Maes *et al.*, 2009; Piletz *et al.*, 2009). Επιπλέον, το χλωρογενικό οξύ βρέθηκε να μειώνει φλεγμονώδεις δείκτες στα ηπατικά κύτταρα (Qin *et al.*, 2005) αλλά και να δρα ενάντια στη νόσο του Αλτσχάιμερ και στη μανιοκατάθλιψη που σχετίζονται με την παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και της βουτυλοχολινεστεράσης (BChE) που αποτελούν ευρέως αποδεκτές θεραπείες στη νόσο του Αλτσχάιμερ (Birks, 2006; Oboh *et al.*, 2013).

Το φερουλικό οξύ που έχει εντοπιστεί σε εκχυλίσματα ύσσωπου (Dzamic *et al.*, 2013), φασκόμηλου (Roby *et al.*, 2013), μελισσόχορτου (Arceusz *et al.*, 2013) δίκταμου (Liolios *et al.*, 2010) και ρίγανης (Agiomyrgiannaki and Dais, 2012) έχει αποδειχθεί να έχει δράση αντικαταθλιπτική δράση συγκρίσιμη με αυτή της υψηλής δόσης ιμπιπραμίνης – ένα τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό (Xu *et al.*, 2013; Zeni *et al.*, 2012). Εκτός από αυτό αξιολογήθηκε η επίδρασή του στα επίπεδα σεροτονίνης σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, και διαπιστώθηκε ότι είχε παρόμοια αποτελέσματα επί των επιπέδων σεροτονίνης συγκριτικά με την ιμπιπραμίνη (Xu *et al.*, 2013). Πρόσθετα παρατηρήθηκε συνεργατική δράση ενάντια στην κατάθλιψη μεταξύ του φερουλικού οξέος και των συμβατικών αντικαταθλιπτικών φλουοξετίνη, παροξετίνη και σετραλίνη (Zeni *et al.*, 2012). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και των νευρικών προγονικών κυττάρων (NPC) του σώματος, τα οποία είναι πρόδρομοι νευρώνων και νευρογλοίων στα έμβρυα και τους ενήλικες (Yabe *et al.*, 2010).

Στο καφεϊκό οξύ που και αυτό έχει βρεθεί να περιέχεται σε όλα τα εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη (Dzamic *et al.*, 2013; Hatipoglu *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011; Roby *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Kouri *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014; Arceusz *et al.*, 2013; Kamdem *et al.*, 2013), έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Butt and Sultan, 2011; Kalonia *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009) παράλληλα με τις νευροπροστατευτικές (Kalonia *et al.*, 2009). Επίσης, όπως και το χλωρογενικό οξύ εμφανίζει ευεργετικά αποτελέσματα ενάντια στην κατάθλιψη μέσω της αναστολής των ενζύμων AChE και της BChE, σε μια σχέση δόσοεξαρτώμενη, όμως, με καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το χλωρογενικό (Oboh *et al.*, 2013) έχοντας ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στη βελτίωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης. Οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες είναι πολύ πιο ισχυρές έναντι άλλων φαινολικών οξέων όπως το χλωρογενικό και το φερουλικό (Kikuzaki *et al.*, 2002). Η αντιοξειδωτική του δράση είναι παρόμοια ή και καλύτερη από εκείνη της α-τοκοφερόλης με βάση τα αποτελέσματα μιας ποικιλίας δοκιμασιών (Chen and Ho, 1997; Gülçin, 2006). Το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του έχουν ευρέως μελετηθεί για τις βιολογικές τους επιδράσεις. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τις ίδιες ενώσεις να έχουν αντικαταθλιπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες είναι σημαντικές πτυχές των νευροφλεγμονοδών υποθέσεων για την κατάθλιψη (Hall *et al.*, 2015). Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ έχουν επίσης αναφερθεί να έχουν βιοενεργές ιδιότητες τόσο ως αντιμικροβιακές ουσίες ενάντια σε παθογόνα βακτήρια και μύκητες (Alves *et al.*, 2013) όσο και ως αντιοξειδωτικές ουσίες (Piazzon *et al.*, 2012; Vilano *et al.*, 2005).

#### 1.2.2.2 Βιολογική δράση μη υδατοδιαλυτών συστατικών

Τα πτητικά συστατικά των δευτερογενών μεταβολιτών περιέχονται στα αιθέρια έλαια τα οποία παραλαμβάνονται από την υδροαπόσταξη των αρωματικών φυτών. Τα αιθέρια έλαια είναι συνήθως πολύπλοκα μίγματα που μπορεί να περιέχουν 20-60 διαφορετικά συστατικά σε διάφορες συγκεντρώσεις. Δυο με τρία κύρια συστατικά που βρίσκονται και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (20-70%) χαρακτηρίζουν το κάθε αιθέριο έλαιο ενώ τα υπόλοιπα συστατικά βρίσκονται σε πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Bakkali *et al.*, 2008). Για παράδειγμα η καρβακρόλη (30%) και η θυμόλη (27%) είναι τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του *Origanum compactum*, η λιναλοόλη (68%) το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του *Coriandrum sativum*, η α- και β- θουγιόνη (57%) και η καμφορά (27%) τα

αντίστοιχα συστατικά της *Artemisia herba-alba*, η μενθόλη (59%) και η μενθόνη (19%) τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της *Mentha piperita*. Γενικά, τα κύρια συστατικά προσδιορίζουν και τις βιολογικές ιδιότητες εκάστου αιθερίου ελαίου. Τα βιοενεργά συστατικά των αιθερίων ελαίων περιλαμβάνουν δύο ομάδες ξεχωριστής βιοσυνθετικής προέλευσης (Croteau *et al.*, 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky *et al.*, 2006). Η κύρια ομάδα αποτελείται από τερπένια και τερπενοειδή που περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους και η άλλη από αρωματικά και αλειφατικά συστατικά τα οποία είναι όλα χαμηλού μοριακού βάρους.

Μεταξύ των κύριων βιολογικών δράσεων των αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους είναι η κυτταροτοξικότητα. Ως κατεχοχίν λιπόφιλες ενώσεις διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη καθώς εισχωρούν στα διάφορα στρώματα πολυσακχαριτών, λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων. Η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών είναι ο κύριος μηχανισμός της κυτταροτοξικότητάς τους. Στα βακτήρια, ειδικότερα, η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σχετίζεται με την απώλεια ιόντων και την αναγωγή του δυναμικού των μεμβρανών, την κατάρρευση της αντλίας πρωτονίων και την εξάντληση των αποθεμάτων ATP (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 2000; Di Pasqua *et al.*, 2006; Turina *et al.*, 2006). Επίσης, τα αιθέρια έλαια μπορούν να καταστρέψουν πρωτεΐνες και λιπίδια στο κυτταρόπλασμα (Ultee *et al.*, 2002; Burt, 2004). Η καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεμβρανών προκαλεί διαρροή των μακρομορίων που περιέχονται σε αυτό οδηγώντας σε πλήρη διάρρηξή του (Juven *et al.*, 1994; Gustafson *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Oussalah *et al.*, 2006).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η δράση των αιθερίων ελαίων προκαλεί αποπόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και μείωση του δυναμικού της μεμβράνης (Richter and Schlegel, 1993; Novgorodov and Gudz, 1996; Vercesi *et al.*, 1997) μειώνοντας το pH κι επηρεάζοντας όπως και στα βακτήρια την αντλία πρωτονίων και τη δεξαμενή ATP. Η διαπερατοποίηση των εξωτερικών και εσωτερικών μεμβρανών οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο μέσω νεκρόπτωσης (Yoon *et al.*, 2000; Armstrong, 2006). Η σάρωση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κυττάρων υπό την επίδραση αιθερίων ελαίων αποκαλύπτει αλλοιώσεις των κυττάρων σε κυτταρική μεμβράνη, πυρήνα και κυτταρόπλασμα (Soylu *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 2007; Santoro *et al.*, 2007). Ανάλυση του προφίλ των λιπιδίων με αέρια χρωματογραφία και των κυτταρικών δομών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βακτηρίων υπό την επίδραση συστατικών αιθερίων ελαίων έδειξε ισχυρή μείωση σε ακόρεστα και μια αύξηση σε κορεσμένα λιπαρά καθώς και μεταβολές σε κυτταρικές δομές (Di Pasqua *et al.*, 2007). Η καταστροφή της κυτταρικής

μεμβράνης εξ αιτίας των αιθερίων ελαίων έχει επιβεβαιωθεί, επίσης, με την ανάλυση μικροσυστοιχιών γονιδίων του *Saccharomyces cerevisiae* που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση εργοστερόλης και στην πρόσληψη στερολών, στο μεταβολισμό των λιπιδίων, και στη δομή και λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος από την επίδραση τερπενίων (Parveen *et al.*, 2004).

Κυτταροτοξικές επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί *in vitro* στα περισσότερα παθογόνα Gram+ και Gram- βακτήρια ανεπτυγμένα με διάφορες μεθόδους (Williams *et al.*, 1998; Kalemba and Kunicka, 2003; Arnal-Schnebel *et al.*, 2004; Burt, 2004; Hong *et al.*, 2004; Rota *et al.*, 2004; Si *et al.*, 2006; Sonboli *et al.*, 2006) στους ιούς ADN και ARN (Hayashi *et al.*, 1995; De logu *et al.*, 2000; Reichling *et al.*, 2005) σε μύκητες (Manohar *et al.*, 2001; Pitarokili *et al.*, 2002; Hammer *et al.*, 2002; Kosalec *et al.*, 2005) και ζύμες (Harris, 2002; Hammer *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Pauli, 2006; Carson *et al.*, 2006).

Η κυτταροτοξική δράση έχει ιδιαίτερη σημασία στην αξιοποίηση των αιθερίων ελαίων όχι μόνο κατά συγκεκριμένων παθογόνων οργανισμών και παρασίτων για τον άνθρωπο, αλλά και στη διατήρηση αγροτικών προϊόντων και αλιευμάτων. Αιθέρια έλαια αλλά και μεμονωμένα συστατικά τους έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά έναντι μεγάλου αριθμού οργανισμών περιλαμβανομένων βακτηρίων (Holley and Dhaval, 2005; Basile *et al.*, 2006; Scheltz *et al.*, 2006), ιών (Duschatzky *et al.*, 2005), μυκήτων (Hammer *et al.*, 2002; Velluti *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2005; Cavaleiro *et al.*, 2006; Pawar and Thaker, 2006), πρωτόζωων (Monzote *et al.*, 2006), παρασίτων (Moon *et al.*, 2006; Priestley *et al.*, 2006), ακάρεων (Rim and Jee, 2006), προνυμφών (Hierro *et al.*, 2004; Pavel, 2005; Morais *et al.*, 2006; Ravi Kiran *et al.*, 2006) και εντόμων (Bhatnagar *et al.*, 1993; Lamiri *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006; Burfield and Reekie 2005; Yang and Ma, 2005; Sim *et al.*, 2006; Kouninki *et al.*, 2005; Chaiyasit *et al.*, 2006, Cheng *et al.*, 2007).

Η κυτταροτοξική δράση των αιθερίων ελαίων ή των κύριων συστατικών τους, κάποιες φορές ενεργοποιείται με το φως όπως έχουν δείξει *in vitro* βιοδοκιμές σε κύτταρα θηλαστικών στις οποίες έγινε χρώση των κυττάρων ή χρησιμοποιήθηκε φθορίζουσα χρωστική (Soderberg *et al.*, 1996; Stamati *et al.*, 1999; Dijoux *et al.*, 2006).

Δεδομένου ότι τα περισσότερα αιθέρια έλαια έχουν βρεθεί να είναι κυτταροτοξικά, χωρίς όμως να είναι μεταλλαξιογόνα, είναι πιθανό να στερούνται καρκινογενούς δράσης. Ωστόσο, κάποια συστατικά των αιθερίων ελαίων μπορεί να θεωρηθούν ως ουσίες δευτερεύοντα καρκινογόνες μετά από μεταβολική τους ενεργοποίηση (Guba, 2001). Για παράδειγμα αιθέρια έλαια όπως αυτά της *Salvia sclarea* προκαλούν εκκρίσεις οιστρογόνων οι οποίες με την σειρά τους μπορεί να προκαλέσουν οιστρογόνο-εξαρτώμενους καρκίνους

(Averbeck *et al.*, 1990). Η πουλεγόνη, ένα συστατικό του αιθερίου ελαίου πολλών ειδών μέντας μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση μέσω του μεταβολισμού της γλουταθειόνης (Zhou *et al.*, 2004). Επίσης, η εστραγόλη, ένα συστατικό του αιθερίου ελαίου του *Ocimum basilicum* έχει δώσει ενδείξεις καρκινογόνους δράσης σε πειραματόζωα (Miller *et al.*, 1983; Anthony *et al.*, 1987).

Οι μέχρι πρότινος εργασίες έδειξαν ότι οι αντι-μεταλλαξιόνες ιδιότητες των αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους μπορεί να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες, όπως η ενεργοποίηση της ενζυμικής αποτοξίνωσης των μεταλλαξιόνων λόγω της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων (Bakkali *et al.* 2008). Λιγότερο γνωστή είναι μια πιθανή παρεμβολή με αντιμεταλλαξιγόνα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA σε περίπτωση γενοτοξικής βλάβης. Ορισμένοι παράγοντες πέρα από την αντιμεταλλαξιγόνο δράση έχει βρεθεί να προωθούν την επιδιόρθωση του DNA (Kada and Shimoi, 1987; De Flora *et al.*, 1992; Bronzetti *et al.*, 1992; Vukovic-Gacic *et al.*, 2006).

Οι De-Oliveira *et al.*, (1999), έδειξαν ότι η μενθόλη το α-πινένιο, το α-τερπινένιο, α-τερπινεόλη, 1,8 κινεόλη, α-λιμονένιο, η καμφορά, η κιτρονελλάλη και η κιτράλη διαμορφώνουν την ηπατική δραστηριότητα της μονο-οξυγενάσης αλληλεπιδρώντας στη βιομετατροπή προκαρκινογόνων ξενοβιοτικών.

Σε πιο πρόσφατη μελέτη το αιθέριο έλαιο του *Origanum compactum* καθώς και κάποια επιμέρους συστατικά του αποδείχθηκαν αντιμεταλλαξιγόνα τόσο έμμεσα κατά της ουρεθάνης όσο και άμεσα στον μεταλλαξιγόνο μεθυλεστέρα (Mezzoug *et al.*, 2007).

Τα αιθέρια έλαια περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες όπως τα τερπενοειδή και τα φαινολικά συστατικά. Η αντιοξειδωτική δράση των αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους έχει αποδειχθεί *in vitro* με διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους (Ruberto and Baratta, 2000; Pizzale *et al.*, 2002; Candan *et al.*, 2003; Alma *et al.*, 2003; Kulisic *et al.*, 2004; Tepe *et al.*, 2004; Mimica-Dukic *et al.*, 2004; Sacchetti *et al.*, 2005; Tuberoso *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2006; Trevisan *et al.*, 2006). Για το λόγο αυτό και λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, έχει προταθεί και δοκιμάζεται η χρήση τους ως πρόσθετα σε τρόφιμα (Aeschbach *et al.*, 1994).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια, παράγονται ανιόντα και υπεροξειδίο του υδρογόνου τα οποία αντιδρούν με τον σίδηρο που περιέχουν και παράγουν δραστικά ενδιάμεσα όπως ρίζες υδροξυλίου οι οποίες είναι ιδιαίτερα επιζήμιες για το μιτοχονδριακό DNA. Το κατεστραμμένο μιτοχονδριακό DNA με τη σειρά του αναστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγώντας σε συσσώρευση δραστικών

μορφών οξυγόνου ROS (Reactive Oxygen Species) (Houten *et al.*, 2006). Κι όλο αυτό συμβαίνει μέσω του μηχανισμού διείσδυσης των αιθερίων ελαίων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Στα μιτοχόνδρια όταν αλλάζει η ροή των ηλεκτρονίων μέσω της αλυσίδας μεταφοράς τους, παράγουν ελεύθερες ρίζες που οξειδώνουν και καταστρέφουν λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA. Επιπλέον, ορισμένα φαινολικά συστατικά των αιθερίων ελαίων οξειδώνονται όταν έρχονται σε επαφή με τη ROS και παράγουν πολύ ενεργές ρίζες φαινοξυλίου οι οποίες προστίθεται στα ROS που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια. Οι προαναφερόμενες αντιδράσεις εξαρτώνται και ενισχύονται από την παρουσία μεταλλικών ιόντων στο κύτταρο όπως  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ή  $Mn^{++}$  (Stadler *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1997; Sakihama *et al.*, 2002; Jimenez Del Rio and Velez-Pardo, 2004; Azmi *et al.*, 2006).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro*, από πολλά φυσικά προϊόντα συμπεριλαμβανομένων και των αιθερίων ελαίων. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται ότι για πολλές ασθένειες η χρήση αντιοξειδωτικών θα μπορούσε να είναι επωφελής για την υγεία, και ιδιαίτερα σε αυτές που οφείλονται σε υπερφόρτωση των αντιδράσεων οξειδωτικού στρες μετά από υπερβολική κατανάλωση κρέατος, ζάχαρης, κλπ (Bakkali *et al.*, 2008). Η αντιμεταλλαξιογόνος (Clark, 2002) και αντικαρκινική δράση των αντιοξειδωτικών πιστεύεται ότι οφείλεται στις ιδιότητες σάρωσης των ελεύθερων ριζών τους (Ames *et al.*, 1993; Birt *et al.*, 2001; Surh, 2002; Ferguson *et al.*, 2004; Collins 2005). Ωστόσο, κάποια φυσικά προϊόντα όπως φλαβονοειδή και κάποια φαινολικά συστατικά τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες *in silico*, είναι δυνατό μετά τη διείσδυσή τους στα κύτταρα να οξειδωθούν προς ROS και έτσι να δημιουργηθούν πρόσθετες ρίζες όπως ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου καθώς και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Schwartz *et al.*, 1993; Albanes *et al.*, 1995; Schwartz, 1996; Sakagami and Satoh, 1997; Bijur *et al.*, 1997; Young and Lowe, 2001; Lowe *et al.*, 2003). Πράγματι, κάποια αντιοξειδωτικά αλληλεπιδρώντας με ROS μετατρέπονται σε προοξειδωτικά τα οποία μπορούν στη συνέχεια να οξειδώσουν λιπίδια πρωτεΐνες αλλά και DNA (Metodiowa *et al.*, 1999; Cowan, 1999; Galati *et al.*, 2002; Galati and O'Brien, 2004; Fujisawa *et al.*, 2002; Sakihama *et al.*, 2002; Nemeikaite-Ceniene *et al.*, 2005; Barbehenn *et al.*, 2005; Atsumi *et al.*, 2005). Το παραπάνω ενδεχόμενο συμβαίνει λόγω της μειωμένης ενδοκυτταρικής άμυνας σε αναστολή των οξειδωτικών αντιδράσεων που οφείλονται σε φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Τα φαινολικά συστατικά των αιθερίων ελαίων μπορούν συνεπώς να λειτουργήσουν ως προοξειδωτικά και να επηρεάσουν την κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη απόπτωση,

νέκρωση αλλά και ζημιές στις πρωτεΐνες και το DNA, ή συνολικά κυτταροτοξικά αποτελέσματα (Bakkali *et al.*, 2006).

Η συγκέντρωση ακόμα και των αποδεδειγμένα επωφελών ουσιών διαφοροποιεί τη δράση τους. Οι Fan and Lou (2004) βρήκαν ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι εξαιρετικά αντιοξειδωτικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά σε μεγάλες συγκεντρώσεις δύναται να προκαλέσουν καταστροφή του DNA σε κυτταρικό επίπεδο. Για παράδειγμα η ρετινόλη και η τοκοφερόλη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιόνες ιδιότητες, αλλά αν αυξηθεί η συγκέντρωσή τους τότε αυτές αποκτούν ιδιότητες γενετοξικές (Bronzetti *et al.*, 2001). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν από τους Palozza *et al.* (2004), όπου η ανάσχεση ή προώθηση της αύξησης αλλά και η κυτταρική απόπτωση εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση των καροτενοειδών στις επεμβάσεις του. Αντίστοιχα, βρήκαν να μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης η βιολογική δράση εκχυλισμάτων πράσινου τσαγιού, κourkouμίνης και *Gingo biloba* (Ramassamy, 2006).

Στα κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητη η οξειδοαναγωγική ισορροπία. Πιθανότατα οι ενώσεις που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση μπορούν να μειώσουν το κύριο φορτίο του οξειδωτικού στρες, αλλά όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών ισοδυνάμων κι επικρατούν τα οξειδωτικά λόγω της μετατροπής των αντιοξειδωτικών σε προοξειδωτικά, οι αντιοξειδωτικές κυτταρικές άμυνες υποχωρούν και καταστρέφονται σημαντικά κυτταρικά συστατικά (Sies and Cadenas, 1985). Από τις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη βιολογική δράση πολυφαινολών και φαινολικών συστατικών μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να δράσουν ως προοξειδωτικά (Sakagami *et al.*, 1999; Sakihama *et al.*, 2002; Fujisawa *et al.*, 2002; Barbehenn *et al.*, 2005; Bakkali *et al.*, 2006).

Γενικά έχει βρεθεί ότι τα κύρια συστατικά εκάστου αιθερίου ελαίου εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τις βιολογικές δράσεις των ελαίων από τα οποία προέρχονται (Ipek *et al.*, 2005), και το εύρος της δράσης τους εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους όταν αυτά ελέγχθηκαν μόνα τους σε αντίστοιχες βιοδοκιμές. Ερώτημα συνεχίζει να αποτελεί η συνεργατική δράση των επιμέρους συστατικών που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με τα κύρια συστατικά. Οι Franzios *et al.*, (1997), Santana-Rios *et al.*, (2001) και Hoet *et al.*, (2006) υποστηρίζουν ότι η δραστικότητα των κύριων συστατικών στα φυσικά μίγματα ρυθμίζεται από τα δευτερεύοντα μόρια που βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Υπό την έννοια αυτή είναι περισσότερο σκόπιμο να εξετάζεται η βιολογική δράση του μίγματος συνολικά κι όχι των επιμέρους συστατικών.



Η κυτταροτοξική δράση των αιθερίων ελαίων τους δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως εξαιρετικοί αντισηπτικοί και αντιμικροβιακοί παράγοντες για προσωπική χρήση και υγιεινή, για διατήρηση τροφίμων ακόμα και εσωτερική κατανάλωση (Bakkali *et al.*, 2008). Το μεγάλο πλεονέκτημα των φυσικών συστατικών των αιθερίων ελαίων είναι το γεγονός ότι στερούνται μακροπρόθεσμων γονιδιοτοξικών κινδύνων, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν σαφή αντιμεταλλαξιογενετική ικανότητα η οποία θα μπορούσε κάλλιστα να συνδέεται με αντικαρκινική δράση. Πρόσφατες έρευνες έχουν καταδείξει την προοξειδωτική δράση των αιθερίων ελαίων και των επιμέρους συστατικών τους τα οποία δρουν αποτελεσματικά και στη μείωση των τοπικών καρκινικών όγκων μέσω της διακοπής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά και λόγω νεκροπρωτικής επίδρασης (Schwartz, 1996; Zheng *et al.*, 1997; Ohizumi *et al.*, 1997; Crowell, 1999; Buhagiar *et al.*, 1999; Legault *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2003; Salim and Fukushima, 2003; Mazières *et al.*, 2003; Mazières *et al.*, 2004; Carvalho de Sousa *et al.*, 2004; Carnesecchi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004; Kloog and Cox, 2004; Paik *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005; Dudai *et al.*, 2005; Tsuneki *et al.*, 2005; Manosroi *et al.*, 2006; Sylvestre *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Kachadourian and Day, 2006). Η γερανιόλη, συγκεκριμένα, βρέθηκε να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω εκπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης και παρεμβολής με τα μονοπάτια ιονισμού και γονιδιακής έκφρασης, αναστέλλοντας επίσης τη σύνθεση του DNA και μειώνοντας τον όγκο του παχέος εντέρου (Carnesecchi *et al.*, 2004). Αντίστοιχα, το φαρνεσύλιο και η γερανιόλη αναστέλλουν τη μεταμεταφραστική τροποποίηση απαραίτητη για την ικανότητα μεταμόρφωσης του *ras* γονιδίου εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό των όγκων (Mazières *et al.*, 2003; Mazières *et al.*, 2004; Kloog and Cox, 2004). Στο ίδιο πνεύμα οι Tsuneki *et al.*, (2005) απέδειξαν την αντιαγγειογενετική δράση της β-ευδεσμόλης. Αρκετά καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από σοβαρές αλλαγές στον ενεργειακό μεταβολισμό, την μιτοχονδριακή υπερπαραγωγή και μόνιμο οξειδωτικό στρες (Czarnecka *et al.*, 2006). Για το λόγο αυτό τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους, εξαιτίας της ικανότητάς τους να παρεμβαίνουν προοξειδωτικά στις μιτοχονδριακές λειτουργίες μπορούν να αποτελέσουν αντικαρκινικούς παράγοντες. Στην πράξη, ήδη, χρησιμοποιούνται συστατικά που παράγουν ρίζες στις θεραπείες κατά των όγκων. Στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους η παραγωγή ριζών μπορεί να είναι καλά ελεγχόμενη και στοχευμένη χωρίς να παρουσιάζει το ίδιο τοξικές ή μεταλλαξιογόνες παρενέργειες σε υγιείς ιστούς. Επίσης, τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στα φορεοποιημένα λιποσώματα (vectorized liposomes) επιτρέποντας

καλύτερο προσδιορισμό των ποσοτήτων που θα πρέπει να εφαρμοσθούν στις θεραπείες αυτές (Sinico *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2006).

Όλα τα προαναφερόμενα στοιχεία ανοίγουν ένα νέο δρόμο κατανόησης και αξιοποίησης από το σύγχρονο πολιτισμό των φυσικών προϊόντων που με σοφία χρησιμοποιεί εδώ και αιώνες η παραδοσιακή ιατρική και θεραπευτική.



# 1.3

## Φυτοπαθογόνοι και εντομοπαθογόνοι μύκητες





Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Συναντώνται στον αέρα, το έδαφος, το νερό ακόμα και στο εσωτερικό άλλων ζωικών οργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Οι μύκητες αποτελούν ξεχωριστό βασίλειο. Έχουν σημαντικές διαφορές τόσο με τους ζωικούς όσο και με τους φυτικούς οργανισμούς. Συνιστούν μια κατηγορία μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν από μονοκύτταρους σχηματισμούς, οι οποίοι μπορούν να γίνουν ορατοί μόνο με το μικροσκόπιο, έως και τα πολυκυττάρια μανιτάρια, τα οποία είναι σαπρόφυτα και εύκολα ορατά με γυμνό οφθαλμό (Kirk *et al.*, 2008; Kwon-Chung *et al.*, 1992). Διακρίνονται σε σαπρόφυτα και παράσιτα. Τα σαπρόφυτα λαμβάνουν την τροφή τους από τη νεκρή ύλη, κι έχουν λιγότερες απαιτήσεις συγκριτικά με τα παράσιτα τα οποία τρέφονται από ζωντανή ύλη.

Οι μύκητες αποτελούνται από το έλυτρο, το κυτταρικό τοίχωμα, την κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, την πυρηνική μεμβράνη, τον πυρηνίσκο, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, τα κενοτόπια. Το κυτταρικό τοίχωμα συνιστά μια πολυεπίπεδη δομή κι αποτελείται από περίπου 90% πολυσακχαρίτες όπως εξόζη και πολυμερή εξοζαμίνης, και κατά 10% από πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες. Ο ρόλος της μεταξύ άλλων είναι να συμβάλλει στο σχήμα, την αντοχή και την προστασία από το ωσμωτικό στρες (Kirk *et al.*, 2008). Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από δύο επίπεδα. Περιέχει φωσφολιπίδια και στερόλες (εργοστερόλη, ζυμοστερόλη) και συμβάλλει στην προστασία του κυτταροπλάσματος και την ωσμωτική ρύθμιση. Επίσης, διευκολύνει τη σύνθεση του ελύτρου και του κυτταρικού τοιχώματος. Η εργοστερόλη είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης και συντίθεται από ένα άλλο λιπίδιο την λανοστερόλη (Kwon-Chung *et al.*, 1992).

Οι μύκητες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: τα δερματόφυτα, τους βλαστομύκητες και τους υφομύκητες ή νηματοειδής μύκητες. Ο μεγαλύτερος αριθμός των δερματοφύτων αναπαράγονται με ατελή σπόρια. Η πιο συνηθισμένη μορφή αναπαραγωγικών σπορίων των δερματοφύτων είναι τα κονίδια. Μέρος των δερματοφύτων αναπαράγονται με γονιμοποίηση μέσω τελικών σπορίων (Kirk *et al.*, 2008; Kwon-Chung *et al.*, 1992).

Οι βλαστομύκητες ή ζυμομύκητες απαντώνται ως μονοκυττάρια, στρογγυλοί ή ωοειδής μικροοργανισμοί. Οι βλαστομύκητες αναπαράγονται με τη διαδικασία της εκβλάστησης. Κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης ο πυρήνας του μητρικού κυττάρου διαιρείται και ένας θυγατρικός πυρήνας περνά στο εκβλάστωμα. Τα κύτταρα χωρίζονται με το σχηματισμό ενός διαφράγματος. Μετά από μικρό χρονικό διάστημα το εκβλάστωμα

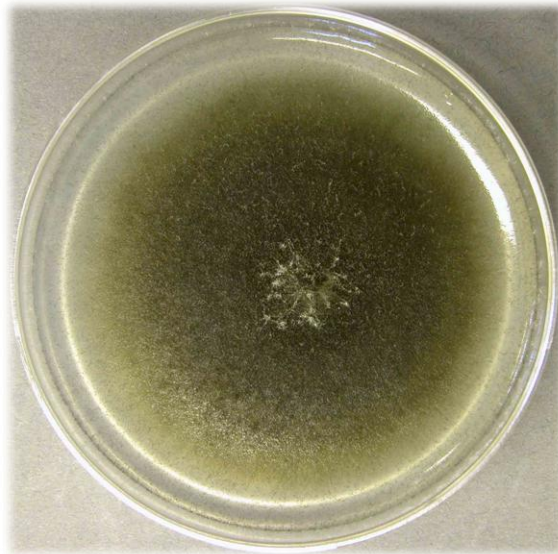
αποσπάται, με αποτέλεσμα τη διαίρεση του αρχικού μικροοργανισμού σε δύο νέους μονοκυττάρους (Kirk *et al.*, 2008; Kwon-Chung *et al.*, 1992).

Οι υφομύκητες ή νηματοειδής μύκητες είναι πολυκυττάριοι οργανισμοί. Η δομική μονάδα των πολυκύτταρων μυκήτων είναι η υφή, η οποία είναι μια νηματοειδής αλυσίδα κυττάρων. Αθροίσματα υφών αποτελούν τα μυκήλια.

### 1.3.1 *Alternaria alternata*

Η επιστημονική ταξινόμηση του μύκητα *Alternaria alternata* (Εικ. 1.3.1) είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο:	Μύκητες
Τάξη:	Pleosporales
Οικογένεια:	Pleosporaceae
Γένος:	<i>Alternaria</i>
Είδος:	<i>A. alternata</i>



Εικόνα 1.3.1 Καλλιέργεια *Alternaria alternata*

Στο γένος *Alternaria* έχουν εντοπιστεί 299 διαφορετικά είδη. Ο μύκητας αυτός είναι ευρύτατα διαδεδομένος στη φύση. Συμμετέχει στην αποσύνθεση άλλων οργανισμών. Τα σπόριά του έχουν χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα, με μια επιμήκη απόληξη σαν ράμφος κατά τον επιμήκη άξονα. Μπορεί να είναι μονήρη. Συνήθως, όμως, σχηματίζουν αλυσίδες σπορίων, στις οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μια λεπτή μεμβράνη.

Ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι 25-28°C. Βέλτιστο επίπεδο σχετικής υγρασίας είναι το εύρος 70-90%. Οι καλλιέργειές του απαιτούν οξυγόνο και μια πηγή οργανικού αζώτου, καθώς και μικρές ποσότητες υδατανθράκων, καθώς στερούνται χλωροφύλλης.

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους μπορούν να αναπαράγουν δύο διαφορετικές αναπαραγωγικές μορφές τα ατελή σπόρια, που είναι μη φυλετικές μορφές και λέγονται αγενή σπόρια ή αναμορφές, και τα τέλεια σπόρια που είναι φυλετικές μορφές και λέγονται εγγενή σπόρια ή τελειομορφές (Εικ. 1.3.2). Οι μορφές αυτές συνήθως δημιουργούνται κάτω από διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, φωτισμός) και θρεπτικού υλικού. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να συνυπάρχουν. Συχνά δίνουν την εντύπωση διαφορετικών οργανισμών, ενώ στην πραγματικότητα αποτελούν στάδια του κύκλου ζωής του ίδιου οργανισμού, του ίδιου μύκητα. Ως Δευτερομύκητες ή Αδηλομύκητες χαρακτηρίζονται προσωρινά οι ατελείς μορφές ανώτερων μυκήτων, μέχρι να βρεθεί η πραγματική ταξινόμησή τους, μετά την ανακάλυψη του εγγενούς κύκλου. Η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας έδωσε τη δυνατότητα της ακριβούς ταξινόμησης των διαφόρων αναπαραγωγικών μορφών των μυκήτων.



Εικόνα 1.3.2 Σπόρια του μύκητα *Alternaria alternata*

Ο μύκητας *Alternaria alternata* αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης για διάφορους ερευνητές μια και πρόκειται για ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη, γνωστό είτε ως σαπρόφυτο και παράσιτο αδυναμίας είτε ως παθογόνο. Στις δυο μονογραφίες του γένους *Alternaria* (Neergaard, 1945; Rotem, 1994) γίνεται εκτενής περιγραφή του είδους *A. alternata*. Ο Rotem (1994) εκτός από θέματα μορφολογίας, φυσιολογίας και ταξινόμησης, αναφέρεται

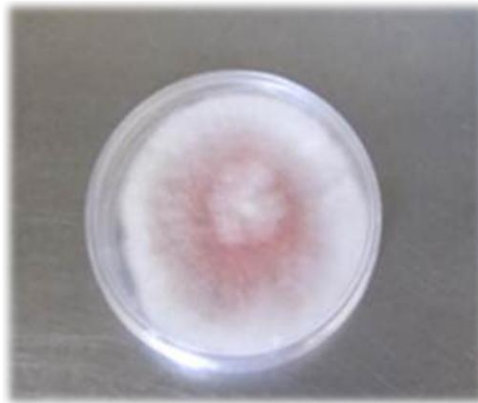


σε θέματα βιολογίας, παθογένεσης και επιδημιολογίας του μύκητα που πλέον θεωρείται βασικό παθογόνο σε διάφορους ξενιστές.

Η είσοδος του μύκητα στους φυτικούς ιστούς γίνεται με απευθείας διάτρηση από πληγές ή από φυσικά ανοίγματα. Γύρω από το σημείο εισόδου της υφής εμφανίζονται μικρές χλωρωτικές κηλίδες σε 3-5 ημέρες όταν η θερμοκρασία διατηρείται στο άριστο σημείο και η σχετική υγρασία είναι υψηλή.

### 1.3.2 *Fusarium oxysporum*

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* (Εικ. 1.3.3) είναι ένα αναμορφικό είδος που περιγράφεται από συγκεκριμένα μορφολογικά κριτήρια (Nelson et.al., 1983) τα κυριότερα των οποίων είναι το σχήμα των μακροκονιδίων, η δομή των μικροκονιδίων και ο σχηματισμός και η διάταξη των χλαμυδοσπορίων.



Εικόνα 1.3.3 Καλλιέργεια *Fusarium oxysporum*

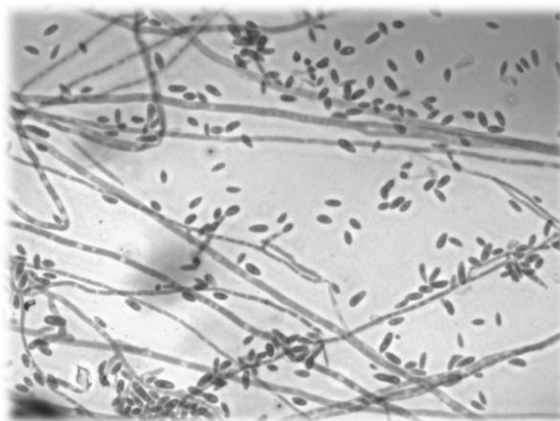
Η ταξινόμική του κατάταξη είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο:	Μύκητες (Fungi)
Τάξη:	Hypocreales
Οικογένεια:	Nectriaceae
Γένος:	<i>Fusarium</i>
Είδος:	<i>F. oxysporum</i>

Το είδος *F. oxysporum* περιλαμβάνει παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη (Gordon and Martyn, 1997) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης ασθενειών. Τα παθογόνα στελέχη αυτής της ομάδας εδαφογενών μυκήτων

είναι υπεύθυνα για ασθένειες σε περισσότερα από 120 είδη φυτών (Armstrong and Armstrong, 1981). Συγκεκριμένα, προκαλούν αγγειακή αποσύνθεση σε πολλά σημαντικά αγροστώδη όπως ο καπνός (Abad *et al.*, 1996). Το *F. oxysporum*, είναι από τους πιο κοινούς μύκητες που απομονώνονται από ασυμπτωματικές ρίζες φυτών που δεν παρουσιάζουν χαρακτηριστικά μόλυνσης (Gordon *et al.*, 1989).

Η ανικανότητα των μη παθογόνων στελεχών να μολύνουν τον ξενιστή αποδίδεται είτε στην αδυναμία του να εισέλθει στους αγγειακούς ιστούς, είτε στην ταχεία απόκριση του φυτού να περιορίσει τη μόλυνση (Gao *et al.*, 1995). Παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη του *F. oxysporum* έχουν βρεθεί σε αγροτικά και φυσικά περιβάλλοντα. Σε αντίθεση με τα καλλιεργούμενα εδάφη, στα φυσικά οικοσυστήματα δεν απαντώνται παθογόνα στελέχη, παρά τους μεγάλους πληθυσμούς του είδους.



Εικόνα I.3.4 Σπόρια του μύκητα *Fusarium oxysporum*

Τα παθογόνα στελέχη του *Fusarium* έχει βρεθεί σε κάποιες περιπτώσεις να μην είναι ικανά να συναγωνιστούν τα μη παθογόνα (Larkin *et al.*, 1996). Το *F. oxysporum* αποτελείται από πολυάριθμα στελέχη, τα οποία ταξινομούνται με βάση παθογονικά κριτήρια (Armstrong and Armstrong, 1981).

### ***1.3.3 Beauveria bassiana***

Η *Beauveria bassiana* (Εικ. I.3.5) είναι μύκητας που αναπτύσσεται στο έδαφος και λειτουργεί ως παράσιτο σε διάφορα είδη αρθροπόδων προκαλώντας τους μια ασθένεια που ονομάζεται white muscardine disease. Για το λόγο αυτό η *B. bassiana* συγκαταλέγεται μεταξύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων, και χρησιμοποιείται από τη βιολογική γεωργία ως βιολογικό εντομοκτόνο για τον έλεγχο ενός αριθμού εντόμων.

Η ταξινομική της κατάταξη είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο:	Μύκητες (Fungi)
Τάξη:	Hypocreales
Οικογένεια:	Clavicipitaceae
Γένος:	<i>Beauveria</i>
Είδος:	<i>B. bassiana</i>



Εικόνα 1.3.5 Καλλιέργεια *Beauveria bassiana*

Στις καλλιέργειες η *B. bassiana* αναπτύσσει ένα λευκό μυκήλιο. Δεν έχει βρεθεί να έχει επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, ή σε άλλα ζώα για αυτό κι έχει θεωρηθεί ασφαλής για εντομοκτόνο χρήση. Η σχετική έρευνα έχει δείξει ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των bed bugs (Barbarin, *et al.*, 2012).

#### 1.3.4 *Aspergillus flavus*

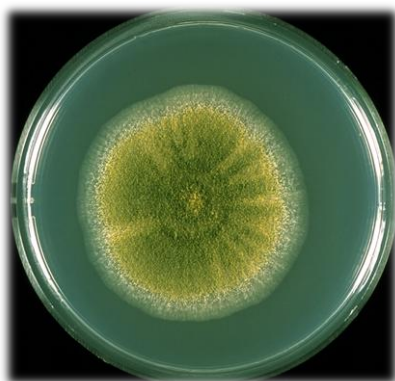
Τα είδη του γένους *Aspergillus* είναι από τους πιο συχνούς και ευρέως διαδεδομένους μύκητες στη φύση. Μέσω της εξελικτικής τους πορείας και προσαρμογής και λόγω του γεγονότος ότι αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και υποστρωμάτων, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς βιοσύνθεσης διαφόρων μεταβολιτών (Δούκας, 2009).

Τα οφέλη από την αξιοποίηση του *Aspergillus* στην Ιατρική και τη Βιομηχανία αντισταθμίζονται από τα προβλήματα στη γεωργική παραγωγή λόγω προσυλλεκτικών και

μετασυλλεκτικών προσβολών. Επιπλέον, πολλά είδη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, κάποια δύναται να προκαλέσουν αλλεργίες, ενώ η σημαντικότερη αρνητική τους επίπτωση είναι η παραγωγή μυκοτοξινών.

Η ταξινομική του κατάταξη είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο:	Μύκητες (Fungi)
Τάξη:	Eurotiales
Οικογένεια:	Trichocomaceae
Γένος:	<i>Aspergillus</i>
Είδος:	<i>A. flavus</i>

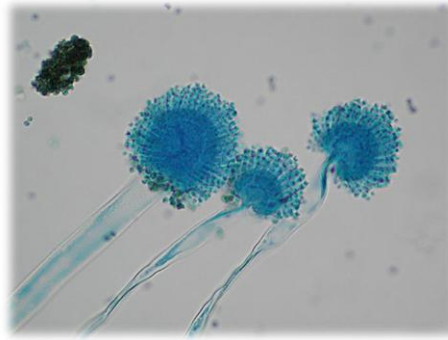


**Εικόνα I.3.6** Καλλιέργεια *Aspergillus flavus*

Πολλοί από αυτούς τους μεταβολίτες έχουν αξιοποιηθεί για φαρμακευτικές χρήσεις όπως ο μεταβολίτης λοβαστατίνη που παράγεται από το είδος *Aspergillus terreus* και άλλα είδη, καθώς και μεγάλος αριθμός αντιβιοτικών, αντικαρκινικών και αντιμυκητιακών ενώσεων, αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Μεγάλος αριθμός ευρεσιτεχνιών έχει κατοχυρωθεί για δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από είδη τους γένους *Aspergillus* για τους τομείς που προαναφέρθηκαν (Δούκας, 2009).

Τα είδη του γένους *Aspergillus* σχηματίζουν αγενή αναπαραγωγικά όργανα, τα κονίδια. Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα σπόρια που μπορεί να φέρουν έναν ή περισσότερους πυρήνες. Τα κονίδια σχηματίζονται σε διαφοροποιημένες κατασκευές, κάθε μια από τις οποίες ονομάζεται ασπεργίλλιο. Το ασπεργίλλιο αποτελείται από μια διογκωμένη κεφαλή (Εικ. I.3.7), η οποία φέρει μια ή δυο σειρές σχηματιζόμενων διαφοροποιημένων κυττάρων (Chang *et al.*, 2000). Το ασπεργίλλιο σχηματίζεται στο άκρο μιας μακριάς διαφοροποιημένης υφής, η οποία ονομάζεται στύπος (Εικ. I.3.7). Στο άλλο άκρο του στύπου διαμορφώνεται μια χαρακτηριστική διόγκωση η οποία ονομάζεται κύτταρο ποδός και με αυτή το ασπεργίλλιο

συνδέεται με το μυκήλιο και αποτελεί χαρακτηριστικό ταξινομικό γνώρισμα των μυκήτων του γένους *Aspergillus*. Το ασπεργίλλιο, ο στύπος και το κύτταρο ποδός, μαζί αποτελούν τον κονιδιοφόρο του μύκητα. Υπάρχουν και μη αφλατοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* που χρησιμοποιούνται ως βιολογικά σκευάσματα για την καταπολέμηση των αφλατοξιών (π.χ. AF36, AflaGuard, AflaSafe)



Εικόνα 1.3.7 Ασπεργίλλιο του *Aspergillus flavus*

### 1.3.5 Βιολογική δράση φυτικών εκχυλισμάτων σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες

Μεγάλος αριθμός ασθενειών σε καλλιέργειες αλλά και σε τρόφιμα μετασυλλεκτικά οφείλεται σε φυτοπαθογόνους μύκητες. Σε παγκόσμια κλίμακα, οι απώλειες μετασυλλεκτικά υπολογίζονται σε 50% περίπου, με τους μύκητες και τα βακτήρια να ευθύνονται κυρίως για αυτές (Magro *et al.*, 2006).

Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι ιδιαίτερα ευπαθή στις σήψεις από μύκητες, τόσο στον αγρό και στα θερμοκήπια όσο και κατά την αποθήκευση μετά τη συγκομιδή. Σημαντικά γένη που προκαλούν σήψεις είναι τα: *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Sclerotinia* και *Rhizoctonia spp.* Η ανάπτυξη των μυκήτων στα φρέσκα φρούτα και τα λαχανικά είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση των τροφίμων και πολλές φυτικές ασθένειες, οι οποίες οδηγούν σε σημαντικές οικονομικές απώλειες (Cabral *et al.*, 2013).

Εκτός από την πρόκληση ασθενειών σε φυτά, πολλά είδη όπως τα *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* και *Alternaria* μπορούν επίσης να συνθέσουν μυκοτοξίνες. Αυτές οι ενώσεις είναι επικίνδυνες για τα ζώα και την ανθρώπινη υγεία, δεδομένου ότι μπορεί να είναι θανατηφόρες, καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες, τερατογόνες, ανοσοκατασταλτικές, ή μπορεί να μμούνται τα οιστρογόνα. Η δράση τους εξαρτάται από τον τύπο της τοξίνης και τη

συγκέντρωσή τους στα τρόφιμα. Η ανησυχία για τους κινδύνους αυτών των χημικών έχει αυξηθεί λόγω του μεγάλου εύρους των τύπων τροφίμων που ενδέχεται να επηρεαστούν και στη μεταβλητότητα της σοβαρότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται (Cabral *et al.*, 2013).

Η αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων σε καλλιέργειες, φρέσκα φρούτα και λαχανικά είναι επομένως αναγκαία προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Το πρώτο βήμα στην καταπολέμηση των μυκητολογικών προσβολών είναι η εφαρμογή μυκητοκτόνων στο πεδίο. Τα μυκητοκτόνα μπορεί να εφαρμοστούν και μετά τη συγκομιδή, με την προϋπόθεση ότι δεν επηρεάζουν δυσμενώς την εμφάνιση ή την ποιότητα των επεξεργασμένων εμπορευμάτων (Amiri *et al.*, 2008).

Χημική αντιμετώπιση του *Aspergillus* γίνεται με μυκητοκτόνα όπως βενζιμιδαζόλια (π.χ. θειαβενδαζόλιο), αρωματικούς υδρογονάνθρακες (π.χ. sodium ortho-phenylphenate) και αναστολείς βιοσύνθεσης στερόλης (π.χ. imazalil) που έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες στον έλεγχο των διαφόρων ασθενειών στη γεωργία. Πιο πρόσφατα, δύο άλλα μυκητοκτόνα, το καθένα με διαφορετικό τρόπο δράσης, έχουν γίνει σημαντικά στην αγορά: το Pyrimethanil και το Fludioxonil.

Η αδιάκριτη και υπερβολική χρήση των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες υπήρξε μια σημαντική αιτία της ανάπτυξης ανθεκτικών πληθυσμών παθογόνων, με αποτέλεσμα τη χρήση υψηλότερων συγκεντρώσεων αυτών των μυκητοκτόνων και την επακόλουθη αύξηση στην τοξικών υπολειμμάτων σε τρόφιμα προϊόντα. Για παράδειγμα, έχει καταδειχθεί η επίκτητη αντίσταση του *Penicillium italicum* και *P. digitatum* σε πολλά συνθετικά μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα στα εσπεριδοειδή (Fogliata *et al.*, 2001). Ορισμένα από αυτά δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα, και μπορούν να συσσωρευτούν στο έδαφος, τα φυτά και το νερό, και συνεπώς επηρεάζουν τον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Αν και οι επεμβάσεις με χημικά σκευάσματα θεωρούνται ότι είναι ο φθηνότερος και πιο αποτελεσματικός τρόπος για την πρόληψη των ασθενειών μετά τη συγκομιδή, η ανάπτυξη ανθεκτικών μικροοργανισμών έχει μειώσει την αποδοχή τους. Ο τύπος και η συγκέντρωση των μυκητοκτόνων που επιτρέπονται για την εφαρμογή τους μετασυσλλεκτικά περιορίζονται λόγω της μακράς περιόδου υποβάθμισής τους και τις πιθανές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (καρκινογένεση, τερατογένεση, χρόνια και οξεία τοξικότητα, υψηλή υπολειμματικότητα, ορμονικές διαταραχές και σπερματοτοξικότητα). Λόγω αυτών των ανεπιθύμητων ενεργειών, πρόσφατες μελέτες κατέληξαν στην ανάκληση μερικών από τα πιο αποτελεσματικά μυκητοκτόνα. Επιπλέον, η δημόσια ανησυχία για την επιβάρυνση των

τροφίμων με υπολείμματα μυκητοκτόνων έχει αυξηθεί σημαντικά. Λαμβάνοντας υπόψη όλους αυτούς τους παράγοντες, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη νέων εναλλακτικών λύσεων με ασφαλή και βιοδιασπώμενα σκευάσματα τα οποία θα είναι αποτελεσματικά και οικονομικά εφικτά.

Προκειμένου να μειωθεί η χρησιμοποίηση συνθετικών χημικών μυκητοκτόνων στα τρόφιμα, έχουν μελετηθεί αρκετές εναλλακτικές λύσεις προερχόμενες από φυτικά προϊόντα. Οι μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, επειδή τα φυτά παράγουν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, είτε ως μέρος της ανάπτυξής τους ή ως απάντηση στο στρες ή την επίθεση από παθογόνους οργανισμούς. Τα τελευταία χρόνια, έχουν προσελκύσει το αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω του ότι θεωρούνται ασφαλή στη χρήση, αποσυντίθενται εύκολα, είναι φιλικά προς το περιβάλλον και μη φυτοτοξικά. Έχει αποδειχθεί ότι τα φυτικά εκχυλίσματα που λαμβάνονται με διαφορετικούς διαλύτες και τα αιθέρια έλαια είναι πλούσια σε δυνητικά βιοδραστικές ενώσεις, όπως οι φυτοαλεξίνες. Πολλοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες είναι γνωστό ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση για την προστασία των ίδιων των φυτών από τα οποία προέρχονται. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται τα αλκαλοειδή, флаβονοειδή, ισοφλαβονοειδή, ταννίνες, κουμαρίνες, γλυκοσίδες, τερπένια, και οργανικά οξέα. Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά ελαιώδη υγρά που παραλαμβάνονται με υδροαπόσταξη από φυτικό υλικό (ολόκληρους ιστούς ή σπόρους) και αποτελούν συνήθως μίγματα διαφόρων συστατικών. Η εγγενής αντιμικροβιακή τους δράση συνήθως σχετίζεται με την χημική δομή των συστατικών τους, τη συγκέντρωση στην οποία είναι αυτά παρόντα, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, που μπορεί να επηρεάσει τις βιοδραστικές τους ιδιότητες. Μπορούν επίσης να περιέχουν διάφορες αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως πολυφαινόλες, φαινόλες, флаβονοειδή, κ.λπ., τα οποία πιστεύεται ότι είναι η βάση των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Το γεγονός ότι αποτελούνται από μια πολύ μεγάλη ποικιλία ενώσεων προσδίδει σε αυτά και άλλα πλεονεκτήματα, όπως να μπορούν να επιτίθενται σε διαφορετικά γένη μυκήτων αλλά και να εμποδίζεται η ανάπτυξη αντοχής από τα παθογόνα (Cabral *et al.*, 2013).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αποτελεσματικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων για την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων στηρίζεται στην σύνθεσή τους. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητά τους ποικίλει ανάλογα με τη φύση του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση. Σε γενικές γραμμές, είναι καλά γνωστό ότι οι πολικοί διαλύτες έχουν μια καλύτερη ικανότητα διείσδυσης στο φυτικό ιστό και μπορούν να εξάγουν μια ευρύτερη ποικιλία των ενώσεων σε σχέση με τους μη-πολικούς εκχυλιστές Cabral *et al.*,

2013). Οι Cakir *et al.* (2005) υποστηρίζουν ότι οι καλύτεροι εκχυλιστές αντιμυκητιακών ενώσεων από το *Hypericum linarioides* είναι η ακετόνη και η μεθανόλη. Στο ίδιο πνεύμα οι Mahlo *et al.* (2010) συμπέραναν ότι η ακετόνη ήταν ο καλύτερος εκχυλιστής για μια μεγάλη ποικιλία φυτών τα οποία ανέλυσαν. Εκτός από το διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση, το μέρος του φυτού που θα χρησιμοποιηθεί παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Διάφορες τεχνικές έχουν εφαρμοσθεί μέχρι σήμερα για την κλασματοποίηση των ακατέργαστων φυτικών εκχυλισμάτων προκειμένου για την κλασματοποίηση και απομόνωση βιοδραστικών μορίων. Προς την κατεύθυνση αυτή, και τα αιθέρια έλαια είναι μίγματα πολλών συστατικών και η σύστασή τους διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών κάθε είδους, την πρακτική καλλιέργειας, το κλίμα και το έδαφος (Feng and Zheng, 2007) καθώς οι παράμετροι αυτοί προσδίδουν διαφορετικό προφίλ και σχετική αναλογία συγκεντρώσεων των βιοδραστικών συστατικών (Delaquis *et al.*, 2002). Οι dos Santos Oliveira and Badiale Furlong (2008) δουλεύοντας με φαινολικά συστατικά κατέληξαν ότι αναφορικά με τη βιολογική δράση περισσότερο σημαντικός από τη συγκέντρωση είναι ο τύπος της φαινολικής δομής.

Η θυμόλη, η ευγενόλη, η ανεθόλη, η μενθόλη, η κιτράλλη, το πινένιο, η καρβακρόλη, η καρβόνη τα βενζοϊκά οξέα, τα φαινολικά οξέα και οι φλαβόνες είναι φυτοχημικά τα οποία έχουν μελετηθεί σε έκταση αναφορικά με τη βιοδραστικότητά τους σε βακτήρια και μύκητες (Souza *et al.*, 2005). Για παράδειγμα η ευγενόλη που περιέχεται στα αιθέρια έλαια του γαρύφαλου και της κανέλλας, ενώ μεμονωμένα έχει καταδειχθεί εξαιρετικά βιοδραστική για μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, το αιθέριο έλαιο στο οποίο περιέχεται εμφανίζει μικρότερη δραστηριότητα έναντι της ανάπτυξης μυκήτων που αποδίδεται σε αρνητική συνέργεια μεταξύ των άλλων συστατικών που περιέχονται στα προαναφερόμενα αιθέρια έλαια και την ευγενόλη (Prakash *et al.*, 2010). Προς την κατεύθυνση αυτή πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην απομόνωση των συστατικών στα οποία αποδίδεται η βιολογική δράση (Guleria *et al.*, 2012). Σε κάθε περίπτωση είναι δύσκολη η απόδοση και συσχέτιση της βιολογικής δράσης ενός μίγματος σε ένα επιμέρους συστατικό του. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ακόμα και ελάσσονα συστατικά ενός μίγματος έχουν κρίσιμο ρόλο στη συνολική βιολογική δράση του μίγματος. Προς αυτή την κατεύθυνση είναι προτιμότερη η αποτίμηση της βιολογικής δράσης του μίγματος συνολικά, καθώς η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους μύκητες έναντι ενός μίγματος είναι μικρότερη, αλλά και το κόστος αξιοποίησης είναι χαμηλότερο από αυτό της απομόνωσης συγκεκριμένων ουσιών, στην περίπτωση εμπορική του αξιοποίησης.



Το γεγονός ότι κάποιο μίγμα ή συστατικό έχει βιολογική δράση σε κάποια στελέχη μυκήτων αυτό το γεγονός δε μπορεί επ' ουδενί να γενικευθεί για όλα τα είδη των μυκήτων. Για παράδειγμα αναφέρθηκε ότι ο μύκητας *A. niger* εμφάνισε αντίσταση έναντι της ευγενόλης σε όποιες συγκεντρώσεις αυτής κι αν εκτέθηκε (Souza *et al.*, 2005).

Οι μηχανισμοί δράσης των φυτικών βιοδραστικών μορίων δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Ωστόσο, υπάρχουν τρεις πτυχές επί των οποίων οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ως προς στην απόδοση της ανασταλτικής δράσης:

- Η παρουσία ομάδων OH<sup>-</sup> οι οποίες είναι σε θέση να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου έχοντας επιπτώσεις στα ένζυμα και τροποποιώντας μια ποικιλία ενδοκυτταρικών λειτουργιών του μύκητα
- Δράση επί της μορφολογίας του μύκητα λόγω αλληλεπιδράσεων με ένζυμα της μεμβράνης που καταλήγουν σε απώλεια της συνοχής και της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος
- Αλλαγή της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών και ρήξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Όλες οι πτυχές είναι στενά αλληλένδετες. Η υδροφοβικότητα των ενώσεων αυτών τις οδηγεί να διασχίσουν την κυτταρική μεμβράνη και να αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις των κυττάρων έτσι ώστε να μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη μεμβράνη, όσο και τα ενδοκυτταρικά ένζυμα. Η απώλεια της διαφορικής διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης θεωρείται γενικά η αιτία θανάτου των κυττάρων, επειδή μπορεί να οδηγήσει σε μια ανισορροπία στην ενδοκυτταρική ωσμωτική πίεση, με επακόλουθη διάσπαση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων, διαρροή του κυτταροπλασματικού περιεχόμενου και τελικά κυτταρικό θάνατο. Η αλληλεπίδραση με τις κυτταρικές μεμβράνες μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διαρροή ορισμένων κυτταρικών συστατικών συμπεριλαμβανομένου του ATP, που είναι το κύριο μόριο αποθήκευσης ενέργειας (Cabral *et al.*, 2013).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας την απώλεια μακρομορίων προς το εξωτερικό του κυττάρου, θα μπορούσαν όμως να προκαλούν και αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες των μεμβρανών προκαλώντας παραμορφώσεις στη δομή και τη λειτουργία τους (Fung *et al.*, 1977). Οι προαναφερόμενες δράσεις κορυφώνονται με αναστολή της σποριογένεσης, παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου κι όπως έχει αναφερθεί η δράση των φυτικών μορίων μπορεί να σχετίζεται με την επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή (Cabral *et al.*, 2013). Συμπερασματικά, τα βιοδραστικά μόρια φυτικής προέλευσης είναι σε

θέση να διαβρώσουν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες του κυτταροπλάσματος, να διεισδύσουν μέσα από αυτά και να επηρεάσουν τις ενδοκυτταρικές λειτουργίες με επακόλουθο τη διατάραξη της φυσιολογικής ανάπτυξης του μυκηλίου.

Μια άλλη πτυχή των φυτικών βιοδραστικών μόριων επί παθογόνων μυκήτων που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα, είναι αυτή της επίδρασης των μορίων αυτών επί της σύνθεσης τοξινών από τον ίδιο το μύκητα. Το γεγονός ότι κάποια φυτικά μόρια περιορίζουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη του μυκηλίου σε ένα μύκητα αυτό δε συνεπάγεται κατ'ανάγκη αναστολή της παραγωγής μυκοτοξίνης, κι αυτό γιατί η ίδια η μυκητοστατική δράση θα μπορούσε να ενισχύσει την παραγωγή μυκοτοξίνης ως απόκριση του δευτερογενούς μεταβολισμού του μύκητα στο στρες το οποίο υπόκειται λόγω των φυτικών βιοδραστικών μορίων.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθεται συνοπτική βιβλιογραφική ανασκόπηση των βιοδοκιμών φυτικών εκχυλισμάτων για τα είδη των μυκήτων που θα εξεταστούν στην παρούσα μελέτη.

**Πίνακας I.3.1** Συνοπτική βιβλιογραφική ανασκόπηση βιοδοκιμών φυτικών εκχυλισμάτων που έχουν προηγηθεί στα είδη μυκήτων που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη

Είδος Μύκητα	Φυτικό είδος που εξετάσθηκε	Είδος εκχυλίσματος	Αναφορά
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Thyme (Thymus capitatus)</i>	Essential Oil	(Ben-Jabeur <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Flourensia spp.</i>	Ethanol extracts	(Jasso de Rodriguez <i>et al.</i> , 2007)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Thyme, clove</i>	Essential oils as well as pure citral, eugenol and thymol	Manganyi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Asparagus (Asparagus officinalis L.)</i>	Ethanol extract enriched in flavonoids	(Rosado-Alvarez <i>et al.</i> , 2014)
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Oregano, thyme, dictamnus, marjoram, lavender, rosemary, sage and pennyroyal</i>	Essential oils	(Daferera <i>et al.</i> , 2003)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Bidens pilosa</i>		Deba <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Carum carvi</i>		Zabca <i>et al.</i> , 2009
	<i>Chenopodium</i>		Kumar <i>et al.</i> , 2007

	<i>ambrosioides</i>		
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>		Singh <i>et al.</i> (2007), Velluti <i>et al.</i> (2004)
	<i>Cuminum cyminum</i>		Naeini <i>et al.</i> (2010), Boyras and Ozcan (2005)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009), Velluti <i>et al.</i> (2004)
	<i>Echinophora tenuifolia</i>		Boyras and Ozcan (2005)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pelargonium roseum</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009),
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Peumus boldus</i>		Souza <i>et al.</i> (2005)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pimenta dioica</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009),
<i>Fusarium spp.</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>		Velluti <i>et al.</i> (2004)
	L.		
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Thymus vulgaris</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009), Feng and Zheng (2007)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Zataria multiflora</i>		Naeini <i>et al.</i> (2010)
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Flourensia spp.</i>	Ethanol extracts	(Jasso de Rodriguez <i>et al.</i> , 2007)
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cassia fistula</i>		Feng and Zheng (2007)
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Thymus vulgaris</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009), Feng and Zheng (2007)
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Sage, thyme, nutmeg, eucaptus, cassia</i>	Essential oils	Feng and Zheng (2007)
	<i>Red kidney bean (Phaseolus vulgaris)</i>		Alizadeh <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i>		Shukla <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Carum carvi</i>		Zabca <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Chenopodium ambrosioides</i>		Kumar <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Cinnamomum</i>		Singh <i>et al.</i> (2007),

	<i>zeylanicum</i>		Velluti <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Citrus limon L.</i>		Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Citrus paradisi L.</i>		Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Citrus reticulate L.</i>		Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Citrus sinensis</i>		Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009), Velluti <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Pelargonium roseum</i>		Zabka <i>et al.</i> (2009),
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Peumus boldus</i>		Souza <i>et al.</i> (2005), Passone <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Essential oils / extracts	Zabka <i>et al.</i> (2009), Feng and Zheng (2007), Kohiyama <i>et al.</i> (2015), Rajkovic <i>et al.</i> (2015), Passone <i>et al.</i> (2012), Omidbeygi <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Cuminum cyminum</i>	Essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel	Zhaveh <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Cinnamomum cassia L.</i>	Essential oils	Rajkovic <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Thymus daenensis</i>	Essential oils / extracts	Gorran <i>et al.</i> (2013)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Satureja khozistanica</i>	Essential oils / extracts	Gorran <i>et al.</i> (2013)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Satureja macrosiphonia</i>	Essential oils / extracts	Gorran <i>et al.</i> (2013)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Satureja hortensis</i>	Essential oils / extracts	Dikbas <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Curcuma longa L.</i>	Essential oil	Dias Ferreira <i>et al.</i> (2013), Reddy <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Syzygium aromaticum L.</i>	Essential oil	Passone <i>et al.</i> (2012), Reddy <i>et al.</i> (2009), Omidbeygi <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Pimpinella anisum</i>	Essential oil	Passone <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Alium sativum</i>	Essential oil	Reddy <i>et al.</i> (2009)

---

<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Ocimum sanctum</i>	Essential oil	Reddy <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Garcinia indica</i>	Extract	Selvi <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Agave asperrima</i>	Extracts	Sanchez <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Agave striata</i>	Extracts	Sanchez <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Cinnamomum jensenianum</i>	Essential Oil	Tian <i>et al.</i> (2012)

---

<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Caesalpinia sappan</i>	homoisoflavonoids	(Niranjan Reddy <i>et al.</i> , 2003)
---------------------------	---------------------------	-------------------	--

---

# 1.4

## Εκτίμηση Τοξικότητας





Παρά το γεγονός ότι φυτικά σκευάσματα χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα στο πλαίσιο της βοτανικής θεραπείας από την παραδοσιακή ιατρική, μόλις το 2007 ολοκληρώθηκε η τελική ρύθμιση για τις ορθές παρασκευαστικές πρακτικές για συμπληρώματα διατροφής – όπως τα αποκαλούν- στις ανεπτυγμένες χώρες. Έτσι οι κανονισμοί απαιτούν πλέον από τους κατασκευαστές να καθορίζουν την ασφάλεια των φυτικών προϊόντων πριν την εμπορία τους. Στο πλαίσιο της ασφάλειας ορίζεται και η εν δυνάμει τοξική δράση που μπορεί να προκαλέσουν αυτά καθ' αυτά ως μίγματα ή κάποια από τα επιμέρους συστατικά τους. «Φυτικό» δε σημαίνει κατ' ανάγκη ότι ένα προϊόν είναι και ασφαλές. Μεγάλη ποικιλία από εξαιρετικά τοξικές ουσίες - δηλητήρια είναι φυτικής προέλευσης.

Τοξικολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με την επίδραση διαφόρων ουσιών ή μιγμάτων στους έμβιους οργανισμούς (μικροοργανισμοί, φυτά, ζώα, άνθρωπος). Οι βιολογικές της επιπτώσεις μπορεί να είναι θανατηφόρες, βαριάς ή μέσης βαρύτητας ακόμα και ελαφρές. Ως βιολογική επιστήμη η τοξικολογία συνδυάζει γνώσεις αναλυτικής χημείας, βιοχημείας, φυσιολογίας, μοριακής βιολογίας και φαρμακολογίας.

#### 1.4.1 Βασικές αρχές

Με βάση τον Παράκελσο (1493-1541, Ελβετός γιατρός, αλχημιστής και φιλόσοφος) που είναι ο πρώτος που τοποθέτησε της τοξικολογία σε επιστημονική βάση, «Όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια. Δεν υπάρχει καμία που να μην είναι δηλητήριο. Η σωστή δόση ξεχωρίζει το φάρμακο από το δηλητήριο» (Κούγκολος, 2005). Η δήλωση αυτή έχει συνάφεια με τη βασική θεώρηση ότι μια ουσία προκαλεί βλαβερές συνέπειες όταν η ποσότητα που εισχωρεί σε έναν οργανισμό είναι αρκετά υψηλή (Landis and Yu, 1999). Πιο συγκεκριμένα, για να εκδηλωθεί το τοξικό αποτέλεσμα μιας ουσίας δεν αρκεί η παρουσία της και μόνο στο περιβάλλον του οργανισμού (Πεταλά, 2006). Θα πρέπει να εισέλθει στο οργανισμό από την κατάλληλη οδό, να φτάσει στο όργανο-στόχο στην κατάλληλη ποσότητα και να δράσει τον κατάλληλο χρόνο (Παπαδόπουλος, 2005).

Η σχέση μεταξύ της δοσολογίας και της βιολογικής επίδρασης, ονομάζεται σχέση δόσης απόκρισης (Landis and Yu, 1999). Οι οργανισμοί-στόχοι εκτίθενται σε διάφορες δόσεις μιας ουσίας ή συγκεντρώσεις ενός μίγματος και μετά το πέρας του πειράματος, ή της βιοδοκιμής όπως συνηθίζεται να αποκαλείται, προσδιορίζεται η επίδραση στον οργανισμό για κάθε μια από αυτές. Στη συνέχεια, σχεδιάζεται η γραφική παράσταση της επίδρασης ως



προς τη δόση ή τη συγκέντρωση, η μορφή της οποίας είναι συχνά σιγμοειδής, οπότε υπολογίζονται οι δυο χαρακτηριστικές παράμετροι:

Η συγκέντρωση ή δόση που προκαλεί 50% μεταβολή της μετρούμενης παραμέτρου – επίδρασης (ενδιάμεσο σημείο).

Η κλίση της γραμμικής περιοχής της καμπύλης που περνά από αυτό το ενδιάμεσο σημείο. Το ενδιάμεσο σημείο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως  $LC_{50}$ ,  $LD_{50}$ ,  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , όπου:

$LC_{50}$ : Η συγκέντρωση που προκαλεί 50% θνησιμότητα στους οργανισμούς.

$LD_{50}$ : η δόση (ποσότητα της ουσίας που εισέρχεται στους οργανισμούς) και προκαλεί 50% θνησιμότητα.

$EC_{50}$ : Η συγκέντρωση που προκαλεί 50% επίδραση (διαφορετική από τη θανάτωση) στους οργανισμούς.

$IC_{50}$ : Η συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή στη φυσιολογική απόκριση ενός οργανισμού. Συνήθως, ο όρος αυτός αναφέρεται όταν μελετάται ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών και των βακτηρίων.

Υπάρχει και το φαινόμενο «Hormesis» (Charman, 2002) όπου η διεγερτική απόκριση ενός οργανισμού είναι περίπου 30-60% σε σχέση με το μάρτυρα, η οποία παρατηρείται για συγκεντρώσεις ουσίας τουλάχιστον 10 φορές μικρότερες από τη συγκέντρωση NOEC (No Observed Effect Concentration – Συγκέντρωση για την οποία δεν παρατηρείται αρνητική επίδραση). Δηλαδή, κάτω από συνθήκες χαμηλού στρες οι οργανισμοί μπορούν όχι μόνο να ανακάμψουν και να ξεπεράσουν τυχόν βλάβη, αλλά και να εξουδετερώσουν οποιοδήποτε ίχνος θα μπορούσε να είχε απομείνει και να προκαλέσει κάποια ανασταλτική δράση στο μέλλον. Ο όρος «hormesis» αποδόθηκε το 1943 από τους C.M. Southam και J. Ehrlich οι οποίοι κατά τη μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος κέδρου σε μύκητες παρατήρησαν ασυνήθιστες καμπύλες δόσης – απόκρισης (Calabrese, 2002). Η απόκριση «hormesis» έχει παρατηρηθεί σε πλήθος οργανισμών, όπως πρωτόζωα, βακτήρια, μύκητες, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, ανεξάρτητα από το μετρούμενο μέγεθος (π.χ. ανάπτυξη, επιβίωση, αναπαραγωγή) και τη φύση της ουσίας (οργανική ή ανόργανη). Τα αίτια εμφάνισής του είναι ποικίλα, εξετάζονται κυρίως σε φαρμακολογικές μελέτες και εστιάζονται περισσότερο στην απόκριση συστημάτων των υποδοχέων (Πεταλά, 2006). Ωστόσο, το φαινόμενο αυτό δεν έχει μελετηθεί σε βάθος και για το λόγο αυτό δεν έχουν τεθεί κανόνες που να το ορίζουν επακριβώς και να το διακρίνουν από άλλα φαινόμενα. Πάντως, το φαινόμενο «hormesis» υποδεικνύει αποκρίσεις οργανισμών, στατιστικά και βιολογικά σημαντικές που παρατηρούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

#### 1.4.1.1 Επίπεδα τοξικής δράσης

Η επίδραση ουσιών σε βιολογικά συστήματα μπορεί να συμβεί στα εξής επίπεδα (Landis and Yu, 1999):

- Αλληλεπίδραση σε μοριακό επίπεδο. Η συνεισφορά των φυσικοχημικών ιδιοτήτων μιας ουσίας στην τοξικότητα που προκαλεί ορίζεται ως «ποσοτική σχέση δομής – δράσης» (Quantitative Structure – Activity Relationship, QSAR).
- Βιοσυσσώρευση/βιομεταμόρφωση/βιοαποικοδόμηση. Βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης ενός συστατικού στους ιστούς και παρατηρείται κυρίως για τις υδρόφοβες ενώσεις. Οι υδρόφοβες ενώσεις παρουσιάζουν την τάση να διαχέονται στις κυτταρικές μεμβράνες και κατά συνέπεια να επαναρροφώνται σε αντίθεση με τις υδρόφιλες που αποβάλλονται (Παπαδόπουλος, 2005). Η αντίσταση ενός οργανισμού προς τις υδρόφοβες ενώσεις γίνεται μέσω μηχανισμών βιομεταμόρφωσης που μετατρέπουν τις ουσίες αυτές σε υδρόφιλες. Βιοαποικοδόμηση είναι η διεργασία κατά την οποία μια ουσία διασπάται από τον οργανισμό σε απλούστερες μορφές.
- Επίδραση σε συγκεκριμένους υποδοχείς
- Βιοχημική και μοριακή επίδραση. Στο επίπεδο αυτό περιλαμβάνεται ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων που μπορεί να προκαλέσουν οι προς δοκιμή ουσίες, όπως αλλαγές στο DNA, καταστροφή του γενετικού υλικού και των κυτταρικών μεμβρανών, και καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού.
- Επίδραση στη φυσιολογία και συμπεριφορά. Η φυσιολογία και συμπεριφορά αποτελούν σημαντικούς δείκτες στην εκτίμηση της κατάστασης της υγείας ενός πληθυσμού κατά την έκθεσή του σε κάποιο περιβάλλον, αν και η αναγωγή συμπερασμάτων σε επίπεδο πληθυσμού από τα αποτελέσματα σε έναν συγκεκριμένο αριθμό οργανισμών (συνήθως μικρό) ίσως αποτελεί κάποιο μειονέκτημα. Στο επίπεδο αυτό μελετώνται οι βλάβες και η νέκρωση των ιστών, η ανάπτυξη όγκων, η ικανότητα αναπαραγωγής και η θνησιμότητα.
- Παράμετροι πληθυσμών. Χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα δεικτών, συμπεριλαμβανομένων της έκτασης, της πυκνότητας ή της κατανομής ενός πληθυσμού, και των αλλαγών στα γενετικά χαρακτηριστικά.
- Επίδραση σε κοινότητες οργανισμών. Ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση είναι η αλλαγή της σύνθεσης των βιοκοινωνιών.

### 1.4.1.2 Μηχανισμοί τοξικής δράσης

Με βάση τους Newman and Unger (2002), οι χημικοί παράγοντες που προκαλούν τοξικότητα περιλαμβάνουν όχι μόνο χημικές ουσίες, αλλά και τους ενεργούς μεταβολίτες αυτών (activated metabolites). Γενικά, οι παράγοντες αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των κυττάρων, με αποτέλεσμα την εκκίνηση αλληλουχίας τοξικών δράσεων. Η τοξική δράση μπορεί να προκαλέσει αναστολή του οξειδωτικού μεταβολισμού ή παρεμπόδιση της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος ενός οργανισμού, αλληλεπίδραση με τα νουκλεϊκά οξέα και επακόλουθη καρκινογένεση ή επιπλοκές στο αναπαραγωγικό σύστημα. Η βιολογική δράση της τοξικής ουσίας μπορεί να τερματιστεί λόγω βιομεταμόρφωσης, αποθήκευσης, ή αποβολής. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως για αρκετές ουσίες, ωστόσο οι κυριότεροι μηχανισμοί είναι τέσσερις:

- Αλλοίωση ή καταστροφή της κυτταρικής δομής.
- Απευθείας χημική αντίδραση με τα κυτταρικά συστατικά προκαλώντας σύμπλοκα και δυσλειτουργία σε όργανα του οργανισμού.
- Επίδραση σε επίπεδο ενζύμων. Κάποιες ουσίες μπορούν να απενεργοποιήσουν ενζυμικά συστήματα μέσω κατάληψης κάποιου ενεργού τους κέντρου, απενεργοποίησης ενός συμπαραγόντα, ανταγωνιστική δράση με συμπαραγόντες για την κατάληψη ενεργών κέντρων ή σχηματισμού τοξικού μεταβολίτη.
- Δευτερογενής δράση. Η παρουσία μιας ουσίας μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση ουσιών που τραυματίζουν ή καταστρέφουν τα κύτταρα. Για παράδειγμα, ουσίες είναι δυνατό να σχηματίσουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και να προκαλέσουν έτσι, την απελευθέρωση απαραίτητων ιχνοστοιχείων, την αποβολή τους, και άρα τη μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων.

### 1.4.2 Δοκιμές ελέγχου τοξικότητας

Στα πειράματα ελέγχου τοξικότητας δοκιμάζεται η επίδραση μιας μεμονωμένης ουσίας ή ενός μίγματος σε ζωντανούς οργανισμούς (βιοδείκτες). Με τον τρόπο αυτό, εκτιμάται η επίδρασή του σε μια κατηγορία οργανισμών και κατ'επέκταση μπορεί να αξιολογηθεί η επικινδυνότητά του. Γενικότερα, τα κριτήρια επιλογής ενός πειράματος τοξικότητας είναι σε γενικές γραμμές το κόστος, ο χρόνος διάρκειας του πειράματος, η

ευαισθησία του χρησιμοποιούμενου οργανισμού, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και η δυνατότητα πραγματοποίησης πολλών πειραμάτων.

Οι εργαστηριακές δοκιμές τοξικότητας αναπτύχθηκαν τις προηγούμενες δεκαετίες προκειμένου να καταδείξουν δυσμενείς επιπτώσεις χημικών ουσιών σε βιολογικά συστήματα. Στη συνέχεια προέκυψε η ανάγκη ανάπτυξης βιοδοκιμών μικρής κλίμακας «micro-scale toxicity tests» ή «microbiotests» οι οποίες αφορούν στην έκθεση σε μονοκύτταρους ή μικρούς πολυκύτταρους οργανισμούς ενός υγρού ή στερεού δείγματος. Αυτές οι δοκιμές έχουν το πλεονέκτημα να χρειάζονται μικρό όγκο δείγματος, να είναι πολύ σύντομες και με χαμηλό κόστος (Blaise et al., 1998).

Η βιοδοκιμή οξείας τοξικότητας με τον Αναλυτή Microtox® έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο ως βιοδοκιμή μικρής κλίμακας η οποία συνδυάζει ταχύτητα, ευκολία στη χρήση, επαναληψιμότητα, ακρίβεια, ευαισθησία και συγκριτικά χαμηλό κόστος (Isenberg, 1993). Στο συγκεκριμένο αναλυτή, ο οργανισμός στόχος που χρησιμοποιείται είναι το φωτοβακτήριο *Vibrio fischeri*. Η χρήση των βακτηρίων στις βιοδοκιμές επικρατεί τις τελευταίες τρεις δεκαετίες καθιστώντας τες σημαντικά εργαλεία για την εκτίμηση τοξικότητας προκειμένου για την συμμόρφωση σε διάφορους κανονισμούς ή τη γρήγορη σάρωση χημικών ουσιών και μιγμάτων ως προς την επικινδυνότητα και την εκτίμηση των επιπτώσεων στην υγεία όταν αυτά εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον (Wells et al., 1998).

Το πείραμα τοξικότητας με τον αναλυτή Microtox, βασίζεται στη χρήση του βακτηρίου *Vibrio fischeri*. Τα βακτήρια αυτά, εφόσον αναπτυχθούν κατάλληλα, εκπέμπουν φωταύγεια ως παραπροϊόν της κυτταρικής τους αναπνοής. Η αναπνοή είναι θεμελιώδους σημασίας για τον κυτταρικό μεταβολισμό και όλες τις σχετικές κυτταρικές λειτουργίες. Η βακτηριακή φωταύγεια είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αναπνοή και οποιαδήποτε αναστολή στην κυτταρική δραστηριότητα έχει ως αποτέλεσμα το μειωμένο ρυθμό αναπνοής και την αντίστοιχη μείωση στην ένταση της παραγόμενης φωταύγειας.

Το *V. fischeri* είναι ένα θαλάσσιο βακτήριο του οποίου το φάσμα εκπομπής φωτός παρουσιάζει μέγιστη ένταση στα 490 nm στην ορατή περιοχή. Συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φθορίζοντα μέρη του σώματος μεγαλύτερων πολυκύτταρων οργανισμών που ζουν κυρίως στο βυθό των θαλασσών. Το στέλεχος B-11177 που χρησιμοποιείται στις βιοδοκιμές επιλέχθηκε λόγω της ευαισθησίας του σε μεγάλο εύρος χημικών ουσιών. Το μέγεθος τους είναι πολύ μικρό (μικρότερο από 1 μm), προσφέροντας έτσι υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο. Επιπλέον, έχουν σχετικά απλή μορφολογία χωρίς επιπλέον λειτουργικά συστήματα στο εσωτερικό των κυττάρων οπότε διαθέτουν αρκετά σημεία κοντά

ή στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης όπου μπορεί να δράσει μια ουσία. Η αντίδραση κατά την οποία παράγεται φωταύγεια, καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση (Farre et al., 2002).

Η βιοφωταύγεια είναι προϊόν της αντίδρασης στην οποία καταναλώνεται ενέργεια σε ποσοστό που φθάνει μέχρι και το 20% της συνολικής ενέργειας του κυττάρου (Wegrzyn and Czyz, 2002). Ο ρυθμός αναπνοής του βακτηρίου είναι 10 – 100 φορές υψηλότερος από αυτόν των κυττάρων των θηλαστικών, ενώ ο αριθμός που χρησιμοποιείται ανά πείραμα είναι πολύ μεγάλος οπότε το παραγόμενο φως είναι μετρήσιμο (APHA-AWWA\_WEF, 1995). Μια τοξική ουσία προκαλεί μεταβολές στην κατάσταση του κυττάρου, η οποία μάλιστα μπορεί να είναι σε διαφορετικά επίπεδα (κυτταρικό τοίχωμα, κυτταρική μεμβράνη, αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, συστατικά κυτταροπλάσματος) και κατά συνέπεια προκαλεί μείωση του εκπεμπόμενου φωτός.

Το πείραμα ελέγχου άμεσης τοξικότητας (acute toxicity) με το φωτοβακτήριο *V. fischeri* αναπτύχθηκε από την AZUR ENVIRONMENTAL Αμερικής. Η βιοδοκική εξελίχθηκε εμπορικά και κυκλοφόρησε στην αγορά για πρώτη φορά το 1979. Σήμερα κυκλοφορεί στο εμπόριο και χρησιμοποιείται ευρύτατα παγκοσμίως, με αποτέλεσμα να υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία για πλήθος ουσιών και μιγμάτων.

Οι εφαρμογές χρήσης του αναλυτή Microtox® (Microtox 500 analyzer) μπορεί να ξεκίνησαν από την οικοτοξικολογία για να εκτιμούν την οικοτοξικότητα μεμονωμένων χημικών ουσιών και μιγμάτων (Park and Que Hee, 2001, Fulladosa et al., 2004) όμως στη συνέχεια επεκτάθηκαν στην διασφάλιση της ποιότητας πόσιμου νερού (van der Schalie et al., 2006; States et al., 2003; Ulitzur et al., 2002), στην εκτίμηση της βιολογικής δράσης φαρμακευτικών (Wawryniuk et al., 2015; Czech et al., 2014) και ιατρικώνσκευασμάτων (Botsford, 2002), και πρόσφατα στην εκτίμηση τοξικότητας φυτικών εκχυλισμάτων από βρώσιμα λαχανικά (Conforti et al., 2008) και αρωματικά φυτά (Skotti et al., 2014) Σε άλλες βιοδοκιμές που χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, οι οδοί έκθεσης σε χημικές ουσίες των πειραματόζωων, είναι το αναπνευστικό σύστημα, επιδερμικά, στοματικά και ενδοφλέβια. Η τοξική ουσία εμφανίζει το μεγαλύτερο τοξικό αποτέλεσμα όταν εισαχθεί ενδοφλέβια. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δέκα ζώα για κάθε δόση, ενώ το εύρος των δόσεων είναι μεγάλο. Η χαμηλότερη δόση σκοτώνει το 1% των ζώων ενώ η ψηλότερη λιγότερο του 100%. Η καμπύλη που παριστάνει τον % αριθμό των θανάτων ως προς τη δόση είναι κανονική. Η διάμεσος τιμή της δίνει την LD<sub>50</sub> (Klaassen 1986). Στην περίπτωση του αναλυτή Microtox δε χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, παρά μόνο βακτήρια σε λυοφιλωμένη μορφή τα οποία

ενεργοποιούνται πριν την έναρξη του πειράματος. Οι εκφράσεις τοξικότητας από τον αναλυτή προκύπτουν ως  $EC_{50}$ , παράμετρος που εξηγείται στη συνέχεια.

#### 1.4.2.1 Αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών

Έως πριν από λίγα χρόνια τα πειράματα τοξικότητας πραγματοποιούνταν με την δοκιμή μιας μόνο ουσίας σε έναν οργανισμό. Στη φύση όμως οι τοξικές ουσίες ποτέ δεν βρίσκονται μεμονωμένες αλλά σε μείγματα. Για τους παραπάνω λόγους έχει ενδιαφέρον το να προβλεφθεί η συνδυασμένη τοξικότητα τοξικών ουσιών που επιδρούν στον ίδιο οργανισμό. Για παράδειγμα η νομοθεσία που καθορίζει τις μέγιστες συγκεντρώσεις που επιτρέπονται να διοχετεύονται στο οικοσύστημα είναι βασισμένη σε πειράματα προσδιορισμού τοξικότητας μεμονωμένων ουσιών.

Οι χημικές ουσίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μια ποικιλία τρόπων ώστε η τελική δράση να είναι (Klassen, 1986):

Προσθετική, όταν η τελική τοξική δράση είναι το άθροισμα των τοξικών δράσεων των επιμέρους ουσιών. Για παράδειγμα όταν δύο οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χορηγούνται ταυτόχρονα, η αναχαίτιση της χολινεστεράσης είναι συνήθως προσθετική.

Συνέργεια, όταν το συνδυασμένο τοξικό αποτέλεσμα των δύο χημικών ουσιών, είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των αποτελεσμάτων των δύο χημικών ουσιών ξεχωριστά.

Ενεργοποίηση, όταν μια ουσία που από μόνη της δεν προκαλεί τοξικό αποτέλεσμα στον οργανισμό, προστίθεται σε μια τοξική ουσία αυξάνοντας κατά πολύ την τοξικότητά της δεύτερης.

Ανταγωνισμός, όταν υπάρχει αλληλεπίδραση δυο τοξικών ουσιών κατά την οποία το τοξικό αποτέλεσμα όταν χορηγηθούν και οι δύο είναι μικρότερο από το άθροισμα του τοξικού αποτελέσματος της κάθε μιας ξεχωριστά. Ο ανταγωνισμός είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα τοξικολογική ιδιότητα και χρησιμοποιείται στην παρασκευή αντιδότην.

Οι αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μάλλον μεταξύ των φυσιολογικών συστημάτων των οργανισμών και των χημικών ουσιών παρά μεταξύ των χημικών ουσιών. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις είναι πολύπλοκες και ο μηχανισμός τους παραμένει άγνωστος. Είναι πάντως σίγουρο ότι η απλή καταγραφή και περιγραφή αυτών υποβοηθά την κατανόησή τους. Η μελέτη της τοξικότητας του συνδυασμού φυτοφαρμάκων ή φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών αποτελεί ένα πεδίο που δεν έχει διευρυνθεί αρκετά, ίσως λόγω του μεγάλου αριθμού των δυνατών συνδυασμών.

### 1.4.2.2 Εκτίμηση της τοξικότητας μειγμάτων

Η προσπάθεια εκτίμησης της τοξικής δράσης μιγμάτων χημικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία διαγραμμάτων, δεικτών, και μαθηματικών σχέσεων, με σκοπό την απεικόνιση και ποσοτικοποίηση των εννοιών αλληλεπίδρασης. Η περισσότερο διαδεδομένη θεωρία προτάθηκε το 1960 από τον Gowing (Kungolos *et al.*, 1997). Με βάση τη θεωρία αυτή, όταν έχουμε συνδυασμένη επίδραση από  $a$  συγκέντρωση της ουσίας  $A$  που προκαλεί ένα αποτέλεσμα  $P(a)$  (εκφράζεται σε % θνησιμότητα ή αναστολή κάποιας λειτουργίας του οργανισμού) και  $b$  η συγκέντρωση της ουσίας  $B$  που προκαλεί ένα αποτέλεσμα  $P(b)$ , το συνολικό αποτέλεσμα θα είναι :

$$P(e) = P(a) + P(b) [100 - P(a)]/100$$

Αν το παρατηρούμενο πειραματικό αποτέλεσμα  $P(0)$  δεν είναι σημαντικά διαφορετικό από το αναμενόμενο  $P(e)$ , τότε το συνδυασμένο αποτέλεσμα είναι προσθετική επίδραση (additive interactive effect). Αν το πειραματικό αποτέλεσμα  $P(0)$  είναι σημαντικά μικρότερο, το συνδυασμένο αποτέλεσμα είναι ανταγωνιστική επίδραση (antagonistic interactive effect). Αν το  $P(0)$  είναι σημαντικά μεγαλύτερο, το αποτέλεσμα είναι συνεργιστική επίδραση (synergistic interactive effect) (Κούγκολος, 2005).

Ακόμα, άλλη μέθοδος προσδιορισμού για την αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών δόθηκε από άλλους ερευνητές με τη δημιουργία μιας άλλης μαθηματικής έκφρασης. Δημιούργησαν τον αθροιστικό δείκτη  $S$  (sum or additive index), ο οποίος υπολογίζεται για κάποια συγκεκριμένη απόκριση του δείγματος (π.χ.  $LC_{20}$ ,  $LC_{50}$  κλπ) και ισούται με:

$$S = [C_A / EC_A] + [C_B / EC_B]$$

Όπου  $C_A$ ,  $C_B$  είναι οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών  $A$  και  $B$  στο μίγμα και  $EC_A$ ,  $EC_B$  οι συγκεντρώσεις της κάθε μιας ουσίας χωριστά που επιφέρει την συγκεκριμένη απόκριση του δείγματος.

Όταν το μίγμα αποτελείται από περισσότερες των δυο χημικών ουσιών, ο αθροιστικός δείκτης γίνεται

$$S = [C_A / EC_A] + [C_B / EC_B] + [C_G / EC_G] + \dots$$

Αν  $S = 1$ , η αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών είναι αθροιστική. Αν  $S > 1$ , υπάρχει ανταγωνισμός, ενώ αν  $S < 1$ , υπάρχει συνέργεια. Ο αθροιστικός δείκτης χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων ουσιών μόνος ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους.

### 1.4.2.3 Κατηγοριοποίηση Δειγμάτων

Για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων, έχει δημιουργηθεί ένας τύπος που ορίζει την τοξικότητα σε μονάδες. Οι Τοξικές Μονάδες (Toxic Units - TU) ορίζονται σύμφωνα με τον τύπο :

$$TU = 1 / [L(E)C_{50}] * 100$$

όπου μετατρέπονται οι τιμές των  $LC_{50}$  και  $EC_{50}$  σε Τοξικές Μονάδες [Michniewicz et al., 2000]

Η κατηγοριοποίηση γίνεται σύμφωνα με τους (Isidori et al., 2000) ως εξής:

- TU=0 Μη τοξικό
- TU<1 Ελαφρώς τοξικό
- TU=1-10 Τοξικό
- TU=11-100 Πολύ τοξικό
- TU>100 Εξαιρετικά τοξικό

### 1.4.2.4 Επιπτώσεις τοξικότητας σε μικροοργανισμούς

Υπάρχουν διάφοροι ενδεχόμενοι μηχανισμοί κατά τους οποίους οι τοξικές ουσίες επηρεάζουν και τελικά θανατώνουν τους μικροοργανισμούς. Οι τοξικές ουσίες μπορούν να βλάψουν το γενετικό υλικό ή μπορεί να οδηγήσουν σε πρωτεϊνική μετουσίωση όπως για παράδειγμα τα αλογόνα. Μπορεί επίσης να προκαλούν ανωμαλίες στις μεμβράνες των κυττάρων (π.χ. φαινόλη) που έχουν ως αποτέλεσμα διαρροή των πρωτεϊνών του DNA και RNA και άλλων οργανικών στοιχείων. Κάποια τοξικά χημικά μπορεί να μετακινήσουν κατιόντα π.χ.  $Na^+$ ,  $Ca^+$  από την θέση της προσρόφησης στα κύτταρα των μικροοργανισμών, π.χ. οξέα και αλκάλια.

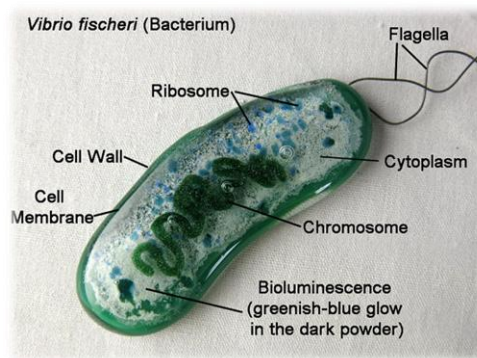
Μια πιο δυσδιάκριτη ενέργεια των τοξικών μολυντών είναι η ικανότητά τους να μπλοκάρουν τους χημικούς υποδοχείς των μικροοργανισμών, οδηγώντας τους έτσι στην αναστολή της οργανικής απόθεσης στη διαδικασία αυτοκαθαρισμού σε εργοστάσια καθαρισμού λυμάτων και σε ύδατα που δέχονται υλικά από λύματα. Πιστεύεται ότι μια από τις πιο σημαντικές επιπτώσεις των τοξικών ρυπαντών στους μικροοργανισμούς εντοπίζεται στις λειτουργίες των ενζύμων. Παρόλα αυτά, σε κάθε μελέτη τοξικότητας, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές μεταβλητές (παρουσία άλλων κατιόντων, pH, η δυνατότητα οξειδωσης και μείωσης, η θερμοκρασία, η οργανική ύλη, ανόργανα αργιλικά, κ.τ.λ.) που ελέγχουν τις τοξικές δράσεις έναντι των μικροοργανισμών.



Μπορούμε με βιοχημικές εξετάσεις να μετρήσουμε την επίπτωση των τοξικών ουσιών στα κύτταρα των μικροοργανισμών. Οι εξετάσεις αυτές συμπεριλαμβάνουν μετρήσεις των δραστηριοτήτων των ενζύμων, του περιεχόμενου του ATP και της βιοφωταύγειας.

#### 1.4.3 Το βακτήριο *Vibrio fischeri*

Το βακτήριο *Vibrio fischeri* (Εικ. 1.4.1), είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο χλώριο και εξαρτάται άμεσα από το pH, το οποίο θα πρέπει να κυμαίνεται από 6 έως 8. Το βακτήριο βρίσκεται σε αδρανή μορφή σε θερμοκρασία  $-25^{\circ}\text{C}$ . Η ενεργοποίησή του είναι αναγκαίο να γίνει όταν ξεκινάει το πείραμα με γρήγορες κινήσεις.



Εικόνα 1.4.1 Βακτήριο *Vibrio fischeri*, βασικά κυτταρικά οργάνδια

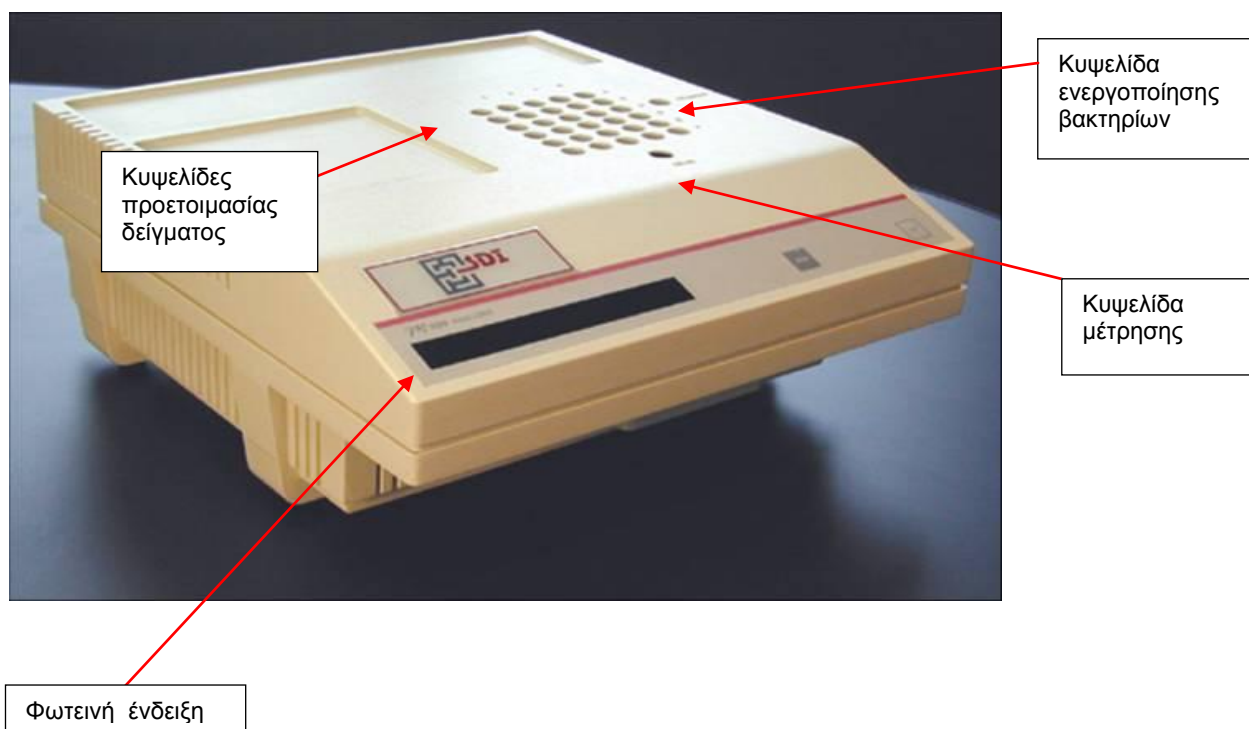
#### 1.4.4 Αναλυτής Τοξικότητας Microtox Analyzer

Με τη χρήση του αναλυτή τοξικότητας Microtox για τον εντοπισμό των αλλαγών στην εκπομπή φωτός, μπορούν να υπολογιστούν οι κίνδυνοι που παρουσιάζονται από τις τοξικές ουσίες. Από τα αποτελέσματα αυτά υπολογίζεται η συγκέντρωση  $IC_{50}$  (Inhibition concentration 50). Η τιμή  $IC_{50}$  αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός δείγματος που προκαλεί 50% μείωση στην εκπεμπόμενη φωταύγεια σε σχέση με το μάρτυρα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Microtox<sup>®</sup> για τον προσδιορισμό της τοξικότητας αφεψημάτων και εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται περιγραφή του εξοπλισμού και της χρήσης του κατά τη βιοδοκιμή.

#### 1.4.4.1 Προετοιμασία Οργάνου

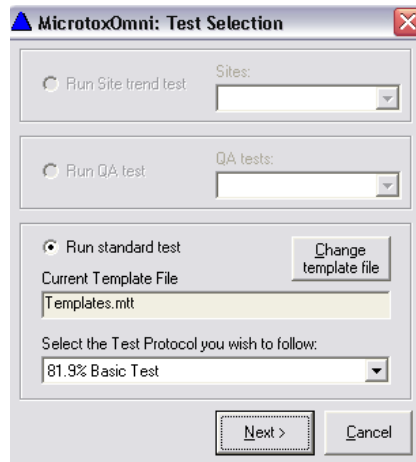
Αφού ενεργοποιηθεί ο εργαστηριακός αναλυτή Microtox® (Εικ. 1.4.2), ενεργοποιείται αυτόματα και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής, που είναι συνδεδεμένος με αυτόν και περιέχει το λογισμικό «MicrotoxOmni». Η θερμοκρασία του οργάνου, είναι αρκετά σημαντική για την ενεργοποίηση και την επιβίωση των βακτηρίων. Για αυτό το λόγο και υπάρχει φωτεινή ένδειξη στον αναλυτή, που ενεργοποιείται όταν φθάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία και μπορεί να γίνει η έναρξη του πειράματος.



Εικόνα 1.4.2 Αναλυτής Microtox®

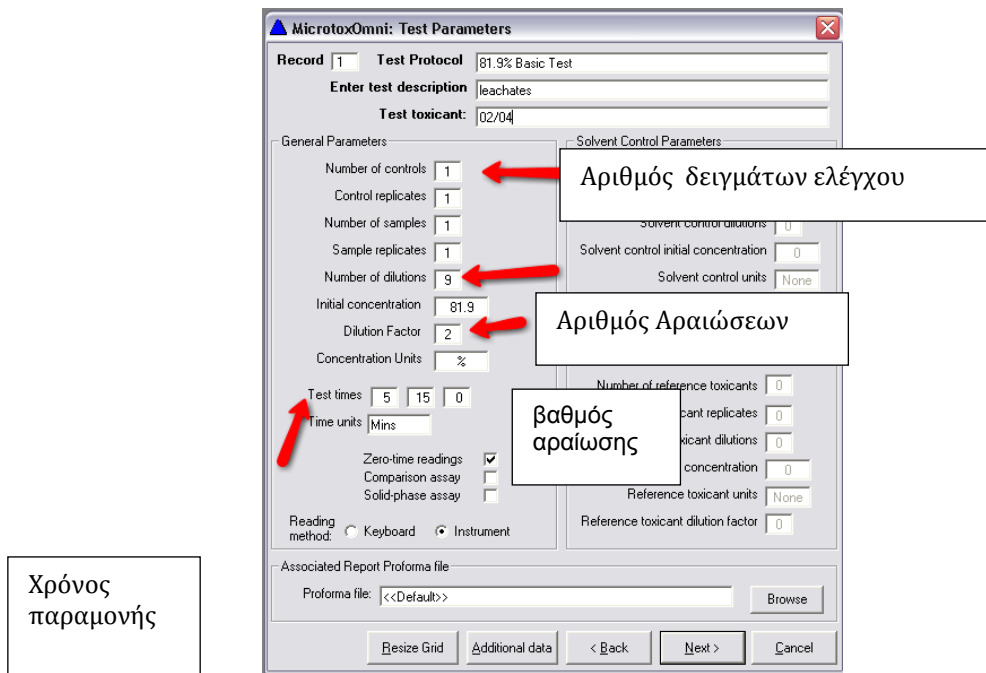
Ειδικά φιαλίδια τοποθετούνται στις κατάλληλα διαμορφωμένες εσοχές –κυψελίδες του αναλυτή, όπου διατηρείται η θερμοκρασία και διεξάγεται το πείραμα. Στην κυψελίδα ενεργοποίησης, η θερμοκρασία παραμένει σε πιο χαμηλά επίπεδα, για να μπορούν να διατηρούνται για περίπου 4 ώρες μετά την ενεργοποίησή τους.

Στο λογισμικό «MicrotoxOmni», δημιουργείται μια καινούργια βάση, επιλέγοντας το ανάλογο πρωτόκολλο.



Εικόνα I.4.3 Λογισμικό MicrotoxOmni

Στην συνέχεια, ορίζονται οι παράμετροι που θα ελεγχθούν, όπως ο βαθμός αραιώσης 1:2, μια κυψελίδα ελέγχου, 10 αραιώσεις για κάθε εκχύλισμα και ο χρόνος μέτρησης σε 5, 15 και 30 λεπτά (Εικ. I.4.4).

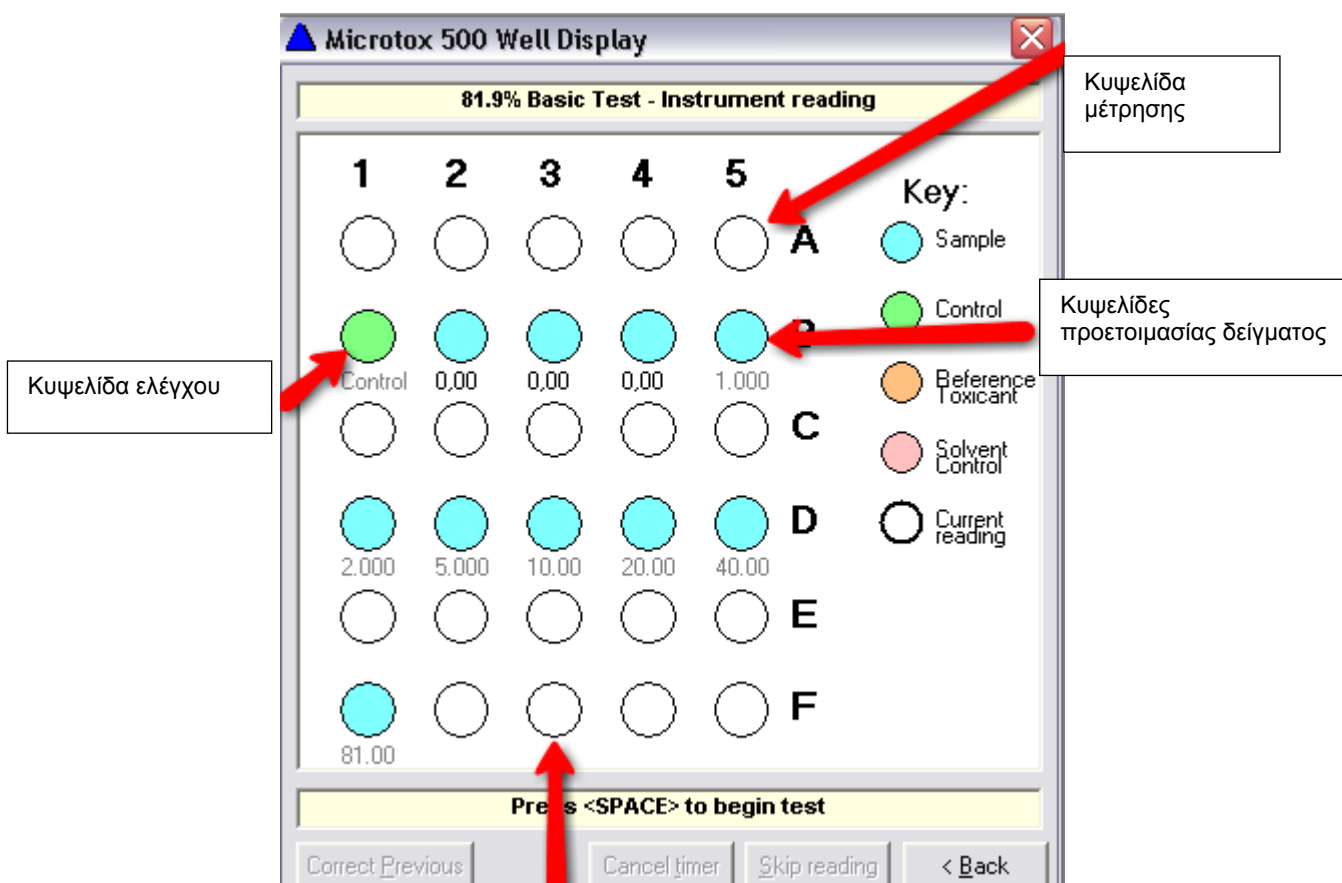


Εικόνα I.4.4 Παράμετροι MicrotoxOmni προς εισαγωγή

Πριν την διεξαγωγή του πειράματος ρυθμίζεται η αλατότητα στο 10% με τη βοήθεια ενός οσμωτικού διαλύματος ρύθμισης, OAS (Osmotic Adjusting Solution), που περιέχει χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε ποσοστό 22%.

#### 1.4.4.2 Πλήρωση κυψελίδων

Στην πρώτη, την τρίτη και την πέμπτη σειρά (A, C, E), βρίσκονται οι κυψελίδες που προετοιμάζεται το δείγμα. Στην δεύτερη, την τέταρτη και την έκτη σειρά (B, D, F), βρίσκονται οι κυψελίδες που γίνονται οι μετρήσεις και περιέχουν τα βακτήρια. (Εικ. 1.4.5).



Εικόνα 1.4.5 Κυψελίδες προς πλήρωση

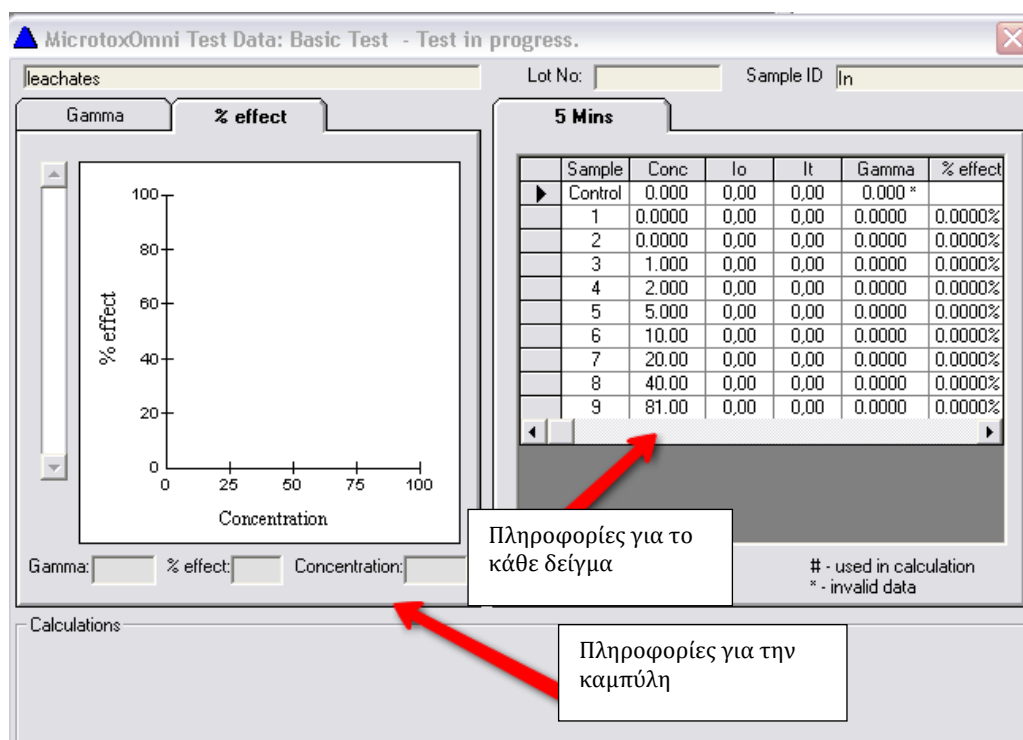
Για το συγκεκριμένο πείραμα και αφού οι διαφορετικές συγκεντρώσεις ήταν δέκα, τοποθετούνται τα ειδικά φιαλίδια στις κυψελίδες A1 έως A5, B1 έως B5, C1 έως C5, D1 έως D5, E1 και F1, όπως φαίνεται παρακάτω. Στην θέση B1 είναι η κυψελίδα ελέγχου. Επίσης, τοποθετείται ένα ακόμα φιαλίδιο στην κυψελίδα F3, για την μεταφορά των ενεργοποιημένων βακτηρίων.

Προστίθεται Reconstitution Solution 1000  $\mu\text{L}$  στο Reagent Well και 1500  $\mu\text{L}$  Diluent στο φιαλίδιο της κυψελίδας F3. Στην συνέχεια, προστίθεται 2000  $\mu\text{L}$  Diluent σε όλες τις κυψελίδες όπου θα πραγματοποιηθεί αραιώση, δηλαδή από την B1 έως την B5 και την D1 έως την D5. Το Diluent είναι ο διαλύτης για τις αραιώσεις. Στο φιαλίδιο της κυψελίδας F1

προστίθεται 4000 μl δείγματος και 400 μl OAS στις κυψελίδες δοκιμής. Στην συνέχεια προστίθεται το μείγμα. Από την κυψελίδα F1 (81% συγκέντρωση), μεταφέρονται 2000 μL, στην κυψελίδα D5 και το μείγμα αναδεύεται. Η αραιώση συνεχίζεται, διαδοχικά σε όλες τις κυψελίδες προετοιμασίας δείγματος, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Από το φιαλίδιο της B2 κυψελίδας, απορρίπτεται 2000 μL δείγματος. Τα διαλύματα, θα πρέπει να αποκτήσουν την κατάλληλη θερμοκρασία και για αυτό το λόγο παραμένουν για 5 λεπτά στις κυψελίδες.

#### 1.4.4.3 Μεταφορά Βακτηρίων.

Η μεταφορά των βακτηρίων, γίνεται από την κυψελίδα ενεργοποίησης, στην κυψελίδα F3. Μεταφέρονται 150 μL βακτηρίων, για τη διεξαγωγή του κάθε πειράματος. Από την κυψελίδα F3 μεταφέρονται 100 μL βακτηρίων στο κάθε φιαλίδιο μέτρησης, από A1 έως A5, C1 έως C2 και E1. Μετά από 15 λεπτά, τοποθετείται το κάθε φιαλίδιο που περιέχει βακτήρια, στο Read Well, και ενεργοποιείται ο αναλυτής με το κουμπί SET και το λογισμικό του με το space bar. Καταγράφεται το επίπεδο της αρχικής φωταύγειας των βακτηρίων σε χρόνο 0 ( $I_0$ ), για όλα τα δείγματα – κυψελίδες, διαδοχικά, όπως υποδεικνύεται από το λογισμικό.



Εικόνα 1.4.6 Λογισμικό MicrotoxOmni Αποτελέσματα

#### 1.4.4.4 Μεταφορά δείγματος

Από κάθε κυψελίδα προετοιμασίας δείγματος, μεταφέρονται 900 µL δείγματος στα βακτήρια (B1 σε A1, B2 σε A2, D1 σε C1, D2 σε C2) και αναδεύονται ελαφρά. Ενεργοποιείται και πάλι το λογισμικό με το space bar, μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς όλων των δειγμάτων. Το λογισμικό μετράει το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για την πρώτη μέτρηση της φωταύγειας, στα 5 πρώτα λεπτά. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται στα 15 και 30 λεπτά.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να γίνονται σε όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να μην αλλάζει η θερμοκρασία των βακτηρίων και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στα βακτήρια.

Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται από το λογισμικό MicrotoxOmni (Εικ. 1.4.6)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

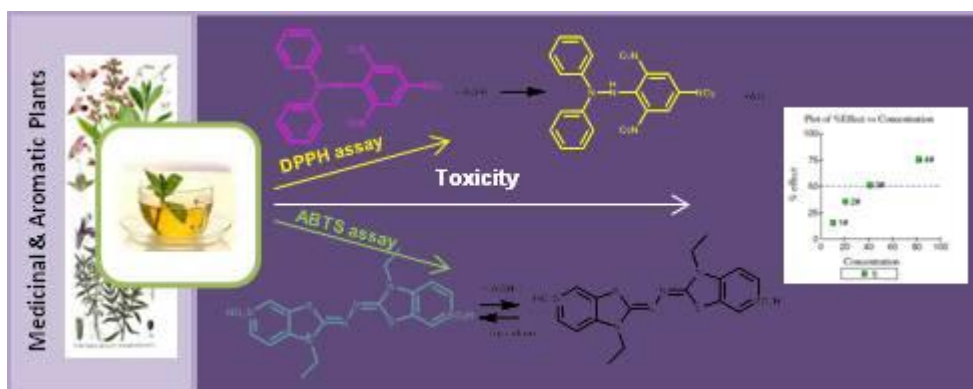
### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ





# II.1

## Εκτίμηση τοξικότητας αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών





### II.1.1 Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία έχει αναδειχθεί σε αντικείμενο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ο ρόλος των αντιοξειδωτικών συστατικών στη διατροφή του ανθρώπου στην πρόληψη ασθενειών και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής (Alvarado *et al.*, 2006; Blasa *et al.*, 2010; Perez Jimenez *et al.*, 2008; Turkmen *et al.*, 2005; Wootton-Beard and Ryan, 2011).

Ως πλούσιες πηγές αντιοξειδωτικών έχουν αναγνωρισθεί τα φρέσκα λαχανικά και τα αφεψήματα (Alarcon *et al.*, 2008; Almajano *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2010). Η βιομηχανία τροφίμων δείχνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα ολικά φαινολικά συστατικά, την αντιοξειδωτική αλλά και την αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, καθώς φυτικά εκχυλίσματα με σημαντική αντιμικροβιακή δράση θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ως συντηρητικά στα τρόφιμα (Almajano *et al.*, 2008).

Τα φυτικά εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται από διάφορους διαλύτες, μεταξύ αυτών και το νερό, είναι μίγματα πολλών ουσιών. Την πιθανή τους βιολογική δράση ως μίγματα την έχουν προσεγγίσει με διάφορα μοντέλα σε φυτά (Bouchagier *et al.*, 2008; Bouchagier and Efthimiadis, 2010), βιοδοκιμές σε μικροοργανισμούς (Daferera *et al.*, 2003), καλλιέργειες ιστών και κυττάρων (Wang *et al.*, 2011), υποδοχείς ενζύμων (Peelman *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008; Kotecha *et al.*, 2007; Kvalheim *et al.*; 2011)

Τα υδατικά φυτικά εκχυλίσματα έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον καθώς μπορούν να καταναλώνονται σε καθημερινή βάση ως αφεψήματα. Πολλά είδη της οικογένειας Lamiales χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως αφεψήματα στη διατροφή και στην παραδοσιακή ιατρική (Barros *et al.*, 2011; Carrio and Valles, 2012; Degner *et al.*, 2009; Liolios *et al.*, 2010; Nedorostova *et al.*, 2009; Noorbala *et al.*, 2005). Η θεραπευτική τους δράση αποδίδεται μέχρι σήμερα σε βιολογικά δραστικά πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα τα οποία έχουν αποδεδειγμένα αντιοξειδωτική δράση (Surveswaran *et al.*, 2007). Παρόλα αυτά προσοχή θα πρέπει να δοθεί στο θέμα της λήψης υψηλών δόσεων (Tajkarimi *et al.*, 2010), καθώς η ενδεχόμενη δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα αυτών των αφεψημάτων δεν έχει προσδιορισθεί. Οι Conforti *et al.* (2008), εισήγαγαν για πρώτη φορά τον αναλυτή τοξικότητας Microtox<sup>®</sup> ως εργαλείο προσδιορισμού της τοξικότητας διαφόρων εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται στη μεσογειακή διατροφή.

Ο αναλυτής τοξικότητας Microtox<sup>®</sup> χρησιμοποιεί ως οργανισμό αναφοράς το φωτοβακτήριο *Vibrio fischeri* και παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα με μεγάλη επαναληψιμότητα κι ευαισθησία, και σχετικά μικρό κόστος για την εκτίμηση της τοξικότητας

μεμονωμένων ουσιών και μιγμάτων οργανικών και ανόργανων ουσιών (Backhaus *et al.*, 2000; Fulladosa *et al.*, 2005; Hernando *et al.*, 2007; Park and QueHee, 2001), βιο-υλικών (Bulich *et al.*, 1990; Burton *et al.*, 1986) χωρίς να εγείρει θέματα ηθικής λόγω της χρήσης πειραματόζων (Conforti *et al.*, 2008; Cotou *et al.*, 2002; Parvez *et al.*, 2006; Shettlemore & Bundy, 2002; Zhao *et al.*, 1998). Οι Conforti *et al.* (2008) πρότειναν πρώτοι τη χρήση του Microtox® όχι μόνο για τον προσδιορισμό της τοξικότητας αφεψημάτων και εγχυμάτων αλλά και για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης υδατοδιαλυτών και πτητικών συστατικών που εκχυλίζονται από μη πολικούς διαλύτες.

Πρόσφατα υπάρχει επίσης έντονο ενδιαφέρον στην αξιολόγηση της πιθανής συνέργειας ή του ανταγωνισμού στην αντιμικροβιακή (Al-Bayati, 2008; Endo *et al.*, 2010; Hemaiswarya and Doble, 2009; Moon *et al.*, 2011; Ncube *et al.*, 2012) και αντιοξειδωτική δράση (Romano *et al.*, 2009) μεμονωμένων ουσιών ή μιγμάτων. Η βιοδοκιμή παρεμπόδισης της χημειοφωταύγειας που εκπέμπει το φωτοβακτήριο *Vibrio fischeri* έχει χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν για την αξιολόγηση του ανταγωνισμού ή της συνέργειας στην τοξικότητα ουσιών σε μίγματα (Zhang *et al.*, 2011).

Στην παρούσα μελέτη, τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* και συγκεκριμένα των *Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum dictamnus* L., *Salvia officinalis* L. και *Hyssopus officinalis* L. εξετάστηκαν όσον αφορά τα ολικά φαινολικά συστατικά, την αντιοξειδωτική τους δράση και την τοξικότητά τους, καθώς αποτελούν αντιπροσωπευτικά είδη της μεσογειακής χλωρίδας. Ο στόχος της παρούσας πειραματικής ενότητας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ ολικών φαινολικών συστατικών, αντιοξειδωτικής ικανότητας και τοξικότητας καθώς και η αλληλεπίδραση των υδατοδιαλυτών συστατικών και των συστατικών του πτητικού κλάσματος που περιέχονται στα προαναφερόμενα εκχυλίσματα.

## II.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

### II.1.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού

Τα φυτικά δείγματα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.), του φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.), της ρίγανης (*Origanum vulgare* L.; χημειότυπος καρβακρόλης) και του ύσσωπου (*Hyssopus officinalis* L.) ήταν συλλογής έτους 2010, είχαν ξηρανθεί με αέρα και προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Καλλιεργητών Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ). Τα δείγματα του δίκταμου (*Origanum dictamnus* L. χημειότυπος καρβακρόλης) προμηθεύτηκαν από την τοπική αγορά

της Κρήτης. Από τα προαναφερόμενα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα φύλλα, με εξαίρεση τη ρίγανη και τον ύσσωπο όπου χρησιμοποιήθηκαν και τα άνθη, και του κρόκου όπου χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση αποκλειστικά τα στίγματα.

Όλα τα φυτικά δείγματα (Πιν. II.1.1) φυλλάσσονταν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

**Πίνακας II.1.1** Φυτικά είδη που εξετάστηκαν

Κωδικός	Είδος	Κοινή ονομασία	No	Περιοχή συλλογής	Μέρος φυτού	Χρήση στη διατροφή
MOF	<i>Melissa officinalis</i>	Μελισσόχορτο	25	Μαυρίας Παναιτωλικού	Φύλλα	Αφέψημα
OVU	<i>Origanum vulgare</i>	Ρίγανη	27	Μ. Χώρα Αγρινίου	Φύλλα	Αρωματικό ως έχει σε σαλάτες, ή κατά τη διαδικασία του μαγειρέματος
ODI	<i>Origanum dictamnus</i>	Δίκταμο		Ηράκλειο Κρήτης	Φύλλα/ άνθη	Αφέψημα
SOF	<i>Salvia officinalis</i>	Φασκόμηλο	18	Σκούτερα	Φύλλα	Αφέψημα, σε φαγητά κατά τη διαδικασία μαγειρέματος
HOF	<i>Hyssopus officinalis</i>	Ύσσωπος	29	Μαυρίας Παναιτωλικού	Φύλλα/ άνθη	Αφέψημα

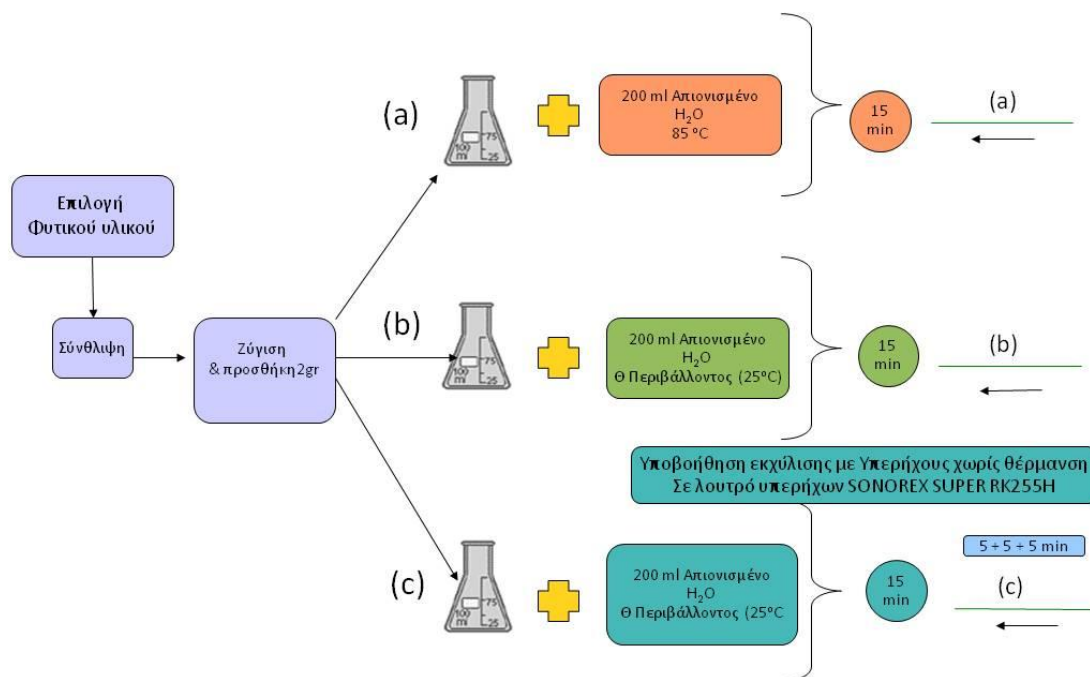
### II.1.2.2 Υλικά & εξοπλισμός

Οι έλεγχοι τοξικότητας πραγματοποιήθηκαν με τον Αναλυτή Τοξικότητας Microtox Analyzer 500, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με 30 υποδοχές σταθερής θερμοκρασίας 15°C για την εκτέλεση των αναλύσεων, και μια υποδοχή σταθερής θερμοκρασίας 5°C για την ενεργοποίηση και παραμονή των βακτηρίων μέχρι την εκτέλεση του πειράματος. Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πρωτοκόλλων άμεσης τοξικότητας ήταν για την αραιώση των εκχυλισμάτων το (Diluent, sterile 2% sodium chloride), για τη διόρθωση της οσμωτικής πίεσης το OAS (osmotic adjusting solution 22% sodium chloride), το διάλυμα ενεργοποίησης των λυοφυλιωμένων βακτηρίων *Vibrio fischeri*, καθώς και τα λυοφυλιωμένα βακτήρια *Photobacterium phosphoreum*, NRRL No B-11177, προμηθεύθηκαν από την Strategic Diagnostic INC.

### II.1.2.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

Για κάθε φυτικό είδος, και για όλα τα είδη των εκχυλίσεων έγιναν τρεις επαναλήψεις. Τα εκχυλίματα λήφθηκαν με προσθήκη 2 gr ξηρής φυτικής δρόγης σε 200 mL απιονισμένο νερό με τρεις διαφορετικούς τρόπους παραλαβής:

#### Παραλαβή Εκχυλισμάτων



**Σχήμα II.1.1** Διαδικασία εκχύλισης για την παραλαβή εκχυλισμάτων (a), (b), (c)

Σε όλα τα εκχυλίματα γινόταν κατ'αρχήν διήθηση με φίλτρο Whatman No. 1 και στη συνέχεια με nylon membrane filter 0.2μm προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα αιωρούμενα σωματίδια που παρεμποδίζουν τη μέτρηση της χημειοφωταύγειας από τον ανιχνευτή (Parvez *et al.*, 2006).

Στη συνέχεια μέρος του εκχυλίματος από τα (a), (b), (c) εκχυλίστηκε εκ νέου με άπολο οργανικό διαλύτη, και συγκεκριμένα πετρελαϊκό αιθέρα, προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη υδατοδιαλυτά συστατικά που μπορεί να υπάρχουν στα αφεψήματα.

#### II.1.2.4 Εκτίμηση τοξικότητας με τον Αναλυτή Microtox®

Ο έλεγχος τοξικότητας των εκχυλισμάτων έγινε με βάση το πρωτόκολλο Basic Test 81.9% (Azur, 1997) το οποίο εφαρμόζεται σε υδατικά διαλύματα, με προηγούμενη αραιώση τέτοια ώστε η  $EC_{50}$  να μπορεί να υπολογιστεί χωρίς παρέκταση των δεδομένων. Στο πρωτόκολλο ρυθμίστηκε συντελεστής αραιώσης 2.0. Τα βακτήρια που ενεργοποιούνται κάθε φορά, χρησιμοποιούνται για μια με δύο ώρες μετά την ενεργοποίησή τους με ανάδευση προ της χρήσης κάθε φορά. Το pH ελέγχονταν κάθε φορά προ της δοκιμής ώστε να βρίσκεται εντός του 6-8.

Οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων γίνονταν εντός των κυψελίδων του αναλυτή και σε θερμοκρασία  $15 \pm 1^\circ C$ . Στα εκχυλίσματα δε χρειάστηκε να γίνει διόρθωση της τιμής της τοξικότητας με την απορρόφηση λόγω χρώματος στα 490 nm (Ashworth *et al.*, 2010) καθώς σε όλα οι απορροφήσεις στις συγκεντρώσεις που ελέχθησαν στον αναλυτή βρέθηκαν αμελητέες.

Οι τιμές προσδιορισμού της τοξικότητας λαμβάνονταν μετά από έκθεση 15 minutes και εκφράζονταν ως τιμές  $EC_{50}$ , δηλαδή συγκέντρωση στην οποία μειώνεται η φωταύγεια των βακτηρίων κατά 50%. Υπολογίσθηκε, επίσης, και η  $EC_{20}$  όπως περιγράφεται παρακάτω.

Η εκτίμηση τοξικότητας περιλαμβάνει ένα συντελεστή διόρθωση ( $R_t$ ) ο οποίος προκύπτει από το κλάσμα της φωταύγειας του δείγματος ελέγχου (control) μετά από παρέλευση χρόνου  $t$  ( $I_t$ ), με τη φωταύγεια του ίδιου δείγματος σε χρόνο 0 ( $I_0$ ):

$$R_t = I_t/I_0$$

Η % παρεμπόδιση της φωταύγειας υπολογίζεται ως

$$\% \text{ bioluminescence inhibition} = 100 \times (E_c - E_i)/E_c$$

όπου  $E_c$  είναι η φωταύγεια του δείγματος ελέγχου και  $E_i$  η φωταύγεια του δείγματος.

$$\text{To } \% \text{ Effect}_t = \{G_t / (1+G_t)\} \times 100$$

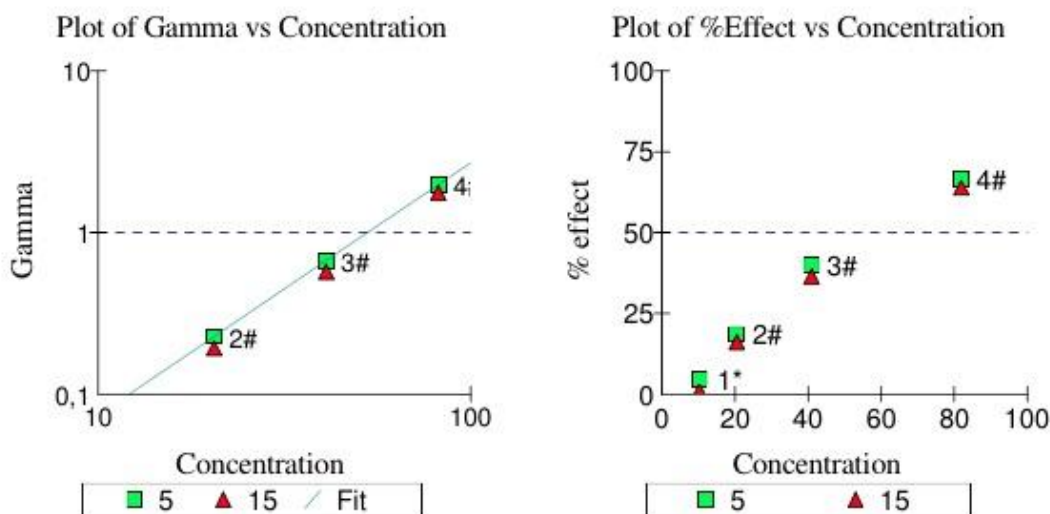
Το λογισμικό OMNI που συνοδεύει τον αναλυτή τοξικότητας Microtox παρέχει μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων τη γραμμική συσχέτιση της τιμής  $G$  με τη συγκέντρωση του δείγματος. Η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης μιας τοξικής ουσίας και η απόκρισή της σε κάποιο συγκεκριμένο οργανισμό όταν μετράται σε τιμές  $G$  μπορεί να αποδοθεί με την παρακάτω εξίσωση:

$$\log C = b \log G + \log a$$

Αυτή η εξίσωση περιγράφει μια ευθεία γραμμή με κλίση  $b$  και τομή στον άξονα των  $x$  στο  $\log a$ , όπου  $C$  είναι η συγκέντρωση του δείγματος και  $G$  η αντίστοιχη τιμή  $\Gamma$  που



περιγράφηκε πιο πάνω.



**Σχήμα 11. 1.2** Καμπύλες Τιμών G/Συγκέντρωση και %Επίδρασης/Συγκέντρωση

Η συγκέντρωση  $E_{20}$ , υπολογίσθηκε από την αντικατάσταση  $G=0.250$  στις εξισώσεις συσχέτισης της τιμής  $G$  με τη συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος, όπως αυτές παρέχονταν από το λογισμικό OMNI του αναλυτή.

Η τιμή  $EC_{20}$  κρίθηκε απαραίτητο να υπολογισθεί, καθώς με βάση τις οδηγίες του ISO 11348 (1998), ένα δείγμα θεωρείται τοξικό όταν εμφανίζει ένα αποτέλεσμα μείωσης φωταύγειας μεγαλύτερο από 20%, συνεπώς οι συγκεντρώσεις αυτές είναι οι μέγιστες στις οποίες μπορεί ένα δείγμα να θεωρηθεί μη τοξικό.

Στην περίπτωση των αφεψημάτων, χρησιμοποιήθηκε ως όγκος αναφοράς τα 200 mL ο οποίος είναι ο μέσος όγκος ενός φλιτζανιού, και ποσότητα ξηρής φυτικής μάζας ίση με 2 gr, η οποία είναι η συνήθης ποσότητα που τοποθετείται στα φακελάκια μιας χρήσεως αφεψημάτων του εμπορίου. Για την περίπτωση της χρήσης των συγκεκριμένων αρωματικών στη διατροφή, ως όγκος αναφοράς για την περίπτωση της ρίγανης χρησιμοποιήθηκαν τα 500 mL και η εκχύλιση (b) στην περίπτωση της σαλάτας, και όγκος 5L και η εκχύλιση (a) για την περίπτωση της ρίγανης αλλά και του φασκόμηλου όταν αυτά προστίθενται στο φαγητό κατά τη διαδικασία μαγειρέματος.

Για όλες τις βιοδοκιμές έγιναν τρεις επαναλήψεις, και οι τιμές που υπολογίσθηκαν ήταν ο μέσος όρος των τιμών από τις τρεις επαναλήψεις.

### II.1.2.5 Εκτίμηση Συνέργειας

Κατά την παραλαβή των εκχυλισμάτων με τις διαδικασίες (a), (b) και (c) μια μικροποσότητα από το αιθέριο έλαιο του εκάστοτε φυτικού είδους εισέρχεται στο εκχύλισμα. Οι πτητικές- μη υδατοδιαλυτές ουσίες των αιθερίων ελαίων στο εκχύλισμα μπορεί να αλληλεπιδρούν με τις υδατοδιαλυτές ενώσεις και να επηρεάζουν την αντιοξειδωτική δράση και την τοξικότητα των δειγμάτων. Προκειμένου να αξιολογηθεί περεταίρω αυτή η πιθανή αλληλεπίδραση, όλα τα εκχυλίσματα (a), (b) και (c) υπέστησαν επιπλέον εκχύλιση με οργανικό μη πολικό διαλύτη (πετρελαϊκό αιθέρα) για να απομακρυνθούν τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου που ενδεχομένως είχαν εισέλθει στο εκχύλισμα και επαναλήφθηκαν εις τριπλούν όλες οι αναλύσεις στο υδατικό κλάσμα της εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα. Οι αναλύσεις αυτές επιτρέπουν τον υπολογισμό του δείκτη συνέργειας SR (Synergism Ratio) μεταξύ υδατοδιαλυτών και πτητικών-μη υδατοδιαλυτών συστατικών του εκάστοτε εκχυλίσματος.

Ο δείκτης SR υπολογίστηκε όπως προτάθηκε από τους Hewlett & Placket (1969) κι έκτοτε χρησιμοποιήθηκε σε αρκετές παρόμοιες περιπτώσεις (Anderson and Zhu, 2004; Otitilou, 2002), με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$SR_{\text{toxicity}} = EC_{50\text{-pte}} / EC_{50\text{ infusion}}, \text{ όπου:}$$

$EC_{50\text{-pte}}$  είναι η τιμή της  $EC_{50}$  του υδατικού κλάσματος μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα, και  $EC_{50\text{ infusion}}$  η αρχική  $EC_{50}$  πριν την προαναφερόμενη εκχύλιση με τον οργανικό διαλύτη.

Εφεξής η ένδειξη (-pte) (**petroleum ether**)θα υποδεικνύει το υδατικό κλάσμα εκάστοτε εκχυλίσματος μετά την περεταίρω εκχύλισή του με πετρελαϊκό αιθέρα.

### II.1.2.6 Στατιστική Επεξεργασία

Όλα τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί ως  $M.O. \pm S.D.$  Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η one-way-analysis of variance (ANOVA) ακολουθούμενη από τη δοκιμή Tukey. Διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές σε επίπεδο  $p < 0.05$ . Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το λογισμικό SPSS version 14.0.

### II.1.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Οι τιμές τοξικότητας εκφραζόμενες σε συγκεντρώσεις  $EC_{50}$ (mg/mL) παρουσιάζονται στον **πίνακα II.1.1**. Οι τιμές των εκχυλισμάτων με εκχύλιση τύπου (a) κυμαίνονται από 8.61 – 119.75 mg/mL, για εκχύλιση τύπου (b) από 40.96 – 200.61 mg/mL και για εκχύλιση τύπου (c) από 22.09 – 137.19 mg/mL. Οι αντίστοιχες τιμές για τα εκχυλίσματα που υπέστηκαν περεταίρω εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα κυμαίνονται από 36.38 – 210.68 mg/mL για τα a-pte, 52.32- 216.30 mg/mL για τα b-pte και 77.69-224.87 mg/mL για τα c-pte.

Τα εκχυλίσματα της ρίγανης έδωσαν τις χαμηλότερες τιμές  $EC_{50}$  για όλες τις μεταχειρίσεις (a), (a-pte), (b), (b-pte), (c) και (c-pte). Τα είδη που έδωσαν αντίστοιχα τις χαμηλότερες τιμές  $EC_{50}$  συγκριτικά ήταν το μελισσόχορτο και το φασκόμηλο (**Πίνακας II.1.2**).

Οι εξισώσεις συσχέτισης των τιμών Gamma με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν, επέτρεψαν το υπολογισμό των συγκεντρώσεων  $EC_{20}$  αντικαθιστώντας σε αυτές 0.25 για την τιμή Gamma. Έτσι προέκυψε η συγκέντρωση η πάνω από την οποία ένα εκχύλισμα μπορεί να θεωρηθεί τοξικό. Βασιζόμενοι στις τιμές της  $EC_{20}$  που υπολογίσθηκαν για συγκεκριμένους όγκους αναφοράς ανάλογα τη χρήση τους στη διατροφή (**πίνακας II.1.3**) και βρέθηκε ότι για την περίπτωση των αφεψημάτων, όλα εκτός της ρίγανης (0.66 gr) και του δίκταμου (0.81 gr) έδωσαν τιμές μεγαλύτερες από τα 2gr που περιέχονται στα φακελάκια με αφεψήματα που πωλούνται στο εμπόριο. Σε σχέση με τη χρήση τους στη διατροφή η ποσότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς να θεωρείται τοξική βρέθηκε για τη μεν ρίγανη στα 6.48gr όταν χρησιμοποιείται σε σαλάτες και 16.5gr όταν χρησιμοποιείται στην παρασκευή φαγητού κι εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία. Για το φασκόμηλο, η αντίστοιχη ποσότητα μέχρι την οποία δε μπορεί να θεωρηθεί τοξική η χρήση του βρέθηκε στα 94.75 gr, για την περίπτωση που αυτό προστίθεται κατά τη διαδικασία του μαγειρέματος. Σε κάθε περίπτωση, μπορεί οι υπολογιζόμενες τιμές να είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από αυτές που χρησιμοποιούνται συνήθως, θέτουν όμως ένα όριο στη χρήση αυτών, και καταρρίπτουν το μύθο ότι εφόσον θεωρούνται ωφέλιμα για την υγεία μπορούν να καταναλώνονται άφοβα κατά βούληση και χωρίς μέτρο.

Πίνακας II.1.2 Τοξικότητα των εκχυλισμάτων για όλα τα φυτικά είδη και όλες τις διαδικασίες εκχύλισης

Φυτικό είδος	Είδος εκχύλισης	Τοξικότητα
		EC <sub>50</sub> (mg/mL) Μετά από 15 min χρόνο επώασης
Μελισσόχορτο	(a)*	119.8±14.5a
<i>Melissa officinalis</i>	(a-pte)**	210.7±6.9b
	(b)	200.6±28.8b
	(b-pte)	216.3±30.3b
	(c)	113.1±7.9a
	(c-pte)	126.9±31.1a
Ύσσωπος	(a)	38.3±3.8a
<i>Hyssopus officinalis</i>	(a-pte)	139.6±23.0c
	(b)	150.7±7.0c
	(b-pte)	162.8±1.5c
	(c)	96.1±14.8b
	(c-pte)	101.5±25.8b
Ρίγανη	(a)	8.6±1.9a
<i>Origanum vulgare</i>	(a-pte)	36.4±7.5b
	(b)	41.0±7.9b
	(b-pte)	52.3±5.8c
	(c)	22.1±2.8a
	(c-pte)	77.7±23.9d
Δίκταμο	(a)	10.6±0.3a
<i>Origanum dictamnus</i>	(a-pte)	42.9±7.3b
	(b)	60.5±11.4b
	(b-pte)	110.7±5.4c
	(c)	62.2±7.5b
	(c-pte)	96.9±8.3c
Φασκόμηλο	(a)	52.2±3.9a
<i>Salvia officinalis</i>	(a-pte)	107.8±25.7b
	(b)	199.5±21.4c
	(b-pte)	198.8±19.1c
	(c)	137.2±2.7b
	(c-pte)	224.9±5.3c

\*(a) εκχύλιση σε θερμοκρασία 85 °C, (b) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (c) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη βοήθεια υπερήχων

**\*\***Η ένδειξη *-pte* αναφέρεται στο υδατικό κλάσμα μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα

**\*\*\***διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) ανάμεσα στις μεταχειρίσεις του ίδιου φυτικού δείγματος.

**Πίνακας II.1.3** Συγκεντρώσεις  $EC_{20}$  που προκαλούν 20% μείωση της φωταύγειας, μέγιστη ποσότητα φυτικής μάζας για συγκεκριμένους όγκους αναφοράς.

Φυτικό είδος	Είδος εκχύλισης	$EC_{20}$ mg/mL	Φυτική μάζα που προκαλεί 20% παρεμπόδιση της φωταύγειας (g)	Όγκος αναφοράς mL	Χρήση στη διατροφή
Μελισσόχορτο	(a)*	48.00	9.60	200	Αφέψημα
	(b)	92.33	18.47	200	---
Ύσσωπος	(a)	11.90	2.38	200	Αφέψημα
	(b)	65.10	13.02	200	-----
Ρίγανη	(a)	3.29	<b>0.66</b>	200	Αφέψημα
			16.5	5000	Χρήση στο μαγείρεμα
	(b)	12.95	6.48	500	Σε σαλάτες
Δίκταμο	(a)	4.04	<b>0.81</b>	200	Αφέψημα
	(b)	21.03	4.21	200	----
Φασκόμηλο	(a)	18.95	3.79	200	Αφέψημα
			94.75	5000	Χρήση στο μαγείρεμα
	(b)	83.79	16.76	200	----

\* (a) εκχύλιση στους  $85^{\circ}C$ , (b) εκχύλιση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Με βάση τις τιμές του δείκτη συνέργειας που υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται στον **πίνακα II.1.4**, η μέγιστη συνέργεια μεταξύ πτητικών και υδατοδιαλυτών συστατικών στα εκχυλίσματα βρέθηκε για την εκχύλιση τύπου (a) στη ρίγανη, το δίκταμο και τον ύσσωπο, με τιμές 4.2, 4.1 και 3.6 αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ισχυρή συμμετοχή των πτητικών συστατικών που συμπαρασύρονται στο εκχύλισμα κατά τη διαδικασία εκχύλισης με ζεστό νερό στην τιμή της τοξικότητας. Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται, επίσης, κι από το γεγονός ότι μεταξύ των εκχυλίσεων για όλα τα φυτικά είδη, οι μεγαλύτερες τιμές συνέργειας βρέθηκαν για είδος εκχύλισης (a), ακολουθούμενο από το (c) και τέλος το (b). Το

προαναφερόμενο τονίζει το ρόλο της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση στην τοξικότητα των δειγμάτων καθώς εισέρχεται μεγαλύτερη ποσότητα πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου στα εκχυλίσματα όταν χρησιμοποιείται ζεστό νερό.

**Πίνακας II.1.4** Δείκτης συνέργειας στην Τοξικότητα  $SR_{\text{toxicity}}$

Φυτικό δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης*	Δείκτης SR toxicity	Επίδραση**
Μελισσόχορτο	(a)	1.8	Συνέργεια
	(b)	1.1	Συνέργεια
	(c)	1.1	Συνέργεια
Ύσσωπος	(a)	<b>3.6</b>	Συνέργεια
	(b)	1.1	Συνέργεια
	(c)	1.1	Συνέργεια
Ρίγανη	(a)	<b>4.2</b>	Συνέργεια
	(b)	1.3	Συνέργεια
	(c)	3.5	Συνέργεια
Δίκταμο	(a)	<b>4.1</b>	Συνέργεια
	(b)	1.8	Συνέργεια
	(c)	1.5	Συνέργεια
Φασκόμηλο	(a)	2.1	Συνέργεια
	(b)	1.0	Προσθετική
	(c)	1.6	Συνέργεια

*\*(a) εκχύλιση στους 85 °C, (b) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και (c) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη βοήθεια υπερήχων*

*\*\*Τιμές  $SR_{\text{toxicity}} < 1$  δείχνουν ανταγωνισμό,  $SR_{\text{toxicity}} > 1$  δείχνουν συνέργεια και  $SR = 1$  προσθετική δράση.*

Έχουν προηγηθεί μελέτες στις οποίες κατά την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από φυτικά προϊόντα, έχουν χρησιμοποιηθεί υπέρηχοι κατά τη διαδικασία εκχύλισης (Caniova and Brandsterova, 2001; Paniwnyk *et al.*, 2001; Proestos and Komaitis, 2006; Vinatoru, 2001). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης υπερήχων έναντι των άλλων μεθόδων, είναι ότι στην ίδια θερμοκρασία η μεταφορά μάζας βιοδραστικών ουσιών μεταξύ φυτικής μάζας και διαλύτη καθώς και η διεύδυση του διαλύτη στους φυτικούς ιστούς είναι εντονότερες. Οι υπέρηχοι έχουν την ικανότητα να διασπούν τα φυτικά κύτταρα και να απελευθερώνουν τα

κυτταρικά συστατικά στο μέσο εκχύλισης. Όμως, θα πρέπει να δίδεται προσοχή στο είδος εφαρμογής των υπερήχων κατά την εκχύλιση, καθώς έχει βρεθεί πως όταν χρησιμοποιείται ακίδα υπερήχων κι όχι λουτρό υπερήχων, διασπώνται τα βιοδραστικά μόρια μέσω του σχηματισμού ελευθέρων ριζών κατά τη διαδικασία εκχύλισης (Paniwnyk *et al.* 2001).

Τα είδη της οικογένειας *Lamiaceae* που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μεσογειακή διατροφή ως αφεψήματα ή ως αρωματικά στα φαγητά, αλλά και από τη βιομηχανία τροφίμων η οποία επίσης τείνει να χρησιμοποιεί ολοένα και πιο προχωρημένες διαδικασίες εκχύλισης όπως αυτή της χρήσης υπερήχων (Vilkhu *et al.*, 2008). Η ανάλυση της τοξικότητας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, έδωσε άμεση εκτίμηση της τοξικότητάς του, προσδιόρισε τις μέγιστες συγκεντρώσεις ανά είδος εκχύλισης, πάνω από τις οποίες κάποιο είδος μπορεί να θεωρηθεί τοξικό κι έδωσε απάντηση στο κατά πόσο υφίσταται συνέργεια στην τοξικότητα μεταξύ των υδατοδιαλυτών συστατικών και των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου για κάθε φυτικό είδος και διαδικασία εκχύλισης.

Οι τιμές τοξικότητας δε βρέθηκε να συσχετίζονται με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών αλλά και την αντιοξειδωτική ικανότητα των ίδιων εκχυλισμάτων, όπως αυτά εκτιμήθηκαν από την Αναστασάκη (2014). Το χαρακτηριστικό φαινολικό συστατικό στα εκχυλίσματα των ειδών της οικογένειας *Lamiaceae*, είναι το ροσμαρινικό οξύ (Lamaison *et al.*, 1991). Το ροσμαρινικό οξύ για τα φυτικά είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία υπολογιζόμενο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC, βρέθηκε να κυμαίνεται από 86 mg/g στο μελισσόχορτο, 60.0 mg/g στη ρίγανη, 39.5 mg/g στο φασκόμηλο και 12 mg/g στον ύσσωπο (Saltas *et al.*, 2013). Η τοξικότητα των εκχυλισμάτων δε θα μπορούσε να αποδοθεί στο ροσμαρινικό οξύ, με βάση τις τιμές από τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκαν, καθώς το μελισσόχορτο που έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από όλα τα φυτά που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκε να είναι το λιγότερο τοξικό στα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα τύπου –pte από όλα τα υπόλοιπα είδη. Η τοξικότητα των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων θα μπορούσε να αποδοθεί σε άλλα φαινολικά συστατικά που απαντώνται στα φυτικά είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και είναι κοινά για τη ρίγανη και το δίκταμο, όπως το π-κουμαρικό, το φερουλικό, το καφεϊκό, και το βανιλικό οξύ (Chun *et al.*, 2005; Kouri *et al.*, 2007; Proestos *et al.*, 2005) ή σε κάποια φλαβονοειδή όπως η απιγενίνη, η καμφερόλη, η κουρκετίνη, η εριοδικτυόλη, η ταξιφολίνη και η ναρινγενίνη (Chatzopoulou *et al.*, 2010). Καθώς δε βρέθηκε συσχέτιση της τοξικότητας με το ροσμαρινικό οξύ στα φυτά που μελετήθηκαν, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού

και της τοξικότητας των άλλων επιμέρους συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Η υπολογισθείσα φυτική μάζα για συγκεκριμένο όγκο αναφοράς, οποία προκαλεί 20% μείωση της φωταύγειας στο φωτοβακτήριο *V. Fischeri* (Πίνακας II.1.4), στην περίπτωση των αφεψημάτων του μελισσόχορτου βρέθηκε πενταπλάσια της ποσότητας των 2 gr που συνήθως περιέχεται στα φακελάκια που κυκλοφορούν στο εμπόριο, αποδεικνύοντας ότι η τοξικότητά του είναι σχεδόν αμελητέα. Αντίστοιχα, το ίδιο μπορεί να θεωρηθεί για το φασκόμηλο και τον ύσσωπο με βάση τον ίδιο πίνακα. Οι αντίστοιχες ποσότητες φυτικής μάζας στην περίπτωση των αφεψημάτων ρίγανης και δίκταμου υπολογίσθηκαν σε 0.66 και 0.81 gr αντίστοιχα, ποσότητες μικρότερες από τις συνήθεις που κυκλοφορούν στο εμπόριο, γεγονός που υποδεικνύει ότι απαιτείται προσεκτική κατανάλωση μέχρι να διεξαχθούν μελέτες που θα δώσουν συμπεράσματα για τα ασφαλή ημερήσια όρια κατανάλωσής τους. Οι αντίστοιχες ποσότητες που υπολογίσθηκαν για τη χρήση της ρίγανης και του φασκόμηλου στη μαγειρική είναι τόσο πολύ μεγαλύτερες αυτών που χρησιμοποιούνται στην πράξη γεγονός που δεν εγείρει καμία ανησυχία για την ασφαλή χρήση τους.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε η διαφορά στην τοξικότητα μεταξύ των αρχικών (a), (b), (c) και των αντίστοιχων (-pte) εκχυλισμάτων υποδεικνύει ότι κατά την παραλαβή υδατικών εκχυλισμάτων με διάφορες τεχνικές εκχύλισης των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, μια μικρή ποσότητα πτητικών-μη υδατοδιαλυτών συστατικών του αιθερίου ελαίου εισέρχεται στην υδατική φάση και αυτή είτε προωθεί είτε μερικώς παρεμποδίζει τη βιολογική δράση των υδατοδιαλυτών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Στην περίπτωση του ύσσωπου, η δράση αυτή μπορεί να αποδοθεί στα κύρια συστατικά που περιέχονται στο αιθέριο έλαιό του και είναι η πινοκαμφόνη (49.1%) το β-πιπένιο (18.4%) και η ισοπινοκαμφόνη (9.7%) (Shah et al., 1986) καθώς τα ίδια συστατικά έχουν δώσει σημαντικά αποτελέσματα στον έλεγχο αντιμικροβιακής δράσης τους *in-vitro* (Fathiazad and Hamedeyazdan, 2011). Η αντίστοιχη συνεργιστική τάση στην περίπτωση της ρίγανης και του δίκταμου μπορεί να αποδοθεί στην καρβακρόλη, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο (Daferera et al., 2000; 2002; 2003; Liolios et al. 2010) τα οποία, επίσης, έχουν δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.

Μέχρι σήμερα, η βιομηχανία τροφίμων έχει αξιοποιήσει τη συνεργιστική ή προσθετική δράση των αιθερίων ελαίων και των επιμέρους συστατικών τους (Bassole & Juliani, 2012). Τα ίδια δεδομένα που αφορούν στα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια έχουν αξιοποιηθεί από τη φαρμακοβιομηχανία στην περίπτωση φυτικών σκευασμάτων ή συνθετικών φαρμάκων (Ghavami et al., 2011; Silva et al., 2011). Για τους παραπάνω λόγους ο



---

προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης στη βιολογική δράση μεταξύ αμιγώς υδατοδιαλυτών συστατικών με συστατικά του αιθερίου ελαίου που περιέχονται στα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών παρέχουν σημαντική πληροφορία για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων όπου η ασφάλεια και η διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή είναι πρώτιστης σημασίας.

#### II.1.4 Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη κατέληξε ότι οι διαδικασίες εκχύλισης επηρεάζουν σημαντικά την τοξικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* στα οποία εξετάστηκαν. Επίσης, βρέθηκε σημαντική συνέργεια στην τοξικότητα μεταξύ των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου και των υδατοδιαλυτών συστατικών σε όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν. Καταλήγοντας είναι σημαντικό να εξελιχθεί και να προχωρήσει σε βάθος ο προσδιορισμός της τοξικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων προκειμένου η χρήση τους ως πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών να τεθεί εντός ασφαλών ορίων για την ανθρώπινη υγεία.

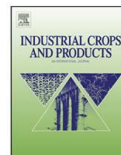
## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ /ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ





Contents lists available at ScienceDirect

## Industrial Crops and Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants



Efstathia Skotti, Eirini Anastasaki, Georgia Kanellou, Moschos Polissiou, Petros A. Tarantilis\*

Laboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 September 2013

Received in revised form 3 December 2013

Accepted 5 December 2013

## Keywords:

Toxicity

Lamiaceae

Synergism

Total phenolic content

Antioxidant activity

## ABSTRACT

In this study, the total phenolic content, the antioxidant activity and toxicity of selected Greek medicinal aromatic namely *Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum dictamnus* L., *Salvia officinalis* L. and *Hyssopus officinalis* L., were investigated under three different extraction processes. Among the plants studied, *Melissa officinalis* L. showed the highest values in total phenolic content ( $0.985 \pm 0.001$  mg caffeic acid/mL) and antioxidant activity ( $6.61 \pm 0.04$  μmol Trolox/mL) independently of the extraction process. Toxicity evaluation of the infusions prepared in concentrations contained in commercial portions showed that inhibition values of *Origanum vulgare* L. and *Origanum dictamnus* L. were greater than 20% thus further research is necessary. Although toxicity of plant extracts examined is not correlated to their total phenolic content and antioxidant activity, it was linked to the interaction of water soluble and volatile organic compounds. Interaction of water soluble and volatile organic compounds was evaluated through the estimation of synergism ratios (SR), where *Origanum vulgare* L., presented the maximum synergism (SR=4.2) in toxicity.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The importance of dietary antioxidant components for the prevention of some diseases and health quality improvement has attracted much research attention through the last decade (Alvarado et al., 2006; Blasa et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2008; Turkmen et al., 2005; Wootton-Beard and Ryan, 2011). Vegetables and herbal infusions have been recognized as important sources of antioxidants (Alarcón et al., 2008; Almajano et al., 2008; Chan et al., 2010). Total phenolic content, antioxidant activity and antimicrobial activity of herbal extracts are of particular interest to food industry which is looking for plant extracts with significant antimicrobial activity to be used as alternatives to conventional food preservatives (Almajano et al., 2008; Madsen and Bertelsen, 1995; Thorsen and Hildebrandt, 2003).

Plant extracts obtained by different solvents and several extraction techniques are mixtures of numerous compounds. Their possible biological activity as mixtures is being investigated through various screening models such as plant (Bouchagier et al., 2008; Bouchagier and Efstathiadis, 2010), bioassays (Daferera et al., 2003), tissue or cell culture (Wang et al., 2011), receptor enzyme

(Peelman et al., 2006) and biochromatography (He et al., 2008; Kotecha et al., 2007; Kvalheim et al., 2011).

Aqueous herbal extracts have attracted attention since they can be consumed in a daily basis as decoctions. Many Lamiaceae extracts are extensively used in traditional diet and popular medicine (Barros et al., 2011; Carrió and Vallès, 2012; Degner et al., 2009; Liolios et al., 2010; Nedorostova et al., 2009; Noorbala et al., 2005). Their therapeutic actions are assigned to biologically active polyphenol components, such as flavonoids and phenolic acids, which possess antioxidant activities (Pietta, 2000; Surveswaran et al., 2007; Zheng and Wang, 2001). However, attention should be given in case of high doses (Tajkarimi et al., 2010), since their toxicity has not yet been fully elucidated. Conforti et al. (2008) introduced Microtox<sup>®</sup> test as an evaluation tool for toxicity estimation of dietary plants extracts.

Microtox<sup>®</sup> analyzer uses the marine bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a reference test species and provides a sensitive, rapid, cost effective and reproducible method for the estimation of toxicity of single compounds and mixtures of organic and inorganic compounds (Backhaus et al., 2000; Fulladosa et al., 2005; Hernando et al., 2007; Park and Que Hee, 2001), biomaterials (Bulich et al., 1990; Burton et al., 1986), without raising any ethical considerations (Conforti et al., 2008; Cotou et al., 2002; Parvez et al., 2006; Shettlemore and Bundy, 2002; Zhao et al., 1998). Conforti et al. (2008) were the first to propose its use to determine toxicity of herbal infusions and decoctions and evaluate interaction between

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 529 4262; fax: +30 210 529 4265.  
E-mail address: [ptara@aua.gr](mailto:ptara@aua.gr) (P.A. Tarantilis).

water soluble and volatile compounds extracted by a non-polar organic solvent.

Recently, there is, also, an increasing interest in the evaluation of potential synergism or antagonism in antimicrobial activity (Al-Bayati, 2008; Endo et al., 2010; Hemaiswarya and Doble, 2009; Moon et al., 2011; Ncube et al., 2012) and antioxidant activity (Romano et al., 2009) of single compounds or mixtures. Bioluminescence inhibition test using *Vibrio* sp. has been used by Zhang et al. (2011) for the evaluation of toxicity antagonism or synergism in mixtures.

In the present work, aqueous extracts of medicinal and aromatic plants of Lamiaceae family, namely *Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum dictamnus* L., *Salvia officinalis* L. and *Hyssopus officinalis* L., were screened in reference to their total phenolic content, antioxidant activity and toxicity, as they are representative species of the Mediterranean flora. The aim of this study is to investigate a possible correlation between total phenolic content, antioxidant activity and toxicity and the interaction of water soluble and volatile organic compounds of the plant species extracts examined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Air dried samples (harvest 2010) of the Lamiaceae family were offered by Aetoloakarnania's Rural Cooperative of Aromatic, Pharmaceutical and Energy Plant Cultivators (Agrotikos Syneterismos Kalliergiton Aromatikion, Farmakeftikon, Energiakion Fyton Aetoloakarnanias, ASKAPEFA), Greece. These samples were, namely, lemon balm (*Melissa officinalis* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.; chemotype carvacrol), and hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Dittany (*Origanum dictamnus* L.; chemotype carvacrol) was supplied from the local market in Crete, Greece. Only the leaves were used, except oregano and hyssop, for which leaves and flowers were used together. Dry plant material was stored at –20 °C until used.

### 2.2. Materials

2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Folin-Ciocalteu phenol reagent, potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ ), sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ ), absolute ethanol and petroleum ether 40–60° were supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and caffeic acid were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany).

Toxicity tests were performed using the Microtox® Toxicity analyzer model 500, equipped with 30 temperature controlled wells regulated at 15 °C in addition with a reactivation well regulated at 5 °C used to store the bacteria suspension before dilution. Acute toxicity reagents such as Diluent (sterile 2% sodium chloride), OAS (osmotic adjusting solution 22% sodium chloride), reconstitution solution and test organisms *V. fischeri*, formerly known as *Photobacterium phosphoreum*, NRRL No B-11177 were supplied by Strategic Diagnostic INC.

### 2.3. Preparation of extracts

For total phenolic content and antioxidant activity assessment tests, the extracts were prepared by adding 2 g of individual freshly crushed herb ( $n = 5$ ) in 200 mL (1 cup) deionized water and steeped under three different processes. (a) at 85 °C, (b) at room temperature and, (c) at room temperature with the assistance of ultrasound water bath (35 MHz). Each treatment lasted for 15 min. The herbal

infusions were then filtered through a Whatman filter No. 1. Prior to analysis, an aliquot was further filtrated with a PTFE filter with 0.45 µm pore size.

For toxicity determination, infusions were prepared as above and were then filtrated through a nylon 0.2 µm membrane filter, in order to remove any suspended material that may interfere with luminescence readings (Parvez et al., 2006).

Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity determination was performed for all plant species. All the infusions described above were then extracted three times with petroleum ether in order to further analyze the aqueous phase derived from this extraction. Three individual preparations for each extract were prepared.

### 2.4. Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined in herbal infusions prior and after extraction with petroleum ether using Folin-Ciocalteu assay (Singleton et al., 1999), with some modifications. Thus 100 µL of each tested infusion, 500 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 6 mL of deionized water were transferred in a 10 mL flask and mixed thoroughly. After 3 min, 1.5 mL of 20%  $Na_2CO_3$  was added in the flask which was filled to 10 mL with water. After two hours standing, absorbance was measured at 725 nm. Caffeic acid was used as a standard (0–500 mg/L) and the results were expressed as mg caffeic acid per mL. All measurements were performed in triplicate.

### 2.5. Determination of antioxidant activity

Herbal infusions were examined for antioxidant activity prior and after extraction with petroleum ether applying both the ABTS assay 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Ree et al., 1999) and the DPPH assay 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (Surveswaran et al., 2007) with some modifications.

The ABTS radical cation ( $ABTS^{*\bullet}$ ) solution was prepared by the reaction of 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate, after incubation at room temperature in the dark for 12–16 h. The ( $ABTS^{*\bullet}$ ) solution was then diluted with ethanol to obtain an absorbance of  $0.700 \pm 0.020$  at 734 nm. After the addition of 3.0 mL of diluted ( $ABTS^{*\bullet}$ ) solution ( $A_{734nm} = 0.700 \pm 0.020$ ) to 30 µL of extracts, the absorbance reading was acquired at 30 °C exactly  $t = 6$  min after initial mixing ( $A_{sample}$ ). Absorbance of control (3.0 mL ( $ABTS^{*\bullet}$ ) solution with 30 µL water) was recorded in advance ( $A_{control}$ ). The percentage of absorbance inhibition at 734 nm was calculated using the formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right] \times 100$$

where  $A_{control}$  and  $A_{sample}$  are the absorbance values of the control and the test sample at  $t = 6$  min, respectively.

A standard curve was obtained by using Trolox standard solution at various concentrations (ranging from 0 to 15 µM final concentration) in ethanol. The inhibition percentage of the test samples was compared to that of the Trolox standard and the results were expressed in terms of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), as mmol Trolox equivalents per mL. All determinations were carried out three times.

The DPPH radical (DPPH $\bullet$ ) solution (60 µM) was prepared in ethanol. The DPPH $\bullet$  solution had an absorbance of  $0.680 \pm 0.050$  at 515 nm. A volume of 3.0 mL of the DPPH $\bullet$  solution was mixed with 30 µL of the tested extracts. The resulting solution was vigorously mixed, incubated at room temperature in the dark for 30 min and the absorbance was recorded at 515 nm. The percentage of absorbance inhibition at 515 nm was calculated as above.

A Trolox standard curve was obtained as above. The results were also expressed as TEAC units ( $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents per mL). All determinations were carried out three times.

### 2.6. Toxicity test

Toxicity assessment of the plant extracts was performed according to a protocol known as Basic Test 81.9% (AZUR, 1997) applied for aqueous samples, but with appropriate primary dilution of samples in order that the  $EC_{50}$  (Effective Concentration where bioluminescence inhibition is 50%) could be obtained without extrapolation of data. A dilution factor 2.0 was used. Activated bacteria were used within 1–2 h after reconstitution, stirred sufficiently before each test. Test performance and sensitivity were monitored with a phenol standard solution. pH was tested in all the samples to ensure that values were in the range of 6–8.

Dilutions and assays were performed in incubator wells at  $15 \pm 0.5$  °C. Color correction, by measuring testing sample and dilutions absorbance at 490 nm (Ashworth et al., 2010) was not applied while the absorbance values of all samples tested was negligible.

Toxicity estimations were obtained after 15 min exposure and expressed as  $EC_{50}$  value, at which 50% loss of luminescence is obtained.  $EC_{20}$  values (sample concentration that gives 20% luminescence inhibition) were also calculated, as described below.

Effect estimation includes the correction factor ( $R_t$ ) which is the fraction obtained when the light output of the Control (Blank) remaining after time  $t$  ( $I_t$ ) is divided by the initial light output of the untreated Control (Blank) ( $I_0$ ):

$$R_t = \frac{I_t}{I_0}$$

$$\% \text{ Bioluminescence inhibition} = 100 \times \frac{E_c - E_i}{E_c}$$

where  $E_c$  is the light emission of control and  $E_i$  is the light emission of sample.

$$\% \text{ Effect}_t = \left[ \frac{G_t}{1 + G_t} \right] \times 100$$

where ( $G$ ) value is the ratio of the light lost at time ( $t$ ) for a given time  $t$  to the light remaining at time ( $t$ ) for a given sample concentration.

Additionally, OMNI software provided the linear correlation of Gamma ( $G$ ) values with sample concentration. The relationship between the concentration of a toxic material and the response of a susceptible organism, when the response is measured in terms of Gamma ( $G$ ) values, can be described by a linear equation for the prediction of concentration from Gamma values:

$$\log C = b \log G + \log a$$

This equation describes a line with a slope of  $b$  and an intercept of  $\log a$ , in which  $C$  represents concentration and  $G$  the corresponding Gamma value.  $EC_{20}$  concentrations were calculated by placing  $G=0.250$  (effect 20%) in correlation equations. As, according to the ISO 11348 (1998) guidelines, a toxic sample shows an effect higher than 20%, the above values are the maximum concentrations for which a sample can be considered as non-toxic. In case of infusions a reference volume of 200 mL was assumed, which is the average cup volume, and calculated the corresponding dry plant mass and compared to the commercial decoction portions that are available in markets which contain usually 2 g of dry plant mass. Referring to their use in nutrition, the corresponding dry plant masses for oregano, which is used as raw herb in salads it was calculated assuming a reference volume of 500 mL on treatment (b). In order to approach the use of herbs in cooking processes, the reference volume was assumed to be (5 L) and evaluated on treatment (a) for oregano and sage, respectively.

All the assays were performed in triplicate. Final values were calculated as an average of the values from triplicate assay.

### 2.7. Synergism evaluation

During the extraction procedure, a small quantity of essential oil compounds is extracted into the infusion. The volatile organic compounds of the essential oil in the extracts may interact with water-soluble compounds and influence the total phenolic content, the antioxidant activity and the toxicity of samples. In order to evaluate this possible interaction, extracts prepared of all the three different treatments were further extracted with petroleum ether in order to remove the volatile organic compounds and all the assays were repeated then in triplicate. Evaluation of total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of samples before and after the extraction with petroleum ether allowed the calculation of synergism ratios (SR) between water soluble and volatile organic compounds of the initial extract.

The synergism ratios (SR) were calculated as proposed by Hewlett and Plackett (1969) and used in several cases of possible synergism evaluation (Anderson and Zhu, 2004; Ottiloju, 2002), as follows:

$$SR_{\text{toxicity}} = \frac{EC_{50\text{-pte}}}{EC_{50\text{infusion}}}$$

where  $EC_{50\text{-pte}}$  is the  $EC_{50}$  of the aqueous phase after the extraction with petroleum ether, and  $EC_{50\text{infusion}}$  is the initial  $EC_{50}$  of each infusion.

$$SR_{\text{total phenolics}} = \frac{\text{Total phenolic value}_{\text{-pte}}}{\text{Total phenolic value}_{\text{infusion}}}$$

$$SR_{\text{DPPH}} = \frac{\text{DPPH value}_{\text{-pte}}}{\text{DPPH}_{\text{infusion}}}$$

$$SR_{\text{ABTS}} = \frac{\text{ABTS value}_{\text{-pte}}}{\text{ABTS value}_{\text{infusion}}}$$

where '-pte' referred to the aqueous phase after the extraction with petroleum ether.

### 2.8. Statistical analysis

Data were expressed as means  $\pm$  S.D. For statistical analysis, one-way-analysis of variance (ANOVA) was applied followed by Tukey's test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Pearson's correlation was used to determine the correlation of antioxidant activity and toxicity versus total phenolic content. All statistical analyses were performed with SPSS version 14.0 statistical package.

The inhibitory concentration 50% was calculated using the OMNI software accompanying the Mictotox<sup>®</sup> analyzer by a dose-response curve obtained by plotting the percentage of inhibition versus the concentrations.

## 3. Results

### 3.1. Total phenolic content

Total phenolic content was estimated in both infusions and the aquatic phase derived from the extraction with petroleum ether, expressed in mg of caffeic acid/mL. Estimated values of total phenolic content varied from 0.052 to 0.985 mg of caffeic acid/mL (Table 1). Total phenolic content of infusions determined in mg of caffeic acid/mL ranged between 0.197–0.985 for process (a), 0.054–0.679 for process (b) and 0.066–0.800 for process (c). The respective values for the aqueous phase from the extraction

**Table 1**  
Total phenolic content, antioxidant activity estimated by DPPH\*, ABTS\*\* method, and Toxicity of the examined herbs and extraction processes.

Sample	Treatment	Total phenolic content (mg caffeic acid/mL)	Antioxidant activity DPPH* (μmol Trolox/mL)	Antioxidant activity ABTS** (μmol Trolox/mL)	Toxicity as EC <sub>50</sub> (mg/mL) after 15 min incubation time
Lemon balm	(a) <sup>a</sup>	0.985 ± 0.001f <sup>***</sup>	6.34 ± 0.05e	6.61 ± 0.04e	119.8 ± 14.5a
	(a-pte) <sup>b</sup>	0.930 ± 0.017e	6.20 ± 0.03e	6.59 ± 0.05e	210.7 ± 6.9b
	(b)	0.679 ± 0.006b	3.22 ± 0.07b	3.83 ± 0.03b	200.6 ± 28.8b
	(b-pte)	0.596 ± 0.001a	3.03 ± 0.09a	3.42 ± 0.02a	216.3 ± 30.3b
	(c)	0.800 ± 0.002d	3.76 ± 0.05d	4.36 ± 0.02d	113.1 ± 7.9a
	(c-pte)	0.724 ± 0.004c	3.38 ± 0.06c	4.18 ± 0.01c	126.9 ± 31.1a
Hyssop	(a)	0.197 ± 0.002d	1.03 ± 0.01d	1.03 ± 0.02d	38.3 ± 3.8a
	(a-pte)	0.159 ± 0.004d	0.91 ± 0.01b	0.95 ± 0.02c	139.6 ± 23.0c
	(b)	0.054 ± 0.002a	0.26 ± 0.03a	0.35 ± 0.02a	150.7 ± 7.0c
	(b-pte)	0.052 ± 0.002b	0.20 ± 0.01a	0.36 ± 0.03a	162.8 ± 1.5c
	(c)	0.066 ± 0.003b	0.25 ± 0.01a	0.43 ± 0.04b	96.1 ± 14.8b
	(c-pte)	0.075 ± 0.006c	0.28 ± 0.04a	0.43 ± 0.01b	101.5 ± 25.8b
Oregano	(a)	0.643 ± 0.003f	3.16 ± 0.06f	3.35 ± 0.01f	8.6 ± 1.9a
	(a-pte)	0.526 ± 0.005e	2.83 ± 0.01e	2.98 ± 0.01e	36.4 ± 7.5b
	(b)	0.318 ± 0.007c	1.45 ± 0.01c	1.55 ± 0.01c	41.0 ± 7.9b
	(b-pte)	0.270 ± 0.006a	1.31 ± 0.01a	1.34 ± 0.01a	52.3 ± 5.8c
	(c)	0.342 ± 0.006d	1.62 ± 0.03d	1.73 ± 0.01d	22.1 ± 2.8a
	(c-pte)	0.288 ± 0.002b	1.38 ± 0.01b	1.44 ± 0.02b	77.7 ± 23.9d
Dittany	(a)	0.320 ± 0.001c	1.50 ± 0.01e	1.61 ± 0.01f	10.6 ± 0.3a
	(a-pte)	0.257 ± 0.007b	1.14 ± 0.02d	1.56 ± 0.01e	42.9 ± 7.3b
	(b)	0.142 ± 0.006a	0.77 ± 0.01b	0.85 ± 0.01c	60.5 ± 11.4b
	(b-pte)	0.140 ± 0.002a	0.62 ± 0.02a	0.70 ± 0.03a	110.7 ± 5.4c
	(c)	0.173 ± 0.002a	0.89 ± 0.02c	0.90 ± 0.01d	62.2 ± 7.5b
	(c-pte)	0.173 ± 0.001a	0.78 ± 0.02b	0.80 ± 0.01b	96.9 ± 8.3c
Sage	(a)	0.331 ± 0.005b	1.64 ± 0.01e	1.63 ± 0.02e	52.2 ± 3.9a
	(a-pte)	0.320 ± 0.010b	1.54 ± 0.01d	1.62 ± 0.03e	107.8 ± 25.7b
	(b)	0.086 ± 0.005a	0.39 ± 0.02b	0.50 ± 0.02b	199.5 ± 21.4c
	(b-pte)	0.083 ± 0.003a	0.33 ± 0.02a	0.45 ± 0.01a	198.8 ± 19.1c
	(c)	0.102 ± 0.020a	0.42 ± 0.02c	0.62 ± 0.01d	137.2 ± 2.7b
	(c-pte)	0.095 ± 0.003a	0.34 ± 0.01a	0.54 ± 0.01c	224.9 ± 5.3c

<sup>a</sup> (a) at 85 °C, (b) at room temperature and, (c) at room temperature with the assistance of ultrasounds.

<sup>b</sup> pte indicates the aqueous phase of infusions after extraction with petroleum ether.

<sup>\*\*\*</sup> Different letter indicates significant differences (*p* < 0.05) among treatments for the same herb sample.

with petroleum ether ranged between 0.159–0.930 for process (a-pte), 0.052–0.596 for process (b-pte) and 0.075–0.724 mg of caffeic acid/200 mL for process (c-pte).

Results show that there is a scaling increase in total phenolic content among the species tested. Lemon balm exhibited the highest phenolic content and hyssop the lowest, regardless the extraction procedure. Very interestingly ranking remains the same in the aqueous phase after the extraction with petroleum ether for all the infusions tested (Table 1).

### 3.2. Antioxidant activity

Antioxidant activity was determined by DPPH\* method and expressed as μmol Trolox/mL. The estimated values of antioxidant activities by DPPH\*, expressed as μmol Trolox/mL varied from 0.35 to 6.61 (Table 1). DPPH\* antioxidant activity of infusions ranged between 1.03–6.61 for process (a), 0.35–3.83 for process (b) and 0.43–4.36 μmol Trolox/mL for process (c). The respective values of the aqueous phase from the extraction with petroleum ether ranged between 0.95–6.59 for process (a-pte), 0.36–3.42 for process (b-pte) and 0.43–4.18 μmol Trolox/mL for process (c-pte).

The antioxidant activity, as determined by ABTS\*\* method, was also expressed as μmol Trolox/mL (Table 2). Values of antioxidant activity, estimated by ABTS\*\*, varied from 0.20 to 6.34 μmol Trolox/mL (Table 1).

Lemon balm presented the highest values of antioxidant activity. The ranking of antioxidant activity values of plant extracts, regardless the method according to which they were determined (DPPH\* or ABTS\*\*), were found to be the same with the

ranking of values of the total phenolic content for the same plant extracts.

### 3.3. Toxicity

The estimated EC<sub>50</sub> toxicity values expressed as mg/mL (Table 1) varied from 8.61 to 224.87. Toxicity of infusions ranged between 8.61–119.75 for process (a), 40.96–200.61 for process (b) and 22.09–137.19 mg/mL for process (c). The same values for the aqueous phase from the extraction with petroleum ether ranged between 36.38–210.68 for process (a), 52.32–216.30 for process (b) and 77.69–224.87 mg/mL for process (c).

Oregano presented the lowest EC<sub>50</sub> values for all treatments. The highest values were obtained by lemon balm in (a), (a-pte), (b), (b-pte), and by sage in (c) and (c-pte) processes (Table 1).

The correlation equations of Gamma values with sample concentration, provided by OMNI software, allowed to calculate the concentrations corresponding to 20% effect (Gamma value: 0.25) where a concentration below this value can be considered as non-toxic. Based on the above, the non-toxic levels of dry plant mass that can be used in diet were calculated (Table 2). In case of infusions, dry plant mass values referred to concentrations that cause inhibition 20% were all calculated higher than 2 g except oregano (0.66 g) and dittany (0.81 g). Referring to their use in nutrition, the corresponding dry plant masses for oregano, was calculated at 6.48 g in salads and 16.5 g in cooking process. For sage, the corresponding value in cooking process calculated at 94.75 g. According to Table 4, no correlation was established between toxicity and total phenolic content (R=0.002), as well as between toxicity and antioxidant

**Table 2**  
Concentration that causes 20% luminescence inhibition, maximum plant mass per reference volume.

	Treatment	Concentration that causes 20% luminescence inhibition (mg/mL)	Plant mass per reference volume that cause 20% luminescence inhibition (g)	Reference volume	Use in diet
Lemon balm	(a) <sup>a</sup>	48.00	9.60	200 mL	Decoction
	(b)	92.33	18.47	200 mL	–
Hyssop	(a)	11.90	2.38	200 mL	Decoction
	(b)	65.10	13.02	200 mL	–
Oregano	(a)	3.29	<b>0.66</b>	200 mL	Decoction
	(b)	12.95	16.5	5000 mL	During cooking process
Dittany	(a)	4.04	<b>0.81</b>	200 mL	Decoction
	(b)	21.03	4.21	200 mL	–
Sage	(a)	18.95	3.79	200 mL	Decoction
	(b)	83.79	94.75	5000 mL	During cooking process
			16.76	200 mL	–

Values in Bold are those that are lower than 2(g).

<sup>a</sup> (a) at 85°C, (b) at room temperature.

activity ( $R=0.008$ ,  $R=0.015$  for DPPH• and ABTS•+ method respectively).

#### 3.4. Interaction of water soluble and volatile organic compounds

According to the results of SR values calculation (Table 3), no significant interaction was observed between volatile organic and water-soluble compounds regarding the total phenolic content and the antioxidant activity (SR values 0.7–1.0). In terms of toxicity, the maximum synergy was observed in oregano (4.2), dittany (4.1) and hyssop (3.6) infusions derived from process (a), indicating the strong influence of the volatile organic compounds of each plant to the toxicity of infusions. Between the treatments, for all species examined, the synergism in toxicity was more intense in process (a) and less intense in process (b), indicating that extraction temperature influenced the toxicity of extracts mainly due to the higher quantity of volatile organic compounds of essential oil that being extracted when hot water is used.

#### 4. Discussion

In all samples examined, higher levels of total phenolic content were obtained when infusions were prepared at high temperature,

compared to those obtained with aqueous solvent at room temperature, either with or without ultrasound assistance. Scarce literature exists for the aqueous infusions and decoctions, since most studies examined organic solvents for the extraction of polyphenols from dried parts of plants (Ćanadanović-Bruneć et al., 2008; Miliuskas et al., 2004; Shan et al., 2005; Kamatou et al., 2010). In this study, total phenolics were higher in lemon balm, followed by oregano, sage, dittany and finally hyssop. In comparative studies with aqueous plant extracts, lemon balm showed the highest phenolic content in relation to the others (Katalinic et al., 2006; Fecka and Turek, 2007). Among infusions of 70 different plants from Croatia, lemon balm was also the richest in phenolic compounds followed by sage (Katalinic et al., 2006). Ivanova et al. (2005), found high levels of total phenolic content in oregano and lemon balm infusions. Recently, in two studies applied the same preparation process, herbal infusions of oregano had high levels of phenolic content, followed by dittany and sage (Kalióra et al., 2014; Kogiannou et al., 2013).

Regarding the antioxidant activity, lemon balm again exhibited the highest antioxidant activity and hyssop the lowest in all three extraction processes in both methods applied, while the activities exhibited by sage and dittany were alike in the case of hot water preparation. Recently, when the DPPH• method was applied, the

**Table 3**  
SR<sub>toxicity</sub>, SR<sub>total phenolic</sub>, SR<sub>DPPH•</sub>, SR<sub>ABTS•+</sub> indexes for the studied samples.

Sample	Treatment <sup>a</sup>	SR <sub>total phenolic</sub>	Effect <sup>b</sup>	SR <sub>DPPH•</sub>	Effect <sup>b</sup>	SR <sub>ABTS•+</sub>	Effect <sup>b</sup>	SR <sub>toxicity</sub>	Effect <sup>c</sup>
Lemon balm	(a)	0.9	Synergism	1.0	Additive	1.0	Additive	1.8	Synergism
	(b)	0.9	Synergism	0.9	Synergism	0.9	Synergism	1.1	Synergism
	(c)	0.7	Synergism	0.9	Synergism	1.0	Additive	1.1	Synergism
Hyssop	(a)	0.9	Synergism	0.9	Synergism	0.9	Synergism	3.6	Synergism
	(b)	1.0	Additive	0.8	Synergism	1.0	Additive	1.1	Synergism
	(c)	1.1	Antagonism	1.1	Antagonism	1.0	Additive	1.1	Synergism
Oregano	(a)	0.8	Synergism	0.8	Synergism	0.9	Synergism	4.2	Synergism
	(b)	0.8	Synergism	0.9	Synergism	0.9	Synergism	1.3	Synergism
	(c)	0.8	Synergism	0.9	Synergism	0.8	Synergism	3.5	Synergism
Dittany	(a)	0.8	Synergism	0.8	Synergism	1.0	Additive	4.1	Synergism
	(b)	1.0	Additive	0.8	Synergism	0.8	Synergism	1.8	Synergism
	(c)	1.0	Additive	0.9	Synergism	0.9	Synergism	1.5	Synergism
Sage	(a)	1.0	Additive	0.9	Synergism	1.0	Additive	2.1	Synergism
	(b)	1.0	Additive	0.9	Synergism	0.9	Synergism	1.0	Additive
	(c)	0.9	Synergism	0.8	Synergism	0.9	Synergism	1.6	Synergism

<sup>a</sup> (a) at 85°C, (b) at room temperature and (c) at room temperature with the assistance of ultrasounds.

<sup>b</sup> In case of total phenolic content and antioxidant activity, SR < 1 indicates synergism, SR > 1 indicates antagonism and SR = 1 additive action.

<sup>c</sup> In case of toxicity, SR<sub>toxicity</sub> < 1 indicates antagonism, SR<sub>toxicity</sub> > 1 indicates synergism and SR = 1 additive action.



**Table 4**  
Correlation between total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of plants studied.

	DPPH*	ABTS**	Total phenolic content	Toxicity
DPPH*		0.995	0.979	0.008
ABTS**	0.995		0.986	0.015
Total phenolic content	0.979	0.986		0.002
Toxicity	0.008	0.015	0.002	

infusion of dittany had highest antioxidant activity against the sage (Kaliora et al., 2014). Using the ABTS\*\* method, in a comparative study of plants used as spices, plants of Lamiaceae family showed high antioxidant activity. Sage infusion felt sort by 50% of the corresponding value of the oregano infusion (Shan et al., 2005). In the present study, the two aforementioned methods were used for the estimation of the antioxidant activity, as there is no specific standardized method yet. Several methods have been published, as well in vitro antioxidant activity determination protocols (Armstrong, 1998; Packer and Ong, 1998; Rajalakshmi and Narasimhan, 1996). No consistent results exist as the evaluation of antioxidant activity depends strongly on the assay being used. According to the results of the present study, a positive linear correlation was established between the two methods of antioxidant activity estimation (Table 4).

The correlation coefficient (*R*) for DPPH\* and ABTS\*\* assay was 0.995. *R*-value was positive at the  $p < 0.001$  significance level, indicating that the values of antioxidant activities assayed by the two different methods were strongly correlated. Both methods are spectrophotometry-based and are widely used to measure the antioxidant activity of natural extracts based on their ability to reduce the radical cation.

The effect of extracts toward DPPH\* and ABTS\*\* radicals indicates the presence of compounds that have the ability to interact with the free radicals by acting as an electron donor or hydrogen atoms. Numerous studies correlate the antioxidant activity of the plant extracts in the presence of phenolic compounds (Cai et al., 2006; Čanadanović-Brunet et al., 2008; Dorman et al., 2004; Li et al., 2008; Shan et al., 2005). However, other studies have come to opposite results (Kahkönen et al., 1999) and there are others that show very little correlation (Stagos et al., 2012). In the current study, positive correlation was also found between total phenolic content and antioxidant activity in all plant extracts (Table 4). The correlation coefficient (*R*) between the antioxidant activity obtained from ABTS\*\* assay and the phenolic content was 0.986 and the *R* between the antioxidant activity obtained from DPPH\* assay and the phenolic content was 0.979, which indicates that high levels of phenolic content correlate to higher antioxidant activity.

It appears that phenolic compounds extracted depend on plant species (Tavassoli and Emam Djomeh, 2011) and the solvent used (Liu et al., 2007; Moure et al., 2001). Furthermore, environmental factors such as climate, soil, irrigation, temperature range, exposure to diseases and pests, the harvest season, the way of drying and storage or even the part of the plant tissue to be used, the content of this water are parameters that should be taken into consideration (Bergonzi et al., 2001; Wang and Zheng, 2001).

The extraction procedure appears to affect total phenolic content and antioxidant activity of each plant. Extraction with hot water differs significantly from the other infusion preparation techniques (Table 1). Similar results have been previously reported indicating the efficiency of the hot water in the extraction of phenolic compounds in various types of tea (Yang et al., 2007; Venditti et al., 2010), oregano (Teixeira et al., 2013) and mushrooms (Vamanu and Nita, 2013). Studies on the use of ultrasound for the extraction of bioactive compounds from plant materials have been reported (Caniova and Brandsterova, 2001; Paniwnyk et al., 2001;

Proestos and Komaitis, 2006; Vinatoru, 2001). The possible benefits of ultrasonic extraction are mass transfer intensification, cell disruption and improved penetration of solvent to the plant tissue. The ultrasonic waves break the vegetal cells and release the cells' contents into the extraction medium. Attention should be given in the case of the system of ultrasound extraction, since the use of probe may result in the degradation of compounds through the formation of hydroxyl radicals during the sonication of the aqueous solvent (Paniwnyk et al., 2001). Lamiaceae aromatic plants included in this study are extensively used in Mediterranean diet either as decoctions or food spices and food industry which also tends to use more sophisticated extraction techniques such as ultrasounds (Vilkhu et al., 2008). The toxicity evaluation of plant extracts studied in this research provided (a) direct comparative toxicity evaluation, (b) determination of non-toxic levels for each extract, (c) comparative evaluation of three extraction procedures in terms of toxicity of the derived extracts, (d) identification of synergism or antagonism of volatile organic and water soluble compounds in the extracts.

Toxicity found not to correlate either with antioxidant activity or total phenolic content. In case of -pte extracts, where the volatile fraction has been removed, toxicity should be related with specific phenolic and flavonoid compounds extracted. The characteristic phenolic compound of Lamiaceae species is the rosmarinic acid (Lamaison et al., 1991; Pettersen and Simmonds, 2003). Rosmarinic acid content, as has determined by high performance liquid chromatography (HPLC), varied between 86 mg/g in lemon balm, 39.50 mg/g for sage, 60 mg/g for oregano and 12 mg/g for hyssop (Saltas et al., 2013). According to the rosmarinic acid values referred in literature, the toxicity cannot be attributed to rosmarinic acid while the lemon balm although contains the highest values of rosmarinic acid, found to be the least toxic compared to the other -pte treatments. From the -pte extracts higher toxicity values presented in oregano and dittany. This activity can be attributed to other phenolic compounds have been identified in common for dittany and oregano such as  $\pi$ -coumaric acid, ferulic acid, caffeic and vanillic acid (Chun et al., 2005; Kouri et al., 2007; Proestos et al., 2005) or flavonoids like apigenin, keampferol, quercetin, eriodictyol, taxifolin and naringenin (Chatzopoulou et al., 2010). As rosmarinic acid levels of plants examined did not also interpret toxicity variations of their aqueous extracts further investigation is necessary to identify, quantify and evaluate toxicity of the specific components in each extract.

The calculated plant mass per reference volume that cause 20% luminescence inhibition in Microtox® (Table 2), in case of lemon balm decoction was fivefold more compared to the commercial portions of 2 g, indicated that its toxicity is negligible similarly to sage and hyssop. The corresponding plant mass of oregano and dittany decoctions was calculated at 0.66 and 0.81 g, respectively, values that are much lower than the usual portions consumed and so moderate use is suggested until further research on maximum daily consumption portions will be completed. The calculated plant mass of oregano and sage in cooking process or in salads found too much higher compared to the actual quantity used, so their use in diet is not raising concerns.

In case of aqueous plant extracts derived through several extraction techniques, a very small quantity of essential oil compounds comes into the aqueous phase and either promotes or inhibits partially the bioactivity of water soluble compounds. The strong influence of the volatile organic compounds to the toxicity of hyssop can be addressed to the major constituents of its essential oil which are pinocampnone (49.1%) >  $\beta$ -pipene (18.4%) > isopinocampnone (9.7%) (Shah et al., 1986; Garg et al., 1999) and have shown remarkable antimicrobial activity in vitro (Fathiazad and Hamedeyazdan, 2011). The same synergistic tendency in dittany and oregano can be attributed to their essential

oil common constituents, such as carvacrol,  $\gamma$ -terpinene and p-cymene (Daferera et al., 2000, 2002, 2003; Lolios et al., 2010), to high antimicrobial activity.

Up to day, food industry has benefited from the synergistic and/or additive effects of essential oils and their isolated components (Bassole and Juliani, 2012). These effects have also been used by pharmaceutical industry in the context of essential oils or herbal extracts and synthetic drugs (Ghavami et al., 2011; Silva et al., 2011). Identification of possible interactions between essential oil compounds and water soluble compounds in herbal extracts, in terms of total phenolics, antioxidant activity and toxicity, should provide useful information to food and pharmaceutical industry, where health safety and health improvement is of primary concern.

## 5. Conclusions

Results of this study indicate that, among the examined plant species, lemon balm presented the highest phenolic content and antioxidant activity values, whereas hyssop presented the lowest ones. The extraction procedure was found to influence significantly the total phenolic content and antioxidant activity, as differences were observed between extractions at high and room temperature. When ultrasound assisted extraction was used, an increase in phenolic content was observed. Similar results were obtained for the aquatic phase derived from the extraction with petroleum ether. A linear positive correlation was established between total phenolic content and antioxidant activity in the infusions studied.

Extraction procedures found also to influence infusions toxicity, but no correlation was detected between toxicity and the total phenolic content or antioxidant activity. The interaction between water soluble compounds and essential oil compounds was synergistic only in case of toxicity, but no significant synergism was observed between total phenol content and antioxidant activity. The toxicity of herbal extracts is vital to be further investigated, so their use in diet as antioxidant sources would be placed in safe limits for human health.

## Acknowledgements

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

We thank the “Aetoloakarnania’s Rural Cooperative of Aromatic, Pharmaceutical and Energy Plant Cultivators (Agrotikos Syneterismos Kalliergiton Aromatikou, Farmakeftikon, Energiakon Fytou Aetoloakarnanias, ASKAFEFA), Greece” for providing the herb samples.

## References

- Al-Bayati, F.A., 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.* 116, 403–406.
- Alarcón, E., Campos, A.M., Edwards, A.M., Lissi, E., López-Alarcón, C., 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: a comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem.* 107, 1114–1119.
- Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., Gordon, M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108, 55–63.
- Alvarado, C., Álvarez, P., Puerto, M., Gausserès, N., Jiménez, L., De la Fuente, M., 2006. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 22, 767–777.
- Anderson, T.D., Zhu, K.Y., 2004. Synergistic and antagonistic effects of atrazine on the toxicity of organophosphorodithioate and organophosphorothioate insecticides to *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Pest. Biochem. Physiol.* 80, 54–64.
- Armstrong, D., et al., 1998. Free Radical and Antioxidant Protocols, Vol 108 of Methods in Molecular Biology. Hummanna Press, Totowa, NJ.
- Ashworth, J., Nijenhuis, E., Glowacka, B., Tran, L., Schenk-Watt, L., 2010. Turbidity and color correction in the Microtox™ bioassay. *Open Environ. Pollut. Toxicol. J.* 2, 1–7.
- AZUR, 1997. Microtox Manual, vol. 1–4. Azur Environmental (formerly Microbics Corporation), Carlsbad, CA.
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat. Toxicol.* 49, 49–61.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., 2011. From famine plants to tasty and fragrant spices: three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal). *LWT – Food Sci. Technol.* 44, 543–548.
- Bassole, H., Juliani, H., 2012. Essential oils in combination to their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006.
- Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D., Vincieri, F.F., 2001. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 491–497.
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., Ningali, P., 2010. Fruit and vegetable antioxidants in health. In: Watson, R., Preedy, V. (Eds.), *Bioactive Foods in Promoting Health – Fruits and Vegetables*. Academic Press, Massachusetts, pp. 37–58.
- Bouchagier, P., Efthimiadou, A., Katsileros, A., Bilalis, D., Efthimiadis, P., 2008. Adverse effect of bermudagrass on physiological and growth components of cotton. *J. Agron.* 7 (1), 49–55.
- Bouchagier, P., Efthimiadis, P., 2010. Allelopathic susceptibility of cotton to bermudagrass. *J. Agron.* 9 (1), 23–28.
- Bulich, A., Tung, K., Scheibner, G., 1990. The luminescent bacteria toxicity test: its potential as an in vitro alternative. *J. Biolumin. Chemilumin.* 5, 71–77.
- Burton, S.A., Petersen, R.V., Dickman, S.N., Nelson, J.R., 1986. Comparison of in vitro bacterial bioluminescence and tissue culture bioassays and in vivo tests for evaluating acute toxicity of biomaterials. *J. Biomed. Mater. Resour.* 20, 827–837.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78, 2872–2888.
- Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., Čanadanović, V., 2008. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J. Med. Food* 11, 133–143.
- Caniova, A., Brandsterova, E., 2001. HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (17), 2647–2659.
- Carrió, E., Vallés, J., 2012. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *J. Ethnopharmacol.* 141, 1021–1040.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Chong, K.L., Tan, J.B.L., Wong, S.K., 2010. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *J. Food Compos. Anal.* 23, 185–189.
- Chatzopoulou, A., Karioti, A., Gousiadou, C., Lax Vivancos, V., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Skalts, H., 2010. Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their in vitro antimicrobial activity in clinical strains. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6064–6068.
- Chun, S.-S., Vattem, D.A., Lin, Y.-T., Shetty, K., 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Proc. Biochem.* 40, 809–816.
- Conforti, F., Iole, G., Statti, G.A., Marrelli, M., Ragno, G., Menichini, F., 2008. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3325–3332.
- Cotou, E., Papatthanassiou, E., Tsangaris, C., 2002. Assessing the quality of marine coastal environments: comparison of scope for growth and Microtox® bioassay results of pollution gradient areas in eastern Mediterranean (Greece). *Environ. Pollut.* 119, 141–149.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2576–2581.
- Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., 2002. Characterization of essential oils from Lamiaceae species by Fourier transform Raman spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5503–5507.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Prot.* 22, 39–44.
- Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Romagnolo, D.F., 2009. Health benefits of traditional culinary of medicinal Mediterranean plants. In: Watson, R. (Ed.), *Complementary and Alternative Therapies of the Aging Population*. Academic Publishing, Massachusetts, pp. 541–562.
- Dorman, D.H.J., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R., 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 52, 762–770.
- Endo, E.H., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res. Microbiol.* 161, 534–540.

- Fathiazad, F., Hamedeyazdan, S., 2011. A review on *Hyssopus officinalis* L.: composition and biological activities. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5 (17), 1959–1966.
- Fecka, I., Turek, S., 2007. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10908–10917.
- Fulladosa, E., Murat, J.C., Villascusa, I., 2005. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 58, 551–557.
- Garg, S., Nagvi, A.A., Singh, H.A., Aggarvals, S., Byers, L.D., Ensley, H.E., Gupta, S., 1999. Composition of essential oil from an annual crop of *Hyssopus officinalis* grown in India plains. *Flavor Fragrance J.* 14, 170–172.
- Ghavami, G., Sardari, S., Shokrgozar, M., 2011. Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistance tumor cells – ACHN and A2780/CP cell lines. *Comput. Biol. Med.* 41, 665–674.
- He, Z.G., Sun, J., Wu, X., Lu, R., Liu, J.F., Wang, Y.J., 2008. Profiling drug membrane permeability and activity via biopartitioning chromatography. *Curr. Drug Metab.* 9, 152–166.
- Hemaiswarya, S., Doble, M., 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16, 997–1005.
- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martinez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R., 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68, 724–730.
- Hewlett, P.S., Plackett, R.L., 1969. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics* 15, 591–610.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T., 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 96, 145–150.
- Kahkönen, M., Hopia, A., Vuorella, H.J., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.
- Kaliora, A.C., Kogiannou, D.A.A., Kefalas, P., Issidora, S., Papassideri, I.S., Kalogeropoulos, N., 2014. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chem.* 142, 233–241.
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Steenkamp, P., 2010. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem.* 119, 684–688.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 94, 550–557.
- Kogiannou, D.A.A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M.G., Kaliora, A.C., 2013. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food Chem. Toxicol.* 61, 152–159.
- Kotecha, J., Shah, S., Rathod, I., Subbiah, G., 2007. Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs. *Int. J. Pharmacol.* 333, 127–135.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V., 2007. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 155–162.
- Kvalheim, M., Chan, H., Benzie, I., Szeto, Y., Tzang, A., Mok, D., Chau, F., 2011. Chromatographic profiling and multivariate analysis for screening and quantifying the contributions from individual components to the bioactive signature in natural products. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 107, 98–105.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A., 1991. Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharm. Acta Helv.* 66, 185–188.
- Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F., 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT* 41, 385–390.
- Liolios, C.C., Graikou, K., Skaltsa, E., Chinou, I., 2010. Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 131, 229–241.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., Yan, G., 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *J. Food Chem.* 105, 548–554.
- Madsen, H.L., Bertelsen, G., 1995. Review: spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 271–277.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85, 231–237.
- Moon, S.E., Kim, H.Y., Dha, J.D., 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch. Oral Biol.* 56, 907–916.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72, 145–171.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2012. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. *J. Ethnopharmacol.* 139, 81–89.
- Nedorostova, L., Klouček, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, 157–160.
- Noorbala, A.A., Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Jamshidi, A.H., 2005. Hydroalcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J. Ethnopharmacol.* 97, 281–284.
- Otitilou, A.A., 2002. Evaluation of the joint action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Typanotonus fuscatus* var *radula* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 404–415.
- Packer, L., Ong, A.S.H., 1998. *Biological Oxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects*. AOCs Press, Champaign, IL.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., Mason, T.J., 2001. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrason. Sonochem.* 8, 299–301.
- Park, K., Que Hee, S., 2001. Effect of dust on the viability of *Vibrio fischeri* in the Microtox test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50, 189–195.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S., 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.* 32, 265–268.
- Peelman, F., Couturier, C., Dam, J., Zabeau, L., Tavernier, J., Jockers, R., 2006. Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (4), 218–225.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M.E., García-Diz, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 24, 646–653.
- Pettersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 45, 1165–1172.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1190–1195.
- Proestos, C., Komaitis, M., 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction techniques. *J. Food Qual.* 29, 567–582.
- Rajalakshmi, D., Narasimhan, S., 1996. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. (Eds.), *Food Antioxidants*. Marcel Dekker, New York, pp. 65–157.
- Ree, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A., Moreno, S., 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem.* 115, 456–461.
- Saltas, D., Pappas, C.S., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., 2013. Direct determination of rosmarinic acid in Lamiaceae herbs using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3235–3241.
- Shah, N.C., Kahol, A.P., Sen, T., Uniyal, G.C., 1986. Gas chromatographic examination of *Hyssopus officinalis*. *Parfumerie und Kos* 67, 116–118.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7749–7759.
- Shettlemore, M.G., Bundy, K.J., 2002. Assessment of dental material degradation product toxicity using a bioluminescent bacterial assay. *Dent. Mater.* 18, 445–453.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D., Domingues, F., 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19, 42–47.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
- Stagos, D., Portes, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4115–4124.
- Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., Corke, H., Sun, M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102, 938–953.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
- Tavassoli, S., Emam Djomeh, Z., 2011. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Vet.* 7, 337–341.
- Teixeira, B., Marques, A., Cristina Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L., 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2707–2714.
- Thorsen, M.A., Hildebrandt, K.S., 2003. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts, aspects of accurate quantification. *J. Chromatogr. A* 995, 119–125.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S., 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* 93, 713–718.
- Yang, D.-J., Hwang, L.S., Lin, J.-T., 2007. Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *J. Chromatogr. A* 1156, 312–320.
- Vamanu, E., Nita, S., 2013. Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. *BioMed Research International*, Article ID 313905.
- Venditti, E., Bacchetti, T., Tiano, L., Carloni, P., Greci, L., Damiani, E., 2010. Hot vs. cold water steeping of different teas: do they affect antioxidant activity? *Food Chem.* 119, 1597–1604.

- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 161–169.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8, 303–313.
- Wang, B., Deng, J., Gao, Y., Zhu, L., He, R., Xu, Y., 2011. The screening toolbox of bioactive substances from natural products. A review. *Fitoterapia* 82, 1141–1151.
- Wang, S.Y., Zheng, W., 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in Strawberry. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4977–4982.
- Wootton-Beard, P.C., Ryan, L., 2011. Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int.* 44, 3135–3148.
- Zhang, J., Liu, S., Dou, R., Liu, H., Zhang, J., 2011. Evaluation of the toxicity of ionic liquid mixture with antagonism and synergism to *Vibrio qinghaiensis* sp.Q67. *Chemosphere* 82, 1024–1029.
- Zhao, Y.H., Ji, G.D., Cronin, M.T.D., Dearden, J.C., 1998. QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp. *Sci. Total Environ.* 216, 205–215.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5165–5170.



## 5<sup>ο</sup> Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

---

Ο ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ  
ΣΤΗΝ ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ  
ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ  
ΣΤΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

*Πρακτικά συνεδρίου*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
13 - 15 Δεκεμβρίου 2012

---



### 5<sup>ο</sup> Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας

#### Αντιοξειδωτική δράση, ολικά φαινολικά συστατικά και τοξικότητα επιλεγμένων φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών

Σκόττη Ε., Αναστασάκη Ε., Ταραντίλης Π.Α. \*, Πολυσιού Μ.

Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική δράση, τα ολικά φαινολικά συστατικά, και η τοξικότητα επιλεγμένων αρωματικών φυτών τα οποία είτε καταναλώνονται ως αφεψήματα είτε χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα. Από τα αρωματικά φυτά που μελετήθηκαν, το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*) έδωσε τις υψηλότερες τιμές ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης, ανεξάρτητα από τη διαδικασία εκχύλισης. Για όλα τα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε η μέγιστη ξηρή μάζα που μπορεί να καταναλωθεί με ασφάλεια στη διατροφή, ως αυτή που δίνει τιμή παρεμπόδισης της φωταύγειας του *Vibrio fischeri* μικρότερη από 20%. Η θερμοκρασία και η διαδικασία εκχύλισης βρέθηκε να επηρεάζει όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Η συνέργεια των υδατοδιαλυτών συστατικών με συστατικά του αιθερίου ελαίου των φυτών που μελετήθηκαν ήταν σημαντική μόνο στην εκτίμηση της τοξικότητας όπου ο μέγιστος δείκτης συνέργειας (SR = 4.2) παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα της ρίγανης (*Origanum vulgare*). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η τοξικότητα των αρωματικών φυτών που μελετήθηκαν δε βρέθηκε να συσχετίζεται με τα ολικά φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση, αλλά να επηρεάζεται από τη διαδικασία εκχύλισης και τη συνέργεια ή τον ανταγωνισμό μεταξύ υδατοδιαλυτών συστατικών και συστατικών του αιθερίου ελαίου στο εκχύλισμα. Η τοξικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου η χρήση τους ως πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών να γίνεται σε ασφαλή όρια για την ανθρώπινη υγεία. Πρόσθετα, ο προσδιορισμός της συνέργειας μεταξύ υδατοδιαλυτών συστατικών και συστατικών του αιθερίου ελαίου στα εκχυλίσματα μπορεί να οδηγήσει στην παραλαβή λιγότερο τοξικών φυτικών εκχυλισμάτων μέσω διαφοροποιήσεων στη διαδικασία εκχύλισης.

**Λέξεις κλειδιά:** Ολικά φαινολικά συστατικά, Αντιοξειδωτική δράση, Τοξικότητα, *Vibrio fischeri*,

**Total phenolic compounds, antioxidant activity and toxicity of selected medicinal and aromatic Plants**

Skotti E., Anastasaki E., Tarantilis P.A. \*, Polissiou M.

*Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece*

In this study were investigated the total phenolic content, the antioxidant activity and the toxicity of selected medicinal aromatic plants that are being consumed as decoctions or used as food additives. Between the plants studied, the lemon balm (*Melissa officinalis*) showed the greater values in total phenolic content and antioxidant activity independently of the extraction procedure. For all extracts analyzed was determined the maximum mass per volume that can be safely used in human diet, as giving inhibition values in *Vibrio fischeri* less than 20%. Temperature and extraction procedure found to influence all the parameters examined. The interaction of soluble substances and the essential oil of the plants studied was remarkable only in the case of toxicity, where *Origanum vulgare* showed the maximum synergism (SR = 4.2). Our findings indicate that toxicity of medicinal plants extracts examined, is not correlated to their total phenolic content and antioxidant activity, but found to be linked with temperature, extraction procedure and the synergism or antagonism of essential oil the soluble substances in the extracts. Toxicity of herbal extracts deserves to be further investigated in order their use in diet as antioxidant sources, to be placed in safe limits for human health. Furthermore, determination of synergism between essential oil and soluble substances can lead to differentiation of extraction procedures towards the productions of less toxic herbal extracts.

**Keywords:** Total phenolic content, Antioxidant activity, Toxicity, *Vibrio fischeri*

## Παρουσίαση Poster



## Total phenolic compounds, antioxidant activity and toxicity of selected medicinal and aromatic plants

Skotti E., Anastasaki E., Tarantilis P. and Polissiou M.

Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Street, 11855, Athens, Greece

The importance of dietary antioxidant components for the prevention of some diseases and health quality improvement has attracted much research attention through the last decade. Vegetables and herbal infusions have been recognized as important antioxidant sources. Food industry shows significant interest in application of plant bioactive compounds for flavoring but also for preservation purposes, but attention should be given in case of high doses. In the current study were investigated the total phenolic content, the antioxidant activity and the toxicity of selected medicinal aromatic plants that are being consumed as decoctions or used as food additives.

### Sample preparation

- 2 g dry mass of each plant species were:
- steeped in 200 ml (1 cup) a) at 85 °C for 15 min,
  - at room temperature for 15 min and,
  - at room temperature with the assistance of ultrasonic (35 MHz) for 15 min. The herbal infusions were then filtered through a Whatman filter No. 1.
- All extracts were then further extracted by petroleum ether.

### Total phenolic content and antioxidant activity

Total phenolic content (in terms of caffeic acid) was determined using a Folin-Ciocalteu assay. Antioxidant determined applying both the ABTS assay - 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and the DPPH assay 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.

### Toxicity tests

Toxicity assessment of the plant extracts has been performed using MICROTOX® toxicity analyzer. MICROTOX® uses the marine bioluminescence bacteria *Vibrio fischeri* as a reference test species for the measurement of bioluminescence inhibition. The protocol used was the Basic Test 81.9% (AZUR, 1997) with appropriate primary dilution of samples in order the EC<sub>50</sub> (Effective Concentration where bioluminescence inhibition is 50%) not to be obtained by extrapolated data.

Table 4. Concentration that cause 20% luminescence inhibition and maximum dry plant mass per unit volume

Species	Treatment	Concentration that cause 20% luminescence inhibition (mg/ml)	Plant mass per unit volume that cause 20% luminescence inhibition (g)	Reference volume (ml)	Use in food
MOF	(b)	92.33	18.47	200	Decoction
	(a)	48.00	9.60	200	
	(c)	12.95	6.48	500	
OVU	(a)	3.29	0.66	200	Decoction
	(b)	16.5	3.30	5000	
	(c)	21.03	4.21	200	
ODI	(a)	4.04	0.81	200	Decoction
	(b)	83.79	16.76	200	
	(c)	18.95	3.79	5000	
SOF	(a)	65.10	13.02	200	Decoction
	(b)	11.90	2.38	200	
	(c)	11.90	2.38	200	

### Results

Total phenolic content was estimated in both infusions and the aqueous phase of their extraction by petroleum ether expressed in mg of caffeic acid /200 ml. Maximum values were given by *Melissa officinalis*. The ranking of antioxidant activity regardless of the method that is being determined DPPH or ABTS is the same with the ranking of the total phenolic content. Results show that there is a scaling increase in total phenolic content among the species tested. *Melissa officinalis* exhibited the higher phenolic content and *Hyssopus officinalis* the lowest regardless the extraction procedure. Ranking remains the same in the aqueous phase of the extraction by petroleum ether for all the infusions (table 2).

Antioxidant activity when determined by ABTS method expressed also in mg/ml (100 μl / 200 ml) (table 2). Maximum values were given by *Melissa officinalis*. The ranking of antioxidant activity regardless of the method that is being determined DPPH or ABTS is the same with the ranking of the total phenolic content.

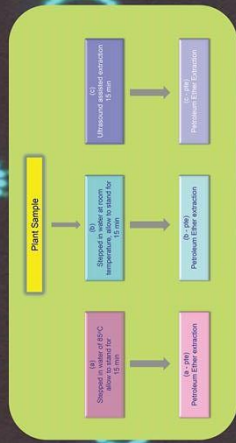


Fig. 1. Schematic Plan of extraction procedures

Table 1. Main and use of plant species examined

Sample	Species	Common Name	Plant Part Used	Use in Herb
MOF	<i>Melissa officinalis</i>	Lemon balm	leaves	Decoctions
OVU	<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	leaves	Herb in salads (fresh or dry), roasted, stewed
ODI	<i>Origanum dictamnus</i>	Dittany	Leaves/flowers	Decoctions
SOF	<i>Salvia officinalis</i>	Sage	Leaves	Decoctions, as a herb in cooking
HOF	<i>Hyssopus officinalis</i>	Hyssop	Leaves/flowers	Decoctions

Table 2. Toxicity of plant species expressed as EC50 (mg/ml) after 15 minutes incubation time

Sample	(a)	(b)	(b-pte) <sup>1</sup>	(c-pte) <sup>1</sup>	(c)	(c-pte) <sup>1</sup>
MOF	119.75	200.61	216.30	113.09	126.93	126.93
HOF	38.31	150.67	162.75	98.05	101.47	101.47
ODI	10.56	60.46	110.75	62.61	96.87	96.87
OVU	8.61	36.38	40.96	22.09	77.69	77.69
SOF	52.17	107.77	198.78	137.19	224.87	224.87

Table 3. Total Phenolic Content, Antioxidant Activity estimated by DPPH and ABTS methods

Treatment	Total Phenolic Content mg Gallic acid / 200 ml	Antioxidant Activity DPPH µmole Trolox / 200 ml	Antioxidant Activity ABTS µmole Trolox / 200 ml
MOF	197.0	1268.3	1321.7
HOF	34.9	206.4	206.8
OVU	128.6	631.1	689.3
ODI	63.9	299.7	321.0
SOF	64.5	328.2	326.1
MOF	185.9	1240.1	1319.5
HOF	31.7	182.5	190.2
OVU	105.1	585.2	595.2
ODI	51.3	227.7	311.9
SOF	62.0	306.9	323.1
MOF	135.8	644.5	766.8
HOF	10.7	51.5	69.2
OVU	63.5	290.1	309.5
ODI	28.3	153.5	189.6
SOF	15.5	77.3	99.2
MOF	119.1	605.5	694.3
HOF	10.4	39.2	71.0
OVU	53.9	282.8	287.1
ODI	27.9	123.7	139.1
SOF	15.5	66.3	88.6
MOF	159.9	752.7	871.8
HOF	13.1	49.7	85.2
OVU	68.3	323.5	344.5
ODI	34.5	177.0	179.6
SOF	16.9	83.7	123.1
MOF	114.7	676.0	834.9
HOF	15.0	55.7	86.1
OVU	57.6	276.3	288.7
ODI	32.9	165.5	160.3
SOF	28.0	88.6	107.9

1) Corofini, F., Icole, G., Satti, G.A., Marrelli, M., Pagno, G., Menichini, F., 2008. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. Food and Chemical Toxicology 46, 3325-3332.  
 2) Ghavami, G., Sarafian, S., Shokrgozar, M., 2011. Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistant tumor cells A549 and A2780/CP cell lines. Computers in Biology and Medicine 41, 685-674.  
 3) Hernandez, M.D., De Vitorio, S., Martinez-Bueno, M.J., Fernandez-Alba, A.R., 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. Chemosphere 68, 724-730.  
 4) ISO 11348/1-2-3, 1998. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri*.

Toxicity evaluation of the plant extracts was performed by applying the Basic Test protocol obtained after 7.5 min exposure expressed as EC<sub>50</sub> value, at which 50% loss of luminescence is obtained. EC<sub>50</sub> was also estimated, at which a 20% loss of light emission is observed, as according to the ISO guidelines (ISO 11348, 1998) a toxic sample shows an effect percentage greater than 20%. Results show that *Origanum vulgare* gave the lower EC<sub>50</sub> values in all treatments. Respectively, higher values were obtained by *Melissa officinalis* in treatments (a), (a-pte), (b), (b-pte), and by *Salvia officinalis* in treatments (c) and (c-pte) (table 3).

Depending on the use of each plant tested in nutrition, was calculated the maximum dry plant mass, in 200ml for decoctions, in 500ml in case of use in salads, and in 50ml when is being used in cooking processes (table 4). Furthermore, was calculated the synergism ratio (SR) as follows:

$$SR_{total\ phenolics} = \frac{Total\ phenolics - pte}{Total\ phenolic\ mixture}$$

$$SR_{antioxidant\ activity} = \frac{Antioxidant\ activity - pte}{Antioxidant\ activity\ mixture}$$

$$SR_{toxicity} = \frac{EC_{50,pte}}{EC_{50,mixture}}$$

Table 5. SR<sub>total phenolics</sub>, SR<sub>antioxidant activity</sub>, SR<sub>toxicity</sub> indexes for sample tested

Sample Code	Treatment	SR <sub>total phenolics</sub>	SR <sub>antioxidant activity</sub>	SR <sub>toxicity</sub>	Effect <sup>1,2</sup>	SR <sub>total phenolics</sub>	SR <sub>antioxidant activity</sub>	SR <sub>toxicity</sub>	Effect <sup>1,2</sup>
MOF	(b)	0.9	Synergism	0.9	Synergism	0.9	Synergism	1.1	Synergism
	(c)	0.7	Synergism	0.9	Synergism	1.0	Additive	1.1	Synergism
	(a)	0.9	Synergism	1.0	Additive	1.0	Additive	1.8	Synergism
HOF	(b)	1.0	Additive	0.8	Synergism	1.0	Additive	1.1	Synergism
	(c)	1.1	Antagonism	1.1	Antagonism	1.0	Additive	1.1	Synergism
	(a)	0.9	Synergism	0.9	Synergism	0.9	Synergism	3.6	Synergism
ODI	(b)	1.0	Additive	0.8	Synergism	0.8	Synergism	1.8	Synergism
	(c)	1.0	Additive	0.9	Synergism	0.9	Synergism	1.5	Synergism
	(a)	0.8	Synergism	0.8	Synergism	1.0	Additive	4.1	Synergism
OVU	(b)	0.8	Synergism	0.9	Synergism	0.8	Synergism	3.5	Synergism
	(c)	0.8	Synergism	0.9	Synergism	0.9	Synergism	4.2	Synergism
	(a)	0.8	Synergism	0.9	Synergism	1.0	Additive	1.0	Additive
SOF	(b)	1.7	Antagonism	0.8	Synergism	0.9	Synergism	1.6	Synergism
	(c)	1.0	Additive	0.9	Synergism	1.0	Additive	2.1	Synergism
	(a)	1.0	Additive	0.9	Synergism	1.0	Additive	2.1	Synergism

1. In case of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity, SR < 1 indicates synergism, SR = 1 indicates antagonism and SR > 1 indicates additive action.  
 2. In case of toxicity, SR < 1 indicates synergism, SR = 1 indicates additive action and SR > 1 indicates additive action.

**Conclusions.** Results of this study indicate that between plant species examined, *Melissa officinalis* presented the higher, and *Hyssopus officinalis* the lower phenolic content and antioxidant activity. Extraction procedure seems to influence significantly the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity respectively, as green differences were observed between extractions in high and room temperature. A small increase was observed in ultrasound assisted extraction. Similar results were obtained when infusions extracted by petroleum ether. Linear positive correlation has been found between total phenolic content and antioxidant activity in the infusions studied.

Toxicity of infusions seems to be also influenced by the temperature and extraction procedure, but no correlation was detected between toxicity and the total phenolic content or antioxidant activity. Interactions of soluble substances and the essential oil of plants were remarkable in case of toxicity in contrast to the case of total phenolic content and antioxidant activity where interaction was almost neutral.

1) Corofini, F., Icole, G., Satti, G.A., Marrelli, M., Pagno, G., Menichini, F., 2008. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. Food and Chemical Toxicology 46, 3325-3332.  
 2) Ghavami, G., Sarafian, S., Shokrgozar, M., 2011. Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistant tumor cells A549 and A2780/CP cell lines. Computers in Biology and Medicine 41, 685-674.  
 3) Hernandez, M.D., De Vitorio, S., Martinez-Bueno, M.J., Fernandez-Alba, A.R., 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. Chemosphere 68, 724-730.



This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund - ESF) and Greek national funds through the Operational Program 'Education and Lifelong Learning' of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in Knowledge Society through the European Social Fund.



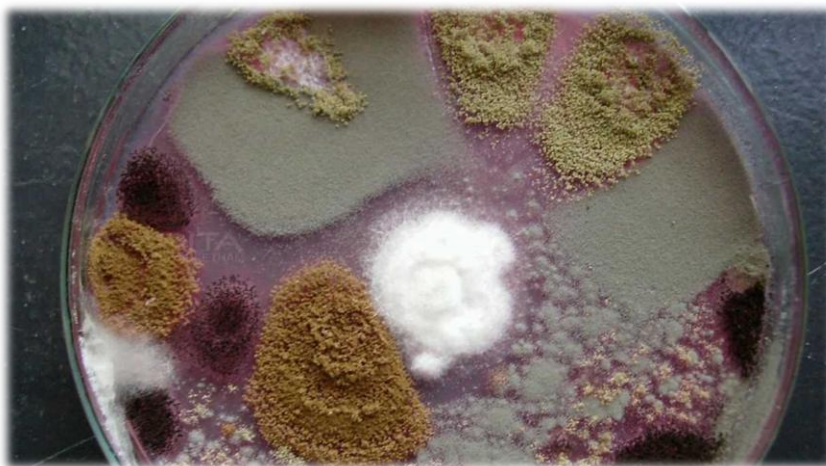
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΑ  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





# II.2

Εκτίμηση της βιολογικής δράσης υδατικών εκχυλισμάτων  
αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών σε φυτοπαθόγους  
και εντομοπαθόγους μύκητες





### II.2.1 Εισαγωγή

Τα φυσικά προϊόντα και τα εκχυλίσματά τους αποτελούνται από μίγματα ουσιών τα οποία παρουσιάζουν βιολογική δράση έναντι παθογόνων και μη μικροοργανισμών, και για το λόγο αυτό τυγχάνουν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια προκειμένου να αξιοποιηθούν ως εναλλακτικά σκευάσματα για την προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς καθώς έχουν ελάχιστες αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον (Matsun *et al.*, 1997). Τα προαναφερόμενα εναλλακτικά σκευάσματα αναφέρονται και ως βιοφυτοπροστατευτικά σκευάσματα στη βιβλιογραφία και βασίζονται σε φυσικά προϊόντα τα οποία μπορούν και δρουν είτε άμεσα μειώνοντας την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών, είτε έμμεσα ενισχύοντας την ανάπτυξη των φυσικών εχθρών τους (Chandler *et al.*, 2008).

Βιοδραστικές ουσίες φυτικής προέλευσης έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων όπως η *A. alternata* (Alizadeh *et al.*, 2011), *Aspergillus flavus* (Al-Saad *et al.*, 2016; Dikbas *et al.*, 2008; Goran *et al.*, 2013; Kohiyama *et al.*, 2015; Omidbeygi *et al.*, 2007; Passone *et al.*, 2012; Rajkovic *et al.* 2015; Sanchez *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2009; Selvi *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2012; Zhavah *et al.*, 2015), *Fusarium oxysporum* (Daferera *et al.*, 2003; Jasso de Rodriguez *et al.*, 2007; Manganyi *et al.*, 2015; Rosado-Alvarez *et al.*, 2014) αλλά και για την ενίσχυση της ανάπτυξης του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* (Niranjan Reddy *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2011). Η αξιολόγηση της βιοδραστικότητας συγκεκριμένων φυσικών συστατικών ή μιγμάτων γίνεται ως επί το πλείστον με βιοδοκιμές και μοριακές αναλύσεις (Barros *et al.*, 2007; Meca *et al.*, 2010; Müller-Riebau *et al.*, 1995). Μεγάλος αριθμός φυτικών εκχυλισμάτων και φυσικών συστατικών έχουν αξιολογηθεί ως προς τη βιολογική τους δράση (Kumar *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Qui *et al.*, 2015) με παράλληλη ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων, των φαινολικών συστατικών και φλαβονοειδών που περιέχονται σε αυτά προκειμένου να αξιολογηθούν το αρωματικό προφίλ, η αντιοξειδωτική δράση και η βιολογική ή αλληλοπαθητική δράση των εκχυλισμάτων αυτών (Castilho *et al.*, 2012; Dzamic *et al.*, 2013; Kaliora *et al.*, 2014; Licina *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2015; Qui *et al.*, 2015).

Τα φυτικά εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται από διάφορους διαλύτες, μεταξύ αυτών και το νερό, είναι μίγματα πολλών ουσιών. Την πιθανή τους βιολογική δράση ως μίγματα την έχουν προσεγγίσει με διάφορα μοντέλα σε φυτά (Bouchagier *et al.*, 2008; Bouchagier and Efthimiadis, 2010), βιοδοκιμές σε μικροοργανισμούς (Daferera *et al.*, 2003), καλλιέργειες ιστών και κυττάρων (Wang *et al.*, 2011), υποδοχείς ενζύμων (Peelman *et al.*,

2006) καθώς και βιοχρωματογραφία ((He *et al.*, 2008; Kotecha *et al.*, 2007; Kvalheim *et al.*; 2011).

Στην περίπτωση των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, μικρή ποσότητα των συστατικών του αιθερίου ελαίου εισέρχεται στο εκχύλισμα κατά τη διαδικασία εκχύλισης κι επηρεάζει ενισχύοντας ή παρεμποδίζοντας τη βιολογική δράση των αμιγώς υδατοδιαλυτών συστατικών. Για το λόγο αυτό υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αξιολόγηση της ενδεχόμενης συνέργειας, ή ανταγωνισμού στην αντιμικροβιακή (Al-Bayati, 2008; Endo *et al.*, 2010; Hemaiswarya *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2011; Ncube *et al.*, 2012) και αντιοξειδωτική δράση (Romano *et al.*, 2009) μεμονωμένων ουσιών ή μιγμάτων.

Οι μύκητες είναι οργανισμοί με ευρύτατες επιπτώσεις στον άνθρωπο τα οικοσυστήματα και το περιβάλλον (Chapin *et al.*, 2000; Desprez-Loustau *et al.*, 2007; Hawksworth, 1991) τόσο θετικές όσο και αρνητικές. Οι επιπτώσεις αυτές ποικίλουν από ανακύκλωση θρεπτικών υλικών, σχηματισμό μυκοριζών και βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Adrio & Demain, 2003; Molitoris, 1995), έως απειλητικές για τον άνθρωπο τα ζώα και τα φυτά εξαιτίας των διαφόρων ασθενειών που μπορεί να προκαλέσουν. Υπάρχουν στελέχη τα οποία μπορούν να γίνουν εξαιρετικά επικίνδυνα, όπως ο *Aspergillus fumigatus*, ο οποίος υπό προϋποθέσεις μπορεί να γίνει παθογόνος για τον άνθρωπο. Τόσο η βιολογία του είδους όσο και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μυκήτων.

Η παρούσα πειραματική ενότητα διερευνά τη βιολογική δράση 5 αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, του *Origanum dictamnus*, του *Origanum vulgare*, του *Hyssopus officinalis*, της *Salvia officinalis* και του *Melissa officinalis* καθώς και του *Crocus sativus* σε τρία στελέχη φυτοπαθογόνων μυκήτων την *Alternaria alternata*, τον *Aspergillus flavus* και το *Fusarium oxysporum*, και σε ένα στέλεχος εντομοπαθογόνου μύκητα τη *Beauveria bassiana*, η οποία χρησιμοποιείται για φυτοπροστασία σε καλλιέργειες που εφαρμόζεται βιολογική γεωργία. Σε όλα τα προαναφερόμενα στελέχη ελέγχθηκε η δράση των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων κι εκτιμήθηκε η συνέργεια των πτητικών συστατικών που εισέρχονται στα εκχύλισματα κατά τη διαδικασία εκχύλισης κι επηρεάζουν τη βιολογική τους δράση.

Στην παρούσα πειραματική ενότητα επιχειρείται επιπλέον η συσχέτιση της βιολογικής δράσης όλων των εκχυλισμάτων τόσο των μικτών όσο και των αμιγώς υδατικών όλων των αρωματικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, με τα κύρια φαινορικά συστατικά που περιέχονται σε αυτά.

Η ποιοτική ανάλυση των βιοδραστικών μορίων έγινε με Υγρή Χρωματογραφία

Υψηλής Απόδοσης όπως περιγράφεται λεπτομερώς στις παραγράφους που ακολουθούν. Έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης πτητικών και υδατοδιαλυτών συστατικών στα εκχυλίσματα μέσω του υπολογισμού και ερμηνείας δεικτών συνέργειας και ανταγωνισμού μεταξύ των προαναφερόμενων κλασμάτων.

Επίσης, μελετήθηκε η συσχέτιση του ροσμαρινικού οξέως, το οποίο περιέχεται σε όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη όπως προέκυψε από τη σχετική ανάλυση, αλλά και σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία (Janicsak *et al.*, 1999), με τη βιολογική δράση των εκχυλισμάτων που παρατηρήθηκε επί της *A. alternata*.

## II.2.2 Υλικά και Μέθοδοι

### II.2.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού

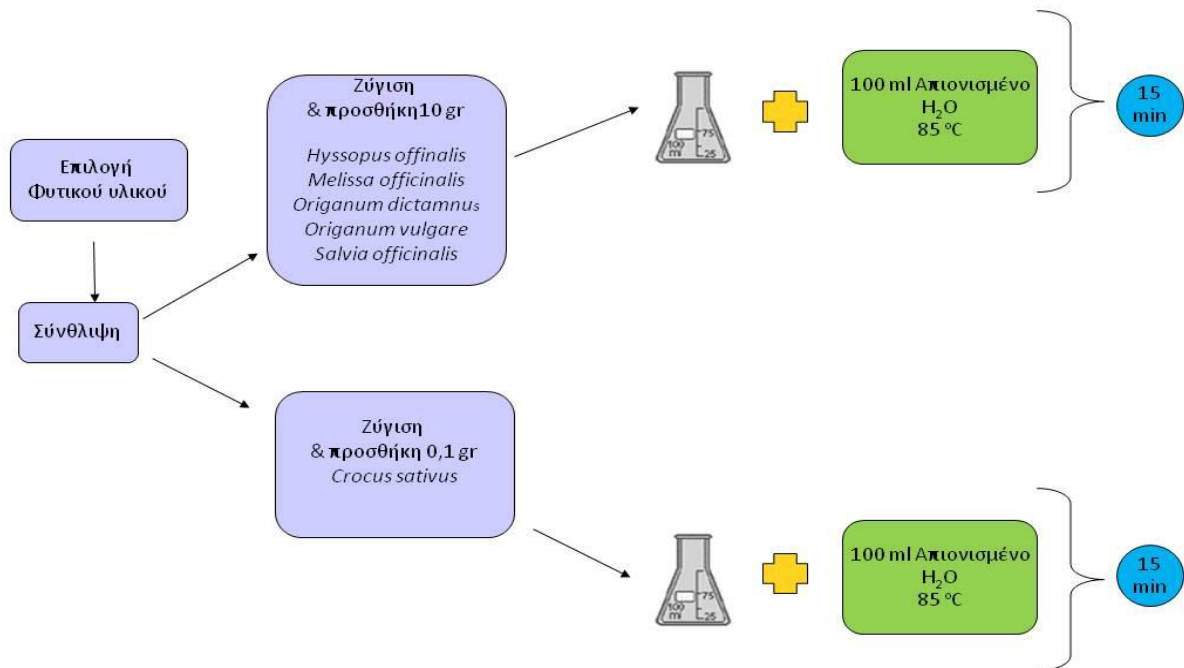
Τα φυτικά δείγματα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.) (MOF), του φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.) (SOF), της ρίγανης (*Origanum vulgare* L.; χημειότυπος καρβακρόλης) (OVU) και του ύσσωπου (*Hyssopus officinalis* L.) (HOF) ήταν συλλογής έτους 2010, είχαν ξηρανθεί με αέρα και προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Καλλιεργητών Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ). Τα δείγματα του δίκταμου (*Origanum dictamnus* L. χημειότυπος καρβακρόλης) (ODI) προμηθεύτηκαν από την τοπική αγορά της Κρήτης και τα δείγματα του κρόκου (*Crocus sativus*) (CRS) προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Κοζάνης. Από τα προαναφερόμενα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα φύλλα, με εξαίρεση τη ρίγανη και τον ύσσωπο όπου χρησιμοποιήθηκαν και τα άνθη, και του κρόκου όπου χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση αποκλειστικά τα στίγματα. Όλα τα φυτικά δείγματα φυλάσσονταν στους -20° C μέχρι τη χρήση τους.

### II.2.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (μελισσόχορτο, φασκόμηλο, ρίγανη, ύσσωπος και δίκταμο) παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 10 g/100 ml με την προσθήκη της δρόγης σε νερό θερμοκρασίας 85°C, ανάδευση του μίγματος και παραμονή του σε ηρεμία εκτός θερμοαντικής πηγής για 15 λεπτά (Σχήμα II.2.1). Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν κατ αρχή με Whatman filter No 1, και προ της προσθήκης τους στο μέσο καλλιέργειας των μυκήτων με αποστειρωμένα φίλτρα 0.2 μm PES filter media (Whatman



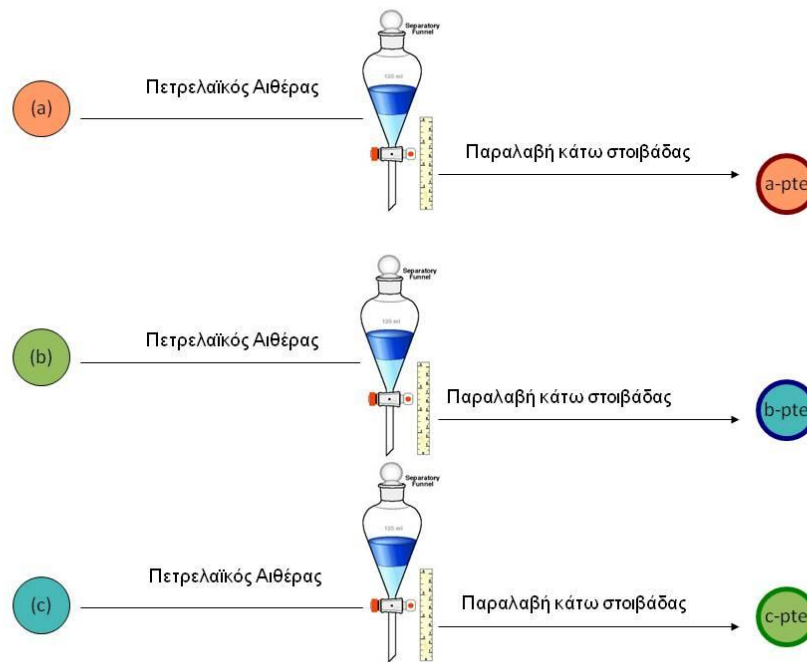
Puradisk 25 mm) προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των καλλιεργειών από άλλους μικροοργανισμούς. Με την ίδια διαδικασία παρασκευάστηκε και το εκχύλισμα του κρόκου αλλά σε συγκέντρωση 0.1 g/100 ml. Τα εκχυλίσματα αυτά στη συνέχεια αναφέρονται ως μικτά (crude) εκχυλίσματα.



**Σχήμα II.2.1** Διαδικασία εκχύλισης για την παραλαβή εκχυλισμάτων από τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά

100 mL κάθε εκχυλίσματος που παραλήφθηκε με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν πιο πάνω τοποθετήθηκαν σε εκχυλιστική χοάνη και εκχυλίστηκαν με 33 mL πετρελαϊκού αιθέρα προκειμένου να παραληφθούν τα πτητικά συστατικά που μπορεί να υπάρχουν στα εκχυλίσματα.

Η εκχυλιστική χοάνη ανακινήθηκε καλά, και μετά την εξισορρόπηση των φάσεων, η οργανική φάση συλλέχθηκε, και η υδατική φάση εκχυλίστηκε άλλες δυο φορές με πετρελαϊκό αιθέρα (σχήμα II.2.2) πρώτου παραληφθεί ως εκχύλισμα (-brte).



**Σχήμα II.2.2** Διαδικασία εκχύλισης για την παραλαβή του υδατικού κλάσματος (-bpte) των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

### II.2.2.3 Αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες σε τριβλία ήταν το Potato Dextrose Agar (PDA) της εταιρείας Sigma Aldrich. Όλοι οι μύκητες *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, καθώς *Beauveria bassiana* προήλθαν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Το ακετονιτρίλιο και τα πρότυπα του ροσμαρινικού, του καφεϊκού, του συριγγικού και του καρνοσικού οξέος προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich Corporation. Τα πρότυπα λουτεολίνης, γλυκοζίτη της λουτεολίνης, απιγενίνης, γλυκοζίτη της απιγενίνης, χλωρογενικό οξύ, και καεμφερόλη, από την Extrasynthese. Το φερουλικό, το *p*-κουμαρικό οξύ και η Εριοδικτυόλη από την εταιρεία FLUKA. Ο πετρελαϊκός αιθέρας προμηθεύτηκε από την εταιρεία Merck.

### II.2.2.4 Καλλιέργειες Μυκήτων

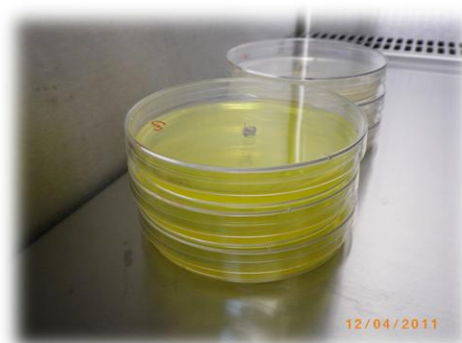
Οι καλλιέργειες των *A. alternata*, *F. oxysporum*, *A. flavus* και *B. bassiana* αναπτύχθηκαν σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε συνθήκες φωτισμού

προκειμένου να παραχθούν αρκετά κονίδια. Η ανάπτυξη του μυκηλίου και των κονιδίων έγιναν σε αποστειρωμένα τριβλία petri 90mm στα οποία είχαν προηγουμένως προστεθεί 19 ml αποστειρωμένου PDA και 1 ml εκχυλίσματος κάθε αρωματικού και φαρμακευτικού φυτού, το οποίο προστέθηκε πριν την στερεοποίηση του PDA.



**Εικόνα II.2.1** Προετοιμασία πλήρωσης των αποστειρωμένων τριβλίων με PDA και εκχυλίσματα αρωματικών φυτών

Τα κονίδια όλων των προαναφερόμενων στελεχών συλλέχθηκαν σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O (στο οποίο είχε προστεθεί 0.01% Tween 80 για την απελευθέρωση των υδροφοβικών κονιδίων) με τη βοήθεια επίπεδης οδοντογλυφίδας. Η συγκέντρωση των κονιδίων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου ρυθμίστηκε στα 10<sup>6</sup> κονίδια/mL. Στη συνέχεια όγκος 10 μL (10<sup>4</sup> κονίδια) από το αιώρημα των κονιδίων που παρασκευάστηκε προηγούμενα τοποθετήθηκε στο κέντρο κάθε τριβλίου πάνω στο υπόστρωμα και στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25° C σε φωτοπερίοδο 12 ώρες φωτός και 12 ώρες σκοτάδι.



**Εικόνα II.2.2** Τριβλία με PDA κι εκχύλισμα *crocus sativus*

Η μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου γινόταν τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα στους φυτοπαθολόγους μύκητες και τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup> και 15<sup>η</sup> για τη *B. bassiana*. Λόγω του μικρότερου ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα. Επιπλέον, υπολογίστηκε η % αύξηση ή μείωση

του μυκηλίου στις διάφορες επεμβάσεις σε σχέση με το μάρτυρα με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ αύξηση του μυκηλίου} = [(\Delta_{\text{επέμβασης}} - \Delta_{\text{μάρτυρα}}) / \Delta_{\text{μάρτυρα}}] \times 100$$

Όπου  $\Delta_{\text{επέμβασης}}$  και  $\Delta_{\text{μάρτυρα}}$  η μέση τιμή της διαμέτρου του μυκηλίου για κάθε επέμβαση και το μάρτυρα αντίστοιχα την 4<sup>η</sup> ημέρα μετρήσεων.

Η μέτρηση των παραγόμενων κονιδίων στις καλλιέργειες έγινε την 7<sup>η</sup> ημέρα, με λήψη 3 δισκίων διαμέτρου 6 mm από κάθε τριβλίο, τα οποία στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν και αναδεύθηκαν για 1 minute σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O περιεκτικότητας 0.01% σε Tween 80 για τη διευκόλυνση αποδέσμευσης των κονιδίων. Στη συνέχεια, τα κονίδια μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου. Για κάθε επέμβαση υπήρχαν τέσσερις επαναλήψεις.

Πρόσθετα, υπολογίστηκε η % αύξηση ή μείωση της ποσότητας των παραγόμενων κονιδίων στις επεμβάσεις σε σχέση με αυτά του μάρτυρα ως ακολούθως:

$$\% \text{ αύξηση παραγωγής κονιδίων} = [(Kv_{\text{επέμβασης}} - Kv_{\text{μάρτυρα}}) / Kv_{\text{μάρτυρα}}] \times 100$$

Όπου  $Kv_{\text{επέμβασης}}$  και  $Kv_{\text{μάρτυρα}}$  η μέση τιμή της συγκέντρωσης κονιδίων για κάθε επέμβαση και το μάρτυρα αντίστοιχα.

### II.2.2.5 Μελέτη των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων (β) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Όλα τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών (-brte) αναλύθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με το σύστημα 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector- DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HPChemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Όλα τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20 μm και διάμετρο 15 mm (Chromafil Xtra PET-2015).

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανεστραμμένης φάσης (HPLC – RF). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης Α ήταν δισαπεσταγμένο και φιλτραρισμένο H<sub>2</sub>O ρυθμισμένο σε pH 2,5 με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος και ο διαλύτης Β ήταν ακετονιτρίλιο

μεγάλης καθαρότητας για HPLC. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 0,4 mL/min. Η πίεση του οργάνου κυμαινόταν από 140-240 bar. Η στήλη ήταν Supelco Discovery HS C<sub>18</sub>, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm πορώδες υλικού 5 μm. Εφαρμόσθηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Αυτό έγινε κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου, με στόχο να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με κατάλληλη σύριγγα HPLC και ο όγκος του εισαγωγής του δείγματος ήταν 20 μL. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στον **πίνακα II.2.1**.

Όλα τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 260, 280 και 330 nm. Το μήκος 260 και 280 χρησιμοποιείται για τα φαινολικά οξέα και τα 330 για τα φλαβονοειδή.

Προκειμένου για την ταυτοποίηση ουσιών έγινε σύγκριση με χρωματογραφήματα μεμονωμένων πρότυπων ουσιών. Τα χρωματογραφήματα των προτύπων λήφθηκαν με τον ίδιο τρόπο, που λήφθηκαν τα άγνωστα δείγματα, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους για τη βαθμιαία έκλουση των διαλυτών της κινητής φάσης. Η σχετική ταυτοποίηση γινόταν κάθε φορά με συνδυασμό του φάσματος του εκλουόμενου συστατικού και του χρόνου κατακράτησης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα γνωστών πρότυπων ουσιών.

**Πίνακας II.2.1** Πρόγραμμα Έκλουσης

Χρόνος (min)	Διαλύτης Β (Ακετονιτρίλιο) (%)	Διαλύτης Α (ddH <sub>2</sub> O, pH=2.5) (%)
0	25	75
2	25	75
40	90	10

Οι πρότυπες ενώσεις που αναλύθηκαν ήταν φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, βανιλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, κατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, κερκετίνη, καεμφερόλη, λουτεολίνη, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, και απιγενίνη. Για κάθε πρότυπη ένωση παρασκευάσθηκε αρχικά ένα μητρικό διάλυμα (Stock solution) συγκέντρωσης 1 mg/mL (1000 ppm) σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC, που διατηρήθηκε στην κατάψυξη στους -18° C. Στη συνέχεια παρασκευάσθηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 100 ppm και αναλύθηκαν στις ίδιες συνθήκες.

### II.2.2.6 Εκτίμηση συνέργειας

Κατά τη διαδικασία παραλαβής των εκχυλισμάτων όπως εμφανίζεται στο (Σχ. II.2.1) μια μικροποσότητα από το αιθέριο έλαιο του εκάστοτε φυτικού είδους εισήλθε στο εκχύλισμα. Οι πτητικές ουσίες των αιθερίων ελαίων στο εκχύλισμα μπορεί να αλληλεπιδρούν με τις υδατοδιαλυτές ενώσεις και να επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών, την αντιοξειδωτική δράση και την τοξικότητα των δειγμάτων. Προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω αυτή η πιθανή αλληλεπίδραση, όλα τα εκχυλίσματα υπέστησαν επιπλέον εκχύλιση με οργανικό μη πολικό διαλύτη (πετρελαϊκό αιθέρα) για να απομακρυνθούν τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου που ενδεχομένως είχαν εισέλθει στο εκχύλισμα. Στο υδατικό κλάσμα της εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα επαναλήφθηκαν εις τριπλούν όλες οι βιοδοκιμές (Σχ. II.2.2). Οι αναλύσεις αυτές επιτρέπουν τον υπολογισμό του δείκτη συνέργειας στη βιολογική δράση SR (Synergism Ratio) μεταξύ υδατοδιαλυτών και πτητικών συστατικών του εκάστοτε εκχυλίσματος.

Ο δείκτης SR υπολογίστηκε όπως προτάθηκε από τους Hewlett & Plackett (1969) κι έκτοτε χρησιμοποιείται σε αρκετές παρόμοιες περιπτώσεις (Anderson and Zhu, 2004; Otitiloju, 2002), με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$SR_{\Delta\mu} = \left[ \frac{\text{αύξηση μυκηλίου στο (-bpte) εκχύλισμα}}{\% \text{ αύξηση μυκηλίου στο αρχικό εκχύλισμα}} \right]$$

Και  $SR_{Kv} = \left[ \frac{\% \text{ αύξηση παραγωγής κονιδίων στο (-bpte) εκχύλισμα}}{\% \text{ αύξηση παραγωγής κονιδίων στο αρχικό εκχύλισμα}} \right]$ , όπου:

$EC_{50\text{-pte}}$  είναι η τιμή της  $EC_{50}$  του υδατικού κλάσματος μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα, και  $EC_{50\text{ infusion}}$  η αρχική  $EC_{50}$  πριν την προαναφερόμενη εκχύλιση με τον οργανικό διαλύτη. Στη περίπτωση που υπάρχει μείωση κι όχι αύξηση, τότε το πρόσημο είναι αρνητικό, και η αρνητική τιμή του δείκτη υποδηλώνει ανταγωνισμό ανεξάρτητα από την τιμή του. Εφεξής η ένδειξη (-bpte) θα υποδεικνύει το υδατικό κλάσμα εκάστοτε εκχυλίσματος μετά την περαιτέρω εκχύλισή του με πετρελαϊκό αιθέρα.

### II.2.2.6 Στατιστική Επεξεργασία

Όλα τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί ως M.O.  $\pm$  S.D. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η one-way-analysis of variance (ANOVA) ακολουθούμενη από τη δοκιμή Tukey. Διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές σε επίπεδο  $p < 0.05$ . Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το λογισμικό SPSS version 14.0.

## II.2.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

### II.2.3.1 Βιολογική δράση φυτικών εκχυλισμάτων

Στην παρούσα πειραματική ενότητα μελετήθηκε η βιολογική δράση των μικτών (crude) αλλά και των αμιγώς υδατικών (-brte) εκχυλισμάτων σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες. Η βιολογική δράση των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με *in vitro* βιοδοκιμές σε τριβλία όπου μετριόνταν η διάμετρος του μυκηλίου και ο αριθμός των παραγόμενων κονιδίων στο τέλος του πειράματος. Στις βιοδοκιμές οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η *Alternaria alternata*, ο *Aspergillus flavus*, το *Fusarium oxysporum* και η *Beauveria bassiana*.

**Πίνακας II.2.2** Επίδραση των μικτών (crude) φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων της *Alternaria alternata*.

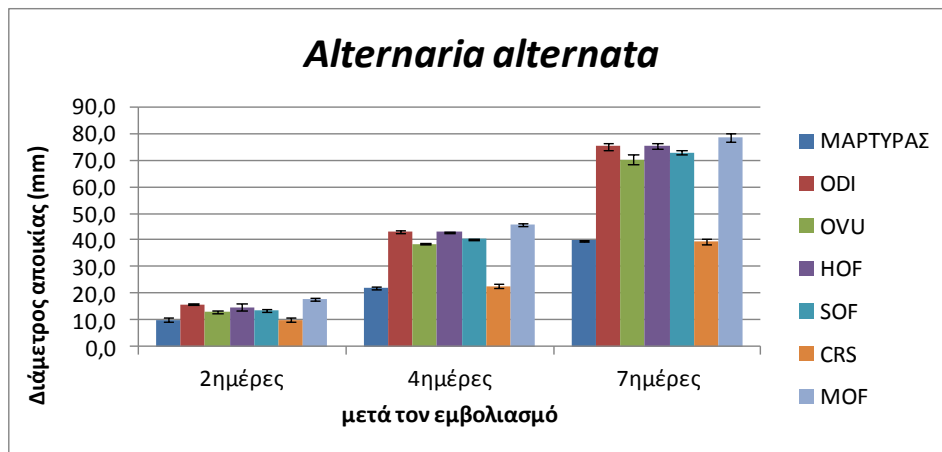
Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)			Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>
	2 ημέρες	4 ημέρες	7 ημέρες	
Μάρτυρας	10,11 ± 0,67 <sup>a</sup>	22,01 ± 0,51 <sup>a</sup>	39,83 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,42*10 <sup>5</sup> ± 0,55*10 <sup>5</sup> bc
<i>O. dictamnus</i> (ODI)	16,01 ± 0,32 <sup>cd</sup>	43,33 ± 0,44 <sup>d</sup>	75,17 ± 1,45 <sup>cd</sup>	3,27*10 <sup>5</sup> ± 0,68*10 <sup>5</sup> cd
<i>O. vulgare</i> (OVU)	13,17 ± 0,33 <sup>b</sup>	38,67 ± 0,44 <sup>b</sup>	70,17 ± 1,86 <sup>b</sup>	1,21*10 <sup>5</sup> ± 0,32*10 <sup>5</sup> ab
<i>H. officinalis</i> (HOF)	14,83 ± 1,45 <sup>bc</sup>	43,01 ± 0,29 <sup>d</sup>	75,51 ± 1,01 <sup>cd</sup>	1,61*10 <sup>5</sup> ± 0,08*10 <sup>5</sup> ab
<i>S. officinalis</i> (SOF)	13,51 ± 0,58 <sup>b</sup>	40,33 ± 0,17 <sup>c</sup>	72,83 ± 0,88 <sup>bc</sup>	3,99*10 <sup>5</sup> ± 0,44*10 <sup>5</sup> d
<i>C. sativus</i> (CRS)	10,17 ± 0,67 <sup>a</sup>	22,83 ± 0,44 <sup>a</sup>	39,51 ± 0,58 <sup>a</sup>	0,67*10 <sup>5</sup> ± 0,27*10 <sup>5</sup> a
<i>M. officinalis</i> (MOF)	17,83 ± 0,33 <sup>d</sup>	46,01 ± 0,51 <sup>e</sup>	78,51 ± 1,53 <sup>d</sup>	3,48*10 <sup>5</sup> ± 0,18*10 <sup>5</sup> cd

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

Στον μύκητα *Alternaria alternata*, τα μικτά (crude) εκχυλίσματα όλων των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (Πιν. II.2.2, Σχ. II.2.3, II.2.4) εμφάνισαν προωθητική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου. Τη μεγαλύτερη προωθητική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου εμφάνισε το μελισσόχορτο, με το δίκταμο να ακολουθεί με μικρή διαφορά από τον ύσσωπο το φασκόμηλο και τέλος τη ρίγανη (Σχ. II.2.3).



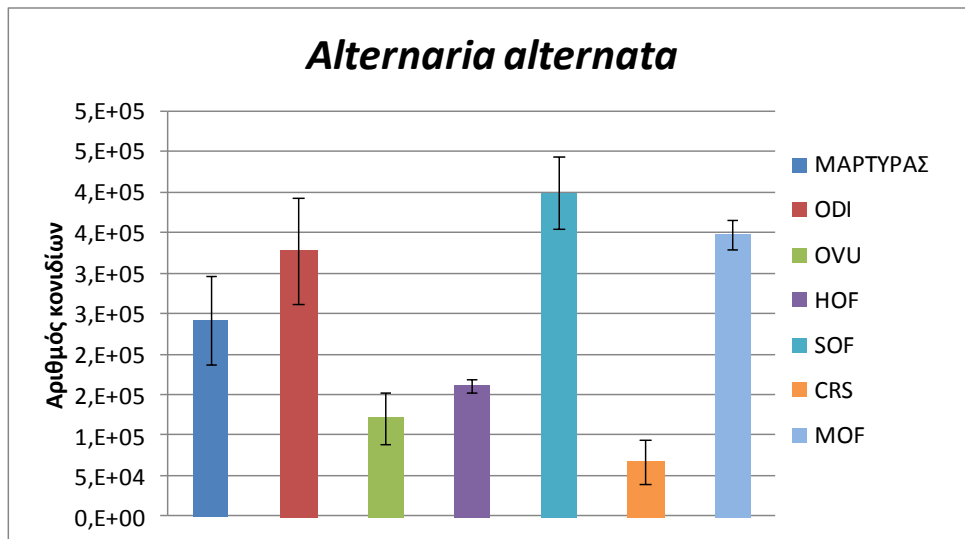
Εικόνα II.2.3 Οι καλλιέργειες της *Alternaria alternata* στο τέλος του πειράματος



Σχήμα II.2.3 Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της *Alternaria alternata* για κάθε επέμβαση

Αντίθετα, η δράση του κρόκου, στην ανάπτυξη του μυκηλίου της *Alternaria alternata* ήταν αμελητέα. Τα ίδια εκχυλίσματα είχαν διαφορετική δράση στην περίπτωση των παραγόμενων κονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με τη δράση των μικτών εκχυλισμάτων (Πιν. II.2.2, Σχ. II.2.4) στην *Alternaria alternata*, τη μεγαλύτερη προώθηση στην ανάπτυξη του μυκηλίου (Πιν. II.2.4) την έδωσε το μελισσόχορτο (+109,1%) ακολουθούμενο από το δίκταμο (+97,0%), τον ύσσωπο (+95,5%), το φασκόμηλο (+83,3%) και τη ρίγανη (+75,8%).





Σχ. II.2.4 Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ.κονιδίων/ cm<sup>2</sup> θρεπτικού υποστρώματος) της *Alternaria alternata* σε κάθε επέμβαση

Πίνακας II.2.3 Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων -bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Alternaria alternata*.

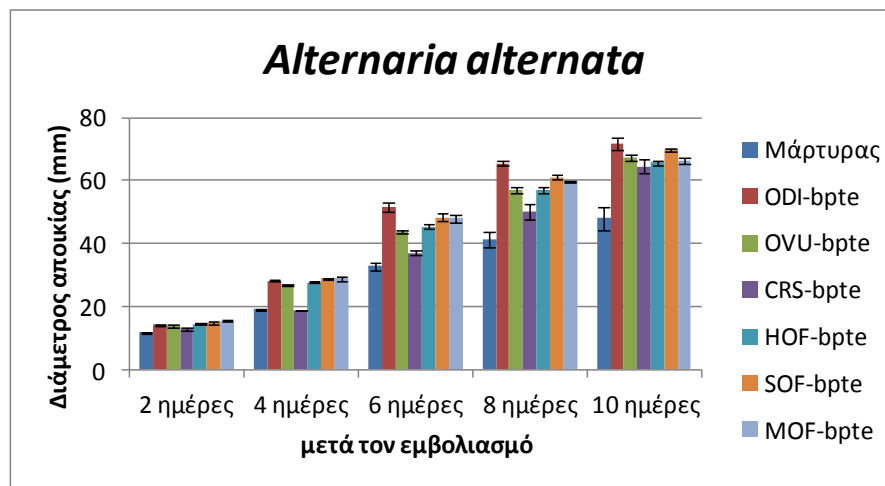
Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)					Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>	
	-bpte	2 ημέρες	4 ημέρες	6 ημέρες	8 ημέρες		10 ημέρες
Μάρτυρας		11,75±0,14 <sup>a</sup>	19,13±0,43 <sup>a</sup>	32,88±1,33 <sup>a</sup>	41,50±2,35 <sup>b</sup>	48,13±3,74 <sup>a</sup>	0,68*10 <sup>5</sup> ±0,14*10 <sup>5</sup> <sup>b,c</sup>
<i>O. dictamnus</i> (ODI)		14,38±0,24 <sup>b</sup>	28,38±0,43 <sup>b</sup>	51,67±1,64 <sup>b</sup>	65,50±0,61 <sup>c</sup>	71,75±2,02 <sup>c,d</sup>	0,76*10 <sup>5</sup> ±0,12*10 <sup>5</sup> <sup>c</sup>
<i>O. vulgare</i> (OVU)		14,13±0,52 <sup>b</sup>	26,75±0,32 <sup>c</sup>	43,75±0,60 <sup>d</sup>	56,88±0,97 <sup>a</sup>	67,25±0,97 <sup>b</sup>	1,18*10 <sup>5</sup> ±0,18*10 <sup>5</sup> <sup>a,d</sup>
<i>C. sativus</i> (CRS)		12,75±0,48 <sup>c</sup>	18,88±0,13 <sup>a</sup>	37,00±0,71 <sup>c</sup>	50,13±2,61 <sup>d</sup>	64,50±2,12 <sup>b,c</sup>	0,80*10 <sup>5</sup> ±0,06*10 <sup>5</sup> <sup>d</sup>
<i>H. officinalis</i> (HOF)		14,50±0,29 <sup>b</sup>	27,88±0,43 <sup>b</sup>	45,50±0,75 <sup>d</sup>	56,83±0,95 <sup>a</sup>	65,63±0,80 <sup>b</sup>	1,25*10 <sup>5</sup> ±0,24*10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>
<i>S. officinalis</i> (SOF)		15,00±0,35 <sup>b,e</sup>	29,00±0,35 <sup>b</sup>	48,38±1,14 <sup>d</sup>	61,13±0,83 <sup>e</sup>	69,75±0,63 <sup>a</sup>	1,14*10 <sup>5</sup> ±0,04*10 <sup>5</sup> <sup>a,c</sup>
<i>M. officinalis</i> (MOF)		15,63±0,24 <sup>d,e</sup>	29,00±0,65 <sup>b</sup>	48,00±1,26 <sup>d</sup>	59,83±0,14 <sup>a</sup>	66,33±0,88 <sup>d</sup>	3,05*10 <sup>5</sup> ±0,08*10 <sup>5</sup> <sup>e</sup>

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (P ≤ 0.05), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

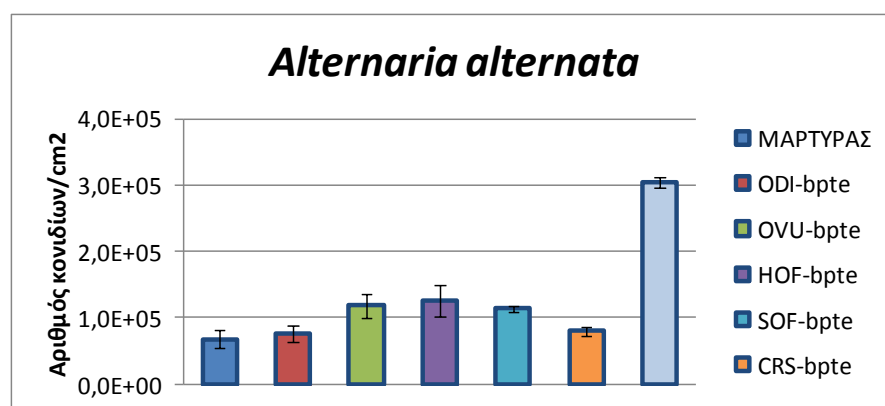
Η προώθηση της ανάπτυξης του μυκηλίου παρατηρήθηκε και στα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα (-bpte) (Πιν. II.2.3, Σχ. II.2.5, Σχ. II.2.6) όπως προαναφέρθηκε, με λιγότερο εντυπωσιακά ποσοστά αύξησης αυτή τη φορά. Πιο συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη προώθηση στην ανάπτυξη την προκάλεσε πάλι το μελισσόχορτο (+51,6%), και το φασκόμηλο, κι

ακολούθησε το δίκταμο (+48,4%), ο ύσσωπος (+45,8%) και η ρίγανη (+39,9%).

Στο **Σχήμα II.2.4** απεικονίζεται η προωθητική δράση στην κονιδιογένεση που προκάλεσαν τα μικτά (crude) εκχυλίσματα του φασκόμηλου, του μελισσόχορτου και του δίκταμου. Αντίθετα, τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του κρόκου, του ύσσωπου και της ρίγανης περιόρισαν κατά πολύ τα παραγόμενα κονίδια σε σχέση με το μάρτυρα. Στην **Εικ. II.2.3** στην οποία εμφανίζονται φωτογραφίες οι οποίες λήφθηκαν στο τέλος του πειράματος, είναι εμφανής η προωθητική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου της *Alternaria alternata* όλων των εκχυλισμάτων εκτός από αυτό του κρόκου (CRS) σε σχέση με το μάρτυρα (MAR).



**Σχήμα II.2.5** Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της *Alternaria alternata* για κάθε -bpte επέμβαση



**Σχήμα II.2.6** Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm<sup>2</sup> θρεπτικού υποστρώματος) της *Alternaria alternata* σε κάθε -bpte επέμβαση

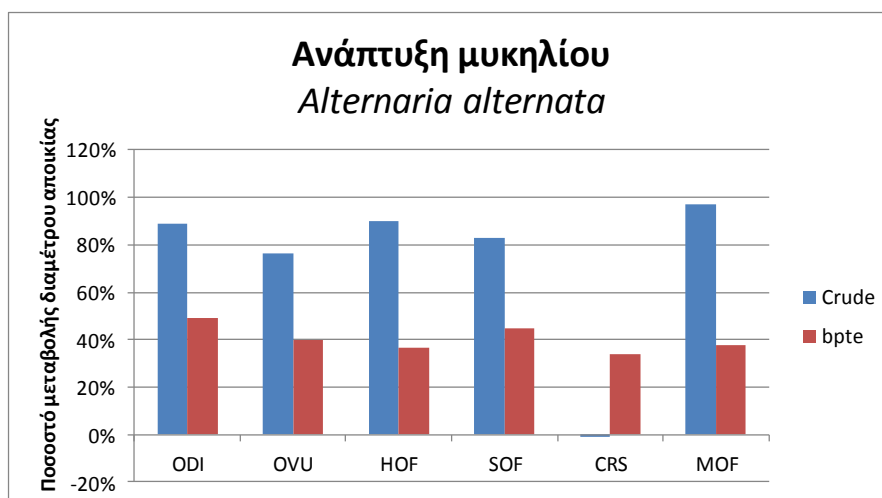
Στα μικτά (crude) εκχυλίσματα (**Πιν. II.2.3**, **Σχ. II.2.5**, **II.2.6**) το φασκόμηλο βρέθηκε πιο δραστικό (**Πιν. II.2.4**) στην ενίσχυση της παραγωγής κονιδίων (+65,0%), ακολουθούμενο από

το μελισσόχορτο (+43,9%) και το δίκταμο (+35,4%). Αντίθετα τα εκχυλίσματα του κρόκου, της ρίγανης και του ύσσωπου είχαν αντίθετη δράση έναντι των άλλων μικτών εκχυλισμάτων παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των κονιδίων σε ποσοστά (-72.31%), (-50,0%) και (-33,3%) αντίστοιχα.

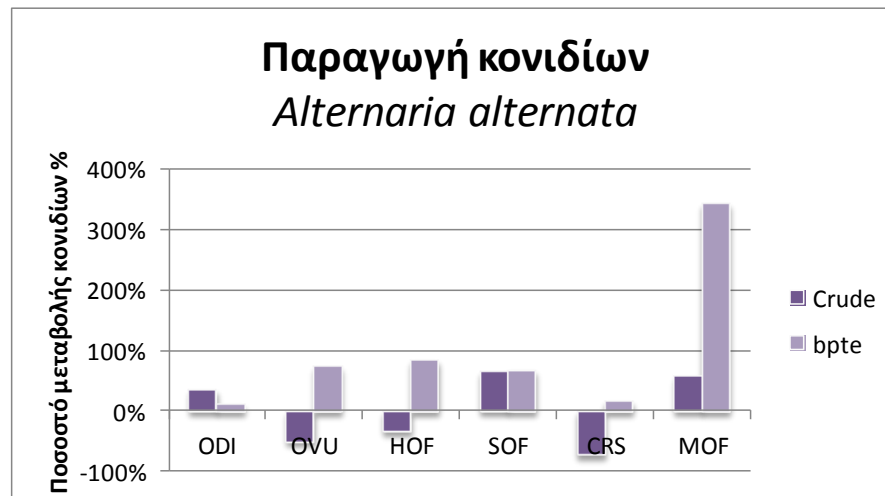
**Πίνακας II.2.4** Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών και αμιγώς υδατικών -bpte εκχυλισμάτων του μύκητα *Alternaria alternata*

	Ανάπτυξη μυκηλίου		Παραγωγή κονιδίων	
	Μικτό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα	Μικτό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα
	crude	-bpte	crude	-bpte
<i>O. dictamnus</i> (ODI)	88,94 %	49,08 %	35,12 %	11,65 %
<i>O. vulgare</i> (OVU)	76,38 %	39,73 %	-50,00 %	74,04 %
<i>H. officinalis</i> (HOF)	89,70 %	36,36 %	-33,47 %	84,37 %
<i>S. officinalis</i> (SOF)	82,91 %	44,92 %	64,88 %	68,14 %
<i>C. sativus</i> (CRS)	-0,75 %	34,01 %	-72,31 %	17,40 %
<i>M. officinalis</i> (MOF)	97,24%	37,81 %	57,02 %	349,95 %

Η αντίστοιχη, δράση των υδατικών εκχυλισμάτων -bpte ήταν αποκλειστικά ενισχυτική και μάλιστα σε ιδιαίτερα σημαντικά ποσοστά (Σχ. II.2.7 και II.2.8). Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με την κονιδιογένεση το μελισσόχορτο προκάλεσε τη μεγαλύτερη αύξηση (+349,3%) και ακολουθούν ο ύσσωπος (+84,1%), η ρίγανη (+73,9%), το φασκόμηλο (+68,1%), ο κρόκος (17,4%) και το δίκταμο (+11,6%) (Πίν. II.2.4).



**Σχήμα II.2.7** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου της *Alternaria alternata* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις



**Σχήμα II.2.8** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων της *Alternaria alternata* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις

Στην περίπτωση του *Aspergillus flavus*, τα μικτά (crude) εκχυλίσματα όλων των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (Πιν. II.2.5, Σχ. II.2.9, II.2.10) που δοκιμάστηκαν δεν προκάλεσαν κάποια αξιοσημείωτη προωθητική ή παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου. Πιο συγκεκριμένα, στην ανάπτυξη του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*, μικρή προωθητική δράση (Πιν. II.2.7, Σχ. II.2.9) προκάλεσαν τα μικτά (crude) εκχυλίσματα του μελισσόχορτου (+9,82%) ακολουθούμενο από τη ρίγανη (+8,14%), τον ύσσωπο (+2,09%) και το δίκταμο (0,43%). Αντίστοιχα μικρή παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου εμφάνισαν ο κρόκος (-1,88%) και το φασκόμηλο (-0,41%).

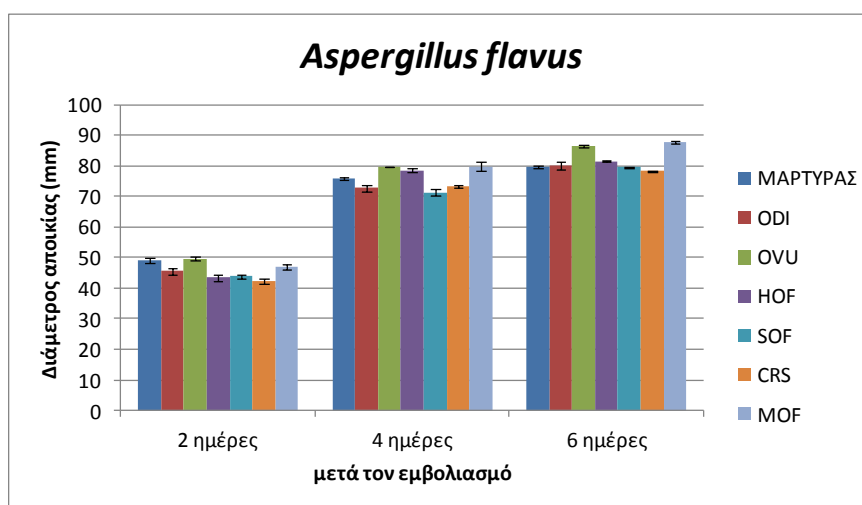
Τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα, σε αντίθεση με την ανάπτυξη του μυκηλίου, όσον αφορά στην παραγωγή κονιδίων του μύκητα *A. flavus* εμφάνισαν στο σύνολό τους, εξαιρετικά σημαντική προωθητική δράση. Στο **σχήμα II.2.10** απεικονίζεται έντονα η δράση αυτή. Πιο συγκεκριμένα, και με βάση τον **πίνακα II.2.7** το δίκταμο (ODI) προκάλεσε προώθηση της κονιδιογένεσης κατά 352,30%, η ρίγανη (OVU) κατά 263,96%, το μελισσόχορτο (MOF) κατά 234,98%, ο ύσσωπος (HOF) 219,79%, το φασκόμηλο (SOF) 133,92% και τέλος ο κρόκος (CRS) 48,41%.

Αναφορικά με την κονιδιογένεση του *A. flavus*, τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν την αντίθετη δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα μικτά. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα μείωσαν την κονιδιογένεση στον *Aspergillus*, με το μελισσόχορτο (Πιν. II.2.7) (MOF) να προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση (-45,59%) και το φασκόμηλο (SOF) τη μικρότερη μείωση (-20,76%).

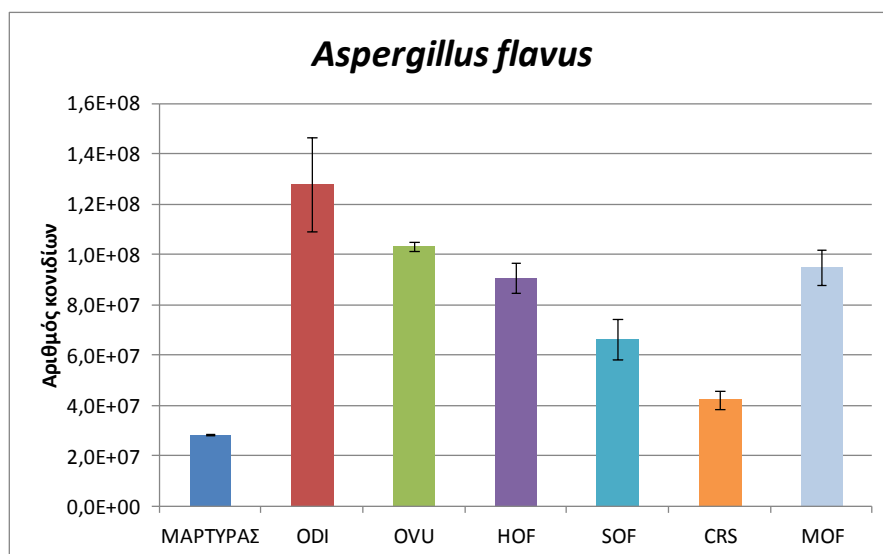
**Πίνακας II.2.5** Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Aspergillus flavus*.

Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)			Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>
	2 ημέρες	4 ημέρες	6 ημέρες	
Μάρτυρας	49,17±0,88 <sup>d</sup>	75,67±0,44 <sup>b</sup>	79,83±0,44 <sup>a,b</sup>	2,83*10 <sup>7</sup> ±0,03*10 <sup>7 a,b</sup>
(ODI) <i>O. dictamnus</i>	45,50±1,01 <sup>b,c</sup>	72,67±1,17 <sup>a</sup>	80,17±1,21 <sup>b,c</sup>	12,80*10 <sup>7</sup> ±1,89*10 <sup>7 c</sup>
(OVU) <i>O. vulgare</i>	49,67±0,73 <sup>d</sup>	79,67±0,17 <sup>c</sup>	86,33±0,44 <sup>d</sup>	10,30*10 <sup>7</sup> ±0,19*10 <sup>7 c</sup>
(HOF) <i>H. officinalis</i>	43,50±1,01 <sup>a,b</sup>	78,50±0,58 <sup>c</sup>	81,50±0,29 <sup>c</sup>	9,05*10 <sup>7</sup> ±0,61*10 <sup>7 c</sup>
(SOF) <i>S. officinalis</i>	43,83±0,67 <sup>a,b</sup>	71,33±0,93 <sup>a</sup>	79,50±0,29 <sup>a,b</sup>	6,62*10 <sup>7</sup> ±0,80*10 <sup>7 b</sup>
(CRS) <i>C. sativus</i>	42,17±0,88 <sup>a</sup>	73,33±0,61 <sup>a</sup>	78,33±0,17 <sup>a</sup>	4,23*10 <sup>7</sup> ±0,36*10 <sup>7 c</sup>
(MOF) <i>M. officinalis</i>	46,83±0,88 <sup>c</sup>	79,83±1,33 <sup>c</sup>	87,67±0,44 <sup>d</sup>	9,48*10 <sup>7</sup> ±0,70*10 <sup>7 c</sup>

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.



**Σχήμα II.2.9** Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του *Aspergillus flavus* για κάθε επέμβαση

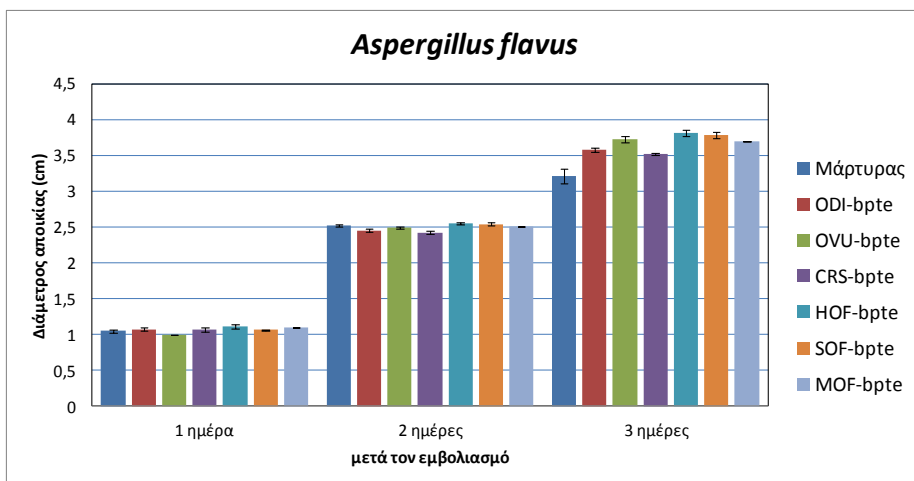


**Σχήμα II.2.10** Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm<sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του *Aspergillus flavus* σε κάθε επέμβαση

**Πίνακας II.2.6** Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων -bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Aspergillus flavus*.

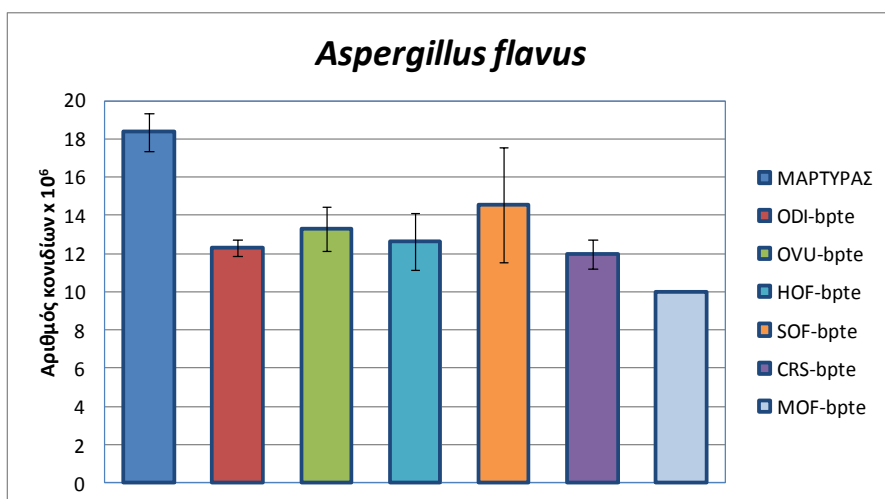
Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)			Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>	
	-bpte	1 ημέρα	2 ημέρες		3 ημέρες
Μάρτυρας		10,50 ± 0,20 <sup>a,b</sup>	25,30 ± 0,10 <sup>b,c</sup>	32,10 ± 1,00	1,83*10 <sup>6</sup> ± 0,10*10 <sup>6c</sup>
(ODI) <i>O. dictamnus</i>		10,80 ± 0,30 <sup>b,c</sup>	24,50 ± 0,20 <sup>a,b</sup>	35,80 ± 0,30	1,23*10 <sup>6</sup> ± 0,04*10 <sup>6a</sup>
(OVU) <i>O. vulgare</i>		10,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	24,90 ± 0,10 <sup>b,c</sup>	37,30 ± 0,50	1,33*10 <sup>6</sup> ± 0,12*10 <sup>6a,b</sup>
(CRS) <i>C. sativus</i>		10,60 ± 0,30 <sup>b,c</sup>	24,30 ± 0,30 <sup>a</sup>	35,30 ± 0,10	1,20*10 <sup>6</sup> ± 0,76*10 <sup>6a,b</sup>
(HOF) <i>H. officinalis</i>		11,10 ± 0,20 <sup>c</sup>	25,50 ± 0,20 <sup>d</sup>	38,10 ± 0,40	1,26*10 <sup>6</sup> ± 0,15*10 <sup>6b,c</sup>
(SOF) <i>S. officinalis</i>		10,60 ± 0,10 <sup>b,c</sup>	25,40 ± 0,20 <sup>c</sup>	37,90 ± 0,40	1,46*10 <sup>6</sup> ± 0,30*10 <sup>6a,b</sup>
(MOF) <i>M. officinalis</i>		11,00 ± 0,00 <sup>b,c</sup>	25,00 ± 0,00 <sup>b,c</sup>	37,00 ± 0,00	1,00*10 <sup>6</sup> ± 0,00 <sup>a</sup>

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.



Σχ. II.2.11 Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του *Aspergillus flavus* για κάθε -bpte επέμβαση

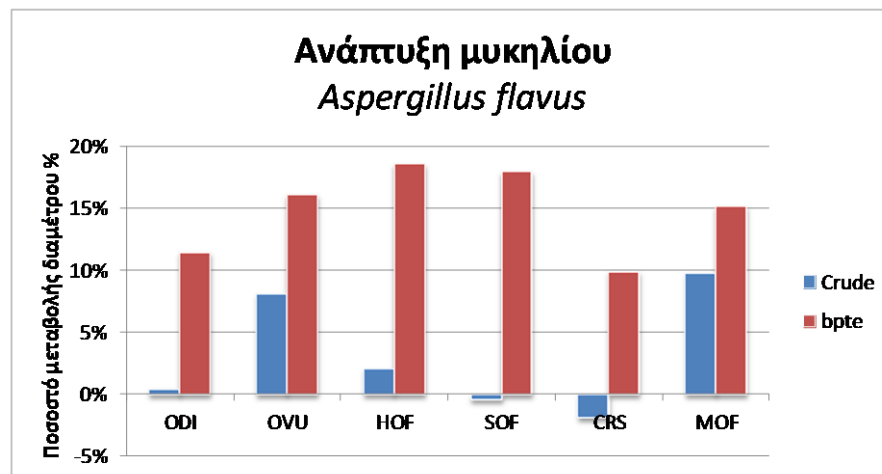
Τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα -bpte (Πιν. II.2.6, Σχ. II.2.11, Σχ. II.2.12) εμφάνισαν διαφοροποιήσεις ως προς τη δράση τους στην ανάπτυξη του μυκηλίου και την κονιδιογένεση σε σχέση με τα αντίστοιχα μικτά εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα προκάλεσαν ενίσχυση της ανάπτυξης του μυκηλίου με τη μεγαλύτερη ενίσχυση (Πιν. II.2.7) να προκαλείται από το εκχύλισμα του ύσσωπου (HOF) 18.69% και τη μικρότερη από το εκχύλισμα του κρόκου (CRS) 9.97%.



Σχήμα II.2.12 Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm<sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του *Aspergillus flavus* σε κάθε -bpte επέμβαση

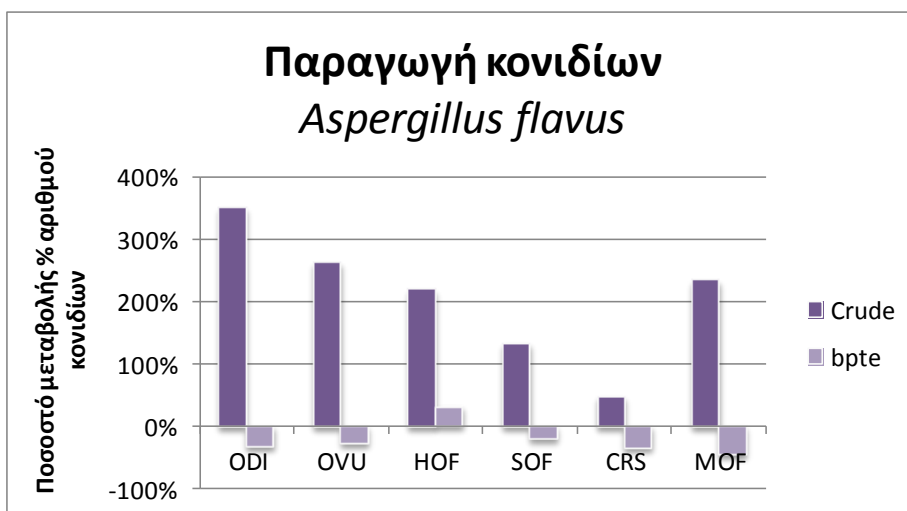
**Πίνακας II.2.7** Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών και αμιγώς υδατικών -bpte εκχυλισμάτων στο μύκητα *Aspergillus flavus*

	Ανάπτυξη μυκηλίου		Παραγωγή κονιδίων	
	Μικτό εκχύλισμα	Υδατικό	Μικτό	Υδατικό
	crude	εκχύλισμα -bpte	εκχύλισμα crude	εκχύλισμα -bpte
(ODI) <i>O. dictamnus</i>	0,43 %	11,53 %	352,30 %	-32,96 %
(OVU) <i>O. vulgare</i>	8,14 %	16,20 %	263,96 %	-27,55 %
(HOF) <i>H. officinalis</i>	2,09 %	18,69 %	219,79 %	-31,30 %
(SOF) <i>S. officinalis</i>	-0,41 %	18,07 %	133,92 %	-20,76 %
(CRS) <i>C. sativus</i>	-1,88 %	9,97 %	48,41 %	-34,88 %
(MOF) <i>M. officinalis</i>	9,82 %	15,26 %	234,98 %	-45,59 %

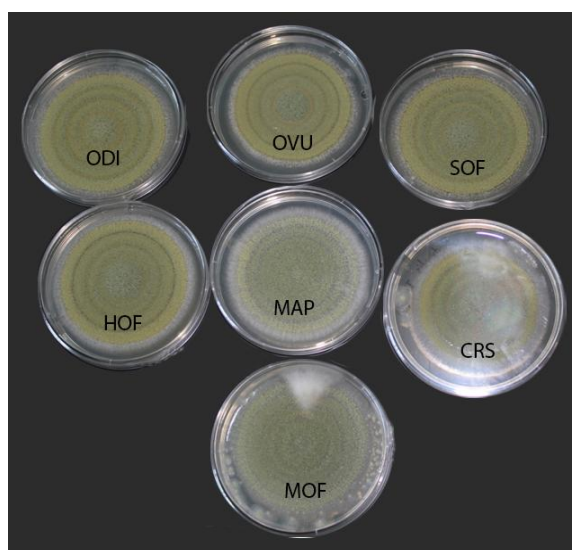


**Σχ. II.2.13** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου του *Aspergillus flavus* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις





**Σχήμα II. 2.14** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων του *Aspergillus flavus* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις



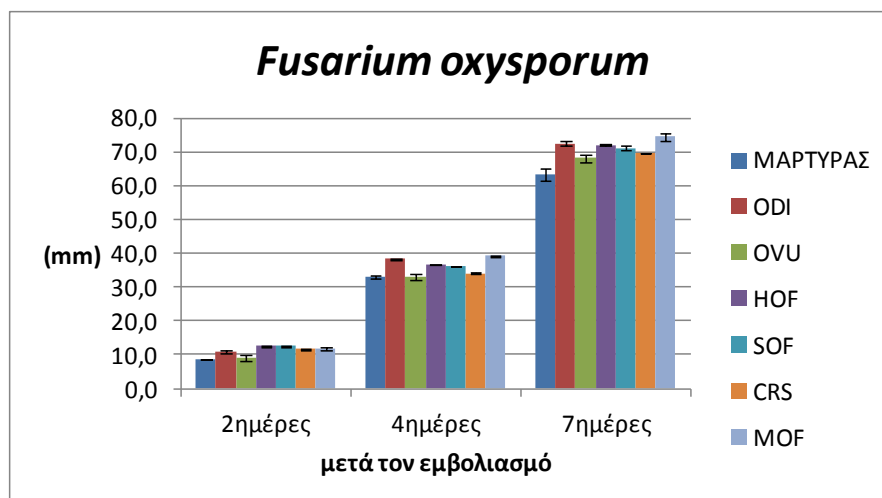
**Εικόνα II.2.4** Οι καλλιέργειες του *Aspergillus flavus* στο τέλος του πειράματος (crude extracts)

**Πίνακας II.2.8** Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)			Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>
	2 ημέρες	4 ημέρες	7 ημέρες	
Μάρτυρας	8,67±0,17 <sup>a</sup>	33,00±0,50 <sup>a</sup>	63,17±1,76 <sup>c</sup>	1,20*10 <sup>6</sup> ±0,03*10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>
(ODI) <i>O. dictamnus</i>	10,83±0,33 <sup>d</sup>	38,33±0,17 <sup>c</sup>	72,50±0,58 <sup>b,c</sup>	2,24*10 <sup>6</sup> ±0,04*10 <sup>6</sup> <sup>d</sup>
(OVU) <i>O. vulgare</i>	9,17±0,33 <sup>a</sup>	33,17±0,17 <sup>a</sup>	68,17±1,86 <sup>a</sup>	4,15*10 <sup>6</sup> ±0,58*10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>
(HOF) <i>H. officinalis</i>	12,51±0,29 <sup>c</sup>	36,67±0,17 <sup>b</sup>	72,00±0,29 <sup>b,c</sup>	1,47*10 <sup>6</sup> ±0,16*10 <sup>6</sup> <sup>a,b</sup>
(SOF) <i>S. officinalis</i>	12,51±0,29 <sup>c</sup>	36,17±0,17 <sup>b</sup>	71,17±0,67 <sup>a,b</sup>	2,52*10 <sup>6</sup> ±0,27*10 <sup>6</sup> <sup>a,b</sup>
(CRS) <i>C. sativus</i>	11,67±0,17 <sup>b</sup>	34,17±0,17 <sup>d</sup>	69,50±0,00 <sup>a,b</sup>	0,88*10 <sup>6</sup> ±0,06*10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
(MOF) <i>M. officinalis</i>	11,83±0,33 <sup>b,c</sup>	39,17±0,17 <sup>e</sup>	74,50±1,00 <sup>c</sup>	2,06*10 <sup>6</sup> ±0,22*10 <sup>6</sup> <sup>a,b</sup>

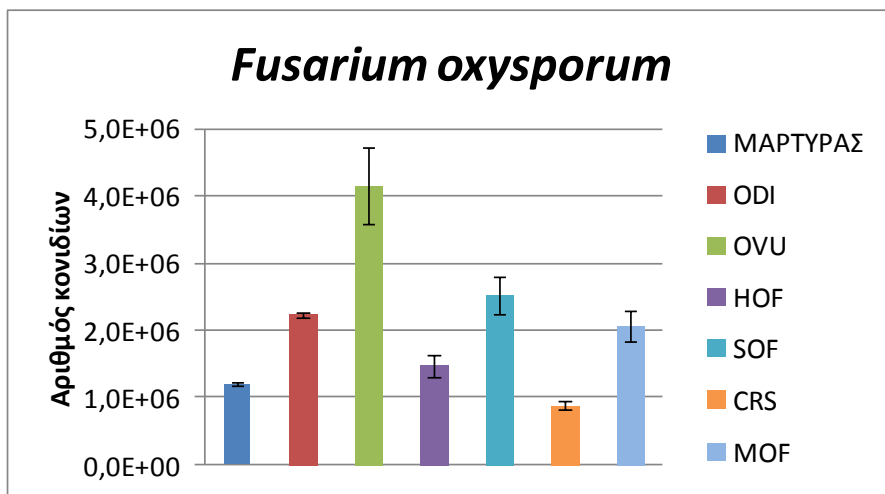
Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

Στην περίπτωση του *Fusarium oxysporum* (Πιν. II.2.8), όλα τα μικτά (crude) εκχυλίσματα εμφάνισαν μικρή προωθητική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου (Σχ. II.2.15), με τη μεγαλύτερη εξ αυτών (Πιν. II.2.10) να εμφανίζει το μελισσόχορτο (MOF) +17,88% και να ακολουθεί το δίκταμο (ODI) +14,72%, ο ύσσωπος (HOF) +13.92%, το φασκόμηλο (SOF) +12,66%, ο κρόκος (CRS) +9.97% και τέλος η ρίγανη (OVU) με +7,91%.

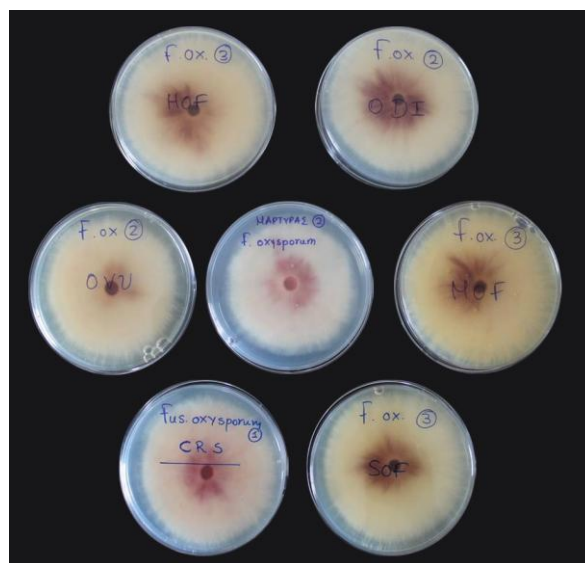


**Σχήμα. II.2.15** Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* για κάθε επέμβαση

Τα μικτά εκχυλίσματα (crude) όσον αφορά στην επιρροή τους στην κονιδιογένεση του *Fusarium* (Πιν. II.2.8, Σχ. II.2.16) υπήρξε διαφοροποιημένη δράση των εκχυλισμάτων. Τα εκχυλίσματα από τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* ενίσχυσαν σημαντικά την κονιδιογένεση σε ποσοστά από 245,83% στην περίπτωση της ρίγανης έως 22,50% στην περίπτωση του ύσσωπου. Εξάιρεση αποτέλεσε ο κρόκος ο οποίος προκάλεσε μείωση της κονιδιογένεσης σε ποσοστό 25% (Πιν. II.2.10).



Σχήμα II.2.16 Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων/ cm<sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του *Fusarium oxysporum* σε κάθε επέμβαση



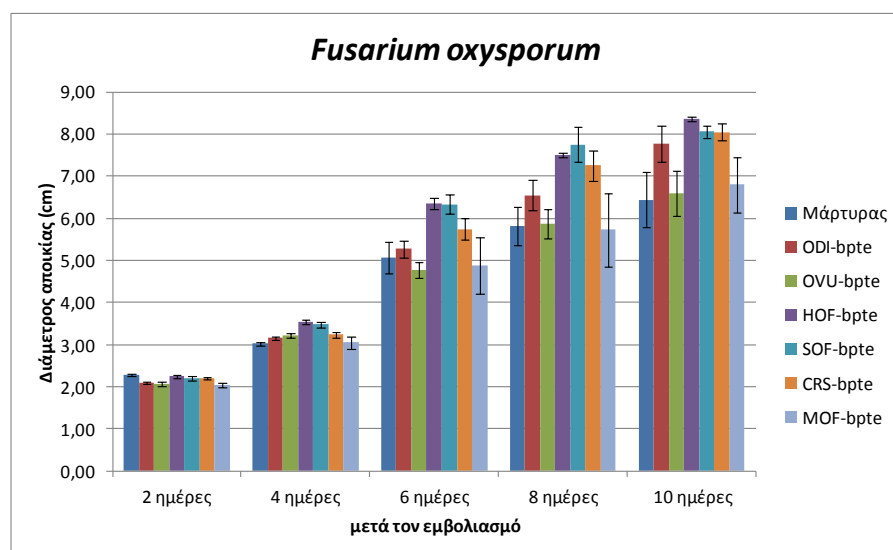
Εικόνα II.2.5 Οι καλλιέργειες του *Fusarium oxysporum* στο τέλος του πειράματος (crude extract)

**Πίνακας II.2.9** Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων -bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Fusarium oxysporum*

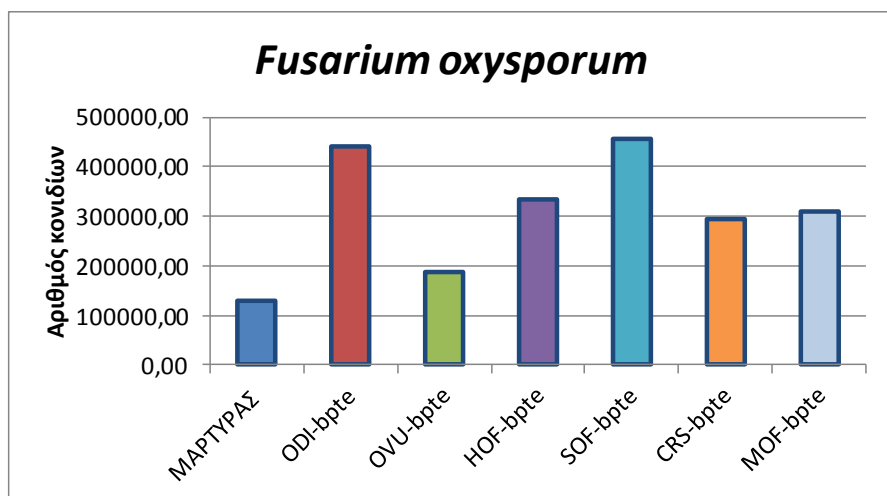
Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)					Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>	
	-bpte	2 ημέρες	4 ημέρες	6 ημέρες	8 ημέρες		10 ημέρες
Μάρτυρας		22,80±0,30 <sup>c</sup>	30,30±0,40 <sup>a</sup>	50,60±3,70 <sup>a,b</sup>	58,10±4,60 <sup>a</sup>	64,40±6,50 <sup>a</sup>	1,28*10 <sup>5</sup> ±0,07*10 <sup>5a</sup>
(ODI) <i>O. dictamnus</i>		21,00±0,20 <sup>a,b</sup>	31,60±0,40 <sup>a</sup>	52,80±2,00 <sup>a,b</sup>	65,50±3,60 <sup>a,c</sup>	77,70±4,30 <sup>b,c</sup>	4,41*10 <sup>5</sup> ±0,12*10 <sup>5d</sup>
(OVU) <i>O. vulgare</i>		20,80±0,60 <sup>a,b</sup>	32,10±0,60 <sup>a</sup>	47,80±2,00 <sup>a</sup>	58,80±3,50 <sup>a</sup>	66,00±5,40 <sup>a,b</sup>	1,86*10 <sup>5</sup> ±0,16*10 <sup>5a,b</sup>
(HOF) <i>H. officinalis</i>		22,50±0,50 <sup>c</sup>	35,40±0,60 <sup>b</sup>	63,60±1,30 <sup>d,b</sup>	75,00±0,50 <sup>c</sup>	83,60±0,60 <sup>c</sup>	3,34*10 <sup>5</sup> ±0,23*10 <sup>5d</sup>
(SOF) <i>S. officinalis</i>		22,00±0,50 <sup>b,c</sup>	34,80±0,80 <sup>b</sup>	63,40±2,30 <sup>c,d</sup>	77,50±4,10 <sup>c</sup>	80,60±1,40 <sup>c</sup>	4,57*10 <sup>5</sup> ±0,94*10 <sup>5c,d</sup>
(CRS) <i>C. sativus</i>		22,00±0,40 <sup>b,c</sup>	32,40±0,70 <sup>a</sup>	57,50±2,50 <sup>b,c</sup>	72,50±3,50 <sup>b,c</sup>	80,50±2,00 <sup>c</sup>	2,94*10 <sup>5</sup> ±0,72*10 <sup>5b,c</sup>
(MOF) <i>M. officinalis</i>		20,50±0,50 <sup>a</sup>	30,50±1,50 <sup>a</sup>	48,80±6,80 <sup>a,b</sup>	57,30±8,70 <sup>a</sup>	68,00±6,50 <sup>a</sup>	3,08*10 <sup>5</sup> ±0,13*10 <sup>5b,c</sup>

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

Τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα (-bpte) όπως και τα μικτά, στην περίπτωση του *Fusarium oxysporum* ενίχυσαν στο σύνολό τους την ανάπτυξη του μυκηλίου σε ελαφρώς μεγαλύτερο εύρος απ'ότι τα μικτά από 29,81% για τον ύσσωπο έως 5,59% για το μελισσόχορτο (Πιν. II.2.10, Σχ. II.2.17), αλλά με διαφοροποίηση ως προς τη σειρά κατάταξης των εκχυλισμάτων βάση της ποσοστιαίας τους επίδρασης.



**Σχήμα II. 2.17** Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* για κάθε -bpte επέμβαση

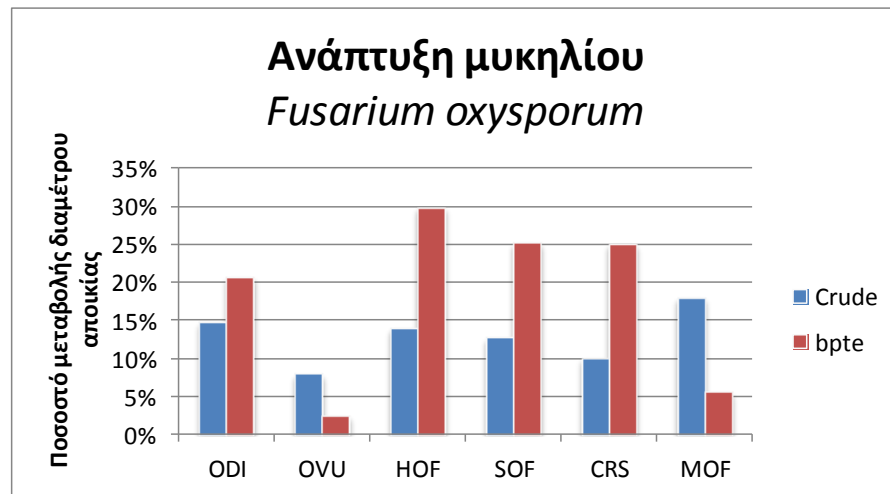


**Σχήμα. II.2.18** Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων/ cm<sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του *Fusarium oxysporum* σε κάθε -bpte επέμβαση

Στην κονιδιογένεση, όλα ανεξαιρέτως τα αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν σημαντική προωθητική δράση από 257,03% έως 45,31%. Και στην περίπτωση αυτή, η σειρά κατάταξης σε σχέση με την ποσοστιαία τους επίδραση είναι διαφοροποιημένη σε σχέση με αυτή των μικτών εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ενώ το μικτό εκχύλισμα της ρίγανης προκάλεσε τη μεγαλύτερη ποσοστιαία προώθηση της κονιδιογένεσης (+245,83%), το αντίστοιχο αμιγώς υδατικό έδωσε το μικρότερο ποσοστό +45,31%.

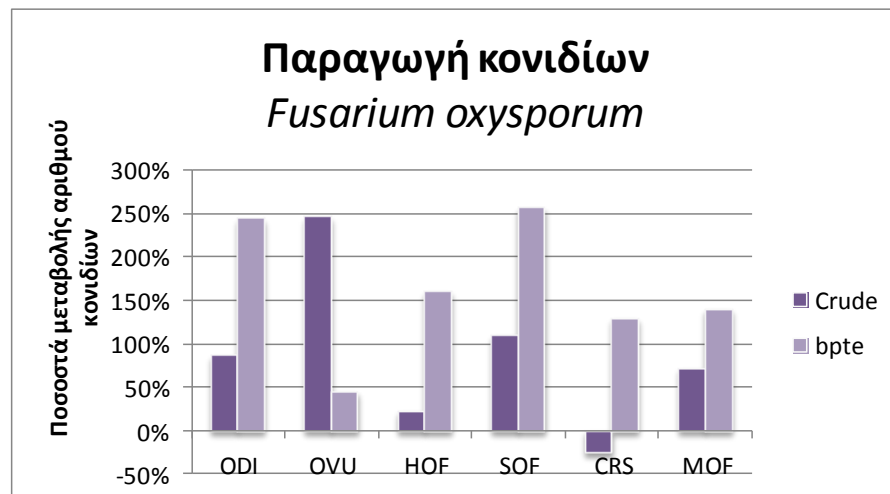
**Πίνακας II.2.10** Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών και αμιγώς υδατικών -bpte εκχυλισμάτων στο μύκητα *Fusarium oxysporum*

	Ανάπτυξη μυκηλίου		Παραγωγή κονιδίων	
	Μικτό εκχύλισμα crude	Υδατικό εκχύλισμα -bpte	Μικτό εκχύλισμα crude	Υδατικό εκχύλισμα -bpte
(ODI) <i>O. dictamnus</i>	14,72 %	20,65 %	86,67 %	244,53 %
(OVU) <i>O. vulgare</i>	7,91 %	2,48 %	245,83 %	45,31 %
(HOF) <i>H. officinalis</i>	13,92 %	29,81 %	22,50 %	160,94 %
(SOF) <i>S. officinalis</i>	12,66 %	25,16 %	110,00 %	257,03 %
(CRS) <i>C. sativus</i>	9,97 %	25,00 %	-25,00 %	129,69 %
(MOF) <i>M. officinalis</i>	17,88 %	5,59 %	71,67 %	140,63 %



**Σχήμα II. 2.19** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις

Οι μεγάλες διαφοροποιήσεις στη δράση μεταξύ μικτών και υδατικών εκχυλισμάτων καταδεικνύουν το ρόλο του πτητικού κλάσματος των εκχυλισμάτων ως προς τη βιολογική τους δράση επί του *Fusarium oxysporum* ο οποίος αποδίδεται και ποσοτικά μέσω τα εκτίμησης της αντίστοιχης συνέργειας που ακολουθεί παρακάτω.



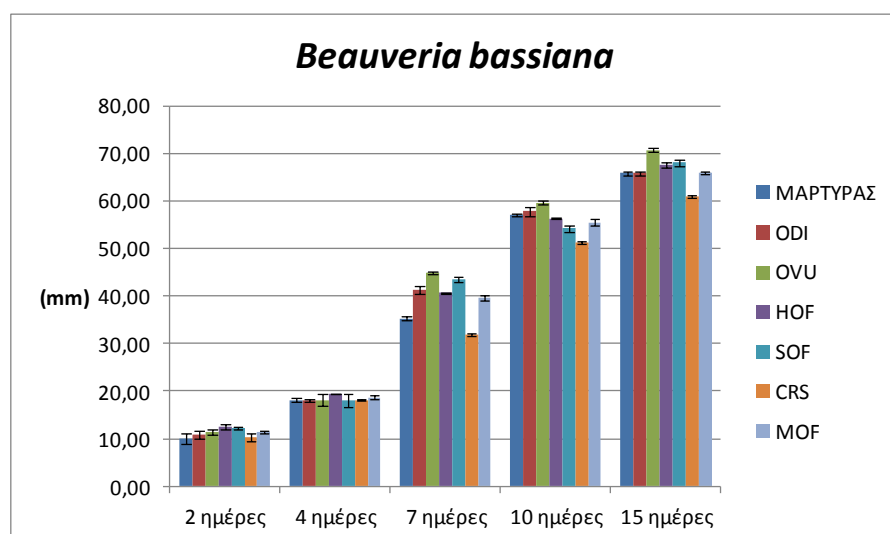
**Σχήμα II.2.20** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων του *Fusarium oxysporum* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις

**Πίνακας II.2.11** Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Beauveria bassiana*

Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)					Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>
	2 ημέρες	4 ημέρες	7 ημέρες	10 ημέρες	15 ημέρες	
Μάρτυρας	10,00±1,04 <sup>a</sup>	18,17±0,33	35,33±0,44 <sup>d</sup>	57,00±0,29 <sup>c,d</sup>	65,83±0,44 <sup>a</sup>	8,03*10 <sup>5</sup> ±0,18*10 <sup>5</sup> c,d
(ODI) <i>O. dictamnus</i>	10,83±0,88 <sup>a,b</sup>	18,00±0,29	41,33±0,93 <sup>b</sup>	57,83±0,93 <sup>d</sup>	65,83±0,33 <sup>a</sup>	22,3*10 <sup>5</sup> ±0,40*10 <sup>5</sup> f
(OVU) <i>O. vulgare</i>	11,50±0,58 <sup>a,b</sup>	18,17±1,33	44,83±0,33 <sup>c</sup>	59,67±0,33 <sup>e</sup>	70,67±0,58 <sup>c</sup>	13,9*10 <sup>5</sup> ±0,21*10 <sup>5</sup> e
(HOF) <i>H. officinalis</i>	12,50±0,58 <sup>c</sup>	19,50±0,00	40,67±0,17 <sup>a,b</sup>	56,33±0,17 <sup>b,c</sup>	67,50±0,44 <sup>b</sup>	3,78*10 <sup>5</sup> ±0,35*10 <sup>5</sup> a
(SOF) <i>S. officinalis</i>	12,17±0,33 <sup>b,c</sup>	18,00±1,41	43,50±0,58 <sup>c</sup>	54,17±0,58 <sup>a</sup>	68,00±0,76 <sup>b</sup>	7,32*10 <sup>5</sup> ±0,72*10 <sup>5</sup> b,c
(CRS) <i>C. sativus</i>	10,33±0,73 <sup>a,b</sup>	18,17±0,17	32,00±0,29 <sup>e</sup>	51,33±0,29 <sup>f</sup>	61,00±0,29 <sup>d</sup>	8,94*10 <sup>5</sup> ±0,69*10 <sup>5</sup> d
(MOF) <i>M. officinalis</i>	11,50±0,29 <sup>a,b</sup>	18,67±0,44	39,67±0,58 <sup>a</sup>	55,50±0,60 <sup>a,b</sup>	66,00±0,29 <sup>a</sup>	4,77*10 <sup>5</sup> ±0,65*10 <sup>5</sup> a

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

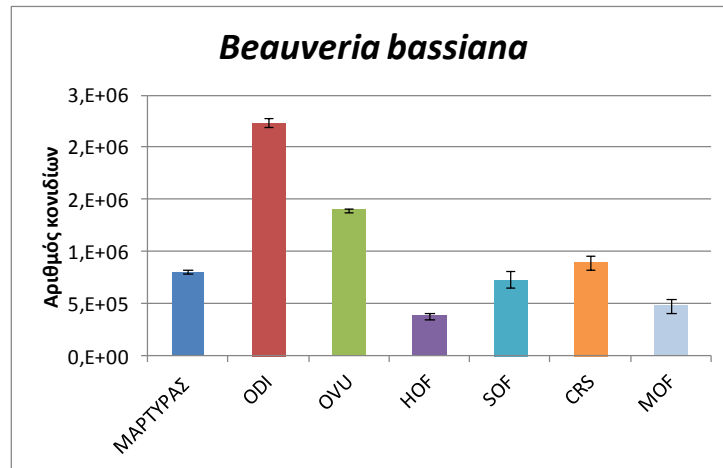
Στην περίπτωση της *Beauveria bassiana* η οποία είναι εντομοπαθογόνος μύκητας και χρησιμοποιείται στη βιολογική γεωργία για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων ασθενειών η δράση των μικτών εκχυλισμάτων ήταν παρόμοια με αυτή στο μύκητα *F. oxysporum* (Πίν. II.2.11).



**Σχήμα II.2.21** Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της *Beauveria bassiana* για κάθε επέμβαση

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα II.2.21, όλα τα μικτά (crude) εκχυλίσματα των

*Lamiaceae* έδειξαν ελαφρά προωθητική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου με τη μεγαλύτερη συγκριτικά να την εμφανίζει η ρίγανη (OVU) +7.35% και να ακολουθούν το φασκόμηλο (SOF) +3.30%, ο ύσσωπος (HOF) +2.54% και το μελισσόχορτο (MOF) +0,26%. Το δίκταμο (ODI) δεν προκάλεσε καμία μεταβολή. Το μικτό εκχύλισμα του κρόκου προκάλεσε παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του μυκηλίου της *Beauveria* σε ποσοστό -7,34%.



**Σχήμα II.2.22** Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων/ cm<sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) της *Beauveria bassiana* σε κάθε επέμβαση μικτών εκχυλισμάτων



**Εικόνα II.2.6** Οι καλλιέργειες της *Beauveria bassiana* στο τέλος του πειράματος, crude extracts

Ο ύσσωπος (HOF), το μελισσόχορτο (MOF) και το φασκόμηλο (SOF) ήταν τα μόνα μικτά εκχυλίσματα που είχαν παρεμποδιστική δράση στη sporogénese της *B. bassiana* (Πιν. II.2.13, Σχ. II.2.22) σε ποσοστά -52.93, -40.60, και -8.84% αντίστοιχα. Αντίθετα, το μικτό



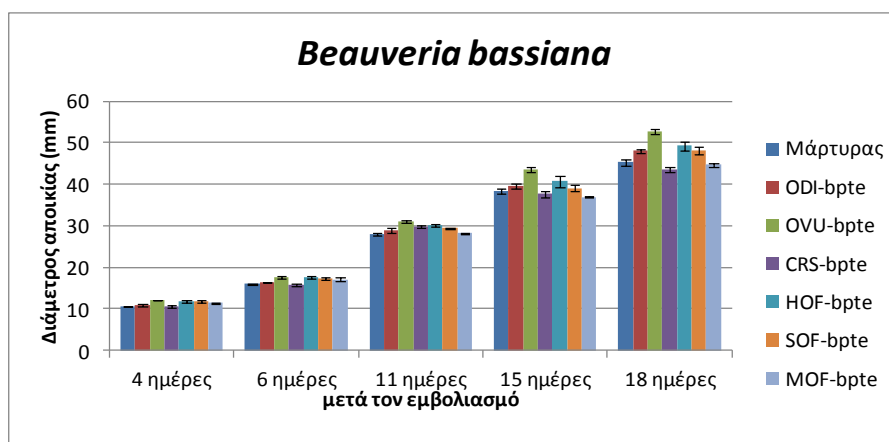
εκχύλισμα του δίκταμου (ODI) ενίσχυσε σημαντικά τη σποριογένεση της *B. bassiana* σε ποσοστό της τάξης του 178,95%, κι ακολούθησε, με μικρότερο όμως ποσοστό, ο κρόκος (CRS) 11.33%.

**Πίνακας II.2.12** Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων –bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *Beauveria bassiana*

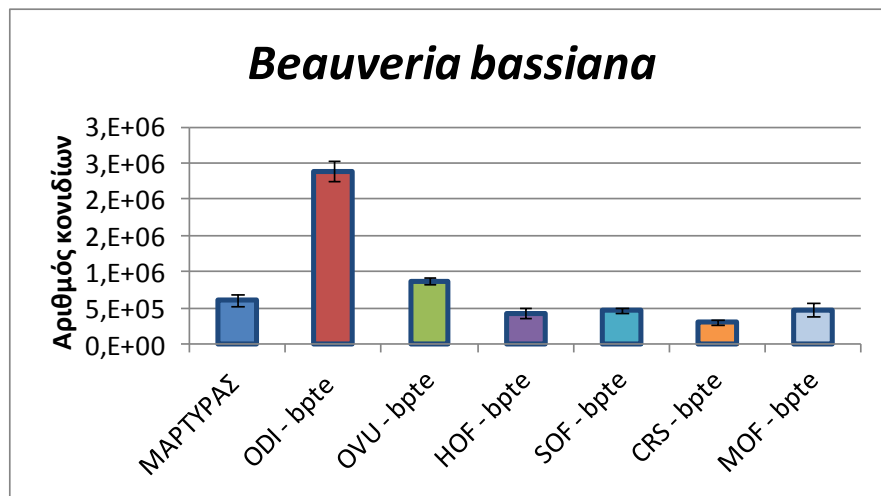
Επέμβαση	Διάμετρος μυκηλίου (mm)					Παραγωγή κονιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>	
	-bpte	4 ημέρες	6 ημέρες	11 ημέρες	15 ημέρες		18 ημέρες
Μάρτυρας		10,63±0,13 <sup>a</sup>	16,00±0,20 <sup>a,b</sup>	28,00±0,20 <sup>a</sup>	38,33±0,67 <sup>a,b</sup>	45,25±0,72 <sup>b</sup>	6,07*10 <sup>5</sup> ±0,78*10 <sup>5 b</sup>
(ODI) <i>O. dictamnus</i>		10,88±0,38 <sup>a,b</sup>	16,50±0,00 <sup>b,c</sup>	28,88±0,72 <sup>a</sup>	39,63±0,52 <sup>b,e</sup>	48,00±0,46 <sup>c</sup>	23,90*10 <sup>5</sup> ±1,42*10 <sup>5 d</sup>
(OVU) <i>O. vulgare</i>		12,00±0,00 <sup>c</sup>	17,50±0,29 <sup>d</sup>	31,00±0,20 <sup>c</sup>	43,50±0,61 <sup>c</sup>	52,75±0,60 <sup>d</sup>	8,73*10 <sup>5</sup> ±0,51*10 <sup>5 c</sup>
(CRS) <i>C. sativus</i>		10,63±0,31 <sup>a</sup>	15,75±0,25 <sup>a</sup>	29,88±0,24 <sup>b</sup>	37,63±0,63 <sup>a</sup>	43,63±0,55 <sup>a</sup>	3,10*10 <sup>5</sup> ±0,35*10 <sup>5 a,b</sup>
(HOF) <i>H. officinalis</i>		11,88±0,24 <sup>c</sup>	17,63±0,24 <sup>d</sup>	30,25±0,32 <sup>b,c</sup>	40,75±1,31 <sup>e</sup>	49,25±1,11 <sup>c</sup>	4,28*10 <sup>5</sup> ±0,72*10 <sup>5 a,b</sup>
(SOF) <i>S. officinalis</i>		11,88±0,24 <sup>c</sup>	17,38±0,24 <sup>d</sup>	29,38±0,24 <sup>b</sup>	39,13±0,75 <sup>b,e</sup>	48,25±0,95 <sup>c</sup>	4,72*10 <sup>5</sup> ±0,43*10 <sup>5 a</sup>
(MOF) <i>M. officinalis</i>		11,38±0,24 <sup>b,c</sup>	17,13±0,24 <sup>c,d</sup>	28,17±0,17 <sup>a</sup>	37,00±0,29 <sup>a</sup>	44,67±0,44 <sup>a,b</sup>	4,82*10 <sup>5</sup> ±0,84*10 <sup>5 a,b</sup>

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (P≤ 0.05), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

Τα υδατικά εκχυλίσματα (-bpte) στην περίπτωση της *Beauveria bassiana*, όσον αφορά την ανάπτυξη του μυκηλίου, δεν προκάλεσαν κάποια σημαντική μεταβολή εκτός από τη ρίγανη (OVU) που προώθησε την ανάπτυξη του μυκηλίου κατά 16,57%.



**Σχήμα II 2.23** Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της *Beauveria bassiana* για κάθε –bpte επέμβαση



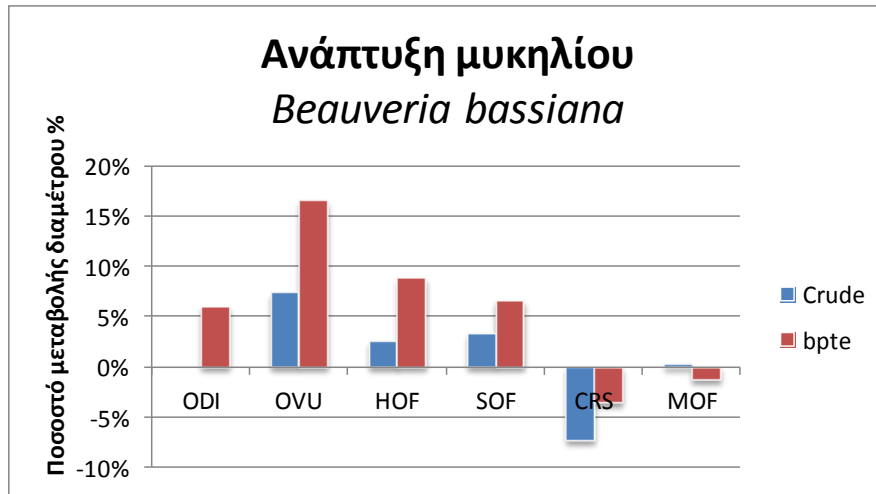
**Σχήμα II.2.24** Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm<sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) της *Beauveria bassiana* σε κάθε -bpte επέμβαση

**Πίνακας II.2.13** Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών (α) και αμιγώς υδατικών (β) -bpte εκχυλισμάτων στην *Beauveria bassiana*

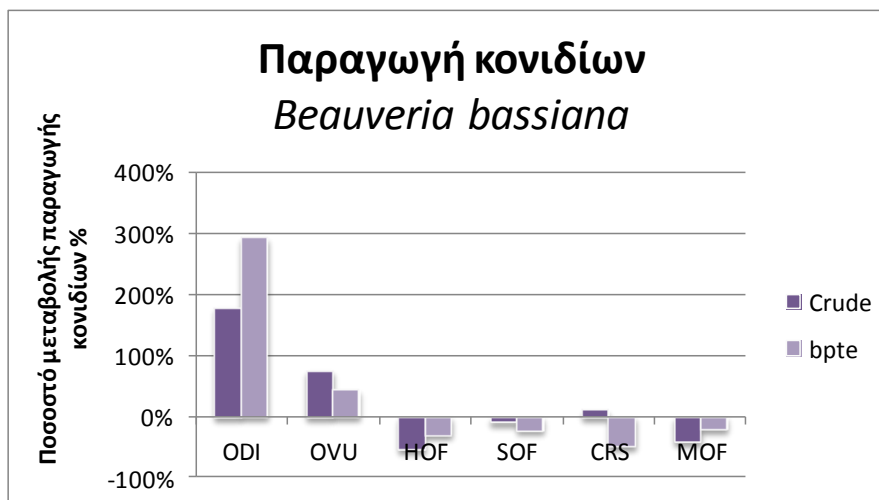
	Ανάπτυξη μυκηλίου		Παραγωγή κονιδίων	
	Μικτό εκχύλισμα crude	Υδατικό εκχύλισμα -bpte	Μικτό εκχύλισμα crude	Υδατικό εκχύλισμα -bpte

(ODI) <i>O. dictamnus</i>	0	6,08	178,95	293,74
(OVU) <i>O. vulgare</i>	7,35	16,57	75,59	43,82
(HOF) <i>H. officinalis</i>	2,54	8,84	-52,93	-29,49
(SOF) <i>S. officinalis</i>	3,30	6,63	-8,84	-22,24
(CRS) <i>C. sativus</i>	-7,34	-3,58	11,33	-48,93
(MOF) <i>M. officinalis</i>	0,26	-1,28	-40,60	-20,59

Όσον αφορά στην κονιδιογένεση του μύκητα *Beauveria bassiana* από τα αμιγώς υδατικά διαλύματα ο κρόκος προκάλεσε τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση σε ποσοστό -48,93% και το δίκταμο (ODI) τη μεγαλύτερη ενίσχυση της κονιδιογένεσης σε ποσοστό +293,74% σε σχέση με το μάρτυρα (Πιν. II.2.13). Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, το αμιγώς υδατικό εκχύλισμα της ρίγανης (OVU) διατήρησε την ίδια προωθητική τάση με το μικτό, αλλά μειώθηκε το ποσοστό επίδρασης περίπου κατά το ήμισυ, και διαμορφώθηκε σε +43,82%. Αντίστοιχα ο ύσσωπος (HOF) και το μελισσόχορτο (MOF) μείωσαν τα ποσοστά παρεμπόδισης στην κονιδιογένεση κι αυτά διαμορφώθηκαν σε -29,49% και -20,59% σε σχέση με το μάρτυρα.



**Σχήμα II.2.25** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου της *Beauveria bassiana* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις



**Σχήμα II.2.26** Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων της *Beauveria bassiana* σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις

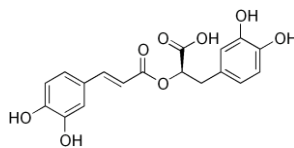
### II.2.3.2 Μελέτη των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η ανάλυση των επιμέρους εκχυλισμάτων b-pte των φυτών της οικογένειας Lamiaceae που εξετάστηκαν, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ποιοτική τους ταυτοποίηση, έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC με τη χρήση ανιχνευτή photodiode array.

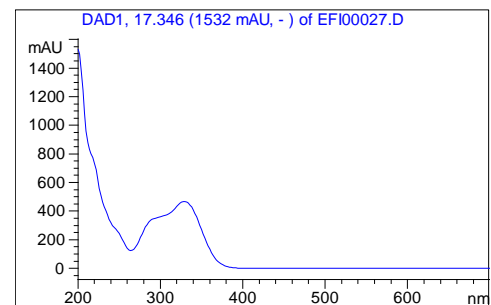
Προκειμένου για τον ποιοτικό προσδιορισμό των συστατικών, μια σειρά προτύπων σε συγκέντρωση 100 ppm, αναλύθηκαν με το ίδιο πρόγραμμα διαλυτών και βαθμιαίας έκλουσης που αναλύθηκαν και όλα τα δείγματα. Για όλα τα πρότυπα διαλύματα καταγράφηκε ο χρόνος έκλουσης και το φάσμα UV-vis αυτών με απώτερο σκοπό την ποιοτική τους ταυτοποίηση στα χρωματογραφήματα των επιμέρους εκχυλισμάτων. Τα πρότυπα που αναλύθηκαν, με το χρόνο παρακράτησης που εμφάνισαν για το συγκεκριμένο πρόγραμμα, και το φάσμα UVvis παρουσιάζεται ακολούθως (Σχ. II.2.27 – II.2.40).

#### Ροσμαρινικό οξύ

(2''R''-2-[[[2''E'']-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]]oxy]-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid



$C_{18}H_{16}O_8$

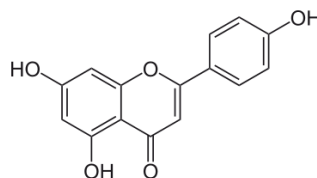


#### Retention Time: 17.334

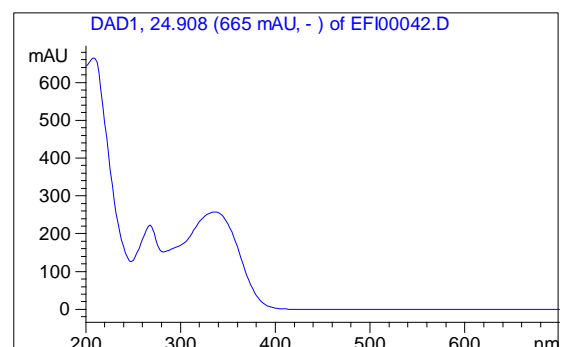
Σχήμα II.2.27 Ροσμαρινικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

#### Απιγενίνη

(5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)



$C_{15}H_{10}O_5$



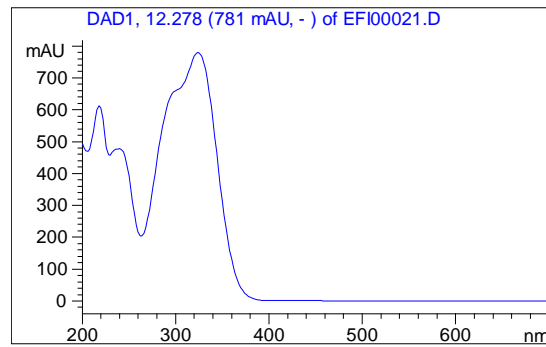
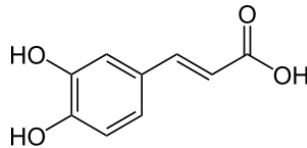
#### Retention Time: 24.883

#### Σχήμα II.

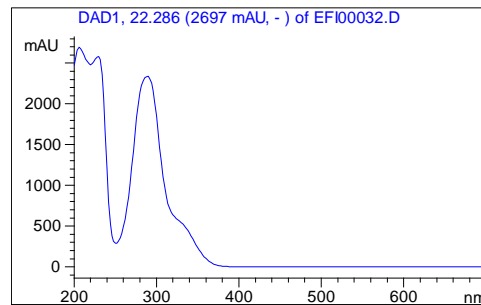
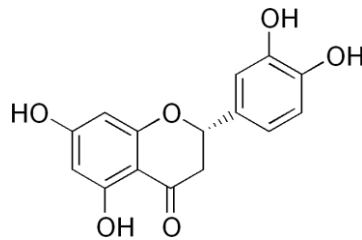
2.28 Απιγενίνη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

**Καφεϊκό οξύ**

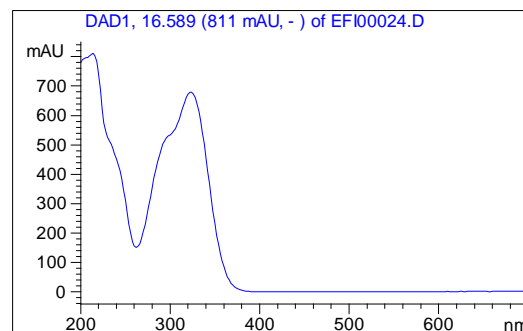
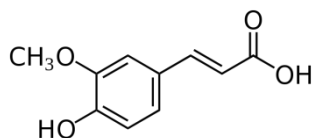
3,4-Dihydroxy-cinnamic acid

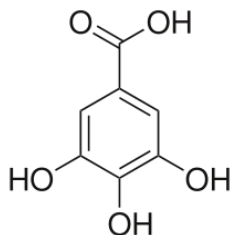
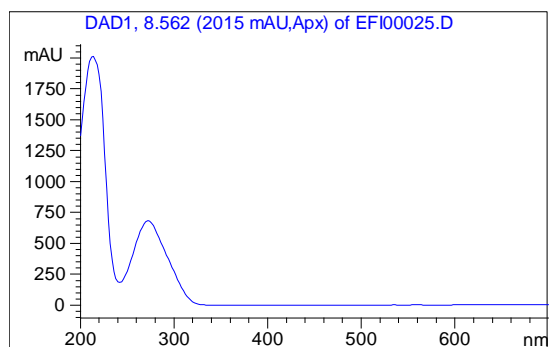
 $C_9H_8O_4$ **Retention Time: 12.235****Σχήμα II.2.29** Καφεϊκό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης**Εριοδικτυόλη**

(2S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromanone

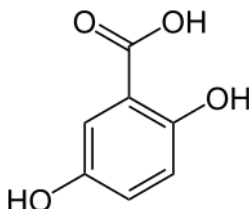
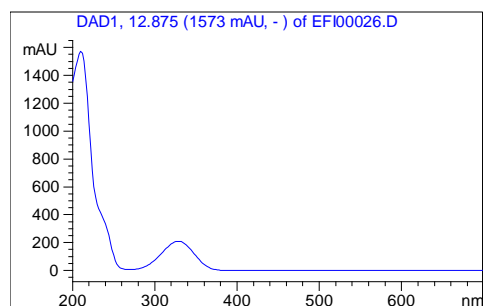
 $C_{15}H_{12}O_6$ **Retention Time: 22.291****Σχήμα II.2.30** Εριοδικτυόλη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης**Φερουλικό Οξύ**

(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid

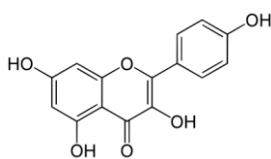
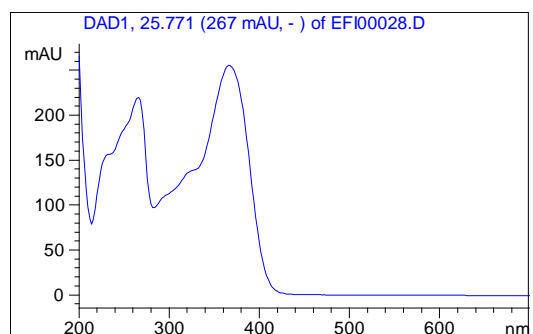
 $C_{10}H_{10}O_4$ **Retention Time: 16.657****Σχήμα II.2.31** Φερουλικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

**Γαλλικό Οξύ**3,4,5-  
trihydroxybenzoic  
acid**C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>****Retention Time:**  
**8.558**

Σχήμα II.2.32 Γαλλικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

**Γεντισικό οξύ**(2,5-  
dihydroxybenzoic  
acid)**C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>****Retention Time:**  
**12.878**  
(330 only)

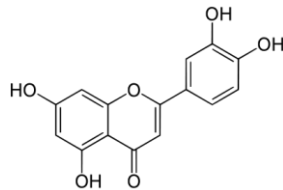
Σχήμα II.2.33 Γεντισικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

**Καεμφερόλη**(3,5,7-  
Trihydroxy-2-(4-  
hydroxyphenyl)-  
4*H*-chromen-4-  
one)**C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>****Retention Time:**  
**25.775**

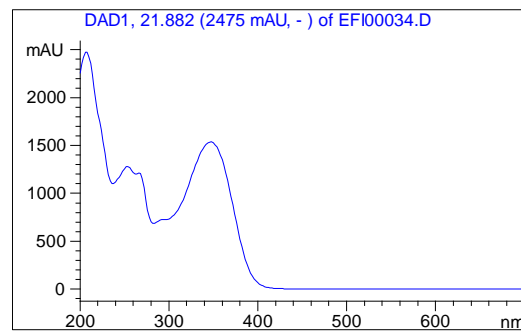
Σχήμα II.2.34 Καεμφερόλη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

**Λουτεολίνη**

(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromenone)



$C_{15}H_{10}O_6$

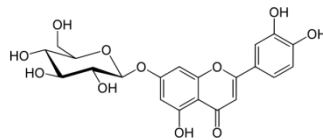


**Retention Time:**  
**21.801**

**Σχήμα II.2.35** Λουτεολίνη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

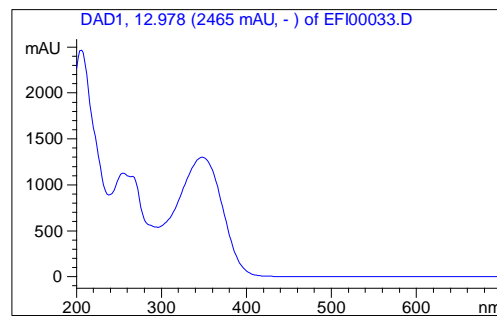
**7-O γλυκοζίτης της Λουτεολίνης**

(2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-4-one)



$C_{21}H_{20}O_{11}$

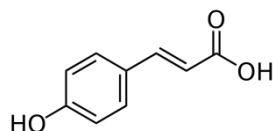
**Retention Time:**  
**12.942**



**Σχήμα II.2.36** 7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

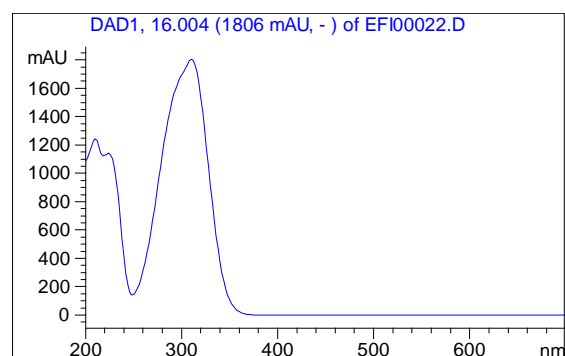
**π - Κουμαρικό οξύ**

((E)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid)



$C_9H_8O_3$

**Retention Time:**  
**16.023**

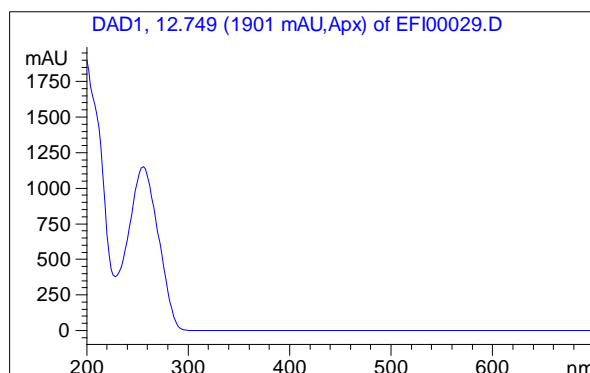
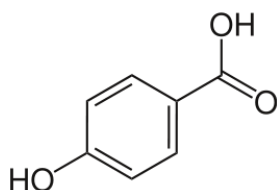


**Σχήμα II.2.37** π-κουμαρικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

$\pi$  -  
Υδροξυβενζοϊκό  
οξύ

(4-  
Hydroxybenzoic  
acid)

$C_7H_6O_3$



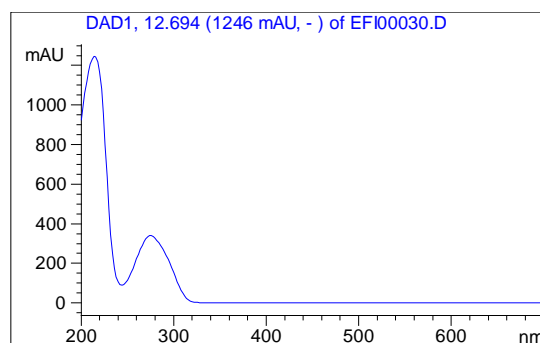
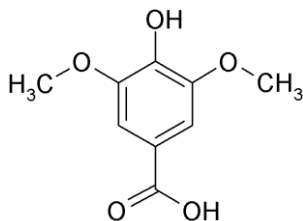
**Retention  
Time: 12.744**

**Σχήμα II.2.38**  $\pi$ -Υδροβενζοϊκό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

Συριγγικό οξύ

(4-hydroxy-3,5-  
dimethoxybenzoic  
acid)

$C_9H_{10}O_5$



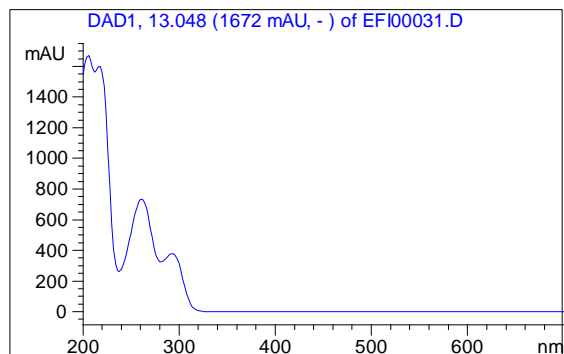
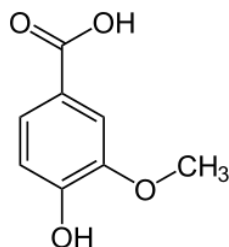
**Retention Time:  
12.597**

**Σχήμα II.2.39** Συριγγικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης

Βανιλικό οξύ

(4-Hydroxy-3-  
methoxybenzoic  
acid)

$C_8H_8O_4$



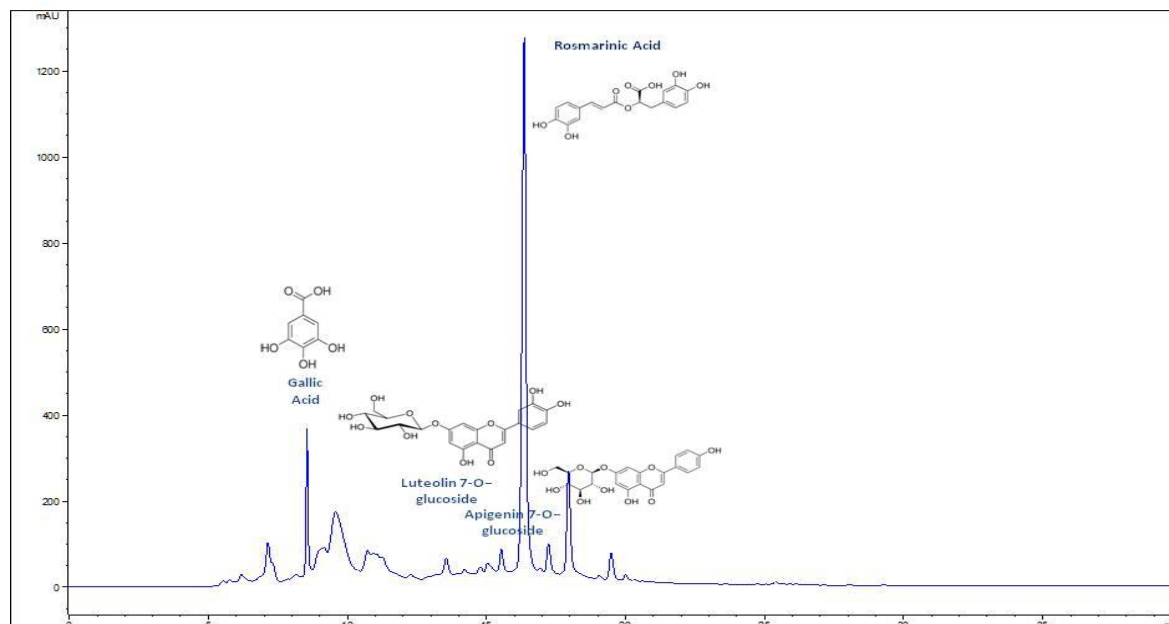
**Retention  
Time: 13.041**

**Σχήμα II.2.40** Βανιλικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης



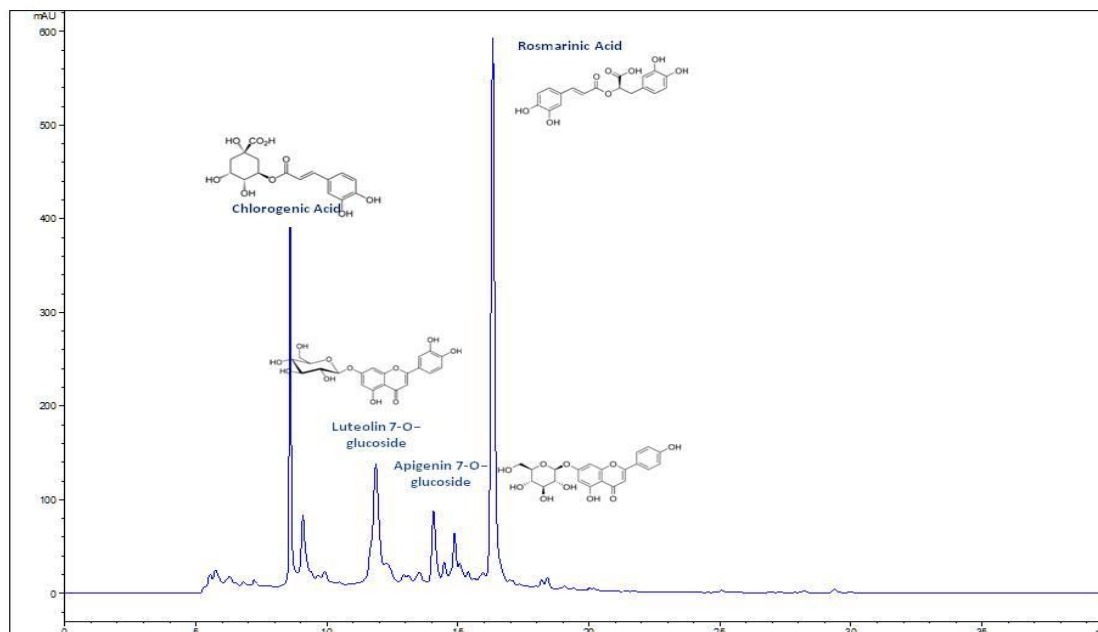
Τα χρωματογράφημα των όλων των -bpte εκχυλισμάτων στα 280nm παρουσιάζονται στα Σχήματα II.2.41 – II.2.45.

*Melissa officinalis* L.

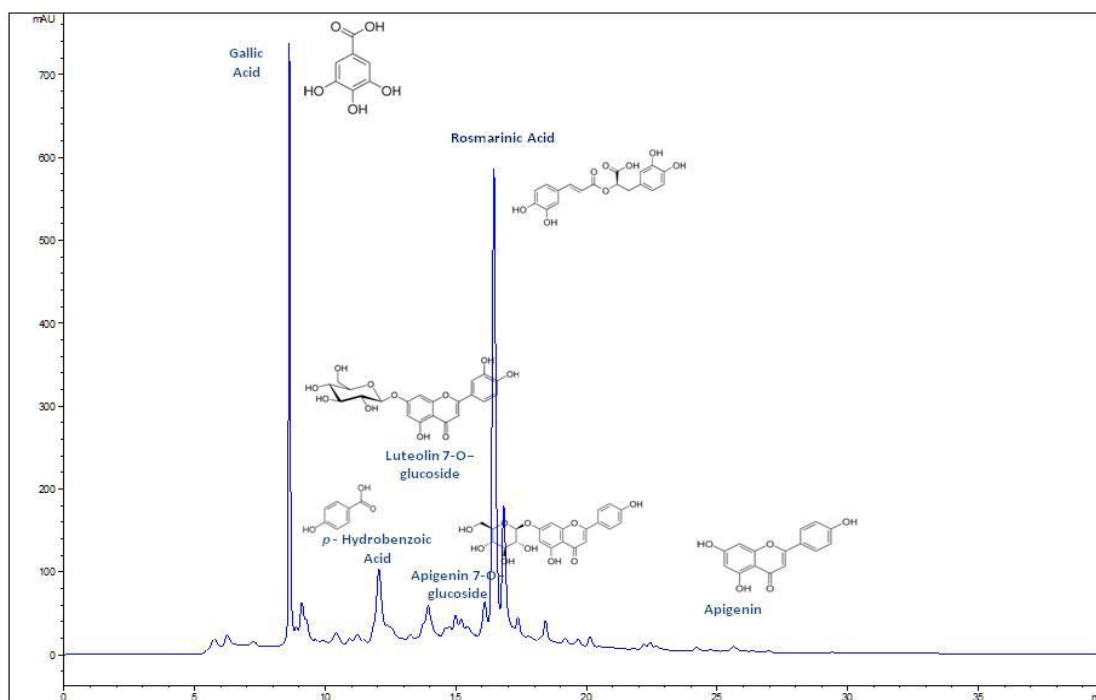


Σχήμα II.2.41 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος (-bpte) μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*) στα 280nm

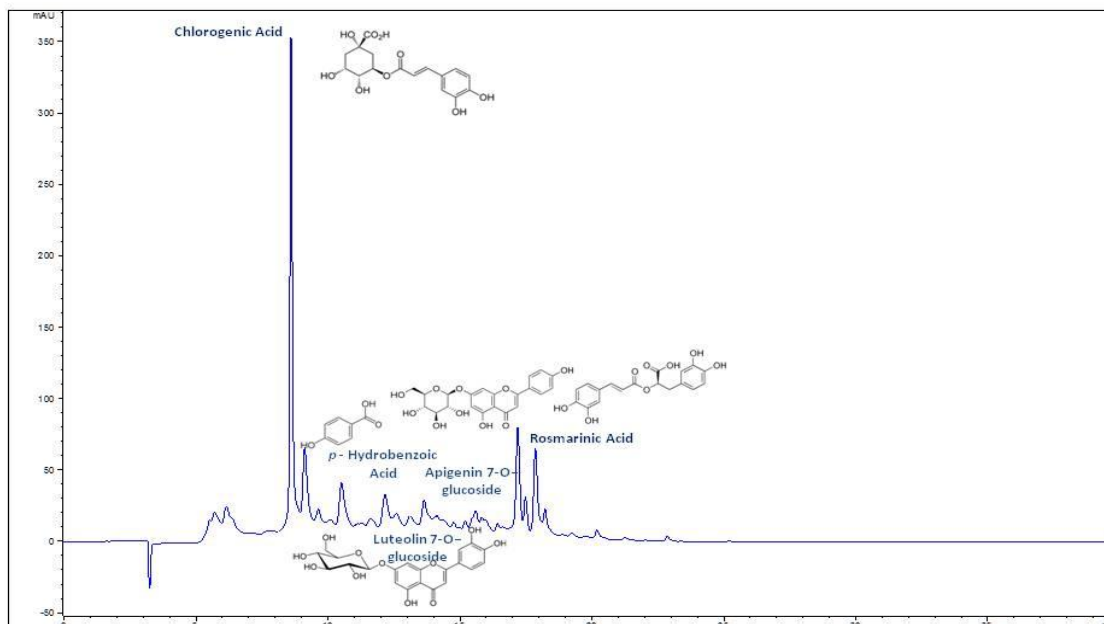
*Salvia officinalis* L.



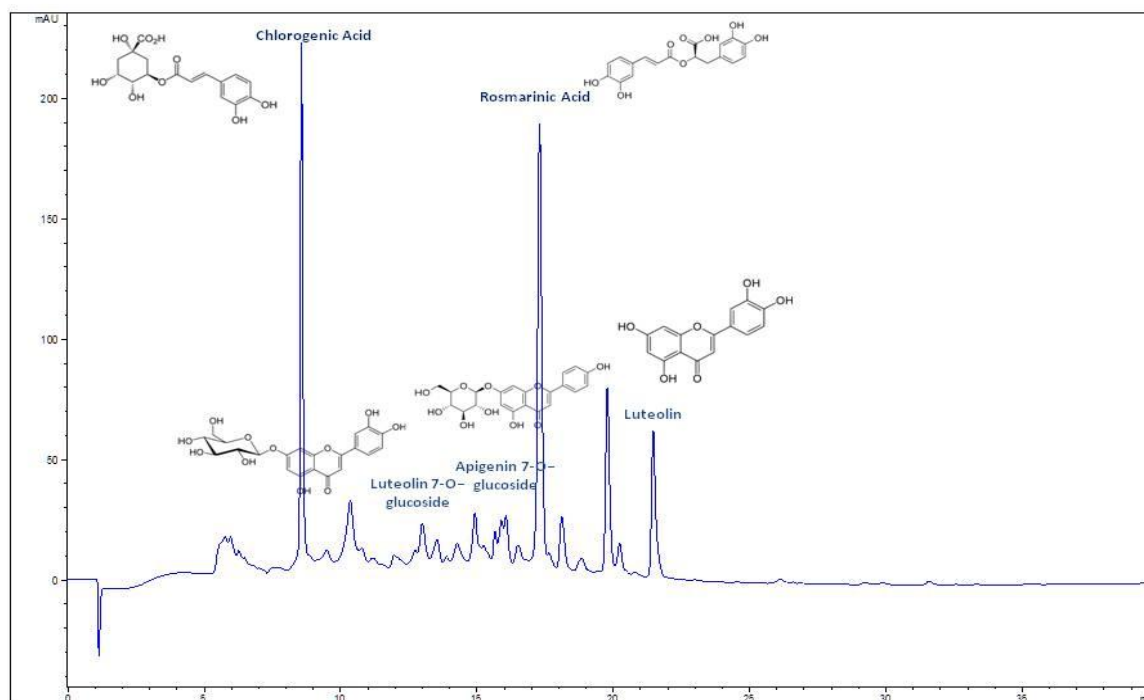
Σχήμα II.2.42 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος (-bpte) φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) στα 280nm

*Origanum vulgare* L.

Σχήμα II.2.43 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος (-bpte) ρίγανης (*Origanum vulgare*) στα 280nm

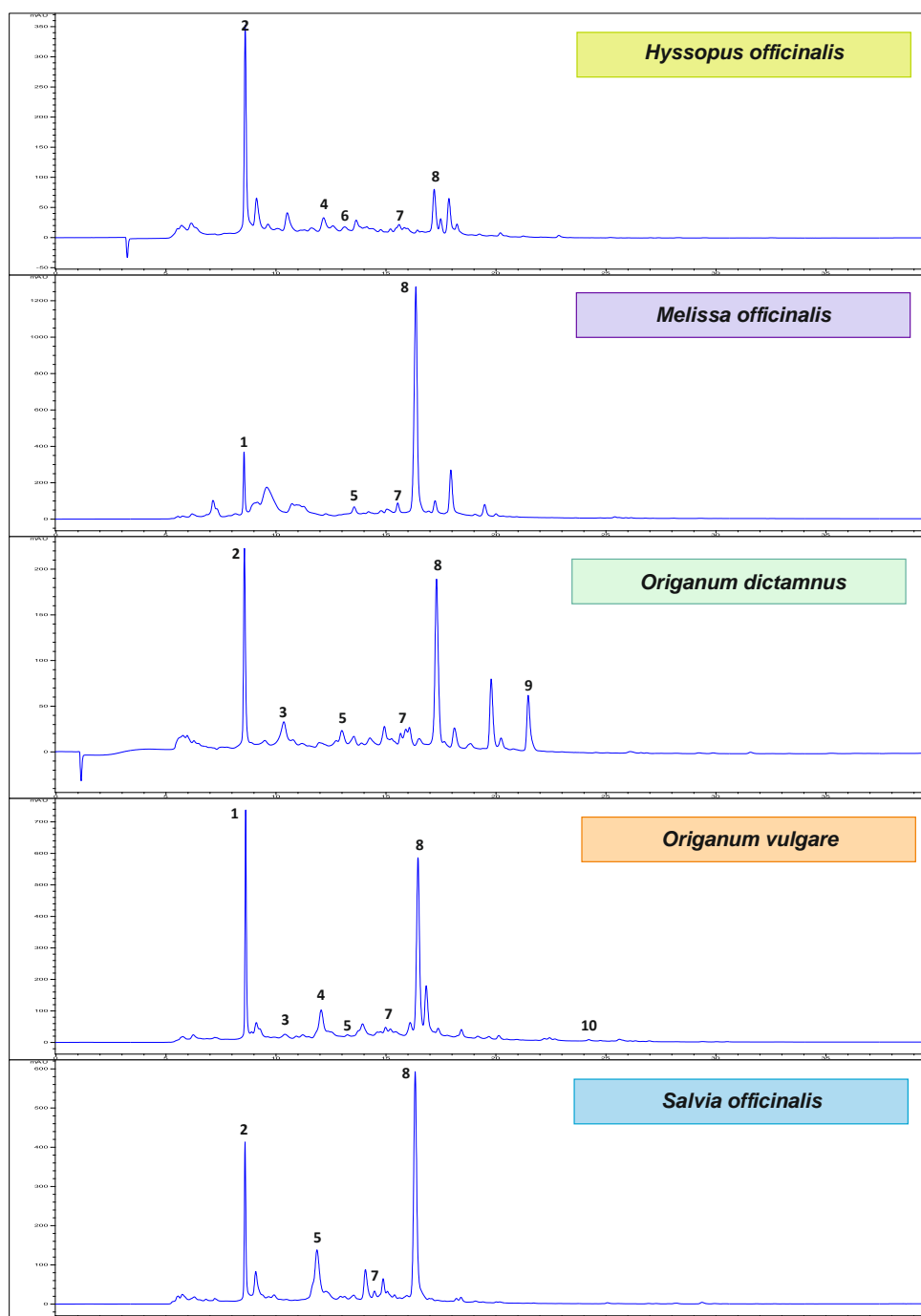
*Hyssopus officinalis* L.

Σχήμα II.2.44 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος (-bpte) ύσσωπου (*Hyssopus officinalis*) στα 280nm

*Origanum dictamnus* L.

**Σχήμα II.2.45** Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος (-bpte) δίκταμου (*Origanum dictamnus*) στα 280nm

Η ποιοτική ταυτοποίηση των συστατικών στα εκχυλίσματα με βάση το χρόνο έκλουσης και το φάσμα UV-vis των προτύπων παρουσιάζεται στο **Σχήμα II.2.46**. Με βάση τα προαναφερόμενα δεδομένα προσδιορίστηκαν οι παραπάνω ουσίες στα δείγματα, όπου αυτό ήταν εφικτό. Μεγάλο ποσοστό κορυφών που εμφανίστηκαν στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν δε μπόρεσαν να αντιστοιχηθούν με τα αντίστοιχα πρότυπα. Παρόλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη τη χρωματογραφική τους συμπεριφορά, και τα φάσματα UV στάθηκε δυνατό να προσδιοριστούν ως παράγωγα υδροξυκιναμικού οξέος ή φλαβονοειδή.



**Σχήμα II.2.46** Χρωματογραφικό προφίλ HPLC φαινολικών και флаβονοειδών αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων των *Hyssopus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare* και *Salvia officinalis* στα 280nm. Προσδιοριζόμενες κορυφές: (1) Γαλλικό οξύ, (2) Χλωρογενικό οξύ, (3) Ρουτίνη, (4) p-υδροβενζοϊκό οξύ, (5) 7-O γλυκοζίτης της Λουτεολίνης, (6) Βανιλικό οξύ, (7) 7-O-γλυκοζίτης της Απιγενίνης, (8) Ροσμαρινικό οξύ, (9) Λουτεολίνη, (10) Απιγενίνη.

Από όλα τα συστατικά που προσδιορίστηκαν στα εκχυλίσματα, το κύριο κοινό συστατικό, το οποίο ανιχνεύθηκε σε όλα τα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν είναι το ροσμαρινικό οξύ. Το ροσμαρινικό οξύ έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες στο παρελθόν σε εκχυλίσματα ύσσωπου (Hatiroglu *et al.*, 2013), μελισσόχορτου (Arceusz *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2013; Carnat *et al.*, 1998; Dastmalchi *et al.*, 2008), δίκταμου (Liolios *et al.*, 2009; Liolios *et al.*, 2010; Kaliora *et al.*, 2014; Kouri *et al.*, 2007; Kogiannou *et al.*, 2013), ρίγανης (Agiomyrgiannaki and Dais, 2012; Martins *et al.*, 2014;) και φασκόμηλου (Cvetkovikj *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014; Roby *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011). Όλα τα αμιγώς υδατικά φυτικά εκχυλίσματα -brte που αναλύθηκαν είχαν την ίδια συγκέντρωση ξηρής φυτικής μάζας και διαλύτη (H<sub>2</sub>O) και για το λόγο αυτό η σχετική συγκέντρωση σε ροσμαρινικό οξύ των δειγμάτων παρουσιάζεται στον **πίνακα II.2.14** ως εμβαδό της αντίστοιχης κορυφής του ροσμαρινικού οξέος στο χρωματογράφημα του δείγματος. Σε προηγούμενες εργασίες ποιοτικής ανάλυσης εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, βρέθηκε ότι ο 7-O γλυκοζίτης της Λουτεολίνης ήταν το κύριο φλαβονοειδές σε όλα (Carnat *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2015). Στην παρούσα πειραματική ενότητα ο 7-O γλυκοζίτης της Λουτεολίνης ανιχνεύθηκε στο μελισσόχορτο, το δίκταμο τη ρίγανη και το φασκόμηλο. Επίσης, ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα ο 7-O γλυκοζίτης της Απιγενίνης, όπως αναφέρεται και στον Cvetkovikj *et al.* (2013). Γαλλικό οξύ ανιχνεύθηκε στο μελισσόχορτο, όπως είχαν προσδιορίσει και οι (Arceusz *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014), στον ύσσωπο, τη ρίγανη και το φασκόμηλο. Σύμφωνα και με εργασίες που έχουν προηγηθεί χλωρογενικό οξύ ανιχνεύθηκε στην παρούσα εργασία στον ύσσωπο (Dzamic *et al.*, 2013; Hatiroglu *et al.*, 2013), στο μελισσόχορτο (Arceusz & Wesolowski, 2013; Pereira *et al.*, 2014), στο δίκταμο (Kouri *et al.*, 2007,) και στη ρίγανη (Agiomyrgiannaki and Dais, 2012). Απιγενίνη ανιχνεύθηκε μόνο στη ρίγανη, όπως και στους Martins *et al.*, (2014). Ρουτίνη βρέθηκε στα δείγματα της ρίγανης και του δίκταμου, και λουτεολίνη στο δίκταμο σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της εργασίας των Skaltsa & Harvala (1987). Φερουλικό οξύ σύμφωνα και με τη σχετική βιβλιογραφία (Dzamic *et al.*, 2013; Hatiroglu *et al.*, 2013; Arceusz *et al.*, 2013; Proestos *et al.*, 2006; Proestos *et al.*, 2008; Agiomyrgiannaki and Dais, 2012) ανιχνεύθηκε στον ύσσωπο, το μελισσόχορτο, το δίκταμο και τη ρίγανη.

Είναι γνωστό ότι διαφορές στην ποιοτική σύσταση των δειγμάτων που αναλύθηκαν σε σχέση με αντίστοιχες εργασίες που έχουν γίνει στο παρελθόν για τα ίδια είδη, όσον αφορά στην παρουσία ή απουσία φαινολικών οξέων ή φλαβονοειδών αποδίδονται σε πολλές παραμέτρους, από τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας, το κλίμα και την εποχή συγκομιδής

έως και τη διαδικασία εκχύλισης που ακολουθήθηκε (Carnat *et al.*, 1998; Zgorika and Glowniak, 2001).

Η βιολογική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται σε αυτά, και μάλιστα κάποιες φαινολικές ενώσεις φαίνεται να έχουν ρόλο κλειδί στη δράση αυτή (Hatiroglou *et al.*, 2013). Στην παρούσα εργασία η επίδραση των αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων επί της κονιδιογένεσης της *A. alternata* φαίνεται να βρέθηκε να έχει ισχυρή συσχέτιση ( $R^2 = 0.84$ ) με τη συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος που περιέχεται σε όλα τα εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν στην *A. alternata* και στη συνέχεια αναλύθηκαν ποιοτικά με HPLC (πίνακας II.2.14).

Δεν εντοπίστηκε αντίστοιχη συσχέτιση μεταξύ ροσμαρινικού οξέος και παραγωγής κονιδίων για τα αντίστοιχα μικτά εκχυλίσματα (crude) των αρωματικών φυτών που εφαρμόστηκαν. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν στη συσχέτιση της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος με τη βιολογική δράση σε μικτά και αμιγώς υδατικά εκχυλίσματα, με γεγονός ότι η συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος είναι αμετάβλητη οφείλονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του πτητικού και υδατοδιαλυτού κλάσματος των φυτικών εκχυλισμάτων.

**Πίνακας II.2.14** Εμβαδό κορυφών του ροσμαρινικού οξέος στα χρωματογραφήματα των αμιγώς υδατικών -brte εκχυλισμάτων

	Συγκέντρωση g ξηρής μάζας / mL	Εμβαδό κορυφής ροσμαρινικού οξέος (AU)
<i>Hyssopus officinalis</i>	0.005	1,593.5 ± 9.5
<i>Melissa officinalis</i>	0.005	23,798.2 ± 598.8
<i>Origanum dictamnus</i>	0.005	3,944.1 ± 107.5
<i>Origanum vulgare</i>	0.005	10,735.2 ± 280.3
<i>Salvia officinalis</i>	0.005	9,409.9 ± 1227.3

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

Δε βρέθηκε αντίστοιχη συσχέτιση της δράσης του ροσμαρινικού οξέος στα άλλα είδη μυκήτων στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι βιοδοκιμές.

### II.2.3.3 Εκτίμηση δεικτών συνέργειας

Η συνέργεια του αμιγώς υδατικού κλάσματος των εκχυλισμάτων με τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου όλων των αρωματικών φυτών που εξετάστηκαν έγινε εμφανής από τις διαφορές στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών και αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων επί του συνόλου των μυκήτων στους οποίους πραγματοποιήθηκαν οι σχετικές βιοδοκιμές. Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, οι διαφορές που εντοπίστηκαν στη βιολογική δράση των μικτών (crude) και αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων (-brte) για το ίδιο φυτό αποδίδονται στη συνέργεια ή το ανταγωνισμό μεταξύ του μίγματος πτητικών και υδατοδιαλυτών συστατικών που περιέχονται σε αυτά.

Προκειμένου να υπάρξει μια ποσοτική αποτίμηση αυτής της συνέργειας υπολογίστηκαν οι δείκτες συνέργειας για κάθε φυτικό είδος που εξετάστηκε και για κάθε είδος μύκητα στον οποίο έγιναν οι επεμβάσεις με τα εκχυλίσματα των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών. Οι προαναφερόμενοι δείκτες συνέργειας παρουσιάζονται στους Πίνακες II.2.15 – II.2.18. Στις περιπτώσεις που η υπολογισθείσα τιμή του δείκτη είναι αρνητική, υποδεικνύει «Ανταγωνισμό» ανεξάρτητα της τιμής.

**Πίνακας II.2.15** Δείκτες συνέργειας για τη διάμετρο του μυκηλίου SRm και την παραγωγή κονιδίων SRc στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών (α) και υδατικών (β) -brte εκχυλισμάτων στην *Alternaria alternata*

	SRm	Δράση	SRc	Δράση
<i>Origanum dictamnus</i>	0,55	Συνέργεια	0,33	Συνέργεια
<i>Origanum vulgare</i>	0,52	Συνέργεια	-1,48	Ανταγωνισμός
<i>Hyssopus officinalis</i>	0,41	Συνέργεια	-2,52	Ανταγωνισμός
<i>Salvia officinalis</i>	0,54	Συνέργεια	1,05	Ανταγωνισμός
<i>Crocus sativus</i>	45,12	Ανταγωνισμός	-0,24	Ανταγωνισμός
<i>Melissa officinalis</i>	0,39	Συνέργεια	6,03	Ανταγωνισμός

SR<1 υποδεικνύει συνέργεια, SR>1 υποδεικνύει ανταγωνισμό και SR = 1 προσθετική δράση

Με βάση τον πίνακα II.2.15, τα πτητικά και τα υδατοδιαλυτά συστατικά των εκχυλισμάτων που προέρχονται από φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* δρουν σε απόλυτη συνέργεια ως προς την αύξηση του μυκηλίου της *A. alternata*. Η μεγαλύτερη συνέργεια (SRm=0.39) εντοπίστηκε στην περίπτωση του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*). Αντίθετα, τα εκχυλίσματα του κρόκου (*Crocus sativus*) έδειξαν να έχουν ανταγωνιστική δράση ως προς την αύξηση του μυκηλίου της *Alternaria*. Στη δράση προώθησης της κονιδιογένεσης, συνέργεια

εντοπίστηκε μόνο στην περίπτωση του δίκταμου (*Origanum dictamnus*), ενώ για τα υπόλοιπα αρωματικά φυτά εντοπίστηκε ανταγωνισμός ο οποίος ήταν εντονότερος στην περίπτωση του μελισσόχορτου.

**Πίνακας II.2.16** Δείκτες συνέργειας SRm (διάμετρος μυκηλίου) και SRc (παραγωγή κονιδίων) στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών (α) και υδατικών -brpe (β) εκχυλισμάτων στον *Aspergillus flavus*

	SRm	Δράση	SRc	Δράση
<i>Origanum dictamnus</i>	27,06	Ανταγωνισμός	0,09	Συνέργεια
<i>Origanum vulgare</i>	1,99	Ανταγωνισμός	0,10	Συνέργεια
<i>Hyssopus officinalis</i>	8,94	Ανταγωνισμός	0,14	Συνέργεια
<i>Salvia officinalis</i>	-43,71	Ανταγωνισμός	0,15	Συνέργεια
<i>Crocus sativus</i>	5,31	Ανταγωνισμός	0,71	Συνέργεια
<i>Melissa officinalis</i>	1,55	Ανταγωνισμός	0,40	Συνέργεια

SR<1 υποδεικνύει συνέργεια, SR>1 υποδεικνύει ανταγωνισμό και SR = 1 προσθετική δράση

Στην περίπτωση του *Aspergillus flavus*, με βάση τα στοιχεία που παρουσιάζονται στον **Πίνακα II.2.16**, σε όλα ανεξαρτήτως των εκχυλίσματα το πτητικό κλάσμα είχε ανταγωνιστική δράση με τα αμιγώς υδατοδιαλυτά συστατικά ως προς την αύξηση του μυκηλίου. Σε αντίθεση, στην περίπτωση της κονιδιογένεσης, τα ίδια συστατικά έδρασαν σε απόλυτη συνέργεια, με τη μεγαλύτερη να εντοπίζεται στη ρίγανη και το δίκταμο.

**Πίνακας II.2.17** Δείκτες συνέργειας SRm (διάμετρος μυκηλίου) και SRc (παραγωγή κονιδίων) στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών και υδατικών -brpe εκχυλισμάτων στο *Fusarium oxysporum*

	SRm	Δράση	SRc	Δράση
<i>Origanum dictamnus</i>	1,40	Ανταγωνισμός	2,82	Ανταγωνισμός
<i>Origanum vulgare</i>	0,31	Συνέργεια	0,18	Συνέργεια
<i>Hyssopus officinalis</i>	2,14	Ανταγωνισμός	7,15	Ανταγωνισμός
<i>Salvia officinalis</i>	1,99	Ανταγωνισμός	2,34	Ανταγωνισμός
<i>Crocus sativus</i>	2,51	Ανταγωνισμός	-5,19	Ανταγωνισμός
<i>Melissa officinalis</i>	0,31	Συνέργεια	1,96	Ανταγωνισμός

SR<1 υποδεικνύει συνέργεια, SR>1 υποδεικνύει ανταγωνισμό και SR = 1 προσθετική δράση

Στην ανάπτυξη του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum*, πτητικά και αμιγώς υδατικά συστατικά έδρασαν ανταγωνιστικά (**Πίν. II.2.17**) στα εκχυλίσματα του δίκταμου του ύσσωπου και του



φασκόμηλου και του κρόκου, και σε συνέργεια στα εκχυλίσματα της ρίγανης και του μελισσόχορτου.

Με βάση τα στοιχεία του ίδιου πίνακα, ανταγωνιστικά όσον αφορά την κονιδιογένεση έδρασαν τα πτητικά και αμιγώς υδατικά συστατικά που περιείχονταν σε όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν πλέον της ρίγανης.

**Πίνακας II.2.18** Δείκτες συνέργειας SR<sub>m</sub> (διάμετρος μυκηλίου) και SR<sub>c</sub> (παραγωγή κονιδίων) στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών και υδατικών –brte εκχυλισμάτων στη *Beauveria bassiana*

	SR <sub>m</sub>	Δράση	SR <sub>c</sub>	Δράση
<i>Origanum dictamnus</i>	-1,39	Ανταγωνισμός	1,64	Ανταγωνισμός
<i>Origanum vulgare</i>	6,20	Ανταγωνισμός	0,58	Συνέργεια
<i>Hyssopus officinalis</i>	-4,57	Ανταγωνισμός	0,56	Συνέργεια
<i>Salvia officinalis</i>	-5,50	Ανταγωνισμός	2,52	Ανταγωνισμός
<i>Crocus sativus</i>	0,31	Συνέργεια	-4,32	Ανταγωνισμός
<i>Melissa officinalis</i>	0,31	Συνέργεια	0,51	Συνέργεια

SR<1 υποδεικνύει συνέργεια, SR>1 υποδεικνύει ανταγωνισμό και SR = 1 προσθετική δράση

Στην περίπτωση της *Beauveria bassiana* (Πιν. II.2.18), το πτητικό και αμιγώς υδατικό κλάσμα των φυτικών εκχυλισμάτων έδρασε σε συνέργεια μόνο στην περίπτωση του κρόκου και του μελισσόχορτου, και ανταγωνιστικά στην περίπτωση όλων των άλλων, δηλαδή του δίκταμου, της ρίγανης, του ύσσωπου και του φασκόμηλου. Όσον αφορά στην κονιδιογένεση της *Beauveria bassiana*, ανταγωνισμός μεταξύ πτητικών και αμιγώς υδατικών συστατικών εντοπίστηκε στα εκχυλίσματα του δίκταμου, του φασκόμηλου και του κρόκου. Αντίθετα, σημειώθηκε συνέργεια στα εκχυλίσματα της ρίγανης, του ύσσωπου και του μελισσόχορτου.

Για τις αλληλεπιδράσεις αυτές ευθύνονται κατά κύριο λόγο τα πτητικά συστατικά που περιέχονται στα μικτά εκχυλίσματα και τα οποία εισήλθαν στο εκχύλισμα κατά τη διαδικασία εκχύλισης με ζεστό νερό. Σε σχέση με το αιθέριο έλαιο των αντίστοιχων φυτικών ειδών, τα πτητικά συστατικά που εισέρχονται κατά τη διαδικασία εκχύλισης με ζεστό νερό και στη συνέχεια διαχωρίζονται από την υδατική φάση με πετρελαϊκό αιθέρα, παρατηρείται απουσία ή μειωμένο ποσοστό υδρογονανθράκων (Αναστασάκη, 2014). Στην περίπτωση του δίκταμου τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου είναι η καρβακρόλη ακολουθούμενη από το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο (Argyroulou et al., 2009; Liolios et al., 2009; Daferera et al., 2002) ή αντί της καρβακρόλης η θυμόλη εάν το δίκταμο προερχόταν από καλλιέργεια

(Daferera *et al.*, 2000). Στην οργανική φάση αφεψήματος δίκταμου βρέθηκε να κυριαρχεί επίσης, η καρβακρόλη, και δεύτερη να έρχεται η θυμοκινόνη (Αναστασάκη, 2014), η παρουσία της οποία έχει αναφερθεί από τους Economidou *et al.*, (2005) σε φύλλα του είδους *Origanum dictamnus* που καλλιεργήθηκαν με υδροπονική μέθοδο. Η θυμόλη και η καρβακρόλη είναι επίσης τα αντίστοιχα κύρια πτητικά συστατικά για την περίπτωση της ρίγανης (Castilho *et al.*, 2012; Kogiannou *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014) και του φασκόμηλου (Kogiannou *et al.*, 2013) στα οποία μπορεί να αποδοθεί η αλληλεπίδραση αυτή. Στην οργανική φάση των αφεψημάτων του φασκόμηλου (Αναστασάκη, 2014) τα κύρια συστατικά που εντοπίστηκαν ήταν η α-θυογινόνη, η καμφορά, η ευκαλυπτόλη και η βορνεόλη. Σύμφωνα με τον Carnat *et al.*, (1998) τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του μελισσόχορτου είναι η γερανιάλη, η νεράλη, και η σιτρονελλάλη, ενώ στην οργανική φάση αφεψημάτων που μελετήθηκαν από την Αναστασάκη (2014), βρέθηκε να κυριαρχεί η γερανιάλη, η νεράλη και η λιναλοόλη. Τα κύρια πτητικά συστατικά που απαντώνται στον ύσσωπο είναι η *cis*-πινοκαμφόνη, η πινοκαρβόνη, το β-πινένιο και η ευκαλυπτόλη (Mazzanti *et al.*, 1998). Στην περίπτωση του εκχυλίσματος από στίγματα κρόκου, έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 150 διαφορετικά συστατικά (Bathaie and Mousavi, 2010) τα οποία περιλαμβάνουν σάκχαρα, μέταλλα, λιπαρά, και δευτερογενείς μεταβολίτες – τερπένια, φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες και καροτενοειδή. Μεταξύ των κύριων βιοδραστικών λιποδιαλυτών συστατικών που ευθύνονται για τις διαφοροποιήσεις στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών και αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων κρόκου είναι η κροκετίνη (Bolhassani *et al.*, 2014). Τα τρία κύρια συστατικά που περιέχονται στα υδατικά εκχυλίσματα σιγμάτων κρόκου είναι η πικροκροκίνη, οι κροκίνες, η σαφρανάλη (Tarantilis *et al.*, 1995).

#### II.2.4 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας πειραματικής ενότητας καταδεικνύουν τη βιολογική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που εξετάζονται στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Η παρατηρούμενη βιολογική δράση των μικτών εκχυλισμάτων αποδίδεται στην αλληλεπίδραση πτητικών και υδατοδιαλυτών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα, τα οποία μεταξύ άλλων περιέχουν και σάκχαρα. Το ροσμαρινικό οξύ από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης βρέθηκε να περιέχεται σε όλα τα εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* που αναλύθηκαν και να σχετίζεται ισχυρά με την ενίσχυση της κονιδιογένεσης στην

*A. alternata*. Η παρατηρούμενη αντίδραση του μύκητα στην έκθεσή του στα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών, μπορεί ενδεχόμενα να οφείλεται σε ενεργοποίηση βιολογικών του μηχανισμών έναντι στο στρες που υπέστη προκειμένου να μπορέσει να προσαρμοσθεί στις χημικές αλλαγές του περιβάλλοντος ανάπτυξής του.

Τα βιοδραστικά μόρια που περιέχονται στα φυτικά εκχυλίσματα που δοκιμάσθηκαν πιθανόν ενεργοποίησαν μοριακούς μηχανισμούς στα κύτταρα του μύκητα που οδήγησαν στην ενίσχυση τόσο της ανάπτυξης του μυκηλίου όσο και της κονιδιογένεσης. Το γεγονός αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς υποδεικνύει πως τα συγκεκριμένα μίγματα ή επιμέρους συστατικά τους παρουσιάζουν δυνατότητες που μπορούν να αξιοποιηθούν από τη βιοτεχνολογία όπου τα βιοδραστικά μόρια που είναι ικανά να προωθούν την ανάπτυξη, και ιδιαίτερα των μυκήτων, στο πλαίσιο του βιολογικού ελέγχου και προς την κατεύθυνση της ενίσχυσης των φυσικών εχθρών ή ανταγωνιστών παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μύκητες *B. bassiana* (Mascarin *et al.*, 2016), καθώς και τα μη παθογόνα στελέχη του *F. oxysporum* (Tsitsigiannis *et al.*, 2012) όπως και τα μη τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* (Atehnkeng *et al.*, 2016) μπορούν με βάση μελέτες να χρησιμοποιηθούν ευρέως στη γεωργική πράξη ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης σημαντικών ασθενειών και εχθρών των καλλιεργειών (Tjamos *et al.*, 2010).

Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών που εξετάζονται στην παρούσα, καθώς και τον αντίστοιχο ρόλο του ροσμαρινικού οξέος, όχι μόνο σε *in vitro* αλλά και σε *in vivo* βιοδοκιμές. Για το λόγο αυτό, η διερεύνηση ενός αντίστοιχου μοριακού μηχανισμού όσο και μια *in vivo* βιοδοκιμή επιχειρούνται σε επόμενο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ /ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ





## 5<sup>ο</sup> Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

---

Ο ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ  
ΣΤΗΝ ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ  
ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ  
ΣΤΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

*Πρακτικά συνεδρίου*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
13 - 15 Δεκεμβρίου 2012

---



### Biological activity of aromatic plants aqueous extracts against plant pathogenic and entomopathogenic fungi

Skotti E.<sup>a</sup>, Anastasaki E.<sup>a</sup>, Koundouri S.D.<sup>b</sup>, Bouchagier P.<sup>c</sup>, Tsitsigiannis D.I.<sup>b</sup>, Tarantilis P.A.<sup>a</sup>,\*, Polissiou M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>b</sup>Laboratory of Phytopathology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>c</sup>Department of Organic Farming and Food Science, Technological Educational Institution of Ionian Islands, Terma Leoforou Vergoti, 28100 Argostoli, Greece

#### Abstract

The aim of this work was to evaluate the biological activity of five *Lamiaceae* species (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*) and *Crocus sativus* aqueous extracts against three plant pathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus*) and an entomopathogenic fungal species (*Beauveria bassiana*) used as a biological insecticide in organic farming. All plant extracts (*Lamiaceae*: 10g/100ml, *Crocus sativus*: 0.1g/100ml) were active against all fungal species contributing to enhancement or inhibition of conidia production and mycelium radial growth. In *Fusarium oxysporum*, more active was the *Origanum vulgare* extract as conidia germination was enhanced almost four times more compared to control. *Salvia officinalis* extract showed similar activity to *Alternaria alternata*, and *Origanum dictamnus* to *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus*. The biological activity of *Lamiaceae* and *Crocus sativus* aqueous extracts, at the concentrations tested, against the above fungal species may be due to the water soluble substances, which among other compounds containing sugars. Correlation was not found between either antioxidant and biological activity or total phenolic compounds and antioxidant activity. To date the essential oil biological activity of several *Lamiaceae* species has been mainly evaluated, and was almost always found as antifungal. Thus, further investigation is needed on the synergism of water soluble substances and essential oil of plant species examined, as well as on the influence of the observed biological activity in gene signaling pathways that regulate hyphal growth and sporulation of the examined fungal species at the molecular level.

**Keywords:** Plant pathogenic fungi, biological activity, aqueous extracts



### Βιολογική δράση υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες

Σκόττη Ε.<sup>α</sup>, Αναστασάκη Ε.<sup>α</sup>, Κουντούρη Σ.Δ.<sup>β</sup>, Μπουχάγιερ Π.<sup>ε</sup>, Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.<sup>β</sup>, Ταραντίλης Π.Α.<sup>α, \*</sup>, Πολυσιού Μ.<sup>α</sup>

<sup>α</sup>Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

<sup>β</sup>Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

<sup>ε</sup>Τμήμα Τεχνολογίας Βιολογικής Γεωργίας και Τροφίμων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ιονίων Νήσων, Τέρμα Λεωφόρου Βεργωτή, 28100 Αργοστόλι

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων πέντε αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*) και του *Crocus sativus* έναντι τριών ειδών φυτοπαθογόνων μυκήτων (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus*), και του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* που χρησιμοποιείται ως βιολογικό εντομοκτόνο από τη βιολογική γεωργία. Όλα τα φυτικά εκχυλίσματα (*Lamiaceae*: 10g/100ml, *Crocus sativus*: 0.1g/100ml) παρουσιάστηκαν βιολογικά ενεργά έναντι όλων των μυκήτων που δοκιμάστηκαν ενισχύοντας ή παρεμποδίζοντας τόσο την κονιδιογένεση όσο και την ανάπτυξη του μυκηλίου. Στην περίπτωση του *Fusarium oxysporum*, περισσότερο ενεργό εμφανίστηκε το εκχύλισμα του *Origanum vulgare*, καθώς τετραπλασιάστηκε η παραγωγή κονιδίων σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίστοιχη δράση εμφάνισε το εκχύλισμα της *Salvia officinalis* στην *Alternaria alternata* και το εκχύλισμα του *Origanum dictamnus* στη *Beauveria bassiana* και τον *Aspergillus flavus*. Η βιολογική δράση των προαναφερόμενων υδατικών εκχυλισμάτων, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, έναντι των μυκήτων που δοκιμάστηκαν ενδεχόμενα οφείλεται στα υδατοδιαλυτά συστατικά, τα οποία μεταξύ των άλλων συστατικών περιέχουν και σάκχαρα. Δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη βιολογική δράση και την αντιοξειδωτική δράση ή το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Μέχρι σήμερα έχει αξιολογηθεί η βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου διαφόρων ειδών *Lamiaceae*, και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε να έχει μυκητοκτόνο δράση. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της συνέργειας των υδατοδιαλυτών συστατικών και του αιθερίου ελαίου των φυτικών ειδών που εξετάστηκαν, καθώς επίσης και της διερεύνησης της επίδρασης της παρατηρούμενης βιολογικής δράσης σε σηματοδοτικά μονοπάτια γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των υφών και την κονιδιογένεση των εξετασθέντων ειδών μυκήτων σε μοριακό επίπεδο.

**Λέξεις κλειδιά:** Φυτοπαθογόνοι μύκητες, βιολογική δράση, υδατικά εκχυλίσματα





## Biological activity of aromatic plants aqueous extracts against plant pathogenic and entomopathogenic fungi

Skotti E.<sup>1</sup>, Anastasaki E.<sup>1</sup>, Kountouri S.D.<sup>2</sup>, Bouchagier P.<sup>3</sup>, Tsitsigiannis D.I.<sup>2</sup>, Tarantilis P.<sup>1</sup> and Polissiou M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Street, 11855, Athens, Greece

<sup>2</sup>Laboratory of Phytopathology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Street, 11855, Athens, Greece

Department of Organic Farming and Food Science, Technological Educational Institution of Ionian Islands, Terma Leoforou Vergoti, 28100 Argostoli, Greece

The increasing awareness on environmental protection has led towards sustainable agricultural ecosystems. Some of the key components in agricultural sustainability are the alternative approaches to pest management that will reduce or eliminate the use of toxic pesticides and insecticides. In this context, the research is looking for new natural substances with biological activity that may be used for the management of plant diseases. In the current study, the biological activity of five *Lamiaceae* species and *Crocus sativus* L. aqueous extracts was evaluated against three plant pathogenic and one entomopathogenic fungal species used as an insecticidal in organic farming. All the plant extracts were active against all fungal species contributing to enhancement or inhibition of conidia production and mycelium radial growth.

**Sample preparation.** Extracts of five *Lamiaceae* species (*Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Hyssopus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Melissa officinalis*) at a concentration of 10 g/100ml, and *Crocus sativus* at 0.1 g/100ml were prepared by soaking dry plant material in boiling distilled water, mixing thoroughly and then allow to stand for 15 minutes.

The above extracts were first filtered through a Whatman filter No.1 and then re-filtered through a sterile and endotoxin free 0.2 µm PES filter media (Whatman Puradisk 25mm) to reduce the risk of interference by micro-organisms.

**Screening of plants extracts against phytopathogenic and entomopathogenic fungal species.** All the plant extracts were tested against three plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* and one entomopathogenic fungal species *Beauveria bassiana*.

All fungal species were grown on PDA plates in order to produce enough conidia. Conidia of each fungus were collected in 1 ml of ddH<sub>2</sub>O using a flat toothpick and then the spore concentration of each fungal species was adjusted to 10<sup>6</sup> conidia/ml. 10 µl of each spore suspension (10<sup>6</sup> conidia) was applied to the center of PDA dishes amended with each plant extract, dried completely and then we let the fungi to grow in an incubation chamber under light (12h) and dark (12h) conditions at 25°C.

Mycelium diameter was measured at 2, 4 and 7 days for *Fusarium*, *Alternaria* and *Aspergillus*, and until 15 days for *Beauveria*. All treatments were replicated three times. For conidia concentration, 3 disks of 6 mm each in diameter were removed with a cork borer from each plate, homogenized and spores were counted using a haemocytometer.

Table 1. Biological activity of five *Lamiaceae* species and *Crocus sativus* L. aqueous extracts towards three plant pathogenic and one entomopathogenic fungal species, as determined by the well diffusion assay

Plant Extract	Inhibition of Mycelial Growth <sup>a, b, c</sup> (%)			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
(ODI) <i>Origanum dictamnus</i>	-15%	-89%	0%	0%
(OVU) <i>Origanum vulgare</i>	-8%	-76%	-8%	-7%
(HOF) <i>Hyssopus officinalis</i>	-14%	-90%	-2%	-3%
(SOF) <i>Salvia officinalis</i>	-13%	-83%	0%	-3%
(CRS) <i>Crocus sativus</i>	-10%	1%	2%	7%
(MOF) <i>Melissa officinalis</i>	-18%	-97%	-10%	0%

<sup>a</sup> OD: 0-100% inhibition  
<sup>b</sup> OD: 0-100% inhibition  
<sup>c</sup> OD: data not collected after 7 days of incubation

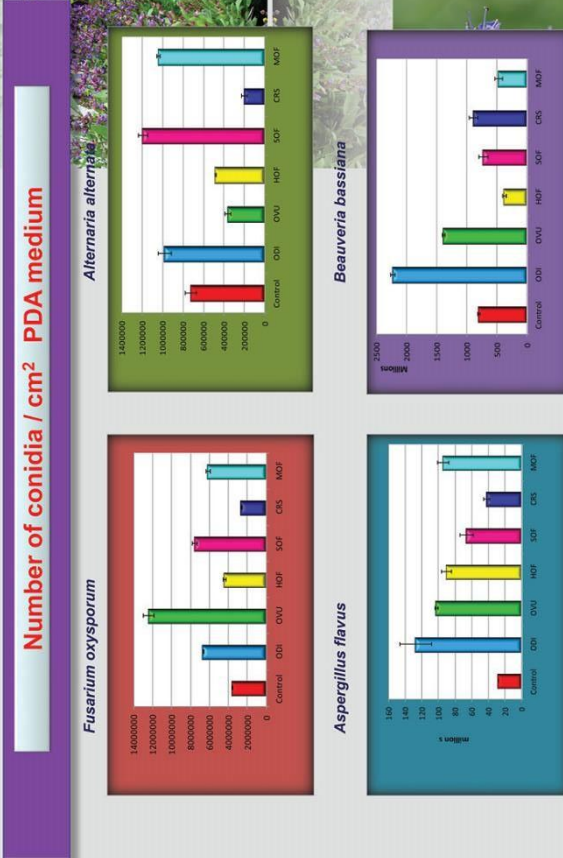


Figure 3. Conidia concentration of fungal species in PDA medium (Number of conidia / cm<sup>2</sup>)

**Results:** In *Fusarium oxysporum* all extracts tested, except *Crocus sativus*, enhanced conidia production and mycelium growth. More active in conidia production enhancement was the *Origanum vulgare* extract. In *Alternaria alternata*, all *Lamiaceae* extracts enhance significantly mycelium growth, *Melissa officinalis* almost duplicate it. *Salvia officinalis* was more active towards conidia production enhancement, and *Crocus sativus* the more active extract towards

inhibition of conidia production and mycelium growth. In *Aspergillus flavus*, all the extracts tested enhance slightly the mycelium growth and significantly the conidia production. More active in conidia production was the *Origanum dictamnus* extract. In *Beauveria bassiana*, *Hyssopus officinalis* and *Melissa officinalis* inhibit conidia production, whereas *Origanum dictamnus* and *Origanum vulgare* enhance it significantly.

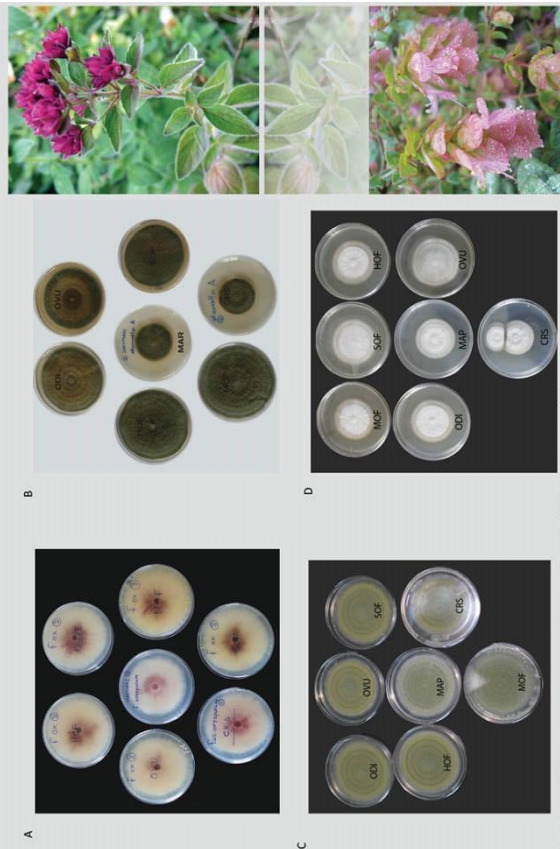


Figure 3. Cultures of (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *Alternaria alternata*, (C) *Aspergillus flavus*, (D) *Beauveria bassiana*.

**Conclusions.** The biological activity of *Lamiaceae* and *Crocus sativus* aqueous extracts, at the concentrations tested may be due to the water soluble substances, which among other compounds containing sugars. Correlation was not found between either antioxidant and biological activity or total phenolic compounds and biological activity.

To date, the essential oil biological activity of several *Lamiaceae* species has been evaluated and was almost always found as antifungal. Thus, further investigation is needed on the synergism of water soluble substances and essential oil of plant species examined, as well as on the influence of the observed biological activity on the gene signaling pathways that regulate hyphal growth and sporulation of the examined fungal species at the molecular level.

Plant Extract	Inhibition of Spore Germination <sup>a,b</sup> (%)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
(ODI) <i>Origanum dictamnus</i>	-86%	-351%
(OVU) <i>Origanum vulgare</i>	-245%	-284%
(HOF) <i>Hyssopus officinalis</i>	-22%	-220%
(SOF) <i>Salvia officinalis</i>	-108%	-134%
(CRS) <i>Crocus sativus</i>	27%	-49%
(MOF) <i>Melissa officinalis</i>	-71%	-235%
		-41%

<sup>a</sup> Mean value of three replicates. <sup>b</sup> Error range of 95% confidence interval.

### Mycelium diameter growth

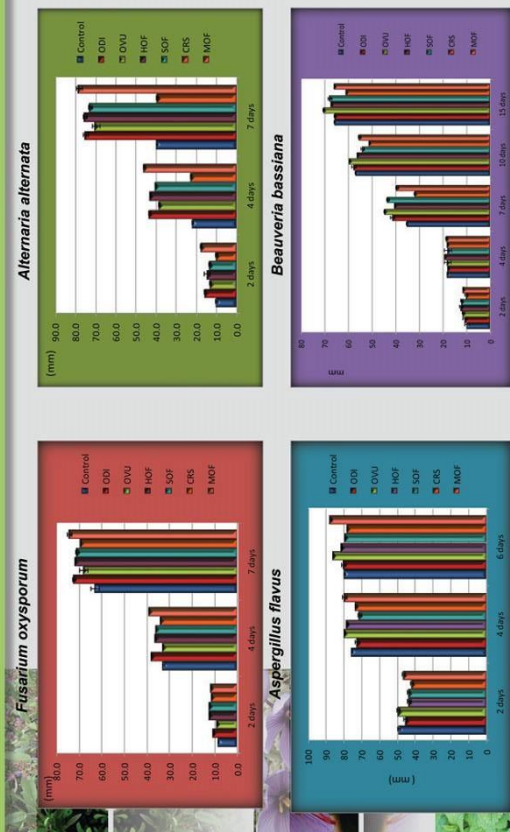


Figure 4. Mycelium radial growth of phytopathogenic and entomopathogenic fungal species when treated by *Lamiaceae* species and *Crocus sativus* extracts.

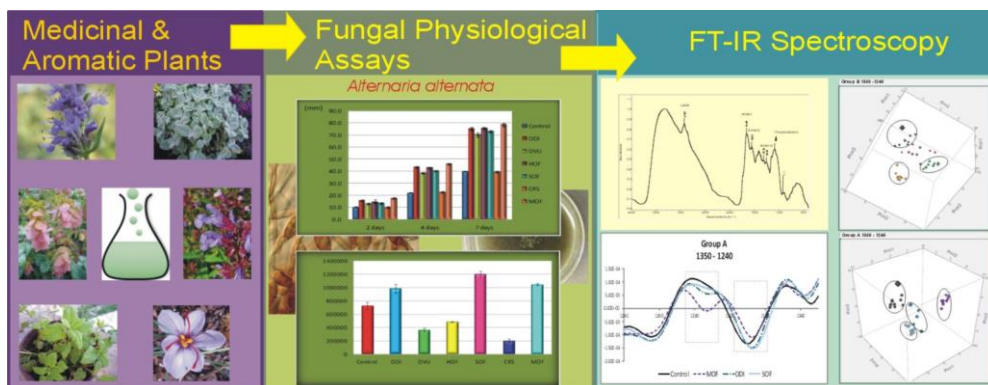
[1] Daferra, D., Zogas, B., Polissiou, M., (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Candida albicans* subsp. *nicholsonii*. *Crop Protection*, Vol. 22, 39-44.  
 [2] Jasso de Rodriguez, D., Hernandez-Castillo, D., Aguilo-Sanchez, R., Villareal-Quintanilla, J., Uva-Salazar, R., (2007). Antifungal activity of *Floerkea sp.* extracts on *Alternaria sp.*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, Vol. 25, 111 – 116.  
 [3] Lopez-Malo, A., Barreto-Vadivieso, J., Palou, E., San Martin, F., (2007). *Aspergillus flavus* growth responses to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control*, Vol. 18, 1358 – 1362.  
 [4] Naeini, A., Zigiari, T., Shokri, H., Khosravi, R., (2012). Assessment of growth inhibition effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal of Medical Mycology*, Vol. 20, 174 – 178.





## 3

Χρήση Φασματοσκοπίας IR για την εκτίμηση της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Alternaria alternata*





### II.3.1 Εισαγωγή

Οι μύκητες είναι οργανισμοί με ευρύτατες επιπτώσεις στον άνθρωπο τα οικοσυστήματα και το περιβάλλον (Charpin *et al.*, 2000; Desprez-Loustau *et al.*, 2007; Hawksworth *et al.*, 1991) τόσο θετικές όσο και αρνητικές. Οι επιπτώσεις αυτές ποικίλουν από ανακύκλωση θρεπτικών υλικών, σχηματισμό mycorrhizae και βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Adrio and Demain, 2003; Molitoris, 1995), έως απειλητικές για τον άνθρωπο τα ζώα και τα φυτά. Υπάρχουν στελέχη τα οποία μπορούν να γίνουν εξαιρετικά επικίνδυνα, όπως ο *Aspergillus fumigatus*, ο οποίος υπό προϋποθέσεις μπορεί να γίνει παθογόνος για τον άνθρωπο (Firon and D' Enfert, 2002). Τόσο η βιολογία του είδους όσο και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μυκήτων.

Η σύσταση των κυττάρων τους, η δομή και οι λειτουργίες είναι αλληλένδετες. Τα κύτταρα τους περιέχουν γενετικό υλικό (DNA και RNA), πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια. Οι μύκητες αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων τους και η κυτταρική σύνθεση εντέλει οφείλεται στην κυτταρική λειτουργία η οποία επηρεάζεται από τις χημικές ενώσεις που εκκρίνουν ή αποθηκεύουν (Carlile *et al.*, 1996). Η *A. alternata* είναι μύκητας ο οποίος αναπτύσσεται στα φυτά, συγκαταλέγεται ανάμεσα στα πλέον σημαντικά αλλεργιογόνα στελέχη (Stierle *et al.*, 1988), και είναι εξαιρετικά καταστροφική για τις καλλιέργειες σε παγκόσμια κλίμακα. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί βιοδραστικές ουσίες ή μίγματα για τον αποτελεσματικό έλεγχο της *A. alternata* στις καλλιέργειες (Guleria *et al.*, 2008). Η αξιολόγηση της βιοδραστικότητας ουσιών ή μιγμάτων συνήθως γίνεται μέσω βιοδοκιμών και μοριακών αναλύσεων (Barros *et al.*, 2007; Meca *et al.*, 2010; Müller-Riebau *et al.*, 1995, Zambonelli *et al.*, 1996). Τα βιο-φυτοπροστατευτικά σκευάσματα αποτελούν τη νέα τάση στην Ευρωπαϊκή Ένωση καθώς μπορούν να ελέγξουν τους παθογόνους οργανισμούς με λιγότερες επιπτώσεις στο περιβάλλον (Matson *et al.*, 1997). Τα βιοφυτοπροστατευτικά είναι μια μορφή φυτοπροστατευτικού προϊόντος η δράση των οποίων βασίζεται είτε σε μικροοργανισμούς είτε σε φυσικά προϊόντα τα οποία μπορούν και δρουν είτε άμεσα ελέγχοντας την ανάπτυξη του παθογόνου παράγοντα ή έμμεσα μέσω της ενίσχυσης των φυσικών εχθρών του (Chandler *et al.*, 2008; Srinivasan, 2012).

Τα φυτικά εκχυλίσματα, είτε υδατικά είτε προερχόμενα από εκχύλιση της δρόγης με οργανικούς διαλύτες, έχουν παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση μέσα από διάφορα πρωτόκολλα αξιολόγησης (Wang *et al.*, 2011) στην προσπάθεια εξεύρεσης αποτελεσματικών εναλλακτικών στα συμβατικά φυτοπροστατευτικά σκευάσματα. Η βιολογική δράση των

φυτικών εκχυλισμάτων ανιχνεύεται μέσω των αλλαγών σε φωτοσυνθετικούς μηχανισμούς ή καταστάσεων στρες στα φυτά (Bouchagier *et al.*, 2008; Bouchagier and Efthimiadis, 2012), βιοδοκιμών (Abou-Jawdah *et al.*, 2004; Daferera *et al.*, 2003), καλλιεργειών ιστών ή κυττάρων (Wang *et al.*, 2011), υποδοχέων ενζύμων (Peelman *et al.*, 2006) και βιοχρωματογραφίας (He *et al.*, 2008; Kotecha *et al.*, 2007; Kvalheim *et al.*, 2011). Η αξιολόγηση βιοδραστικών ουσιών και μιγμάτων, εκτός από τις συνήθεις μικροβιολογικές μεθόδους, διεξάγεται πρόσφατα και μέσω πρωτοποριακών τεχνικών σε μεταβολομικές διαδικασίες όπως η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier - Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Cardinali *et al.*, 2008; Corte *et al.*, 2010; Huleihel *et al.*, 2009; Zoumproulou *et al.*, 2010).

Η χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR αποτελεί εργαλείο για την κατανόηση της βιοχημικής σύστασης των κυττάρων (Beekes *et al.*, 2007; Jilkine *et al.*, 2008; Kaminskyj *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012) καθώς τα φάσματα της υπέρυθρης ακτινοβολίας παρέχουν αναλυτική πληροφορία για επιμέρους συστατικά του κυττάρου όπως οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα λιπίδια (Helm and Naumann, 1995). Καθώς τα φάσματα είναι σύνθετα και περιλαμβάνουν απορροφήσεις από όλα τα κυτταρικά συστατικά, η φασματοσκοπία FT-IR έχει αξιοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό, τη διάκριση και την κατάταξη μικροοργανισμών (Branan and Wells, 2007, Erukhimovitch *et al.*, 2005; Mariey *et al.*, 2001; Salman *et al.*, 2002) μεταξύ αυτών και πολλών ειδών μυκήτων (Fischer *et al.*, 2006; Naumann *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010) καθώς και την ανίχνευση βιοχημικών αλλαγών σε κύτταρα και ιστούς όταν αυτά έχουν εκτεθεί σε ιούς (Salman *et al.*, 2002), έχουν υποστεί καρκινικές αλλοιώσεις (Huleihel *et al.*, 2002; Rigas *et al.*, 2000) ή άλλα παθογόνα αίτια (Erukhimovitch *et al.*, 2005). Η ανίχνευση των αλλαγών στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων όταν αυτά υπόκεινται σε διάφορους παράγοντες στρες προσεγγίζεται επίσης με την ίδια τεχνική FT-IR (Kamnev, 2008; Sompong *et al.*, 2013; Stehfest *et al.*, 2005; Zoumproulou *et al.*, 2013), και πιο εξειδικευμένα στην περίπτωση μυκήτων σε αντίστοιχες συνθήκες (Kaminskyj *et al.*, 2008; Szeghalmi *et al.*, 2007). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες τα φάσματα υπέρυθρου των μυκήτων παρέχουν πληροφορίες για τη βιοχημική σύσταση του μυκηλίου, των υφών και των κονιδίων, κι έχουν δώσει αποτελέσματα τόσο στη διάκριση μεταξύ των ειδών των μυκήτων όσο και στην αποτύπωση των βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν όταν οι μύκητες υπόκεινται σε διάφορες συνθήκες στρες (Jilkine *et al.*, 2008; Kaminskyj *et al.*, 2008; Sompong *et al.*, 2013). Με επιτυχία γίνεται επίσης η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης και συσχέτισης διαφόρων παραγόντων (Huleihel *et al.*, 2009; Zoumproulou *et al.*, 2010) μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR.

Ανάμεσα στους παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR σε βιολογικά δείγματα είναι η προετοιμασία του δείγματος και η μέθοδος λήψης του φάσματος. Η Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) έχει αποδειχθεί ως η πλέον ταχεία μέθοδος που μπορεί να εφαρμοσθεί σε διάφορα στερεά δείγματα χωρίς προηγούμενη άλλη επεξεργασία του δείγματος (Schmitt & Flemming, 1998) και έχει εφαρμοστεί σε λυοφυλιωμένα δείγματα βιολογικού υλικού (Belton *et al.*, 1995; Hřebičík *et al.*, 1997; Pappas *et al.*, 2011). Σε συνδυασμό και με πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους όπως η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) η τεχνική αυτή εμφανίζει ιδιαίτερη δυναμική για την εφαρμογή της ως διαγνωστικό εργαλείο (screening tool) προσδιορισμού και χαρακτηρισμού βιοχημικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανάπτυξη των μυκήτων.

Ο στόχος της παρούσας πειραματικής ενότητας είναι η εφαρμογή της φασματοσκοπίας FT-IR για την αξιολόγηση των βιοχημικών αλλαγών στην κυτταρική σύσταση του φυτοπαθογόνου μύκητα *A. alternata* ως αποτέλεσμα της έκθεσής του κατά την επώαση σε υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

### II.3.2 Υλικά και Μέθοδοι

#### II.3.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού

Τα φυτικά δείγματα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.), του φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.), της ρίγανης (*Origanum vulgare* L.; χημειότυπος καρβακρόλης) και του ύσσωπου (*Hyssopus officinalis* L.) ήταν συλλογής έτους 2010, είχαν ξηρανθεί με αέρα και προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Καλλιεργητών Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ). Τα δείγματα του δίκταμου (*Origanum dictamnus* L. χημειότυπος καρβακρόλης) προμηθεύτηκαν από την τοπική αγορά της Κρήτης και τα δείγματα του κρόκου (*Crocus sativus*) προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Κοζάνης. Από τα προαναφερόμενα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα φύλλα, με εξαίρεση τη ρίγανη και τον ύσσωπο όπου χρησιμοποιήθηκαν και τα άνθη, και του κρόκου όπου χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση αποκλειστικά τα στίγματα. Όλα τα φυτικά δείγματα φυλάσσονταν στους -20° C μέχρι τη χρήση τους.

#### II.3.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (μελισσόχορτο, φασκόμηλο,



ρίγανη, ύσσωπος και δίκταμο) παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 10 g/100 ml με την προσθήκη της ξηρής δρόγης σε νερό που βράζει, ανάδευση του μίγματος και παραμονή του σε ηρεμία εκτός θερμαντικής πηγής για 15 minutes. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν κατ αρχή με φίλτρο Whatman No 1, και προ της προσθήκης τους στο μέσο καλλιέργειας των μυκήτων με αποστειρωμένα φίλτρα 0.2 μm PES filter media (Whatman Puradisk 25 mm) προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των καλλιεργειών της *A. alternata* από άλλους μικροοργανισμούς. Με την ίδια διαδικασία παρασκευάστηκε και το εκχύλισμα του κρόκου αλλά σε συγκέντρωση 0.1 g/100 ml.

### II.3.2.3 Αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες σε τριβλία ήταν το Potato Dextrose Agar (PDA) της εταιρείας Sigma Aldrich. Το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές καλλιέργειες ήταν Potato Dextrose Broth και παρασκευάστηκε στο εργαστήριο ως ακολούθως:

200 gr πατάτας τεμαχισμένης σε κύβους διαστάσεων περίπου (1x1x1 cm) μετά το βρασμό τους σε διπλά αποσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O, διηθήθηκαν και στο υγρό τμήμα που συλλέχθηκε προστέθηκαν 20bg δεξτρόζης και στη συνέχεια έγινε πλήρωση όγκου με ddH<sub>2</sub>O έως το 1 lt. Στη συνέχεια το μίγμα αποστειρώθηκε για 20 minutes στους 120° C.

Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Alternaria alternata* προήλθε από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### II.3.2.4 Καλλιέργειες Μυκήτων

Οι στερεές καλλιέργειες της *A. alternata* αναπτύχθηκαν σε τριβλία σε συνθήκες άπλετου φωτισμού προκειμένου να υποβοηθηθεί η παραγωγή κονιδίων. Η ανάπτυξη του μυκηλίου και των κονιδίων έγιναν σε αποστειρωμένα τριβλία Petri διαμέτρου 90 mm στα οποία είχαν προηγουμένως προστεθεί 19 ml αποστειρωμένου PDA και 1 ml από το εκάστοτε εκχύλισμα πριν την στερεοποίηση του PDA (θερμοκρασία υγρού 40-50 °C).

Τα κονίδια της *A. alternata* συλλέχθηκαν σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O (στο οποίο είχε προστεθεί 0.01% Tween 80 για την απελευθέρωση των υδροφοβικών κονιδίων) με τη βοήθεια επίπεδης οδοντογλυφίδας. Η συγκέντρωση των κονιδίων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου ρυθμίστηκε στα 10<sup>6</sup> κονίδια/mL. Στη συνέχεια όγκος 10 μL (10<sup>4</sup> κονίδια) από το αιώρημα των κονιδίων που παρασκευάστηκε προηγούμενα τοποθετήθηκε στο κέντρο κάθε τριβλίου πάνω στο υπόστρωμα και στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο

στους 25° C με ρύθμιση 12 ώρες φωτός και 12 ώρες σκοτάδι.

Η μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου πραγματοποιήθηκε τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα. Η μέτρηση των παραγόμενων κονιδίων στις καλλιέργειες έγινε την 7<sup>η</sup> ημέρα, με λήψη 3 δισκίων διαμέτρου 6 mm από κάθε τριβλίο, τα οποία στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν και αναδεύθηκαν για 1 minute σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O περιεκτικότητας 0.01% σε Tween 80 για τη διευκόλυνση αποδέσμευσης των κονιδίων. Στη συνέχεια, τα κονίδια μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου. Για κάθε επέμβαση έγιναν τέσσερις επαναλήψεις.

Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένους PTFE δοκιμαστικούς σωλήνες. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε 4.5 ml από το Potato Broth που προετοιμάστηκε παραπάνω και 0.5 ml εκχυλίσματος από κάθε επέμβαση όπως αναφέρθηκαν στο II.3.2.2. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν στη συνέχεια 50 μl που περιείχαν κατά προσέγγιση 10<sup>8</sup> κονίδια/mL *A. alternata*. Για κάθε επέμβαση έγιναν εννέα επαναλήψεις, και η επώαση των καλλιεργειών έγινε σε θερμοκρασία 25° C για 3 ημέρες.

Μετά την επώαση των 3 ημερών, το περιεχόμενο της καλλιέργειας από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση, και στη συνέχεια κάθε δείγμα ξεπλύθηκε δυο φορές από το potato broth με ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα στη συνέχεια λυοφιλιώθηκαν και φυλλάχθηκαν σε καταψύκτη στους -20° C, μέχρι τη λήψη του φάσματος.

Τα δεδομένα των μικροβιολογικών παραμέτρων συγκρίθηκαν στατιστικά με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και Fisher's Least Significance Difference (LSD) με χρήση του λογισμικού πακέτου Statgraphics Plus Software.

### II.3.2.5 Ανάλυση δειγμάτων με χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

Στην παρούσα μελέτη, για τη διερεύνηση των αλλαγών στα κύτταρα της *A. alternata*, που προκλήθηκαν από την έκθεσή της σε υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, επιλέχθηκε η φασματοσκοπία FT-IR. Η φασματοσκοπία FT-IR αποτελεί μια φυσικοχημική μέθοδο, με την οποία γίνεται καταγραφή των δονήσεων των χημικών δεσμών όταν αυτοί διεγείρονται μετά από απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας (Legal *et al.*, 1991). Όταν εφαρμόζεται σε ολόκληρα κύτταρα μικροοργανισμών, το φάσμα υπέρυθρου που προκύπτει, περιέχει ποιοτικές πληροφορίες για την ολική βιοχημική σύσταση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα των μυκήτων περιέχουν πληροφορίες για τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης όσο και του κυτταροπλάσματος (Kamminskyj *et al.*, 2008). Για το λόγο αυτό η φασματοσκοπία FT-IR έχει

βρει εφαρμογή τόσο στην ταυτοποίηση διαφόρων μυκήτων αλλά και της ανίχνευσης κυτταρικών αλλαγών λόγω της επίδρασης διαφόρων παραγόντων. Η φασματοσκοπία FT-IR σε συνδυασμό με τη χημειομετρία έχει αποδειχθεί ως ένα εξαιρετικό εργαλείο ανάλυσης των βιοχημικών χαρακτηριστικών των μυκήτων σε κυτταρικό επίπεδο όσο και των βιοχημικών αλλαγών που επέρχονται στους μύκητες όταν αυτοί υπόκεινται σε πειραματικές επεμβάσεις και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Kaminskyj, 2008).

Στα λυοφιλωμένα δείγματα των καλλιιεργειών της παρούσας μελέτης προκειμένου για την ανάλυσή τους με φασματοσκοπία FT-IR εφαρμόστηκε η τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy – DRIFTS). Αυτή είναι μια τεχνική με την οποία λαμβάνονται φάσματα από δείγματα τα οποία βρίσκονται σε στερεά κατάσταση και συνήθως σε μορφή σκόνης. Η συγκεκριμένη μέθοδος DRIFTS είναι ιδιαίτερα απλή και δεν απαιτεί ιδιαίτερη προηγούμενη κατεργασία τους δείγματος. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος. Το εξάρτημα αυτό διαθέτει 6 κάτοπτρα. Τα  $M_1$ ,  $M_2$  και  $M_3$  εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα  $M_4$ ,  $M_5$  και  $M_6$  εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Ο υποδοχέας του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε έχει διάμετρο 3 mm και ύψος 2 mm αντίστοιχα.

Μικρή ποσότητα δείγματος από κάθε καλλιέργεια τοποθετούνταν στον υποδοχέα, και γινόταν λήψη του φάσματος FT-IR στο φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700. Ως φάσμα αναφοράς (background) λαμβανόταν το φάσμα του καθαρού βρωμιούχου καλίου (KBr). Σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 σαρώσεις (scans), και η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Σε όλα τα φάσματα έγινε εξομάλυνση του σήματος (smoothing), η οποία καταργεί τον υψηλής συχνότητας θόρυβο του οργάνου υπολογίζοντας το μέσο όρο γειτονικών μετρήσεων, και διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correction) χρησιμοποιώντας την αυτόματη διαδικασία που παρέχεται από το λογισμικό OMNIC (version 7.3, Thermo Electron Corporation). Οι προαναφερόμενες επεξεργασίες αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας κάθε φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς καθώς τις περισσότερες φορές τα φάσματα μιγμάτων ή φυσικών προϊόντων παρουσιάζουν θόρυβο και η βασική τους γραμμή αποτελείται από σημεία η ένταση των οποίων δεν είναι μηδέν. Επίσης, υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών που οφείλονται σε διαφορετικές λειτουργικές χαρακτηριστικές ομάδες με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται ως μια κορυφή. Για τους παραπάνω λόγους κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω επεξεργασία τέτοιων φασμάτων (Huang *et al.*, 2001).

To spectrum match και ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου (second derivative) κάθε φάσματος για το διαχωρισμό των επικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης υπολογίσθηκε με το φίλτρο Savitzky – Golay με παραμέτρους (7 σημεία, 4 cm<sup>-1</sup>, polynomial degree 3) χρησιμοποιώντας το λογισμικό OMNIC και TQ Analyst. Τα αριθμητικά δεδομένα από τη δεύτερη παράγωγο των φασμάτων εξάχθηκαν στο στατιστικό λογισμικό JMP (Version 7, SAS Institute Inc.) προκειμένου να τεθούν στην πολυκριτηριακή στατιστική τεχνική της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA). Η τεχνική αυτή της στατιστικής επεξεργασίας των κυρίων συνιστωσών, επιλέχθηκε καθώς έχει εκτεταμένα εφαρμοσθεί κατά το παρελθόν για τη διάκριση φασμάτων υπερύθρου από μικροοργανισμούς (Rodriguez-Saona *et al.*, 2001; Al-Qadiri *et al.*, 2006).

Με την τεχνική αυτή δημιουργούνται με βάση τα αριθμητικά δεδομένα από τα φάσματα καινούργιες μεταβλητές οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών (κυμματαριθμοί) έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και να περιέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Οι κύριες συνιστώσες που προκύπτουν μπορούν να ερμηνεύσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης. Η πρώτη κύρια συνιστώσα αποδίδει τη μεγαλύτερη ποσότητα πληροφορίας, ακολουθούμενη από τη δεύτερη κ.ο.κ. Η ανάλυση αυτή στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε στη δεύτερη παράγωγο συγκεκριμένων περιοχών των φασμάτων FT-IR οι οποίες αντιστοιχούν σε περιοχές απορρόφησης βασικών κυτταρικών συστατικών.

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών μπορεί και μετατρέπει έναν αριθμό πιθανά συσχετισμένων μεταβλητών σε ένα μικρότερο αριθμό μη συσχετισμένων μεταβλητών οι οποίες ονομάζονται κύριες συνιστώσες (Principal Components, PCs). Η επεξεργασία αυτή στηρίζεται στον υπολογισμό των πιο βασικών χαρακτηριστικών ενός πολυδιάστατου συνόλου πληροφοριών, αφαιρώντας τυχαίες διακυμάνσεις και συγκρατεί τις κύριες συνιστώσες διατηρώντας τη στατιστική διακύμανση των δειγμάτων (Goodacre *et al.*, 1996). Η επεξεργασία της πολυδιάστατης πληροφορίας γίνεται με τεχνικές ελαχίστων τετραγώνων και καταλήγει σε μια σειρά ορθογώνιων ιδιοδιανυσμάτων (eigenvectors) του πίνακα συνδιασποράς των δειγμάτων. Η τεχνική αυτή δείχνει εάν υπάρχουν φυσικές ομάδες των αποτελεσμάτων και περιγράφει ομοιότητες ή διαφορές πολυπαραμετρικών πληροφοριών. Στην παρούσα μελέτη, η ανάλυση αυτή εφαρμόσθηκε στη δεύτερη παράγωγο των φασμάτων FT-IR της *A. alternata* σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος που αντιστοιχούν σε περιοχές απορρόφησης βασικών κυτταρικών συστατικών.

### II.3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Alternaria alternata* εξετάσθηκε αρχικά σε στερεές καλλιέργειες σε τριβλίο με μέτρηση της ανάπτυξης του μυκηλίου την 2η, 4η και 7η ημέρα καθώς και τον αριθμό των παραγόμενων κωνιδίων σε κάθε καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα II.3.1.

Όλα τα εκχυλίσματα από φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, βρέθηκε να ενισχύουν σημαντικά την ανάπτυξη του μυκηλίου της *A. alternata*. Πιο συγκεκριμένα, το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*) προκάλεσε αύξηση του μυκηλίου κατά 97%, ακολουθώντας ο Ύσσωπος (*Hyssopus officinalis*) με 90%, το δίκταμο (*Origanum dictamnus*) με 89%, το φασκόμηλο (*Salvia officinalis*) με 83% αλλά και η ρίγανη (*Origanum vulgare*) με 76%. Το φασκόμηλο βρέθηκε να είναι και το πλέον δραστικό στην προώθηση της κωνιδιογένεσης παρατηρώντας μια αύξηση +65% σε σχέση με το μάρτυρα, ακολουθούμενο από το μελισσόχορτο με +44% και το δίκταμο με +35%. Το εκχύλισμα του κρόκου (*Crocus sativus*) βρέθηκε να είναι το πλέον βιολογικά ενεργό όσον αφορά στη μείωση της παραγωγή των κωνιδίων σε σχέση με το μάρτυρα σε ποσοστό -73%, ακολουθούμενο από τη ρίγανη με ποσοστό -50% και τον ύσσωπο με αντίστοιχο ποσοστό -33%.

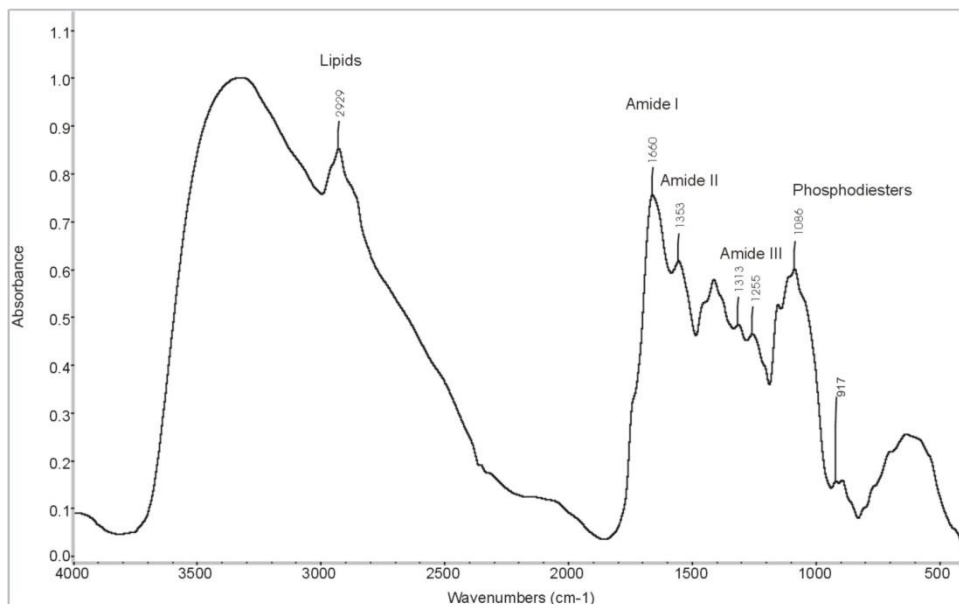
**Πίνακας II.3.1** Επίδραση των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών στην ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή κωνιδίων της *Alternaria alternata*.

Επέμβαση/ φυτικό είδος	Διάμετρος μυκηλίου (mm)			Παραγωγή κωνιδίων αριθμός/cm <sup>2</sup>
	2 ημέρες	4 ημέρες	7 ημέρες	
Control	10,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	22,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	39,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,42*10 <sup>5</sup> ± 0,55*10 <sup>5</sup> <sup>b,c</sup>
<i>Crocus sativus</i>	10,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	22,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	39,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,67*10 <sup>5</sup> ± 0,27*10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>
<i>Hyssopus officinalis</i>	14,8 ± 1,5 <sup>bc</sup>	43,0 ± 0,3 <sup>d</sup>	75,5 ± 1,0 <sup>cd</sup>	1,61*10 <sup>5</sup> ± 0,08*10 <sup>5</sup> <sup>a,b</sup>
<i>Melissa officinalis</i>	17,8 ± 0,3 <sup>d</sup>	46,0 ± 0,5 <sup>e</sup>	78,5 ± 1,5 <sup>d</sup>	3,48*10 <sup>5</sup> ± 0,18*10 <sup>5</sup> <sup>c,d</sup>
<i>Origanum dictamnus</i>	16,0 ± 0,3 <sup>cd</sup>	43,3 ± 0,4 <sup>d</sup>	75,2 ± 1,5 <sup>cd</sup>	3,27*10 <sup>5</sup> ± 0,68*10 <sup>5</sup> <sup>c,d</sup>
<i>Origanum vulgare</i>	13,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	38,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	70,2 ± 1,9 <sup>b</sup>	1,21*10 <sup>5</sup> ± 0,32*10 <sup>5</sup> <sup>a,b</sup>
<i>Salvia officinalis</i>	13,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	40,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	72,8 ± 0,9 <sup>bc</sup>	3,99*10 <sup>5</sup> ± 0,44*10 <sup>5</sup> <sup>d</sup>

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές ( $P \leq 0.05$ ), συγκριτικά με το μάρτυρα για κάθε ημέρα μέτρησης.

Η παρατηρούμενη βιολογική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Lamiaceae καθώς και του κρόκου, επί της *A. alternata* στις συγκεντρώσεις που αυτή ελέγχθηκε, πιθανόν να οφείλεται στις υδατοδιαλυτές ουσίες οι οποίες μεταξύ άλλων περιέχουν και σάκχαρα. Η απόκριση της *A. alternata* στην έκθεσή της στα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών, πιθανότατα οφείλεται στην ενεργοποίηση μοριακών μηχανισμών του μύκητα για την αντιμετώπιση του προκαλούμενου στρες που οφείλεται στις χημικές αλλαγές του περιβάλλοντος ανάπτυξής του.

Τα βιοδραστικά μόρια των υδατικών εκχυλισμάτων που ελέγχθησαν πιθανότατα ενεργοποιούν μοριακούς μηχανισμούς στα κύτταρα του μύκητα που οδηγούν σε αύξηση τόσο της ανάπτυξης του μυκηλίου όσο και της παραγωγής των κονιδίων.



**Σχήμα II. 3. 1.** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων

Στην παρούσα ενότητα, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία FT-IR προκειμένου να ανιχνευθούν αλλαγές στη βιοχημική σύσταση των καλλιεργειών του φυτοπαθογόνου μύκητα *A. alternata* ως αποτέλεσμα της έκθεσής του, κατά την επώαση σε υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Τα αποτελέσματα της παρούσας καταδεικνύουν τη δυνατότητα που παρέχει η φασματοσκοπία FT-IR για γρήγορη και παράλληλα αξιόπιστη αξιολόγηση των βιοδραστικών ουσιών που περιέχονται στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά.

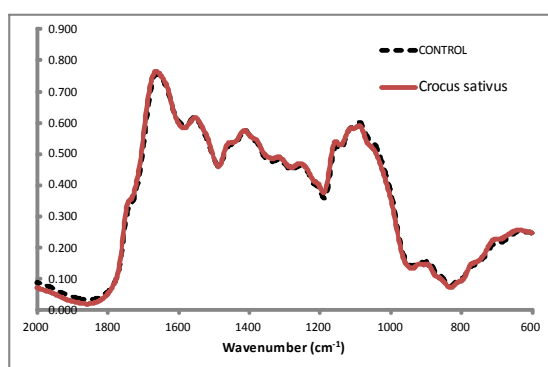
**Πίνακας II.3.2** Σύγκριση εμβαδού, έπειτα από ολοκλήρωση, συγκεκριμένων περιοχών του φάσματος της *Alternaria alternata* για κάθε επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα

		Επεμβάσεις						
Περιοχή φάσματος (cm <sup>-1</sup> )	Αντιστοιχία	<i>Crocus sativus</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Salvia officinalis</i>	
I	3000 - 2800	Lipids	98.38	95.00	92.91	92.16	87.95	93.13
II	1705 - 1575	Amide I	94.31	78.19	77.74	86.11	75.21	84.28
III	1575 - 1480	Amide II	90.86	80.03	63.07	76.18	87.06	75.03
IV	1350 - 1240	Amide III	89.54	58.96	<b>30.58<sup>a</sup></b>	<b>43.47<sup>a</sup></b>	<b>46.37<sup>a</sup></b>	58.85
V	1200 - 900	Carbohydrates	92.09	83.17	82.05	74.45	69.93	77.72
	4000 - 400		89.79	67.24	66.57	75.92	72.21	75.22

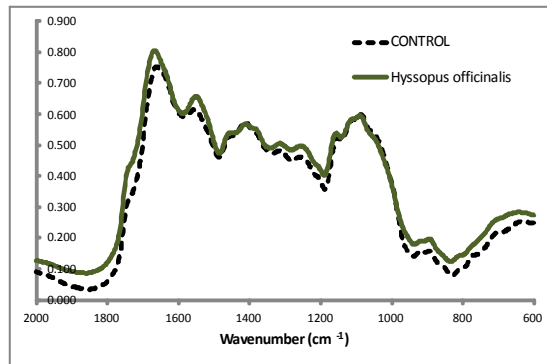
(a) Δεν υπάρχει ομοιότητα σε σχέση με το μάρτυρα.

\*Critical match value = 50.00

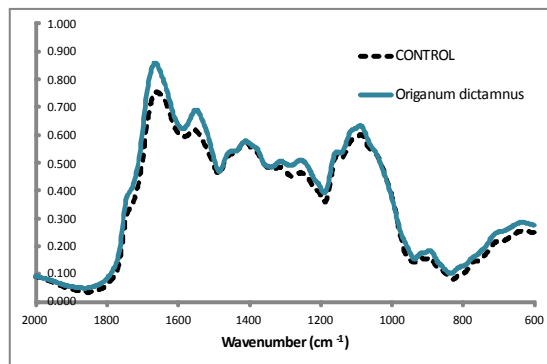
Το φάσμα FT-IR της *A. alternata* (Σχήμα II.3.1), είναι ο μέσος όρος των φασμάτων από εννέα ανεξάρτητες επαναλήψεις και είναι ανάλογο και συγκρίσιμο με άλλα φάσματα μυκήτων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Jilkine *et al.*, 2008; Kaminskyj *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010; Sompong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Ισχυρές απορροφήσεις παρατηρήθηκαν σε όλες τις περιοχές του φάσματος που χαρακτηρίζουν τα κύρια κυτταρικά συστατικά. Πιο αναλυτικά, η περιοχή του φάσματος από 3000-2800 cm<sup>-1</sup>, διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των αλυσίδων των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις δονήσεις τάσης δεσμών άνθρακα υδρογόνου C-H.



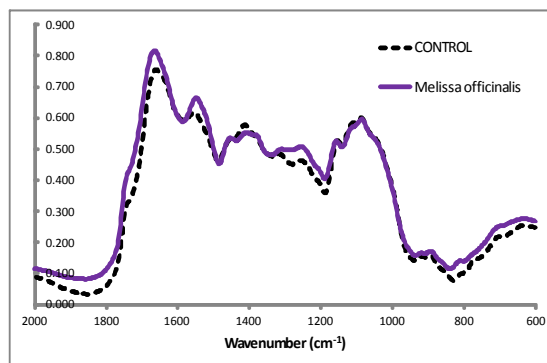
**Σχήμα II.3.2** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata* έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος *Crocus sativus*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων



**Σχήμα II.3.3** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata* έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος *Hyssopus officinalis*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων

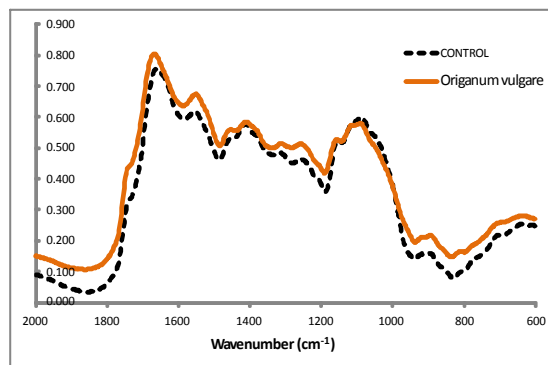


**Σχήμα II.3.4** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata* έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος *Origanum dictamnus*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων

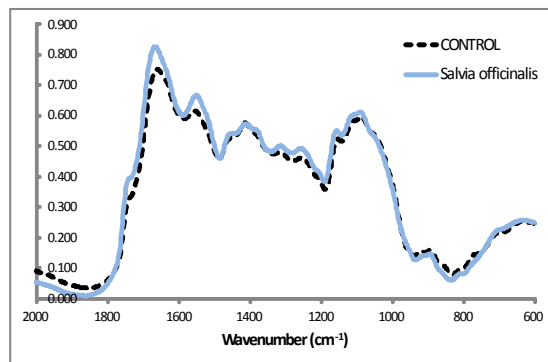


**Σχήμα II.3.5** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata* έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος *Melissa officinalis*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων





**Σχήμα II.3.6** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata* έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος *Origanum vulgare*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων



**Σχήμα II.3.7** FT-IR φάσμα της *Alternaria alternata* έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος *Salvia officinalis*. Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων

Στην παρούσα μελέτη η κορυφή που ανιχνεύθηκε στα  $2929\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδεται στα λιπαρά οξέα που περιέχονται στην κυτταρική μεμβράνη (Wu *et al.*, 2001; Donbeshko *et al.*, 2000). Στην περιοχή του φάσματος από  $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ , που απορροφούν οι αμιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων των κυττάρων (Van der Mei *et al.*, 1993) παρατηρήθηκαν δυο έντονες απορροφήσεις στα  $1660\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1553\text{ cm}^{-1}$  χαρακτηριστικές του αμιδικού δεσμού I (Naumann, 1998) που προκύπτουν από τη δόνηση τάσης του δεσμού  $>\text{C}=\text{O}$  και από τη δόνηση κάμψης του δεσμού C-N, και του αμιδικού δεσμού II των πρωτεϊνών αντίστοιχα (Eckel *et al.*, 2001) που προκύπτει από τη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και από τη δόνηση τάσης του δεσμού C-N των πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Kansiz *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2006). Οι κορυφές που ανιχνεύθηκαν στα  $1313$  και  $1255\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς III των πρωτεϊνών (Yang *et al.*, 2005; Chiriboga *et al.*, 1998).

Η περιοχή του φάσματος από  $1200-900\text{cm}^{-1}$ , διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των πολυσακχαριτών. Η απορρόφηση στα  $1152\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην παραμόρφωση των  $\text{CH}_3$  (Schul & Baranska, 2007), στα  $1086\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην απορρόφηση των συμμετρικών δονήσεων τάσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών που προέρχονται από τους φωσφοδιεστέρες των νουκλεϊκών οξέων (Beekes *et al.*, 2007; Erukhimovitch *et al* 2005; Fujioka *et al.*, 2004) και η απορρόφηση στα  $917\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί στους φωσφοδιεστέρες (Wood *et al.*, 1996). Ο μέσος όρος από τα φάσματα της *A. alternata* για την περιοχή  $2000 - 600\text{ cm}^{-1}$  τόσο του μάρτυρα (control) όσο και κάθε επέμβασης με υδατικά εκχυλίσματα κρόκου, ύσσωπου, μελισσόχορτου, δίκταμου, ρίγανης και φασκόμηλου αντίστοιχα παρουσιάζονται στο **Σχήμα II.3.2**.

Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στα συστατικά των κυττάρων κυρίως σχετίζονται με τη δυνατότητα του οργανισμού να εκτελεί πολύ ειδικές λειτουργίες σε συγκεκριμένες περιοχές, και σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες φασματοσκοπίας FT-IR επάνω στην απόκριση των μυκήτων σε συνθήκες στρες, τα φάσματα έδειξαν χαμηλότερο συνολικά σήμα των αμιδικών δεσμών I και II των πρωτεϊνών (Szeghalmi *et al.*, 2007).

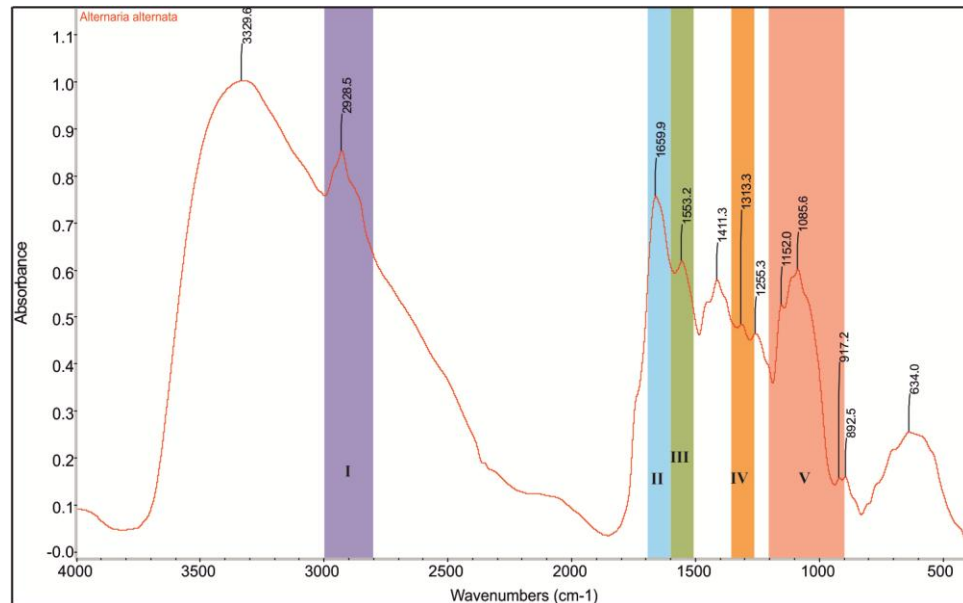
Πρόσθετα, υπολογίστηκαν οι τιμές ομοιότητας (match values) μεταξύ των μέσων όρων των φασμάτων των επεμβάσεων σε σχέση με το μέσο όρο των φασμάτων του μάρτυρα (control) προκειμένου να εκτιμηθούν ενδεχόμενες διαφοροποιήσεις σε συγκεκριμένες υποπεριοχές του φάσματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **πίνακα II.3.2**. Οι χαμηλότερες τιμές ομοιότητας παρατηρήθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις με υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών της οικογένειας *Lamiaceae*, στα αμύδια των πρωτεϊνών, και οι πλέον χαμηλές συγκεκριμένα στο αμύδιο III, για την περίπτωση του μελισσόχορτου, του δίκταμου και της ρίγανης (**πίνακας II.3.2**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πιθανόν τα φαινορικά συστατικά των εκχυλισμάτων και ειδικότερα το ροσμαρινικό οξύ το οποίο είναι η χαρακτηριστική βιοδραστική ουσία για τα φυτά αυτής της οικογένειας (Janicsák *et al.*, 1999), ευθύνονται για την ενεργοποίηση διαφόρων μοριακών μηχανισμών στην *A. alternata* ικανών να δώσουν ως απόκριση ένα διαφορετικό πρωτεϊνικό προφίλ. Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι το μελισσόχορτο, το οποίο περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος ανάμεσα σε όλα τα είδη της οικογένειας *Lamiaceae* (Janicsák *et al.*, 1999; Saltas *et al.*, 2013) προκαλεί τις πλέον έντονες διαφοροποιήσεις (alterations) στο πρωτεϊνικό προφίλ. Επιπλέον, οι τιμές ομοιότητας για την περιοχή του αμιδίου III, ακολουθούν αντιστρόφως ανάλογα την κατάταξη των ειδών της οικογένειας *Lamiaceae* όσον αφορά τη συγκέντρωσή τους σε

ροσμαρινικό οξύ όπως αυτό έχει υπολογισθεί σε άλλες εργασίες (Saltas *et al.*, 2013 ).

Οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα φάσματα του μάρτυρα και των επεμβάσεων μπορούν να διακριθούν πιο έντονα αξιοποιώντας τα δεδομένα προηγούμενων παρόμοιων εργασιών, αν αυτά μετασχηματισθούν με βάση τη δεύτερη παράγωγο (Somrong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Zoumproulou *et al.*, 2013). Ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά βήματα πριν την αξιολόγηση των φασμάτων. Ουσιαστικά με τη δεύτερη παράγωγο εξασφαλίζεται ο διαχωρισμός των αλληλεπικαλυπτόμενων ζωνών του αρχικού φάσματος και μειώνεται η ποικιλομορφία των επαναλήψεων των ίδιων φασμάτων λόγω μετατόπισης της βασικής γραμμής τους (Al-Qadiri *et al.*, 2006).

Προκειμένου για την πληρέστερη και αναλυτικότερη προσέγγιση στα φάσματα επιλέχθηκαν πέντε υποπεριοχές σε αυτά, στις οποίες απορροφούν δεσμοί γνωστών κυτταρικών συστατικών (Σχ. II.3.8). Οι πέντε υποπεριοχές του φάσματος που εξετάστηκαν ξεχωριστά για κάθε μια από τις έξι επεμβάσεις με τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών στην *A. alternata*, και ήταν οι ακόλουθες:

- Υποπεριοχή I:  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  , η οποία διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών.
- Υποπεριοχή II:  $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  η οποία διαμορφώνεται από τους αμιδικούς δεσμούς I των πρωτεϊνών
- Υποπεριοχή III:  $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  η οποία διαμορφώνεται από τους αμιδικούς δεσμούς II των πρωτεϊνών
- Υποπεριοχή IV:  $1350 - 1240 \text{ cm}^{-1}$  η οποία διαμορφώνεται από τους αμιδικούς δεσμούς III των πρωτεϊνών
- Υποπεριοχή V:  $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$  χαρακτηριστική περιοχή για πολυσακχαρίτες (Moen *et al.*, 2005, Zoumproulou *et al.*, 2010) που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων από τη σύσταση των υδατανθράκων και ειδικά για κορυφές που εντοπίζονται από  $1100 - 900 \text{ cm}^{-1}$  (Kaminskyj *et al.*, 2008).



**Σχήμα II.3.8.** Υποπεριοχές φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου

Στα **σχήματα II.3.9 και II.3.11** παρουσιάζονται τα φάσματα όπως μετασηματίστηκαν με τη δεύτερη παράγωγο χωρισμένα σε δυο διακριτές ομάδες, η πρώτη (Group A) (**Σχ. II.3.9**) με εκχυλίσματα τα οποία προωθούν την παραγωγή κονιδίων της *A. alternata* και η δεύτερη (Group B) (**Σχ. II.3.11**) σε αυτά που την παρεμποδίζουν. Διαφορές στα φάσματα στην Υποπεριοχή I, εντοπίστηκαν στα  $2926$  και  $2960\text{ cm}^{-1}$  και μπορούν να αποδοθούν στα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης (Fung *et al.*, 1996). Διαφορές στην Υποπεριοχή II εντοπίστηκαν στα  $1630$ ,  $1670$  και  $1685\text{ cm}^{-1}$ , και αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς I των πρωτεϊνών (Wood *et al.*, 1996; Shetty *et al.*, 2006). Στην Υποπεριοχή III αντίστοιχα, εντοπίστηκαν στα  $1553$ ,  $1570$  και  $1585\text{ cm}^{-1}$ , που αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς II των πρωτεϊνών (Beekes *et al.*, 2007; Naumann, 1998; Eckel *et al.*, 2001). Οι αντίστοιχες διαφορές στα φάσματα στην υποπεριοχή VI, εντοπίστηκαν στα  $1313$ ,  $1284$ ,  $1255\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς III των πρωτεϊνών (Chiriboga *et al.*, 1998). Στη υποπεριοχή V διαφορές εντοπίστηκαν στα  $1150\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-O των υδατανθράκων (Fung *et al.*, 1996) και στα  $985\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται σε  $\text{OCH}_3$  – πολυσακχαρίτες. Συμπερασματικά από τα παραπάνω όλα τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών που εξετάστηκαν παρουσίασαν σημαντική επίδραση στο περιεχόμενο των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, στις πρωτεΐνες αλλά και τους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων της *A. alternata*.

Μετά τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου των φασμάτων πραγματοποιήθηκε η τεχνική της πολυπαραμετρικής ανάλυσης των κύριων συνιστωσών PCA για να εντοπιστεί η στατιστική διακύμανση μεταξύ των φασμάτων της *A. alternata* ύστερα από την επώασή της με διαφορετικά υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Η εφαρμογή της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών από φάσματα μετασχηματισμένα με δεύτερη παράγωγο, έχει αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματική για τον προσδιορισμό των βιοχημικών αλλαγών σε μικροοργανισμούς σε προηγούμενες εργασίες (Jilkine *et al.*, 2008; Somrong *et al.*, 2013; Zoumproulou *et al.*, 2013; Szeghalmi *et al.*, 2007). Η ανάλυση PCA εφαρμόστηκε ξεχωριστά για κάθε μια από τις πέντε υποπεριοχές του φάσματος που περιγράφηκαν πιο πάνω.

Η τεχνική αυτή βοηθάει στην ομαδοποίηση των επεμβάσεων με παρόμοια χαρακτηριστικά στα φάσματά τους και έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη γραφική απεικόνιση των διαφορών και των ομοιοτήτων από την επεξεργασία των φασμάτων (Al-Qadiri *et al.*, 2006). Στην παρούσα μελέτη, οι σημαντικές διαφορές στα φάσματα αποδίδουν τις αλλαγές σε βασικά κυτταρικά συστατικά της *A. alternata* εξαιτίας της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων.

Πράγματι, η ανάλυση της υποπεριοχής I, ( $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ), η οποία διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των κυττάρων της *A. alternata* ανάλογα με την επέμβαση που χρησιμοποιήθηκε. Αναφορικά με την πρώτη ομάδα (Group A), τα φάσματα του μάρτυρα διαχωρίστηκαν πλήρως από τις επεμβάσεις, και μεταξύ των επεμβάσεων αυτή του φασκόμηλου διαχωρίστηκε πλήρως από αυτές του μελισσόχορτου και του δίκταμου. Στη δεύτερη ομάδα, παρατηρήθηκε πλήρης διαχωρισμός όλων των φασμάτων ανάλογα με την επέμβαση του εκχυλίσματος που δέχθηκαν. Τα διαγράμματα φορτίου (loading plots) (Σχήμα II.3.10 και II.3.12) καταδεικνύουν τη συνεισφορά θετική ή αρνητική της κάθε μεταβλητής (κυμματαριθμός) σε κάθε μια από τις κύριες συνιστώσες και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ένδειξη για το κατά πόσο μια περιοχή του φάσματος συμμετέχει ή όχι στην παρατηρούμενη διασπορά (Kansiz *et al.*, 1999). Από τα διαγράμματα φορτίου, λοιπόν, είναι εμφανές το που οι απορροφήσεις επηρεάζουν σημαντικά και τις τρεις κύριες συνιστώσες, και άρα συμμετέχουν σημαντικά στη διασπορά των δειγμάτων.

Καταλήγοντας από τα προηγούμενα, η στατιστική επεξεργασία των κυρίων συνιστωσών ομαδοποίησε τα δείγματα σε διακριτές ομάδες εντός των τριών κύριων πρώτων συνιστωσών (PCs), υπολογίζοντας για 69-89% μεταβλητότητα (variability) στα αρχικά δεδομένα ανάλογα την υποπεριοχή του φάσματος. Θετικές ή αρνητικές συνεισφορές της

κάθε μεταβλητής (κυμματαριθμός) σε κάθε μια από τις κύριες συνιστώσες όπως εμφανίστηκαν στα διαγράμματα φορτίου (loading plots) της πρώτης, δεύτερης και τρίτης κύριας συνιστώσας (σχήμα II.3.10 και II.3.12) επιβεβαιώνουν ότι τα αμίδια I, II, III και οι πολυσακχαρίτες έχουν τη μεγαλύτερη συμμετοχή στη διαφοροποίηση των δεδομένων.

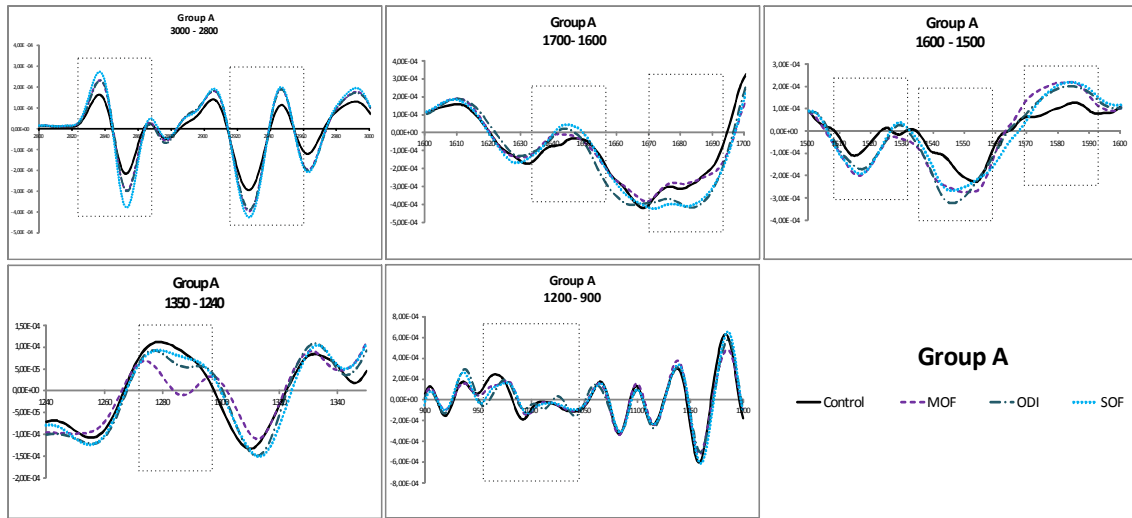
Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο γεγονός ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών που εξετάστηκαν προκαλούν μεταβολές στη σύσταση των βασικών κυτταρικών στοιχείων, όπως έχει αποδειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Huleihel *et al.*, 2009; Sompong *et al.*, 2013; Zoumproulou *et al.*, 2013) εξαιτίας της επίδρασης των βιοδραστικών μορίων που περιέχονται σε αυτά. Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών των φασμάτων FT-IR του φυτοπαθογόνου μύκητα *A. alternata* κατέδειξε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που δοκιμάστηκαν σε αυτόν επηρέασαν σημαντικά τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και τις πρωτεΐνες.

**Πίνακας II.3. 3** Λόγοι εμβαδού υποπεριοχών φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* υπό την επίδραση εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

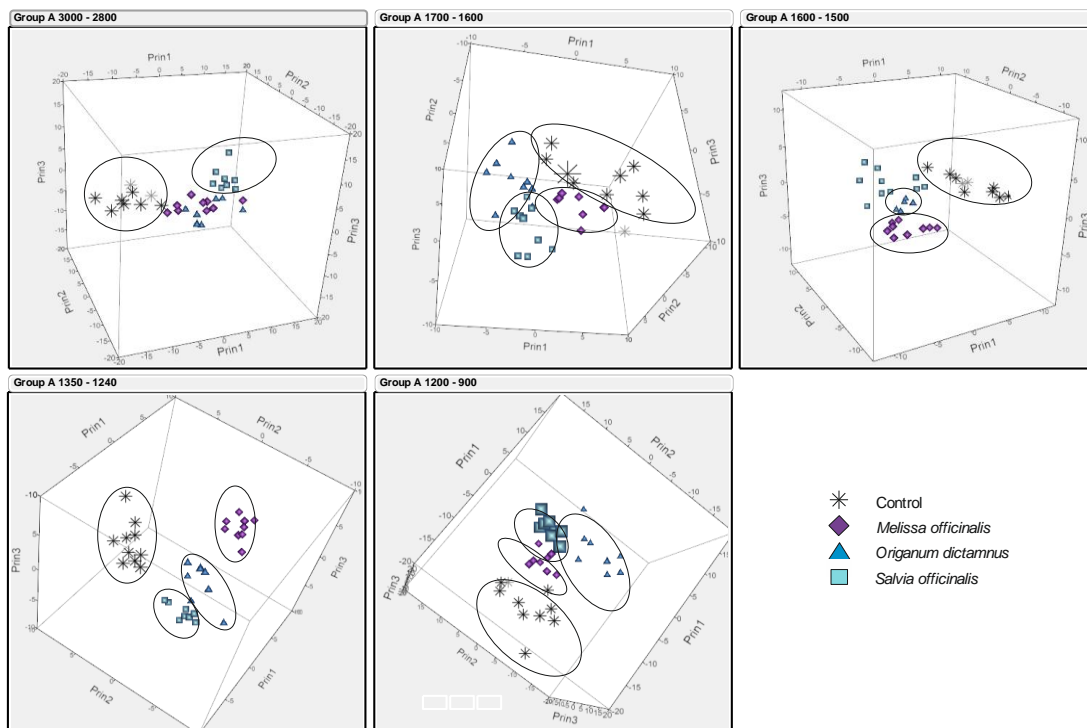
Επεμβάσεις	Lipids / Amide I	Lipids/ Amide II	Amide I/ Total Amides	Amide II/ Total Amides	Lipids / Carbs
Μάρτυρας	0.617	3.734	0.844	0.139	0.266
<i>Crocus sativus</i>	0.676	3.709	0.832	0.152	0.313
<i>Hyssopus officinalis</i>	0.708	2.455	0.736	0.220	0.366
<i>Melissa officinalis</i>	0.704	2.140	0.748	0.246	0.134
<i>Origanum dictamnus</i>	0.617	2.187	0.770	0.217	0.314
<i>Origanum vulgare</i>	0.646	2.699	0.796	0.190	0.352
<i>Salvia officinalis</i>	0.730	2.625	0.769	0.214	0.360

Η παραπάνω συσχέτιση βρέθηκε θετική μόνο για την περίπτωση της διαμέτρου του μυκηλίου των καλλιέργειών σε τριβλίο κι όχι για την περίπτωση της παραγωγής των κονιδίων. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι η παραγωγή των κονιδίων στις υγρές καλλιέργειες με βάση τις οποίες λήφθηκαν τα φάσματα FT-IR δεν ήταν στην ίδια φάση ανάπτυξης με τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε στερεό υπόστρωμα agar στα τριβλία κι έτσι οι διαφορές οφείλονται στις συνθήκες καλλιέργειας κι όχι στις επεμβάσεις από τα

εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών.

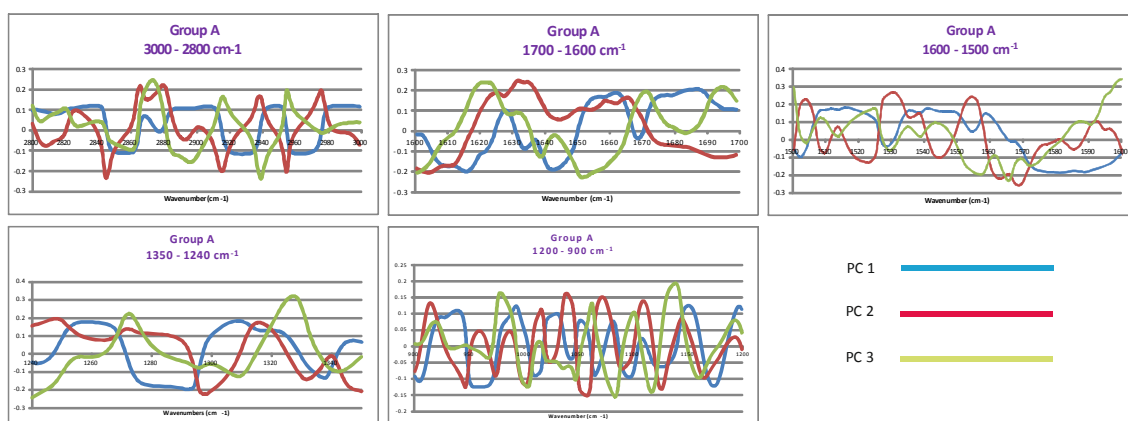


**Σχήμα II.3.9** Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα *Melissa officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Salvia officinalis*. Β' παράγωγος των υποπεριοχών του φάσματος

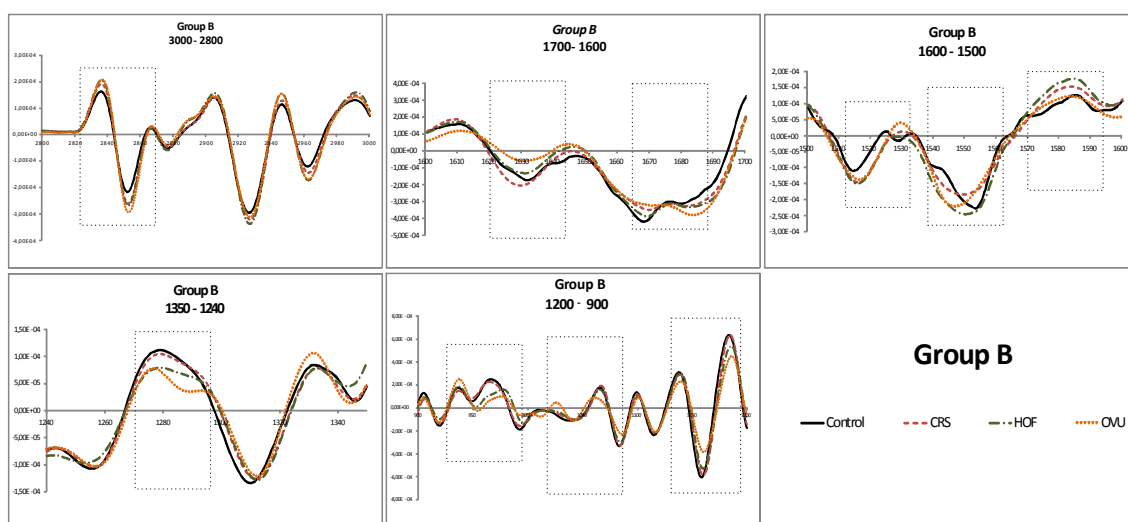


**Σχήμα II.3.10** Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα *Melissa officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Salvia officinalis*. Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων συνιστωσών σε αντιστοιχία με τη β' παράγωγο από το II.3.9

Επιπλέον υπολογίσθηκαν οι λόγοι εμβαδών των συγκεκριμένων κορυφών (πίνακας II.3.3) που αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες ομάδες μακρομορίων, και βρέθηκαν να συσχετίζονται με τις μικροβιολογικές παραμέτρους του πίνακα II.3.1. Πιο συγκεκριμένα, η διάμετρος του μυκηλίου βρέθηκε να συσχετίζεται ισχυρά (πίνακας II.3.4) με το λόγο των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στα λιπίδια/αμίδιο II ( $r_2: 0.92-0.98$ ), το λόγο των εμβαδών αμίδιο I/σύνολο αμιδίων ( $r_2: 0.88-0.96$ ), και το λόγο των εμβαδών αμίδιο II/σύνολο αμιδίων ( $r_2: 0.91-0.96$ ).



**Σχήμα II.3.11** Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα *Melissa officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Salvia officinalis*. Διάγραμμα φορτίου για τις υποπεριοχές του φάσματος

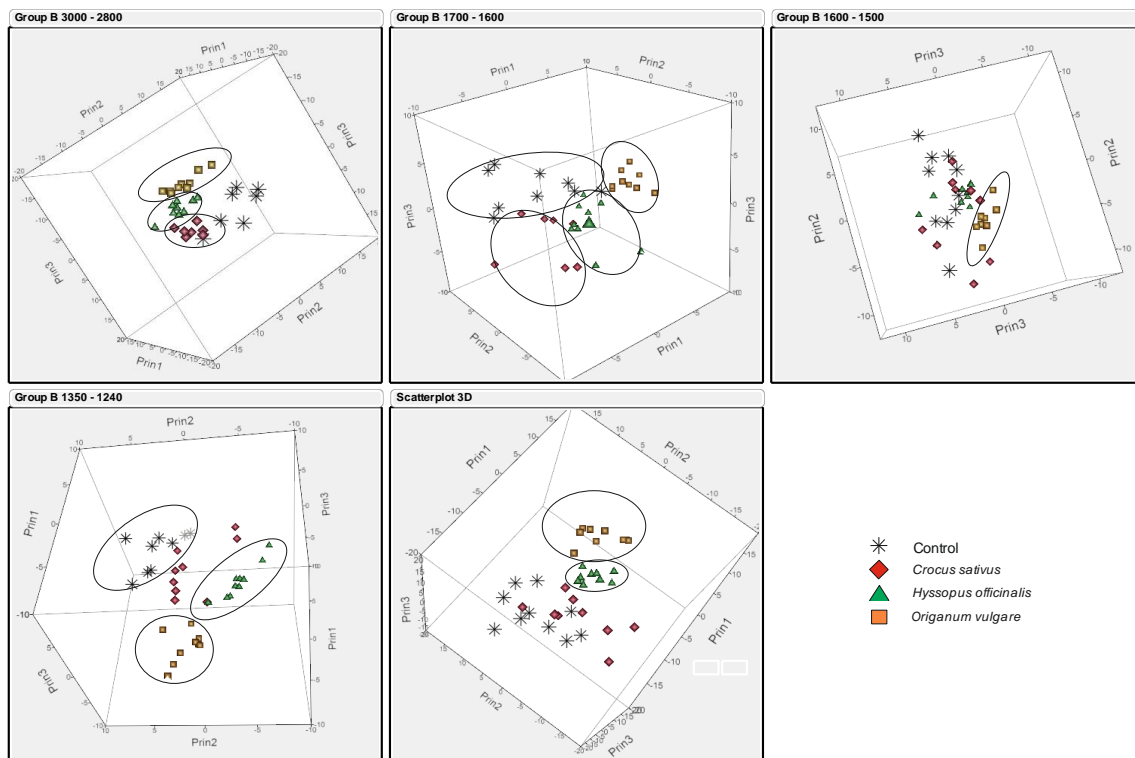


**Σχήμα II.3.12** Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα *Crocus sativus*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum vulgare*. Β' παράγωγος των υποπεριοχών του φάσματος.

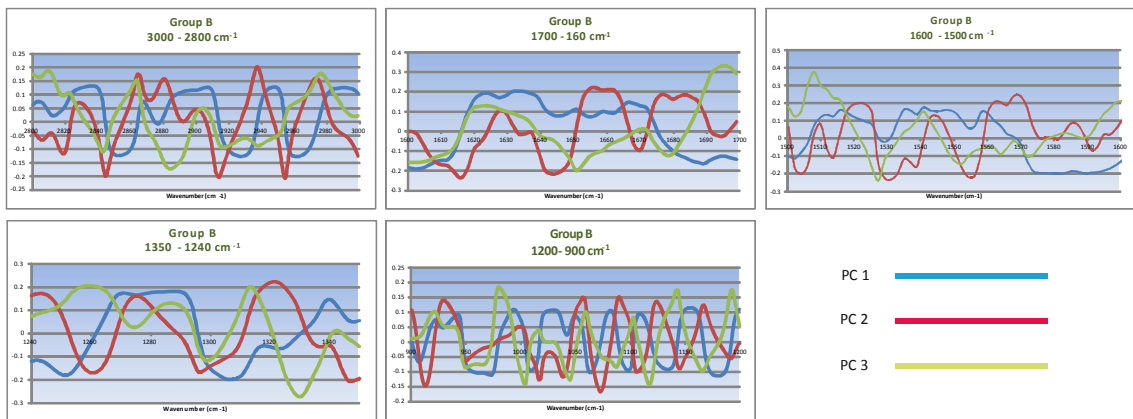


**Πίνακας II.3.4** Συντελεστές συσχέτισης συγκεκριμένων του λόγου εμβαδού συγκεκριμένων περιοχών του φάσματος της *Alternaria alternata* με τη διάμετρο του μυκηλίου

Λόγοι Εμβαδού περιοχών φάσματος FTIR	Διάμετρος μυκηλίου			
	2 <sup>η</sup> Ημέρα	3 <sup>η</sup> Ημέρα	4 <sup>η</sup> Ημέρα	7 <sup>η</sup> Ημέρα
Lipids/Amide II	0.92	0.98	0.98	0.96
Amide I / Total Amides	0.88	0.96	0.95	0.92
Amide II / Total Amides	0.92	0.96	0.95	0.91



**Σχήμα II.3.13** Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα *Crocus sativus*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum vulgare*. Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων συνιστωσών σε αντιστοιχία με τη β' παράγωγο από το II.3.12



**Σχήμα II.3.14** Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της *Alternaria alternata* έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα *Crocus sativus*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum vulgare*. Διάγραμμα φορτίου για όλες τις υποπεριοχές του φάσματος

**Η παρούσα μελέτη θεωρείται η πρώτη που προσδιόρισε συσχέτιση, και μάλιστα ισχυρή, μεταξύ της ανάπτυξης του μυκηλίου και του λόγου εμβαδών συγκεκριμένων κορυφών των φασμάτων FT-IR.**

### II.3.4 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη κατέδειξε ότι η ανάλυση με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR μπορεί να αξιολογήσει με αρκετή λεπτομέρεια αλλαγές στα κύρια κυτταρικά συστατικά κάτω από συνθήκες στρες, να κάνει επίσης διάκριση και ταξινόμηση των επεμβάσεων αναλόγων των αλλαγών που επιφέρουν στα κυτταρικά συστατικά, και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα στην αξιολόγηση της ανάπτυξης των μυκήτων σε πειράματα *in vitro*.

Πρόσθετα, το φαινόμενο της ενίσχυσης της ανάπτυξης συγκεκριμένων ειδών μυκήτων λόγω της επιρροής βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, μπορεί να αξιοποιηθεί ευρύτατα σε βιοτεχνολογικές καινοτόμες δράσεις. Τα βιοδραστικά μόρια τα οποία είναι ικανά να ενισχύσουν και να προωθήσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών και ιδιαίτερα μυκήτων αναμένεται να τύχουν μεγάλης προσοχής το επόμενο διάστημα στον τομέα του βιολογικού ελέγχου των ασθενειών. Για το λόγο αυτό, χρειάζεται περαιτέρω εμβάθυνση σε μοριακό επίπεδο της βιολογικής δράσης που ανιχνεύθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, και η οποία αφορά στα μονοπάτια έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την κονιδιογένεση της *A. alternata*, καθώς και του πιθανού ρόλου που διαδραματίζει το ροσμαρινικό οξύ σε αυτή τη διαδικασία, γι αυτό και ακολουθεί σχετική βιοδοκιμή στην επόμενη ενότητα.



## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ /ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ





Contents lists available at ScienceDirect

## Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)

## FTIR spectroscopic evaluation of changes in the cellular biochemical composition of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* induced by extracts of some Greek medicinal and aromatic plants



Efstathia Skotti<sup>a</sup>, Sophia Kountouri<sup>b</sup>, Pavlos Bouchagier<sup>c</sup>, Dimitrios I. Tsitsigiannis<sup>b</sup>, Moschos Polissiou<sup>a</sup>, Petros A. Tarantilis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>b</sup>Laboratory of Phytopathology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>c</sup>Department of Food Technology, Technological Educational Institute of Ionian Islands, GR 28100 Kefallonia, Greece

### HIGHLIGHTS

- Evaluation of medicinal and aromatic plants in the physiology of the fungus *Alternaria alternata*.
- Detection of biochemical changes in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* by spectroscopy.
- Correlation between FTIR band area ratios and mycelium growth development of *Alternaria alternata*.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 December 2013

Received in revised form 21 February 2014

Accepted 26 February 2014

Available online 6 March 2014

#### Keywords:

FTIR

*Alternaria alternata*

Medicinal and aromatic plants

Growth enhancement

### ABSTRACT

In this study, the biological activity of aquatic extracts of selected Greek medicinal and aromatic plants to the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* was investigated. *Lamiaceae* species (*Hyssopus officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Origanum dictamnus* L., *Origanum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L.) were found to enhance significantly the mycelium growth whereas *Crocus sativus* appears to inhibit it slightly. *M. officinalis* and *S. officinalis* caused the highest stimulation in mycelium growth (+97%) and conidia production (+65%) respectively. In order to further investigate the bioactivity of plant extracts to *A. alternata*, we employed Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Differences of original spectra were assigned mainly to amides of proteins. The second derivative transformation of spectra revealed changes in spectral regions corresponding to absorptions of the major cellular constituents such as cell membrane and proteins. Principal component analysis of the second derivative transformed spectra confirmed that fatty acids of the cell membranes, amides of proteins and polysaccharides of the cell wall had the major contribution to data variation. FTIR band area ratios were found to correlate with fungal mycelium growth.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 529 4262; fax: +30 210 529 4265.  
E-mail address: [ptara@aua.gr](mailto:ptara@aua.gr) (P.A. Tarantilis).

## Introduction

Fungal species have diverse impacts on plants, animals, ecosystems and the environment [1–3] ranging from nutrient recycling, to biotechnology [4,5] or emerging animal and plant pathogens. Many fungal pathogens cause serious damage to a large number of crops with significant impacts to agricultural economy [6,7]. Fungal cells contain genetic material (DNA and RNA), gene products (proteins) and products of proteins (carbohydrates and lipids) [8]. Fungal species interact with their surroundings through their cell walls and by means of the compounds they secrete or store and cell function is related to cell composition [9]. *Alternaria alternata*, commonly grown on vegetation, is one of the most important species among the allergenic fungi [10] and a devastating plant pathogen of several crops worldwide. Bioactive compounds or mixtures have been used for the effective control of fungal pathogens such as *A. alternata* [11]. The evaluation of bioactive compounds or mixtures on specific cells is usually conducted through bioassays and molecular tests [12–15]. Biopesticides represent a new trend in the European Union; they can control pathogen and pests effectively with the minimum environmental impact [16]. Biopesticides are a form of pesticide based on microorganisms or natural products that may act directly controlling pathogen and pest epidemics or indirectly by enhancing the development of natural enemies [17,18].

Plant extracts, either aqueous or in organic solvents, have shown antimicrobial activity when examined by different screening models [19] mainly towards finding successful drug candidates. Biological activity of plants extracts is being investigated through alterations in photosynthetic mechanism or stress status of plants [20,21], bioassays [22,23], tissue or cell culture [19], receptor enzyme [24] and biochromatography [25–27]. The evaluation of bioactive compound and mixtures except the common microbiological methods lately conducted through novel techniques in metabolomic procedures such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) [28–31].

The use of (FTIR) spectroscopy has been extensively used as a tool for understanding the main cellular composition [32,33,8,34] as infrared spectra provide detailed information on several cellular components such as proteins, polysaccharides and lipids [35]. While spectra are complex and comprise contributions from all the cellular components, FTIR spectroscopy has been successfully used as a valuable tool in identification, discrimination and classification of specific microorganisms [36–39] and fungal species [40–42]. FTIR spectroscopy was successfully used for identification of cells infected with viruses [39], cancer cells [43,44] as well as for detections and identification of infections caused by pathogens [37]. Detections of changes on cellular components under several stress conditions have also been approached using FTIR technique [45–48], as well as fungal species growth under optimal or stress conditions [8,49]. According to previous studies fungal FTIR spectra reflect the biochemical cellular composition of hyphae, mycelium and spores, and can distinguish fungal species and biochemical changes under stressed conditions [33,8,46]. Past research has shown that lipid accumulations have been detected in fungal cells as a response to environmental stress [46]. Evaluation of antimicrobial agents activity and efficiency was also performed through the use of FTIR spectroscopy [30,31].

Sample preparation and the method of spectra recording are among the most critical factors in the application of FTIR spectroscopy to biological samples. The diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) has been proved as a rapid method that can be applied to various solid samples without any other chemical pretreatment [50] and has been applied to freeze-dried

biological specimens [51–53]. In combination with multivariate statistical methods such as principle component analysis, this technique seems to have a potential to be applied as a screening tool to identify and characterize biochemical changes related to fungal mycelium growth.

The aim of this study was to apply FTIR spectroscopy technique for evaluating changes in cellular composition of the phytopathogenic fungus *A. alternata* induced by aquatic extracts of some medicinal and aromatic plants.

## Materials and methods

### Plant material

Air dried samples (harvest 2010) of the *Lamiaceae* family were offered by Aetoloakarnania's Rural Cooperative of Aromatic, Pharmaceutical and Energy Plant Cultivators (Agrotikos Syneterismos Kalliergiton Aromatikon, Farmakeftikon, Energiakon Fyton Aetoloakarnanias, ASKAFEFA), Greece. These samples were, namely, lemon balm (*Melissa officinalis* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.; chemotype carvacrol) and hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Dittany (*Origanum dictamnus* L.; chemotype carvacrol) was supplied from the local market in Crete, Greece and saffron (*Crocus sativus*) was offered by Agricultural Cooperative of Kozani. Only leaves of the aforementioned samples were used, with the exception of oregano and hyssop, for which leaves and flowers were used together, and saffron for which only stems were used. The samples were dried at room temperature. Dry plant material was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

### Preparation of plant extracts

Extracts of five *Lamiaceae* species (*H. officinalis*, *M. officinalis*, *O. dictamnus*, *O. vulgare*, and *S. officinalis*) at a concentration of 10 g/100 ml, and *C. sativus* at 0.1 g/100 ml were prepared by soaking dry plant material in boiling double distilled water (ddH<sub>2</sub>O), mixing thoroughly and then allowing to stand for 15 min. The herbal extracts were first filtered through a Whatman filter No. 1. Prior to inoculation, an aliquot was further filtered through a sterile and endotoxin free 0.2  $\mu\text{m}$  PES filter media (Whatman Puradisk 25 mm) to reduce the risk of interference by micro-organisms.

### Reagents and test organisms

Potato dextrose agar (PDA) was supplied by Sigma Aldrich. Potato dextrose broth medium was prepared in the lab using the filtered broth of 200 g of boiled potato small pieces (approx. 1 cm  $\times$  1 cm) in 500 ml of ddH<sub>2</sub>O, adding 20 g of dextrose and the correct amount of ddH<sub>2</sub>O to bring the volume to 1 l; the broth was autoclaved for 20 min at 120  $^{\circ}\text{C}$ . *A. alternata* was provided by the laboratory of Phytopathology of the Agricultural University of Athens.

### Bioassays

#### Fungal physiological assays

*A. alternata* was grown in PDA plates under light conditions in order to produce enough conidia. Fungal mycelium development and spore production studies were carried out on plates containing 19 ml solid PDA medium plus 1 ml of each of the aromatic plants extracts that were added in PDA after autoclaving and cooling down and before medium solidification. The experiments were conducted in 90 mm sterile petri dishes. Conidia of *A. alternata* were collected in 1 ml of ddH<sub>2</sub>O (supplemented with 0.01% Tween 80

**Table 1**  
Effect of aromatic plants extracts to mycelium growth and conidia production of *Alternaria alternata*.

Treatment	Mycelium diameter (mm)			Conidia production $10^6/cm^2$
	2 days	4 days	7 days	
Control	10.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	39.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.42 ± 0.55 <sup>bc</sup>
<i>Crocus sativus</i>	10.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	39.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.27 <sup>a</sup>
<i>Hyssopus officinalis</i>	14.8 ± 1.5 <sup>bc</sup>	43.0 ± 0.3 <sup>d</sup>	75.5 ± 1.0 <sup>cd</sup>	1.61 ± 0.08 <sup>ab</sup>
<i>Melissa officinalis</i>	17.8 ± 0.3 <sup>d</sup>	46.0 ± 0.5 <sup>e</sup>	78.5 ± 1.5 <sup>d</sup>	3.48 ± 0.18 <sup>cd</sup>
<i>Origanum dictamnus</i>	16.0 ± 0.3 <sup>cd</sup>	43.3 ± 0.4 <sup>d</sup>	75.2 ± 1.5 <sup>cd</sup>	3.27 ± 0.68 <sup>cd</sup>
<i>Origanum vulgare</i>	13.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	38.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	70.2 ± 1.9 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.32 <sup>ab</sup>
<i>Salvia officinalis</i>	13.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	40.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	72.8 ± 0.9 <sup>bc</sup>	3.99 ± 0.44 <sup>d</sup>

Equal initial amounts of fungal spores were grown on media agar plates for 7 days. During incubation period fungal cultures were evaluated by measuring mycelium diameter growth and conidia concentration. Results are means of four replicates ± the SE (Standard Error) Superscript letters depict the statistical analysis whereas different letters demonstrate statistically different values according to Tukey's multiple range test at  $P \leq 0.05$ .

to facilitate the release of the hydrophobic spores-conidia) using a flat toothpick and then the spore concentration was counted and adjusted to  $10^6$  conidia/ml using a haemocytometer.  $10 \mu\text{l}$  of the spore suspension ( $10^4$  conidia) was applied to the center of PDA dishes amended with each plant extract, dried completely and then fungi were allowed to grow in an incubation chamber under light (12 h) and dark (12 h) conditions at  $25^\circ\text{C}$ .

Mycelium diameter was measured at 2, 4 and 7 days. For conidia concentration, 3 disk cores of 6 mm each in diameter were removed with a cork borer from each plate at 7 days after inoculation, homogenized and vortexed for 1 min in 1 ml sterile water supplemented with 0.01% Tween 80 to facilitate the release of the spores. Spores were counted using a haemocytometer. The experiments were performed with four replicates.

#### Liquid cultures for FTIR

An aliquot of  $50 \mu\text{l}$  containing approximately  $10^8$  conidia/ml of *A. alternata* was inoculated in sterile PTFE tubes containing 4.5 ml of Potato broth and 0.5 ml of aromatic plant aquatic extract. Nine replicates were used per treatment, and incubation was carried out in the dark at  $25^\circ\text{C}$ .

#### FTIR sample preparation and measurement and analysis

Cultures of *A. alternata* incubated in potato dextrose broth and treated with plant extracts, were examined by FTIR spectroscopy after 3 days incubation. Cultures were collected by centrifugation, washed twice and resuspended in sterile double distilled water ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ). The samples were further freeze dried and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until measurement.

IR spectra were recorder in the Drift mode in absorbance between  $4000$  and  $400 \text{ cm}^{-1}$  using a Thermo Nicolet 6700 spectrometer (DTGS detector; Nichromesource; KBr beamsplitter; Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA). As a background was used KBr. Spectra were recorded at a  $4 \text{ cm}^{-1}$  spectral resolution and each spectrum was achieved by co-adding 100 scans.

Spectra were processed using Omnic software (version 7.3, Thermo Electron Corporation). The signal was smoothed, baseline corrected and normalized using the automatic functions and the algorithms built into the software mentioned above. Spectrum match was performed using TQ Analyst software.

Furthermore, the second derivative of each processed spectrum was calculated with the Savitzky–Golay derivative filter and default parameters (7-point,  $4 \text{ cm}^{-1}$  resolution, polynomial degree 3). Data from second derivative were exported to JMP Software (JMP, Version 7. SAS Institute Inc.) and subjected to the multivariate statistical technique of principal component analysis (PCA).

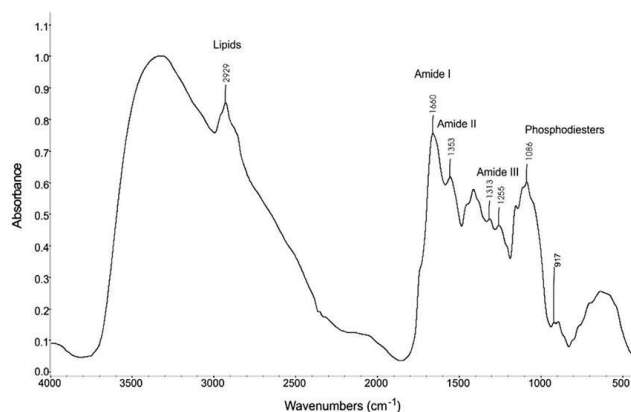
#### Statistical analysis

Spore data were statistically compared by analysis of variance (ANOVA) and Fisher's Least Significant Difference (LSD) using the Statgraphics Plus Software.

## Results and discussion

#### Effect of plant extracts on *Alternaria alternata*

Biological activity of aromatic plants extracts on *A. alternata*, was primarily screened using *in vitro* plate bioassays by measuring



**Fig. 1.** DRIFT spectra of *Alternaria alternata*. Data are means of nine independent experiments.



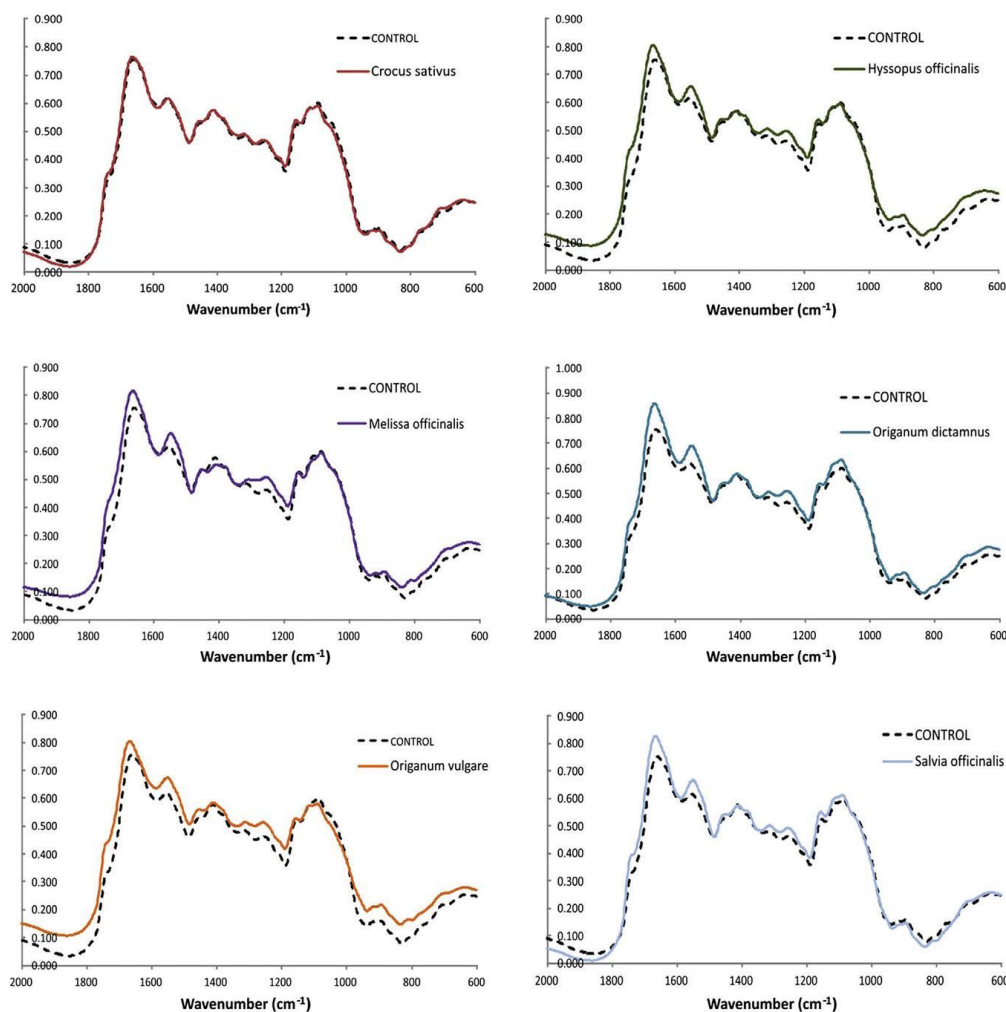


Fig. 2. Mean DRIFT spectra ( $2000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ ) from control and each one of the treatments. Each spectrum presented is the average of the spectra recorded from nine independent experiments.

mycelium growth and conidia production (Table 1). All *Lamiaceae* extracts found to enhance noteworthy mycelium growth. Significant increase in mycelium growth was observed for *M. officinalis* (+97%), followed by *H. officinalis* (+90%), *O. dictamnus* (+89%), *S. officinalis* (+83%) and *O. vulgare* (+76%). *S. officinalis*, was also, found to be the most active towards conidia production enhancement (+65%), followed by *M. officinalis* (+44%) and *O. dictamnus* (+35%). *C. sativus* was the most active extract towards inhibition of conidia production (−73%) followed by *O. vulgare* (−50%) and *H. officinalis* (−33%).

The biological activity of *Lamiaceae* and *C. sativus* aquatic extracts, at the concentrations tested, may be due to the water soluble substances, which among other compounds contain sugars. Responses of *A. alternata* in exposure to aromatic plants extracts are possibly due to the activation of fungal stress response pathways to adapt to chemical changes in growing environment. The bioactive compounds of tested aromatic plant extracts possibly

activate molecular mechanisms in fungal cells that lead to stimulation of mycelium growth or conidia production.

#### FTIR spectra of *Alternaria alternata* treated with plant extracts

In our study, we use the FTIR spectroscopy for the detection of biochemical composition changes in cultures of the phytopathogenic fungus, *A. alternata* as a response to incubation with aromatic plants extracts. The results presented below show the potential of FTIR spectroscopy for rapid and reliable evaluation of aromatic plants bioactive compounds.

The FTIR spectrum of *A. alternata* (Fig. 1) was comparable to spectra derived from other fungal species [33,8,42,46,34]. Strong absorptions were detected in all spectral regions that characterize the major cellular components. In detail, at region  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ , the peak found at  $2929\text{ cm}^{-1}$ , is assigned to the C–H stretching bands of the cell membrane fatty acids [54,55]. At region

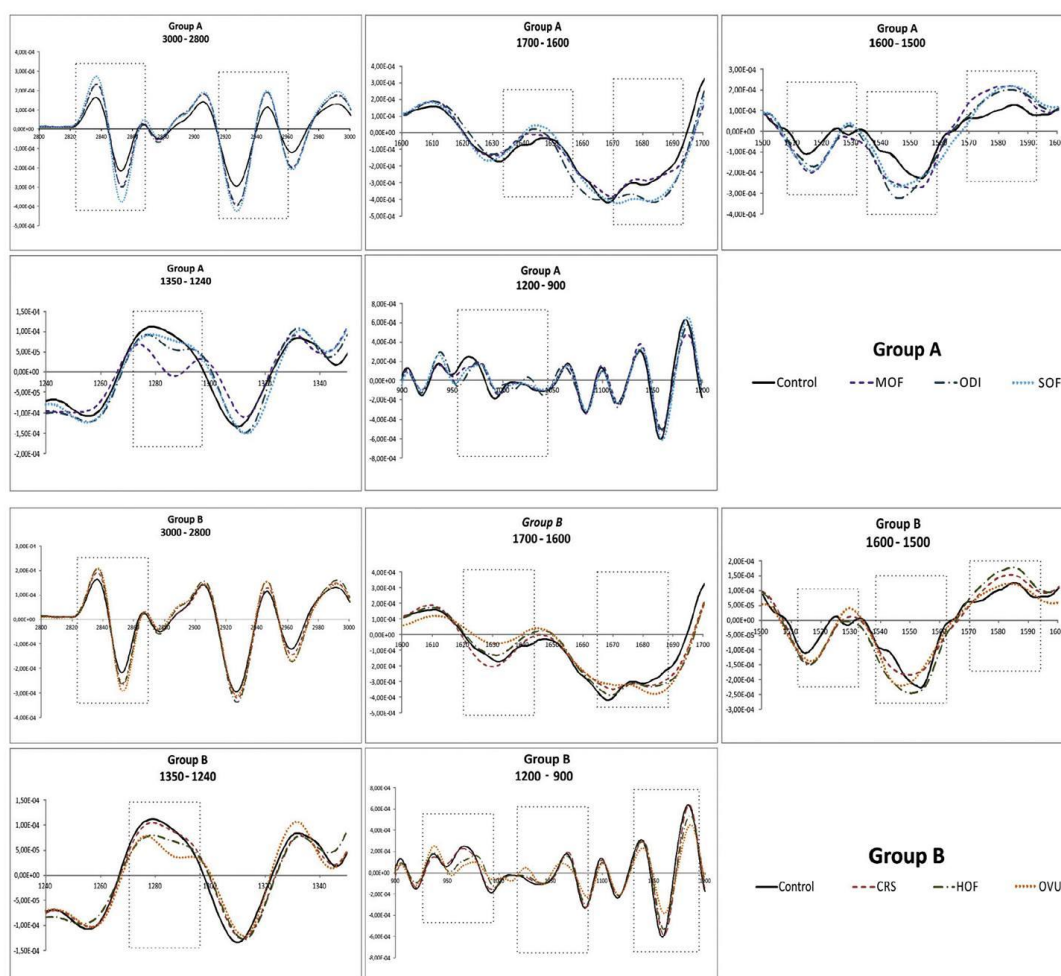
**Table 2**  
Integrated infrared Band area match values of aromatic plants extracts treatments to *Alternaria alternata*, compared to control (Critical match value = 50.00).

	Band area (cm <sup>-1</sup> )	Designation	Treatments					
			<i>Crocus sativus</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Salvia officinalis</i>
I	3000–2800	Lipids	98.38	95.00	92.91	92.16	87.95	93.13
II	1705–1575	Amide I	94.31	78.19	77.74	86.11	75.21	84.28
III	1575–1480	Amide II	90.86	80.03	63.07	76.18	87.06	75.03
IV	1350–1240	Amide III	89.54	58.96	30.58 <sup>a</sup>	43.47 <sup>a</sup>	46.37 <sup>a</sup>	58.85
V	1200–900	Carbohydrates	92.09	83.17	82.05	74.45	69.93	77.72
	4000–400		89.79	67.24	66.57	75.92	72.21	75.22

<sup>a</sup> No match compared to control.

1700–1500 cm<sup>-1</sup>, the two intense peaks identified at 1660 cm<sup>-1</sup> and 1553 cm<sup>-1</sup> are typical of amide I [56] and amide II modes of proteins [57] respectively. Peaks found at 1313 and 1255 cm<sup>-1</sup> are attributed to amide III band components of proteins [58,59].

In region, 1200–900 cm<sup>-1</sup>, absorption at 1152 cm<sup>-1</sup> is due to CH<sub>3</sub> deformations [60], at 1086 cm<sup>-1</sup> due to the symmetric phosphate modes originated from the phosphodiester groups in nucleic acids [32,37,61] and absorption at 917 cm<sup>-1</sup> can be



**Fig. 3.** Second derivative transformed DRIFT spectra of *Alternaria alternata* in all five spectral regions revealed differences in whole – cell chemical composition of hyphae and conidia incubated with aromatic plants extracts. MOF: *Melissa officinalis* L., ODI: *Origanum dictamnus* L., SOF: *Salvia officinalis* L., CRS: *Crocus sativus*, HOF: *Hyssopus officinalis* L. and OVU: *Origanum vulgare* L. Each transformed spectrum presented is the average of the spectra recorded from nine independent experiments.

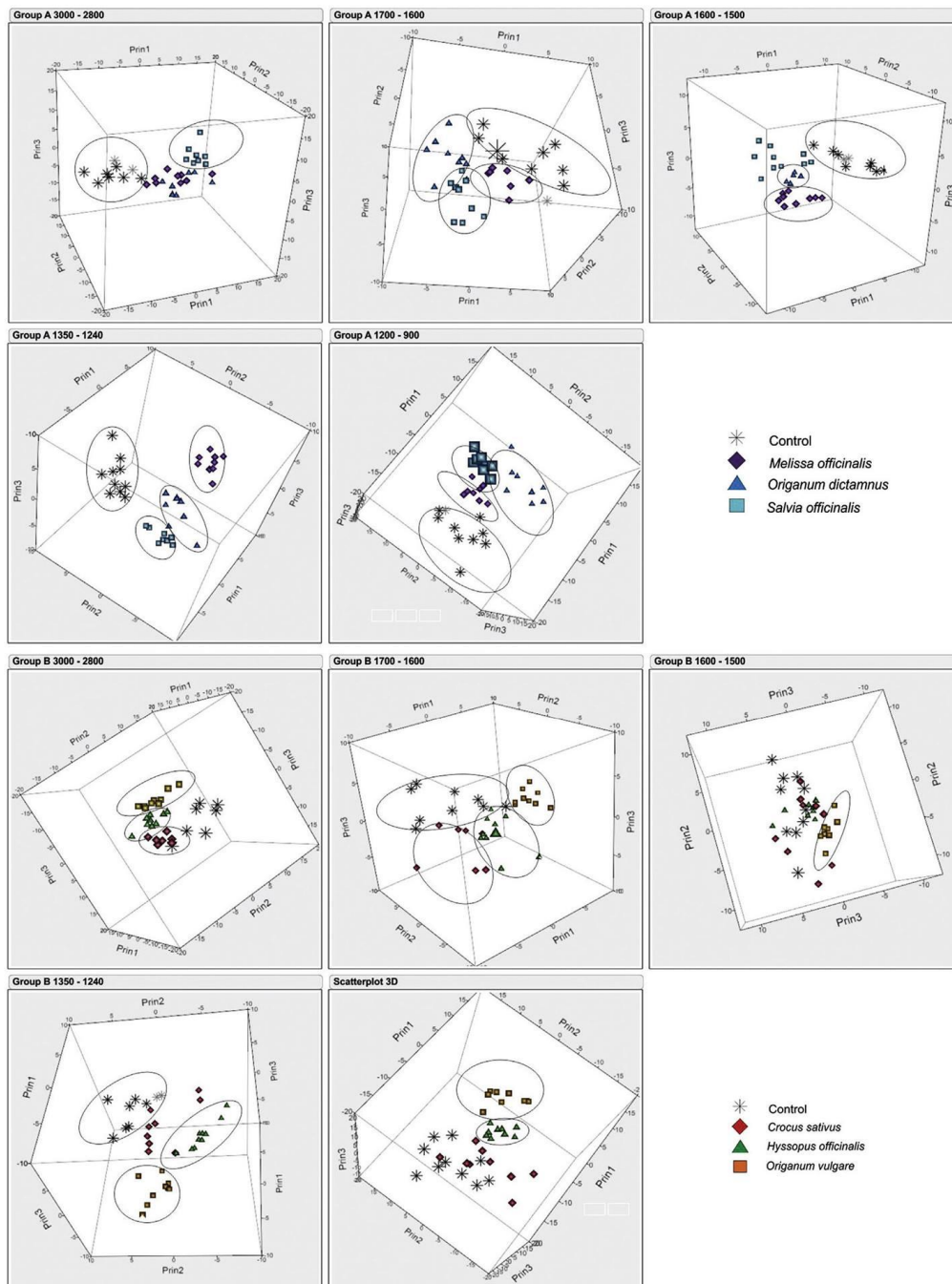
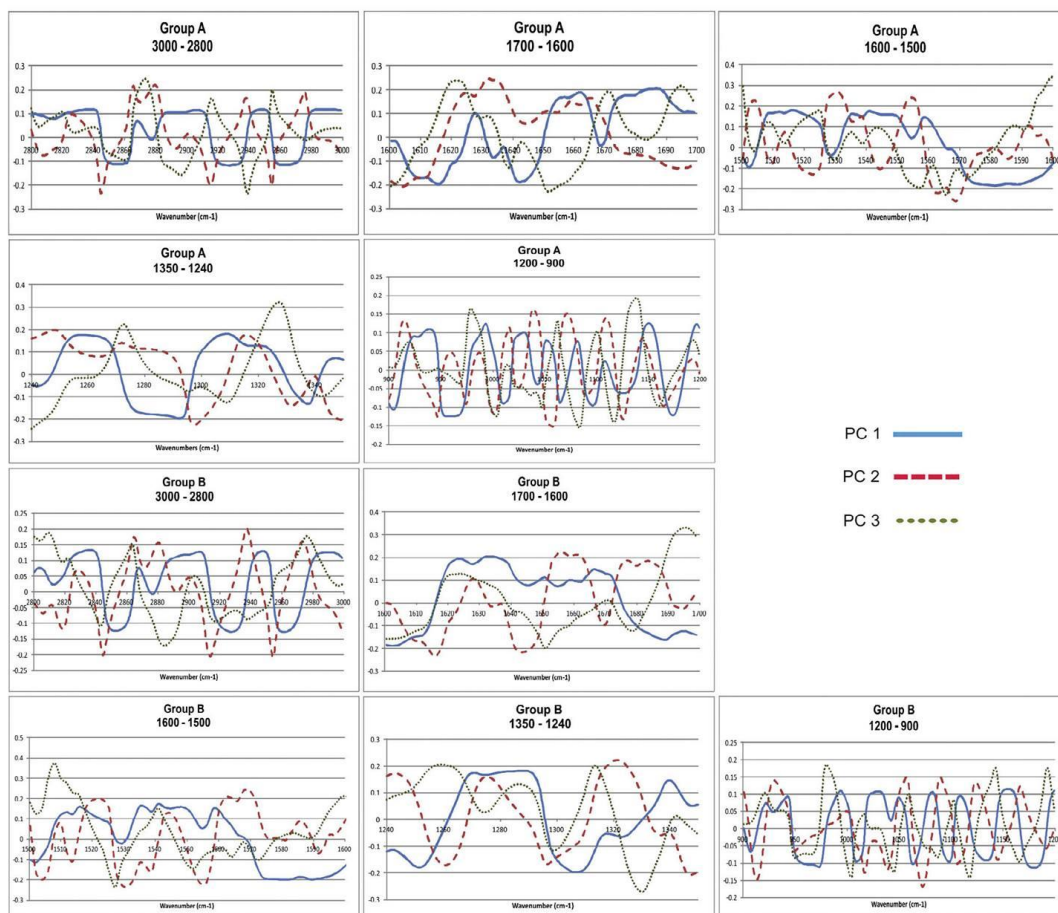


Fig. 4. PCA of the second derivative transformed DRIFT spectra of *Alternaria alternata* cultures in the five characteristic spectral regions when incubated with Group A (*Melissa officinalis* L., *Origanum Dictamnus* L. and *Salvia officinalis* L.) and Group B (*Crocus sativus*, *Hyssopus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L.) of treatments.



**Fig. 5.** Loading plots of the first, second and third principle components from PCA of the second derivative DRIFT spectra of *Alternaria alternata* incubated with *Melissa officinalis* L., *Origanum dictamnus* L. and *Salvia officinalis* L. for Group A, and *Crocus sativus*, *Hyssopus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. for Group B. Panels correspond to characteristic spectral regions.

**Table 3**

Integrated infrared Band area ratios of aromatic plants extracts treatments to *Alternaria alternata*.

Treatment	Lipids <sup>a</sup> /Amide I <sup>b</sup>	Lipids/Amide II <sup>c</sup>	Amide I/Total Amides <sup>d</sup>	Amide II/Total Amides	Lipids/Carbohydrates <sup>e</sup>
Control	0.617	3.734	0.844	0.139	0.266
<i>Crocus sativus</i>	0.676	3.709	0.832	0.152	0.313
<i>Hyssopus officinalis</i>	0.708	2.455	0.736	0.220	0.366
<i>Melissa officinalis</i>	0.704	2.140	0.748	0.246	0.134
<i>Origanum dictamnus</i>	0.617	2.187	0.770	0.217	0.314
<i>Origanum vulgare</i>	0.646	2.699	0.796	0.190	0.352
<i>Salvia officinalis</i>	0.730	2.625	0.769	0.214	0.360

Corresponding wavenumber ranges:

<sup>a</sup> 3000–2800 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>b</sup> 1705–1575 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>c</sup> 1575–1480 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>d</sup> Ranges of (b) + (c) plus the range 1350–1240 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>e</sup> 1200–900 (cm<sup>-1</sup>).

assigned to phosphodiester [62]. The average FTIR spectra of *A. alternata* treated with aqueous extracts of saffron, hyssop, lemon balm, dittany, oregano and sage respectively, are presented in Fig. 2. The variation in cell composition is fundamentally related

to the organism's ability to carry out specialized functions in appropriate regions, and according to past FTIR research on fungal response to stress conditions has shown lower total signal of amide I and amide II bands of proteins [49]. Match values of average

**Table 4**  
Correlation coefficients between specific FTIR band area ratios and mycelium diameter of *Alternaria alternata*.

FTIR band area ratios	Mycelium diameter			
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 7
Lipids <sup>a</sup> /Amide II <sup>c</sup>	0.92	0.98	0.98	0.96
Amide I <sup>b</sup> /Total Amides <sup>d</sup>	0.88	0.96	0.95	0.92
Amide II/Total Amides	0.92	0.96	0.95	0.91

Corresponding wavenumber ranges:

<sup>a</sup> 3000–2800 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>b</sup> 1705–1575 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>c</sup> 1575–1480 (cm<sup>-1</sup>).

<sup>d</sup> Ranges of (b) + (c) plus the range 1350–1240 (cm<sup>-1</sup>).

treated spectra compared to control were calculated in order to identify properly variations in the main cellular composition from the original spectra in specific band regions. The lower match values were detected in amide bands of proteins for all the *Lamiaceae* species and the critical ones in amide III band of proteins in case of lemon balm, dittany and oregano (Table 2). These results indicate that possibly the phenolic constituents and especially the rosmarinic acid which is the characteristic bioactive compound of *Lamiaceae* family [63] are responsible for the activation of several molecular mechanisms in *A. alternata* that lead to differences in protein profile. This, is also supported by the fact that lemon balm which causes the larger alterations in proteins profile is found to have the highest levels of rosmarinic acid among the other *Lamiaceae* species examined [63,64] in addition that match values in amide III band follow the ranking of *Lamiaceae* species tested according to the rosmarinic acid concentrations as estimated [64].

The differences in spectral regions are more discernible after second derivative spectral transformation, as expected according to previous studies [46,34,48]. For this reason we also, used second derivative spectral transformation in order to identify the exact peak locations between spectra as it separates overlapping absorption bands, removes baseline shifts and increases the number of discriminative features [65]. Under this context, the five spectral regions that were examined for each of the six treatments to *A. alternata* were: Region I, (3000–2800 cm<sup>-1</sup>) which is dominated by fatty acids of cell membrane; Region II, (1700–1600 cm<sup>-1</sup>) influenced by amide I from proteins; Region III, (1600–1500 cm<sup>-1</sup>) influenced by amide II; Region IV, 1350–1240, influenced by amide III and Region V, 1200–900, typical region for polysaccharides [66,31] that provides information regarding fungal cell walls derived from carbohydrate composition, especially for peaks at 1100–900 cm<sup>-1</sup> [8]. Fig. 3 shows the second derivative transformed FTIR spectra of *A. alternata*, of plant extracts treatments that either enhance (Group A) or inhibit (Group B) conidia production. The first group of treatments consisted of treatments results to growth stimulation and the second group consisted of treatments results to growth inhibition in conidial production. Spectral differences in region I were identified at about 2926 and 2960 cm<sup>-1</sup> assigned to fatty acids of the cell membrane [67], in region II at about 1630, 1670 and 1685 cm<sup>-1</sup>, attributed to amide I of proteins [62,68], in region III at about 1553, 1570 and 1585 cm<sup>-1</sup> attributed to amide II of proteins [32,56,57], in region VI at about 1313, 1284 and 1255 cm<sup>-1</sup> due to amide III of proteins [59] and in region V at about 1150 cm<sup>-1</sup> assigned to C–O stretch of carbohydrates [67] and 985 cm<sup>-1</sup> assigned to OCH<sub>3</sub>–Polysaccharides [68]. According to the above, this study shows the significant influence of aromatic plants aquatic extracts to lipid content of cell membrane, proteins and polysaccharides of the cell wall of *A. alternata*.

In order to rationalize the multivariate data set, we proceeded to PCA of the second derivative transformed data. The end result of PCA is to get graphical representation of similarities or differences from IR spectral data. PCA analysis of the second derivative

transformed spectra has been previously shown suitable for identification of biochemical changes in FTIR spectra [33,46,48,49]. PCA indicates whether there are clusters of data and describes similarities or differences from multivariate data sets [33]. Fig. 4, shows the PCA of the second derivative transformed FTIR spectra of *A. alternata*, in the five spectral regions referred above indicating that average FTIR spectra of *A. alternata* treated with different aquatic plant extracts were different to untreated samples in biochemical components. Multivariate statistical analysis of principal components clustered treated samples in districts groups evident within the first three PCs, accounting for 69–89% of the variability in the original data depending on the spectral region. Positive or negative loading plots of the first, second and third principal component (Fig. 5), confirm that amides I, II, III and polysaccharides have the major contribution to data variations. Untreated and treated samples were clustered in different groups, and in some band areas each of treatments was grouped separately. These findings demonstrate that aquatic aromatic plants extracts had resulted in alteration of the composition of all major cellular components, as also observed in previous studies [30,46,48] due to the effect of bioactive molecules contained in the aromatic plant extracts. Taken as a whole, PCA analysis of FTIR spectra of *A. alternata* exposed to *Lamiaceae* aqueous extracts showed that polysaccharides of the cell walls, fatty acids of the cell membranes as well as proteins were significantly affected.

Specific band area ratios of spectral peaks were calculated (Table 3), assigned to distinct functional groups that belong to different classes of macromolecules, and found to be correlated to microbiological parameters presented in Table 1. Mycelium growth diameter correlates strongly with band area ratios of lipids/amide II ( $r^2$ : 0.92–0.98), amide I/total amides ( $r^2$ : 0.88–0.96) and amide II/total amides ( $r^2$ : 0.91–0.96) (Table 4). Correlation between the microbiological parameters estimated in well diffusion assays, and FTIR band area ratios was found to be positive only in case of mycelium growth development, but not in case of conidia production. This can be explained by the fact that conidia production was not at the same stage of development between solid agar (used to measure mycelium growth and spore production) and liquid fungal cultures (used for FTIR analysis), so the differences found should be due to the culture conditions and not to the specific treatments. This study is considered as the first which can identify the strong correlation between fungal mycelium growth and FTIR band area ratios.

## Conclusions

The results of this study indicate that FTIR analysis can further evaluate the changes in the main cellular components under several stress conditions, discriminate and classify specific microorganisms and can be also used in fungal growth evaluation in *in vitro* experiments.

Moreover, growth enhancement attributed to the bioactive compounds of the aquatic extracts of medicinal and aromatic plants may be valuable in biotechnological innovations. Bioactive constituents that can stimulate growth of microorganisms and fungi is expected to be of great interest in biological control. Thus, further investigation is needed on the influence of the observed biological activity in gene signaling pathways that regulate hyphal growth and sporulation of *A. alternata*, at the molecular level, and the possible role of rosmarinic acid in this procedure.

## Acknowledgements

We thank the Aetoloakarnania's Rural Cooperative of Aromatic, Pharmaceutical and Energy Plant Cultivators (Agrotikos Syneterismos

Kalliergiton Aromatikon, Farmakeftikon, Energiakon Fyton Aetoloarkarnanias, ASKAFEFA), Greece and Cooperative of Saffron Producers of Kozani, Greece, for providing the herb samples.

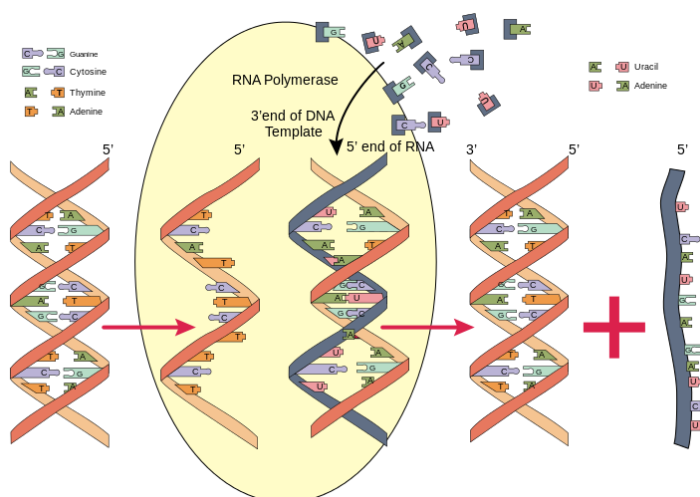
## References

- F.S. Chapin III, E.S. Zavaleta, V.T. Eviner, R.L. Naylor, P.M. Vitousek, H.L. Reynolds, D.U. Hooper, S. Lavorel, O.E. Sala, S.E. Hobbie, M.C. Mack, S. Díaz, Consequences of changing biodiversity, *Nature* 405 (6783) (2000) 234–242, <http://dx.doi.org/10.1038/35012241>.
- M.-L. Desprez-Loustau, C. Robin, M. Buée, R. Courtecuisse, J. Garbaye, F. Suffert, I. Sache, D.M. Rizzo, The fungal dimension of biological invasions, *Trends Ecol. Evol.* 22 (9) (2007) 472–480, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2007.04.005>.
- D.L. Hawksworth, The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation, *Mycol. Res.* 95 (6) (1991) 641–655.
- J.L. Adrio, A.L. Demain, Fungal biotechnology, *Int. Microbiol.* 6 (3) (2003) 191–199, <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-003-0133-0>.
- H.P. Molitoris, Fungi in Biotechnology, Past, present, future, *Czech Mycol.* 48 (1995) 53–65.
- P.K. Anderson, A.A. Cunningham, N.G. Patel, F.J. Morales, P.R. Epstein, P. Daszak, Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers, *Trends Ecol. Evol.* 19 (10) (2004) 535–544, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>.
- E.-C. Oerke, Crop losses to pests, *J. Agric. Sci.* 144 (1) (2006) 31–43, <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859605005708>.
- S. Kaminskyj, K. Jilkine, A. Szeghalmi, K. Gough, High spatial resolution analysis of fungal cell biochemistry – Bridging the analytical gap using synchrotron FTIR spectromicroscopy, *FEMS Microbiol. Lett.* 284 (1) (2008) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01162.x>.
- M. Carille, S. Watkinson, G. Gooday, *The Fungi*, Academic Press, 1996.
- A. Stierle, J. Cardellina, G. Strobe, Maculosin, a host-specific phytoalexin for spotted knapweed from *Alternaria alternata* (conference paper), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8008–8011.
- S. Guleria, A. Kumar, A.K. Tikku, Chemical composition and fungitoxic activity of essential oil of *Thuja orientalis* L. grown in the north-western Himalaya, *Z. fur Naturforsch. – Sect. C J. Biosci.* 63 (3–4) (2008) 211–214.
- L. Barros, R.C. Calhelha, J.A. Vaz, L.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, L.M. Esteveho, Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2) (2007) 151–156, <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0394-x>.
- G. Meca, J.M. Soriano, A. Gaspari, A. Riti, A. Moretti, J. Mafies, Antifungal effects of the essential compounds enniatins A, B, B1, *Toxicol. Methods* 3(3) (2010) 480–485, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.04.013>.
- F. Müller-Riebau, B. Berger, O. Yegen, Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey, *J. Agric. Food Chem.* 43 (8) (1995) 2262–2266.
- A. Zambonelli, A. Zechini D'Aulerio, A. Bianchi, A. Albasini, Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro, *J. Phytopathol.* 144 (9–10) (1996) 491–494.
- P.A. Matson, W.J. Parton, A.G. Power, M.J. Swift, Agricultural intensification and ecosystem properties, *Science* 277 (5325) (1997) 504–509, <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5325.504>.
- D. Chandler, G. Davidson, W.P. Grant, J. Greaves, G.M. Tatchell, Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability, *Trends. Food Sci. Technol.* 19 (5) (2008) 275–283, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.009>.
- R. Srinivasan, Integrating biopesticides in pest management strategies for tropical vegetable production, *J. Biopesticides* (5) (2012) 36–45.
- B. Wang, J. Deng, Y. Gao, L. Zhu, R. He, Y. Xu, The screening toolbox of bioactive substances from natural products: a review, *Fitorapia* 82 (2011) 1141–1151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitore.2011.08.007>.
- P. Bouchagier, A. Eftimiadiou, A. Katsileros, D. Bilalis, P. Eftimiadis, Adverse effect of Bermudagrass on physiological and growth components of cotton, *J. Agron.* 7 (1) (2008) 49–55, <http://dx.doi.org/10.3923/ja.2008.49.55>.
- P. Bouchagier, P. Eftimiadis, Allelopathic susceptibility of cotton to bermudagrass, *J. Agron.* 9 (1) (2012) 23–28.
- Y. Abou-jawdah, R. Wardan, H. Sobh, A. Salameh, Antifungal activities of extracts from selected Lebanese wild plants against plant pathogenic fungi, *Phytopathol. Mediterr.* 43 (3) (2004) 377–386.
- D.J. Daferera, B.N. Zizgas, M.G. Polissiou, The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Crop Protection* 22 (2003) 39–44.
- F. Peelman, C. Couturier, J. Dam, L. Zabeau, J. Tavernier, R. Jockers, Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor, *Trends. Pharmacol. Sci.* 27 (4) (2006) 218–225.
- Z.G. He, J. Sun, X. Wu, R. Lu, J.F. Liu, Y.J. Wang, Profiling drug membrane permeability and activity via biopartitioning chromatography, *Curr. Drug Metab.* 9 (2008) 152–166.
- J. Kotecha, S. Shah, I. Rathod, G. Subbiah, Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs, *Int. J. Pharm.* 333 (2007) 127–135.
- M. Kvalheim, H. Chan, I. Benzie, Y. Szeto, A. Tzang, D. Mok, F. Chau, Chromatographic profiling and multivariate analysis for screening and quantifying the contributions from individual components to the bioactive signature in natural products, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 107 (2011) 98–105.
- G. Cardinali, P. Rellini, C. Pelliccia, L. Antonielli, F. Faticenti, MMS: A “R” package for metabolomic markers search in stress response studies, *Open Appl. Informatics J.* 2 (2008) 1–8.
- L. Corte, P. Rellini, L. Roscini, F. Faticenti, G. Cardinali, Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study, *Anal. Chim. Acta* 659 (1–2) (2010) 258–265, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.035>.
- M. Huleihel, V. Pavlov, V. Erukhimovitch, The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity, *J. Photochem. Photobiol., B* 96 (1) (2009) 17–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.03.009>.
- G. Zoumpopoulou, K. Papadimitriou, M.G. Polissiou, P.A. Tarantilis, E. Tsakalidou, Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy, *Int. J. Food Microbiol.* 144 (1) (2010) 202–207, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jifoodmicro.2010.09.023>.
- M. Beekes, P. Lasch, D. Naumann, Analytical applications of Fourier transform-infrared (FTIR) spectroscopy in microbiology and prior research, *Vet. Microbiol.* 123 (4) (2007) 305–319, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010>.
- K. Jilkine, K.M. Gough, R. Julian, S.G.W. Kaminskyj, A sensitive method for examining whole-cell biochemical composition in single cells of filamentous fungi using synchrotron FTIR spectromicroscopy, *J. Inorg. Biochem.* 102 (3) (2008) 540–546, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.10.023>.
- X. Wang, X. Chen, Z. Qi, X. Liu, W. Li, S. Wang, A study of *Ganoderma lucidum* spores by FTIR microspectroscopy, *Spectrochimica Acta – Part A: molecular and biomolecular spectroscopy* 91 (2012) 285–289, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.004>.
- D. Helm, D. Naumann, Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy, *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1) (1995) 75–79, [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(94\)00529-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(94)00529-Z).
- N. Branan, T.A. Wells, Microorganism characterization using ATR–FTIR on an ultrathin polystyrene layer, *Vib. Spectrosc.* 44 (1) (2007) 192–196, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.10.002>.
- V. Erukhimovitch, L. Tsror, M. Hazanovsky, M. Talyshinsky, I. Mukmanov, Y. Souprun, M. Huleihel, Identification of fungal phyto-pathogens by Fourier-transform infrared (FTIR) microscopy, *J. Agric. Technol.* 1 (1) (2005) 145–152.
- L. Marley, J.P. Signolle, C. Amiel, J. Travert, Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vib. Spectrosc.* 26 (2) (2001) 151–159, [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00113-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00113-8).
- A. Salman, V. Erukhimovitch, M. Talyshinsky, M. Huleihel, FTIR spectroscopic method for detection of cells infected with herpes viruses, *Biopolymers – Biospectroscopy Sect.* 67 (6) (2002) 406–412, <http://dx.doi.org/10.1002/bip.10171>.
- G. Fischer, S. Braun, R. Thissen, W. Dott, FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi, *J. Microbiol. Methods* 64 (1) (2006) 63–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmimet.2005.04.005>.
- A. Naumann, M. Navarro-González, S. Peddireddi, U. Kües, A. Polle, Fourier transform infrared microscopy and imaging: detection of fungi in wood, *Fungal Genet. Biol.* 42 (10) (2005) 829–835, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.003>.
- C. Santos, M.E. Fraga, Z. Kozakiewicz, N. Lima, Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts, *Res. Microbiol.* 161 (2) (2010) 168–175, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.007>.
- M. Huleihel, A. Salman, V. Erukhimovitch, J. Ramesh, Z. Hammody, S. Mordechai, Novel spectral method for the study of viral carcinogenesis in vitro, *J. Biochem. Biophys. Methods* 50 (2–3) (2002) 111–121, [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00177-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00177-4).
- B. Rigas, K. LaGuardia, L. Qiao, P.S. Bhandare, T. Caputo, M.A. Cohenford, Infrared spectroscopic study of cervical smears in patients with HIV: implications for cervical carcinogenesis, *J. Lab. Clin. Med.* 135 (1) (2000) 26–31.
- A.A. Kamnev, FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling, *Spectrosc.: Int. J.* 22 (2–3) (2008) 83–95, <http://dx.doi.org/10.3233/SPE-2008-0329>.
- M. Sompong, K. Thumanu, I. Prakhongka, B. Burapatpong, D. Athinuwat, S. Prathuangwong, N. Buensantaei, Infrared spectroscopy: methods for investigating cellular components of phytopathogenic fungi response to temperature stress, *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (34) (2013) 4331–4337, <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR12.327>.
- K. Stehfest, J. Toepel, C. Wilhelm, The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae, *Plant Physiol. Biochem.* 43 (7) (2005) 717–726, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.001>.
- G. Zoumpopoulou, E. Pepelassi, W. Papaioannou, M. Georgalaki, P.A. Maragkoudakis, P.A. Tarantilis, M. Polissiou, E. Tsakalidou, K. Papadimitriou, Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (3) (2013) 4640–4654, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14034640>.
- A. Szeghalmi, S. Kaminskyj, K.M. Gough, A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and

- stressed conditions (Conference Paper), Anal. Bioanal. Chem. 387 (5) (2007) 1779–1789, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0850-2>.
- [50] J. Schmitt, H.-C. Flemming, FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis, Int. Biodeterior. Biodegrad. 41 (1) (1998) 1–11.
- [51] P.S. Belton, E.K. Kemsley, M.C. McCann, S. Ttofis, R.H. Wilson, I. Delgadillo, The identification of vegetable matter using Fourier transform infrared spectroscopy, Food Chem. 54 (4) (1995) 437–441.
- [52] M. Hřebičík, G. Budínová, T. Godarská, D. Vláčil, S.B. Vogenseh, K. Volka, Diffuse-reflectance infrared Fourier transform spectroscopy: new technique of sample preparation (conference paper), J. Mol. Struct. 410–411 (1997) 527–530, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860\(96\)09662-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860(96)09662-7).
- [53] C.S. Pappas, C. Takidelli, E. Tsantili, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, Quantitative determination of anthocyanins in three sweet cherry varieties using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy, J. Food Compos. Anal. 24 (1) (2011) 17–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.07.001>.
- [54] J.-G. Wu, Y.-Z. Xu, C.-W. Sun, R.D. Soloway, D.-F. Xu, Q.-G. Wu, K.-H. Sun, S.-F. Weng, G.-X. Xu, Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques, Biopolymers – Biospectroscopy Sect. 62 (4) (2001) 185–192, <http://dx.doi.org/10.1002/bip.1013>.
- [55] G.I. Dobeshko, N.Y. Gridina, E.B. Kruglova, O.P. Pashchuk, FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage, Talanta 53 (1) (2000) 233–246, [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00462-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00462-8).
- [56] A. Naumann, Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology, Proc. SPIE – Int. Soc. Opt. Eng. 3257 (1998) 245–257, <http://dx.doi.org/10.1117/12.306089>.
- [57] R. Eckel, H. Huo, H.-W. Guan, X. Hu, X. Che, W.-D. Huang, Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue, Vib. Spectrosc. 27 (2) (2001) 165–173, [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00134-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00134-5).
- [58] Y. Yang, J. Sulé-Suso, G.D. Sockalingum, G. Kegelaer, M. Manfait, A.J. El Haj, Study of tumor cell invasion by Fourier transform infrared microspectroscopy, Biopolymers 78 (6) (2005) 311–317, <http://dx.doi.org/10.1002/bip.20297>.
- [59] L. Chiriboga, P. Xie, H. Yee, V. Vigorita, D. Zarou, D. Zakim, M. Diem, Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix, Biospectroscopy 4 (1) (1998) 47–53.
- [60] H. Schulz, M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, Vib. Spectrosc. 43 (1) (2007) 13–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>.
- [61] N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai, M. Kikuchi, Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy, Cancer Detect. Prev. 28 (1) (2004) 32–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cdp.2003.11.004>.
- [62] B.R. Wood, M.A. Quinn, F.R. Burden, D. McNaughton, An investigation into FTIR spectroscopy as a biodiagnostic tool for cervical cancer, Biospectroscopy 2 (3) (1996) 143–153.
- [63] G. Janicsák, I. Máthé, V. Miklóssy-Vári, G. Blunden, Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of *Lamiaceae* species, Biochem. Syst. Ecol. 27 (7) (1999) 733–738.
- [64] D. Saltas, C.S. Pappas, D. Daferera, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, Direct determination of rosmarinic acid in *Lamiaceae* herbs using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics, J. Agric. Food Chem. 61 (13) (2013) 3235–3241, <http://dx.doi.org/10.1021/jf305520m>.
- [65] H.M. Al-Qadiri, M. Lin, A.G. Cavinato, B.A. Rasco, Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice, Int. J. Food Microbiol. 111 (1) (2006) 73–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.004>.
- [66] B. Moen, A. Oust, Ø. Langsrud, N. Dorrell, G.L. Marsden, J. Hinds, A. Kohler, B.W. Wren, K. Rudl, Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions, Appl. Environ. Microbiol. 71 (4) (2005) 2086–2094, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.4.2086-2094.2005>.
- [67] M.F.K. Fung, M.K. Senterman, N.Z. Mikhael, S. Lacelle, P.T.T. Wong, Pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium, Biospectroscopy 2 (3) (1996) 155–165.
- [68] G. Shetty, C. Kendall, N. Shepherd, N. Stone, H. Barr, Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus, Br. J. Cancer 94 (10) (2006) 1460–1464, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603102>.

# II.4

Αποτίμηση της δράσης των εκχυλισμάτων αρωματικών και  
φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή μυκοτοξινών από τον  
*Aspergillus flavus*







### II.4.1 Εισαγωγή

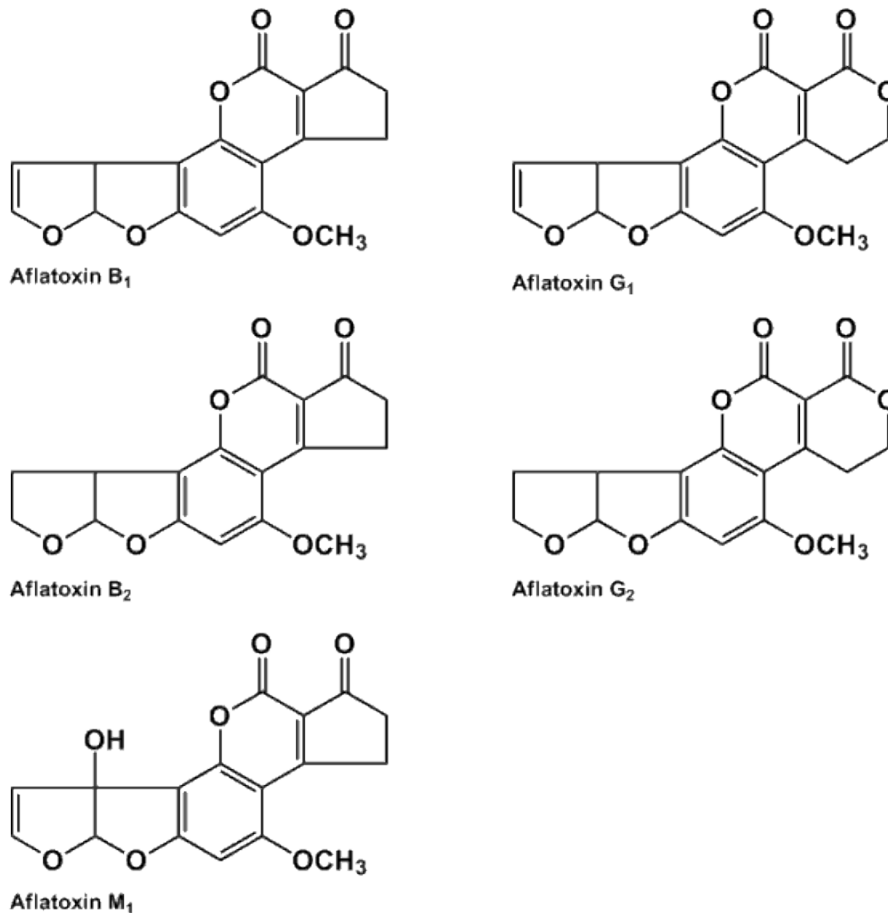
Οι μύκητες είναι οργανισμοί με ευρύτατες επιπτώσεις στον άνθρωπο τα οικοσυστήματα και το περιβάλλον (Charpin *et al.*, 2000; Desprez-Loustau *et al.*, 2007; Hawksworth, 1991) τόσο θετικές όσο και αρνητικές. Οι επιπτώσεις αυτές ποικίλουν και μπορεί να είναι από ανακύκλωση θρεπτικών υλικών και βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Adrio and Demain, 2003; Molitoris, 1995), έως απειλητικές συνέπειες για τον άνθρωπο τα ζώα και τα φυτά. Υπάρχουν στελέχη τα οποία μπορούν να γίνουν εξαιρετικά επικίνδυνα, όπως ο *Aspergillus fumigatus*, ο οποίος υπό προϋποθέσεις μπορεί να γίνει παθογόνος για τον άνθρωπο (Firon and d' Enfert, 2002). Τόσο η βιολογία του είδους όσο και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μυκήτων.

Η κυτταρική σύσταση των μυκήτων, η δομή και οι λειτουργίες τους είναι αλληλοσυνδεδεμένες. Τα κύτταρα περιέχουν γενετικό υλικό (DNA και RNA), πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια. Οι μύκητες αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων τους και η κυτταρική τους λειτουργία επηρεάζεται από τις χημικές ενώσεις που εκκρίνουν ή αποθηκεύουν (Carlile *et al.*, 1996).

Κάποια είδη μυκήτων παράγουν τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίοι αναφέρονται ως μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες θεωρούνται απειλή τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το ζωικό κεφάλαιο. Η πλέον διαδεδομένη κατηγορία μυκοτοξινών είναι οι αφλατοξίνες που αντιπροσωπεύουν μια από τις γνωστότερες χημικές ομάδες με καρκινογόνες ιδιότητες. Το IARC (International Agency for Research on Cancer) τις έχει κατατάξει στην κατηγορία A ως προς την καρκινογενετική τους ικανότητα. Οι ουσίες αυτές παράγονται από τα είδη *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* σε διάφορα προϊόντα (δημητριακά, σύκα, ελαιόσποροι, ξηροί καρποί, καπνός και άλλα 27 (Diener *et al.*, 1987). Οι αφλατοξίνες αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού του φυτοπαθογόνου μύκητα *Aspergillus flavus*. Για τη μελέτη της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών έχουν χρησιμοποιηθεί ιχνοθετημένοι πρόδρομοι του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων καθώς και διάφοροι αναστολείς τους.

Σε παγκόσμια κλίμακα η παρουσία αφλατοξινών έχει ανιχνευτεί σε μια μεγάλη κατηγορία προϊόντων όπως το καλαμπόκι, ο βαμβακόσπορος, το ρύζι, τα φιστίκια, οι σπόροι κολοκύθας, οι ηλιόσποροι, τα σύκα, τα φιστίκια πεκάν και σε άλλους ξηρούς καρπούς. Από τα προαναφερόμενα, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν εντοπιστεί σε φιστίκια και καλαμπόκι προκαλώντας ανησυχία τόσο στις χώρες που τα εισάγουν όσο και στις χώρες που τα εξάγουν. Η ρύπανση των προϊόντων καλαμποκιού από αφλατοξίνη εμφανίζει εποχικές και χωρικές

διακυμάνσεις. Οι αφλατοξίνες μέσω της τροφικής αλυσίδας μεταφέρονται και στους ζωικούς οργανισμούς που καταναλώνουν ζωοτροφές οι οποίες περιέχουν αφλατοξίνες. Με τον τρόπο αυτό, οι αφλατοξίνες ανιχνεύονται στη συνέχεια και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από ζώα που κατανάλωσαν ζωοτροφή με αφλατοξίνες.



**Σχήμα II.4.1** Οι κυριότερες δομές αφλατοξινών (B1, B2, G1, G2, M1)

Αρχικά απομονώθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας τέσσερις αφλατοξίνες. Οι δυο εμφάνιζαν μπλε φθορισμό και ονομάστηκαν B1 και B2 (blue), ενώ οι άλλες δυο πράσινο και ονομάστηκαν G1 και G2 (green). Μια άλλη αφλατοξίνη με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία, είναι η αφλατοξίνη M1, που προκύπτει από το μεταβολισμό της αφλατοξίνης B1 και βρίσκεται κυρίως στο γάλα. Άλλες αφλατοξίνες που εντοπίστηκαν, αλλά ακόμη δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς οι επιπτώσεις από την παρουσία ή την κατανάλωσή τους, είναι οι M2, B2α, Q1, αφλατοξικόλη, H, D, G και η παρασιτικόλη (Diekman and Green, 1992).

Από τους μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες, ο *Aspergillus parasiticus* παράγει τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 ενώ ο *Aspergillus flavus* παράγει συνήθως της B1 και B2. Οι αφλατοξίνες παράγονται είτε μετασυσπλεκτικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των καρπών, αλλά μπορεί να παραχθούν και στους Αγρούς κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των φυτών (Moss, 1989).

Η κατανάλωση των αφλατοξινών από τον άνθρωπο ή τα ζώα οδηγεί σε διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Οι παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν ονομάζονται αφλατοξικώσεις. Οι αφλατοξίνες αν καταναλωθούν σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να αποβούν θανατηφόρες, ενώ σε μικρότερες ποσότητες μπορεί να οδηγήσουν σε χρόνια τοξίκωση ή ακόμη και στη δημιουργία νεοπλασιών. Καθημερινή ή περιστασιακή κατανάλωση τροφής που περιέχει αφλατοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της πρόσληψης και του μεταβολισμού της, μείωση της ανοσίας έναντι παρασίτων και μικροβίων, καθώς και σε εκδήλωση συμπτωμάτων, όπως αιμορραγίες στους μυς ή στις σωματικές κοιλότητες (Jacobsen *et al.*, 1993).

Ο στόχος της παρούσας πειραματικής ενότητας είναι η διερεύνηση της ενδεχόμενης δράσης φυτικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή αφλατοξινών, καθώς και στην κατανόηση του σχετικού μηχανισμού δράσης τους.

## II.4.2 Υλικά και Μέθοδοι

### II.4.2.1 Προμήθεια Φυτικού Υλικού

Τα φυτικά δείγματα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.), του φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.), της ρίγανης (*Origanum vulgare* L.; χημειότυπος καρβακρόλης) και του ύσσωπου (*Hyssopus officinalis* L.) ήταν συλλογής έτους 2010, είχαν ξηρανθεί με αέρα και προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Καλλιεργητών Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ). Τα δείγματα του δίκταμου (*Origanum dictamnus* L. χημειότυπος καρβακρόλης) προμηθεύτηκαν από την τοπική αγορά της Κρήτης και τα δείγματα του κρόκου (*Crocus sativus* L.) προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Κοζάνης. Από τα προαναφερόμενα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα φύλλα, με εξαίρεση τη ρίγανη και τον ύσσωπο όπου χρησιμοποιήθηκαν και τα άνθη, και του κρόκου όπου χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση αποκλειστικά τα στίγματα. Όλα τα φυτικά δείγματα φυλάσσονταν στους -20° C μέχρι τη χρήση τους.

#### II.4.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (μελισσόχορτο, φασκόμηλο, ρίγανη, ύσσωπος και δίκταμο) παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 10 g/100 ml με την προσθήκη της ξηρής δρόγης σε νερό που βράζει, ανάδευση του μίγματος και παραμονή του σε ηρεμία εκτός θερμοκρατικής πηγής για 15 minutes. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν κατ αρχήν με Whatman filter No1, και προ της προσθήκης τους στο μέσο καλλιέργειας των μυκήτων με αποστειρωμένα φίλτρα 0.2 μm PES filter media (Whatman Puradisk 25 mm) προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των καλλιεργειών του *Aspergillus flavus* από άλλους μικροοργανισμούς. Με την ίδια διαδικασία παρασκευάστηκε και το εκχύλισμα του κρόκου αλλά σε συγκέντρωση 0.1 g/100 ml.

#### II.4.2.3 Αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες σε τριβλία ήταν το Coconut Cream Agar (CCA). Το CCA επιλέχθηκε ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus flavus* διότι προωθεί την παραγωγή αφλατοξινών και διευκολύνει την ανίχνευσή τους στη συνέχεια, καθώς τα τριβλία που περιέχουν τοξικογόνα στελέχη παίρνουν εξ αιτίας του CCA ένα χαρακτηριστικό πράσινο ή μπλε φθορίζον χρώμα, όταν φωτίζονται με λάμπα UV.

Για την παρασκευή 1L θρεπτικού υποστρώματος CCA προστέθηκαν 250 ml γάλα καρύδας συσκευασμένο AROY-D και 750 ml απιονισμένο νερό. Το μείγμα μετά την ανάδευσή του, ρυθμίστηκε σε pH 6,9 και προστέθηκαν 20 g Agar. Στη συνέχεια το μίγμα αποστειρώθηκε για 20 minutes στους 120° C.

Για τις υγρές καλλιέργειες του *Aspergillus flavus* χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το *Coconut Broth* για την παρασκευή του οποίου ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το CCA αλλά χωρίς την προσθήκη του Agar.

Τα στελέχη του μύκητα *Aspergillus flavus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, προήλθαν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

#### II.4.2.4 Βιοδοκιμές σε στερεές καλλιέργειες *Aspergillus flavus*

Οι στερεές καλλιέργειες του *A. flavus* αναπτύχθηκαν σε τριβλία σε συνθήκες άπλετου φωτισμού προκειμένου να παραχθούν αρκετά κονίδια. Η ανάπτυξη του μυκηλίου και των κονιδίων έγινε σε αποστειρωμένα τριβλία Petri 90 mm στα οποία είχαν

προηγούμενως προστεθεί 19 ml αποστειρωμένου CCA και 1 ml εκχυλίσματος από τα υπό εξέταση αρωματικά φυτά πριν την στερεοποίηση του CCA.

Τα κονίδια του *A. flavus* συλλέχθηκαν σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O (στο οποίο είχε προστεθεί 0.01% Tween 80 για την απελευθέρωση των υδροφοβικών κονιδίων) με τη βοήθεια επίπεδης οδοντογλυφίδας. Η συγκέντρωση των κονιδίων με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου ρυθμίστηκε στα 10<sup>6</sup> κονίδια / mL. Στη συνέχεια όγκος 10 μL (10<sup>4</sup> κονίδια) από το αιώρημα των κονιδίων που παρασκευάστηκε προηγούμενα τοποθετήθηκε στο κέντρο κάθε τριβλίου επάνω στο θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25° C με ρύθμιση φωτοπεριόδου 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι.

Η μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου έγινε τη 2<sup>η</sup>, την 4<sup>η</sup> και την 7<sup>η</sup> ημέρα. Η μέτρηση των παραγόμενων κονιδίων στις καλλιέργειες έγινε την 7<sup>η</sup> ημέρα, με λήψη 3 δισκίων διαμέτρου 6 mm από κάθε τριβλίο, τα οποία στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν και αναδεύθηκαν για 1 minute σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O περιεκτικότητας 0.01 % σε Tween 80 για τη διευκόλυνση αποδέσμευσης των κονιδίων. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση κονιδίων σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου. Για κάθε επέμβαση με φυτικό εκχύλισμα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών έγιναν σε τέσσερις επαναλήψεις.

Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Κάθε δοκιμαστικό σωλήνας περιείχε 4.5 mL από το Coconut Broth που προετοιμάστηκε παραπάνω και 0.5 mL φυτικού εκχυλίσματος. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν στη συνέχεια 50 μl βιολογικού υλικού που περιείχαν κατά προσέγγιση 10<sup>8</sup> κονίδια / mL *A. flavus*. Για κάθε επέμβαση έγιναν τέσσερις επαναλήψεις, και η επώαση των καλλιεργειών έγινε σε επωαστικό θάλαμο στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 25° C για 3 ημέρες. Μετά την επώαση 3 ημερών, το περιεχόμενο της καλλιέργειας από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση, και στη συνέχεια ξηπλύθηκε δυο φορές από το Coconut broth με ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα στη συνέχεια λυοφιλιώθηκαν και φυλάχθηκαν σε καταψύκτη στους -80° C.

Τα δεδομένα των μικροβιολογικών παραμέτρων συγκρίθηκαν στατιστικά με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και Fisher's Least Significance Difference (LSD) με χρήση του λογισμικού πακέτου Statgraphics Plus Software.

#### II.4.2.5 Μέθοδος ανίχνευσης αφλατοξινών με χρήση TLC

- Αντιδραστήρια – υλικά

Μικροπιπέττες 20 και 200 μL. Αιθυλική αλκοόλη, καλλιέργειες *A. flavus* σε CCA, Eppendorf tubes (-80° C) Centrifuge tubes 50mL (falcon). Αποστειρωμένες λαβίδες, Γυάλινα

βαζάκια Mc Cartney, Χλωροφόρμιο, Αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, μεθανόλη, αιθέρας. Φελλοτρυπητήρας 9 mm, Συσκευή ανάμιξης (vortex). TCL plates, silica gel 20x20 cm, 250 μm layer (Whatman). Γυάλινο δοχείο παρακολούθησης TLC, Λάμπα UV.

- Διαδικασία

Για την ανάπτυξη των στερεών καλλιεργειών του *Aspergillus flavus* στο τριβλίο επιλέχθηκε όπως έχει προαναφερθεί το θρεπτικό υπόστρωμα Coconut Cream Agar καθώς αυτό προωθεί την ανάπτυξη των αφλατοξινών αλλά και την ανίχνευση των αφλατοξινών καθώς τα τριβλία που περιέχουν τα τοξικογόνα στελέχη παίρνουν ένα πράσινο ή μπλε φθορίζον χρώμα όταν φωτίζονται με λάμπα UV. Ο χαρακτηριστικός αυτός φωτισμός παρουσιάζεται περίπου 32 ώρες από τη μεταφορά του μύκητα στο θρεπτικό υπόστρωμα και όσο περνάει ο καιρός αυξάνεται. Μετά από 3 ημέρες, φθορίζει ακόμα και η αφλατοξίνη που βρίσκεται σε ελάχιστη ποσότητα.

Ο εμβολιασμός των τοξικογόνων στελεχών του *Aspergillus flavus* έγινε με τοποθέτηση 10 μL ( $10^6$  κονίδια / mL) στο κέντρο κάθε τριβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα. Μετά την πλήρη ανάπτυξη του μύκητα στα τριβλία, μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα 10 δισκία 9 mm από κάθε καλλιέργεια σε ξεχωριστά σωληνάκια falcon στα οποία προστέθηκαν 5 mL χλωροφόρμιο, αναδεύτηκαν καλά, και παρέμειναν σε αυτό για 12 ώρες. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια falcon, αφού πρώτα αφαιρέθηκαν τα δισκία, φυγοκεντρήθηκαν για 6 min στις 1000 στροφές/min σε φυγόκεντρο Sorvall. Στη συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε γυάλινα βαζάκια Mc Cartney τα οποία τοποθετήθηκαν, χωρίς καπάκι, σε απαγωγό εστία και παρέμειναν σε αυτή 1-2 ημέρες μέχρι να εξατμιστεί όλος ο διαλύτης. Στη συνέχεια σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 100 μL χλωροφόρμιο κι ανακινήθηκαν με vortex.

- Προετοιμασία πλακιδίων TLC

Με τη χρήση χάρακα και μολυβιού ορίστηκαν οι αποστάσεις καθώς και τα σημεία έγχυσης κάθε δείγματος στις πλάκες χρωματογραφίας. 10 μL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν στην αντίστοιχη θέση έγχυσης στην πλάκα TLC. Στη συνέχεια η πλάκα TLC τοποθετήθηκε στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας το οποίο περιείχε αιθέρα, μεθανόλη και αποστειρωμένο απιονισμένο νερό σε αναλογία 96:3:1.

Μετά από 40 – 60 min η στάθμη της κινητής φάσης των διαλυτών έφθασε στο προσημειωμένο όριο στην πλάκα TLC, κι αυτή με τη σειρά της αφαιρέθηκε από το γυάλινο δοχείο κι αφέθηκε να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, σε συνθήκες πλήρους σκότους και χρησιμοποιώντας λάμπα UV καταγράφηκαν και φωτογραφήθηκαν τα

αποτελέσματα της μεθόδου. Οι γραμμές με χαρακτηριστικό μπλε φθορίζον χρώμα δηλώνουν παρουσία αφλατοξινών.

#### II.4.2.6 Απομόνωση RNA από μυκήλιο του *Aspergillus flavus*

Η απομόνωση του μυκηλιακού RNA του *A. flavus* έγινε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Το μυκήλιο του *A. flavus* αναπτύχθηκε σε Coconut Cream Broth μέσα σε αποστειρωμένα τριβλία τα οποία περιείχαν 19 mL θρεπτικού υποστρώματος και 1 mL φυτικού εκχυλίσματος. Κάθε μυκήλιο αφαιρέθηκε από το τριβλίο κι αφού ξεπλύθηκε 2 φορές από το θρεπτικό υπόστρωμα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, ανακίνηση και φυγοκέντρηση, στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε διηθητικό χαρτί να στεγνώσει μερικώς και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια erpendorf 1.5 mL τα οποία τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα λυοφιλιώθηκαν. Κάθε λυοφιλιωμένο μυκήλιο, λυοτριβήθηκε με χρήση αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων και στη συνέχεια ποσότητα 100 mg από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια erpendorf.

Σε κάθε φιαλίδιο δείγματος προστέθηκε 1 mL Trizol-reagent (Invitrogen®) προκειμένου να καταστραφούν οι κυτταρικές μεμβράνες του μυκηλίου και να απελευθερωθεί το RNA/DNA των κυττάρων. Τα δείγματα αναδεύθηκαν σε συσκευή vortex κι επώαστηκαν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 µL χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ ) για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών από το RNA και ακολούθησε ανακίνηση σε vortex για 15 sec.

Το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 10 min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 14 min σε θερμοκρασία 4° C. Μετά τη φυγοκέντρηση, δημιουργήθηκαν τρεις φάσεις σε κάθε φιαλίδιο erpendorf. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf, και προστέθηκε σε αυτό ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης αναλογίας (25:24:1) και το μίγμα αναδεύθηκε ικανοποιητικά. Ακολούθησε και πάλι φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 15 min στους 4° C και η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε εκ νέου σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf στο οποίο προστέθηκαν 500 µL ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια, έγινε ανάδευση και επώαση του μίγματος για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου για την κατακρήμνιση του RNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4° C, κι απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης με προσοχή ώστε να μη διαφύγει το ίζημα (pellet) που είχε δημιουργηθεί. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 1 mL αιθανόλης 70%, φυγοκεντρήθηκε στους 13.000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C και αφού απομακρύνθηκε η αιθανόλη το μίγμα



αφέθηκε να στεγνώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη 50  $\mu$ L αποστειρωμένου RNase free νερό και τα φιαλίδια με το δείγμα αποθηκεύθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας  $-80^{\circ}$  C.

#### II.4.2.7 Διερεύνηση επιτυχίας μετάλλαξης με Real-Time PCR

Προκειμένου να εξακριβωθεί η επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* και του βιοσυνθετικού γονιδίου *Nor-1* που είναι καθοριστικός παράγοντας για την παραγωγή αφλατοξίνης στο μύκητα *A. flavus*, πραγματοποιήθηκε πείραμα έκφρασης των γονιδίων αυτών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction). Κατά το πείραμα αυτό έγινε καλλιέργεια μονόσπορης αποικίας του κάθε στελέχους σε θρεπτικό υλικό και αφού τα στελέχη αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά ακολούθησε ενεργοποίησή τους σε υγρό Coconut broth, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε έκπλυση, λυοφυλίωση και εξαγωγή RNA από το μυκήλιο κάθε δείγματος (επεμβάσεις και μάρτυρας) με τελικό στόχο την ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* και του γονιδίου *Nor-1* όταν ο μύκητας εκτίθεται κατά την ανάπτυξή του στα φυτικά εκχυλίσματα.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR είναι μια τεχνική η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση αλληλουχιών DNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δυο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δυο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δυο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης.

Στην παρούσα εργασία, μετά από απομόνωση του RNA από μυκήλιο του μύκητα *A. flavus* όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) με σκοπό τη δημιουργία cDNA από RNA. Για τη διαδικασία αυτή έγινε καθαρισμός του RNA που απομονώθηκε από υπολείμματα τυχόν γενωματικού DNA σύμφωνα με το

πρωτόκολλο της Fermentas κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκαν 1 µg RNA, 1 µL 10x ρυθμιστικού διαλύματος MgCl<sub>2</sub> και 1µL DNase I- RNase-free (#EN0521) DEPC-WATER μέχρι τα 10 µL (#R0601).

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή PCR για 30 min στους 37° C. Στη συνέχεια, για να καταστραφεί το DNA, προστέθηκε 1 µL EDTA και τα δείγματα τοποθετήθηκαν ξανά στην PCR για 10 min στους 65° C. Έπειτα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Superscript II RT: First-Strand Synthesis Using Superscript II RT, με βάση το οποίο σε 11 µL δείγματος RNA προστέθηκαν 1 µL dNTPs και 1 µL Oligo (dT). Το μείγμα τοποθετήθηκε στην PCR για 10 min στους 65° C και στη συνέχεια στο μίγμα προστέθηκαν: 4 µL διαλύματος συγκέντρωσης 5X First-Strand Buffer, 2 µL DTT συγκέντρωσης 0.1 M και 1µL RNase OUT. Τα δείγματα είχαν τελικό όγκο 20 µL και τοποθετήθηκαν πάλι σε PCR για 2 min στους 25° C. Τέλος προστέθηκε από 1 µL Superscript II RT στα δείγματα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή για PCR σε πρόγραμμα για 50 min στους 42 °C και μετά για 15 min στους 70 °C για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του cDNA. Η Real-time PCR αντίδραση έγινε στο θερμοκυκλοποιητή Mx3005PTM (Stratagene) χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντιδραστήρια (QuantiFast™ SYBR Green PCR Kit, QIAGEN).

Για την εκτέλεση της αντίδρασης αυτής χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς το 18S με τους εκκινητές:

18S-F (5'-TTCCTAGCGAGCCCAACCT-3') και

18S-R (5'-CCCGCCGAAGCAACTAAG-3').

Για την εξέταση της έκφρασης του AfIR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

AfIR-F (5'-CCGGGATAGCTGTACGAGGTTG-3') και

AfIR-R (5'-GAGCACAGGCCGTTTCTC-3').

Τέλος, για την εξέταση της έκφρασης του Nor-1 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

Nor1-F (5'- GGCAACCCGCCTGATG-3') και

Nor1-R (5'-GGCGCCGATCAAGACAAA-3').

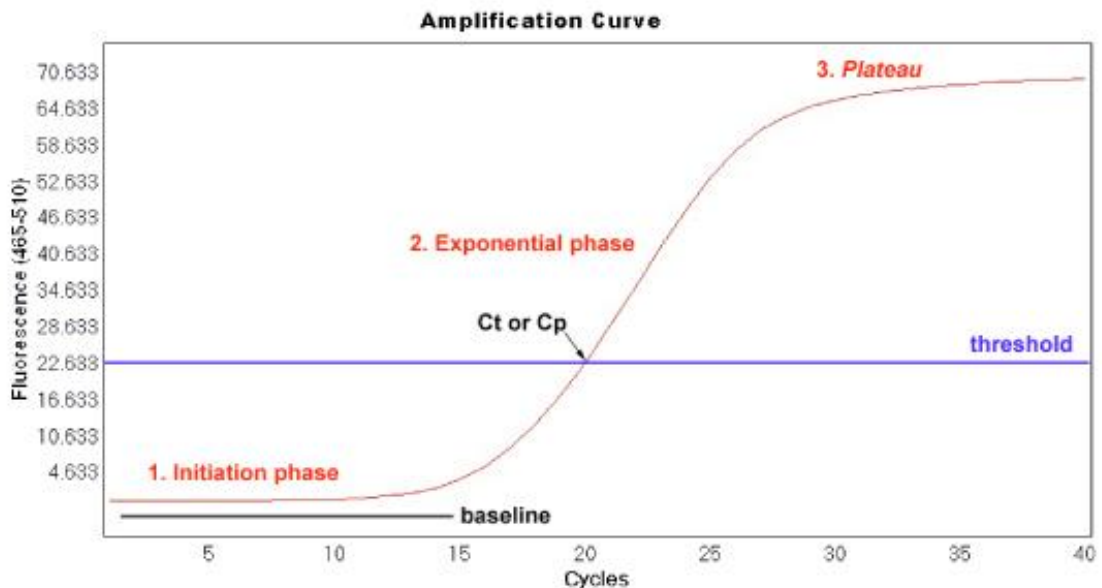
Για την εκτέλεση της αντίδρασης σε κάθε δείγμα προστεθήκαν 1,5 µL c-DNA , 5 µL χρωστικής ουσίας SYBR green και 0,2 µL από κάθε ένα από τους προαναφερθέντες εκκινητές. Ο συνολικός όγκος ήταν 10 µL με την προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας ddH<sub>2</sub>O νερού. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις Real-time PCR περιελάμβανε τα εξής στάδια:

- a) Ενεργοποίηση της HotStarTaq Plus DNA πολυμεράσης στους 95 °C για 5 min
- b) 40 κύκλοι που στον κάθε ένα πραγματοποιούνται αποδιάταξη του c-DNA για 3 δευτερόλεπτα στους 95° C
- c) Υβριδισμός και επέκταση στους 60° C για 30 sec
- d) 95° C για 1 min
- e) 60° C για 30 sec
- f) Σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 0,5° C/30 sec έως τους 95° C προκειμένου να διαχωριστούν τα πιθανά διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές.

Η Real-Time PCR ανήκει στην ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) και αποτελεί μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδο, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός φθορίζοντος μορίου αναφοράς σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η ανίχνευση του φθορίζοντος μορίου (χρησιμοποιήθηκε φθορίζουσα χρωστική SYBR Green στη συγκεκριμένη μελέτη) βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική ενισχύεται σημαντικά μετά την πρόσδεσή της σε δίκλωνο DNA.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις (Σχ. II.4.1) την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin *et al.*, 2005, Kubista *et al.*, 2006).



**Σχήμα II.4.1:** Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

#### II.4.2.8 *In vivo* δοκιμή επίδρασης εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή αφλατοξίνης

Για την *In vivo* βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από φιστίκια Αιγίνης (*Pistacia vera*). Τα εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αραιώθηκαν με προσθήκη 45 mL ddH<sub>2</sub>O σε κάθε 5 mL εκχυλίσματος, και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά ο επιφανειοδραστικός παράγοντας Tween 20, σε συγκέντρωση 0,01%. Οι σπόροι, αφού προηγουμένως εμβαπτίσθηκαν για 2h στο εκάστοτε μείγμα φυτικού εκχυλίσματος και Tween 20, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα τριβλία και παρέμειναν εντός θαλάμου νηματικής ροής (Laminar flow cabin) για 24 h, προκειμένου να απορροφηθεί το φυτικό εκχύλισμα από τους σπόρους προ της επώασής τους με το φυτοπαθογόνο μύκητα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τριβλία, μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *A. flavus*, με συγκέντρωση 10<sup>6</sup> κονίδια/mL και στη συνέχεια επώαστηκαν στους 28°C στο σκοτάδι.

#### II.4.2.9 Εκτίμηση αφλατοξινών στις *in-vivo* βιοδοκιμές με την μέθοδο ELISA

Μετά την παρέλευση 9 ημερών από τη μόλυνση με *A. flavus*, τα σπέρματα *P. vera* μεταφέρθηκαν από τα τριβλία και λυοτριβήθηκαν προ της εκχύλισής τους για την παραλαβή των αφλατοξινών. Η εκχύλιση έγινε με προσθήκη 50 mL διαλύματος μεθανόλης-νερού (70:30) σε 10 gr λυοτριβημένης φυτικής μάζας, ανάδευση για 3 min και στη συνέχεια διήθηση για την απομάκρυνση του φυτικού υλικού.

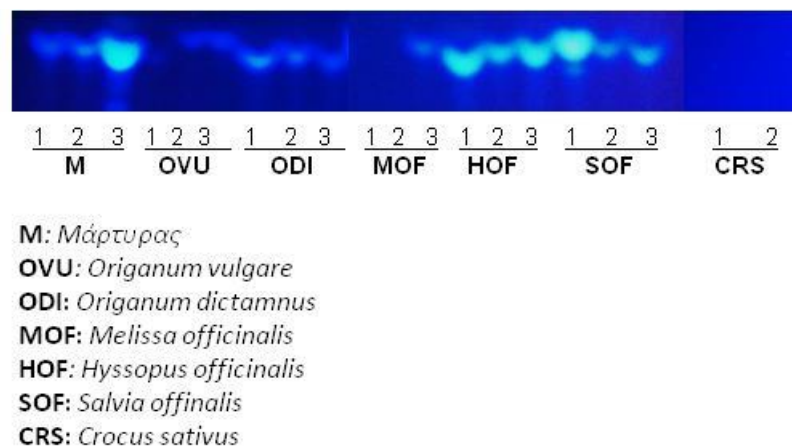
Στην υγρή φάση της εκχύλισης ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο για την εκτίμηση των αφλατοξινών που περιέχονται σε αυτή. Η μέθοδος βασίζεται στη δράση αντισωμάτων που δεσμεύουν την αφλατοξίνη. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιγράφεται στο kit «Agra-quant Aflatoxin 4-40 ppb / Romer Labs» και έχει ως εξής:

Την εκχύλιση κάθε δείγματος ακολουθεί ρύθμιση του pH της υγρής φάσης μεταξύ 6-8. Στη συνέχεια, 100 μL από κάθε δείγμα καθώς και τα αντίστοιχα standards που περιέχονται στο kit, τοποθετήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις (strips). Σε κάθε θέση προστέθηκε σε αυτά 200 μL από το conjugate buffer και αναδεύθηκαν με την πιπέττα. Ακολούθως, μεταφέρθηκαν 100 μL από κάθε διάλυμα στα antibody strips που περιέχονται στο kit και τα αφέθηκαν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο των 15 minutes απορρίφθηκε η ποσότητα που υπάρχει σε κάθε θέση και έγιναν πλύσεις με νερό. Η πρώτη διήρκησε 5 min και οι υπόλοιπες 4 που ακολούθησαν διήρκησαν 3 min. Μετά από κάθε πλύση γινόταν φαίρεση του

νερού από το plate. Έπειτα προστέθηκαν 100μL από το substrate buffer και αφέθηκαν σε συνθήκες δωματίου για 5 min. Τέλος, προστέθηκαν 100 μL από το stop solution buffer και η πλάκα τοποθετήθηκε σε φωτόμετρο ELISA για να αποδοθούν αριθμητικά οι αντίστοιχες τιμές απορρόφησης.

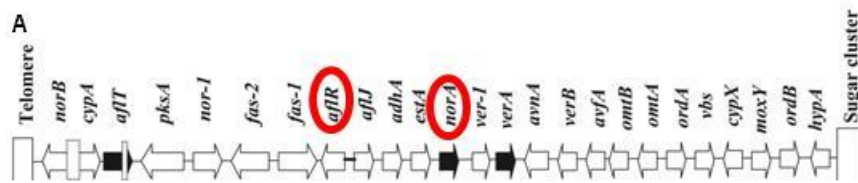
### II.4. 3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Τα αποτελέσματα από την ανίχνευση αφλατοξινών με χρήση TLC σε καλλιέργειες *A. flavus* με επεμβάσεις φυτικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών παρουσιάζονται στο **σχήμα II.4.2**. Με βάση το σχήμα παρατηρείται μείωση παραγωγής αφλατοξίνης από την εφαρμογή των υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών *Melissa officinalis*-MOF, *Origanum vulgare*-OVU, *Origanum dictamnus*-ODI, και *Crocus sativus*-CRS.



**Σχήμα II.4.2** Πλάκα TLC-Παρατήρηση της παραγωγής αφλατοξίνης του *Aspergillus flavus*.

Η μοριακή μελέτη επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων στην έκφραση γονιδίων βιοσύνθεσης αφλατοξίνης έγινε με βάση την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* και του βιοσυνθετικού γονιδίου *nor-1* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αφλατοξίνης στον *A. flavus* με τη μέθοδο της qReal-time PCR που περιγράφηκε πιο πάνω. Η εξαγωγή RNA έγινε με τη μέθοδο TRIZOL, και στη συνέχεια έγινε σύνθεση cDNA και εφαρμογή qReal-time PCR με τους εκκινητές Aflavus\_18S-F, Aflavus\_18S-R, Aflavus aflR-F, Aflavus aflR-R, Aflavus-nor1-F και Aflavus-nor2-R (**Σχ. II.4.3**).

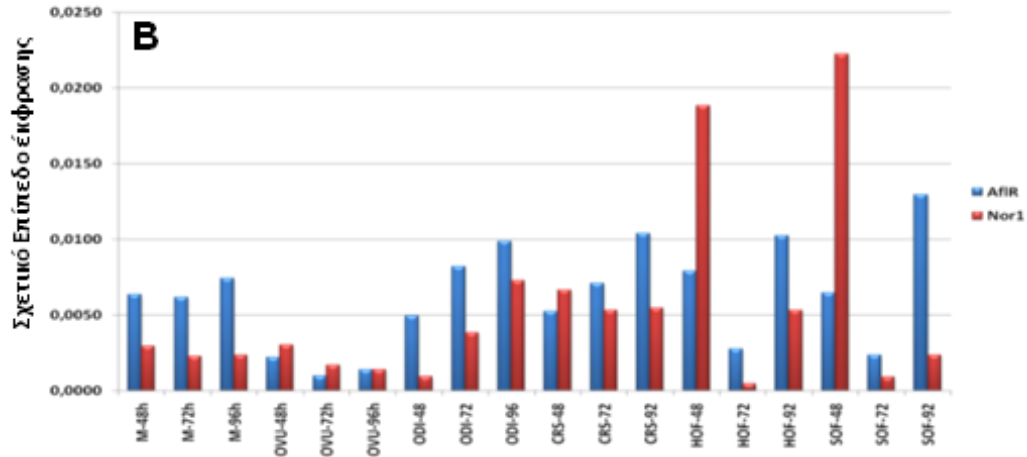


Σχήμα 11.4.3 Δέσμη γονιδίων βιοσύνθεσης αφλατοξίνης

Από το Σχ. 11.4.4 που παρουσιάζονται τα ποσοτικά αποτελέσματα της realtime PCR προκύπτει ότι το εκχύλισμα του *Origanum vulgare*-OVU μειώνει σημαντικά την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *aflR* και του βιοσυνθετικού γονιδίου *nor-1*. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την μειωμένη παραγωγή αφλατοξινών από τον *A. flavus* όταν αυτός υπόκειται σε επέμβαση με *Origanum vulgare* προέρχεται από την αναστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα και του γονιδίου που ευθύνεται για την παραγωγή της αφλατοξίνης στο συγκεκριμένο είδος μύκητα.

Η επίδραση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus* όχι μόνο δεν παρεμπόδισε την ανάπτυξη του μύκητα σε επίπεδο μυκηλίου, αλλά ενίσχυσε σημαντικά και τη σποριογένεσή του. Θα μπορούσε ενδεχόμενα και η εξαιρετικά σημαντική αύξηση στην παραγωγή κονιδίων του *A. flavus* να οφείλεται και αυτή σε επιρροή των εκχυλισμάτων στην έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου της σποριογένεσης. Μόνο που ενώ τα υπό εξέταση εκχυλίσματα ενίσχυσαν στο σύνολό τους, αλλά σε διαφορετικό βαθμό το κάθε ένα από αυτά, την κονιδιογένεση του *A. flavus*, μόνο το *Origanum vulgare*, το *Melissa officinalis* και ο *Crocus sativus* περιορίζουν σημαντικά την παραγωγή αφλατοξίνης, και μόνο το *Origanum vulgare* περιόρισε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα και του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της. Συγκρίνοντας τα διαγράμματα παραγωγής κονιδίων και έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα και του αντίστοιχου γονιδίου, παρατηρείται ότι η αύξηση της κονιδιογένεσης, είναι αντίστοιχη αναλογικά με τον περιορισμό παραγωγής αφλατοξίνης. Δηλαδή, το εκχύλισμα που προκαλεί τη μεγαλύτερη ενίσχυση της κονιδιογένεσης και στην προκειμένη περίπτωση το OVU, προκαλεί και τη μεγαλύτερη μείωση στην παραγωγή αφλατοξίνης.

Το γεγονός αυτό, δίνει την ένδειξη ότι ενδεχόμενα, το ίδιο μίγμα δραστικών συστατικών ενδεχομένως επιδρά σε δυο μοριακούς μηχανισμούς του ίδιου οργανισμού με αντίστροφη δράση, στον μεν ενισχυτικά (κονιδιογένεση) και στον άλλο παρεμποδιστικά (παραγωγή αφλατοξίνης), αλλά πιθανόν η δράση αυτή να οφείλεται σε διαφορετικά συστατικά του ίδιου δείγματος.



**Σχήμα II.4.4** Έκφραση των γονιδίων *aflR* και *nor-1* μετά την εφαρμογή των υδατικών εκχυλισμάτων σε καλλιέργειες του μύκητα *A. flavus*.

Αντίστοιχα αποτελέσματα με τα αυτά των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκαν και σε άλλα φυσικά προϊόντα όπως το oriental mustard flour, το αιθέριο έλαιο του *Curcuma longa* L. Και το αιθέριο έλαιο του *Piper betle* var. *magahi* όπου περιορίστηκε η παραγωγή αφλατοξινών χωρίς να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του μύκητα (Quiles *et al.*, 2015; Hontanaya *et al.*, 2015; Sindu *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2013).

Δυο από τα γονίδια που ευθύνονται για τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών στον *Aspergillus flavus* είναι το *Nor-1* μαζί με τον αντίστοιχο μεταγραφικό παράγοντα *aflR* (Georgianna and Payne, 2009). Πολλοί είναι οι παράγοντες που έχει βρεθεί να επηρεάζουν το μηχανισμό της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών από τα στελέχη του *Aspergillus* (Bok and Keller, 2004; Perrin *et al.*, 2007) μεταξύ αυτών και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Calvo *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2005) με το φως να κατέχει τον κυρίαρχο ρόλο. Ο μηχανισμός της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών είναι περίπλοκος και περιλαμβάνει πολλά αλληλοσυνδεόμενα δίκτυα. Οι αφλατοξίνες ήταν από τους πρώτους δευτερογενείς μεταβολίτες των οποίων όλα τα βιοσυνθετικά γονίδια συγκεντρώνονται σε μια δέσμη γονιδίων. Η έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων των αφλατοξινών ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα *AflR* στην προκειμένη περίπτωση για τον *Aspergillus flavus* (Price *et al.*, 2006) ο οποίος είναι απολύτως απαραίτητος για την έκφρασή τους. Μελέτες που έχουν εκπονηθεί σχετικά με την έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων για τις αφλατοξίνες κατέληξαν ότι μπορεί να υπάρχουν



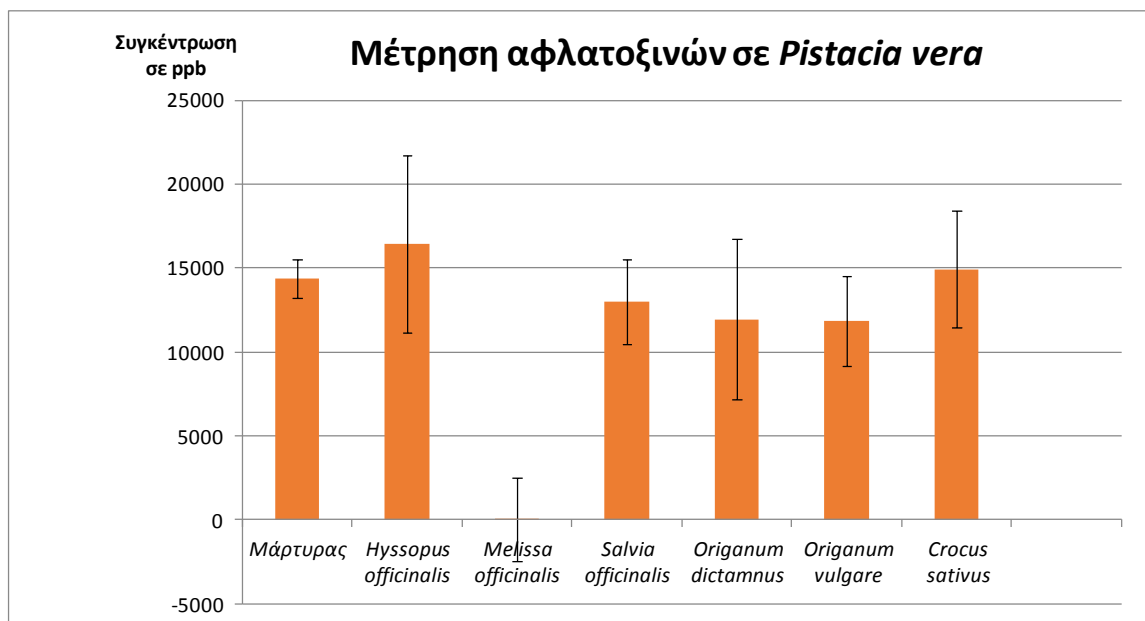
κι άλλοι παράγοντες πέραν του *afIR* που να ρυθμίζουν την έκφρασή τους (Georgianna and Payne, 2009). Αρκετοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων φαίνεται να είναι υπό τον έλεγχο επιγενετικών παραγόντων καθώς έχει βρεθεί ότι υπό συνθήκες στρεσογόνων παραγόντων δύναται να παράγονται και να συσσωρεύονται νέες χημικές ενώσεις από τα λεγόμενα «σιωπηλά βιοσυνθετικά μονοπάτια» οι οποίες δε θα παράγονταν σε διαφορετική περίπτωση (Williams *et al.*, 2008). Από τις εργασίες που έχουν εκπονηθεί μέχρι σήμερα η επιγενετική είναι δυνατό να διαδραματίσει κύριο ρόλο και στη ρύθμιση ήδη ενεργά εκφρασμένων δευτερογενών μεταβολιτών όπως οι αφλατοξίνες (Georgianna and Payne, 2009).

Εργασίες που πρόσφατα έχουν εκπονηθεί έδειξαν ότι η Velvet A protein (VeA) είναι απαραίτητη για την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *alfR* και παράλληλα σχετίζεται με την ανάπτυξη και την κονιδιογένεση (Calvo, 2008). Το οξειδωτικό στρες είναι ένας παράγοντας που διεγείρει την παραγωγή αφλατοξινών με βάση μελέτες που έχουν προηγηθεί (Jayashree and Subramanyam, 2000; Reverberi *et al.*, 2008), ενώ τα αντιοξειδωτικά συστατικά όπως το γαλλικό οξύ εμφανίζουν ανασταλτική επίδραση στην παραγωγή τους (Mahoney and Molyneux, 2004). Η μελέτη των Kim *et al.*, (2008) ανέλυσε την επίδραση αντιοξειδωτικών συστατικών όπως το καφεϊκό οξύ στην έκφραση των γονιδίων μέσω μικροσυστοιχιών βρίσκοντας ότι υπό την επίδρασή του περιορίζεται η έκφραση των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Chitarrini *et al.* (2014) όσον αφορά τα αντιοξειδωτικά συστατικά και την παραγωγή αφλατοξινών από τον *A. flavus*. Έχει επίσης μελετηθεί η επίδραση του αιθερίου ελαίου και εκχυλισμάτων τόσο υδατικών όσο και οργανικών διαλυτών τριών φυτικών ειδών της οικογένειας *Lamiaceae* (*Thymus daenensis*, *Satureja khazistanica* και *Satureja macrosiphonia*) στην ανάπτυξη και παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A. flavus* και *parasiticus*. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης τα αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα των οργανικών διαλυτών εμπόδισαν κυρίως την ανάπτυξη του στελέχους με παράλληλη μικρή δράση έναντι της βιοσύνθεσης αφλατοξίνης AFB1, σε αντίθεση με τα υδατικά εκχυλίσματα τα οποία δεν περιόρισαν τόσο την ανάπτυξη του μύκητα όσο μείωσαν εξαιρετικά σημαντικά την παραγωγή της αφλατοξίνης (Gorran *et al.*, 2013).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία και με τα αντίστοιχα των Gorran *et al.*, (2013) οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* στην ανάπτυξη και παραγωγή αφλατοξίνης

από τον *A. flavus*. Πρόσθετα, η παρούσα μελέτη τεκμηρίωσε το γεγονός ότι η μείωση στην παραγωγή αφλατοξίνης οφείλεται σε περιορισμό της έκφρασης του γονιδίου *nor-1* και του μεταγραφικού παράγοντα *afIR* κι όχι σε κάποιο μεταγενέστερο στάδιο του μηχανισμού βιοσύνθεσης.

Όπως προαναφέρθηκε, η αντιοξειδωτική δράση και τα αντιοξειδωτικά συστατικά σχετίζονται άμεσα με τον περιορισμό στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Το γεγονός αυτό μπορεί και ερμηνεύει την δράση των υδατικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σχετίζοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Η δοκιμασία με Real-time PCR δεν έδωσε δεδομένα για την περίπτωση της επέμβασης με *M. officinalis*-MOF καθώς δεν κατέστη τεχνικά δυνατή η παραλαβή ικανής ποσότητας RNA για τη διεξαγωγή του πειράματος μετά από πολλές επαναλήψεις της ίδιας διαδικασίας. Το γεγονός υποδεικνύει ότι ενδεχομένως το εκχύλισμα του *M. officinalis* για αδιευκρίνιστους λόγους επηρεάζει και δεν επιτρέπει τεχνικά τη διεξαγωγή της διαδικασίας.



**Σχήμα II.4.5** Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξινών σε *in-vivo* δοκιμή *Pistacia vera* υπό την επέμβαση εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

Συμπεράσματα για τη δράση του *M. officinalis* το οποίο έχει τη μεγαλύτερη συγκριτικά αντιοξειδωτική δράση έναντι των άλλων εκχυλισμάτων (Skotti *et al.*, 2014) μπορούν να δοθούν από τις *in-vivo* και *in vitro* δοκιμές, καθώς και από τη μέτρηση των

αφλατοξινών με ELISA. Το *M. officinalis* έδωσε τη μεγαλύτερη δράση στον σχεδόν πλήρη περιορισμό της βιοσύνθεσης αφλατοξίνης από τον *A. flavus* στις *in-vivo* βιοδοκιμές με σπόρους *P.vera* (Σχ. II.4.5).

#### II.4.4 Συμπεράσματα

Όλα τα εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που δοκιμάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης στο φυτοπαθογόνο στέλεχος *A. flavus* έδειξαν να έχουν επίδραση σε παραμέτρους τόσο της ανάπτυξης του μύκητα όσο και της παραγωγής αφλατοξινών από αυτόν. Την πλέον ενδιαφέρουσα επίδραση από την πλευρά της ενδεχόμενης αξιοποίησής τους από τον τομέα της βιοτεχνολογίας και της τεχνολογίας τροφίμων, την έδειξε το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*), το οποίο αν και δεν έδωσε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *A. flavus* περιόρισε σε πολύ σημαντικό βαθμό την παραγωγή αφλατοξίνης, όπως αυτό ελέγχθηκε ποιοτικά με TLC αλλά και ποσοτικά με ELISA τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* βιοδοκιμές με σπόρους *Pistacia vera*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι εξαιρετικά ενθαρρυντικά για την ενδεχόμενη αξιοποίηση των εκχυλισμάτων του *M. officinalis* στην αντιμετώπιση της παρουσίας αφλατοξινών σε τρόφιμα μετασυλλεκτικά. Το γεγονός, βέβαια, συνιστά περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης ενός μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου στην παραγωγή αφλατοξινών από τον *A. flavus*, καθώς και διεξαγωγή *in-vivo* δοκιμών σε μεγάλη ποικιλία ειδών πέραν της *P. vera* προκειμένου να καταδειχθεί η αποτελεσματικότητά του ως αντιαφλατοξικογόνος παράγοντας ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στα τρόφιμα.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ /ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ





6<sup>ο</sup>

**Πανελλήνιο Συνέδριο  
Της Επιστημονικής Εταιρείας  
Μικροβιόκοσμος**

**Μικροβιόκοσμος:  
Νέοι ορίζοντες στον μικρόκοσμο**

**Θεματικές Ενότητες**

- περιβάλλον
- ενέργεια
- γεωργία
- τρόφιμα
- μοριακοί οργανισμοί σε μικροοργανισμούς-μοντέλα
- νέες τεχνολογίες - βιοτεχνολογικές εφαρμογές

**3-5  
Απριλίου 2015**

**Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών  
Βασ. Κωνσταντίνου 48, Αθήνα**

[mikrobiokosmos6.aua.gr](http://mikrobiokosmos6.aua.gr)

**Πρακτικά Συνεδρίου**

**Biological activity of aromatic plant's aqueous extracts  
against plant-pathogenic fungi and aflatoxin biosynthesis**

**Skotti E.<sup>1</sup>, Kaiafa M.<sup>2</sup>, Kountouri S.D.<sup>2</sup>, Bouchagier P.<sup>3</sup>, Tsitsigiannis D.I.<sup>2</sup>,  
Polissiou M.<sup>1</sup>, Tarantilis P.A.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>2</sup>Laboratory of Plant Pathology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>3</sup>Department of Food Technology, Technological Educational Institute of Ionian Islands, GR 28100 Kefallonia, Greece

\*Email: ptara@aua.gr

The aim of this work is to evaluate the biological activity of five Lamiaceae species (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*), and *Crocus sativus* aqueous extracts against three plant pathogenic fungal species (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus*). All plant extracts (Lamiaceae: 1g/10mL, *Crocus sativus*: 0.01g/10mL) were biologically active against all fungal species, contributing to enhancement or inhibition of conidia production and mycelium radial growth. In the case of *Fusarium oxysporum*, *Origanum vulgare* extract appeared more active as the conidia production quadrupled compared to the control. A similar activity was demonstrated on the effects of *Salvia officinalis* extract on *Alternaria alternata* and *Origanum dictamnus* extract on *Aspergillus flavus*. In contrast, *Origanum vulgare*, *Crocus sativus* and *Hyssopus officinalis* extracts reduced conidia production in *Alternaria alternata*. So far, the essential oils of several Lamiaceae species have been evaluated and in almost all cases it was found that they have antifungal activity. Therefore, further investigation on the synergism of water soluble substances and essential oils of plant species examined was necessary. These studies revealed that in some cases the ingredients of the aqueous extracts play an important role in the biological activity observed. In further experiments, a study of the effects of the aqueous extracts of five aromatic plants was conducted on the aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in CCA (Coconut Cream Agar) medium. The toxin was extracted with the TLC method and results showed a notable reduction of the aflatoxin production from the application of the aqueous extracts of *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Melissa officinalis* and *Crocus sativus* (1g/10ml). The effects of the different extracts at molecular level and more specifically on expression of genes that are involved in aflatoxin biosynthesis pathway (by means of the Real-time PCR method), will be presented.

**Βιολογική δράση υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε φυτοπαθογόνους μύκητες και στη βιοσύνθεση αφλατοξινών**

**Ε. Σκώττη<sup>1</sup>, Μ. Καϊάφα<sup>2</sup>, Σ.Α. Κουντούρη<sup>2</sup>, Π. Μπουχάγιερ<sup>3</sup>,  
Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης<sup>2</sup>, Μ. Πολυσίου<sup>1</sup>, Π.Α. Ταραντίλης<sup>1\*</sup>**

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Γενικής Χημείας  
Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα<sup>1</sup>

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και  
Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας  
Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα<sup>2</sup>

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ιονίων Νήσων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Τέρμα Λεωφόρου Βεργωτή, 28100 Αργοστόλι<sup>3</sup>

\*Email: ptara@aua.gr

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων πέντε αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*) και του *Crocus sativus* έναντι τριών ειδών φυτοπαθογόνων μυκήτων (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus*). Όλα τα φυτικά εκχυλίσματα (*Lamiaceae*: 1g/10mL, *Crocus sativus*: 0.01g/10mL) παρουσιάστηκαν βιολογικά ενεργά έναντι όλων των μυκήτων που δοκιμάστηκαν ενισχύοντας ή παρεμποδίζοντας τόσο την κονιδιογένεση όσο και την ανάπτυξη του μυκηλίου σε θρεπτικά υποστρώματα σε τρυβλία. Στην περίπτωση του *Fusarium oxysporum*, περισσότερο ενεργό εμφανίστηκε το εκχύλισμα του *Origanum vulgare*, καθώς τετραπλασιάστηκε η παραγωγή κονιδίων σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίστοιχη δράση εμφάνισε το εκχύλισμα της *Salvia officinalis* στην *Alternaria alternata* και το εκχύλισμα του *Origanum dictamnus* στον *Aspergillus flavus*. Σε αντίθεση, τα εκχυλίσματα του *Origanum vulgare*, *Crocus sativus* και *Hyssopus officinalis* οδήγησαν σε σημαντική μείωση της παραγωγής κονιδίων στην *Alternaria alternata*. Μέχρι σήμερα έχει αξιολογηθεί η βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου διαφόρων ειδών *Lamiaceae*, και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε να έχει μυκητοκτόνο δράση. Συνεπώς ήταν απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της συνέργειας των υδατοδιαλυτών συστατικών και του αιθερίου ελαίου των φυτικών ειδών που εξετάστηκαν και διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική δράση που παρατηρήθηκε. Σε περαιτέρω πειράματα, έγινε μελέτη της επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων των πέντε αρωματικών φυτών στην παραγωγή αφλατοξίνης του μύκητα *Aspergillus flavus* σε θρεπτικό υπόστρωμα CCA (Coconut Cream Agar). Η εξαγωγή της τοξίνης έγινε με την μέθοδο TLC και τα αποτελέσματα έδειξαν αξιοσημείωτη μείωση της παραγωγής αφλατοξίνης από την εφαρμογή των υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Melissa officinalis* και *Crocus sativus* (1g/10mL). Θα γίνει παρουσίαση της επίδρασης των εκχυλισμάτων σε μοριακό επίπεδο στην έκφραση διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στην παραγωγή αφλατοξίνης με τη μέθοδο της Real-time PCR.



# Biological activity of aromatic plant's aqueous extracts against plant-pathogenic fungi and aflatoxin biosynthesis

E. Skotti<sup>1</sup>, M. Kaiafa<sup>2</sup>, S.D. Kountouri<sup>2</sup>, M.K. Iliadi<sup>2</sup>, A.A. Gkatzouni<sup>2</sup>, P. Bouchagier<sup>3</sup>, D.I. Tsitsigiannis<sup>2</sup>, M. Polissiou<sup>1</sup>, P.A. Tarantilis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Human Nutrition, General Chemistry Laboratory, Greece

<sup>2</sup>Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Plant Pathology Laboratory, Greece

<sup>3</sup>Department of Food Technology, Technological Educational Institution of Ionian Islands, Greece

## Introduction

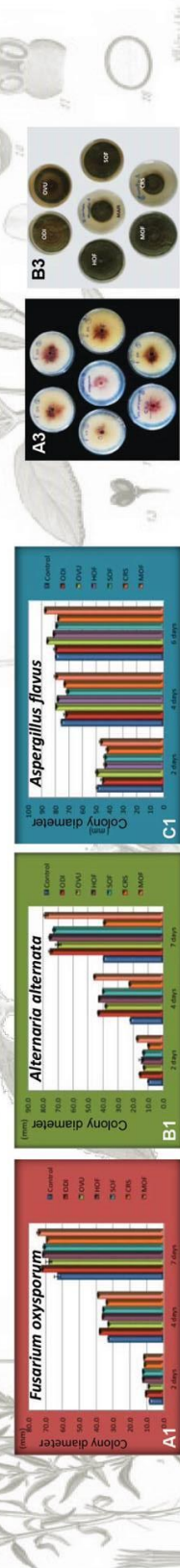
In the past 20 years there have been numerous research studies about the evaluation and antimicrobial activity of plant essential oils. In this study, the aqueous extracts of 5 aromatic plants of the Lamiaceae family (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*) and *Crocus sativus* were evaluated on their effects on conidia production and mycelium growth of three plant pathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*). In further experiments, a study was also conducted on the effects of the aqueous extracts of the aromatic plants in aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus*.

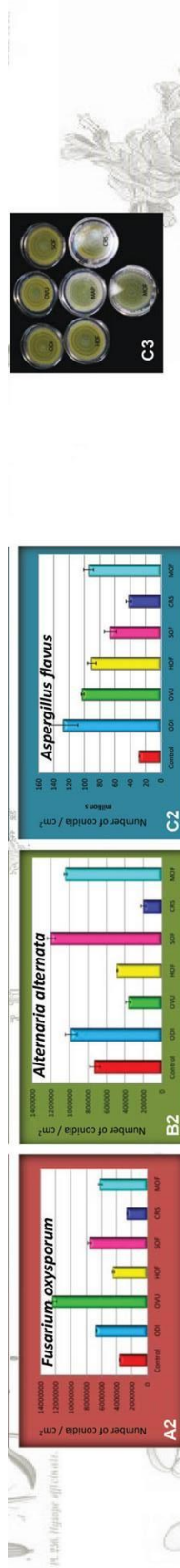
## Preparation of essential oils

The extracts of the five Lamiaceae species (*Origanum dictamnus*-ODI, *Origanum vulgare*-OVU, *Hyssopus officinalis*-HOF, *Salvia officinalis*-MOF and *Melissa officinalis*-MOF in concentration 1gr/10ml) and *Crocus sativus*-CRS at 0,01gr/10ml were prepared by immersing the dried plant material to boiled distilled water, mixed well and then allowed to stand for 15 minutes. These extracts were first filtered through Whatman No.1 filter and then passed again through a sterile endotoxin-free filter PES (0.2 µm) (Whatman Puradisk 25 mm) to reduce the risk of contamination by microorganisms.

## Fungal cultures in culture media with aqueous plant extracts

All species were grown in Petri dishes with PDA medium. The conidia of each fungus were collected in 1 mL ddH2O and after measuring the concentration of the conidia of each fungus, the final concentration was adjusted to be 10<sup>6</sup> con/ml. A droplet of 10 µL conidial suspension (10<sup>4</sup> conidia) was placed in the center of each Petri dish, which contained PDA mixed with the plant extracts (1 ml/dish). Petri dishes were placed in an incubator chamber under light (12h) and dark (12h) conditions, at 25 °C. The colony diameter was measured at 2, 4 and 7 days for *Fusarium*, *Alternaria* and *Aspergillus*. All procedures were repeated three times (Fig. 1). To measure conidia, 3 disks of 6 mm diameter each, were collected from each sample using a cork borer and they were homogenized. The conidia were counted using a hemocytometer. In the case of *Fusarium oxysporum*, the *Origanum vulgare*-OVU extract appeared more active, and quadrupled the conidia production relative to the control. The extract of *Salvia officinalis*-SOF showed a similar effect to *Alternaria alternata* and the extract of *Origanum dictamnus*-ODI to *Aspergillus flavus*. In contrast, extracts of *Origanum vulgare*-OVU, *Crocus sativus*-CRS and *Hyssopus officinalis*-HOF led to a significant reduction of conidia production on *Alternaria alternata* (Fig. 1).





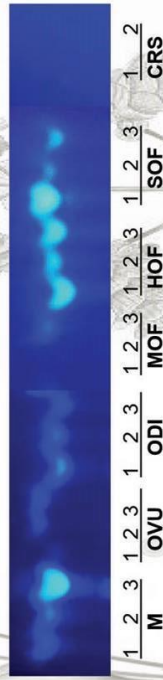
**Figure 1.** Graphs of the colony diameter measurements of (A1) *Fusarium oxysporum*, (B1) *Alternaria alternata*, (C1) *Aspergillus flavus*, conidia numbers (A2-B2-C2) respectively, and illustration of the Petri dishes with the fungal cultures (A3-B3-C3).

**The effect of the aqueous extracts on aflatoxin biosynthesis**

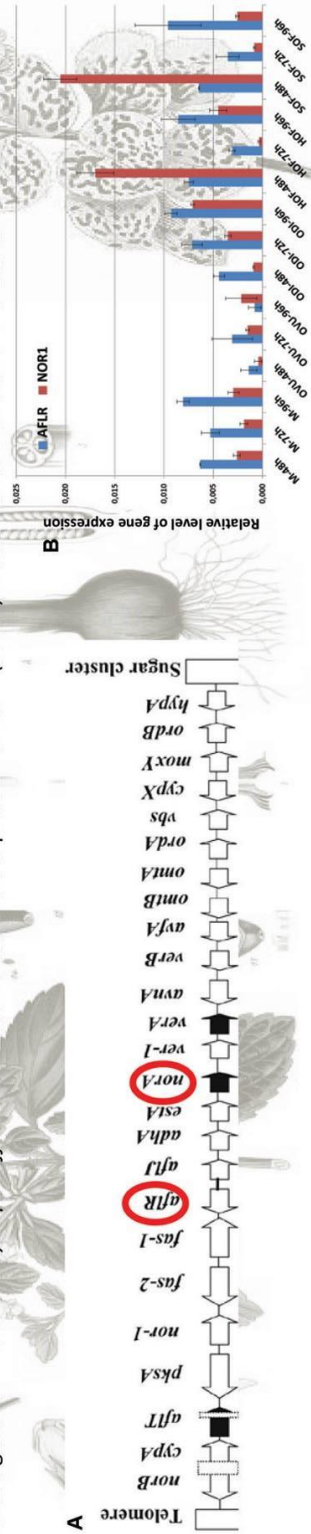
The effects of the aqueous extracts of the essential oils on aflatoxin production of the phytopathogenic fungus *Aspergillus flavus* was further examined. The fungus was cultivated in CCA (Coconut Cream Agar) medium and the toxin was analyzed by Thin Layer Chromatography method (TLC). The results showed a significant reduction in biosynthesis of aflatoxin by the application of aqueous extracts of the plants *Origanum vulgare*-OVU, *Origanum dictamnus*-ODI, *Melissa officinalis*-MOF and *Crocus sativus*-CRS at the concentration of 1 g/10 mL, (Fig. 2).

**Molecular study of the effect of aqueous extracts on the expression of aflatoxin biosynthesis genes**

Subsequently, we carried out gene expression analysis (by Real-time PCR) of the transcription factor *afR* and the biosynthetic gene *nor-1*, which are responsible for the production of aflatoxin in *A. flavus*. The fungus *A. flavus* (D. 1.3 strain) was cultivated in liquid CCA (Coconut Cream Agar) cultures at a concentration of 10<sup>5</sup> conidia/ml, with the addition of the corresponding aqueous extracts of plant essential oils (1 ml/Petri dish). The concentration of all the tested aqueous extracts was 1 gr/ml. Mycelium collection was conducted 2, 3 and 4 days after the conidia addition in the liquid CCA culture. RNA was extracted using the TRIZOL method and cDNA synthesis was followed. qReal-time PCR was conducted, using the primers: *A.flavus\_185-F*, *A.flavus\_185-R*, *A.flavus\_afR-F*, *A.flavus\_afR-R*, *A.flavus\_nor1-F*, *A.flavus\_nor1-R* (Fig. 3) (18S was the reference housekeeping gene). qReal-time PCR showed that *Origanum vulgare* extract significantly reduces the expression of the transcription factor *afR* and the biosynthetic gene *nor-1* whereas *Hyssopus officinalis* extract increased the expression of *nor-1* (at 48h) in accordance with the AF TLC results.



**Figure 2:** TLC plate showing the aflatoxin production of *Aspergillus flavus* after treatment with plant essential oils at a concentration of 1g/10ml in 3 replications. (M=Mock)



**Figure 3.** (A) Cluster of aflatoxin biosynthesis genes, (B) Expression of *afR* and *nor-1* genes after application of plant essential oils in cultures of the fungus *A. flavus*.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



## Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της βιολογικής δράσης και της τοξικότητας υδατικών εκχυλισμάτων και αφεψημάτων καλλιεργούμενων και αυτοφυών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών προκειμένου αυτά να αξιοποιηθούν μελλοντικά από τη Βιομηχανία τροφίμων και τη βιολογική γεωργία καθώς η αξιοποίηση των αφεψημάτων και των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αποτελεί ένα νέο πεδίο που ολοένα αναπτύσσεται.

Αρχικά, η διατριβή επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της τοξικότητας αφεψημάτων και υδατικών εκχυλισμάτων των οποίων η εκχύλιση έγινε με νερό σε θερμοκρασία 85° C, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος καθώς και υποβοηθούμενη από υπερήχους. Στη συνέχεια οι αναλύσεις επαναλήφθηκαν αφού προηγουμένως είχε αφαιρεθεί από τα εκχυλίσματα μέσω περαιτέρω εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα η όποια μικροποσότητα μη υδατοδιαλυτών συστατικών του αιθέριου ελαίου του εκάστοτε φυτικού είδους που είχε εισέλθει κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Η εκτίμηση της τοξικότητας πραγματοποιήθηκε με τον αναλυτή Microtox®, ο οποίος χρησιμοποιεί ως βιοδείκτη το βακτήριο *Vibrio fischeri* που έχει την ιδιότητα να εκπέμπει φωταύγεια. Η παρούσα μελέτη κατέληξε ότι οι διαδικασίες εκχύλισης επηρεάζουν σημαντικά την τοξικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* στα οποία εξετάστηκαν. Επίσης, βρέθηκε σημαντική συνέργεια στην τοξικότητα μεταξύ των πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου και των υδατοδιαλυτών συστατικών σε όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι είναι σημαντικό να εξελιχθεί και να προχωρήσει σε βάθος η έρευνα για την τοξικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων με σειρές βιοδοκιμών κι ελέγχων τοξικότητας προκειμένου η χρήση τους ως πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών να τεθεί εντός ασφαλών ορίων για την ανθρώπινη υγεία.

Στη συνέχεια η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με τη βιολογική δράση υδατικών εκχυλισμάτων των ανωτέρω αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στους φυτοπαθογόνους μύκητες *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* και *Aspergillus flavus* και στον εντομοπαθογόνο μύκητα *Beauveria bassiana*. Σε αυτή την περίπτωση τα εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν ήταν υδατικά αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση φυτικής δρόγης από την προηγούμενη ενότητα και η εκχύλιση έγινε αποκλειστικά με ζεστό νερό, και ακολούθησε και περαιτέρω εκχύλισή τους με πετρελαϊκό αιθέρα κι επανάληψη των βιοδοκιμών στο αμιγώς

υδατικό κλάσμα των εκχυλισμάτων. Οι δείκτες ελέγχου της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων ήταν η διάμετρος ανάπτυξης του μυκηλίου των μυκήτων καθώς και ο αριθμός των κονιδίων που ανέπτυσαν. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντική βιολογική δράση όλων των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης όχι προς την κατεύθυνση της αντιμικροβιακής δράσης αλλά προς την προώθηση της ανάπτυξης τόσο του μυκηλίου όσο και των παραγόμενων κονιδίων. Υπήρξαν δε περιπτώσεις όπου η παραγωγή των κονιδίων διαπιστώθηκε τριπλάσια σε σχέση με το μάρτυρα. Η αλληλεπίδραση στη βιολογική δράση μεταξύ του πτητικού κλάσματος και των υδατοδιαλυτών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα εκτιμήθηκε μέσω του υπολογισμού δεικτών συνέργειας. Η χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έδειξε πλήθος φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών κι επιβεβαίωσε την παρουσία του ροσμαρινικού οξέος στο σύνολο των εκχυλισμάτων. Το ροσμαρινικό οξύ, στις συγκεντρώσεις που βρέθηκε στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν έδειξε να σχετίζεται ισχυρά με την ενίσχυση της κονιδιογένεσης στην *A. alternata*.

Η παρατηρούμενη αντίδραση των μυκήτων στην έκθεσή τους στα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών, ενδεχόμενα οφείλεται σε ενεργοποίηση βιολογικών τους μηχανισμών έναντι στο στρες που υπέστηκαν προκειμένου να μπορέσουν να προσαρμοστούν στις χημικές αλλαγές του περιβάλλοντος ανάπτυξής τους. Επιπλέον, τα βιοδραστικά μόρια που περιέχονται στα φυτικά εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν πιθανόν ενεργοποίησαν μοριακούς μηχανισμούς στα κύτταρα των μυκήτων που επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων κι οδηγούν στην ενίσχυση της ανάπτυξης του μυκηλίου και της κονιδιογένεσης.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπερέυθρου FT-IR και η χημειομετρία για να αξιολογηθούν και να ερμηνευθούν οι αλλαγές που παρατηρούνται στη δομική-βιοχημική σύσταση των κυττάρων του φυτοπαθογόνου μύκητα *A. alternata* υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Τα φάσματα FT-IR των μυκήτων περιέχουν πληροφορίες για τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης όσο και του κυτταροπλάσματος. Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών των φασμάτων FT-IR του φυτοπαθογόνου μύκητα *A. alternata* κατέδειξε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που δοκιμάστηκαν σε αυτόν επηρέασαν σημαντικά τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και τις πρωτεΐνες. Επίσης, οι παρατηρούμενες βιοχημικές αλλαγές ήταν διακριτά διαφορετικές για κάθε εκχύλισμα που δοκιμάστηκε όπως προέκυψε

από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών. Η επεξεργασία των φασμάτων έδωσε επιπλέον την πληροφορία, ότι υφίσταται πολύ ισχυρή συσχέτιση της αύξησης του μυκηλίου με το λόγο του εμβαδού των κορυφών που αντιστοιχούν στα λιπίδια/αμίδιο II ( $R^2$ : 0.92-0.98), αμίδιο I/σύνολο αμιδίων ( $R^2$ :0.88-0.96) και αμίδιο II/σύνολο αμιδίων ( $R^2$ : 0.91-0.96). Το προαναφερόμενο εύρημα, το οποίο καταγράφηκε και δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, δίνει τη δυνατότητα χρήσης της φασματοσκοπίας υπερύθρου σε μικροβιολογικές εφαρμογές.

Το φαινόμενο της ενίσχυσης της ανάπτυξης συγκεκριμένων ειδών μυκήτων υπό την επίδραση βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, που καταγράφηκε από την παρούσα διατριβή, μπορεί να αξιοποιηθεί ευρύτατα σε βιοτεχνολογικές καινοτόμες δράσεις. Τα βιοδραστικά μόρια τα οποία είναι ικανά να ενισχύσουν και να προωθήσουν την ανάπτυξη ωφέλιμων μικροοργανισμών, και ιδιαίτερα μυκήτων, αναμένεται να τύχουν μεγάλης προσοχής το επόμενο διάστημα στον τομέα του βιολογικού ελέγχου των ασθενειών σε καλλιέργειες. Για το λόγο αυτό, χρειάζεται περαιτέρω εμβάθυνση σε μοριακό επίπεδο της δράσης που ανιχνεύθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, και αφορά στα μονοπάτια έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την κονιδιογένεση της *A. alternata*, καθώς και του πιθανού ρόλου που διαδραματίζει το ροσμαρινικό οξύ σε αυτή τη διαδικασία.

Όλα τα εκχυλίσματα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που δοκιμάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης στο φυτοπαθολόγο στέλεχος *A. flavus* έδειξαν να έχουν επίδραση σε παραμέτρους τόσο της ανάπτυξης του μύκητα όσο και της παραγωγής αφλατοξινών από αυτόν. Η διερεύνηση της μηχανισμού επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στον *A. flavus* με μοριακές μεθόδους και συγκεκριμένα με Real-Time PCR, κατέδειξε ότι τα εκχυλίσματα μπορούν και παρεμβαίνουν στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* και του βιοσυνθετικού γονιδίου *Nor-1* που ρυθμίζουν την παραγωγή αφλατοξίνης από τον μύκητα. Ο βαθμός παρέμβασης είναι διαφορετικός για κάθε εκχύλισμα γι' αυτό και διαφέρουν τα αποτελέσματα που έχει καθένα το από αυτά στη συγκέντρωση των αφλατοξινών στο τέλος κάθε βιοδοκιμής.

Την πλέον ενδιαφέρουσα επίδραση για την αξιοποίηση των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών από τον τομέα της βιοτεχνολογίας και της τεχνολογίας τροφίμων, την εμφάνισε το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*), το οποίο αν και δεν έδωσε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *A. flavus* περιορίσε σε πολύ σημαντικό βαθμό την παραγωγή αφλατοξίνης. Ο περιορισμός στην παραγωγή



αφλατοξίνης υπό την επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων ελέγχθηκε τόσο ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε *in-vitro* βιοδοκιμές όσο και ποσοτικά με ELISA σε *in-vivo* βιοδοκιμές σε καρπούς κελυφωτής φιστικιάς (*Pistacia vera*). Τα φιστίκια Αιγίνης είναι πολύ ευαίσθητα στη μόλυνση με *A. flavus* και με αφλατοξίνες και η ανάπτυξη μεθόδων αντιμετώπισης των μυκοτιξινών κρίνεται επιτακτική.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι εξαιρετικά ενθαρρυντικά για την ενδεχόμενη αξιοποίηση των εκχυλισμάτων του μελισσόχορτου *M. officinalis* στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξινών μετασυλλεκτικά σε τρόφιμα. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης ενός μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων υδατικών εκχυλισμάτων μελισσόχορτου στην παραγωγή αφλατοξινών από τον *A. flavus*, καθώς και διεξαγωγή *in-vivo* δοκιμών σε μεγάλη ποικιλία ειδών πέραν της *P. vera* προκειμένου να καταδειχθεί η αποτελεσματικότητά του ως αντιαφλατοξικογόνος παράγοντας ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στα τρόφιμα.

Τα υδατικά εκχυλίσματα των αυτοφυών και καλλιεργούμενων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που εξετάστηκαν είναι πολύ φθηνά στην παραγωγή τους και περιέχουν βιοδραστικά μόρια ικανά να παρεμβαίνουν σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων στους οργανισμούς στόχους που εξετάστηκαν. Η δυνατότητα αυτή εάν μελετηθεί περαιτέρω μπορεί να διευρύνει κατά πολύ τους ορίζοντες αξιοποίησης των αρωματικών φυτών τόσο από τη βιομηχανία τροφίμων με χρήση τους ως αντιαφλατοξικογόνα όσο και από τη βιολογική γεωργία στην βιολογική καταπολέμηση ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες.

## Βιβλιογραφία

- Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G., 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* 16 (9), 7672-7690.
- Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Liu, D., Narasimhan, M.I., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., Bressam, R.A., 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* 118 (1), 11-23.
- Abou-Jawdah, Y., Wardan, R., Sobh, H., Salameh, A., 2004. Antifungal activities of extracts from selected Lebanese wild plants against plant pathogenic fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 43 (3), 377-386.
- Adrio, J.L., Demain, A.L., 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6, (3), 191-199.
- Adzu, B., Amos, S., Dzarma, S., Wambebe, C., Gamaniel, K., 2002. Effect of zizyphusspina-christi wild aqueous extract on the central nervous system in mice. *J. Ethnopharmacol.* 79, 13-16.
- Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* 32, 31-36.
- Agiomyriganaki, A., Dais, P., 2012. Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by 31P NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 50, 739-748.
- Akhondzadeh, S., Nooroonian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A.H., Khani, M., 2003a. *Melissa officinalis* extract in the treatment of patient with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 74, 863-866.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A.H., Khani, M., 2003b. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's Disease: a double blind, randomized and placebocontrolled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 28, 53-59.
- Akhondzadeh, S., Fallah Pour, H., Afkham, K., Jamshidi, A., Khalighi-Cigarodi, F., 2004. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial. *J Ethnopharmacol.* 97, 281-284.
- Alarcón, E., Campos, A.M., Edwards, A.M., Lissi, E., López-Alarcón, C., 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem.* 107, 1114-1119.
- Albanes, D., Heinonen, O.P., Huttunen, J.K., Taylor, P.R., Virtamo, J., Edwards, B.K., Haapakoski, J., Rautalahti, M., Hartman, A.M., Palmgren, J., *et al.*, 1995. Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1427S-1430S.
- Al-Bayati, F.A., 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinellaanisum* essential oils and methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.* 116, 403-406
- Alizadeh, H., Leung, D.W.M., Cole, A.L.J., 2011. Conidiogenic effects of mannose-binding lectins isolated from cotyledons of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) on *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* 72, 94-99.
- Alma, M.H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., Hirata, T., 2003. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1725-1729.
- Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., Gordon, M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108, 55-63.

- Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Cavinato, A.G., Rasco, B.A., 2006. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 111 (1), 73-80.
- Al-Saad, L.A., Al-Badran, A.I., Al-Jumayli, S.A., Magan, N., Rodriguez, A., 2016. Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus* under different environmental and nutritional regimes. *International Journal of Food Microbiology* 217, 123-129.
- Alvarado, C., Álvarez, P., Puerto, M., Gausserès, N., Jiménez, L., De la Fuente, M., 2006. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 22, 767-777.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V., Martins, A., Pintado, M., 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 346–357.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7915–7922.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L., Bompeix, G., 2008. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 13–19.
- An, L.J., Guan, S., Shi, G.F., Bao, Y.M., Duan, Y.L., Jiang, B., 2006. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology* 44, 436–443.
- Anderson, T.D., Zhu, K.Y., 2004. Synergistic and antagonistic effects of atrazine on the toxicity of organophosphorodithioate and organophosphorothioate insecticides to Chironomus tentans (Diptera: Chironomidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 80, (54-64).
- Anthony, A., Caldwell, G., Hutt, A.G., Smith, R.L., 1987. Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. *Food Chem. Toxicol.*, 25, 799–806
- APHA-AWWA-WEF, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19<sup>th</sup> Ed. Washington D.C.
- Arceusz, A., Wesolowski, M., 2013. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantification of selected phenolic acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 83, 215-220.
- Argyropoulou, C., Papadatou, M., Gregoriades, C., Maloupa, E., Skaltsa, H., 2009. Carvacrol content of cultivated in North Greece *Origanum dictamnus* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 12.
- Armstrong, G.M., and Armstrong, J.K., 1981. Formae Speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. *Fusarium diseases biology and taxonomy*. Pages 91-399 in: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook, eds. Pennsylvania State University Press, University Park. 457 pp.
- Armstrong, J.S., 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253-260.
- Armstrong, D. (Ed), 1998. Free radical and antioxidant protocols, Vol 108 of *Methods in Molecular Biology*. Humanna Press, Totowa, NJ.
- Arnal-Schnebelen, B., Hadji-Minaglou, F., Peroteau, J.F., Ribeyre, F., de Billerbeck, V.G., 2004. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *Int. J. Aromather.* 14, 192–197.
- Ashidate, K., Kawamura, M., Mimura, D., Tohda, H., Miyazaki, S., Teramoto, T. *et al.*, 2005. Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *European Journal of Pharmacology* 513, 173–179.

- Ashworth, J., Nijenhuis, E., Glowacka, B., Tran, L., Schenk-Watt, L., 2010. Turbidity and Color Correction in the Microtox™ Bioassay. *The Open Environmental Pollution & Toxicology J.* 2, 1-7.
- Atsumi, T., Murakami, Y., Shibuya, K., Tonosaki, K., Fujisawa, S., 2005. Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression, by curcumin and its analog, alpha-diisoeugenol. *Anticancer Res.* 25, 4029–4036.
- Atehnkeng, J., Donner, M., Ojiambo, P.S., Ikotun, B., Augusto, J., Cotty, P.J. & Bandyopadhyay, R. 2016. Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*. *Microbial Biotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 75-88.
- Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A.R., Morlière, P., 1990. Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochem. Photobiol. B* 7, 209–229.
- Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hanif, S., Hadi, S.M., 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* 580, 533–538.
- AZUR, 1997. *Microtox Manual*. Azur Environmental (formerly Microbics Corporation), vol. 1-4. 2232 Rutherford Road, Carlsbad, CA.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I., 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11 (1), 98-107.
- Backhaus, T., Grimme, L.H., 1999. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 38 (14), 3291-3301.
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat. Toxicol.* 49, 49-61.
- Baden, C., 1991. *Sideritis* L., in: Strid, A., Tan, K., (ed) *Mountain Flora of Greece*. Vol. 2., 84-91. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK.
- Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S.K., Prakash, D., 2005. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int. J. FoodSci. Nutr.* 56 (4), 287-291.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D., Idaomar, M., 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutat. Res.* 606, 27–38.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology.* 46 (2), 446–475.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C.C., Preston, C.A., 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking Trees" in the genomics era. *Science* 311 (5762), 812-815.
- Barbarin, A., Jenkins, N., Rajotte, E., Thomas, M., 2012. A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. *Journal of Invertebrate Pathology* 111, 82-85.
- Barbehenn, R., Cheek, S., Gasperut, A., Lister, E., Maben, R., 2005. Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 31, 969–988.
- Barros, L., Calhelha, R.C., Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Estevinho, L.M., 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology* 225 (2), 151-156.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., 2011. From famine plants to tasty and fragrant spices: Three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal). *LWT – Food Sci. Technol.* 44, 543-548.

- Barros, L., Duenas, M., Diaz, M., Sousa, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I., 2013. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. Food Chemistry 136, 1-8.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D., Vuotto, M.L., 2006. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. J. Ethnopharmacol. 107, 240–248.
- Bassole, H., Juliani, H., 2012. Essential oils in combination to their antimicrobial properties. Molecules 17, 3989-4006.
- Bathaie, S.Z., Mousavi, S.Z., 2010. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 50, 761–786.
- Beekes, M., Lasch, P., Naumann, D., 2007. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FTIR) spectroscopy in microbiology and prion research. Veterinary Microbiology 123 (4), 305-319.
- Beiranvand, S.P., Beiranvand, N.S., Moghadam, Z.B., Birjandi, M., Azhari, S., Rezaei, E., Salehnia, A.N., Beiranvand, S., 2015. The effect of *Crocus sativus* (saffron) on the severity of premenstrual syndrome. European Journal of Integrative Medicine. In Press.
- Belton, P.S., Kemsley, E.K., McCann, M.C., Ttofis, S., Wilson, R.H., Delgado, I., 1995. The identification of vegetable matter using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Food Chemistry 54 (4), 437-441.
- Ben-Jabeur, M., Ghabri, E., Myriam, M., Hamada, W., 2015. Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and *Fusarium* wilt. Plant Physiology and Biochemistry 94, 35–40.
- Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P., 2015. *Asteraceae* species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. Industrial Crops and Products 76, 604-615.
- Betts, T.J., 2001. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. J. Chromatogr. A 936, 33–46.
- Bhandari, P.R., 2015. *Crocus sativus* L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. Journal of Traditional and Complementary Medicine 5 (2), 81-87.
- Bhargava, V.K., 2011. Medical uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* Linn (Saffron). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3 (3), 21-26.
- Bhatnagar, M., Kapur, K.K., Jalees, S., Sharma, S.K., 1993. Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum sanctum* L. plants, essential oils and their major constituents against vector mosquito species. J. Entom. Res. 17, 21–26.
- Bijur, G.N., Ariza, M.E., Hitchcock, C.L., Williams, M.V., 1997. Antimutagenic and promutagenic activity of ascorbic acid during oxidative stress. Environ. Mol. Mutagen. 30, 339–345.
- Birks, J., 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst. Rev. (1).
- Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol. Therap. 90, 157–177.
- Blaise, C., 1998. Microbiotesting: An expanding field in aquatic toxicology. Ecotoxicology and environmental Safety 40 (1-2), 115-119.
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., Ningali, P., 2010. Fruit and vegetable antioxidants in health, in: Watson, R., Preedy, V. (Eds), Bioactive foods in promoting health – fruits and vegetables. Academic Press, Massachusetts, pp. 37-58.
- Blumenthal, M. (ed.), 2000. Sage leaf. Herbal Medicine expanded Commission E Monographs, 330-334, American Botanical Council, Austin.
- Bok, J.W. and Keller, N.P., 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *aspergillus* spp. Eukaryotic Cell 3 (2), 527-535.
- Bolhassani, A., Khavaria, A., Bathaieb, S.Z., 2014. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1845 (1), 20-30.

- Bolkent, S., Yanardag, R., Karabulut-Bulan, O., Yesilyaprak, B., 2005. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. *Ethnopharmacol.* 14, 391-8.
- Bosch, A., Golowezye, M.A., Abraham, A.G., Garrote, G.I., De Antonie, G.I., Yantorno, O., 2006. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol.*
- Botsford, J.L., 2002. A comparison of ecotoxicological tests. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* 30 (5), 539-550.
- Bouchagier, P., Efthimiadou, A., Katsileros, A., Bilalis, D., Efthimiadis, P., 2008. Adverse effect of Bermudagrass on physiological and growth components of cotton. *Journal of Agronomy* 7 (1), 49-55.
- Bouchagier, P., Efthimiadis P., 2010. Allelopathic susceptibility of cotton to bermudagrass. *J. Agron.* 9 (1), 23-28.
- Bowles, E.J., 2003. *Chemistry of Aromatherapeutic Oils*. Allen & Unwin, Crows Nest, Australia.
- Boyras, N., Özcan, M., 2005. Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* 76, 661–665.
- Branan, N., Wells, T.A., 2007. Microorganism characterization using ATR-FTIR on an ultrathin polystyrene layer. *Vibrational Spectroscopy* 44 (1), 192-196.
- Bronzetti, G., Della Croce, C., Galli, A., 1992. Antimutagenicity in yeast. *Mutat. Res.* 267, 193–200.
- Buhagiar, J.A., Podesta, M.T., Wilson, A.P., Micallef, M.J., Ali, S., 1999. The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulate*. *Anticancer Res.* 19, 5435–5444.
- Bulich, A., Tung, K., Scheibner, G., 1990. The luminescent bacteria toxicity test: its potential as an in vitro alternative. *J. Biolumin. Chemilumin.* 5, 71-77.
- Burfield, T., Reekie, S.L., 2005. Mosquitoes, malaria and essential oils. *Inter. J. Aromather.* 15, 30–41.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Burton, S.A., Petersen R.V., Dickman, S.N., Nelson, J.R., 1986. Comparison of *in vitro* bacterial bioluminescence and tissue culture bioassays and *in vivo* tests for evaluating acute toxicity of biomaterials. *J. of Biomedical Material Resources* 20, 827-837.
- Butt, M.S., Sultan, M.T., 2011. Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51 (4), 363–373.
- Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., Abdullaev, F.I., 2007. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry* 100, 1126-1131.
- Cabral, L.C., Pinto, V.F., Patriarca, A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 166 (1), 1–14.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E., 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 245–256.
- Calabrese, E.J., 2002. Hormesis: changing view of the dose – response, a personal account of the history and current status. *Mutation Research* 511, 181 – 189.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3), 447-459.
- Calvo, A.M., 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 45 (7), 1053-1061.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 87, 215–220.
- Caniova, A., & Brandsterova, E., 2001. HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 24, 2647-2659.

- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749–760.
- Cardinali, G., Rellini, P., Pelliccia, C., Antonielli, L., Fatichenti, F., 2008. MMS: A “R” Package for Metabolomic Markers Search in Stress Response Studies. *The Open Applied Informatics Journal* 2, 1–8.
- Carlile, M., Watkinson, S., Gooday, G., 2001. *The Fungi*. (2nd Edition) Academic Press, New York.
- Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J., 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 72, 301–305.
- Carnesecchi, S., Bras-Gonçalves, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gossé, F., Poupon, M.F., Raul, F., 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.* 215, 53–59.
- Carrió, E., Vallès, J., 2012. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *J. Ethnopharmacol.* 141, 1021–1040.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 50–62.
- Carvalho Costa, D., Costa, H.S., Gonçalves Albuquerque, T., Ramos, F., Castilho, M.C., Sanches-Silva, A., 2015. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology* 45 (2), 336–354.
- Carvalho de Sousa, A., Sales Alviano, D., Fitzgerald Blank, A., Barreto Alves, P., Sales Alviano, C., Rocha Gattass, C., 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 677–681.
- Castilho, P., Savluchinske-Feio, S., Weinhold, T., Gouveia, S., 2012. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira island, Portugal. *Food Control* 23, 552–558.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Goncalves, M.J., Salgueiro, L., 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1333–1338
- Chaiyasit, D., Choochote, W., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., Chaiwong, P., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Riyong, D., Pitasawat, B., 2006. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitol. Res.* 99, 715–721.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Chong, K.L., Tan, J.B.L., Wong, S.K., 2010. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *J. Food Compos. Anal.* 23, 185–189.
- Chandler, D., Davidson, G., Grant, W.P., Greaves, J., Tatchell, G.M., 2008. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends in Food Science and Technology* 19 (5), 275–283.
- Chang, G., Bhatnagar, D., Cleveland, T., 2000. *Aspergillus* – introduction. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, San Diego. pp. 62–71.
- Chang, M.Y., Shen, Y.L., 2014. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. *Molecules* 19, 6694–6706.
- Chapin III, F.S., Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., Hooper, D.U., Lavorel, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E., Mack, M.C., Díaz, S., 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405 (6783), 234–242.
- Chapman, P.M., 2002. Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *The science of the total environment* 288, 131 – 140.
- Chatzopoulou, A., Karioti, A., Gousiadou, C., V.L., Vivancos, P., Kyriazopoulos, S., Golegou, H., Skaltsa, 2010. Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their *in Vitro* antimicrobial activity in clinical strains. *Agric. Food Chem.*, 58(10), 6064–6068.

- Chen, J.H., Ho, C.-T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45 (7), 2374–2378.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Chow, J.M., Ko, C.H., Tseng, S.W., 2004. Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.* 25, 661–670.
- Cheng, S.S., Chang, H.T., Wu, C.L., Chang, S.T., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresour. Technol.* 98, 456–459.
- Chiriboga, L., Xie, P., Yee, H., Vigorita, V., Zarou, D., Zakim, D., Diem, M., 1998. Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. *Biospectroscopy* 4 (1), 47-53.
- Chitarrini, G., Nobili, C., Pinzari, F., Antonini, A., De Rossi, P., Del Fiore, A., Procacci, S., *et al.* 2014. Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology* 189 , 1-10.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.-J., Haroutounian, S.A., 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 8261-8267.
- Chun, K.S., Kundu, J., Kundu, J.K., Surh, Y.J., 2014. Targeting Nrf2-Keap1 signaling for chemoprevention of skin carcinogenesis with bioactive phytochemicals. *Toxicology letters* 229 (1), 73-84.
- Chun, S.-S., *et al.*, 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* 40, 809-816.
- Clark, S.F., 2002. The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutr. Clin. Pract.* 17, 5–17.
- Clifford, M.N., Scalbert, A., 2000. Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1118–1125.
- Collins, A.R., 2005. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *Eur. J. Cancer* 41, 1923–1930.
- Conforti, F., Ioele, G., Statti, G.A., Marrelli, M., Ragno, G., Menichini, F., 2008a. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3325-3332.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Loggia, R.D., 2008b. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology* 116 (1), 144–151.
- Corte, L., Rellini, P., Roscini, L., Fatichenti, F., Cardinali, G., 2010. Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study. *Analytica Chimica Acta* 659 (1-2), 258-265.
- Cotou, E., Papathanassiou, E., Tsangaris, C., 2002. Assessing the quality of marine coastal environments: comparison of scope for growth and Microtox® bioassay results of pollution gradient areas in eastern Mediterranean (Greece). *Environ. Pollut.* 119, 141-149.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4), 564–582.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000), pp. 170–175.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites), in: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists.
- Crowell, P.L., 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.* 129, 775S–778S.
- Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard H., 1994. Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (3), 665-669.



- Cuvelier, M.-E., Richard, H., Berset, C., 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of American Oil Chemists' Society* 73, 645-652.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Petreska Stanoeva, J., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., Kulevanova, S., 2013. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assesment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A* 1282, 38-45.
- Czarnecka, A.M., Golik, P., Bartnik, E., 2006. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J. Appl. Genet.* 47, 67–78.
- Czech, B., Joško, I., Oleszczuk, P., 2014. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicology and Environmental safety* 104 (1), 247-253.
- Daferera, D., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2576-2581.
- Daferera, D., Tarantilis, P., Polissiou, M., 2002. Characterization of essential oils of Lamiaceae species by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5503-5507.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22, 39-44.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.
- Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Oinonen, P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LTW* 41, 391-400.
- De Flora, S., Camoirano, A., D'Agostini, F., Balansky, R., 1992. Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. *Mutat. Res.* 267, 183–192.
- De Logu, A., Loy, G., Pellerano, M.L., Bonsignore, L., Schivo, M.L., 2000. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antivir. Res.* 48, 177–185.
- De Sousa, A.C., Alviano, D.S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano, C.S., Gattas, C.R., 2004. *Melissa officinalis* L. Essential oil: Antitumoral and antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.* 52 (9), 2485-2489.
- De Sousa, L.L., de Andrade, S.C.A., Athayde, A.J.A.A., de Oliveira, C.E.V., de Sales, C.V., Madruga, M.S., de Souza, E.L., 2013. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology* 165, 312-318.
- Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M., Tawata, S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control* 19, 346–352.
- Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Romagnolo, D.F., 2009. Health benefits of traditional culinary of Medicinal Mediteranean Plants, in: Watson, R., (Ed), *Complementary and alternative therapies of the aging population*. Academic Publishing, Massachusetts, pp. 541-562.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101–109.
- De-Oliveira, A.C.A.X., Fidalgo-Neto, A.A., Paumgarten, F.J.R., 1999. *In vitro* inhibition of liver monooxygenases by  $\beta$ -ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol. *Toxicology* 135, 33–41.

- Desprez-Loustau, M.L., Robin, C., Buée, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Sache, I., Rizzo, D.M., 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (9), 472-480.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2745–2749.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4863–4870
- Diapoulis, C., 1980. Prehistoric Plants of the Islands of the Aegean Sea, Sea Daffodils (*Pancreatium maritimum*), Thera and the Aegean World II, London. 129-139.
- Dias Ferreira, F., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C.C., da Costa, C.L., Mallmann, C.A., Janeiro, V., Dias Ferreira, F.M., Mossini, S.A.G., Silva, E.L., Machinski Jr., M., 2013. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry* 136 (2), 789–793.
- Dicke, M., De Boer, J.G., Höfte, M., Rocha-Granados, M.C., 2003. Mixed blends of herbivore-induced plant volatiles and foraging success of carnivorous arthropods. *Oikos* 101 (1), 38–48
- Diekman, M.A. and Green, M.L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* 70 (5), 1615-1627.
- Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S., Klich, M.A., 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 25, 249-270.
- Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageot, C., Combe, C., Ferret, P.J., 2006. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol. in vitro* 20, 480–489.
- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F., Sahin, F., 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *International Journal of Food Microbiology* 124, 179-182.
- dos Santos Oliveira, M., Badiale Furlong, E., 2008. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal* 1, 139–146.
- dos Santos-Neto, L.L., de Vilhena Toledo, M.A., Medeiros-Souza, P., de Souza, G.A., 2006. The use of herbal medicine in Alzheimer's disease-a systematic Review, *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 3, 441- 445.
- Dovbeshko, G.I., Gridina, N.Y., Kruglova, E.B., Pashchuk, O.P., 2000. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta* 53 (1), 233-246.
- Duarte, M.C., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305–311.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R., 2005. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med.* 71, (2005), 484–488
- Duschatzky, C.B., Possetto, M.L., Talarico, L.B., Garcia, C.C., Michis, F., Almeida, N.V., De Lampasona, M.P., Schuff, C., Damonte, E.B., 2005. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antivir. Chem. Chemother.* 16, 247–251.
- Dweck, A., 2000. The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species, in: Kintzios, S. (Ed), *Sage the genus Salvia*, 1-25, Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Dzamic, A.M., Socovic, M.D., Novakovic, M., Jadranin, M., Ristic, M.S., Tesevic, V., Marin, P.D., 2013. Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *Pilifer* (Pant.) Murb essential oil and deodorized extracts. *Industrial Crops and Products* 51, 401-407.
- Eckel, R., Huo, H., Guan, H.-W., Hu, X., Che, X., Huang, W.-D., 2001. Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. *Vibrational Spectroscopy* 27 (2), 165-173.

- Economakis, C.D., 1993. Effect of potassium on growth and yield of *Origanum dictamnus* L. in solution culture. *Acta Horticulturae* 331, 339-344.
- Economakis, C.D., Skaltsa, H., Demetzos, C., Sokovic, M., Thanos, C.A., 2002. Effect of phosphorus concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves and bracts of *Origanum dictamnus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22), 6276-6280.
- Economakis, C., Karioti, A., Skaltsa, H., Perdetzoglou, D., Demetzos, C., 2005. Effect of solution conductivity on the volatile constituents of *Origanum dictamnus* L. in nutrient film culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1656-1660.
- Endo, E.H., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res. Microbiol.* 161, 534-540.
- Engels, G., 2011. Sage. *HerbalGram* 89, 1-4.
- Erukhimovitch, V., Tsrur, L., Hazanovsky, M., Talyshinsky, M., Mukmanov, I., Souprun, Y., Huleihel, M., 2005. Identification of fungal phyto-pathogens by Fourier-transform infrared (FTIR) microscopy. *Journal of Agricultural Technology* 1 (1), 145-152.
- Escribano, J., Alonso, G.L., Coca-Prados, M., Fernandez, J.A., 1996. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Letters* 100, 23-30.
- European Medicines Agency (EMA). Community Herbal Monograph on *Salvia officinalis* L., Folium. London (2009). Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2010/02/WC500070852.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2010/02/WC500070852.pdf).
- Fang, J.Y., Lee, W.R., Shen, S.C., Huang, Y.L., 2006. Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. *J. Dermatol. Sci.* 42, 101-109.
- Farre, M., Kloter, G., Petrovic, M., Alonso, M.C., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., 2002. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Analytica Chimica Acta*, 456, 19-30.
- Fathiazad, F., Mazandarani, M., Hamedeyazdan, S., 2011. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Adv Pharm Bull.* 1 (2), 63-67.
- Feng, W., Zheng, X., 2006. Control of *Alternaria alternata* by cassia oil in combination with potassium chloride or sodium chloride. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1317-1322.
- Feng, W., Zheng, X., 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*, 18, 1126-1130.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 198, 147-159.
- Fernandes, R., Heywood, V.H., 1972, in: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), *Flora Europaea*, vol. III, 32-9. Cambridge University Press.
- Ferreira, F.D., Mossini, S.A.G., Ferreira, F.M.D., Arrotéia, C.C., Da Costa, C.L., Nakamura, C.V., Machinski Junior, M., 2013. The inhibitory effects of *Curcuma longa* L. essential oil and curcumin on *Aspergillus flavus* link growth and morphology. *The Scientific World Journal* 2013.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V., 1997. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16, 1543-1560.
- Firon, A., d'Enfert, C., 2002. Identifying essential genes in fungal pathogens of humans. *Trends in Microbiology* 10, 456-462.
- Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W, 2006. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 64 (1), 63-77.

- Fogliata, G.M., Torres, L.G.J., Ploper, L.D., 2001. Detection of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. in citrus packing houses of Tucumán Province (Argentina) and their behaviour against current employed and alternative fungicides. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 77, 71–75.
- Franco, C., Morais, L., Quintans-Junior, L., Almeida, R., Antonioli, A., 2005. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sidacordifolia* L. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 98, 275-279.
- Franzios, G., Mirotsoy, M., HatziaPOSTOLOY, E., Kral, J., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2690–2694.
- Fuentealba, A., Bauce, É., 2016. Interspecific variation in resistance of two host tree species to spruce budworm. *Acta Oecologica* 70, 10–20.
- Fujioka, N., Morimoto, Y., Arai, T., Kikuchi, M., 2004. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Detection and Prevention* 28 (1), 32-36.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H., 2002. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177, 39–54.
- Fulladosa, E., Murat, J.C., Martínez, M., Villaescusa, I., 2004. Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46 (2), 176-182.
- Fulladosa, E., Murat, J.C., Villaescusa, I., 2005. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 58, 551-557.
- Fung, D.Y.C., Taylor, S., Kahan, J., 1977. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxitoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety* 1, 39–51.
- Fung, M.F.K., Senterman, M.K., Mikhael, N.Z., Lacelle, S., Wong, P.T.T., 1996. Pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium. *Biospectroscopy* 2 (3), 155-165.
- Gadd, C.J., in: *The dynasty of Agade and the Guitan invasion*. Edwards I.E.S, Gass C.J, Hammand N.G.L., editors. Cambridge: Cambridge University Press; 1971. Pp.417-463
- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J., 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177, 91–104.
- Galati, G., O'Brien, P.J., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 287–303.
- Gao, H., Beckman, C.H., Mueller, W.C., 1995. The rate of vascular colonization as a measure of genotypic interaction between various cultivars of tomato and various formae or races of *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 4 (1), 29-43.
- Garcia-Olmo, D.C., Riese, H.H., Escribano, J., Ontanon, J., Fernandez, J.A., Atienzar, M., *et al.* 1999. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): An experimental study in the rat. *Nutrition and Cancer*, 35 (2), 120-126.
- Georgianna, D.R. and Payne, G.A., 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 46 (2), 113-125.
- Geromichalos, G.D., Papadopoulos, T., Sahpazidou, D., Sinakos, Z., 2014. Safranal, a *Crocus sativus* L constituent suppresses the growth of K-562 cells of chronic myelogenous leukemia. *In silico and in vitro* study. *Food Chem Toxicol* 74C, 45-50.
- Ghavami, G., Sardari, S., Shokrgozar, M., 2011. Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistance tumor cells-ACHN and A2780/CP cell lines. *Comput. Biol. Med.* 41, 665-674.

- Gheisari, H.R., Amiri, F., Zolghadri, Y., 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of Iranian Bael (*AegleMarmelos*) fruit against some food pathogens. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 3, 85-88.
- Goodacre, R., Timmins, E.M., Rooney, P.J., Rowland, J.J., Kell, D.B., 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectans – absorbans Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Fems microbial. Lett.* 140, 233-239.
- Gordon, T.R., Martyn, R.D., 1997. The evolutionary Biology of *Fusarium*. *Annual Review of Phytopathology* 35(1), 111-128.
- Gordon, T.R., Okamoto, D., Jacobson, D.J., 1989. Colonization of muskmelon and monhost crops by *fusarium oxysporum* sp. Melonis and other species of *Fusarium*. *Phytopathology* 79: 1095-1100.
- Gorran, A., Farzanehb, M., Shivazada, M., Rezaeianc, M., Ghassempourd, A., 2013. Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). *Food Control* 31 (1), 218–223.
- Grupta, N., Grupta, S., Mahmood, A., 2007. Gallic acid inhibits brush border disaccharides in mammalian intestine. *Nutrition Research* 27, 230–235.
- Guba, R., 2001. Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential. *Int. J. Aromather.* 11, 76–83.
- Gülçin, İ., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217 (2–3), 213–220.
- Guleria, S., Kumar, A., Tiku, A.K., 2008. Chemical composition and fungitoxic activity of essential oil of *Thuja orientalis* L. grown in the north-western Himalaya. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 63, (3-4), 211-214.
- Guleria, S., Tiku, A.K., Gupta, S., Singh, G., Koul, A., Razdan, V.K., 2012. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of *Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21, 44–50.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine* 27 (1), 1-93.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R., 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 194–198.
- Güvenç, A., Okada, Y., Akkol, E.K., Duman, H., Okuyama, T., Çaliş, I., 2010. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chemistry* 118 (3), 686-692.
- Hall, S., Desbrow, B., Anoopkumar, Dukie, S., Davey, A.K., Arora, D., McDermott, C., Schubert, M.M., Perkins, A.V., Kiefel, M.J., Grant, G.D., 2015. A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Research International* 76, (3), 626–636.
- Hamilton, A.C., 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity and Conservation* 13 (8), 1477-1517.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2002. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 195–199.
- Hanlidou, E., Karousou, R., Kleftoyanni, V., Kokkini, S., 2004. The herbal market of Thessaloniki (N. Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *Journal of Ethnopharmacology* 91 (2-3), 281-299.
- Harbone, J.B., 1998 *in* *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis.* Chapman & Hall, 3<sup>rd</sup> edition.
- Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., de Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O., Upson, T., 2004. Labiatae in: Kadereit, J.W. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Lamiales*, vol. VII. 167-282. Springer, Berlin.

- Harris, R., 2002. Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int. J. Aromather.* 12, 83–91.
- Hata, T., Sakaguchi, I., Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., Watabe, K., 2003. Induction of apoptosis by *Citrus paradisi* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. *In Vivo* 17, 553–559.
- Hatipoglu, G., Sokmen, M., Bektas, E., Daferera, D., Sokmen, A., Demir, E., Sahin, H., 2013. Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. spp. *Angustifolius*. *Industrial Crops and Products* 43, 427–433.
- Hawksworth, D.L., 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95 (6), 641–655.
- Hayashi, K., Kamiya, M., Hayashi, T., 1995. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta Med.* 61, 237–241.
- He, Z.G., Sun, J., Wu, X., Lu, R., Liu, J.F., Wang, Y.J., 2008. Profiling drug membrane permeability and activity via biopartitioning chromatography. *Curr. Drug Metab.* 9, 152–166.
- Hedge, I.C., 1972, *Salvia*, L., in: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A (Eds.), *Flora Europaea III*, 289–290. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Heil, M., Kost, C., 2006. Priming of indirect defences. *Ecology Letters* 9 (7), 813–817.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590–3595.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A. *et al*, 2013. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology* 58, 95–100.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Esteves, A.P., Queiroz, M.J.R.P., 2014. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International* 55, 170–175.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites *versus* parent compounds: A review. *Food Chemistry* 173, 501–513.
- Helm, D., Naumann, D., 1995. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* 126 (1) 75–79.
- Hemaiswarya, S., Doble, M., 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16, 997–1005.
- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martinez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R., 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68, 724–730.
- Hewlett, P.S., Plackett, R.L., 1969. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics* 15, 591–610.
- Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., Gonzalez, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.C., 2004. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* 11, 77–82.
- Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M.F., Quetin-Leclercq, J., 2006. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72, 480–482.
- Hoffmann, C., Christofi, N., 2001. Testing the toxicity of influents to activated sludge plants with the *Vibrio fischeri* bioassay utilising a sludge matrix. *Environ. Toxicol.* 16, 422–427.
- Holley, R.A., Dhaval, P.I., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22, 273–292.
- Homma, M., Oka, K., Yamada, T., Niitsuma, T., Ihto, H., Takahashi, N., 1992. A strategy for discovering biologically active compounds with high probability in traditional Chinese herb remedier: an application of Saiboku-To in bronchial asthma. *Anal. Biochem.* 202, 179–187.

- Hong, E.J., Na, K.J., Choi, I.G., Choi, K.C., Jeung, E.B., 2004. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 863–866.
- Hontanaya, C., Meca, G., Luciano, F.B., Mañes, J., Font, G., 2015. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. *Food Control* 47, 154-160.
- Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M., 2002. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology* 2, 1-8.
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G., Niapoor, M., 2004. Antidepressant effect of *Crocus sativus* L. stigma extracts and their constituents, crocin and safranal, in mice. *Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology* 650, 435-445.
- Houghton, P., 2004. Activity and constituents of Sage relevant to the potential treatment of symptoms of Alzheimer's disease, *HerbalGram*, 61, 49-53.
- Hřebičík, M., Budínová, G., Godarská, T., Vláčil, D., Vogenseh, S.B., Volka, K., 1997. Diffuse-reflectance infrared Fourier transform spectroscopy: New technique of sample preparation (Conference Paper). *Journal of Molecular Structure* 410-411, 527-530.
- Huang, Y., Rogers, T.M., Wenz, M.A., Cavinato, A.G., Mayes, B.M., Bledsoe, G.E., Rasco, B.A., 2001. Detection of sodium chloride in curd salmon roe by SW-NIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4161-4167.
- Hughes, M.M., Carballedo, A., McLoughlin, D.M., Amico, F., Harkin, A., Frodl, T. *et al.*, 2012. Tryptophan depletion in depressed patients occurs independent of kynurenine pathway activation. *Brain Behav. Immun.* 26 (6), 979–987.
- Huleihel, M., Salman, A., Erukhimovitch, V., Ramesh, J., Hammody, Z., Mordechai, S., 2002. Novel spectral method for the study of viral carcinogenesis *in vitro*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 50 (2-3), 111-121.
- Huleihel, M., Pavlov, V., Erukhimovitch, V., 2009. The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96 (1), 17-23.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuglu, M., Husnu Can Baser, K., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chem.* 93, 551–556.
- Iqbal, M., 1993. International trade in non-wood forest products: an overview. FAO, Rome.
- Isenberg, D.L., 1993. The Microtox toxicity test: a developer's commentary, in: Richardson, M., (Ed), *Ecotoxicology Monitoring*. Weinheim, Germany: VCH, 3-15.
- Isidori, M., Parrella, A., Piazza, C.M.L., Strada, R., 2000. Toxicity screening of surface waters in southern Italy with Toxkit microbiotests, in: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W., (Eds) *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, 289-293. Springer US, New York. DOI: 10.1007/978-1-4615-4289-6\_33.
- ISO 11348/1-2-3, 1998. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri*.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M., *et al.* 2010. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33, 983–987.
- Iwai, K., Onodera, A., Matsue, H., 2004. Inhibitory effects of viburnum dilatatum thumb. (Gamazumi) on oxidation and heperglycemia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1002-1007.
- Jacobsen, B.J., Bowen, K.L., Shedly, R.A., Diener, U.L., Kemppainer, B.W., Floyd, J., 1993. *Mycotoxins and Mycotoxicoses*. Alabama A & M and Auburn Universities.

- Jalal, Z., Atki, Y.E., Lyoussi, B., Abdellaoui, A., 2015. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5 (6), 458-461.
- Janicsak, G., Mathe, I., Miklossy-Vari, V., Blunden, G., 1999. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of *Lamiaceae* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 733-738.
- Janina, M.S., 2003. *Melissa officinalis*. *The Int. J. Aromather.* 10, 132-139.
- Jasso de Rodriguez, D., Hernandez-Castillo, D., Angulo-Sanchez, J.L., Rodriguez-Garcia, R., Quintanilla, J.A.V., Lira-Saldivar, R.H., 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. Extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products* 25, 111-116.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem.* 83, 547-550.
- Jayashree, T. and Subramanyam, C., 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine* 29 (10), 981-985.
- Jilkine, K., Gough, K.M., Julian, R., Kaminskyj, S.G.W., 2008. A sensitive method for examining whole-cell biochemical composition in single cells of filamentous fungi using synchrotron FTIR spectromicroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102, (3), 540-546.
- Jimenez Del Rio, M., Velez-Pardo, C., 2004. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an *in vitro* model for neurodegeneration. *Arch. Med. Res.* 35, 185-193.
- Johnson B.T., 2005. Microtox® acute toxicity test, in: Blaise, C., and Ferard, J.-F. (Eds.), *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, Vol. 1. Springer, Netherlands, pp. 69-105
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., Milos, M., 2007. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother. Res.* 21 (3), 259-261.
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T., 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 799, 101-110.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626-631.
- Kachadourian, R., Day, B.J., 2006. Flavonoid-induced glutathione-depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 65-76.
- Kada, T., Shimoi, K., 1987. Desmutagens and bio-antimutagens – their modes of action. *Bioessays* 7, 113-116.
- Kaiser, K.I.E., 1998. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental Health Prospect* 106, 583-591.
- Kalembe, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.
- Kaliora, A., Kogiannou, D., Kefalas, P., Papassideri, I., Kalogeropoulos, N., 2014. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chemistry* 142, 233-241.
- Kalonia, H., Kumar, P., Kumar, A., Nehru, B., 2009. Effect of caffeic acid and rofecoxib and their combination against intraatrial quinolinic acid induced oxidative damage, mitochondrial and histological alterations in rats. *Inflammopharmacology* 17 (4), 211-219.
- Kamdem, J.P., Adeniran, A., Boligon, A.A., Klimaczewski, C.V., Elekofehinti, O.O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuk, E.P., Meinerz, D.F., Athayde, M.L., 2013. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Industrial Crops and Products* 51, 26-34.



- Kaminskyj, S., Jilkine, K., Szeghalmi, A., Gough, K., 2008. High spatial resolution analysis of fungal cell biochemistry - Bridging the analytical gap using synchrotron FTIR spectromicroscopy. *FEMS Microbiology Letters* 284 (1), 1-8.
- Kamnev, A.A., 2008. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling. *Spectroscopy* 22 (2-3), 2008, 83-95.
- Kang, N.J., Lee, K.W., Shin, B.J., Jung, S.K., Hwang, M.K., Bode, A.M., *et al.*, 2009. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 30 (2), 321–330.
- Kansiz, M., Heraud, B., Wood, F., Burden, J., Beardall, D., McNaughton, 1999. Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* 52, 407-411.
- Karanika, M.S., Komaitis, M., Aggelis, G., 2001. Effect of aqueous extracts of some plants of Lamiaceae family on the growth of *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Food Microbiology* 64 (1-2), 175-181.
- Karousou, R., Balta, M., Hanlidou, E., Kokkini, S., 2007. Mints, smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2), 248-257.
- Karousou, R., Deirmentzoglou, S., 2011. The herbal market of Cyprus: Traditional links and cultural exchanges. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (1), 191-203.
- Karpozilos, A., Pavlidis, N., 2004. The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer* 40 (14), 2033-2040.
- Karvelas, M., Katsoyiannis, A., Samara, C., 2002. Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment plant of Thessaloniki. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 3, 194-195.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. *J. Hazard. Mater.* 141, 614-621.
- Kennedy, D.O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E.J., Milne, A., Scholey, A.B., 2006. Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology* 31, 845-852.
- Kianbakht, S., Mozaffari, K., 2009. Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and nondiabetic rats. *Journal of Medicinal Plants* 8 (5), 30-38.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H., 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50 (7), 2161–2168.
- Kim, J. H., J. Yu, N. Mahoney, K. L. Chan, R. J. Molyneux, J. Varga, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, W. C. Nierman, and B. C. Campbell. 2008. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 122 (1-2), 49-60.
- Kim, Y.J., 2007. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30, 1052–1055.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., J.A. Stalpers, 2008. *Dictionary of the fungi*. 10<sup>th</sup> Edition, Wallingford, GB. CABI Publishing.
- Klaassen, C. D., 1986. Distribution, excretion and absorption of toxicants, in: Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J., (Eds.) *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 3rd ed., 33–64. Macmillan Publishing Company, New York.
- Kloog, Y., Cox, A.D., 2004. Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin. Cancer Biol.* 14, 253–261.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* 1, 119–128.

- Kogiannou, D., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M., Kaliora, A., 2013. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical toxicology* 61, 152-159.
- Kohiyama, C.Y., Ribeiro, M.M.Y., Mossini, S.A.G., Bando, E., Bomfim, N.S., Nerilo, S.B., Rocha, G.H.O., Grespan, R., Mikcha, J.M.G., Machinski Jr, M., 2015. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry* 173, 1006-1010.
- Kokkini, S., Karousou, R., Vokou, D., 1994. Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Biochemical systematics and ecology* 22 (5), 517-528.
- Kokkini, S., 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano.
- Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E., 2003. HERBS | Herbs of the Labiatae, in: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, ed. Editor-in-Chief: Benjamin Caballero, 3082-3090. Academic Press, Oxford.
- Komaitis, M.E., Revinthi-Moraiti, K., Evangelatos, G., 1988. The lipid composition of fresh *Origanum dictamnus* leaves. *Food Chemistry* 27 (1), 25-32.
- Kong, W.K., Zhao, Y.L., Shan, L.M., Xiao, X.H., Guo, W.Y., 2008. Thermochemical studies on the quantity-antibacterial effect relationship of four organic acids from *Radix isatidis* on *Escherichia coli* growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 1301–1305.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Kustrak, D., 2005. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm.* 55, 377–385.
- Kostic, D.A., Mitic, S.S., Mitic, M.N., Zarubica, A.R., Velickovic, J.M., Dordevic, A.S., Randelovic, S.S., 2010. Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia. *J. Med. Plants Res.* 4 (17), 1727-1732.
- Kotecha, J., Shah, S., Rathod I., Subbaiah, G., 2007. Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs. *Int. J. Pharmacol.* 333, 127-135.
- Kouninki, H., Haubruge, E., Noudjou, F.E., Lognay, G., Malaisse, F., Ngassoum, M.B., Goudoum, A., Mapongmetsem, P.M., Ngamo, L.S., Hance, T., 2005. Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70, 787–792.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V., 2007. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 155-162.
- Krakauer, T., 2002. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. *Immunotoxicol.* 24 (1), 113–119.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Frohner, C.R., Leal, P.C., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Trybala, E., *et al.*, 2008. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 903–907.
- Kuhn, M.A., Winston, D., 2000. *Herbal therapy and supplements: a scientific and traditional approach*. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Wilkins, pp. 210-212.
- Kulisic, T., Radoni, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85, 633–640
- Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K., Tripathi, Y.B., 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, anti-aflatoxigenic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology* 115, 159–164.

- Kumar, V., Mathela, C.S., Tewari, G., Singh, D., 2014. Antifungal activity of *Nepeta elliptica* Royle ex Benth. Oil and its major constituent (7R)-trans,trans-nepetalactone: A comparative study. *Industrial Crops and Products* 55, 70-74.
- Kungolos, A., Samaras, P., Sakellaropoulos, G.P., 1997. Evaluation of the interactive effect of chemicals on aquatic organisms, using a method based on the theory of probabilities, in: Rajar, R., Brebbia, C.A., (eds.) *Proceedings of the International Conference on Water Pollution IV*, Southampton, UK, 107–114.
- Kvalheim, M., Chan, H., Benzie, I., Szeto, Y., Tzang, A., Mok, D., Chau, F., 2011. Chromatographic profiling and multivariate analysis for screening and quantifying the contributions from individual components to the bioactive signature in natural products. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 107, 98-105.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. *Medical Mycology*. 2<sup>nd</sup> ed., 1992 Philadelphia and London: Lea & Febiger.
- Lai, F., Wissing, S.A., Muller, R.H., Fadda, A.M., 2006. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 7 (1), E10-E18.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A., 1991. Lamiacées médicinales à propriétés antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 66, 185-188.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462.
- Lamiri, A., Lhaloui, S., Benjilali, B., Berrada, M., 2001. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* 71, 9–15.
- Landis, W.G., Yu, M.H., 1999. *Introduction to Environmental Toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. 2nd Ed. Lewis Publishers, Florida.
- Larkin, R., H., DL. and M., Fin, 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathology* 86, 812-819.
- Legal, J.M., Manfait, M., Theophanides, T., 1991. Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria. *Journal of Molecular Structure* 242, 397-407.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Madelmont, J.C., 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* 69, 402–407.
- Li, K.M., Bao, Y.S., Zhang, Z.I., 2015. Allelopathic effects of *Panax notoginseng* plant extracts on germination and seedling growth of soy bean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). *Allelopathy journal* 36 (1), 63-74.
- Licina, B., Stefanovic, O., Vasic, S., Radojevic, I., Dekic, M., Comic, L., 2013. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control* 33, 498-504.
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, L., 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry* 112, 77-83.
- Liolios, C.C., Graikou, K., Skaltsa, E., Chinou, I., 2010. Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 131, 229-241.
- Liu, C.H., Mishra, A.K., Tan, R.X., Tang, C., Yang, H., Shen, Y.F., 2006. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresour. Technol.* 97, 1669–1673.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., Yan, G., 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophyte *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *J. Food Chem.* 105, 548-554.

- López, A., Cortés, F., Gutiérrez Rodilla, B., 2006. Estudios y traducción Dioscorides. Manuscrito de Salamanca. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., Li, J., 2012. *P*-coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25, 550–554.
- Lowe, G.M., Vlismas, K., Young, A.J., 2003. Carotenoids as prooxidants? *Mol. Aspects Med.* 24, 363–369.
- Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., *et al.*, 2010. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European Journal of Pharmacology* 641, 102–107.
- Mabberlay, D. J., 1997. *The Plant Book*, 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Machrafi, Y., Prévost, D., Beauchamp, C.J., 2006. Toxicity of phenolic compounds extracted from bark residues of different ages. *Journal of Chemical Ecology* 32 (12), 2595-2615.
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., *et al.*, 2009. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: Leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.* 24 (1), 27–53.
- Maes, M., 2011. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35 (3), 664-675.
- Maggi, L., Carmona, M., Kelly, S.D. Marigheto, N., Alonso, G.L., 2011. Geographical origin differentiation of saffron spice (*Crocus sativus* L. stigmas) - Preliminary investigation using chemical and multi-element (H, C, N) stable isotope analysis. *Food Chemistry* 128, 543-548.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., Mexia, A., 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micología* 23, 176–178.
- Mahlo, S.M., McGaw, L.J., Eloff, J.N., 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection* 29, 1529–1533.
- Mahoney, N. and Molyneux, R. J., 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (7), 1882-1889.
- Manganyi, M.C., Regnier, T., Olivier, E.I., 2015. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. *South African Journal of Botany* 99, 115-121.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N.A., Echard, B.W., Bagchi, D., Preuss, H.G., 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* 228, 111–117.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., Manosroi, A., 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* 235, 114–120.
- Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J., 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* 26 (2), 151-159.
- Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., 2004. Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytother. Res.* 18 (10), 789-792.
- Martinez-Frances, V., Rivera, D., Heinrich, M., Obon, C., Rios, S., 2015. An ethnopharmacological and historical analysis of “Dictamnus”, a European traditional herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 175, 390-406.
- Martins, N., Barros, L., Santos Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I., 2014. Decoction, infusion, and hydralcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry* 158, 73-80.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I., 2015. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* 170, 378-385.

- Mascarin, G.M. & Jaronski, S.T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 32, no. 11.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277 (5325), 504-509.
- Mazières, J., Pradines, A., Favre, G., 2003. Les inhibiteurs de farnésyl transférase: une cible peut en cacher une autre. *Médecine/Sciences* 19, 211–216.
- Mazières, J., Pradines, A., Favre, G., 2004. Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett.* 206, 159–167.
- Mazzanti, G., Battinelli, L., Salvatore, G., 1998. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour. Fragr. J.* 13, 289-294.
- McMurry, J., 2009. *Organic Chemistry Enhanced Edition*. Cengage Learning.
- Meca, G., Soriano, J.M., Gaspari, A., Ritieni, A., Moretti, A., Mañes, J., 2010. Antifungal effects of the bioactive compounds enniatins A, A1, B, B1. *Toxicon* 56, (3), 480-485.
- Meftahizade, H., Lotfi, M., Moradkhani, H., 2010. Optimization of Micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (28), 4314-4321.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickancaite, E., Segura-Aguilar, J., 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 107–116.
- Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N.S., Abrini, J., Zhiri, A., Baudoux, D., Diallo, B., El Jaziri, M., Idaomar, M., 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.* 629, 100–110.
- Michniewicz, M., Nalecz-Jawecki, G., Stufka-Olczyk, J., Sawicki, J., 2000. Comparison of chemical composition and toxicity of wastewaters from pulp industry, in: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W., (eds.) *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, 401-411. Springer US.
- Miller, E.C., Swanson, A.B., Phillips, D.H., Fletcher, T.L., Liem, A., Miller, J.A., 1983. Structure–activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res.* 43, 1124–1134.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2485-2489.
- Moen, B., Oust, A., Langsrud, Ø., Dorrell, N., Marsden, G.L., Hinds, J., Kohler, A., Wren, B.W., Rudi, K., 2005. Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4), 2086-2094.
- Molitoris, H.P., 1995. Fungi in Biotechnology. Past, present, future. *Czech Mycol.* 48 (1), 53-65.
- Moon, S.E., Kim, H.Y., Dha, J.D., 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch. Oral Biol.* 56, 907-916.
- Moon, T., Wilkinson, J.M., Cavanagh, H.M., 2006. Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol. Res.* 99, 722–728.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin A., Meftahizade H., 2010. Review *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (25), 2753-2759.
- Morais, S.M., Cavalcanti, E.S., Bertini, L.M., Oliveira, C.L., Rodrigues, J.R., Cardoso, J.H., 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22, 161–164.
- Moss, M.O., 1989. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 18, 69s-81s.

- Mowat, F.S., Bundy, K.J., 2002. Experimental and mathematical/computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from the Microtox® assay. *Adv. Environ. Res.* 6, 547-558.
- Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C.H., Chidewe, C., Ndhlala, A.R., Benhura, M.A.N., 2007. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology*, 2, 414-420
- Müller-Riebau, F., Berger, B., Yegen, O., 1995. Chemical composition and fungi toxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (8), 2262-2266.
- Munkittrick, K.R., Power, E.A., Sergy, G.A., 1991. The relative sensitivity of Microtox daphnids, rainbow trout, and fathead minnows acute lethality tests. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 35-62.
- Nabavizadeh, F., Salimi, E., Sadroleslami, Z., Karimian, S.M., Vahedian, J., 2009. Saffron (*Crocus sativus*) increases gastric acid and pepsin secretions in rats: Role of nitric oxide (NO). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3 (5), 181-184
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., Khosravi, A.R., 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 20, 174-178.
- Naumann, A., 1998. Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 3257, 245-257.
- Naumann, A., Navarro-González, M., Peddireddi, S., Kües, U., Polle, A., 2005. Fourier transform infrared microscopy and imaging: Detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology* 42 (10), 829-835.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2012. *In vitro* antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. *J. Ethnopharmacol.* 139, 81-89.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, 157-160.
- Neergaard, P., 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Humfrey Millford, Oxford University Press, London, 559 pp.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania State University Press.
- Nemeikaite-Ceniene, A., Imbrasaitė, A., Sergedienė, E., Cenas, N., 2005. Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple. *Arch. Biochem. Biophys.* 441, 182-190.
- Newman, M.C., Unger, M.A., 2002. *Fundamentals of Ecotoxicology*, Second Edition. CRC Press, London.
- Niranjan Reddy, V.L., Ravikanth, V., Jansi Lakshmi, V.V.N.S., Suryanarayan Murty, U., Venkateswarlu, Y., 2003. Inhibitory activity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* against *Beauveria bassiana*. *Fitoterapia*, 74, 600-602.
- Noorbala, A.A., Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Jamshidi, A.H., 2005. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J. Ethnopharmacol.* 97, 281-284.
- Novgorodov, S.A., Gudz, T.I., 1996. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 139-146.
- Oboh, G., Agunloye, O.M., Akinyemi, A.J., Ademiluyi, A.O., Adefegha, S.A., 2013. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. *Neurochem. Res.* 38 (2), 413-419.
- Obulesu M., Rao D.M., 2011. Effect of plant extracts on Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic avenues. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 2, 56-61.

- Ohizumi, H., Masuda, Y., Yoda, M., Hashimoto, S., Aiuchi, T., Nakajo, S., Sakai, I., Ohsawa, S., Nakaya, K., 1997. Induction of apoptosis in various tumor cell lines by geranylgeraniol. *Anticancer Res.* 17, 1051–1057.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18, 1518-1523.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B., 2008. Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. *Z Naturforsch. C*, 63, 547-553.
- Orhan I., Aslan M., 2009. Appraisal of scopolamine-induced antiamnesic effect in mice and *in vitro* antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 327- 332.
- Otiloju, A.A., 2002. Evaluation of the joint action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 404-415.
- Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M., 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69, 1046–1055.
- Ovesna, Z., Vachalkova, A., Horvathova, K., Tothova, D., 2004. Pentacyclitriterpenoic acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma* 51, 327-333.
- Ozer, H., Sahin, F., Kilic, H., Gulluce, M., 2005. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L., subsp. *angustifolius* (Bieb.) Arcangeli from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 20 (1), 42-45.
- Packer, L., Ong, A.S.H., 1998. Biological oxidants: molecular mechanisms and health effects. AOCS Press, Champaign, IL.
- Paik, S.Y., Koh, K.H., Beak, S.M., Paek, S.H., Kim, J.A., 2005. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 802–807.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., Mason, T.J., 2001. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 299-301.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal Ethnopharmacology* 39, 167-170.
- Pappas, C.S., Takidelli, C., Tsantili, E., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., 2011. Quantitative determination of anthocyanins in three sweet cherry varieties using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (1), 17-21.
- Park, K., Que Hee, S., 2001. Effect of dust on the viability of *Vibrio fischeri* in the Microtox test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50, 189-195.
- Parveen, M., Hasan, M.K., Takahashi, J., Murata, Y., Kitagawa, E., Kodama, O., Iwahashi, H., 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 46–55.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S., 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.* 32, 265-268.
- Passone, M.A., Girardi, N.S., Ferrand, C.A., Etcheverry, M., 2012. *In vitro* evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation* 70, 82-88.
- Pauli, A., 2006. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med. Res. Rev.* 26, 223–268.
- Pavela R., 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 76, 691–696.

- Pawar, V.C., Thaker, V.S., 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49, 316–323.
- Peelman, F., Couturier, C., Dam, J., Zabeau, L., Tavernier, J., Jockers, R., 2006. Techniques: New pharmacological perspectives for the leptin receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27 (4), 218-225.
- Pena-Neira, A., Hernandez, T., Garcia-Vallejo, C., Estrella, I., Suarez, J.A., 2000. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology* 210, 445–448.
- Pereira, R.P., Boligon, A.A., Appel, A.A., Fachineto, R., Ceron, C.S., Tanus-Santos, J.E., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T., 2014. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. *Industrial Crops and Products* 53, 34-45.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M.E., García-Diz, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 24, 646-653.
- Perrin, R.M., Fedorova, N.D., Bok, J.W., Cramer, R.A., Wortman, J.R., Kim, H.S., Nierman, W.C., Keller, N.P., 2007. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathogens* 3 (4).
- Perry, E., Pickering, A., Wang, W.W., Houghton, P., Perry, N., 1999. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51, 527-534.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Theobald, A.E., Jenner, P., Perry, E.K., 2000. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholine esterase by *Salvia lavandulifolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52, 895-902.
- Piazzon, A., Vrhovsek, U., Masuero, D., Mattivi, F., Mandoj, F., Nardini, M., 2012. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: Synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 12312–12323.
- Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311, 808-811.
- Piletz, J.E., Halaris, A., Iqbal, O., Hoppensteadt, D., Fareed, J., Zhu, H., *et al.*, 2009. Pro-inflammatory biomarkers in depression: Treatment with venlafaxine. *World J. Biol. Psychiatry* 10 (4), 313–323.
- Piozzi, F., Paternostro, M., Passannanti, S., Gacs-Baitz, E., 1986. Triterpenes from *Amaracus dictamnus*. *Phytochemistry* 25 (2), 539-541.
- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N., Tzakou, O., 2002. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6688–6691.
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., Conte, L.S., 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agr.* 82, 1645-1651.
- Plimakis, A.G., 1997. *Dictamnus* the miraculous herb of Crete, Hania, Greece.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2010. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology* 142, 114–119.
- Preston, C.A., Laue, G., Baldwin, I.T., 2001. Methyl jasmonate is blowing in the wind, but can it act as a plant-plant airborne signal? *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 1007-1023.
- Price, M.S., Conners, S.B., Tachdjian, S., Kelly, R.M., Payne, G.A., 2005. Aflatoxin conducive and non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology* 42 (6), 506-518.



- Price, M.S., Yu, J., Nierman, W.C., Kim, H., Pritchard, B., Jacobus, C.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., 2006. The aflatoxin pathway regulator AfIR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiology Letters* 255 (2), 275-279.
- Priestley, C.M., Burgess, I.F., Williamson, F.M., 2006. Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia* 77, 303–309.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., 2005. 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.
- Proestos, C. & Komaitis, M., 2006a. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: Comparison with conventional extraction techniques. *Journal of Food Quality*, 29, 567-582.
- Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M., 2006b. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry* 95, 44-52.
- Proestos, C., Kapsokafalou, M., Komaitis, M., 2008. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS after silylation. *Journal of Food Quality* 31, 402-414.
- Pugazhendhi, D., Pope, G.S., Darbre, P.D., 2005. Oestrogenic activity of *p*-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *Journal of Applied Toxicology* 25, 301-309.
- Qin, L., Li, G., Qian, X., Liu, Y., Wu, X., Liu, B., *et al.*, 2005. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* 52 (1), 78-84.
- Qui, D.R., Wang, D.C., Chung, I.M., Zhang, M.Z., Cheng, H.E., Wei, D.S., Qin, S.C., Yang, S.X., 2015. Allelopathic effects of essential oil of *Hosta ventricosa* flowers on seed germination and seedling growth of crops. *Allelopathy journal* 36 (1), 103 -108.
- Quiles, J.M., Manyes, L., Luciano, F.B., Mañes, J., Meca, G., 2015. Effect of the oriental and yellow mustard flours as natural preservative against aflatoxins B1, B2, G1 and G2 production in wheat tortillas. *Journal of Food Science and Technology* 52 (12), 8315-8321.
- Qureshi, A.A., Coleman, R.N., Paran, J.H., 1983. Evaluation and refinement of the Microtox test for use in toxicity screening. In: Dutka, B.J., Liu, D. (Eds.), *Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems*. Marcel Dekker, New York, pp. 89-118.
- Rahbar, N., Shafaghat, A., Salimi, F., 2012. Antimicrobial activity and constituents of the hexane extracts from leaf and stem of *Origanum vulgare* L. ssp. *Viride* (Boiss.) Hayek. growing wild in Northwest Iran. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6 (13), 2681-2685.
- Rajalakshmi, D., Narasimhan, S., 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation, in: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., (Eds), *Food antioxidants*. Marcel Dekker, New York, pp. 65-157.
- Rajkovic, K., Pekmezovic, M., Barac, A., Nikodinovic-Runic, J., Arsenijevic, V.A., 2015. Inhibitory effect of thyme and cinnamon essential oils on *Aspergillus flavus*: Optimization and activity prediction model development. *Industrial Crops and Products* 65, 7-13.
- Ramassamy, C., 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 51-64.
- Ravi Kiran, S., Bhavani, K., Sita Devi, P., Rajeswara Rao, B.R., Janardhan Reddy, K., 2006. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour. Technol.* 97, 2481-2484.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Muralidharan, K., 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*, 20, 173–178.

- Ree, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Free Radical Biol. Med. 26, 1231-1237.
- Reichling, J., Koch, C., Stahl-Biskup, E., Sojka, C., Schnitzler, P., 2005. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Med.* 71, 1123-1127.
- Reuter J., Jocher A., Hornstein S. Mönting J.C., Schempp C.M., 2007. Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema *in vivo*. *Planta Medica*, 73, 1190-1191.
- Reverberi, M., Betti, C., Fabbri, A.A., Zjalic, S., Spadoni, S., Mattei, B., Fanelli, C., 2008. A role for oxidative stress in the citrus limon / *Phoma tracheiphila* interaction. *Plant Pathology* 57 (1), 92-102.
- Revinthi-Moraiti, K., Komaitis, M.E., Evangelatos, G., Kapoulas, V., 1985. Identification and quantitative determination of the lipids of dried *Origanum dictamnus* leaves. *Food Chemistry* 16, 15-24.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure – Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933-956.
- Richter, C., Schlegel, J., 1993. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicol. Lett.* 67, 119-127.
- Rigas, B., LaGuardia, K., Qiao, L., Bhandare, P.S., Caputo, T., Cohenford, M.A., 2000. Infrared spectroscopic study of cervical smears in patients with HIV: Implications for cervical carcinogenesis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 135 (1), 26-31.
- Rim, I.S., Jee, C.H., 2006. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farina* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol.* 44, 133-138.
- Robards, K., 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1000, 657-691.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A., Khalel, K.I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and total phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial crops and Products* 43, 827-831.
- Rodriguez-Saona, L.E., Khambaty, F.M., Fry, F.S., Calvey, E.M., 2001. Rapid Detection and Identification of Bacterial Strains By Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2), 574-579.
- Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A., Moreno, S., 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem.* 115, 456-461.
- Rosado-Alvarez, C., Molinero-Ruiz, L., Rodriguez-Across, R., Basallote-Ureba, M.J., 2014. Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *Scientia Horticulturae* 171, 51-57.
- Rose, J., 2000. An Herb for Skin Care. *Aromatic Plant Project Pres Release* 8, 897-901.
- Rota, C., Carraminana, J.J., Burillo, J., Herrera, A., 2004. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 67, 1252-1256.
- Rotem, J., 1994. The genus *Alternaria*. APS Press, Saint Paul Minnesota, USA, 313pp.
- Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69, 167-174.
- Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfino, S., Cardile, V., Rosseli, S., Bruno, M., 2013. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology* 55, 42-47.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem.* 91, 621-632.

- Sakagami, H., Satoh, K., 1997. Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res.* 17, 221–224.
- Sakagami, H., Oi, T., Satoh, K., 1999. Prevention of oral diseases by polyphenols (Review). *In vivo* 13, 155-172.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67-80.
- Salevev, S.U., Okello, E.J., Perry, E.K., 2004. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, 18, 315-324.
- Salim, E.I., Fukushima, S., 2003. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 45, 195-202.
- Salman, A., Erukhimovitch, V., Talyshinsky, M., Huleihil, M., 2002. FTIR spectroscopic method for detection of cells infected with herpes viruses. *Biopolymers - Biospectroscopy Section* 67 (6), 406-412.
- Saltas, D., Pappas, C.S., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., 2013. Direct determination of rosmarinic acid in *Lamiaceae* herbs using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (13), 3235-3241.
- Samarghandian, S., Tavakkol Afshari, J., Davoodi, S., 2011. Suppression of pulmonary tumor promotion and induction of apoptosis by *Crocus sativus* L. extraction. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, 238-247.
- Sanchez, E., Heredia, N., Garcia, S., 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal of Food Microbiology* 98, 271-279.
- Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.Y., Dashwood, R.H., 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutat. Res.* 495, 61-74.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimaraes, L.G., Mendonca, L.Z., Soares, M.J., 2007a. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 116, 283-290.
- Santoro, G.F., das Gracas Cardoso, M., Guimaraes, L.G., Salgado, A.P., Menna-Barreto, R.F., Soares, M.J., 2007b. Effect of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783-790.
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N., 2010. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161 (2), 168-175.
- Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A., 2015. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *Vulgare* and *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130 (8) SUPPL., 2073S-2085S.
- Schapowal, A., Berger, D., Klein, P., Suter, A., 2009. Echinacea/sage or chlohexidine/lidocaine for treating acute sore throats: a randomized doubleblind trial. *European Journal of Medical Research* 14, 406-412.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77, 279–285.
- Schippmann, U., Leaman, D.J., Cunningham, A.B., 2002. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues, in: (FAO). Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries. Satellite event on the occasion of the Ninth regular session of the

- commission on genetic resources for food and agriculture. Rome 12 - 13 October 2002. Inter departmental working group on biological diversity for food and agriculture, Rome 2002.
- Schmitt, J., Flemming, H.-C., 1998. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41 (1), 1-11.
- Schnitzer, P., Schuhmacher, A., Astani, A., Reichling, J., 2008. *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15, 134-740.
- Scholey, A.B., Tildesley, N.T.J., Ballard, C.G., *et al.*, 2008. An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 198, 127-139.
- Schulz, H., Baranska, M., 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43 (1), 13-25.
- Schwartz, J. L., Shklar, G., Trickler, D., 1993. Vitamin C enhances the development of carcinomas in the hamster buccal pouch experimental model. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 76, 718-722.
- Schwartz, J.L., 1996. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J. Nutr.* 126, 1221S–1227S.
- Selvi, A.T., Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., 2003. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiology* 20, 455-460.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S., 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22 (1), 102-106.
- Sengul, M., Ercisli, S., Yildiz, H., Gungor, N., Kavaz, A., Cetin, B., 2011. Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponariaofficinalis*. *Iran. J. Pharm. Res.* 10 (1), 49-56.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Valero, D., 2005. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 6, 115-123.
- Shah, M.A., Don Bosco, S.J., Mir, S., A., 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, (98), 1, 21-23
- Shen, S.C., Ko, C.H., Tseng, S.W., Tsai, S.H., Chen, Y.C., 2004. Structurally related antitumor effects of flavonones *in vitro* and *in vivo*: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 84-95.
- Shen, W., Qi, R., Zhang, J., Wang, Z., Wang, H., Hu, C. *et al.*, 2012. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* 88 (5), pp. 487-494.
- Sheng, L., Qian, Z., Zheng, S., Xi, L., 2006. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase. *European Journal of Pharmacology*, 543 (1-3), 116-122.
- Shettlemore, M.G., Bundy, K.J., 2002. Assessment of dental material degradation product toxicity using a bioluminescent bacterial assay. *Dent. Mater.* 18, 445-453.
- Shetty, G., Kendall, C., Shepherd, N., Stone, N., Barr, H., 2006. Raman spectroscopy: Elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of esophagus. *British Journal of Cancer* 94 (10), 1460-1464.
- Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C.S., Srivastava, B., Dubey, N.K., 2008. Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 348–351.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., Du, Z., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 100, 296-305.

- Sidhu, O.P., Chandra, H., Behl, H.M., 2009. Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica* Gmel.) seeds: Synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Food and Chemical Toxicology* 47, 774-777.
- Sies, H., Cadenas, E., 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 311, 617-631.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022-8028.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonca, D., Domingues, F., 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19, 42-47.
- Sim, M.J., Choi, D.R., Ahn, Y.J., 2006. Vapor phase toxicity of plant essential oils to *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 593-598.
- Sindu, J., Lehmann, D., Silaghi, S., Cobet, C., Esser, N., Sankaracharyulu, M.G.V., Friedrich, M., Zahn, D.R.T., 2013. Dielectric response of ultra-thin multilayer of guanine and cytosine DNA bases. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 79 (3), 365-371.
- Singh, G., Marimuthu, P., de Heluani, C.S., Catalan, C.A., 2006. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *J. Agric. Food Chem.* 54, 174-181.
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M.P., Catalan, C.A.N., 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1650-1661.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Sinico, C., De Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., Bonsignore, L., Fadda, A.M., 2005. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 161-168.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oil. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 44, 1202-1205.
- Skaltsa, H., Harvala, C., 1987. Contribution a l'étude Chimique d'*Origanum dictamnus* L., -2nd communication (Glycosides des Feuilles). *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 11, 56-62.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P.A., 2014. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 53, 46-54.
- Skoula, M., Kamenopoulos, S., 1997. *Origanum dictamnus* L. and *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*: Traditional uses and production in Greece, in: Padulosi, S. (Ed.): *Oregano*. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996, CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy. 1997, pp. 26-32; Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops No. 14, Published by IPGRI.
- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., Johnson, B.C., 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry* 52 (4), 649-657.
- Söderberg, T.A., Johansson, A., Gref, R., 1996. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology* 107, 99-109.
- Sompong, M., Thumanu, K., Prakhongka, I., Burapatpong, B., Athinuwat, D., Prathuangwong, S., Buensanteai, N., 2013. Infrared spectroscopy: Methods for investigating cellular components of

- phytopathogenic fungi response to temperature stress. *African Journal of Microbiology Research* 7 (34), 4331-4337.
- Sonboli, A., Babakhani, B., Mehrabian, A.R., 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.* 61, 160-164.
- Soulimani, R., Fleurentin, J., Mortier, F., Misslin, R., Derrieu, G., Pelt, J.M., 1991. Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Medica* 57 (2), 105-109.
- Sousa, L.A.D., Pires Junior, H.B., Soares, S.F., Ferri, P.H., Ribas, P., Lima, E.M., Furlong, J., Bittencourt, V.R.E.P., Perinotto, W.M.S., Borges, L.M.F., 2011. Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Phipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations. *Veterinary Parasitology* 175, 320-324.
- Southam, C.M., Ehrlich, J., 1943. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33, 517-524.
- Souza, E.L., Lima, E.O., Freire, K.R.L., Sousa, C.P., 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 245–250.
- Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N., 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control* 18, 409-413.
- Soylu, E.M., Soylyu, S., Kurt, S., 2006. Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119-128.
- Srinivasan, R., 2012. Integrating biopesticides in pest management strategies for tropical vegetable production. *Journal of Biopesticides* 5 (SUPPL.), 36-45.
- Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R.K., Dharamveer, S., Saraf, A., 2010. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. *Pharmacology review* 4 (8), 200-208.
- Stadler, R.H., Markovic, J., Turesky, R.J., 1995. *In vitro* anti- and pro-oxidative effects of natural polyphenols. *Biol. Trace Elem. Res.* 47, 299-305.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food and Chemical Toxicology* 50 (11), 4115-4124.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L., von Wright, A., 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem. Toxicol.* 37, 813-823.
- Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H., 2003. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 175-179.
- States, S., Scheuring, M., Kuchta, J., Newberry, J., Casson, L., 2003. Utility-based analytical methods to ensure public water supply security. *Journal / American Water Works Association* 95 (4), 103-115.
- Stehfest, K., Toepel, J., Wilhelm, C., 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry* 43 (7), 717-726.
- Stierle, A., Cardellina, J., Strobe, G., 1988. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata* (conference paper). *Proc.Natl.Acad.Sci.uSA* 5, 8008-8011.
- Surh, Y.J., 2002. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1091-1097.
- Surveswaran S., Cai, Y.-Z., Corke, H., Sun, M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102, 938-953.
- Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., Pichette, A., 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine* 12, 299-304.

- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., Legault, J., 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* 103, 99-102.
- Szeghalmi, A., Kaminskyj, S., Gough, K.M., 2007. A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions (Conference Paper). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (5), 1779-1789.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199-1218.
- Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., Polissiou, M., 1995. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography- UV Visible photodiode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699, 107–118.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., Polissiou, M., 1995. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography- UV Visible photodiode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699, 107–118.
- Tarantilis, P. A., Polissiou, M.G., 1997. Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 45 (2), 459-462.
- Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., Mousavi, S.H., 2008. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (11), 3443-3447.
- Tavassoli, S., EmamDjomeh, Z., 2011. Total Phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Vet.* 7, 337-341.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., Sökmen, A., 2004. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (5), 1132-1137.
- Teuscher, E., 2003. Medicinal Spices, 324-328, medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J., Wang, Y., 2012. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservation. *Food Chemistry* 130, 520-527.
- Tjamos, E.C., Tjamos, S.E. & Antoniou, P.P., 2010. Biological management of plant diseases: Highlights on research and application. *Journal of Plant Pathology*, vol. 92, no. SUPPL. 4, pp. S4.17-S4.21.
- Trevisan, M.T., Vasconcelos Silva, M.G., Pfundstein, B., Spiegelhalder, B., Owen, R.W., 2006. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4378–4382.
- Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P.P. & Tjamos, E.C., 2012. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 51, no. 1, pp. 158-174.
- Tsuneki, H., Ma, E.L., Kobayashi, S., Sekizaki, N., Maekawa, K., Sasaoka, T., Wang, M.W., Kimura, I., 2005. Antiangiogenic activity of beta-eudesmol *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 512, 105-115
- Tuberoso, C.I., Kowalczyk, A., Coroneo, V., Russo, M.T., Dessi, S., Cabras, P., 2005. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica* all. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10148-10153.
- Turhan, M., 2006. Hand book of herbal plants, chapter 4. *Melissa officinalis*, 3, 184-245.
- Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A., 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, 101–113.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S., 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* 93, 713-718.
- Turkmen Erol, N., Sari, F., Polat, G., Velioglu, Y.S., 2009. Antioxidant and Antibacterial Activities of Various Extracts and Fractions of Fresh Tea Leaves and Green Tea. *Tarim Bilimleri Dergisi* 15 (4), 371-378.

- Ulitzur, S., Lahav, T., Ulitzur, N., 2002. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity. *Environmental toxicology* 17 (3), 291-296.
- Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174, 233–238.
- Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561-1568.
- United States Food and Drug Administration (FDA). 21 CFR Part 356. Oral health care drug products for over-the-counter human Use; antigingivitis/antiplaque drug products; establishment of a Monograph. Federal register. 68(103), 32232-32287 (2003). Available at: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2003-05-29/pdf/03-12783.pdf>. Accessed April 16, 2015.
- United States Food and Drug Administration (FDA). 21 CFR Part 582.10. Substances Generally Recognized as Safe. Spices and other natural seasoning and flavoring. Washington, National Archives and Records Administration (2014). Available at: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2014-title21-vol6/pdf/CFR-2014-title21-vol6-sec582-10.pdf> Accessed April 16, 2015.
- Valnet, J., 1990. *Aromatherapy*. 11th Edn. France: Maloine, Paris, 11, 242-246.
- van der Schalie, W.H., James, R.R., Gargan II, T.P., 2006. Selection of a battery of rapid toxicity sensors for drinking water evaluation. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (1), 18-27.
- Van der Mei, H.C., De Vries, J., Busscher, H. J., 1993. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy *Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, (12) 4305-4312.
- Van Houten, B., Woshner, V., Santos, J.H., 2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 5, 145–152.
- Vanaclocha, B., Canigual, S., 2003. *Fitoterapia: Vademecum de Prescripcion* (4oEd. ed.), Barcelona.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J., Marin, S., 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 145-154.
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology* 21, 649–656.
- Venditi, A., Bianco, A., Frezza, C., Conti, F., Bini, L.M., Giulani, C., Bramucci, M., Quassinti, L., Damiano, S., Luidi, G., Beghelli, D., Caterbi, S., Petrelli, D., Vitali, L.A., Papa, F., Caprioli, G., Maggi, F., 2015. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Codr.) Nyman from central Italy. *Industrial Crops and Products* 77, 353-363.
- Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F., 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* 17, 43-52.
- Vilãno, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2005. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. *Analytica Chimica Acta* 538, 391-398.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161–169.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs (2001) *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulate* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19, 1130–1138.



- Vokou, D., Katradi, K., Kokkini, S., 1993. Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 187-196.
- Vukovic-Gacic, B., Nikcevic, S., Beric-Bjedov, T., Knezevic-Vukcevic, J., Simic, D., 2006. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1730-1738.
- Walter, S., 2001. Non-wood forest products in Africa: a regional and national overview. Les produits forestiers non ligneux en Afrique: un aperçu régional et national. FAO Forestry Department, Rome. Working Paper/Document de Travail nr. FOPW/01/1.
- Wang, B., Deng, J., Gao, Y., Zhu, L., He, R., Xu, Y., 2011. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. *Fitoterapia* 82, 1141-1151.
- Wang, S.Y., Chen, P.F., Chang, S.T., 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Biores. Technol.* 96, 813-818.
- Wang, X., Chen, X., Qi, Z., Liu, X., Li, W., Wang, S., 2012. A study of *Ganoderma lucidum* spores by FTIR microspectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 91, 285-289.
- Wawryniuk, M., Pietrzak, A., Nałecz-Jawecki, G., 2015. Evaluation of direct and indirect photodegradation of mianserin with high-performance liquid chromatography and short-term bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety* 115, 144-151.
- Węgrzyn, G., Czyż, A., 2002. How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology? *Oceanologia*, 44 (3), 291–305.
- Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S.J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H., Sauer, S., 2015. *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine* 22 (2), 262-270.
- Wellmann, M., 1958. *Pedanius Dioscuridis "De Materia Medica"*. weidmannsche verlagsbuchhandlung, Berlin, III, 32.1.
- Wells, P., Lee, K., Blaise C., (Eds.), 1998. *Microscale aquatic toxicology: Advances, Techniques and Practice* CRC Lewis, Boca Raton.
- Wichtl, M., Bisset, N.G., (ed) transl. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*, 440-443, medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart (1994).
- Williams, L.R., Stockley, J.K., Yan, W., Home, V.N., 1998. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *Int. J. Aromather.* 8, 30-40.
- Williams, W.P., G.L., Windham, P.M., Buckley, 2008. Diallel analysis of aflatoxin accumulation in maize. *Crop Science* 48 (1), 134-138.
- Wink, M., Schmeller, T., Latz-Brüning, B., 1998. Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology* 24 (11), 1881-1937.
- Wood, B.R., Quinn, M.A., Burden, F.R., McNaughton, D., 1996. An investigation into FTIR spectroscopy as a biondiagnostic tool for cervical cancer. *Biospectroscopy* 2, (3), 143-153.
- Wootton-Beard, P.C., Ryan, L., 2011. Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int.* 44, 3135-3148.
- Wu, J.-G., Xu, Y.-Z., Sun, C.-W., Soloway, R.D., Xu, D.-F., Wu, Q.-G., Sun, K.-H., Weng, S.-F., Xu, G.-X., 2001. Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques. *Biopolymers - Biospectroscopy Section* 62 (4), 185-192.
- Wu, T.-Y., Chen, C.-P., Jinn, T.-Y., 2011. Traditional Chinese medicines and Alzheimer's disease. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 50, 131- 135.

- Wu, X.J., Stahl, T., Hu, Y., Kassie, F., Mersch-Sundermann, V., 2006. The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *J. Nutr.* 136, 608-613.
- Xi, L., Qian, Z.Y., Shen, X.C., Wen, N., Zhang, Y.B., 2005. Crocetin prevents dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Planta Medica*, 71 (10), 917-922.
- Xu, J.-G., Hu, Q.-P., Liu, Y., 2012. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J. Agric. Food Chem.* 60 (46), 11625–11630.
- Xu, Y., Zhang, L., Shao, T., Ruan, L., Wang, L., Sun, J. *et al.*, 2013. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: Behavioral and neurobiological analyses. [Research support, Non-U.S. Gov't]. *Metab. Brain Dis.* 28 (4), 571-583.
- Yabe, T., Hirahara, H., Harada, N., Ito, N., Nagai, T., Sanagi, T. *et al.*, 2010. Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. *Neuroscience* 165 (2), 515-524.
- Yang, P., Ma, Y., 2005. Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. *J. Vector. Ecol.* 30, 231-234.
- Yang, Y., Sulé-Suso, J., Sockalingum, G.D., Kegelaer, G., Manfait, M., El Haj, A.J., 2005. Study of tumor cell invasion by fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers.* 78 (6), 311-317.
- Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M., Hsu, C.K., 2009. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: Potential mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 6468–6473.
- Yip, E.C.H., Chan, A.S.L., Pang, H., Tam, Y.K., Wong, Y.H., 2006. Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biology and Toxicology* 22, 293–302.
- Yoo, C.B., Han, K.T., Cho, K.S., Ha, J., Park, H.J., Nam, J.H., Kil, U.H., Lee, K.T., 2005. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 225, 41-52.
- Yoon, H.S., Moon, S.C., Kim, N.D., Park, B.S., Jeong, M.H., Yoo, Y.H., 2000. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 151-156.
- You, B.R., Moon, H.J., Han, Y.H., Park, W.H., 2010. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1334-1340.
- Young, A.J., Lowe, G.M., 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 20-27.
- Zabka, M., Pavela, R., Slezakova, L., 2009. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 30, 250–253.
- Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A., Albasini, A., 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology* 144 (9-10), 491-494.
- Zeni, A.L.B., Zomkowski, A.D.E., Maraschin, M., Rodrigues, A.L.S., Tasca, C.I., 2012. Ferulic acid exerts effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 679 (1–3), 68–74.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Baser, K.H.C., 2003. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells beta-ring a human N-RAS oncogene. *Urban & Fischer, Phytomedicine I* 10, 292-299.
- Zgorka, G., Głowniak, K., 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26, 79-87.
- Zhang, J., Liu, S., Dou, R., Liu, H., Zhang, J., 2011. Evaluation of the toxicity of ionic liquid mixture with antagonism and synergism to *Vibrio qinghaiensis* sp.Q67. *Chemosphere* 82, 1024-1029.
- Zhao, Y.H., Ji, G.D., Cronin, M.T.D., Dearden, J.C., 1998. QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *carp*. *Sci. Total Environ.* 216, 205-215.

- Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S.T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., Tabatabaei, M., 2015. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 69, 251-256.
- Zheng, S., Yang, H., Zhang, S., Wang, X., Yu, L., Lu, J., Li, J., 1997. Initial study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 27, 106-112.
- Zheng, S.G., Qian, Z.Y., Tang, F.T., Sheng, L., 2005. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochemical Pharmacology*, 70 (8), 1192-1199.
- Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J., 2004. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci.* 74, 935-968.
- Zimmermann, B., Walch, S., Ngaba Tinzoh, L., Stuhlinger, W., Lachenmeier, D., 2011. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Journal of Chromatography B* 879, 2459-2464.
- Zoumpoulou, G., Pepelassi, E., Papaioannou, W., Georgalaki, M., Maragkoudakis, P.A., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., 2013. Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3), 640-4654.
- Zoumpoulou, G., Papadimitriou, K., Polissiou, M.G., Tarantilis, P.A., Tsakalidou, E., 2010. Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* 144 (1), 202-207.
- Zurita, J.L., Jos, A., del Peso, A., Salguero, M., Lopez-Artiguez, M., Repetto, G., 2007. Ecotoxicological assessment of bromobenzene using a test battery with five model systems. *Food Chem. Toxicol.* 45, 575-584.
- Αϊναλίδου, Α. Δευτερογενείς μεταβολίτες από φυτά της ελληνικής χλωρίδας με επίδραση στην ανάπτυξη φυτοπαθογόνων βακτηρίων (2008) Μεταπτυχιακή διατριβή. Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας. Σχολή Γεωπονίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Αναστασάκη, Ε. Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της μεσογειακής χλωρίδας. Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας (2014) Διδακτορική διατριβή.
- Δούκας, Ε. Βιοχημική και μοριακή διερεύνηση της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα τριαζολικά μυκητοκτόνα στην παραγωγή μυκοτοξινών από μύκητες του γένους *Aspergillus* (2009) Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.
- Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Β. Χημεία φυτικών προϊόντων (1998) Τμήμα φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Καββάδας Δ., (1956), Βοτανικόν Φυτολογικόν Λεξικόν, Αθήνα, Τόμος 6, 2902.
- Καραμπουρνιώτης, Γ.Α., 2003. Η άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Σε: Φυσιολογία καταπόνησεων των φυτών, οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες.
- Κούγκολος Α. Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Μηχανική (2005). Εκδόσεις Τζιόλα
- Κουκουλίτσα, Α., Ι. Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από τα φυτά: *Centaurea zaccariniana* DC. & *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* Βιολογικές δοκιμασίες *in vitro*. ΙΙ. Μοριακή Προσομοίωση: Εφαρμογή και μελέτη στις απομονωμένες ουσίες (2006). Διδακτορική διατριβή. ΕΚΠΑ.
- Οκονομίδη, Χ., Όλγα Τζάκου. Φασκόμηλο και νόσος Alzheimer - πρόσφατες έρευνες. (2015). Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. ΕΚΠΑ.

- 
- Παπαδόπουλος, Α.Ι. Σημειώσεις παραδόσεων: Εισαγωγή στην τοξικολογία – βασικές γνώσεις τοξικολογίας (2005). Θεσσαλονίκη.
- Παπανδρέου, Μ. Μελέτη του ρόλου συστατικών των στύλων του φυτού *Crocus Sativus* και άλλων ενδημικών ειδών *Crocus* σε νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς με έμφαση στη νόσο Alzheimer (2010). Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Πεταλά, Μ. Επίδραση της τριτοβάθμιας επεξεργασίας στην τοξικότητα υγρών αποβλήτων αστικής προέλευσης (2006). Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- Πυλαρά, Α. Συμβολή στην κυτταρολογία, μορφομετρία και χημική ανάλυση των στύλων ενδημικών ειδών του γένους *Crocus* L. από την Πελοπόννησο. (2008) Ερευνητική εργασία. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα, Οικολογία-Διαχείριση και προστασία Φυσικού Περιβάλλοντος, Παν/μιο Πατρών.
- Ταραντίλης, Π.Α. Απομόνωση, καθαρισμός, ταυτοποίηση, φασματοσκοπική και βιολογική μελέτη συστατικών των στιγμάτων του κρόκου *Crocus Sativus* L. (1994). Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Χανλίδου, Ε. Δευτερογενείς μεταβολίτες στη χλωρίδα του Εθνικού Δρυμού Βίκου-Αώου. Χημειοταξινομική προσέγγιση (1996) Διδακτορική διατριβή.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



## Περιεχόμενα Εικόνων

	σελ
<b>Εικόνα I.1.1</b> Άνθη <i>Hyssopus officinalis</i>	8
<b>Εικόνα I.1.2</b> <i>Salvia officinalis</i>	11
<b>Εικόνα I.1.3</b> <i>Melissa officinalis</i> L.	16
<b>Εικόνα I.1.4</b> <i>Origanum dictamnus</i>	19
<b>Εικόνα I.1.5</b> <i>Origanum vulgare</i>	23
<b>Εικόνα I.1.6</b> <i>Crocus sativus</i>	27
<b>Εικόνα I.1.7</b> «Κροκοσυλλέκτριες», τοιχογραφία στο Ακρωτήριο της Θήρας με μορφές γυναικών που συλλέγουν άνθη κρόκου	29
<b>Εικόνα I.1.8</b> «Ο κροκοσυλλέκτης πίθηκος», η χαρακτηριστικότερη αναφορά στον κρόκο κατά τη Μινωική εποχή. Βρέθηκε στο βορειοδυτικό τμήμα του ανακτόρου της Κνωσού στο «σπίτι των τοιχογραφιών» και χρονολογείται περίπου στα 1500 π.χ. Εκτίθεται στο μουσείο Ηρακλείου.	30
<b>Εικόνα I.1.9</b> Στίγματα κρόκου	31
<b>Εικόνα I.3.1</b> Καλλιέργεια <i>Alternaria alternata</i>	66
<b>Εικόνα I.3.2</b> Σπόρια του μύκητα <i>Alternaria alternata</i>	67
<b>Εικόνα I.3.3</b> Καλλιέργεια <i>Fusarium oxysporum</i>	68
<b>Εικόνα I.3.4</b> Σπόρια του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	69
<b>Εικόνα I.3.5</b> Καλλιέργεια <i>Beauveria bassiana</i>	70
<b>Εικόνα I.3.6</b> Καλλιέργεια <i>Aspergillus flavus</i>	71
<b>Εικόνα I.3.7</b> Ασπεργίλιο του <i>Aspergillus flavus</i>	72
<b>Εικόνα I.4.1</b> Βακτήριο <i>Vibrio fischeri</i> , βασικά κυτταρικά οργανίδια	92
<b>Εικόνα I.4.2</b> Αναλυτής Microtox®	93
<b>Εικόνα I.4.3</b> Λογισμικό MicrotoxOmni	94
<b>Εικόνα I.4.4</b> Παράμετροι MicrotoxOmni προς εισαγωγή	94
<b>Εικόνα I.4.5</b> Κυψελίδες προς πλήρωση	95
<b>Εικόνα I.4.6</b> Λογισμικό MicrotoxOmni Αποτελέσματα	96
<b>Εικόνα II.2.1</b> Προετοιμασία πλήρωσης των αποστειρωμένων τριβλίων με PDA και εκχυλίσματα αρωματικών φυτών	142
<b>Εικόνα II.2.2</b> Τριβλία με PDA κι εκχύλισμα <i>crocus sativus</i>	142
<b>Εικόνα II.2.3</b> Οι καλλιέργειες της <i>Alternaria alternata</i> στο τέλος του πειράματος	147
<b>Εικόνα II.2.4</b> Οι καλλιέργειες του <i>Aspergillus flavus</i> στο τέλος του πειράματος	156
<b>Εικόνα II.2.5</b> Οι καλλιέργειες του <i>Fusarium oxysporum</i> στο τέλος του πειράματος	158
<b>Εικόνα II.2.6</b> Οι καλλιέργειες της <i>Beauveria bassiana</i> στο τέλος του πειράματος	163





## Περιεχόμενα Πινάκων

σελ

<b>Πίνακας I.1.1</b> Ιδιότητες του <i>Hyssopus officinalis</i> με βάση τη βιβλιογραφία	10
<b>Πίνακας I.1.2</b> Συστατικά εκχυλισμάτων του <i>Hyssopus officinalis</i> με βάση τη βιβλιογραφία	10
<b>Πίνακας I.1.3</b> Ιδιότητες της <i>Salvia officinalis</i> με βάση τη βιβλιογραφία	14
<b>Πίνακας I.1.4</b> Συστατικά εκχυλισμάτων της <i>Salvia officinalis</i> με βάση τη βιβλιογραφία	15
<b>Πίνακας I.1.5</b> Ιδιότητες του <i>Melissa officinalis</i> με βάση τη βιβλιογραφία	18
<b>Πίνακας I.1.6</b> Ιδιότητες του <i>Melissa officinalis</i> με βάση τη βιβλιογραφία	19
<b>Πίνακας I.1.7</b> Ιδιότητες του <i>Origanum dictamnus</i> με βάση τη βιβλιογραφία	21
<b>Πίνακας I.1.8</b> Συστατικά εκχυλισμάτων του <i>Origanum dictamnus</i> με βάση τη βιβλιογραφία	22
<b>Πίνακας I.1.9</b> Ιδιότητες του <i>Origanum vulgare</i> με βάση τη βιβλιογραφία	25
<b>Πίνακας I.1.10</b> Συστατικά εκχυλισμάτων του <i>Origanum vulgare</i> με βάση τη βιβλιογραφία	26
<b>Πίνακας I.1.11</b> Ιδιότητες του <i>Crocus sativus</i> με βάση τη βιβλιογραφία	30
<b>Πίνακας I.1.12</b> Ιδιότητες του <i>Crocus sativus</i> με βάση τη βιβλιογραφία	31
<b>Πίνακας I.2.1</b> Χαρακτηριστικές ομάδες τερπενοειδών	44
<b>Πίνακας I.3.1</b> Συνοπτική βιβλιογραφική ανασκόπηση βιοδοκιμών φυτικών εκχυλισμάτων που έχουν προηγηθεί στα είδη μυκήτων που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη	77
<b>Πίνακας II.1.1</b> Φυτικά είδη που εξετάστηκαν	105
<b>Πίνακας II.1.2</b> Τοξικότητα των εκχυλισμάτων για όλα τα φυτικά είδη και όλες τις διαδικασίες εκχύλισης	111
<b>Πίνακας II.1.3</b> Συγκεντρώσεις EC <sub>20</sub> που προκαλούν 20% μείωση της φωταύγειας, μέγιστη ποσότητα φυτικής μάζας για συγκεκριμένους όγκους αναφοράς.	112
<b>Πίνακας II.1.4</b> Δείκτης συνέργειας στην Τοξικότητα SR <sub>toxicity</sub>	113
<b>Πίνακας II.2.1</b> Πρόγραμμα Έκλυσης	144
<b>Πίνακας II.2.2</b> Επίδραση των μικτών (crude) φυτικών εκχυλισμάτων (α) στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων της <i>Alternaria alternata</i> .	146
<b>Πίνακας 2.3</b> Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων –brpe στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Alternaria alternata</i> .	148
<b>Πίνακας II.2.4</b> Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών (α) και αμιγώς υδατικών (β) –brpe εκχυλισμάτων του μύκητα <i>Alternaria alternata</i>	150
<b>Πίνακας II.2.5</b> Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και	152

στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .	
<b>Πίνακας II.2.6</b> Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων -bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .	153
<b>Πίνακας II.2.7</b> Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών (α) και αμιγώς υδατικών (β) -bpte εκχυλισμάτων στο μύκητα <i>Aspergillus flavus</i>	155
<b>Πίνακας II.2.8</b> Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> .	157
<b>Πίνακας II.2.9</b> Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων -bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	159
<b>Πίνακας II.2.10</b> Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών (α) και αμιγώς υδατικών (β) -bpte εκχυλισμάτων στο μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	160
<b>Πίνακας II.2.11</b> Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Beauveria bassiana</i>	162
<b>Πίνακας II.2.12</b> Επίδραση των αμιγώς υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων -bpte στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην παραγωγή των κονιδίων του μύκητα <i>Beauveria bassiana</i>	164
<b>Πίνακας II.2.13</b> Ποσοστιαία μεταβολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και της σποριογένεσης υπό την επίδραση μικτών (α) και αμιγώς υδατικών (β) -bpte εκχυλισμάτων στην <i>Beauveria bassiana</i>	165
<b>Πίνακας II.2.14</b> Εμβαδό κορυφών του ροσμαρινικού οξέος στα χρωματογραφήματα των αμιγώς υδατικών -bpte εκχυλισμάτων	177
<b>Πίνακας II.2.15</b> Δείκτες συνέργειας SRm και SRC στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών (α) και αμιγώς υδατικών (β) -bpte εκχυλισμάτων στην <i>Alternaria alternata</i>	178
<b>Πίνακας II.2.16</b> Δείκτες συνέργειας SRm και SRC στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών (α) και αμιγώς υδατικών -bpte (β) εκχυλισμάτων στον <i>Aspergillus flavus</i>	179
<b>Πίνακας II.2.17</b> Δείκτες συνέργειας SRm και SRC στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών (α) και αμιγώς υδατικών -bpte (β) εκχυλισμάτων στο <i>Fusarium oxysporum</i>	179
<b>Πίνακας II.2.18</b> Δείκτες συνέργειας SRm και SRC στη βιολογική δράση μεταξύ μικτών (α) και αμιγώς υδατικών -bpte (β) εκχυλισμάτων στη <i>Beauveria bassiana</i>	180
<b>Πίνακας II.3.1</b> Επίδραση των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών στην ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή κονιδίων της <i>Alternaria alternata</i> .	200
<b>Πίνακας II.3.2</b> Σύγκριση εμβαδού, έπειτα από ολοκλήρωση, συγκεκριμένων περιοχών	202

του φάσματος της <i>Alternaria alternata</i> για κάθε επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα	
<b>Πίνακας II.3.3</b> Λόγοι εμβαδού υποπεριοχών φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> υπό την επίδραση εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών	209
<b>Πίνακας II.3.4</b> Συντελεστές συσχέτισης συγκεκριμένων του λόγου εμβαδού συγκεκριμένων περιοχών του φάσματος της <i>Alternaria alternata</i> με τη διάμετρο του μυκηλίου	212



## Περιεχόμενα Σχημάτων

	Σελ.
<b>Σχήμα Ι.1.1</b> Η Εξάπλωση του <i>Hyssopus officinalis</i> στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο	9
<b>Σχήμα Ι.1.2</b> Η Εξάπλωση της <i>Salvia officinalis</i> στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο	12
<b>Σχήμα Ι.1.3</b> Η Εξάπλωση του <i>Melissa officinalis</i> στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο	17
<b>Σχήμα Ι.1.4</b> Η Εξάπλωση του <i>Origanum dictamnus</i> στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο	20
<b>Σχήμα Ι.1.5</b> Η Εξάπλωση του <i>Origanum vulgare</i> στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο	24
<b>Σχήμα Ι.1.6</b> Η Εξάπλωση του <i>Crocus sativus</i> στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο	28
<b>Σχήμα Ι.2.1</b> Πρωτογενής και δευτερογενής μεταβολισμός (Αναστασάκη, 2014 – προσαρμοσμένο από Morris and Robbins, 1997)	37
<b>Σχήμα Ι.2.2</b> Κατηγορίες Φαινολικών Ενώσεων (Αναστασάκη, 2014, Προσαρμοσμένο από Robins, 2003)	38
<b>Σχήμα Ι.2.3</b> Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων μέσω του σικιμικού οξέος (Καραμπουρνιώτης σημειώσεις, 2015)	39
<b>Σχήμα Ι.2.4</b> Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων μέσω του μαλονικού οξέος (Καραμπουρνιώτης σημειώσεις, 2015)	40
<b>Σχήμα Ι.2.5</b> Υδροξυκιναμικά οξέα	40
<b>Σχήμα Ι.2.6</b> Υδροξυβενζοϊκά οξέα	41
<b>Σχήμα Ι.2.7</b> Βασικές δομές κοινών κατηγοριών φλαβονοειδών. (1) Φλαβόνες, (2) Φλαβανόνες, (3) ισοφλαβόνες, (4) φλαβονόλες, (5) φλαβανόλες, (6) φλαβανονόλες, (7) ισοφλαβόνες (Bessada et al., 2015)	42
<b>Σχήμα Ι.2.8</b> Φλαβόνες	43
<b>Σχήμα Ι.2.9</b> Φλαβανόλες	43
<b>Σχήμα Ι.2.10.</b> Φλαβανόνες	43
<b>Σχήμα Ι.2.11</b> Ισοπρένιο	44
<b>Σχήμα Ι.2.12</b> Ακυκλα μονοτερπένια	45
<b>Σχήμα Ι.2.13</b> Μονοκυκλικά μονοτερπένια	46
<b>Σχήμα Ι.2.14</b> Δικυκλικά Μονοτερπένια	46
<b>Σχήμα Ι.2.15</b> Μονοκυκλικά σεσκιτερπένια	47
<b>Σχήμα Ι.2.16</b> Δικυκλικά σεσκιτερπένια	47
<b>Σχήμα Ι.2.17</b> Διτερπένια	48
<b>Σχήμα Ι.2.18</b> Τετρατερπένια	49
<b>Σχήμα Ι.2.19</b> Δομές κροκινών	50
<b>Σχήμα ΙΙ. 1.1</b> Διαδικασία εκχύλισης για την παραλαβή εκχυλισμάτων (a), (b), (c)	106
<b>Σχήμα ΙΙ. 1.2</b> Καμπύλες Τιμής G/Συγκέντρωση και %Επίδρασης/Συγκέντρωση	108

<b>Σχήμα II.2.1</b> Διαδικασία εκχύλισης για την παραλαβή εκχυλισμάτων από τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά	140
<b>Σχήμα II.2.2</b> Διαδικασία εκχύλισης για την παραλαβή του αμιγώς υδατικού κλάσματος (-bpte) των εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών	141
<b>Σχήμα II.2.3</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της <i>Alternaria alternata</i> για κάθε επέμβαση	147
<b>Σχ. II.2.4</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm <sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) της <i>Alternaria alternata</i> σε κάθε επέμβαση	148
<b>Σχήμα II.2.5</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της <i>Alternaria alternata</i> για κάθε –bpte επέμβαση	149
<b>Σχήμα II.2.6</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. / cm <sup>2</sup> ) της <i>Alternaria alternata</i> σε κάθε –bpte επέμβαση	149
<b>Σχήμα II.2.7</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου της <i>Alternaria alternata</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	150
<b>Σχήμα II.2.8</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων της <i>Alternaria alternata</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	151
<b>Σχήμα II.2.9</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του <i>Aspergillus flavus</i> για κάθε επέμβαση	152
<b>Σχήμα II.2.10</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων/ cm <sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του <i>Aspergillus flavus</i> σε κάθε επέμβαση	153
<b>Σχ. II.2.11</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του <i>Aspergillus flavus</i> για κάθε -bpte επέμβαση	154
<b>Σχήμα II.2.12</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm <sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του <i>Aspergillus flavus</i> σε κάθε –bpte επέμβαση	154
<b>Σχ. II.2.13</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου του <i>Aspergillus flavus</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	155
<b>Σχήμα II. 2.14</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων του <i>Aspergillus flavus</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	156
<b>Σχήμα. II.2.15</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του <i>Fusarium oxysporum</i> για κάθε επέμβαση	157
<b>Σχήμα II.2.16</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων / cm <sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του <i>Fusarium oxysporum</i> σε κάθε επέμβαση	158
<b>Σχήμα II. 2.17</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου του <i>Fusarium oxysporum</i> για κάθε -bpte επέμβαση	159
<b>Σχήμα. II.2.18</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. κονιδίων/ cm <sup>2</sup> στερεού υποστρώματος) του <i>Fusarium oxysporum</i> σε κάθε –bpte επέμβαση	160

<b>Σχήμα II. 2.19</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου του <i>Fusarium oxysporum</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	161
<b>Σχήμα II.2.20</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων του <i>Fusarium oxysporum</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	161
<b>Σχήμα II.2.21</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της <i>Beauveria bassiana</i> για κάθε επέμβαση	162
<b>Σχήμα II.2.22</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. / cm <sup>2</sup> ) της <i>Beauveria bassiana</i> σε κάθε επέμβαση	163
<b>Σχήμα II 2.23</b> Ανάπτυξη της διαμέτρου του μυκηλίου της <i>Beauveria bassiana</i> για κάθε – bpte επέμβαση	164
<b>Σχήμα II.2.24</b> Συγκέντρωση των κονιδίων (αρ. / cm <sup>2</sup> ) της <i>Beauveria bassiana</i> σε κάθε – bpte επέμβαση	165
<b>Σχήμα II.2.25</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της διαμέτρου του μυκηλίου της <i>Beauveria bassiana</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	166
<b>Σχήμα II.2.26</b> Συγκριτικά ποσοστά αύξησης ή μείωσης της παραγωγής κονιδίων της <i>Beauveria bassiana</i> σε σχέση με το μάρτυρα για όλες τις επεμβάσεις	166
<b>Σχήμα II.2.27</b> Ροσμαρινικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	167
<b>Σχήμα II.2.28</b> Απιγενίνη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	168
<b>Σχήμα II.2.29</b> Καφεϊκό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	168
<b>Σχήμα II.2.30</b> Εριοδικτυόλη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	168
<b>Σχήμα II.2.31</b> Φερουλικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	168
<b>Σχήμα II.2.32</b> Γαλλικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	169
<b>Σχήμα II.2.33</b> Γεντισικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	169
<b>Σχήμα II.2.34</b> Καεμφερόλη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	169
<b>Σχήμα II.2.35</b> Λουτεολίνη. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	170
<b>Σχήμα II.2.36</b> 7-Ο- γλυκοζίτης της λουτεολίνης. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	170



<b>Σχήμα II.2.37</b> π-κουμαρικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	170
<b>Σχήμα II.2.38</b> π-Υδροβενζοϊκό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	171
<b>Σχήμα II.2.39</b> Συριγγικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	171
<b>Σχήμα II.2.40</b> Βανιλικό οξύ. Μοριακός τύπος, Συντακτικός τύπος, Φάσμα UV και χρόνος παρακράτησης	171
<b>Σχήμα II.2.41</b> Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος (-bpte) μελισσόχορτου ( <i>Melissa officinalis</i> ) στα 280nm	172
<b>Σχήμα II.2.42</b> Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος (-bpte) φασκόμηλου ( <i>Salvia officinalis</i> ) στα 280nm	172
<b>Σχήμα II.2.43</b> Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος (-bpte) ρίγανης ( <i>Origanum vulgare</i> ) στα 280nm	173
<b>Σχήμα II.2.44</b> Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος (-bpte) ύσσωπου ( <i>Hyssopus officinalis</i> ) στα 280nm	173
<b>Σχήμα II.2.45</b> Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος (-bpte) δίκταμου ( <i>Origanum dictamnus</i> ) στα 280nm	174
<b>Σχήμα II.2.46</b> Χρωματογραφικό προφίλ HPLC φαινολικών και флаβονοειδών αμιγώς υδατικών εκχυλισμάτων των <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Origanum dictamnus</i> , <i>Origanum vulgare</i> και <i>Salvia officinalis</i> στα 280nm. Προσδιοριζόμενες κορυφές: (1) Γαλλικό οξύ, (2) Χλωρογενικό οξύ, (3) Ρουτίνη, (4) p-υδροβενζοϊκό οξύ, (5) 7-Ο γλυκοζίτης της Λουτεολίνης, (6) Βανιλικό οξύ, (7) 7-Ο-γλυκοζίτης της Απιγενίνης, (8) Ροσμαρινικό οξύ, (9) Λουτεολίνη, (10) Απιγενίνη.	175
<b>Σχήμα II. 3. 1.</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	201
<b>Σχήμα II.3.2</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος <i>Crocus sativus</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	202
<b>Σχήμα II.3.3</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος <i>Hyssopus officinalis</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	203
<b>Σχήμα II.3.4</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος <i>Origanum dictamnus</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	203
<b>Σχήμα II.3.5</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώαση 3 ημερών σε	203

θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος <i>Melissa officinalis</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	
<b>Σχήμα II.3.6</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος <i>Origanum vulgare</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	204
<b>Σχήμα II.3.7</b> FT-IR φάσμα της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώαση 3 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB υπό την επίδραση εκχυλίσματος <i>Salvia officinalis</i> . Τα δεδομένα προέκυψαν από το μέσο όρο 9 ανεξάρτητων επαναλήψεων	204
<b>Σχήμα II.3.8.</b> Υποπεριοχές φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου	207
<b>Σχήμα II.3.9</b> Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα <i>Melissa officinalis</i> , <i>Origanum dictamnus</i> , <i>Salvia officinalis</i> . Β' παράγωγος των υποπεριοχών του φάσματος	210
<b>Σχήμα II.3.9</b> Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα <i>Melissa officinalis</i> , <i>Origanum dictamnus</i> , <i>Salvia officinalis</i> . Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων συνιστωσών σε αντιστοιχία με τη β' παράγωγο από το 3.9	210
<b>Σχήμα II.3.10</b> Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα <i>Melissa officinalis</i> , <i>Origanum dictamnus</i> , <i>Salvia officinalis</i> . Διάγραμμα φορτίου για τις υποπεριοχές του φάσματος	211
<b>Σχήμα II.3.11</b> Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα <i>Crocus sativus</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> . Β' παράγωγος των υποπεριοχών του φάσματος.	211
<b>Σχήμα II.3.12</b> Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα <i>Crocus sativus</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> . Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων συνιστωσών σε αντιστοιχία με τη β' παράγωγο από το 3.11	212
<b>Σχήμα II.3.12</b> Ανάλυση PCA όλων των υποπεριοχών του φάσματος FTIR της <i>Alternaria alternata</i> έπειτα από επώασή της με εκχυλίσματα <i>Crocus sativus</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> . Διάγραμμα φορτίου για όλες τις υποπεριοχές του φάσματος	213
<b>Σχήμα II.4.1</b> Οι κυριότερες δομές αφλατοξινών (B1, B2, G1, G2, M1)	230
<b>Σχήμα II.4.1:</b> Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.	239
<b>Σχήμα II.4.2</b> Πλάκα TLC-Παρατήρηση της παραγωγής αφλατοξίνης του <i>Aspergillus flavus</i> .	241
<b>Σχήμα II.4.3</b> Δέσμη γονιδίων βιοσύνθεσης αφλατοξίνης	242

---

<b>Σχήμα II.4.4</b> Έκφραση των γονιδίων <i>aflr</i> και <i>nor-1</i> μετά την εφαρμογή των υδατικών εκχυλισμάτων σε καλλιέργειες του μύκητα <i>A. flavus</i> .	243
<b>Σχήμα II.4.5</b> Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξινών σε <i>in-vivo</i> δοκιμή <i>P.vera</i> υπό την επέμβαση εκχυλισμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών	245

