



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ (FOOD, NUTRITION AND HEALTH)

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Συγκριτική μελέτη διαφόρων ειδών *Hypericum* ως προς τη χημική τους σύσταση, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα και την αντιμικροβιακή τους δράση»*



Δήμητρα Π. Κώστογλου

Επιβλέπων: Καθηγητής Γ.Π.Α.
Πέτρος Α. Ταραντίλης

ΑΘΗΝΑ
2020

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συγκριτική μελέτη διαφόρων ειδών *Hypericum* ως προς τη χημική τους σύσταση, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα και την αντιμικροβιακή τους δράση

“Comparative evaluation of different *Hypericum* species on their chemical composition, total phenolic component, antioxidant capacity and antimicrobial activity”

Δήμητρα Π. Κώστογλου

Εξεταστική Επιτροπή

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

Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Γκιαούρης Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου (Λήμνος)

Συγκριτική μελέτη διαφόρων ειδών *Hypericum* ως προς τη χημική τους σύσταση, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα και την αντιμικροβιακή τους δράση

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Χημείας

Περίληψη

Τα βότανα του γένους *Hypericum* αποτελούν μονοετείς ή πολυετείς πόες και εμφανίζουν ερευνητικό ενδιαφέρον, τόσο για τις διαφοροποιήσεις στη φυτοχημεία τους όσο και για τη βιοδραστικότητά τους. Το *H. perforatum* είναι το πιο μελετημένο είδος για την επουλωτική, αντική, αντιβακτηριακή, αντικαταθλιπτική, αντικαρκινική και άλλες δράσεις του, που έχουν αποδοθεί στη χημική σύσταση του φυτού και ιδιαιτέρως στην περιεκτικότητά του σε φαινολικές ενώσεις (ναφθοδιανθρόνες, φλωρογλυκινόλες, φλαβονοειδή). Στην παρούσα μελέτη, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα τεσσάρων ειδών *Hypericum* (*H. perforatum*, *H. cycladicum*, *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*, *H. perforatum*), αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία (LC-DAD-MS). Επίσης, εκτιμήθηκε το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις δοκιμασίες DPPH και ABTS, και η αντιβακτηριδιακή τους δράση με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ και τη δοκιμασία μικροαραιώσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη (ως δείκτης της μεταβολικής δραστηριότητας). Τα χρωματογραφήματα LC-DAD-MS των τεσσάρων ειδών *Hypericum* φανέρωσαν ορισμένες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χημικών προφίλ των ειδών, με το *H. perforatum* να εμφανίζει τις περισσότερες διαφορές σε ποιοτικό επίπεδο. Η κύρια κορυφή που ταυτοποιήθηκε στα χρωματογραφήματα των *H. perforatum* και *H. perforatum* αποδόθηκε στην χημική ένωση 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης, ενώ για τα *H. cycladicum* και *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* στην χημική ένωση μυρικιτρίνη. Από τα αποτελέσματα των δύο αντιοξειδωτικών δοκιμασιών, φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα *H. perforatum* και *H. perforatum* είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δείγματα *H. cycladicum* και *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις είχε το εκχύλισμα *H. perforatum* (17,22 mg/mL) και τη χαμηλότερη το *H. perforatum* (7,30 mg/mL). Κατά τον έλεγχο της αντιβακτηριδιακής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο διάχυσης από

βοθρίο σε άγαρ, δεν παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Αντίθετα, με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη η ανάπτυξη του στελέχους DFSN_B77 (*E.coli* O157:H7, Gram⁻) παρεμποδίστηκε από όλα τα εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 50 mg/mL. Μάλιστα παρατηρήθηκε πληθυσμιακή μείωση μεγαλύτερη από 99,9% από τον αρχικό πληθυσμό, με εξαίρεση το δείγμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Σε συμφωνία των δύο μεθόδων, το δείγμα *H. perforatum* ήταν το πιο δραστικό εκχύλισμα στη χαμηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε με την εκάστοτε μέθοδο, όσον αφορά τα θετικά κατά Gram στελέχη. Αντίθετα, το δείγμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* παρουσίασε την πιο ασθενή αντιβακτηριακή δράση. Το στέλεχος DFSN_B98 (*S. mutans*) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα εκχυλίσματα και ιδιαιτέρως στο εκχύλισμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Ωστόσο, για τη μείωση του αρχικού πληθυσμού του DFSN_B98 κατά 99,9% (MBC) με εκχύλισμα *H. perfoliatum* απαιτήθηκε η ίδια συγκέντρωση με αυτή του *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης φαίνεται να υπάρχει μία θετική συσχέτιση της ποσότητας αλλά κι της ποιότητας των φαινολικών συστατικών με την αντιοξειδωτική και την αντιμικροβιακή δράση, καθώς το *H. perforatum* που περιείχε σε μεγαλύτερη αφθονία τον 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης και υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο από τα υπόλοιπα είδη *Hypericum*, ήταν και αυτό που παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση.

Επιστημονική περιοχή: Επιστήμη Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: *Hypericum* spp., φαινολικές ενώσεις, Υγρή Χρωματογραφία, LC-DAD-MS, DPPH, ABTS, Folin – Ciocalteu, αντιμικροβιακή δράση, MIC, MBC, μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ, δοκιμασία μικροαραίωσης σε ζωμό, ρεσαζουρίνη

Comparative evaluation of different *Hypericum* species on their chemical composition, total phenolic component, antioxidant capacity and antimicrobial activity

*Department of Food Science and Human Nutrition
Chemistry laboratory*

Abstract

Herbs of the genus *Hypericum* are annual or perennial plants and show a great research interest, both for their diversities in phytochemistry and bioactivity. *H. perforatum* is the most widely studied species for its healing, antiviral, antibacterial, antidepressant, anti-cancer and other functions, which have been attributed to the chemical composition of the plant and specifically its phenolic compounds content (naphthodianthrones, phloroglucinols, flavonoids). In the present study, the hydromethanolic extracts of four *Hypericum* species (*H. perforatum*, *H. cycladicum*, *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*, *H. perforatum*) were analyzed through liquid chromatography (LC-DAD-MS). Their total phenolic content was also evaluated with the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant capacity with the DPPH and ABTS assays, and antibacterial activity with agar well diffusion method and broth microdilution assay with resazurin (as metabolic activity indicator). LC-DAD-MS chromatograms of the four *Hypericum* species revealed some variations among the chemical profiles of the species, with *H. perforatum* presenting the biggest quality differences. The major peak identified in *H. perforatum* and *H. perforatum* chromatograms was attributed to the quercetin-3- β -D-glucoside compound, while the major peak identified in *H. cycladicum* and *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* was attributed to myricitrin. The results of the two antioxidant tests showed that the extracts of *H. perforatum* and *H. perforatum* had stronger antioxidant capacity than *H. cycladicum* and *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Regarding the results of Folin-Ciocalteu method, the highest content of total phenolic compounds was in *H. perforatum* extract (17,22 mg / mL) and the lowest was in *H. perforatum* (7,30 mg / mL). During testing the antibacterial activity of the extracts by agar well diffusion method, no inhibitory effect was observed on Gram-negative bacteria. On the contrary, by broth microdilution assay with resazurin the growth of strain DFSN_B77 (E.coli O157: H7, Gram⁻) was inhibited by all extracts at a concentration of 50 mg / mL. In fact, a population decrease of more than 99.9% was observed compared to the initial population, with the exception of

the sample *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. In agreement of the two methods, *H. perforatum* was the most active extract at the lowest concentration tested by the respective method, in terms of Gram-positive strains. On the contrary, *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* showed the weakest antibacterial activity. Strain DFSN_B98 (*S. mutans*) showed the highest resistance to all extracts and especially to *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. However, in order to reduce the initial population of DFSN_B98 by 99.9% (MBC) with *H. perforatum* extract, the same concentration as *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* was required. From the results of this study there seems to be a positive correlation of the quantity but also the quality of the phenolic components with the antioxidant and antimicrobial activity, as *H. perforatum* which contained in greater abundance the quercetin-3- β -D-glucoside and higher total phenolic content than other *Hypericum* species was also the one that showed the strongest antioxidant and antibacterial activity.

Scientific area: Food Science

Key words: *Hypericum* spp., phenolic compounds, Liquid Chromatography, LC-DAD-MS, DPPH, ABTS, Folin – Ciocalteu, antimicrobial activity, MIC, MBC, agar well diffusion method, broth microdilution assay, resazurin

Στη μνήμη του Harvey...

I. Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο **Εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**, το χρονικό διάστημα 2019 – 2020. Ένα σημαντικό μέρος αυτής, το μικροβιολογικό, εκπονήθηκε στο **Εργαστήριο Βιολογίας, Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστημίου Αιγαίου**, στη Λήμνο. Για τη διεκπεραίωση της μελέτης που επέλεξα απαιτήθηκε καλή διάθεση, χρόνος, κόπος, αμέριστη υπομονή και συνεργασία με ανθρώπους που θα αναφέρω ονομαστικά παρακάτω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, **Καθηγητή κύριο Πέτρο Α. Ταραντίλη** που μου έδειξε εμπιστοσύνη αναθέτοντάς μου ένα θέμα που επιθυμούσα και μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω καινούρια πράγματα στο εργαστήριο του τμήματος.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στον **Επίκουρο Καθηγητή κύριο Ευστάθιο Γκιαούρη** που για μία ακόμη φορά με εμπιστεύθηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω το μικροβιολογικό μέρος της διπλωματικής μου στο εργαστήριο του τμήματος στην όμορφη Λήμνο, δίνοντάς μου συνεχώς πολύτιμες συμβουλές, αποτελώντας για εμένα αστείρευτη πηγή έμπνευσης.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ελένη Κακούρη που μέσα από το δύσκολο και απαιτητικό πρόγραμμά της έβρισκε χρόνο για να με καθοδηγήσει και να με συμβουλέψει, καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής. Στα μέλη του εργαστηρίου, την κ. Νάντια Ασπρακά και την κ. Δήμητρα Δαφερέρα επίσης οφείλω ένα «ευχαριστώ» για την πολύτιμη βοήθειά τους αλλά και στις νέες μου φίλες την Αντωνέλα και την Τζίνα που η αλληλεπίδραση μαζί τους ήταν η πιο ευχάριστη και ωφέλιμη εμπειρία που είχα μέσα στον εργαστηριακό χώρο αλλά και εκτός αυτού.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου που με υποστήριξε αυτό τον δύσκολο χρόνο αλλά και όλους τους κοντινούς μου φίλους, παλιούς και νέους, που ομόρφυναν την καθημερινότητά μου όπως κάνουν πάντα.

II. Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	iii
Abstract.....	v
I. Ευχαριστίες.....	viii
II. Πίνακας Περιεχομένων	ix
III. Κατάλογος Εικόνων	xiii
IV. Κατάλογος Πινάκων.....	xviii
Κεφάλαιο 1	1
Εισαγωγή	1
1.1 Το γένος <i>Hypericum L.</i>	1
1.1.1 Σύγχρονη ταξινομική προσέγγιση.....	1
1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους.....	2
1.1.3 Γεωγραφική εξάπλωση	4
1.1.4 Ετυμολογία – Ονομασίες - Ιστορικά στοιχεία - Λαϊκή Θεραπευτική	4
1.1.5 Χρήσεις στη φαρμακευτική και ως συμπλήρωμα διατροφής - κλινικά στοιχεία, αλληλεπιδράσεις και παρενέργειες.....	5
1.2 Βιολογικές δραστικές χημικές ενώσεις του γένους <i>Hypericum L.</i>	7
1.2.1 Φλωρογλυκινόλες	8
1.2.1.1 Βιοδραστικότητα	9
1.2.2 Ναφθοδιανθρόνες	10
1.2.2.1 Βιοδραστικότητα.....	11
1.2.3 Φλαβονοειδή	13
1.2.3.1 Βιοδραστικότητα	14
1.2.4 Πτητικά συστατικά	15
1.2.4.1 Βιοδραστικότητα	16
1.3 Παρουσίαση επιλεγμένων ειδών του γένους <i>Hypericum</i>	16
1.3.1 <i>Hypericum perforatum L.</i>	16
1.3.2 <i>Hypericum perforatum L.</i>	17
1.3.3 <i>Hypericum cycladicum</i> Trigas	18
1.3.4 <i>Hypericum rumeliacum</i> subsp. <i>apollinis</i> Boiss	18
Κεφάλαιο 2	20

Μέθοδοι χημικής ανάλυσης και ελέγχου της βιοδραστηκότητας φυσικών προϊόντων	20
2.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του περιεχομένου φυτικών πολυφαινόλων και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης	20
2.1.1 Δοκιμασία DPPH.....	20
2.1.2 Δοκιμασία ABTS	21
2.1.3 Μέθοδος Folin – Ciocalteu.....	21
2.2 Χημική ανάλυση φυσικών προϊόντων	21
2.2.1 Χρωματογραφία.....	22
2.2.1.1 Υγρή Χρωματογραφία	24
2.2.2 Αέρια Χρωματογραφία	25
2.3 Μέθοδοι ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης	25
2.3.1 Μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ	27
2.3.2 Μέθοδος μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζωμό	28
2.3.3 Δοκιμασία μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη	29
Κεφάλαιο 3	31
Σκοπός	31
Κεφάλαιο 4	32
Πειραματικό μέρος	32
4.1 Πρώτες ύλες, Αντιδραστήρια και Όργανα	32
4.1.1 Προμήθεια φυτικού υλικού	32
4.1.2 Διαλύτες, Αντιδραστήρια, Πρότυπες ενώσεις και Θρεπτικά υλικά	32
4.1.3 Οργανολογία	33
4.2 Διαγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας	34
4.3 Εκχύλιση των <i>Hypericum spp.</i>	34
4.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων	34
4.3.2 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	34
4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας <i>in vitro</i> των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i>	35
4.4.1 Δοκιμασία DPPH.....	35
4.4.2 Δοκιμασία ABTS	36

4.5 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου <i>in vitro</i> των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i> με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	37
4.6 Χημική ανάλυση των εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i>	38
4.6.1 Χημική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS)	38
4.7 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i>	39
4.7.1 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων	41
4.7.2 Προετοιμασία καλλιιεργειών εργασίας μικροοργανισμών δεικτών	41
4.7.3 Εκτίμηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών δεικτών στα εκχυλίσματα <i>Hypericum</i> με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ	42
4.7.4 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό	43
4.7.4.1 Μέθοδος μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη	46
Κεφάλαιο 5	48
Αποτελέσματα	48
5.1 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i> – Αποδόσεις φυτικών υλικών	48
5.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i>	48
5.2.1 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμασίας DPPH	48
5.2.2 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμασίας ABTS	51
5.2.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων των αντιοξειδωτικών δοκιμασιών DPPH και ABTS	55
5.3 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου <i>in vitro</i> των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i> με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	56
5.4 Χημική ανάλυση	57
5.4.1 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS)	57
5.5 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων <i>Hypericum spp.</i>	68
5.5.1 Εκτίμηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών δεικτών στα εκχυλίσματα <i>Hypericum</i> με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ	68

5.5.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> – Μέθοδος μικροαραίωσης σε ζυμό με ρεσαζουρίνη.	72
5.5.3 Σύγκριση των <i>in vitro</i> δοκιμασιών εκτίμησης της αντικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i>	75
Κεφάλαιο 6	77
Συζήτηση – Συμπεράσματα	77
Βιβλιογραφία	84
Παραρτήματα	104
Παράρτημα Α	104
Παράρτημα Β	111
Παράρτημα Γ	114

III. Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Φωτογραφία υπερίκου (Πηγή (1)).....	1
Εικόνα 2: <i>Hypericum albiflorum</i> (Πηγή: (7)).	2
Εικόνα 3: Απεικόνιση φαρμάκων (Πηγή: (3))	7
Εικόνα 4: <i>Hypericum perforatm L.</i> (Πηγή (5)).....	16
Εικόνα 5: <i>H. perfoliatum L.</i> (Πηγή (8)).	17
Εικόνα 6: <i>H. cycladicum</i> Trigas (Πηγή: (9)).....	18
Εικόνα 7: <i>H. rumeliacum subsp. apollinis</i> (Πηγή: (6)).	18
Εικόνα 8: Διάγραμμα μεθόδων <i>in vitro</i> αξιολόγησης αντιμικροβιακής δράσης παραγόντων.	27
Εικόνα 9 Η αρχή της δοκιμασίας βιωσιμότητας κυττάρων με ρεσαζουρίνη (Πηγή: (9)).	30
Εικόνα 10: Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας.....	34
Εικόνα 11: Υδρομεθανολικό εκχύλισμα HC.....	34
Εικόνα 12: Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων HC, HP, HR, HPL (από αριστερά προς τα δεξιά), μετά το στάδιο της λυσοφιλίωσης.	35
Εικόνα 13: Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας-συστοιχίας φωτοδιοδών-μασματομετρίας μαζών (LC-DAD-MS) που χρησιμοποιήθηκε.	38
Εικόνα 14: Διάγραμμα μεθοδολογίας εμβολιασμού μικροπλακιδίου.....	44
Εικόνα 15: Σχεδιάγραμμα διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος <i>Hypericum</i> , για τα αρνητικά (πάνω) και τα θετικά (κάτω) κατά gram στελέχη, σε μικροπλακίδιο πολυστυρενίου 96 βοθρίων.	46
Εικόνα 16: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος με τη δοκιμασία DPPH.	49
Εικόνα 17: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> με τη μέθοδο DPPH.....	49
Εικόνα 18: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. cycladicum</i> με τη μέθοδο DPPH.....	50
Εικόνα 19: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. rumeliacum ssp. apollinis</i> με τη μέθοδο DPPH.....	50
Εικόνα 20: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. perfoliatum</i> με τη μέθοδο DPPH.....	51
Εικόνα 21: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος με τη δοκιμασία ABTS.	52
Εικόνα 22: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> με τη μέθοδο ABTS.....	53
Εικόνα 23: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. cycladicum</i> με τη μέθοδο ABTS.	53
Εικόνα 24: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. rumeliacum ssp apollinis</i> με τη μέθοδο ABTS.....	54
Εικόνα 25: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>H. perfoliatum</i> με τη μέθοδο ABTS.	54
Εικόνα 26: Ραβδογράμμα σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (<i>H.perforatum</i> (HP), <i>H. cycladicum</i> (HC), <i>H. rumeliacum ssp. apollinis</i> (HR), <i>H. perfoliatum</i> (HPL)) και πρότυπης καφεϊκού οξέος (CA) με τις μεθόδους DPPH και ABTS.	56
Εικόνα 27: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος με τη δοκιμασία Folin – Ciocalteu.....	57

Εικόνα 28: LC-DAD-MS χρωματογράφημα των τεσσάρων δειγμάτων <i>Hypericum</i>	58
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος <i>Hypericum perforatum</i> με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Κατεχίνη (2) Χλωρογενικό οξύ (3) Επικατεχίνη (4) 3-β-D- γλυκοζίτης της κερκετίνης (5) Ελλαγικό οξύ (6) Κερκιτρίνη (7) Πρωτοϋπερικήνη (8) Κερκετίνη.	59
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος <i>Hypericum cycladicum</i> με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Χλωρογενικό οξύ (2) Επικατεχίνη (3) <i>Hyperjovinoi B</i> (4) Μυρικιτρίνη (5) 3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (6) Ελλαγικό οξύ (7) Κερκιτρίνη (8) Κερκετίνη.....	61
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος <i>Hypericum rumeliacum ssp. apollinis</i> με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Χλωρογενικό οξύ (2) Επικατεχίνη (3) <i>Hyperjovinoi B</i> (4) Μυρικιτρίνη (5) 3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (6) Ελλαγικό οξύ (7) Κερκιτρίνη (8) 3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης (9) Κερκετίνη.	63
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος <i>Hypericum perfoliatum</i> με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Κατεχίνη (2) Χλωρογενικό οξύ (3) Επικατεχίνη (4) <i>Hyperjovinoi B</i> (5) Γαλλική επικατεχίνη (6) Οριεντίνη (7) Γενιστίνη & Ψευδοϋπερικήνη (8) 3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (9) Πρωτοϋπερικήνη & Ελλαγικό οξύ (10) Κερκιτρίνη (11) 3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης (12) Κερκετίνη (13) Καμφερόλη.	65
Εικόνα 33: Σύγκριση του χημικού προφίλ των τεσσάρων ειδών <i>Hypericum</i> ως προς την περιεκτικότητά του σε κύριες ομάδες χημικών ενώσεων.	68
Εικόνα 34: Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> έναντι στα (Α) <i>S. epidermidis</i> , (Β) <i>S. aureus</i> , (Γ) <i>L. monocytogenes</i> (Δ) <i>S. mutans</i> (Ε) <i>E. faecalis</i>	71
Εικόνα 35: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> έναντι σε στελέχη <i>S. aureus</i> και <i>L. monocytogenes</i>	72
Εικόνα 36: Ανίχνευση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> με τη χρήση ρεσαζουρίνης.	73
Εικόνα 37: Ανίχνευση του τελικού σημείου της MIC με τη δοκιμασία μικροαραίωσης σε ζυμό με ρεσαζουρίνη.....	74
Εικόνα 38: Συγκεντρωτικά ραβδογράμματα σύγκρισης των δύο μεθόδων ελέγχου της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των θετικών κατά Gram εξετασθέντων βακτηριακών στελεχών στα εκχυλίσματα <i>Hypericum</i> . Όπου HP: <i>H. perforatum</i> , HC: <i>H. cycladicum</i> , HR: <i>H. rumeliacum ssp. apollinis</i> και HPL: <i>H. perfoliatum</i>	76
Εικόνα 39: Ανίχνευση της κορυφής της κατεχίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum ssp. apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	104
Εικόνα 40: Ανίχνευση της κορυφής του χλωρογενικού οξέος σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum ssp. apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	104
Εικόνα 41: Ανίχνευση της κορυφής της επικατεχίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το	

κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	105
Εικόνα 42: Ανίχνευση της κορυφής της γαλλικής επικατεχίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	105
Εικόνα 43: Ανίχνευση της κορυφής της οριεντίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	106
Εικόνα 44: Ανίχνευση της κορυφής της γενιστίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	106
Εικόνα 45: Ανίχνευση της κορυφής της μυρικιτρίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	107
Εικόνα 46: Ανίχνευση της κορυφής του 3-β-D- γλυκοζίτη της κερκετίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	107
Εικόνα 47: Ανίχνευση της κορυφής του ελλαγικού οξέος σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	108
Εικόνα 48: Ανίχνευση της κορυφής του 7-O- γλυκοζίτη της απιγενίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	108
Εικόνα 49: Ανίχνευση της κορυφής της κερκιτρίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	109
Εικόνα 50: Ανίχνευση της κορυφής του 3-O- γλυκοζίτη της καμφερόλης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	109
Εικόνα 51: Ανίχνευση της κορυφής της κερκετίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	110
Εικόνα 52: Ανίχνευση της κορυφής της καμφερόλης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο <i>H. perforatum</i> , το	

κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	110
Εικόνα 53: Φάσμα UV-Vis ($\lambda=270$ nm). Το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί στο δείγμα <i>H. perforatum</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	111
Εικόνα 54: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού πρωτοϋπερικίνης στο δείγμα <i>H. perfoliatum</i>	111
Εικόνα 55: Ανίχνευση αρνητικού ιόντος της πρωτοϋπερικίνης στο δείγμα <i>H. perforatum</i>	112
Εικόνα 56: Ανίχνευση της κορυφής της <i>HyperjovinoI B</i> σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το κόκκινο στο <i>H. cycladicum</i> , το μπλε στο <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> και το πράσινο στο <i>H. perfoliatum</i>	112
Εικόνα 57: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού της ψευδοϋπερικίνης.....	113
Εικόνα 58: Ανίχνευση των αρνητικών ιόντων της ψευδοϋπερικίνης και της γενιστίνης στο δείγμα <i>H. perfoliatum</i>	113
Εικόνα 59: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. epidermidis</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO). ..	114
Εικόνα 60: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. aureus</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	114
Εικόνα 61: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>L. monocytogenes</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	115
Εικόνα 62: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perforatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. mutans</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	115
Εικόνα 63: MIC του εκχυλίσματος <i>H. cycladicum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. epidermidis</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO). ..	116
Εικόνα 64: MIC του εκχυλίσματος <i>H. cycladicum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. aureus</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	116
Εικόνα 65: MIC του εκχυλίσματος <i>H. cycladicum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>L. monocytogenes</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	117
Εικόνα 66: MIC του εκχυλίσματος <i>H. cycladicum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. mutans</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	117
Εικόνα 67: MIC του εκχυλίσματος <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. epidermidis</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	118
Εικόνα 68: MIC του εκχυλίσματος <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. aureus</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	118
Εικόνα 69: MIC του εκχυλίσματος <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>L. monocytogenes</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	119
Εικόνα 70: MIC του εκχυλίσματος <i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. mutans</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	119
Εικόνα 71: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perfoliatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. epidermidis</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO). ..	120

Εικόνα 72: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perfoliatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. aureus</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	120
Εικόνα 73: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perfoliatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>L. monocytogenes</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	121
Εικόνα 74: MIC του εκχυλίσματος <i>H. perfoliatum</i> έναντι στο βακτηριακό στέλεχος <i>S. mutans</i> . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).	121

IV. Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση LC-DAD-MS.....	39
Πίνακας 2: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε	39
Πίνακας 3: Μικροοργανισμοί δείκτες ελέγχου αντιμικροβιακής δραστηριότητας εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i>	40
Πίνακας 4: Μέσος όρος αποδόσεων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων εκφρασμένων ως mg εκχυλίσματος/g φυτικού υλικού \pm την τυπική απόκλιση (SD) (n=3).	48
Πίνακας 5: Προυσίαση των τιμών IC50 των δειγμάτων κατά φθίνουσα σειρά (δοκιμασία DPPH).....	51
Πίνακας 6: Προυσίαση των τιμών IC50 των δειγμάτων κατά φθίνουσα σειρά (δοκιμασία ABTS).	55
Πίνακας 7: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων εκπεφρασμένο σε mg/g ξηρής δρόγης. Οι τιμές των απορροφήσεων αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποτελεσμάτων \pm την τυπική απόκλιση (SD) (n=3).	57
Πίνακας 8: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους <i>Hypericum perforatum</i> . ..	60
Πίνακας 9: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους <i>Hypericum cycladicum</i>	62
Πίνακας 10: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους <i>Hypericum rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	64
Πίνακας 11: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους <i>Hypericum perforatum</i>	66
Πίνακας 12: Παρουσίαση των χημικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν από τα τέσσερα εκχυλίσματα <i>Hypericum</i>	67
Πίνακας 13: Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> που απαιτήθηκαν για να παρατηρηθεί παρεμπόδιση ανάπτυξης (ζώνη αναστολής) των μικροοργανισμών δεικτών με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ.....	69
Πίνακας 14: Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> , σε πέντε επιλεγμένες συγκεντρώσεις, έναντι πέντε θετικών κατά Gram στελεχών, με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποτελεσμάτων με \pm την τυπική απόκλιση τριών βιολογικών επαναλήψεων.	70
Πίνακας 15: Αποτελέσματα των ελάχιστων ελάχιστων ανασταλτικών (MIC) και βακτηριοκτόνων (MBC) συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων <i>Hypericum</i> έναντι στους μικροοργανισμούς δείκτες.....	74

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Το γένος *Hypericum* L.

Η ύπαρξη του γένους *Hypericum* χρονολογείται στα μέσα της Παλαιογενούς περιόδου, ενώ οι πρόγονοι του γένους αυτού πιθανώς ήταν τροπικοί θάμνοι οι οποίοι μετανάστευσαν από την Αφρική στην Παλαιαρκτική ταυτόχρονα με την εξάπλωση του τροπικού κλίματος σε βορειότερα γεωγραφικά πλάτη.



Εικόνα 1: Φωτογραφία υπερικού (Πηγή (1)).

Από μοριακές μελέτες πιθανολογείται πως οι χαμηλότερες θερμοκρασίες που επικράτησαν στη Γη από τα μέσα της Παλαιογενούς περιόδου (Mid Tertiary) μπορεί να προώθησαν την προσαρμογή των προγόνων του *Hypericum* σε εύκρατα κλίματα, με την ανάπτυξη ποώδους μορφής (*herbaceous habit*) και αδιαφοροποίητων στεφάνων (*unspecialized corollas*) (Meseguer *et al.*, 2013).

Ο Linnaeus ήταν ο πρώτος που αντιμετώπισε το γένος *Hypericum* ως φυσική ομάδα (*natural unit*). Στην οικογένεια *Hypericaceae* ανήκουν εννέα γένη, τα *Cratoxylum* Blume, *Eliea* Cambess, *Harungana* Lamarck, *Hypericum* L., *Lianthus* N. Robson, *Santomasia* N. Robson, *Thornea* Breedlove & McClintock, *Triadenum* Rafinesque, και *Vismia* Vand (Robson 1977, 1981). Το γένος *Hypericum* και τα συγγενικά σε αυτό γένη δεν είναι σαφές ακόμη αν αποτελούν ξεχωριστή οικογένεια, την *Hypericaceae* ή ανήκουν στην υποοικογένεια *Hypericoideae* της *Guttiferae sensu lato*, ωστόσο περίπου το 80% της ποικιλότητας της οικογένειας προέρχεται από το γένος *Hypericum* (Carine & Christenhusz 2013, Crockett & Robson 2011).

1.1.1 Σύγχρονη ταξινομική προσέγγιση

Το γένος *Hypericum* ανήκει στα λίγα μεγάλα γένη για τα οποία υπάρχει σχεδόν πλήρης ταξινομική προσέγγιση. Ο Norman Robson δημοσίευσε μία σειρά μονογραφιών για το γένος *Hypericum* όπου περιέγραψε πολυάριθμα είδη και χαρακτήρισε τους κύριους διαγνωστικούς χαρακτήρες για την ταξινόμηση του

γένους αυτού. Από το 1977 έως το 2012 δημοσίευσε τη μονογραφία “Studies in the genus *Hypericum* L.” σε οχτώ μέρη (Robson, 1977, 1981, 1985, 1987, 1990, 1996, 2001, 2002, 2006, 2010a, 2010b, 2012). Το πρώτο μέρος της μονογραφίας διαχωρίζει το γένος σε 36 τμήματα (sections), στο δεύτερο μέρος περιγράφονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους και τα μέρη 3 – 8 της μονογραφίας εξετάζουν τα τμήματα και τις ταξινομικές βαθμίδες (taxa) εντός αυτών, όπως αναφέρεται και από τους Carine & Christenhusz (2013). Τα μέρη της μονογραφίας παρέχουν ταξινομική περιγραφή των ειδών, εργαλεία ταξινομικού προσδιορισμού και πληροφορίες σχετικά με την εξάπλωση και τις εξελικτικές σχέσεις του γένους (Dauncey et al., 2017).

Μέχρι και σήμερα νέα είδη του γένους *Hypericum* αναγνωρίζονται, όπως είναι το προσφάτως αναγνωρισμένο είδος *Hypericum cycladicum* Trigas από τις Κυκλάδες το οποίο περιγράφηκε και αποτελεί μέλος του τμήματος *Drosocarpium* (Trigas 2018).

1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους

Το γένος *Hypericum* περιλαμβάνει δέντρα, θάμνους, πολυετείς και μονοετείς πόες. Τα δέντρα με την κλασική έννοια του όρου, του να έχουν ένα μοναδικό στέλεχος, είναι σπάνια μέσα στο γένος αφού τα περισσότερα ξυλώδη μέλη έχουν πολλαπλά στελέχη που δημιουργούνται κοντά στη βάση του φυτού.



Εικόνα 2: *Hypericum albiflorum* (Πηγή: (7)).

Παρόλα αυτά κάποιες ταξινομικές βαθμίδες του τμήματος *Campylosporus*, στην Αφρική, φτάνουν σε ύψος άνω των 10 μέτρων και μπορούν να σχηματίζουν ξυλώδη βλαστό. Οι θαμνώδεις ταξινομικές βαθμίδες του γένους αναπτύσσουν όρθιους (erect) ή έρποντες (spreading) βλαστούς, οι οποίοι όμως δεν ριζοβολούν στα γόνατα που έρχονται σε επαφή με το έδαφος. Οι πολυετείς πόες παρουσιάζουν την τάση να ριζοβολούν από γόνατα που βρίσκονται οριζόντια προς το έδαφος, ιδιαίτερα σε υδάτινα ενδιαιτήματα. Οι μονοετείς πόες αντίθετα, τείνουν να έχουν μια κεντρική ρίζα και πολύ ανεπτυγμένο σύστημα δευτερογενών ριζικών τριχιδίων (Robson 1981, Crockett & Robson 2011). Σε ορισμένες περιπτώσεις η μορφή των τριχιδίων στα

διάφορα όργανα των φυτών αποτελεί διαγνωστικό μορφολογικό χαρακτηριστικό για τον προσδιορισμό των ειδών (π.χ. *H. barbatum* και *H. rumeliacum*) ενώ το μέγεθος και ο αριθμός των αδένων συσχετίζεται θετικά με την περιεκτικότητα σε ναφθοδιανθρόνες (Zobayed et al., 2006; Robson 2010a).

Τα φύλλα είναι σχεδόν πάντα σε αντίθετη σταυροειδή (decussate) διάταξη ενώ δεν εντοπίζονται παράφυλλα (stipules). Τόσο στο εσωτερικό των φύλλων όσο και περιφερειακά εντοπίζονται σκουρόχρωμοι και ανοιχτόχρωμοι αδένες, όπου οι τελευταίοι εμφανίζονται ως φωτεινές κηλίδες ή γραμμές, υπό το φως. Επίσης, η ύπαρξη και η διάταξη των αδένων και των τριχιδίων στα σέπαλα, αποτελεί βασικό διαγνωστικό μορφολογικό χαρακτηριστικό μεταξύ διαφόρων ειδών του γένους. Τα πέταλα του *Hypericum* είναι σχεδόν πάντα ομοιόμορφα κίτρινα ενώ σε ορισμένες ταξινομικές βαθμίδες έχουν παρατηρηθεί ροζ πέταλα (*H. albiflorum* var. *albiflorum* και *H. geminiflorum*) και σε άλλα κόκκινοι χρωματισμοί (γραμμές, κηλίδες) στην εξωτερική πλευρά των πετάλων, που είναι εμφανείς κυρίως όταν τα άνθη είναι κλειστά. Τα πέταλα, όπως και τα σέπαλα μπορεί να είναι ισομήκη ή άνισα και ασύμμετρα και στην περιφέρεια τους μπορεί να εμφανίζονται αδένες, ελαφρές οδοντώσεις και βλεφαρίδες (*cilia*).

Στην εξωτερική επιφάνεια των καρπών του γένους *Hypericum* αναπτύσσονται συγκεκριμένοι επιμήκεις ή στικτοί αδένες, με μεγάλη ποικιλότητα σχημάτων και διάταξης ενώ το χρώμα τους είναι συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο (pale amber) και σπάνια μαύρο (ορισμένες ταξινομικές βαθμίδες στο τμήμα *Drosocarpium*) (Crockett & Robson 2011). Ο τύπος των αδένων, η διάταξη και το χρώμα τους αποτελεί βασικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό μεταξύ ειδών αλλά και υποειδών (π.χ. υποείδη *H. perforatum*) (Ciccarelli et al., 2002). Σύμφωνα με τους Gronquist et al. (2001) και Crockett et al. (2008), όπως αναφέρεται από τους Crockett και Robson (2011), οι εκχυλίσες των εξωτερικών επιφανειών των καρπών συγκεκριμένων ειδών είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση της φλωρογλυκινόλης (phloroglucinol) και άλλων τερπενοειδών παραγώγων, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μια βιοσυνθετική συσχέτιση μεταξύ αυτών των αδένων και των ωχρών αδένων (pale glands) του φυτικού ιστού. Τέλος, τα σπέρματα (seeds) των *Hypericum* είναι μικρά (0,3 - 1,5 mm), κίτρινα – καφέ έως σκούρα μωβ, κυλινδρικά

έως ελλειπτικά και μπορεί να φέρουν πτερύγια (narrowly winged) (Crockett & Robson 2011).

1.1.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Το γένος *Hypericum* είναι ένα από τα 100 μεγαλύτερα γένη που περιλαμβάνει το 22% της ποικιλίας αγγειόσπερμου και αποτελείται από 484 είδη από 36 τμήματα (Carine & Christenhusz, 2010; Crockett & Robson, 2011). Κατανέμεται και στα δύο ημισφαίρια σε εύκρατες, υπο-τροπικές και ορεινές τροπικές περιοχές. Οι πληθυσμοί του φύονται σε ποικίλα ενδιαιτήματα, από απότομες βραχώδεις παραθαλάσσιες πλαγιές μέχρι υγροβιότοπους, καθώς και κοντά σε καλλιέργειες. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί τουλάχιστον 50 ταξινομικές βαθμίδες (35 είδη και 15 υποείδη) και κατατάσσονται σε 13 ομάδες, εκ των οποίων οι 12 ταξινομικές βαθμίδες είναι ελληνικά ενδημικά φυτά και κατατάσσονται σε 6 ομάδες (2).

Η λεκάνη της Μεσογείου έχει αναγνωριστεί ως το επίκεντρο (hot spot) της ποικιλομορφίας για το γένος *Hypericum*, και ως εκ τούτου είναι μια περιοχή στην οποία υπάρχουν πολλά ενδημικά είδη. Τα είδη που ανήκουν σε τμήματα που διανέμονται σε αυτήν την περιοχή του κόσμου παρουσιάζουν σημαντική μορφολογική και φυτοχημική ποικιλομορφία. Αυτό μάλιστα θεωρείται το κύριο πρόβλημα στην τυποποίηση των φαρμακευτικών προϊόντων και των συμπληρωμάτων διατροφής που παράγονται από το γένος *Hypericum*, γι' αυτό και παρόλη την πληθώρα δημοσιευμένων εργασιών η έρευνα επί του γένους εξακολουθεί να έχει ενδιαφέρον (Nürk & Crockett, 2012; Cirak & Radusiene, 2019).

1.1.4 Ετυμολογία – Ονομασίες - Ιστορικά στοιχεία - Λαϊκή Θεραπευτική

Το όνομα *Hypericum* – υπερικόν προέρχεται από της ελληνικές λέξεις «υπέρ» (πάνω) και «εικών» (εικόνα), λόγω της εικόνας που εμφανίζεται στα πέταλα και αναφέρεται στην παράδοση να τοποθετείται το βότανο πάνω από μια εικόνα την ημέρα εορτασμού του Αγ. Ιωάννη του Βαπτιστή, για να εκδιώξει το κακό (Linnaeus 1753).

Όσον αφορά στο πιο γνωστό είδος του, το *Hypericum perforatum*, η ονομασία του προέρχεται από την λατινική και σημαίνει «διάτρητο», καθώς

αναφέρεται στις μικρές διάστικτες περιοχές των φύλλων του που σήμερα είναι γνωστό ότι οφείλονται στις ρητίνες και τα αιθέρια έλαια. Οι χριστιανοί του 6^{ου} αιώνα το ονόμασαν St. John's Wort (βότανο του Αγ. Ιωάννη) από τον Ιωάννη τον Βαπτιστή, καθώς πίστευαν ότι το φυτό μάτωνε (κόκκινο έλαιο από τους αδένες των πετάλων) εξαιτίας του αποκεφαλισμού του. Μάλιστα, τα σκούρα κόκκινα στίγματα των πετάλων συμβολίζουν το αίμα του, ενώ οι διάφανες κηλίδες των φύλλων, τα δάκρυα που χύθηκαν για το γεγονός αυτό. Τα κοινά ονόματα στην Ελλάδα είναι υπερίκό, βάλσαμο, βαλσαμόχορτο, σπαθόχορτο, περίκη, λειχινόχορτο, χελωνόχορτο, βότανο του προδρόμου. Στα αγγλικά η κοινή ονομασία του *H. perforatum* είναι St. John's wort (SJW), ενώ άλλες αγγλικές κοινές ονομασίες είναι Goatweed, Tiptonweed, Amber, Rose of Sharon, Aaron's beard, Jerusalem Star, ενώ η ονομασία που κυριαρχεί στη Β. Αμερική είναι Klamath weed (Καββαδάς, 1956).

Στη λαϊκή θεραπευτική (Ελλάδα) το υπερίκό χρησιμοποιείται ως αφέψημα κατά της επιληψίας, για την αντιμετώπιση γαστρεντερικών διαταραχών, χολικής στάσης και διαταραχών της εμμηνορροής. Το λάδι υπερίκου, γνωστό ως βαλσαμόλαδο χρησιμοποιείται ως κατάπλασμα σε πληγές και αιματώματα. Ωστόσο, αποτελεί και ένα εξαιρετικά επιβλαβές ζιζάνιο για καλλιέργειες. Στα ζώα προκαλεί καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος, αυθόρμητη αποβολή και μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο ενώ από πολύ παλιά είχε παρατηρηθεί η φωτοτοξικότητά του στα λευκοκέφαλα πρόβατα που πάθαιναν εγκαύματα όταν κατανάλωναν υπερίκό υπό το φως του ηλίου. Μεταξύ των διαφορετικών μελών του γένους, το *H. perforatum*, γνωστό στην παγκόσμια αγορά ως St. John's wort, είναι το πλέον μελετημένο είδος όσον αφορά τη φυτοχημεία και τις θεραπευτικές δράσεις του. Χρησιμοποιείται ως παραδοσιακό φάρμακο αλλά και σε σύγχρονα φαρμακευτικά παρασκευάσματα (Božin *et al.* 2013, Carine & Christenhusz 2013, Guedes *et al.* 2012).

1.1.5 Χρήσεις στη φαρμακευτική και ως συμπλήρωμα διατροφής - κλινικά στοιχεία, αλληλεπιδράσεις και παρενέργειες

Τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται ευρέως και με ιδιαίτερη προτίμηση από τους καταναλωτές καθώς από πολλούς θεωρούνται εντελώς ασφαλή. Η αυξημένη χρήση των φαινομενικά ασφαλών φυτικών σκευασμάτων έχει αναδείξει

και ορισμένες παρενέργειες αυτών όπως αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα ή συστατικά τροφίμων και ανεπιθύμητες αντιδράσεις (Henderson *et al.*, 2002). Το *H. perforatum* είναι γνωστό κυρίως για την επουλωτική, την αντι – ική και την αντικαταθλιπτική δράση του, ωστόσο έχει μελετηθεί εκτενώς και για πολλές άλλες σημαντικές δράσεις. Στην αγορά εντοπίζεται συνήθως σε μορφή κάψουλας, εκχυλίσματος, ελαίου, σκόνης και ως συστατικό σε φαρμακευτικά προϊόντα. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι το *H. perforatum* έχει συγκρίσιμη αντικαταθλιπτική αποτελεσματικότητα με χρησιμοποιούμενα συνθετικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα για τη θεραπεία της ήπιας/μέτριας μορφής κατάθλιψης (Russo *et al.*, 2013). Ως μονοθεραπεία, έχει ενθαρυντικό προφίλ ασφάλειας όμως έχουν καταγραφεί πολλές αναφορές που υποδεικνύουν τη δυνατότητα σημαντικών αλληλεπιδράσεων με συνταγογραφούμενα φάρμακα, μερικές εκ των οποίων μπορεί να έχουν σοβαρές κλινικές συνέπειες (Izzo, 2004). Γι' αυτό είναι σημαντικό να τηρούνται οι δοσολογίες που συνταγογραφούνται για το εκάστοτε σκεύασμα υπερικού, να είναι τιτλοδοτημένο και επαρκούς ποιότητας, καθώς έχουν καταγραφεί και νοθείες των *H. perforatum* με χρωστικές ή με άλλα είδη υπερικού κινεζικής προέλευσης με διαφορετικούς χημειότυπους (Booker *et al.*, 2018).

Σε πιλοτική έρευνα του *H. perforatum*, για τη χρήση του ως εικονικό φάρμακο (placebo) για τη θεραπεία του προεμμηνορροϊκού συνδρόμου, σε μικρή ομάδα γυναικών παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων (Stevinson & Ernst, 2005). Επίσης, η υπερικίνη που παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω αποτελεί τη φωτοενεργή ένωση του *H. perforatum* και είναι ίσως ο πιο ισχυρός φωτοευαισθητοποιητής που βρίσκεται στη φύση, με μεγάλο δυναμικό στην αντικαρκινική φωτοδυναμική θεραπεία (PPT) και τη φωτοδυναμική διάγνωση (PDD) (Jendželovská *et al.*, 2016). Ωστόσο, σε πιλοτική μελέτη για τη φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του δέρματος με τοπική χρήση εκχυλίσματος *H. perforatum* το ποσοστό πλήρους κλινικής ανταπόκρισης ήταν 50% και κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης οι ασθενείς παραπονέθηκαν για αίσθηση καύσου και πόνου (Kacerovská *et al.*, 2008).

Μερικές από τις ουσίες – φάρμακα για τις οποίες έχουν καταγραφεί αλληλεπιδράσεις με το *H. perforatum* είναι τα αλπραζολάμη (αγχολυτικό),

αμιτριπτυλίνη (αντικαταθλιπτικό), κυκλοσπορίνη (ανοσοκατασταλτικό και αντιφλεγμονώδες), διγοξίνη (φάρμακο παθήσεων κυκλοφορικού συστήματος), φεξοφenaδίνη (αντιισταμινικό), ινδιναβίρη και νεβιραπίνη (αντιρετροϊκά), ιρινοτεκάνη και τακρόλιμους (αντινεοπλασματικά και ανοσοκατασταλτικά), μεθαδόνη (κατασταλτικό), σιμβαστατίνη (υπολιπιδαιμικός παράγοντας), θεοφυλλίνη (βρογχοδιασταλτικό), βαρφαρίνη (αντιπηκτικό αίματος) και από του στόματος αντισυλληπτικά (Izzo, 2004).

1.2 Βιολογικές δραστικές χημικές ενώσεις του γένους *Hypericum L.*

Τα κύρια φυτοχημικά συστατικά του γένους *Hypericum* αποτελούνται από παράγωγα φλωρογλυκινόλης, ναφθοδιανθρόνες, ξανθόνες, παράγωγα φλαβονοειδών και τερπενοειδή των οποίων η ποιότητα και η ποσότητα ποικίλουν, ανάλογα με την τοποθεσία, το κλίμα και την εποχή συλλογής του φυτικού υλικού (Bagdonaitė *et al.*, 2012; Mathioudaki *et al.*, 2018; Cirak & Radusiene, 2019; Zhang *et al.*, 2020).



Εικόνα 3: Απεικόνιση φαρμάκων (Πηγή: (3))

Στις ναφθοδιανθρόνες συγκαταλέγονται πέντε ενώσεις, η υπερικίνη, η ψευδοϋπερικίνη, η πρωτοϋπερικίνη, η πρωτοψευδοϋπερικίνη και η κυκλοψευδοϋπερικίνη. Αυτές οι ενώσεις υπάρχουν σε όλα τα είδη υπερικού και εντοπίζονται ως μικρά μαύρα στίγματα στα υπέργεια τμήματα του φυτού, ιδιαίτερα στα άνθη και τα μπουμπούκια (Bilia *et al.*, 2002). Τα παράγωγα των φλωρογλυκινολών περιλαμβάνουν την υπερφορίνη, που σήμερα θεωρείται το κύριο δραστικό συστατικό και την αντυπερφορίνη, ουσίες περιορισμένης σταθερότητας που οξειδώνονται σχετικά εύκολα. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από γλυκοζίτες της κερκετίνης, υπεροσίδη, κερκιτρίνη, ισοκερκιτρίνη, ερυθρίνη και 13,118-διαπιγενίνη, ενώ κύριος εκπρόσωπος των φαινολικών οξέων είναι το χλωρογενικό οξύ. Παρόλο που το βότανο του Αγίου Ιωάννη παράγει μια ποικιλία βιοδραστικών ουσιών, η μεγάλη πλειοψηφία των μελετών επικεντρώνεται στην υπερικίνη, την ψευδοϋπερικίνη και την υπερφορίνη του βαλσαμόχορτου, καθώς σε αυτές τις ενώσεις οφείλονται κυρίως η επουλωτική, η αντικαταθλιπτική, η αντικαρκινική, η αντί-ική, αντιμικροβιακή δράση του φυτού, ειδικά όταν

συνδυάζονται με φωτοδυναμική θεραπεία καθώς αποτελούν φωτοευαίσθητοποιές ενώσεις (Nahrstedt & Butterweck 1997; Erdelmeier 1998; Beerhues, 2006; Zhang *et al.*, 2018).

1.2.1 Φλωρογλυκινόλες

Η υπερφορίνη – και το παράγωγό της, αντί-υπερφορίνη– ανήκει στους σημαντικούς μεταβολίτες του είδους *H. perforatum* και άλλων ειδών που μορφολογικά είναι πολύ κοντά σ' αυτό το είδος (*H. perforatum*, *H. origanifolium*, *H. barbatum*, *H. richeri*, *H. rumeliacum*, *H. maculatum*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum*, *H. linarioides*, *H. olympicum*), και πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για αρκετές νευρολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων υπερικού (Chatterjee *et al.*, 1998; Smelcerovic & Spiteller, 2006; Çırak *et al.*, 2008). Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ως κύριο δραστικό συστατικό υπεύθυνο για τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Η υπερφορίνη απομονώθηκε πρώτα από τους Bystrov *et al.*, το 1975, οι οποίοι την εκχύλισαν από το *H. perforatum* (Bystrov *et al.*, 1975). Είναι μία από τις πιο βιοδραστικές ενώσεις που περιέχεται σε αφθονία στα άνθη, στους καρπούς και στα φύλλα. Η αποτελεσματικότητά τους στην ήπια έως μέτρια κατάθλιψη αποδείχθηκε σε αρκετές κλινικές δοκιμές έναντι εικονικού φαρμάκου και πρότυπων αντικαταθλιπτικών (Whiskey *et al.*, 2001). Ο σχετικά χαμηλός αριθμός ανεπιθύμητων ενεργειών και η καλή ανεκτικότητα οδηγούν σε υψηλή αποδοχή από τον ασθενή ενώ η ανίχνευση πρόσθετων φαρμακολογικών δράσεων τα τελευταία χρόνια προκάλεσε περαιτέρω το ενδιαφέρον για την υπερφορίνη (Medina *et al.*, 2006).

Οι φλωρογλυκινόλες είναι εύκολα αποικοδομήσιμες ενώσεις, γι' αυτό και παρουσιάζουν δυσκολίες κατά τη μελέτη τους, καθώς είναι ευαίσθητες στην έκθεση στον αέρα και στο φως και ασταθείς στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Η δομή της υπερφορίνης, η οποία είναι μοναδική ως φυσικό προϊόν, είναι αυτή ενός ισοπρενοειδούς που περιέχει 35 άτομα άνθρακα. Θεωρητικά, τρία διαφορετικά ταυτομερή είναι πιθανά, μία δικετόνη και δύο ενόλες (Fourneron & Nait-Si, 2006). Πιο αναλυτικά, η υπερφορίνη είναι ένα (πρενυλιωμένο) φλωρογλυκινολικό παράγωγο που αποτελείται από ένα φλωρογλυκινολικό σκελετό με 5 λιπόφιλες ισοπρενικές αλυσίδες. Η στερεοχημική δομή ταυτοποιήθηκε ύστερα από

φασματογραφικά πειράματα, ενώ η απόλυτη διαμόρφωση διευκρινίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (Brondz *et al.*, 1982, 1983).

Η πλειοψηφία των εμπορικών εκχυλισμάτων του βαλσαμόχορτου που παρασκευάζονται με υδροαλκοολική εκχύλιση περιέχει 1-5% υπερφορίνη (Lang *et al.*, 2002). Στο *H. perforatum*, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις υπερφορίνης εντοπίζονται στα λουλούδια (flowers) και τους καρπούς. Κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης των λουλουδιών, η περιεκτικότητα σε υπερφορίνη αυξάνεται συνεχώς από 2,5% στα νεαρά μπουμπούκια (3-4 mm) σε 8,5% στους άγριους καρπούς, το τελευταίο αναπτυξιακό στάδιο που μελετήθηκε από τους Tekel'ová *et al.* (2000). Αντίθετα, οι υπερικίνες και τα φλαβονοειδή σχηματίζονται κυρίως σε σέπαλα, πέταλα και στήμονες που πέφτουν (Repčák & Mártonfi, 1997). Τέλος, η υπερφορίνη είναι ασταθής στον λιπόφιλο διαλύτη, πεντάνιο που απαιτείται για τον καθαρισμό του ακατέργαστου εκχυλίσματος, αλλά είναι σταθερή για εβδομάδες σε μεθανόλη, έναν διαλύτη που επιτρέπει τη σταθερότητα μέσω αλληλεπιδράσεων δεσμού υδρογόνου. Λεπτομερής φασματοσκοπική ανάλυση με φασματοσκοπία 1- και 2-D NMR, MS και IR χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της δομής μέσω της αντιστοίχισης των συντονισμών ^1H και ^{13}C (Chrea *et al.*, 2014).

1.2.1.1 Βιοδραστικότητα

Η υπερφορίνη αποτελεί δομικά αλλά και λειτουργικά ένα μοναδικό αντικαταθλιπτικό συστατικό του βαλσαμόχορτου που σε αντίθεση με τα συνθετικά αντικαταθλιπτικά που δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς, η ένωση αυτή δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τους μεταφορείς διαβιβαστών αλλά αυξάνει τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού νατρίου, αναστέλλοντας έτσι την συναπρωσμική επαναπρόσληψη ορισμένων νευροδιαβιβαστών (Treiber *et al.*, 2005; Butterweck, 2003). Αποτελεί αναστολέα της επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών ευρείας ζώνης που επηρεάζει τη συναπρωσμική (synaptosomal) πρόσληψη σεροτονίνης, ντοπαμίνης, νοραδρεναλίνης (νορεπινεφρίνης), γλουταμινικού και γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) με παρόμοιες αποδόσεις (Müller, 2003). Επίσης, συμβάλλει αποτελεσματικά στην επαγωγή του κυτοχρώματος P450 και της P- γλυκοπρωτεΐνης, ένζυμα που βοηθούν

στο μεταβολισμό των φαρμάκων, ενώ είναι πολλά υποσχόμενη ένωση ως αντικαρκινικός παράγοντας (Beerhues, 2006).

Στις μέρες μας, όλο και περισσότερες μελέτες εστιάζουν στη συνεργιστική επίδραση συστατικών του βαλσαμόχορτου, κυρίως της υπερφορίνης και της υπερικίνης, ή/και σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία (photodynamic therapy – PDT) με πολύ ενθαρυντικά αντι-ογκογενετικά (anti-angiogenic) αποτελέσματα (Quiney *et al.*, 2006; Tassone *et al.*, 2011; Majerník *et al.*, 2019). Βασική ιδιότητα της υπερφορίνης είναι και η αντιβακτηριακή δραστηριότητά της (Gurevich *et al.*, 1971).

Η υπερφορίνη αναστέλλει την ανάπτυξη θετικών κατά gram βακτηρίων όπως το *Corynebacterium diphtheriae* σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 0,1 μg / mL (Schempp *et al.*, 1999). Τα πολυανθεκτικά (multiresistance) στελέχη *Staphylococcus aureus* ήταν επίσης ευαίσθητα στην έκθεση σε υπερφορίνη (Schempp *et al.*, 1999; Reichling *et al.*, 2001). Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί αναστολή ανάπτυξης σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, και σποριογόνα βακτηρια, ενώ έχει παρατηρηθεί μέτρια έως καθόλου αναστολή σε μύκητα *Candida albicans* (Vajs *et al.*, 2003). Το αντιβιοτικό δυναμικό της υπερφορίνης μπορεί να εξηγήσει την παραδοσιακή χρήση των παρασκευασμάτων του βαλσαμόχορτου (St. John's wort) για την τοπική θεραπεία των μολυσμένων τραυμάτων (Schempp *et al.*, 1999). Επιπλέον, η έντονη αντιφλεγμονώδης δράση της υπερφορίνης μπορεί να παράσχει μια αιτιολογία για την τοπική θεραπεία φλεγμονωδών διαταραχών του δέρματος (Schempp *et al.*, 2000, Albert *et al.*, 2002).

1.2.2 Ναφθοδιανθρόνες

Η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη είναι δύο φυσικά προϊόντα που ανήκουν στη χημική οικογένεια των ναφθοδιανθρόνων και αποτελούν χαρακτηριστικά συστατικά του γένους *Hypericum* καθώς και απομονώθηκαν αρχικά από το *H. perforatum*. Η περιεκτικότητά τους στο φυτό κυμαίνεται περίπου από 0,05 έως 0,3% στα φύλλα και σε 1-14% στο άνθος, όμως μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το υψόμετρο, τις συνθήκες φωτός ή την περίοδο συλλογής. Το υπερικό περιέχει επίσης την πρωτοϋπερικίνη, την ψευδοπρωτοϋπερικίνη και την

κυκλοψευδοϋπερικίνη. Όλες αυτές οι ενώσεις βρίσκονται κυρίως στο ανθισμένο τμήμα του φυτού και ειδικότερα στους μαύρους αδένες. Η πρωτοϋπερικίνη και η ψευδοπρωτοϋπερικίνη θεωρούνται τα πρόδρομα μόρια της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης, αντίστοιχα. Επίσης η ψευδοϋπερικίνη είναι πιθανόν να μετατρέπεται στην κυκλοψευδοϋπερικίνη (Wirz *et al.*, 2001; Sirvent *et al.*, 2003). Η πρωτοϋπερικίνη, η ψευδοπρωτοϋπερικίνη και η κυκλοψευδοϋπερικίνη ανιχνεύονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, γι' αυτό και αναφέρονται ως «συνολικές υπερικίνες» ή «συνολικές ναφθοδιανθρόνες». Γενικά, το ποσοστό της ψευδοϋπερικίνης (0,03-0,34%) είναι υψηλότερο από αυτό της υπερικίνης (0,03-0,09%) δύο έως τέσσερις φορές (Mauri & Pietta, 2000). Η υπερικίνη διαλύεται σε κοινούς πολικούς διαλύτες και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της αρωματικής ένωσης είναι υπεύθυνες για τη σταθερή δομή του μορίου. Παράγοντες που επηρεάζουν το φάσμα απορρόφησης της υπερικίνης είναι οι διαλύτες, το pH και η διαμόρφωση στην οποία βρίσκεται (Falk *et al.*, 1992). Όσον αφορά τις συνθήκες αποθήκευσης των διαλυμάτων με πρότυπες ουσίες υπερικίνη ή ψευδοϋπερικίνη, αναφέρεται ότι η σταθερότητα αυτών είναι μεγαλύτερη στους -20 °C στο σκοτάδι. Η υπερικίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με την ψευδοϋπερικίνη στο σκοτάδι. Ωστόσο, η σταθερότητα της ψευδοϋπερικίνης είναι μεγαλύτερη στα διαλύματα εκχύλισης απ' ότι στα πρότυπα διαλύματα (Liu *et al.*, 2005; Fourneron & Nait-Si, 2006). Η υπερικίνη σχηματίζει κόκκινα διαλύματα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, πράσινο διάλυμα σε βασικό μέσο ενώ σε υδατικό περιβάλλον χρωματίζεται βιολετί (Wynn & Cotton, 1995). Πρότυπα διαλύματα «καθαρής» υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης παρουσιάζουν μείωση κατά 20% ύστερα από 4 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, γι' αυτό και είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα (Karioti *et al.*, 2009).

1.2.2.1 Βιοδραστικότητα

Η υπερικίνη είναι μία από τις σημαντικότερες ναφθοδιανθράνες που υπάρχουν στο *H. Perforatum* και αναφέρεται ότι έχει αντικαταθλιπτικές, αντιρετροϊκές και κυτταροτοξικές ιδιότητες (Butterweck *et al.*, 2002; Kosuth *et al.*, 2003).

Οι έρευνες για την αντικαταθλιπτική δράση του υπερικού είχαν επικεντρωθεί αρχικά στην υπερικήνη, την οποία περιέγραφαν ως αναστολέα της μονοαμινο-οξειδάσης (MAO), ένζυμο που έχει σχέση με τον εντός των νευρώνων καταβολισμό των αμινών (Suzuki *et al.*, 1984). Έχει μελετηθεί εκτενώς για την εφαρμογή της στη φωτοδυναμική θεραπεία καθώς η χρήση της εκεί είναι ιδιαίτερα ελκυστική χάρη στην εκλεκτικότητά της.

Οι ναφθοδιανθρόνες παρουσιάζουν μια ισχυρή ικανότητα να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), γεγονός που τις συγκαταλέγει στις πιο ισχυρές φωτοευαισθητοποιές ενώσεις της φύσης. Οι Vandenbergae *et al.* (1997) μελέτησαν τις ενδιαφέρουσες αυτές ιδιότητες, προτείνοντας τις ναφθοδιανθρόνες ως φωτοχημειοθεραπευτικές ενώσεις με την υπερικήνη να είναι αποτελεσματικότερη από την ψευδοϋπερικήνη (Vandenbergae *et al.*, 1997; Vandenbergae *et al.*, 1998a, 1998b). Οι ιδιότητες αυτές δικαιολογούν επίσης και την αντιϊκή δράση καθώς οι επιστήμονες είχαν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη χρήση κατά του ιού HIV-1 (Meruelo *et al.*, 1988), έρευνες οι οποίες τελικά έδωσαν απογοητευτικά αποτελέσματα καθώς οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε υπερικήνη εμφάνισαν φωτοτοξικότητα και σήμερα η υπερικήνη προτείνεται ως φθορίζον διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων (Kubin *et al.*, 2008). Τέλος, *in vivo* πειράματα σε οφθαλμό αρουραίου υποδεικνύουν ισχυρή ανασταλτική δράση της υπερικήςνης στην αγγειογένεση, προσθέτοντας στις εν δυνάμει εφαρμογές της, αυτή της οφθαλμολογικής (Lavie *et al.*, 2005).

Η ανασταλτική επίδραση της υπερικήςνης έναντι των ανθεκτικών σε πενικιλίνη *S. aureus* (PRSA) και των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) έχει φανεί από παλαιότερα (Lopez-Bazzocchi *et al.*, 1991). Λόγω της εξαιρετικά λιπόφιλης φύσης, της χαμηλής διαλυτότητας σε υδατικά μέσα και της ανεπαρκούς βιοδιαθεσιμότητάς της έχει περιορισμένη εφαρμογή. Η λιποσωματική ενθυλάκωση είναι μια υποσχόμενη λύση για την υπέρβαση αυτών των περιορισμών, καθώς η χρήση λιποσωμάτων ως φορέων χορήγησης υπερικήςνης για αντιμικροβιακή φωτοδυναμική θεραπεία (aPDT) πέτυχαν μείωση 2,3 - 2,5 log CFU·mL⁻¹ του *Staphylococcus saprophyticus* spp. *bovis* και διευκόλυναν τη δέσμευση και πρόσληψη του φωτοευαισθητοποιητή μέσω του βακτηριακού κυτταρικού

τοιχώματος (Plenagl *et al.*, 2018). Επίσης, η συνδιαστική χρήση της υπερικίνης με άλλες φυσικές ενώσεις, όπως είναι η καρβακρόλη ενισχύει την αντιβακτηριακή δράση έναντι σε κύτταρα *S. aureus* (Bahmani *et al.*, 2019). Η φωτοδυναμική απενεργοποίηση (PDI) βασισμένη στην υπερικίνη μπορεί να επιφέρει μείωση έως και $4,1 \log \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ στα κύτταρα του *Escherichia coli*, καθώς η υπερικίνη κατέχει ισχυρή ικανότητα να δεσμεύεται σε κύτταρα. Η PDI αναμένεται να είναι μια ασφαλής, αποτελεσματική, χαμηλού κόστους και πρακτική μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων (Zhang *et al.*, 2018). Τέλος η φωτοδυναμική αδρανοποίηση διαμεσολαβούμενη από υπερικίνη εγκλεισμένη σε μικκύλια συμπολυμερούς P123 είναι μια πολλά υποσχόμενη επιλογή για τη θεραπεία μυκητιακών λοιμώξεων και ιατρικών συσκευών για την πρόληψη του σχηματισμού βιο-υμενίου και της εξάπλωσης των μυκήτων, ενώ με παρόμοιο τρόπο έχει φανεί ότι η υπερικίνη είναι πολύ δραστική έναντι και σε πρωτόζωα (Sakita *et al.*, 2019; De Morais *et al.*, 2019).

1.2.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή ανήκουν σε μία μεγάλη ομάδα φυσικών προϊόντων – πολυφαινολικές ενώσεις – τα οποία κατανέμονται ευρέως σε όλο το φυτικό βασίλειο (στα άνθη, στους βλαστούς, στις ρίζες των φυτών) και αποτελούν συστατικά των φρούτων, λαχανικών και αφεψημάτων (τσάι, κρασί). Περισσότερες από τέσσερις χιλιάδες φλαβονοειδείς ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί, πολλές από τις οποίες είναι υπεύθυνες για το ελκυστικό χρώμα των λουλουδιών, των φρούτων και των φύλλων, ενώ συνήθως παρουσιάζονται στους ιστούς των φυτών με τη μορφή των γλυκοζιτών. Ανάλογα με τη μοριακή τους δομή, μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες: παράγωγα φλαβόνης, φλαβονόλης, φλαβανόνης, ισοφλαβόνες, διφλαβόνες, ανθοκυανίνες κ.α. Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών δράσεων, όπως αντιβακτηριδιακή, αντι-ική, αντι-ηπατοτοξική, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική και αντιοξειδωτική. Έρευνες έχουν δείξει ότι αυξημένη διαιτητική πρόσληψη φλαβονοειδών σχετίζεται με την προστασία από τη στεφανιαία νόσο αλλά και τον καρκίνο ενώ κάποια φλαβονοειδή όπως είναι η κερκετίνη βοηθούν στη διαπερατότητα άλλων δραστικών ενώσεων όπως είναι η υπερικίνη (Hertog *et al.*, 1997; Verjee *et al.*, 2017).

Φυτά του γένους *Hypericum* spp. αποτελούν πλούσια πηγή φλαβονοειδών και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα δραστηρότητας. Τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή βρίσκονται στο *H. perforatum* σε ποσοστό 2-4% και αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη ομάδα των δευτερεύοντων μεταβολιτών του. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα φλαβονοειδών ενοπίζεται στον μη ανθοφόρο και ανθοφόρο βλαστό και μικρότερη στις ρίζες. Τα κύρια φλαβονοειδή του υπερικού είναι η ερυθρίνη, η υπεροσίδη, η ισοκερκιτρίνη, η κερκιτρίνη, ενώ σε μικρότερο ποσοστό η μη-γλυκοζυλιωμένη κερκετίνη και εντοπίζονται κυρίως στα φύλλα και τα άνθη. Διφλαβονοειδή όπως η 13,118-διαπιγενίνη και η αμεντοφλαβόνη απαντώνται αποκλειστικά στο ανθισμένο τμήμα του υπερικού (Urbánek *et al.*, 2002; Huang & Liaw, 2017; Tusevski *et al.*, 2019). Από τους μαλακούς ιστούς που δημιουργούνται από τραυματισμένα μέρη (*callus*) του *H. perforatum* δημιουργούνται φυσικά οι ενώσεις 6-C-πρενυλ λουτεολίνη, 5,3'-διμεθυλαιθέρας λουτεολίνης, 5-γλυκοζίτης λουτεολίνης και 3'-γλυκοζίτης λουτεολίνης (Dias *et al.*, 1998). Η ποιότητα και η ποσότητα των φλαβονοειδών στο *H. perforatum* εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες που ξεκινούν από την καλλιέργεια μέχρι και την εκχύλιση της πρώτης ύλης (Poutaraud & Girardin, 2005). Μελέτες που σχετίζονται με την εκχύλιση ενώσεων από το *H. Perforatum* έδειξαν ότι ανάλογα με τις συνθήκες της εκχύλισης (διαλύτης, διάρκεια εκχύλισης, θερμοκρασία), οι βιοδραστικές ιδιότητες του εκχυλίσματος αλλάζουν (Liu, 2000).

1.2.3.1 Βιοδραστικότητα

Τα φλαβονοειδή και τα παράγωγά τους, που απομονώνονται από διάφορα είδη *Hypericum*, εμφανίζουν αντινεοπλασματικές, αντιμυκητιακές, αντιμικροβιακές, αντι-έλκουσες, αντι-καταθλιπτικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Di Carlo *et al.*, 2001; Greeson *et al.*, 2001; Skalkos *et al.*, 2005; Butterweck & Schmidt, 2007; Nahrstedt & Butterweck, 2010; Huang & Liaw, 2017). Τα φλαβονοειδή από διάφορες πηγές έχουν αναφερθεί ότι προλαμβάνουν την οξειδωση της LDL *in vitro* και εμφανίζουν έντονα υπολιπιδαιμική δράση *in vivo*, υποδηλώνοντας την αποτελεσματικότητα των φλαβονοειδών για την πρόληψη και τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης. Έτσι και το πλούσιο – φλαβονοειδικό εκχύλισμα του υπερικού έχει δοκιμαστεί σε αρουραίους που έκαναν διατροφή πλούσια σε

λιπαρά και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα είχε πολύ έντονα υποχολιστερολαιμικά αποτελέσματα (Zou & Wei, 2005). Η κερκετίνη και η υπεροσίδη του *H. perforatum* ύστερα από φασματοφωτομετρική αξιολόγηση φάνηκαν να έχουν ανασταλτικές δράσεις έναντι του ενζύμου συνθάση νιτρικού οξειδίου (NOS) στο αίμα και στο εγκεφαλικό ομογενοποίημα αρουραίων, με την υπεροσίδη να είναι αποτελεσματικότερη στον εγκέφαλο με πιθανή εξήγηση, το τμήμα γαλακτόζης της να προσδίδει αυτή την εκλεκτικότητα (Luo et al., 2004). Φλαβονοειδικά κλάσματα του *H. perforatum* έχουν μελετηθεί για την αντικαταθλιπτική τους δράση σε αρουραίους με δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (Forced Swimming Test) με μεγάλη αποτελεσματικότητα, ενώ σε αρουραίους που χορηγήθηκε εκ του στόματος εκχύλισμα *H. Connatum* (δεν περιέχει υπερφορίνη) παρατηρήθηκε μείωση του άγχους που προκαλείται από την έλλειψη διαφυγής και αποδόθηκε πειραματικά στα φλαβονοειδή (Butterweck et al., 2000; Scheggi et al., 2016).

1.2.4 Πτητικά συστατικά

Τα είδη του γένους *Hypericum* κατατάσσονται στα φυτικά υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια (γενική απόδοση ελαίου < 1%, β/β). Σε υγιή φυτά *H. perforatum* η περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια είναι υψηλότερη κατά το στάδιο της πλήρους άνθισης έναντι του σταδίου προ-άνθισης ή της καρποφορίας (0,35% έναντι 0,12 και 0,18% αντίστοιχα) (Guedes et al., 2012).

Από τις υπάρχουσες έρευνες έχει φανεί ότι ο αποτελεσματικότερος τρόπος παραλαβής του αιθέριου ελαίου είναι η υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger (0,28%, β/β), ακολουθεί η εκχύλιση με υγρό ή υπερκρίσιμο CO₂ (απόδοση 1%, β/β) και λιγότερο αποτελεσματική είναι η απόσταξη με ατμό (0,06%, β/β). Επίσης, με υγρό ή υπερκρίσιμο CO₂ μπορεί να εκχυλισθεί και η υπερφορίνη με τα παράγωγά της κάτι που δεν συμβαίνει στην εκχύλιση με ατμό. Τα αιθέρια έλαια των διαφόρων ειδών *Hypericum* παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα στη χημική σύσταση η οποία οφείλεται στις εποχιακές διακυμάνσεις, τη γεωγραφική κατανομή, τον φαινολικό κύκλο και τον τύπο του οργάνου στο οποίο παράγονται ή/και συσσωρεύονται αυτά. Οι κύριες ομάδες χημικών ενώσεων που εντοπίζονται στο πτητικό περιεχόμενο των διαφόρων ειδών είναι τα μονοτερπένια (α-πινένιο, β-

πινένιο, α-τερπινεόλη, γερανιόλη, λιμονένιο κ.α.), οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (μεθυλ-2-οκτάνιο, μεθυλο-2-δεκανίου και η-εντεκάνιο) και τα σεσκιτερπένια (καρυοφυλλένιο, χουμουλένιο) (Schwob *et al.*, 2002; Couladis *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2004; Crockett, 2010; Guedes *et al.*, 2012).

1.2.4.1 Βιοδραστικότητα

Το αιθέριο έλαιο του υπερικού είναι γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητά του σε πτητικά συστατικά τα οποία έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Από τον Μεσαίωνα, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τις βακτηριοκτόνες, ιοκτόνες, μυκητοκτόνες, αντιπαρασιτικές και εντομοκτόνες δράσεις και είχε φαρμακευτικές και καλλυντικές εφαρμογές. Στις μέρες μας, αξιοποιείται κυρίως από τις φαρμακευτικές, υγειονομικές, καλλυντικές, γεωργικές και βιομηχανίες τροφίμων. Παρόλο που τα εκχυλίσματα υπερικού έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις βιολογικές δράσεις τους, οι μελέτες για τη βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου είναι περιορισμένες. Οι υπάρχουσες μελέτες έχουν εστιάσει κυρίως στην αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου, χρησιμοποιώντας όμως ανόμοιες αντιμικροβιακές δοκιμασίες γεγονός που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του αιθερίου ελαίου μεταξύ των ειδών του γένους *Hypericum*. Οι δοκιμασίες που έχουν χρησιμοποιηθεί γι' αυτό το σκοπό σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι: η μέθοδος διάχυσης δισκίου σε άγαρ, η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ από βοθρίο και η μέθοδος μικροαραίωσης σε ζωμό (Guedes *et al.*, 2012).

1.3 Παρουσίαση επιλεγμένων ειδών του γένους *Hypericum*

1.3.1 *Hypericum perforatum* L.

Το *Hypericum perforatum* είναι ένα κίτρινο-ανθισμένο, έγχρωμο ή σαρμενόζη (sarmentose), πολυετές βότανο ιθαγενές στην Ευρώπη, το οποίο έχει εισαχθεί σε πολλές εύκρατες περιοχές του πλανήτη και αναπτύσσεται άγρια σε λιβάδια. Η κοινή ονομασία του (St John's wort)



Εικόνα 4: *Hypericum perforatum* L. (Πηγή (5)).

προέρχεται από την παραδοσιακή του άνθηση και συγκομιδή την εορταστική ημέρα του Αγίου Ιωάννη, στις

24 Ιουνίου. Το όνομα του είδους *perforatum* αναφέρεται στην παρουσία μικρών

ελαιωδών αδένων στα φύλλα που μοιάζουν με παράθυρα, τα οποία μπορούν να φανούν όταν κρατούνται ενάντια στο φως. Το βότανο του Αγίου Ιωάννη είναι ένα πολυετές φυτό με εκτεταμένα, έρποντα ριζώματα (creeping rhizomes). Τα στελέχη του είναι όρθια, διακλαδισμένα στο άνω τμήμα και μπορούν να αυξηθούν σε ύψος 1 m. Έχει αντίθετα, χωρίς στεφάνι, στενά, επιμήκη φύλλα μήκους 12 mm ή ελαφρώς μεγαλύτερα. Τα φύλλα έχουν κίτρινο-πράσινο χρώμα, με διαφανείς κουκίδες σε ολόκληρο τον ιστό και μερικές φορές με μερικές μαύρες κουκίδες στην κάτω επιφάνεια. Τα φύλλα παρουσιάζουν προφανείς διαφανείς κουκίδες όταν συγκρατούνται στο φως, δίνοντάς τους μια «διάτρητη» εμφάνιση, εξ ου και το λατινικό όνομα του φυτού. Τα λουλούδια της φτάνουν μέχρι 2,5 εκατοστά, έχουν πέντε πέταλα και είναι χρωματισμένα με κίτρινο χρώμα με εμφανείς μαύρες κουκίδες. Τα λουλούδια εμφανίζονται σε μεγάλα κύματα στα άκρα των ανώτερων κλαδιών, ανάμεσα στα τέλη της άνοιξης και τις αρχές του καλοκαιριού. Τα σέπαλα είναι μυτερά, με αδενικές κουκίδες στον ιστό. Υπάρχουν πολλοί στήμονες, οι οποίοι είναι ενωμένοι στη βάση σε τρεις δέσμες. Όταν τα μπουμπούκια των λουλουδιών (όχι τα ίδια τα λουλούδια) ή οι λοβοί σπόρων συνθλίβονται, παράγεται ένα κοκκινωπό / πορφυρό υγρό (4).

1.3.2 *Hypericum perforatum* L.

Το *Hypericum perforatum* L. ανήκει στο γένος *Hypericum*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο σε ζεστές και εύκρατες περιοχές σε όλο τον κόσμο και παρουσιάζεται στη Μεσόγειο και την Εγγύς Ανατολή. Είναι ένα πολυετές φυτό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Guttiferae, που συνήθως αναπτύσσεται σε σκιερά εδάφη μεταξύ των βράχων και η χημική σύσταση του ελαίου του μπορεί να διαφέρει λίγο ή αρκετά από τοποθεσία σε τοποθεσία και από χώρα σε χώρα (Couladis *et al.*, 2001; Petrakis *et al.*, 2005; Touafek *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2008).



Εικόνα 5: *H. perforatum* L. (Πηγή (8)).

1.3.3 *Hypericum cycladicum* Trigas

Το *Hypericum cycladicum* Trigas ανήκει στην οικογένεια Hypericaceae και περιγράφηκε και απεικονίστηκε πρώτη φορά από τις Κυκλάδες (Ελλάδα) το 2018. Ανήκει στο τμήμα *Drosocarpium* και οι πλησιέστεροι συγγενείς του φαίνεται να είναι το κρητικό ενδημικό *H. trichocaulon* και το ευρέως διαδεδομένο στη Μεσόγειο *H. perforiatum*. Το νέο είδος είναι σήμερα γνωστό από την Άνδρο, την Πάρο και τη Νάξο, αλλά πιθανότατα έχει μια ευρύτερη διανομή εντός της ομάδας των Κυκλάδων. Ανθίζει από τα μέσα



Απριλίου έως τις αρχές Ιουνίου και τα *Εικόνα 6: H. cycladicum Trigas (Πηγή: (9)).* περικάρπιά του ωριμάζουν από τα τέλη Ιουνίου έως τα τέλη Ιουλίου. Αναπτύσσεται αποκλειστικά σε ξηρές πλαγιές, σε αντίθεση με το *H. perforiatum* που αναπτύσσεται σε μεσημβρινές, υγρές ή/και σκιασμένες θέσεις, και κυρίως σε σχιστολιθικές θέσεις με φρύγανα και περιστασιακά σε αιθαλείς θάμνους (macchie) από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι τα 800 m a.s.l. (Trigas, 2018).

1.3.4 *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* Boiss

Το *Hypericum rumeliacum* subsp. *Boiss* είναι ένα ενδημικό είδος των Βαλκανίων. Ανήκει στο τμήμα *Drosocarpium* της ομάδας *Olympia*. Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει περίπου 12 είδη που διανέμονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου (Robson 1977, 1981). Η φαρμακολογική δυναμική του *H. rumeliacum* είναι



υψηλή και συγκρίσιμη με αυτή ορισμένων άλλων εκπροσώπων του γένους *Hypericum*. Η παρουσία των φωτοδυναμικών χρωστικών υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη είναι χαρακτηριστική ειδικά για τους πιο εξελιγμένους εκπροσώπους του γένους (Smelcerovic *et al.*, 2006; Smelcerovic & Spiteller 2006; Galati *et al.*, 2008).

Εικόνα 7: H. rumeliacum subsp. apollinis (Πηγή: (6)).

Η χημική σύσταση αλλά και η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του *H. rumeliacum* subsp. *apollinis* ερευνήθηκε πρώτη φορά από τους Couladis *et al.*

(2003) και οι πολυφαινολικές ενώσεις από τον Kitanov (1979). Μεταξύ των φαρμακολογικών αποτελεσμάτων έχει αναφερθεί το αντιμικροβιακό, το αντιφλεγμονώδες και το αντιοξειδωτικό δυναμικό. Οι Radulovic *et al.* (2007) προσδιόρισαν ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών ιδιοτήτων του μεθανολικού εκχυλίσματος του *H. rumeliacum*, ενώ έχει αποδειχθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση συνδέεται με την παρουσία και τη σύνθεση αιθερίων ελαίων (Couladis *et al.*, 2003; Saroglou *et al.*, 2007; Radulovic *et al.*, 2007).

Κεφάλαιο 2

Μέθοδοι χημικής ανάλυσης και ελέγχου της βιοδραστηκότητας φυσικών προϊόντων

2.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του περιεχομένου φυτικών πολυφαινόλων και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται με μεταβολικές και φυσιολογικές διεργασίες και οι οργανισμοί τις απομακρύνουν μέσω ενζυματικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών καθώς μπορεί να προκαλέσουν επιβλαβείς οξειδωτικές αντιδράσεις. Υπό ορισμένες συνθήκες, η αύξηση των οξειδωτικών και η μείωση των αντιοξειδωτικών δεν μπορεί να προληφθεί και η οξειδωτική ή αντιοξειδωτική ισορροπία μετατοπίζεται προς την οξειδωτική κατάσταση. Κατά συνέπεια, αναπτύσσεται το οξειδωτικό στρες, το οποίο εμπλέκεται σε περισσότερες από 100 διαταραχές (Halliwell & Gutteridge, 1991). Τα αντιοξειδωτικά μόρια προλαμβάνουν ή αναστέλλουν αυτές τις επιβλαβείς αντιδράσεις. Οι πολυφαινόλες είναι οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες για ένα ευρύ φάσμα φυτών αντιπροσωπεύοντας τα πλέον μελετημένα φυτοχημικά προϊόντα τα οποία δρουν ως χηλικοί παράγοντες, σαρώνοντας και απομακρύνοντας ελεύθερες ρίζες (Harnafi & Amrani, 2008).

Παρακάτω παρουσιάζονται δύο βασικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες δοκιμασίες αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων και η μέθοδος ανίχνευσης ολικών φαινολικών Folin-ciocalteu.

2.1.1 Δοκιμασία DPPH

Το DPPH^{*} (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλδραζύλιο) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, λόγω της μετεγκατάστασης του εφεδρικού ηλεκτρονίου σε ολόκληρο το μόριο. Έτσι, το DPPH δεν διμερίζεται, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Η μετεγκατάσταση στο μόριο DPPH καθορίζει την εμφάνιση μωβ χρώματος, με ζώνη απορρόφησης με μέγιστο περίπου στα 520 nm. Όταν το DPPH^{*} αντιδρά με δότη υδρογόνου, δημιουργείται η μειωμένη (μοριακή) μορφή (DPPH), συνοδευόμενη

από την εξαφάνιση του ιώδους χρώματος. Επομένως, η μείωση της απορρόφησης εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού. Το Trolox χρησιμοποιείται ως πρότυπο αντιοξειδωτικό (Pisoschi & Negulescu, 2012).

2.1.2 Δοκιμασία ABTS

Η κατιονική ρίζα ABTS (ABTS^{•+}) η οποία απορροφά στα 743 nm (δίνοντας ένα γαλαζωπό πράσινο χρώμα) σχηματίζεται από την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το άτομο αζώτου του ABTS (2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)). Παρουσία Trolox (ή άλλου αντιοξειδωτικού που δίδει υδρογόνο), το άτομο αζώτου σβήνει το άτομο υδρογόνου, αποδίδοντας το διάλυμα αποχρωματισμού (Pisoschi & Negulescu, 2012).

2.1.3 Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Αυτή η χρωματομετρική μέθοδος βασίζεται στη μείωση ενός συμπλόκου φωσφογλυκάνης – φωσφομολυβδαινικού άλατος από φαινόλη σε μπλε προϊόντα αντίδρασης σε αλκαλικές συνθήκες. Η ποσότητα των συνολικών πολυφαινολών στα φυτικά εκχυλίσματα υπολογίζεται από την καμπύλη, με γνωστά πρότυπα πολυφαινολών όπως είναι τα καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ ή κατεχίνη και εκφράζεται ως mg ισοδύναμα πρότυπου / g ξηρού φυτικού εκχυλίσματος (Harnafi & Amrani, 2008).

2.2 Χημική ανάλυση φυσικών προϊόντων

Τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν πηγή φυσικών προϊόντων (δευτερογενών μεταβολιτών) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Η κατανόηση των υπαρχουσών φυτοχημικών ενώσεων, των φαρμακολογικών – δραστικών ιδιοτήτων και της δομικής τους σύνθεσης είναι σημαντική για την παρασκευή ενός φαρμάκου και την εφαρμογή του. Η ζήτηση των φαρμακευτικών φυτών για την απομόνωση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων έχει αυξηθεί ραγδαία. Για παράδειγμα, το *Hypericum perforatum* είναι ένα γνωστό βότανο σε όλο τον κόσμο λόγω των ποικίλων δράσεών του που οφείλονται στις βιοδραστικές ενώσεις του (Mulat *et al.*, 2019). Ωστόσο, ο χημειότυπος ανάλογα την γεωγραφική περιοχή, το στάδιο ανάπτυξης, το είδος, το υποείδος και άλλους

παράγοντες μπορεί να αλλάξει (Silva *et al.*, 2005; Smelcerovic *et al.*, 2006; Filippini *et al.*, 2010; Cirak & Radusiene, 2019).

Ο έλεγχος του χημειότυπου πραγματοποιείται με διαχωρισμο των συστατικών που εμπεριέχονται στο εκάστοτε φυτό και ταυτοποίηση αυτών. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των κύριων κατηγοριών φυτοχημικών μέσω λεπτομερούς ανάλυσης συστατικών γίνεται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), χρωματογραφίας στήλης, υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS). Περαιτέρω δομική διευκρίνιση των δραστικών συστατικών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω φασματομετρίας μαζών συντονισμού ιόντων κυκλοτρονίου μετασχηματισμού Fourier – Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR), όπου έχει αποδειχθεί ότι είναι μία αποτελεσματική τεχνική στην μεταβολομική των φυτών. Επιπλέον, διευκρίνιση των καθαρών ενώσεων πραγματοποιείται με φασματοσκοπική ανάλυση μέσω υπερύθρων (IR), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis spectroscopy) (Mulat *et al.*, 2019).

2.2.1 Χρωματογραφία

Με τον όρο χρωματογραφία (chromatography) εννοούμε το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών σε επιμέρους συστατικά μέσω αναλυτικών τεχνικών. Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρέως για την διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών μιγμάτων που περιέχουν περιορισμένο αριθμό προσμίξεων γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας ενώ η ταυτοποίηση των συστατικών μετά τον διαχωρισμό πραγματοποιείται με χημικές ή φασματοσκοπικές τεχνικές. Η χρωματογραφία σε συνδυασμό με επακόλουθη συζευγμένη τεχνική ανίχνευσης (tandem chromatography), κυρίως με φασματοσκοπικές τεχνικές όπως UV/Vis, MS ή IR, αποτελεί αναγκαίο προκαταρτικό στάδιο για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζόμενων ουσιών, καθώς επίσης χρησιμοποιείται και ως μέθοδος απομόνωσης των συστατικών ενός μίγματος στη φυτοχημεία, τη χημεία φυσικών προϊόντων κ.α. (προπαρασκευαστική χρωματογραφία, preparatory chromatography). Η χρωματογραφία βρίσκει εφαρμογή στην κλινική και φαρμακευτική ανάλυση, την ανάλυση τροφίμων και

περιβαλλοντικών δειγμάτων, στη βιοχημική έρευνα, στην καθημερινή πρακτική ενός συνθετικού χημικού εργαστηρίου και αλλού.

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες ενός μίγματος μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Τα συστατικά ενός δείγματος κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό λόγω της αγκιστείας (φυσικοχημική συγγένεια) του κάθε συστατικού με την κάθε φάση. Το αποτέλεσμα αυτού είναι ότι κάποια συστατικά μετακινούνται γρηγορότερα ενώ κάποια άλλα με πιο αργό ρυθμό και έτσι πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Η διαφορετική αγκιστεία οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του δείγματος και σε ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Η αγκιστεία αυτή περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής K (partition coefficient) ο οποίος ορίζεται ως:

$$K = C_s / C_m$$

Όπου:

C_s : η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στη στατική φάση και

C_m : η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στην κινητή φάση.

Η παράμετρος K είναι μια χαρακτηριστική σταθερά για μια δεδομένη χημική ένωση και το ζεύγος στατικής/κινητής φάσης, σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Συνεπώς, για να διαχωριστούν δύο ουσίες θα πρέπει να έχουν διαφορετικό συντελεστή κατανομής.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται, με βάση το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση, σε χρωματογραφία στήλης και επίπεδη χρωματογραφία. Διακρίνονται επίσης, με βάση το είδος της κινητής και της στατικής φάσης, σε υγρή και αέρια χρωματογραφία και τέλος, ανάλογα με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και τη στατική φάση, σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας (Καρκαλούσος *et al.*, 2015).

2.2.1.1 Υγρή Χρωματογραφία

Στην υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) αποτελεί μία εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση αντί να ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας υποβοηθείται με αντλία. Με αυτό τον τρόπο επιταχύνεται η ανάλυση, μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό και επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα των αναλυόμενων μορίων. Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή.

Η HPLC μπορεί να είναι κανονικής φάσης ή αντίστροφης φάσης (reversed phase HPLC, RP-HPLC). Στην πρώτη, ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό (π.χ. SiO_2 , Al_2O_3) και έτσι η στατική φάση είναι πολική, ενώ η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας. Με αυτό τον τρόπο οι άπολες ενώσεις εκλύονται πρώτες από τη στήλη καθώς οι πολικές προσροφούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση. Στην RP-HPLC η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες και άλλες, οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα και η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Οι πιο κοινές τροποποιήσεις του προσροφητικού υλικού γίνονται με την πρόσδεση υδρογονανθράκων αποτελούμενων από 4 ή 8 ή 18 άτομα άνθρακα. Οι στήλες με τα παραπάνω προσροφητικά μέσα ονομάζονται C4 ή C8 ή C18, αντίστοιχα, ενώ για τον διαχωρισμό μικρών μορίων με RP-HPLC μεγαλύτερη εφαρμογή βρίσκουν οι στήλες C18. Συνεπώς, σε αυτή την περίπτωση τα πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα εκλύονται πρώτα καθώς συμπαρασύρονται από την πολική κινητή φάση και τα μη πολικά προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα.

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει τους περιέκτες διαλυτών, δηλαδή ειδικές φιάλες στις οποίες αποθηκεύεται η κινητή φάση, τον απαερωτή κενού για τον έλεγχο της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη, την αντλία (pump), το σύστημα

εισαγωγής δείγματος (injection system/ injection valve), τη χρωματογραφική στήλη (column) της οποίας η θερμοκρασία ρυθμίζεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven) και τον ανιχνευτή (detector). Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως στην HPLC είναι: ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV-Vis Detector), ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD), αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector), ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector), φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector), ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR) (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector), ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector) και φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector) (Καρκαλούσος *et al.*, 2015).

2.2.2.2 Αέρια Χρωματογραφία

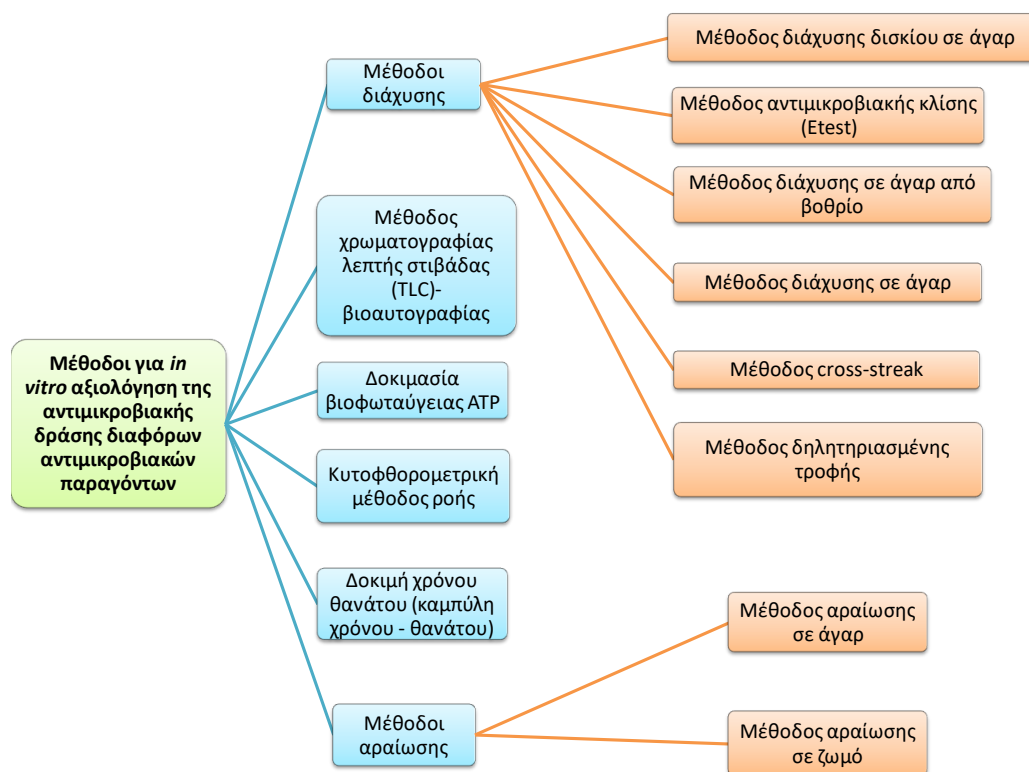
Στην αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) η κινητή φάση αποτελείται από έδρανές αέριο, το φέρον αέριο (carrier gas) ενώ για τη στατική φάση χρησιμοποιείται είτε στήλη με στερεό πληρωτικό υλικό, είτε τριχοειδής στήλη (capillary column). Στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος μπορεί να υπάρχει λεπτή στοιβάδα υγρού υψηλού σημείου ζέσεως και τότε μιλάμε για χρωματογραφία αέριου – υγρού. Η αέρια χρωματογραφία είναι κατάλληλη μόνο για την ανάλυση μιγμάτων πτητικών ουσιών ή ουσιών σχετικά μικρού μοριακού βάρους που μπορούν να καταστούν πτητικές, χωρίς όμως να διασπώνται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Η ανάλυση ξεκινάει με ένεση του δείγματος στον εισαγωγέα, άμεση εξάτμιση αυτού και εισαγωγή σε χρωματογραφική στήλη (στατική φάση) η οποία είναι εγκλεισμένη σε φούρνο. Εκεί η θερμοκρασία αυξάνεται αρκετά και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των στατικών. Τέλος, οι διαχωρισμένες ουσίες περνούν από ανιχνευτή έτσι ώστε να γίνει η ταυτοποίηση αυτών (Καρκαλούσος *et al.*, 2015).

2.3 Μέθοδοι ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης

Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη φαρμάκων, την επιδημιολογία και την πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος. Στις μέρες μας υπάρχει μια παγκόσμια ανησυχία για τη δημόσια

υγεία, όσον αφορά τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε πολλαπλά φάρμακα (multidrug – resistant bacteria) όπως είναι τα κοινά αντιβιοτικά. Για το λόγο αυτό, η ανακάλυψη νέων φαρμάκων αποτελεί σημαντικό στόχο και τα φυσικά προϊόντα αποτελούν μία από τις σημαντικότερες πηγές νέων μορίων φαρμάκων, με κυριότερες πηγές τα φυτά και τους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων όσον αφορά την αντιμικροβιακή επίδραση των φυσικών προϊόντων είναι συχνά δύσκολη λόγω της χρησιμοποίησης διαφορετικών μη τυποποιημένων τεχνικών προσεγγίσεων παρασκευής εμβολίου, μεγέθους εμβολίου, μέσου ανάπτυξης, συνθηκών επώασης και προσδιορισμού τελικών σημείων. Συνεπώς, όταν ένα φυτικό εκχύλισμα παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση είναι σημαντικό τα αποτελέσματα να είναι αξιότιστα και συγκρίσιμα, αποφεύγοντας την παρουσίαση της αντιμικροβιακής δράσης μόνο ως συμπλήρωμα μιας φυτοχημικής μελέτης.

Οι πιο γνωστές βιοδοκιμασίες είναι η διάχυσης σε δισκίο η διάχυσης σε βοθρίο και αραίωσης σε ζυμό ή άγαρ. Για περαιτέρω μελέτη της αντιμικροβιακής επίδρασης ενός παράγοντα σε βάθος, συνιστώνται η δοκιμή χρόνου θανάτωσης (time – kill test) και οι κυτταροφθορομετρικές μέθοδοι ροής (flow cytofluorometric methods). Άλλες όπως είναι οι μέθοδοι ροής κυτταροφθορομετρίας και βιοφωταύγειας δεν χρησιμοποιούνται ευρέως επειδή απαιτούν καθορισμένο εξοπλισμό και περαιτέρω αξιολόγηση όσον αφορά την αναπαραγωγικότητα και την τυποποίηση, αν και μπορούν να παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα των επιδράσεων του αντιμικροβιακού παράγοντα και καλύτερη κατανόηση της επίδρασής του στη βιωσιμότητα και την κυτταρική βλάβη που προκαλείται στον εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα σύντομο σχεδιάγραμμα με μερικές από τις πιο γνωστές μεθόδους για *in vitro* αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των αντιμικροβιακών παραγόντων (Balouiri *et al.*, 2016).



Εικόνα 8: Διάγραμμα μεθόδων in vitro αξιολόγησης αντιμικροβιακής δράσης παραγόντων.

2.3.1 Μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ

Η μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης φυτικών ή μικροβιακών εκχυλισμάτων. Σε αυτή, ένα τρυβλίο ή πλάκα με άγαρ εμβολιάζεται με τυποποιημένο εμβόλιο από τον εκάστοτε μικροοργανισμό και γίνεται διάδοση του όγκου σε ολόκληρη την επιφάνεια. Στη συνέχεια, δημιουργείται ασυπτικά μία τρύπα με διάμετρο 6 - 8 mm με τη βοήθεια εργαστηριακού μεταλλικού φελλού ή κάποιου άλλου εργαλείου, και εισάγεται ο αντιμικροβιακός παράγοντας στην επιθυμητή συγκέντρωση. Εφόσον μετά την επώαση παρατηρηθεί μία ζώνη διαύγασης, τότε αυτή ερμηνεύεται ως ζώνη ανάπτυξης αναστολής το εξεταζόμενου μικροοργανισμού.

Ωστόσο, επειδή η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης δεν σημαίνει τον βακτηριακό θάνατο, αυτή η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής

συγκέντρωσης (MIC), καθώς είναι αδύνατο να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα που διαχέεται στο στερεό θρεπτικό μέσο. Ωστόσο, μία κατά προσέγγιση MIC μπορεί να υπολογιστεί για ορισμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες συγκρίνοντας τις ζώνες αναστολής με αποθηκευμένους αλγόριθμους.

Αυτή η μέθοδος προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους: απλότητα, χαμηλό κόστος, ικανότητα δοκιμής τεράστιου αριθμού μικροοργανισμών και αντιμικροβιακών παραγόντων και την ευκολία ερμηνείας των παρεχόμενων αποτελεσμάτων. Τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου, κυρίως η απλότητα και το χαμηλό κόστος, έχουν συμβάλει στην κοινή χρήση της για τον αντιμικροβιακό έλεγχο φυτικών εκχυλισμάτων, αιθέριων ελαίων και άλλων φαρμάκων (Balouiri *et al.*, 2016).

2.3.2 Μέθοδος μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζυμό

Η μικροαραίωση σε ζυμό ανήκει στις μεθόδους αραίωσης σε ζυμό και είναι μια από τις πιο βασικές μεθόδους δοκιμής της ευαισθησίας κατά των μικροοργανισμών, με κύρια πλεονεκτήματα την αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων, την οικονομία των αντιδραστηρίων αλλά και την οικονομία χώρου. Για τα αερόβια βακτήρια, τις ζύμες και τους νηματοειδείς μύκητες υπάρχουν τυποποιημένες μέθοδοι αραίωσης σε ζυμό.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία δυαδικών αραιώσεων του αντιμικροβιακού παράγοντα σε υγρό μέσο ανάπτυξης το οποίο στη συνέχεια διανέμεται στα βοθρία πλακιδίου μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων. Κάθε βοθρίο εμβολιάζεται με ένα μικροβιακό εμβόλιο που παρασκευάζεται στο ίδιο μέσο μετά από αραίωση τυποποιημένου μικροβιακού εμβολίου ρυθμισμένο για τα αερόβια βακτήρια σε κλίμακα 0,5 McFarland ή μετά από φασματοφωτομετρική ρύθμιση του εμβολίου ($A_{625} = 0,8 - 0,12$), δίνοντας έτσι και στις δύο περιπτώσεις εναιώρημα βακτηριακών κυττάρων $(1-2) \times 10^8$ CFU/mL. Μετά από καλή ανάμιξη, το ενοφθαλμισμένο μικροπλακίδιο επωάζεται υπό κατάλληλες συνθήκες ανάλογα με τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό.

Η MIC είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του οργανισμού σε δοκιμαστικούς σωλήνες

(μακροαραιώση) ή βοθρία (μικροαραιώση) όπως ανιχνεύεται από το γυμνό μάτι. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η προσέγγιση του τελικού αποτελέσματος μπορεί να ανιχνεύεται με δυσκολία. Συμπληρωματικά, η επιβεβαίωση του τελικού σημείου της MIC μπορεί να γίνει είτε φασματοφωτομετρικά με ειδικές συσκευές ανάγνωσης μικροπλακιδίων είτε με χρωματομετρικές μεθόδους που βασίζονται σε αντιδραστήρια χρώσης (π.χ. ΜΜΤ, ΧΤΤ, μπλε χρώση Alamar – ρεσαζουρίνη). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων. Τέλος, ο προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνας συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC), επίσης γνωστή ως η ελάχιστη θανατηφόρα συγκέντρωση (Minimum Lethal Concentration, MLC), είναι η πιο κοινή εκτίμηση της βακτηριοκτόνου δράσης. Ως MBC ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που απαιτείται για τη θανάτωση του 99,9% του τελικού εμβολίου μετά από επώαση για 24 ώρες υπό τυποποιημένο σύνολο συνθηκών. (Balouiri *et al.*, 2016).

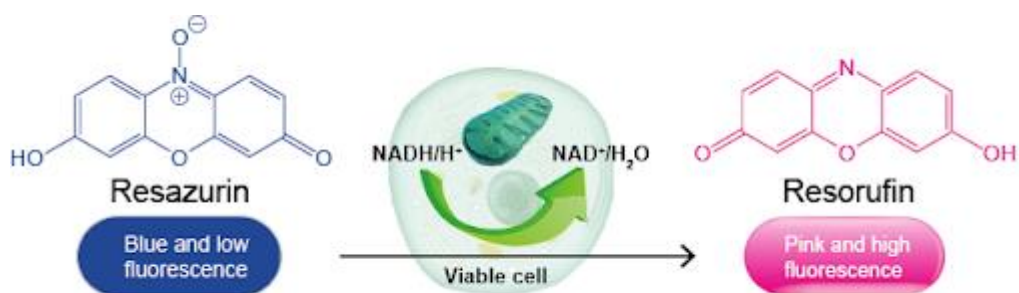
2.3.3 Δοκιμασία μικροαραιώσης σε ζυμό με ρεσαζουρίνη

Η δοκιμασία μικροαραιώσης σε ζυμό με ρεσαζουρίνη ακολουθεί την ίδια πειραματική διαδικασία με αυτή της μεθόδου μικροαραιώσης σε ζυμό, με τη διαφορά ότι ως διαγνωστικό μέσο για το τελικό σημείο της MIC χρησιμοποιείται η χρωστική ρεσαζουρίνη.

Η ρεσαζουρίνη (resazurin) είναι ένας μπλε, μη τοξικός, υδατοδιαλυτός δείκτης μείωσης της οξειδωσης που μετατρέπεται σε ροζ όταν ανάγεται σε ρεσορουφίνη (resorufin) από κυτταρικές οξειδοοδουκτάσες και γίνεται διαυγής καθώς το οξυγόνο περιορίζεται μέσα στο μέσο. Το πρώτο στάδιο αυτής της μείωσης οφείλεται στην απώλεια ενός ατόμου οξυγόνου που συνδέεται χαλαρά στο άζωτο του πυρήνα της φαινοξαζίνης. Αυτή η αλλαγή σε ροζ ρεσορουφίνη δεν είναι αναστρέψιμη από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη τόσο από το δυναμικό μείωσης όσο και από την περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Το δεύτερο στάδιο της μείωσης στην άχρωμη κατάσταση είναι αναστρέψιμο από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (Twigg 1945; Guerin *et al.*, 2001; Mariscal *et al.*, 2009; Hudman *et al.*, 2013). Η ρεσαζουρίνη είναι πολύ σταθερή σε ένα μέσο

καλλιέργειας χωρίς κύτταρα, αλλά μειώνεται γρήγορα παρουσία ζωντανών κυττάρων. Αρκετές αναγωγάσες, όπως οι διαφωράσες και η αφυδρογονάση NADPH, θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν τη ρεσαζουρίνη ως δέκτη ηλεκτρονίων και να είναι υπεύθυνες για τη μείωση της ρεσαζουρίνης σε ρεσορουφίνη (O'Brien *et al.* 2000). Η συγκέντρωση βιώσιμων κυττάρων σε ένα εναιώρημα που περιέχει ρεσαζουρίνη καθορίζει άμεσα το χρονικό σημείο για μια ορατή μετατροπή από μπλε σε ροζ χρώμα (Vega-Avila & Pugsley 2011; Coban 2012).

Οι δοκιμασίες μείωσης της ρεσαζουρίνης (resazurin reduction tests) έχουν χρησιμοποιηθεί για να αποδειχθεί η μόλυνση του γάλακτος από βακτηρίδια και ζύμες, για τον προσδιορισμό της χημικής κυτταροτοξικότητας, το προσδιορισμό των ελάχιστων τιμών ανασταλτικής συγκέντρωσης για τα αντιβιοτικά και για την ποσοτικοποίηση βιο-υμενίων (Bigalke 1984; Drummond & Waigh 2000; McNicholl *et al.* 2006; Sarker *et al.* 2007; Mariscal *et al.*, 2009; Budri *et al.*, 2015).



Εικόνα 9 Η αρχή της δοκιμασίας βιωσιμότητας κυττάρων με ρεσαζουρίνη (Πηγή: (9)).

Κεφάλαιο 3

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η διερεύνηση της χημικής σύστασης τεσσάρων ειδών *Hypericum*, ενδημικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας, η ανάλυση των διαφοροποιήσεων σε ποιοτικό επίπεδο αλλά και στη βιοδραστικότητα των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων τους.

Πρωταρχικό μέλημα είναι η παραλαβή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων από τη δρόγη, η οποία στην παρούσα μελέτη αποτελείται από ολόκληρο το φυτικό υλικό εκτός της ρίζας, και ακολούθως, η χημική ανάλυσή τους με υγρή χρωματογραφία. Τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα που αποτελούν την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή εμπορικώς, μελετήθηκαν ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (δοκιμασία Folin – Ciocalteu), την αντιοξειδωτική ικανότητα (δοκιμασίες DPPH, ABTS) και την αντιβακτηριακή δράσης (μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ, δοκιμασία μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη), με απώτερο στόχο τη συσχέτιση των διαφοροποιήσεων με το χημικό προφίλ του βοτάνου.

Κεφάλαιο 4

Πειραματικό μέρος

4.1 Πρώτες ύλες, Αντιδραστήρια και Όργανα

4.1.1 Προμήθεια φυτικού υλικού

Όλα τα φυτικά υλικά συλλέχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τον Επίκουρο Καθηγητή Παναγιώτη Τρίγκα (Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) και την ερευνητική ομάδα του. Το είδος *H. cycladicum* συλλέχθηκε από την Άνδρο τον Ιούνιο του 2019. Τα τέσσερα είδη που μελετήθηκαν ήταν τα: *Hypericum perforatum*, *H. cycladicum*, *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* και *H. perfoliatum*.

4.1.2 Διαλύτες, Αντιδραστήρια, Πρότυπες ενώσεις και Θρεπτικά υλικά

Για την παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

- Μεθανόλη (HPLC grade, καθαρότητα: 99,99%, Fisher Chemical).
- Απιονισμένο νερό.

Για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών με την δοκιμασία DPPH

- Μεθανόλη (HPLC grade, καθαρότητα: 99,99%, Fisher Chemical).
- Απιονισμένο νερό.
- Σκόνη DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, D9132-1G, SIGMA-ALDRICH).
- Καφεϊκό οξύ (C0625-5G, SIGMA).

Για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών με την δοκιμασία ABTS

- Μεθανόλη (HPLC grade, καθαρότητα: 99,99%, Fisher Chemical).
- Απιονισμένο νερό.
- Σκόνη ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, diammonium salt, 98%, Alfa Aesar).
- Καφεϊκό οξύ (C0625-5G, SIGMA).

Για την ανάλυση HPLC

- Μεθανόλη (LC-MS grade, καθαρότητα: $\geq 99,9\%$, Fisher Chemical).

- Πρότυπες ενώσεις.

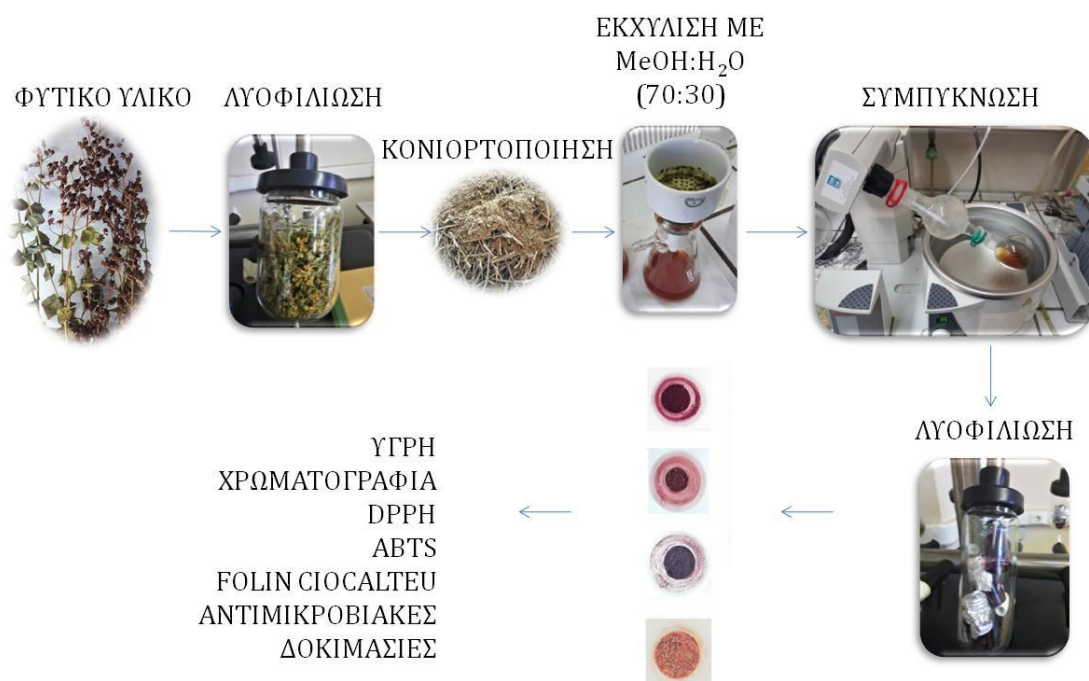
Για το μικροβιολογικό μέρος

- Ρεσαουρίνη (B21187 Resazurin sodium salt, Alfa Aesar).
- Διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO) (3.619.541.611, Panreac).
- Καναμυκίνη (Kanamycin sulfate BP906, Fisher Scientific).
- Θρεπτικός ζωμός τρυπτόνης (Tryptone Soy Broth, TSB) (θρεπτικός ζωμός γενικού σκοπού): Trypticasein Soy Broth της εταιρείας Conda (CAT №: 1224).
- Θρεπτικό άγαρ τρυπτόνης (Tryptone Soy Agar, TSA) (στερεό θρεπτικό υλικό γενικού σκοπού): Tryptone Soya Agar της εταιρείας Oxoid (CM0131).
- Ταμπλέτες Ringer's Solution ¼ strength tablets της εταιρείας LABM (LAB100Z).
- Θρεπτικό άγαρ γενικού σκοπού (Agar No. 2, MC006, LABM).

4.1.3 Οργανολογία

- Συσκευή συμπύκνωσης με αντλία κενού με θερμαντικό λουτρό της εταιρείας Heidolph.
- Συσκευή λυοφιλοποίησης.
- Σύστημα LC-DAD/MS της SHIMADZU.
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Jasco V-550).
- Φασματοφωτόμετρο – Αναγνώστης μικροπλακιδίων (Microplate reader) της εταιρείας TECAN.
- Επωαστήρας, ρυθμισμένος στους 37 °C.
- Κλίβανος Υγρής Αποστείρωσης - Αυτόκαυστο (autoclave) της εταιρείας RAYPA.
- Λουτρό υπερήχων της εταιρείας Grant.
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας.

4.2 Διαγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας



Εικόνα 10: Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας

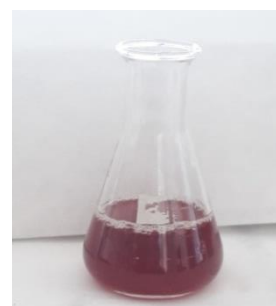
4.3 Εκχύλιση των *Hypericum* spp.

4.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Από τα φυτικά υλικά που παραλήφθηκαν, οι ρίζες απομακρύνθηκαν με το χέρι και απορρίφθηκαν. Το κύριο στέλεχος, οι μίσχοι με τα άνθη και τα φύλλα υπέστησαν κρυοξήρανση σε κρυοξηραντήρα, κονιορτοποιήθηκαν σε αναμεικτήρα (blender) και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C, για μικρό χρονικό διάστημα, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

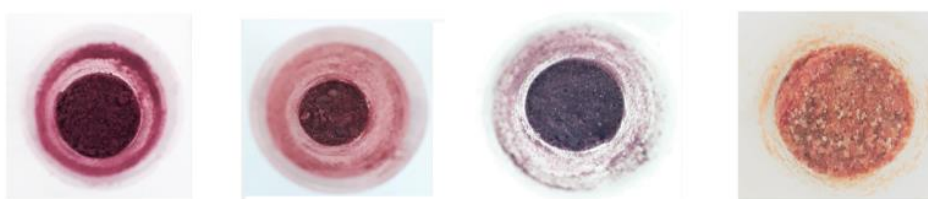
4.3.2 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Ποσότητα 4 g κονιορτοποιημένου δείγματος τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και εμποτίστηκε με 60 mL διαλύματος μεθανόλης:νερού σε αναλογία 70:30 v/v (MeOH:H₂O, 70:30 v/v). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων τύπου GRANT σταθερής συχνότητας 35 kHz, στους 25 °C για 15 λεπτά και το ληφθέν υδρομεθανολικό εκχύλισμα



Εικόνα 11: Υδρομεθανολικό εκχύλισμα HC

διηθήθηκε υπό κενό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και ο συνολικός όγκος διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν 180 mL. Στη συνέχεια, το στερεό υπόλειμμα απορρίφθηκε και το υδρομεθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) με αντλία κενού, μέχρι ο οργανικός διαλύτης να εξατμιστεί πλήρως. Το συμπύκνωμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια και λυοφιλιοποιήθηκε ώστε προκύψει σκόνη απαλλαγμένη από υγρασία. Τα φιαλίδια με τα εκχυλίσματα *Hypericum* αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 12: Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων HC, HP, HR, HPL (από αριστερά προς τα δεξιά), μετά το στάδιο της λυοφιλίωσης.

4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro* των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum spp.*

4.4.1 Δοκιμασία DPPH

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων δειγμάτων *Hypericum* μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη δοκιμασία DPPH. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα εργασίας της σταθερής ρίζας DPPH, συγκέντρωσης 0,04 mg/mL. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πέντε συγκεντρώσεις πρότυπης ουσίας καφεϊκού οξέως διαλυμένη σε MeOH:H₂O (70:30, v/v). Το εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης ουσίας ήταν από 1 µg/mL μέχρι 5 µg/mL.

Ποσότητα 50 µL από κάθε δείγμα και σε διάφορες συγκεντρώσεις αναμίχθηκαν με 5 mL διαλύματος εργασίας DPPH. Τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν σε λουτρό υπερήχων και αφέθηκαν για επώαση 30 λεπτών, σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφησή τους με

φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 517 nm και καταγράφηκαν οι τιμές απορρόφησης. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε MeOH:H₂O (70:30, v/v).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε μg/mL ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (caffeic acid equivalents, CAE) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Τέλος, η % παρεμπόδιση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Παρεμπόδιση (\%)} = \frac{A_{\text{μάρτυρα}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{μάρτυρα}}} \cdot 100$$

όπου $A_{\text{μάρτυρα}}$ η απορρόφηση του μάρτυρα και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος.

4.4.2 Δοκιμασία ABTS

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων δειγμάτων *Hypericum* μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και με τη δοκιμασία ABTS. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε το διάλυμα ρίζας ABTS^{•+} με ανάμιξη αντιδραστηρίου ABTS συγκέντρωσης 7 mM και υπερθειϊκού καλίου συγκέντρωσης 2,45 mM. Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν 38,40 mg αμμωνιακού άλατος ABTS τα οποία διαλύθηκαν πλήρως σε απιονισμένο νερό. Έπειτα, προστέθηκαν 6,62 mg υπερθειϊκού καλίου και με ανατάραξη παρελήφθη διαυγές διάλυμα. Το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένο από το φως για 12-16 ώρες, ώστε να προκύψει διάλυμα χρώματος βαθύ κυανού (Skotti *et al.*, 2013). Την επόμενη ημέρα, με κατάλληλη αραιώση του αρχικού πυκνού μίγματος σε MeOH:H₂O (70:30, v/v), παρασκευάστηκε το τελικό διάλυμα εργασίας, το οποίο είχε απορρόφηση περίπου 0,7 μονάδες στα 734 nm.

Ποσότητα 30 μL από κάθε δείγμα και σε διάφορες συγκεντρώσεις αναμίχθηκαν με 3 mL διαλύματος εργασίας ABTS. Τα μίγματα αναδεύτηκαν σε συσκευή vortex και αφέθηκαν για επώαση 6 λεπτών, σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφησή τους με

φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 734 nm και καταγράφηκαν οι τιμές απορρόφησης. Επίσης, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πέντε συγκεντρώσεις πρότυπης ουσίας καφεϊκού οξέως διαλυμένη σε MeOH:H₂O (70:30, v/v). Το εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης ουσίας ήταν από 1 µg/mL μέχρι 5 µg/mL. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα και το καφεϊκό οξύ και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε MeOH:H₂O (70:30, v/v).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε µg/mL ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (caffeic acid equivalents, CAE) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Τέλος, η % παρεμπόδιση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Παρεμπόδιση (\%)} = \frac{A_{\text{μάρτυρα}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{μάρτυρα}}} \cdot 100$$

όπου $A_{\text{μάρτυρα}}$ η απορρόφηση του μάρτυρα και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος.

4.5 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου *in vitro* των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum spp.* με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων δειγμάτων *Hypericum* μελετήθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά με τη δοκιμασία Folin-Ciocalteu. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα Folin-Ciocalteu 0,2 N και ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) (75 g/L). Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ. Επίσης, προετοιμάστηκαν τα δείγματα *Hypericum* σε συγκέντρωση 2 mg/mL με διαλυτοποίησή τους σε MeOH:H₂O (70:30, v/v), όπου το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε και ως τυφλό διάλυμα.

Αρχικά, ποσότητα 50 µL κάθε δείγματος αναμίχθηκε με 450 µL απιονισμένου νερού και 2,5 mL διαλύματος Folin – Ciocalteu. Το κάθε μίγμα αφέθηκε για επώαση 5 λεπτών και αμέσως μετά προστέθηκαν 2 mL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Ακολούθησε μηχανική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex και τα δείγματα

αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι για 1,5 ώρα, με μεσολάβηση επανάληψης μηχανικών αναδύσεων ανά 30 λεπτά. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε σε μήκος κύματος $\lambda = 765 \text{ nm}$.

Επίσης, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πέντε συγκεντρώσεις πρότυπης ουσίας γαλλικού οξέως διαλυμένη σε μεθανόλη. Το εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης ουσίας ήταν από 1 $\mu\text{g/mL}$ μέχρι 8 $\mu\text{g/mL}$. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα και το γαλλικό οξύ και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη.

Από την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του κάθε δείγματος σε ολικές φαινολικές ενώσεις ως ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE).

4.6 Χημική ανάλυση των εκχυλισμάτων *Hypericum spp.*

4.6.1 Χημική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS)

Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων *Hypericum* επετεύχθησαν με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων και φασματομετρία μαζών (LC – DAD – MS) της εταιρείας SHIMADZU (Εικόνα 13). Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα περιλαμβάνονταν από αντλία LC-10ADnr, απαερωτή



Εικόνα 13: Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας-συστοιχίας φωτοδιόδων-μασματομετρίας μαζών (LC-DAD-MS) που χρησιμοποιήθηκε.

DGU-14A, βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών FCV-10ALnr, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr, φούρνο στήλη CTO-10Avr, ανιχνευτή SPD-M10Avr, ανιχνευτή Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (DAD), φασματογράφο μάζας LC-MS 2010A, φασματογράφο μάζας απλού τετραπόλου, μονάδα ελέγχου SCL-10Avr και λογισμικό LCMS solution 3.40.307. Ως στατική

φάση, χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης, Supelco Discovery HSC18, μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και με μεγέθους σωματιδίων 5 μm.

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις σε μεθανόλη HPLC (Πίνακας 1), αφού προηγήθηκε διήθηση σε φίλτρα, και ποσότητα 20 μL εισήχθει στον αυτόματο δειγματολήπτη. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,4 mL/λεπτό ενώ η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30 °C.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων *Hypericum* που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση LC-DAD-MS.

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/mL)
<i>H. perforatum</i>	1
<i>H. cycladicum</i>	1
<i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	1
<i>H. perforiatum</i>	2

Για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών, A: 0,25 % μυρμηκικό οξύ σε νερό και B: μεθανόλη, με βαθμιδωτή έκλουση σύμφωνα με το πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε

Χρόνος (λεπτά)	% A	% B
0	75	25
2	75	25
40	10	90
45	10	90
50	75	25
60	75	25

4.7 *In vitro* αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των υδρομεθατολικών εκχυλισμάτων *Hypericum* spp.

Μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων τεσσάρων ειδών *Hypericum* (HP, HC, HR, HPL) έναντι σε πέντε θετικά κατά Gram και δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Πίνακας 3), που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ως μικροοργανισμοί δείκτες (indicator microorganisms). Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (ΕΑΣ) (minimum

inhibitory concentration, MIC) των εκχυλισμάτων έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων του κάθε στελέχους με:

- ✓ τη μέθοδο μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζωμό (broth microdilution method, BMM) και
- ✓ τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ από βοθρίο (agar well diffusion method, AWDM)

καθώς και η ελάχιστη βακτηριοκτόνα συγκέντρωση (ΕΒΣ) (minimum bactericidal concentration, MBC).

Πίνακας 3: Μικροοργανισμοί δείκτες ελέγχου αντιμικροβιακής δραστηριότητας εκχυλισμάτων *Hypericum*.

α/α	Κωδικός	Βακτηριακό είδος	Αντίδραση κατά Gram	Άριστη θερμοκρασία (°C)	Λοιπές πληροφορίες
1	DFSN_B68	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Typhimurium</i>	-	37	FMCC_B137, strain DT193, multidrug resistant, human isolate implicated in salmonellosis outbreak
2	DFSN_B77	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	37	ATCC 43888, CDC B6914MS1
3	DFSN_B26	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	37	isolated from melichloro (traditional Lemnos cheese)
4	DFSN_B72	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	37	ser. 4b, str. AAL 20074, isolated from green salad
5	DFSN_B4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	37	FMCC B-202, C5M6, ACA-DC 4057, isolated from fermenting grape juice, AUA vineyard, Athens, Greece
6	DFSN_B98	<i>Streptococcus mutans</i>	+	37	DSM 20523, ATCC 25175
7	DFSN_B78	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	37	ATCC 29212

DFSN = Department of Food Science and Nutrition

4.7.1 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων

❖ Θρεπτικά υλικά

Όλα τα θρεπτικά υλικά προετοιμάστηκαν και αποστειρώθηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες των παρασκευαστών. Για το μαλακό TSA soft (0,7%) agar, ζυγίστηκαν 30 g σκόνη TSB και 7 g άγαρ τα οποία διαλύθηκαν μαζί προσθέτοντας 1000 mL απιονισμένου ύδατος. Όλα τα θρεπτικά υλικά και οι ταμπλέτες ¼ Ringer διαλυτοποιήθηκαν σε απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά, σε αυτόκαυστο.

❖ Διάλυμα καναμυκίνης συγκέντρωσης 50 mg/ml

Ποσότητα 0,05 g καναμυκίνης διαλύθηκε σε 1 mL απιονισμένου νερού και αναδεύτηκε μέχρι πλήρους διάλυσης. Το διάλυμα διηθήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια σύρριγγας χρησιμοποιώντας φίλτρο με διάμετρο οπών 0,22 μm. Το αποστειρωμένο διήθημα συλλέχθηκε σε νέο άδειο αποστειρωμένο σωληνάκι erpendorf και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

❖ Διάλυμα ρεσαζουρίνης 0.1% w/v

Ζυγίστηκε ποσότητα 2 mg σκόνης ρεσαρουρίνης σε αποστειρωμένο σωληνάκι erpendorf των 2 mL, συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τελικού όγκου 2 mL και αναδεύτηκε καλά. Το πυκνό διάλυμα αποθηκεύθηκε στους -20°C.

❖ Προετοιμασία διαλυμάτων εργασίας εκχυλισμάτων *Hypericum* με 3% v/v DMSO

Τα διαλύματα εργασίας που παρασκευάστηκαν για την εκάστοτε μέθοδο αντιμικροβιακής ευαισθησίας περιείχαν 3% (v/v) DMSO. Η περιεκτικότητα αυτή προέκυψε από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία και ύστερα από πειραματικές δοκιμές (Rabanal *et al.*, 2002; Avato *et al.*, 2004; MILOSEVIC *et al.*, 2007; Yousuf *et al.*, 2012; Süntar *et al.*, 2015).

4.7.2 Προετοιμασία καλλιιεργειών εργασίας μικροοργανισμών δεικτών

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum*, οι μικροοργανισμοί δείκτες ανακτήθηκαν από τους -80 °C. Αρχικά, εμβολιάστηκε τρυβλίο TSA από την καλλιέργεια διατήρησης του κάθε

στελέχους (αυτή βρισκόταν παγωμένη μέσα σε BHI broth και 15% (v/v) γλυκερόλη, στους -80 °C), με τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών (streaking). Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες (προκαλλιέργεια). Από την προκαλλιέργεια, ενοφθαλμίστηκαν 10 mL θρεπτικού ζωμού TSB, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και αφέθηκαν για επώαση στους 37 °C για 24 ώρες (καλλιέργεια εργασίας, συγκέντρωση $\approx 10^{8-9}$ κύτταρα/mL).

4.7.3 Εκτίμηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών δεικτών στα εκχυλίσματα *Hypericum* με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ

❖ Προετοιμασία διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων *Hypericum*

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ικανότητας, εξετάστηκαν τουλάχιστον 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος. Τα διαλύματα εργασίας προετοιμάστηκαν την ημέρα που αναμενόταν να χρησιμοποιηθούν, όπου και ζυγίστηκε η κατάλληλη ποσότητα του κάθε εκχυλίσματος, εφαρμόζοντας τον κανόνα των αραιώσεων ($C_A \cdot V_A = C_T \cdot V_T$). Ως διαλύτης αραιώσης χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (dH₂O) με 3% (v/v) DMSO. Το εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκε κυμάνθηκε από 0,78 mg/mL έως 50 mg/mL, ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος.

❖ Πειραματική διαδικασία

Προετοιμάστηκαν 100 mL μαλακού TSA 0,7% w/v (soft agar) για κάθε μικροοργανισμό δείκτη, μέσα σε γυάλινη φιάλη Duran. Κάθε αποστειρωμένο θρεπτικό μαλακό άγαρ ενοφθαλμίστηκε με 1 mL από την καλλιέργεια εργασίας του εκάστοτε μικροοργανισμού δείκτη (αραίωση 1:100, τελική συγκέντρωση $\approx 10^{6-7}$ cfu/mL) και αναδεύθηκε καλά, μέσω ήπιων κυκλικών κινήσεων της φιάλης Duran. Αμέσως μετά, τοποθετήθηκε το κάθε ενοφθαλμισμένο θρεπτικό μαλακό άγαρ (x7 μικροοργανισμούς δείκτες) σε τετράγωνα πλαστικά τρυβλία (50 mL θρεπτικού μαλακού άγαρ/τρυβλίο x σύνολο δειγμάτων). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 1 ώρα στους 4 °C προκειμένου να στερεοποιηθεί καλά το θρεπτικό μαλακό άγαρ.

Στα στερεοποιημένα θρεπτικά υλικά δημιουργήθηκαν 16 βοθρία (το καθένα διαμέτρου 5 mm), με τη βοήθεια γυάλινης πιπέττας Pasteur. Ακολούθως, μεταφέρθηκαν 40 µL από κάθε συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε κάθε βοθρίο και στον θετικό μάρτυρα τοποθετήθηκε διάλυμα καναμυκίνης 50 mg/mL. Τα τρυβλία αφέθηκαν για περίπου 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να επιτραπεί η καλή διάχυση του χημικού αντιμικροβιακού παράγοντα μέσα στο άγαρ και στη συνέχεια επωάστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες.

Μετά τις 24 ώρες επώασης, ελέγχθηκαν τα βοθρία για ύπαρξη ζωνών παρεμπόδισης (growth – free inhibition zones) γύρω από αυτά και σε περίπτωση ύπαρξης μετρήθηκε η διάμετρος (με τη βοήθεια ενός χάρακα).

Μια ζώνη παρεμπόδισης μεγαλύτερη από 1 mm γύρω από το βοθρίο θεωρήθηκε θετικό αποτέλεσμα (παρεμπόδιση).

4.7.4 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων *Hypericum* με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζυμό

Η MIC του κάθε εκχυλίσματος *Hypericum* (HP, HC, HR, HPL) έναντι στα πλαγκτονικά κύτταρα των επιλεγμένων μικροοργανισμών δεικτών, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζυμό όπως αυτή περιγράφηκε από τους [Kostoglou et al. \(2020\)](#) με ορισμένες διαφοροποιήσεις ([Kostoglou et al., 2020](#)).

❖ Προετοιμασία διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων *Hypericum*

Για τον προσδιορισμό της MIC, εξετάστηκαν 10 διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος. Τα διαλύματα εργασίας προετοιμάστηκαν την ημέρα που αναμενόταν να χρησιμοποιηθούν, όπου και ζυγίστηκε η κατάλληλη ποσότητα του κάθε εκχυλίσματος. Ως διαλύτης αραίωσης χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο TSB με 3% (v/v) DMSO. Το εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκε κυμάνθηκε από 0,006 mg/mL έως 50 mg/mL, ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος.

❖ Πειραματική διαδικασία

Αρχικά εκτελέστηκαν δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της κάθε καλλιέργειας εργασίας του στελέχους σε ¼ Ringer με σκοπό να προκύψει αλατούχο βακτηριακό εναιώρημα συγκέντρωσης $\approx 10^{6-7}$ κύτταρα/mL. Από το ρυθμισμένο εναιώρημα μεταφέρθηκαν 20 μ L σε κάθε βοθρίο ενός αποστειρωμένου μικροπλακιδίου 96 βοθρίων, σύμφωνα με το παρακάτω σχεδιάγραμμα (Εικόνα 14).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A			ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ (1 ^{ΟΥ} ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ)										
B			ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ (2 ^{ΟΥ} ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ)										
C			ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ (3 ^{ΟΥ} ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ)										
D			ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ (3 ^{ΟΥ} ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ)										
E			ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ (3 ^{ΟΥ} ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ)										
F			ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ (3 ^{ΟΥ} ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ)										
G			ΤΙΠΟΤΑ (ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ)										
H			ΤΙΠΟΤΑ (ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ)										

Εικόνα 14: Διάγραμμα μεθοδολογίας εμβολιασμού μικροπλακιδίου.

Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν, 180 μ L από τον κάθε θρεπτικό ζωμό, με διαφορετική συγκέντρωση εκχυλίσματος, σε κάθε βοθρίο του μικροπλακιδίου (αραίωση: 1/10, αρχική κυτταρική συγκέντρωση: 10^{5-6} κύτταρα/mL), σύμφωνα με τα σχεδιαγράμματα στην Εικόνα 15. Τόσο στον θετικό, όσο και στον αρνητικό μάρτυρα τοποθετήθηκε αποστειρωμένος θρεπτικός ζωμός TSB με 3% (v/v) DMSO. Το κάθε μικροπλακίδιο σφραγίστηκε με ταινία παραφίνης (για την αποφυγή της εξάτμισης), τοποθετήθηκε το καπάκι του και επώαστηκε στους 37 °C για 24 ώρες.

Στις 24 ώρες επώασης, η μικροβιακή ανάπτυξη του περιεχομένου κάθε βοθρίου αξιολογήθηκε θολομετρικά με οπτική παρατήρηση και επιβεβαιώθηκε με μέτρηση απορροφήσεων στα 600 nm, σε φασματοφωτόμετρο/αναγνώστη μικροπλακιδίων. Η Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (ΕΑΣ, MIC) του κάθε δείγματος εκχυλίσματος υπολογίστηκε ως την ελάχιστη συγκέντρωση αυτού ικανή να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του κάθε βακτηρίου ($A_{\text{δείγματος}} \leq A_{\text{αρνητικού μάρτυρα}}$).

Ακολούθως, ενοφθαλμίστηκαν 10 μ L από καθένα από εκείνα τα βοθρία που παρέμειναν διαυγή (δίχως ορατή βακτηριακή ανάπτυξη και τα οποία περιείχαν συγκέντρωση αντιμικροβιακής ουσίας \geq MIC), σε θρεπτικό υλικό TSA σε τρυβλίο. Για κάθε διαυγές βοθρίο, μεταφέρθηκαν 2 κηλίδες/τεχνικές επαναλήψεις. Τα τρυβλία αφέθηκαν για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (ώστε να στεγνώσουν καλά οι κηλίδες) και ακολούθως επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες.

Υπολογίστηκε την Ελάχιστη Βακτηριοκτόνα Συγκέντρωση (ΕΒΣ, MBC) της ουσίας ως την ελάχιστη συγκέντρωση αυτής ικανή να μειώνει (θανατώνει) το αρχικό εμβόλιο κατά \geq 99,9% (\geq 3 λογαρίθμους, δηλαδή δεν παρατηρούνται παραπάνω από 5-10 αποικίες στο σημείο που είχε τοποθετηθεί η κηλίδα).

Εκτελέστηκαν τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις του κάθε πειράματος (χρησιμοποιώντας ανεξάρτητες βακτηριακές καλλιέργειες) και καταγράφηκαν όλες οι μετρήσεις.

GRAM NEGATIVE												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
B	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	1 ₀ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
C	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
D	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	2 ₀ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
E	50	25mg/m	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
F	mg/mL	L	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	3 ₀ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
G	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ										ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
H											ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	

GRAM POSITIVE												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	0,049	0,024	0,012	0,006	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
B	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	1 ₀ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
C	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	0,049	0,024	0,012	0,006	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
D	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	2 ₀ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
E	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	0,049	0,024	0,012	0,006	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
F	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	3 ₀ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
G	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ										ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	
H											ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	

Εικόνα 15: Σχεδιάγραμμα διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος *Hypericum*, για τα αρνητικά (πάνω) και τα θετικά (κάτω) κατά gram στελέχη, σε μικροπλακίδιο πολυστυρενίου 96 βοθρίων.

4.7.4.1 Μέθοδος μικροαραίωσης σε ζυμό με ρεσαζουρίνη

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά για επιλεγμένα στελέχη όπου απαιτήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος *Hypericum* για την ανίχνευση της MIC και η μεταβολή της θολερότητας δεν ήταν ευδιάκριτη με γυμνό οφθαλμό και με φασματοφωτομέτρηση, λόγω της παρεμπόδισης του πυκνού χρώματος του εκάστοτε εκχυλίσματος. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η

ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην υποενότητα 4.5.2, με επιπλέον προσθήκη διαλύματος ρεσαζουρίνης 0,01 % w/v, ως διαγνωστικό μέσο του τελικού σημείου της MIC.

❖ Προετοιμασία διαλύματος ρεσαζουρίνης 0,01% w/v

Την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, προετοιμάστηκε διάλυμα εργασίας ρεζαρουρίνης με συγκέντρωση 0,01% w/v, αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα αποθήκευσης ρεσαζουρίνης.

❖ Ανίχνευση τελικού σημείου MIC

Μετά την επώαση των μικροπλακιδίων στους 37 °C για 24 ώρες, προστέθηκαν 50 µL διαλύματος 0,01% ρεσαζουρίνης σε κάθε βοθρίο και επώαστηκαν στους 37 °C για 4,5 ώρες. Στις περιπτώσεις που οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων ήταν εξαιρετικά μεγάλες και το χρώμα πολύ σκούρο, η προσθήκη της ρεσαζουρίνης έγινε αφού είχε προηγηθεί μία δεδαδική αραιώση από τα βοθρία με το σκουρόχρωμο περιεχόμενο σε αποστειρωμένο TSB. Η MIC καταγράφηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος στην οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη, όπως υποδεικνύεται από την αλλαγή χρώματος από μπλε σε ροζ (Coban, 2012). Εκτελέστηκαν τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις του κάθε πειράματος (χρησιμοποιώντας ανεξάρτητες βακτηριακές καλλιέργειες).

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

5.1 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum spp* – Αποδόσεις φυτικών υλικών

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των τεσσάρων εξετασθέντων ειδών *Hypericum*, κατά φθίνουσα σειρά, ως μιλιγραμμάρια υδρομεθανολικού εκχυλίσματος ανά γραμμάριο φυτικού υλικού. Για κάθε φυτικό υλικό πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Πίνακας 4: Μέσος όρος αποδόσεων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων εκφρασμένων ως mg εκχυλίσματος/g φυτικού υλικού \pm την τυπική απόκλιση (SD) (n=3).

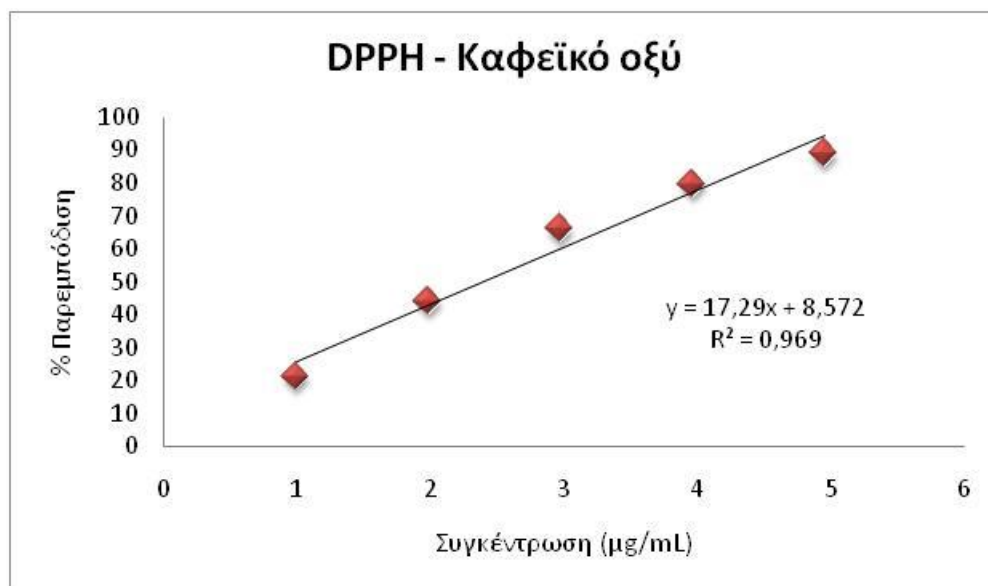
ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΠΟΔΟΣΗ (mg _{εκχυλίσματος} /g _{φυτού}) \pm SD	
<i>H. cycladicum</i>	311,81	\pm 18,22
<i>H. perforatum</i>	230,51	\pm 22,00
<i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	225,19	\pm 1,56
<i>H. perforiatum</i>	210,19	\pm 8,49

5.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων *Hypericum spp.*

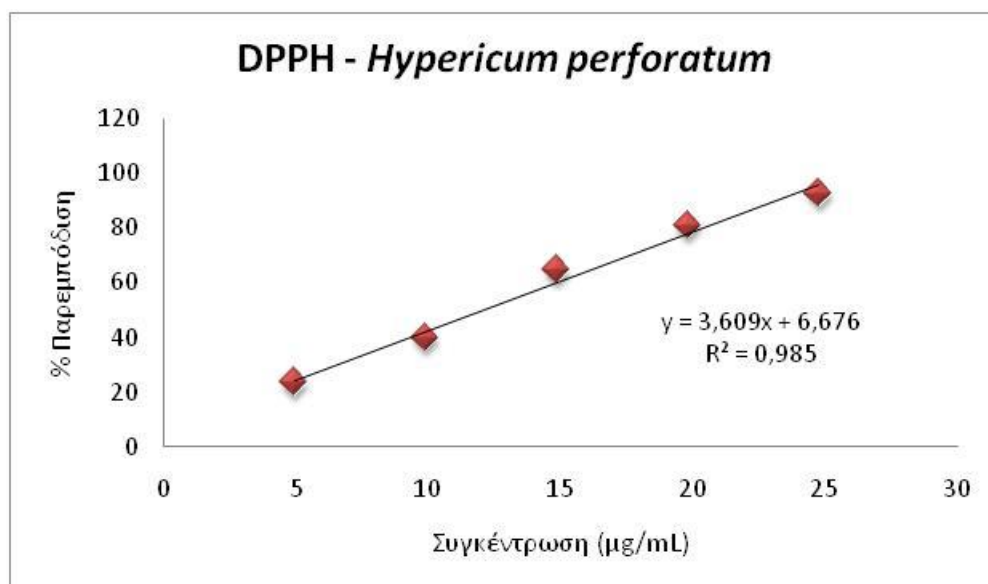
5.2.1 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμασίας DPPH

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε με τη δοκιμασία DPPH και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Για την αποτελεσματική σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος (Εικόνα 16). Από την εξίσωση της κάθε γραφικής παράστασης (Εικόνες 17, 18, 19, 20) προσδιορίστηκαν οι IC₅₀ της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων.

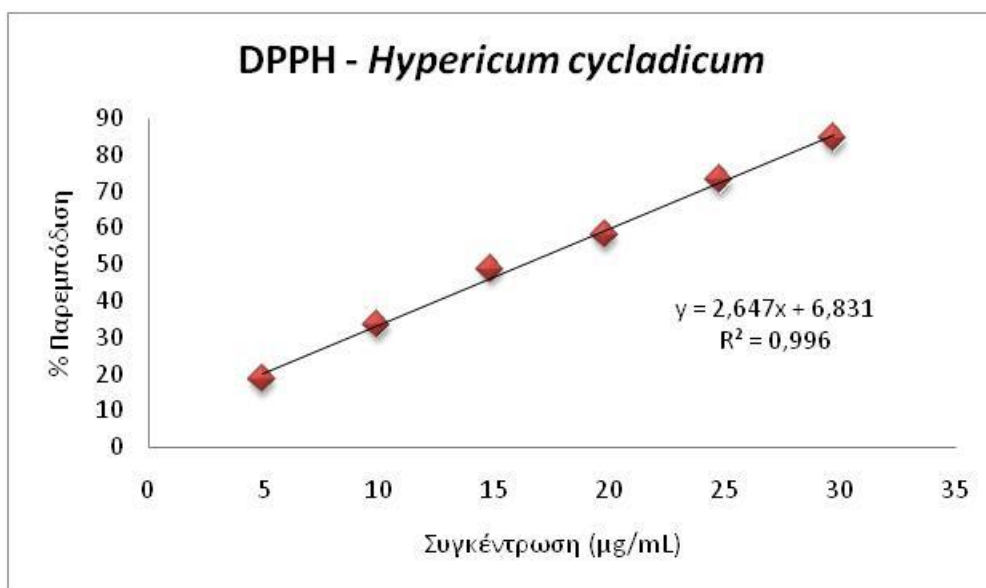
Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων, με φθίνουσα σειρά, δηλαδή αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας.



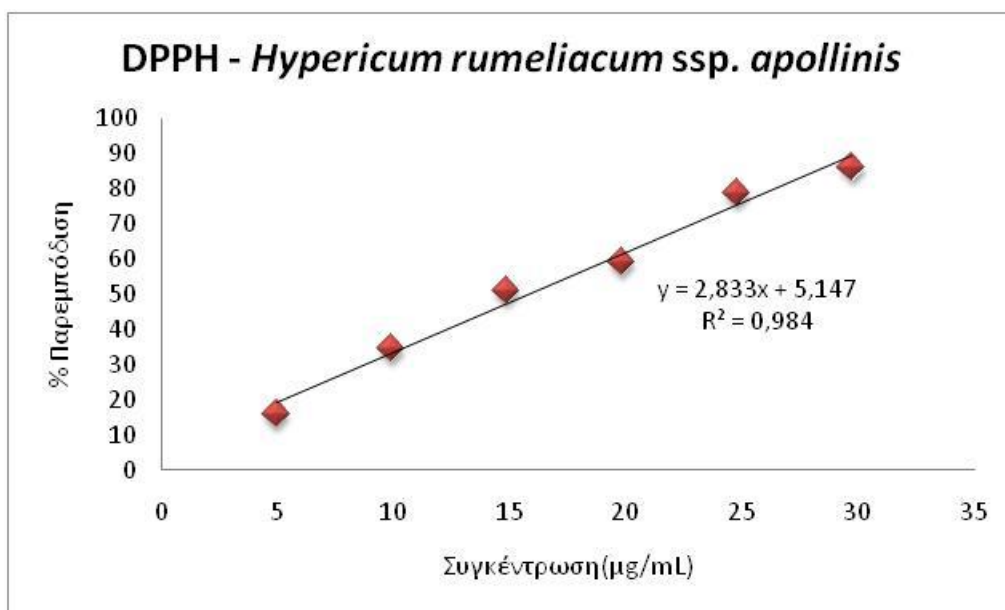
Εικόνα 16: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος με τη δοκιμασία DPPH.



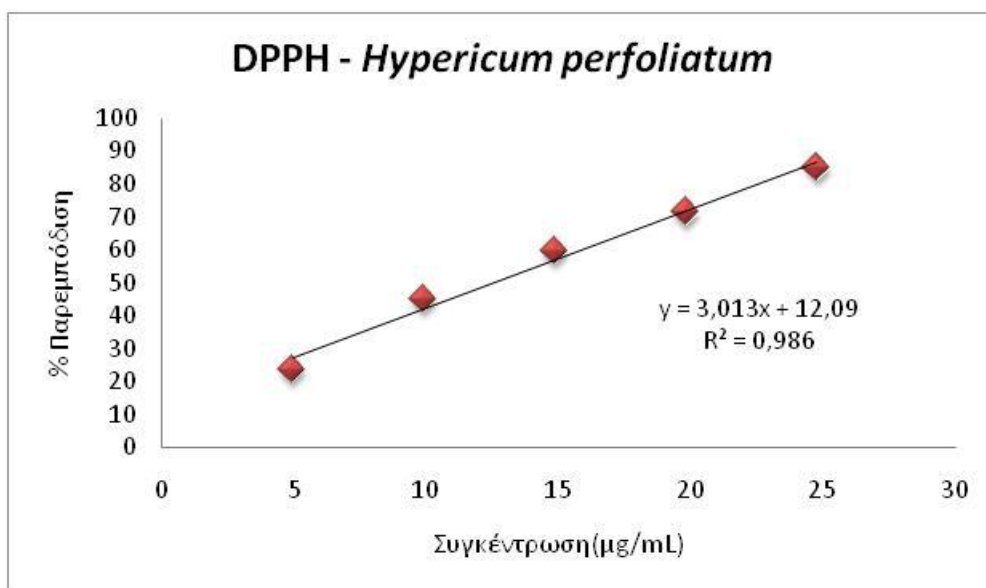
Εικόνα 17: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. perforatum* με τη μέθοδο DPPH.



Εικόνα 18: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. cycladicum* με τη μέθοδο DPPH.



Εικόνα 19: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. rumeliacum ssp. apollinis* με τη μέθοδο DPPH.



Εικόνα 20: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. perfoliatum* με τη μέθοδο DPPH.

Πίνακας 5: Προυσίαση των τιμών IC₅₀ των δειγμάτων κατά φθίνουσα σειρά (δοκιμασία DPPH).

ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>H. cycladicum</i>	16,31
<i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	15,83
<i>H. perfoliatum</i>	12,58
<i>H. perforatum</i>	12,00
Καφεϊκό οξύ	2,40

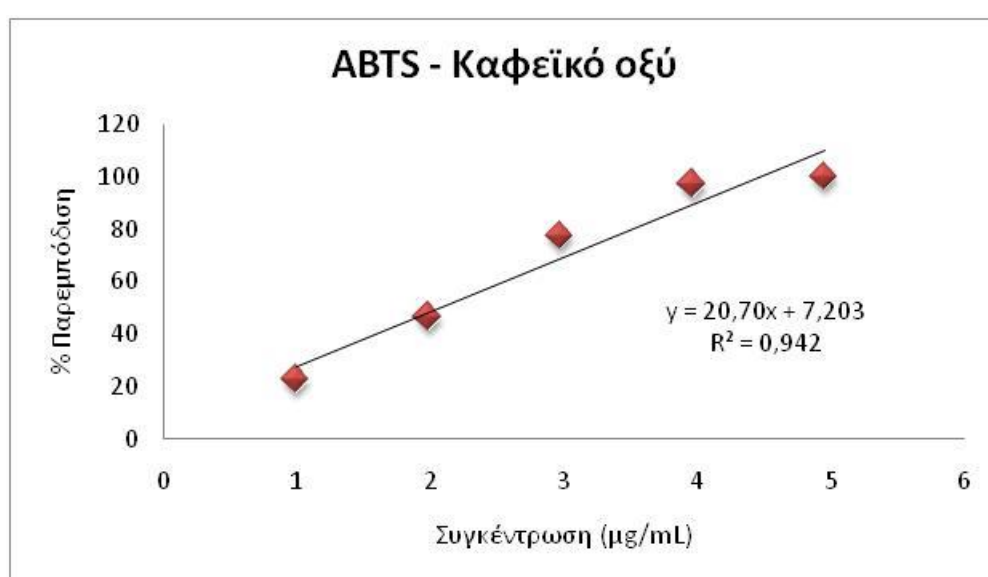
Από τον Πίνακα 5 φαίνεται πως την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, με τη δοκιμασία DPPH, έχει το εκχύλισμα *H. perforatum*, ενώ το εκχύλισμα *H. cycladicum* φαίνεται να έχει την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

5.2.2 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμασίας ABTS

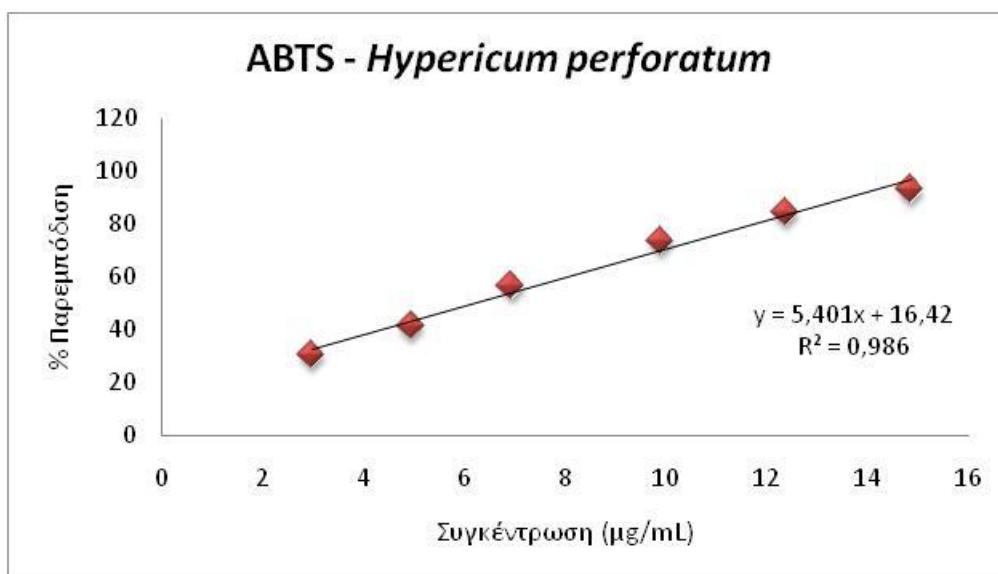
Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε και με τη δοκιμασία ABTS και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει

παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Για την αποτελεσματική σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος (Εικόνα 21). Από την εξίσωση της κάθε γραφικής παράστασης (Εικόνες 22, 23, 24, 25) προσδιορίστηκαν οι IC₅₀ της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων.

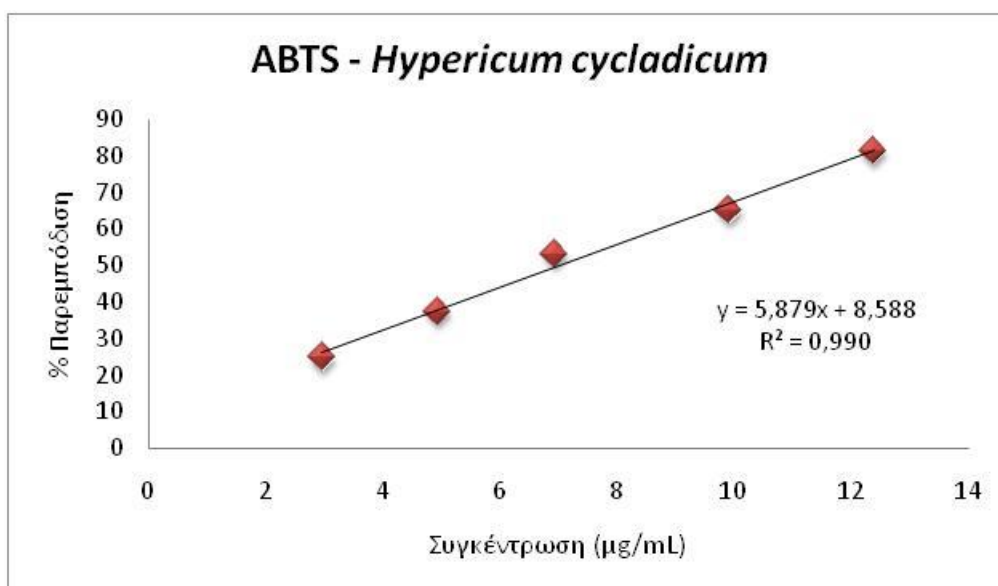
Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων, με φθίνουσα σειρά, δηλαδή αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας.



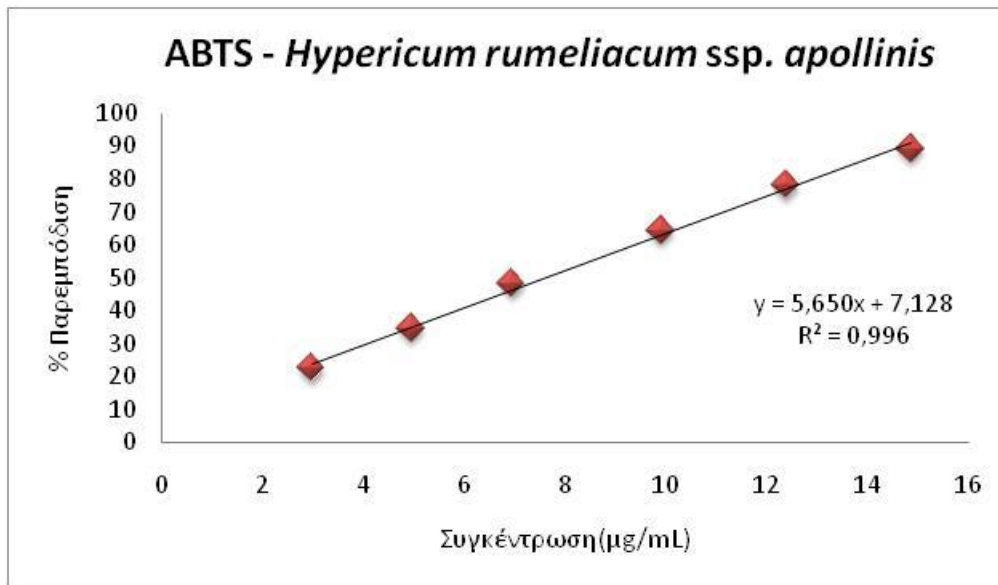
Εικόνα 21: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος με τη δοκιμασία ABTS.



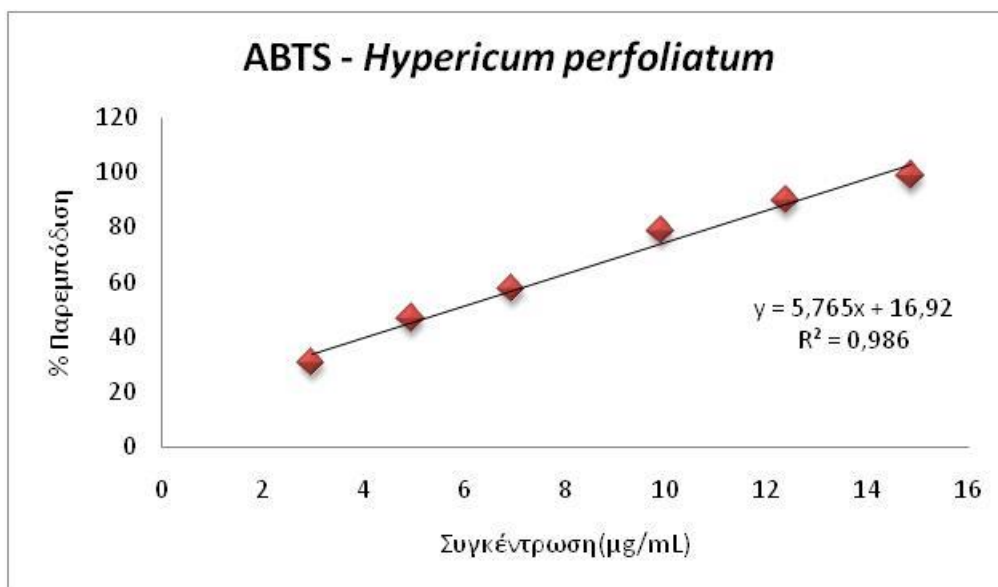
Εικόνα 22: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. perforatum* με τη μέθοδο ABTS.



Εικόνα 23: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. cycladicum* με τη μέθοδο ABTS.



Εικόνα 24: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. rumeliacum* ssp *apollinis* με τη μέθοδο ABTS.



Εικόνα 25: Γραφική παράσταση αντιοξειδωτικής ικανότητας του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. perforatum* με τη μέθοδο ABTS.

Πίνακας 6: Προυσίαση των τιμών IC₅₀ των δειγμάτων κατά φθίνουσα σειρά (δοκιμασία ABTS).

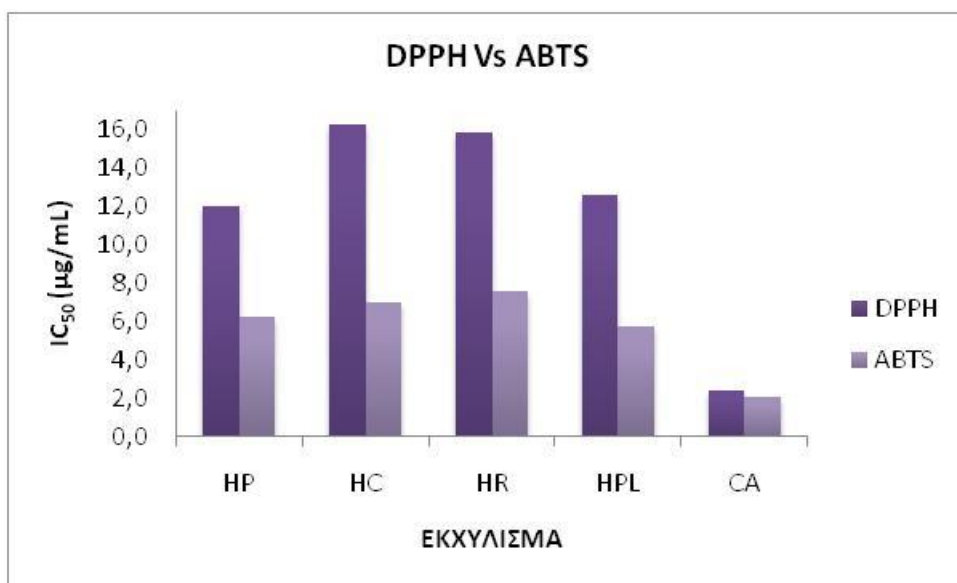
ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	IC ₅₀ (μg/mL)
<i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	7,59
<i>H. cycladicum</i>	7,04
<i>H. perforatum</i>	6,22
<i>H. perforiatum</i>	5,74
Καφεϊκό οξύ	2,07

Από τον Πίνακα 6 φαίνεται πως την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, με τη δοκιμασία ABTS, έχει το εκχύλισμα *H. perforiatum*, ενώ το εκχύλισμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* φαίνεται να έχει την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

5.2.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων των αντιοξειδωτικών δοκιμασιών

DPPH και ABTS

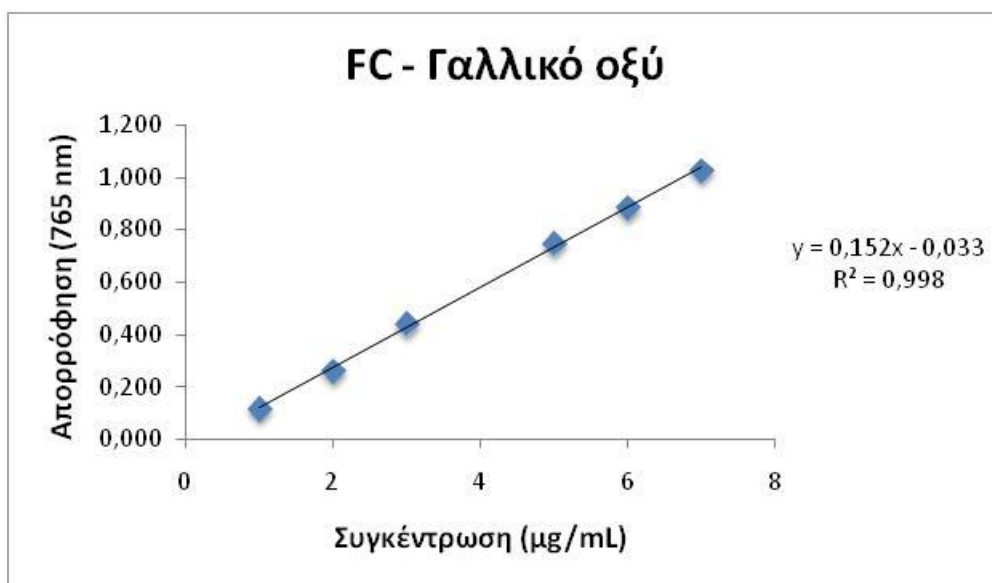
Στο ραβδόγραμμα της Εικόνας 26 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τεσσάρων δειγμάτων *Hypericum* (υδρομεθανολικά εκχυλίσματα) με τις αντιοξειδωτικές δοκιμασίες DPPH και ABTS.



Εικόνα 26: Ραβδογράμμο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (*H. perforatum* (HP), *H. cycladicum* (HC), *H. rumeliacum ssp. apollinis* (HR), *H. perforiatum* (HPL)) και πρότυπης καφεϊκού οξέος (CA) με τις μεθόδους DPPH και ABTS.

5.3 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου *in vitro* των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum spp.* με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η εκτίμηση της περιεκτικότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων σε ολικές φαινολικές ουσίες εκφράστηκε ως εισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος (Εικόνα 27). Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εκτίμησης ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.



Εικόνα 27: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος με τη δοκιμασία Folin – Ciocalteu

Πίνακας 7: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων εκπεφρασμένο σε mg/g ξηρής δρόγης. Οι τιμές των απορροφήσεων αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποτελεσμάτων \pm την τυπική απόκλιση (SD) (n=3).

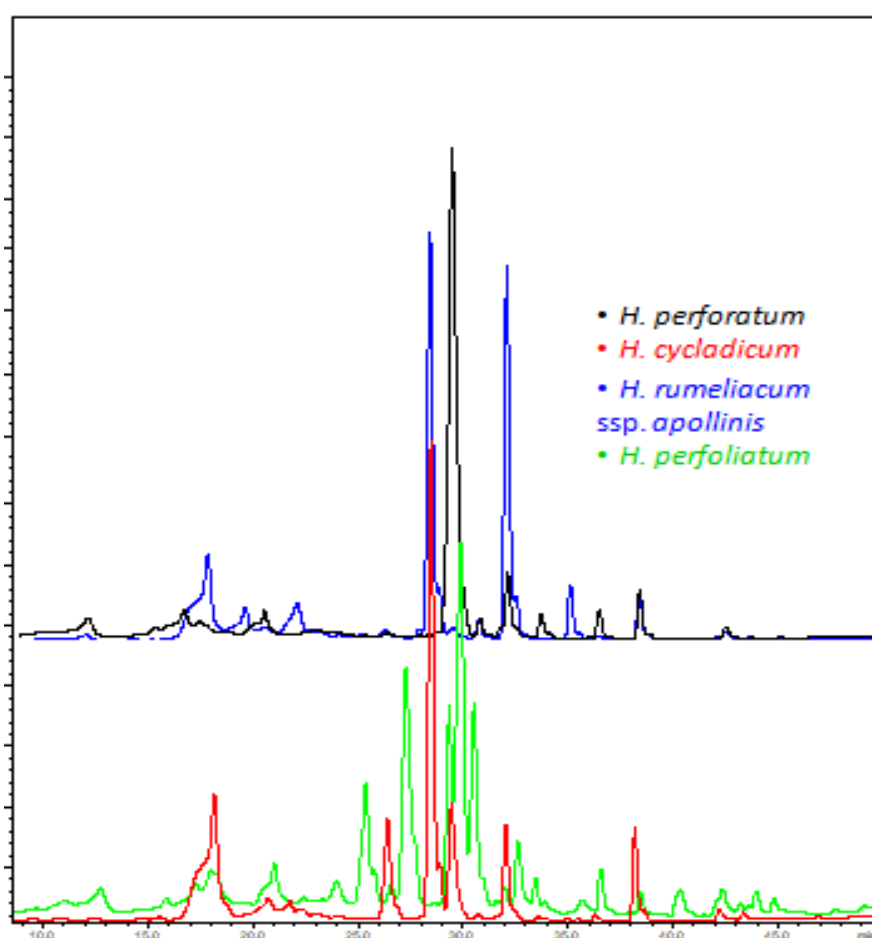
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (765 nm)		ΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΗ ΞΗΡΗΣ ΔΡΟΓΗΣ (mg/g)
<i>H. perforatum</i>	0,823	\pm 0,019	17,22
<i>H. cycladicum</i>	0,703	\pm 0,014	16,12
<i>H. rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	0,704	\pm 0,005	11,00
<i>H. perforiatum</i>	0,503	\pm 0,037	7,30

5.4 Χημική ανάλυση

5.4.1 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS).

Όλα τα δείγματα *Hypericum* όπως και οι πρότυπες φαινολικές ενώσεις, αναλύθηκαν με αρνητικό ιονισμό. Στα 270 nm οι κορυφές όλων των δειγμάτων ήταν πιο ευδιάκριτες, γι' αυτό και η εκτίμηση του χημικού προφίλ των

εκχυλισμάτων έγινε σε αυτό το μήκος κύματος. Στην [Εικόνα 28](#) παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα αρνητικού ιονισμού των τεσσάρων δειγμάτων όπως αυτά εμφανίστηκαν σε μήκος κύματος 270 nm. Από εκεί φαίνεται ότι τα δείγματα παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ μεταξύ τους, με το *H. perforatum* να παρουσιάζει τις μεγαλύτερες διαφορές και το πλουσιότερο χημικό προφίλ από τα υπόλοιπα είδη. Η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών έγινε με βάση το χρόνο έλουσής, του κλάσματος m/z , των πρότυπων ενώσεων και της διαθέσιμης βιβλιογραφίας.

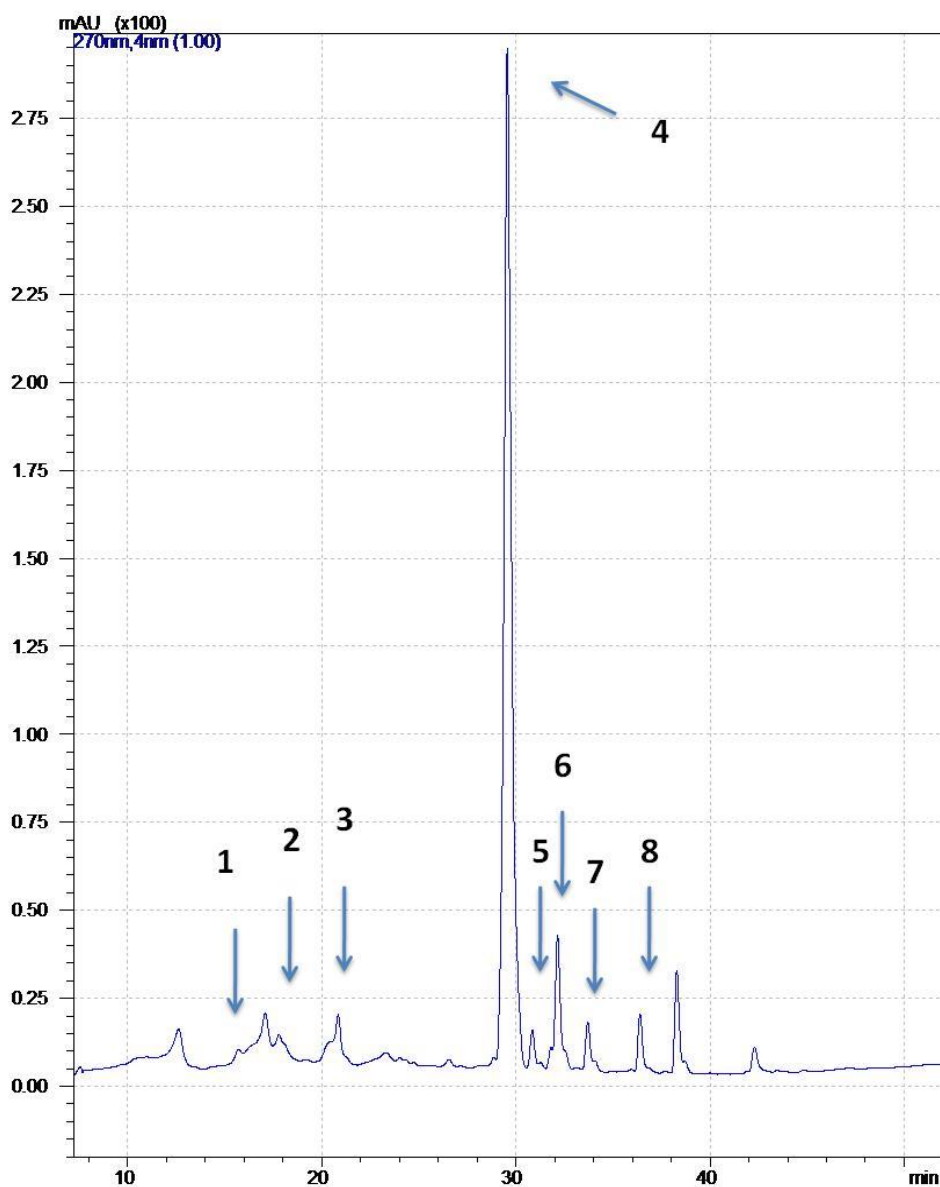


Εικόνα 28: LC-DAD-MS χρωματογράφημα των τεσσάρων δειγμάτων *Hypericum*.

❖ Χημικό προφίλ υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Hypericum perforatum*

Από τη χημική ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. perforatum* με LC-DAD-MS προέκυψε το χρωματογράφημα που παρουσιάζεται στην [Εικόνα 29](#).

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται όλες οι χημικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν κατά σειρά χρόνου έκλουσης. Από τα ληφθέντα αποτελέσματα η κύρια κορυφή με χρόνο έκλουσης $T_R = 29.548$ min, είχε $[M-H]^-$ στα 462,9 m/z και αποδόθηκε στον 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης. Επίσης, η κορυφή που εμφανίστηκε σε $T_R = 33.694$ min, με $[M-H]^-$ στα 505,0 m/z και αποδόθηκε στην πρωτοϋπερικήνη, με βάση τη σειρά που αναμενόταν να εμφανίζεται το μοριακό ιόν της σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος *Hypericum perforatum* με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Κατεχίνη (2) Χλωρογενικό οξύ (3) Επικατεχίνη (4) 3-β-D- γλυκοζίτη της κερκετίνης (5) Ελλαγικό οξύ (6) Κερκετρίνη (7) Πρωτοϋπερικήνη (8) Κερκετίνη.

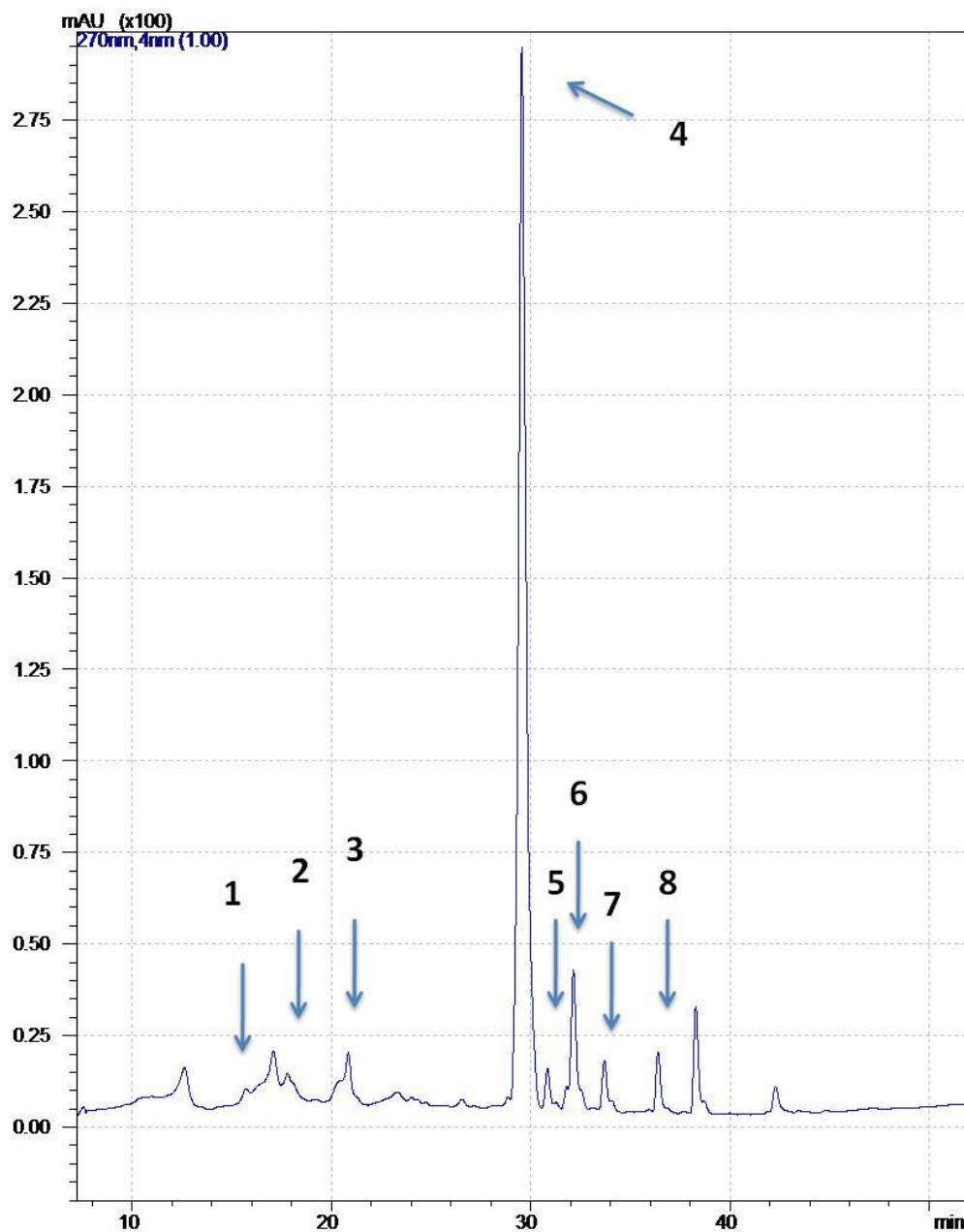
Πίνακας 8: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους *Hypericum perforatum*.

#	T _R (min)	Εμβαδό %	UV max (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Χημική ένωση	Μοριακός τύπος
1	15.707	0,890	279	289,8	Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
2	18.026	0,923	219, 279	352,9	Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
3	20.835	2,524	278	289,0	Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
4	29.548	59,719	227, 255, 356	462,9	3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
5	30.840	1,356	254, 355	300,06	Ελλαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈
6	31.799	0,583	245, 265, 351	432,6	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
7	32.140	5,127	255, 350	447,1	Κερκιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
8	32.501	0,134	249, 346	446,9	3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
9	33.694	1,705	254, 355	505,0	*Πρωτοϋπερικίνη	C ₃₀ H ₁₈ O ₈
10	36.388	2,198	255, 372	278,3	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
11	39.994	0,040	258, 372	285	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆

*Η ταυτοποίηση έγινε βιβλιογραφικά

❖ Χημικό προφίλ υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Hypericum cycladicum*

Από τη χημική ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. cycladicum* με LC-DAD-MS προέκυψε το χρωματογράφημα που παρουσιάζεται στην [Εικόνα 30](#). Στον [Πίνακα 9](#) παρουσιάζονται όλες οι χημικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν κατά σειρά χρόνου έκλουσης. Από τα ληφθέντα αποτελέσματα η κύρια κορυφή με χρόνο έκλουσης T_R= 28.477 min, είχε [M-H]⁻ στα 463,2 m/z και αποδόθηκε στην μυρικιτρίνη.



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος *Hypericum cycladicum* με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Χλωρογενικό οξύ (2) Επικατεχίνη (3) *Hyperjovinal B* (4) Μυρικιτρίνη (5) 3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (6) Ελλαγικό οξύ (7) Κερκιτρίνη (8) Κερκετίνη.

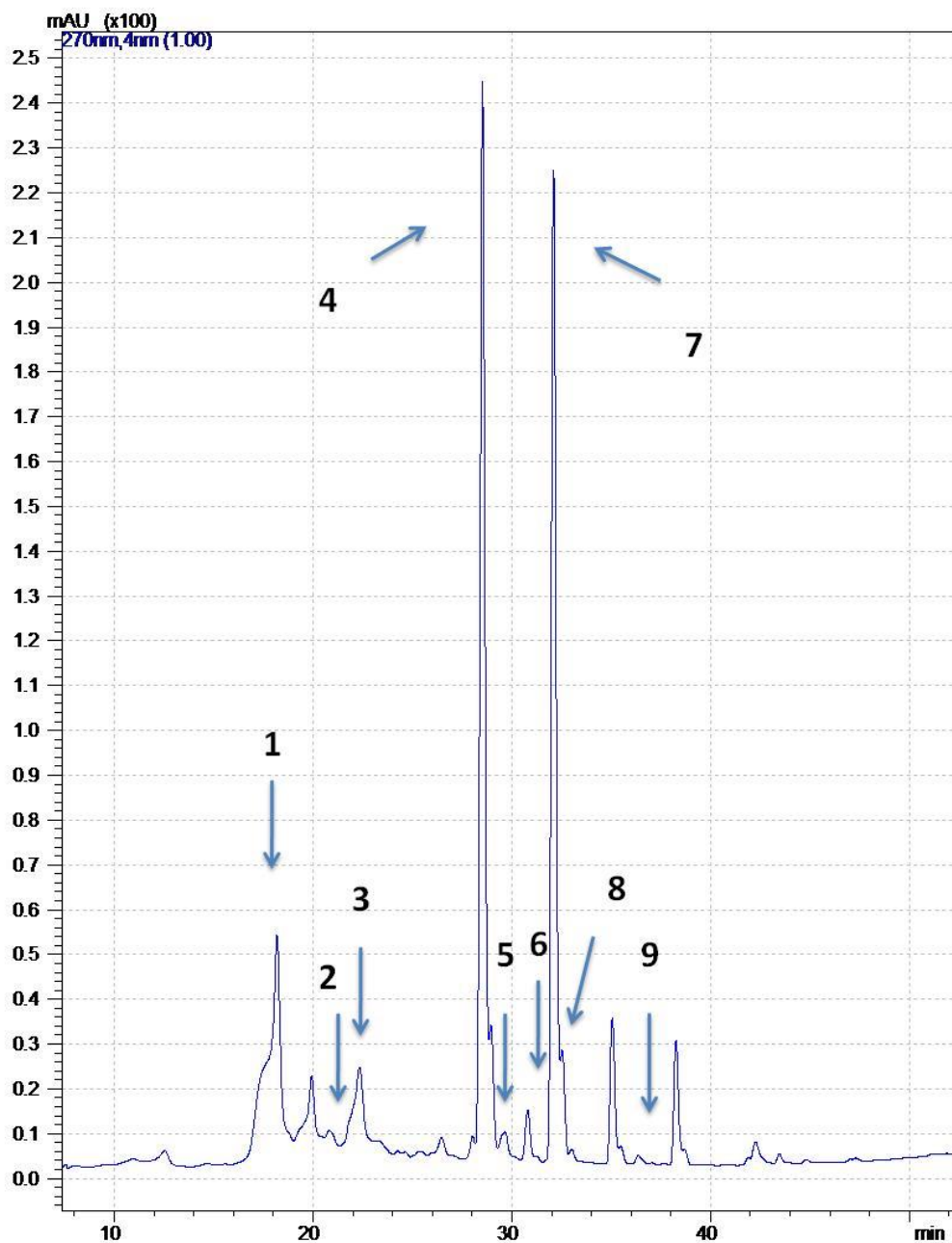
Πίνακας 9: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους *Hypericum cycladicum*.

#	T _R (min)	Εμβαδό %	UV max (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Χημική ένωση	Μοριακός τύπος
1	15.560	0,301	278	289,1	Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
2	18.158	13,373	220, 326	353,1	Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
3	20.736	1,931	279, 530	288,8	Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
4	22.401	0,373	332	330,6	*Hyperjovinol B	C ₂₀ H ₂₈ O ₄
5	28.477	32,054	212, 227, 256, 352	463,2	Μυρικιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
6	29.451	10,570	255, 356	462,9	3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
7	30.730	0,345	244, 356	300,7	Ελλαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈
8	31.675	0,209	245, 337, 351	431,1	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
9	32.040	6,184	255, 355	446,9	Κερκιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
10	32.463	0,489	251, 353	447,1	3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
11	36.286	0,424	254, 372	300,7	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
12	39.874	0,014	258, 372	285,0	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆

*Η ταυτοποίηση έγινε βιβλιογραφικά

❖ **Χημικό προφίλ υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Hypericum rumeliacum* ssp. *apollinis***

Από τη χημική ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* με LC-DAD-MS προέκυψε το χρωματογράφημα που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 31**. Στον **Πίνακα 10** παρουσιάζονται όλες οι χημικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν κατά σειρά χρόνου έκλουσης. Από τα ληφθέντα αποτελέσματα η κύρια κορυφή με χρόνο έκλουσης T_R= 28.519 min, είχε [M-H]⁻ στα 462,9 m/z και αποδόθηκε στην μυρικιτρίνη, ενώ η αμέσως επόμενη σε αφθονία κορυφή με χρόνο έκλουσης T_R= 32.092 min, είχε [M-H]⁻ στα 447,1 m/z και αποδόθηκε στην κερκιτρίνη.



Εικόνα 31: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος *Hypericum ruteliacum ssp. apollinis* με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Χλωρογενικό οξύ (2) Επικατεχίνη (3) Ηυπεργονιολ Β (4) Μυρικιτρίνη (5) 3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (6) Ελλαγικό οξύ (7) Κερκετρίνη (8) 3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης (9) Κερκετίνη.

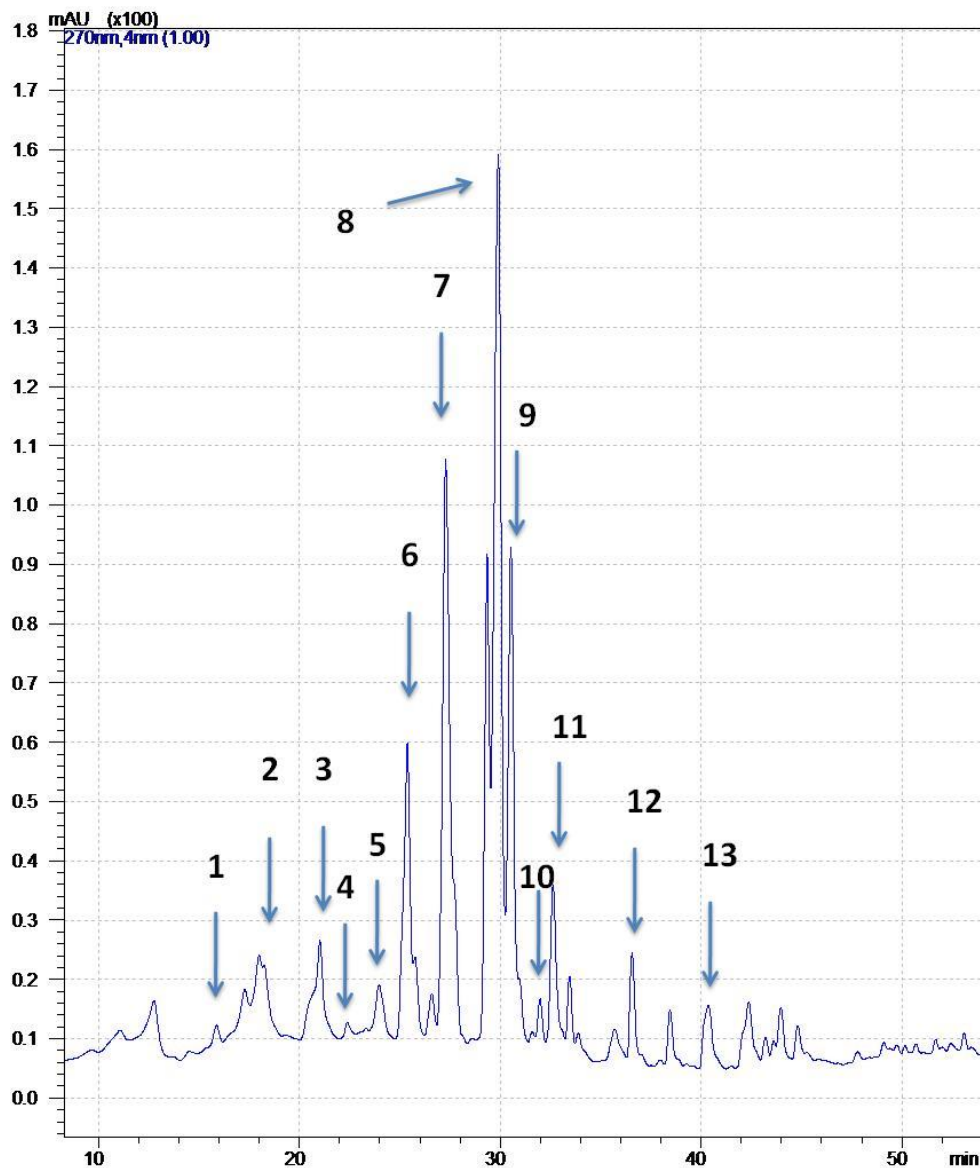
Πίνακας 10: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους *Hypericum rumeliacum ssp. apollinis*.

#	T _R (min)	Εμβαδό %	UV max (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Χημική ένωση	Μοριακός τύπος
1	15.574	0,034	279	288,7	Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
2	18.185	9,080	326	352,9	Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
3	20.806	0,547	276, 527	289,1	Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
4	22.332	3,973	322	330,9	*HyperjovinoI B	C ₂₀ H ₂₈ O ₄
5	28.519	29,208	234, 255, 352	462,9	Μυρικιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
6	29.638	1,141	241, 355	299,4	3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
7	30.792	1,319	254, 355	299,7	Ελλαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈
8	32.092	25,848	255, 350	447,1	Κερκιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
9	32.526	2,470	255, 350	447,0	3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
10	36.353	0,326	254, 367	300,7	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
11	39.972	0,012	268	284,8	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆

*Η ταυτοποίηση έγινε βιβλιογραφικά

❖ Χημικό προφίλ υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Hypericum perforatum*

Από τη χημική ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. perforatum* με LC-DAD-MS προέκυψε το χρωματογράφημα που παρουσιάζεται στην [Εικόνα 32](#). Στον [Πίνακα 11](#) παρουσιάζονται οι χημικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν κατά σειρά χρόνου έκλουσης. Από τα ληφθέντα αποτελέσματα η κύρια κορυφή με χρόνο έκλουσης T_R= 29.548 min, είχε [M-H]⁻ στα 462,9 m/z και αποδόθηκε στον 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης. Επίσης, η κορυφή που εμφανίστηκε σε T_R= 22.380 min, με [M-H]⁻ στα 331,9 m/z και αποδόθηκε στην HyperjovinoI B, με βάση τη σειρά που αναμενόταν να εμφανίζεται το μοριακό ιόν της σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Στην κορυφή με T_R= 27.277 min και τα μοριακά ιόντα [M-H]⁻ στα 519,9 και m/z [M-H]⁻ στα 430,9 m/z αποδόθηκε σε συνέκλυση των ψευδοϋπερικίνη και γενιστίνη, αντίστοιχα. Τέλος, στην κορυφή με T_R= 30.522 min και τα μοριακά ιόντα [M-H]⁻ στα 505,0 και m/z [M-H]⁻ στα 299,8 m/z αποδόθηκε σε συνέκλυση των πρωτοϋπερικίνη και ελλαγικό οξύ, αντίστοιχα.



Εικόνα 32: Χρωματογράφημα LC-DAD-MS του εκχυλίσματος *Hypericum perforatum* με αρνητικό ιονισμό. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) Κατεχίνη (2) Χλωρογενικό οξύ (3) Επικατεχίνη (4) *Hyperjoniol B* (5) Γαλλική επικατεχίνη (6) Οριεντίνη (7) Γενιστίνη & Ψευδοϋπερικίνη (8) 3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (9) Πρωτοϋπερικίνη & Ελλαγικό οξύ (10) Κερκιτρίνη (11) 3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης (12) Κερκετίνη (13) Καμφερόλη.

Πίνακας 11: Ποιοτικός χαρακτηρισμός χημικού προφίλ του είδους *Hypericum perforatum*.

#	T _R (min)	Εμβασδό %	UV max (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Χημική ένωση	Μοριακός τύπος
1	15.867	0,625	279	288,9	Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
2	18.243	1,928	279	352,9	Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
3	21.013	2,535	278	289,1	Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
4	22.380	0,253	332	331,9	*HyperjovinoI B	C ₂₀ H ₂₈ O ₄
5	23.961	1,494	332	440,9	Επικατεχίνη γαλλικού οξέος	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
7	25.371	6,727	267, 349	446,9	Οριεντίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
8	27.277	13,976	224, 268, 340, 547	430,9	Γενιστίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
9				519,1	*Ψευδοϋπερικίνη	C ₃₀ H ₁₆ O ₉
10	29.894	21,685	255, 355	462,9	3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
11	30.522	9,969	255, 356	299,8/505	Ελλαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈
12					*Πρωτοϋπερικίνη	C ₃₀ H ₁₈ O ₈
13	31.589	0,132	242, 267, 332	431,1	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
14	31.979	0,651	243, 266, 345	448,3	Κερκιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
15	32.626	2,928	245, 266, 288, 345	447,1	3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
16	36.559	1,775	255, 371	300,9	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
17	40.202	0,494	261, 327	284,9	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆

*Η ταυτοποίηση έγινε βιβλιογραφικά

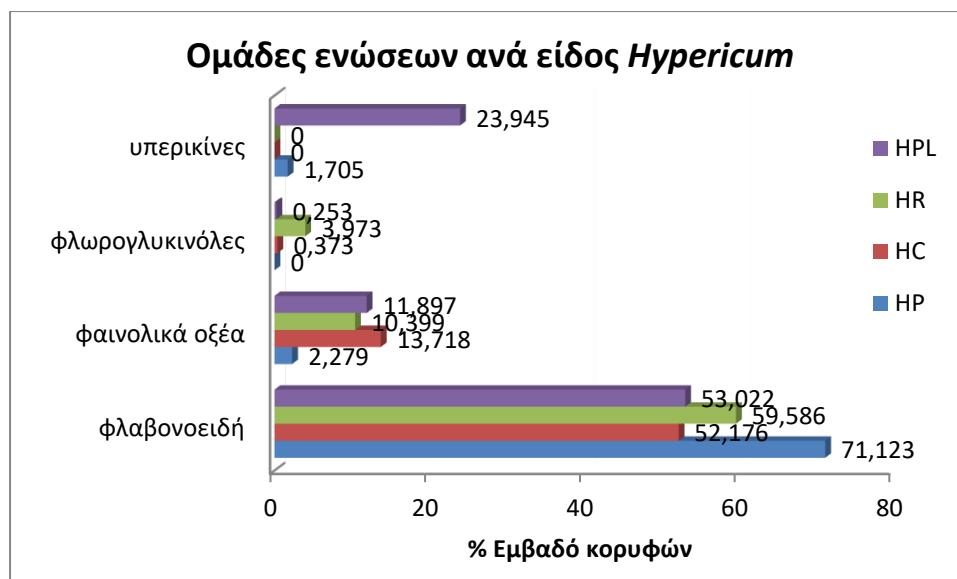
❖ Σύγκριση χημικού προφίλ των τεσσάρων εκχυλισμάτων

Τα τέσσερα εκχυλίσματα εμφάνισαν διαφορές στο χημικό προφίλ τους οι οποίες φαίνονται καλύτερα στο [Παράρτημα 1](#) όπου παρουσιάζονται οι κορυφές που αποδόθηκαν σε χημικές ενώσεις συνδυαστικά για τα τέσσερα δείγματα. Στον [Πίνακα 12](#) παρουσιάζονται οι διαφορές και οι ομοιότητες των τεσσάρων εκχυλισμάτων ως προς το χημικό προφίλ τους όπως αυτό αναλύθηκε με LC-DAD-MS. Και τα τέσσερα είδη *Hypericum* αποτελούνταν σε μεγαλύτερο ποσοστό από φλαβονοειδή με το *H. perforatum* να εκτιμάται πως περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα αυτών ([Εικόνα 33](#)).

Πίνακας 12: Παρουσίαση των χημικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν από τα τέσσερα εκχυλίσματα *Hypericum*.

α/α	Χημική ένωση	Ομάδα	Εμβαδό %			
			<i>Hypericum</i>			
			<i>perforatum</i>	<i>cycladicum</i>	<i>rumeliacum</i> <i>ssp apollinis</i>	<i>perfoliatum</i>
1	Κατεχίνη	Φλαβαν-3-όλη	0,89	0,30	0,03	0,62
2	Χλωρογενικό οξύ	Φαινολικό οξύ	0,92	13,37	9,08	1,93
3	Επικατεχίνη	Φλαβαν-3-όλη	2,52	1,93	0,55	2,54
4	* <i>Hyperjovinoi B</i>	Φλωρογλυκινόλη	-	0,37	3,97	0,25
5	Επικατεχίνη γαλλικού οξέος	Φλαβαν-3-όλη	-	-	-	1,49
6	Οριεντίνη	Φλαβόνη	-	-	-	6,73
7	Γενιστίνη	Ισοφλαβόνη	-	-	-	13,98
8	*Ψευδοϋπερικίνη	Νφθοδιανθρόνη	-	-	-	-
9	Μυρικιτρίνη	γλυκοζίτης φλαβονόλης	-	32,05	29,21	-
10	3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης	γλυκοζίτης φλαβονόλης	59,72	10,57	1,14	21,69
11	Ελλαγικό οξύ	Φαινολικό οξύ	1,36	0,35	1,32	9,97
12	*Πρωτοϋπερικίνη	Ναφθοδιανθρόνη	1,71	-	-	-
13	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	Φλαβόνο-O-γλυκοζίτης	0,58	0,21	-	0,13
14	Κερκιτρίνη	Φλαβονόλ O- γλυκοζίτης	5,13	6,18	25,85	0,65
15	3-O-γλυκοζίτης της καμφερόλης	Φλαβονόλ O- γλυκοζίτης	0,13	0,49	2,47	2,93
16	Κερκετίνη	Φλαβονόλη	2,20	0,42	0,33	1,77
17	Καμφερόλη	Φλαβονόλη	0,04	0,01	0,01	0,49

*Η ταυτοποίηση έγινε βιβλιογραφικά



Εικόνα 33: Σύγκριση του χημικού προφίλ των τεσσάρων ειδών *Hypericum* ως προς την περιεκτικότητά του σε κύριες ομάδες χημικών ενώσεων.

5.5 *In vitro* αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum spp*

5.5.1 Εκτίμηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών δεικτών στα εκχυλίσματα *Hypericum* με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ

Όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα 2.3.1, η μέθοδος διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ (agar well diffusion method, AWDM) είναι μία κλασική, εύκολη και γρήγορη μέθοδος για την εκτίμηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε διάφορους πιθανούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα.

Τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, με βάση τη δομή του κυτταρικού τους φακέλου, τα θετικά κατά Gram (Gram positive, Gram⁺) και τα αρνητικά κατά Gram (Gram negative, Gram⁻) βακτήρια. Τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά που οδηγούν στις διαφορετικές ιδιότητες οπτικοποίησης των θετικών και αρνητικών κατά Gram ειδών είναι το πάχος του στρώματος πεπτιδογλυκάνης και η παρουσία ή απουσία της εξωτερικής λιπιδικής μεμβράνης. Αυτή η διαφοροποίηση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντοχή των βακτηρίων σε καταπονήσεις από διάφορους εξωγενείς παράγοντες (Γκιαούρης, 2015).

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται οι ελάχιστες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απαιτήθηκαν για να παρατηρηθεί παρεμπόδιση ανάπτυξης (ζώνη αναστολής) των εξεταζόμενων στελεχών από το εκάστοτε εκχύλισμα *Hypericum*.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζεται η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων *Hypericum*, σε πέντε επιλεγμένες συγκεντρώσεις (0,78 – 12,50 mg/mL), έναντι στα πέντε θετικά κατά Gram στελέχη, με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα καναμυκίνης συγκέντρωσης 50 mg/mL (Εικόνα 34).

Πίνακας 13: Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων *Hypericum* που απαιτήθηκαν για να παρατηρηθεί παρεμπόδιση ανάπτυξης (ζώνη αναστολής) των μικροοργανισμών δεικτών με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ.

Στέλεχος	Χρώση Gram	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (mg/mL)			
		<i>H.</i> <i>perforatum</i>	<i>H.</i> <i>cycladicum</i>	<i>H.</i> <i>rumeliacum</i> ssp. <i>apollinis</i>	<i>H.</i> <i>perfoliatum</i>
DFSN_B4	+	0,78	1,56	12,50	3,13
DFSN_B26	+	0,78	1,56	12,50	3,13
DFSN_B72	+	0,78	0,78	3,13	3,13
DFSN_B98	+	1,56	3,13	12,50	1,56
DFSN_B78	+	0,78	0,78	6,25	1,56
DFSN_B77	-	> 50,00	> 50,00	> 50,00	> 50,00
DFSN_B68	-	> 50,00	> 50,00	> 50,00	> 50,00

DFSN = Department of Food Science and Nutrition

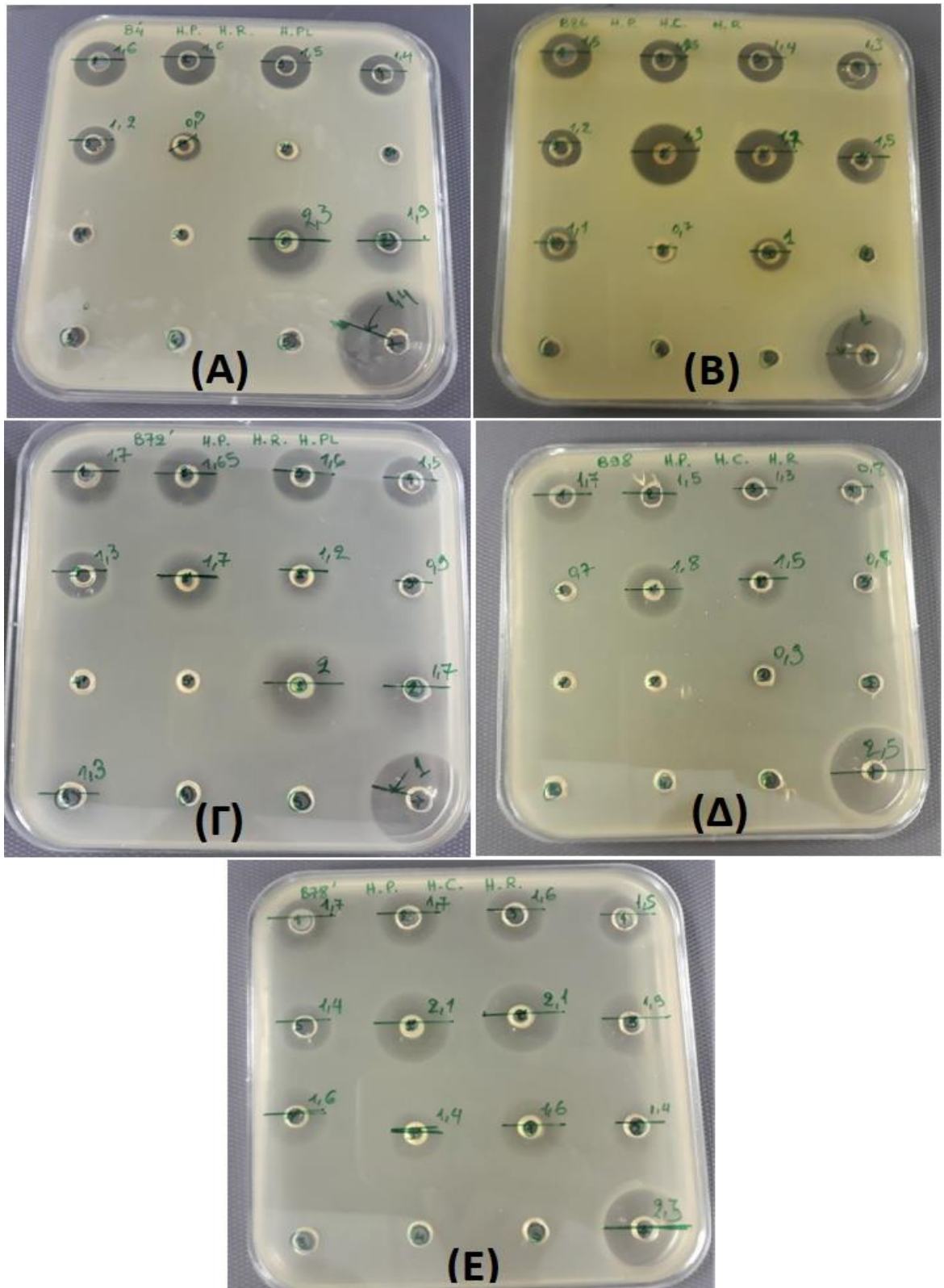
Πίνακας 14: Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων *Hypericum*, σε πέντε επιλεγμένες συγκεντρώσεις, έναντι πέντε θετικών κατά Gram στελεχών, με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποτελεσμάτων με \pm την τυπική απόκλιση τριών βιολογικών επαναλήψεων.

<i>Hypericum perforatum</i>										
Συγκέντρωση (mg/mL)	Στέλεχος									
	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>	
Ζώνη παρεμπόδισης (mm)										
12,50	4,5	$\pm 0,5$	4,2	$\pm 0,6$	5,5	$\pm 0,0$	6,0	$\pm 0,4$	5,5	$\pm 0,0$
6,25	4,3	$\pm 0,8$	3,8	$\pm 0,7$	5,3	$\pm 0,3$	4,5	$\pm 0,0$	5,1	$\pm 0,1$
3,13	4,0	$\pm 0,9$	3,5	$\pm 0,9$	5,0	$\pm 0,0$	1,4	$\pm 0,3$	4,7	$\pm 0,3$
1,56	3,3	$\pm 0,8$	3,2	$\pm 1,0$	4,6	$\pm 0,1$	1,1	$\pm 0,4$	4,3	$\pm 0,3$
0,78	2,2	$\pm 1,0$	1,7	$\pm 0,5$	4,0	$\pm 0,5$	0,5	$\pm 0,0$	3,8	$\pm 0,3$
καναμυκίνη (50 mg/mL)	12,3	$\pm 0,6$	9,7	$\pm 0,8$	9,2	$\pm 0,8$	9,9	$\pm 0,3$	7,8	$\pm 0,8$

<i>Hypericum cycladicum</i>										
Συγκέντρωση (mg/mL)	Στέλεχος									
	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>	
Ζώνη παρεμπόδισης (mm)										
12,50	7,8	$\pm 0,3$	6,3	$\pm 0,3$	8,7	$\pm 0,8$	6,5	$\pm 0,7$	7,5	$\pm 0,0$
6,25	6,5	$\pm 0,0$	5,3	$\pm 0,8$	7,5	$\pm 0,0$	4,7	$\pm 0,8$	6,7	$\pm 0,3$
3,13	4,3	$\pm 0,3$	4,0	$\pm 0,9$	5,7	$\pm 0,6$	1,7	$\pm 0,8$	6,0	$\pm 0,5$
1,56	1,3	$\pm 0,3$	2,2	$\pm 0,6$	3,3	$\pm 0,8$	0,5	$\pm 0,7$	4,3	$\pm 0,6$
0,78	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	1,7	$\pm 0,3$	0,2	$\pm 0,3$	3,2	$\pm 0,8$
καναμυκίνη (50 mg/mL)	12,3	$\pm 0,6$	9,7	$\pm 0,6$	9,2	$\pm 0,8$	10,1	$\pm 0,5$	7,8	$\pm 0,8$

<i>Hypericum rumeliacum ssp. apollinis</i>										
Συγκέντρωση (mg/mL)	Στέλεχος									
	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>	
Ζώνη παρεμπόδισης (mm)										
12,50	1,7	$\pm 0,3$	2,0	$\pm 0,0$	5,2	$\pm 0,6$	1,5	$\pm 0,0$	4,7	$\pm 0,6$
6,25	0,2	$\pm 0,3$	0,0	$\pm 0,0$	2,5	$\pm 0,5$	0,0	$\pm 0,0$	2,8	$\pm 0,8$
3,13	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	1,2	$\pm 1,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,5	$\pm 0,9$
1,56	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,2	$\pm 0,3$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$
0,78	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$
καναμυκίνη (50 mg/mL)	12,3	$\pm 0,6$	9,7	$\pm 0,6$	9,2	$\pm 0,8$	10,3	$\pm 0,5$	7,8	$\pm 0,8$

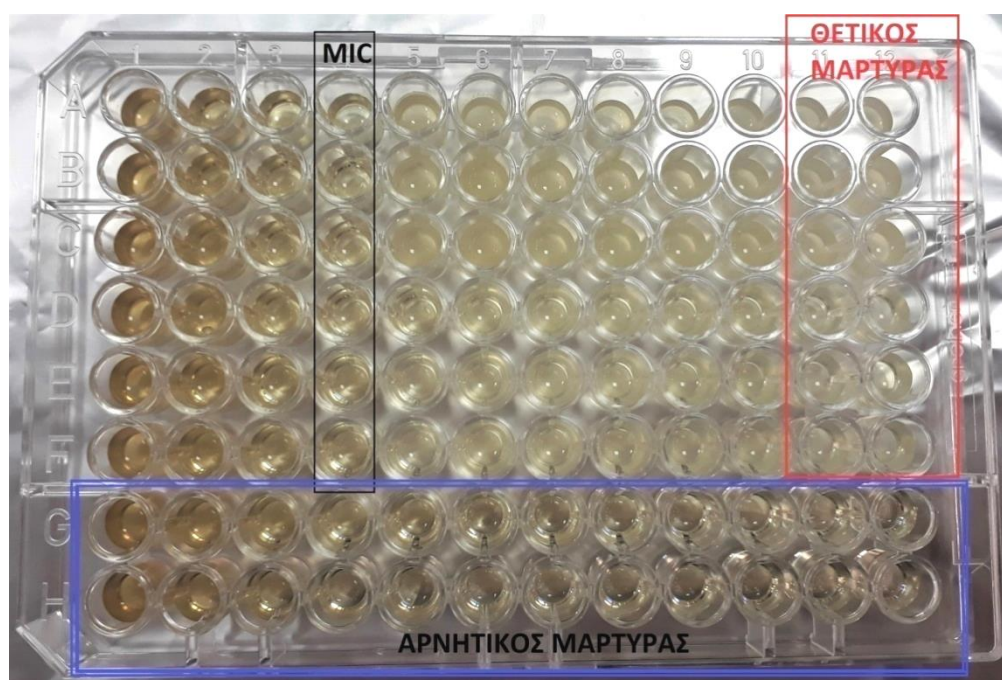
<i>Hypericum perforatum</i>										
Συγκέντρωση (mg/mL)	Στέλεχος									
	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>	
Ζώνη παρεμπόδισης (mm)										
12,50	9,3	$\pm 1,0$	7,7	$\pm 0,3$	6,0	$\pm 0,9$	9,7	$\pm 0,8$	7,8	$\pm 0,6$
6,25	7,2	$\pm 0,8$	5,5	$\pm 0,5$	4,8	$\pm 0,6$	8,8	$\pm 0,8$	6,5	$\pm 0,5$
3,13	2,8	$\pm 1,9$	2,8	$\pm 1,0$	3,5	$\pm 0,5$	7,2	$\pm 0,4$	5,0	$\pm 0,5$
1,56	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	1,0	$\pm 1,2$	2,0	$\pm 1,7$
0,78	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,0$
καναμυκίνη (50 mg/mL)	12,3	$\pm 0,6$	9,7	$\pm 0,6$	9,2	$\pm 0,8$	10,1	$\pm 0,5$	7,8	$\pm 0,8$



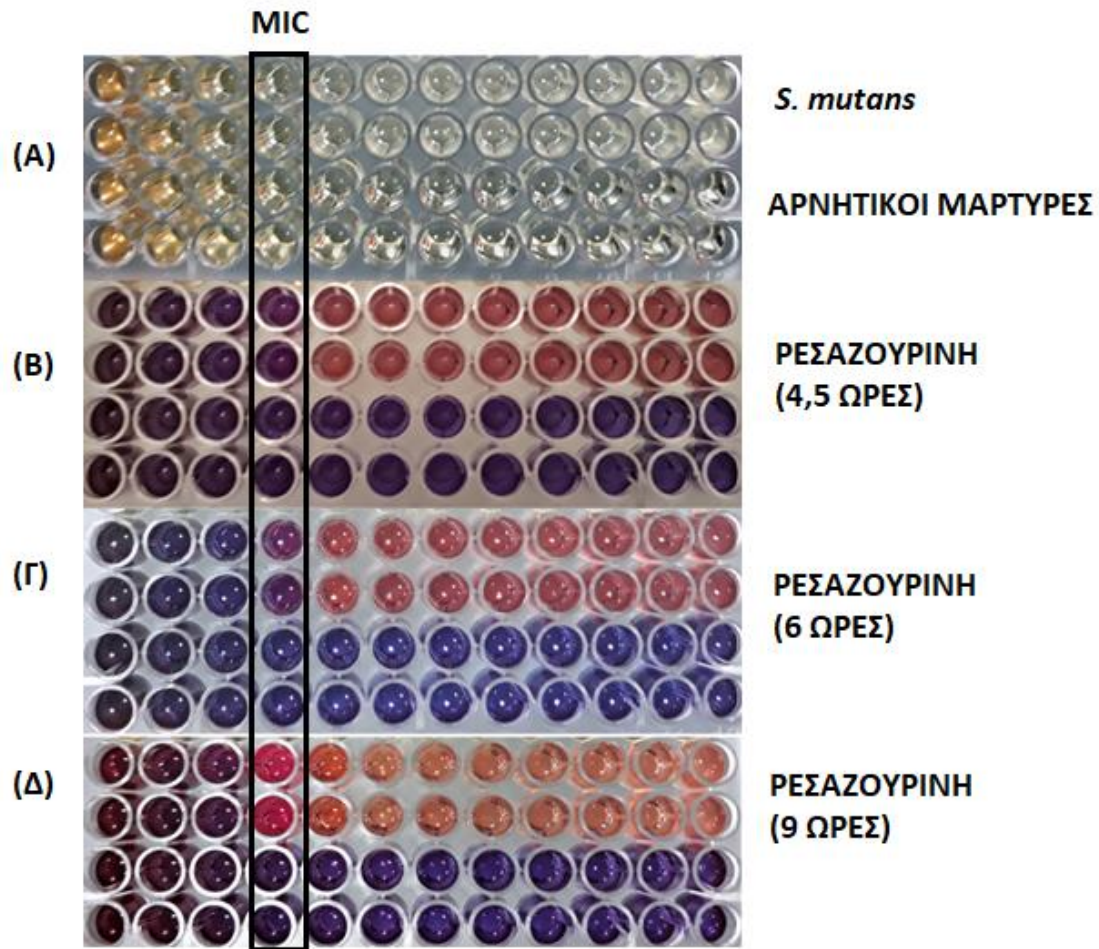
Εικόνα 34: Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων Hypericum έναντι στα (Α) *S. epidermidis*, (Β) *S. aureus*, (Γ) *L. monocytogenes* (Δ) *S. mutans* (Ε) *E. faecalis*.

5.5.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων *Hypericum* – Μέθοδος μικροαραίωσης σε ζυμό με ρεσαζουρίνη

Για την καλύτερη αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των τεσσάρων εκχυλισμάτων *Hypericum*, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) αυτών με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζυμό και η ελάχιστη βακτηριοκτόνα συγκέντρωση (MBC). Η ανίχνευση του τελικού σημείου MIC έγινε με οπτική παρατήρηση (γυμνό οφθαλμό) (Εικόνα 35) και με φασματοφωτομέτρηση (600 nm) (Παράρτημα 3). Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου η θολερότητα του εκχυλίσματος ή το χρώμα αυτού παρεμπόδιζε την λήψη ασφαλών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η ρεσαζουρίνη ως δείκτης της μεταβολικής δραστηριότητας των βακτηριακών κυττάρων (Εικόνα 36).



Εικόνα 35: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του εκχυλίσματος *H. perforatum* έναντι σε στελέχη *S. aureus* και *L. monocytogenes*.



Εικόνα 36: Ανίχνευση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος *H. perforatum* με τη χρήση ρεσαζουρίνης.

Στον [Πίνακα 15](#) παρουσιάζονται οι τιμές MIC και MBC των τεσσάρων εκχυλισμάτων για τους μικροοργανισμούς δείκτες. Και με αυτή τη μέθοδο ελέγχου της ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες εντοπίστηκε η διαφοροποίηση μεταξύ θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών. Επίσης, με τη μέθοδο αυτή και τη χρήση της χρωστικής ρεσαζουρίνης έγινε αντιληπτή η MIC και σε ένα αρνητικό κατά Gram βακτηριακό στέλεχος, το *E.coli* O157:H7, σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 50 mg/mL ([Εικόνα 37](#)). Μάλιστα, σε αυτή τη συγκέντρωση όλα τα εκχυλίσματα εκτός του *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* μείωσαν τον αρχικό πληθυσμό του *E.coli* O157:H7 κατά 99,9%.

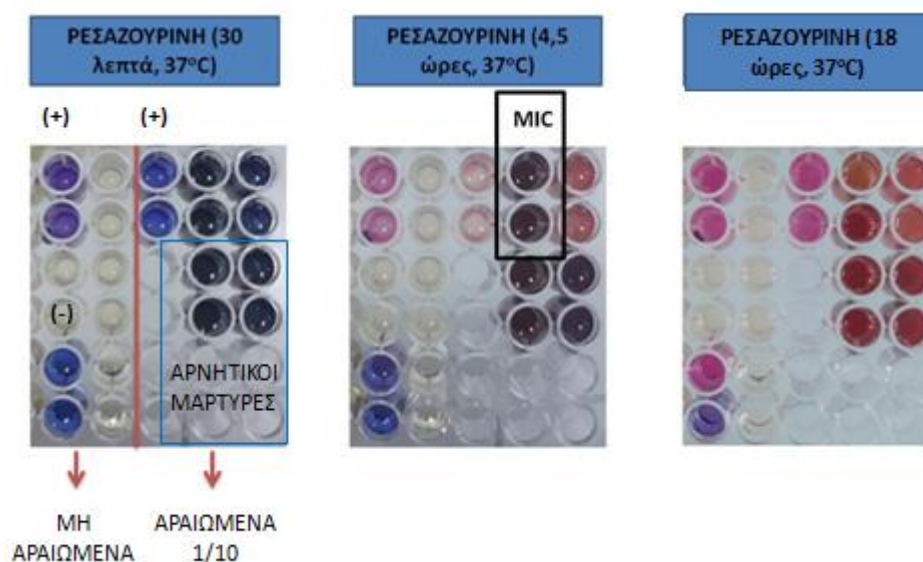
Πίνακας 15: Αποτελέσματα των ελάχιστων ελάχιστων ανασταλτικών (MIC) και βακτηριοκτόνων (MBC) συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων *Hypericum* έναντι στους μικροοργανισμούς δείκτες.

Στέλεχος	Χρώση Gram	MIC			
		Συγκέντρωση εκχυλίσματος (mg/mL)			
		HP	HC	HR	HPL
DFSN_B4	+	0,05	0,10	0,78	0,20
DFSN_B26	+	0,02	0,10	0,78	0,39
DFSN_B72	+	0,02	0,10	0,39	0,20
DFSN_B98	+	0,78	0,78	1,56	0,78
DFSN_B77	+	50,00	50,00	50,00	50,00
DFSN_B68	-	> 50,00	> 50,00	> 50,00	> 50,00

DFSN = Department of Food Science and Nutrition

Στέλεχος	Χρώση Gram	MBC			
		Συγκέντρωση εκχυλίσματος (mg/mL)			
		HP	HC	HR	HPL
DFSN_B4	+	0,10	1,95	0,78	3,91
DFSN_B26	+	0,05	1,95	0,78	3,91
DFSN_B72	+	0,10	7,81	0,78	3,91
DFSN_B98	+	0,78	0,78	31,25	31,25
DFSN_B77	+	50,00	50,00	> 50,00	50,00
DFSN_B68	-	> 50,00	> 50,00	> 50,00	> 50,00

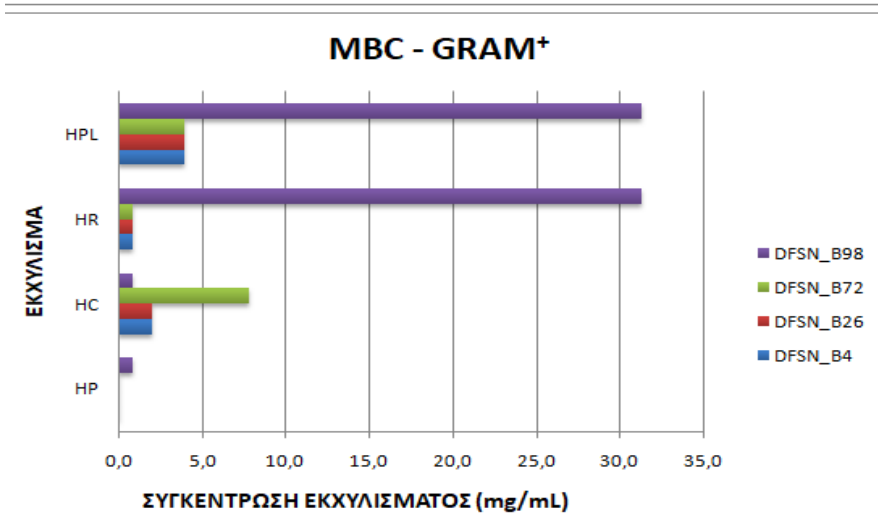
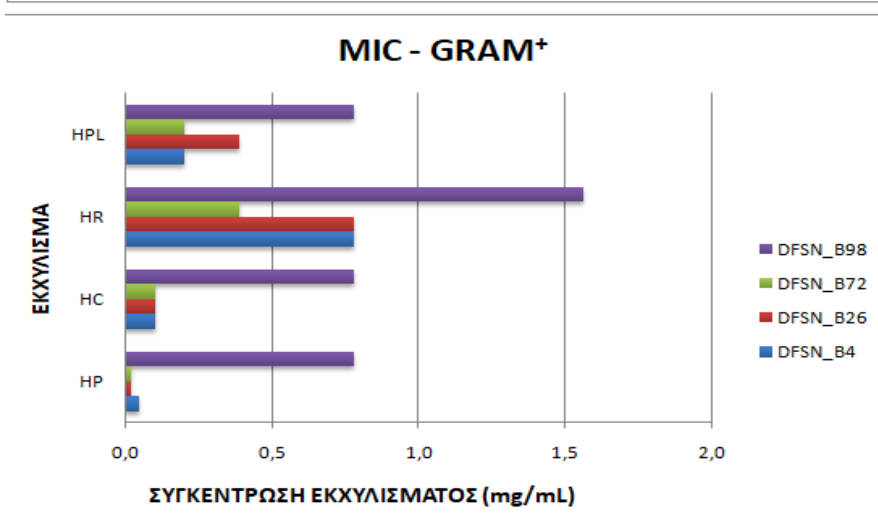
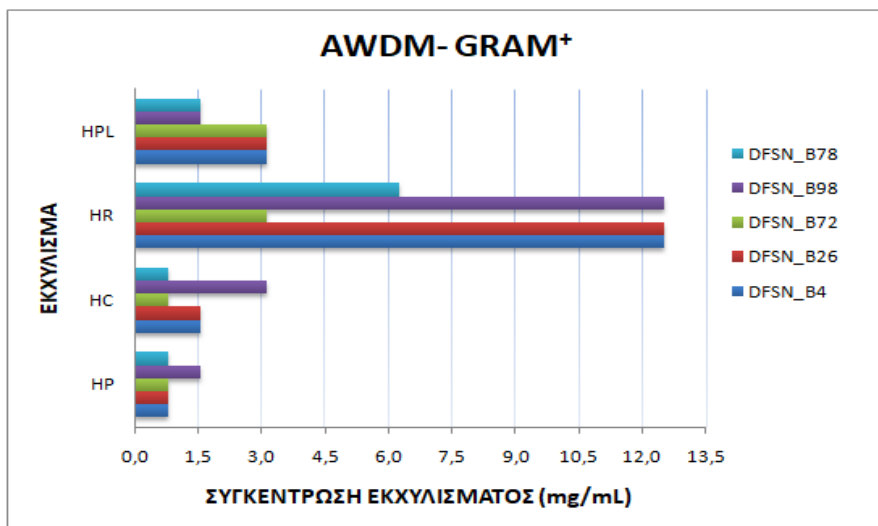
DFSN = Department of Food Science and Nutrition



Εικόνα 37: Ανίχνευση του τελικού σημείου της MIC με τη δοκιμασία μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη.

5.5.3 Σύγκριση των *in vitro* δοκιμασιών εκτίμησης της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων *Hypericum*

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ελέγχου της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων, πρωτίστως, εντοπίζεται μία μεγάλη διαφορά στο όριο ανίχνευσης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Στην [Εικόνα 38](#) παρουσιάζονται τα ραβδογράμματα με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις που απαιτήθηκαν από τα τέσσερα εκχυλίσματα για να αναστείλουν την ανάπτυξη των θετικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών, με τις δύο μεθόδους και το ραβδόγραμμα με τις ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (MBC).



Εικόνα 38: Συγκεντρωτικά ραβδογράμματα σύγκρισης των δύο μεθόδων ελέγχου της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των θετικών κατά Gram εξετασθέντων βακτηριακών στελεχών στα εκχυλίσματα *Hypericum*. Όπου HP: *H. perforatum*, HC: *H. cycladicum*, HR: *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* και HPL: *H. perforliatum*.

Κεφάλαιο 6

Συζήτηση – Συμπεράσματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων τεσσάρων ειδών *Hypericum* (*H. perforatum*, *H. cycladicum*, *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*, *H. perforiatum*), με σκοπό τη σύγκρισή τους ως προς το χημικό προφίλ, την αντιοξειδωτική ικανότητα και την αντιμικροβιακή δράση. Πρωτίστως, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις δοκιμασίες DPPH και ABTS, καθώς επίσης, εκτιμήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Στη συνέχεια, έγινε ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με LC-DAD-MS. Εν συνεχεία, τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν για την αντιβακτηριακή δράση τους έναντι σε επτά μικροοργανισμούς δείκτες (πέντε θετικά κατά Gram και δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια) με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ. Τέλος, προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες ανασταλτικές και βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (MIC, MBC) με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη.

Το πρώτο μέρος, περιλάμβανε την παραλαβή των φυτικών υλικών, την εκχύλισή τους με μεθανόλη:νερό (70:30, v/v) και την παραλαβή τους σε τελική μορφή σκόνης. Το *H. cycladicum* παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση σε υδρομεθανολικό εκχύλισμα (311,81 mg/g) από τα υπόλοιπα είδη. Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu αλλά και η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών με τις δοκιμασίες DPPH και ABTS.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο αντιοξειδωτικών δοκιμασιών, φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα *H. perforatum* και *H. perforiatum* είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δείγματα *H. cycladicum* και *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Σε πρόσφατη μελέτη που αφορούσε την αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων *H. perforatum*, *H. rumeliacum* και άλλων 11 ειδών *Hypericum*, με τις δοκιμασίες DPPH και ABTS, το *H. perforatum* παρουσίασε την δεύτερη αποτελεσματικότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα υπόλοιπα είδη, ενώ

το *H. rumeliacum* βρισκόταν αρκετά χαμηλότερα στην κατάταξη (Zheleva-Dimitrova *et al.*, 2010). Επίσης, συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η δοκιμασία ABTS παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την DPPH, κάτι έχει φανεί κι σε άλλες μελέτες (Zheleva-Dimitrova *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2018). Όσον αφορά τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, φάνηκε ότι μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις είχε το εκχύλισμα *H. perforatum* (17,22 mg/mL) και τη χαμηλότερη το *H. perfoliatum* (7,30 mg/mL). Από τις υπάρχουσες μελέτες, η ποσότητα και τη ποιότητα του φαινολικού περιεχομένου ενός φυτικού υλικού συσχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα αυτού (Da Silva *et al.*, 2006; Raederstorff *et al.*, 2009).

Το δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης περιλάμβανε την χημική ανάλυση των τεσσάρων δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων και φασματογράφο μαζών ρυθμισμένο σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Από το χρωματογράφημα του δείγματος *H. perforatum* οι κυριότερες κορυφές αποδόθηκαν στην επικατεχίνη, τον 3-β-D- γλυκοζίτη της κερκετίνης, την πρωτοϋπερικήνη και την κερκετίνη, με εμβαδό %: 2,5 60,0 1,4 5,1 1,7 και 2,2 % αντίστοιχα. Από το χρωματογράφημα του δείγματος *H. cycladicum* οι κυριότερες κορυφές αποδόθηκαν στο χλωρογενικό οξύ, την μυρικιτρίνη, τον 3-β-D- γλυκοζίτη της κερκετίνης και την κερκιτρίνη, με εμβαδό %: 13,4 32,1 10,6 και 6,2 % αντίστοιχα. Από το χρωματογράφημα του δείγματος *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* οι κυριότερες κορυφές αποδόθηκαν στο χλωρογενικό οξύ, την υπερζοϊνολ Β, την μυρικιτρίνη και την κερκιτρίνη, με εμβαδό %: 9,1 4,0 29,2 και 25,8 % αντίστοιχα. Από το χρωματογράφημα του δείγματος *H. perfoliatum* οι κυριότερες κορυφές αποδόθηκαν στην οριεντίνη, την γενιστίνη με την ψευδοϋπερικήνη (συνέκλουση), τον 3-β-D- γλυκοζίτη της κερκετίνης και την πρωτοϋπερικήνη με το ελλαγικό οξύ (συνέκλουση), με εμβαδό %: 6,7 14,0 21,7 30,5 % αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, καθώς για τα είδη *H. perforatum*, *H. rumeliacum* και *H. perfoliatum* τα κύρια συστατικά που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από τα αλκοολικά εκχυλίσματά τους ανήκουν στα φαινολικά οξέα με κυρίαρχο το χλωρογενικό οξύ, τους γλυκοζίτες φλαβονοειδών με κυρίαρχα την υπεροσίδη (hyperoside, quercetin-3-O-β-D-galactoside) και άλλους

γλυκοζίτες της κερκετίνης, τα άγλυκα φλαβονοειδή με κυρίαρχα την καρκετίνη και την ερυθρίνη (rutin), τις ναφθοδιανθρόνες (υπερικήνη, πρωτοϋπερικήνη, ψευδοϋπερικήνη, πρωτοψευδοϋπερικήνη) και τις φλωρογλυκινόλες (υπερφορίνη, αντιυπερφορίνη) (Barnes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005; Çırak *et al.*, 2007; Sakavitsi *et al.*, 2017). Επιπλέον, οι Sakavitsi *et al.* (2017) που μελέτησαν το φαινολικό προφίλ μεθανολικών εκχυλισμάτων *H. perforatum* και *H. rumeliacum* με LC-DAD και UHPLC-ESI(-)-HRMS και MS/MS, ανίχνευσαν την φλωρογλυκινόλη hyperjovinoI B στο εκχύλισμα του *H. rumeliacum* και όχι στο εκχύλισμα του *H. perforatum*, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη (Sakavitsi *et al.*, 2017). Τα εκχυλίσματα *H. cycladicum* και *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* παρουσίασαν μεγαλύτερη ομοιότητα στο φαινολικό προφίλ τους απ' ότι με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, περιέχοντας μάλιστα σε μεγαλύτερη αφθονία την μυρικιτρίνη (κύρια κορυφή). Τα εκχυλίσματα *H. perforatum* και *H. perfoliatum* περιείχαν σε μεγαλύτερη αφθονία τον 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης. Τέλος, το εκχύλισμα του *H. perfoliatum* παρουσίασε τις μεγαλύτερες διαφορές σε ποιοτικό επίπεδο από τα υπόλοιπα τρία εκχυλίσματα.

Το τελευταίο μέρος της παρούσας μελέτης περιλαμβάνει τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων *Hypericum* έναντι σε επτά μικροοργανισμούς δείκτες. Για την καλύτερη διεξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους, την μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ, που ανήκει στις μεθόδους διάχυσης και τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό με ή χωρίς ρεσαζουρίνη, που ανήκει στις μεθόδους αραίωσης για την *in vitro* αξιολόγηση αντιμικροβιακών παραγόντων (Balouiri *et al.*, 2016).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ, αποκαλύπτουν την ύπαρξη μεγάλης διαφοράς στην ευαισθησία μεταξύ των θετικών κατά Gram και των αρνητικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών στα εκχυλίσματα *Hypericum*. Στα θετικά κατά Gram, η εμφάνιση ζώνης παρεμπόδισης εντοπίστηκε από τη συγκέντρωση 0,78 mg/mL ενώ στα αρνητικά κατά Gram δεν εντοπίστηκε ζώνη παρεμπόδισης μέχρι και τη συγκέντρωση εκχυλίσματος 50 mg/mL. Από το εκχύλισμα *H. perforatum* απαιτήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση (0,78 mg/mL) για την ανίχνευση παρεμπόδισης ανάπτυξης όλων των θετικών κατά Gram στελεχών,

ενώ από το δείγμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* απαιτήθηκε έως και η δεκαπλάσια συγκέντρωση εκχυλίσματος (3,13-12,5 mg/mL) για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη τους αντίστοιχα. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση (0,78 mg/mL) που εξετάσθηκε, η αντιμικροβιακή ικανότητα του *H. perforatum* υπερίσχυσε των υπολοίπων ειδών, ενώ το στέλεχος *S. mutans* δε φάνηκε να επηρεάζεται από κανένα είδος εκχυλίσματος σε αυτή τη συγκέντρωση. Στη αμέσως υψηλότερη συγκέντρωση (1,56 mg/mL) φαίνεται η διαφορά αντιμικροβιακής δυναμικής μεταξύ των εκχυλισμάτων αφού όπως δείχνουν τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα των *H. perforatum* και *H. cycladicum* είναι δραστικότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες από εκείνα των *H. rumeliacum* ssp *apollinis* και *H. perfoliatum*. Το στέλεχος *S. mutans* εξακολουθεί να μην επηρεάζεται από το εκχύλισμα *H. cycladicum* ενώ αντίθετα το *H. perfoliatum* στην ίδια συγκέντρωση παρουσίασε ισοδύναμη δραστικότητα με αυτή του εκχυλίσματος του *H. perforatum* έναντι στα στελέχη *E. faecalis* και *S. mutans*. Στη συγκέντρωση 6,25 mg/mL, το εκχύλισμα του *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* εξακολουθεί να μην παρουσιάζει κάποια αντιμικροβιακή δράση στα 3/5 των εξεταζόμενων βακτηρίων ενώ σ' αυτή τη συγκέντρωση εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση στο στέλεχος *E. faecalis*. Τέλος, στη υψηλότερη συγκέντρωση (12,5 mg/mL) που εξετάσθηκε με αυτή τη μέθοδο φάνηκε ότι το εκχύλισμα του *H. perfoliatum* έδρασε αποτελεσματικότερα από τα υπόλοιπα τρία εκχυλίσματα στα Gram⁺ βακτήρια εκτός του στελέχους *L. monocytogenes* σπου οποίου εμφανίστηκε μεγαλύτερη ζώνη διαύγασης μετά τη μεταχείριση με εκχύλισμα του *H. cycladicum*.

Με τη μέθοδο διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ, δεν παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Αντίθετα, με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη η ανάπτυξη του στελέχους DFSN_B77 (*E.coli* O157:H7, Gram⁻) παρεμποδίστηκε από όλα τα εκχυλίσματα, σε συγκέντρωση 50 mg/mL. Μάλιστα παρατηρήθηκε πληθυσμιακή μείωση μεγαλύτερη από 99,9% από τον αρχικό πληθυσμό, με εξαίρεση το δείγμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*.

Σε συμφωνία των δύο μεθόδων, το δείγμα *H. perforatum* ήταν το πιο δραστικό εκχύλισμα στη χαμηλότερη συγκέντρωση που εξετάσθηκε με την εκάστοτε μέθοδο, όσον αφορά τα θετικά κατά Gram στελέχη. Αντίθετα, το δείγμα *H.*

rumeliacum ssp. *apollinis* παρουσίασε την πιο ασθενή αντιβακτηριακή δράση. Το στέλεχος DFSN_B98 (*S. mutans*) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα εκχύλισμα και ιδιαιτέρως στο εκχύλισμα *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Ωστόσο, για τη μείωση του αρχικού πληθυσμού του DFSN_B98 κατά 99,9% (MBC) με εκχύλισμα *H. perforatum* απαιτήθηκε η ίδια συγκέντρωση με αυτή του *H. rumeliacum* ssp. *apollinis*. Οι [Süntar et al., \(2015\)](#) εξέτασαν το υδροαλκοολικό εκχύλισμα (αιθανολική εκχύλιση και υποεκχύλιση με νερό) του εναέριου μέρους του *H. perforatum* για την αντιβακτηριακή δράση του, με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό με ρεσαζουρίνη, έναντι σε μικροοργανισμούς δείκτες της στοματικής υγιεινής και εντόπισαν την MIC στα 32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για ένα στέλεχος *S. mutans* και στα 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για ένα στέλεχος *E. faecalis* ([Süntar et al., 2015](#)).

Η αντιβακτηριακή δράση των οργανικών και υδατικών εκχυλισμάτων έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες με χαρακτηριστική διαφοροποίηση της δράσης τους έναντι σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, καθώς στις περισσότερες μελέτες παρατηρείται αντιβακτηριακή δράση ή/και καθόλου έναντι στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ([Rabanal et al., 2002](#); [Avato et al., 2004](#); [MILOSEVIC et al., 2007](#); [Saddiqe et al., 2010](#); [Yousuf et al., 2012](#)). Η βασική διαφοροποίηση μεταξύ θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έγκειται στην διαφορετική δομή του εξωτερικού περιβλήματος ([Γκιαούρης, 2015](#)). Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν χαρακτηριστεί, στην πλειοψηφία τους, ως ανθεκτικά σε πολλαπλά φάρμακα, καθώς η εσωτερική λιπιδική μεμβράνη τους αποτελεί εξαιρετικό φραγμό για τα υδρόφιλα μόρια, παρόλο που είναι σχετικά διαπερατή στα περισσότερα αμφίφιλα φάρμακα (amphiphilic drugs) ([Nikaido & Thanassi, 1993](#); [Silver, 2016](#)). Εν αντιθέσει, τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα σε πολλαπλά φάρμακα, με εξαίρεση τους σταφυλόκοκκους (*staphylococci*) ([Adeleke & Odelola, 1997](#); [Takizawa et al., 2005](#)). Τόσο οι εγγενείς όσο και οι επίκτητες αντιβιοτικές αντοχές των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ενεργοποιούνται από εμπόδια διαπερατότητας, συμπεριλαμβανομένων, των δύο λιπιδικών μεμβρανών, της ενεργοποίησης των αντλιών εκροής φαρμάκων (ενεργός εκκροή, active efflux) που βρίσκονται και στις δύο λιπιδικές μεμβράνες αλλά και της επαγωγής των ένζυμων, υποβαθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τους αντιβακτηριακούς παράγοντες

(Nikaido, 1994; Zgurskaya *et al.*, 2018). Από τα χρωματογραφικά ευρήματα της παρούσας διπλωματικής, οι κύριες κορυφές για τα εκχυλίσματα *H. perforatum* και *H. perforatum* αποδόθηκαν στον 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης. Στο εκχύλισμα *H. cycladicum*, η κορυφή της ίδιας χημικής ένωσης ήταν η τρίτη κατά σειρά αφθονίας (10,57% εμβαδό κορυφής). Αντίθετα, στο εκχύλισμα *H. rumeliacum ssp. apollinis* η κορυφή που αποδόθηκε στον 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης ήταν στο κατώτερο όριο αφθονίας (1,14% εμβαδό κορυφής). Επίσης, από τα αποτελέσματα αντιμικροβιακού ελέγχου των εκχυλισμάτων *Hypericum*, το *H. rumeliacum ssp. apollinis* ενώ σε συγκέντρωση 50 mg/mL ανέστειλε την ανάπτυξη του αρνητικού κατά Gram στελέχους, *E. coli* O157:H7, δεν κατάφερε να προκαλέσει την μείωση του αρχικού πληθυσμού του σε ποσοστό 99,9% (θανάτωση), όπως συνέβει με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Ο 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης ανήκει στις πολυφαινολικές ενώσεις που αναστέλλουν τη δραστηριότητα του μεμβρανικού ενζύμου, ATPάση του ATP του βακτηριακού είδους *E. coli*, διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο την πρωτονιεγερτική δύναμη εκατέρωθεν της μεμβράνης κάτι που μπορεί να οδηγήσει στη λύση του κυττάρου (Stahlberg *et al.*, 2001; Dadi *et al.*, 2009). Δεδομένου ότι, το ύψος και το %εμβαδό της κορυφής ενός χρωματογραφήματος είναι ανάλογα της συγκέντρωσης της χημικής ένωσης στην οποία έχει αποδοθεί αυτή η κορυφή, το γεγονός ο 3-β-D-γλυκοζίτη της κερκετίνης βρέθηκε σε μικρότερη αφθονία στο εκχύλισμα *H. rumeliacum ssp. apollinis* απ' ότι στα υπόλοιπα εκχυλίσματα, πιθανώς να διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στα ευρήματα περί δραστηριότητας έναντι στο στέλεχος *E. coli* O157:H7.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η χημική σύσταση και κατ' επέκταση η βιοδραστηριότητα των εκχυλισμάτων *Hypericum* εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως είναι το είδος, ο διαλύτης εκχύλισης, η γεωγραφική τοποθεσία απ' όπου συλλέχθηκε το βότανο, η περίοδος συγκομιδής του, το ανατομικό μέρος του βοτάνου (δρόγη) και άλλους (Bagdonaitė *et al.*, 2012; Mathioudaki *et al.*, 2018; Cirak & Radusiene, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Για παράδειγμα, οι Avato *et al.* (2004) εξέτασαν την αντιβακτηριακή δράση διαφόρων οργανικών εκχυλισμάτων *Hypericum perforatum* με τη μέθοδο αραιώσης σε άγαρ. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι τα μεθανολικά και τα αιθανολικά εκχυλίσματα

ήταν πιο δραστικά έναντι σε έξι θετικά κατά Gram στελέχη εκ των οποίων τρία στελέχη ήταν *S. aureus* και ένα στέλεχος, *E. faecalis*. Η MIC των μεθανολικών εκχυλισμάτων για αυτά τα στελέχη κυμάνθηκε μεταξύ 200 – 300 µg/mL και απέδειξαν ότι η δραστικότητα αυτή οφειλόταν κυρίως στις υπερφορίνες και τις υπερικίνες, ενώ δεν παρατήρησαν αντιμικροβιακή δράση από τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονταν στο μεθανολικό εκχύλισμα (Avato et al., 2004). Οι Yousuf et al. (2012) από την άλλη, εξέτασαν την αντιβακτηριακή δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα φύλλα φυτικού υλικού *H. perforatum*, με τις μεθόδους διάχυσης από βοθρίο σε άγαρ και αραιώσης σε ζωμό, απ' όπου προέκυψε ότι η MIC για το θετικό κατά Gram *S. epidermidis* ήταν στα 0,78 mg/mL και η MIC για τα αρνητικά κατά Gram, *Salmonella typhi* και *E. coli*, ήταν στα 3,12 mg/mL, δηλαδή μόλις η τετραπλάσια συγκέντρωση από το θετικό κατά Gram στέλεχος. Η μεγάλη αυτή δραστικότητα του εκχυλίσματος αποδόθηκε στα φαινολικά συστατικά και τα αλκαλοειδή, με εκτίμηση της ολικής ποσότητας αυτών στο εκχύλισμα (Yousuf et al., 2012). Τέλος, οι Dall'Agnol et al. (2003) μελέτησαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα από τα εναέρια μέρη διαφόρων ειδών *Hypericum* σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών και κανένα από αυτά τα είδη δεν ήταν αποτελεσματικό έναντι σε στελέχη *S. epidermidis* και *E. coli*, δηλαδή ένα θετικό και ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο (Dall'Agnol et al., 2003).

Τα αποτελέσματα την παρούσας διπλωματικής σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών, υπογραμμίζουν την σχέση χημικής σύστασης και βιοδραστικότητας του γένους *Hypericum*, η οποία επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, καθώς το βότανο αυτό αποτελεί ένα ενδημικό φυτό που φύεται σχεδόν παντού. Γι' αυτό και η συνέχιση της έρευνας, όσον αφορά τον χημειότυπο και την βιοδραστικότητα αυτού του βοτάνου είναι απαραίτητη καθώς τα αποτελέσματα από τις διάφορες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας, παρουσιάζουν ομοιότητες και διαφορές.

Βιβλιογραφία

Ξένη

- Adeleke**, O. E. & Odelola, H. A. (1997). *Plasmid profiles of multiple drug resistant local strains of Staphylococcus aureus*. Afr J Med Med Sci; 26(3-4):119-21.
- Albert**, D., Zündorf, I., Dingermann, T., Müller, W.E., Steinhilber, D., Werz, O. (2002). *Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase*. Biochem. Pharmacol. 64, 1767–1775.
- Avato**, P., Raffo, F., Guglielmi, G., Vitali, C., & Rosato, A. (2004). *Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity*. Phytotherapy Research, 18(3), 230–232.
- Bagdonaitė**, E., Mártonfi, P., Repčák, M., & Labokas, J. (2012). *Variation in concentrations of major bioactive compounds in Hypericum perforatum L. from Lithuania*. Industrial Crops and Products, 35(1), 302–308.
- Bahmani**, M., Taherikalani, M., Khaksarian, M., Rafieian-Kopaei, M., Ashrafi, B., Nazer, M., Soroush, S., Abbasi, N., Rashidipour, M. (2019). *The synergistic effect of hydroalcoholic extracts of Origanum vulgare, Hypericum perforatum and their active components carvacrol and hypericin against Staphylococcus aureus*. Future Science OA, FSO371.
- Balouiri**, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2), 71–79.
- Barnes**, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2001). *St John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53(5), 583–600.
- Beerhues**, L. (2006). *Hyperforin*. Phytochemistry, 67(20), 2201–2207.
- Berdy**, J. (2005). *Bioactive microbial metabolites*, J. Antibiot., 58, pp. 1-26.
- Bigalke**, D. L. (1984). *Methods used for monitoring the microbiological quality of raw milk*. Dairy Food Sanit 4:189–190.

- Bilia**, A. R., Bergonzi, M. C., Morgenni, F., Mazzi, G., & Vincieri, F. F. (2001). *Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations*. International Journal of Pharmaceutics, 213(1-2), 199–208.
- Booker**, A., Agapouda, A., Frommenwiler, D. A., Scotti, F., Reich, E., & Heinrich, M. (2018). *St John's wort (Hypericum perforatum) products – an assessment of their authenticity and quality*. Phytomedicine, 40, 158–164.
- Bronz**, I., Greibrokk, T., Groth, P.A., Aasen, A.J. (1982). *The relative stereochemistry of hyperforin –an antibiotic from Hypericum perforatum L.* Tetrahedron Lett. 23:1299-1300.
- Budri**, P.E., Silva, N. C. C., Bonsaglia, E. C. R., Fernandes, A., Araújo, J. P., Doyama, J. T., Gonçalves, J.L., Santos, M.V., Fitzgerald-Hughes, D., Rall, V. L. M. (2015). *Effect of essential oils of Syzygium aromaticum and Cinnamomum zeylanicum and their major components on biofilm production in Staphylococcus aureus strains isolated from milk of cows with mastitis*. Journal of Dairy Science, 98(9), 5899–5904.
- Butterweck**, V. & Schmidt, M. (2007). *St. John's wort: Role of active compounds for its mechanism of action and efficacy*. Wiener Medizinische Wochenschrift, 157(13-14), 356–361.
- Butterweck**, V. (2003). *Mechanism of action of St. John's wort in depression*. CNS Drugs 17, 539–562.
- Butterweck**, V., Bockers, T., Korte, B., Wittkowski, W., Winterhoff, H. (2002). *Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus*. Brain Res., 930, 21–29.
- Butterweck**, V., Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A., & Winterhoff, H. (2000). *Flavonoids from Hypericum perforatum Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test*. Planta Medica, 66(1), 3–6.
- Bystrov**, N. S., Dobrynin, V. N., Kolosov, M. N., Chernov, B. K., Chervin, II (1975). *Structure of the chromophoric part of hyperforin*. Dokl Akad Nauk SSSR 225, 1327-1328.

Carine, M. A., & Christenhusz, M. J. (2013). *About this volume: the monograph of Hypericum by Norman Robson*. *Phytotaxa*, 4(1), 1-4.

Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A., Muller, W. E. (1998). *Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts*. *Life Sci* 63, 499-510

Chrea, B., O'Connell, J. A., Silkstone-Carter, O., O'Brien, J., & Walsh, J. J. (2014). *Nature's Antidepressant for Mild to Moderate Depression: Isolation and Spectral Characterization of Hyperforin from a Standardized Extract of St. John's Wort (Hypericum perforatum)*. *Journal of Chemical Education*, 91(3), 440–442.

Çirak, C., & Radušienė, J. (2019). *Factors affecting the variation of bioactive compounds in Hypericum species*. *Biologia Futura*, 70(3), 198–209.

Çirak, C., Radušienė, J., & Çamas, N. (2008). *Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish Hypericum species: Variation among plant parts and phenological stages*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(5-6), 377–382.

Çirak, C., Radušienė, J., Janulis, V., & Ivanauskas, L. (2007). *Secondary metabolites in Hypericum perforatum: variation among plant parts and phenological stages*. *Botanica Helvetica*, 117(1), 29–36.

Coban, A. Y. (2012). *Rapid Determination of Methicillin Resistance among Staphylococcus aureus Clinical Isolates by Colorimetric Methods*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2191–2193.

Couladis, M., Baziou, P., Petrakis, P.V., Harvala, C. (2001). *Essential oil composition of Hypericum perforatum L. growing in different locations in Greece*. *Flavour Fragrance J.* 16, 204e206.

Couladis, M., Chinou, I. B., Tzakou, O., & Petrakis, P. V. (2003). *Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Hypericum rumeliacum subsp. apollinis (Boiss. & Heldr.)*. *Phytotherapy Research*, 17(2), 152–154.

Crockett, S. L., & Robson, N. K. (2011). *Taxonomy and chemotaxonomy of the genus Hypericum*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 5(Special Issue 1), 1.

Da Silva, J. F. M., de Souza, M. C., Matta, S. R., de Andrade, M. R., & Vidal, F. V. N. (2006). *Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities*. Food Chemistry, 99(3), 431–435.

Dall’Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D., Nör, C., Sarmiento, L., Lamb, L., Hass, M., von Poser, G., Schapoval, E. E. S. (2003). *Antimicrobial activity of some Hypericum species*. Phytomedicine, 10(6-7), 511–516.

Dauncey, E. A., Irving, J. T. W., & Allkin, R. (2017). *A review of issues of nomenclature and taxonomy of Hypericum perforatum L. and Kew's Medicinal Plant Names Services*. Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Dewick, P.M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2 ed., John Wiley & sons: Baffins Lane, Chichester, West Sussex, UK, p. 67.

Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., & Izzo, A. A. (2001). *St John’s wort: Prozac from the plant kingdom*. Trends in Pharmacological Sciences, 22(6), 292–297.

Dias, A. C. P., Tomás-Barberán, F. A., Fernandes-Ferreira, M., & Ferreres, F. (1998). *Unusual flavonoids produced by callus of Hypericum perforatum*. Phytochemistry, 48(7), 1165–1168.

Drummond, A.J., Waigh, R.D. (2000). *The development of microbiological methods for phytochemical screening*. In: Pandalai S (ed) Recent research developments in phytochemistry. Research Signpost, India.

Erdelmeier, C. A. (1998). *Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of Hypericum perforatum L.* Pharmacopsychiatry 31 (S1):2–6.

Falk, H. & Schoppel, G. (1992). *On the synthesis of hypericin by oxidative trimethylemodinanthrone and emodin anthrone dimerization: Isohypericin*. Monatshefte für Chemie 123, 931-938.

Filippini, R., Piovan, A., Borsarini, A., & Caniato, R. (2010). *Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of Hypericum perforatum.* *Fitoterapia*, 81(2), 115–119.

Fourneron, J. D., Nait-Si, Y. (2006). *Effect of eluent pH on the HPLC-UV analysis of hyperforin from St. John's Wort (Hypericum perforatum L.).* *PhytochemAnal* 17, 71-77.

Galati, E. M., Contartese, G., Miceli, N., Taviano, M. F., Sdrafkakis, V., Couladis, M., Tzakou, O. & Lanuzza, F. (2008). *Antiinflammatory and antioxidant activity of Hypericum rumeliacum Boiss. subsp. apollinis (Boiss. & Heldr.) Robson & Strid methanol extract.* *Phytotherapy Research*, 22(6), 766–771.

Greeson, J. M., Sanford, B., & Monti, D. A. (2001). *St. John's wort (Hypericum perforatum): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature.* *Psychopharmacology*, 153(4), 402–414.

Guerin, T.F, Mondido, M., McClenn, B., Peasley, B. (2001). *Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading microorganisms.* *Lett Appl Microbiol* 32:340–345.

Gurevich, A.I., Dobrynin, V.N., Kolosov, M.N., Popravko, S.A., Ryabova, I.D., Chernov, B.K., Derbentseva, N.A., Aizenman, B.E., Gargulya, A.D. (1971). *Hyperforin, an antibiotic from Hypericum perforatum.* *Antibiotiki* 16, 510–513.

Guschin, A., Ryzhikh, P., Rummyantseva, T., Gomberg, M. & Unemo, M. (2015). *Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of Mycoplasma genitalium during treatment of male urethritis with josamycin,* *BMC Infect. Dis.*, 15, pp. 1-7.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1991). Third ed. Oxford: Oxford Science Publications. *International Journal of Biochemistry*, 23(1), 129, p. 617 – 24.

Harnafi, H. & Amrani, S. (2008). *Spectrophotometric Methods for Determination of Plant Polyphenols Content and their Antioxidant Activity Assessment: an Overview.* *Pharmacognosy Reviews* Vol 2, Issue 3.

- Henderson, L., Yue, Q. Y., Bergquist, C., Gerden, B., & Arlett, P. (2002).** *St John's wort (Hypericum perforatum): drug interactions and clinical outcomes.* British Journal of Clinical Pharmacology, 54(4), 349–356.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D. (1997).** *Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk.* Lancet 349, 699.
- Huang, H. S., & Liaw, E. T. (2017).** *Extraction Optimization of Flavonoids from Hypericum formosum and Matrix Metalloproteinase-1 Inhibitory Activity.* Molecules, 22(12), 2172.
- Hudman, D. A., & Sargentini, N. J. (2013).** *Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity.* SpringerPlus, 2(1), 55.
- Izzo, A. A. (2004).** *Drug interactions with St. John's Wort (Hypericum perforatum): a review of the clinical evidence.* International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 42(3):139-148.
- Jendželovská, Z., Jendželovský, R., Kuchárová, B., & Fedoročko, P. (2016).** *Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin.* Frontiers in Plant Science, 7.
- Kacerovska, D., Pizinger, K., Majer, F., Šmíd, F. (2008).** *Photodynamic therapy of non melanoma skin cancer with topical Hypericum perforatum extract-A pilot study.* Photochem. Photobiol. 84, 779–785.
- Karioti, A., Vincieri, F. F., Bilia, A. R. (2009).** *Rapid and efficient purification of naphthodianthrones from St. John's wort extract by using liquid-liquid extraction and SEC.* J SepSci 32, 1374-1382.
- Kitanov, G. M. (1979).** *Flavonoids from Hypericum rumeliacum.* Khimia Prirodnih Soedinenii 3: 407–408.
- Kolaci, M., Γκόκου Π., Πέτρου Α., Πέτσιου Β. (2007).** *Τα είδη του Hypericum.* Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

- Kostoglou, D.,** Protopappas, I., & Giaouris, E. (2020). *Common Plant-Derived Terpenoids Present Increased Anti-Biofilm Potential against Staphylococcus Bacteria Compared to a Quaternary Ammonium Biocide*. *Foods*, 9(6), 697.
- Kosuth, J.,** Koperdakova, J., Tolonen, A., Hohtola, A., Cellarova, E. (2003). *The content of hypericins and phloroglucinols in Hypericum perforatum L. seedlings at early stage of development*. *PlantSci.* 165, 515–521
- Kubin, A.,** Meissner, P., Wierrani, F., Burner, U., Bodenteich, A., Pytel, A., Schmeller, N. (2008). *Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin*. *PhotochemPhotobiol* 84, 1560-1563.
- Kusari, S,** Lamshöft, M, Zühlke, S, Spiteller, M. (2008). *An endophytic fungus from Hypericum perforatum that produces hypericin*. *J. Nat. Prod.*, 71, 159–162.
- Kusari, S.,** Zuhlke, S., Kosuth, J., Cellarova, E., Spiteller, M. (2009). *Light-independent metabolomics of endophytic Thielaviasthermophila provides insight into microbial hypericin biosynthesis*. *J. Nat. Prod.*, 72, 1825–1835.
- Lang, F.,** Biber, A., Erdelmeier, C. (2002). *Hyperforin in Johanniskraut – Droge, -Extrakten und –Präparaten*. *Pharm. Unserer Zeit* 5, 512–514.
- Lavie, G.,** Mandel, M., Hazan, S., Barliya, T., Blank, M., Grunbaum, A., Meruelo, D., Solomon, A. (2005). *Anti-angiogenic activities of hypericin in vivo: potential for ophthalmologic applications*. *Angiogenesis* 8, 35-42.
- Leite, K. C. de S.,** Garcia, L. F., Lobón, G. S., Thomaz, D. V., Moreno, E. K. G., Carvalho, M. F. de, Rocha, M. L., Santos, W. T. P. dos, Gil, E. de S. (2018). *Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: an electroanalytical approach*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(3), 325–332.
- Linde, K.,** (2009). *St. John's wort - an overview*. *Forsch Komplementmed* 16, 146-155
- Linnaeus, C.** (1753). *Εἶδος Plantarum* , Tomus II:783
<https://www.biodiversitylibrary.org/item/13830#page/225/mode/1up>

Liu, F., Pan, C., Drumm, P., Ang, C.Y.W. (2005). *Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: active constituents and their transformation.* J. Pharm. Biomed. Anal. 37, 303–312

Liu, F.F. (2000). *Optimization of extraction conditions for active components in Hypericum perforatum using response surface methodology.* J. Agric. Food Chem. 48, 3364–3371.

Lopez-Bazzocchi, I., Hudson, J.B., Towers, G.H. (1991). *Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin.* Photochem. Photobiol. 54, 95–98.

Luo, L., Sun, Q., Mao, Y.Y., Lu, Y.H., & Tan, R.X. (2004). *Inhibitory effects of flavonoids from Hypericum perforatum on nitric oxide synthase.* Journal of Ethnopharmacology, 93(2-3), 221–225.

Majerník, M., Jendželovský, R., Babinčák, M., Košuth, J., Ševc, J., Tonelli Gombalová, Z., Jendželovská, Z., Buríková M., Fedoročko, P. (2019). *Novel Insights into the Effect of Hyperforin and Photodynamic Therapy with Hypericin on Chosen Angiogenic Factors in Colorectal Micro-Tumors Created on Chorioallantoic Membrane.* International Journal of Molecular Sciences, 20(12), 3004.

Mariscal, A., Lopez-Gigosos, R. M., Carnero-Varo, M., & Fernandez-Crehuet, J. (2009). *Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm.* Applied Microbiology and Biotechnology, 82(4), 773–783.

Martin, P. Sawatzky, G. Liu, Mulvey MR (2015). *Antimicrobial resistance to Neisseria gonorrhoeae in Canada: 2009-2013.*, Can. Commun. Dis. Rep., 41, pp. 40-41

Mathioudaki, A., Berzesta, A., Kypriotakis, Z., Skaltsa, H., & Heilmann, J. (2018). *Phenolic metabolites from Hypericum kelleri B ald., an endemic species of Crete (Greece).* Phytochemistry, 146, 1–7.

Mauri, P., Pietta, P. (2000). *High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of Hypericum perforatum extracts.* Rapid Commun Mass Spectrom 14, 95-99.

- Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., Marchaim, D. (Eds.) (2009).** *Antimicrobial Drug Resistance C: Clinical and Epidemiological Aspects*, vol. 2, Springer Dordrecht Heidelberg, London, pp. 681–1347
- McNicholl, B.P., McGrath, J.W., Quinn, J.P. (2006).** *Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management.* *Water Res* 41:127–133.
- Medina, M.A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M.I., Quesada, A.R. (2006).** *Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?* *Life Sci.* 79, 105–111.
- Meruelo, D., Lavie, G., Lavie, D. (1988).** *Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5230-5234.
- Meseguer, A. S., Aldasoro, J. J., & Sanmartín, I. (2013).** *Bayesian inference of phylogeny, morphology and range evolution reveals a complex evolutionary history in St. John's wort (Hypericum).* *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(2), 379-403.
- MILOSEVIC, T., SOLUJIC, S., SUKDOLAK, S. (2007).** *In Vitro Study of Ethanolic Extract of Hypericum perforatum L. on Growth and Sporulation of Some Bacteria and Fungi.* *Turk J Biol*, 31 (2007) 237-241.
- Mulat, M., Khan, F., Muluneh, G., & Pandita, A. (2019).** *Phytochemical profile and antimicrobial effects of different medicinal plant: Current knowledge and future perspectives.* *Current Traditional Medicine*, 05.
- Müller, W.E. (2003).** *Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy.* *Pharmacol. Res.* 47, 101–109.
- Nahrstedt, A., & Butterweck, V. (2010).** *Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of St. John's Wort L.* *Journal of Natural Products*, 73(5), 1015–1021.
- Nahrstedt, A., and V. Butterweck. (1997).** *Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L.* *Pharmacopsychiatry* 30 (S2):129–134.

Nestor, M. S., M. H. Gold, A. N. Kauvar, A. F. Taub, R. G. Geronemus, E. C. Ritvo, M. P. Goldman, D. J. Gilbert, D. F. Richey, T. S. Alster, R. R. Anderson, D. E. Bank, A. Carruthers, J. Carruthers, D. J. Godberg, C. W. Hanke, N. J. Lowe, D. M. Pariser, D. S. Rigel, P. Robins, J. M. Spencer and B. D. Zelickson (2006). *The use of photodynamic therapy in dermatology: Results of a consensus conference*. J. Drugs Dermatol. 5, 140–154.

Nikaido, H. (1994). *Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux*. Science 264: 382–388.

Nikaido, H., & Thanassi, D. G. (1993). *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37(7), 1393–1399.

Nogueira, T., Marcelo-Curto, M. J., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Rubiolo, P., & Bicchi, C. (2008). *Chemotaxonomy of Hypericum genus from Portugal: Geographical distribution and essential oils composition of Hypericum perforatum, Hypericum humifusum, Hypericum linarifolium and Hypericum pulchrum*. Biochemical Systematics and Ecology, 36(1), 40–50.

Nürk, N. M., Crockett, S. L. (2012). *Morphological and Phytochemical Diversity among Hypericum Species of the Mediterranean Basin*. Med Aromat Plant Sci Biotechnol. (Special Issue 1): 14–28.

O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. (2000). *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem 267:5421–5426.

Petrakis, P.V., Couladis, M., Roussis, V. (2005). *A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: the case of five Hellenic Hypericum L. species*. Biochem. Syst. Ecol. 33, 873e898.

Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review*. Biochemistry & Analytical Biochemistry, 01(01).

- Plenagl, N., Seitz, B. S., Reddy Pinnapireddy, S., Jedelská, J., Brüßler, J., & Bakowsky, U. (2018).** *Hypericin Loaded Liposomes for Anti-Microbial Photodynamic Therapy of Gram-Positive Bacteria.* *Physica Status Solidi (a)*, 215(15), 1700837.
- Poutaraud, A., Girardin, P. (2005).** *Improvement of medicinal plant quality: a Hypericum perforatum literature review as an example.* *Plant Genet. Res.* 3, 178–189.
- Quiney, C., Billard, C., Kolb, J.-P., Fourneron, J.-D., Mirshahi, P. (2006).** *Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells.* *Leukemia*, 20, 583–589.
- Rabanal, R. ., Arias, A., Prado, B., Hernández-Pérez, M., & Sánchez-Mateo, C. . (2002).** *Antimicrobial studies on three species of Hypericum from the Canary Islands.* *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2), 287–292.
- Radulović, N., Stankov-Jovanović, V., Stojanović, G., Šmelcerović, A., Spitteller, M., & Asakawa, Y. (2007).** *Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine Hypericum species from the Balkans.* *Food Chemistry*, 103(1), 15–21.
- Reichling, J., Weseler, A., Saller, R. (2001).** *A current review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L.* *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl), 116–118.
- Repčák, M., Mártonfi, P. (1997).** *The localization of secondary substances in Hypericum perforatum flowers.* *Biologia* 52, 91–94.
- Robson, N.K.B. (1977).** *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 1. Infrageneric classification.* *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series* 5, 295–355.
- Robson, N.K.B. (1981).** *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 2. Characters of the genus.* *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series* 8, 55–226.

Robson, N.K.B. (1985). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 3. Sections 1. Campylosporus to 6a. Umbraculoides*. Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series 12, 163–211.

Robson, N.K.B. (1987). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 7. Section 29. Brathys (part 1)*. Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series 16, 1–106.

Robson, N.K.B. (1990). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys*. Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series 20, 1–151.

Robson, N.K.B. (1996). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 6. Sections 20. Myriandra to 28. Elodes*. Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series 26, 75–217.

Robson, N.K.B. (2001). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 4(1). Sections 7. Roscyna to 9. Hypericum sensu lato (part 1)*. Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series 31, 37–88.

Robson, N.K.B. (2002). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). 4(2). Section 9. Hypericum sensu lato (part 2): subsection 1. Hypericum series 1, Hypericum*. Bulletin of the Natural History Museum, London (Botany) 32, 61–123.

Robson, N.K.B. (2006). *Studies in the genus Hypericum L. (Clusiaceae). Section 9. Hypericum sensu lato (part 3): subsection 1. Hypericum series 2. Senanensia, subsection 2. Erecta and section 9b Graveolentia*. Systematics and Biodiversity 4, 19–98.

Robson, N.K.B. (2010a). *Studies in the genus Hypericum L. (Hypericaceae). 5(1). Sections 10. Olympia to 15/16. Crossophyllum*. Phytotaxa 4, 5–126.

Robson, N.K.B. (2010b). *Studies in the genus Hypericum L. (Hypericaceae). 5(2). Section 17. Hirtella to 19. Coridium*. Phytotaxa 4, 127–258.

Robson, N.K.B. (2012). *Studies in the genus Hypericum L. (Hypericaceae) 9. Addenda, corrigenda, keys, lists and general discussion*. Phytotaxa 72, 1–111.

Russo, E., Scicchitano, F., Whalley, B. J., Mazzitello, C., Ciriaco, M., Esposito, S., Patanè, M., Upton, R., Pugliese, M., Chimirri, S., Mammi, M., Palleria, C., De Sarro, G. (2013). *Hypericum perforatum: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug-Drug Interactions*. Phytotherapy Research, 28(5), 643–655.

Saddiqe, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). *A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L.* Journal of Ethnopharmacology, 131(3), 511–521.

Sakavitsi, M. E., Christodoulou, M. I., Tchoumtchoua, J., Fokialakis, N., Kokkinopoulou, I. K., Papageorgiou, E., Argyropoulou, A., Skaltsounis, L. A., Halabalaki, M., Scorilas, A. (2017). *Comparative HPLC-DAD and UHPLC-ESI(-)-HRMS & MS/MS profiling of Hypericum species and correlation with necrotic cell-death activity in human leukemic cells*. Phytochemistry Letters, 20, 481–490.

Sakita, K. M., Conrado, P. C., Faria, D. R., Arita, G. S., Capoci, I. R., Rodrigues-Vendramini, F. A., Peralisi, N., Cesar, G. B, Gonçalves, R. S., Caetano, W., Hioka, N., Kioshima, E. S., Svidzinski, T. I., Bonfim-Mendonça, P. S. (2019). *Copolymeric micelles as efficient inert nanocarrier for hypericin in the photodynamic inactivation of Candida species*. Future Microbiology.

Samel, D., Donnella-Deana, A., & de Witte, P. (1996). *The Effect of Purified Extract of Fagopyrum esculentum (Buckwheat) on Protein Kinases Involved in Signal Transduction Pathways*. Planta Medica, 62(02), 106–110.

Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). *Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. Methods, 42(4), 321–324.

Saroglou, V., Marin, P. D., Rancic, A., Veljic, M., & Skaltsa, H. (2007). *Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six Hypericum species from Serbia*. Biochemical Systematics and Ecology, 35(3), 146–152.

Scheggi, S., Marandino, A., Del Monte, D., De Martino, L., Pelliccia, T., del Rosario Fusco, M., Petenatti, Gambarana, C., De Feo, V. (2016). *The protective effect of Hypericum connatum on stress-induced escape deficit in rat is related to its flavonoid content.* *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1782–1792.

Schempp, C. M., Simon-Haarhaus B., Termeer, C. C., Simon, J. C. (2001). *Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8.* *FEBS Letters* 493, 26-30.

Schempp, C.M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, E., Simon, J.C. (1999). *Antibacterial activity of hyperforin from St. John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria.* *Lancet* 353, 2129.

Schempp, C.M., Winghofer, B., Lütke, R., Simon-Haarhaus, B., Schöpf, E., Simon, J.C. (2000). *Topical application of St. John's wort (Hypericum perforatum L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells.* *Br. J. Dermatol.* 142, 979–984.

Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., & Dias, A. C. P. (2005). *Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts.* *Food Chemistry*, 90(1-2), 157–167. Raederstorff, D. (2009). *Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Humans: a Review.* *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79(3), 152–165.

Silver, L. L. (2016). *A Gestalt approach to Gram-negative entry.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(24), 6379–6389.

Sirvent, T. M., Krasnoff, S. B. & Gibson, D. M. (2003). *Induction of hypericins and hyperforins in Hypericum perforatum in response to damage by herbivores.* *J Chem Ecol* 29: 2667–2681.

Skalkos, D., Stavropoulos, N., Tsimaris, I., Gioti, E., Stalikas, C., Nseyo, U., Ioachim, E., Agnantis, N. (2005). *The Lipophilic Extract of Hypericum perforatum Exerts Significant Cytotoxic Activity Against T24 and NBT-II Urinary Bladder Tumor Cells.* *Planta Medica*, 71(11), 1030–1035.

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.

Smelcerovic, A. & Spiteller, M. (2006). *Phytochemical analysis of nine Hypericum L. species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia*. *Pharmazie* 61: 251–252.

Smelcerovic, A., Verma, V., Spiteller, M., Ahmad, S. M., Puri, S. C. & Qazi, G. N. (2006). *Phytochemical analysis and genetic characterization of six Hypericum species from Serbia*. *Phytochemistry* 67: 171–177.

Stahlberg, H., Müller, D. J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthei, U., Dimroth, P. (2001). *Bacterial Na⁺-ATP synthase has an undecameric rotor*. *EMBO Reports*, 2(3), 229–233.

Stevinson, C., & Ernst, E. (2000). *A pilot study of Hypericum perforatum for the treatment of premenstrual syndrome*. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 107(7), 870–876.

Süntar, I., Oyardı, O., Akkol, E. K., & Özçelik, B. (2015). *Antimicrobial effect of the extracts from Hypericum perforatum against oral bacteria and biofilm formation*. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 1065–1070.

Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M., Blatt, S., Wagner, H. (1984). *Inhibition of monoamine oxidase by hypericin*. *Planta Medica*, 50:272–274.

Takizawa, Y., Taneike, I., Nakagawa, S., Oishi, T., Nitahara, Y., Iwakura, N., Ozaki, K., Takano, M., Nakayama, T., Yamamoto, T. (2005). *A Panton-Valentine Leucocidin (PVL)-Positive Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Strain, Another Such Strain Carrying a Multiple-Drug Resistance Plasmid, and Other More-Typical PVL-Negative MRSA Strains Found in Japan*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3356–3363.

Tassone, E., Maran, C., Masola, V., Bradascchia, A., Garbisa, S., Onisto, M. (2011). *Antidepressant hyperforin up-regulates VEGF in CNS tumour cells*. *Pharmacol. Res.*, 63, 37–43.

Tekel' ová, D., Repčák, M., Zemková, E., Tóth, J. (2000). *Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of Hypericum perforatum.* *Planta Med.* 66, 778–780.

Touafek, O., Nacer, A., Kabouche, A., Kabouche, Z. (2005). *Analysis of the essential oil of Algerian Hypericum perforatum L.* *Flavour Fragrance J.* 20 (6), 669e670.

Treiber, K., Singer, A., Henke, B., Müller, W.E. (2005). *Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs).* *Br. J. Pharmacol.* 145, 75–83.

Trigas, P. (2018). *A new Hypericum (sect. Drosocarpium, Hypericaceae) from the Cyclades Islands (Greece).* *Nordic Journal of Botany*, 36(11) e02205.

Tusevski, O., Todorovska, M., Spasenoski, M., Simic, SG. (2019). *Antioxidant phenolic compounds in Hypericum perforatum L. wild-growing plants collected in the Republic of Macedonia.* *Biologica Nyssana.* Vol 10, No 2, 2217-4605.

Twigg, R. S. (1945). *Oxidation-reduction aspects of Resazurin.* *Nature* 155:401–402.

Urbánek, M., Blechtová, L., Pospíšilová, M., & Polášek, M. (2002). *On-line coupling of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of Hypericum perforatum leaves or flowers.* *Journal of Chromatography A*, 958(1-2), 261–271.

Vajs, V., Vugdelija, S., Trifunović, S., Karadžić, I., Juranić, N., Macura, S., & Milosavljević, S. (2003). *Further degradation product of hyperforin from Hypericum perforatum (St. John's Wort).* *Fitoterapia*, 74(5), 439–444.

Vandenbogaerde, A. L., Cuveele, J. F., Proot, P., Himpens, B. E., Merlevede, W. J., de Witte, P. A. (1997). *Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin.* *J PhotochemPhotobiol B* 38, 136-142.

Vandenbogaerde, A. L., Delaey, E. M., Vantieghem, A. M., Himpens, B. E., Merlevede, W. J., de Witte, P. A. (1998a). *Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization.* *PhotochemPhotobiol* 67, 119-125.

Vandenbogaerde, A.L., Kamuhabwa, A., Delaey, E., Himpens, B.E., Merlevede, W.J., de Witte, P.A. (1998b). *Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin*. J. Photochem. Photobiol. B 45, 87–94.

Vega-Avila, E., Pugsley M.K. (2011). *An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells*. Proc West Pharmacol Soc 54:10–14.

Verjee, S., Kelber, O., Kolb, C., Abdel-Aziz, H., & Butterweck, V. (2017). *Permeation characteristics of hypericin across Caco-2 monolayers in the presence of single flavonoids, defined flavonoid mixtures or Hypericum extract matrix*. Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Whiskey, E., Werneke, U., Taylor, D. (2001). *A systematic review and meta-analysis of Hypericum perforatum in depression: a comprehensive clinical review*. Int. Clin. Psychopharmacol. 16, 239–252.

Wirz, A., Meier, B. & Sticher O. (2001). *Stability of hypericin and pseudohypericin in extract solutions of Hypericum perforatum and in standard solutions*. Pharm Ind 63: 410–415.

Wirz, A., Meier, B., Sticher, O. (2002). *Solubility of hypericin in methanol and methanol-pyridine*. Pharmazie 57, 543-545.

Wynn, J. L., Cotton, T. M. (1995). *Spectroscopic Properties of Hypericin in Solution and at Surfaces*. J. Phys. Chem., 99 (12), pp 4317–4323.

Yousuf, M., Aslam, K., Wani, B.A., Aslam, N., Dar, N.A. & Nawchoo, I.A. (2012). *In vitro antibacterial activity and phytochemical studies of methanolic extract of leaves of Hypericum perforatum L. growing wild in Kashmir Himalaya*. Asian Journal of Plant Science and Research, 2012, 2 (4):414-420.

Zgurskaya, H. I., Rybenkov, V. V., Krishnamoorthy, G. & Leus, I.V. (2018). *Trans-envelope multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria and their synergism with the outer membrane barrier*. Res. Microbiol. 169: 351–356.

Zhang, J., Zhang, F., Tang, Q., Xu, C., & Meng, X. (2018). *Effect of photodynamic inactivation of Escherichia coli by hypericin.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(7).

Zhang, R. J. Y., Zhang, X., Kennelly, E. J., & Long, C. (2020). *Ethnopharmacology of Hypericum species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology.* Journal of Ethnopharmacology, 112686.

Zheleva-Dimitrova, D., Nedialkov, P., & Kitanov, G. (2010). *Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from Hypericum species growing in Bulgaria.* Pharmacognosy Magazine, 6(22), 74.

Zobayed, S. M. A., Afreen, F., Goto, E., Kozai, T. (2006). *Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of Hypericum perforatum.* Annals of Botany, 98:793–804.

Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2005). *Hypocholesterolemic Effects of a Flavonoid-Rich Extract of Hypericum perforatumL. in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(7), 2462–2466.

Ελληνική

Γκιαούρης, Ε. (2015). Κυτταρική δομή και μικροβιακή ποικιλομορφία. 2η Διάλεξη Θεωρίας Γενικής Μικροβιολογίας. Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Σχολή Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής.

Καββαδάς, Δ., Εικονογραφημένον Βοτανικόν φυτολογικόν λεξικόν (9 τόμοι), εκδότης Πελεκάνος.

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Ά., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. (2015). Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα.. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Ά., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ.

Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 8.

Δικτυογραφία

(1) Εικόνα υπερικού:

https://www.google.com/search?q=%CE%B5%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CE%BD%CE%B5%CF%82+%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CF%83%CE%B1%CE%BC%CE%BF%CF%87%CE%BF%CF%81%CF%84%CE%BF%CF%85&sxsrf=ACYBGNTyWtD2fW0VDGb0dUXYfnNcqq7ZXw:1581604801610&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwin0 - C4c7nAhWlxaYKHaaVBnAQ_AUoAXoECAwQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=r7ANdgh7dYjeNM&imgdii=NP7t2Cpg-IYIGM

(2) <http://florahellenica.blogspot.com/>

(3) <https://www.leibniz-wirkstoffe.de/projects/>

(4) <https://web.archive.org/web/20160808184205/http://www.projectnoah.org/spottings/13596011>

(5) https://www.google.com/search?q=hypericum+perforatum&sxsrf=ACYBGNQP4BY4Wavc0RZqoYYH2qzP-2s7FQ:1581791992657&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwinvNKumtTnAhXBRBUIHah-Bp0Q_AUoAXoECBQQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=j9sJY7v8pp-a2M

(6) http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/e890e853-5eb4-47f0-a7c1-c0987703f0dc#habitat

(7) https://www.google.com/search?q=Hypericum+albiflorum+var.+albiflorum&tbm=isch&ved=2ahUKEwios5SNydbnAhXMm7QKHTarCDoQ2-cCegQIABAA&oq=Hypericum+albiflorum+var.+albiflorum&gs_l=img.3...24291.26823..27179...0.0..0.296.1582.0j7j2.....0....1..gws-wiz-img.....35i39.x2ni7U-Rpp4&ei=anhJXqjWFsy30gW21qLQAw&bih=657&biw=1366#imgrc=gSP4iIL-K2QBMM

(8) http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/83455a15-9f06-4027-9e4c-53b14a887d77

- (9) http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/ace61712-99cd-4282-bfa1-8859a6edc372
- (10) <http://www.abpbio.com/alarblue-1/>

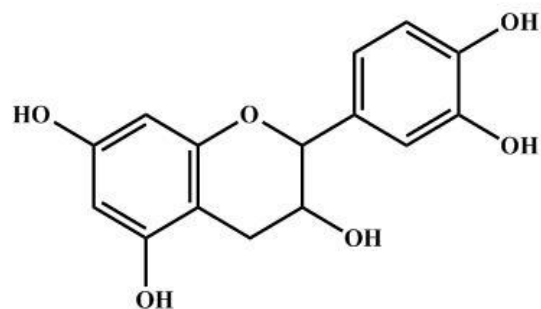
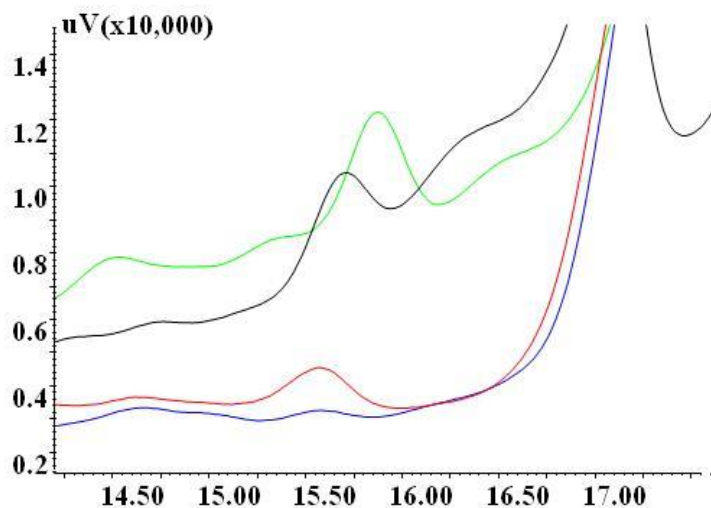
Παραρτήματα

Παράρτημα Α

LC-DAD-MS – Χρωματογραφήματα ανά κορυφή χημικής ένωσης των τεσσάρων

δειγμάτων *Hypericum*

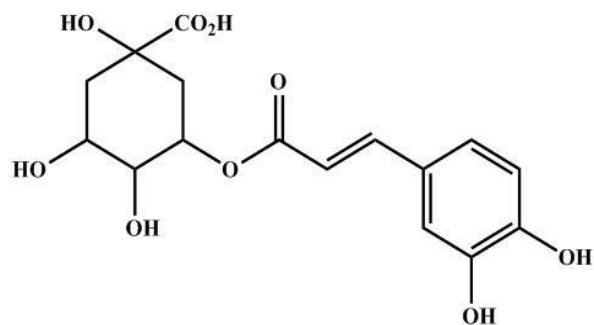
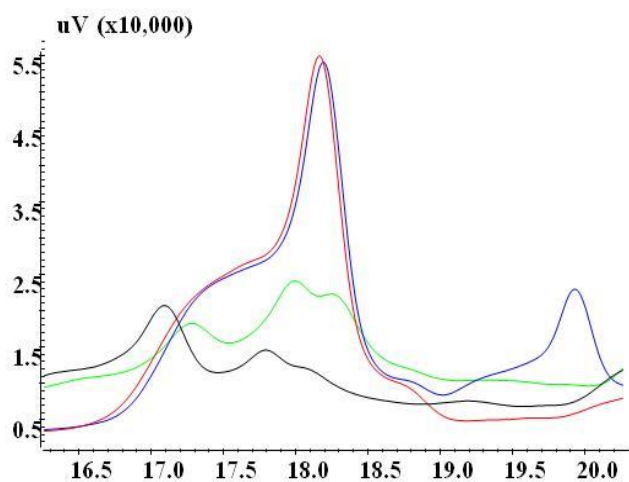
Κατεχίνη



Chemical Formula: $C_{15}H_{14}O_6$

Εικόνα 39: Ανίχνευση της κορυφής της κατεχίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

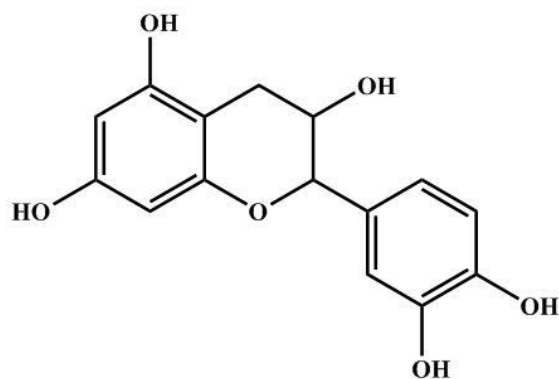
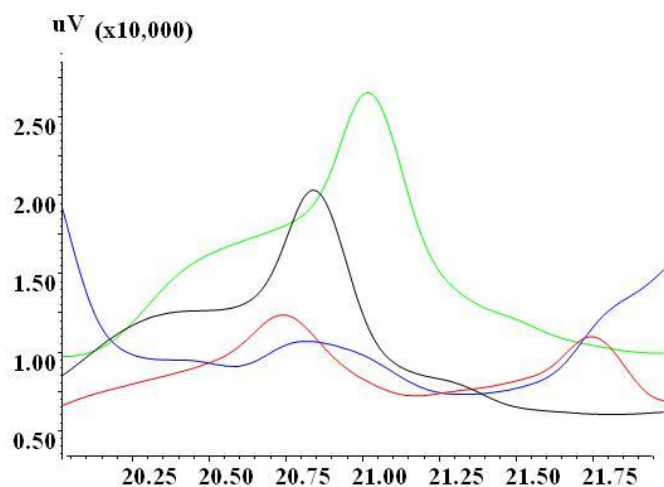
Χλωρογενικό οξύ



Chemical Formula: $C_{16}H_{18}O_9$

Εικόνα 40: Ανίχνευση της κορυφής του χλωρογενικού οξέος σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

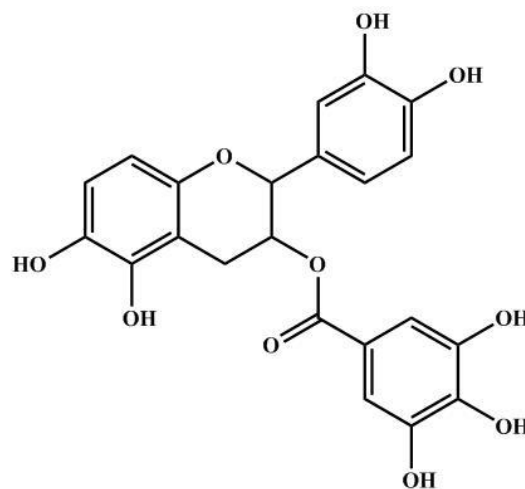
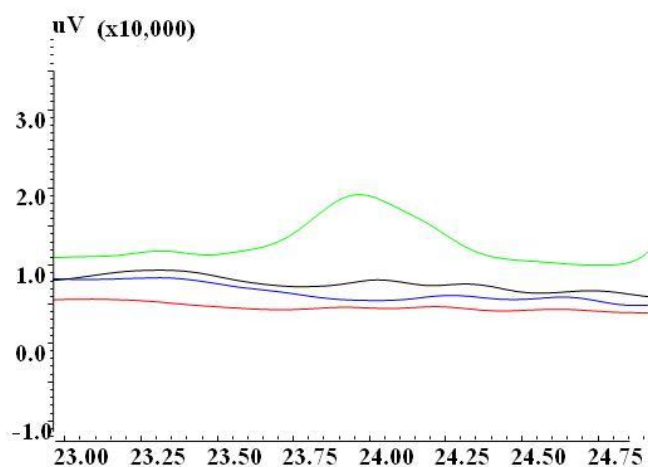
Επικατεχίνη



Chemical Formula: $C_{15}H_{14}O_6$

Εικόνα 41: Ανίχνευση της κορυφής της επικατεχίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

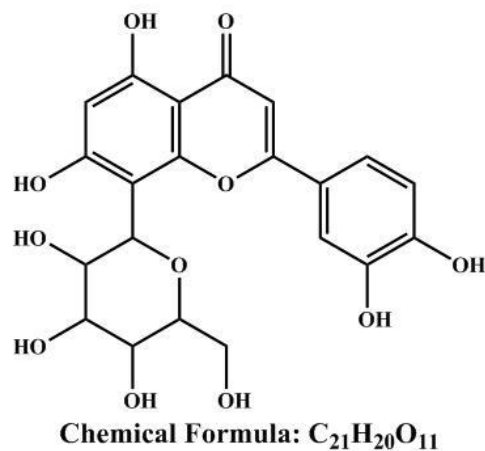
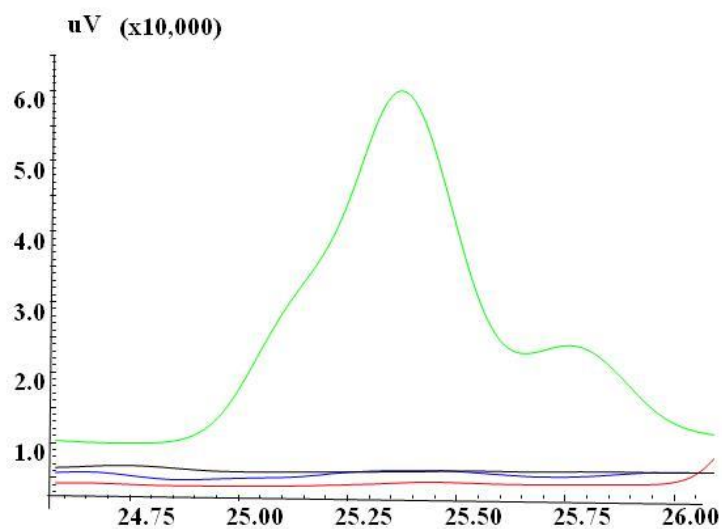
Γαλλική επικατεχίνη (Epicatechin gallate)



Chemical Formula: $C_{22}H_{18}O_{10}$

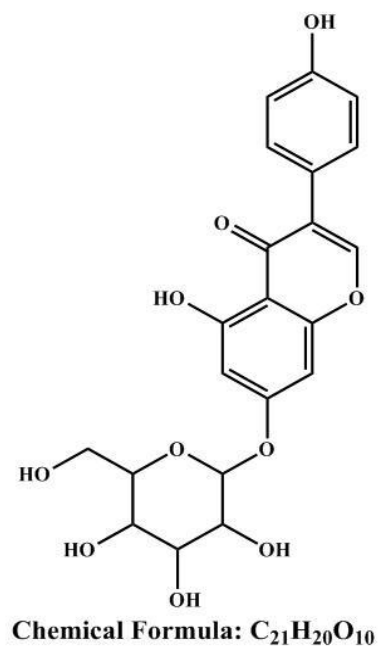
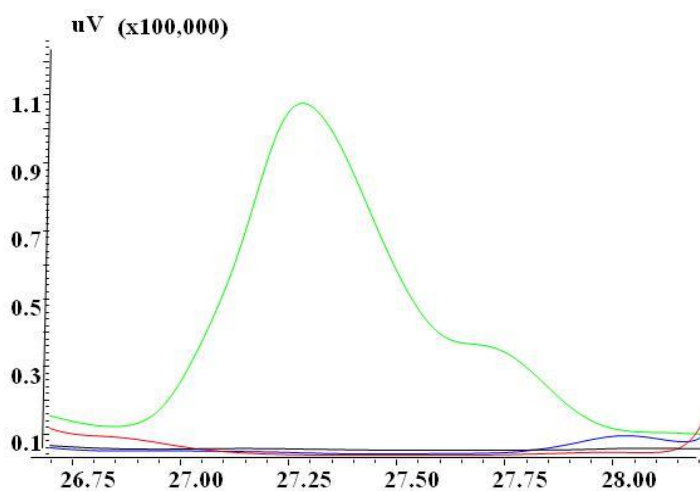
Εικόνα 42: Ανίχνευση της κορυφής της γαλλικής επικατεχίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

Οριεντίνη (Orientin)



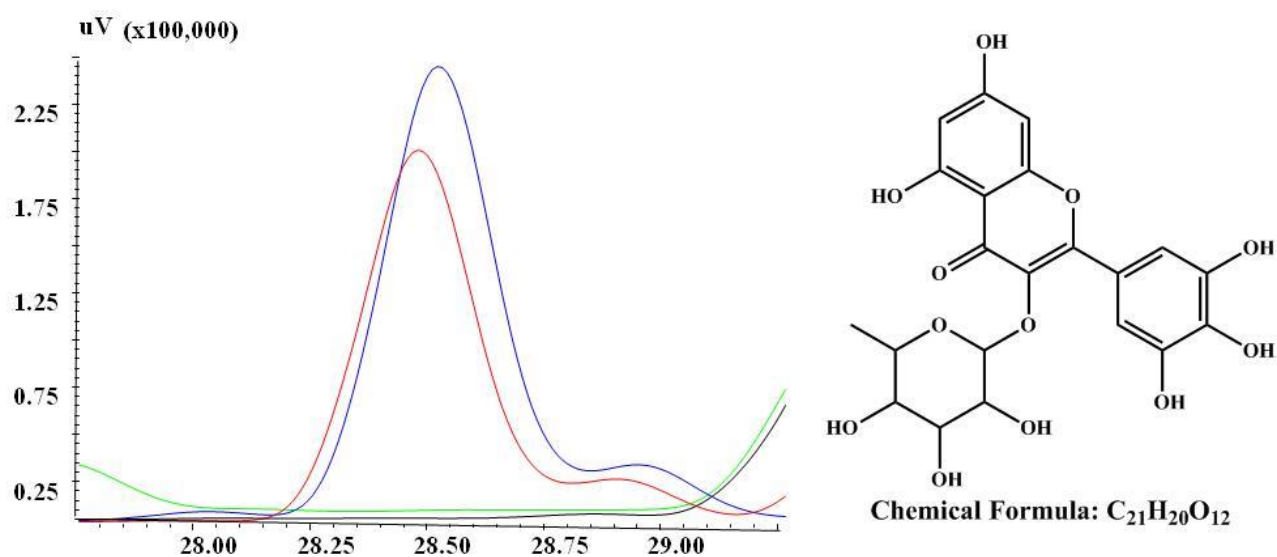
Εικόνα 43: Ανίχνευση της κορυφής της οριεντίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

Γενιστίνη (Genistin)



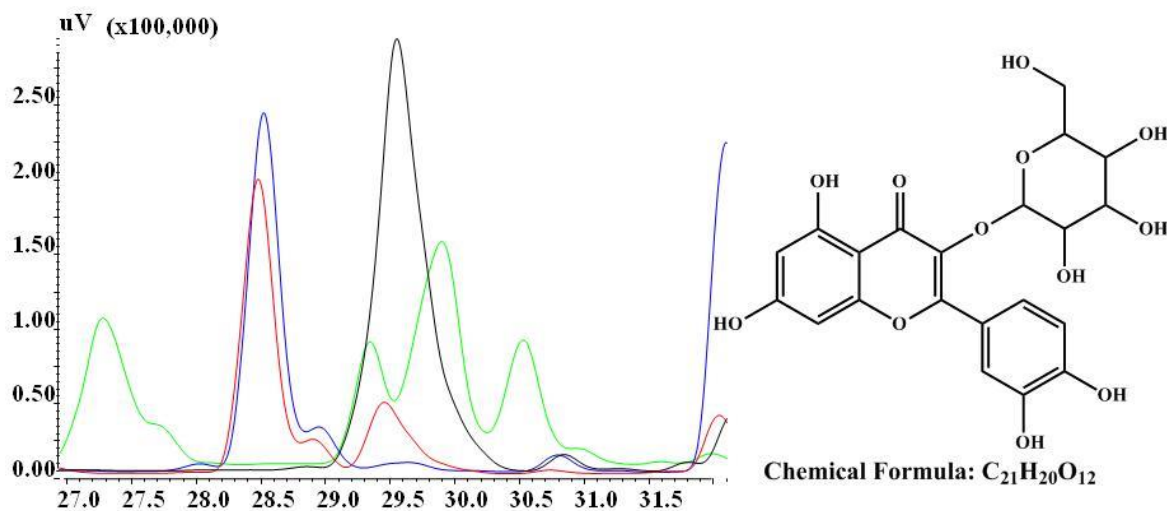
Εικόνα 44: Ανίχνευση της κορυφής της γενιστίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

Μυρικιτρίνη (Myricitrin/Myricetin-3-O-rhamnoside)



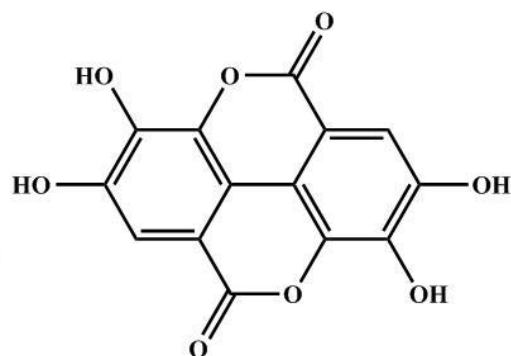
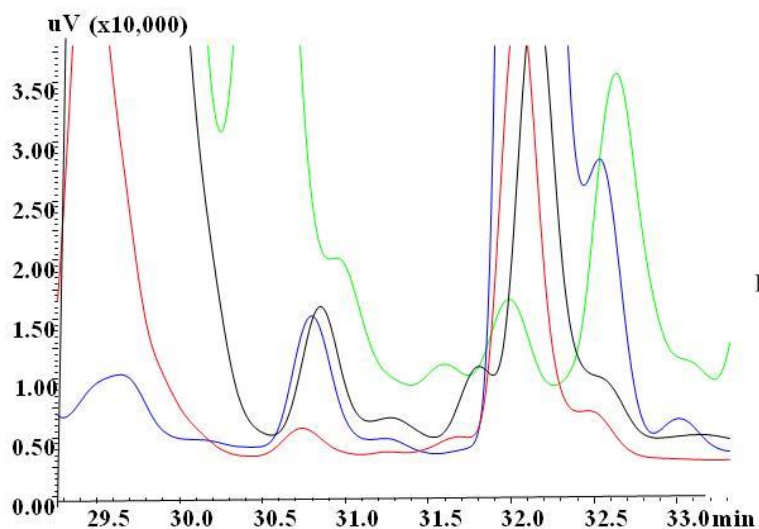
Εικόνα 45: Ανίχνευση της κορυφής της μυρικιτρίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

3-β-D-γλυκοζίτης της κερκετίνης (Quercetin-3-β-D-glucoside)



Εικόνα 46: Ανίχνευση της κορυφής του 3-β-D- γλυκοζίτη της κερκετίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

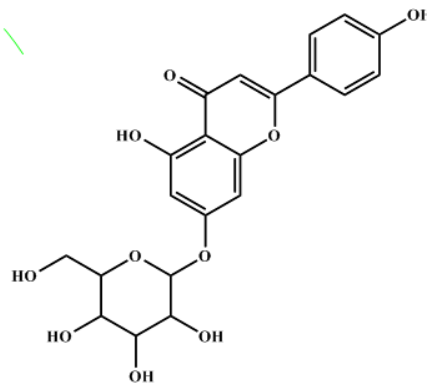
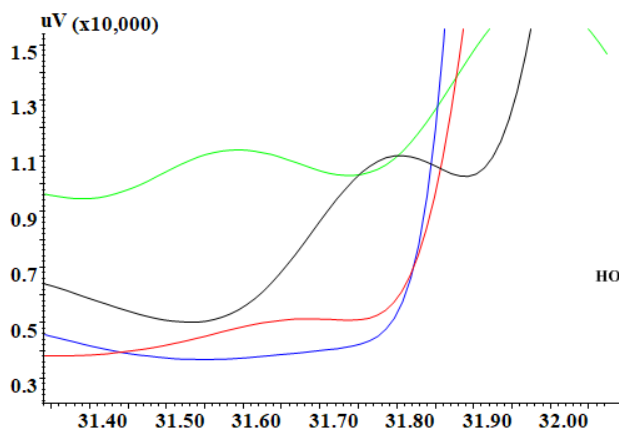
Ελλαγικό οξύ



Chemical Formula: $C_{14}H_6O_8$

Εικόνα 47: Ανίχνευση της κορυφής του ελλαγικού οξέος σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. arpollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

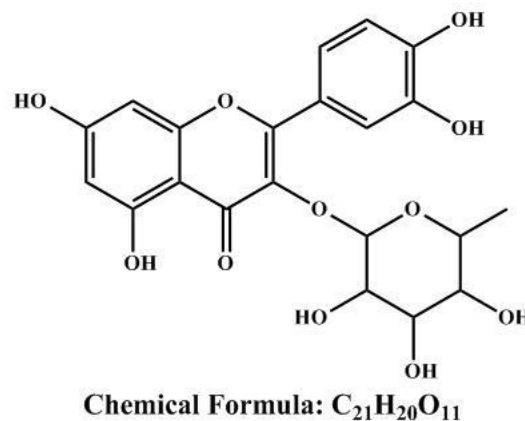
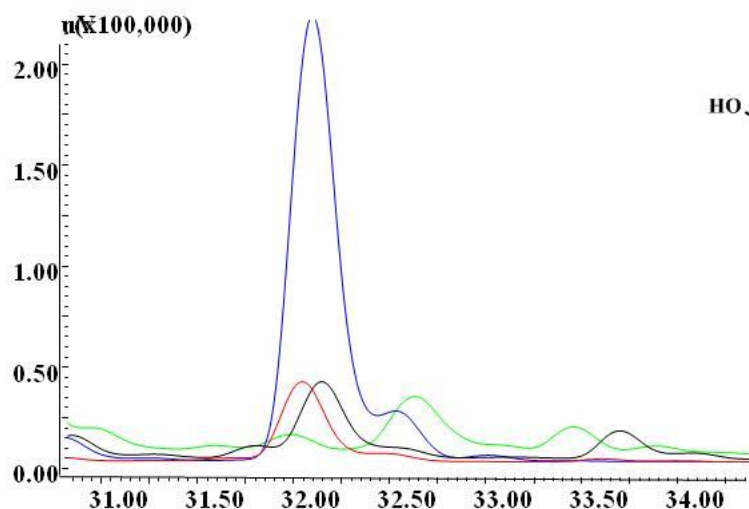
7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης (Apigenin-7-O-glucoside)



Chemical Formula: $C_{21}H_{20}O_{10}$

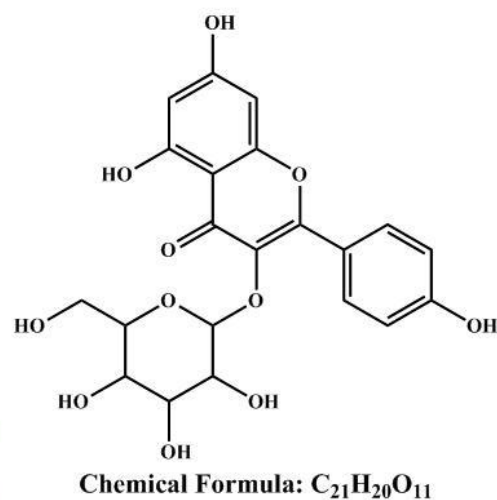
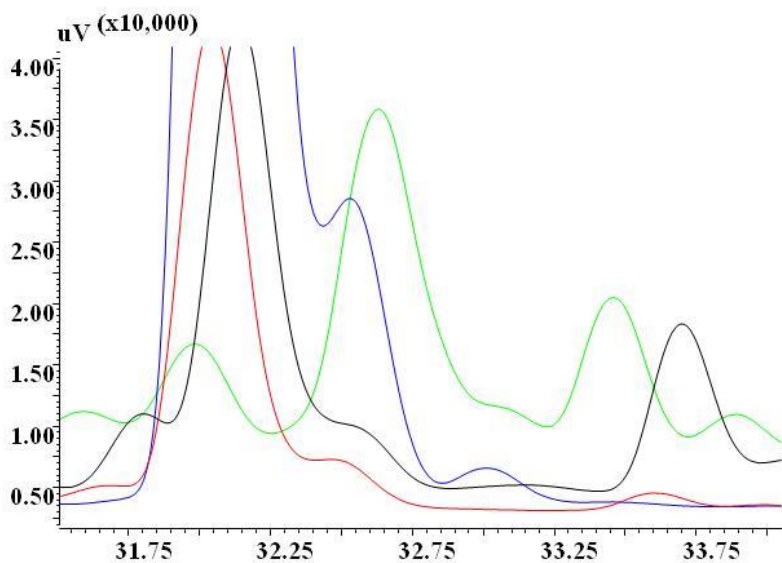
Εικόνα 48: Ανίχνευση της κορυφής του 7-O- γλυκοζίτη της απιγενίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. arpollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

Κερκιτρίνη



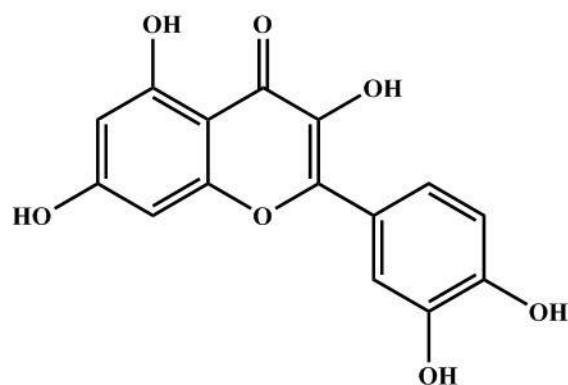
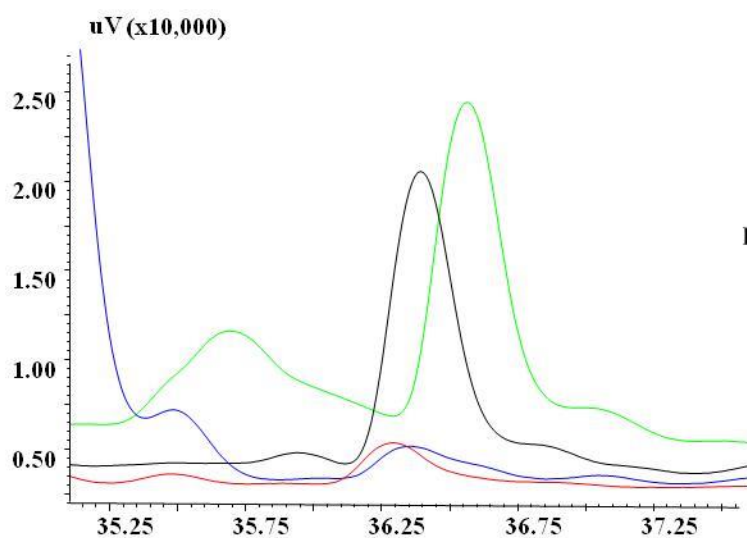
Εικόνα 49: Ανίχνευση της κορυφής της κερκιτρίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

3-O- γλυκοζίτης της καμφερόλης (Kaempferol-3-O-glucoside)



Εικόνα 50: Ανίχνευση της κορυφής του 3-O- γλυκοζίτη της καμφερόλης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

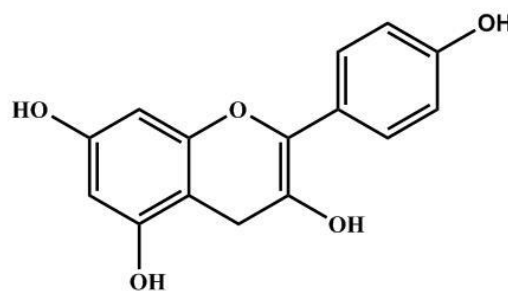
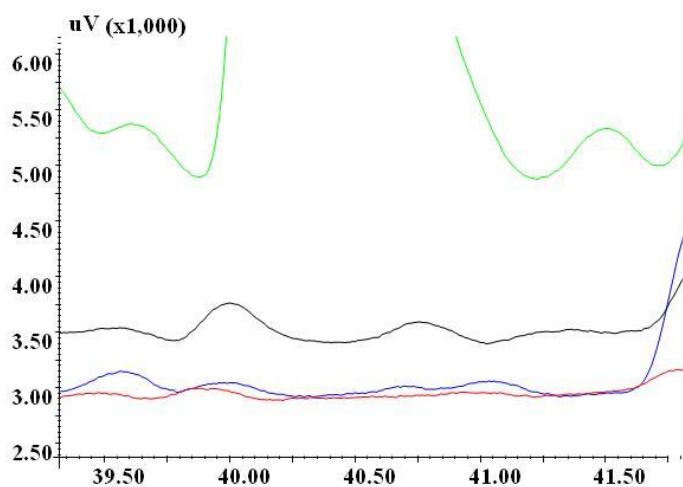
Κερκετίνη



Chemical Formula: $C_{15}H_{10}O_7$

Εικόνα 51: Ανίχνευση της κορυφής της κερκετίνης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

Καμφερόλη



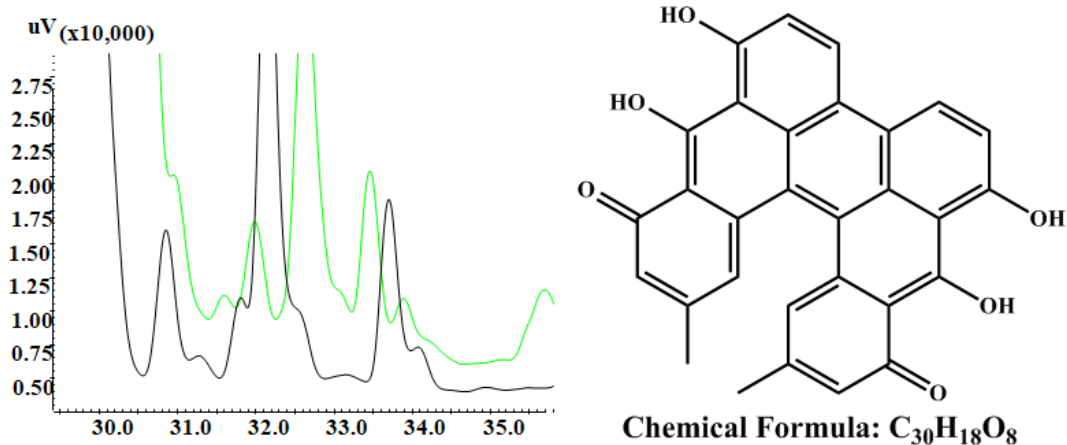
Chemical Formula: $C_{15}H_{12}O_5$

Εικόνα 52: Ανίχνευση της κορυφής της καμφερόλης σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το μαύρο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο *H. perforatum*, το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

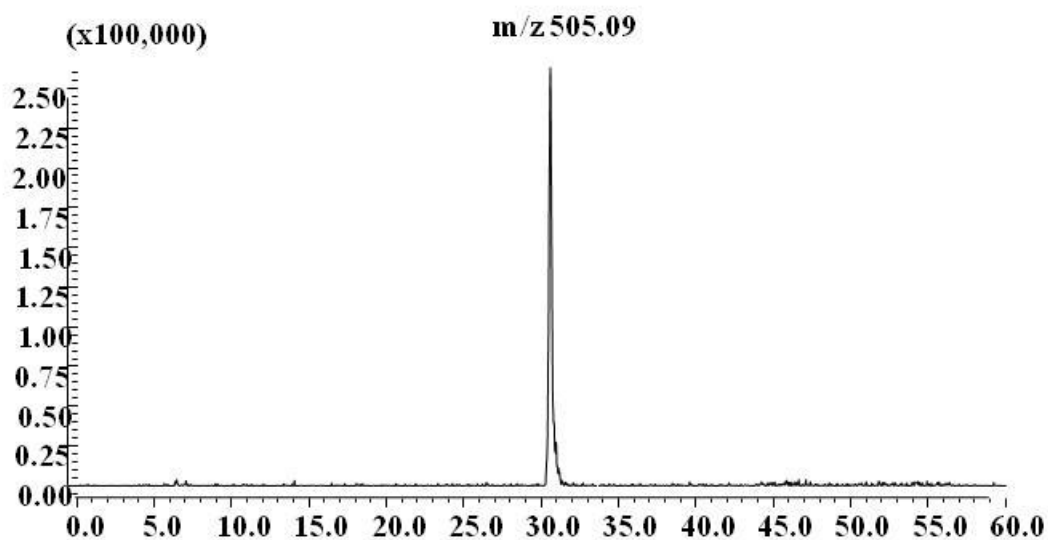
Παράρτημα Β

LC-DAD-MS – Χρωματογραφήματα και φάσματα μαζών ανά κορυφή χημικής ένωσης που ταυτοποιήθηκε από τη βιβλιογραφία

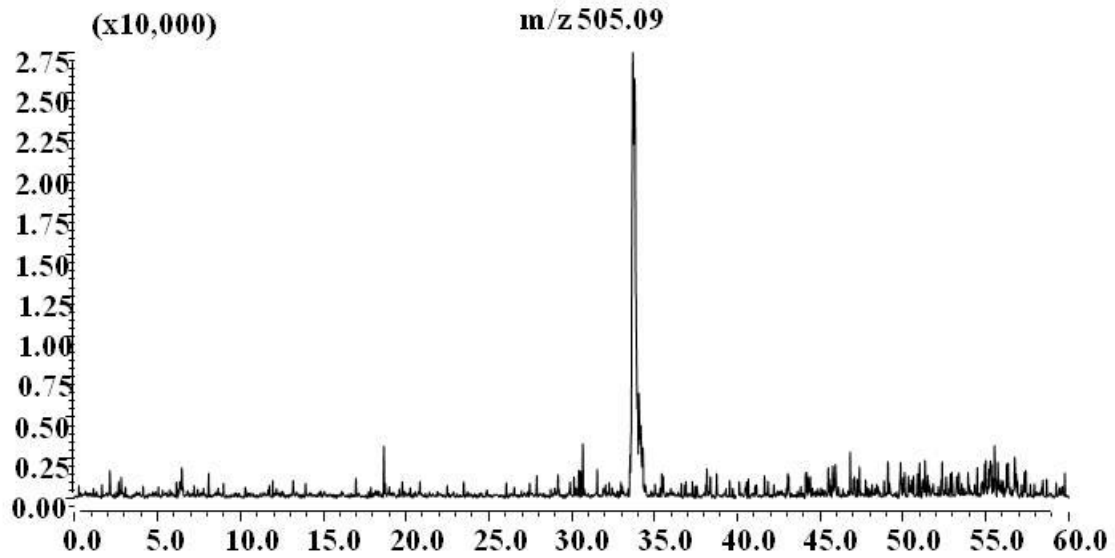
Πρωτούπερικίνη



Εικόνα 53: Φάσμα UV-Vis ($\lambda=270$ nm). Το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί στο δείγμα *H. perforatum* και το πράσινο στο *H. perfoliatum*.

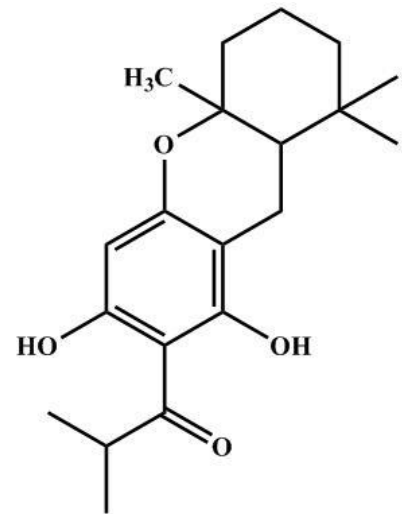
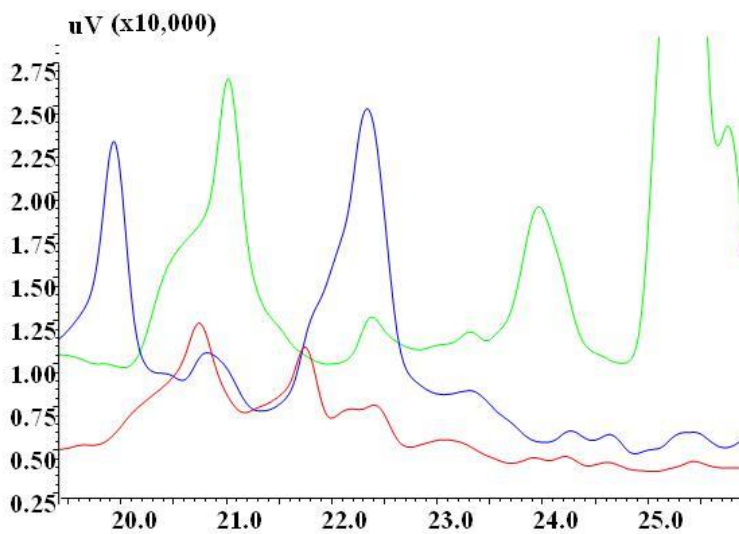


Εικόνα 54: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού πρωτούπερικίνης στο δείγμα *H. perfoliatum*.



Εικόνα 55: Ανίχνευση αρνητικού ιόντος της πρωτοϋπερικίνης στο δείγμα *H. perforatum*

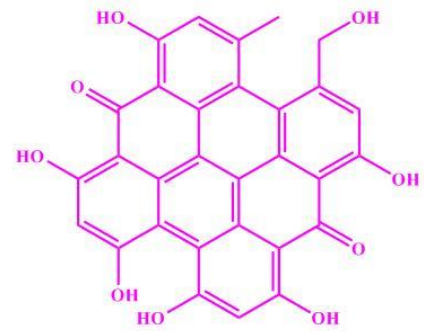
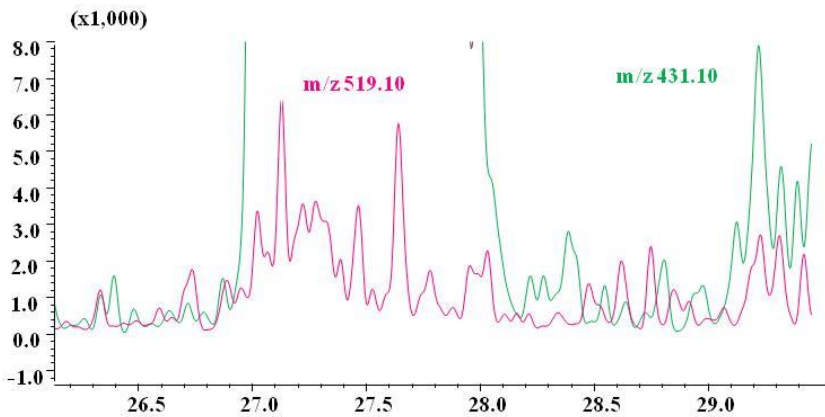
Hyperjovinol B



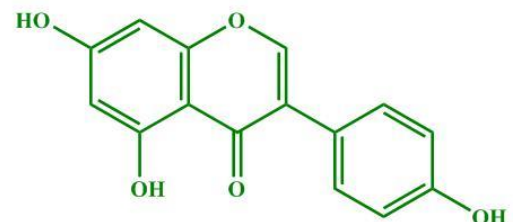
Chemical Formula: $C_{20}H_{28}O_4$

Εικόνα 56: Ανίχνευση της κορυφής της *Hyperjovinol B* σε χρωματογράφημα LC-DAD-MS σε μήκος κύματος 270 nm. Το κόκκινο στο *H. cycladicum*, το μπλε στο *H. rumeliacum ssp. apollinis* και το πράσινο στο *H. perforatum*.

Συνέκλωση ψευδοϋπερικίνης με γενιστίνη

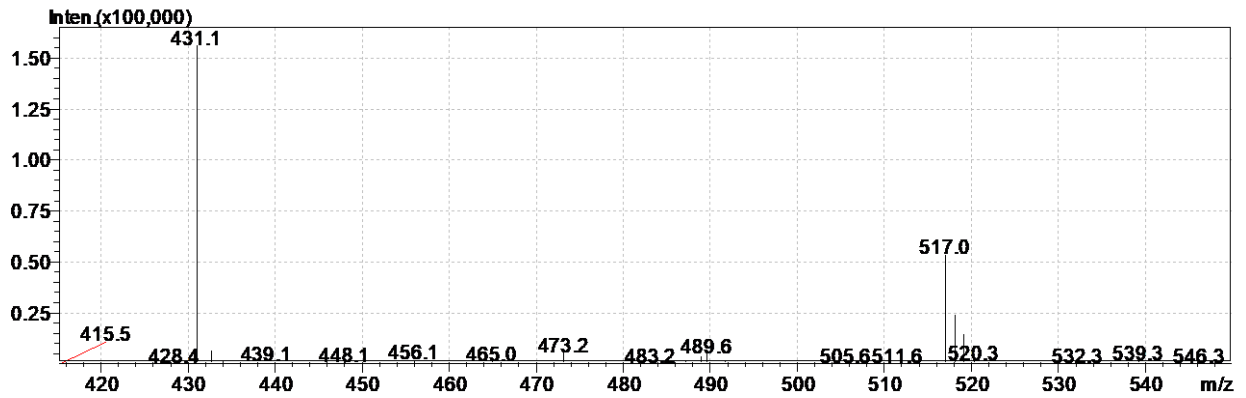


Chemical Formula: $C_{30}H_{16}O_9$



Chemical Formula: $C_{15}H_{10}O_5$

Εικόνα 57: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού της ψευδοϋπερικίνης.

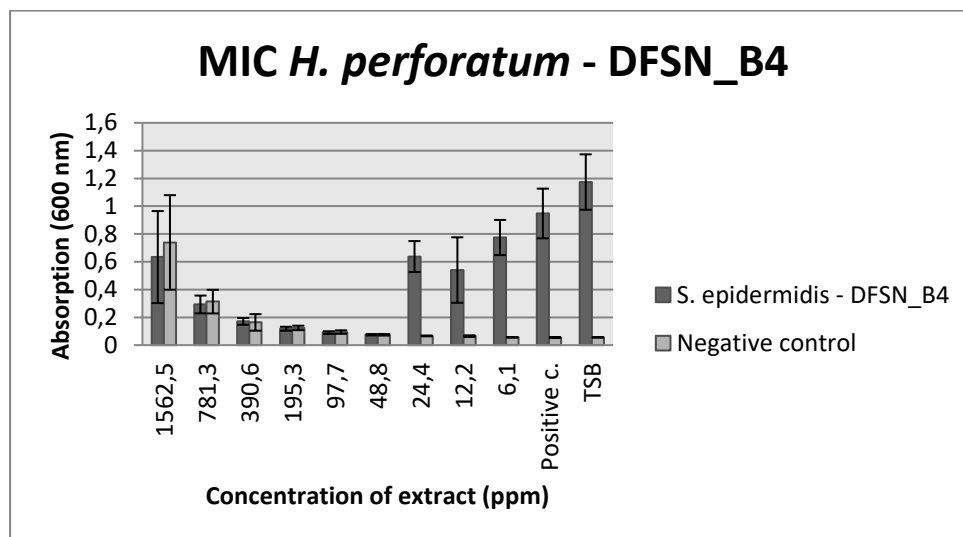


Εικόνα 58: Ανίχνευση των αρνητικών ιόντων της ψευδοϋπερικίνης και της γενιστίνης στο δείγμα *H. perforiatum*

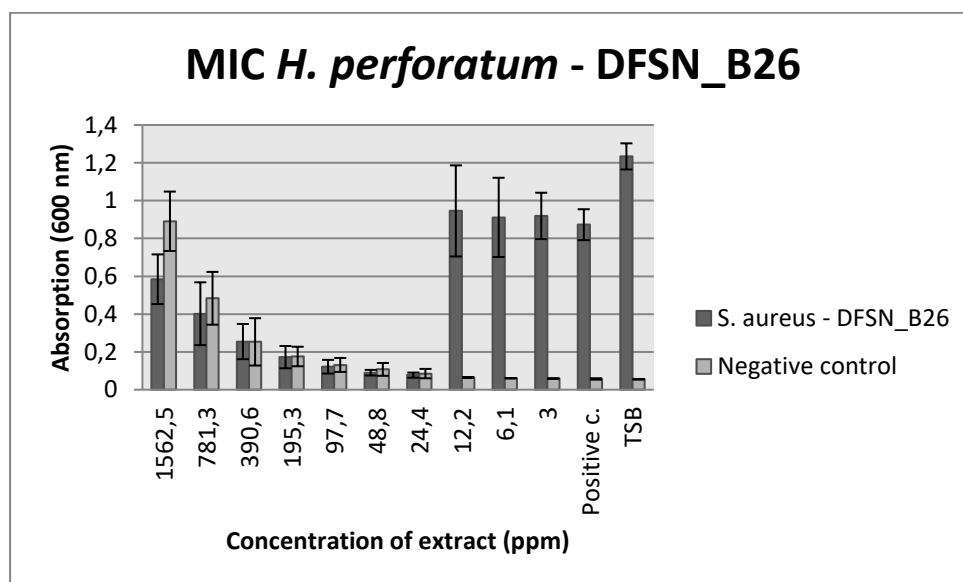
Παράρτημα Γ

Φασματοφωτομετρικά αποτελέσματα της MIC των εκχυλισμάτων *Hypericum*

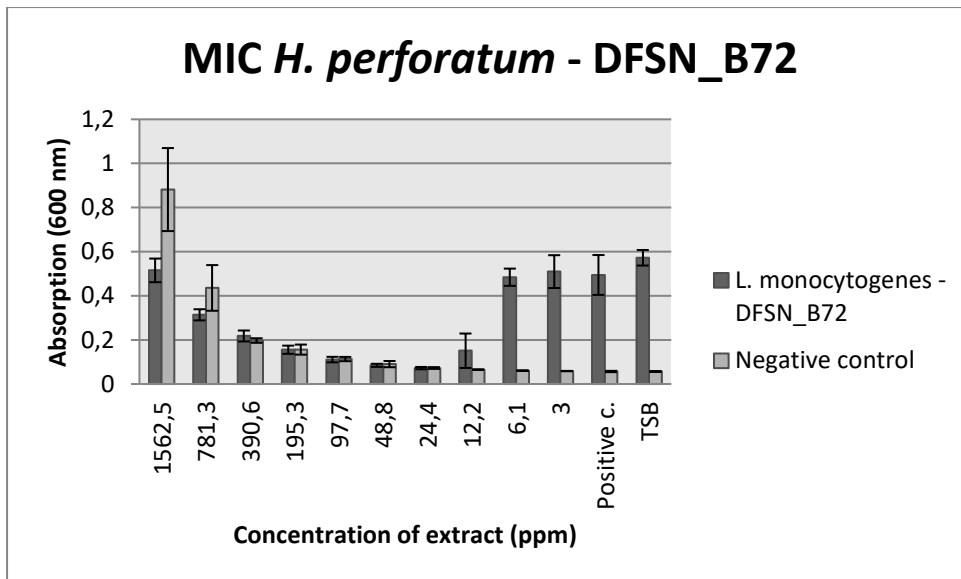
❖ *H. perforatum*



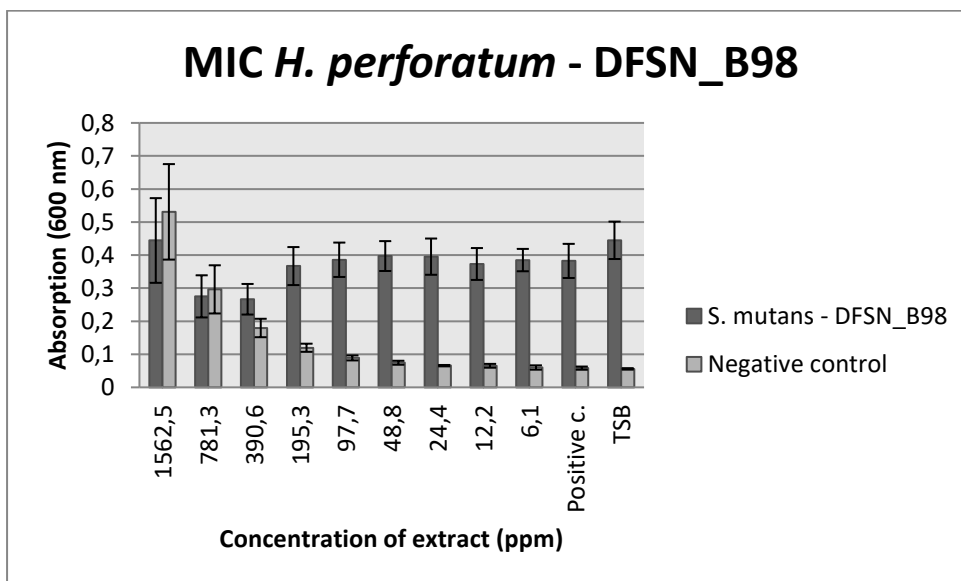
Εικόνα 59: MIC του εκχυλίσματος *H. perforatum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. epidermidis*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).



Εικόνα 60: MIC του εκχυλίσματος *H. perforatum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. aureus*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

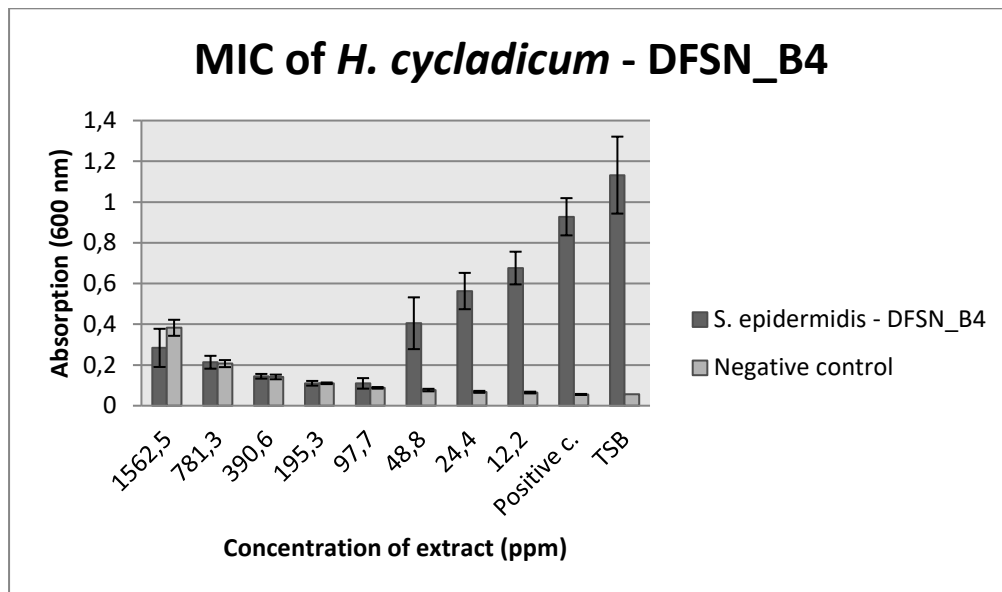


Εικόνα 61: MIC του εκχυλίσματος H. perforatum έναντι στο βακτηριακό στέλεχος L. monocytogenes. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

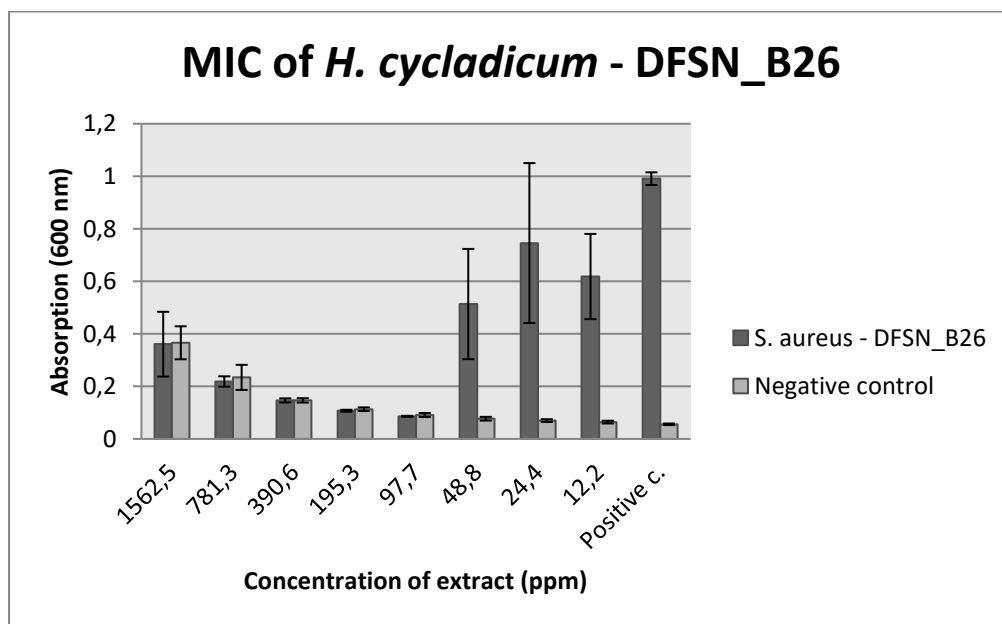


Εικόνα 62: MIC του εκχυλίσματος H. perforatum έναντι στο βακτηριακό στέλεχος S. mutans. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

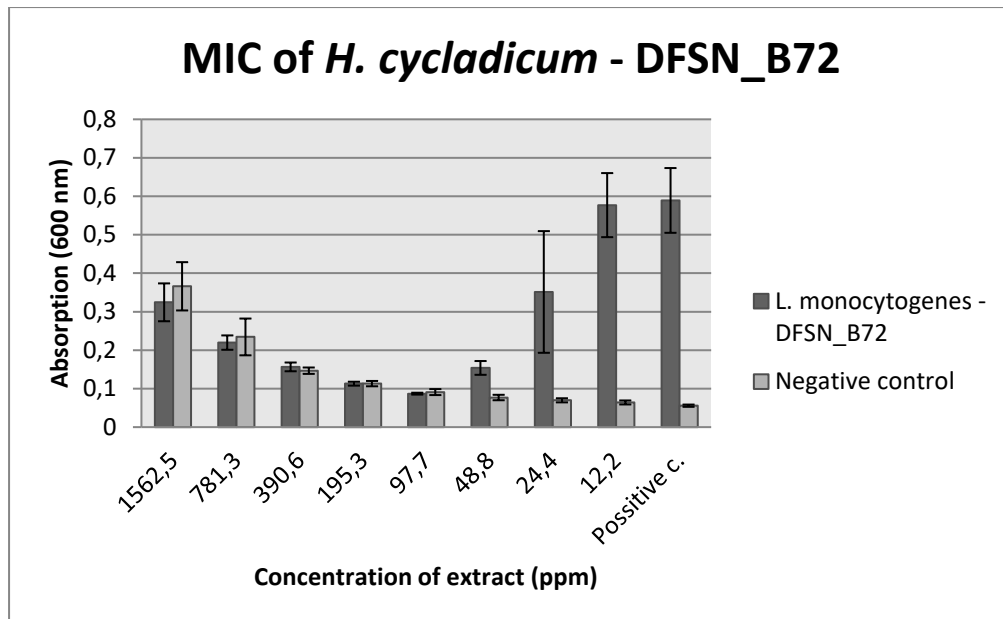
❖ *H. cycladicum*



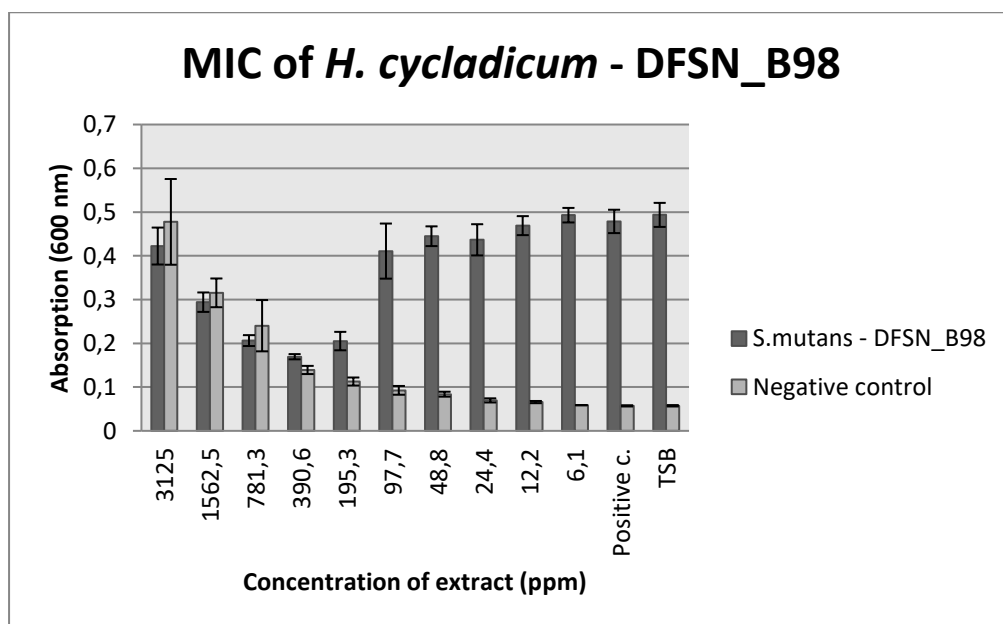
Εικόνα 63: MIC του εκχυλίσματος *H. cycladicum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. epidermidis*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).



Εικόνα 64: MIC του εκχυλίσματος *H. cycladicum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. aureus*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

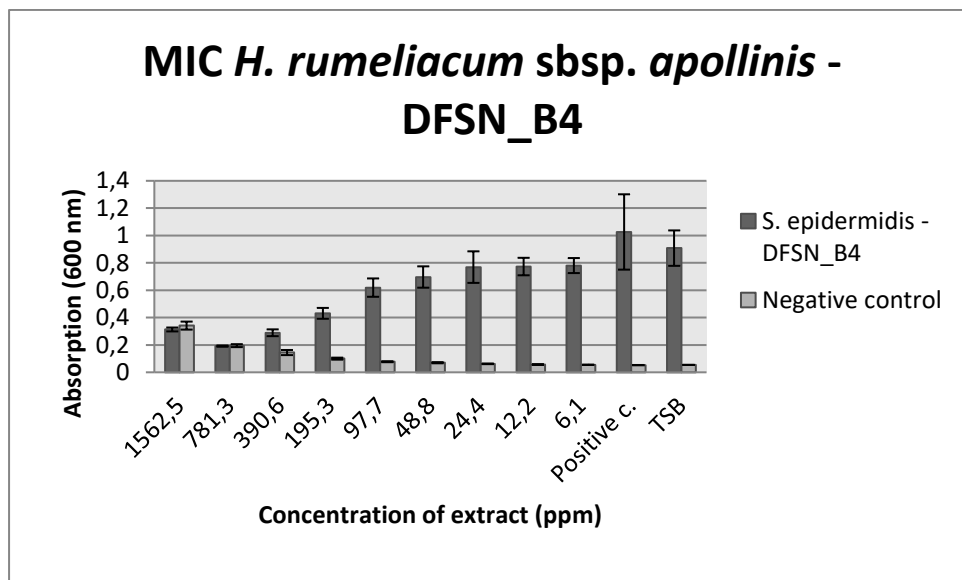


Εικόνα 65: MIC του εκχυλίσματος *H. cycladicum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *L. monocytogenes*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

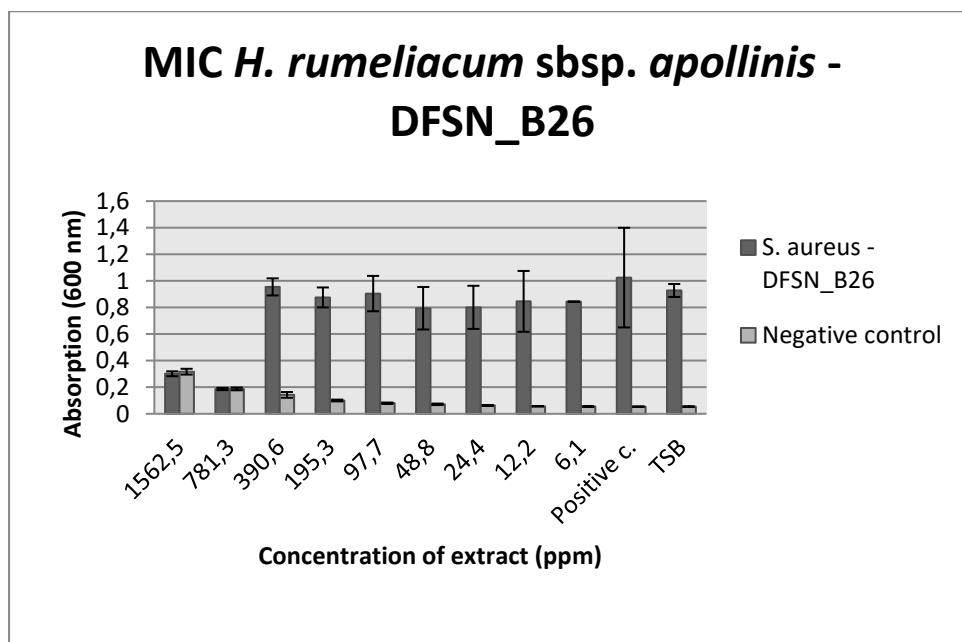


Εικόνα 66: MIC του εκχυλίσματος *H. cycladicum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. mutans*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

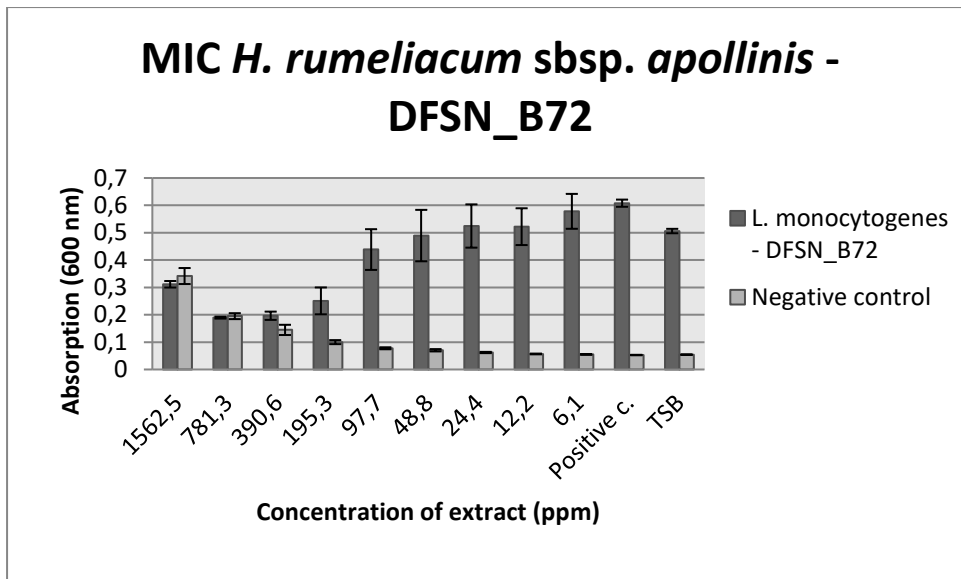
❖ *H. rumeliacum ssp. apollinis*



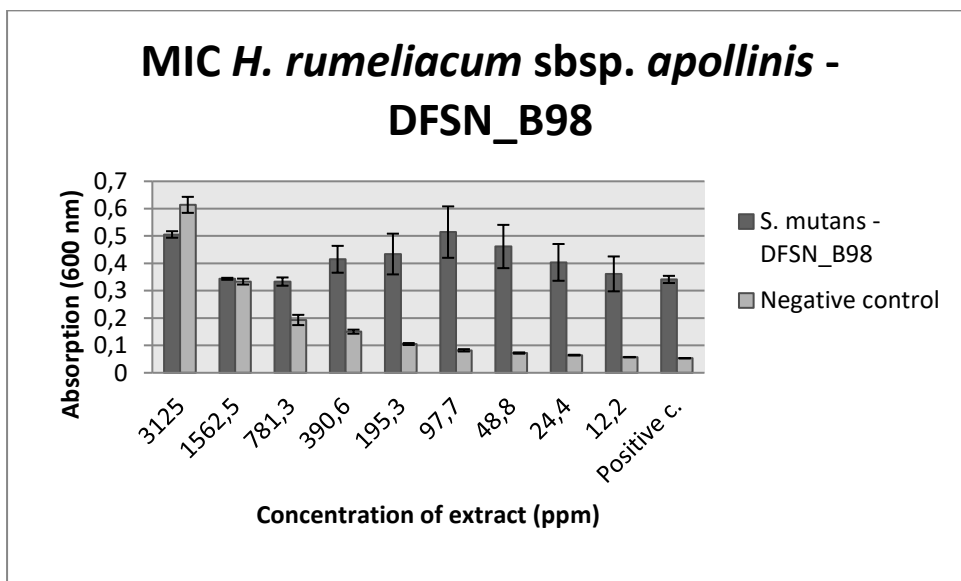
Εικόνα 67: MIC του εκχυλίσματος *H. rumeliacum ssp. apollinis* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. epidermidis*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).



Εικόνα 68: MIC του εκχυλίσματος *H. rumeliacum ssp. apollinis* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. aureus*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

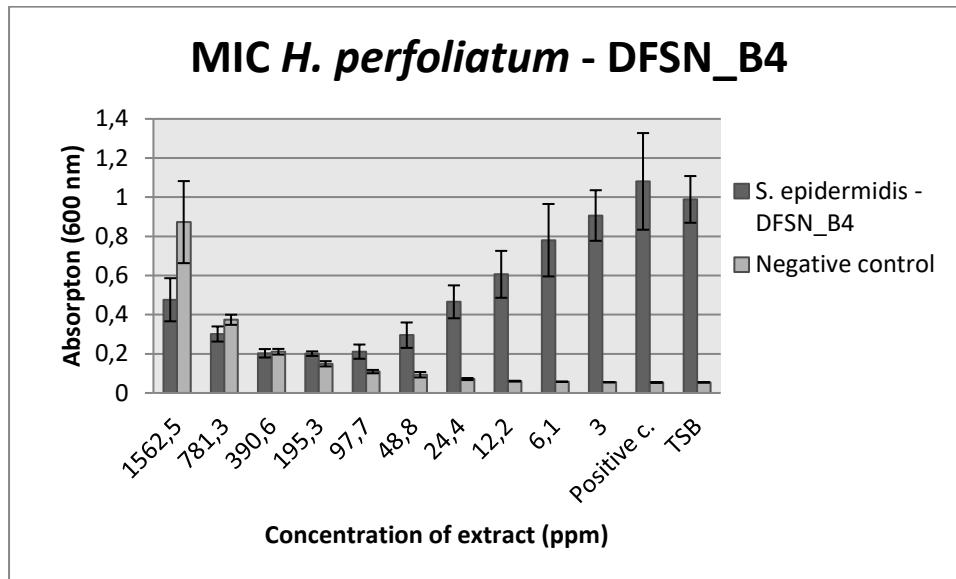


Εικόνα 69: MIC του εκχυλίσματος *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *L. monocytogenes*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

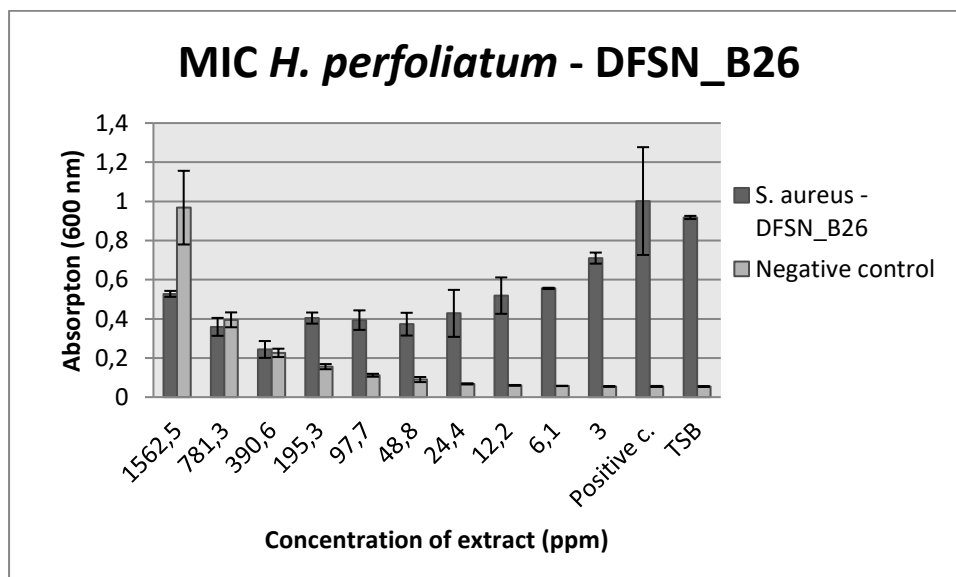


Εικόνα 70: MIC του εκχυλίσματος *H. rumeliacum* ssp. *apollinis* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. mutans*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).

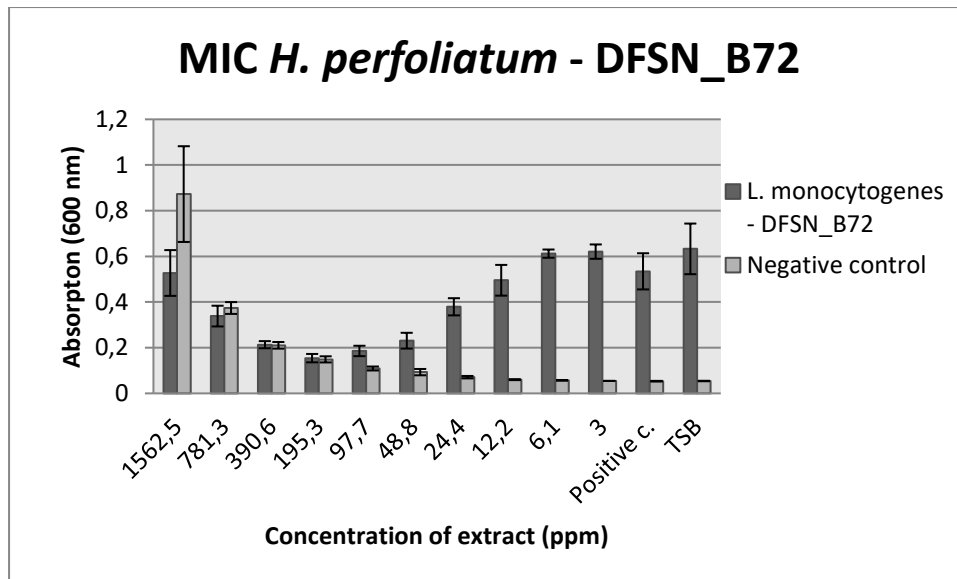
❖ *H. perfoliatum*



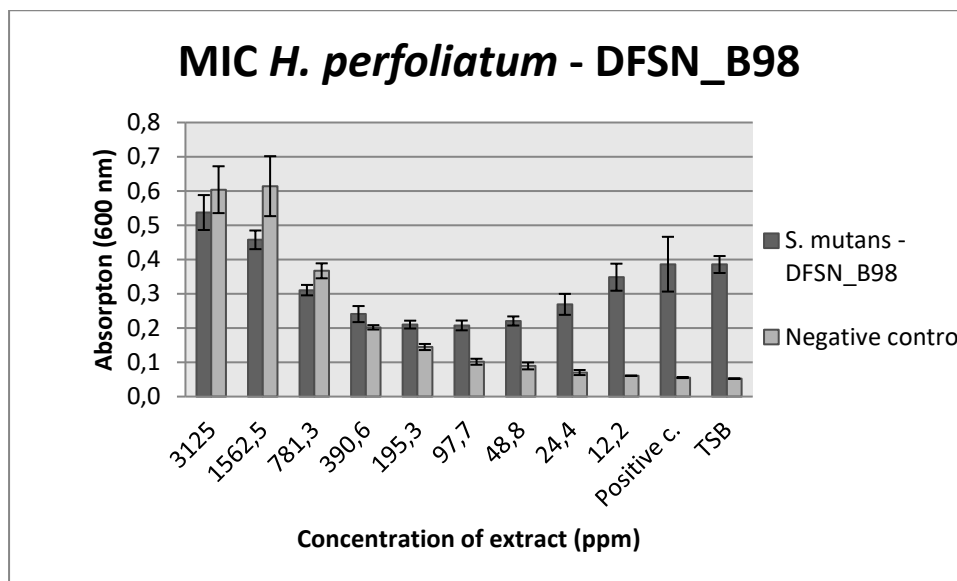
Εικόνα 71: MIC του εκχυλίσματος *H. perfoliatum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. epidermidis*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).



Εικόνα 72: MIC του εκχυλίσματος *H. perfoliatum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. aureus*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).



Εικόνα 73: MIC του εκχυλίσματος *H. perfoliatum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *L. monocytogenes*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).



Εικόνα 74: MIC του εκχυλίσματος *H. perfoliatum* έναντι στο βακτηριακό στέλεχος *S. mutans*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός TSB (3% DMSO).